

Molekulare Untersuchungen zur Phylogenie der Gattung *Fosterella* (Bromeliaceae)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Naturwissenschaften
der Universität Kassel

vorgelegt von:

Martina Rex

aus:

**Wismar
(Mecklenburg/Vorpommern)**

Kassel, im Juni 2007

Betreuer: Prof. Dr. Kurt Weising

Prüfungskommission: Prof. Dr. Kurt Weising (1. Gutachter)
Prof. Dr. Georg Zizka (2. Gutachter)
Dr. Maria Maier-Stolte (Beisitzerin)
Prof. Dr. Hartmut Follmann (Beisitzer)

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Allgemeine Merkmale der Bromeliaceae.....	6
1.2	Systematik der Bromeliaceae	7
1.3	Die Gattung <i>Fosterella</i>	11
1.3.1	Merkmale der Gattung <i>Fosterella</i>	12
1.3.2	Systematische Einordnung	18
1.3.3	Artabgrenzung und Verwandtschaftsbeziehungen	18
1.4	Problemstellungen und Ziele der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Pflanzenmaterial.....	20
2.2	Molekulare Methoden	36
2.2.1	Allgemeine Grundlagen.....	36
2.2.2	DNA-Isolation.....	38
2.2.3	Gelelektrophorese.....	39
2.2.4	AFLP- Analyse	41
2.2.4.1	Allgemeine Grundlagen und Prinzip der Methode.....	41
2.2.4.2	Durchführung der AFLP-Methode	42
2.2.4.3	Restriktion und Ligation	43
2.2.4.4	Amplifikation	43
2.2.4.5	Reproduzierbarkeitstest.....	46
2.2.4.6	Codierung der Bandenmuster und Erstellung von Datenmatrizen.....	46
2.2.5	Vergleichende DNA-Sequenzierung	48
2.2.5.1	Allgemeine Grundlagen	48
2.2.5.2	Chloroplasten-DNA-Analyse	48
2.2.5.3	Mitochondrien-DNA-Analyse.....	55
2.2.5.4	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten.....	57
2.2.5.5	Sequenzierung der PCR-Fragmente.....	58
2.2.5.6	Editierung und Sequenzalignment	59
2.2.5.7	Überprüfung erhaltener Sequenzen mit Hilfe der NCBI Gen-Bank.....	60
2.3	Verfahren zur Datenanalyse	61
2.3.1	Distanzen und Evolutionsmodelle	61
2.3.2	Wahl der Außengruppe für die Analysen.....	62
2.3.3	Distanzanalysen	62
2.3.4	Cophänetische Koeffizientenanalyse	63
2.3.5	Hauptkoordinatenanalyse (PCoA).....	63
2.3.6	Maximum Parsimonie-Analyse (MP)	63
2.3.7	Maximum Likelihood-Analyse (ML)	64
2.3.8	Bayes'sche Analyse (MB).....	65
2.4	Anwendung der Datenanalyseverfahren	66
2.4.1	AFLP-Datenanalyse.....	66
2.4.2	Chloroplasten-DNA-Datenanalyse	68

3	Ergebnisse	70
3.1	DNA-Isolation	70
3.2	Ergebnisse der Vorversuche.....	71
3.2.1	Pilotexperimente zur AFLP-Analyse.....	71
3.2.1.1	Primer- und Probenauswahl	71
3.2.1.2	Reproduzierbarkeit der AFLPs.....	75
3.2.2	Pilotexperimente zur DNA-Sequenzierung	77
3.2.2.1	Chloroplasten-DNA-Regionen	77
3.2.2.2	Mitochondrien-DNA-Regionen	81
3.2.3	AFLP-Phylogenie der Gattung <i>Fosterella</i>	83
3.2.3.1	Distanzanalysen	85
3.2.3.2	Cophänetische Koeffizientenanalyse	92
3.2.3.3	Hauptkoordinatenanalyse	92
3.2.3.4	Maximum Parsimonie-Analyse	93
3.2.4	Sequenzanalyse der Chloroplasten-DNA.....	95
3.2.4.1	Einzeldatensätze	95
3.2.4.2	Kombination der Einzeldatensätze.....	102
4	Diskussion.....	114
4.1	Methodische Aspekte	114
4.1.1	DNA-Isolation.....	114
4.1.2	AFLP-Fingerprinting.....	115
4.1.3	Vergleichende Sequenzierung	118
4.1.4	Datenauswertung.....	120
4.1.4.1	Vor- und Nachteile verschiedener Datenanalyseverfahren	120
4.1.4.2	AFLP-Daten.....	124
4.1.4.3	DNA-Sequenzdaten.....	126
4.1.4.4	Differenzen zwischen AFLPs und Sequenzdaten	127
4.2	Molekulare Systematik (Phylogenie) der Gattung <i>Fosterella</i>	128
4.2.1	Auswahl der Taxa	128
4.2.2	Stellung der Gattung <i>Fosterella</i> in der Familie der Bromeliaceae.....	129
4.2.3	Artengruppen innerhalb der Gattung <i>Fosterella</i>	130
4.2.4	Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung, ihre Evolution und Biogeographie.....	141
5	Zusammenfassung	145
6	Ausblick.....	148
7	Literaturverzeichnis.....	149
8	Abbildungsverzeichnis.....	164
9	Tabellenverzeichnis.....	166
10	Abkürzungsverzeichnis.....	167
11	Anhang	169

1 Einleitung

Die Familie der Bromeliaceae wurde 1789 vom französischen Botaniker Antoine Laurent de Jussieu (1748-1826) erstmals beschrieben. Er benannte sie nach dem schwedischen Arzt und Botaniker Celia Olaf Bromell (1639-1705) (z. B. Simpson 2006). Bei den Bromeliaceae handelt es sich um eine fast ausschließlich neuweltliche Pflanzenfamilie, die von den Südstaaten der USA bis nach Südchile in allen mittel- und südamerikanischen Ländern verbreitet ist. Die einzige Ausnahme ist *Pitcairnia feliciana*, die im Westen Afrikas beheimatet ist (Porembski und Barthlott 1999).



Abb. 1: Geographische Verbreitung der Bromeliaceae.

Pitcairnia feliciana kommt als einzige Art in Guinea (Afrika) vor.

Quelle: <http://www.mobot.org/mobot/research/APweb/orders/poalesweb.htm#Bromeliaceae>.

Durch ihre Fähigkeit zur Anpassung an extreme Standortbedingungen sind die Pflanzen dieser Familie sowohl in trockenen Halbwüsten und Wüsten als auch in feuchten Nebel- und Regenwaldregionen zu finden (Benzing 2000). Ihr Anpassungsvermögen macht überdies eine Verbreitung vom Tiefland bis in extreme Höhenlagen (> 4000 m) möglich. Die Entwicklung verschiedener Strategien v. a. mit Trockenstress zurecht zu kommen, erlaubt den Bromeliaceae eine vielseitige ökologische Flexibilität (Schulte *et al.* 2005), was wiederum eine hohe Diversität an Lebensformen mit sich bringt. Bromelien wachsen sowohl terrestrisch, als auch auf Felsen (epilithisch) oder auf anderen Pflanzen (epiphytisch). Benzing (2000) beschreibt diese Familie als herausragendes Beispiel für die adaptive Radiation bei Pflanzen.

1.1 Allgemeine Merkmale der Bromeliaceae

Bromelien sind meist ausdauernde Rosettenpflanzen. Die Sprossachsen sind stark gestaucht, so dass sich alle Blätter fast auf der gleichen Höhe befinden. Einige Arten bilden einen Stamm aus, der sich entweder aufrecht, hängend oder kriechend entwickeln kann. Die meisten Vertreter der Bromeliaceae sind krautig mit Wuchshöhen unter einem Meter, maximal werden Größen von bis zu 12 m erreicht (*Puya raimondii*).

Die Wurzeln der Pflanzen sind fast immer Adventivwurzeln, die allerdings bei epiphytischen Vertretern häufig reduziert sind und nur noch als Haftorgane dienen. Im Zuge dieser Reduktion ist auch ihre Funktion als Organ zur Wasser- und Nährstoffaufnahme stark eingeschränkt. Diese Aufgaben werden bei vielen Bromelien von den Blättern übernommen, die mit speziellen Saugschuppen (Trichomen) ausgestattet sind. Die Trichome können Spaltöffnungen überlagern, was zum Verdunstungsschutz beiträgt. Bei manchen Arten dienen sie zu einem kleinen Anteil der Lichtreflexion oder besitzen sogar eine wasserabweisende Funktion, die in sehr feuchten Gebieten zur Gewährleistung des Gasaustausches beitragen soll (Pierce *et al.* 2001).

Die wechselständig stehenden Blätter haben meist eine linealische oder dreieckige Form und können an den Rändern bestachelt sein. Bisweilen können sie eine beträchtliche Sukkulenz aufweisen. Bei vielen Arten bilden die in der Rosette eng aufeinander liegenden Blattscheiden Zisternen, in denen sich Regenwasser sammelt. In langen Trockenperioden ist es der Pflanze so möglich, aus diesem Vorrat ihren Wasser- und Nährstoffbedarf zu decken. Die Trichterbildung ist sowohl bei epiphytischen als auch bei terrestrischen Vertretern der Familie zu finden.

Die verschiedenen Formen der Anpassung an Wassermangel führen zu einem dominanten Vorkommen vor allem terrestrischer Vertreter in Trockengebieten. Insbesondere die Saugschuppen und die Blatttrichter sind als Schlüsselinnovationen zu werten, die kaum eine andere Pflanze aufweist und die große Konkurrenzvorteile beim epiphytischen Wachstum mit sich bringen.

Die dreigliedrigen Blüten der Bromeliaceae sind vorwiegend zwittrig und mehr oder weniger radiärsymmetrisch gebaut. Einzelblüten sind oft relativ klein und stehen in einfachen oder zusammengesetzten Ähren, Trauben oder Köpfchen. Die Blüten und Hochblätter der Infloreszenzen sind häufig leuchtend gefärbt und dienen der Anlockung von Bestäubern. In großen Höhen und feuchten Regionen ist Ornithophilie die dominierende Bestäubungsform, wohingegen entomophile Bestäubung und Autogamie eher in ariden Regionen zu finden sind. Chiropterophilie kommt seltener und vorwiegend in feuchten Tieflandregionen vor (Kessler und Krömer 2000).

Bromeliaceae können unterschiedliche Fruchttypen ausbilden, die zusammen mit anderen Merkmalen zur Aufteilung in Unterfamilien herangezogen wurden (s. u.). Aus den unterständigen Fruchtknoten der Bromelioideae entstehen Beeren, während sich aus den oberständigen Fruchtknoten der anderen Unterfamilien Kapseln entwickeln. Die bekannteste

Frucht der Bromeliaceae ist zweifelsohne der vollständig fleischig werdende Fruchtstand (= Fruchtverband) der Ananas (*Ananas comosus*).

Die vegetative Vermehrung der Pflanzen erfolgt über Seitensprosse, die auch als Kindel bezeichnet werden. Einige terrestrische Arten bilden auch unterirdische Ausläufer aus, die zu einer flächendeckenden Ausbreitung führen können.

Ein weiteres erwähnenswertes Merkmal der Bromeliaceae ist die Ausbildung des „crassulacean acid metabolism“ (CAM)-Photosyntheseweges bei verschiedenen Arten. Der Anteil von CAM-Pflanzen ist bei den Bromeliaceae wesentlich höher als in anderen Pflanzenfamilien (Martin 1994) und dient ebenso wie viele der o. g. morphologisch-anatomischen Anpassungen der Wasserökonomie (Benzing 2000).

1.2 Systematik der Bromeliaceae

Die Bromeliaceae umfassen etwa 2900 Arten, die in 56 Gattungen zusammengefasst werden (Luther 2002). Traditionell werden drei Unterfamilien unterschieden, zu deren Charakterisierung Blüten- und Fruchtmerkmale herangezogen werden: die Bromelioideae, die Tillandsioideae und die Pitcairnioideae (Smith und Downs 1974). In neuerer Zeit wurden zahlreiche morphologische, anatomische, cytologische und palynologische Untersuchungen durchgeführt, die weitere Erkenntnisse über die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen und innerhalb der Unterfamilien sowie über die Abgrenzungen von Gattungen und Arten erbracht haben (z. B. Brown und Gilmartin 1984; Gilmartin und Brown 1987; Varadarajan und Gilmartin 1988a,b,c; Halbritter 1992; Horres und Zizka 1995). Ein klareres Bild über die Systematik der Bromeliaceae ergab sich jedoch erst durch die Einbeziehung molekularsystematischer Erkenntnisse, die vor allem durch die vergleichende Sequenzierung verschiedener Chloroplasten-DNA-Abschnitte gewonnen wurden (s. u.).

Großsystematisch lassen sich die Bromeliaceae nach neuesten Erkenntnissen in die Ordnung Poales eingliedern (APGII 2003), die mit 18 Familien eine der größten Ordnungen der Monokotylen ist und von grasähnlichen Pflanzen dominiert wird (Chase 2004). An der Monophylie der Bromeliaceae bestand zu keinem Zeitpunkt ein Zweifel. Sie wird auch durch die molekularen Arbeiten der letzten Jahre gestützt (z. B. Terry und Brown 1996; Givnish *et al.* 1999, 2005; Chase *et al.* 2000, 2004; APGII 2003; Duval *et al.* 2003). Noch unvollständig geklärt ist hingegen, welches die nächstverwandten Familien sind. Insbesondere die Schwestergruppenbeziehung der Bromeliaceae wird noch kontrovers diskutiert:

- Dahlgren *et al.* (1985) postulierten, basierend auf morphologischen und anatomischen Merkmalen, eine nähere Verwandtschaft zwischen Bromeliaceae und Typhaceae.
- Lange Zeit galten die Velloziaceae als mögliche Schwestergruppe der Bromeliaceae (Gilmartin und Brown 1987).

- Im Gegensatz dazu zeigten erste DNA-Sequenzdaten des chloroplastidären *rbcL*-Gens eine (allerdings nur schwach gestützte) enge Beziehung der Bromeliaceae zu den Mayacaceae und den Rapateaceae (Givnish *et al.* 1999).
- Michelangeli *et al.* (2003) untersuchten die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der Poaceae und angrenzender Familien mit Hilfe einer Multigenanalyse des Kern-, Chloroplasten- und Mitochondriengenoms. Danach stehen die Bromeliaceae als Schwestergruppe einem Clade aus Vertretern der Rapateaceae, Eriocaulaceae, Mayacaceae und Xyridaceae gegenüber.
- Basierend auf Sequenzen der Chloroplastengene *atpB* und *rbcL* zeigten Davis *et al.* (2004), dass die Rapateaceae die basalsten Vertreter der Poales sind. Als nächsten Abzweig fanden sie einen Clade aus Typhaceae und Bromeliaceae, die basal zu allen übrigen Familien der Poales stehen.
- Givnish *et al.* (2005; im Druck) schließlich fanden in einer Untersuchung der Monokotyledonen auf der Basis chloroplastidärer *ndhF*-Sequenzen eine Schwesterguppenbeziehung der Bromeliaceae zu den Typhaceae. Beide stehen an der Basis der Poales. Die nächsten verwandten Familien sind demnach die Rapateaceae und die Sparganiaceae.

Die aufgeführten Beispiele verdeutlichen, dass bezüglich der systematischen Einordnung der Bromeliaceae weiterer Bedarf an ausführlicheren Analysen besteht.

Molekularsystematische Untersuchungen haben auch für die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Bromeliaceae wichtige neue Erkenntnisse gebracht, insbesondere bezüglich der Einteilung in Unterfamilien. Die Beziehung der drei traditionell beschriebenen Unterfamilien zueinander wurde schon vor der Einbeziehung molekularer Daten kontrovers diskutiert. Gilmartin und Brown (1987) z. B. fanden in ihrer cladistisch-morphologischen Analyse eine Schwestergruppenbeziehung zwischen Tillandsioideae und Bromelioideae. Die Pitcairnioideae vermuteten sie als ursprünglichste der Unterfamilien. Die ersten molekular durchgeführten Untersuchungen brachten allerdings hierzu widersprüchliche Ergebnisse hervor:

- Ranker *et al.* (1990) konnten mit Hilfe von Restriktionsanalysen des Chloroplastengenoms ein Schwestergruppenverhältnis zwischen Bromelioideae und Pitcairnioideae zeigen.
- Eine Studie von der Gruppe um Terry (1996) ließ mit Hilfe der vergleichenden Sequenzierung des chloroplastidären *ndhF*-Gens, eine Schwestergruppenbeziehung zwischen den Bromelioideae und den Pitcairnioideae erkennen. Darüber hinaus vermuteten die Autoren eine basale Stellung der Tillandsioideae und stellten auf Basis ihrer Ergebnisse eine Schwestergruppenbeziehung zwischen den Bromelioideae und der Gattung *Puya* heraus.

Alle bis dahin durchgeführten morphologischen und molekularen Analysen bestätigten, dass die traditionell definierten Unterfamilien Tillandsioideae und Bromelioideae monophyletisch

sind. Die Pitcairnioideae erwiesen sich hingegen eindeutig als paraphyletisch (z. B. Smith und Downs 1974; Gilmartin und Brown 1987; Ranker *et al.* 1990; Terry und Brown 1996; Terry *et al.* 1997; Crayn und Quinn 2000b; Givnish *et al.* 2004; Barfuss *et al.* 2005a). Diese Unterfamilie zeigte in allen molekularen Studien eine Aufspaltung in verschiedene unabhängige Linien (Terry *et al.* 1997; Horres *et al.* 2000; Givnish *et al.* 2004).

Schon Varadarajan und Gilmartin (1988a,b,c) erkannten morphologische Differenzen innerhalb dieser Unterfamilie und teilten die Pitcairnioideae morphologisch-cladistisch in die drei Triben Brocchinieae, Puyeeae und Pitcairnieae ein. Smith und Till (1998) ließen in ihrer Revision der Familie alle bis dato durchgeführten molekularen Untersuchungen außer Acht und übernahmen diese Einteilung.

Die widersprüchlichen Befunde der o. g. Studien lassen sich darauf zurückführen, dass es die Pitcairnioideae im traditionellen Umfang gar nicht gibt. Nach den neuesten molekularsystematischen Erkenntnissen repräsentieren die Pitcairnioideae sechs unabhängige Linien (Givnish *et al.* 2004, vgl. Abb. 2), die jeweils einen Unterfamilienstatus bekommen sollten (Givnish *et al.* im Druck):

- Puyoideae (*Puya*)
- Brewcarioideae (*Brewcaria*, *Navia*, *Sequencia* (vorher *Brocchinia serrata*) und *Cottendorfia*)
- Hechtioideae (*Hechtia*)
- Lindmanioideae (*Lindmania*)
- Brocchinioideae (*Brocchinia* und *Ayensua*)
- Pitcairnioideae s. str. (*Abromeitiella*, *Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Encholirium*, *Fosterella* und *Pitcairnia*).

Die Beziehungen der nun insgesamt acht Unterfamilien der Bromeliaceae zueinander sind noch nicht im Detail bekannt, trotzdem können schon einige relativ gesicherte Erkenntnisse aufgezeigt werden. Die Brocchinioideae z. B. stehen in allen molekularen Untersuchungen an der Basis der Familie (z. B. Terry *et al.* 1997; Horres *et al.* 2000; Crayn *et al.* 2004) und die Puyoideae zeigen in verschiedenen Studien eine Schwestergruppenbeziehung zu den Bromelioideae auf (z. B. Horres *et al.* 2000; Crayn *et al.* 2000a, 2004; Givnish *et al.* 2004, im Druck).

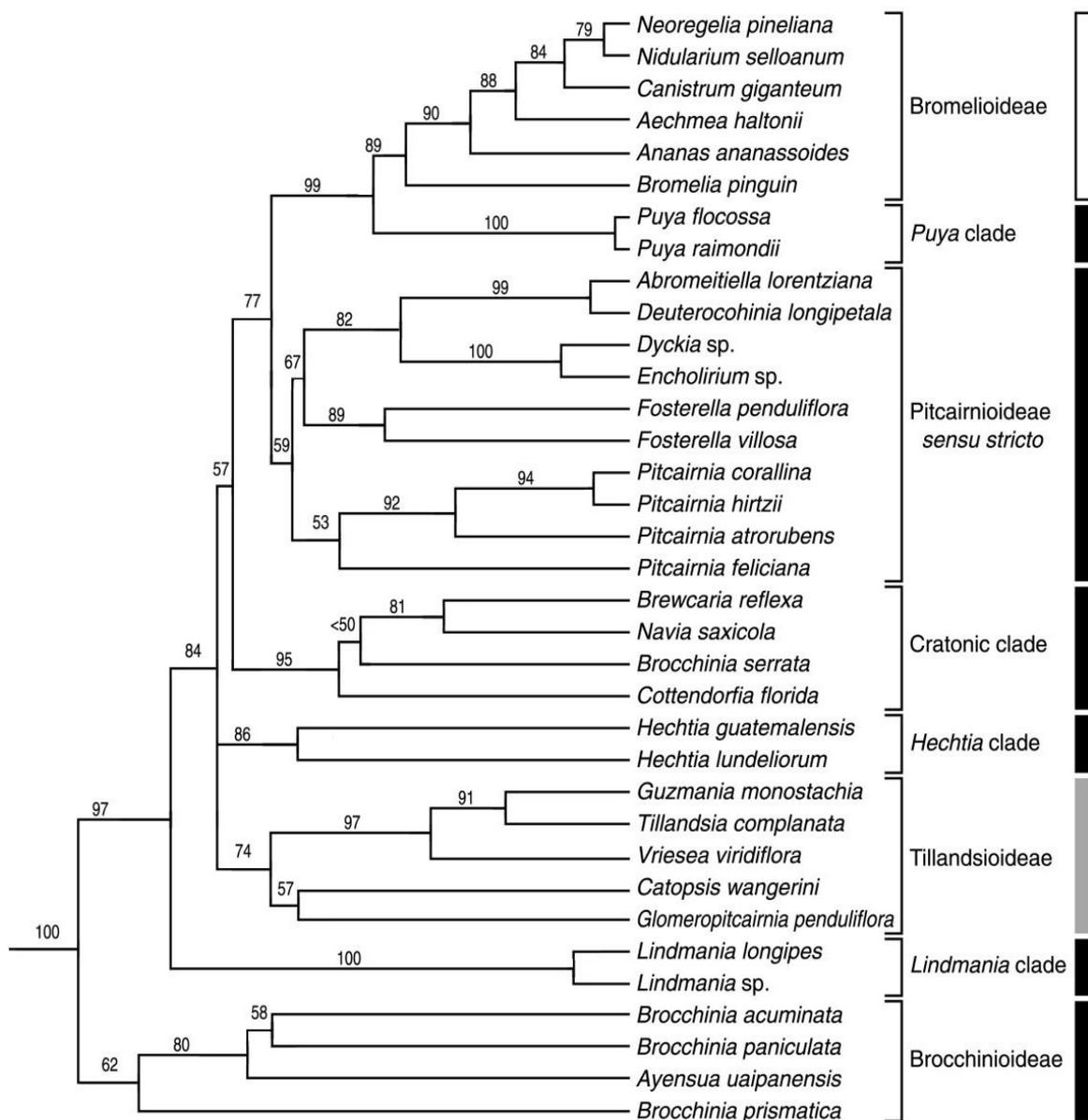


Abb. 2: Molekulare Phylogenie der Bromeliaceae nach Givnish *et al.* 2004.

Der Baum basiert auf *ndhF*-Sequenzdaten und wurde leicht modifiziert dargestellt. Die Klammern fassen die von Givnish *et al.* neu definierten Unterfamilien zusammen. Die Balken am rechten Rand kennzeichnen die Zugehörigkeit zu den Unterfamilien im traditionellen Sinne: schwarz = Pitcairnioideae, grau = Tillandsioideae, weiß = Bromelioideae.

Auf Gattungs- und Artebene gibt es innerhalb der Bromeliaceae noch sehr wenige molekulare Studien. Untersuchungen auf niedrigem taxonomischen Niveau sind jedoch sehr wichtig, denn sie können nicht nur einen Einblick in die Entwicklung einzelner Artengruppen geben, sondern erlauben möglicherweise auch Rückschlüsse auf die Evolution der gesamten Familie.

Beispielhaft ist in diesem Zusammenhang die Studie von Givnish *et al.* (1997) zu nennen, in dessen Rahmen Restriktionsanalysen von Chloroplasten-DNA und nukleärer rDNA zur Verwandtschaftsanalyse der Gattung *Brocchinia* eingesetzt wurden. Dabei wurden 15 der 20

bekanntesten Arten dieser Gattung untersucht. *Brocchinia* gilt als Modellgattung für die adaptive Radiation bezüglich der Überlebensstrategien auf den extrem unfruchtbaren Böden auf den Gipfeln der Tafelberge (Tepuis) des Guayana-Schilds im Osten Venezuelas.

Weitere Untersuchungen auf Gattungsebene existieren z. B. für *Tillandsia* von Barfuss *et al.* (2004) und für *Aechmea* von Schulte 2003 (in Horres *et al.* im Druck).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Systematik und Phylogenie einer weiteren Gattung dieser Familie – der Gattung ***Fosterella***. Wie kaum eine andere Verwandtschaftsgruppe haben es die Vertreter von *Fosterella* geschafft, auch ohne die für viele Bromeliaceae typischen, o. g. Schlüsselinnovationen wie Saugschuppen, Zisternenbildung und CAM-Photosyntheseweg auszukommen und trotzdem teilweise extreme Habitate zu besiedeln. *Fosterella*-Arten sind sowohl an trockenen Standorten als auch in Nebel- und Regenwaldregionen Südamerikas zu finden. Die adaptive Radiation dieser Gattung, das teilweise nur lokalendemische Vorkommen ihrer Arten sowie die geringen Kenntnisse hinsichtlich ihrer Systematik, Ökologie, Biogeographie und Evolution ihrer Arten machen *Fosterella* zu einem besonders interessanten Untersuchungsobjekt.

1.3 Die Gattung *Fosterella*

Die Gattung *Fosterella* wurde 1960 von L. B. Smith aufgestellt und nach dem Botaniker und Bromelienliebhaber Mulford B. Foster benannt. Seit der letzten umfassenden Monographie der Bromeliaceae von Smith und Downs (1974), in der 13 *Fosterella*-Arten aufgeführt wurden, sind zahlreiche Neubeschreibungen hinzugekommen (z. B. Smith und Read 1992; Ibisch *et al.* 1997; 1999; Kessler *et al.* 1999; Ibisch *et al.* 2002) (vgl. Abb. 3). Gegenwärtig sind 30 verschiedene Arten und eine Varietät beschrieben (vgl. Tab. 1).

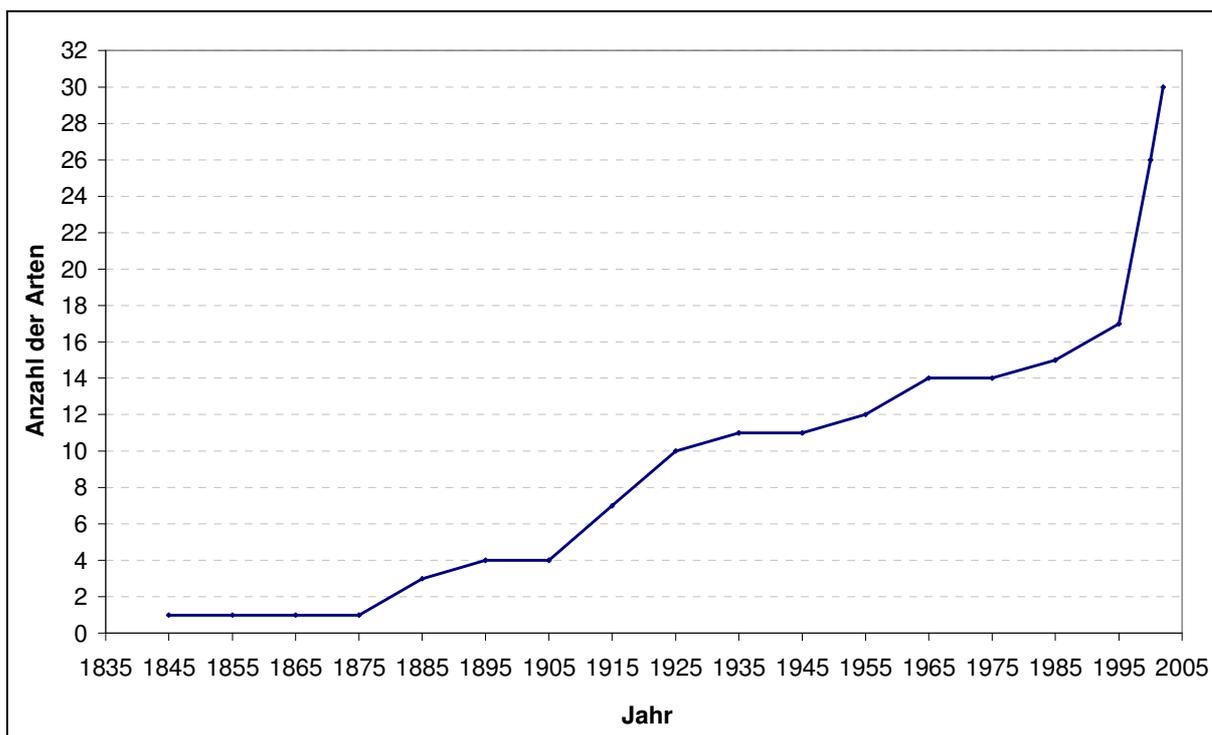


Abb. 3: Historische Entwicklung der Anzahl beschriebener *Fosterella*-Arten.

Die Grafik wurde anhand der Veröffentlichungsdaten von P. L. Ibsch und G. Rauer (Ibsch *et al.* 1997) erstellt und von K. Schulte modifiziert. Berücksichtigt sind alle Erst-Veröffentlichungen von 1843 bis 2002, Umkombinationen wurden nicht mit einbezogen. Alle vor 1960 beschriebenen Arten wurden zunächst unter anderen Gattungsnamen geführt.

1.3.1 Merkmale der Gattung *Fosterella*

Morphologisch stellt *Fosterella* innerhalb der Bromeliaceae einen relativ merkmalsarmen Verwandtschaftskreis dar. Die überwiegend mesophytischen Pflanzen bilden kleine bis mittelgroße, krautige und meist stammlose Rosetten ohne Zisternenhabitus aus und können sowohl terrestrisch als auch epilithisch wachsen. Die vegetative Vermehrung erfolgt über Erneuerungsknospen (Kindel). Das Wurzelsystem ist gut ausgebildet und dient der Aufnahme von Wasser und Nährstoffen. Blühend erreichen die Pflanzen eine Größe von bis zu 200 cm. Die Blätter können 1 bis 7 cm breit sein und eine Länge bis zu 100 cm erreichen. Die Blattspreiten sind meist linealisch bis lanzettlich, einige sind mehr oder weniger verschmälert an der Basis. Einige Arten sind an der Blattbasis gezähnt. Manche Arten bilden ein deutliches Wasserspeichergewebe aus. Die Blätter sind v. a. an der Unterseite unterschiedlich dicht mit Trichomen besetzt. Die Infloreszenzen sind meist mehrfach verzweigt (selten einfach) und zum Teil behaart. Die Blüten sind nickend oder aufrecht, einseitwendig oder spreizend, meistens etwa 1 cm groß. Die drei Sepalen sind meist grün, frei und kürzer als die Petalen. Die drei Petalen sind meist weiß und ebenfalls frei. Sie besitzen keine Anhängsel. Die sechs Staubblätter sind zum Teil gebogen; die Filamente sind frei. Die Staubbeutel sind zunächst gerade, rollen sich aber während der Anthese etwas ein. Die Bestäubung erfolgt wahrscheinlich durch Fliegen oder Schmetterlinge. Beobachtungen haben aber auch gezeigt, dass die Bestäubung einiger Arten durch kleine Bienen erfolgen

kann (pers. Mitteilung Prof. Dr. P. L. Ibsch). Als Früchte bildet *Fosterella* kugelige Kapseln aus, die 3-5 mm große, schmale, zweiflügelige, vermutlich anemochore Samen entlassen. Varadarajan und Gilmartin (1988c) sind allerdings der Auffassung, dass diese Samen nicht gut fliegen können und somit für eine weiträumige Ausbreitung ungeeignet sind (vgl. Abb. 4).

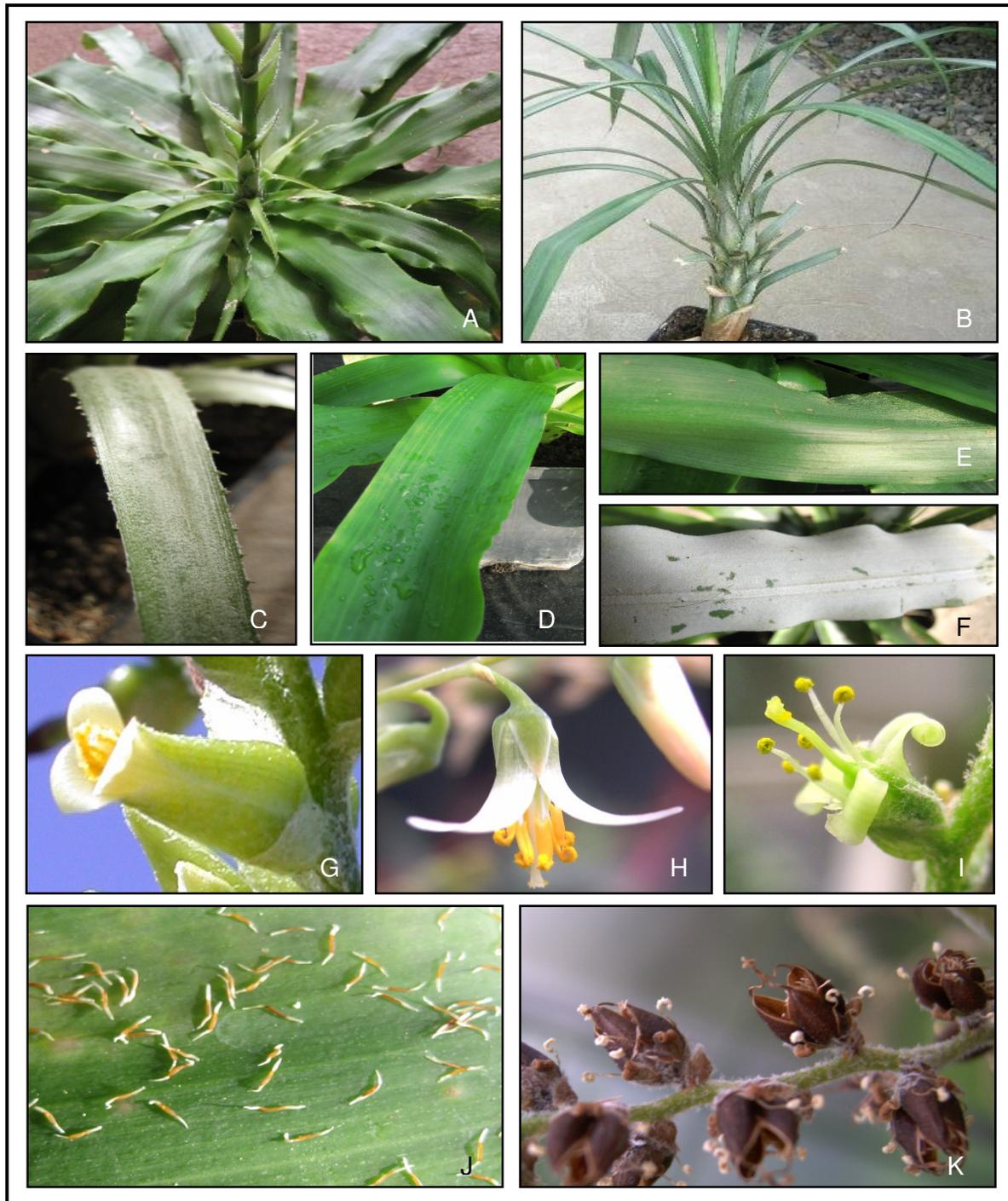


Abb. 4: Merkmale der Gattung *Fosterella*.

A = *Fosterella yuvinkae*, flache Rosette, B = *F. caulescens*, Stämmchen, C = *F. caulescens*, gezähnte Blattbasis, D = *F. micrantha*, ganzrandige Blattbasis, E = *F. micrantha*, spärlich beschuppte Blattunterseite, F = *F. elata*, dicht beschuppte Blattunterseite, G = Blüte: *F. floridensis*, gerade, nur an der Spitze zurückgebogene Petalen, H = Blüte: *F. penduliflora*, zurückgebogene Petalen, I = Blüte: *F. albicans*, uhrfederartig zurückgerollte Petalen, J = zweiflügelige *Fosterella*-Samen, K = typische Kapsel Früchte von *Fosterella*.

Tab. 1 : Morphologische Merkmale zur Unterscheidung der Arten der Gattung *Fosterella*.

Art	Lebensform	Stamm	Blattrand	Schuppen blattunterseits	Rosette	Petalenfarbe	Petalen
<i>F. albicans</i>	epilithisch	-	gezähnt an der Basis	viele	aufrecht	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. aletroides</i>	terrestrisch	-	ganzrandig	keine	flach	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. caulescens</i>	terrestrisch	+	gezähnt an der Basis	viele	aufrecht	blassgrün	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. chaparensis</i>	terrestrisch	-	ganzrandig	keine	aufrecht	weiß	leicht zurückgebogen
<i>F. chiquitana</i>	terrestrisch	-	ganzrandig	viele	flach	weiß	leicht zurückgebogen
<i>F. cotacajensis</i>	terrestrisch/ epilithisch	+	gezähnt an der Basis	viele	aufrecht	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. elata</i>	terrestrisch	-	gezähnt an der Basis	viele	flach	creme mit roten Punkten	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. floridensis</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	viele	aufrecht	weiß	gerade
<i>F. fuentesii</i>	terrestrisch	-	gezähnt an der Basis	viele	aufrecht	grünlich/gelb	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. gracilis</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	viele	flach	gelb	leicht zurückgebogen
<i>F. graminea</i>	terrestrisch	-	gezähnt an der Basis	viele	aufrecht	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, gerade nach Anthese
<i>F. hatschbachii</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	keine	aufrecht	weiß	leicht zurückgebogen
<i>F. heterophylla</i>	terrestrisch	+	ganzrandig	wenige	aufrecht	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, gerade nach Anthese

Art	Lebensform	Stamm	Blattrand	Schuppen blattunterseits	Rosette	Petalenfarbe	Petalen
<i>F. latifolia</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	wenige	flach	weiß	leicht zurückgebogen
<i>F. micrantha</i>	terrestrisch	-	ganzrandig	wenige	flach	weiß	leicht zurückgebogen
<i>F. nowickii</i>	terrestrisch	+	gezähnt an der Basis	viele	aufrecht	grünlich	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. pearcei</i>	terrestrisch	-	ganzrandig	keine	aufrecht	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. penduliflora</i>	terrestrisch	-	ganzrandig	wenige	flach	weiß	leicht zurückgebogen
<i>F. petiolata</i>	terrestrisch	-	ganzrandig	viele	aufrecht	grünlich	leicht zurückgebogen
<i>F. rexiae</i>	terrestrisch	+	gezähnt an der Basis	viele	aufrecht	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. rojasii</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	wenige	flach	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. rusbyi</i>	terrestrisch	+	gezähnt an der Basis	viele	flach	grünlich	gerade
<i>F. schidosperma</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	keine	aufrecht	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, gerade nach Anthese
<i>F. schidosperma</i> var. <i>vestida</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	keine	aufrecht	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, gerade nach Anthese
<i>F. spectabilis</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	viele	flach	rötlich oder coral-orange	gerade
<i>F. vasquezii</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	gezähnt an der Basis	viele	flach	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, auch nach Anthese
<i>F. villosula</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	wenige	flach	weiß	leicht zurückgebogen

Tab. 1 : Fortsetzung

Tab. 1 : Fortsetzung

Art	Lebensform	Stamm	Blattrand	Schuppen blattunterseits	Rosette	Petalenfarbe	Petalen
<i>F. weberbaueri</i>	terrestrisch	+/-	ganzrandig	keine	flach	weiß	uhrfederartig zurückgerollt, gerade nach Anthese
<i>F. weddelliana</i>	terrestrisch	+	gezähnt an der Basis	viele	aufrecht	weiß	uhrfederartig zurückgerollt auch nach Anthese
<i>F. windischii</i>	terrestrisch	-	ganzrandig	viele	flach	weiß/creme	uhrfederartig zurückgerollt auch nach der Anthese
<i>F. yuvinkae</i>	terrestrisch/ epilithisch	-	ganzrandig	wenige	flach	weiß	leicht zurückgebogen

Die Gattung *Fosterella* weist ein disjunktes Verbreitungsmuster auf. Während die meisten Arten im zentralen Südamerika verbreitet sind, kommt *Fosterella micrantha* isoliert in Mittelamerika vor (südliches Mexiko, Guatemala, El Salvador). Das Diversitätszentrum der Gattung befindet sich in Bolivien. Einzelne Arten wurden auch in Peru (*F. aletroides*), Paraguay (*F. rojasii*) oder in Brasilien (z. B. *F. hatschbachii*, *F. windischii*) gefunden (vgl. Abb. 5).



Abb. 5: Gesamtverbreitungsgebiet der Gattung *Fosterella* in Südamerika.

Fosterella micrantha ist als einzige Art in Mittelamerika beheimatet. Karte von P. L. Ibisch 2002.

1.3.2 Systematische Einordnung

Die Gattung *Fosterella* ist eine monophyletische Gattung, die nach Frucht- und Samenmerkmalen traditionell den Pitcairnioideae zugeordnet wurde (Smith und Downs 1974; Smith und Till 1998). Auch die Mehrzahl der molekularsystematischen Befunde sprechen für eine Zugehörigkeit zu den Pitcairnioideae im klassischen Sinne (z. B. Horres *et al.* 2000; Crayn *et al.* 2004; Givnish *et al.* 2004). Nach der Aufteilung der Pitcairnioideae in die sechs o. g. Linien verbleibt die Gattung *Fosterella* bei den Pitcairnioideae s. str. (Givnish *et al.* im Druck).

Nach Sequenzanalysen des *matK*-Gens durch Crayn *et al.* (2000a), steht *Fosterella* innerhalb der Pitcairnioideae in einer unaufgelösten Polytomie (siehe auch Reinert *et al.* 2003). Auch weiterführende Untersuchungen dieser Gruppe mit *matK* und *rps16*-Intron konnten diese Polytomie nicht auflösen (Crayn *et al.* 2004). Die *ndhF*-Analysen von Givnish *et al.* (2004; im Druck) zeigen hingegen eine Verwandtschaft von *Fosterella* zu einer Gruppe aus den Gattungen *Dyckia*, *Deuterochonia* und *Encholirium*. Diese Beziehung ist aber statistisch nur schwach gestützt. Außerdem bestehen auch andere Vorstellungen über die nächsten Verwandten zu *Fosterella*. Horres *et al.* (im Druck) postulieren in ihrer systematischen Untersuchung der Bromelioideae sogar eine Schwestergruppenbeziehung zwischen *Puya*, *Fosterella* und den Bromelioideae.

Eine endgültige Klärung der Schwestergruppenbeziehung von *Fosterella* bedarf also weiterer molekularer Analysen.

1.3.3 Artabgrenzung und Verwandtschaftsbeziehungen

Die Unterscheidung der einzelnen *Fosterella*-Arten voneinander gestaltet sich schwierig, da die Gattung morphologisch und anatomisch sehr merkmalsarm ist. Selbst Experten können die Arten nur in blühendem Zustand unterscheiden. Die Tab. 1 stellt eine Reihe von taxonomisch potentiell relevanten morphologischen Merkmalen der bisher beschriebenen *Fosterella*-Arten zusammen. Die Abgrenzung der Arten auf morphologischer Ebene wird durch Übergangsformen zusätzlich erschwert. Die Problematik wird in der Diskussion näher beleuchtet.

Die Merkmalsarmut erschwert nicht nur die Artabgrenzung und die Erstellung eines Bestimmungsschlüssels, sie stellt auch ein großes Hindernis für die Aufklärung der Phylogenie innerhalb der Gattung dar. Zu bedenken ist weiterhin, dass Übereinstimmungen und Unterschiede in phänotypischen Merkmalen nicht notwendigerweise Rückschlüsse auf Verwandtschaftsbeziehungen erlauben. Sie können auch auf Konvergenzen infolge von Adaptationen an ähnliche Umweltbedingungen beruhen.

Aus den genannten Gründen reichen morphologische Daten allein für die Erstellung einer befriedigenden Phylogenie innerhalb der Gattung *Fosterella* nicht aus. Hier könnten molekulare Daten helfen. Erste Vorarbeiten an einigen wenigen Vertretern der Gattung wurden bereits im Rahmen einer vorausgegangenen Diplomarbeit durchgeführt (Rex 2001 z. T.

publiziert in Ibisch *et al.* 2002). Die vorliegende Arbeit stellt nun eine umfassende molekularsystematische Analyse der Gattung *Fosterella* vor.

1.4 Problemstellungen und Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der molekularen Verwandtschaftsverhältnisse der Gattung *Fosterella* auf der Basis molekularer Daten und eines umfassenden „Samplings“ aller verfügbaren Taxa.

Die molekularen Daten sollten einerseits durch Fingerprint-Verfahren (amplified fragment length polymorphisms; AFLPs; (Vos *et al.* 1995)) und andererseits durch vergleichende Sequenzierung ausgewählter Chloroplasten-DNA-Bereiche erhoben werden.

Beide Methoden sollten für die Gattung *Fosterella* zunächst etabliert und optimiert werden. Anschließend sollten geeignete AFLP-Primer bzw. Chloroplasten-Loci für die molekularen Analysen identifiziert werden.

Die in Form von molekularen Stammbäumen ausgewerteten Ergebnisse sollten mit bereits bekannten morphologisch-anatomischen und biogeographischen Daten und Hypothesen verglichen sowie auftretende Parallelen und Unterschiede diskutiert werden.

Die folgenden Fragen sollten im Zuge dieser Arbeit betrachtet und einer Klärung näher gebracht werden.

- Sind die aufgrund von morphologischen Merkmalen bzw. ihrer geographischen Verbreitung bisher beschriebenen 30 *Fosterella*-Arten auch molekular voneinander abgrenzbar?
- Wie sind die einzelnen Arten miteinander verwandt? Lassen sich innerhalb der Gattung evolutionäre Linien identifizieren?
- Sind Akzessionen, die bisher noch keiner Art zugeordnet werden konnten, genetisch distinkt?
- Lässt sich eine Schwestergattung von *Fosterella* herausstellen?
- Ist *Fosterella* innerhalb der Pitcairnioideae s. str. die Schwestergruppe der Bromelioideae?

Die morphologische Unterteilung der Arten ist, wie bereits erwähnt, sehr schwierig. Erste Erkenntnisse über die Unterscheidung der Arten auf molekularer Ebene, sowie über die Verwandtschaft der Arten untereinander sind mittels einer molekularen Phylogenie zu erwarten.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial ist einschließlich der Fundorte, Akzessionsnummern, Sammlernummern, DNA-Nummern, Herbarbelege und der Verwendung in den verschiedenen molekularen Analysen in Tab. 2 zusammengestellt. Das Material wurde zum größten Teil in Bolivien gesammelt oder stammt aus der Lebendpflanzensammlung der Fundación Amigos de la Naturaleza – FAN, in Santa Cruz, Bolivien. Sechs der Proben kommen aus Marie Selby's Botanical Garden in Sarasota, USA und eine weitere aus der über 7000 Pflanzen umfassenden Lebendpflanzensammlung von Dr. Juiz Elton Martinez Carvalho Leme (Brasilien). Einige *Fosterella*-Arten und alle anderen Bromeliaceae stammen aus den Lebendpflanzensammlungen der Botanischen Gärten in Heidelberg, Berlin-Dahlem, Stuttgart, Osnabrück sowie aus dem Palmengarten in Frankfurt am Main.

Von allen von der Autorin selbst gesammelten Pflanzen wurden Herbarbelege angelegt und im Herbarium Senckenbergianum in Frankfurt am Main (FR) oder im Herbarium der Universität Kassel (KAS) hinterlegt. Belege weiterer Pflanzen finden sich auch in anderen Herbarien.

Frisch gesammeltes Pflanzenmaterial wurde, zwischen Zeitungspapier gelegt und nach Kassel transportiert oder geschickt. Sofort nach ihrer Ankunft in Deutschland wurden die Proben in Kassel in beschriftete Tüten verpackt und bei -80 °C eingefroren oder zuvor bereits in Frankfurt lyophilisiert. Das so getrocknete Material wurde in Papiertüten mit Silikagel gelagert. Die direkte Trocknung von frischem Blattmaterial mit Silikagel erwies sich als problematisch oder z. T. unmöglich, da die Blätter aufgrund ihres z. T. xeromorphen Baus nur sehr langsam trockneten, was wiederum eine massive DNA-Degradation zur Folge hatte.

Jedes DNA-Isolat erhielt eine individuelle DNA-Nummer. DNA-Proben, die aus dem Blattmaterial derselben Pflanze isoliert wurden, erhielten die gleiche Nummer mit einem zusätzlich angefügten Buchstaben. Akzessionen, die noch in keine der beschriebenen Arten eingeordnet werden konnten, wurden mit *F. spec.* bezeichnet. Alle DNA-Proben werden bei -20 °C in der Abteilung Systematik und Morphologie der Pflanzen der Universität Kassel aufbewahrt.

Legende Tabelle 2: B = Herbarium Botanisches Museum Berlin-Dahlem; BGB = Botanischer Garten Berlin-Dahlem; BGHD = Botanischer Garten Heidelberg; BGO = Botanischer Garten Osnabrück; BGS = Botanischer Garten Stuttgart; FAN = Lebendpflanzensammlung der "Fundación Amigos de la Naturaleza", Santa Cruz, Bolivien; FR = Forschungsinstitut Senckenberg, Frankfurt/Main; FRP = Palmengarten Frankfurt/Main; GOET = Herbarium Universität Göttingen; HB = Herbarium Bradeanum, Rio de Janeiro, Brasilien; HEID = Botanischer Garten der Universität Heidelberg, KAS = Herbarium und Gewächshausanlage der Universität Kassel; LBP = Nationalherbarium Boliviens, La Paz, Bolivien; LEME = Lebendpflanzensammlung von Elton Leme, Rio de Janeiro, Brasilien; MSBG = Marie Selbys Botanischer Garten, Sarasota, USA; NY = Botanischer Garten New York; SEL = Herbarium Marie Selby Botanischer Garten, Sarasota, USA, USZ = Autonome Universität Gabriel René Moreno, Santa Cruz, Bolivien; VASQ = Herbarium Vasquezianum, Santa Cruz, Bolivien; WU = Herbarium der Universität Wien, Österreich. Die Nomenklatur folgt Smith und Downs (1974), und für später beschriebene Arten Ibisch *et al.* (1997; 1999; 2002), Kessler *et al.* (1999), Luther (1981; 1997), Rauh (1979; 1987) und Smith und Read (1992). *Fosterella* spec. sind bis dato noch unbenannte Morphospecies. Abkürzungen: aff. = lat. affinis: verwandt, aber sicher eine andere Art, cf. = lat. conferre: in Nachbarschaft stellen, Sammler der Pflanzen: AF = Arturo Fuentes, CN = Christoph Nowicki, IV = Israel Vargas, KS = Katharina Schulte, PI = Pierre Ibisch, RM = Robert Müller, RS = Martina Rex und Katharina Schulte, RV = Roberto Vasquéz, RX = Martina Rex, SR = S. Reichle, TK = Thorsten Krömer, ~ = keine Angaben vorhanden.

Tab. 2: Auflistung des für diese Arbeit verwendeten Pflanzenmaterials.
 Legende s. Seite 21

Gattungs- und Arname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
Bromelioideae								
<i>Aechmea kertesziae</i> Reitz	FRP 98-16935-3	~	F9a	-	+	~	~	~
<i>Aechmea orlandiana</i> L.B.Sm.	FRP 90-1666-2	~	F18a	-	+	~	~	~
<i>Bromelia pinguin</i> L.	BGHD 104015	Stolten s.n.	F38a	-	+	Mexiko, Yucatan, Merida	50	~
<i>Bromelia serra</i> Griseb.	FRP 98-17751-1	~	F12a	-	+	~	~	~
<i>Deinacanthon urbanianum</i> (Mez) Mez	FRP 98-17786-2	~	F20a	-	+	~	~	~
<i>Edmundoa lindenii</i> var. <i>rosea</i> (E.Morren) Leme	BGHD 107435	Buckup s.n.	F49a	-	+	Brasilien, Santa Catarina, Ilha de Santa Catarina	~	~
<i>Neoregelia laevis</i> (Mez) L.B.Sm.	FRP 98-16962-3	~	F29a	-	+	~	~	~
<i>Ochagavia</i> cf. <i>carnea</i> L.B.Sm. & Looser	FRP 94-14614-3	~	F36a	-	+	~	~	~
<i>Ochagavia carnea</i> L.B.Sm. & Looser	FRP 98-16853-2	~	F22a	-	+	Chile	~	~
Pitcairnioideae s. lato								
Brocchinioideae								
<i>Ayensua uaipanensis</i> (Maquire) L.B.Sm.	FRP 92-9510-2	~	F7a	-	+	~	~	~

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Brocchinia acuminata</i> L.B.Sm.	FRP 95-15043-3	~	F19a	-	+	~	~	~
Pitcairnioideae s. str.								
<i>Deuterocohnia brevifolia</i> (Griseb.) M.A.Spencer & L.B.Sm.	BGHD 107170	Balfanz 075	F42a	-	+	Bolivien, Tarija, Navarez	2000	~
<i>Deuterocohnia brevispicata</i> Rauh & L.Hrom.	BGHD 102379	Hromadnik 5213	F51a	-	+	Bolivien, Chuquisaca bei Inca Huasi	1300	HEID
<i>Deuterocohnia glandulosa</i> E.Gross	BGHD 103854	Hromanik 5167	F43a	-	+	Bolivien, Tarija, Campo Serere	1200	~
<i>Deuterocohnia lotteae</i> (Rauh) M.A.Spencer & L.B.Sm.	BGHD 103817	Hromadnik 5131	F44a	-	+	Bolivien, Tarija, Cumbre del Condor	2700	HEID
<i>Deuterocohnia scapigera</i> (Rauh & L.Hrom.) M.A.Spencer & L.B.Sm.	BGHD 130020	Hromadnik 5275	F45a	-	+	Bolivien, Potosi, Palca Grande	2400	~
<i>Dyckia encholirioides</i> Mez	FRP 94-19369-3	~	F13a	-	+	~	~	~
<i>Dyckia estevesii</i> Rauh	BGHD 105188	Braun s.n.	F40a	-	+	Brasilien,	~	~
<i>Dyckia estevesii</i> Rauh	BGHD 105012	Esteves-Pereira s.n.	F50a	-	+	Brasilien, Goias, Caiaponia	500	~
<i>Dyckia goehringii</i> E.Gross & Rauh	BGHD 105013	Rauh 67622	F39a	-	+	Brasilien, Minas Gerais, Diamantina	~	~
<i>Encholirium horridum</i> L.B.Sm.	BGHD 108213	Schindhelm s.n.	F46a	-	+	Brasilien, Minas Gerias,	600	~

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella albicans</i> (Griseb.) L.B.Sm.	FAN RV 3796 I	Vasquez 3796I	8b	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1000	VASQ, SEL, USZ
	FAN RV 3796 II	Vasquez 3796I	8c	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1000	VASQ, SEL, USZ
	FAN RV 3796	Vasquez 3796I	8d	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1000	VASQ, SEL, USZ
	FAN RV 4023	Vasquez 4023	32a	+	-	Bolivien, Tarija, Arcre	1000	SEL, VASQ, FR
	FAN RV 4051	Vasquez 4051	46a	+	-	Bolivien, Tanja, O´ConNord	840	SEL, VASQ
	FAN RV 3317	Vasquez 3317	51a	+	-	Bolivien, Cochabamba, Chapare	1750	GOET, LPB, FR
	FAN RV 4185	Vasquez 4185	54a	+	-	Bolivien, Cochabamba, Ayopaya	1630	SEL, VASQ
	FAN RV 3617	Vasquez 3617	62a	+	+	Bolivien, La Paz, Inquisivi		FR
	FAN PI 98.0204	Ibisch 98.0204	64a	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1700	GOET, LPB, SEL, USZ, FR
	MSBG 1980-1733	~	79a	+	-	~	~	~
	FAN RV 4626b	Vasquez 4626b	94c	+	+	Bolivien, Cochabamba, Chapare	1800	GOET, LPB, SEL, VASQ
<i>Fosterella caulescens</i> Rauh	FRP 99-18434-3	Rauh 40579a	3a	+	+	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1200	HEID, SEL, U, WU
	BGHD 103532	Rauh 40579a	142b	-	+	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1200	HEID, SEL, U, WU

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Arname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella caulescens</i> Rauh	FAN RV 4654b	Vasquez 4654b	112a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	923	VASQ
	MSBG 1989-0220	Rauh 40579a	80a	+	+	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1200	HEID, SEL, U, WU
<i>Fosterella chiquitana</i> Ibisch, R.Vasquez & E.Gross	FAN PI 98.0125	Ibisch 98.125	11c	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Nuflo de Chavez	500	FR, LPB
	FAN CN 2221	Nowicki 2221	20a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Nuflo de Chavez	~	LPB
	FAN RV 3762	Vasquez 3762	34a	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Nuflo de Chaves	~	VASQ, FR, LBP
	FAN RS 301002-3	Rex & Schulte 301002-3	118a	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Guarayos	200	FR, SEL
	FAN RV 4685	Vasquez 4685	120a	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Guarayos	220	VASQ
<i>Fosterella cotacajensis</i> M.Kessler, Ibisch & E.Gross	FAN RV 3612	Vasquez 3612	13a	+	+	Bolivien, La Paz, Inquisivi	2170	SEL
	FAN MK 9620a	Kessler 9620a	76a	+		Bolivien, Cochabamba, Ayopaya	2100	SEL, LPB
	FAN MK 9620b	Kessler 9620b	76d	+	+	Bolivien, Cochabamba, Ayopaya	2100	SEL, LPB
<i>Fosterella elata</i> H.Luther	FAN RV 4177	Vasquez 4177	31a	+	-	Bolivien, Cochabamba, Ayopaya	1330	~
	FAN CN 2076b	Nowicki 2076b	14?	+	-	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1192	~
	FAN RV 3654	Vasquez 3654	15a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	960	VASQ, USZ, FR
	FAN RV 3633	Vasquez 3633	16c	+	-	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1600	LPB, USZ, SEL, FR

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella elata</i> H.Luther	FAN IV 6365	Vargas 6365	33a	+	-	Bolivien, Cochabamba, Ayopaya	990	SEL, USZ
	FAN CN 2061	Nowicki 2061	60a	+	+	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1350	~
	MSBG 1983-0004	~	81a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	~	SEL
	MSBG 1981-0059	~	82a	+	-	Bolivien, La Paz, Munecas	~	SEL
	FAN RS 251002-3	Rex & Schulte 251002-3	107b	+	+	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1380	FR, SEL
	FAN RS 261002-4	Rex & Schulte 261002-4	113a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	917	FR
	FAN RV 4642	Vasquez 4642	119a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1870	SEL, VASQ, FR
	FAN RV 4655	Vasquez 4655	122b	+	-	Bolivien, La Paz, Caranavi	950	VASQ, FR
<i>Fosterella floridensis</i> Ibisch, R.Vasquez & E.Gross	FAN PI 02.0001	Ibisch 02.0001	67d	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Florida	~	FR, SEL
	FAN PI 02.0006	Ibisch 02.0006	73a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, A. Ibanez	~	~
	FAN RS 111002-11	Rex & Schulte 111002-11	103a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	~	FR
<i>Fosterella graminea</i> (L.B.Sm.) L.B.Smith	BGB 115-19-83-80	~	143a	-	+	~		B
	FAN RM 216^2	Müller 216/2	71c	+	+	Bolivien, La Paz, Larecaja	1200	~

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella graminea</i> (L.B.Sm.) L.B.Smith	FAN RM 216	Müller 216	71a	+	-	Bolivien, La Paz, Larecaja	1200	SEL
<i>Fosterella gracilis</i> (Rusby) L.B.Sm.	FAN RS 281002-6	Rex & Schulte 281002-6	117a	+	+	Bolivien, Beni, Ballivian	223	~
<i>Fosterella heterophylla</i> Rauh	FAN RS 241002-5	Rex & Schulte 241002-5	105a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	2152	~
	FAN RV 3661	Vasquez 3661	26a	+	+	Bolivien, La Paz, Caranavi	1600	LPB, SEL, FR
	FAN RV 3661	Vasquez 3661	26c	+	-	Bolivien, La Paz, Caranavi	1600	~
	FAN RS 261002-18	Rex & Schulte 261002-18	114a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1454	FR
<i>Fosterella latifolia</i> Ibisch, R.Vasquez & E.Gross	FAN PI 98.0098	Ibisch 98.0098	18c	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1000	LPB, FR, SEL
	FAN PI 98.0173	Ibisch 98.0173	25c	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Nuflo de Chavez	450	USZ
	FAN RV 3406	Vasquez 3406	35a	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Florida	700	FR, LBP
	FAN RV 3407	Vasquez 3407	38a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	700	VASQ
	FAN RS 111002-1	Rex & Schulte 111002-1	101a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1019	FR
<i>Fosterella micrantha</i> (Lindl.) L.B.Sm	BGHD 103726	Welz 3124	133a	-	+	Guatemala, Suchitepéquez, Santa Teresa	~	HEID, FR, B
	BGB 079-02-92-34	Welz 3124	132a	-	+	Guatemala, Suchitepéquez, Santa Teresa	200	FR, B
<i>Fosterella nowickii</i> Ibisch, R.Vasquez & E.Gross	FAN RV 3636	Vasquez 3636	12b	+	-	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1400	FR, LBP

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m u. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella nowickii</i> Ibisch, R.Vasquez & E.Gross	FAN CN 2060	Nowicki 2060	27b	+	-	Bolivien, Cochabamba, Hernando Siles	1353	~
	FAN CN 2060 tipo	Nowicki 2060	27c	+	-	Bolivien, Cochabamba, Hernando Siles	1353	~
	FAN CN 2076	Nowicki 2076	14a	+	-	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1200	~
	FAN CN 2076 tipo	Nowicki 2076	14?	+	-	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1192	~
	FAN CN 2076b?	Nowicki 2076b	58a	+	-	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1192	SEL,LPB, FR
	FAN CN 2076 tipo	Nowicki 2076	58b	+	-	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1192	~
	FAN CN 2076 II	Nowicki 2076 II	58c	+	+	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1192	~
<i>Fosterella penduliflora</i> (C.H.Wright) L.B.Sm.	FAN RV 3636(a)	Vasquez 3636a	12d	+	-	Bolivien, La Paz, Süd Yungas	1400	~
	FAN RV 3730	Vasquez 3730	17a	+	-	Bolivien, Cochabamba, Luis Calvo	1330	VASQ, FR
	FAN RV 3710	Vasquez 3710	21a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Cordillera	600	VASQ
	FAN RV 2979a	Vasquez 2979a	43a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1350	USZ, FR
	FAN RV 3817	Vasquez 3817	22c	-	+	Bolivien, Santa Cruz, Cordillera	650	VASQ, USZ, SEL, LPB
	FAN PI 00.0036	Ibisch 00.0036	50b	-	+	Bolivien, Santa Cruz, Cordillera	~	~
	FAN RV 4003	Vasquez 4003	45a	+	+	Bolivien, Tarija, Gran Chaco	~	LPB, SEL, USZ, VASQ
	FAN RV 4051(b)	Vasquez 4051b	46d	+	+	Bolivien, Tarija, O'Connor	~	VASQ, FR

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella penduliflora</i> (C.H.Wright) L.B.Sm.	FAN RV 3624	Vasquez 3624	55a	+	+	Bolivien, Chuquisaca, Inquisivi	~	VASQ, FR
	FAN RV 2979	Vasquez 2979	65a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1350	~
	FAN RS 111002-7	Rex & Schulte 111002-7	102a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1019	VASQ, FR
<i>Fosterella petiolata</i> (Mez) L.B.Sm.	FAN AF 3176	Fuentes 3176	68a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1820	LPB, SEL, FR, USZ
	MSBG 1995-0007	~	85a	+	-	~	~	~
	FAN RV 3673	Vasquez 3673	9b	+	-	Bolivien, La Paz, Caranavi	830	~
<i>Fosterella rexiae</i> Ibsch, R.Vasquez & E.Gross	FAN RV 3673	Vasquez 3673	9d	+	+	Bolivien, La Paz, Caranavi	830	LPB, SEL
	FAN RV 3666	Vasquez 3666	10a	+	+	Bolivien, La Paz, Caranavi	1310	USZ
<i>Fosterella rusbyi</i> (Mez) L.B.Sm.	BGHD 103751	Rauh 20866	137b	-	+	Peru, Cuzco, Vilcancanota-Tal	1200	WU, HEID
	BGO 94-17-0049-80	~	141b	-	+	~	~	~
	FAN RV s/n y s/loc	Vasquez	97a	+	-	~	~	~
<i>Fosterella schidosperma</i> (Baker) L.B.Sm.	BGO 94-17-005080	~	135b	-	+	~	~	~

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer.	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella schidosperma</i> (Baker) L.B.Sm.	MSBG 1978-0905	~	86a	+	+	~	~	SEL
<i>Fosterella spectabilis</i> H.Luther	MSBG 1995-0415	Cathcart B-17	87a	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Florida	~	SEL, HB
	BGB 290-08-00-84	~	144a	-	+	~	~	B
<i>Fosterella vasquezii</i> E.Gross & Ibisch	FAN PI 98.0116	Ibisch 98.0116	63b	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Velasco	300	FR
	FAN PI 98.0117	Ibisch 98.0117	23b	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Velasco	300	~
<i>Fosterella villosula</i> (Harms) L.B.Sm.	FAN RV 4623	Vasquez 4623	104a	+	+	Bolivien, Cochabamba, Chapare	580	VASQ, FR
	FAN PI 02.0002	Ibisch 02.0002	66a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	1100	~
	FAN RV 3318	Vasquez 3318	24c	+	-	Bolivien, Cochabamba, Chapare	640	~
	FAN PI 98.0173	Ibisch 98.0173	25f	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Andres Ibanez	450	USZ, FR, WU, SEL
	FAN RV 2994	Vasquez 2994	39a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, A. Ibanez	460	USZ, FR
	FAN RV 3322	Vasquez 3322	40a	+	-	Bolivien, Cochabamba, Chapare	440	VASQ
	FAN "H. Justiniano" s/n	Justinianomo	59a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Florida	~	~

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella villosula</i> (Harms) L.B.Sm.	BGO 94-05-0016-20	Cathcart	136b	-	+	Bolivien, Cochabamba	~	HEID
	FAN IV 5121	Vargas 5121	92a	+	-	~	~	~
	FAN RV 4650a	Vasquez 4650a	126a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1050	VASQ
<i>Fosterella weberbaueri</i> (Mez) L.B.Sm.	BGHD 105332	Kroemer 7286	138b	-	+	Bolivien, Cochabamba, Chapare	~	FR
	FAN RV 3570	Vasquez 3570	48d	+	+	Bolivien, Cochabamba, Chapare	590	VASQ, SEL, LPB, USZ, FR
	FAN RV 4650	Vasquez 4650	122a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1050	VASQ
	FAN RM 217^2	Müller 217*2	95c	+	+	Bolivien, La Paz, Larecaja	~	SEL
	FAN RV 4656	Vasquez 4656	121a	+	+	Bolivien, La Paz, Caranavi	1480	VASQ, FR
<i>Fosterella weddelliana</i> (Brongn. ex Baker) L.B.Sm	FAN RV 3627	Vasquez 3627	36a	+	+	Bolivien, La Paz, Inquisivi	2720	FR
	FAN CN 2034	Nowicki 2034	37a	+	+	Bolivien, La Paz, Inquisivi	~	~
	FAN RV 3620	Vasquez 3620	56a	+	+	Bolivien, La Paz, Inquisivi	2020	SEL, VASQ
<i>Fosterella aff. weddelliana</i>	HEID 104866	Mijagawa s.n.	145a	-	+	Bolivien, La Paz, Solacana	1100	HEID
<i>Fosterella windischii</i> L.B.Sm. & Read	EW PI 03.0016	Ibisch 03.0016	139b	-	+	Bolivien, Santa Cruz, Velasco	~	LBP

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella yuvinkae</i> Ibisch, R.Vásquez, E.Gross & S.Reichle	FAN RV 4510	Vasquez 4510	140b	-	+	Bolivien, Santa Cruz, Chiquitos	670	VASQ, LBP
	FAN SR 1	Reichle 1	72a	+	+	Bolivien, Santa Cruz, Chiquitos	~	FR, LPB
	FAN SR-P1	Reichle P1	74a	+	-	Bolivien, Santa Cruz, Chiquitos	~	~
<i>Fosterella spec.</i>	MSBG 1980-0854	~	88a	+	-	~	~	~
	FAN RS 271002-1	Rex & Schulte 271002-1	116a	+	-	Bolivien, Beni, Ballivian	850	FR
	FAN RV 3652	Vasquez 3652	29a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1970	VASQ
	FAN TK 1398b	Kroemer 1398b	28b	+	-	Bolivien, La Paz, Caranavi	1500	LBP
	FAN TK 1398	Kroemer 1398	28d	+	+	Bolivien, La Paz, Caranavi	1500	~
	FAN IV 6387	Vargas 6387	30a	+	-	Bolivien	~	~
	FAN RV 3674 (a)	Vasquez 3674a	49b	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	1100	NY, USZ, GOET, LPB
	FAN RV 3724b	Vasquez 3724b	57a	+	-	Bolivien, Santa, Cruz, Cordillera	1120	~
	FAN RV 3724	Vasquez 3724	57b	+	-	Bolivien, Santa, Cruz, Cordillera	1120	~
	FAN CN 2076 I	Nowicki 2076 I	58d	+	-	~	1192	~

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Arname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Fosterella spec.</i>	FAN RM 150	Müller 150	93a	-	+	~	~	~
	FAN RV 3729	Vasquez 3729	19g	+	+	Bolivien, Chuquisaca, Luis Calvo	1430	~
	FAN RV 3729a	Vasquez 3729a	128a	+	+	Bolivien, Chuquisaca, Luis Calvo	1430	VASQ
	FAN RS 261002-10	Rex & Schulte 261002-10	111a	+	-	Bolivien, La Paz, Nord Yungas	923	~
	FAN RM 7	Müller 7	69a	+	-	~	~	~
	FAN RM 150	Müller 150	93a	-	+	~	~	~
	FAN RM 22	Müller 22	70a	+	-	Bolivien, La Paz, Larecaja	850	LPB
	LEME 5078	Fernandes da Silva s.n.	129a	+	+	Brasilien, Pará, Itaituba	~	SEL, HB
<i>Pitcairnia albiflora</i> Spreng.	FRP s/n	~	F15a	-	+	~	~	~
<i>Pitcairnia atrorubens</i> (Beer) Baker	FRP 89-16095-2	~	F34a	-	+	~	~	~
<i>Pitcairnia chiapensis</i> Miranda	BGS 41677	~	F35a	-	+	~	~	~
<i>Pitcairnia grafii</i> Rauh	BGHD 102579	~	F16a	-	+	~	~	~
<i>Pitcairnia loki-schmidtiae</i> Rauh & Barthlott	BGHD 104044	~	F47a	-	+	Mexiko, Jalisco, Puerto Vallarta	~	HEID

Tab. 2: Fortsetzung

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammlernummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequenzierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
<i>Pitcairnia macrochlamys</i> Mez	FRP 93-12596-3	~	F27a	-	+	~	~	~
<i>Pitcairnia rubro-nigriflora</i> Rauh	BGHD 103787	Rauh 53676	F48a	-	+	Peru, San Martin, Tarapoto	800	~
<i>Pitcairnia undulato-sepala</i> Rauh	FRP 1-19497-3	~	F14a	-	+	~	~	~
Hechtioideae								
<i>Hechtia argentea</i> Baker	FRP 88-19332-3	~	F11a	-	+	~	~	~
<i>Hechtia stenopetala</i> Klotzsch	FRP 0-19154-2	~	F21a	-	+	~	~	~
Puyoideae								
<i>Puya coerulea</i> var. <i>violacea</i> (Brongn.) L.B.Sm. & Looser	FRP 91-18506-3	~	F23a	-	+	~	~	~
<i>Puya herzogii</i> Wittm.	BGHD 105240	Krömer 6581	F53a	-	+	Bolivien	~	~
<i>Puya mirabilis</i> (Mez) L.B.Sm.	BGHD 130080	Gouda 95GR01093	F41a	-	+	Bolivien, Cochabamba, Mizque	~	~
<i>Puya spathacea</i> (Grisebach) Mez	BGHD 103912	~	F52a	-	+	Argentinien, Cordoba, Colon	1300	HEID
<i>Puya venusta</i> Phil. ex Baker	FRP 86-18503-3	~	F24a	-	+	~	~	~

Tab. 2: Fortsetzung

Gattungs- und Artname	Akzessionsnummer	Sammler- nummer	DNA Nummer	AFLPs	Sequen- zierung	Fundort	Höhe [m ü. NN]	Herbarbeleg
Tillandsioideae								
<i>Catopsis floribunda</i> (Brongn.) L.B.Sm.	FRP 9290-2846-2	~	F10a	-	+	~	~	~
<i>Catopsis morreniana</i> Mez	FRP 92-12302-0	~	F30a	-	+	~	~	~
<i>Guzmania glaucophylla</i> Rauh	BGHD 102386	Rauh 66031	F8a	-	+	Peru, Pasco, Yaupi Baja	2500	~
<i>Guzmania musaica</i> Mez	FRP 92-10645-0	~	F33a	-	+	~	~	~
<i>Racinea pugiformis</i> (L.B.Sm.) M.A.Spencer & L.B.Sm.	FRP 4-21908-3	~	F25a	-	+	~	~	~
<i>Tillandsia fraseri</i> Baker	FRP 90-1326-2	~	F26a	-	+	~	~	(Horres 1582)
<i>Tillandsia somnians</i> L.B.Smith	FRP 90-2820-3	~	F31a	-	+	~	~	~

2.2 Molekulare Methoden

2.2.1 Allgemeine Grundlagen

Im Gegensatz zur tierischen Zelle, die zwei Genome beinhaltet (Kern- und Mitochondriengenom), enthält die typische Pflanzenzelle ein drittes genetisches System, das Chloroplastengenom.

Im Zellkern liegt die genomische DNA in Form linearer Chromosomen vor, die Organellen-DNA hingegen ist ringförmig. In der DNA entstehen durch Mutationen Sequenzunterschiede, die als Merkmale betrachtet und z. B. für molekularsystematische Untersuchungen verwendet werden können. In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden entwickelt, um solche Sequenzunterschiede nachzuweisen. Beispielhaft sollen hier die Restriktionsfragmentanalysen (Botstein *et al.* 1980), die DNA-DNA-Hybridisierung (vgl. Avise 1994) und eine Vielzahl sogenannter molekularer Marker Methoden (Übersichten bei Avise 1994; Weising *et al.* 2005) sowie die vergleichende DNA-Sequenzierung (Übersicht bei Hillis *et al.* 1996) aufgeführt werden.

Die Wahl einer geeigneten Methode hängt u. a. vom zu untersuchenden taxonomischen Niveau ab (Weising *et al.* 2005). Für systematische Untersuchungen von Großgruppen, wie Familien, Ordnungen oder gar Klassen, werden typischerweise kodierende Bereiche (Gene) verwendet, die aufgrund von Selektion nur einer sehr langsamen Evolution unterliegen. Für Untersuchungen auf niedrigerem taxonomischen Niveau hingegen eignen sich vor allem schnell evolvierende nichtkodierende Bereiche wie Introns und intergenische Abschnitte (Spacer). Die Mehrzahl dieser Bereiche verhält sich selektiv neutral, ihre Variabilität ist weitgehend unabhängig von funktionellen Eigenschaften und umweltbedingten Veränderungen.

Für phylogenetische Studien können im Prinzip alle drei Genome betrachtet werden. Das Kern- und das Chloroplastengenom finden in der Pflanzensystematik die häufigste Anwendung. Das relativ große pflanzliche Mitochondriengenom wird hingegen nur selten eingesetzt (Chaw *et al.* 2000; Cho *et al.* 2004). Die Gründe dafür sind u. a. die aufgrund von intramolekularer Rekombination äußerst variable Molekülstruktur (Palmer 1992) in Verbindung mit einer niedrigen Basensubstitutionsrate, das Vorhandensein von Duplikationen und Sequenzen plastidärer und nukleärer Herkunft sowie häufiger horizontaler Gentransfer zwischen nur entfernt verwandten Arten (Marienfeld *et al.* 1999; Bergthorsson *et al.* 2003; Cummings *et al.* 2003). Die Struktur und genetische Organisation des Chloroplastengenoms sind dagegen relativ einheitlich, seine Gene sind hoch konserviert und die Substitutionsrate ist durchschnittlich viermal geringer als die der im Kern enthaltenen DNA. Chloroplasten-DNA (cpDNA) wird seit über 15 Jahren für molekularsystematische Analysen in großem Umfang eingesetzt (z. B. Clegg und Zurawski 1992). Mittlerweile ist das Chloroplastengenom für eine Reihe von Organismen wie z. B. die Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*, Shinozaki *et al.* 1986), das Lebermoos (*Marchantia polymorpha*, Ohyama *et al.* 1986) und der Reis (*Oryza sativa*, Hiratsuka *et al.* 1989) vollständig sequenziert.

Um Verwandtschaftsanalysen anstellen zu können, muss ein Minimum an informativen Positionen vorhanden sein. Auf Artebene werden für diese Analysen vorwiegend nicht-kodierende Bereiche in Spacer-Regionen verwendet, weil die Substitutionsraten hier höher sind als in den hoch konservierten Genen. Spacer-Regionen können neben informativen Basensubstitutionen zusätzlich auch Indels (Insertions-Deletionsereignisse) und sogar variable Mikrosatelliten (SSR, simple sequence repeats) enthalten. Sequenzunterschiede existieren dabei sowohl inner- als auch zwischenartlich. Der Vorteil der vergleichenden Sequenzierung nichtkodierender Regionen von Chloroplasten-DNA liegt darin, dass sie für ein sehr breites Spektrum höherer Pflanzen anwendbar macht.

Für eine große Anzahl an Zielbereichen wurden bereits flankierende PCR-Primer publiziert (Sugiura 1992). Dies sind beispielsweise das *atpB*-Gen (Davis *et al.* 2004), *rbcL*-Gen (Clark *et al.* 1993), *ndhF*-Gen (Gaut *et al.* 1997), *matK*-Gen (Sang *et al.* 1997), der *atpB-rbcL*-Spacer (Manen *et al.* 1994a), *psbB-psbH*-Spacer (Xu *et al.* 2000), *trnL-trnF*-Spacer (Taberlet *et al.* 1991) und das *rps16*-Intron (Oxelman *et al.* 1997). Eine Übersicht über die Vielzahl nichtkodierender cpDNA-Sequenzen und ihre Eignung für phylogenetische Analysen ist bei Shaw *et al.* (2005) zu finden. Für die Einordnung der Bromeliaceae in die Poales und Analysen auf Familienebene wurden vor allem Sequenzen der Chloroplastengene *ndhF*, *atpB* und *rbcL* eingesetzt (z. B. Chase *et al.* 2000; Graham *et al.* 2002; Duval *et al.* 2003; Givnish *et al.* 2004; 2005; 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit soll die vergleichende Sequenzierung von cpDNA als Werkzeug zur molekularsystematischen Untersuchung eingesetzt werden.

Das Chloroplastengenom wird (ebenso wie das Mitochondriengenom) uniparental, also nur von einem Elter an die Nachkommen vererbt. Bei Angiospermen erfolgt dieser Schritt i. d. R. maternal über die Eizelle, bei Gymnospermen i. d. R. paternal über den Pollen (Reboud und Zeyl 1994). Hier treten also nur in sehr seltenen Fällen Rekombinationsereignisse auf.

Parallel zu cpDNA-Untersuchungen können auch Untersuchungen des Kerngenoms erfolgen. Durch einen Vergleich der Ergebnisse können u. a. Hybridisierungsereignisse identifiziert und retikuläre Evolution untersucht werden. Auch in der vorliegenden Arbeit soll die vergleichende Sequenzierung von cpDNA als Werkzeug zur molekularsystematischen Untersuchung eingesetzt werden.

Die im Kerngenom am häufigsten untersuchte Region für phylogenetische Analysen ist die ITS-Region. Dabei handelt es sich um die internen transkribierten Spacer des ribosomalen Genclusters ITS 1- 5.8S rDNA- ITS 2. Der Versuch diese Region mit Hilfe von Standardprimern für Bromeliaceae zu amplifizieren, blieb lange ohne Ergebnis. Erst Barfuss *et al.* (2005b) gelang es die ITS-Region für Bromeliaceae erfolgreich zu amplifizieren und zu sequenzieren. Dabei bereitete besonders der hohe GC-Gehalt der Sequenzen (70 bis 80%) Schwierigkeiten bei der Amplifikation. Zudem zeigte sich, dass die Variabilität für eine umfangreiche phylogenetische Analyse auf Familienebene nicht ausreicht (Barfuss *et al.* 2005b). Eine größere Variabilität zeigt das nukleäre Phosphoribulokinase (PRK)-Gen, das für die Analyse der Tillandsioideae- (Barfuss *et al.* 2005b) und der Bromelioideae-Phylogenie

verwendet wurde (Schulte und Zizka 2006). Die Topologie dieser Phylogenie ist vergleichbar mit der aus plastidären Daten (Schulte *et al.* 2005), zeigt aber eine bessere Auflösung.

Für die Untersuchung nahe verwandter Akzessionen ist die Sequenzvariabilität, oft zu gering. In diesem Fall kann man sich molekulare Marker zunutze machen (Hodkinson *et al.* 2000; Després *et al.* 2003). Mit molekularen Markertechniken können DNA-Sequenzpolymorphismen nachgewiesen werden, ohne eine Sequenzierung durchführen zu müssen. In unbekanntem Genomabschnitten werden so Sequenzvariationen entdeckt und verglichen. Beispiele für molekulare Markertechniken auf PCR-Basis sind neben den RAPDs (random amplified length polymorphism, Williams *et al.* 1990) und der MP-PCR-Technik (microsatellite-primed PCR, Gupta *et al.* 1994; Weising *et al.* 1995a) die AFLP-Methode (amplified fragment length polymorphism, Vos *et al.* 1995). Letztgenannte soll in Ergänzung zur Chloroplasten-DNA-Analyse auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt werden.

Die Methodik der in dieser Arbeit verwendeten molekularen Werkzeuge wird im Folgenden erläutert:

2.2.2 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte aus 100-150 mg frischem oder 20-30 mg lyophilisiertem Pflanzenmaterial. Dazu wurde entweder eine modifizierte CTAB-Methode (Saghai-Marooft *et al.* 1984) oder ein kommerzielles Kit (Qiagen GmbH 2000) verwendet (s. u.). Für beide Methoden wurde das Pflanzenmaterial zunächst mit flüssigem Stickstoff und einem Pistill in einem Mörser zu Pulver zerkleinert.

CTAB-Methode

Verwendete Reagenzien:

- | | |
|------------------------------------|---|
| • flüssiger Stickstoff | <u>Extraktionspuffer (CTAB-Puffer):</u> |
| • Extraktionspuffer (→) | 2 % (w/v) CTAB |
| • TE-Puffer (→) | 1,4 M NaCl |
| • Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) | 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 |
| • 100 % Isopropanol | 20 mM EDTA |
| • 70 % Ethanol | 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP 40) |
| • RNase A (10 mg/ml) | 0,2 % (v/v) β-Mercaptoethanol (MET) |
| | <u>TE-Puffer (Tris/EDTA-Puffer):</u> |
| | 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 |
| | 1 mM EDTA |

Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde in 400 µl des auf 60 °C vorgeheizten Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) -haltigen Extraktionspuffers überführt und 30 min im Thermomixer compact (Eppendorf) inkubiert. Das CTAB-Detergenz bewirkt eine Zerstörung der Membranen sowie der Zell- und Kernstrukturen, sodass die DNA freigesetzt wird. Durch die Zugabe von 400 µl eines Chloroform/Isoamylalkoholgemisches (24:1) und anschließend 10 minütigem Schwenken und Zentrifugieren (4000 rpm, 30 min, 25 °C) der resultierenden Emulsion entstand eine Phasentrennung. Die unteren beiden Phasen

enthielten v. a. Zellreste, gelöste Proteine, Lipide und Chlorophyll. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert. Sie beinhaltete Nukleinsäuren und Polysaccharide, die durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol ausgefällt und abzentrifugiert wurden (13000 rpm, 15 min, 10 °C). Das entstandene Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 25 °C), anschließend getrocknet und über Nacht in 200 µl TE-Puffer gelöst, dem 0,5 µl einer RNase A-Stammlösung (10 mg/ml) zugesetzt wurde. Danach erfolgte die dauerhafte Aufbewahrung der Proben bei -20 °C. Auf weitere Aufreinigungsschritte konnte verzichtet werden, weil die DNA für die angewandten Methoden rein genug war.

Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit

Aus Pflanzen und Pilzen lässt sich schnell und einfach DNA mit Hilfe des DNeasy® Plant Mini Kits gewinnen (Qiagen 2000).

Verwendete Reagenzien:

- Reagenzien des Qiagen DNeasy® Plant Mini Kits

Das Pflanzenmaterial wurde wie o. a. zerkleinert. Die anschließenden Schritte der Isolation wurden nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Quantifizierung der DNA

Aufgrund der Durchführung des CTAB-DNA-Isolationsprotokolls im Minimaßstab waren nur geringe Mengen an DNA zu erwarten. Aus diesem Grund wurden sowohl die Qualität und auch die Quantität der isolierten DNA nicht photometrisch, sondern mit Hilfe der vergleichenden Gelelektrophorese (vgl. Kap. 2.2.3) beurteilt. Dazu wurden jeweils 5 µl der DNA-Lösung parallel zu einer Standard λ -DNA (DNA des Bakteriophagen λ) mit unterschiedlicher Konzentration (5, 10, 20, 40, 100 ng/µl) als Referenz auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Konzentration der Probe wurde durch einen Bandenintensitätsvergleich mit der Referenz abgeschätzt. Die Qualität der DNA wurde anhand ihrer Laufweite verifiziert. Eine klar abgegrenzte, hochmolekulare Bande sprach für eine hohe DNA-Qualität.

2.2.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von Molekülen (meist DNA oder Proteine) im elektrischen Feld (Sambrook und Russell 2001). Bei der Arbeit mit DNA werden als Trägersubstanz sowohl Agarose- als auch Polyacrylamidgele eingesetzt.

In der Agarose-Gelelektrophorese werden je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden DNA unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet; für hochmolekulare DNA z. B. 0,8 %ige Gele und für die Auftrennung von PCR-Fragmenten 1,5 %ige Gele.

Verwendete Reagenzien:

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Agarose NEEO (Roth) • Elektrophoresepuffer (pH 8,3)
(nach Sambrook <i>et al.</i> (2001)) (→) • DNA-Auftragspuffer (→) • Größenstandard (Invitrogen) (→) • Färbe-Lösung (→) | <p><u>0,5 x TBE-Puffer:</u>
45 mM Tris-Borat
1 mM EDTA</p> <p><u>DNA-Auftragspuffer:</u>
40 % Glycerin (v/v)
0,1 % Bromphenolblau (w/v)
0,1 % Xylencyanol (w/v)</p> <p><u>Größenstandard:</u>
100 bp-DNA-Marker in
DNA-Auftragspuffer</p> <p><u>Färbe-Lösung:</u>
1 µg/ ml Ethidiumbromid
in 0,5 x TBE-Puffer</p> |
|--|---|

Ein Aliquot der aufzutrennenden DNA-Probe wurde mit DNA-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente ein 100 bp-DNA-Marker (Invitrogen). Der eingesetzte Laufpuffer war ein 0,5 x TBE-Puffer. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 3 bis 5 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Nach Beendigung des Laufs wurde die Gelmatrix 30 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und anschließend unter UV-Licht mit einem Videodokumentationssystem (Biometra; BioDocAnalyse) aufgenommen und gespeichert.

Eine höhere Auflösung von DNA-Fragmenten kann durch den Einsatz der Polyacrylamid-Gelelektrophorese erzielt werden. Sie wurde in dieser Arbeit für die Auftrennung der AFLP-Amplifikate und der Sequenzierprodukte verwendet.

Vor dem Auftrag der Proben auf das Polyacrylamidgel erfolgte ein Denaturierungsschritt, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Dazu wurden die Amplifikate mit jeweils 20 µl (bei den AFLPs) oder 1 Vol. (bei der Sequenzierung) Formamidpuffer versetzt und im Thermocycler für 5 min auf 85 °C erhitzt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20 °C im Dunkeln. Die Lagerungsdauer sollte nicht länger als 4 Wochen betragen, da die Fluoreszenz der mit IRD-Farbstoffen markierten DNA-Fragmente mit der Zeit schwächer wird (eigene Beobachtung).

Verwendete Reagenzien

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Formamidpuffer (→) • Elektrophoresepuffer, pH 8,3 (→) • Polyacrylamidgel (→) | <p><u>Formamid-Puffer:</u>
98 % Formamid
0,025 % Fuchsin
10 mM EDTA</p> <p><u>1 x TBE-Puffer:</u>
90 mM Tris-Borat
2 mM EDTA</p> <p><u>Polyacrylamidgel (PAA-Gel):</u>
ULTRA PURE SequaGel® XR (National Diagnostics)
ULTRA PURE SequaGel® XR Complete Buffer
Reagent (National Diagnostics)
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung</p> |
|--|--|

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ein 6 %iges denaturierendes Gel hergestellt, welches nach der Polymerisation in einen automatischen LI-COR IR² DNA Sequenzierer Long Readir 4200 eingehängt wurde. Jeweils 0,5 µl der denaturierten DNA-Proben wurden zusammen mit drei internen Markern auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese verlief bei 1200 V, 25 mA sowie einer Heizplattentemperatur von 55 °C. Die entstandenen Gelbilder wurden auf einen Rechner übertragen und anschließend ausgewertet.

2.2.4 AFLP- Analyse

2.2.4.1 Allgemeine Grundlagen und Prinzip der Methode

Zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Fosterella* wurde u. a. eine AFLP-Analyse (Amplified Fragment Length Polymorphism, Vos *et al.* 1995) durchgeführt. Die AFLP-Technik basiert auf dem Prinzip einer selektiven Amplifikation von Restriktionsfragmenten, die nach dem Verdau genomischer DNA mit Restriktions-Endonukleasen entstanden sind. Polymorphismen der amplifizierten Fragmente können mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Die gesamte genomische DNA wird zunächst mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen zerschnitten (verdaut). Gewöhnlich werden ein seltener („rare cutter“, z. B. *HindIII*) und ein häufiger schneidendes Enzym („frequent cutter“, z. B. *MseI*) eingesetzt. Die Enzyme schneiden so, dass an beiden Enden der Restriktionsfragmente Überhänge (sticky ends) erzeugt werden, an die jeweils ein doppelsträngiger Adapter ligiert wird. Die Adapter dienen wiederum als Bindestellen für die Primer der nachfolgenden PCR-Amplifikation. Diese Primer tragen am 3'-Ende eine unterschiedliche Zahl (meist ein bis drei) selektiver Basen, die ins Innere des Restriktionsfragmentes hineinragen. Es werden nur diejenigen Restriktionsfragmente erfolgreich amplifiziert, deren Enden komplementär zu den jeweils gewählten selektiven Basen sind. Um Fehlpaarungen zu vermeiden, die beim Einsatz von Primern mit drei oder mehr selektiven Basen trotz stringenter PCR-Bedingungen auftreten können, wird dem eigentlichen Amplifikationsschritt meist eine Präamplifikation mit einer oder zwei selektiven Basen vorgeschaltet.

Einer der in der Amplifikation eingesetzten Primer erhält eine Markierung (Labelling), mit deren Hilfe ein Teil der entstehenden Amplifikate auf einem hoch auflösenden Gel sichtbar gemacht werden kann. Die Markierung der Primer kann sowohl radioaktiv als auch mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgen.

Untersuchtes Pflanzenmaterial

In die AFLP-Analyse wurden 112 Akzessionen aus 18 (von 30 bisher beschriebenen) Arten und 13 unzugeordneten Taxa aus verschiedenen Arten der Gattung *Fosterella* einbezogen (Tab. 2). Da zum Zeitpunkt dieser Analyse noch keine Schwestergruppe zur Gattung *Fosterella* bekannt war, konnte keine Probe außerhalb der Gattung als Außengruppe gewählt werden.

Enzym- und Primerauswahl

In vielen AFLP-Analysen wird die Enzymkombination *EcoRI/MseI* eingesetzt (Vos *et al.* 1995; Schwarz *et al.* 2000; Bussell *et al.* 2005). *EcoRI* besitzt jedoch eine so genannte „star activity“, die bewirkt, dass unter suboptimalen Bedingungen Schnittstellen erkannt werden, die von der eigentlichen Erkennungssequenz abweichen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die von Debener und Mattiesch (1999) vorgeschlagene Kombination *HindIII/MseI* verwendet. In Tab. 11 sind die Sequenzen der in den Hauptversuchen verwendeten Adapter und Primer aufgeführt.

2.2.4.2 Durchführung der AFLP-Methode

Die AFLP-Methode wurde nach einem modifizierten Protokoll von Debener und Mattiesch (1999) durchgeführt. Die Analyse besteht aus vier Schritten:

1. Restriktion und Ligation
2. Präamplifikation mit *einer* selektiven Base
3. Amplifikation mit *drei* selektiven Basen
4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf dem Li-COR-Sequenzierer

Verwendete Reagenzien

- | | |
|--|---|
| • Restriktions-/Ligationspuffer (RL), pH 7,5 (→) | <u>RL-Puffer:</u>
100 mM Tris-HCl
100 mM Magnesiumacetat
500 mM Kaliumacetat
50 mM Dithiothreitol |
| • 1 x TE-Puffer, pH 8,3 (→) | <u>1 x TE-Puffer:</u>
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA |
| • 10 x PCR-Puffer, pH 7,5 (→) | <u>PCR-Puffer:</u>
200 mM Tris-HCl
500 mM KCl |
| • Triton X-100 | |
| • <i>Mse I</i> | |
| • <i>Hind III</i> | |
| • <i>MseI</i> -Adapter | |
| • <i>HindIII</i> -Adapter | |
| • ATP | |
| • T4 DNA Ligase | |
| • Primer <i>HindIII</i> +A | |
| • Primer <i>MseI</i> +C/A | |
| • Taq DNA Polymerase | |
| • MgCl ₂ | |
| • dNTPs | |

2.2.4.3 Restriktion und Ligation

In einem Endvolumen von 30 μl wurden 20 ng genomische DNA mit den Enzymen *MseI* und *HindIII* verdaut. Im selben Reaktionsansatz wurden *MseI*- und *HindIII*-Adapter (vgl. Tab. 11) an die Enden der Restriktionsfragmente ligiert. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 3 wiedergegeben. Die Reaktion fand im Schüttelinkubator 3031 (GFL) über Nacht bei 37 °C statt. Die verdauten und ligierten Proben wurden bei -20 °C dauerhaft aufbewahrt. Um zu überprüfen, ob die Proben erfolgreich verdaut waren, wurden 3 μl des entstandenen Produktes auf ein 1,5 %iges Agarosegel (siehe Kap. 2.2.3) aufgetragen. Nach einem vollständigen DNA-Verdau sollte keine hochmolekulare DNA mehr zu sehen sein, dafür aber viele unaufgelöste Fragmente.

Tab. 3: Reaktionsansatz für den Restriktions-/Ligationsschritt der AFLP-Methode.

Das Gesamtvolumen betrug 30 μl . Als Templat wurde genomische DNA eingesetzt. Der RL-Puffer ist der Restriktions-/Ligationspuffer (pH 7,5). Die Enzyme stammen von der Firma New England Biolabs. Die Adaptersequenzen sind in Tab. 11 nachzulesen.

	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Genomische DNA		20 ng
RL Puffer	10 x	1 x
<i>HindIII</i>	10 U/ μl	2,5 U
<i>MseI</i>	10 U/ μl	2,5 U
<i>HindIII</i> -Adapter	1 μM	0,5 pmol
<i>MseI</i> -Adapter	10 μM	10 pmol
ATP	10 mM	0,2 mM
T4 DNA Ligase	2 U/ μl	0,1 U
A. bidest	ad 30 μl	

2.2.4.4 Amplifikation

Dem eigentlichen Amplifikationsschritt mit drei selektiven Basen wurde die Amplifikation mit einer selektiven Base (Präamplifikation) vorgeschaltet.

In der Präamplifikation dient die verdaute und ligierte DNA als Templat (vgl. Tab. 4). Für die Reaktion wurden 5 μl Templat und die beiden Präamplifikationsprimer mit jeweils einer selektiven Base eingesetzt (vgl. Tab. 11). Die erhaltenen Präamplifikate wurden im Verhältnis 1:20 mit 1 x TE-Puffer (pH 8,3) verdünnt. Das verdünnte Präamplifikat diente als Templat für den nachfolgenden Amplifikationsschritt.

Für die selektive Amplifikation der Produkte wurden Primer mit jeweils drei selektiven Basen verwendet (Tab. 11). Dabei entsprach die erste der drei Basen der selektiven Base, die schon in der Präamplifikation eingesetzt worden ist. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe einer

Touchdown-PCR (Don *et al.* 1991). Dabei wurde die Anlagerungstemperatur der zu erwartenden Schmelztemperatur des Primers (T_a) zyklusweise angenähert und über diese hinaus abgesenkt. Dadurch werden Primerdimere und Artefakte verringert, die Spezifität der PCR-Reaktion erhöht und vorzugsweise das gewünschte Fragment vermehrt. Zur Verbesserung der Ausbeute an gewünschten Amplifikaten wurde anschließend eine hohe Anzahl an PCR-Zyklen mit niedriger Anlagerungstemperatur durchgeführt. Die *HindIII*-Primer waren mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (IRD 700 fluoresziert im Wellenlängenbereich von 700 nm, IRD 800 bei 800 nm, Primersequenzen siehe Tab. 11). Aufgrund der unterschiedlichen Wellenlängen konnten jeweils zwei Primerkombinationen im gleichen Ansatz bearbeitet werden. Die Tab. 5 gibt die jeweils verwendeten Konzentrationen der einzelnen Reagenzien für einen 10 μ l-Reaktionsansatz wieder.

Tab. 4: Reaktionsansatz für die Präamplifikation der AFLP-Methode.

Das Volumen des Ansatzes betrug 50 μ l. Als Templat wurden 5 μ l der verdauten, ligierten DNA eingesetzt. An das 3'-Ende des *MseI*-Primers wurde entweder A oder C als selektive Base angehängt (vgl. Tab. 11).

	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Templat		
PCR-Puffer	10 x	1 x
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM
Primer <i>HindIII</i> +A	50 ng/ μ l	1,5 ng/ μ l
Primer <i>MseI</i> +C/A	50 ng/ μ l	2,5 ng/ μ l
Taq DNA Polymerase	5 U/ μ l	1 U
A. bidest	ad 50 μ l	

Die Präamplifikation wurde im T1-Cycler (Biometra) durchgeführt. Das Programm folgte den Angaben von Debener und Mattiesch (1999):

1. Denaturierung:	94 °C	30 s
2. Anlagerung der Primer:	60 °C	30 s
3. Kettenverlängerung:	72 °C	60 s
4. Finale Kettenverlängerung:	72 °C	7 min
Die Schritte 1 bis 3 wurden 19-mal wiederholt.		

Tab. 5: Reaktionsansatz für die selektive Amplifikation der AFLP-Methode.

Der Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 10 µl. Als Templat wurden 2,5 µl der 1:20 verdünnten, präamplifizierten DNA eingesetzt. Der *MseI*-Primer blieb unmarkiert, die beiden *HindIII*-Primer besaßen eine Fluoreszenzmarkierung (IRD700 *HindIII*+3= *HindIII*-Primer mit drei selektiven Basen und einer Fluoreszenzmarkierung bei 700 nm, IRD800 *HindIII*+3= *HindIII*-Primer mit drei selektiven Basen und einer Fluoreszenzmarkierung bei 800 nm). Triton X-100 ist ein Detergenz, das die Polymerase besser in Lösung hält. Die Sequenzen der Primer sind Tab. 11 zu entnehmen.

	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Templat		
PCR-Puffer	10 x	1 x
MgCl ₂	25 mM	2 mM
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM
Primer IRD700 <i>HindIII</i> +3	2 ng/µl	3 ng
Primer IRD800 <i>HindIII</i> +3	2 ng/µl	3,6 ng
Primer <i>MseI</i> +3	50 ng/µl	3 ng
Triton X-100	100 %	0,3 %
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	0,25 U
A. bidest	ad 10 µl	

Folgendes PCR-Programm (modifiziert nach Debener und Mattiesch 1999) kam für die Amplifikation im T1-Cycler (Biometra) zum Einsatz:

1. Denaturierung:	94 °C	30 s
2. Anlagerung der Primer:	65 °C	30 s
3. Kettenverlängerung:	72 °C	60 s
4. Denaturierung:	94 °C	30 s
5. Anlagerung der Primer:	65 °C → 56 °C	30 s
6. Kettenverlängerung:	72 °C	60 s
7. Denaturierung:	94 °C	30 s
8. Anlagerung der Primer:	56 °C	30 s
9. Kettenverlängerung:	72 °C	60 s
10. Finale Kettenverlängerung:	72 °C	7 min

Die Schritte 4 bis 6 wurden 11-mal wiederholt, wobei die Anlagerungstemperatur in jedem Schritt um 0,7 °C verringert wurde. Die Schritte 7 bis 9 wurden danach 35-mal wiederholt.

Die erhaltenen AFLP-Amplifikate wurden elektrophoretisch auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Kap. 2.2.3) und die erhaltenen Bandenmuster mit verschiedenen Verfahren analysiert.

2.2.4.5 Reproduzierbarkeitstest

Ein für Fingerprintmethoden häufig diskutiertes Thema ist die Reproduzierbarkeit der entstandenen Bandenmuster (Weising et al. 1995a; Fang und Roose 1997; Jones et al. 1997; Weising et al. 2005). Aus diesem Grund wurde vor Beginn der eigentlichen AFLP-Studie ein Reproduzierbarkeitstest auf mehreren Ebenen durchgeführt. Die dabei eingesetzte Strategie ist in Abb. 6 zusammengefasst. Aus derselben Pflanze wurde zweimal unabhängig voneinander DNA isoliert. Aus beiden Isolaten wurden jeweils ein Restriktions/Ligationsansatz, eine Präamplifikation und eine Amplifikation durchgeführt. Der Restriktions/Ligationsansatz wurde für eine Probe wiederholt und von diesem wurden wiederum zwei Präamplifikationsreaktionen angesetzt. Schließlich diente einer der beiden Präamplifikationsansätze als Templat für zwei unabhängige Amplifikationsreaktionen.

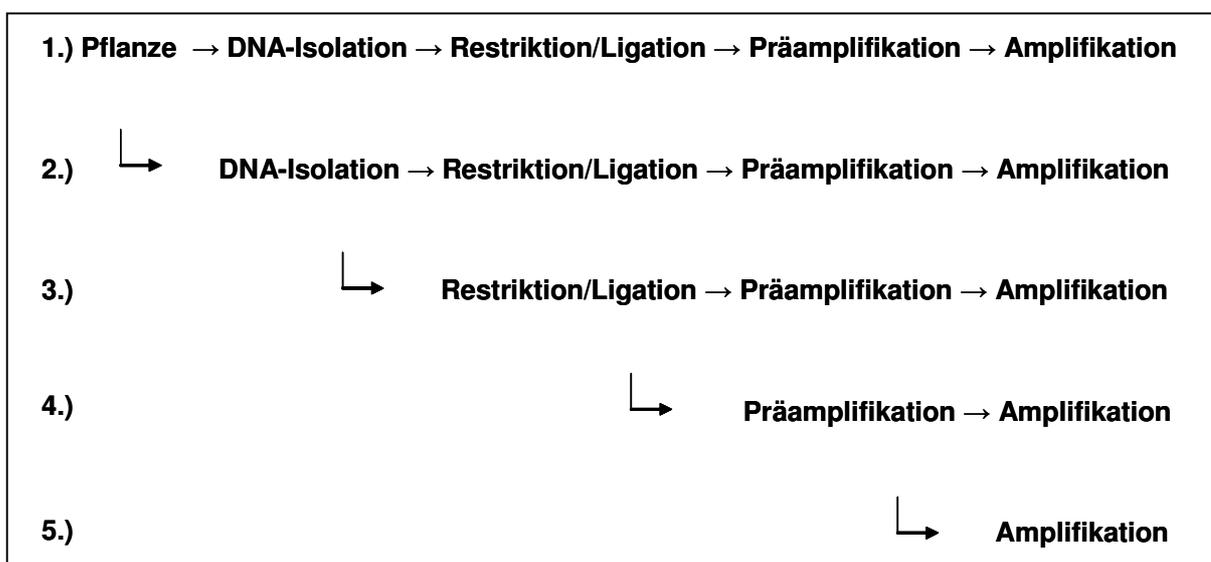


Abb. 6: Versuchsansatz für die Reproduzierbarkeitstests der AFLP-Methode auf verschiedenen Ebenen.

Jeder Schritt wurde aus dem vorhergehenden in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Die AFLP-Muster der fünf Amplifikationen wurden miteinander verglichen.

2.2.4.6 Codierung der Bandenmuster und Erstellung von Datenmatrizen

Erstellen einer binären Datenmatrix

Zur Erstellung und Auswertung der Datenmatrix der AFLP-Analyse wurden die Rohdaten (Bandenmuster) in das Programm Genelmager 4.05 (Scanalytics 1990-1998) eingelesen und mit dessen Hilfe eine binäre Matrix erstellt. Eine an einer bestimmten Position vorhandene Bande wurde mit 1, ihre Abwesenheit mit 0 kodiert. Nur deutlich sichtbare Banden mit einer Mindestgröße von 30 bp wurden ausgewertet. War die Templat-DNA bereits degradiert, traten generell nur sehr kleine Fragmente auf.

Komigrierende Banden mit gleicher Intensität wurden als homologes Merkmal gewertet, jene die starke Intensitätsunterschiede aufwiesen hingegen nicht. Dabei war das Editieren von Hand notwendig, da das Programm Genelmager oftmals Banden, die deutlich nicht auf

einer Höhe liefern, als gleiches Merkmal wertete. Proben, die im ersten Experiment keine oder nur schwache Banden aufwiesen, wurden erneut amplifiziert und konnten durch Verwendung interner Standards meist auch zu einem späteren Zeitpunkt in die Matrix integriert werden. Proben, die mit einem bestimmten Primerpaar auch nach Wiederholung keine Amplifikate lieferten, wurden als „missing data“ betrachtet und mit „4“ kodiert. Jene, die mit mehr als einem Primerpaar keine Amplifikate erzeugten, mussten aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Umwandlung der binären Datenmatrix in eine Ähnlichkeits- oder Distanzmatrix

Die binäre Datenmatrix wurde nun mit Hilfe des Computerprogrammes NTSYS-pc Version 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Rohlf 2000) weiterverarbeitet und unter Verwendung der „Similarity“-Funktion in eine paarweise Ähnlichkeitsmatrix umgewandelt. Zu diesem Zweck stehen eine Reihe von Distanz- bzw. Ähnlichkeit-Indizes zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden die Berechnungen auf der Basis des Jaccard-Index „J“ (Jaccard 1908) und des Nei & Li-Index (Nei und Li 1979) durchgeführt.

$$J = n_{ab} / (n_a + n_b - n_{ab})$$

J:	Jaccard-Koeffizient
n_{ab} :	Anzahl gemeinsam vorhandener Banden der Taxa a und b
n_a :	Anzahl aller vorhandenen Banden für a
n_b :	Anzahl aller vorhandenen Banden für b
a, b:	zwei taxonomische Einheiten

$$F = 2n_{ab} / (n_a + n_b)$$

F:	Nei und Li-Koeffizient
n_{ab} :	Anzahl gemeinsam vorhandener Banden der Taxa a und b
n_a :	Anzahl aller vorhandenen Banden für a
n_b :	Anzahl aller vorhandenen Banden für b
a, b:	zwei taxonomische Einheiten

Der Nei & Li-Index wird auch als Dice-Index (Dice 1945) bezeichnet. Bei beiden Indizes handelt es sich um Ähnlichkeitsmaße, die nur gemeinsam vorhandene Banden (1/1) als homologe Merkmale berücksichtigen, nicht jedoch gemeinsam abwesende Banden (0/0). Dabei ergeben sich Werte zwischen 0 (völlig verschieden) und 1 (identisch) (Bussell *et al.* 2005).

Die entsprechenden Distanzen und die daraus resultierende Distanzmatrix (D) lassen sich nach folgender Formel berechnen:

$$D_A = 1 - A.$$

D_A :	paarweise Distanz
A:	paarweise Ähnlichkeit

Die Berechnung von Ähnlichkeitsbäumen auf der Basis der Distanzmatrizen ist in Kapitel 2.3.3 beschrieben.

2.2.5 Vergleichende DNA-Sequenzierung

2.2.5.1 Allgemeine Grundlagen

Eine Standardmethode zur molekularsystematischen Untersuchung ist die vergleichende DNA-Sequenzierung. Dafür kann sowohl Kern- als auch Chloroplasten- und Mitochondrien-DNA herangezogen werden. Die Amplifikation und Sequenzierung geeigneter Kern-DNA-Bereiche erwies sich für Bromeliaceae als schwierig und wurde deshalb lange Zeit nicht eingesetzt (vgl. Kap. 2.2.1).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Chloroplasten- und Mitochondrienloci auf ihre Verwendbarkeit für eine phylogenetische Analyse der Gattung *Fosterella* getestet und eine Auswahl Erfolg versprechender Regionen für alle untersuchten Taxa vergleichend sequenziert.

2.2.5.2 Chloroplasten-DNA-Analyse

Untersuchtes Pflanzenmaterial

In die Chloroplastenanalyse wurden zunächst 61 Akzessionen der Gattung *Fosterella* aus 24 der bisher beschriebenen 30 Arten einbezogen. Bei der Probenauswahl wurden die Ergebnisse der AFLP-Analyse berücksichtigt. Darüber hinaus wurden zusätzliche Proben und weitere Arten einbezogen, die in der AFLP-Studie keine Ergebnisse lieferten bzw. nicht zur Verfügung standen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Großteil der ausgewählten Proben eine klare Artzuordnung besaß. Von sechs *Fosterella*-Arten stand zum Zeitpunkt der Untersuchung leider kein Material zur Verfügung. Die Amplifikation von DNA aus Herbarmaterial war nicht erfolgreich. Für die Analyse der taxonomischen Stellung der Gattung *Fosterella* innerhalb der Bromeliaceae wurden zudem zwei Proben aus zwei Gattungen der Brocchinioideae, 18 Proben aus vier Gattungen der Pitcairnioideae s. str., zwei Proben der Hechtioideae, fünf Proben der Puyoideae, zehn Proben aus sechs Gattungen der Bromelioideae und neun Proben aus vier Gattungen der Tillandsioideae sequenziert (Bezeichnung der Unterfamilien nach Givnish *et al.* im Druck).

Auswahl der Zielregionen

In Pilotexperimenten wurden zunächst einige der am häufigsten für Untersuchungen auf Artebene verwendeten Chloroplasten-Loci (vgl. Shaw *et al.* 2005) mit fünf Akzessionen aus vier Arten der Gattung *Fosterella* nebst einer Probe von *Nicotiana tabacum* als Positivkontrolle amplifiziert. Da für die meisten Loci die Größe des Amplifikats von *N. tabacum* bekannt war, konnte durch ungefähren Größenvergleich festgestellt werden, ob das gewünschte Amplifikat erzeugt wurde.

Die ausgewählten Loci und Primersequenzen sowie die jeweilige Literaturreferenz sind in Tab. 6 zusammengefasst. Im Folgenden werden die untersuchten Loci kurz beschrieben:

Taberlet-Primer

Die Chloroplasten-DNA enthält etwa 30 tRNA-Gene (*trn*), die über das gesamte Genom verstreut angeordnet sind. Für den Bereich *trnT* bis *trnF* sind von Taberlet *et al.* (1991) universelle Primer entwickelt und an Algen, Moosen und Gefäßpflanzen erfolgreich getestet worden. Die Region schließt die tRNA Gene *trnT*, *trnL* und *trnF* mit den enthaltenen Intron- und den Spacerbereichen ein. Diese Gene befinden sich auf dem großen Einzelkopiebereich (large single copy) des Chloroplastengenoms. Die Primer wurden passend gegen die distalen Enden der hoch konservierten tRNA Gene konstruiert und sind damit auf ein breites Spektrum höherer Pflanzen anwendbar. Die Bezeichnung der Primer mit A/B für die Spacerregion zwischen *trnT-trnL*, mit C/D für das *trnL*-Intron und mit E/F für den *trnL-trnF*-Spacer ist ebenfalls gebräuchlich. Vor allem die beiden letztgenannten Regionen erwiesen sich in zahlreichen Studien auf Gattungs- und Artebene als informativ (z. B. Sang *et al.* 1997; Widmer und Baltisberger 1999; Horres *et al.* 2000; Klak *et al.* 2003; Vanderpoorten *et al.* 2003; Small *et al.* 2005; Barfuss *et al.* 2005b).

trnS-trnG-Intergenischer Spacer

Die Gene *trnS* und *trnG* befinden sich ebenfalls auf dem großen Einzelkopiebereich des Chloroplastengenoms, allerdings viel näher an der Wiederholungsregion A (IR_A) als die eben genannten. Ihr intergenischer Spacer weist eine Länge zwischen 800 und 1000 bp auf, seine Variabilität wurde sowohl zwischen verschiedenen Arten der Sojabohne (Xu *et al.* 2000) als auch für den Tribus *Sinningieae* (Gesneriaceae, Perret *et al.* 2003) als relativ gering eingestuft. Innerhalb der Gattung *Prunus* Untergattung *Prunus* zeigte der Spacer allerdings eine gute Variabilität (Shaw und Randall 2004). Hamilton *et al.* (2003) konnten für diesen Locus eine Sequenzdivergenz von 10 % innerhalb der Familie der Lecythidaceae nachweisen.

ccmp 1 bis 10

Weising und Gardner (1999) entwickelten zehn universelle Primerpaare zur Untersuchung von Mikrosatellitenregionen des Chloroplastengenoms bei dikotylen Angiospermen. Sie nannten die Primer, die in konservierten Regionen des Chloroplastengenoms binden, ccmp für „consensus chloroplast microsatellite primers“. Die Universalität der Primer und die häufige Anwesenheit von innerartlich variablen Mikrosatelliten in den Amplifikaten wurde in zahlreichen späteren Arbeiten bestätigt, u. a. von Mengoni *et al.* (2000) an Luzerne und von Vogel *et al.* (2003) an *Macaranga*. Die Position und die Zielsequenzen der Primerpaare sind Tab. 6 zu entnehmen.

atpB-rbcL-Intergenischer Spacer

Der Bereich zwischen dem *atpB*- und dem *rbcL*-Gen wurde bereits für eine große Bandbreite an Pflanzen untersucht. Das *rbcL*-Gen kodiert für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase, das *atpB*-Gen für eine Untereinheit der ATPase-β. Beide Gene liegen nahe beieinander auf der cpDNA, allerdings auf den unterschiedlichen DNA-Strängen.

Anhängig von der untersuchten Pflanze liegen die beiden Regionen meist etwa 600-800 bp auseinander (Manen *et al.* 1994a), die Größe kann jedoch aufgrund von Indels teilweise enorm variieren (vgl. Schütze *et al.* 2003 und die vorliegende Studie).

Die Region wurde bisher zur phylogenetischen Untersuchung von Unterfamilien (vgl. Manen *et al.* 1994; Schütze *et al.* 2003; Barfuss *et al.* 2004), Gattungen, Arten und sogar auf Populationsebene eingesetzt (Savolainen *et al.* 1994; Natali *et al.* 1995; Klak *et al.* 2003; Huang *et al.* 2005; Janssens *et al.* 2006).

rps16-Intron

Die *rps*-Gene kodieren Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit im Chloroplastengenom. Das *rps16*-Gen besitzt ein Gruppe II-Intron, mit dem Oxelman *et al.* (1997) erste phylogenetische Untersuchungen auf intra- und intergenerischer Ebene (Tribus Sileneae) durchführten. Die gesamte Region besitzt eine Größe von 800-900bp. Die oftmals leichte Amplifizier- und Sequenzierbarkeit und hohe Variabilität machen das Intron zu einem nützlichen Marker für phylogenetische Untersuchungen. Shaw *et al.* (2005) zeigten, dass diese Region für alle in ihre Studie einbezogenen Angiospermen und für zwei der drei untersuchten Gymnospermen anwendbar ist. Weitere mit diesem Marker (allein oder in Kombination mit anderen) durchgeführte Studien auf unterschiedlichem taxonomischen Niveau fanden u. a. an *Glycine* (Xu *et al.* 2000), an Oleaceae (Wallander und Albert 2000), an Colchicaceae (Vinnersten und Reeves 2003) und an Bromeliaceae statt (Barfuss *et al.* 2005a).

psbB-psbH- und psbA-trnH-Intergenischer Spacer

Ein Großteil der proteinkodierenden Gene des Chloroplastengenoms kodieren für Bestandteile des Photosystems. Komponenten des Photosystems I werden dabei als *psa*, die des Photosystems II als *psb* bezeichnet. Alle vier Gene bzw. beide Spacerbereiche liegen auf dem großen Einzelkopiebereich des Chloroplastengenoms, allerdings in verschiedenen Regionen. Der Spacerbereich von *psbB-psbH* beinhaltet zudem zwei weitere Gene: *psbN* und *psbT*. Die Spacer wurden mit unterschiedlichem Erfolg, meist kombiniert mit anderen cpDNA-Regionen in phylogenetischen Studien auf unterschiedlichem taxonomischen Niveau eingesetzt (z. B. Sang *et al.* 1997; Xu *et al.* 2000; Klak *et al.* 2003). Hamilton *et al.* (2003) wiesen z. B. für *psbA-trnH* innerhalb der Lecythydaceae eine Sequenzdivergenz von 15 % nach.

matK-Gen

Das *matK* Gen ist ca. 1600 bp lang, liegt ebenfalls auf dem großen Einzelkopiebereich des Chloroplastengenoms und ist innerhalb des *trnK*-Introns lokalisiert. Es kodiert höchstwahrscheinlich eine Maturase, deren Funktion das Spleißen von Gruppe II-Introns ist (Neuhaus und Link 1987; Ems *et al.* 1995; Vogel *et al.* 1997). *MatK* ist wahrscheinlich die einzige Maturase in höheren Pflanzen (Vogel *et al.* 1997) und wurde schon häufig in phylogenetischen Studien eingesetzt (z. B. Hilu und Liang 1997; Azuma *et al.* 1999; Hilu *et al.* 2003; Barfuss *et al.* 2005a).

Das *matK*-Gen hat gegenüber den meisten anderen Genen, die für phylogenetische Studien von Angiospermen eingesetzt werden, drei Vorteile. Es weist:

- eine größere Anzahl an Basensubstitutionen auf,
- alle drei Codonpositionen besitzen die gleiche Mutationsrate und es hat
- eine größere Anzahl an Indels (Johnson und Soltis 1994; Johnson und Soltis 1995; Hilu und Liang 1997; Hilu *et al.* 2003).

Olmstedt und Palmer (1992) zeigten, dass die Basensubstitutionsrate von *matK* im Vergleich zwischen dem monokotylen Reis und dem dikotylen Tabak bis zu sechsmal höher ist als für *atpB* und *rbcL*. Auch in phylogenetischen Studien von Bromeliaceae wurde *matK* bereits eingesetzt. So konnten Barfuss *et al.* (2004) in ihrer Sieben-Marker-Analyse der Tillandsioideae für dieses Gen die größte Auflösung feststellen, obwohl die anderen Regionen Spacer und Introns waren. Crayn *et al.* (2000a) fanden bei der Untersuchung der Pitcairnioideae mit *matK* allerdings nur eine niedrige Sequenzvariation.

Bezeichnung	Sequenzen	cpDNA-Region	T _a [°C]	Fragmentlänge [bp] <i>N. tabacum</i>	Referenz
ccmp 1	5´ - CAG GTA AAC TTC TCA ACG GA - 3´	<i>trnK</i> Intron	58	139	(Weising und Gardner 1999)
	5´ - CCG AAG TCA AAA GAG CGA TT - 3´				
ccmp 2	5´ - GAT CCC GGA CGT AAT CCT G - 3´	5´ zu <i>trnS</i>	60	189	
	5´ - ATC GTA CCG AGG GTT CGA AT - 3´				
ccmp 3	5´ - CAG ACC AAA AGC TGA CAT AG - 3´	<i>trnG</i> Intron	56	112	
	5´ - GTT TCA TTC GGC TCC TTT AT - 3´				
ccmp 4	5´ - AAT GCT GAA TCG AYG GAC CTA - 3´	<i>atpF</i> Intron	58	126	
	5´ - CCA AAA TAT TBG GAG GAC TCT - 3´				
ccmp 5	5´ - TGT TCC AAT ATC TTC TTG TCA TTT - 3´	3´ zu <i>rps2</i>	58	121	
	5´ - AGG TTC CAT CGG AAC AAT TAT - 3´				
ccmp 6	5´ - CGA TGC ATA TGA AGA AAG CC - 3´	ORF 77 - ORF 82	58	103	
	5´ - CAT TAC GTC CGA CTA TCT CC - 3´				
ccmp 7	5´ - CAA CAT ATA CCA CTG TCA AG - 3´	<i>atpB-rbcL</i> lg Spacer	56	133	
	5´ - ACA TCA TTA TTG TAT ACT CTT TC - 3´				
ccmp 8	5´ - TTG GCT ACT CTA ACC TTC CC - 3´	<i>rpl20 - rps12</i> lg Spacer	58	77	
	5´ - TTC TTT CTT ATT TCG CAG DGA A - 3´				
ccmp 9	5´ - GGA TTT GTA CAT ATA GGA CA - 3´	ORF 74b- <i>psbB</i> lg Spacer	54	98	
	5´ - CTC AAC TCT AAG AAA TAC TTG - 3´				
ccmp 10	5´ - TTT TTT TTT AGT GAA CGT GTC A - 3´	<i>rpl2-rps19</i> lg Spacer	56	103	
	5´ - TTC GTC GDC GTA GTA AAT AG - 3´				

Tab. 6: Getestete Chloroplasten-DNA-Loci für die Sequenzanalyse der Gattung *Fosterella*. Die Primer, ihre Sequenzen und die angegebene Anlagerungstemperatur, sowie die Fragmentgrößen in *Nicotiana tabacum* gehen (wenn nicht anders angegeben) auf die aufgeführten Autoren zurück. Abkürzungen: lg Spacer = Inter-genischer Spacer, *Fragmentgröße nach eigener Schätzung, Fragmentgröße in Monocotylen (Hillu und Liang 1997).

Bezeichnung	Sequenzen	cpDNA-Region	Ta [°C]	Fragmentlänge [bp] <i>N. tabacum</i>	Referenz
Tab A/B	5' - CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT - 3'	<i>trnT</i> – <i>trnL</i> Ig Spacer	50 - 55	773	(Taberlet <i>et al.</i> 1991)
	5' - TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC - 3'				
Tab C/D	5' - CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG - 3'	<i>trnL</i> Intron	50 - 55	577	
	5' - GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC - 3'				
Tab E/F	5' - GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC - 3'	<i>trnL-trnF</i> Ig Spacer	50 - 55	438	
	5' - ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG - 3'				
<i>rpsF</i> (fwd) <i>rpsR2</i> (rev)	5' - GTG GTA GAA AGC AAC GTG CGA CTT - 3'	<i>rps16</i> Intron	60	900 *	(Wallander und Albert 2000)
	5' - TGC GGA TCG AAC ATC AAT TGC AAC - 3'				(Oxelmann <i>et al.</i> 1997)
<i>psbA</i> - <i>trnH</i>	5' - TGA TCC ACT TGG CTA CAT CCG CC - 3'	<i>psbA</i> – <i>trnH</i> Ig Spacer	60	590 *	(Sang <i>et al.</i> 1997)
	5' - GCT AAC CTT GGT ATG GGA GT - 3'				
<i>trnS</i> - <i>trnG</i>	5' - GAT TAG CAA TCC GCC GCT TT - 3'	<i>trnS</i> – <i>trnG</i> Ig Spacer	60	850 *	(Xu <i>et al.</i> 2000)
	5' -TTA CCA CTA AAC TAT ACC CGC - 3'				
<i>atpB</i> - <i>rbcl</i>	5' - GAA GTA GTA GGA TTG ATT CTC - 3'	<i>atpB</i> – <i>rbcl</i> Ig Spacer	58	900 *	(Manen <i>et al.</i> 1994b)
	5' - CAA CAC TTG CTT TAG TCT CTG - 3'				
<i>psbB</i> - <i>psbH</i>	5' - AGA TGT TTT TGC TGG TAT TGA - 3'	<i>psbB</i> – <i>psbH</i> Ig Spacer	56	750 *	(Xu <i>et al.</i> 2000)
	5' -TTC AAC AGT TTG TGT AGC CA - 3'				
<i>matK5</i> (F)	5' - ATA CCC TGT TCT GAC CAT ATT G - 3'	<i>matK</i> Gen, liegt im Intron des <i>trnK</i> -Gens	52	~1500#	(Crayn <i>et al.</i> 2004)
<i>matK2</i> (R)	5' - AAC ATA ATG CAT GAA AGG ATC C - 3'				

Tab. 6: Fortsetzung

In den Hauptversuchen wurden die in Tab. 6 fett hervorgehobenen Regionen amplifiziert.

Amplifikation der Chloroplasten-DNA

Die Amplifikation der in Tab. 6 aufgeführten Chloroplastenloci erfolgte unter Variation der Primer mit einem standardisierten Reaktionsansatz (siehe Tab. 7).

Die erhaltenen Amplifikate wurden auf 1,5 %igen Agarosegelen parallel zu einem Standardgrößenmarker (siehe Kap. 2.2.3) aufgetrennt. So konnten gleichzeitig die Intensität, die Qualität und die ungefähre Größe der Fragmente bestimmt werden.

Die Amplifikation von Fragmenten, die anschließend sequenziert werden sollten, erfolgte mit „M13-getailten“ Primern, um in der Sequenzierreaktion immer mit den gleichen fluoreszenzmarkierten Primern arbeiten zu können. Getailte Primer enthalten neben den Primerbindungssequenzen eine Verlängerung (tail). An diese Sequenz, welche in der PCR mit amplifiziert wird, binden in der nachfolgenden Sequenzierreaktion universelle Sequenzierprimer, die wiederum die zu den „tails“ komplementären Sequenzen besitzen.

Tab. 7: Reaktionsansatz einer PCR mit Chloroplasten- und Mitochondrien-DNA-Primern.

BSA (Rinder-Serumalbumin) ist ein Protein, das freie Oberflächen absättigt und so alle PCR-Zutaten besser in Lösung hält. DMSO (Dimethylsulfoxid) ist ein Zusatzstoff, der die Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen unterstützt und somit häufig in der Amplifikation GC-reicher Fragmente eingesetzt wird (Frackman *et al.* 1998). Der Einsatz von BSA und DMSO in der PCR erfolgte nicht standardmäßig. *variabel eingesetzte Zutaten.

	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Templat	2 ng/μL	
10 x PCR- Puffer	10 x	1 x
MgCl ₂	50 mM	2,5 mM
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM
Primer fwd*	10 μM	1 μM
Primer rev*	10 μM	1 μM
DMSO*	100 %	10 %
BSA*	20 μg/μl	5 μg
Taq DNA Polymerase	5 U/μL	0,02 U
A. bidest	ad 25 μl	

Für die Amplifikation der Chloroplastenfragmente wurde ein PCR-Programm nach Weising und Gardner (1999) verwendet:

1. Eingangsdennaturierung:	94 °C	5 min
2. Denaturierung:	94 °C	1 min
3. Anlagerung der Primer:	Ta	1 min*
4. Kettenverlängerung:	72 °C	1 min
5. Finale Kettenverlängerung:	72 °C	8 min**

Die Schritte 2 bis 4 wurden 30 x wiederholt.
 Anlagerungstemperatur=(Ta) (siehe Tab. 6)
 *2 min für alle Primer außer ccmp
 **10 min für alle Primer außer ccmp und Taberlet

Die amplifizierten Proben wurden bei 4 °C dauerhaft im Kühlschrank aufbewahrt. Sie dienten als Templat für die Sequenzierreaktion.

2.2.5.3 Mitochondrien-DNA-Analyse

Untersuchtes Pflanzenmaterial

Für die Mitochondrien-DNA-Primertests wurde zunächst nur ein kleines Probenet ausgewählt. Bei der Auswahl der Proben wurde darauf geachtet, dass sie (nach bisherigem Erkenntnisstand) nicht allzu nahe miteinander verwandt sind. Folgende Proben wurden eingesetzt: *F. micrantha* (DNA-Nr. 133a), *F. elata* (60a) und *F. schidosperma* (86a). Als Positivkontrolle wurde DNA von *Brassica napus* verwendet. In Tab. 8 wird eine Übersicht der getesteten Primer und die Bewertung ihrer Amplifikationsergebnisse auf Agarose gezeigt.

Auswahl der Zielregionen

Die Auswahl der zu amplifizierenden Loci erfolgte auf der Grundlage der Arbeiten von: Demesure *et al.* (1995), Dumolin-Lapégué *et al.* (1997) und Duminil *et al.* (2002). Um genügend Variabilität zu finden, wurden Regionen ausgewählt, die sowohl Gene als auch Intron- und Spacerbereiche enthalten und deren Fragmente eine Mindestlänge von 500 bp aufweisen. Die Fragmentlänge sollte wiederum 1500 bp nicht überschreiten, um eine Sequenzierung in höchstens zwei Schritten zu ermöglichen. Die Definition der Intronbereiche erfolgt mittels Erwähnung der anschließenden Exons, z. B. entspricht die Bezeichnung *nad7/2 - nad7/3r* dem Intron des Gens *nad7* zwischen den Exons 2 und 3. Die in den Hauptversuchen verwendeten Primer wurden ebenfalls „M13-getailt“ verwendet. Eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit untersuchten Regionen, die verwendeten Primer, ihre Sequenzen und die entstanden Fragmentgrößen im untersuchten Organismus sind in Tab. 8 zu finden.

Die meisten Gene liegen auf dem durch CsCl-Gleichgewichtsgradienten als schwerer identifizierten H-Strang (h= heavy) des mtGenoms, so z. B. die proteinkodierenden Gene *nad1* bis *nad5*, die neben *nad6* (das sich auf dem leichteren L-Strang (l=light) befindet) Bestandteile des NADH-Ubiquitin-Oxidoreductase-Komplexes synthetisieren. Die Gene *cox1*

bis *cox3* kodieren Komponenten der Cytochrom c-Oxidase, die *rps*-Gene ribosomale Proteine (Knippers 2001).

Im Gegensatz zur cpDNA in der hochkonservierte und weniger konserviertere Regionen direkt nebeneinander liegen, ist der Abstand solcher Bereiche im Mitochondriengenom sehr groß. Zudem ist es aufgrund häufiger Rekombinationsereignisse in der mtDNA relativ schwierig, universelle Primer zu finden, die Bereiche amplifizieren, deren Variabilität auf niedrigem taxonomischen Niveau hoch genug ist, um phylogenetische Untersuchungen durchführen zu können

Tab. 8: Getestete Mitochondrien-DNA-Loci für die Sequenzanalyse der Gattung *Fosterella*.

Die Primer, ihre Sequenzen und die angegebene Anlagerungstemperatur sowie die Fragmentgrößen in *Nicotiana tabaccum* gehen (wenn nicht anders angegeben) auf die aufgeführten Autoren zurück. Abkürzungen: lg Spacer = Intergenescher Spacer, *Fragmentlänge im untersuchten Organismus, ** untersuchter Organismus = *Quercus robur*

Bezeichnung der Region	Sequenzen	Ta [°C]	Fragmentlänge [bp]*	Referenz
<i>cox3</i>	5´ - CCG TAG GAG GTG TGA TGT - 3´	58	704	(Duminil <i>et al.</i> 2002) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
	5´ - CTC CCC ACC AAT AGA TAG AG - 3´			
<i>nad4/L -orf 25</i>	5´ - GTC CGR GGT ACT ATT GCT GT - 3´	52	671	
	5´-CTG TYT TTT CGC ACT TAG GC - 3´			
<i>nad6</i>	5´ - TGA GTG GGT CWG TCG TCC TC - 3´	58	605	
	5´ - TGA TAC TTT CTG TTT TGT CG - 3´			
<i>orf 25</i>	5´ - AAG ACC RCC AAG CYY TCT CG - 3´	50	504	
	5´ - TTG CTG CTA TTC TAT CTA TT - 3´			
<i>rps4</i>	5´ - CST TTC YGC TCC GAA GAG - 3´	58	950	
	5´ - TCT CCG AAG GAT TGA GG - 3´			
<i>rps12-1 - nad3-2</i>	5´ - TTT CTT CTC TAC CAT GAC GA - 3´	50	700	
	5´ - TAG TCC YAC TCG GTS TTC CT - 3´			
<i>nad4/3c - nad4/4r</i>	5´ - GGA GCT TTC CAA AGA AAT AG - 3´	57	1011	(Dumolin-Lapègue <i>et al.</i> 1997) (<i>Marchantia polymorpha</i>)
	5´ - GCC ATG TTG CAC TAA GTT AC - 3´			
<i>nad7/2 - nad7/3r</i>	5´ - GCT TTA CCT TAT TCT GAT CG - 3	57	1064	
	5´ - TGT TCT TGG GCC ATC ATA GA - 3´			
<i>nad1exB - nad1exC</i>	5´ - GCA TTA CGA TCT GCA GCT CA - 3´	57	1550	(Demesure <i>et al.</i> 1995) **
	5´ - GGA GCT CGA TTA GTT TCT GC - 3			

Amplifikation der Mitochondrien-DNA

Der Reaktionsansatz für die Amplifikation der Mitochondrienloci entspricht dem in Tab. 7 aufgeführten und schon für die Amplifikation der Chloroplastenloci verwendeten PCR-Ansatz. BSA wurde generell in einer Endkonzentration von 2 µg eingesetzt.

Die Reaktion wurde im T1-Cycler (Biometra) mit folgendem Programm (modifiziert nach Duminil *et al.* 2002) durchgeführt:

1. Eingangsdenaturierung:	94 °C	4 min
2. Denaturierung:	94 °C	45 s
3. Anlagerung der Primer:	AT	45 s
4. Kettenverlängerung:	72 °C	1 min
5. Finale Kettenverlängerung:	72 °C	4 min

Die Schritte 2 bis 4 werden 35 x wiederholt.
AT=Anlagerungstemperatur=(Ta) (siehe Tab. 8).

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel verifiziert, später sequenziert und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.5.4 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate erfolgte mit bzw. ohne vorhergehende Gelelektrophorese.

Verwendete Reagenzien:

- NucleoSpin®Extract-Kit (Macherey-Nagel)
 - QIAquick®PCR Purification Kit (Qiagen)
 - 1 x TAE-Elektrophoresepuffer, pH 8,0 (→)
 - 2 % Seakem®LE Agarose (Biozym)
 - Färbe-Lösung (→)
- | |
|------------------------|
| <u>1 x TAE-Puffer:</u> |
| 40 mM Tris-Acetat |
| 1 mM EDTA |
| <u>Färbe-Lösung:</u> |
| 1 µg/ml Ethidiumbromid |
| in 1 x TAE-Puffer |

Zum Ausschneiden und Aufreinigen von PCR-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde eine hochauflösende Agarose verwendet. Jeweils 20 µl der Probe wurden mit 5 µl DNA-Auftragspuffer versetzt und parallel zu einem Molekulargewichtsmarker elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid in TAE-Puffer gefärbt. Die PCR-Fragmente wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe eines Qiagen-Kits nach Anweisung des Herstellers (Qiagen 2003). Die aufgereinigten Fragmente konnten anschließend sequenziert werden.

Für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten ohne vorhergehende Gelelektrophorese kam ein Kit der Firma Macherey-Nagel zum Einsatz. Auch hier wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt (Macherey-Nagel GmbH 2005).

2.2.5.5 Sequenzierung der PCR-Fragmente

Die Sequenzierung der PCR-Fragmente basiert auf der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977), wobei eine Variante des „Cycle-Sequencing“ (Murray 1989) verwendet wurde.

Die Amplifikate wurden mit einem automatischen Sequenzierer der Firma LI-COR bidirektional sequenziert (Fartmann *et al.* 1999). Die Reaktion wurde mit universellen, fluoreszenzmarkierten Primern (siehe Tab. 9) und dem Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Dieses Kit soll gewährleisten, dass die Signalintensität der vier Reaktionen (A, C, G, T) möglichst identisch ist, damit eine computergestützte Auswertung vereinfacht wird. Zudem bewirken die chemischen Komponenten dieses Kits die Auflösung komplexer Sekundärstrukturen der DNA und vereinfachen so ein Ablesen durch die Polymerase.

Tab. 9: Sequenzen der M13-Universal-Primer (Fartmann *et al.* 1999).

Der Vorwärtsprimer besitzt einen Fluoreszenzfarbstoff der bei einer Wellenlänge von 700 nm emittiert (IRDye 700), der Rückwärtsprimer fluoresziert bei 800 nm (IRDye 800). Ta=Schmelz- oder Anlagerungstemperatur des Primers.

Primer	Fluoreszenzfarbstoff	Sequenz	Ta [°C]
M13universal	IRDye 700	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'	57
M13reverse	IRDye 800	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'	57

Tab. 10: Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion ohne Thermosequenasekit.

Als Templat wurde das zuvor mit den getailten Primern erzeugte Amplifikat verwendet. Je nach Konzentration des Amplifikats wurde sein Volumen im Ansatz variiert.

	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Templat		
M13universal	1 µM	3 pmol
M13 reverse	1 µM	5 pmol
A. bidest	ad 21 µl	

Jeweils 4,5 µl des in Tab. 10 aufgeführten Reaktionsmixes wurden mit 1,5 µl A-, C-, G- und T-Reagenz vermischt und die Reaktion im T1-Cycler (Biometra) durchgeführt:

1. Eingangsdenuaturierung:	95 °C	5 min
2. Denaturierung:	95 °C	15 s
3. Anlagerung der Primer:	57 °C	30 s
4. Kettenverlängerung:	70 °C	45 s
5. Finale Kettenverlängerung:	72 °C	7 min

Die Schritte 2 bis 4 wurden 25-mal wiederholt.

Vorbereitung der Proben für den Gelauftrag

Die Probenvorbereitung für den Auftrag auf das Polyacrylamidgel und die Polyacrylamid-Gelelektrophorese sind in Kapitel 2.2.3 nachzulesen. Jede einzelne Sequenzierreaktion wurde vor der Denaturierung mit einem Volumen Formamidpuffer versetzt. Die Sequenzierung wurde bidirektional mit jeweils zwei Primern, die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe besaßen, in der gleichen Reaktion durchgeführt. Die entstandenen Gelbilder wurden mit Hilfe der e-Seq™ DNA Sequencing Software V 2.0 der Firma LI-COR dargestellt, gespeichert und später weiter bearbeitet.

2.2.5.6 Editierung und Sequenzalignment

Die erhaltenen Sequenzen wurden zunächst mit der e-Seq Software bearbeitet. Ein anschließendes Editieren von Hand war unumgänglich, da die Software nicht immer korrekt arbeitet. Vor allem Sequenzabfolgen, die ein Hintergrundrauschen beinhalten, können mit der Software nicht eindeutig bestimmt werden.

Mit Hilfe der AlignIR™ Assembly and Alignment Software, Version 1.2 und 2.0 der Firma LI-COR wurden Vor- und Rücksequenz einer Probe übereinander gelegt und erneut editiert. An uneindeutigen Positionen wurden „Wobbel-Basen“ (z. B. M für A oder C) eingesetzt. Die Darstellung der im Laufe der Editierung korrigierten Basen erfolgte durch kleine Buchstaben. Die Consensussequenz wurde abgespeichert und später in ein Gesamtalignment der Consensussequenzen aller Proben eingefügt.

Das Programm AlignIR folgt in der Einstellung des Alignments dem Parsimonie-Prinzip, d. h. die Sequenzen werden so übereinander gelegt, dass möglichst wenig Variation entsteht. Nach Anfertigung des Gesamtalignments wurden alle variablen Positionen noch einmal überprüft und durch Einfügen von Alignierungslücken („gaps“) homologisiert. Nun konnten Sequenzunterschiede in Form von Basensubstitutionen, Insertionen und Deletionen (Indels) sichtbar gemacht werden.

Insertions- und Deletionsereignisse können nützliche phylogenetische Informationen enthalten und somit für die phylogenetische Rekonstruktion hilfreich sein (Lloyd und Calder 1991; Baldwin und Markos 1998; Simmons und Ochoterena 2000; Kawakita *et al.* 2003). Zur Integration von Indels in phylogenetische Analysen gibt es eine Reihe verschiedener Methoden (z. B. Baum *et al.* 1994; Wheeler 1996; Simmons und Ochoterena 2000) und

mittlerweile auch Computerprogramme, die die langwierige Prozedur von Hand, vor allem bei hoher Indelzahl oder überlappenden Indels, erleichtern (z. B. Müller 2005).

In dieser Arbeit wurde zur Kodierung der Indels das Programm GapCoder (Young und Healy 2003) verwendet¹. Mit GapCoder wird jedes Indel mit unterschiedlicher Anfangs- oder Endposition als eigenes Merkmal gewertet. Diese Kodierungsweise schlagen auch Simmons und Ochoterena (2000) vor. Die resultierenden Indel-Merkmale werden in einer binären Matrix kodiert (0 für abwesendes Indel, 1 für vorhandenes Indel) und an das Ende des Gesamtalignments gehängt. Die Ausgabedatei besitzt das Nexus-Format und beinhaltet am Ende eine Tabelle, die die Regionen, auf denen die Indel-Merkmale beruhen, zeigt. Die Lücken (also Indels in der Sequenz) werden bei der Berechnung mit PAUP als „missing data“ gewertet, so dass Substitutionen, die bei anderen Sequenzen in diesen Bereichen auftreten und wertvolle Information enthalten, einbezogen werden können. Im Programm PAUP kann die 0/1-Kodierung in zwei verschiedene Basen übersetzt und mitgerechnet werden (z. B. 0=A, 1=C). Die kodierten Datensätze wurden ausschließlich für Maximum Parsimonie-Analysen eingesetzt. Für Stammbaumberechnungen, denen ein Evolutionsmodell zugrunde gelegt wird, wurden Lücken im Datensatz als „missing data“ betrachtet und nicht weiter in die Analyse einbezogen.

2.2.5.7 Überprüfung erhaltener Sequenzen mit Hilfe der NCBI Gen-Bank

Für jeden Locus wurden drei der sequenzierten Proben mit Hilfe der BLAST-Software auf ihre Übereinstimmung mit Sequenzen aus der Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) überprüft. Dabei sollte ermittelt werden, ob von der gewünschten Zielregion bereits DNA-Sequenzen existieren.

Ebenso wurden aus dieser Datenbank bereits vorhandene Sequenzen für *Fosterella*-Arten heruntergeladen, um Sequenzvariationen für weitere schon untersuchte Loci (z. B. *matK*) zu ermitteln.

¹Die Inputmatrix für das Programm GapCoder muss als FASTA-Format abgespeichert werden. Sie wurde mit dem Programm AlignIRtoGapCoder von Gero Bonow erstellt. Dieses Programm diente auch dem Kombinieren verschiedener Datensätze.

2.3 Verfahren zur Datenanalyse

In den folgenden Kapiteln werden phylogenetische Rekonstruktionsverfahren zunächst allgemein vorgestellt. Anschließend erfolgt die konkrete Anwendung dieser Verfahren für die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten.

Es gibt eine Reihe statistischer Methoden, die eine Rekonstruktion phylogenetischer Bäume auf der Grundlage molekularer Daten erlauben.

Allgemein wird unterschieden zwischen:

- Distanzanalysemethoden und
- merkmalsbezogenen Analysemethoden (Parsimonie-Methode, Likelihood-Methode, u. a.).

2.3.1 Distanzen und Evolutionsmodelle

Distanzmethoden, die für die Berechnung von Topologien eingesetzt werden können, gehörten zu den ersten Methoden, die für diese Art der Datenanalyse verwendet wurden (Edwards und Cavalli-Sforza 1963; Zuckerkandl und Pauling 1965). Sie erlauben die Bestimmung evolutionärer Distanzen zwischen beliebigen Gruppen von Taxa. Auf der Basis dieser Distanzen kann ein phylogenetischer Baum erstellt werden. Für DNA-Sequenzvergleiche ist die einfachste Distanz die unkorrigierte p-Distanz, welche die prozentualen Anteile von Sequenzunterschieden darstellt (Wägele 2001). Bei der Verwendung der p-Distanz werden allerdings Mehrfach- und Rückmutationen an einer Position nicht berücksichtigt, was besonders bei großen evolutionären Abständen zu Fehlern führt. Zur Korrektur dieser Fehler macht man sich Evolutionsmodelle zu nutze.

Jukes und Cantor (1969) schlugen ein einfaches Korrekturmodell vor, bei dem angenommen wird, dass die Substitutionswahrscheinlichkeit jeder Base gleich groß ist und dass alle Basen in der Sequenz ungefähr gleich häufig vorkommen. Da in diesem Modell sehr stark vereinfacht wird, kann es nur für nahe verwandte Sequenzen angewendet werden, bei denen davon auszugehen ist, dass es pro Base maximal eine Mutation gegeben hat. Für entfernt verwandte Linien hingegen ist davon auszugehen, dass multiple Basensubstitutionen an der gleichen Position aufgetreten sind. Hierfür müssen komplexere Modelle zu Grunde gelegt werden.

Das K2P-Modell (Kimura-2-Parameter-Modell, Kimura 1980), das F84-Modell von Felsenstein (1984), und das HKW85-Modell (Hasegawa-Kishino-Yano-Modell, Hasegawa *et al.* 1985) sind Beispiele für Modelle mit differenzierter Gewichtung für Transition und Transversion. Das GTR-Modell (general time reversal model, Lanave *et al.* 1984) setzt für jeden einzelnen Typ von Basensubstitution eine eigene Wahrscheinlichkeit voraus. Die Wahl des „richtigen“ Evolutionsmodells hat einen entscheidenden Einfluss auf die Topologie der berechneten Bäume, da zu einfache, aber auch zu komplexe Modelle zur Begründung einer

falschen Verwandtschaftshypothese führen können (Wägele 2001). Ist ein geeignetes Modell gefunden, werden dessen Parameter zur Berechnung des Baumes eingesetzt.

2.3.2 Wahl der Außengruppe für die Analysen

Um die Polarität von Merkmalsveränderungen beurteilen zu können, ist es wichtig zu wissen, welche Merkmale ursprünglich und welche abgeleitet sind. Eine solche Abschätzung kann mit verschiedenen Methoden erfolgen, z. B. durch die Wahl einer Außengruppe mit dem so genannten „midpoint-rooting“ oder durch den Vergleich mit fossilen Belegen. Da über fossile Belege meist keine DNA-Information zur Verfügung steht, ist es für molekulare Daten üblich, eine Außengruppe zu wählen, die möglichst nahe mit der untersuchten Gruppe verwandt sein sollte. Dabei lässt sich auf frühere Untersuchungen oder Kenntnisse der zu analysierenden Gruppe zurückgreifen. Zudem besteht die Möglichkeit ein hypothetisches Taxon als Außengruppe zu definieren, dem für alle Merkmale ein ursprünglicher (pleisiomorpher) Zustand zugeordnet wird (all-zero-Außengruppe, vgl. Lundberg 1972; Wägele 2001). Ist die Wahl einer Außengruppe nicht möglich, kann das „midpoint-rooting“ verwendet werden. Dabei wird die Wurzel genau in der Mitte der zwei an weitesten voneinander entfernten Cluster gesetzt (Swofford *et al.* 1996).

2.3.3 Distanzanalysen

Für die Erstellung phylogenetischer Bäume gibt es verschiedene Distanzmethoden. Eine der einfachsten ist die UPGMA-Methode (unweighted pair group method using arithmetic averages, Sneath und Sokal 1973). Bei der UPGMA-Methode handelt es sich um ein Cluster-Verfahren, bei dem zunächst die beiden Taxa mit der geringsten Distanz zueinander zu einem neuen Cluster zusammengefasst werden. Für diesen neuen Datensatz werden wiederum alle paarweisen Distanzen berechnet und erneut die Cluster mit der geringsten Distanz zusammengefasst. Dabei wird für jeden Cluster jeweils die mittlere Distanz zu allen anderen Clustern oder Taxa berechnet. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis alle Taxa auf zwei verbleibende Cluster aufgeteilt sind. Die Wurzel des Baumes wird automatisch zwischen den beiden zuletzt gebildeten Clustern angebracht. Das UPGMA-Verfahren setzt voraus, dass die Daten ultrametrisch sind, d. h., dass alle Taxa/Sequenzen mit einheitlicher und konstanter Geschwindigkeit evolvieren (molekulare Uhr).

Ein weiteres häufig eingesetztes Verfahren ist die Neighbor-Joining Methode (NJ, Saitou und Nei 1987), bei der unterschiedliche Evolutionsraten berücksichtigt werden. Auch hier handelt es sich um ein Clusterverfahren, bei dem zunächst die Taxa mit der geringsten genetischen Distanz zusammengeführt werden. Zwischen diesen Individuen wird ein hypothetischer Mittelpunkt erzeugt, von dem aus erneut die genetische Distanz zum nächsten Nachbarn errechnet wird. Es entsteht ein unbewurzelter, additiver Baum, dessen Astlängen unterschiedlich und in ihrer Gesamtlänge minimiert sind.

Beide Verfahren sind schnell durchführbar und lassen sich gut für große Datensätze verwenden. Die paarweisen Distanzen, die mit Distanzmethoden errechnet werden, können

in Form eines Dendrogramms, das für phänetische Analysen auch als Phänogramm bezeichnet wird, veranschaulicht werden.

Die Aussagekraft der entstandenen Dendrogramme kann mit verschiedenen Verfahren statistisch überprüft werden, z. B. „Bremer support“ (auch Decay-Index genannt, Bremer 1988) oder das „Jackknifing“ (Quenouille 1956). Am häufigsten wird der von Felsenstein (1985) entwickelte Bootstrap-Test angewandt, der auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde und daher hier näher erläutert werden soll. Beim Bootstrapping werden aus dem vorhandenen Datensatz zufällig Merkmale ausgewählt (mit Zurücklegen) und zu einem neuen „Pseudo“-Datensatz mit gleichem Umfang zusammengefügt. Für jeden so gewonnenen Datensatz wird die optimale Topologie berechnet. Durch 100 bis 1000-fache Wiederholung dieses Vorgangs erhält man den so genannten Bootstrap-Wert, der die Häufigkeit des Vorkommens eines bestimmten Astes in den Pseudodatensätzen prozentual wieder gibt.

2.3.4 Cophänetische Koeffizientenanalyse

Die Überprüfung der Kongruenz zwischen der Ähnlichkeits- bzw. Distanzmatrix, die einer Clusteranalyse zugrunde liegt, und dem resultierenden Dendrogramm kann über die Berechnung der cophänetischen Korrelation nach Sneath und Sokal (1973) durchgeführt werden. Hierzu wird aus der die Clusteranalyse repräsentierenden Matrix eine Matrix cophänetischer (ultrametrischer) Werte berechnet und diese mit der zugrunde liegenden Ähnlichkeits- oder Distanzmatrix verglichen. Zur Quantifizierung wird die cophänetische Korrelation in Form eines Korrelationskoeffizienten (r) ermittelt. Dieser lässt Aussagen darüber zu, wie verlässlich der Baum die Ursprungsmatrix widerspiegelt.

2.3.5 Hauptkoordinatenanalyse (PCoA)

Die Hauptkoordinatenanalyse (PCoA = principal coordinates analysis) ist eine Ordinationsmethode, mit deren Hilfe die Komplexität eines multivariaten Datensatzes reduziert werden kann (Gower 1966). Ausgangsbasis für eine Hauptkoordinatenanalyse ist die Distanzmatrix. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe des Bray-Curtis-Similarity-Index (Bray und Curtis 1957). Bei der Hauptkoordinatenanalyse wird der erste Faktor (Dimension) so gelegt, dass er einen möglichst großen Anteil der Gesamtvarianz aller Variablen auf sich bindet. Der zweite (und jeder weitere Faktor) wird nun so gelegt, dass er möglichst viel der noch verbleibenden Restvarianz (ohne die vom ersten Faktor) auf sich bindet. Die untersuchten Merkmale werden dabei in ihrer maximalen Differenzierung dargestellt. Aufgrund der Übersichtlichkeit werden maximal dreidimensionale Plots betrachtet.

2.3.6 Maximum Parsimonie-Analyse (MP)

Die Maximum Parsimonie-Methode (MP) ist eine merkmalsbezogene Analysemethode, bei der kein Substitutionsmodell zugrunde gelegt wird. Sie dient der Rekonstruktion von Phylogenie und beruht auf numerischer Kladistik. Die Methode verfolgt das so genannte Sparsamkeitsprinzip (Edwards und Cavalli-Sforza 1963). Gesucht wird nach dem „kürzesten“

Baum, d. h. nach dem Baum, der einen gegebenen Datensatz mit der geringsten Gesamtzahl evolutiver Schritte erklärt. Die Einschätzung der Merkmale spielt für die Rekonstruktion der Baumtopologie eine entscheidende Rolle. Genaue Angaben zu den Algorithmen dieses Verfahrens sind z. B. in Wägele (2001) zu finden.

Für große Datensätze können auch von einem schnellen Computerprogramm nicht mehr alle möglichen Bäume geprüft werden. Deshalb wird ein heuristisches Suchverfahren angewendet („heuristic search“), das die Suche erheblich beschleunigt und ausschließlich mit dem kürzesten gefundenen Baum weiter arbeitet. Es gibt eine Reihe heuristischer Algorithmen, z. B. die schrittweise Additionsmethode („stepwise addition“). Bei der heuristischen Suche besteht aber keine Garantie dafür, dass der kürzeste Baum gefunden wird. Um gegebenenfalls ein lokales Optimum zu verlassen, wird hier die heuristische Suchoption 100- bis 1000-mal mit unterschiedlicher Eingabereihenfolge wiederholt („random taxon addition“). Zudem wurde durch die Verlagerung der Äste („branch-swapping“) ein noch kürzerer Baum gesucht.

Beim TBR- („tree bisection and reconnection“) Algorithmus wird der Baum an einer Stelle in zwei Unterbäume geteilt („tree bisection“), die wiederum durch jeweils einen Ast neu miteinander verbunden werden („reconnection“). Dies führt zu einer starken Umgestaltung der Ausgangstopologie.

Mittels verschiedener Indizes kann überprüft werden, wie gut die einzelnen Bäume den Datensatz repräsentieren: z. B. durch den Konsistenzindex (CI), den Konservierungsindex (RI) und den Homoplasieindex (HI). HI und CI bewerten den Anteil an Homoplasien², wobei HI der Anteil der Merkmalsänderungen ist, der durch Homoplasien verursacht wird. Der CI leitet sich aus dem HI ab ($HI=1-CI$). Er ist allerdings kein gutes Maß für die Konsistenz eines Datensatzes, da er von der Zahl der Merkmale und Taxa abhängig ist. Außerdem ändert sich sein Wert durch den Einfluss von Autapomorphien. Entspricht CI dem Wert eins, sind keine Homoplasien im Datensatz vorhanden. Der Konservierungsindex (RI) ist ein Maß für die Anzahl der potentiellen Synapomorphien und somit ein besserer Index, da nur der Anteil an Information im Datensatz bewertet wird, der auch eine phylogenetische Aussage zulässt. Je näher der Wert für RI bei eins liegt, desto wahrscheinlicher ist die Baumtopologie (Wägele 2001).

2.3.7 Maximum Likelihood-Analyse (ML)

Die Maximum Likelihood-Analyse (Edwards und Cavalli-Sforza 1963) gilt als eine der Standardmethoden zur Berechnung phylogenetischer Bäume. Sie erfordert ein sorgfältiges Taxon-„Sampling“ und meist ein komplexes Evolutionsmodell.

Für DNA-Sequenzen werden die Wahrscheinlichkeiten für Punktmutationen zwischen den verschiedenen Nucleotiden anhand des Datensatzes für Basenfrequenzen, Substitutionsraten, Parameter der Gammaverteilung und den Anteil invariabler Stellen geschätzt und

²Homoplasie: Zwei verschiedene Taxa haben ein Merkmal gemeinsam, das aber nicht homolog (gleicher evolutionärer Verwandtschaft) ist.

hinsichtlich ihres Likelihood-Wertes ($-lnL$) optimiert. Die Berechnung dieser Parameter und die Wahl des geeigneten Evolutionsmodells erfolgen zunächst mit dem Programm Modeltest Version 3.7 (Posada und Crandall 1998). Die erhaltenen Werte werden für die Likelihood-Berechnung mit PAUP vorgegeben und der Stammbaum mit dem optimalsten (kleinsten) Likelihoodwert berechnet.

2.3.8 Bayes'sche Analyse (MB)

Die Bayes'sche Analyse (Huelsenbeck und Ronquist 2001b) ist ein in den letzten Jahren zunehmend zur Rekonstruktion phylogenetischer Bäume verwendetes Verfahren (Beaumont und Rannala 2004), das ebenso wie ML auf den Merkmalen selbst beruht. Für Bayes wird ein Likelihood-Modell (für die Sequenzevolution) sowie eine *a priori*-Verteilung an Bäumen und Modellparametern zugrunde gelegt. Phylogenetische Untersuchungen mit dieser Methode basieren auf dem Bayes'schen Theorem (vgl. Rannala und Yang 1996), das ganz allgemein besagt, wie mit bedingten Wahrscheinlichkeiten gerechnet werden kann. Damit ist es möglich, die Wahrscheinlichkeit verschiedener Hypothesen auf Grundlage der Daten zu berechnen. Ziel dieser Methode ist es, die *a posteriori*-Wahrscheinlichkeitsverteilung für phylogenetische Bäume zu bestimmen. Der Unterschied zwischen der *a priori*- und der *a posteriori* Wahrscheinlichkeit zeigt, ob eine Hypothese „wahrscheinlicher“ geworden und somit eher anzunehmen ist. Da aber die Berechnung aufgrund der Rechenkapazitäten nicht exakt möglich ist, werden heuristische Schätzverfahren mit Hilfe der Monte Carlo Markov Kette („MCMC“) vorgenommen.

Die Analyse startet mit einer zufälligen Baumtopologie mit willkürlichen Astlängen und einem willkürlichen Set an Parameterwerten. Die Markov-Kette läuft über Tausende bis Millionen Generationen (=Bäume, „ngen“), wobei jede Generation einen leicht veränderten Baum gegenüber dem vorherigen aufweist. Jeder Baum wird dann entsprechend seiner posterioren Wahrscheinlichkeit mit Hilfe des Metropolis-Hastings Algorithmus (Metropolis *et al.* 1953; Hastings 1970) entweder akzeptiert oder abgelehnt.

Der dreidimensionale Bereich, in dem gesammelt wird, ist vergleichbar mit einer Landschaft aus Bergen und Tälern, wobei der höchste Berg dem globalen Optimum entspricht. Läuft die Kette lange genug, strebt sie irgendwann gegen einen stationären Zustand („burn-in“), an dem die Annäherung an die höchste posteriore Wahrscheinlichkeit erreicht ist. Dieses Plateau wird als ihr globales Optimum angesehen, um das die Ketten zu suchen beginnen. Dabei kann es sich, wie bei der heuristischen Suche, allerdings um ein lokales Optimum handeln, was zu einem verfälschten Ergebnis führen kann. Um dem entgegenzuwirken, werden zur gleichen Zeit mehrere Ketten gestartet („nchains“), wobei die Hauptkette eine „kalte“ Kette repräsentiert, neben der noch mehrere so genannte geheizte Ketten laufen. Letztere können wesentlich einfacher Täler überspringen und zudem ihre Parameter in Intervallen mit der kalten Kette tauschen. Die Kettentauschrate sollte zwischen 10 und 70 % liegen (Ronquist, 2004) und kann durch Erniedrigung der Kettentemperatur („temp“) und Verringerung der Kettenanzahl („nchains“) erreicht werden. Durch diesen Vorgang wird die Suche nach dem globalen Optimum statistisch verbessert und die Analyse beschleunigt. Aus

den gesammelten Bäumen wird ein Consensus-Baum erstellt, der in Form eines 50 % Majority Rule-Baumes dargestellt wird (vgl. Kap. 2.4.1). Die statistische Unterstützung der Äste entspricht dabei ihrer posterioren Wahrscheinlichkeit.

2.4 Anwendung der Datenanalyseverfahren

Die DNA-Sequenz- und AFLP-Daten wurden mit verschiedenen Analyseverfahren untersucht und die dabei erhaltenen Ergebnisse (Stammbäume) miteinander verglichen. Liefern alle Datenanalyseverfahren ähnliche Ergebnisse ist die Aussagekraft der Daten wesentlich verlässlicher und glaubhafter als das Ergebnis einer einzelnen Analyse.

2.4.1 AFLP-Datenanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurde der AFLP-Datensatz sowohl phänetisch als auch kladistisch analysiert und die Ergebnisse beider Analysen miteinander verglichen. Die phänetische Analyse wurde sowohl mit der UPGMA- als auch NJ-Methode durchgeführt und einer Bootstrap-Analyse mit 1000 Replikaten unterzogen. Für die UPGMA-Analyse kamen die Programme NTSYSpc Version 2.10p (Rohlf 2000) und PAUP Version 4.1b10 (Swofford 2001) zum Einsatz, die NJ-Analyse und die anschließende Bootstrap-Analyse wurden sowohl mit dem Treecon Software-Paket Version 1.3b (Van de Peer und De Wachter 1994) als auch mit PAUP Version 4.1b10 (Swofford 2001) durchgeführt.

Für die Gattung *Fosterella* liegen keine fossilen Belege vor. Zudem war zum Zeitpunkt der Analyse noch sehr wenig über Schwestergruppenbeziehungen mit anderen Bromeliaceae bekannt. Aus diesem Grund wurde zunächst ein „midpoint-rooting“ durchgeführt. Des Weiteren wurde eine künstliche Außengruppe kreiert, indem ein Taxon in die Matrix integriert wurde, dessen Merkmale alle mit „0“ kodiert wurden. Die Probe, die für diese beiden Methoden der Außengruppensuche die basalste Position einnahm und zudem in der Distanzmatrix die größte Distanz zu allen anderen Taxa aufwies, wurde als Außengruppe gewählt. Danach wurden verschiedene Taxa als Außengruppe eingesetzt und die Topologie des Baumes verglichen. Der NJ-Baum wurde in drei Varianten dargestellt:

- mit *F. spectabilis* als Außengruppe,
- ohne jegliche Außengruppe (midpoint-rooting) und
- mit einer „allzero“-Außengruppe.

Die UPGMA-Bäume wurden sowohl mit dem Jaccard- als auch mit dem Dice-Index berechnet und dargestellt.

Zur Ermittlung der cophänetischen Korrelationskoeffizienten wurde ebenfalls das Programm NTSYSpc Version 2.10p (Rohlf 2000) eingesetzt. Dabei wurden alle Kombinationen von NJ- und UPGMA-Bäumen und den beiden hier verwendeten Distanzmatrizen (Jaccard versus Dice) überprüft.

Die Hauptkoordinatenanalyse wurde mit dem Programm NTSYSpC Version 2.10p (Rohlf 2000) durchgeführt. Die verwendete Distanzmatrix wurde mit Hilfe des Bray-Curtis-Index (Bray und Curtis 1957) erstellt. Die Darstellung der Analyse erfolgte dreidimensional.

Die kladistische Maximum Parsimonie-Analyse des AFLP-Datensatzes wurde mit PAUP Version 4.1b10 (Swofford 2001) durchgeführt. Es wurde eine heuristische Suche vorgenommen, bei der der Startbaum durch zufällige schrittweise Addition der Zweige ermittelt wurde. Das Verfahren, das für den Zweigtausch ausgewählt wurde, war der TBR-Algorithmus (Tree bisection and reconnection). Die erhaltenen kürzesten Bäume (most parsimonious trees) wurden zusammengefasst und sowohl in Form eines „Strict Consensus-tree“ als auch eines „50 %-Majority Rule Consensus-tree“ dargestellt. Letzterer enthält alle Knoten, die in mindestens 50 % aller Einzelbäume auftraten, der Strict Consensus-Baum hingegen zeigte nur Knoten, die in allen Einzelbäumen vorhanden waren. Zur statistischen Absicherung der Baumtopologie wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1000 Replikaten durchgeführt. Außerdem ermöglichten die Bestimmungen des Homoplasie-Index (HI), des Konsistenz-Index (CI) und des Retentionsindex (RI) Aussagen über die Homoplasien im Datensatz (Farris 1989a,b).

2.4.2 Chloroplasten-DNA-Datenanalyse

Die Sequenzdaten wurden sowohl einer Distanzanalyse als auch einer Maximum Parsimonie- sowie einer Maximum Likelihood- und einer Bayes'schen Analyse unterzogen. Zunächst wurden die Datensätze der untersuchten Loci einzeln analysiert. Die Ergebnisse sollten erste Tendenzen der Verwandtschaften anzeigen. Die einzelnen Datensätze wurden am Schluss kombiniert und dann einer Gesamtanalyse unterzogen. Für den gesamten Datensatz erfolgte die Kodierung der Indels (vgl. Kap 2.2.5.6). Diese kodierte Matrix kann ausschließlich mit dem Parsimonie-Verfahren analysiert werden. In den anderen Analysen werden Gap-Positionen als „missing-data“ betrachtet und nicht verrechnet.

Als Außengruppe für alle Analysen der Chloroplastendaten wurden *Ayensua uaipanensis* und *Brocchinia acuminata* gewählt. Diese Auswahl basiert u. a. auf vorhergehenden Arbeiten von Crayn *et al.* (2000a; 2004), Horres *et al.* (2000) und Givinish *et al.* (2004), in deren Analysen diese Gattungen eine basale Position in der Phylogenie der Bromeliaceae einnehmen.

Mit der Maximum Parsimonie-Analyse wurden sowohl die Einzeldatensätze der untersuchten Chloroplastenloci als auch der Gesamtdatensatz jeweils mit und ohne kodierte Indels betrachtet. Bei der heuristischen Suche wurden die kürzesten Bäume gespeichert. Die Startbäume entstanden mittels schrittweiser Addition, deren Reihenfolge zufällig war. Dabei wurde nur jeweils ein kürzester Baum behalten. Der Zweigtausch wurde mit dem TBR-Verfahren durchgeführt und die Anzahl der gespeicherten Bäume auf 1000 pro Wiederholung beschränkt. Jeweils ein 50 % Majority Rule-Baum und ein Strict Consensus-Baum wurden errechnet. Die statistische Überprüfung der Topologie erfolgte nach dem Bootstrap-Verfahren mit 1000 Replikaten. Die Indizes (HI, CI und RI) wurden zur Einschätzung der Homoplasie der Datensätze berechnet.

Für die Distanzanalyse wurde die NJ-Methode verwendet. Dabei wurde der Gesamtdatensatz der Chloroplastenanalyse ohne Indelkodierung betrachtet und mit PAUP Version 4.0b10 (Swofford 2001) verrechnet. Die Außengruppe (*Brocchinia acuminata* und *Ayensua uaipanensis*) sollte monophyletisch und Schwester zur Innengruppe sein.

Alle Merkmale wurden gleich gewichtet und mit der p-Distanz verrechnet. Zudem wurde eine Verrechnung mit dem GTR-Modell vorgenommen und dargestellt, um die Resultate beider Indizes miteinander zu vergleichen. Die statistische Analyse wurde mit der Bootstrap-Methode mit 1000 Replikaten durchgeführt.

Für die Analyse des kombinierten Chloroplastendatensatzes ohne Indelkodierung mit der Maximum Likelihood-Methode musste zunächst ein geeignetes Evolutionsmodell ausgewählt werden. Dafür wurde das Programm Modeltest Version 3.7 (Posada und Crandall 1998) mit dem Akaike-Informationskriterium verwendet. Die Likelihoodberechnungen erfolgten mit PAUP 4.0b10 (Swofford 2001), wobei die für die Analyse notwendigen Parameter und das Evolutionsmodell durch Modeltest vorgegeben wurden. Bei der heuristischen Suche wurden nur die besten Bäume gespeichert. Wegen der benötigten Rechenkapazität wurden nur zehn

Replikate in der schrittweisen Addition durchgeführt. Zudem wurde das TBR-Verfahren verwendet. Auf eine anschließende Bootstrap-Analyse musste verzichtet werden, da für deren Berechnung zu wenig Computerkapazität zur Verfügung stand.

Die Bayes'sche Analyse für den kombinierten Chloroplastendatensatz ohne Indelkodierung wurde mit dem Programm MrBayes 3.0 (Ronquist und Huelsenbeck 2003) durchgeführt. Zunächst wurde der Wert des stationären Zustandes (burn-in) ermittelt. Die bis zu diesem Plateau gesammelten Bäume wurden in den anschließenden Analysen verworfen. Die Anzahl der Ketten wurde auf vier verringert, wobei die Kettenaustauschraten durch die Veränderung der Kettentemperatur variiert und optimiert wurden. Die finale Analyse wurde mit vier Millionen Generationen durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die erhaltenen Bäume eine Verteilung im globalen Optimum der *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeit darstellen, wurde die Analyse dreimal wiederholt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeitswerte wurden auf dem 50 % Majority Rule-Consensus oberhalb der Äste dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation aus frischem oder lyophilisiertem Pflanzenmaterial erbrachte sowohl mit der CTAB-Methode als auch mit dem DNA-Isolationskit der Firma Qiagen hochmolekulare, weitgehend intakte DNA. Auf den Agarosegelen sind für die Isolate mit dem Qiagen-Kit klar abgegrenzte Banden sichtbar; die Isolate der CTAB-Methode zeigen neben der hochmolekularen Bande einen schwachen „Schmier“ im mittleren und niedermolekularen Bereich (Abb. 7). Dieses Ergebnis ist mit dem höheren DNA-Gehalt der mit der CTAB-Methode isolierten Proben (bei gleicher Menge an eingesetztem Ausgangsmaterial) zu begründen. Im Vergleich wiesen die Proben, die mit der CTAB-Methode isoliert wurden eine z. T. 10-fach höhere DNA-Ausbeute auf als diejenigen, die mit dem Qiagen-Kit isoliert wurden. Je nach Probe und Probeneinwaage wurde aus dem Blattmaterial zwischen 0,2 µg und 60 µg DNA gewonnen.

Die Isolationsergebnisse aus dem mit Silikagel getrockneten Pflanzenmaterial zeigen kaum hochmolekulare Banden. Sofern es überhaupt gelang, DNA aus getrocknetem Material zu isolieren, weisen solche Proben auf dem Agarosegel einen „Schmier“ im niedermolekularen Bereich auf. Dies lässt sich weitgehend auf eine DNA-Degradation zurückführen. Der DNA-Gehalt dieser Proben war sehr gering.

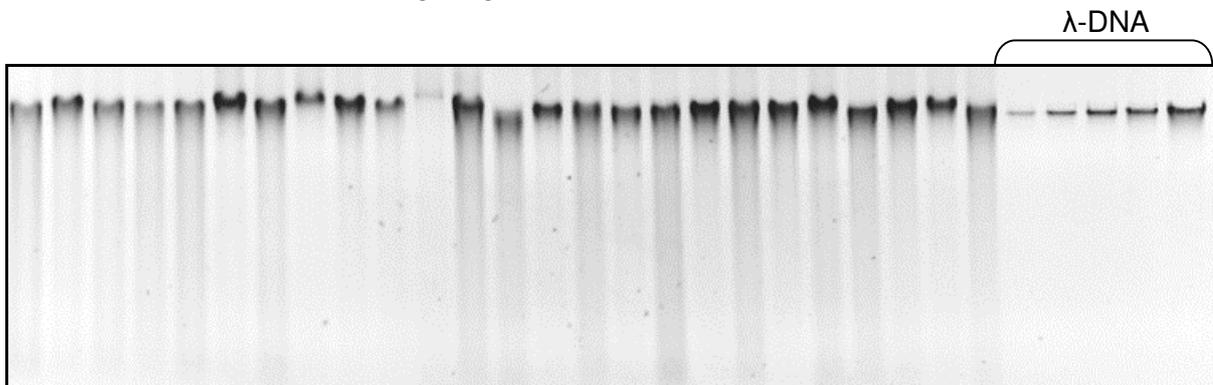


Abb. 7: Gelelektrophoretische Auftrennung von 25 DNA-Proben aus verschiedenen Arten der Gattung *Fosterella*.

Die DNA wurde mit der CTAB-Methode (vgl. Kap. 2.2.2) isoliert. Die fünf Bahnen auf der rechten Seite enthalten λ -DNA in zunehmenden Konzentrationen als Vergleichsstandards: 2, 5, 10, 20 und 50 ng.

DNA, zur Untersuchung phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen sollte möglichst aus frischem Pflanzenmaterial gewonnen werden. So können von vornherein Fehler, die auf die Degradation der DNA zurückzuführen sind, ausgeschlossen werden.

3.2 Ergebnisse der Vorversuche

3.2.1 Pilotexperimente zur AFLP-Analyse

3.2.1.1 Primer- und Probenauswahl

Für die vorliegenden AFLP-Untersuchungen wurden generell Primer mit jeweils drei selektiven Basen verwendet. Zunächst wurden 58 Primerkombinationen mit einem Probenset von zehn Taxa getestet. Dabei wurden stark unterschiedliche Ergebnisse erzielt, aufgrund derer die Primerkombinationen in fünf Qualitätskategorien eingeteilt wurden (Spalte „Informativität“ in Tab. 12). Die wichtigsten Kriterien für die Einstufung als „informativ“ und damit für Auswahl der Primerkombinationen für die nachfolgenden Experimente waren:

- ein möglichst hoher Polymorphiegrad,
- ein klares Bandenmuster,
- eine große Anzahl von Banden,
- wenig Hintergrundrauschen sowie
- ein geringer Probenausfall.

Die Anzahl der letztendlich verwendeten Primerkombinationen für die Hauptversuche richtete sich außerdem nach der Anzahl der auf den einzelnen Gelen auswertbaren Fragmente. Die erste Baumrekonstruktion wurde mit Merkmalen von fünf Primerkombinationen durchgeführt. Anschließend wurde die Anzahl der berücksichtigten Merkmale sukzessive erhöht (vgl. Ramser *et al.* 1996). Veränderten sich die Topologien der Stammbäume und die statistische Unterstützung der einzelnen Äste beim Hinzufügen weiterer Merkmale nicht mehr, wurde die Anzahl an Merkmalen, die in die Analyse einbezogen wurden, als ausreichend angesehen. Mit 13 Primerkombinationen wurden gut aufgelöste Bandenmuster erzeugt, wobei acht schließlich in den Hauptversuchen zum Einsatz kamen. Diese sind in Tab. 12 grau unterlegt.

Insgesamt standen zum Zeitpunkt der AFLP-Untersuchung 112 Proben aus der Gattung *Fosterella* zur Verfügung. Von diesen lieferten 77 Proben ein distinktes AFLP-Bandenmuster und wurden in die phylogenetische Analyse einbezogen. Die verbleibenden 35 Proben wiesen entweder mit weniger als sieben Primerkombinationen ein Bandenmuster auf oder ihre DNA war zu stark degradiert. Dies äußerte sich in einem Überschuss an starken Fragmenten im niedermolekularen Bereich, während im höher molekularen Bereich keine Fragmente festzustellen waren.

Tab. 11: Sequenzen der für die AFLP-Analyse verwendeten Adapter und Primer.
Die selektiven Basen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Enzym	Funktion	Sequenz 5' - 3'
<i>MseI</i>	Adapter (+)	GAC GAT GAG TCC TGA G
	Adapter (-)	TA CTC AGG ACT CAT
<i>HindIII</i>	Adapter (+)	CTC GTA GAC TGC GTA CC
	Adapter (-)	CAT CTG ACG CAT GGT CGA
<i>MseI</i>	Primer + 1 selektive Base	GAT GAG TCC TGA GTA AA
		GAT GAG TCC TGA GTA AC
<i>HindIII</i>	Primer + 1 selektive Base	GAC TGC GTA CCA GCT TA
<i>MseI</i>	Primer + 3 selektive Basen	GAT GAG TCC TGA GTA AAA G
		GAT GAG TCC TGA GTA AAG C
		GAT GAG TCC TGA GTA ACA A
		GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
<i>HindIII</i>	Primer + 3 selektive Basen	GAC TGC GTA CCA GCT TAC C
		GAC TGC GTA CCA GCT TAG C
		GAC TGC GTA CCA GCT TAA C
		GAC TGC GTA CCA GCT TAC G
		GAC TGC GTA CCA GCT TAC A
		GAC TGC GTA CCA GCT TAA G

Tab. 12: Kategorisierung der für die AFLP-Analyse getesteten Primerkombinationen.

In den ersten beiden Spalten sind jeweils nur die selektiven Basen aufgeführt. Die vollständigen Primersequenzen sind Tab. 11 zu entnehmen. Den Primerkombinationen wurde nach den im Text genannten Kriterien eine Qualitätsstufe zugeteilt (Spalte „Informativität“), Primerkombinationen, die mit „++“ oder „+“ beurteilt wurden, waren für die Hauptversuche prinzipiell zu verwenden, es wurden jedoch nur die grau unterlegten Primerkombinationen für die phylogenetischen Untersuchungen eingesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung der Primer erfolgte entweder bei 700 nm oder bei 800 nm, AM = Amplifikationsmuster.

Selektive Basen Msel	Selektive Basen HindIII	Amplifikationsergebnis	Informativität der Primer- kombination
AAG	700-AAC	AM polymorph, hohe Bandenzahl	++
	700-ACA	AM polymorph, hohe Bandenzahl	++
	700-AAG	AM mäßig polymorph, hohe Bandenzahl, Proben ausgefallen	+/-
	700-ACC	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	+/-
	800-ACG	AM sehr schwach, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	--
	800-ACT	AM polymorph aber schwach, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	-
	800-AGC	AM polymorph aber schwach, geringe Bandenzahl, Proben ausgefallen	--
	800-AGG	AM mäßig polymorph und schwach, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	--
AGC	700-AAC	AM polymorph, mittlere Bandenzahl	++
	700-ACA	AM kaum polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	--
	700-AAG	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	+
	700-ACC	AM sehr wenig polymorph, mittlere Bandenzahl	--
	800-ACG	AM polymorph, mittlere Bandenzahl	++
	800-ACT	AM polymorph, mittlere Bandenzahl	++
	800-AGC	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	+
	800-AGG	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	+
ACG	700-AAC	AM nicht auszuwerten, Proben ausgefallen	--
	700-ACA	AM nicht auszuwerten, Proben ausgefallen	--
	700-AAG	AM polymorph aber schwach, mittlere Bandenzahl	+/-
	700-ACC	AM mäßig polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	-
	800-AGC	AM mäßig polymorph und schwach, mittlere Bandenzahl	-
	800-ACT	AM wenig polymorph, mittlere Bandenzahl	+/-
AAC	700-AAC	AM nicht auszuwerten, Proben ausgefallen	--
	700-ACA	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	+/-
	700-AAG	AM nicht auszuwerten, Proben ausgefallen	--
	700-ACC	AM nicht auszuwerten, Proben ausgefallen	--
	800-ACG	AM wenig polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	--

Tab. 12: Fortsetzung

Selektive Basen <i>MseI</i>	Selektive Basen <i>HindIII</i>	Amplifikationsergebnis	Informativität der Primer- kombination
AAC	800-AGG	AM wenig polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	--
CTA	700-AAC	AM polymorph, teilweise schwach, mittlere Bandenzahl	+/-
	700-ACA	AM wenig polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	-
	700-AAG	AM wenig polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	-
	700-ACC	AM mäßig polymorph und schwach, mittlere Bandenzahl	+/-
	800-ACG	AM nicht auswertbar, Proben ausgefallen	--
	800-ACT	AM mäßig polymorph und schwach, mittlere Bandenzahl	+/-
	800-AGG	AM nicht auswertbar, Proben ausgefallen	--
CGA	700-AAC	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Probe ausgefallen	+
	700-ACA	AM polymorph, mittlere Bandenzahl	++
	700-AAG	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Probe ausgefallen	+
	700-ACC	AM wenig polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	--
	800-ACG	AM polymorph, mittlere Bandenzahl	++
	800-ACT	AM wenig polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	--
	800-AGC	AM polymorph, aber sehr schwach, mittlere Bandenzahl	-
CAC	700-AAC	AM wenig polymorph, mittlere Bandenzahl	+/-
	700-ACA	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	+/-
	700-AAG	AM polymorph, mittlere Bandenzahl	++
	700-ACC	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Probe ausgefallen	++
	800-ACG	AM nicht auswertbar, Proben ausgefallen	--
	800-ACT	AM mäßig polymorph, mittlere Bandenzahl	+
	800-AGC	AM polymorph, hohe Bandenzahl	++
	800-AGG	AM nicht auswertbar, Proben ausgefallen	--
CAA	700-AAC	AM polymorph, mittlere Bandenzahl, Proben ausgefallen	+/-
	700-ACA	AM polymorph, hohe Bandenzahl	++
	700-AAG	AM mäßig polymorph, mittlere Bandenzahl	+
	700-ACC	AM polymorph, hohe Bandenzahl	++
	800-ACG	AM mäßig polymorph, mittlere Bandenzahl	+
	800-ACT	AM mäßig polymorph und schwach, mittlere Bandenzahl	+/-
	800-AGC	AM polymorph, mittlere Bandenzahl	++
	800-AGG	AM nicht auswertbar, Proben ausgefallen	--

3.2.1.2 Reproduzierbarkeit der AFLPs

Ein Reproduzierbarkeitstest über verschiedene Ebenen der AFLP-Methode zeigte, dass unter konstanten Bedingungen die gleichen Bandenmuster entstehen (Abb. 8). Die in unabhängigen Experimenten auf der Basis verschiedener Zwischenprodukte erzeugten Muster sind bis auf geringe Intensitätsunterschiede identisch.

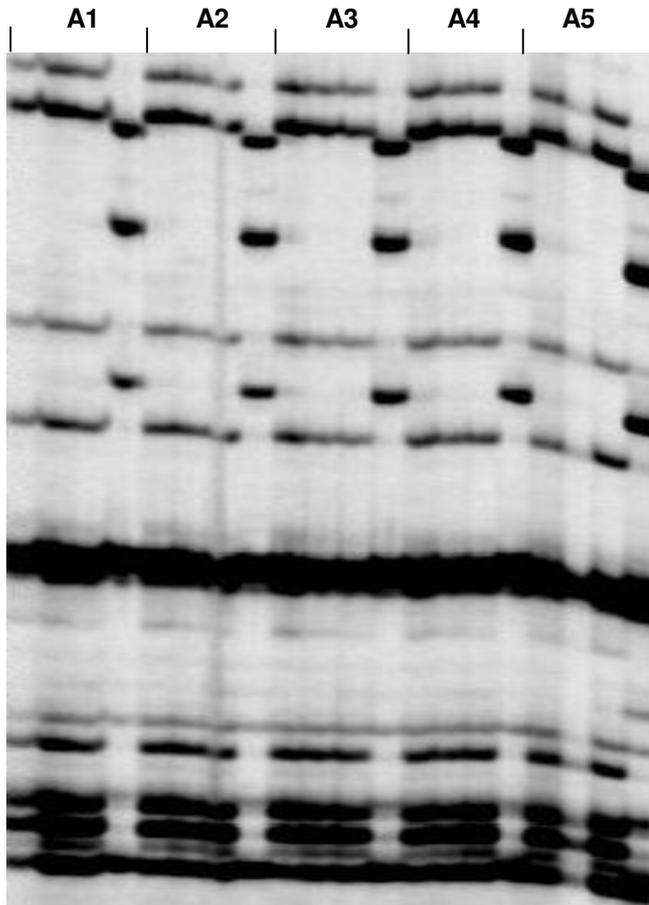


Abb. 8: Ergebnis der Reproduzierbarkeitstests der AFLP-Methode auf verschiedenen Ebenen.

Die Probenreihenfolge (v.l.n.r.) ist jeweils: 18c (*F. latifolia*), 43a und 22c (*F. penduliflora*) und 14a (*F. nowickii*). A = Amplifikation; A1 und A5 sind Ergebnisse der gleichen Amplifikationsreaktionen aus unterschiedlichen DNA-Isolaten derselben Pflanze. A1 und A4 sind verschiedene Amplifikationsergebnisse aus derselben DNA-Probe. A1 und A3 gehen aus demselben Restriktions-Ligationsansatz, A1 und A2 aus derselben Präamplifikation hervor. Die einzelnen Reaktionen wurden vom genannten Punkt an unabhängig voneinander durchgeführt (vgl. Schema Abb. 6).

Exemplarisch wurde ein weiterer Reproduzierbarkeitstest mit 61 Proben und derselben Primerkombination (*Mse*I+CAC und *Hind*III+ACC) zweimal unabhängig auf Basis der gleichen Präamplifikation durchgeführt (Abb. 9). Die Bandenmuster und die relative Intensität der Banden sind nahezu identisch.

Die gute Reproduzierbarkeit erlaubte es, einzelne in der Hauptanalyse ausgefallene Proben zu einem späteren Zeitpunkt zu wiederholen und die dabei erhaltenen Bandenmuster zuverlässig in die AFLP-Matrix zu integrieren.

Amplifikation 1

Amplifikation 2

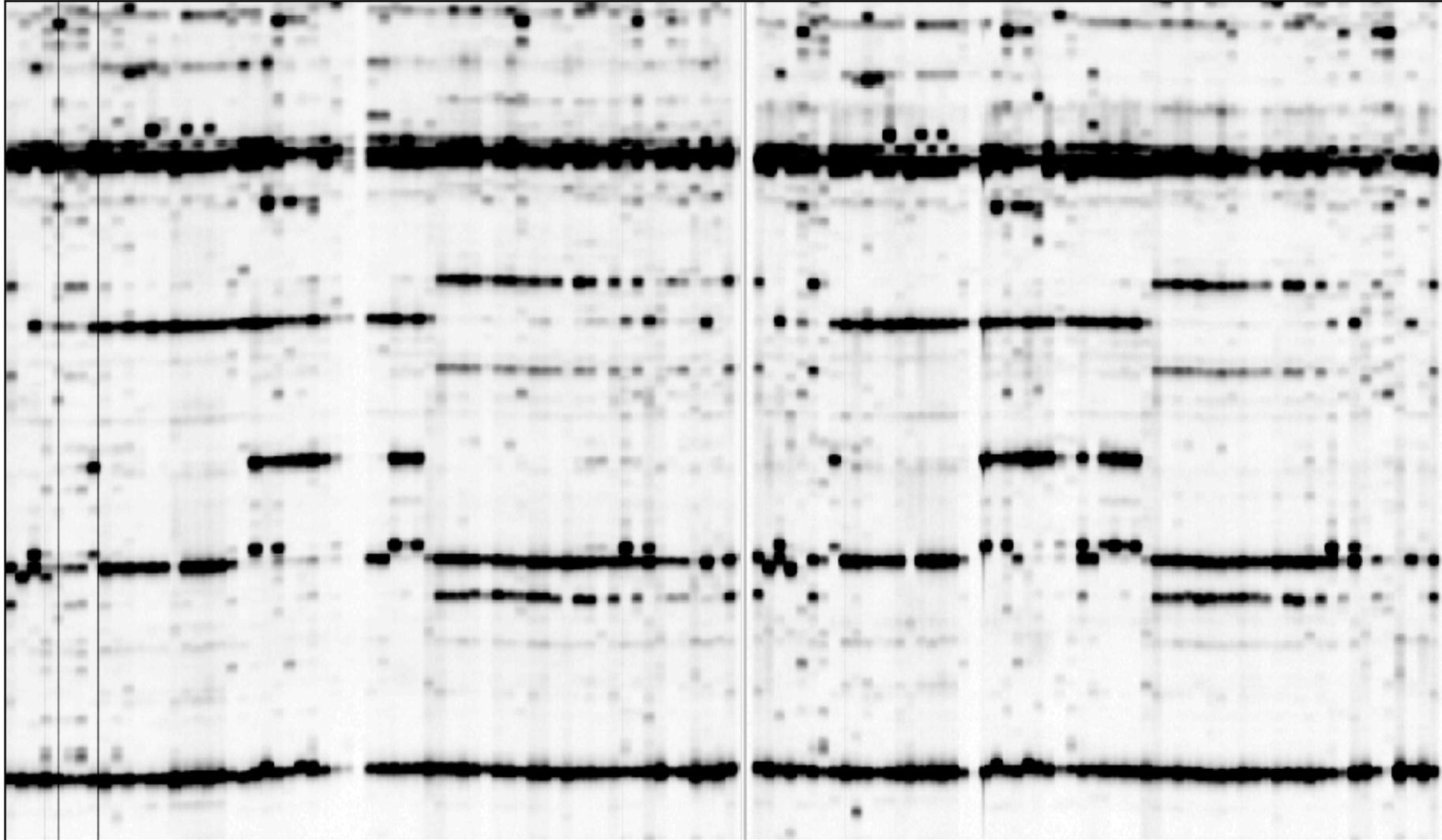


Abb. 9: Reproduzierbarkeitstest für ein Gel mit 61 *Fosterella*-Proben und der Primerkombination *MseI*+CAC und *HindIII*+ACC.
Die Amplifikationsreaktionen wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Die Template der einzelnen Proben entstammen derselben Präamplifikation.

3.2.2 Pilotexperimente zur DNA-Sequenzierung

3.2.2.1 Chloroplasten-DNA-Regionen

Zunächst wurden mit Hilfe universeller Primerpaare 18 verschiedene Chloroplastenloci amplifiziert und auf ihre Funktionalität sowie die Variabilität der Größe der erhaltenen PCR-Fragmente innerhalb der Gattung untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein kleines DNA-Set von fünf Taxa aus vier Arten der Gattung *Fosterella* zusammengestellt (zwei Taxa von *F. penduliflora*, *F. chiquitana*, *F. latifolia*, *F. weddelliana*). Die Tab. 13 zeigt eine Übersicht der getesteten Loci und ihrer Amplifikationsergebnisse nach der Auftrennung auf Agarosegelen.

Anhand verschiedener Kriterien erfolgte die Auswahl der Zielregionen, die schließlich sequenziert werden sollten. Ein **klar abgegrenztes Amplifikat** konnte für das gesamte Testset mit 14 der 18 untersuchten Primerpaare erzeugt werden. Für drei weitere Regionen war die Amplifikation nur teilweise erfolgreich. Mit der Positivkontrolle (Tabak) erfolgte bis auf ccmp 8 für alle Regionen eine Amplifikation mit deutlichem PCR-Produkt.

Bei der Amplifikation sollten neben den gewünschten **keine zusätzlichen Amplifikate** erzeugt werden, da sie die Sequenzierung beeinflussen und nur durch eine zeitintensive Aufreinigung entfernt werden können. Diese traten allerdings bei allen drei Taberlet-Regionen, einigen ccmp-Loci, *trnS-trnG* und *psbA-trnH* auf und wurden deshalb für die Sequenzierung zunächst nicht in Betracht gezogen.

Zudem sollten die **Amplifikate nicht zu klein** sein, da bei kurzen Fragmenten nur wenig phylogenetische Information erwartet werden kann. Aus diesem Grund wurden alle ccmp-Loci aus der fortführenden Untersuchung ausgeschlossen.

Die **Größenvariabilität der Fragmente**, die schon auf Agarosegelen sichtbar wird, weist auf das Vorhandensein von Indels hin. Diese wiederum können phylogenetische Informationen enthalten und sind bei *atpB-rbcL*, *psbB-psbH* und *rps16*-Intron zu finden. Zudem erfüllen die drei eben genannten Regionen alle anderen o. g. Auswahlkriterien und wurden deshalb zur Überprüfung der intragenerischen Sequenzvariabilität der Gattung *Fosterella* ausgewählt.

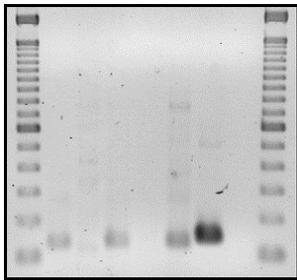
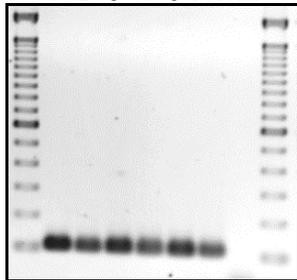
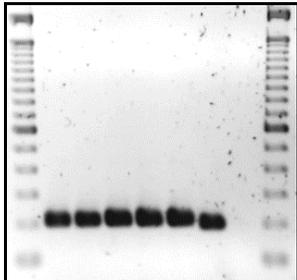
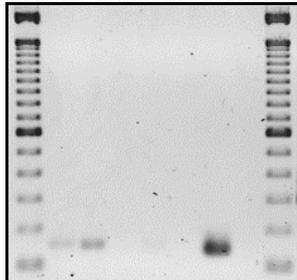
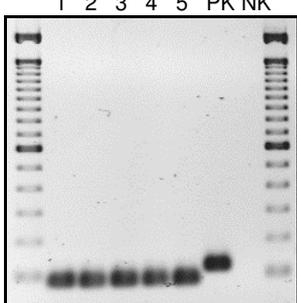
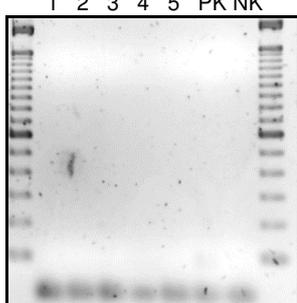
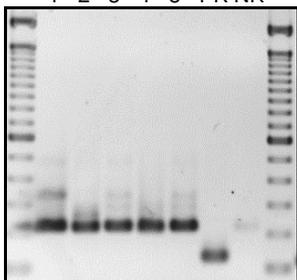
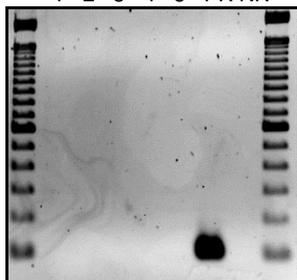
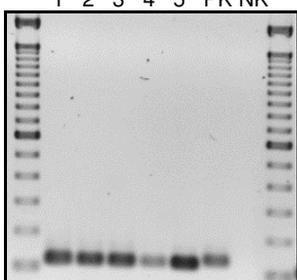
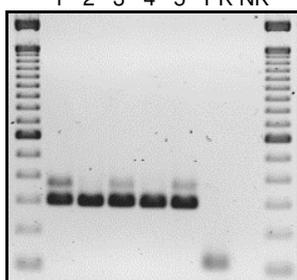
Weiterhin wurde die NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nach Chloroplastensequenzen für *Fosterella* durchsucht. Zusätzlich zu den eigens untersuchten Chloroplastenregionen wurden Sequenzen für den Locus *matK* gefunden und auf ihre Variabilität überprüft.

Tab. 13: Übersicht der PCR-Amplifikationsergebnisse für 18 Chloroplastenloci und fünf Akzessionen der Gattung *Fosterella*.

Die Probenreihenfolge ist zur besseren Orientierung für jeden Locus gleich gewählt worden: 1 = *F. chiquitana* (RV 3762), 2 = *F. latifolia* (PI 98.173) 3 = *F. penduliflora* (RV 3817), 4 = *F. weddelliana* (RV 3620), 5 = *F. penduliflora* (RV 4003), PK = Positivkontrolle (*Nicotiana tabacum*), NK = Negativkontrolle (keine Templat-DNA). Weitere Angaben zu den Primern sind Tab. 6 zu entnehmen. Als Molekulargewichtsmarker diente eine 100 bp-Leiter (Invitrogen). Die durch Fettdruck hervorgehobenen Loci wurden in den Hauptversuchen für die vergleichende Sequenzierung eingesetzt.

Locus	Gelbild	Locus	Gelbild
Tab A/B (<i>trnT-trnL</i>)		<i>psbB-psbH</i>	
Tab C/D (<i>trnL</i> Intron)		<i>rps16</i> -Intron	
Tab E/F (<i>trnL-trnF</i>)		<i>trnS-trnG</i>	
<i>psbA-trnH</i>		<i>atpB-rbcL</i>	

Tab. 13: Fortsetzung

Locus	Gelbild	Locus	Gelbild
ccmp1		ccmp6	
ccmp2		ccmp7	
ccmp3		ccmp8	
ccmp4		ccmp9	
ccmp5		ccmp10	

Überprüfung der Sequenzvariabilität ausgewählter Chloroplastenloci

atpB-rbcL

Für die Sequenzierung des *atpB-rbcL* intergenischen Spacers wurde das gleiche kleine Probenset verwendet, das schon für die PCR-Tests eingesetzt wurde (vgl. Tab. 13). Für diese fünf Proben konnten insgesamt 825 Basenpositionen lesbar sequenziert werden. Im Alignment wurden 26 variable Positionen gefunden (3,2 %). Dieser Wert bezieht sich nur auf Basensubstitutionen; Indels und variable Mikrosatelliten wurden nicht in die Berechnung der Sequenzvariabilität einbezogen. Eine spätere Untersuchung der Sequenzvariation auf höherer taxonomischer Ebene (23 Taxa aus 15 Gattungen der Bromeliaceae) ergab einen Wert von 10,3 %.

psbB-psbH

Die Sequenzierung der PCR-Amplifikate der fünf *Fosterella*-Proben für *psbB-psbH* ergab im Alignment 627 lesbare Basenpositionen, von denen sich 13 Positionen als variabel erwiesen (2,1 %).

rps16-Intron

Die Variabilität des *rps16*-Introns wurde für drei *Fosterella*-Arten (*F. penduliflora*, *F. petiolata*, *F. elata*) überprüft. Dazu wurden bereits vorhandene Sequenzen von Crayn *et al.* (2004) aus der NCBI-Datenbank verwendet. Crayn konnte 884 lesbare Positionen sequenzieren, von denen 2,3 % variabel waren.

matK-Gen

Für den Locus *matK* wurden in der NCBI-Datenbank drei Sequenzen für *Fosterella* (*F. penduliflora*, *F. petiolata*, *F. elata*) gefunden. Diese Sequenzen stammen ebenfalls aus der Arbeit von Crayn *et al.* (2004). In 836 lesbaren Positionen lag die Sequenzvariabilität bei 1,8 %.

Auswahl der Loci

Für die vergleichende Sequenzanalyse der Gattung *Fosterella* und die Ermittlung ihrer Stellung in den Bromeliaceae wurden aufgrund der o. g. Tests folgende Chloroplastenloci untersucht:

- *atpB-rbcL*-Intergenischer Spacer,
- *psbB-psbH*-Intergenischer Spacer,
- *rps16*-Intron.

Aufgrund der im Vergleich zu den anderen Loci ermittelten niedrigen Sequenzvariation innerhalb der Gattung *Fosterella* wurde der Locus *matK* nicht in die weiterführenden Untersuchungen einbezogen.

Untersuchtes Pflanzenmaterial

Insgesamt wurden 61 Proben aus 24 Arten der Gattung *Fosterella* und 47 weitere Akzessionen aus sechs der acht Unterfamilien der Bromeliaceae in die vergleichende Chloroplastensequenzierung einbezogen. Proben, die trotz mehrmaliger Wiederholung keine auswertbaren Sequenzen erbrachten, mussten aus der Analyse ausgeschlossen werden.

3.2.2.2 Mitochondrien-DNA-Regionen

Zunächst wurden mit Hilfe universeller Primerpaare neun Mitochondrienloci amplifiziert und die Größenvariabilität der Amplifikate innerhalb der Gattung untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein kleines DNA-Set bestehend aus drei Arten der Gattung *Fosterella* ausgewählt (*F. micrantha*, *F. elata* und *F. schidosperma*). Die Tab. 14 zeigt eine Übersicht der getesteten Regionen und die Bewertung der Amplifikationsergebnisse nach der Auftrennung auf Agarosegelen.

Tab. 14: Übersicht der PCR-Amplifikationsergebnisse für neun Mitochondrienloci und drei Taxa der Gattung *Fosterella*.

Weitere Angaben zu den Primern sind Tab. 8 zu entnehmen. Die durch Fettdruck hervorgehobenen Loci wurden auch für die vergleichende Sequenzierung eingesetzt.

Locus	Bewertung des Amplifikationsergebnisses
<i>cox3</i>	Amplifikate von ca. 730 bp in allen Proben, keine Größenvariabilität auf Agarose
<i>nad4/L-Orf25</i>	Amplifikat von ca. 510 bp in allen Proben, keine Größenvariabilität auf Agarose
<i>nad6</i>	Amplifikate von ca. 620 bp in allen Proben, keine Größenvariabilität auf Agarose
Orf25	Amplifikate von ca. 590 bp in allen Proben, keine Größenvariabilität auf Agarose
<i>rps4</i>	keine Amplifikate für <i>Fosterella</i> , Positivkontrolle wies ein Fragment von ca. 1000 bp auf
<i>rps12-1 - nad3-2</i>	nur schwache Amplifikate für <i>Fosterella</i> von ca. 420 bp keine Größenvariabilität auf Agarose
<i>nad4/3c - nad4/4r</i>	keine Amplifikate für die untersuchten Proben und die Positivkontrolle
<i>nad7/2 - nad7/3r</i>	Amplifikate von ca. 1510 bp in allen Proben, keine Größenvariabilität auf Agarose
<i>nad1exB - nad1exC</i>	Amplifikate von ca. 1720 bp in allen Proben, keine Größenvariabilität auf Agarose

Die Auswahl der Zielregionen, die schließlich sequenziert werden sollten, erfolgte nach den gleichen Kriterien wie für die Auswahl der Chloroplasten-Loci.

Sechs der neun untersuchten Loci erbrachten distinkte, klar abgegrenzte PCR-Amplifikate. Ihre Größe war mit mindestens 510 bp ausreichend, um genügend phylogenetische Information zu erhalten. Zudem waren keine zusätzlichen Amplifikate erkennbar. Allerdings zeigte keine der untersuchten Regionen Größenvariabilität auf Agarose. Die Amplifikate der sechs in Tab. 14 durch Fettdruck hervorgehobenen Regionen wurden schließlich vergleichend sequenziert.

Überprüfung der Sequenzvariabilität ausgewählter Mitochondrienloci

cox3

Die Sequenzierung der drei Taxa des *Fosterella*-Probensets ergab im Gesamtalignment eine Länge von 669 bp lesbaren Basen. In der gesamten Sequenz wurde nur eine einzige Punktmutation gefunden. An diesem Locus ist somit keine phylogenetische Information zu erwarten.

nad4/L-orf25

Das Alignment für die drei *Fosterella*-Proben hatte eine Gesamtlänge von 564 lesbaren Basen. Die Sequenzen waren völlig identisch.

Orf 25

Die Gesamtlänge des Alignments für das kleine Probenset hatte eine Länge von 513 bp und enthielt 2 Basensubstitutionen.

nad6

Das Alignment für zwei der drei *Fosterella*-Species hatte eine Länge von 524 bp. *Fosterella micrantha* lieferte keine lesbare Sequenz. Die beiden anderen Sequenzen unterscheiden sich nur in einer einzigen Basensubstitution.

nad7/2 - nad7/3r

Das Gesamtalignment hatte eine Länge von 1084 bp lesbaren Basenpositionen, in denen zwei Basensubstitutionen gefunden wurden.

nad1exB - nad1exC

Für diesen Locus wurde trotz Wiederholung mit keiner der untersuchten *Fosterella*-Proben eine lesbare Sequenz erhalten. Somit lässt sich keine Aussage über die Sequenzvariabilität dieser Region für die Gattung *Fosterella* treffen.

Aufgrund der sehr geringen Variabilität aller untersuchten Mitochondrienregionen lässt sich feststellen, dass diese für die phylogenetische Analyse der Gattung *Fosterella* ungeeignet sind.

3.2.3 AFLP-Phylogenie der Gattung *Fosterella*

In die AFLP-Analyse der Phylogenie der Gattung *Fosterella* konnten 77 Proben aus mindestens 20 verschiedenen Arten einbezogen werden. Dabei wurden AFLP-Bandenmuster von acht Primerkombinationen berücksichtigt. Eines dieser Muster für das gesamte untersuchte Probenet von 118 Proben wird in Abb. 10 gezeigt. Der Ausfall von Proben für mehr als eine Primerkombination hatte die starke Reduktion der Anzahl der letztendlich ausgewerteten Proben zur Folge.

Insgesamt wurden 310 Merkmale gewertet wobei die Anzahl der Banden pro Primerkombination zwischen 30 und 52 lag. Innerhalb der Gattung *Fosterella* waren nur 4 % der Banden monomorph (vgl. Tab. 15). Die Größe der auswertbaren Fragmente variierte zwischen 40 und 575 bp.

Tab. 15: Bandenstatistik der in den Hauptversuchen der AFLP-Methode verwendeten Primerkombinationen.

Σ = Summe, MW = Mittelwert

Primerkombination	Anzahl gewerteter Fragmente	Anzahl polymorpher Fragmente [%]
<i>MseCAA-HindACC</i>	52	94
<i>MseCAC-HindACC</i>	34	94
<i>MseCAC-HindAGC</i>	32	97
<i>MseCAA-HindACA</i>	36	94
<i>MseCAA-HindAAG</i>	42	100
<i>MseAAG-HindAAC</i>	32	94
<i>MseAGC-HindACG</i>	30	100
<i>MseAAG-HindACA</i>	52	96
Σ/MW	310	96

Die Bandenmuster wurden in einer binären Matrix kodiert (vgl. Kap. 2.2.4.6) und der gesamte Datensatz mit unterschiedlichen Rechenverfahren, mit denen die Verwandtschaft der Proben bestimmt werden sollte, analysiert.

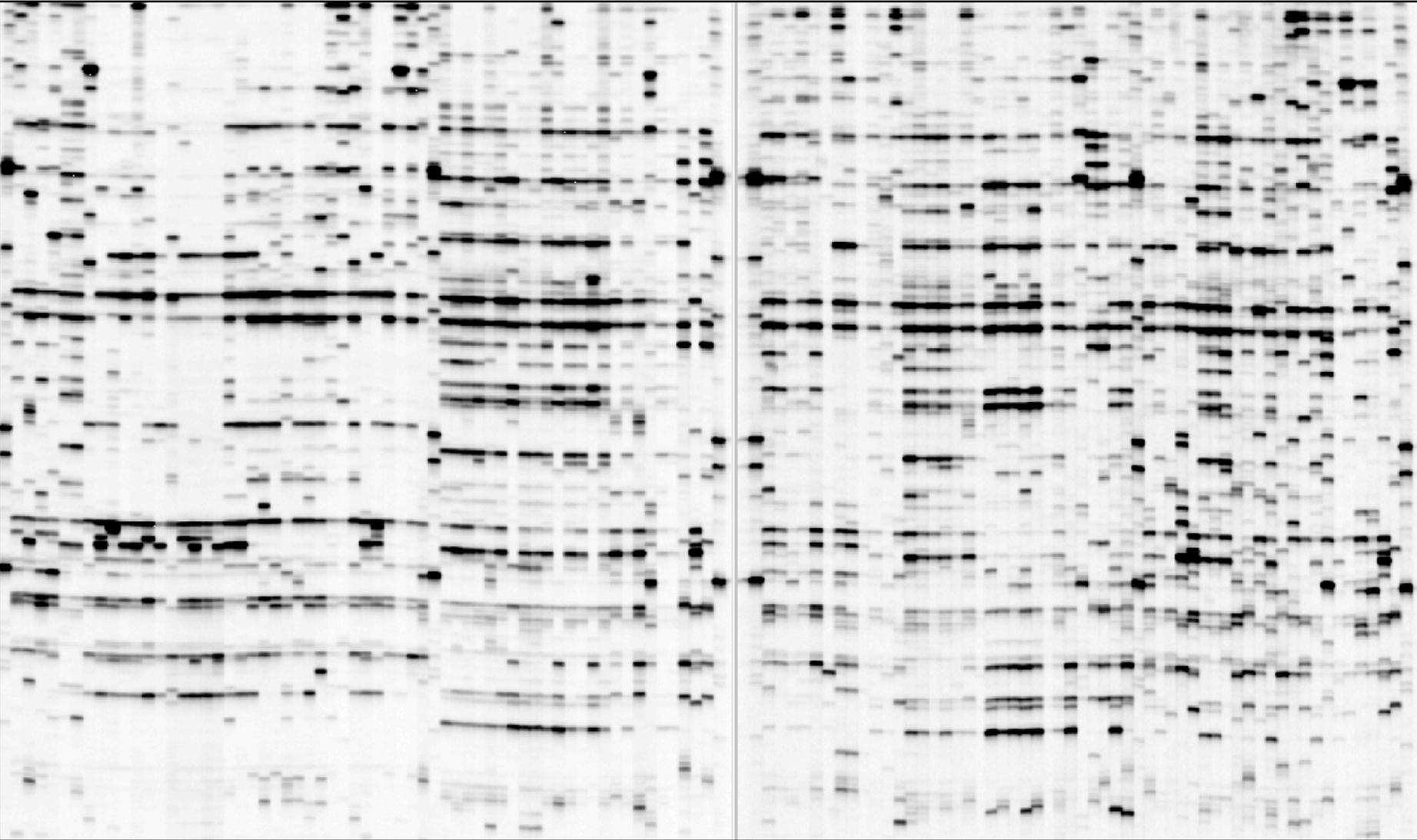


Abb. 10: AFLP-Bandenmuster von 118 *Fosterella* Akzessionen amplifiziert mit der Primerkombination *Mse*I+CAA und *Hind*III+ACA.
Die PCR- Produkte wurden auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel auf einem automatischen LI-COR IR2 Sequenzierer aufgetrennt (vgl. Kap. 2.2.3).

3.2.3.1 Distanzanalysen

Die Berechnung der paarweisen Ähnlichkeitswerte der 77 in die Auswertung einbezogenen Proben, basierend auf dem Jaccard- und dem Dice-Index, zeigten annähernd gleiche Ergebnisse. Mit dem Jaccard-Index berechnet, betrug die interspezifische Ähnlichkeit zwischen 0,25 und 0,95; intraspezifisch war die geringste relative Ähnlichkeit mit 0,48 zwischen zwei Akzessionen von *Fosterella elata* zu finden. Die größte Distanz zu allen anderen Taxa wies *F. spectabilis* auf (relative Ähnlichkeit 0,25).

Die paarweisen Dice-Ähnlichkeitswerte der Taxa lagen innerhalb der Gattung *Fosterella* zwischen 0,39 und 0,95. Innerhalb einer Art betrug die Ähnlichkeit mindestens 0,66. Die geringste Ähnlichkeit zu allen anderen Taxa zeigte erneut *F. spectabilis* mit 0,39.

NJ-Analyse

Die Neighbor-Joining-Analyse basierend auf dem gesamten AFLP-Datensatz (77 Proben und 310 Merkmale) wurde mit beiden Ähnlichkeitskoeffizienten durchgeführt. Die Topologien der entstandenen Phänogramme sind nahezu identisch. Aus diesem Grund werden im Folgenden Bäume dargestellt, deren Berechnung mit Hilfe des Dice-Index durchgeführt wurden.

Die für eine Phylogenie benötigte Außengruppe musste aus den vorhandenen *Fosterella*-Proben gewählt werden. Um diese zu ermitteln wurden verschiedene Bewurzelungsmöglichkeiten gewählt. Beim „midpointrooting“ war *Fosterella spectabilis*, die die größten Distanzwerte zu allen anderen Taxa aufwies, auf dem längsten Ast zu finden (Abb. 11). Bei der Erzeugung einer künstlichen Außengruppe mit der „all-zero-Hypothese“ (Lundberg 1972) stand *F. spectabilis* der künstlichen Außengruppe in der Topologie am nächsten und damit basal zu allen anderen *Fosterella*-Akzessionen (Abb. 11). Aus diesem Grund wurde *F. spectabilis* für alle nachfolgenden Berechnungen als Außengruppe verwendet (vgl. Abb. 12). Alternativ wurden auch andere Taxa als Außengruppe eingesetzt, was aber keinen nennenswerten Einfluß auf die Topologie der Innengruppe in den NJ-Phänogrammen hatte.

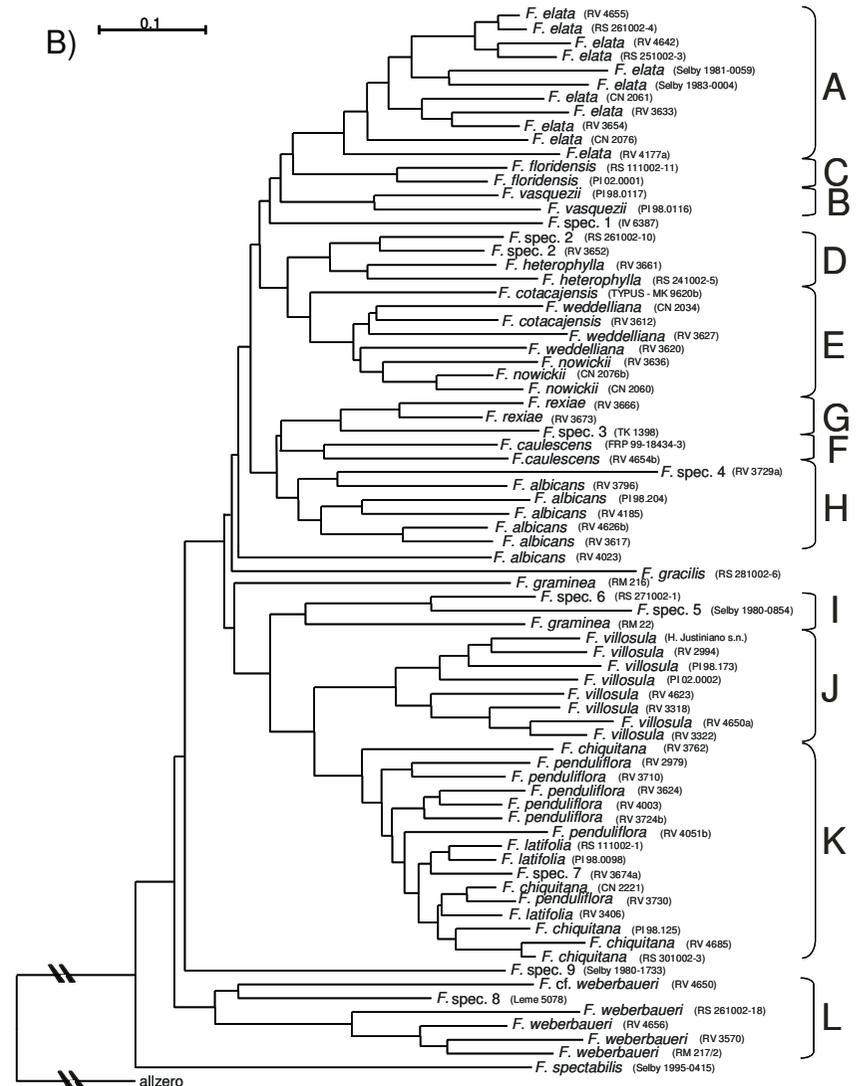
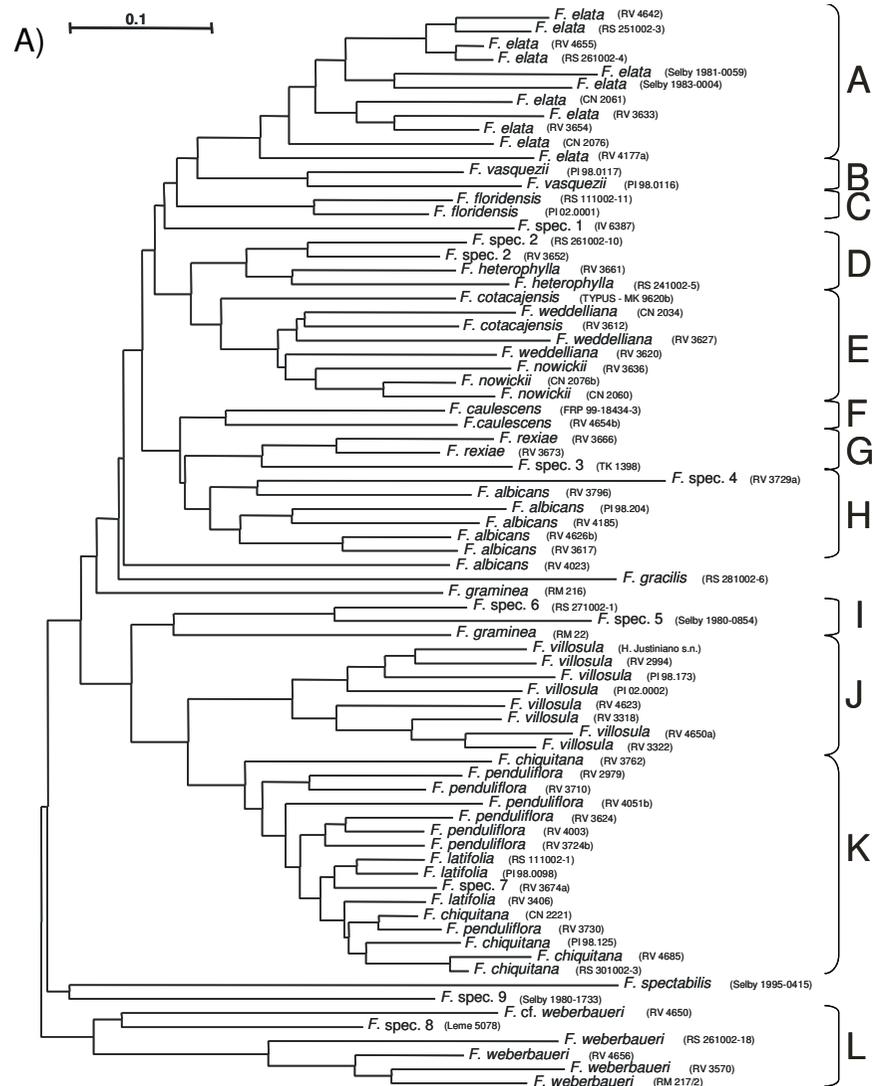


Abb. 11: Neighbor-Joining-Phänogramme der kombinierten AFLP-Analyse: Außengruppenvergleich.

Die Berechnung beruht auf acht Primerkombinationen mit 310 Merkmalen. A) Phänogramm mit „midpointrooting“ B) Phänogramm mit künstlicher Außengruppe (allzero), für die alle Merkmale als „0“ in der Merkmalsmatrix gewertet wurden. Die Distanzen wurden mit dem Dice-Index (Nei und Li 1979) berechnet. Die Klammern fassen moderat bis sehr gut gestützte Artengruppen zusammen (vgl. Abb. 12).

Das Phänogramm der Neighbor-Joining-Analyse des kombinierten AFLP-Datensatzes mit *F. spectabilis* als Außengruppe ist in Abb. 12 dargestellt. Dieser Baum lässt sich (unabhängig von der Wahl der Außengruppe) in 12 Gruppen (A bis L) unterteilen, die statistisch unterschiedlich gut gestützt sind (vgl. auch Abb. 11).

- Die **Gruppe A**, die mit einem Bootstrapwert (BS) von 73 % moderat gestützt ist, umfasst alle Proben von *Fosterella elata*.
- **Gruppe B** beinhaltet die beiden untersuchten Proben von *F. vasquezii*.
- **Gruppe C**, enthält zwei Akzessionen von *F. floridensis*. Die Gruppen B und C sind mit einem BS von 97 % bzw. 100 % sehr gut gestützt. *Fosterella spec. 1* nimmt zu den Gruppen A, B und C eine basale Position ein.
- **Gruppe D** (BS 87 %) fasst zwei Akzessionen einer noch unbekanntes Spezies (*F. spec. 2*, BS 85 %) mit zwei Proben von *F. heterophylla* zusammen, die wiederum eine moderate Unterstützung von 69 % aufweisen.
- Der gleiche Bootstrapwert zeigt sich auch für die **Gruppe E**. Sie beinhaltet in einer basalen Position den Klonotypus von *F. cotacajensis*, drei Proben von *F. nowickii* (vereinigt mit 57 % BS) sowie vier Akzessionen von *F. weddelliana* (gestützt mit 53 % BS).
- **Gruppe F** (BS 58 %) besteht aus zwei Akzessionen von *F. caulescens*,
- **Gruppe G** (BS 73 %) beinhaltet neben den beiden Akzessionen von *F. rexiae* eine noch unbestimmte *Fosterella* (*F. spec. 3*).
- Die **Gruppe H** (BS < 50 %), vereinigt fünf Akzessionen von *F. albicans* mit der noch keiner Art zugeordneten *F. spec. 4*.
- Zu **Gruppe I** (ohne BS) gehören zwei weitere *Fosterella*-Akzessionen unbekannter Zuordnung (*F. spec. 5* und *F. spec. 6*) und eine weitere *F. graminea*.
- In der sehr gut gestützten **Gruppe J** (BS 98 %) sind alle Proben von *F. villosula* zusammengefasst. Sie kann in zwei Untergruppen geteilt werden, von denen eine moderat (BS 70 %) und die andere nur sehr schwach (BS 55 %) gestützt ist.
- Die **Gruppe K** (BS 72 %) beinhaltet neben allen Akzessionen von *F. penduliflora*, *F. chiquitana* und *F. latifolia* auch die bisher unbekanntes *F. spec. 7*.
- Im Phänogramm steht **Gruppe L** (BS 57 %) allen anderen Gruppen gegenüber und kombiniert die einzige brasilianischen *Fosterella* (*F. spec. 8*) eine *F. cf. weberbaueri* und einer sehr gut gestützten Untergruppe (BS 98 %) mit allen weiteren *F. weberbaueri*-Akzessionen.
- Die basalste Position der Innengruppe nimmt eine weitere unbekanntes *Fosterella* (*F. spec. 9*) ein.

-
- Die Gruppen **A bis H** bilden zusammen eine Großgruppe, die jedoch keine statistische Unterstützung besitzt und an der basal eine weitere *F. albicans*, eine *F. gracilis* und die zweite *F. graminea* stehen.
 - Eine weitere Großgruppe, die mit 53 % schwach gestützt ist, wird aus den Gruppen **I bis K** gebildet.

Über die Verwandtschaften der einzelnen Gruppen zueinander können wegen der sehr schlechten oder nicht vorhandenen statistischen Unterstützung kaum Aussagen getroffen werden. Die Gruppen D und E weisen ebenso wie die Gruppen J und K jeweils ein Schwestergruppenverhältnis auf, dass mit 57 % bzw. 50 % BS allerdings sehr schwach gestützt ist.

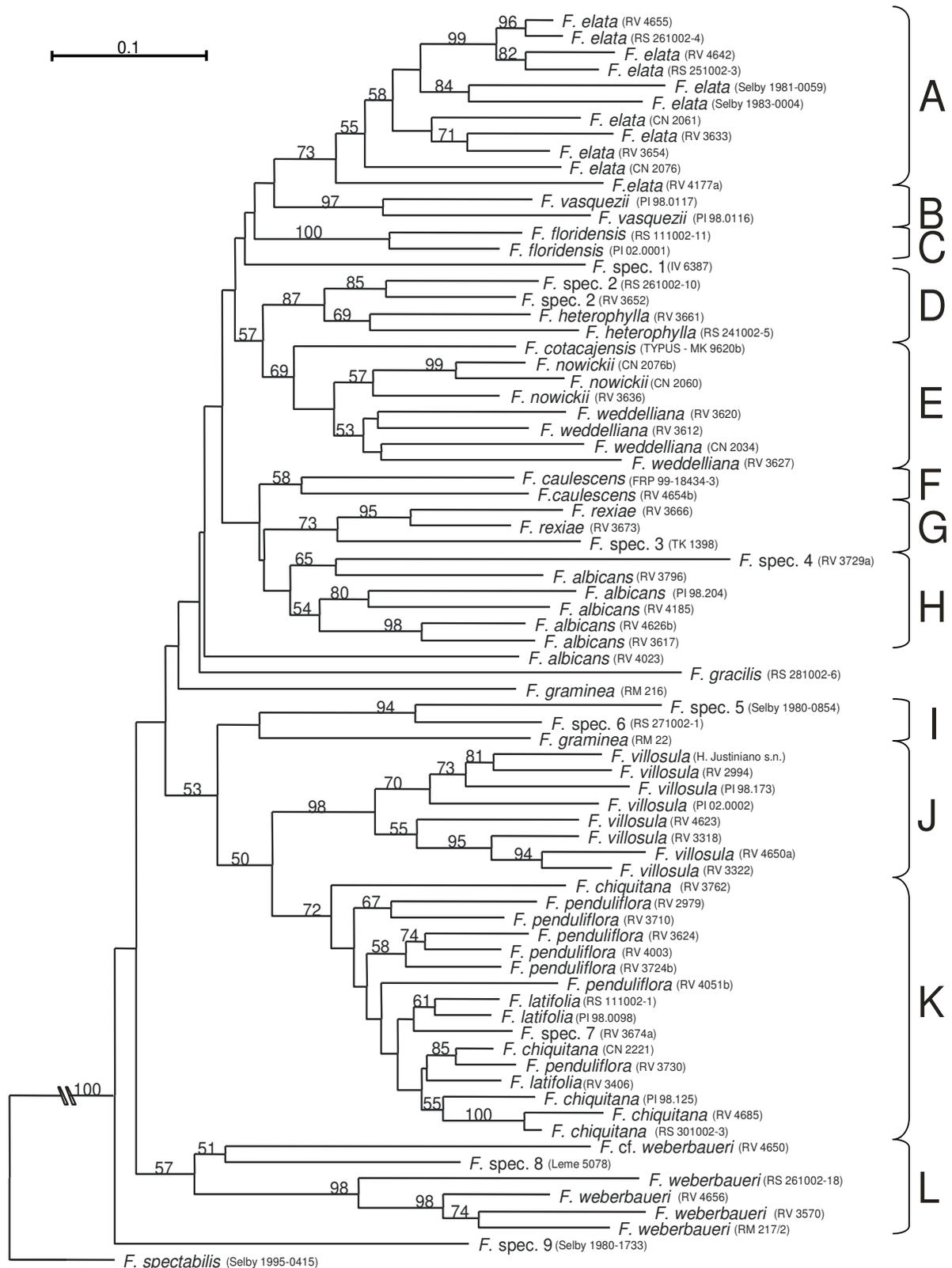


Abb. 12: Neighbor-Joining-Phänogramm der kombinierten AFLP-Analyse mit *F. spectabilis* als Außengruppe.

Die Berechnung beruht auf acht Primerkombinationen mit 310 Merkmalen. Als Außengruppe dient *F. spectabilis*. Die Distanzen wurden mit dem Dice-Index (Nei und Li 1979) berechnet. Bootstrapwerte, basierend auf 1000 Replikaten sind oberhalb der Äste zu finden. Die Klammern fassen moderat bis sehr gut gestützte Artengruppen zusammen.

UPGMA-Analyse

Die UPGMA-Analyse wurde sowohl unter Verwendung des Jaccard- als auch des Dice-Index für den gesamten AFLP-Datensatz (77 Proben und 310 Merkmale) durchgeführt. Die Topologien der entstandenen Phänogramme (Abb. 13 und Abb. 28) sind identisch, sie unterscheiden sich lediglich in den Astlängen, der einzelnen Gruppen. Die Zuordnung der Proben zu den Gruppen A bis L und deren Bootstrap-Unterstützung stimmen weitgehend mit denen des NJ-Phänogramms überein.

Die beiden schon in der NJ-Analyse erkennbaren Großgruppen treten auch im UPGMA-Phänogramm auf; die Artengruppen A (BS 63 %), B (BS 94 %), C (BS 100 %), D (BS 89 %), E (BS 74 %), J (BS 97 %) und K sind für beide Analysen identisch. Die Bootstrapwerte für diese Gruppen differieren zwischen den verschiedenen Analysen nur geringfügig, fallen in der UPGMA-Analyse tendenziell sogar etwas höher aus als in der NJ-Analyse. Die Gruppen F, G und H, die in der NJ-Analyse schwach oder gar nicht gestützt sind, bilden in der UPGMA-Analyse eine gemeinsame Gruppe, die ebenfalls keine statistische Unterstützung besitzt. Aus dieser Gruppe fällt allerdings das Taxon *F. spec. 4* heraus, das in der UPGMA-Analyse zusammen mit *F. spec. 5* der oberen Großgruppe, in der *F. spec. 9* die basalste Position einnimmt, gegenüber steht.

Die untere Großgruppe setzt sich auch im UPGMA-Baum aus den Artengruppen K (78 %), J (BS 97 %) und L' (BS 99%) zusammen. An der Basis der Gruppe K stehen *F. spec 6* und *F. graminea*, die in der NJ-Analyse der Gruppe I zugeordnet wurden. Den Gruppen K und J steht eine Gruppe gegenüber, die zum einen zwei Proben, die in der NJ-Analyse der Gruppe L zugeordnet wurden (*F. spec. 8* und *F. cf. weberbaueri*), und zum anderen eine der beiden untersuchten *F. graminea* (RM 216) enthält.

F. gracilis steht allen bisher beschriebenen Gruppen gegenüber. Die basalste Artgruppe im Baum ist aber auch für diese Analyse die Gruppe L', die nun ausschließlich aus Vertretern der Spezies *F. weberbaueri* (BS 99 %) besteht. *Fosterella spectabilis* nimmt erneut die basalste Position der gesamten Topologie ein.

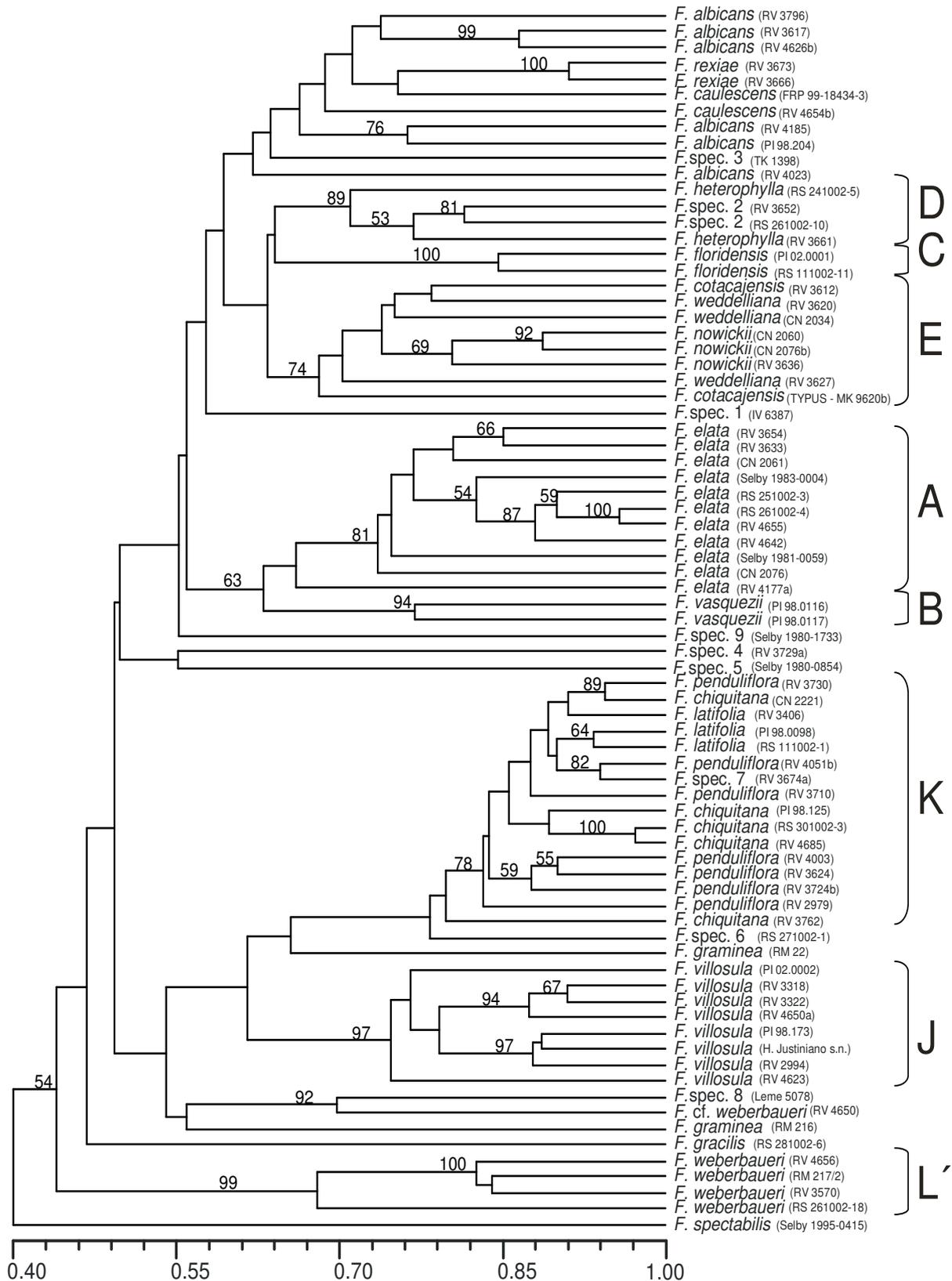


Abb. 13: UPGMA-Phänogramm der kombinierten AFLP-Analyse berechnet mit dem Dice-Index. Die Berechnung beruht auf acht Primerkombinationen mit 310 Merkmalen. Der Maßstab gibt die relative genetische Ähnlichkeit an. Bootstrapwerte basierend auf 1000 Replikaten sind oberhalb der Äste zu finden. Die Klammern fassen die im der NJ-Baum herausgestellten Artengruppen zusammen.

3.2.3.2 Cophänetische Koeffizientenanalyse

Sowohl die Neighbor-Joining- als auch die UPGMA-Analyse wurden mit Distanzmatrizen durchgeführt, die entweder auf dem Dice- oder dem Jaccard-Index beruhen. Mit Hilfe einer cophänetischen Analyse wurden die Korrelationskoeffizienten (r) für alle Analyse/Index-Kombinationen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 zusammengefasst. Die Kombination des Jaccard-Index mit der UPGMA-Clusteranalyse erbrachte die höchste cophänetische Korrelation ($r = 0,93$). Dieser Wert ist jedoch nur geringfügig höher als der für die Kombination des Dice-Index mit UPGMA ($r = 0,92$). Die Topologie der mit dem Dice- oder dem Jaccard-Ähnlichkeitsindex erstellten Dendrogramme war jeweils identisch (vgl. Abb. 13 und Abb. 28). Die Korrelation zwischen den Indizes und ihren cophänetischen Matrizen zeigt somit, dass die Dendrogramme ihre jeweilige Ausgangsmatrix generell sehr gut widerspiegeln. Auch die Topologien der NJ-Dendrogramme sind sehr ähnlich zu denen der UPGMA-Analyse.

Tab. 16: Korrelationskoeffizienten (r) der cophänetischen Analyse.

Vergleich zwischen den verschiedenen Ähnlichkeitsindizes (Dice, Jaccard) und den verwendeten Clusteranalysemethoden (NJ, UPGMA).

	UPGMA	NJ
Dice	0,92	0,83
Jaccard	0,93	0,82

3.2.3.3 Hauptkoordinatenanalyse

Das Ergebnis der Hauptkoordinatenanalyse ist in Abb. 14 dargestellt. Die im Koordinatensystem (durch Einkreisen) hervorgehobenen, bereits in der NJ- und der UPGMA-Analyse statistisch gut gestützten Gruppen A, B, D, J, K und L sind entlang der ersten Hauptkoordinate, die eine Varianz von 28,4 % aufweist, deutlich voneinander abgrenzbar. Im oberen rechten Quadranten des Koordinatensystems finden sich eine Reihe von Akzessionen, die anscheinend nahe nebeneinander liegen. Diese sind in der zweiten Ebene, die eine Varianz von 12,2 % aufweist, etwas besser aufgelöst, sodass hier die Gruppen C, E und I differenzierbar werden. Die „NJ“-Gruppen F, G und H sind in der Hauptkoordinatenanalyse nicht kohärent, was den Ergebnissen der UPGMA-Analyse entspricht. Die Varianz der dritten Ebene beträgt 11,4 %. Die Gesamtvarianz für die drei dargestellten Ebenen zeigt mit 52 % eine gute Auflösung der Proben im Koordinatensystem.

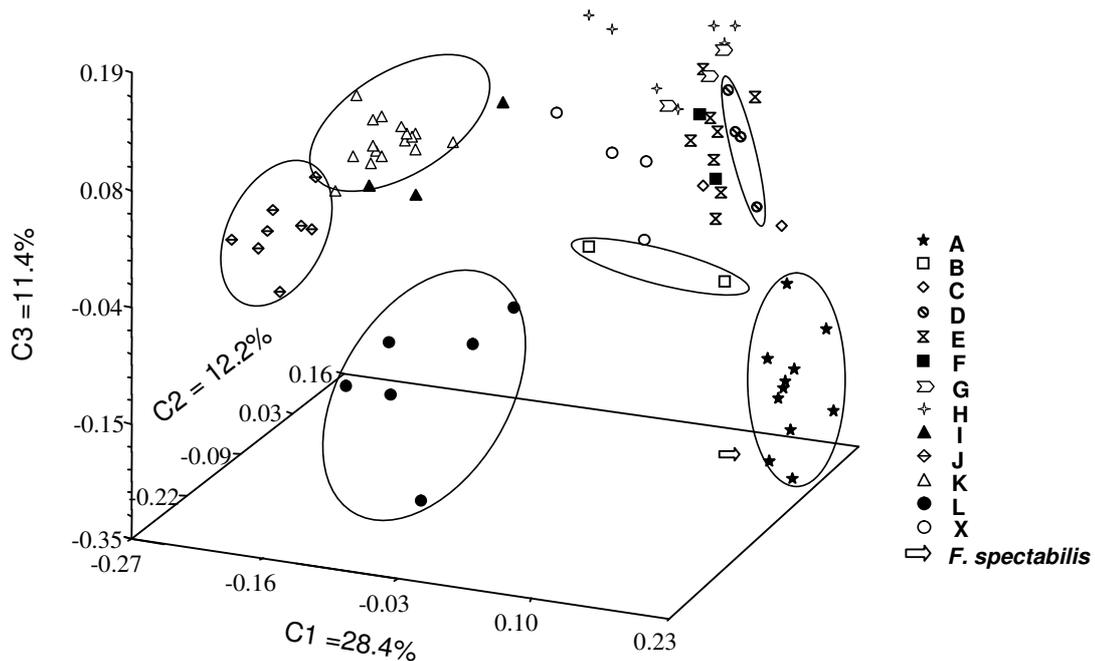


Abb. 14: Hauptkoordinatenanalyse des kombinierten AFLP-Datensatzes.

Die Berechnung beruht auf acht Primerkombinationen mit 310 Merkmalen. Jeder Punkt, der mit einem Symbol dargestellt ist, steht für eine Akzession. Die verschiedenen Symbole repräsentieren die einzelnen Gruppen, die entsprechend der NJ-Analyse (vgl. Abb. 12) benannt sind. Artengruppen, die im Koordinatensystem deutlich voneinander abgrenzbar sind, wurden durch Einkreisen hervorgehoben. Ein X steht für Proben, die sowohl in der NJ-Analyse als auch in allen weiteren Analysen keiner Gruppe zugeordnet werden konnten. Die Werte an den Achsen zeigen die Varianz der entsprechenden Ebene. Die verwendete Distanzmatrix wurde mit dem Bray-Curtis-Index (Bray und Curtis 1957) erstellt.

3.2.3.4 Maximum Parsimonie-Analyse

Die kladistische Analyse des kombinierten AFLP-Datensatzes (77 Proben und 310 Merkmale) unter Anwendung des Maximum Parsimonie-Kriteriums ergab neun kürzeste Bäume mit einer Länge von 2491 Schritten. Einer dieser neun Bäume (most parsimonious tree) ist in Abb. 29 im Anhang dargestellt. Der niedrige Wert seines Konsistenzindex (CI = 0,12) spricht für einen hohen Grad an Homoplasie, was für AFLP-Analysen großer Datensätze bekannt ist (vgl. Despres *et al.* 2003; Bänfer *et al.* 2004). Der Retentionsindex beträgt RI = 0,516.

In Abb. 15 ist der Strict Consensus-Baum dargestellt. Ein großer Teil der untersuchten Taxa sowie die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Artengruppen sind nicht aufgelöst, allerdings sind die folgenden, in den beiden Distanzanalysen definierten Artengruppen mit unterschiedlicher Bootstrap-Unterstützung auch im MP-Baum zu finden: A (BS 56 %), B (BS 81 %), C (BS 99 %), D (BS 57 %), E (BS 65 %), J (BS 63 %), K (BS 97 %) und L (BS 53 %). Die Gruppen J, K und zwei Akzessionen der Gruppe I (*F. spec.* 5 und *F. spec.* 6) stehen mit einer schwachen statistischen Unterstützung (BS 67 %) in Beziehung zueinander. Alle übrigen Proben sind nicht zu Gruppen vereinigt, sondern stehen einzeln oder in Artpaaren im Baum (Rex *et al.* 2007).

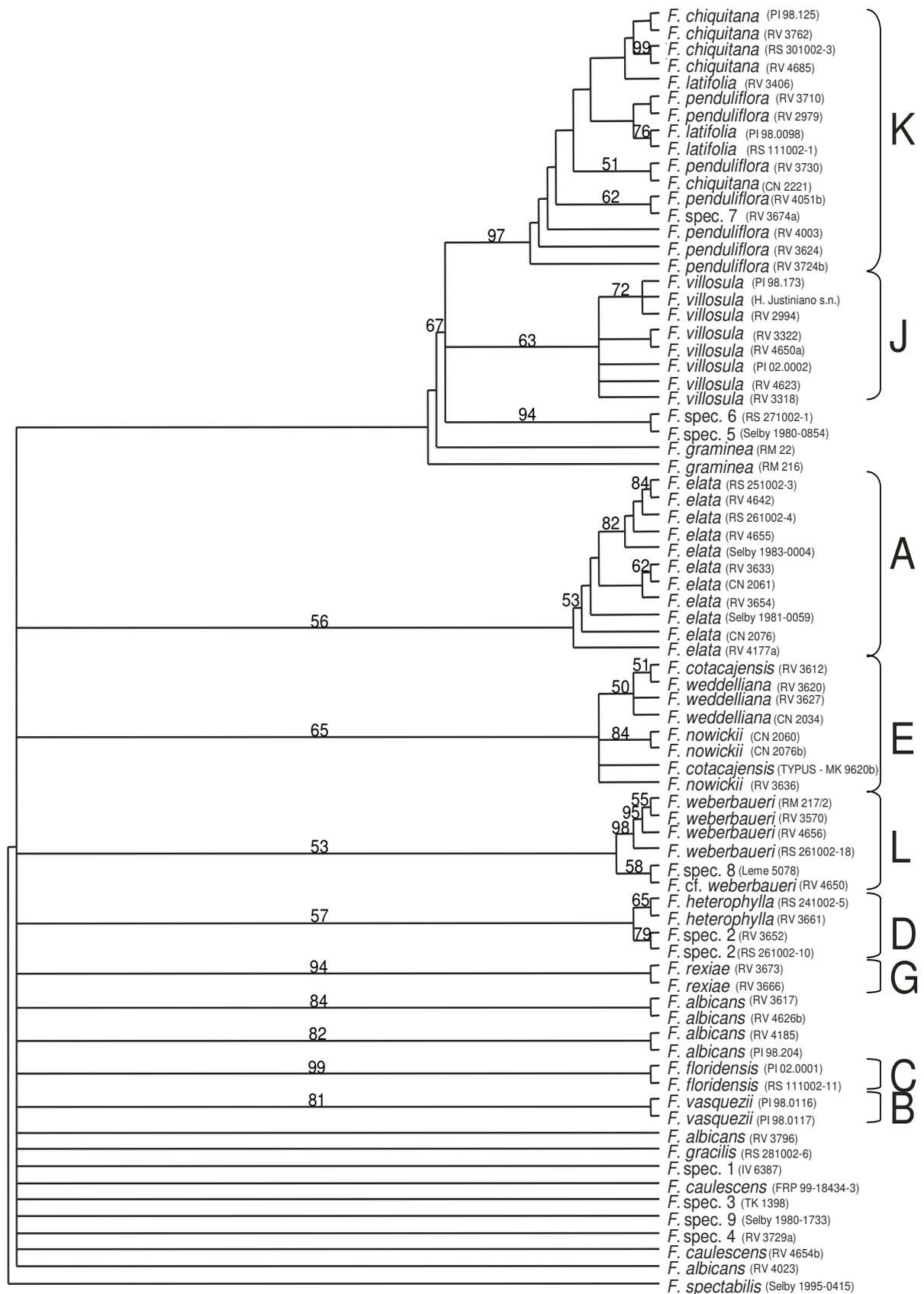


Abb. 15: Strict Consensus-Baum der MP-Analyse des kombinierten AFLP-Datensatzes.

Die Berechnung beruht auf acht Primerkombinationen mit 310 Merkmalen. Die einzelnen Artgruppen sind mit Klammern zusammengefasst und entsprechen (soweit vorhanden) denen der NJ-Analyse (Abb. 12). Bootstrap-Werte auf der Basis von 1000 Replikaten sind oberhalb der Äste zu finden.

3.2.4 Sequenzanalyse der Chloroplasten-DNA

Im nachstehenden Abschnitt erfolgt zunächst die Beschreibung der Sequenzalignments sowie der Ergebnisse der Maximum Parsimonie-Analyse der einzelnen Loci im Vergleich. Anschließend wird eine kombinierte Analyse der Loci mit unterschiedlichen Verfahren durchgeführt. In Tab. 17 werden die Sequenzdaten aller Einzel- und Gesamtanalysen zusammengefasst.

3.2.4.1 Einzeldatensätze

***atpB-rbcL*-Intergenischer Spacer**

Die Chloroplasten-Region *atpB-rbcL* weist einen dreifachen zusammengesetzten Mikrosatelliten ($C_{(n)}$, $T_{(n)}$, $A_{(n)}$) mit so starker Variation auf, dass sich die Editierung und Homologisierung dieses Bereiches als schwierig erwies (Abb. 16). Aus diesem Grund wurde diese Mikrosatellitenregion sowohl aus der Einzel- als auch aus den kombinierten Analysen ausgeschlossen. Das editierte Alignment besitzt für *atpB-rbcL* eine Gesamtlänge von 713 bp. Von diesen 713 Basenpositionen wurden 454 Gap-Positionen (Lücken bzw. Insertions- oder Deletionsereignisse), zu 35 Indels mit einer Größe zwischen 1 bp bis 175 bp kodiert. Somit betrug die Anzahl der für diesen Locus einbezogenen Merkmale 748. In der Maximum Parsimonie-Analyse wurden 596 konstante und 156 variable Merkmale gewertet, von denen wiederum 97 Parsimonie-informativ (Synapomorphien) waren. Die interspezifische Sequenzvariabilität der Gattung *Fosterella* (ausschließlich beruhend auf Basensubstitutionen) hat einen Wert von 3,2 %, für das gesamte Probenet beträgt sie 10,3 %.

In der Maximum Parsimonie-Analyse wurden 234 kürzeste Bäume mit einer Länge von 211 Schritten gefunden, aus denen sowohl ein 50 % Majority Rule- als auch ein Strict Consensus-Baum konstruiert wurden (Abb. 17).

Die Topologien beider Bäume unterscheiden sich nur geringfügig. So zeigt sich im Majority Rule Consensus-Baum eine enge Verwandtschaft zwischen zwei *F. weberbaueri*-Akzessionen (TK 7285 und RV 3570). *F. rusbyi* (Heid 103751) fällt aus der Gruppe der *F. schidosperma*-Akzessionen heraus in die basale *Fosterella*-Polytomie.

Ein zufällig ausgewähltes sparsamstes Phylogramm (most parsimonious tree) ist in Abb. 30 im Anhang abgebildet. Sein Konsistenzindex (CI) beträgt 0,749, der Retentionsindex 0,932.

Tab. 17: Sequenzdaten der drei untersuchten Chloroplasten-DNA Regionen.

Für die Einzelanalysen wurden kodierte Indels einbezogen, die kombinierte Analyse wurde jeweils mit und ohne kodierte Indels durchgeführt. bp = Basenpaare

	<i>atpB-rbcL</i> (ohne Mikrosatelliten -Region)	<i>psbB-psbH</i>	<i>rps16</i> Intron	alle 3 Loci (ohne Indels)	alle 3 Loci (mit Indels)
Sequenz- länge [bp]	713	729	928	2370	2488
Position der Sequenzen im Gesamt- alignment	1-713	749-1477	1506-2433	1-713 749-1477 1506-2433	1-2488
Anzahl zu kodierender Gap- Positionen	454	71	409	0	934
Anzahl kodierte Indels	35	28	55	0	118
Position kodierter Indels im Gesamt- alignment	714-748	1478-1505	2434-2488	0	714-748 1478-1505 2434-2488
Anzahl konstanter Merkmale	596	657	797	2050	2050
Anzahl Aut- apomorphien	55	28	61	95	143
Anzahl Syn- apomorphien	97	72	125	225	295
Ausge- schlossene Regionen	polyC (13), polyT (17), poly A (20)	-	-	polyC (13), polyT (17), poly A (20) aus <i>atpB-rbcL</i>	polyC (13), polyT (17), poly A (20) aus <i>atpB-rbcL</i>

<i>F.penduliflora</i> (RV 3624)	TC-----TTTTTTTTTT-----AA-----TT
<i>F.chiquitana</i> (RV 4685)	TC-----TTTTTTTTTT-----AAA-----TT
<i>F.latifolia</i> (RV 3406)	TC-----TTTTTTTTTT-----AA-----TT
<i>F.villosula</i> (BGO 94-05-0016-20)	TC-----TTTTTTTTTT-----AAA-----TT
<i>F.villosula</i> (PI 98.0173)	TCC-----TTTTTTTTTT-----CAAAAAAAAAA-----TT
<i>F.weberbaueri</i> (RV 3570)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.spec.</i> (Leme 5078)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.vasquezii</i> (PI 98.0117)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.elata</i> (RS 251002-3)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAAAAAAAAAAATTT
<i>F.windischii</i> (PI 03.0016)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.floridensis</i> (PI 02.0001)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAAAAAAAAAA-----TT
<i>F.heterophylla</i> (RV 3661)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.cotacajensis</i> (MK 9620b)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAA-----TT
<i>F.rusbyi</i> (HEID 103751)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.rexiae</i> (RV 3666)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.caulescens</i> (FRP 99-18434-3)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.spec.</i> (RV 3729a)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----AA-----TT
<i>F.albicans</i> (PI 98.0204)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.spectabilis</i> (MSBG 1995-0415)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.yuvinkae</i> (SR1)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.graminea</i> (BGB 115-19-83-80)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>F.micrantha</i> (HEID 103751)	TCC-----TTTTTTTTTTTT-----CAAAAAAAAAA-----TT
<i>F.gracilis</i> (RS 281002-6)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----AA-----TT
<i>T.somnians</i> (Blass 1447)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----TT
<i>C.morreniana</i> (FRP 92-12302-0)	TCCCCCCC-TTTTTTTTTT-----CAAAAAAAAAA-----TT
<i>Deu.scapigera</i> (HEID 130020)	TC-----TTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TTAAATT
<i>Bro.acuminata</i> (FRP 95-15043-3)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----CAAAAAAAAAA-----TT
<i>Ae.kertesziae</i> (FRP 98-16935-3)	TCCCCCCCCCTTTTTTTTTT-----CAAAAAAAAAA-----TT
<i>Deu.brevifolia</i> (HEID 107170)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>O.carnea</i> (FRP 98-16853-2)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----AA-----TT
<i>Deu.lotteae</i> (HEID 103817)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>G.glaucophylla</i> (HEID 102386)	TCC-----TTTTTTTTTTTTTT-----AA-----TT
<i>Pu.venustra</i> (FRP 86-18503-3)	TC-----TTTTTTTTTTTTTTTTTCAAAAAGAA-----TT
<i>H.stenopetala</i> (FRP 0-19154-2)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----CAAAAAAAAAA-----TT
<i>Pit.chiapensis</i> (BGS 41677)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----GAAAAAAAAA-----TT
<i>Dy.estevesii</i> (HEID 105188)	TC-----TTTTTTTTTTTT-----CAAAAAAAAAA-----TTAAATT

Abb. 16: Komplexer Mikrosatellit im Sequenzalignment des *atpB-rbcl*-Intergenischen Spacers.

Der abgebildete Bereich von 50 bp, der einen zusammengesetzten Mikrosatelliten aus drei Motiven enthält, wurde aus dem Alignment ausgeschlossen. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, Pit: *Pitcairnia*, Ae: *Aechmea*, O: *Ochagavia*, Pu: *Puya*, T: *Tillandsia*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, Bro: *Brocchinia*.

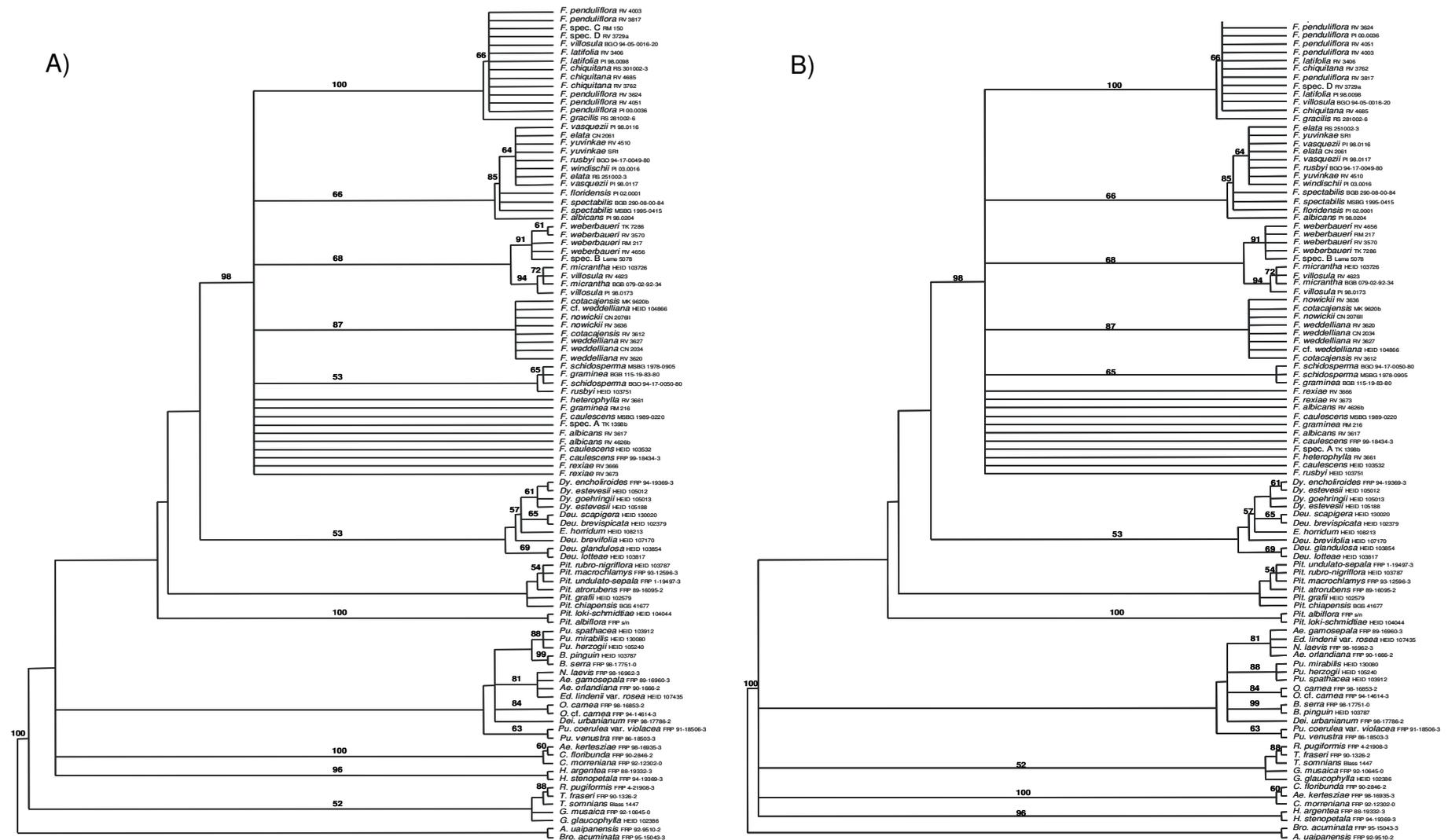


Abb. 17: Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus *atpB-rbcL*: Consensus-Bäume.
 A) 50 % Majority Rule Consensus-Baum, B) Strict Consensus-Baum aus 234 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 211. Bootstrappwerte sind oberhalb der Äste angegeben. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, Pit: *Pitcairnia*, Ae: *Aechmea*, O: *Ochagavia*, Pu: *Puya*, T: *Tillandsia*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, Bro: *Brocchinia*.

***psbB-psbH*-Intergenischer Spacer**

Das Sequenzalignment für den Locus *psbB-psbH* hat eine Länge von 729 bp. Dabei wurden 71 Gap-Positionen in 28 Indels (deren Größenbereich zwischen 1 bp und 19 bp lag) kodiert. Von den insgesamt 757 Merkmalen sind 657 konstant, von den 100 variablen Merkmalen wiederum sind 72 Parsimonie-informativ (synapomorph).

Die Sequenzvariabilität für die Gattung *Fosterella* (ausschließlich beruhend auf Basensubstitutionen) beträgt 2,9 %, die für das gesamte Probenet 5,2 %.

In der MP-Analyse wurden für den Locus *psbB-psbH* 618 kürzeste Bäume mit 298 Schritten Länge gefunden. Der 50 % Majority Rule- und der Strict Consensus-Baum sind in Abb. 18 dargestellt.

Unterschiede in den Topologien dieser beiden Bäume treten nur innerhalb der Clades auf. Im Majority Rule-Baum zeigt sich eine nähere Verwandtschaft zwischen allen Akzessionen von *F. vasquezii*, *F. yuvinkae* und *F. windischii*, die allerdings statistisch nicht gestützt ist. Die zwei Akzessionen von *F. rexiae* bilden ebenso wie beide Vertreter von *Ochagavia* eigene Gruppen, die im Strict Consensus-Baum jeweils Polytomien zugeordnet werden. Die Gruppe der Bromelioideae-Vertreter *Aechmea*, *Navia* und *Edmundoa* zeigt im Majority Rule-Baum eine bessere Auflösung.

Ein zufällig ausgewähltes Phylogramm ist in Abb. 31 im Anhang gezeigt. Der Konsistenzindex (CI) beträgt 0,677, der Retentionsindex (RI) hat einen Wert von 0,922.

***rps16*-Intron**

Das Sequenzalignment für das *rps16*-Intron hat eine Länge von 928 bp. Davon wurden 409 Gap-Positionen in 55 Indels (Länge: 1 bp bis 38 bp) kodiert. Die Gesamtzahl des auszuwertenden Datensatzes beläuft sich also auf 983 Merkmale, von denen 797 konstant sind. Von den 186 variablen Merkmalen sind 125 Parsimonie-informativ (Synapomorphien). Die Sequenzvariabilität (ausschließlich auf Basensubstitutionen beruhend) beträgt 2,9 % für die Gattung *Fosterella* und 7,8 % für das gesamte Probenet. In der Maximum Parsimonie-Analyse wurden 618 kürzeste Bäume mit einer Länge von 298 Schritten gefunden, aus denen ein 50 % Majority Rule- und ein Strict Consensus-Baum konstruiert wurden (Abb. 19).

Im Majority Rule Consensus-Baum zeigt eine Innengruppe aus allen untersuchten Tillandsioideae-Akzessionen, die im Strict Consensus-Baum zwei Gruppen einer Polytomie bilden.

Ein zufällig ausgewählter kürzester Baum ist in Abb. 32 im Anhang dargestellt. Der Konsistenzindex (CI) dieses Baumes liegt bei 0,705 und der Retentionsindex (RI) bei 0,904.

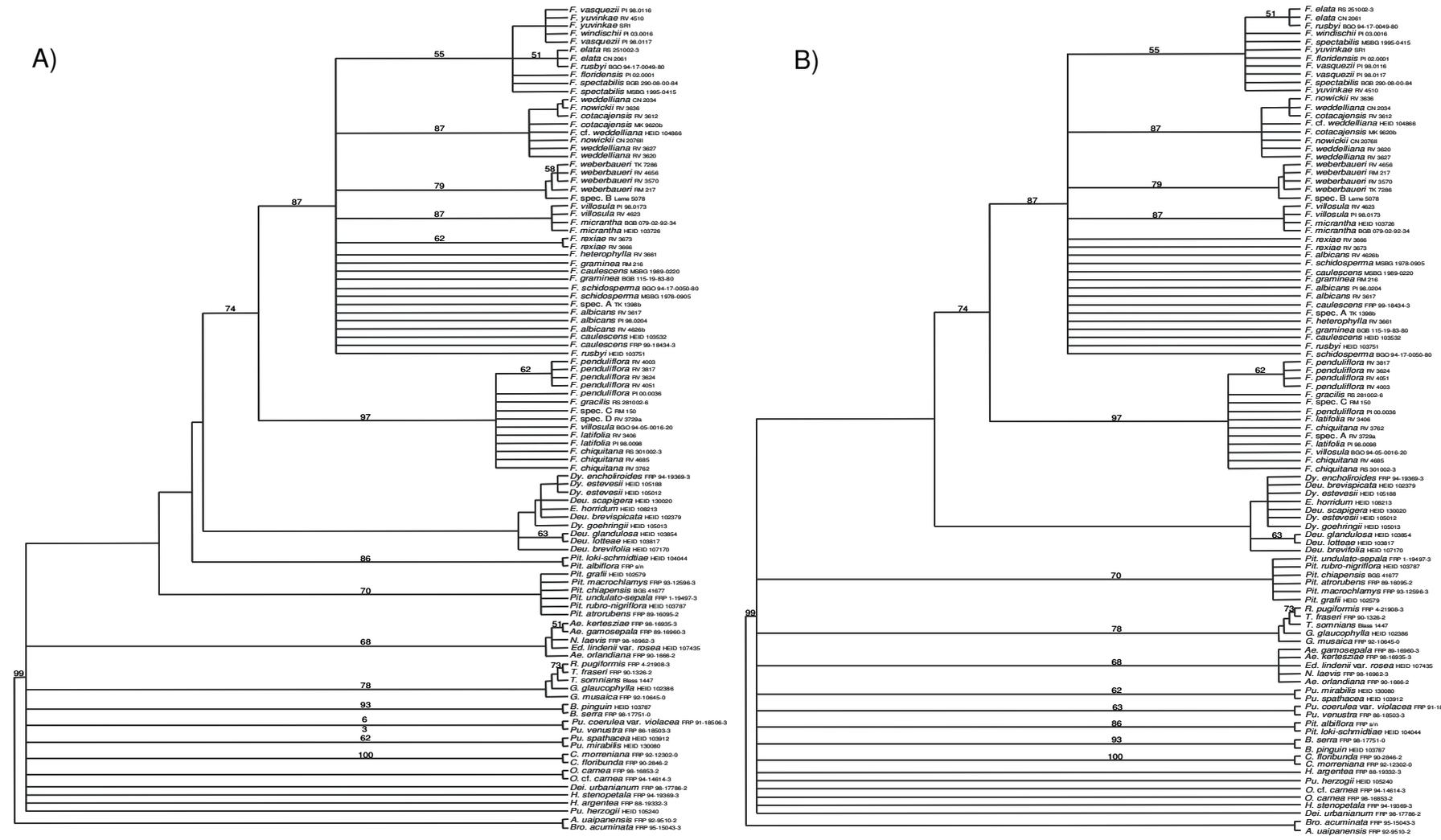


Abb. 18: Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus *psbB-psbH*: Consensus-Bäume.

A) 50 % Majority Rule Consensus-Baum, B) Strict Consensus-Baum aus 587 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 158. Bootstrappwerte sind oberhalb der Äste angegeben. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, Pit: *Pitcairnia*, Ae: *Aechmea*, O: *Ochagavia*, Pu: *Puya*, T: *Tillandsia*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, Bro: *Brocchinia*.

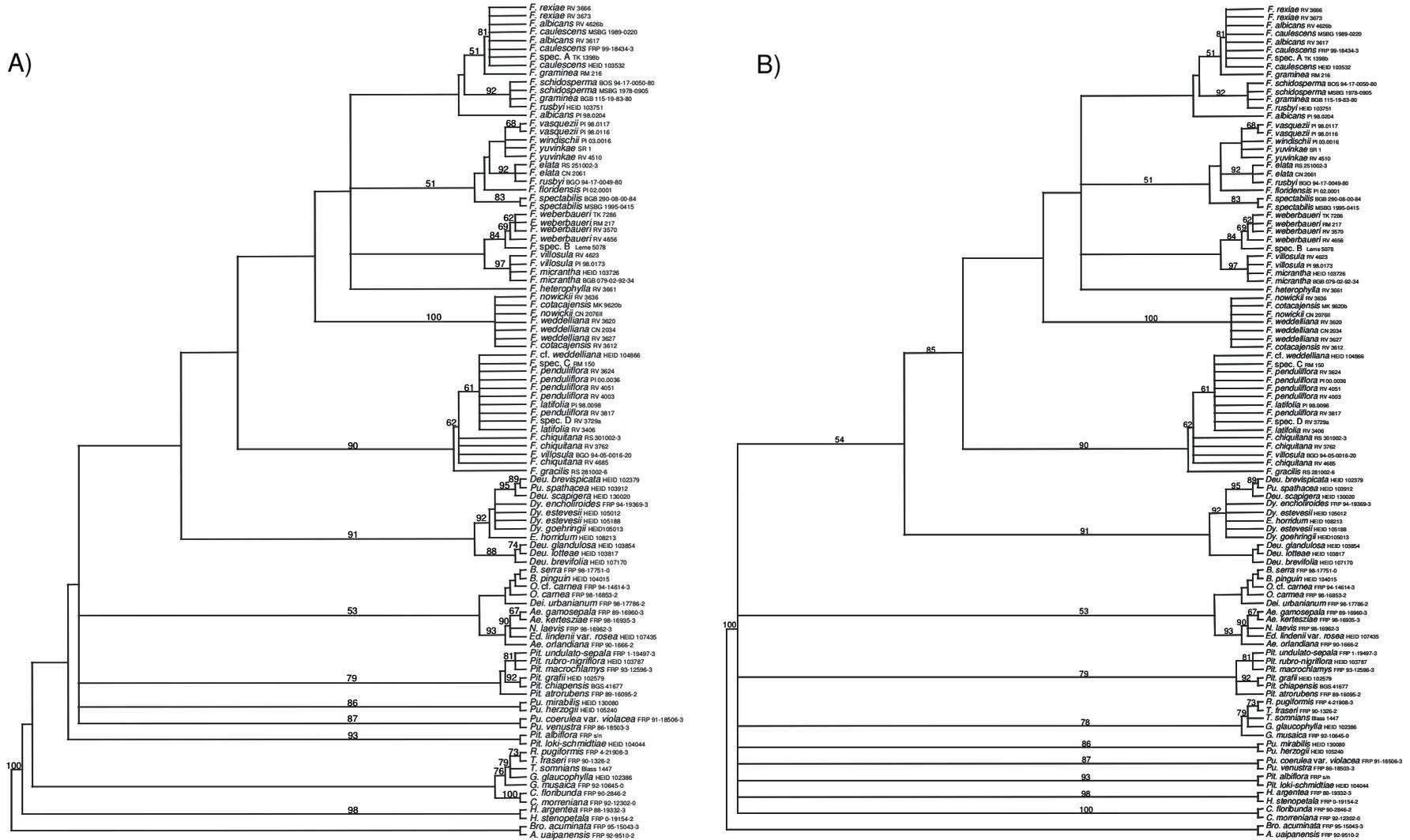


Abb. 19: Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus *rps16*-Intron: Consensus-Bäume.

A) 50 % Majority Rule Consensus-Baum, B) Strict Consensus-Baum aus 618 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 298. Bootstrapwerte sind oberhalb der Äste angegeben. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, Pit: *Pitcairnia*, Ae: *Aechmea*, O: *Ochagavia*, Pu: *Puya*, T: *Tillandsia*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, Bro: *Brocchinia*.

Beim Vergleich der aus den drei Einzelalignments hervorgegangenen Phylogenien (Abb. 17 bis Abb. 19) lassen sich folgende Gemeinsamkeiten hervorheben:

- Die Gattung *Fosterella* stellt eine monophyletische Gruppe dar.
- Die drei Arten *F. penduliflora*, *F. latifolia* und *F. chiquitana* bilden gemeinsam ebenso eine gut gestützte monophyletische Gruppe, wie die drei Arten *F. weddelliana*, *F. nowickii* und *F. cotacajensis*.
- Die *Fosterella*-Arten *F. vasquezii*, *F. elata*, *F. yuvinkae*, *F. floridensis*, *F. windischii*, *F. spectabilis* und eine der beiden *F. rusbyi*-Akzessionen (BGO 94-17-0049-80) gruppieren in jeder Einzelanalyse zusammen.
- Die Schwestergruppe zur Gattung *Fosterella* ist eine Gruppe aus Arten der drei Gattungen *Dyckia*, *Deuterocohnia* und *Encholirium*.
- Die Pitcairnioideae sind wie erwartet, in ihrer traditionellen Umschreibung in allen drei Einzelanalysen paraphyletisch.

Da die Einzeldatensätze keine schwerwiegenden Widersprüche enthielten, wurden sie kombiniert und verschiedenen phylogenetischen Berechnungen unterzogen, die im Folgenden beschrieben werden.

3.2.4.2 Kombination der Einzeldatensätze

Der kombinierte Datensatz bestehend aus den Sequenzalignments von *atpB-rbcL*, *psbB-psbH* und *rps16*-Intron wurde mit verschiedenen Algorithmen zu Phylogenien verrechnet.

Maximum Parsimonie-Analyse einschließlich der Indels

Der kombinierte Datensatz enthielt inklusive der 118 kodierten Indels 2488 Merkmale. Davon waren 2050 Merkmale konstant und 295 Merkmale Parsimonie-informativ (Synapomorphien). Der Mikrosatellit aus der Region *atpB-rbcL* (vgl. Abb. 16) wurde wie bereits bei den Einzelanalysen ausgeschlossen. Die Sequenzvariabilität (beruhend auf Basensubstitutionen inklusive Indels) betrug 4,9 % innerhalb der Gattung *Fosterella* und 11,9 % für das gesamte Probenet.

Die maximale paarweise Sequenzdivergenz im gesamten Probenet betrug 3,99 % zwischen *Fosterella nowickii* und *Brocchinia acuminata* sowie 1,89 % innerhalb der Gattung *Fosterella* zwischen *F. gracilis* und *F. weberbaueri*.

In Abb. 20 wird der aus 777 kürzesten Bäumen mit einer Länge von 712 Schritten konstruierte 50 % Majority Rule- und in Abb. 33 der Strict Consensus-Baum gezeigt. Die Topologien der beiden Bäume sind nahezu identisch.

Ein zufällig ausgewählter kürzester Baum ist im Anhang abgebildet (Abb. 34). Sein Konsistenzindex (CI) beträgt in dieser Analyse 0,667, der Retentionsindex (RI 0,899). Der hohe Wert des Retentionsindex zeigt, dass der Datensatz einen vergleichsweise geringen Anteil an Homoplasien aufweist.

Die Bäume lassen sich in insgesamt 14 Artengruppen unterteilen, die mit römischen Ziffern bezeichnet und im Folgenden näher erläutert werden sollen. Die Gruppen I bis VII entfallen dabei auf die Spezies der Gattung *Fosterella*.

- Die **Gruppe I** ist mit einem Bootstrapwert von 51 % nur sehr schwach gestützt. Sie beinhaltet alle untersuchten Akzessionen von *F. rexiae* und *F. caulescens*, eine unzugeordnete *F. spec. A* und zwei Akzessionen von *F. albicans*, die alle gemeinsam eine Polytomie bilden (BS 79 %). Basal dazu findet sich eine der beiden untersuchten Akzessionen von *F. graminea* (RM 216). Im Majority Rule Consensus-Baum zeigen die beiden *F. rexiae*-Proben eine enge Verwandtschaft zueinander (BS 64 %).
- **Gruppe II** (BS 99 %) umfasst neben den beiden Akzessionen von *F. schidosperma* auch die zweite *F. graminea* (BGB 115-19-53-80) und eine Akzession von *F. rusbyi* (HEID 103751). Die Vertreter der beiden erstgenannten Arten stehen moderat gestützt (BS 73 %) zusammen.
- Die sehr gut gestützte **Gruppe III** (BS 96 %) beinhaltet die folgenden Proben: *F. vasquezii*, *F. windischii* und *F. yuvinkae*, *F. elata* und eine Akzession von *F. rusbyi* (BGO 94-17-0049-80), *F. floridensis* und sowie zwei Akzessionen von *F. spectabilis* (BS 85 %). *Fosterella albicans* (PI 98.0204) nimmt eine basale Position zur sehr gut gestützten Gruppe III (BS 96 %) ein. Im Strict Consensus-Baum (Abb. 33) ist diese Probe ein Teil der Polytomie der Gruppen I bis V und *F. heterophylla*.
- **Gruppe IV** (BS 100 %) vereint alle Taxa von *F. weberbaueri* und enthält zudem die noch nicht zugeordnete brasilianische *Fosterella* (*F. spec. B*).
- **Gruppe V** (BS 100 %) enthält alle Akzessionen der bolivianischen *F. villosula* und der mittelamerikanischen *F. micrantha*.

Die bis hier aufgeführten Gruppen stehen mit *F. heterophylla* in einer Polytomie (BS 68 %), wobei sich die Gruppen I und II ebenso wie die Gruppen IV und V jeweils einen Ast teilen.

- Die **Gruppe VI** (BS 79 %) enthält neben allen Vertretern der Spezies *F. nowickii*, *F. weddelliana* und *F. cotacajensis* auch eine zu *F. weddelliana* ähnliche Akzession.
- **Gruppe VII** (BS 84 %) ist die Schwestergruppe zu den Gruppen I bis VI und vereinigt alle Akzessionen von *F. penduliflora*, zwei unzugeordnete Taxa (*F. spec. C* und *D*), zwei Proben von *F. latifolia*, drei Akzessionen von *F. chiquitana*, einer weiteren *F. villosula* und *F. gracilis*.

Einige Beziehungen zwischen den einzelnen Arten lassen sich ebenfalls erkennen:

- Innerhalb der Gruppe III zeigt sich ein moderat gestütztes Schwestergruppenverhältnis (BS 70%) zwischen *F. elata*/*F. rusbyi* (BS 96 %) und *F. vasquezii*/*F. windischii*/*F. yuvinkae* (BS 60 %).
- Die Gruppen I und II (kein BS) und IV und V (BS 94 %) lassen jeweils ein Schwestergruppenverhältnis vermuten.

Innerhalb der Gruppen bilden verschiedene Spezies Einheiten, die allerdings keine weiteren Aussagen über ihre Verwandtschaftsverhältnisse zulassen.

Über die Gattung *Fosterella* hinaus wurden die Gruppen VIII bis XIV eingeteilt, die alle zusätzlich untersuchten Akzessionen der drei klassisch definierten Unterfamilien beinhalten.

- **Gruppe VIII** (BS 83 %) kombiniert die Akzessionen der Gattungen *Dyckia*, *Deuterocohnia* und *Encholirium*.
- Die **Gruppen IX** (BS 94 %) und **X** (100 %) beinhalten verschiedene Spezies der Gattung *Pitcairnia*.
- **Gruppe XI** enthält alle untersuchten Bromelioideae (*Neoregelia*, *Aechmea*, *Edmondoa*, *Bromelia*, *Ochagavia* und *Deinacanthon*) sowie die *Puya*-Spezies an der Basis. Die Monophylie der Bromelioideae ist statistisch nicht gestützt.
- Die beiden basalsten Äste der Innengruppe werden einerseits von den Tillandsioideae (**Gruppe XII**, BS 58 %) mit *Racinea*, *Tillandsia*, *Guzmania*, und andererseits *Catopsis* und *Hechtia* (**Gruppe XIII**, BS 100 %) gebildet.
- **Gruppe XIV** besteht aus *Brocchinia* und *Ayensua*. Wegen ihrer bekannten Stellung an der Basis der Bromeliaceae wurden diese Vertreter als Außengruppe gewählt.

Aufgrund des geringen Samplings lassen sich nur wenige Aussagen über die Beziehungen der Gattungen zueinander treffen.

Die Analyse macht jedoch deutlich, dass zwischen der eindeutig monophyletischen Gattung *Fosterella* (Gruppen I bis VII mit einem BS von 100 %) und der gut gestützten Gruppe VIII (*Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Encholirium*; BS 78 %) ein Schwestergruppenverhältnis besteht.

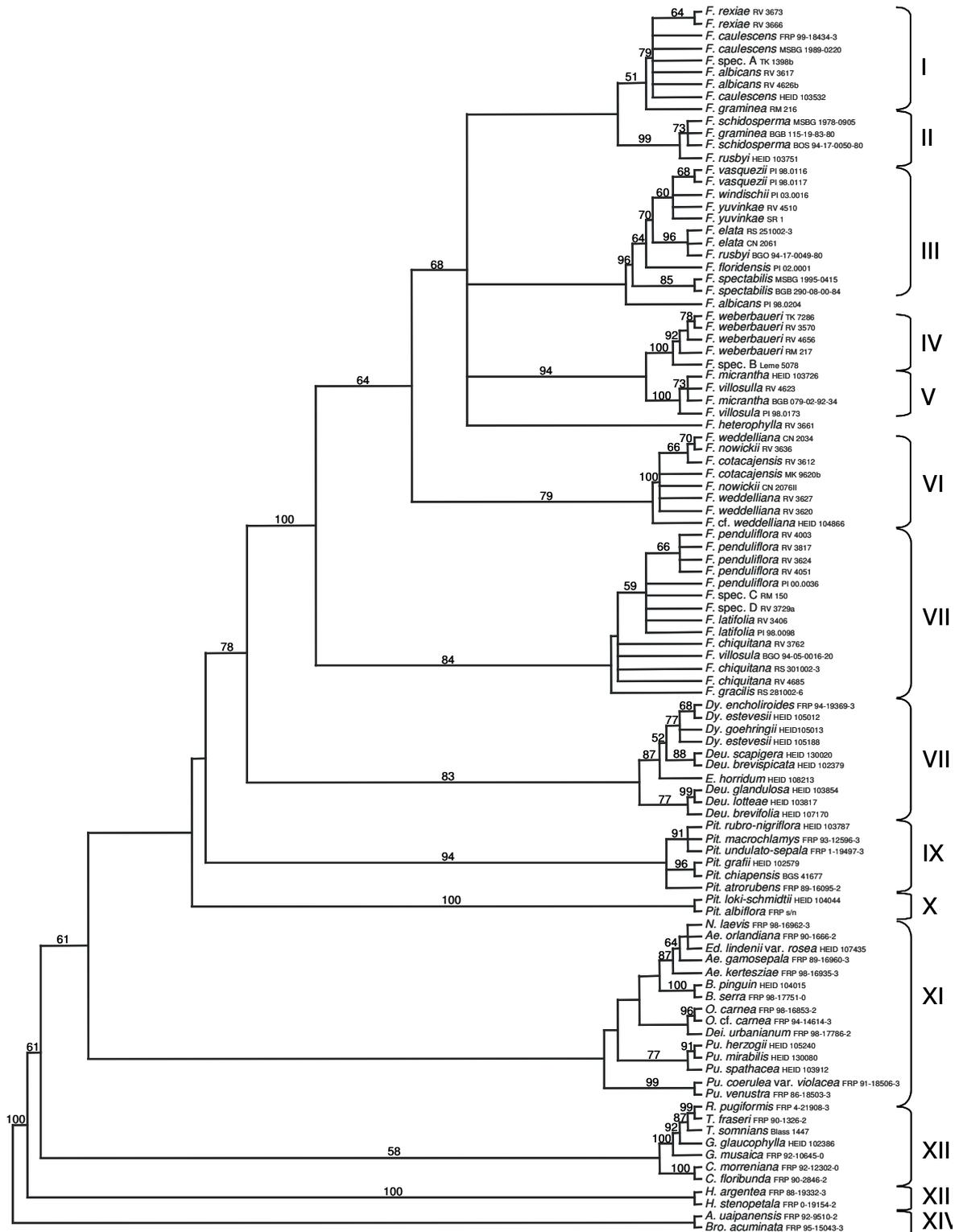


Abb. 20: Kombiniertes Chloroplasten-Datensatz: 50 % Majority Rule Consensus-Baum einer Maximum Parsimonie-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels.

Majority Rule-Baum der drei untersuchten Chloroplastenloci (*atpB-rbcL*, *psbB-psbH* und *rps16*-Intron) aus den 777 besten Bäumen mit einer Mindestschrittlänge von 712. Die Bootstrapwerte über 50 %, basierend auf 1000 Replikaten sind oberhalb der Äste angegeben. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, E: *Encholirium*, Pit: *Pitcairnia*, N: *Neoregelia*, Ae: *Aechmea*, Ed: *Edmundoa*, B: *Bromelia*, O: *Ochagavia*, Dei: *Deinacanthos*, Pu: *Puya*, R: *Racinea*, T: *Tillandsia*, G: *Guzmania*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, A: *Ayensua*, Bro: *Brocchinia*.

Maximum Parsimonie-Analyse ohne Indels

Eine weitere kombinierte Maximum Parsimonie-Analyse wurde unter Ausschluss der Indels vorgenommen, (d. h. das komplette Alignment wurde in die Analyse einbezogen und nur die Kodierung weggelassen). In diese Analyse wurden 2370 Merkmale einbezogen, von denen 2050 konstant und 225 synapomorph sind. Die Sequenzvariabilität (beruhend auf Basensubstitutionen) betrug für die Gattung *Fosterella* 3,0 %, das gesamte Probenet zeigte eine Variabilität von 9,5 %.

Der Majority Rule Consensus-Baum aus 959 kürzesten Bäumen mit 496 Schritten Länge ist in Abb. 21 dargestellt, der Strict Consensus-Baum wird in Abb. 35 und einer der 959 most parsimonious trees in Abb. 36 im Anhang gezeigt. Die zur Beurteilung des Homoplasiegrades berechneten Indizes sind mit $CI=0,720$ und $RI=0,919$ etwas höher als für den Datensatz mit kodierten Indels.

Die Topologien der mit und ohne Indels erhaltenen MP-Bäume weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. Alle oben genannten Artgruppen sind in der gleichen Zusammensetzung wieder zu finden, ihre statistische Unterstützung ist jedoch generell geringer. Die Anordnung der Gruppen variiert innerhalb der Gattung *Fosterella* ebenfalls geringfügig, aufgrund der fehlenden statistischen Unterstützung lassen sich aber keine Aussagen über ihre Verwandtschaft untereinander treffen. Das Schwestergruppenverhältnis zwischen der Gattung *Fosterella* und der Gruppe VIII (*Deuterocohnia/Dyckia/Encholirium*) ist mit 59 % in dieser Analyse nur sehr schwach gestützt.

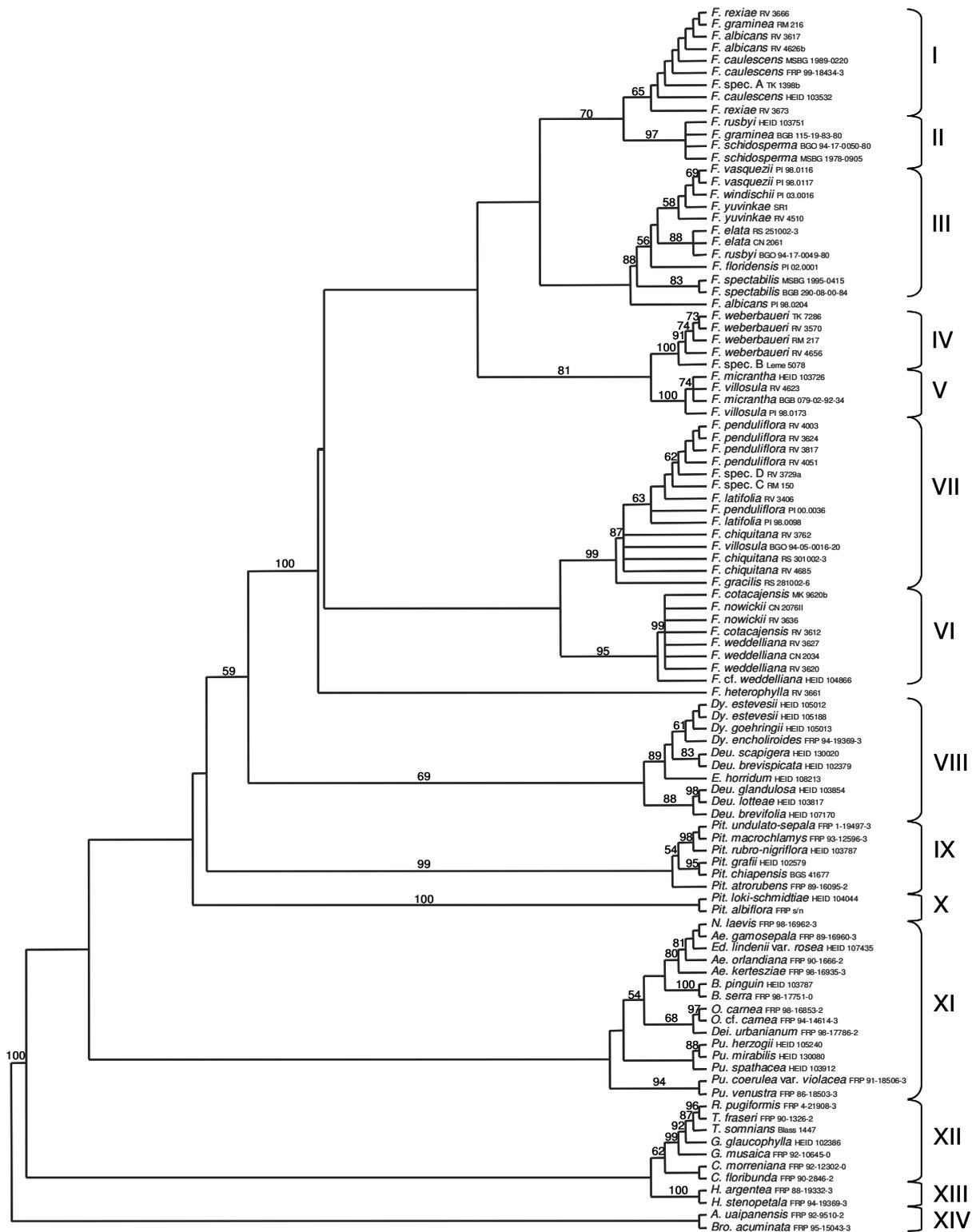


Abb. 21: Kombinerter Chloroplasten-Datensatz: 50 % Majority Rule Consensus-Baum einer Maximum Parsimonie-Analyse ohne kodierte Indels.

MR-Baum der drei untersuchten Chloroplastenloci (*atpB-rbcL*, *psbB-psbH* und *rps16*-Intron) aus den 786 besten Bäumen mit einer Mindestschrittlänge von 723. Die Bootstrapwerte über 50 %, basierend auf 1000 Replikaten sind oberhalb der Äste angegeben. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, E: *Encholirium*, Pit: *Pitcairnia*, N: *Neoregelia*, Ae: *Aechmea*, Ed: *Edmundoa*, B: *Bromelia*, O: *Ochagavia*, Dei: *Deinacanthon*, Pu: *Puya*, R: *Racinea*, T: *Tillandsia*, G: *Guzmania*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, A: *Ayensua*, Bro: *Brocchinia*

Neighbor Joining-Analyse

Die Dendrogramme der Distanzanalyse des kombinierten Datensatzes berechnet mit dem NJ-Verfahren und der p- bzw. der GTR-Distanz sind in Abb. 22 bzw. Abb. 37 dargestellt. Die beiden Bäume sind in ihrer Topologie identisch. Die statistische Unterstützung des mit der GTR-Distanz berechneten Baumes ist allerdings geringfügig höher.

Zudem gibt es sehr große Übereinstimmungen zwischen der Topologie der mit dem Neighbor Joining- und dem Maximum Parsimonie-Verfahren erhaltenen Dendrogramme. Die mit beiden Methoden erhaltenen Artengruppen I bis XIV sind identisch, die Bootstrapwerte unterscheiden sich nur unwesentlich. Innerhalb der Gattung *Fosterella* zeigen die NJ-Dendrogramme ein schwach gestütztes Schwestergruppenverhältnis zwischen den Gruppen VI und VII (BS 59 %) sowie IV und V (BS 55 %). Das Schwestergruppenverhältnis der Gattung *Fosterella* zur Gruppe VIII (*Deuterocohnia/Dyckia/Encholirium*) bleibt in der NJ-Analyse jedoch ungestützt.

Des Weiteren steht die Gattung *Fosterella* ansich auf einem sehr langen Ast. Dies unterstützt die Monophylie der Gattung deutlich.

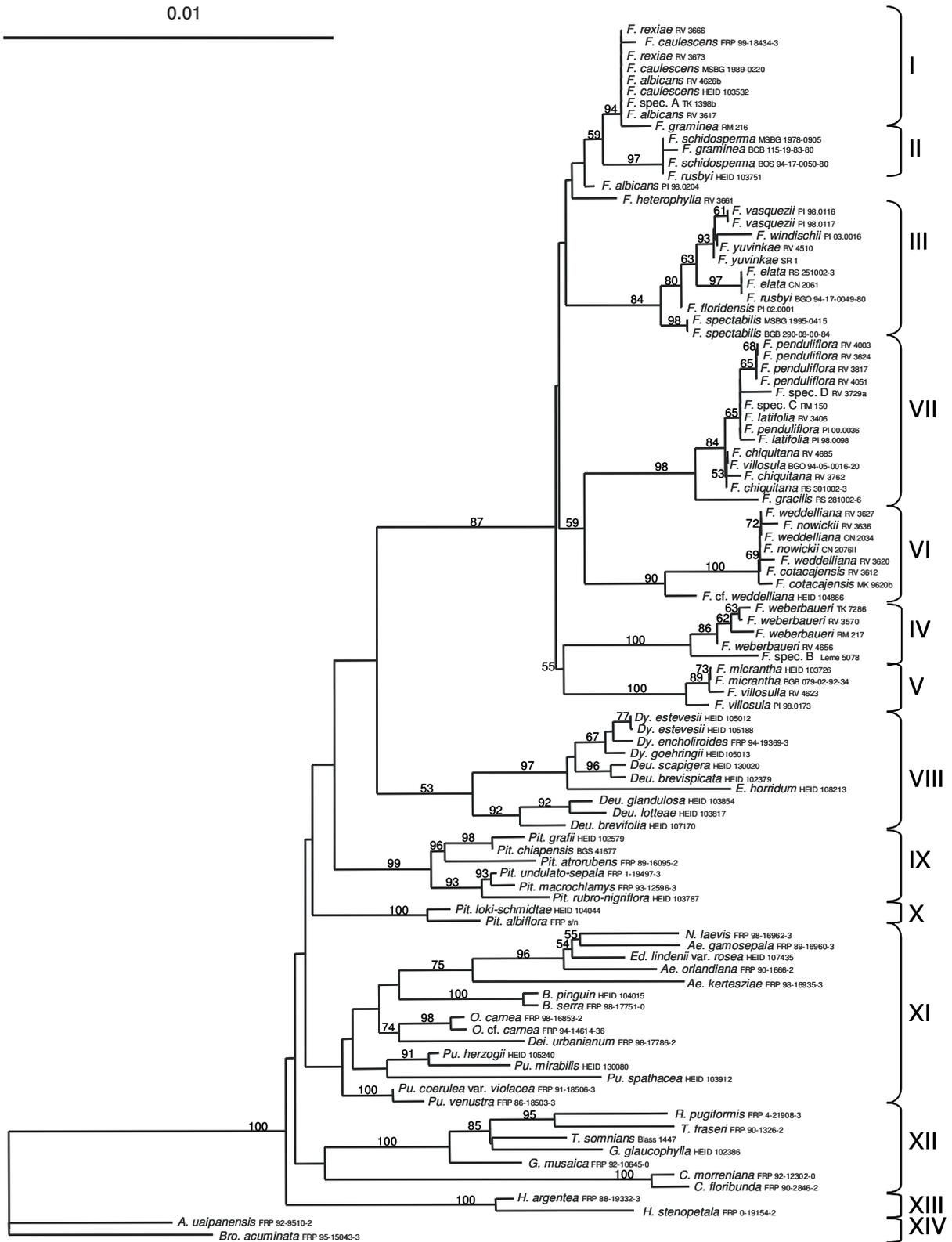


Abb. 22: Kombiniertes Chloroplasten-Datensatz: Neighbor Joining-Dendrogramm einer Distanz-Analyse beruhend auf der p-Distanz.

NJ-Baum der drei untersuchten Chloroplastenloci (*atpB-rbcL*, *psbB-psbH* und *rps16*-Intron). Die Bootstrapwerte über 50 %, basierend auf 1000 Replikaten, sind oberhalb der Äste angegeben. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, E: *Encholirium*, Pit: *Pitcairnia*, N: *Neoregelia*, Ae: *Aechmea*, Ed: *Edmundoa*, B: *Bromelia*, O: *Ochagavia*, Dei: *Deinacanthon*, Pu: *Puya*, R: *Racinea*, T: *Tillandsia*, G: *Guzmania*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, A: *Ayensua*, Bro: *Brocchinia*

Maximum Likelihood-Analyse

Für die Maximum Likelihood-Analyse des kombinierten Datensatzes der drei Chloroplastenloci wurden zunächst die benötigten Parameter und das Substitutionsmodell mit dem Programm Modeltest (Posada und Crandall 1998) bestimmt. Sie sind in Tab. 18 zusammengefasst. Der erhaltene Baum (Abb. 23) besitzt einen $-\log$ Likelihoodwert von 6834,83635. Alle anhand des Maximum Parsimonie-Baums definierten Gruppen lassen sich auch im Maximum Likelihood-Baum in identischer Topologie wieder finden. Durch die fehlende statistische Unterstützung lassen sich keine gesicherten Aussagen über Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den verschiedenen Gruppen treffen.

Tab. 18: Übersicht der mit Modeltest berechneten Parameter für den kombinierten Datensatz der drei Chloroplastenloci.

Die in der Tabelle aufgeführten Parameter wurden für die Maximum-Likelihood-Analyse vorgegeben.

	Kombinierter Datensatz	
Substitutionsmodell	TVM+I+G	
Anzahl der Ratenkategorien	9	
Basenfrequenzen	A	0,3373
	C	0,1500
	G	0,1752
	T	0,3375
Substitutionsraten	A-C	1,5090
	A-G	2,4549
	A-T	0,6704
	C-G	0,8414
	C-T	2,4549
	G-T	1,0000
Anteil invariabler Merkmale (I)	0,1485	
Merkmalsverteilung	Gamma-Verteilung (G)	
Formparameter Gamma-Verteilung	0,8315	

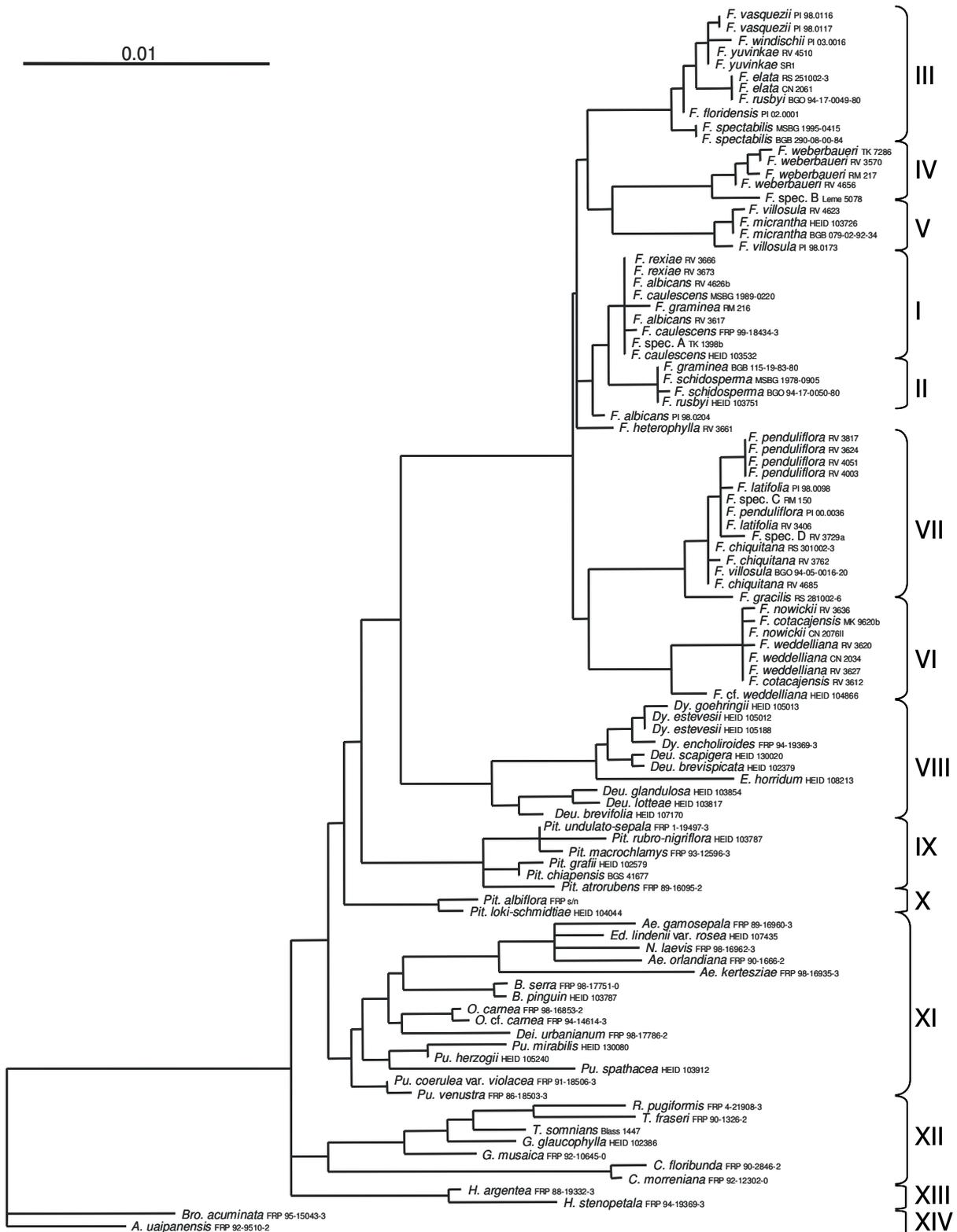


Abb. 23: Kombiniertes Chloroplasten-Datensatz: Maximum Likelihood-Phylogramm.

ML-Baum der drei untersuchten Chloroplastenloci (*atpB-rbcL*, *psbB-psbH* und *rps16*-Intron). Der beste Baum hat einen $-\log$ Likelihoodwert von 6834,83635. Die Berechnung erfolgte unter Annahme des TVM+I+G-Modells. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, E: *Encholirium*, Pit: *Pitcairnia*, N: *Neoregelia*, Ae: *Aechmea*, Ed: *Edmuntoa*, B: *Bromelia*, O: *Ochagavia*, Dei: *Deinacanthon*, Pu: *Puya*, R: *Racinea*, T: *Tillandsia*, G: *Guzmania*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, A: *Ayensua*, Bro: *Brocchinia*.

Bayes'sche Analyse

Schließlich spiegelt auch der 50 % Majority Rule Consensus-Baum (Abb. 24) der Bayes'schen Analyse die in ihrer Topologie identischen Gruppen (I bis XIV) der Maximum Parsimonie-Analyse wider. Das in Abb. 24 dargestellte Phylogramm ist ein 50 % Majority Rule Consensus-Baum aus 78692 Einzelbäumen, die nach Erreichen der stationären Phase und mit 4 Millionen Generationen berechnet wurden. Die statistische Unterstützung ist für die einzelnen Gruppen insgesamt etwas höher als im Falle der MP- und NJ- Bäume. Die *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeitswerte (PW) zeigen sowohl an den Hauptverzweigungsästen als auch zwischen den einzelnen Gruppen des Phylogramms eine moderate bis gute Unterstützung. Die Gruppen VI und VII stehen in einer moderat gestützten Dichotomie (PW 69 %). Das Schwestergruppenverhältnis zwischen den Gruppen I und II ist ebenso wie das zwischen den Gruppen IV und V mit *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeiten von 99 % und 98 % sehr gut gestützt. Innerhalb der Gruppe III stehen sich *F. elata*/*F. rusbyi* und *F. vasquezii*/*F. windischii*/*F. yuvinkae* sehr gut gestützt gegenüber (PW 98 %).

Die Gattung *Fosterella* steht auch hier der Gruppe VIII gegenüber. Diese Verwandtschaft ist zu 100 % im Majority Rule Consensus-Baum gestützt. Die Monophylie der Bromelioideae (PW 93%) zeigt ebenso wie die der Tillandsioideae (PW 92 %) eine gute Unterstützung, während die Pitcairnioideae in ihrer traditionellen Umschreibung in allen Analysen eindeutig paraphyletisch sind.

Ein zufällig ausgewählter Einzelbaum ist in Abb. 38 dargestellt.

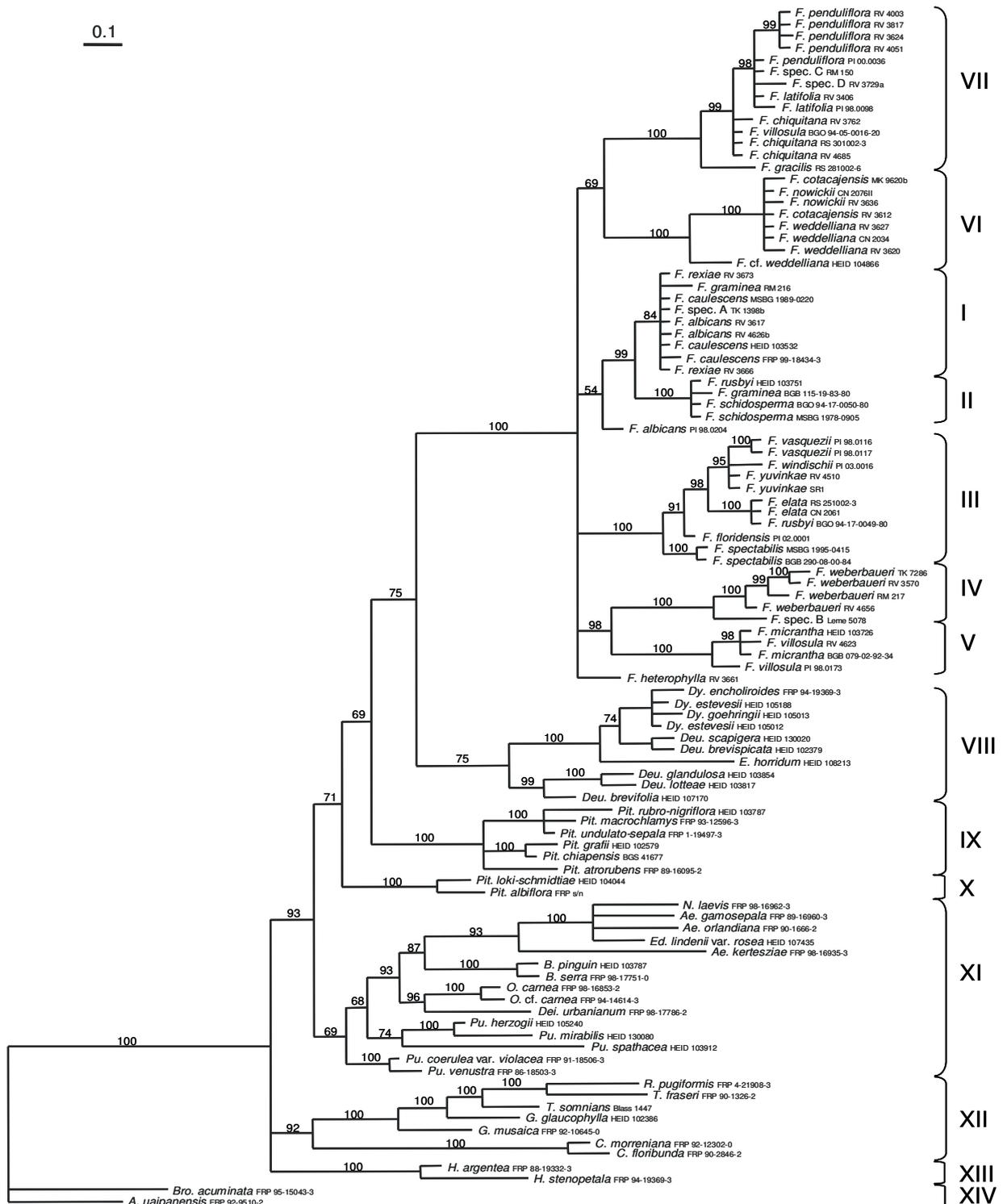


Abb. 24: Kombiniertes Chloroplasten-Datensatz: 50 % Majority Rule Consensus-Baum einer Bayes'schen Analyse.

MR-Baum einer Bayes'schen-Analyse der drei untersuchten Chloroplastenloci (*atpB-rbcL*, *psbB-psbH* und *rps16*-Intron). Die Werte der posterioren Wahrscheinlichkeiten (PW) über 50 % sind oberhalb der Äste angegeben. Der beste Baum besitzt einen $-\log$ -Likelihoodwert von 6965,84. Die Berechnung erfolgte unter der Annahme des GTR+I+G-Modells mit 4 Millionen Generationen. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, E: *Encholirium*, Pit: *Pitcairnia*, N: *Neoregelia*, Ae: *Aechmea*, Ed: *Edmondoa*, B: *Bromelia*, O: *Ochagavia*, Dei: *Deinacanthos*, Pu: *Puya*, R: *Racinea*, T: *Tillandsia*, G: *Guzmania*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, A: *Ayensua*, Bro: *Brocchinia*.

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

In der vorliegenden Arbeit wird die Phylogenie der Gattung *Fosterella* und deren Einordnung in die Familie der Bromeliaceae mit Hilfe verschiedener molekularer Techniken rekonstruiert. Dabei kommt neben der vergleichenden Sequenzierung verschiedener Chloroplasten- und Mitochondrienregionen die AFLP-Methode zum Einsatz. Mit Hilfe verschiedener Algorithmen werden molekulare Stammbäume rekonstruiert und auf der Basis bereits vorliegender morphologischer, anatomischer und biogeographischer Daten diskutiert. Die Arbeit baut auf einer 2001 entstandenen Diplomarbeit auf (Rex 2001).

4.1.1 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation aus Arten der Gattung *Fosterella* war bereits in einer vorausgegangen Diplomarbeit optimiert worden (Rex 2001). Dabei hatte sich gezeigt, dass sowohl die Verwendung eines kommerziellen DNA-Isolationskits (Plant Mini DNA Isolation Kit; Qiagen) als auch eine Variante der CTAB-Methode in DNA-Präparationen resultierten, die sich für PCR-Analysen prinzipiell eigneten. Aus Kostengründen wurde für die vorliegende Arbeit eine CTAB-Methode im kleinen Maßstab eingesetzt (siehe Kap. 2.2.2).

Die Abschätzung der DNA-Qualität erfolgte visuell, indem ein kleiner Anteil der erhaltenen DNA-Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Dabei wurde erkennbar, ob die enthaltene DNA hochmolekular ist (oder bereits teilweise oder vollständig degradiert), und ob die Probe noch Reste von RNA enthält. Aufgrund des kleinen Isolationsmaßstabs wurden generell nur geringe Mengen an DNA gewonnen, weshalb eine photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes und der Proteinkontamination nach Sambrook *et al.* (2001) nicht möglich war. Neben der Qualität wurde auch die Konzentration der isolierten DNA mit Hilfe von Vergleichsstandards, Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung abgeschätzt. Diese Schätzung ist nur sehr grob und kann zu Fehlbestimmungen führen. Für die hier durchgeführten PCR-Analysen war allerdings aus Vorversuchen bereits bekannt, dass der optimale Bereich der Templat-Konzentration sehr groß ist und daher kleine Fehleinschätzungen keinen Einfluss auf die Bandenmuster haben. Für die Amplifikation der Chloroplasten-PCR-Produkte wurde die DNA aller Proben auf etwa die gleiche Konzentration (2 ng/μl) gebracht.

Die nach der CTAB-Methode isolierte DNA konnte problemlos für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden. Eine weitere Aufreinigung der DNA, z. B. um den inhibierenden Einfluss von Polysacchariden auf Restriktionsenzyme, Ligasen und Polymerasen zu minimieren, (vgl. Michaels *et al.* 1994), erwies sich als nicht erforderlich.

4.1.2 AFLP-Fingerprinting

Das AFLP-Verfahren (Vos *et al.* 1995) vereint die Stärke zweier Methoden:

- die Zuverlässigkeit der RFLPs und
- die Vorteile der PCR (u. a. geringe benötigte DNA-Menge).

Sie erlaubt die Detektion von Restriktionsfragment-Polymorphismen mit Hilfe einer PCR-Amplifikation.

Die AFLP-Technik wird häufig auch zur Gewinnung systematisch-taxonomischer Daten eingesetzt und ist somit ein viel versprechendes Werkzeug für evolutive Studien (Kardolus *et al.* 1998). Die Methode ist relativ preisgünstig, schnell, einfach durchführbar und zuverlässig. In wenigen Experimenten können Hunderte von informativen Markern in Form von polymorphen Banden auf einem Gel erzeugt werden (Mueller und Wolfenbarger 1999). Die Fähigkeit, gleichzeitig viele verschiedene DNA-Regionen zu detektieren, die über das gesamte Genom verteilt sind, ist bei systematisch-taxonomischen Studien ein Vorteil gegenüber DNA-Sequenzanalysen, bei denen ein Stammbaum auf der Basis eines einzigen oder einiger weniger Gene konstruiert wird. Das Verfahren kann im Prinzip für alle Organismen, ohne vorherige Kenntnisse über das Genom oder die Genomgröße des Organismus (Vos *et al.* 1995) eingesetzt werden.

In den bisher publizierten AFLP-Untersuchungen variiert die verwendete Templatkonzentration sehr stark. So setzten z. B. Turpeinen *et al.* (2003) für eine AFLP-Analyse an wilder Gerste 100 ng hochmolekulare DNA pro Probe ein, während Rosendahl und Taylor (1997) mit 0,1 bis 0,5 ng DNA pro Spore eines Mycorrhizapilzes auskamen. Obwohl AFLPs auch bei größeren Schwankungen in der DNA-Konzentration meist stabile Ergebnisse liefern, zeigten Vos *et al.* (1995), dass unterhalb einer gewissen Mindestkonzentration abweichende Bandenmuster auftreten können. In der vorliegenden Arbeit wurde daher generell von einer DNA-Menge von mindestens 20 ng ausgegangen.

AFLPs sind deutlich besser reproduzierbar als RAPDs. Dies ist unter anderem dadurch begründet, dass stringente Bedingungen für die PCR gewählt werden können und keine Fehlpaarungen der Primer erlaubt sind (vgl. Mace *et al.* 1999; Mueller und Wolfenbarger 1999). Jones *et al.* (1997) überprüften die Reproduzierbarkeit der AFLP-Methode aus DNA-Proben zweier Klone der Zuckerrübe über acht Labors hinweg, wobei der Fehler weniger als 0,6 % betrug. Myburg *et al.* (2001) verwendeten fluoreszenzmarkierte PCR-Primer für ihre AFLP-Studie an zwei unterschiedlichen DNA-Proben desselben Eukalyptusbaums und konnten einen Reproduzierbarkeitsfehler von 0,9 % nachweisen. Hansen *et al.* (1999) erreichten in ihrer Analyse von AFLPs an der Gattung *Beta* eine Reproduzierbarkeit von 97,6 % und konnten zeigen, dass nur 0,5 % des Fehlers auf der AFLP-Technik an sich beruhen. Der Rest ist auf Probleme mit der gelelektrophoretischen Auflösung, den „Faktor Mensch“, durch Primerfehlbindung oder durch eine nur teilweise erfolgte Restriktion der DNA zurück zu führen (siehe auch O'Hanlon und Peakall 2000; Peters *et al.* 2001;

Bussell *et al.* 2005; Cervera *et al.* 2005). Durch den Einsatz von hochmolekularer und relativ gut gereinigter DNA können solche Fehler minimiert werden.

Die hohe Reproduzierbarkeit der AFLPs bezieht sich allerdings vor allem auf Experimente, die in etwa im gleichen Zeitraum angesetzt werden. Bei der Wiederholung eines AFLP-Experiments zu einem deutlich späteren Zeitpunkt bzw. mit einer anderen Charge von Enzymen können allerdings veränderte Bandenmuster auftreten. Dies erschwert, ebenso wie bei RAPDs, die nachträgliche Intergration von weiteren Proben in die Analysen.

Ausgedehnte Reproduzierbarkeitstest für die AFLP-Studie der Gattung *Fosterella* haben eine 96 %ige Übereinstimmung der Amplifikationsmuster gezeigt. Dieses Resultat korreliert mit denen der zuvor aufgeführten Studien und zeigt, dass optimale Bedingungen zur Durchführung der AFLP-Analyse der Gattung *Fosterella* erzielt worden sind. Auch der Reproduzierbarkeitstest der verschiedenen Ebenen (vgl. Kap. 2.2.4.5) zeigte sehr gute Kongruenzen der Bandenmuster. Zwischen den einzelnen Experimenten wurden zwar Intensitätsunterschiede beobachtet, diese hatten aber keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit.

Bei komigrierenden Banden treten häufig Intensitätsunterschiede auf, so auch bei der AFLP-Analyse von *Fosterella*-Arten. Diese können ihre Ursache z. B. in Pipettierfehlern haben. In diesem Falle sollten jedoch alle Banden der gesamten Proben schwächer oder stärker sein als die der Nachbarprobe. Intensitätsunterschiede können außerdem auf Homo- vs. Heterozygotie, die unterschiedliche Gesamtzahl von Amplifikationsprodukten in den verglichenen Bahnen, partielle Fehlpaarungen des Primers oder auch auf die Konkurrenz von PCR-Produkten zurückzuführen sein (vgl. Bussell *et al.* 2005). Unterschiede im Bandenmuster aufgrund von PCR-Produktkonkurrenz können zur Fehleinschätzung genetischer Distanzen führen und somit eine bedeutende Fehlerquelle darstellen. Die Verwendung von Primern, die komplexere Bandenmuster erzeugen, könnte diesen Effekt minimieren (Harris 1999). In die Auswertung der AFLP-Muster der vorliegenden Arbeit wurden weitestgehend nur Banden gleicher Intensität einbezogen. Die zu erwartenden Fehler sollten mit den durchgeführten Optimierungen minimiert worden sein, was die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitstests verdeutlichen.

Bei der systematischen Auswertung von komplexen Bandenmustern, die bei anonymen Multilocus-Markermethoden wie der AFLP-Analyse entstehen, wird allgemein vorausgesetzt, dass Banden gleicher Mobilität homologe Merkmale darstellen. Homologe Fragmente könnten allerdings auch homoplastisch sein, d. h. auf gleicher Höhe befindliche, „komigrierende“ Fragmente könnten rein zufällig gleich groß sein und von verschiedenen Loci stammen. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Form von Homoplasie auftritt, ist bei AFLPs wegen der hohen Auflösung auf PAA-Gelen geringer als bei RAPDs (Rosendahl und Taylor 1997; Kardolus *et al.* 1998). Um Homoplasien aufzudecken oder ihren Grad abschätzen zu können, werden so genannte Homologietests z. B. in Form von Restriktionsverdau (z. B. Rieseberg 1996), Southern-Blot-Hybridisierungen (z. B. Williams *et al.* 1993) oder mittels vergleichender Sequenzierung durchgeführt. Beim Restriktionsverdau werden die Amplifikate mit zwei oder drei Endonukleasen geschnitten

und die entstandenen Muster miteinander verglichen. Gleiche Fragmentgrößen weisen dabei auf Homologien hin. Bei der Southern-Blot-Hybridisierung hingegen werden die zu untersuchenden Fragmente aus dem Gel extrahiert und als Sonde verwendet. Die Homologie der Banden ist nachgewiesen, wenn die Sonde an alle Banden auf gleicher Höhe hybridisiert. Rouppe van der Voort *et al.* (1997) zeigten durch Sequenzierung von AFLP-Produkten einer Kartoffelpopulation, dass 19 von 20 komigrierenden Banden in der Tat von homologen Loci stammten. Die Verfahren zur Durchführung von Homologietests sind allerdings sehr zeitaufwendig und teuer. Aus diesem Grund werden sie entweder gar nicht oder nur exemplarisch eingesetzt, da sie ansonsten die Vorteile der Fingerprintmethoden aufheben würden.

Das Homologie-Problem wird umso größer, je weiter die untersuchten Taxa phylogenetisch voneinander entfernt sind. Die AFLP-Technik wird daher meist innerhalb von Arten oder für die Untersuchung eng verwandter Arten eingesetzt, die nur schwer durch morphologische oder andere molekularsystematische Merkmale getrennt werden können (vgl. Després *et al.* 2003). Für höhere taxonomische Ebenen (z. B. zum Vergleich von Gattungen) ist die Anwendung von AFLPs problematisch, da wegen der hohen Variabilität dieser Marker die Ähnlichkeiten zwischen zwei Taxa weitgehend auf Zufall beruhen (Mueller und Wolfenbarger 1999; Koopman *et al.* 2001).

Die AFLP-Studie der vorliegenden Arbeit bewegt sich ausschließlich unterhalb der Gattungsebene. Deshalb wurde es nicht als zwingend erforderlich gesehen, Homologietests durchzuführen. Es ist anzunehmen, dass Fehleinschätzungen aufgrund von fälschlicherweise als homolog angesehenen Banden ungerichtet sind und über den gesamten Datensatz streuen. Um diese Fehler zu minimieren, wurde durch das schrittweise Hinzufügen von Merkmalen und der Beobachtung ihrer Auswirkung auf die Baumtopologie ausgeschlossen, dass zu wenige Merkmale in die Studie einbezogen wurden. Erst als die Auflösung der errechneten Bäume durch Ergänzung weiterer Merkmale nicht verbessert werden konnte und die Topologie der Bäume stabil blieb, wurde auf den Einsatz weiterer Primerpaare verzichtet. Aus diesem Grund sollten die erhaltenen Dendrogramme relativ robust sein.

Um eine Verbesserung der Auflösung phylogenetischer Bäume zu erreichen, sollten nicht zusätzliche Merkmale, sondern besser zusätzliche Taxa hinzugefügt werden. Nur vollständiges Sampling kann zur optimalen Rekonstruktion der Phylogenie beitragen. Zum Zeitpunkt der AFLP-Untersuchung standen jedoch nur ein Teil der *Fosterella*-Arten zur Verfügung. Als die Anzahl der Arten zu einem späteren Zeitpunkt vollständiger war, hätte aus Reproduzierbarkeitsgründen die komplette Analyse noch einmal wiederholt werden müssen. Dies war aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich.

Innerhalb der Gattung *Fosterella* konnten mit der AFLP-Methode einige Artengruppen identifiziert werden, Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Gruppen sind jedoch nur schwach gestützt. Unaufgelöste interne Knoten (z. B. Gruppe H) und lange terminale Äste (z. B. *F. spec.* 4) sind in AFLP-Dendrogrammen häufig zu finden (vgl. Bänfer *et al.* 2004),

was den Nutzen der AFLP-Technik für phylogenetische Analysen in gewissem Ausmaß limitiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die AFLP-Methode erste interessante Erkenntnisse zu Verwandtschaftsbeziehungen in der Gattung *Fosterella* ergab, und somit für derartige Untersuchungen geeignet ist, sofern das „Sampling“ möglichst dicht ist, d. h. die größtmögliche Anzahl von Arten der zu untersuchenden Gattung enthält.

4.1.3 Vergleichende Sequenzierung

Organellen-DNA-Sequenzen sind die Hauptquelle für molekularsystematische Studien in Pflanzen. Typischerweise werden mit Hilfe universeller Primerpaare kodierende und/oder nichtkodierende Regionen der Organellen-DNA amplifiziert, die PCR-Produkte sequenziert, die Sequenzen verglichen und die Sequenz-Alignments zur Rekonstruktion von Stammbäumen verwendet (z. B. Taberlet *et al.* 1991; Golenberg *et al.* 1993; Demesure *et al.* 1995; Dumolin-Lapègue *et al.* 1997; Schütze *et al.* 2003). Die Eignung der einzelnen Regionen muss dabei im Vorfeld getestet werden, da oftmals keine Kenntnisse über die Evolutionsgeschwindigkeit der entsprechenden Loci in den jeweiligen Taxa vorliegen (Shaw *et al.* 2005).

Ein wesentlicher Vorteil der Sequenzierung von Organellen-DNA ist, dass sie im Gegensatz zur Kern-DNA nur in einer Variante im Genom vorhanden ist (single copy sequence). Die Vererbung von Mitochondrien erfolgt stets maternal, die der Chloroplasten bei den meisten Angiospermen ebenfalls maternal und bei den Gymnospermen paternal (Reboud und Zeyl 1994; Birky 1995). Intermolekulare Rekombination ist selten oder nicht vorhanden. Aus diesem Grund liegen für Organellen vergleichsweise einheitliche Genome vor, während in der Kern-DNA eine stete Rekombination mütterlicher und väterlicher DNA stattfindet.

In der vorliegenden Arbeit wurden in Pilotexperimenten zunächst sowohl mitochondriale als auch chloroplastidäre DNA-Abschnitte auf ihre Variabilität innerhalb der Gattung *Fosterella* überprüft. Solche Sequenzvariabilitätstest an drei oder vier Spezies lassen bereits gute Aussagen über die voraussichtliche Nützlichkeit eines Markers für eine phylogenetische Analyse zu (eigene Beobachtungen und Shaw *et al.* 2005). Nach Maßgabe der Ergebnisse dieser Vortests wurde eine Auswahl geeigneter, ausreichend variabler Marker für die eigentliche Studie getroffen.

Die vergleichende Sequenzierung von Mitochondrien-DNA wird häufig für phylogenetische Untersuchungen bei Tieren eingesetzt, wohingegen phylogenetische Untersuchungen bei Pflanzen vorzugsweise mit chloroplastidärer DNA durchgeführt werden. Nur wenige molekularsystematische Untersuchungen verwenden mitochondriale Pflanzen-DNA (z. B. Cho *et al.* 2004; Kubo *et al.* 2005; Nishikawa *et al.* 2005). Wegen der unterschiedlichen Größen von mitochondrialer DNA in Pflanzen ist es allerdings sehr schwierig, geeignete Primer zu finden (Duminil *et al.* 2002). Zudem ist die mitochondriale DNA höherer Pflanzen in ihrer Sequenz zwar sehr konserviert, allerdings in ihrer Struktur sehr variabel (Duminil *et al.* 2002). Relativ häufig werden wegen ihres Vererbungsmodus (s. o.) mitochondriale DNAs bei Gymnospermen untersucht und mit Chloroplastendaten verglichen.

Die für die Amplifikation mitochondrialer DNA von *Fosterella* ausgewählten Primer wurden speziell für solche Analysen generiert (Dumolin-Lapègue *et al.* 1997; Duminil *et al.* 2002). Bei den eingesetzten Loci handelt es sich sowohl um Genbereiche (z. B. *cox3*) als auch um Spacer-Regionen (z. B. *nad1exB-nad1exC*). Allerdings zeigten alle gewählten Regionen der Mitochondrien-DNA eine sehr geringe Sequenzvariabilität für *Fosterella*. Das bedeutet, dass die Evolutionsrate der untersuchten Bereiche im Gegensatz z. B. zur Gattung *Plantago* (Cho *et al.* 2004) für *Fosterella* sehr gering ist. Da bisher keine Untersuchungen mitochondrialer DNA an Bromeliaceae durchgeführt wurden, war im Vorfeld nicht klar, wie variabel diese Regionen sein werden. Die ausgewählten Regionen waren offenbar zu stark konserviert und wären vermutlich für phylogenetische Untersuchungen auf einem höherem taxonomischen Niveau (z. B. Familienebene) geeignet gewesen. Andererseits waren manche der eingesetzten Primer offenbar nicht universell genug, um für alle Regionen Amplifikate mit *Fosterella*-DNA zu erzeugen. Die untersuchten mt-DNA Loci wurden daher für phylogenetische Untersuchungen der Gattung *Fosterella* als durchweg ungeeignet eingestuft.

Bei der Auswahl der chloroplastidären Loci wurde darauf geachtet, dass die Fragmente eine Länge von 200 bp nicht unter- und von 1000 bp nicht überschreiten, um einerseits genügend variable Positionen zu finden und andererseits die Sequenzierung in einem einzigen Schritt durchführen zu können. Da ein einzelner Locus oftmals nicht genügend phylogenetische Information enthält, werden in der Literatur häufig verschiedene Regionen kombiniert. Auch für Bromeliaceae wurden bereits mehrere solcher cpDNA-Multigenanalysen durchgeführt (z. B. Barfuss *et al.* 2004; Crayn *et al.* 2004; Schulte *et al.* 2005; Barfuss *et al.* 2005a; Horres *et al.* im Druck). Wichtig für die Auswahl eines geeigneten Locus ist seine Evolutionsrate, die dem taxonomischen Niveau der untersuchten Gruppe angepasst sein sollte. Nichtkodierende Spacer- und Intronbereiche des Chloroplastengenoms sind vor allem auf Art- und Gattungsebene informativ, während die hoch konservierten kodierenden Bereiche eher auf und oberhalb der Familienebene eingesetzt werden sollten (z. B. Shaw *et al.* 2005).

Mit Hilfe von Multigenanalysen lassen sich häufig besser aufgelöste molekulare Phylogenien erstellen als nur mit einem Bereich (z. B. Wallander und Albert 2000; Perret *et al.* 2003; Renner 2004; Xu und Ban 2004; vgl. Shaw *et al.* 2005; Barfuss *et al.* 2005a). Die Kombination mehrerer Regionen, möglichst noch aus mehreren Genomen (cpDNA, mtDNA, Kern-DNA), reduziert den Sampling-Fehler. Optimal wäre ein Vergleich kompletter Genome z. B. der cpDNA (Martin *et al.* 2005); entsprechende Daten liegen aber bisher nur für wenige Arten vor (z. B. Chaw *et al.* 2000; Qiu *et al.* 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzen von drei cpDNA-Regionen, die in den Vorversuchen die größte Variabilität gezeigt haben, für das gesamte Probenset sequenziert und die Datensätze kombiniert. Dabei handelt es sich um den *atpB-rbcL*-Spacer, den *psbB-psbH*-Spacer und das *rps16*-Intron.

Die Vorteile der vergleichenden DNA-Sequenzierung gegenüber anderen Methoden der molekularen Systematik liegen in der sehr geringen Fehlerrate und der sicheren Bestimmung jeglicher auftretender genetischer Variation. Zudem geht die Sequenzierung von PCR-

Fragmenten recht schnell und es ist möglich, mehrere Reaktionen parallel durchzuführen. Mit einem Fluoreszenz-Sequenzierer lässt sich die Detektion der Fragmente automatisieren und die Leseweite gegenüber der klassischen, radioaktiven Methode wesentlich verlängern. Des Weiteren können, im Gegensatz zu AFLPs und anderen Fingerprint-Methoden, jederzeit neue Taxa einbezogen werden, ohne die gesamte Analyse wiederholen zu müssen. Schließlich können zusätzliche, z. B. in Datenbanken niedergelegte Sequenzen leicht in die eigene Studie integriert werden. Nachteilig sind hingegen die relativ hohen Kosten pro Sequenzierreaktion, die Beschränkung auf ca. 1000 bp pro Sequenzierung und die Tatsache, dass ein „Genstammbaum“ und nicht ein „Organismenstammbaum“ rekonstruiert wird.

Die drei im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Chloroplastenregionen wurden mit Hilfe eines automatischen LI-COR-Sequenzierers untersucht. Vornehmliches Ziel war die Analyse auf Gattungs- und Artebene, weshalb nichtkodierende cpDNA-Bereiche ausgewählt wurden. Die erhaltenen Phylogenien zeigen stabile Topologien, die statistische Unterstützung der einzelnen Äste ist moderat bis sehr gut und übertrifft in den meisten Fällen die Unterstützung der entsprechenden Äste in der AFLP-Analyse. Aus diesem Grund wird die vergleichende Sequenzierung nichtkodierender cpDNA-Bereiche als eine gute Methode zur Rekonstruktion der Phylogenie der Gattung *Fosterella* und zur Analyse ihrer Schwestergruppenbeziehungen angesehen.

4.1.4 Datenauswertung

Das Ziel einer phylogenetischen Analyse ist die vollständige Auflösung der Verwandtschaftsbeziehungen der untersuchten Gruppe, was aber nur dann erreicht werden kann, wenn nur ein einziger Stammbaum gefunden wird. Eine solche Situation ist unrealistisch, sie tritt nur ein, wenn sehr wenige Taxa untersucht werden und ein sehr hohes Maß an Merkmalskongruenz vorliegt. Im Normalfall stellt sich die Aufgabe, aus zahlreichen Stammbaum-Hypothesen die wahrscheinlichsten herauszufinden. Die Erstellung dieser Hypothesen kann nach verschiedenen Algorithmen und Kriterien erfolgen. Unterschieden wird, wie oben bereits erwähnt, zwischen Phänetik und Kladistik. Die kladistische Analyse beruht auf den Merkmalen selbst (und zwar ausschließlich auf Synapomorphien), weshalb ein Kladogramm einen echten Stammbaum darstellt. In der Phänetik hingegen werden aus einer Merkmalsmatrix paarweise Distanzen zwischen allen Taxa errechnet. Die entstehenden Phänogramme beruhen also auf Ähnlichkeiten und spiegeln keinen Stammbaum wider. Kladistische Methoden sind z. B. Parsimonie-, Likelihood- und Bayes'sche-Analyseverfahren, während bei phänetischen Methoden z. B. zwischen Neighbor-Joining und UPGMA-Verfahren unterschieden werden kann.

4.1.4.1 Vor- und Nachteile verschiedener Datenanalyseverfahren

Die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Analyseverfahren liegen vor allem in ihrer Geschwindigkeit, der Fähigkeit mehrere beste Lösungen zu finden und ihrer Robustheit trotz falscher Annahmen die richtige Topologie zu erzielen (Nei 1996). Sie sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

Maximum-Parsimonie ist ein mathematisch gut untersuchtes, schnelles, einfaches und gut etabliertes Verfahren und beruht einzig auf der Annahme, dass eine evolutive Veränderung an sich selten stattfindet und eine direkte Evolution von A nach C daher wahrscheinlicher ist als der Weg von A über B nach C. Es wird kein Substitutionsmodell (s. u.) zugrunde gelegt, was deshalb vorteilhaft ist, weil bei möglichst wenigen Annahmen zum Evolutionsprozess auch die Anzahl falsch getroffener Annahmen gering bleibt. Mehrfachsubstitutionen einer Base können allerdings nicht verfolgt werden, da immer nur der aktuelle Merkmalszustand sichtbar wird. Folglich können beim Vergleich von DNA-Sequenzen immer nur beobachtbare Unterschiede gezählt werden, was zu einer Unterschätzung der Anzahl der wirklich abgelaufenen Substitutionen führt (Knoop und Müller 2006). Ein weiterer wesentlicher Nachteil bei der Rekonstruktion eines phylogenetischen Baumes mit dem Maximum Parsimonie-Verfahren ist das Phänomen der „long branch attraction“. Dabei bilden zwei oder mehrere, jeweils isoliert (auf „langen Ästen“) stehende Taxa aufgrund zufälliger Übereinstimmungen in einer Vielzahl paralleler Mutationen artifizielle Schwestergruppenverhältnisse aus (Felsenstein 1978; Wägele 2001).

Trotz dieses und anderer Probleme bietet eine computergestützte Maximum Parsimonie-Analyse den Vorteil, dass im Vergleich zur Maximum Likelihood-Analyse (s. u.) große Datenmengen bearbeitet werden können. Eine Analyse mit über 100 Taxa und mehr als 3000 Merkmalen ist mit einem schnellen Computer in wenigen Stunden durchführbar.

Das Programm PAUP 4.0b10 (Swofford 2001) verrechnet nur synapomorphe Merkmalsausprägungen (von PAUP als „Parsimonie-informativ“ bezeichnet), die bei mindestens zwei, aber nicht bei allen Taxa der Datenmatrix vorkommen. Autapomorphien bleiben unberücksichtigt. Außerdem setzt der Algorithmus des Maximum-Parsimonie-Verfahrens voraus, dass alle Merkmale voneinander unabhängig sind. Dies lässt sich für molekulare Daten jedoch nicht ohne weiteres überprüfen.

Zur statistischen Bewertung der Ergebnisse können verschiedene Indizes berechnet werden. Dabei gibt der Konsistenzindex oder „consistency index“ (CI) den Grad der Homoplasie eines Kladogramms an und hat bei 1 seinen Optimalwert (hier liegt keine Homoplasie vor). Ein Nachteil bei der Verwendung des CI als Qualitätskriterium liegt darin, dass Parsimonie-uninformative Merkmale (Autapomorphien) immer einen CI von 1 haben und somit den Gesamt-CI ansteigen lassen. Zudem wird der CI, ohne dass sich der Informationsgehalt ändert, mit zunehmender Taxonzahl geringer. Er kann daher nicht zum Vergleich kladistischer Analysen untereinander genutzt werden, die auf unterschiedlich großen Merkmalsmatrizen beruhen. Der Retentions-Index (RI) bietet ein Maß für das Verhältnis von echten zu allen (inkl. scheinbaren) Synapomorphien. Sein optimaler Wert ist ebenfalls eins. Er kann im Gegensatz zum CI aber auch den Wert 0 annehmen und ist somit das zur Bewertung der Homoplasie besser geeignet als der CI (Knoop und Müller 2006). Die Ergebnisse phylogenetischer Analysen werden meist als Consensus-Bäume dargestellt, da es aufgrund ihrer großen Anzahl nicht möglich ist, alle gleich sparsamen Kladogramme abzubilden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese Darstellung nur der Summe mehrerer gleichermaßen sparsamer phylogenetischer Hypothesen entspricht, und nicht die ultimative

Hypothese darstellt (vgl. Wägele 2001). Bei der Interpretation der o. g. Indizes muss beachtet werden, dass es sich bei den dargestellten Werten um diejenigen von jeweils einem der sparsamsten Kladogramme handelt und nicht um die des Consensus-Baumes, da dessen Werte von denen der eigentlichen phylogenetischen Hypothesen abweichen können.

Distanzanalysen haben gegenüber dem Maximum Parsimonie- und besonders dem Maximum Likelihood-Verfahren den Vorteil, sehr schnelle Berechnungen zu ermöglichen, da nur ein einziger Baum erstellt wird. Sie ermöglichen daher eine nur wenig aufwändige erste Abschätzung der Verwandtschaftsverhältnisse (Knoop und Müller 2006).

Allerdings sind Distanzanalysen eher für die Untersuchung konservierter Sequenzen und/oder nahe verwandter Taxa geeignet (Wägele 2001). Dies liegt hierin begründet, dass oft Mehrfachsubstitutionen auftreten, die nicht sichtbar werden, und so mit zunehmender Divergenzzeit der Unterschied zwischen tatsächlicher und messbarer Distanz immer größer wird. Dieser Faktor macht eine Distanzanalyse oberhalb eines bestimmten taxonomischen Niveaus unzuverlässig.

Ein weiterer grundsätzlicher Nachteil von Distanzanalysen liegt darin, dass bei der Transformation der Originaldaten in eine Distanzmatrix unweigerlich Informationen verloren gehen: aus den Distanzen lassen sich die Primärdaten nicht mehr rekonstruieren. Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass auch Autapomorphien und Plesiomorphien, die nur bei einem Außengruppentaxon vorkommen, bei der Transformation in die Distanzmatrix mit einbezogen werden, wohingegen beim Maximum Parsimonie-Verfahren Autapomorphien ausgeschlossen werden. Während zufällige Sequenzübereinstimmungen bei großen Datensätzen als „Hintergrundrauschen“ vernachlässigbar sind, können sie bei kleineren Datensätzen zu fehlerhaften Baumtopologien und so zur Postulierung falscher Verwandtschaftshypothesen führen (Wägele 2001).

Ein nicht zu vernachlässigendes Problem bei der Durchführung von Distanzanalysen besteht auch darin, dass die Baumtopologie unter Umständen von der Reihenfolge der Proben im untersuchten Datensatz abhängen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Fehler allerdings ausgeschlossen werden, da Berechnungen mit veränderter Probenreihenfolge identische Baumtopologien hervorbrachten.

Distanz- und Maximum Parsimonie-Methoden werden zunehmend vom **Maximum Likelihood-Verfahren** (Swofford *et al.* 1996; Swofford 2001) abgelöst. Wie bei Maximum Parsimonie werden die Daten selbst als Merkmale gewertet, es geht also keine Information durch die Transformation der Daten in Distanzen verloren. Die Maximum Likelihood-Methode wird von einigen Autoren für die phylogenetische Rekonstruktion als überlegen angesehen (Huelsenbeck und Hillis 1993; Huelsenbeck 1995a,b). Sie benötigt allerdings ein geeignetes, mehr oder weniger komplexes Evolutionsmodell, dessen Annahmen bei der Baumberechnung zugrunde gelegt werden. Die Eignung eines bestimmten Modells ist im Einzelfall schwierig einzuschätzen und die Annahme eines grundlegend falschen Evolutionsmodells kann zu einem falschen Stammbaum führen (Archibald *et al.* 2003). Mit Hilfe des Computer-Programms MODELTEST (Posada und Crandall 1998) lässt sich aus 56

verschiedenen Modellen ein geeignetes Evolutionsmodell für einen gegebenen Datensatz heraussuchen.

Beim Maximum Likelihood-Verfahren werden zunächst alle alternativen Bäume für einen Datensatz errechnet. Aus diesen unzähligen Bäumen wird anschließend derjenige herausgesucht, der unter Annahme des gewählten Evolutionsmodells mit der höchsten Wahrscheinlichkeit den Datensatz widerspiegelt. Diese Prozedur erfordert einen erheblichen Rechenaufwand, für den auch Computer mit hoher Rechenleistung mehrere Tage benötigen. Die Zahl der zu untersuchenden Taxa ist daher begrenzt.

Bedeutend geringer ist der Rechenaufwand hingegen bei der in jüngster Zeit populär gewordenen **Bayes'schen Analyse**, bei der zwar nicht der optimale Baum unter unendlich vielen möglichen gesucht wird, sondern die Bäume entsprechend ihrer *a-posteriori*-Wahrscheinlichkeit gesammelt werden. Vereinfacht gesagt, entspricht das Verfahren einer Maximum Likelihood-Analyse mit anschließender Bootstrap-Analyse (Huelsenbeck und Bollback 2001a). Wie bei Maximum Likelihood- und Distanzmethoden wird ein Modell zur Sequenzevolution vorausgesetzt, mit allen damit verbundenen o. g. Problemen.

Die Verwendung von MCMC (Markov Chain Monte Carlo)-Algorithmen macht die Analyse auch mit sehr komplexen Modellen möglich. Allerdings kann es unter bestimmten Bedingungen vorkommen, dass sich eine Markov-Kette nicht der posterioren Wahrscheinlichkeitsverteilung annähert (Huelsenbeck und Bollback 2001a). Aus diesem Grund lässt man mehrere Ketten parallel laufen. Die posterioren Wahrscheinlichkeitswerte der Bayes'schen Analyse werden oft mit Bootstrap-Werten gleichgesetzt, entsprechen diesen aber nicht.

Es gibt eine Reihe von Verfahren, mit denen abgeschätzt werden kann, inwieweit die Topologie der gefundenen Bäume tatsächlich den Datensatz repräsentieren. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren war die **Bootstrap-Analyse**. Über die Eignung des Bootstrap-Tests zur Überprüfung von Baum-Topologien wird in der Literatur eingehend diskutiert (z. B. Hillis und Bull 1993; Swofford *et al.* 1996; Mort *et al.* 2000). Beim Bootstrap-Verfahren handelt es sich um ein „sampling with replacement“, der Bootstrap-Wert lässt also lediglich Aussagen darüber zu, wie empfindlich die errechnete Baumtopologie auf eine unterschiedliche Wichtung der zugrunde liegenden Merkmale reagiert. Aussagen über die Qualität der verwendeten Merkmale, das Fehlen von Information oder das Auftreten von Analogien können jedoch nicht getroffen werden (Wägele 2001). Hillis und Bull (1993) vertreten die Auffassung, dass eine Gruppe von Taxa, die mit einem Bootstrap-Wert über 70% gestützt ist, als relativ zuverlässig eingestuft werden kann. Diese Grenze wird jedoch kontrovers diskutiert (vgl. Wägele 2001).

Für alle Analysemethoden gilt, dass mit zunehmender Größe des Datensatzes die Berechnungen zwar schwieriger und aufwändiger, die Bäume aber immer sicherer werden (Knoop und Müller 2006).

4.1.4.2 AFLP-Daten

Wahl der Außengruppe

Die Bestimmung der Leserichtung (Polarisation) eines Merkmals ist für molekulare Daten nur durch einen Außengruppenvergleich durchführbar. Ohne eine geeignete Außengruppe ist es daher nicht möglich, Aussagen über die evolutive Richtung einer Merkmalsänderung (z. B. „Bande vorhanden“ oder „Bande nicht vorhanden“) zu treffen. Die Konstruktion eines „künstlichen“ (hypothetischen) Vorfahrens (Lundberg 1972) bietet nur eine erste Hypothese der möglichen Evolutionsrichtung. Bei der Wahl eines hypothetischen Vorfahrens als Außengruppe sollte allerdings bedacht werden, dass Apomorphien der Außengruppe dabei als Plesiomorphien interpretiert werden, was zu Fehlpolarisierungen führen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die AFLP-Analyse neben den anderen auch eine künstliche Außengruppe kreiert, in der für eine Probe alle Merkmale den Zustand „0“ erhielten. Die Ergebnisse zeigen, dass die erhaltenen Topologien unabhängig von der Wahl der Außengruppe nahezu identisch sind. Die evolutive Merkmalsausprägungsrichtung sollte allerdings zu gegebener Zeit durch eine neue AFLP-Analyse mit vollständigerem Sampling und bekannter Außengruppenprobe wiederholt werden.

Phänetische und kladistische Analyse der AFLP-Daten

Die taxonomisch-systematische Auswertung von AFLP-Daten erfolgt in der Regel durch eine **phänetische Analyse**. Es ist aber auch möglich, eine **kladistische Auswertung** durchzuführen. In vielen AFLP-Studien kommen beide Analyseformen im Vergleich zur Anwendung (z. B. Kardolus *et al.* 1998; Koopman *et al.* 2001; Pelser *et al.* 2003; Bänfer *et al.* 2004; Müller *et al.* 2005). Aussagen über abgeleitete vs. ursprüngliche Merkmale (Sympleiomorphien) können bei der kladistischen Analyse für AFLP-Banden jedoch nur getroffen werden, wenn eine geeignete Außengruppe zur Verfügung steht (s. o.).

Die kladistische Auswertung der AFLP-Daten erfolgt typischerweise mittels einer **Maximum Parsimonie**-Analyse (z. B. Kardolus *et al.* 1998; Pelser *et al.* 2003; Bänfer *et al.* 2004). Für die Studie der Gattung *Fosterella* ergab die kladistische Analyse der AFLP-Muster einige gut gestützte Artgruppen. Verwandtschaften zwischen diesen Gruppen lassen sich allerdings nur in geringem Maße erkennen, da die Auflösung des Kladogramms nur mäßig war.

Ein Auflösungsdefizit kann durch Homoplasien bedingt sein, die vorwiegend im Vergleich weiter entfernter Taxa (in diesem Fall schon zwischen Arten) auftreten. Aus weiter oben ausgeführten Gründen ist das Homoplasie-Risiko bei AFLP-Bandemustern relativ hoch, was gerade in der kladistischen Analyse (wo einzelne Merkmale einen starken Einfluss haben können) leicht zu einer fehlerhaften Topologie führt (Koopman *et al.* 2001). Auch der niedrige Konsistenzindex (CI = 0,12) weist auf einen hohen Grad an Homoplasie im Datensatz hin. Die fehlende Auflösung kann aber auch ein Indiz dafür sein, dass die Merkmale insgesamt zu variabel für die Rekonstruktion der Verwandtschaft zwischen den Artengruppen sind.

Maximum Likelihood- und **Bayes'sche Analysen** von AFLP-Daten sind nicht ohne weiteres durchführbar. Sie setzen ein Evolutionsmodell voraus, das den Gewinn und den

Verlust von AFLP-Banden einbezieht und Wahrscheinlichkeiten bzw. Parametern für diese Ereignisse festlegt. Ein solches Modell liegt bisher nicht vor. Brouat *et al.* (2004) führten trotzdem erstmals eine MrBayes-Analyse für AFLPs an *Leonardoxa* durch und begründen dies damit, dass Likelihood-Berechnungen besonders hilfreich für die Erstellung evolutionärer Verwandtschaftsbeziehungen seien. Die Autoren argumentierten außerdem, dass die Bayes'sche Analyse von AFLP-Daten ein besseres Verständnis der zu vergleichenden Eigenschaften und der posterioren Wahrscheinlichkeiten ermöglicht. Allerdings wird es schwierig sein, ein geeignetes Modell für diese Art von Daten zu finden. Ein solches Modell müsste verschiedene Raten für die Übergänge von Merkmalsverlust zu Merkmalsgewinn annehmen und umgekehrt. Darüber lassen sich anhand eines AFLP-Datensatzes *a priori* aber keine Aussagen treffen.

In der vorliegenden Arbeit verwendete phänetische Auswerteverfahren sind die **UPGMA**- und die **Neighbor-Joining-Analyse**. Insgesamt wurden 310 Merkmale aus acht Primerkombinationen in die Auswertung einbezogen. Dabei zeigen die Phänogramme für beide Analysen die gleichen Artengruppen, deren statistische Unterstützungswerte nur geringe Unterschiede aufwiesen. Auch die aufgezeigten Verwandtschaften zwischen den Artengruppen sind weitgehend identisch, mit Ausnahme derjenigen Gruppen, die schon in der NJ-Analyse schlecht oder gar nicht gestützt waren. Einzelproben, die in der NJ-Analyse auf langen Ästen stehen und keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, nehmen differierende Positionen in der UPGMA-Analyse ein.

Bei phänetischen Analysen ist es sinnvoll, verschiedene Koeffizienten zur Berechnung der paarweisen Distanzen einzusetzen. Diese Koeffizienten sollten vorzugsweise nur die gemeinsame Anwesenheit von Banden als verbindendes Merkmal interpretieren (Jaccard- und Dice-Index), nicht aber die gemeinsame Abwesenheit (simple matching). Der **kophänetische Korrelationswert** (r) dient zur einfachen Überprüfung der Kongruenz einer zugrunde liegenden Ähnlichkeits- bzw. Distanzmatrix und dem daraus resultierenden Dendrogramm. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl der Jaccard-Index als auch der Dice-Index verwendet (siehe Kap. 2.3.3). Die berechneten kophänetischen Korrelationskoeffizienten zeigen für alle untersuchten Koeffizienten/Analyse-Kombinationen eine hohe Güte der Anpassung der Daten aus der Clusteranalyse zu den Ausgangsdaten der Ähnlichkeitsmatrix. Die Kombination von UPGMA mit dem Jaccard-Koeffizienten erbrachte die beste kophänetische Korrelation. Für den vorliegenden Datensatz erwies sich die Kombination von UPGMA mit dem Dice-Index gleichfalls als geeignet. Die Topologien der Bäume aus beiden Analysekombinationen waren identisch. Auch Milbourne *et al.* (1997 an Kartoffel-Kultivaren) und Koopman *et al.* (2001 an *Lactuca*-Arten) fanden für die beiden Kombinationen identische Topologien in ihren AFLP-Studien. Die Dendrogramme spiegeln also offenbar die Datensätze im Allgemeinen gut wider. Lediglich für die Absolutwerte der errechneten Distanzen traten zwischen den Indizes geringe Unterschiede auf.

Zur grafischen Verdeutlichung der phylogenetischen Zusammenhänge auf Grundlage von AFLP-Daten kam neben der NJ- und UPGMA-Clusteranalyse mit der **Hauptkoordinatenanalyse** ein weiteres Gruppierungsverfahren zum Einsatz. Während in einer

Clusteranalyse individuelle genetische Unterschiede deutlich werden, dient die Hauptkoordinatenanalyse der besseren grafischen Darstellung großer Individuenzahlen und ihrer genetischen Distanz zueinander. Auf diese Weise können Beziehungen zwischen den verschiedenen Genotypen verdeutlicht werden.

Die Hauptkoordinatenanalyse der vorliegenden Arbeit hat die Ergebnisse der Clusteranalysen bestätigt. Die dort schon deutlich voneinander abgrenzbaren Artgruppen zeigten auch im Koordinatensystem klare Distanzen zueinander auf, wohingegen die Gruppen, die schon in der Clusteranalyse keine deutliche Trennung zeigten, im Koordinatensystem ebenfalls übereinander lagen. Diese sind dann erst in einer höheren, nicht mehr graphisch darzustellenden Ebene des Koordinatensystems voneinander getrennt.

4.1.4.3 DNA-Sequenzdaten

Phänetische und kladistische Analyse DNA-Sequenz-Daten

Für die Analyse der DNA-Sequenzdaten wurden ebenfalls verschiedene Methoden eingesetzt, deren Vor- und Nachteile im Folgenden besprochen werden sollen.

Ein generelles Problem phylogenetischer Analysen auf der Basis von DNA-Sequenzen besteht darin, dass für jede Nukleotidposition (jedes Merkmal) nur vier Merkmalsausprägungen (A, G, C, T) vorhanden sind. Neben der Unterschätzung der Anzahl tatsächlich abgelaufener Substitutionen (Knoop und Müller 2006) kann die Einbeziehung von Pleisiomorphien eine Ursache für die Aufstellung falscher Hypothesen sein. Dabei können falsche Gruppierungen gestützt werden, die scheinbar auf Synapomorphien, in Wirklichkeit aber auf Sympleisiomorphien beruhen. Durch die Wahl einer guten Außengruppe kann dieses Problem reduziert werden. Die Außengruppenwahl in der vorliegenden Arbeit beruht auf relativ gesicherten Erkenntnissen früherer Studien zur Phylogenie der Bromeliaceae (Horres *et al.* 2000; u. a. Crayn *et al.* 2000a; Crayn *et al.* 2004; Givnish *et al.* 2004; Barfuss *et al.* 2005a).

Im Umgang mit Alignierungslücken („gaps“) bieten sich mehrere Möglichkeiten an.

1. Bereiche mit Lücken werden als fehlende Merkmale betrachtet („missing data“),
2. für jede einzelne Basenposition wird als fünftes Merkmal „fehlt“ gewertet,
3. An- und Abwesenheit einer Lücke wird als separates Merkmal kodiert.

Je nach Wahl des Verfahrens können die entstehenden Baumtopologien deutlich unterschiedlich sein. Werden die einzelnen Basenpositionen als fünftes Merkmal betrachtet, können Bereiche mit nicht eindeutig geklärter Homologie zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Außerdem kommt es bei besonders langen Lücken zu einer deutlichen Übergewichtung dieses Merkmals. In der vorliegenden Arbeit wurden die erste und die dritte Vorgehensweise miteinander kombiniert. Da Lücken im Alignment vermutete Insertions- oder Deletionsereignisse (Indels) repräsentieren und historische Informationen enthalten, die für phylogenetische Analysen geeignet sind (Giribet und Wheeler 1999), wurden sie binär kodiert und so in die Berechnung mit einbezogen. Die Verwendung eines geeigneten

Computerprogrammes zur Kodierung der Lücken ist sehr zeitsparend und weniger fehleranfällig als eine Kodierung von Hand. Dies gilt besonders, wenn verschiedene Merkmals- oder Probensets verwendet oder verschiedene Außengruppen untersucht werden sollen.

Die für die Chloroplastendaten durchgeführte **phänetische Analyse** wurde mit der NJ-Methode durchgeführt. Vergleichend wurden dabei die p-Distanz (als einfaches Modell) bzw. die GTR-Distanz (als sehr komplexes Modell) betrachtet. Trotz dieser sehr unterschiedlich komplexen Modelle erwiesen sich die Topologien der Bäume als identisch. Die Komplexität des Evolutionsmodells scheint also für den vorhandenen Datensatz keine wesentliche Rolle zu spielen. Distanzanalysen sind besonders für die Untersuchung konservierter Sequenzen und nahe verwandter Taxa geeignet (s. o.). Im NJ-Baum stehen einige Artengruppen auf relativ langen Ästen, was auf eine große Sequenzdiversität zwischen den betroffenen Arten hinweist. Allerdings sind die Ergebnisse der Distanzanalyse weitgehend kongruent zu denen der kladistischen Analysen, sodass im Fall der vorliegenden Arbeit das für Distanzanalysen tolerierbare taxonomische Niveau nicht überschritten sein sollte.

Die **Maximum Parsimonie-Analyse** wurde für den vorliegenden cpDNA-Datensatz sowohl mit als auch ohne Berücksichtigung der kodierten Indels durchgeführt. Die Topologien beider Bäume waren fast identisch. Ein Vergleich der Bewertungs-Indizes (CI und RI) weist darauf hin, dass einige der berücksichtigten Indels homoplastisch sind. Andererseits haben die Indels zusätzliche phylogenetische Information beigetragen, was die höhere statistische Unterstützung des entsprechenden Baumes zeigt.

Die in der Maximum Parsimonie- und Distanzanalyse definierten Artengruppen finden sich schließlich auch in den **Maximum Likelihood-** und die **Bayes-Bäumen** wieder. Zudem resultierten mehrere parallel durchgeführte Bayes'sche Analysen in jeweils identischen Baum-Topologien mit nur geringfügigen statistischen Unterschieden.

Jedes der zur Rekonstruktion der Stammbäume in dieser Arbeit eingesetzten Verfahren beruht auf einem anderen mathematischen Algorithmus und/oder Optimalitätskriterium. Zudem führt jede Rekonstruktionsmethode zu einem hypothetischen Stammbaum. Da sich die mit verschiedensten Algorithmen erhaltenen Baumtopologien zum großen Teil als identisch erwiesen, ist davon auszugehen, dass sie die gesuchten Verwandtschaftsverhältnisse relativ zuverlässig widerspiegeln.

4.1.4.4 Differenzen zwischen AFLPs und Sequenzdaten

Die Ergebnisse von Verwandtschaftsuntersuchungen auf der Basis von Kern- und Chloroplasten-DNA sind nicht immer identisch (z. B. Pelsler *et al.* 2003; Brouat *et al.* 2004). Ein Grund dafür könnten Hybridisierungs- und Introgressionsereignisse zwischen noch nicht komplett getrennten Taxa sein. Auch für die vorliegenden Analysen zeigen sich gewisse Unterschiede zwischen Dendrogrammen, die aus den AFLP- und den cpDNA-Sequenzdaten abgeleitet wurden.

Der deutlichste Unterschied im Vergleich der beiden Analysen bezieht sich auf die Schwestergruppenbeziehung der *F. penduliflora*-Gruppe. Sie zeigt in der AFLP-Analyse eine

klare Assoziation zur *F. villosula*-Gruppe, die allerdings statistisch nicht gestützt ist. In der Chloroplastenanalyse hingegen (Maximum Parsimonie-Berechnung mit kodierten Indels) steht die *F. penduliflora*-Gruppe in einem deutlichen Schwestergruppenverhältnis zu allen anderen *Fosterella*-Species. Bei den auf Evolutionsmodellen basierenden Berechnungen besteht wiederum eine moderate Verwandtschaftsbeziehung zur *F. weddelliana*-Gruppe. Das Vorkommen von Hybridisierungsereignissen wurde für die Gattung *Fosterella* nicht untersucht, weshalb sich die o. g. Differenzen nicht ohne weiteres auf solche Ereignisse zurückführen lassen. Allerdings führen Hybridisierungen in Pflanzen oftmals zur Polyploidie. Für die *Fosterella penduliflora*-Gruppe wird aufgrund der Ergebnisse aktueller Mikrosatellitenanalysen (Brauer 2006) und beispielhafter durchflusszytometrischer C-Wert-Bestimmungen (pers. Mitteilung Dr. F. Blattner) ein polyploides Kerngenom vermutet. Auch das vermehrte Auftreten von AFLP-Banden in der *Fosterella penduliflora*-Gruppe im Vergleich zu den anderen Arten, könnte auf einen polyploiden Status zurückzuführen sein.

Weitere Unterschiede im Vergleich der Analysen treten nur bei solchen Proben auf, die in den AFLP- und/oder cpDNA-Bäumen keiner Gruppe klar zugeordnet werden können (z. B. *F. gracilis* oder *F. spec.* (RV 3729a)). All diese Proben stehen in den Phylogrammen auf verhältnismäßig langen Ästen. Um klarere Aussagen treffen zu können, müssten sowohl mehr Proben als auch mehr Merkmale in die Analysen einbezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich im Vergleich der beiden angewandten Methoden herausstellen, dass beide Verfahren zur Erstellung einer molekularen Phylogenie der Gattung *Fosterella* geeignet sind. Die vergleichende Sequenzierung zeigt eine sehr gute Auflösung der Artgruppen und gibt erste Ideen ihrer Verwandtschaft zueinander. Die Ergänzung des Datensatzes durch einen oder zwei weitere Chloroplastenloci könnte hier weitere Erkenntnisse liefern.

Die AFLP-Daten zeigen ebenfalls z. T. sehr gut gestützte Artgruppen, deren Verwandtschaft zueinander durch die fehlende statistische Unterstützung allerdings im Unklaren bleiben. Dies deutet darauf hin, dass die Arten der Gattung *Fosterella* molekular doch relativ distanziert sind. Die AFLPs wären daher für die detailliertere Untersuchung der in den Analysen entstandenen Artengruppen die Methode der Wahl.

4.2 Molekulare Systematik (Phylogenie) der Gattung *Fosterella*

4.2.1 Auswahl der Taxa

Ein vielfach diskutierter Aspekt in der molekularen Systematik ist das Taxon-Sampling. Ein unzureichendes Taxon-Sampling wird von vielen Autoren als signifikanter Fehler in phylogenetischen Studien hervorgehoben (z. B. Graybeal 1998; Poe 1998). Nach Möglichkeit sollten die Datensätze das gesamte Spektrum der zu untersuchenden Taxa abdecken also z. B. alle bekannten Arten einer Gattung. Rosenberg *et al.* (2001b) stellten heraus, dass sowohl ein gutes Sampling als auch eine ausreichende Anzahl an Merkmalen die Genauigkeit der Phylogenien verbessert.

Graybeal (1998) untersuchte den relativen Einfluss der Anzahl von Taxa bzw. von Merkmalen auf eine Phylogenie und fand heraus, dass die Hinzunahme zusätzlicher Taxa eine erhebliche Verbesserung der Phylogenie zur Folge hatte, die Erhöhung der Merkmalszahl hingegen einen wesentlich geringeren Effekt zeigte. Häufig konnten durch die Erhöhung der Zahl an Taxa lange Äste im Baum aufgelöst und das Problem der „long-branch attraction“ verringert werden. Poe (1998) bestätigte, dass die Anzahl der Taxa einen signifikanten Einfluss auf den Retentionsindex (vgl. Kap. 2.3.6) hat. Andere Autoren wiederum kamen zu dem Ergebnis, dass eine unvollständige Taxonauswahl keinen entscheidenderen Einfluss auf die korrekte Rekonstruktion einer Phylogenie ausübt als z. B. die Anzahl der Merkmale (Rosenberg und Kumar 2001a). Allgemein anerkannt ist aber, dass durch die Berücksichtigung einer größeren Zahl von Taxa die Gefahr geringer wird, dass paraphyletische Gruppen fälschlich als Monophyla erscheinen, oder dass isolierte Arten durch „long branch attraction“ zusammen gruppieren. Im Idealfall sollten daher alle irgend verfügbaren Arten einer zu untersuchenden Verwandtschaftsgruppe berücksichtigt werden.

Für die hier durchgeführte AFLP-Analyse wurden alle zum entsprechenden Zeitpunkt in Kassel verfügbaren *Fosterella*-Proben einbezogen, von denen allerdings ein Teil noch keiner beschriebenen Art zugeordnet worden war. Die zeitlich später durchgeführte cpDNA-Sequenzanalyse beinhaltete (soweit vorhanden) mindestens zwei Proben jeder Art, wobei fast ausschließlich eindeutig zu einer Art zugeordnete Akzessionen verwendet wurden. Da zum Zeitpunkt der Sequenzanalyse mehr Arten zur Verfügung standen als zum Zeitpunkt der AFLP-Analyse, war das Probenet für beide Methoden nicht kongruent.

Die Proben stammen entweder direkt vom Standort (meist Bolivien) oder aus verschiedenen Botanischen Gärten (siehe Tab. 2).

Insgesamt wurden in der vorliegenden Studie 23 der derzeit 30 beschriebenen Arten untersucht. Einige sehr seltene Arten mit kleinen Verbreitungsgebieten waren nicht verfügbar.

4.2.2 Stellung der Gattung *Fosterella* in der Familie der Bromeliaceae

Wie in Kap. 1.2 schon ausgeführt, gab es lange Zeit keine gesicherte Information über die Stellung der Gattung *Fosterella* innerhalb der Pitcairnioideae. Erst Givnish *et al.* (2004) konnte eine moderat gestützte Schwestergruppenbeziehung zwischen *Fosterella* einerseits und einer Gruppe aus *Abromeitiella*, *Deuterocohnia*, *Dyckia* und *Encholirium* andererseits nachweisen. Alle fünf Gattungen gehören danach zu den Pitcairnioideae im traditionellen Sinne und verbleiben nach den molekularen Studien von Givnish *et al.* (2004) bei den Pitcairnioideae sensu stricto.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Schwestergruppenverhältnis mittels der Chloroplastenanalyse bestätigt und mit einer verbesserten statistischen Unterstützung (BS 78 %) untermauert werden. Die von Horres *et al.* (2000) postulierte Schwestergruppenbeziehung zwischen *Fosterella* und den Bromelioideae konnte hingegen auch in dieser Studie eindeutig widerlegt werden.

Betrachtet man bisherige Untersuchungen der Familie der Bromeliaceae und die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, lässt sich postulieren, dass die Aufspaltung der Gattung *Fosterella* in ihre Arten früher stattfand, als die innerhalb ihrer Schwestergruppe.

Die erhaltenen Sequenzdaten zeigen für die Gattung *Fosterella* eine relativ hohe Variabilität, was für eine lange Evolutionszeit der Gattung spricht. Erste Untersuchungen für die Gattung *Deuterocohnia* zeigen dagegen eine geringere Sequenzvariabilität (pers. Mitteilung Natascha Wagner) wie sie im Allgemeinen bei den Bromeliaceae zu finden ist.

Zudem haben Givnish *et al.* (2004) anhand von Molekulare-Uhr-Berechnungen das Alter des letzten gemeinsamen Vorfahren von *Fosterella* und der Gruppe aus *Dyckia*, *Encholirium*, *Deuterocohnia* und *Abromeitiella* auf etwa 13,5 Millionen Jahre geschätzt. Givnishes Berechnungen zeigen ebenfalls, dass die Aufspaltung der Arten innerhalb von *Fosterella* bereits vor ca. 10 Millionen Jahren begonnen hat, die von *Deuterocohnia* z. B. allerdings erst vor 1,2 Mio. Jahren. Die Altersschätzung von Givnish *et al.* (2004) ist aufgrund des Fehlens sicherer fossiler Quellen jedoch kritisch zu betrachten.

Deutlich herausstellen lässt sich zudem die Monophylie der Gattung *Fosterella* (BS 100%).

Aus dem kombinierten cpDNA-Stammbaum lassen sich auch einige Erkenntnisse folgern, die über die Gattung *Fosterella* hinaus reichen. Beispielsweise verteilen sich die Arten der Gattung *Deuterocohnia* auf zwei getrennte Untergruppen, und auch die mit etwa 300 Arten sehr umfangreiche Gattung *Pitcairnia* sowie die Vertreter der Gattung *Puya* (insgesamt etwa 200 Arten) stellen in dem kombinierten cpDNA-Baum kein Monophylum dar. Eine mögliche Para- oder gar Polyphylie dieser drei Gattungen müsste allerdings durch ein intensiviertes Sampling erhärtet werden.

Im Jahre 1992 synonymisierten Smith und Read die Gattung *Abromeitiella* mit der Gattung *Deuterocohnia*. Obwohl beide Taxa morphologisch durchaus Unterschiede aufweisen, gibt es unter den Bromelienexperten bisher keinen Consensus über ihren taxonomischen Status (vgl. Givnish *et al.* 2004). In der vorliegenden Studie finden sich Vertreter der ehemaligen Gattung *Abromeitiella* in beiden Untergruppen von *Deuterocohnia*. Derzeit laufende morphologische, taxonomische und molekulare Untersuchungen dieser Gattungen werden weitere Erkenntnisse über diese Vereinigung bzw. Aufspaltung erbringen (Nicole Schütz und Natascha Wagner, pers. Mitt.).

Die Schwestergruppenbeziehung zwischen den Bromelioideae und *Puya*, die Givnish *et al.* (2004) mit Untersuchungen des Chloroplastenlocus *ndhF* deutlich herausstellen konnte, wird auch in der vorliegenden Studie erkennbar, ist allerdings nicht statistisch gestützt.

4.2.3 Artengruppen innerhalb der Gattung *Fosterella*

In allen Analysen zeigen sich mehr oder weniger übereinstimmende Gruppierungen, die jeweils Vertreter von einer oder von mehreren Arten umfassen. Zunächst sollen diese Artengruppen betrachtet werden. Dazu werden für jede Gruppe (AFLPs, Gruppen A bis L vgl. Abb. 12 und cpDNA, Gruppen I bis VII, vgl. Abb. 20) zuerst die molekularen Ergebnisse miteinander verglichen und diese dann den bisher bekannten morphologischen,

geographischen und den Fundortdaten gegenübergestellt. Eine Übersicht der in beiden Studien vertretenen noch keiner Art zugeordneten Taxa findet sich in Tab. 19.

F. elata*, *F. vasquezii*, *F. floridensis*, *F. windischii*, *F. rusbyi*, *F. yuvinkae*, *F. spectabilis

Die in der AFLP-Analyse definierten Gruppen A, B und C sollen hier gemeinsam diskutiert werden. Sie beinhalten zum einen die Vertreter der Arten *F. elata*, *F. vasquezii* und *F. floridensis*, die deren jeweilige Monophylie durch die AFLP-Daten eine gute bis sehr gute statistische Stützung erfährt. Ihre Position im AFLP-Baum lässt eine nahe Verwandtschaft dieser drei Arten vermuten, die allerdings keine statistische Unterstützung findet. Die im cpDNA-Baum definierte Gruppe III (BS 96%) umfasst, neben den eben genannten Arten zusätzlich Vertreter von *F. windischii*, *F. rusbyi*, *F. yuvinkae* und *F. spectabilis*. Mit Ausnahme von *F. spectabilis* (die im AFLP-Baum eine separate Position einnimmt) standen diese drei Arten für die AFLP-Analyse (noch) nicht zur Verfügung.

Innerhalb dieser Gruppe ist es möglich, aufgrund morphologischer Daten eine Unterteilung vorzunehmen. So besitzen die Akzessionen von *F. vasquezii*, *F. elata*, *F. rusbyi* und *F. windischii* uhrfederartig zurückgerollte Petalen, während *F. floridensis* und *F. spectabilis* gerade Petalen und *F. yuvinkae* zurückgebogene Petalen aufweisen. Das Merkmal der Petalenform war von Robert Read bereits vor Jahren zur Unterteilung der Gattung *Fosterella* in zwei große Gruppen vorgeschlagen worden (Pierre Ibisch, pers. Mitt.). Die Anwesenheit von drei verschiedenen Petalenformen allein in der hier behandelten Artengruppe zeigt jedoch, dass das Merkmal wohl nur auf niedriger systematischer Ebene informativ ist.

Ibisch *et al.* (1997) beschrieben *F. vasquezii* als eine neue Art, die eine große morphologische Ähnlichkeit zu *F. elata* aufweist. Wesentliche Unterschiede sahen die Autoren in der Blattbreite (2 cm breit bei *F. vasquezii*; 4 cm breit, stark gesägt und unduliert bei *F. elata*). und in der Blütenfarbe (weiß bei *F. vasquezii*, cremefarbene Petalen mit einem rosa Streifen bei *F. elata*, vgl. Abb. 27). Beide Arten unterscheiden sich auch durch ihr Vorkommen in verschiedenen Ökoregionen. Während *F. elata* im Unterholz des semihumiden Nebelwaldes der Yungas auf 800m bis 2100m Höhe zu finden ist, lebt *F. vasquezii* auf den präkambrischen Tafelbergen (in 300m bis 850m Höhe) im Nordosten Boliviens unter sehr feuchten und wärmeren Bedingungen (vgl. Ibisch *et al.* 1997) Dieses relativ alte Habitat ist vermutlich schon vor langer Zeit von *F. vasquezii* oder dessen Vorfahren besiedelt worden. Hier scheint eine Aufspaltung durch Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen stattgefunden zu haben.

Auf dem präkambrischen Schild sind auch *F. yuvinkae* und *F. windischii* zu finden. Morphologisch sind diese beiden Arten neben der Petalenform u. a. durch ihre Beschuppung an der Blattunterseite (*F. windischii* stark; *F. yuvinkae* spärlich beschuppt, vgl. Abb. 27) zu unterscheiden. In der Chloroplastenanalyse bilden diese drei Arten eine Polytomie, in der *F. elata* und *F. rusbyi* als sehr gut gestützte Untergruppe gegenübersteht. Die beiden letztgenannten Arten sind hinsichtlich der untersuchten cpDNA-Sequenzen nahezu identisch und sind sich auch morphologisch sehr ähnlich. Im Rahmen der in Vorbereitung befindlichen

taxonomischen Revision (Peters *et al.* in Vorbereitung) wurde *F. elata* mit *F. rusbyi* synonymisiert.

Fosterella floridensis und *Fosterella spectabilis* unterscheiden sich deutlich von allen bisher genannten Arten dieser Gruppe. *F. floridensis* hat ein kleines Verbreitungsgebiet am Fuße der Anden. Diese Art hat verhältnismäßig große Blüten (14 mm), deren Petalen immer gerade sind und eine Röhre bilden (vgl. Abb. 4 G) Über die Bestäubungsform dieser Spezies ist bisher noch nichts bekannt. Es könnte sich um eine Art „Übergangstyp“ von entomophiler zu ornithophiler Bestäubung handeln.

F. spectabilis wurde aufgrund der großen morphologischen, aber auch molekularen Distanz zu den anderen *Fosterella*-Spezies in der AFLP-Analyse als Außengruppe gewählt. Sie ist mit ihren sehr großen Blüten (22 bis 30mm), deren Petalen rot oder orange gefärbt und nur an der Spitze leicht zurückgebogen sind, die auffälligste aller *Fosterella*-Arten (Abb. 271). Sie ist auch die einzige ornithophile Art der Gattung. Auch *F. spectabilis* hat ein relativ kleines Verbreitungsgebiet in den halbtrockenen Wäldern Boliviens.

Um die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb dieser Gruppe genauer zu verstehen, sind weitere molekulare, morphologische, taxonomische und biogeographische Untersuchungen erforderlich.

F. heterophylla*, *F. spec. 2

Die Gruppe D der AFLP-Analyse beinhaltet neben zwei Akzessionen von *F. heterophylla* auch zwei Aufsammlungen, deren Artzugehörigkeit noch nicht genau bestimmt werden konnte, die aber aufgrund ihrer Ähnlichkeit zueinander als zur gleichen Art (*F. spec 2*) gehörig aufgefasst werden. Die Gruppe ist insgesamt gut gestützt, wobei auch *F. spec. 2* von *F. heterophylla* deutlich differenzierbar ist. In die cpDNA-Analyse wurde nur ein Vertreter der Spezies *F. heterophylla* einbezogen, der hier jedoch keiner Gruppe zuzuordnen ist.

Beide Species dieser Gruppe besitzen ganzrandige Blätter, ihre weißen Blüten sind jeweils uhrfederartig zurückgerollt. Die Beschuppung der Blattunterseiten ist bei *F. heterophylla* sehr dicht, bei *F. spec. 2* eher spärlich. Zudem ist *F. heterophylla* verzweigt und besitzt einen kurzen Stamm, während *F. spec 2* eine flache Rosette ausbildet. Beiden Arten kommen in den andinen Yungas-Nebelwäldern vor. Aufgrund der hier aufgeführten Unterschiede ist zu vermuten, dass es sich bei *F. spec. 2* um eine neue, noch unbeschriebene *Fosterella*-Art handelt. Peters *et al.* (in Vorbereitung) werden die Akzession mit der Nummer RS 261002-10 als *Fosterella elviragrossiae* neu beschreiben.

F. nowickii*, *F. cotacajensis*, *F. weddelliana

Die im AFLP-Baum mäßig gestützte Gruppe E beinhaltet Vertreter der drei Spezies *F. nowickii*, *F. cotacajensis* und *F. weddelliana*. Dabei weist die Typusprobe von *F. cotacajensis* eine deutliche Distanz zu den Proben von *F. nowickii* und *F. weddelliana* auf. Vertreter der beiden letztgenannten Arten gruppieren zwar jeweils zusammen, sind aber statistisch sehr schwach gestützt. In der cp-DNA-Analyse bilden alle drei Arten gemeinsam die relativ gut gestützte Gruppe V, der zusätzlich noch die Probe *F. cf. weddelliana*

zuzuordnen ist (siehe Abb. 20). Eine klare Abgrenzung der Arten voneinander wird jedoch nicht deutlich. Morphologisch-anatomisch verbindet die drei Arten z. B. die Bildung eines Stämmchens (vgl. Abb. 4A und B), das innerhalb der Gattung ansonsten nur bei *F. caulescens*, *F. heterophylla* und *F. rexiae* auftritt, die uhrfederartig zurückgedrehten Petalen (vgl. Abb. 4I), die gezähnten Blätter (vgl. Abb. 4C) und der gleiche Blattanatomietyp (Patzold 2005; Rex *et al.* 2007). Alle drei Arten sind in trockenen innerandinen Tälern zu finden, wobei *F. cotacajensis* in höheren Lagen bis 2200 m vorkommt. *F. nowickii* und *F. weddelliana* hingegen sind bis max. 1800 m zu finden und beide bevorzugen eher semihumide Gebiete.

Die in Arbeit befindliche taxonomische Revision (Peters *et al.* in Vorbereitung) reduziert *F. nowickii* als Synonym unter *F. weddelliana*, während der Artstatus von *F. cotacajensis* aufrecht erhalten werden soll (vgl. auch Patzold 2005; Rex *et al.* 2007).

F. caulescens*, *F. rexiae*, *F. albicans*, *F. spec. 3(A)*, *F. spec. 4

Die im AFLP-Baum definierten Gruppen F, G und H sollen ebenfalls gemeinsam diskutiert werden. Inbegriffen sind hier außerdem zwei bisher keiner Art zugeordneten Akzessionen (*F. spec. 3* und *F. spec. 4*). Bis auf die beiden Akzessionen von *F. rexiae* ist keine der Gruppen gut gestützt. Die Probe *F. spec. 3* ist nach den AFLP-Daten *F. rexiae* sehr ähnlich. Die Vertreter von *F. albicans* bilden weder im AFLP- noch im Chloroplasten-Baum ein Monophylum. In letzterem sind die Akzessionen von *F. rexiae* und *F. albicans* Bestandteil der heterogenen und insgesamt wenig aufgelösten Gruppe I, die außerdem noch die Probe *F. spec. A* (entspricht *F. spec. 3* der AFLP-Analyse), *F. caulescens* und *F. graminea* beherbergt (vgl. Abb. 12). Auf der Basis der molekularen Daten lassen sich zu den Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb dieser Gruppe keine klaren Aussagen treffen.

Auch morphologisch und bezüglich ihrer Verbreitung ist die Gruppe heterogen. *F. caulescens* und *F. rexiae* bilden ein Stämmchen aus, die anderen Arten nicht. Mit Ausnahme von *F. spec. 4* besitzen alle Akzessionen dieser Gruppe zurückgerollte Petalen, und alle Vertreter bis auf *F. spec. 3* und *F. spec. 4* haben an der Blattbasis Zähnen ausgebildet. *F. caulescens*, *F. rexiae* und *F. spec. 3* stammen aus den Yungas von La Paz, dem nördlichen andinen Regenwald, *F. albicans* und *F. spec. 4* hingegen kommen im semihumiden tucumanisch-bolivianischen Wald vor. *F. albicans* hat ein sehr weites Verbreitungsgebiet und wächst in unterschiedlichsten Habitaten; auch bis hin zum montanen Regenwaldgebiet der Yungas-Region. Aufgrund der molekularen und biogeographischen Daten ist zu vermuten, dass sich hinter der Bezeichnung *F. albicans* mehrere Arten verstecken.

F. graminea*, *F. schidosperma*, *F. spec. 5*, *F. spec. 6

In der Gruppe I der AFLP-Studie stehen neben *F. graminea* (RM22) zwei offenbar eng miteinander verwandte *Fosterella*-Akzessionen unbekannter Artzuordnung (*F. spec. 5* und *F. spec. 6*). Die Gruppe zeigt insgesamt keine statistische Unterstützung. Eine weitere *F. graminea* (RM 216) nimmt im AFLP-Baum eine isolierte Position außerhalb dieser Gruppe ein. Die *F. graminea* (RM216) wurde auch in die cpDNA-Analyse einbezogen und steht dort

in der sehr gut gestützten Gruppe II neben zwei Akzessionen von *F. schidosperma*. An der Basis dieser Gruppe wiederum steht eine *F. rusbyi*, die aus dem Botanischen Garten Heidelberg stammt. Morphologisch unterscheidet sie sich allerdings stark von anderen *F. rusbyi*-Akzessionen, sodass es sich hier höchstwahrscheinlich um eine andere Art handelt (pers. Mitteilung Jule Peters). Die beiden *F. schidosperma*-Akzessionen stehen so eng mit *F. graminea* zusammen, dass es sich bei allen drei Proben um die gleiche Art handeln könnte. Diese Vermutung muss jedoch durch morphologische Untersuchungen erhärtet werden. Beide Arten kommen in tropischen Regenwaldgebieten vor.

F. villosula*, *F. micrantha

Die acht in der AFLP-Analyse eingesetzten Akzessionen von *F. villosula* bilden die Gruppe J, die mit 98% BS statistisch sehr gut unterstützt ist. Wie schon in Kap 3.2.3.1 erwähnt, fällt eine Einteilung in zwei Untergruppen auf. Dabei ist die Untergruppe mit den nördlicheren Vertretern diejenige, deren Vorkommen nahe dem des Typusfundortes von *F. villosula* d. h. im humiden Regenwald der Chapare-Region Zentralboliviens, liegt. Die in der südlicheren Gruppe vereinigten Akzessionen kommen hingegen im semihumiden Wald des Andenvorlandes nahe Santa Cruz vor. Diese molekularen und ökologischen Unterschiede legen nahe, dass es sich bei den südlicheren Akzessionen um eine separate Art handelt. In der cp-DNA-Analyse bilden zwei *F. villosula*-Vertreter der Gruppe J des AFLP-Baumes eine gut gestützte Gruppe (V) mit zwei Akzessionen von *F. micrantha*, die in Mittelamerika beheimatet ist. Eine der beiden *F. villosula*-Akzessionen (die aus der Chapare-Region stammt) gruppiert deutlich enger mit den beiden *micrantha*-Proben als die andere. Parallel zu den molekularen Studien durchgeführte morphologische und biogeographische Untersuchungen durch Peters *et al.* (in Vorbereitung) führten in jüngster Zeit zu einer Auftrennung der beiden *villosula*-Gruppen in unabhängige Taxa, wobei die südlichere Gruppe nach dem 2003 verstorbenen Bromelienforscher Robert Read als *Fosterella robertreadii* benannt werden soll.

Vergleicht man die morphologischen Merkmale der nunmehr drei Spezies dieser Gruppe miteinander, so findet man auch hier sehr große Ähnlichkeiten. Es handelt sich generell um stammlose Pflanzen mit ganzrandigen verhältnismäßig breiten Blättern in einer flachen Rosette, einer behaarten Infloreszenz und zurückgebogenen, weißen Petalen. Unterscheiden lassen sich die Arten morphologisch u. a. durch die Beschuppung der Blätter, die bei *F. villosula* und *F. robertreadii* dicht, *Fosterella micrantha* hingegen sehr spärlich ist. Blattanatomisch gehören zumindest *F. micrantha* und *F. villosula* den selben Typ an (Patzold 2005; Rex *et al.* 2007).

Fosterella micrantha ist die einzige *Fosterella*-Art, die in Mittelamerika (El Salvador, West Guatemala und Mexiko) zu finden ist, wo sie trockene Wälder besiedelt. Alle anderen *Fosterella*-Arten kommen im mittleren Südamerika vor. Es stellt sich die Frage, wie diese Disjunktion zustande gekommen ist.

Zwei Hypothesen für das Vorkommen von *Fosterella micrantha* in Mittelamerika sind denkbar:

- Ausbreitung durch long distance dispersal (Fernausbreitungsereignis) oder
- Relikt eines ehemals größeren Verbreitungsgebietes der Gattung *Fosterella*.

Das Vorkommen durch ein erst kürzlich stattgefundenes Fernausbreitungsereignis ist dabei die erheblich wahrscheinlichere Hypothese, die auch durch die molekularen Studien (terminale Position von *F. micrantha* in den Dendrogrammen) gestützt wird. Möglicherweise wurde diese Spezies sogar erst durch den Menschen nach Mittelamerika verschleppt, da die etwa 3 mm kleinen, zweiflügligen Samen sich nur schwierig über so weite Strecken ausbreiten können (vgl. Varadarajan und Gilmartin 1988c). Zudem ist bis jetzt noch kein Fund von *Fosterella villosula* oder *F. micrantha* in Brasilien oder Peru bekannt, was ebenfalls für ein singuläres Fernverbreitungsereignis spricht.

F. penduliflora*, *F. latifolia*, *F. chiquitana*, *F. gracilis*, *F. spec. 7*, *F. spec. C*, *F. spec. D

Die drei Arten *F. penduliflora*, *F. latifolia*, *F. chiquitana* und die noch keiner Art zugeordnete *F. spec. 7* (siehe Abb. 12) bilden die ebenfalls gut gestützte *Fosterella*-Gruppe K der AFLP-Analyse (BS 72%). Innerhalb der Gruppe gibt es jedoch keine klaren Strukturen, die es erlauben würden, diese drei Arten voneinander zu separieren.

Das gleiche Bild zeigt sich in der Chloroplastenanalyse, in der zusätzlich zwei weitere bisher unbeschriebene Taxa (*F. spec. C* und *F. spec. D*) innerhalb der gleichen Gruppe stehen (siehe Abb. 20). Auch hier sind die drei Arten nicht klar voneinander getrennt. Die mittels der AFLP-Analyse keiner Gruppe zugeordnete, einzige gelb blühende *Fosterella*-Art (*F. gracilis*) nimmt im cp-DNA-Baum einen Platz an der Basis der „*penduliflora*-Gruppe“ ein, weist aber dennoch eine deutliche Distanz zu dieser auf. Beides spricht für eine taxonomische Eigenständigkeit dieser Spezies (Abb. 27).

Fosterella penduliflora ist die am weitesten verbreitete Art der Gattung und von Nord-Argentinien über Zentral- und Ostbolivien bis ins südliche Peru zu finden. Die Spezies ist in der Lage, in sehr unterschiedlichen Ökoregionen zu leben, wie z. B. dem bolivianisch-tucumanischen Wald (semihumid), dem Chaco-Bergwald (humid) und dem Chiquitano-Trockenwald (arid). Dabei ist sie in Höhenlagen zwischen 200 und 2500 m, sowohl im Unterholz des andinen Trockenwaldes als auch auf sonnenexponierten Felsen zu finden. *F. penduliflora* ist zudem sehr trockenresistent. Die Pflanzen dieser Art sind in der Lage, die Blätter vollständig abzuwerfen und trockene Zeiten mit einer Art Bulbus zu überstehen.

F. chiquitana und *F. latifolia* wurden durch Ibisch *et al.* (1999) erstbeschrieben und kommen im Tiefland des Chiquitano-Trockenwaldes bzw. in halbfleuchten andinen Wäldern vor. Die molekularen Daten stellen ihren Status als separate Arten in Frage. Zweifelsfrei sind die Akzessionen dieser beiden Arten sehr nahe miteinander und mit *F. penduliflora* verwandt oder sogar auseinander hervorgegangen. Es könnte sich aber auch um eine einzige Art handeln, die sich unterschiedlichen Umweltbedingungen angepasst hat und somit eine große morphologische Variation zeigt. Peters *et al.* (in Vorbereitung) haben aufgrund dieser Daten

die drei Arten zu *F. penduliflora* vereinigt. Dabei wird *F. latifolia* mit *F. penduliflora* synonymisiert und *F. chiquitana* bekommt den Status einer Unterart, *F. penduliflora* ssp. *chiquitana*.

Fosterella gracilis besaß in der letzten umfassenden Monographie der Gattung (Smith und Downs 1974) einen eigenen Artstatus. Smith und Read (1992) hingegen stuften die Spezies als Synonym von *F. penduliflora* ein. Allerdings gibt es eine Reihe morphologischer Merkmale (wie z. B. die Art der Blattbeschuppung, die Größe der Infloreszenz oder ihre Verzweigung) durch die sich *F. gracilis* deutlich von *F. penduliflora* unterscheiden lässt. Das auffälligste morphologische Unterscheidungsmerkmal ist die gelbe Blütenfarbe von *F. gracilis* (im Gegensatz zu weißen Blüten bei *F. penduliflora* vgl. Abb. 27). Auch ökologisch und geographisch gesehen unterscheidet sich *F. gracilis* von *F. penduliflora*. Sie kommt auf waldfreien Abhängen bzw. Felsen vor und ist im subandinen Bereich in Tälern Nordboliviens bzw. auf dem Andenfuß in Höhen zwischen 200 und 1000m zu finden. Diese Unterschiede rechtfertigen die Wiederaufstellung des Taxons *F. gracilis* (Ibisch *et al.* 2006).

***F. weberbaueri*, *F. spec. 8* (B)**

Die schwach gestützte Gruppe L der AFLP-Analyse umfasst neben einer gut gestützten Untergruppe aus vier Akzessionen von *F. weberbaueri* eine zu *F. weberbaueri* ähnliche Probe (*F. cf. weberbaueri*) und die einzige im Probenet vorhandene brasilianische *Fosterella*-Akzession (*F. spec. Leme 5078*), deren Artzuordnung bisher unbekannt war (s. u.). Sowohl im AFLP- als auch cpDNA-Baum sind beide Arten deutlich voneinander getrennt. Das gleiche gilt für die geographische Verbreitung. Während *F. weberbaueri* in den prä- und subandinen Amazonaswäldern und in den Yungas zu finden ist, dort in Höhenlagen von 600 m bis 1500 m vorkommt, wurde die brasilianische Probe im feuchten Amazonaswald in Höhen unter 200 m gefunden. Morphologisch sind sich die Pflanzen ähnlich, weisen aber Unterschiede auf, u. a. in der Petalenform (*F. weberbaueri* hat zeitweise zurückgerollte, die brasilianische Akzession nur leicht zurückgebogene Petalen) und in der Beschuppung der Blattunterseiten auf (*F. weberbaueri* besitzt keine Schuppen, die brasilianische Art zeigt eine spärliche Beschuppung) Zudem ist der Habitus der brasilianischen Spezies insgesamt kleiner.

Molekulare, morphologische und biogeographische Daten deuten daher darauf hin, dass die brasilianische Akzession eine separate Art repräsentiert. Die in Arbeit befindliche taxonomische Revision (Peters *et al.* in Vorbereitung) zeigt, dass die brasilianische Probe morphologische Ähnlichkeiten zu *F. aletroides* besitzt.

Akzessionen mit unbekannter oder unklarer Artzuordnung

In diesem Abschnitt werden die z. T. bereits im Zusammenhang mit den einzelnen Artengruppen diskutierten Affinitäten der bisher keiner Art zugeordneten Akzessionen *F. spec. 1* bis *9* und *F. spec. A* bis *D* zusammengefasst (vgl. Tab. 19).

Fosterella spec. 3 aus der AFLP-Studie entspricht *F. spec. A* der cpDNA-Analyse. Diese Probe steht nach den molekularen Daten nahe bei *F. rexiae*, während sie morphologisch

Ähnlichkeiten zu *F. windischii* aufweist. In den aktuellen morphologischen und taxonomischen Untersuchungen (Peters *et al.* in Vorbereitung) wurde deutlich, dass es sich bei *F. spec. 3* um eine neue eigenständige Art handelt. Sie wird den Namen *F. kroemeri* bekommen, nach ihrem Sammler Torsten Krömer.

Tab. 19: Nomenklatur der noch unzugeordneten bzw. unbeschriebenen *Fosterella*-Akzessionen.

Proben, die im jeweiligen Baum nicht vorhanden sind werden mit „-“ gekennzeichnet.

DNA-Nr.	Benennung und Position im AFLP-Baum	Benennung und Position im cpDNA-Baum	Beschreibung als neue Art
30a	F. spec. 1, basal zu <i>F. elata</i> , <i>F. vasquezii</i> , <i>F. floridensis</i>	-	
111a	F. spec. 2,	-	<i>F. elviragrossae</i>
29a	in Gruppe D mit <i>F. heterophylla</i>	-	
28d	F. spec. 3, in Gruppe G mit <i>F. rexiae</i>	F. spec. A, in Gruppe I mit <i>F. albicans</i> , <i>F. caulescens</i> und <i>F. rexiae</i>	<i>F. kroemeri</i>
128a	F. spec. 4, in Gruppe H mit <i>F. albicans</i>	F. spec. D, in Gruppe VII mit <i>F. penduliflora</i> , <i>F. latifolia</i> und <i>F. chiquitana</i>	
88a	F. spec. 5, in Gruppe I mit <i>F. spec. 6</i> und einer <i>F. graminea</i> (RM 22)	-	
116a	F. spec. 6, in Gruppe I mit <i>F. spec. 5</i> und einer <i>F. graminea</i> (RM 22)	-	
49b	F. spec. 7, in Gruppe K mit <i>F. penduliflora</i> , <i>F. latifolia</i> und <i>F. chiquitana</i>	-	
129a	F. spec. 8, in Gruppe L mit <i>F. weberbaueri</i>	F. spec. B in Gruppe IV mit <i>F. weberbaueri</i>	
79a	F. spec. 9, basal zu Gruppen A bis L	-	
93a	-	F. spec. C, in Gruppe VII mit <i>F. penduliflora</i> , <i>F. latifolia</i> und <i>F. chiquitana</i>	

Fosterella spec. 4 steht im AFLP-Baum auf einem sehr langen Ast und kann hier keiner Artgruppe zugeordnet werden. Lange Äste weisen auf eine schnelle Evolution hin (hohe Anzahl von Mutationen in kurzer Zeit), was als Hinweis darauf gedeutet werden kann, dass es sich hier um eine separate Art handelt. Aus diesem Grund wurde die Probe in die cpDNA-Analyse mit einbezogen (hier *F. spec. D*). Im Chloroplastenbaum ordnet sich die Art in die

penduliflora-Gruppe ein. Auch ihr Fundort liegt innerhalb des Verbreitungsgebiets von *F. penduliflora*, morphologisch differiert *F. spec. 4* aber deutlich von *F. penduliflora*.

Fosterella spec. 5 stammt aus Selby's Botanical Garden. Leider war es nicht möglich, zu dieser Probe weitere Angaben zu erhalten. Die in Selbys bestimmte Art war *F. villosula*; diese Artzugehörigkeit konnte aber in den vorliegenden Studien widerlegt werden. Die Probe ähnelt *F. spec 6*, die wie *F. spec. 9* allerdings ebenfalls morphologische Ähnlichkeiten mit *F. villosula* aufweist.

Fosterella spec. 7 steht im AFLP-Baum inmitten der *penduliflora*-Gruppe. Diese Pflanze ist wie *F. chiquitana* an der Blattunterseite dicht beschuppt, besitzt allerdings im Gegensatz zu den anderen Vertretern dieser Gruppe zurückgerollte Petalen, die nach der Anthese auch zurückgerollt bleiben. Sie kommt auf 830 m Höhe in der Yungas-Region vor und ist somit morphologisch, ökologisch und biogeographisch völlig verschieden zu den anderen Mitgliedern der *penduliflora*-Gruppe. Eine mögliche Erklärung für diese unerwartete Position könnte eine Verwechslung der Proben sein.

Die Probe *F. spec C* der cpDNA-Analyse stammt aus der Lebendpflanzensammlung der FAN Bolivien. Leider gibt es auch zu dieser Probe keine weiteren Angaben.

Fosterella cf. weddelliana ist eine stammbildende Art die morphologisch *F. weddelliana* sehr ähnlich ist. In der cpDNA-Analyse steht sie basal zu den anderen *F. weddelliana*.

Fosterella graminea (RM 216) lässt sich in der AFLP-Analyse keiner Gruppe zuordnen. Sie steht außerdem weit entfernt von der zweiten in dieser Untersuchung einbezogenen *F. graminea* (RM 22). Die Probe entspricht *F. graminea* in der cpDNA-Analyse, in der die Probe eine basale Stellung zur Gruppe I einnimmt. Allerdings sind auch hier keine Aussagen über die Artzugehörigkeit möglich.

Bei *F. albicans* (PI 98.204) handelt es sich um eine „echte“ *F. albicans* (pers. Mitteilung P.L. Ibsch). Da sie im Baum aber basal zur Gruppe III steht und damit in keinster Weise in der Nähe der anderen Vertreter dieser Spezies, wurde diese Probe wahrscheinlich in irgendeinem Stadium der Untersuchung verwechselt.

Alle hier aufgeführten Proben bedürfen weiterer morphologischer und/oder molekularer Analysen, um genauere Erkenntnisse über ihren taxonomischen Status zu erlangen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen legen nahe, dass es noch mehr neue, bisher unbeschriebene *Fosterella*-Arten gibt.

Allerdings zeigt sich insgesamt eine weitgehende Kongruenz der einzelnen Artengruppen der AFLP- und der cpDNA-Bäume.

Mit den im Rahmen dieser Studie erhaltenen molekularen Ergebnissen lassen sich die bisher aufgrund morphologischer und geographischer Merkmale beschriebenen *Fosterella*-Arten zum Teil voneinander abgrenzen.

- Die meisten bisher beschriebenen und hier analysierten Arten sind genetisch distinkt und stellen jeweils ein Monophylum da.

-
- Die Arten lassen sich in Verwandtschaftsgruppen zusammenfassen, deren jeweilige Monophylie unterschiedlich stark gestützt ist.
 - Einige der in diese Untersuchungen einbezogenen, bisher noch keiner Art zugeordneten Taxa ließen sich z. T. in die entstanden Artengruppen einordnen oder aufgrund ihrer distinkten Position in den Dendrogrammen vermuten, dass es sich um neue Arten handelt.
 - Über die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gruppen lassen sich mit den bisherigen molekularen Daten nur begrenzte Aussagen treffen. Hier bedarf es einer Reevaluation morphologisch-anatomischer und biogeographischer Daten.
 - Es gibt eine Reihe von Widersprüchen zwischen molekularen und morphologischen Daten, die einen weiteren Klärungsbedarf aufwerfen.
 - Hinter einigen morphologisch definierten Arten versteckt sich eine erstaunliche genetische Variabilität (z. B. bei *F. villosula*; *F. albicans*), die die Beschreibung neuer Taxa erforderlich machen könnte.

Nach der Betrachtung der einzelnen Artengruppen in den Bäumen sollen im nächsten Abschnitt die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen diesen Gruppen diskutiert werden.

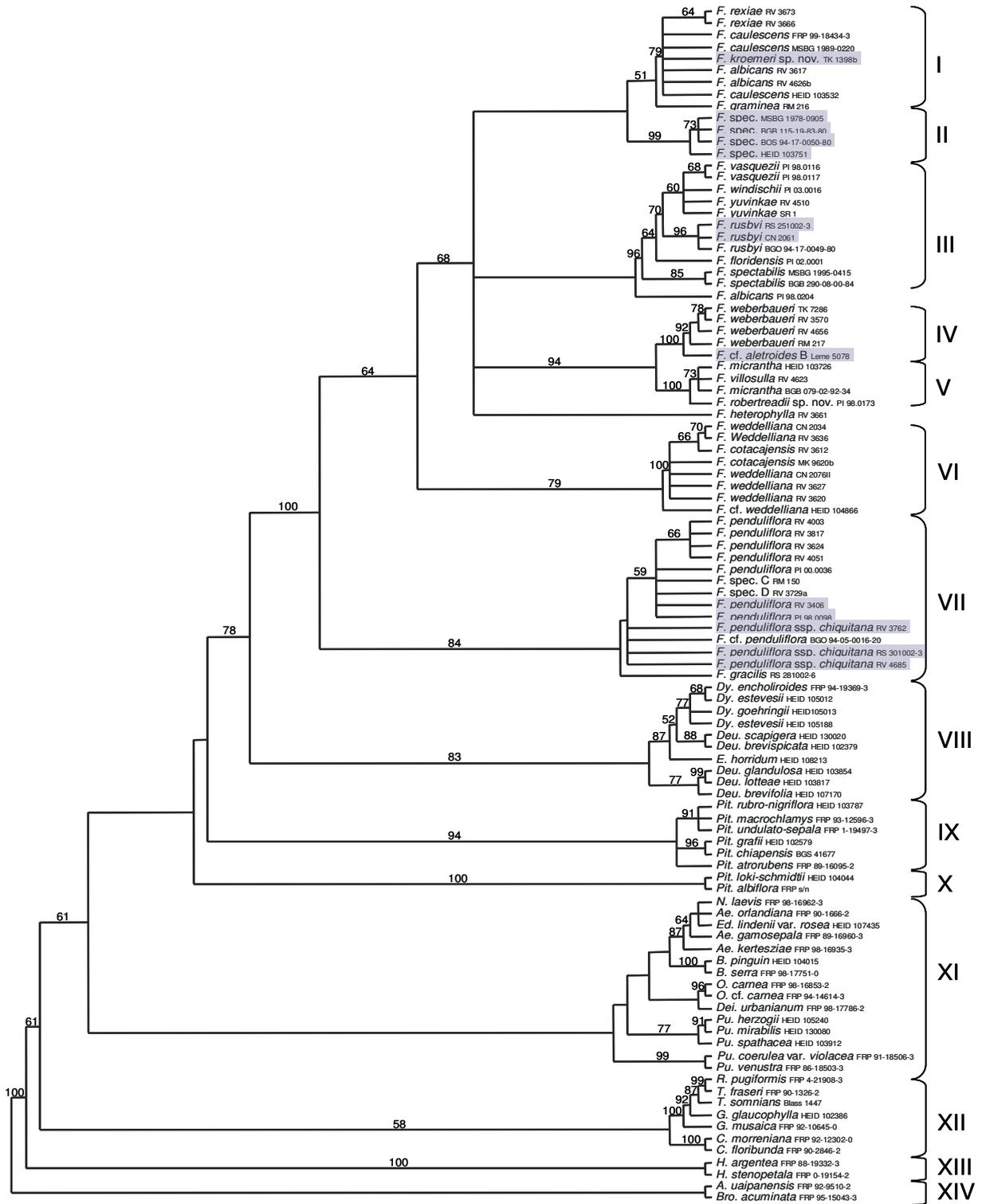


Abb. 25: Kombiniertes Chloroplasten-Datensatz: 50 % Majority Rule Consensus-Baum einer Maximum Parsimonie-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels. Baum mit neuer Benennung.

MR-Baum der drei untersuchten Chloroplastenloci (*atpB-rbcL*, *psbB-psbH* und *rps16*-Intron). Die Bootstrapwerte über 50 %, basierend auf 1000 Replikaten sind oberhalb der Äste angegeben. Die grau unterlegten Proben wurden mit den veränderten Benennungen versehen. Abkürzungen: F: *Fosterella*, Dy: *Dyckia*, Deu: *Deuterocohnia*, E: *Encholirium*, Pit: *Pitcairnia*, N: *Neoregelia*, Ae: *Aechmea*, Ed: *Edmondoa*, B: *Bromelia*, O: *Ochagavia*, Dei: *Deinacanthos*, Pu: *Puya*, R: *Racinea*, T: *Tillandsia*, G: *Guzmania*, C: *Catopsis*, H: *Hechtia*, A: *Ayensua*, Bro: *Brocchinia*

4.2.4 Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung, ihre Evolution und Biogeographie

Auf morphologischer Ebene sind in der Vergangenheit nur sehr wenige Aussagen bezüglich der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung *Fosterella* getroffen worden. Die molekularen Stammbäume lassen z. T. sehr klare Erkenntnisse über diese Beziehungen zu. Allerdings konnte in diesen Untersuchungen nicht die basalste Art oder Artengruppe bestimmt werden, sodass nur wenige Aussagen über den ursprünglichen Zustand von *Fosterella* getroffen werden können.

Die molekularen Daten machen z. B. deutlich, dass das von Robert Read aufgestellte morphologische Merkmal der Petalenkrümmung zur Unterteilung der Gattung in zwei Untergattungen nicht anwendbar ist. Für das Merkmal „Petalenform“ gibt es mehr als zwei Zustände bei *Fosterella* (gerade, leicht zurückgebogen, uhrfederartig zurückgerollt während und nach der Anthese und uhrfederartig zurückgerollt während und gerade nach der Anthese, vgl. Tab. 1 und Abb. 4G bis I). Reads Erkenntnisse und Hypothesen sind von ihm nie publiziert worden. Bei der Kartierung der Petalenform auf den molekularen Stammbaum (Abb. 26) lässt sich aber deutlich erkennen, dass das uhrfederartige Zurückrollen der Petalen innerhalb der Gattung *Fosterella* mehrfach entstanden sein muss. Allerdings lässt sich Reads Erkenntnis auf einer tieferen systematischen Ebene sehr wohl verwenden. So sind z. B. die Gruppen K und L der AFLP-Analyse und die Gruppen IV, V und VII der Chloroplastenanalyse mit geraden bzw. zurückgebogenen Petalen assoziiert, während alle Vertreter der Gruppe E bzw. VI zurückgerollte Petalen aufweisen.

Im AFLP-Baum zeigt sich eine Schwestergruppenbeziehung zwischen der Gruppe J (*F. villosula*) und der Gruppe K (*F. penduliflora*). Allerdings ist dieses Verhältnis nur sehr schwach gestützt und wird durch die cpDNA-Analyse nicht bestätigt. Nach den Chloroplastendaten sind beide Gruppen deutlich distanziert zueinander. Kessler *et al.* (1999) stellten aufgrund von morphologischen Merkmalen Ähnlichkeiten zwischen *F. villosula* und *F. chiquitana* heraus. Die neuesten taxonomischen Untersuchungen, die *F. chiquitana* als Unterart von *F. penduliflora* einstufen (Peters *et al.* in Vorbereitung), lassen in der Tat eine morphologische Ähnlichkeit zwischen beiden Gruppen erkennen.

Eine klare Aussage lässt sich über die Beziehung der Gruppen IV (*F. weberbaueri*) und V (*F. micrantha*/*F. villosula*) treffen. Die statistische Unterstützung von 94% spricht dafür, dass diese beiden Gruppe eng miteinander verwandt sind. Morphologisch lassen sich die Arten dieser Gruppen allerdings deutlich unterscheiden.

Eine weitere Verwandtschaftshypothese lässt sich für die Gruppen D (*F. heterophylla*) und E (*F. weddelliana*) aufstellen. Hier liegt ebenfalls nur eine sehr schwache statistische Unterstützung vor. Morphologisch vereinen diese Gruppen neben den o. g. zurückgerollten Petalen u. a. die Bildung eines Stämmchens und die gezähnten Blattbasen. Diese stehen wiederum den ganzrandigen Blättern und dem flachen Rosettentyp der *penduliflora*-Gruppe (VII und K) gegenüber.

In Abb. 26 ist aber auch für das Merkmal der Stammbildung deutlich eine mehrfache Entstehung erkennbar. Somit scheint auch dieses kein „gutes“ Merkmal für die Abgrenzung einzelner Arten zu sein. Hier muss weiterhin nach taxonomisch relevanten Merkmalen gesucht werden.

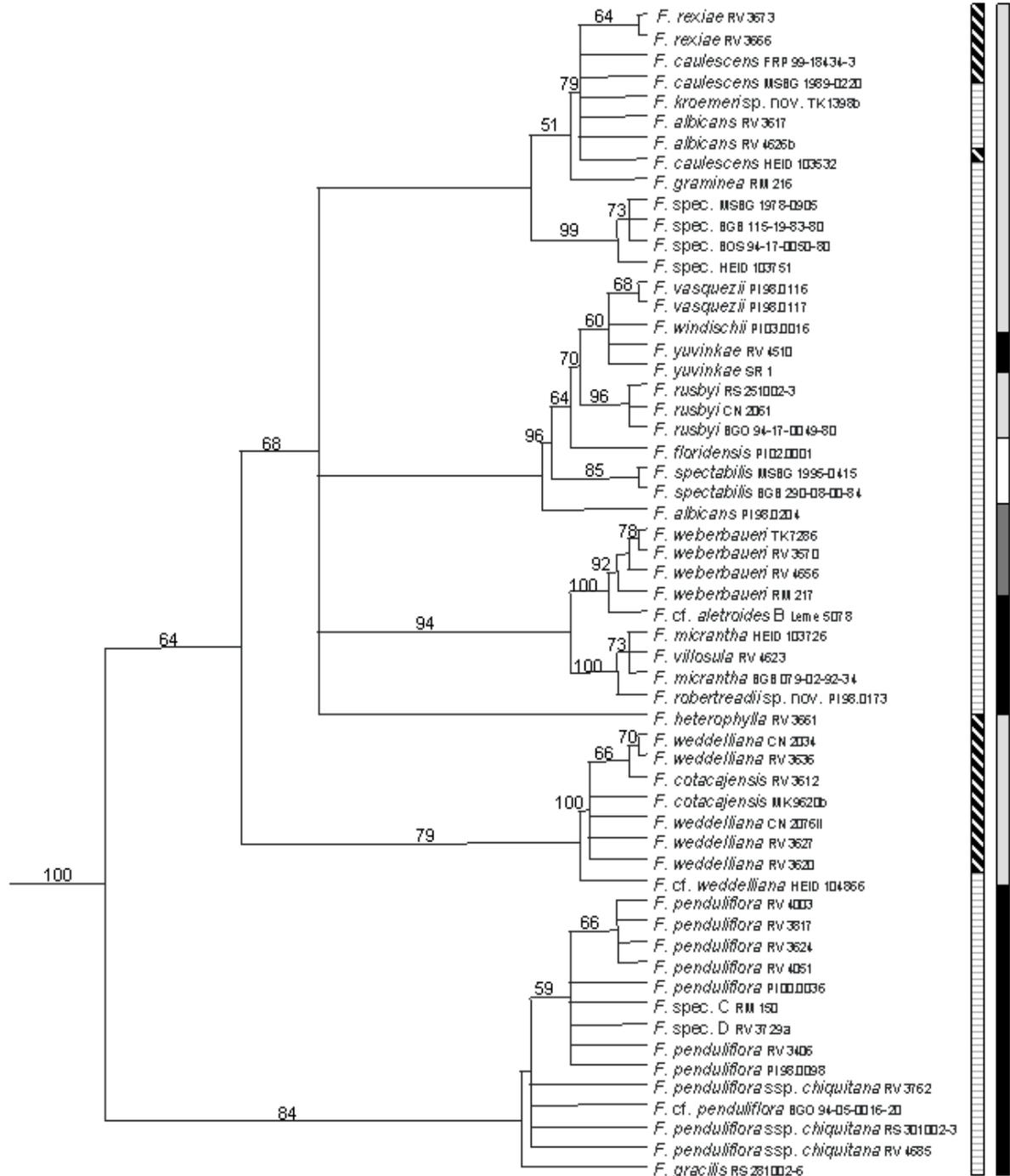


Abb. 26: Merkmalskartierung.

Ausschnitt aus dem 50% MR-Baum der Maximum-Parsimonie-Analyse inkl. Indels. Bootstrapwerte sind oberhalb der Äste angegeben. Der rechte Balken kartiert das Merkmal Stammbildung: diagonal gestreift = mit Stamm; quergeschreift = stammlos. Der linke Balken zeigt das Merkmal der Petalenkrümmung: schwarz = leicht zurückgebogene Petalen; dunkelgrau = uhrfederartig zurückgebogene Petalen, die nach der Anthese gerade werden; hellgrau = uhrfederartig zurückgebogene Petalen, auch nach der Anthese; weiß = gerade Petalen.

Die xerophytischen Vertreter von *Fosterella* (z. B. *F. cotacajensis*, *F. weddelliana* und *F. caulescens*) sind vornehmlich in ariden Gebieten verbreitet durch das Abwerfen der Blätter im unteren Teil des Sprosses die Stämmchen aus. Sie weisen eine chamaephytische Lebensform auf. Die meisten anderen *Fosterella*-Arten sind den Hemikryptophyten zuzuordnen. Diese Lebensform ist vermutlich ursprünglich in der Familie der Bromeliaceae. Einige hemikryptophytische Vertreter von *Fosterella* sind sogar sehr feuchten Bedingungen angepasst und kommen in Tieflandregenwäldern vor. Die mesophytischen Vertreter sprechen auch hier für eine mehrfache Ausbreitung in die verschiedenen Habitate.

Die Samen von *Fosterella* sind klein (2 bis 3 mm groß) und tragen beidseitig Anhängsel (Flügel). Eine Windverbreitung über lange Strecken erscheint allerdings relativ unwahrscheinlich. Die Samen sind aufgrund ihrer Größe, Form und Farbe nicht attraktiv für Tiere. Die begrenzte Ausbreitungsfähigkeit könnte das z. T. sehr engräumige Vorkommen bzw. den Lokalendemismus einzelner Arten erklären. Dies wird durch das Vorkommen verschiedener *Fosterella*-Arten im Unterwuchs begünstigt. Varadarajan und Gilmartin (1988c) stellten Untersuchungen zur Samenmorphologie der Pitcairnioideae an. Ein von ihnen aufgestellter Samentyp ist der *Fosterella*-Typ. Der gleiche Typ wurde von den Autoren auch Vertretern der Gattungen *Abromeitiella*, *Ayensua*, *Connelia*, *Cottendorfia*, *Hechtia* und *Pitcairnia* zugeordnet, alles Gattungen, in denen ebenfalls Lokalendemismus auftritt.

Anhand der vorhandenen Daten zur Ausbreitung von *Fosterella* lässt sich nicht sagen, ob die Besiedlung von Andenhabitaten ins amazonische Tiefland erfolgte oder umgekehrt. In der Gattung gibt es Vertreter, die das Tiefland besiedeln, andere kommen in verschiedenen Habitaten des Hochlandes vor und wieder andere besiedeln die Gebiete dazwischen. Allerdings ist davon auszugehen, dass *Fosterella* einige Gebiete mehrfach neu besiedelt hat. Betrachtet man beispielsweise das relativ geringe Alter von andinen *Fosterella*-Habitaten und vergleicht diese mit den Taxa, die in sehr alten und ökologisch stabilen Habitaten vorkommen, lässt sich eine Ausbreitung vom Tief- ins Hochland postulieren, die vermutlich sogar mehrfach stattgefunden hat. Für diese Ausbreitungsrichtung spricht ebenfalls der relativ lange Ast, auf dem die Gruppe mit den xerophytischen Vertretern (*F. cotacajensis*, *F. nowickii*, *F. weddelliana*) steht. Die Distanz zu den anderen *Fosterella*-Arten ist hier sehr groß, was ein Hinweis auf eine verhältnismäßig langsame Differenzierung dieser Gruppe ist.

Die vermutlich durch long-distance-dispersal nach Mittelamerika ausgebreitete *F. micrantha* könnte auch erst in jüngster Zeit durch den Menschen verschleppt worden sein. Eine Ausbreitung durch Tiere ist eher unwahrscheinlich, es sei denn, dass Samen im Federkleid von Vögeln hängen geblieben und so mitgeschleppt worden sind.

Mit Hilfe zusätzlicher molekularer, morphologischer und vor allem biogeographischer Untersuchungen soll eine Klärung der Frage nach der Ausbreitungsrichtung für *Fosterella* erfolgen. Diese könnten dann weitere Rückschlüsse auf die Evolution der Gattung selbst und die der gesamten Bromeliaceae zulassen.

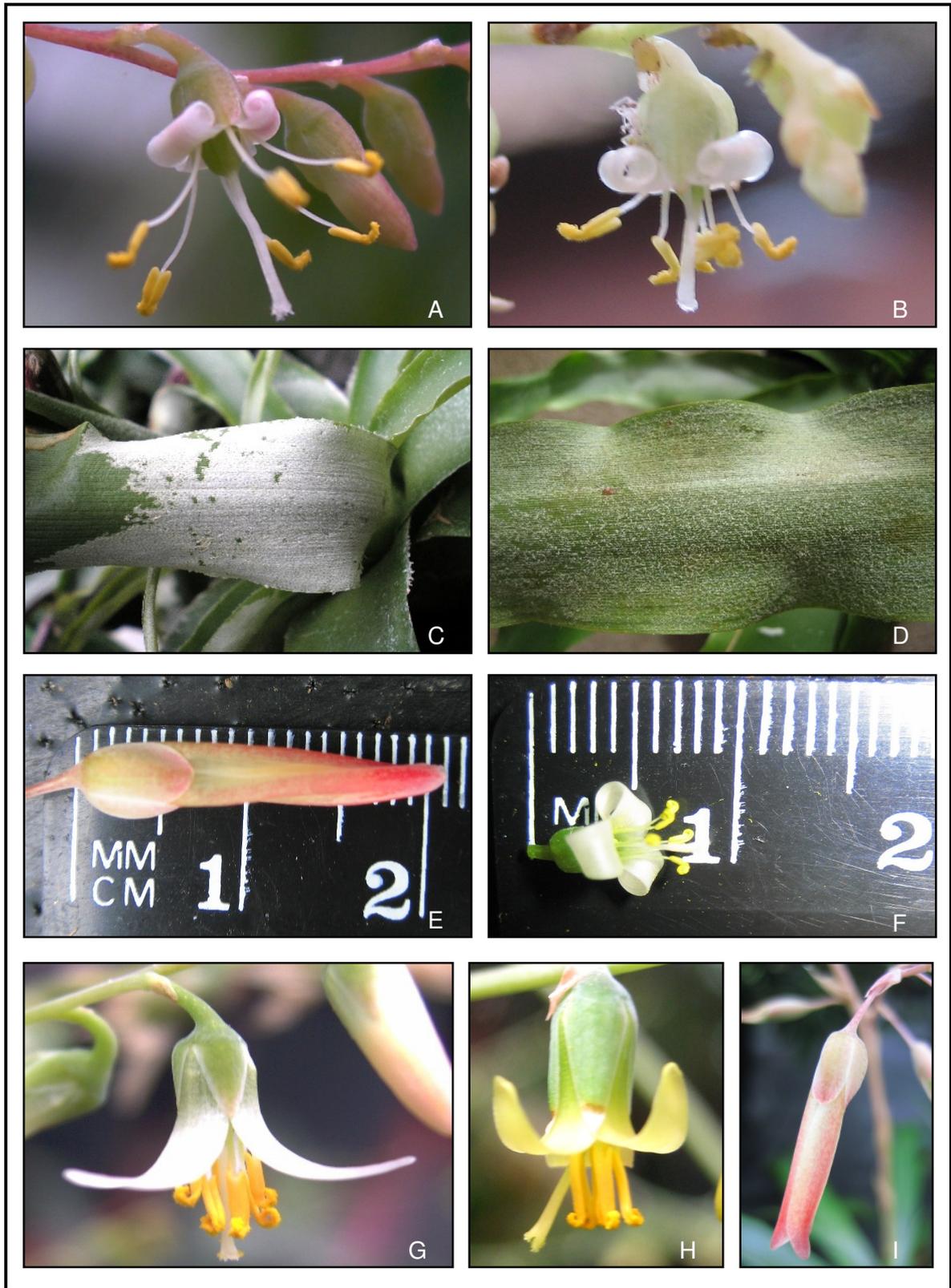


Abb. 27: Differenzierung einiger *Fosterella*-Spezies.

A = Blüte *Fosterella elata*, B = Blüte *F. vasquezii*, C. = Beschuppung der Blattunterseite von *F. windischii* (Foto: Jule Peters), D = Beschuppung der Blattunterseite von *F. yuvinkae*, E = Blütengröße von *F. spectabilis*, F = Blütengröße von *F. micrantha*, G = Blüte *F. penduliflora*, H = Blüte *F. gracilis*, I = Blüte *F. spectabilis*.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe molekularer Techniken die Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung *Fosterella* geklärt und eine umfassende Phylogenie erstellt werden. Im Vordergrund standen dabei die folgenden Fragen:

1. Sind die aufgrund von morphologischen Merkmalen bzw. ihrer geographischen Verbreitung bisher beschriebenen 30 *Fosterella*-Arten auch molekular voneinander abgrenzbar?
2. Wie sind die einzelnen Arten miteinander verwandt?
3. Lassen sich innerhalb der Gattung evolutionäre Linien identifizieren?
4. Sind Akzessionen, die bisher noch keiner Art zugeordnet werden konnten, genetisch distinkt?
5. Lässt sich eine Schwestergattung von *Fosterella* herausstellen?
6. Ist *Fosterella* innerhalb der Pitcairnioideae s. str. die Schwestergruppe der Bromelioideae?

Zwei verschiedene molekulare Techniken, die AFLP-Methode (amplified fragment length polymorphism, Vos *et al.* 1995) und die vergleichende Sequenzierung verschiedener Mitochondrien- und Chloroplasten-DNA-Regionen wurden zur phylogenetischen Untersuchung der Gattung *Fosterella* etabliert und optimiert. Diese beiden Methoden wurden anschließend vergleichend für die molekularsystematischen Studien eingesetzt.

Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden:

1. Für die erstmals innerhalb der Gattung *Fosterella* eingesetzte AFLP-Methode wurden 58 Primerkombinationen getestet, von denen 13 als gut geeignet befunden und acht für die Hauptanalysen ausgewählt wurden. Die AFLP-Bandenmuster erwiesen sich als komplex, distinkt und reproduzierbar und sowohl intra- als auch interspezifisch informativ. Insgesamt wurden mit 77 Proben aus mindestens 18 der bisher beschriebenen 30 Arten 310 informative AFLP-Merkmale erzeugt, in eine binäre Matrix überführt und mittels verschiedener Analyseverfahren ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Phänogrammen, Kladogrammen und in einem „dreidimensionalen Koordinatensystem“ (Hauptkoordinatenanalyse). Zur statistischen Absicherung wurden Bootstrap-Analysen durchgeführt.
2. Die Topologien der einzelnen Bäume untereinander stimmten weitgehend überein, wobei sich insgesamt 12 Artengruppen definieren ließen, die statistisch unterschiedlich gut abgesichert waren. In einigen Gruppen ließen sich enge Verwandtschaftsbeziehungen feststellen, so z. B. zwischen *F. penduliflora*, *F. latifolia* und *F. chiquitana* sowie zwischen *F. cotacajensis*, *F. weddelliana* und *F. nowickii*.
3. Die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Artengruppen sind nicht befriedigend aufgelöst. Ausnahmen betreffen die offenbar engen Beziehungen zwischen der

F. penduliflora-Gruppe und *F. villosula*, zwischen *F. weberbaueri* und der einzigen brasilianischen Akzession (*F. spec.* 8), sowie der *F. weddelliana*-Gruppe und einer Gruppe aus *F. heterophylla* und zwei noch unzugeordneten Proben (*F. spec.* 2), die vermutlich der gleichen Spezies angehören.

4. Einige der in diese Untersuchung einbezogenen, bisher noch keiner Art zugeordneten Taxa ließen sich z. T. in die entstandenen Artengruppen einordnen oder aufgrund ihrer distinkten Position in den Dendrogrammen vermuten, dass es sich um neue Arten handelt.
5. Für die vergleichende DNA-Sequenzierung wurde zunächst die Eignung von 18 verschiedenen Chloroplasten- und acht verschiedener Mitochondrien-DNA-Regionen getestet. Mit 14 Chloroplasten- und sechs Mitochondrienprimerpaaren konnten PCR-Amplifikate erzeugt werden, die auf Agarosegelen distinkte Banden lieferten. Zur Überprüfung der Sequenzvariabilität wurden drei Chloroplasten- und sechs Mitochondrienloci für ein kleines Probenstet sequenziert. Die Bereiche *atpB-rbcL*, *psbB-psbH* und *rps16*-Intron wurden für die vergleichende Sequenzierung der Chloroplasten-DNA als geeignet befunden, während alle untersuchten Mitochondrien-Loci eine so geringe Sequenzvariabilität aufwiesen, dass sie nicht weiter in Betracht gezogen wurden.
6. Die drei Chloroplastenloci wurden mit 61 Akzessionen aus 24 der bisher 30 beschriebenen *Fosterella*-Arten sowie 44 Akzessionen aus sechs der acht Unterfamilien (nach Givnish *et al.* im Druck) sowohl einzeln, als auch kombiniert ausgewertet. Dabei ergab sich eine Gesamtzahl von 2488 auswertbaren Merkmalen. Die Merkmalsmatrix wurde sowohl mit einem Distanzverfahren, als auch mit Maximum Parsimonie-, Maximum Likelihood- und Bayes'schen-Methoden analysiert und in Form von Dendrogrammen dargestellt. Die mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Baumtopologien waren weitgehend kongruent.
7. Es konnte gezeigt werden, dass die Gattung *Fosterella* monophyletisch ist. Zudem besteht eine sehr gut gestützte Schwestergruppenbeziehung der Gattung zu einer Gruppe aus den Gattungen *Dyckia*, *Encholirium* und *Deuterocohnia*. Die in Givnish *et al.* (im Druck) gezeigte Einordnung von *Fosterella* in die Pitcairnioideae s. str. wurde ebenfalls bestätigt.
8. Die cpDNA-Bäume ließen insgesamt 14 Artengruppen erkennen, von denen sieben auf die Gattung *Fosterella* entfielen. Basal lässt sich die Gattung in zwei Linien einteilen, von denen eine auf die *F. penduliflora*-Gruppe entfällt und die andere alle anderen sechs Gruppen vereint. Dabei lässt sich erneut eine deutliche Abgrenzung der *weddelliana*-Gruppe zeigen. Die Gruppen I bis V stehen in einer Polytomie, in der sich die Gruppen I und II und IV und V jeweils eine Linie teilen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass sich der Großteil der bisher beschriebenen 30 *Fosterella*-Arten auch molekular voneinander abgrenzen lassen, also genetisch distinkte Taxa (Monophyla) darstellen. Die meisten Spezies lassen sich Artengruppen zuordnen, innerhalb derer die Verwandtschaft allerdings z. T. ungeklärt bleibt (z. B. *F. vasquezii*, *F. windischii* und *F. yuvinkae*). Diese Speziesgruppen bilden monophyletische Linien mit unterschiedlicher statistischer Unterstützung. Einige bisher nur morphologisch definierte Taxa zeigen eine enorme genetische Variabilität (z. B. *F. albicans* und *F. villosula*).

9. Die Beziehungen zwischen den einzelnen Gruppen der Gattung *Fosterella* sind nur wenig aufgelöst. Gut gestützt sind die Schwestergruppenbeziehungen zwischen *F. weberbaueri* und einer Gruppe aus *F. villosula*/*F. robertreadii* und *F. micrantha*, zwischen der Gruppe aus *F. vasquezii*, *F. windischii*, *F. yuvinkae* und *F. rusbyi*, sowie diesen gemeinsam zu *F. spectabilis* und zwischen der Gruppe aus *F. rexiae*, *F. caulescens* und *F. albicans* zu *F. schidosperma/graminea*.

Die Ergebnisse der beiden in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Techniken sind weitgehend kongruent und für die Verwandtschaftsanalyse der Gattung *Fosterella* als geeignet einzustufen. Die Auflösung der AFLP-Bäume deutet allerdings auf eine noch bessere Nützlichkeit für die Untersuchung innerhalb der einzelnen Artengruppen hin, während die vergleichende Sequenzierung durch Ergänzung weiterer Regionen relativ klare Strukturen innerhalb der Gattung *Fosterella* erkennen lässt (vgl. Rex *et al.* 2006).

6 Ausblick

Aufgrund der zahlreichen Neubeschreibungen und Synonymisierungen verschiedener *Fosterella*-Arten wird derzeit eine Revision der Gattung angestrebt. Zu diesem Zweck werden neben den hier vorliegenden molekularen Ergebnissen, die bereits durch Sequenzdaten eines weiteren cpDNA-Markers (*matK*) ergänzt wurden, ausführliche taxonomische, anatomische, morphologische und biogeographische Untersuchungen angestellt, die im Rahmen der Dissertation von Frau Jule Peters in der Arbeitsgruppe Systematik und Morphologie der Pflanzen des Fachbereichs Naturwissenschaften der Universität Kassel stattfinden.

Morphologische, anatomische und biogeographische Merkmale werden derzeit auf die molekularen Bäume kartiert, um ihre Entstehung innerhalb der Gattung zu verfolgen und „gute“, Merkmale zur Unterscheidung der Arten und Artengruppen zu finden. Diese Arbeiten sollten helfen, die angestrebte Revision voranzutreiben und einen Bestimmungsschlüssel für die Gattung *Fosterella* zu erstellen.

Populationsgenetische Untersuchungen der Gattung *Fosterella* sollen weiteren Aufschluss über die Ausbreitungsgeschichte und Evolution erbringen.

Durch die Verknüpfung von molekularer Phylogenie, Morphologie und Biogeographie werden weitreichende Erkenntnisse über die Evolution der Gattung *Fosterella* erwartet.

7 Literaturverzeichnis

- APG-Angiosperm Phylogeny Group (2003):** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 399-436.
- Archibald, J. K., Mort, M. E. und Crawford, D. J. (2003):** Bayesian inference of phylogeny: a non-technical primer. *Taxon*, 52: 187-191.
- Avise, J. C. (1994):** Molekular Markers, Natural History and Evolution, *Chapman & Hall*, New York, London.
- Azuma, H., Thien, L. B. und Kawano, S. (1999):** Molecular phylogeny of *Magnolia* (Magnoliaceae) inferred from cpDNA sequences and evolutionary divergence of the floral scents. *J. Plant Res.* 112(1107): 291-306.
- Baldwin, B. G. und Markos, S. (1998):** Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Mol. Phyl. Evol.* 10(3): 449-463.
- Bänfer, G., Fiala, B. und Weising, K. (2004):** AFLP analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic species of *Macaranga* (Euphorbiaceae) and their allies. *Plant Syst. Evol.* 249(3-4): 213-231.
- Barfuss, M. H. J., Samuel, M. R. und Till, W. (2004):** Molecular phylogeny in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on six cpDNA markers: an update. *J. Brom. Soc.* 54(1): 8-17.
- Barfuss, M. H. J., Samuel, R., Till, W. und Stuessy, T. F. (2005a):** Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *Am. J. Bot.* 92(2): 337-351.
- Barfuss, M. H. J., Till, W. und Samuel, M. R. (2005b):** Phylogenetics of subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae): a comparison of plastid and nuclear DNA sequences with morphological data. *XVII International Botanical Congress 2005*, Wien, Tagungsband.: 150.
- Baum, D. A., Sytsma, K. J. und Hoch, P. C. (1994):** A phylogenetic analysis of *Epilobium* (Onagraceae) based on nuclear ribosomal DNA-sequences. *Syst. Bot.* 19(3): 363-388.
- Beaumont, M. A. und Rannala, B. (2004):** The Bayesian revolution in genetics. *Nat. Rev. Genet.* 5(4): 251-261.
- Benzing, D. H. (2000):** Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Bergthorsson, U., Adams, K. L., Thomason, B. und Palmer, J. D. (2003):** Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. *Nature* 424(6945): 197-201.
- Birky, C. W. (1995):** Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 92(25): 11331-8.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. und Davis, R. W. (1980):** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.

- Brauer, I. (2006):** Charakterisierung von Mikrosatelliten-DNA-Markern in der Gattung *Fosterella* (Bromeliaceae). *Wissenschaftliche Hausarbeit zur ersten Staatsexamensprüfung für das Lehramt an Gymnasien, Systematik und Morphologie der Pflanzen*, FB 18, Naturwissenschaften, Universität Kassel, Kassel
- Bray, J. R. und Curtis, J. T. (1957):** An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monographs* 27: 325-349.
- Bremer, K. (1988):** The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- Brouat, C., McKey, D. und Douzery, E. J. P. (2004):** Differentiation in a geographical mosaic of plants coevolving with ants: phylogeny of the *Leonardoxa africana* complex (Fabaceae: Caesalpinioideae) using amplified fragment length polymorphism markers. *Mol. Ecol.* 13(5): 1157-1171.
- Brown, G. K. und Gilmartin, A. J. (1984):** Stigma structure and variation in Bromeliaceae - neglected taxonomic characters. *Brittonia* 36: 364-374.
- Bussell, J. D., Waycott, M. und Chappill, J. A. (2005):** Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 7(1): 3-26.
- Cervera, M. T., Storme, V., Soto, A., Ivens, B., Van Montagu, M., Rajora, O. P. und Boerjan, W. (2005):** Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1440-1456.
- Chase, M. W. (2004):** Monocot relationship: an overview. *Am. J. Bot.* 91(10): 1645-1655.
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Rudall, P. J., Fay, M. F., Hahn, W. H., Sullivan, S., Joseph, J., Molvray, M., Kores, P. J., Givnish, T. J., Sytsma, K. J. und Pires, J. C. (2000):** Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. *Proceedings of the 2nd International Monocot Symposium*. In: Wilson, K. L. und Morrison, D. A., CSRIO, Melbourne: 3-16.
- Chaw, S. M., Parkinson, C. L., Cheng, Y. C., Vincent, T. M. und Palmer, J. D. (2000):** Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97(8): 4086-4091.
- Cho, Y., Mower, J. P., Qiu, Y. L. und Palmer, J. D. (2004):** Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(51): 17741-17746.
- Clark, W. D., Gaut, B. S., Duvall, M. R. und Clegg, M. T. (1993):** Phylogenetic relationships of the Bromeliiflorae-Commeliniflorae-Zingiberiflorae complex of monocots based on *rbcl* sequence comparisons. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 80: 987-998.
- Clegg, M. T. und Zurawski, G. (1992):** Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. In: Soltis, D. E., Solts, P. S. und Doyle, J.: *Molecular Systematics of plants*. *Chapman and Hall*. New York, Oxford: 1-13.
- Crayn, D. M. und Quinn, C. J. (2000b):** The evolution of the *atp* beta-*rbcl* intergenic spacer in the epacrids (Ericales) and its systematic and evolutionary implications. *Mol. Phyl. Evol.* 16(2): 238-252.

- Crayn, D. M., Terry, R. G., Smith, J. A. C. und Winter, K. (2000a).** Molecular systematic investigations in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) as a basis for understanding the evolution of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). In: Wilson, K. L. und Morrison, D. A.: *Monocots: Systematics and Evolution*, CSIRO, Melbourne: 569-579.
- Crayn, D. M., Winter, K. und Smith, J. A. C. (2004):** Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the neotropical family Bromeliaceae. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 101(10): 3703-3708.
- Cummings, M., Nugent, J., Olmstead, R. und Palmer, J. (2003):** Phylogenetic analysis reveals five independent transfers of the chloroplast gene *rbcl* to the mitochondrial genome in angiosperms. *Curr. Genet.* 43(2): 131-138.
- Dahlgren, R. M. T., Clifford, H. T. und Yeo, P. F. (1985):** The families of the Monocotyledons. *Springer Verlag*, Berlin.
- Davis, J., Stevenson, D., Petersen, G., Seberg, O., Campbell, L., Freudenstein, J., Goldman, D., Hardy, C., Michelangeli, F., Simmons, M., Specht, C., Vergara-Silva, F. und Gandolfo, M. (2004):** A phylogeny of the monocots, as inferred from *rbcl* and *atpA* sequence variation, and a comparison of methods for calculating jackknife and bootstrap values. *Syst. Bot.* 29(3): 467-510.
- Debener, T. und Mattiesch, L. (1999):** Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99(5): 891-899.
- Demesure, B., Sodji, N. und Petit, R. J. (1995):** A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4(1): 129-131.
- Després, L., Gielly, L., Redoutet, B. und Taberlet, P. (2003):** Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Mol. Phyl. Evol.* 27: 185-196.
- Dice, L. R. (1945):** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. und Mattick, J. S. (1991):** "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl. Acids Res.* 19: 4008.
- Duminil, J., Pemonge, M. und Petit, R. (2002):** A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Mol. Ecol. Notes* 2(4): 428-430.
- Dumolin-Lapègue, S., Pemonge, M.-H. und Petit, R. J. (1997):** An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Mol. Ecol.* 6: 393-397.
- Duval, M. F., Buso, G. S., Ferreira, F. R., Noyer, J. L., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Hamon, P. und Ferreira, M. E. (2003):** Relationships in *Ananas* and other related genera using chloroplast DNA restriction site variation. *Genome* 46(6): 990-1004.
- Edwards, A. W. F. und Cavalli-Sforza, L. L. (1963):** The reconstruction of evolution. *Ann. Hum. Genet.* 27: 104-105.
- Ems, S. C., Morden, C. W., Dixon, K. W., Wolfe, K. H., De Pamphilis, C. W. und Palmer, J. D. (1995):** Transcription, splicing, and editing of plastid RNAs in nonphotosynthetic plant *Epifagus virginiana*. *Plant Mol. Biol.* 29: 721-733.

- Fang, D. Q. und Roose, M. L. (1997):** Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95(3): 408-417.
- Farris, J. S. (1989a):** The retention index and homoplasy excess. *Syst. Zool.* 38: 406-407.
- Farris, J. S. (1989b):** The retentions index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- Fartmann, B., Nikoleit, K. und Rehfeldt, K. (1999):** Sequencing brochure by MWG-Biotech AG - Instructions for DNA template preparation, primer design and sequencing with LI-COR DNA Sequencer 4000 and 4200 series. 4: 8.
- Felsenstein, J. (1978):** Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27(4): 401-410.
- Felsenstein, J. (1984):** Distance methods for inferring phylogenies: a justification. *Evolution* 38: 16-24.
- Felsenstein, J. (1985):** Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D. und Storts, D. (1998):** Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega Notes* 65: 27-30.
- Gaut, B. S., Clark, L. G., Wendel, J. F. und Muse, S. V. (1997):** Comparisons of the molecular evolutionary process at *rbcl* and *ndhF* in the grass family (Poaceae). *Mol. Biol. Evol.* 14(7): 769-777.
- Gilmartin, A. J. und Brown, G. K. (1987):** Bromeliales, related monocots, and resolution of relationships among Bromeliaceae subfamilies. *Syst. Bot.* 12(4): 493-500.
- Giribet, G. und Wheeler, W. (1999):** On gaps. *Mol. Phyl. Evol.* 13(1): 132-143.
- Givnish, T. J., Sytsma, K. J., Smith, J. F., Hahn, W. J., Benzing, D. H. und Burkhardt, E. M. (1997).** Molecular Evolution and Adaptive Radiation in *Brocchinia* (Bromeliaceae: Pitcairnioideae) atop tepuis of the Guayana Shield. In: Givnish, T. J. und Sytsma, K. J.: Molecular evolution and adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge: 259-311
- Givnish, T. J., Evans, T. M., Pires, J. C. und Sytsma, K. J. (1999):** Polyphyly and convergent morphological evolution in Commelinales and Commelinidae: evidence from *rbcl* sequence data. *Mol. Phyl. Evol.* 12(3): 360-385.
- Givnish, T. J., Millam, K. C., Evans, T. M., Hall, J. C., Pires, J. C., Berry, P. E. und Sytsma, K. J. (2004):** Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *Int. J. Plant Sci.* 165(4): 35-S54.
- Givnish, T. J., Pires, J. C., Graham, S. W., McPherson, M. A., Prince, L. M., Patterson, T. B., Rai, H. S., Roalson, E. H., Evans, T. M., Hahn, W. J., Millam, K. C., Meerow, A. W., Molvray, M., Kores, P. J., O'Brien, H. E., Hall, J. C., Kress, W. J. und Sytsma, K. J. (2005):** Repeated evolution of net venation and fleshy fruits among monocots in shaded habitats confirms a priori predictions: evidence from an *ndhF* phylogeny. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 272(1571): 1481-1490.

- Givnish, T. J., Millam, K. C., Evans, T. M., Pires, J. C., Berry, P. E. und Sytsma, K. J. (im Druck):** Phylogeny, biogeography and ecological evolution of Bromeliaceae – insights from *ndhF* sequences. In: Columbus, J. T., Frair, E. A., Hamilton, C. W., Porter, J. M., Simpson, M. G.: Monocots: comparative biology and evolution. Monocots II, Rancho Santa Botanic Garden, Claremont, Californien.
- Golenberg, E. M., Clegg, M. T., Durbin, M. L., Doebley, J. und Ma, D. P. (1993):** Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2(1): 52-64.
- Gower, J. C. (1966):** Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-338.
- Graham, S., Olmstead, R. und Barrett, S. (2002):** Rooting phylogenetic trees with distant outgroups: A case study from the commelinoid monocots. *Mol. Biol. Evol.* 19(10): 1769-1781.
- Graybeal, A. (1998):** Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Syst. Biol.* 47(1): 9-17.
- Gupta, M., Chyi, Y.-S., Romero-Severson, J. und Owen, J. L. (1994):** Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998-1006.
- Halbritter, H. (1992):** Morphologie und systematische Bedeutung des Pollens der Bromeliaceae. *Grana* 31: 197-212.
- Hamilton, M. B., Braverman, J. M. und Soria-Hernenz, D. F. (2003):** Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new world species of the Lecythidaceae. *Mol. Biol. Evol.* 20(10): 1710-1721.
- Hansen, M., Kraft, T., Christiansson, M. und Nilsson, N. O. (1999):** Evaluation of AFLP in *Beta*. *Theor. Appl. Genet.* 98(6-7): 845-852.
- Harris, S. A. (1999):** RAPDs in systematics - a useful methodology? *Taylor and Francis*, London.
- Hasegawa, M., Kishino, H. und Yano, T. (1985):** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160-174.
- Hastings, W. K. (1970):** Monte-Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 57: 97-109.
- Hillis, D. M. und Bull, J. J. (1993):** An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42: 182-192.
- Hillis, D. M., Mable, B. K., Larson, A., Davis, S. K. und Zimmer, E. A. (1996):** Nucleic acids IV: sequencing and cloning. 2. Edition, *Sinauer*, Sunderland.
- Hilu, K. W., Borsch, T., Müller, K., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Savolainen, V., Chase, M. W., Powell, M. P., Alice, L. A., Evans, R., Sauquet, H., Neinhuis, C., Slotta, T. A. B., Rohwer, J. G., Campbell, C. S. und Chatrou, L. W. (2003):** Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *Am. J. Bot.* 90(12): 1758-1776.
- Hilu, K. W. und Liang, H. P. (1997):** The *matK* gene: Sequence variation and application in plant systematics. *Am. J. Bot.* 84(6): 830-839.

- Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Ishibashi, T., Sakomoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C. R., Meng, B. Y., Li, Y. Q., NKano, A., Nishizawa, Y., Hirai, A., Shinozaki, K. und Sugiura, M. (1989):** The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217: 185-194.
- Hodkinson, T., Renvoize, S., Ni Chonghaile, G., Stapleton, C. und Chase, M. (2000):** A comparison of ITS nuclear rDNA sequence data and AFLP markers for phylogenetic studies in *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae). *J. Plant Res.* 113(1111): 259-269.
- Horres, R. und Zizka, G. (1995):** Untersuchungen zur Blattsukkulenz bei Bromeliaceae. *Beitr. Biol. Pflanz.* 69: 43-76.
- Horres, R., Zizka, G., Kahl, G. und Weising, K. (2000):** Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: Evidence from *trnL*(UAA) intron sequences of the chloroplast genome. *Plant Biol.* 2(3): 306-315.
- Horres, R., Schulte, K., Weising, K. und Zizka, G. (im Druck):** Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - evidence from molecular and anatomical studies. *Monocots III Aliso* 23: 27-43.
- Huang, J. C., Wang, W. K., Peng, C. I. und Chiang, T. Y. (2005):** Phylogeography and conservation genetics of *Hygrophila pogonocalyx* (Acanthaceae) based on *atpB-rbcL* noncoding spacer cpDNA. *J. Plant Res.* 118(1): 1-11.
- Huelsenbeck, J. P. und Hillis, D. M. (1993):** Success of phylogenetic methods in the fourtaxon case. *Syst. Biol.* 42: 247-264.
- Huelsenbeck, J. P. (1995a):** The robustness of 2 phylogenetic methodes- 4-Taxon simulations reveal a slight superiority of maximum-likelihood over neighbor joining. *Mol. Biol. Evol.* 12(5): 843-849.
- Huelsenbeck, J. P. (1995b):** The performance of phylogenetic methods in simulation. *Syst. Biol.* 44(1): 17-48.
- Huelsenbeck, J. P. und Bollback, J. P. (2001a):** Empirical and hierarchical Bayesian estimation of ancestral states. *Syst. Biol.* 50(3): 351-366.
- Huelsenbeck, J. P. und Ronquist, F. (2001b):** MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-755.
- Ibisch, P. L. (1999):** More novelties of *Fosterella* L. B. Smith (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) from Bolivia. *Revista de la Sociedad Boliviana de Botánica* 2(2): 117-132.
- Ibisch, P. L., Gross, E., Rauer, G. und Rudolph, D. (1997):** On the diversity and biogeography of genus *Fosterella* L. B. Smith (Bromeliaceae). With the description of a new species from eastern Bolivia. *J. Brom. Society.* 211-217.
- Ibisch, P. L., Vásquez, R., Gross, E., Krömer, T. und Rex, M. (2002):** Novelties in Bolivian *Fosterella* (Bromeliaceae). *Selbyana.* 23(2): 204-219
- Ibisch, P. L., Peters, J., Rex, M., Schulte, K., Osinaga, A. und Vasquez, R. (2006):** Die Bromelien Boliviens (V): *Fosterella gracilis* (Rusby) L.B. Smith. *Die Bromelie* 2: 40-45.

- Jaccard, P. (1908):** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44: 223-270.
- Janssens, S., Geuten, K., Yuan, Y. M., Song, Y., Küpfer, P. und Smets, E. (2006):** Phylogenetics of *Impatiens* and *Hydrocera* (Balsaminaceae) using chloroplast *atpB-rbcL* spacer sequences. *Syst. Bot.* 31(1): 171-180.
- Johnson, L. A. und Soltis, D. E. (1994):** *MatK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Syst. Bot.* 19: 143-156.
- Johnson, L. A. und Soltis, D. E. (1995):** Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* sequences. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 82: 149-175.
- Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matther, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Ruada, J., Linacero, R., Vazquez, A. und Karp, A. (1997):** Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding* 3: 381-390.
- Jukes, T. H. und Cantor, C. R. (1969):** Evolution of protein molecules. In: Munro, M. N.: Mammalian protein metabolism. Band 3, *Academic Press*, New York: 21-132.
- Kardolus, J. P., van Eck, H. J. und van den Berg, R. G. (1998):** The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 210: 87-103.
- Kawakita, A., Sota, T., Ascher, J., Ito, M., Tanaka, H. und Kato, M. (2003):** Evolution and phylogenetic utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). *Mol. Biol. Evol.* 20(1): 87-92.
- Kessler, M., Ibsch, P. L. und Gross, E. (1999):** *Fosterella cotacajensis*, una nueva especie de Bromeliaceae de los valles secos andinos de Bolivia. *Revista de la Sociedad Boliviana de Botánica* 2(2): 111-116.
- Kessler, M. und Krömer, T. (2000):** Patterns and ecological correlates of pollination modes among bromeliad communities of andean forests in Bolivia. *Plant Biol.* 2: 659-669.
- Kimura, M. (1980):** A simple method of estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Klak, C., Khunou, A., Reeves, G. und Hedderson, T. (2003):** A phylogenetic hypothesis for the Aizaceae (Caryophyllaceae) based on four plastid DNA regions. *Am. J. Bot.* 90(10): 1433-1445.
- Knippers, R. (2001):** Molekulare Genetik. 8. Auflage, *Georg-Thieme-Verlag*, Stuttgart.
- Knoop, V. und Müller, K. (2006):** Gene und Stammbäume - Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik. *Spektrum Akademischer Verlag*, München, Heidelberg.
- Koopman, W. J., Zevenberg, M. J. und Van den Berg, R. G. (2001):** Species relationships in *Lactuca* s.l. (Lactucaceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. *Am. J. Bot.* 88: 1881-1887.
- Kubo, N., Salomon, B., Komatsuda, T., von Bothmer, R. und Kadowaki, K. (2005):** Structural and distributional variation of mitochondrial *rps2* genes in the tribe Triticeae (Poaceae). *Theor. Appl. Genet.* 110: 995-1002.

- Lanave, C. G., Preparata, G., Saccone, C. und Serio, G. (1984):** A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20: 86-93.
- Lloyd, D. G. und Calder, V. L. (1991):** Multi-residue gaps, a class of molecular characters with exceptional reliability for phylogenetic analyses. *J. Evol. Biol.* 4: 9-21.
- Lundberg, J. G. (1972):** Wagner networks and ancestors. *Syst. Zool.* 21(4): 398-413.
- Luther, H. E. (1981):** Miscellaneous new taxa of Bromeliaceae. *Selbyana*: 5 310-311.
- Luther, H. E. (1997):** A showy new *Fosterella* from Bolivia. *J. Brom. Soc.* 47(3): 118-119.
- Luther, H. E. (2002):** An alphabetical list of bromeliad binomials. *Bromeliad Society International* 8.
- Mace, E. S., Lester, R. N. und Gebhardt, C. G. (1999):** AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae). *Theor. Appl. Genet.* 99(3-4): 626-633.
- Macherey-Nagel GmbH und CoKG (2005):** Protocol for DNA extraction from agarose gels. *PCR clean-up Gel extraction User manual Nucleospin® Extract II*: 12-13.
- Manen, D., Xia, G. X. und Caro, L. (1994):** A locus involved in the regulation of replication in plasmid PSC 101. *Mol. Microbiol.* 11(5): 875-884.
- Manen, J. F., Natali, A. und Ehrendorfer, F. (1994b):** Phylogeny of Rubiaceae-Rubieae inferred from the sequence of a cpDNA intergene region. *Plant Syst. Evol.* 190(3-4): 195-211.
- Manen, J. F., Savolainen, V. und Simon, P. (1994a):** The *atpB* and *rbcl* promoters in plasmid DNAs of a wide dicot range. *J. Mol. Evol.* 38(6): 577-582.
- Marienfeld, J., Unseld, M. und Brennicke, A. (1999):** The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends in Plant Science* 4(12): 495-502.
- Martin, C. E. (1994):** Physiological Ecology of the Bromeliaceae. *Bot. Rev.* 60: 1-82.
- Martin, W., Deusch, O., Stawski, N., Grunheit, N. und Goremykin, V. (2005):** Chloroplast genome phylogenetics: why we need independent approaches to plant molecular evolution. *Trends Pl. Sci.* 10(5): 203-209.
- Mengoni, A., Ruggini, C., Vendramin, G. G. und Bazzicalupo, M. (2000):** Chloroplast microsatellite variations in tetraploid alfalfa. *Plant Breeding*(119): 509-512.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H. und Teller, E. (1953):** Equation of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.* 21: 1087-1092.
- Michaels, S. D., John, M. C. und Amasino, R. M. (1994):** Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques* 17(2): 274-276.
- Michelangeli, F., Davis, J. und Stevenson, D. (2003):** Phylogenetic relationships among Poaceae and related families as inferred from morphology, inversions in the plastid genome, and sequence data from the mitochondrial and plastid genomes. *Am. J. Bot.* 90(1): 93-106.

- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. und Waugh, R. (1997):** Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated *potato*. *Mol. Breeding* 3(2): 127-136.
- Mort, M., Soltis, P., Soltis, D. und Mabry, M. (2000):** Comparison of three methods for estimating internal support on phylogenetic trees. *Syst. Biol.* 49(1): 160-171.
- Mueller, U. G. und Wolfenbarger, L. L. (1999):** AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14(10): 389-394.
- Müller, J., Friedl, T., Hepperle, D., Lorenz, M. und Day, J. G. (2005):** Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and ITS rDNA sequences. *J. Phycol.* 41: 1236-1247.
- Müller, K. (2005):** Incorporating information from length-mutational events into phylogenetic analysis. *Mol. Phyl. Evol.* 38: 667-676.
- Murray, V. (1989):** Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* 17: 8889.
- Myburg, A. A., Remington, D. L., O'Malley, D. M., Sederoff, R. R. und Whetten, R. W. (2001):** High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automated DNA sequencer. *Biotechnics* 30(2): 348-357.
- Natali, A., Manen, J. F. und Ehrendorfer, F. (1995):** Phylogeny of the Rubiaceae-Rubioideae, in particular the tribe Rubieae: evidence from a noncoding chloroplast DNA sequence. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 82: 428-439.
- Nei, M. und Li, W.-H. (1979):** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76(10): 5269-5273.
- Nei, M. (1996):** Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Ann. Rev. Genet.* 30: 371-403.
- Neuhaus, H. und Link, G. (1987):** The chloroplast tRNA^{Lys} (UUU) gene from mustard (*Sinapsis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase related polypeptide. *Curr. Genet.* 11: 251-257.
- Nishikawa, T., Vaughan, D. A. und Kadowaki, K. (2005):** Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes. *Theor. Appl. Genet.* 110: 696-705.
- O'Hanlon, P. C. und Peakall, R. (2000):** A simple method for the detection of size homoplasy among amplified fragment length polymorphism fragments. *Mol. Ecol.* 9: 815-816.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesons, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. und Ozeki, H. (1986):** Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.
- Oxelman, B., Lidén, M. und Berglund, D. (1997):** Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Syst. Evol.* 206: 393-410.

- Palmer, J. D. (1992):** Mitochondrial DNA in plants systematics: applications and limitations. In: Soltis, P. S., Soltis, D. E., Doyle, J. E.: Molecular systematics of plants. *Chapman and Hall*, New York: 36-49.
- Patzold, K. (2005):** Blattanatomische Untersuchungen zur Systematik der Gattung *Fosterella* (Bromeliaceae). *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie und Informatik, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Frankfurt/Main.
- Pelser, P. B., Gravendeel, B. und van der Meijden, R. (2003):** Phylogeny reconstruction in the gap between too little and too much divergence: the closest relatives of *Senecio jacobaea* (Asteraceae) according to DNA sequences and AFLPs. *Mol. Phyl. Evol.* 29: 613-628.
- Perret, M., Chautems, A., Spichiger, R., Kite, G. und Savolainen, V. (2003):** Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): evidence from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear NCPGS. *Am. J. Bot.* 90(3): 445-460.
- Peters, J., Ibsch, P. L., Vasquez, R., Osinaga, A., Leme, E., Rex, M. und Weising, K. (in Vorbereitung):** Toward a taxonomic revision of the genus *Fosterella*.
- Peters, J. L., Constandt, H., Neyt, P., Cnops, G., Zethof, J., Zabeau, M. und Gerats, T. (2001):** A physical amplified fragment-length polymorphism map of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127(4): 1579-1589.
- Pierce, S., Maxwell, K., Griffiths, H. und Winter, K. (2001):** Hydrophobic trichome layers and epicuticular wax powders in Bromeliaceae. *Am. J. Bot.* 88(8): 1371-1389.
- Poe, S. (1998):** Sensitivity of phylogeny estimation to taxonomic sampling. *Syst. Biol.* 47(1): 18-31.
- Porembski, S. und Barthlott, W. (1999):** *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. *Harvard Papers Bot.* 4: 175-184.
- Posada, D. und Crandall, K. A. (1998):** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- Qiagen GmbH (2000):** Protocol for Isolation of DNA from Plant Tissue with the DNeasy Plant Mini Kit. *DNeasy Plant Mini Kit and DNeasy Plant Maxi Kit Handbook*.
- Qiagen GmbH (2003):** MinElute Gel Extraction Kit Protocol using a microcentrifuge. *MinElute™ Handbook for MinElute Gel Extraction Kit*: 19.
- Qiu, Y. L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Zanis, M., Zimmer, E. A., Chen, Z., Savolainen, V. und Chase, M. W. (2000):** Phylogeny of basal angiosperms: Analyses of five genes from three genomes. *Int. J. Plant Sci.* 161: 3-27.
- Quenouille, M. H. (1956):** Notes on bias in estimation. *Biometrika* 43: 353-360.
- Ramser, J., LopezPeralta, C., Wetzel, R., Weising, K. und Kahl, G. (1996):** Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 39(1): 17-25.
- Ranker, T. A., Soltis, D. E., Soltis, P. S. und Gilmartin, A. J. (1990):** Subfamilial phylogenetic relationships of the Bromeliaceae: evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *Syst. Bot.* 15(3): 425-434.

- Rannala, B. und Yang, Z. (1996):** Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 43(3): 304-11.
- Rauh, W. (1979):** Bromelienstudien I. Neue und wenig bekannte Arten aus Peru und anderen Ländern. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 31: 22-29.
- Rauh, W. (1987):** *Fosterella heterophylla*. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 60: 24 -27.
- Reboud, X. und Zeyl, C. (1994):** Organelle inheritance in plants. *Heredity* 72: 132-140.
- Reinert, F., Russo, C. A. M. und Salles, L. O. (2003):** The evolution of CAM in the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Biol. J. Linnean Soc.* 80: 261-268.
- Renner, S. S. (2004):** Bayesian analysis of combined chloroplast loci, using multiple calibrations, supports the recent arrival of Melastomataceae in Africa and Madagascar¹. *Am. J. Bot.* 91(9).
- Rex, M. (2001):** Molekulare Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen in ausgewählten Gattungen der Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Diplomarbeit*, Systematik und Morphologie der Pflanzen, Fachbereich 18, Naturwissenschaften, Universität Kassel, Kassel.
- Rex, M., Patzolt, K., Schulte, K., Zizka, G., Vasquez, R., Ibisch, P. L. und Weising, K. (2007):** AFLP analysis of genetic relationships in the genus *Fosterella* L.B. Smith (Pitcairnioideae, Bromeliaceae). *Genome* 50(1): 90-105.
- Rex, M., Schulte, K., Patzolt, K., Ibisch, P. L., Vasquez, R., Zizka, G. und Weising, K. (2006):** Chloroplast phylogeny of the genus *Fosterella* (Bromeliaceae). Poster: *17th International Symposium Biodiversity and Evolutionary Biology of the German Botanical Society*. Bonn.
- Rieseberg, L. H. (1996):** Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol. Ecol.* 5: 99-105.
- Rohlf, F. J. (2000):** NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1., Exeter Software, Setauker, New York.
- Ronquist, F. und Huelsenbeck, J. P. (2003):** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12): 1572-4.
- Rosenberg, M. und Kumar, S. (2001a):** Traditional phylogenetic reconstruction methods reconstruct shallow and deep evolutionary relationships equally well. *Mol. Biol. Evol.* 18(9): 1823-1827.
- Rosenberg, M. und Kumar, S. (2001b):** Incomplete taxon sampling is not a problem for phylogenetic inference. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98(19): 10751-10756.
- Rosendahl, S. und Taylor, J. (1997):** Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP(TM). *Mol. Ecol.* 6(9): 821-829.
- Roupe van der Voort, J. N. A. M., Van Zandvoort, P. M., VAn Eck, H. J., Folkertsma, R. T., Hutten, R. C. B., Draaistra, J., Gommers, F. J., Jacobsen, E., Helder, J. und Bakker, J. (1997):** Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* 255: 438-447.

- Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. und Allard, R. W. (1984):** Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 81: 8014-8018.
- Saitou, N. und Nei, M. (1987):** The neighbor-joining method: A new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001):** Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 3rd Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- Sang, T., Crawford, D. J. und Stuessy, T. F. (1997):** Chloroplast DNA phylogeny reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 84(8): 1120-1136.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* 74: 5463-5467.
- Savolainen, V., Manen, J. F., Douzery, E. J. P. und Spichiger, R. (1994):** Molecular phylogeny of families related to *Celastrales* based on 5' flanking sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 3: 27-37.
- Scanalytics, I. (1990-1998):** GenImage IR 4.05 for Windows. Genotyping and DNA Fragment Analysis Software.
- Schulte, K., Horres, R. und Zizka, G. (2005):** Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family (Poales, Bromeliaceae). *Senckenbergiana Biol.* 85: 113-125.
- Schulte, K. und Zizka, G. (2006):** Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) including nuclear DNA sequence data and its implications on character evolution. Vortrag: *17th International Symposium: Biodiversity and Evolutionary Biology*. 77.
- Schütze, P., Freitag, H. und Weising, K. (2003):** An integrated molecular and morphological study of the subfamily Suaedoideae Ulbr. (Chenopodiaceae). *Plant Syst. Evol.* 239: 257-286.
- Schwarz, G., Herz, M., Huang, X. Q., Michalek, W., Jahoor, A., Wenzel, G. und Mohler, V. (2000):** Application of fluorescence based semi-automated AFLP analysis in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100(3-4): 545-551.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W. S., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E. und Small, R. L. (2005):** The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92(1): 142-166.
- Shaw, J. und Randall, L. S. (2004):** Addressing the "Hardest puzzle in american pomology:" Phylogeny of *Prunus* Sect. *Prunocerasus* (Rosaceae) based on seven noncoding chloroplast DNA regions. *Am. J. Bot.* 96(6): 985-996.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. und Sugiura, M. (1986):** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5(9): 2043-2049.

- Simmons, M. P. und Ochoterena, H. (2000):** Gaps and characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 49: 369-381.
- Simpson, M. G. (2006):** Plant Systematics. 1st, *Dana Dreibelbis, Elsevier Academic Press*, Burlington, MA; San Diego, California; London, UK.
- Small, R. L., Lickey, E. B., Shaw, J. und Hauk, W. D. (2005):** Amplification of noncoding chloroplast DNA for phylogenetic studies in lycophytes and monilophytes with a comparative example of relative phylogenetic utility from Ophioglossaceae. *Mol. Phyl. Evol.* 36(3): 509-522.
- Smith, L. B. und Downs, R. J. (1974):** Flora Neotropica Monograph 14, Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Hafner Press*, New York: 199-209.
- Smith, L. B. und Read, R. W. (1992):** Flora Neotropica Monograph 14(1), suppl. No 3: *Fosterella. Bradea* 6 (15): 134-140.
- Smith, L. B. und Till, W. (1998).** Bromeliaceae. In: Kubitzki, K.: The families and genera of vascular plants. *Springer*, Berlin, Heidelberg, New York, 4: 74-99.
- Sneath, P. H. A. und Sokal, R. R. (1973):** Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification. *Freeman*, San Francisco.
- Sugiura, M. (1992):** The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19: 149-168.
- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. und Hillis, D. M. (1996).** Phylogenetic inference. In: Hillis, D. M., Moritz, C. und Mable, B. K.: Molecular Systematics. *Sinauer Associates*, Inc. Sunderland, Massachusetts USA.
- Swofford, D. L. (2001):** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), Version 4.0b10. *Sinauer Associates*. Sunderland, Massachusetts USA.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. und Bouvet, J. (1991):** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105-1109.
- Terry, R. G. und Brown, G. K. (1996):** A study of evolutionary relationships in Bromeliaceae based on comparison of DNA sequences from the chloroplast gene *ndhF*. *J. Brom. Soc.* 46: 107-112.
- Terry, R. G., Brown, G. K. und Olmstead, R. G. (1997):** Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *Am. J. Bot.* 84: 664-670.
- Turpeinen, T., Vanhala, T., Nevo, E. und Nissilä, E. (2003):** AFLP genetic polymorphism in wild barley (*Hordeum spontaneum*) populations in Israel. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1333-1339.
- Van de Peer, Y. und De Wachter, R. (1994):** TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 9: 569-570.
- Vanderpoorten, A., Goffinet, B., Hedenäs, L., Cox, C. J. und Shaw, A. J. (2003):** A taxonomic reassessment of the Vittaceae (Hypnales, Bryopsida): evidence from phylogenetic analyses of combined chloroplast and nuclear sequence data. *Plant Syst. Evol.* 241: 1-12.

- Varadarajan, G. S. und Gilmartin, A. J. (1988a):** Phylogenetic relationships of groups of genera within the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Syst. Bot.* 13(2): 283-293.
- Varadarajan, G. S. und Gilmartin, A. J. (1988b):** Taxonomic realignments within the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Syst. Bot.* 13: 294-299.
- Varadarajan, G. S. und Gilmartin, A. J. (1988c):** Seed morphology of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and its systematic implications. *Am. J. Bot.* 75(6): 808-818.
- Vinnersten, A. und Reeves, G. (2003):** Phylogenetic relationships within Colchicaceae. *Am. J. Bot.* 90(10): 1455-1462.
- Vogel, J., Hübschmann, T., Börner, T. und Hess, W. R. (1997):** Splicing and intron-internal RNA editing of *trnK-matK* transcripts in barley plastids: support for *matK* as an essential splice factor. *J. Mol. Biol.* 270: 179-187.
- Vogel, M., Banfer, G., Moog, U. und Weising, K. (2003):** Development and characterization of chloroplast microsatellite markers in *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Genome* 46(5): 845-857.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. und Zabeau, M. (1995):** AFLP - A new technique for DNA-Fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4407-4414.
- Wägele, J. W. (2001):** Grundlagen der Phylogenetischen Systematik. 2. Auflage. *Verlag Dr. Friedrich Pfeil*, München.
- Wallander, E. und Albert, V. A. (2000):** Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. *Am. J. Bot.* 87(12): 1827-1841.
- Weising, K., Atkinson, R. G. und Gardner, R. C. (1995a):** Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Methods Appl.* 4: 249-255.
- Weising, K. und Gardner, R. C. (1999):** A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. und Kahl, G. (2005):** DNA fingerprinting in plants principles, methods and applications., 2. Edition, *Taylor and Francis*, Boca Raton, London, New York, Singapore.
- Wheeler, W. C. (1996):** Optimization alignment: the end of multiple alignment in phylogenetics? *Cladistics* 12: 1-9.
- Widmer, A. und Baltisberger, M. (1999):** Extensive intraspecific chloroplast DNA (cpDNA) variation in the alpine *Draba aizoides* L. (Brassicaceae): haplotype relationships and population structure. *Mol. Ecol.* 8(9): 1405-1415.
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. und Tingey, S. V. (1993):** Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* 218: 704-740.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, J., Rafalski, J. A. und Tingey, S. V. (1990):** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.

Xu, D. H., Abe, J., Sakai, M., Kanazawa, A. und Shimamoto, Y. (2000): Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes. *Theor. Appl. Genet.* 101: 712-732.

Xu, D. H. und Ban, T. (2004): Phylogenetic and evolutionary relationships between *Elymus humidus* and other *Elymus* species based on sequencing of non-coding regions of cpDNA and AFLP of nuclear DNA. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1443-1448.

Young, N. D. und Healy, J. (2003): GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 4: 1-6.

Zuckerklund, E. und Pauling, L. (1965): Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8(2): 357-66.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Mai 2006

<http://www.mobot.org/mobot/research/APweb/orders/poalesweb.htm#Bromeliaceae>, Juni 2007

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Geographische Verbreitung der Bromeliaceae.	5
Abb. 2:	Molekulare Phylogenie der Bromeliaceae nach Givnish <i>et al.</i> 2004.	10
Abb. 3:	Historische Entwicklung der Anzahl beschriebener <i>Fosterella</i> -Arten.	12
Abb. 4:	Merkmale der Gattung <i>Fosterella</i>	13
Abb. 5:	Gesamtverbreitungsgebiet der Gattung <i>Fosterella</i> in Südamerika.	17
Abb. 6:	Versuchsansatz für die Reproduzierbarkeitstests der AFLP-Methode auf verschiedenen Ebenen.	46
Abb. 7:	Gelelektrophoretische Auftrennung von 25 DNA-Proben aus verschiedenen Arten der Gattung <i>Fosterella</i>	70
Abb. 8:	Ergebnis der Reproduzierbarkeitstests der AFLP-Methode auf verschiedenen Ebenen.	75
Abb. 9:	Reproduzierbarkeitstest für ein Gel mit 61 <i>Fosterella</i> -Proben und der Primerkombination <i>Msel</i> + <i>CAC</i> und <i>HindIII</i> + <i>ACC</i>	76
Abb. 10:	AFLP-Bandenmuster von 118 <i>Fosterella</i> Akzessionen amplifiziert mit der Primerkombination <i>Msel</i> + <i>CAA</i> und <i>HindIII</i> + <i>ACA</i>	84
Abb. 11:	Neighbor-Joining-Phänogramme der kombinierten AFLP-Analyse: Außengruppenvergleich.	86
Abb. 12:	Neighbor-Joining-Phänogramm der kombinierten AFLP-Analyse mit <i>F. spectabilis</i> als Außengruppe.	89
Abb. 13:	UPGMA-Phänogramm der kombinierten AFLP-Analyse berechnet mit dem Dice-Index.	91
Abb. 14:	Hauptkoordinatenanalyse des kombinierten AFLP-Datensatzes.	93
Abb. 15:	Strict Consensus-Baum der MP-Analyse des kombinierten AFLP-Datensatzes.	94
Abb. 16:	Komplexer Mikrosatellit im Sequenzalignment des <i>atpB-rbcL</i> -Intergenischen Spacers.	97
Abb. 17:	Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus <i>atpB-rbcL</i> : Consensus-Bäume.	98
Abb. 18:	Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus <i>psbB-psbH</i> : Consensus-Bäume.	100
Abb. 19:	Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus <i>rps16</i> -Intron: Consensus-Bäume.	101
Abb. 20:	Kombinierter Chloroplasten-Datensatz: 50 % Majority Rule Consensus-Baum einer Maximum Parsimonie-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels.	105
Abb. 21:	Kombinierter Chloroplasten-Datensatz: 50 % Majority Rule Consensus-Baum einer Maximum Parsimonie-Analyse ohne kodierte Indels.	107
Abb. 22:	Kombinierter Chloroplasten-Datensatz: Neighbor Joining-Dendrogramm einer Distanz-Analyse beruhend auf der p-Distanz.	109
Abb. 23:	Kombinierter Chloroplasten-Datensatz: Maximum Likelihood-Phylogramm.	111
Abb. 24:	Kombinierter Chloroplasten-Datensatz: 50 % Majority Rule Consensus-Baum einer Bayes'schen Analyse.	113
Abb. 25:	Kombinierter Chloroplasten-Datensatz: 50 % Majority Rule Consensus-Baum einer Maximum Parsimonie-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels. Baum mit neuer Benennung.	140
Abb. 26:	Merkmalskartierung.	142
Abb. 27:	Differenzierung einiger <i>Fosterella</i> -Spezies.	144

Abb. 28:	UPGMA-Phänogramm der kombinierten AFLP-Analyse berechnet mit dem Jaccard-Index.....	172
Abb. 29:	Ein zufällig ausgewählter von neun kürzesten Bäumen Maximum Parsimonie-Analyse des kombinierten AFLP-Datensatzes.	173
Abb. 30:	Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus <i>atpB-rbcL</i> : ein zufällig ausgewählter Baum.	174
Abb. 31:	Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus <i>psbB-psbH</i> : ein zufällig ausgewählter Baum.....	175
Abb. 32:	Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus <i>rps 16</i> -Intron: ein zufällig ausgewählter Baum.	176
Abb. 33:	Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: Strict Consensus-Baum der Maximum Parsimonie-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels.	177
Abb. 34:	Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: ein zufällig ausgewählter Baum der Maximum Parsimonie-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels.	178
Abb. 35:	Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: Strict Consensus-Baum der Maximum Parsimonie-Analyse ohne kodierter Indels.....	179
Abb. 36:	Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: ein zufällig ausgewählter Baum der Maximum Parsimonie-Analyse ohne kodierte Indels.	180
Abb. 37:	Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: Neighbor Joining-Phänogramm einer Distanz-Analyse beruhend auf der GTR-Distanz.	181
Abb. 38:	Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: ein zufällig ausgewählter Baum einer Bayes'schen Analyse.....	182
Titelbild:	Blüten von oben links: <i>F. penduliflora</i> , unten links: <i>F. albicans</i> , rechts: <i>F. spectabilis</i>	

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Morphologische Merkmale, zur Unterscheidung der Arten der Gattung <i>Fosterella</i>	14
Tab. 2:	Auflistung des für diese Arbeit verwendeten Pflanzenmaterials.....	22
Tab. 3:	Reaktionsansatz für den Restriktions-/Ligationsschritt der AFLP-Methode.....	43
Tab. 4:	Reaktionsansatz für die Präamplifikation der AFLP-Methode.....	44
Tab. 5:	Reaktionsansatz für die selektive Amplifikation der AFLP-Methode.....	45
Tab. 6:	Getestete Chloroplasten-DNA-Loci für die Sequenzanalyse der Gattung <i>Fosterella</i>	52
Tab. 7:	Reaktionsansatz einer PCR mit Chloroplasten- und Mitochondrien-DNA-Primern.....	54
Tab. 8:	Getestete Mitochondrien-DNA-Loci für die Sequenzanalyse der Gattung <i>Fosterella</i>	56
Tab. 9:	Sequenzen der M13-Universal-Primer (Fartmann <i>et al.</i> 1999).....	58
Tab. 10:	Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion ohne Thermosequensekit.....	58
Tab. 11:	Sequenzen der für die AFLP-Analyse verwendeten Adapter und Primer.....	72
Tab. 12:	Kategorisierung der für die AFLP-Analyse getesteten Primerkombinationen.....	73
Tab. 13:	Übersicht der PCR-Amplifikationsergebnisse für 18 Chloroplastenloci und fünf Akzessionen der Gattung <i>Fosterella</i>	78
Tab. 14:	Übersicht der PCR-Amplifikationsergebnisse für neun Mitochondrienloci und drei Taxa der Gattung <i>Fosterella</i>	81
Tab. 15:	Bandenstatistik der in den Hauptversuchen der AFLP-Methode verwendeten Primerkombinationen.....	83
Tab. 16:	Korrelationskoeffizienten (r) der cophänetischen Analyse.....	92
Tab. 17:	Sequenzdaten der drei untersuchten Chloroplasten-DNA Regionen.....	96
Tab. 18:	Übersicht der mit Modeltest berechneten Parameter für den kombinierten Datensatz der drei Chloroplastenloci.....	110
Tab. 19:	Nomenklatur der noch unzugeordneten bzw. unbeschriebenen <i>Fosterella</i> -Akzessionen.....	137
Tab. 20:	Legende zur Beschriftung der Proben in den Bäumen.....	169
Tab. 21:	Kodierung der Indels im Sequenzalignment.....	183
Tab. 22:	NCBI-Datenbanknummern der einzelnen Sequenzen.....	185

10 Abkürzungsverzeichnis

λ	Lambda
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
A	Adenin
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
agg.	Artengruppe
aff.	lat. affinis, verwandt
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BSA	Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumin)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
ccmp	Consensus chloroplast microsatellite primer
cpDNA	Chloroplasten-DNA
CI	Konsistenzindex
CsCl	Caesiumchlorid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium-Salz
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
G	Guanin
GTR	general time reversal model
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HI	Homoplasie-Index
Indels	Insertions- Deletionsereignisse
IR _A	Inverted Repeat A
ITS	Internal transcribed spacer
J	Jaccard-Index
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
M	Molar
MB	Bayes'sche Analyse
MCMC	Monte Carlo Markov-Kette
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ML	Maximum Likelihood
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MP	Maximum Parsimonie
MP-PCR	Microsatellite-PCR
MR	Majority Rule
mtDNA	Mitochondriale DNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natrium-Hydroxid
NJ	Neighbor-Joining
ng	Nanogramm
PCoA	Hauptkoordinatenanalyse (principle coordinate analysis)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pmol	Pikomol
PRK	Phosphoribulokinase
PW	a-posteriori-Wahrscheinlichkeitswert
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA

RI	Konservierungs-Index
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
s. l.	sensu lato
s. str.	sensu stricto
spec.	Spezies
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBR	tree bisection and reconnection
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPGMA	unweighted pair group method using arithmetic average
UV	Ultraviolett
V/cm	Volt/Zentimeter
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

11 Anhang

Anhang 1: Legende zur Probenbezeichnung

Tab. 20: Legende zur Beschriftung der Proben in den Bäumen

Probennummer	Artname (alte Benennung)	Artname (neue Benennung)	Akzessionsnummer
104aFvill	<i>F. villosula</i>	-	FAN RV 4623
107bFelat	<i>F. elata</i>	<i>F. rusbyi</i>	FAN RS 251002-3
10aFrexia	<i>F. rexiae</i>	-	FAN RV 3666
117aFgrac	<i>F. gracilis</i>	-	FAN RS 281002-6
118aFchiq	<i>F. chiquitana</i>	<i>F. penduliflora ssp. chiquitana</i>	FAN RS 301002-3
120aFchiq	<i>F. chiquitana</i>	<i>F. penduliflora ssp. chiquitana</i>	FAN RV 4685
121aFwebe	<i>F. weberbaueri</i>	-	FAN RV 4656
129aFbati	<i>F. spec.B</i>	<i>F. cf. aletroides</i>	Leme 5078
12aFnowic	<i>F. nowickii</i>	<i>F. weddelliana</i>	FAN RV 3636
132aFmicr	<i>F. micrantha</i>	-	BGB 079-02-92-34
133aFmicr	<i>F. micrantha</i>	-	FAN BGHD 103726
135bFschi	<i>F. schidosperma</i>	<i>F. spec.</i>	BGOS 94-17-0050-80
136bFvill	<i>F. villosula</i>	-	BGO 94-05-0016-20
137bFrusb	<i>F. rusbyi</i>	-	BGHD 103751
138bFwebe	<i>F. weberbaueri</i>	-	FAN TK 7286
139bFwind	<i>F. windischii</i>	-	FAN PI 03.0016
13aFcotac	<i>F. cotacajensis</i>	-	FAN RV 3612
140bFyuvi	<i>F. yuvinkae</i>	-	FAN RV 4510
141bFrusb	<i>F. rusbyi</i>	-	BGO 94-17-0049-80
142bFcaul	<i>F. caulescens</i>	-	BGHD 103532
143aFgram	<i>F. graminea</i>	-	BGB 115-19-83-80
144aFspec	<i>F. spectabilis</i>	-	BGB 290-08-00-84
145aFwedd	<i>F. cf. weddelliana</i>	-	BGHD 104866
18eFlatif	<i>F. latifolia</i>	<i>F. penduliflora</i>	FAN PI 98.0098
19gFgraci	<i>F. spec.D</i>	-	FAN RV 3729a
22cFpendu	<i>F. penduliflora</i>	-	FAN RV 3817
23aFvasqu	<i>F. vasquezii</i>	-	FAN PI 98.0117
25fFvillo	<i>F. villosula</i>	<i>F. robertreadii</i>	FAN PI 98.0173
26aFheter	<i>F. heterophylla</i>	-	FAN RV 3661
28dFspeci	<i>F. spec. A</i>	<i>F. kroemeri</i>	FAN TK 1398b
34aFchiqu	<i>F. chiquitana</i>	<i>F. penduliflora ssp. chiquitana</i>	FAN RV 3762
35aFlatif	<i>F. latifolia</i>	<i>F. penduliflora</i>	FAN RV 3406
36aFcotac	<i>F. weddelliana</i>	-	FAN RV 3627
37aFcotac	<i>F. weddelliana</i>	-	FAN CN 2034
3aFcaules	<i>F. caulescens</i>	-	FRP 99-18434-3
45cFpendu	<i>F. penduliflora</i>	-	FAN RV 4003
46dFpendu	<i>F. penduliflora</i>	-	FAN RV 4051
48dFweber	<i>F. weberbaueri</i>	-	FAN RV 3570
50bFpendu	<i>F. penduliflora</i>	-	FAN PI 00.0036
55aFpendu	<i>F. penduliflora</i>	-	FAN RV 3624
56aFwedde	<i>F. weddelliana</i>	-	FAN RV 3620
58cFnowic	<i>F. nowickii</i>	<i>F. weddelliana</i>	FAN CN 2076 II
60aFelata	<i>F. elata</i>	<i>F. rusbyi</i>	FAN CN 2061
62aFalbic	<i>F. albicans</i>	-	FAN RV 3617

Tab. 20: Fortsetzung

Probennummer	Artnamen (alte Benennung)	Artnamen (neue Benennung)	Akzessionsnummer
63bFvasqu	<i>F. vasquezii</i>	-	FAN PI 98.0116
64aFalbic	<i>F. albicans</i>	-	FAN PI 98.0204
67dFflori	<i>F. floridensis</i>	-	FAN PI 02.0001
71cFgrami	<i>F. graminea</i>	-	FAN RM 216
72aFyuvini	<i>F. yuvinkae</i>	-	FAN SR1
76dFcotac	<i>F. cotacajensis</i>	-	FAN MK 9620b
80aFcaule	<i>F. caulescens</i>	-	MSBG 1989-0220
86aFschid	<i>F. schidosperma</i>	<i>F. spec.</i>	MSBG 1978-0905
87aFspect	<i>F. spectabilis</i>	-	MSBG 1995-0415
93aFspeci	<i>F. spec. C</i>	-	FAN RM 150
94cFalbic	<i>F. albicans</i>	-	FAN RV 4626b
95cFweber	<i>F. weberbaueri</i>	-	FAN RM 217/2
9dFrexiae	<i>F. rexiae</i>	-	FAN RV 3673
F13aDench	<i>Dy. encholiroides</i>	-	FRP 94-49369-3
F50aDeste	<i>Dy. estevesii</i>	-	BGHD 105188
F39aDgoer	<i>Dy. goehringii</i>	-	BGHD 105013
F40aDeste	<i>Dy. estevesii</i>	-	BGHD 105012
F45aDscap	<i>Deu. scapigera</i>	-	BGHD 130020
F51aDbrev	<i>Deu. brevispicata</i>	-	BGHD 102379
F46aEhori	<i>E. horridum</i>	-	BGHD 108213
F43aDglan	<i>Deu. glandulosa</i>	-	BGHD 103854
F44aDlott	<i>Deu. lotteae</i>	-	BGHD 103817
F42aDbrev	<i>Deu. brevifolia</i>	-	BGHD 107170
F14aPundu	<i>Pit. undulato-sepala</i>	-	FRP 1-19497-3
F48aPrubr	<i>Pit. rubro-nigriflora</i>	-	BGHD 103787
F27aPmacr	<i>Pit. macrochlamys</i>	-	FRP 93-12596-3
F16aPgraf	<i>Pit. grafii</i>	-	BGHD 102579
F35aPchia	<i>Pit. chiapensis</i>	-	BGS 41677
F34aPatro	<i>Pit. atrorubens</i>	-	FRP 89-16095-2
F15aPalbi	<i>Pit. albiflora</i>	-	FRP s/n
F47aPloki	<i>Pit. loki-schmidtiae</i>	-	BGHD 104044
F18aAorla	<i>Ae. orlandiana</i>	-	FRP 90-1666-2
F49aElind	<i>Ed. lindenii var. rosaea</i>	-	BGHD 07435
F29aNlaev	<i>N. laevis</i>	-	FRP 98-16962-3
F9aAkerte	<i>Ae. kertesziae</i>	-	FRP 98-16935-3
F17aAgamo	<i>Ae. gamosepala</i>	-	FRP 89-16960-3
F12aBserr	<i>B. serra</i>	-	FRP 98-17751-0
F38aBping	<i>B. pinguin</i>	-	BGHD 103787
F22aOeleg	<i>O. carnea</i>	-	FRP 98-16853-2
F36aOcarne	<i>O. cf. carnea</i>	-	FRP 94-14614-3
F20aDurba	<i>Dei. urbanianum</i>	-	FRP 98-17768-2
F41aPmira	<i>Pu. mirabilis</i>	-	BGHD 130080
F53aPherz	<i>Pu. herzogii</i>	-	BGHD 105240
F52aPspat	<i>Pu. spathacea</i>	-	BGHD 103912
F23aPcoer	<i>Pu. coerulea var. violacea</i>	-	FRP 91-18506-3
F24aPvenu	<i>Pu. venusta</i>	-	FRP 86-18503-3
F25aRpugi	<i>R. pugiformis</i>	-	FRP 4-21908-3
F26aTfras	<i>T. fraseri</i>	-	FRP 90-1326-2

Tab. 20: Fortsetzung

Probennummer	Artname (alte Benennung)	Artname (neue Benennung)	Akzessionsnummer
F31aTsomn	<i>T. somnians</i>	-	Blass 1447
F8aGglauc	<i>G. glaucophylla</i>	-	BGHD 102386
F33aGmusa	<i>G. musaica</i>	-	FRP 92-10645-0
F10aCflor	<i>C. floribunda</i>	-	FRP 90-2846-2
F30aCmorr	<i>C. morreniana</i>	-	FRP 92-12302-0
F11aHarge	<i>H. argentea</i>	-	FRP 88-19332-3
F21aHsten	<i>H. stenopetala</i>	-	FRP 94-19369-3
F19aBacum	<i>Bro. acuminata</i>	-	FRP 95-15043-3
F7aAuaipe	<i>A. uaipanensis</i>	-	FRP 92-9510-2

Anhang 2: UPGMA-Baum der AFLP-Analyse mit Jaccard-Index

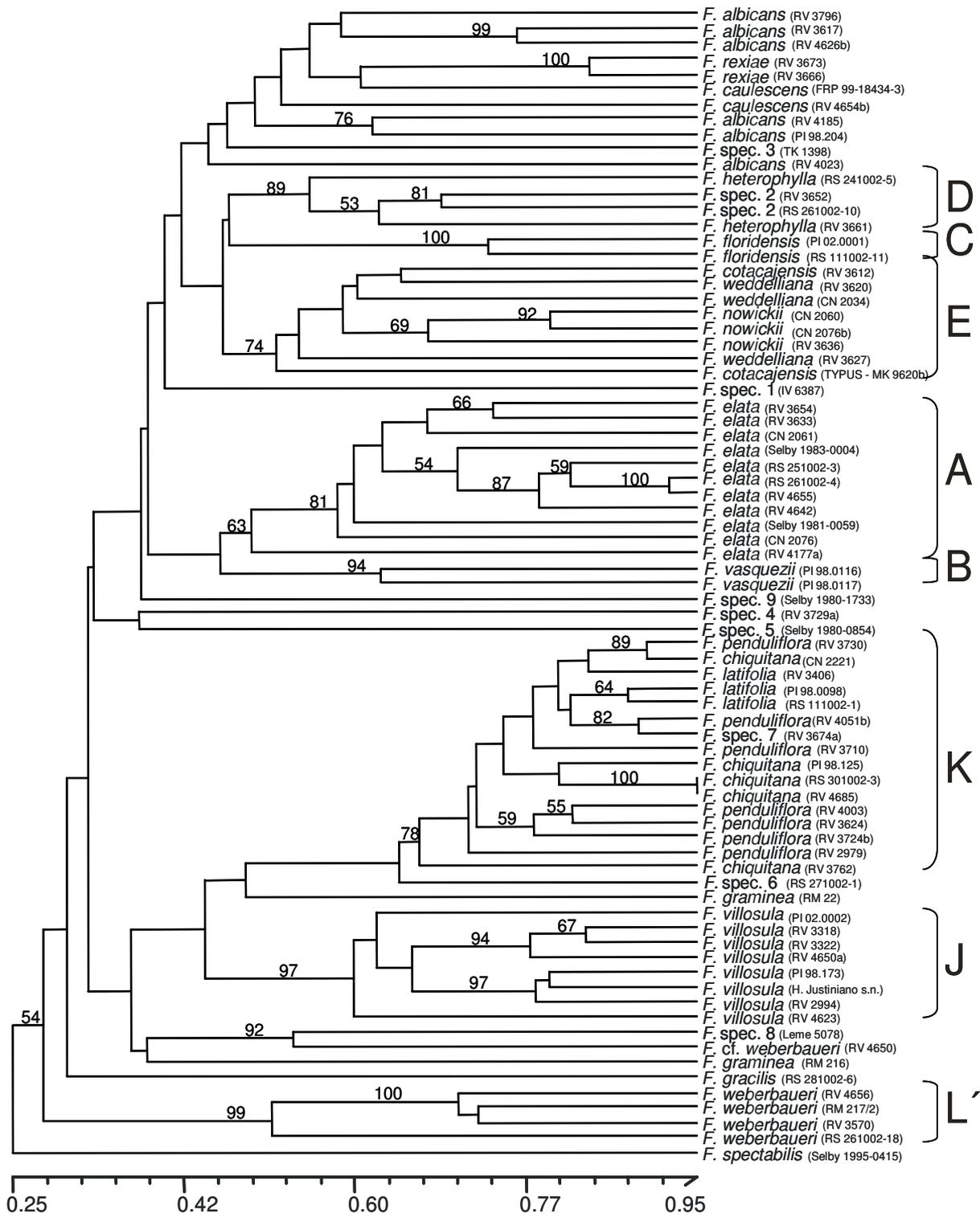


Abb. 28: UPGMA-Phänogramm der kombinierten AFLP-Analyse berechnet mit dem Jaccard-Index.

Die Berechnung beruht auf acht Primerkombinationen mit 310 Merkmalen. Der Maßstab gibt die relative genetische Ähnlichkeit an. Die Bootstrapanalyse, deren Werte oberhalb der Äste zu finden ist, wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt. Die Klammern fassen die in der NJ-Analyse herausgestellten Artengruppen zusammen.

Anhang 3: Ein zufällig ausgewählter Baum der MP-Analyse der AFLPs

10

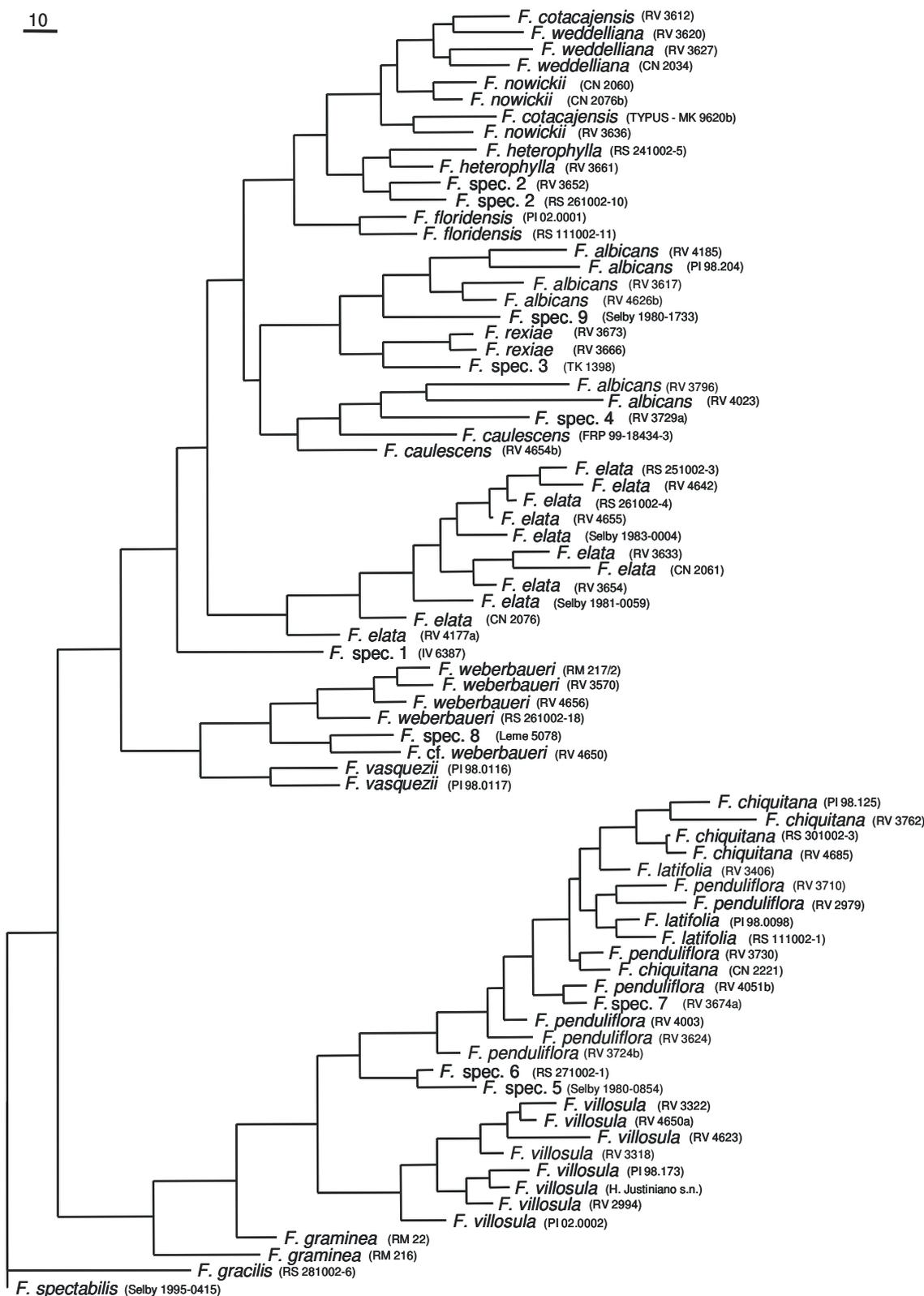


Abb. 29: Ein zufällig ausgewählter von neun kürzesten Bäumen Maximum Parsimonie-Analyse des kombinierten AFLP-Datensatzes.

Die Berechnung beruht auf acht Primerkombinationen mit 310 Merkmalen.

Anhang 4: Ein zufällig ausgewählter Baum der MP-Analyse für *atpB-rbcL*

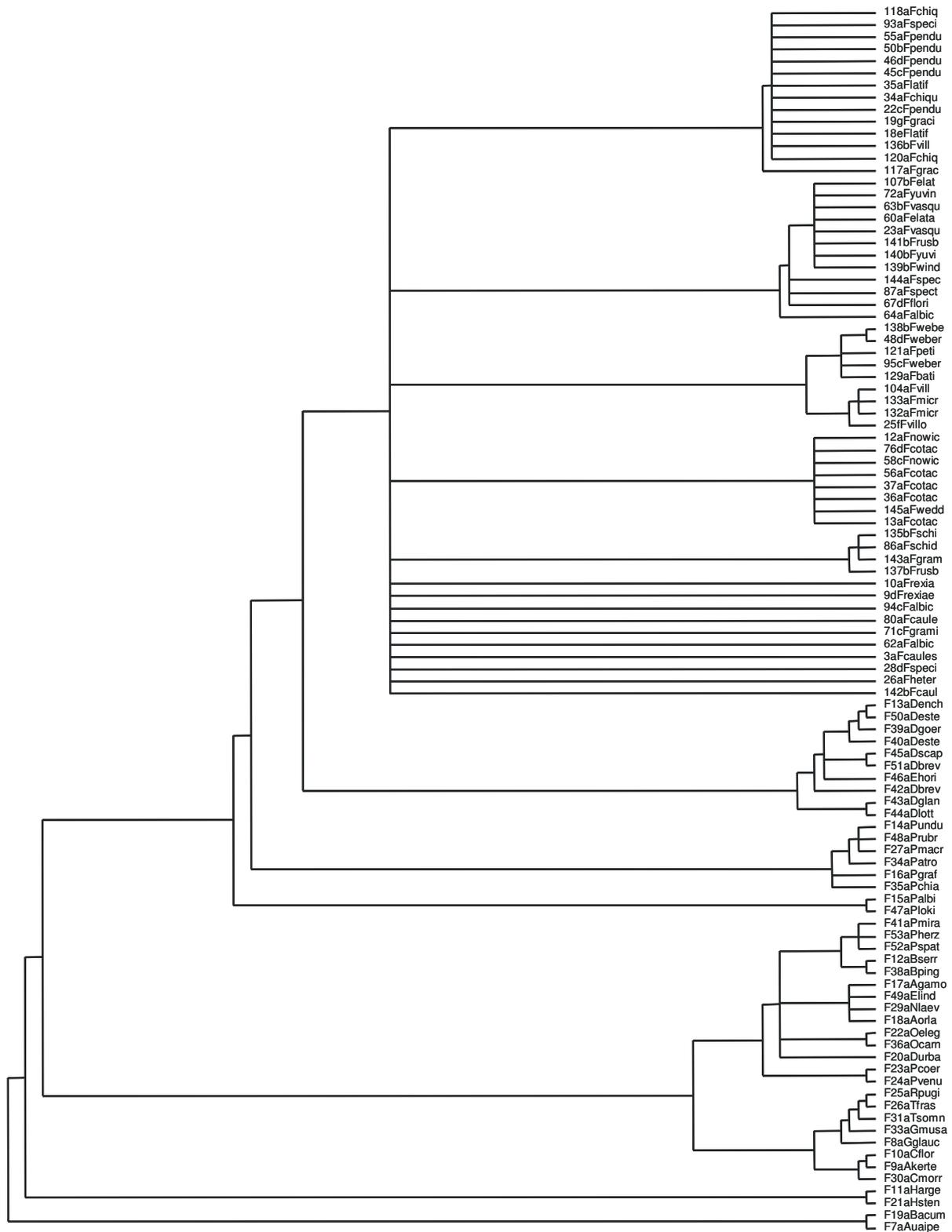


Abb. 30: Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus *atpB-rbcL*: ein zufällig ausgewählter Baum.

Legende s. Tab. 20. Einer aus 234 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 211.

Anhang 5: Ein zufällig ausgewählter Baum der MP-Analyse für *psbB-psbH*

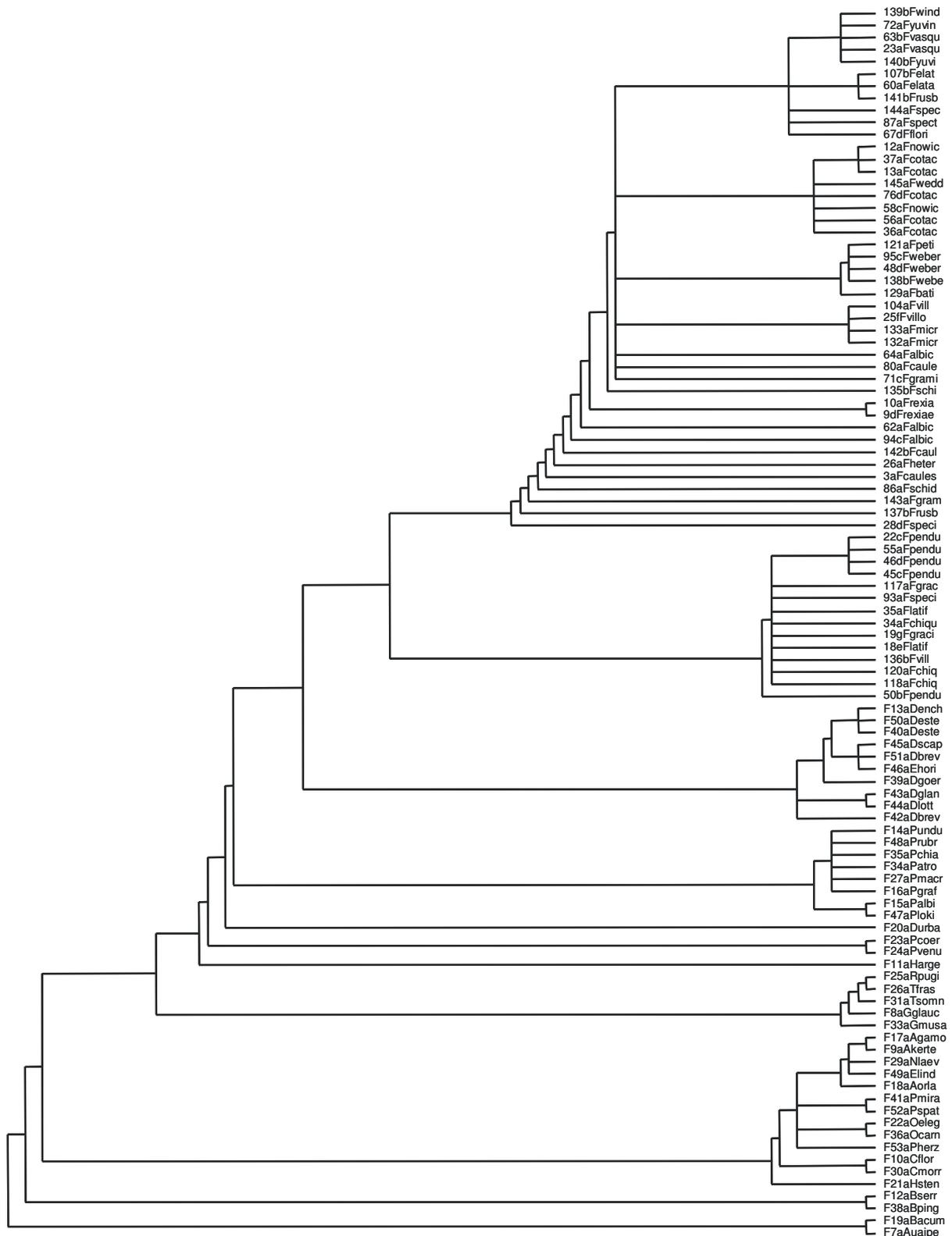


Abb. 31: Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus *psbB-psbH*: ein zufällig ausgewählter Baum.

Legende s. Tab. 20. Einer aus 587 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 158.

Anhang 6: Ein zufällig ausgewählter Baum der MP-Analyse für das *rps16*-Intron

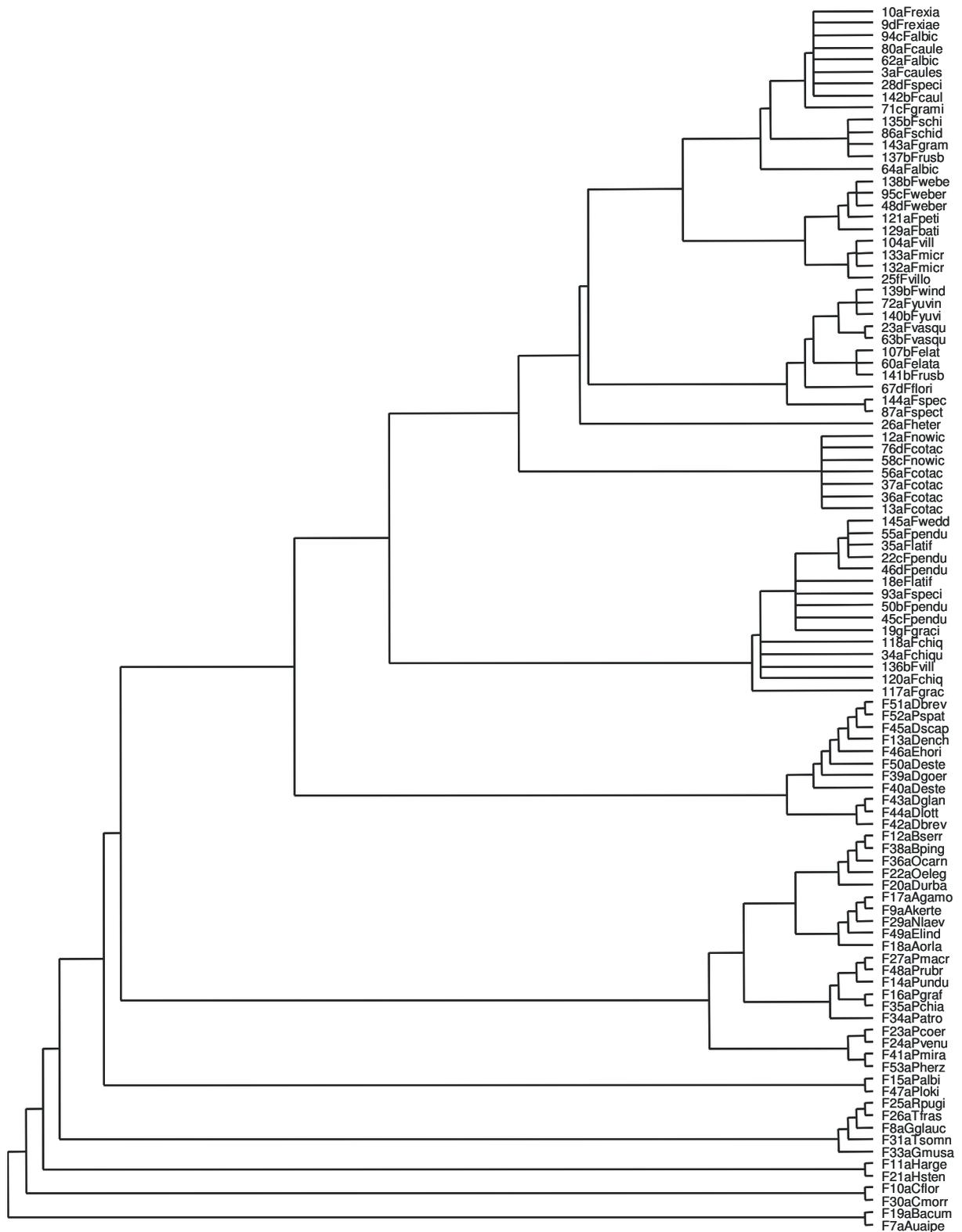


Abb. 32: Maximum Parsimonie-Analyse für den Locus *rps 16*-Intron: ein zufällig ausgewählter Baum.

Legende s. Tab. 20. Einer aus 618 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 298.

Anhang 7: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: Strict Consensus-Baum der MP-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels.

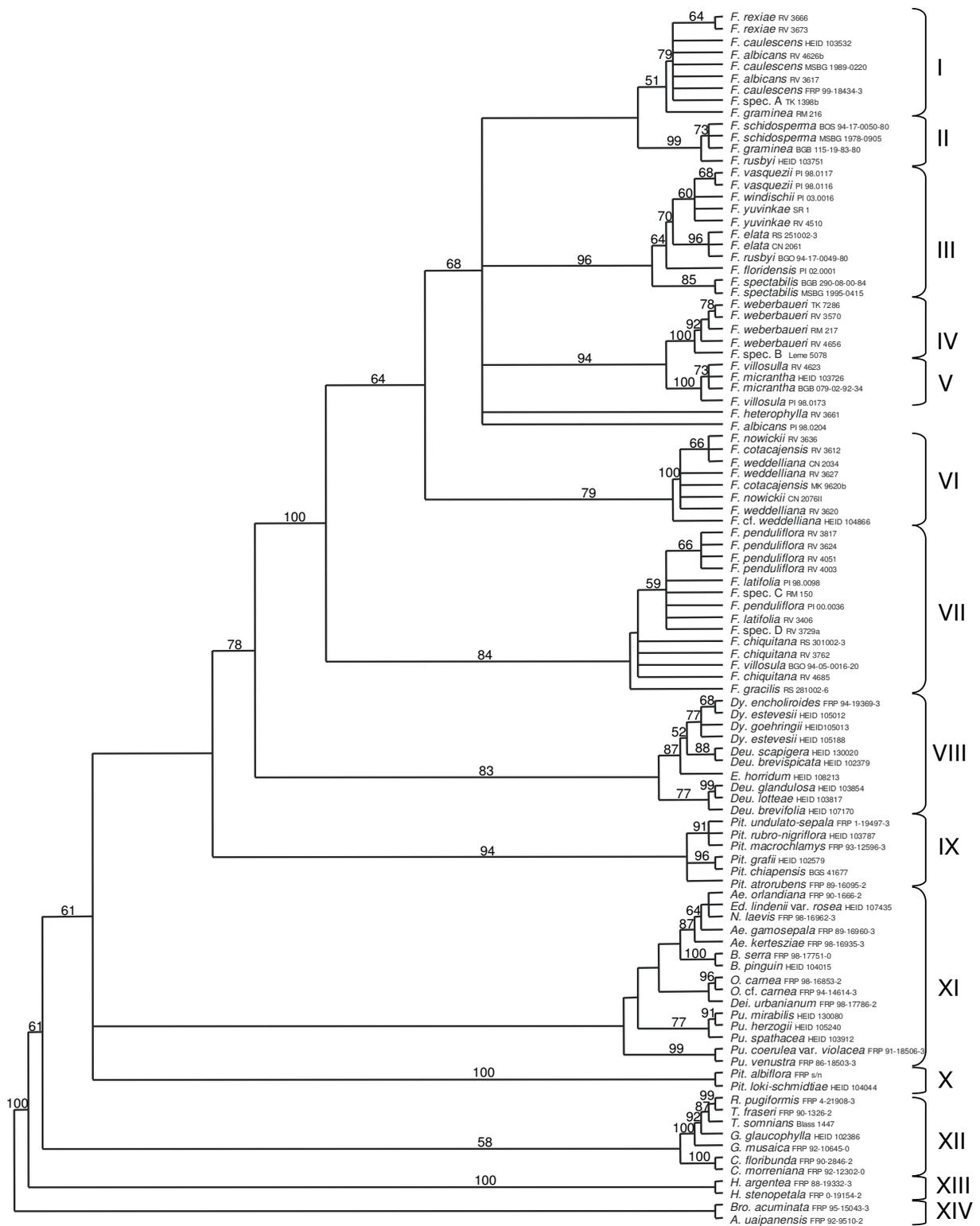


Abb. 33: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: Strict Consensus-Baum der Maximum Parsimonie-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels.

Legende s. Tab. 20. Strict Consensus- von 777 besten Bäumen mit einer Schrittlänge von 712.

Anhang 8: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: ein zufällig ausgewählter Baum der MP-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels.

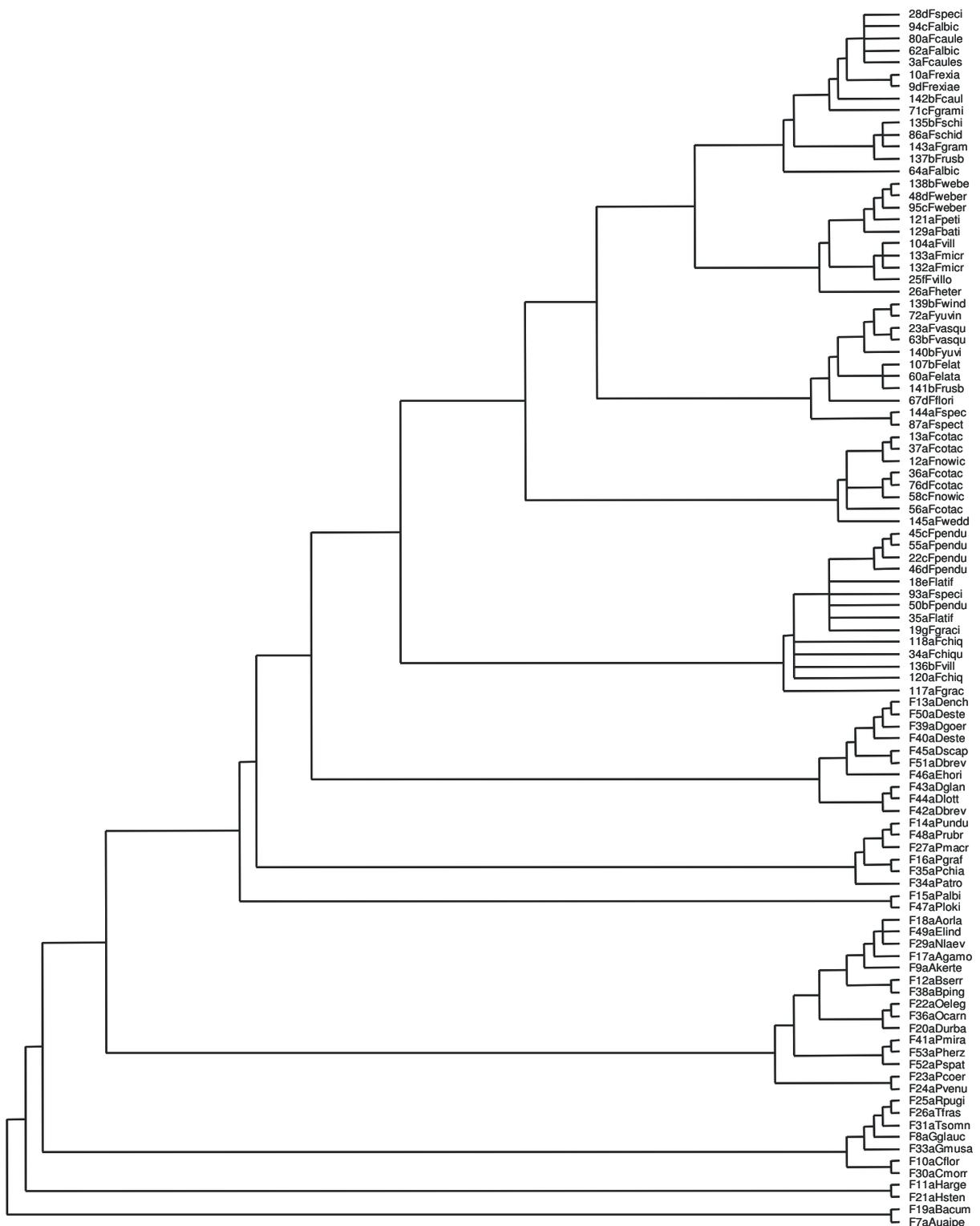


Abb. 34: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: ein zufällig ausgewählter Baum der Maximum Parsimonie-Analyse unter Berücksichtigung kodierter Indels.

Legende s. Tab. 20. Einer von 777 besten Bäumen mit einer Schrittlänge von 712.

Anhang 9: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: Strict Consensus-Baum der MP-Analyse ohne kodierter Indels.

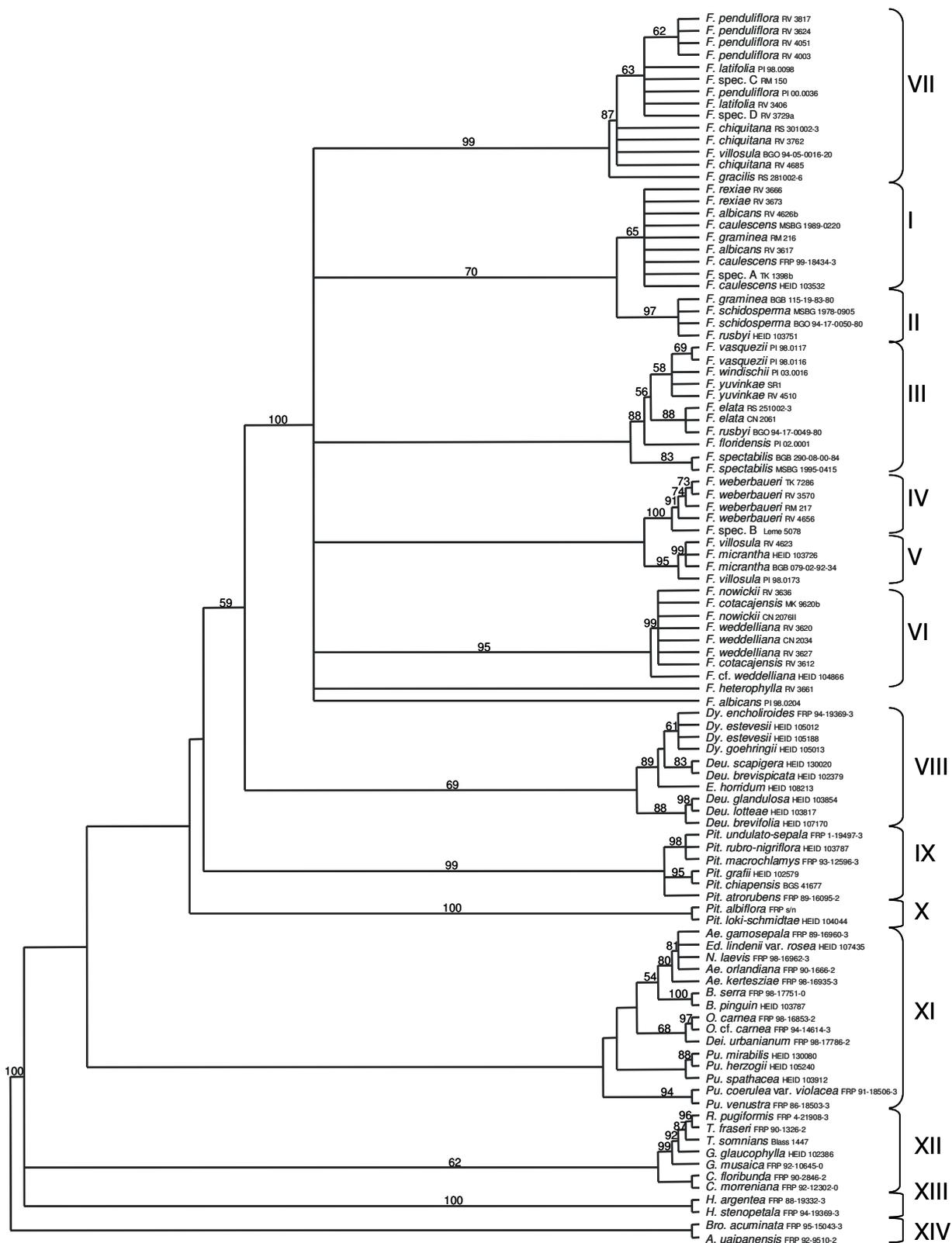


Abb. 35: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: Strict Consensus-Baum der Maximum Parsimonie-Analyse ohne kodierter Indels.

Legende s. Tab. 20. Strict Consensus- von 786 besten Bäumen mit einer Schrittlänge von 723.

Anhang 10: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: ein zufällig ausgewählter Baum der MP-Analyse ohne kodierte Indels.

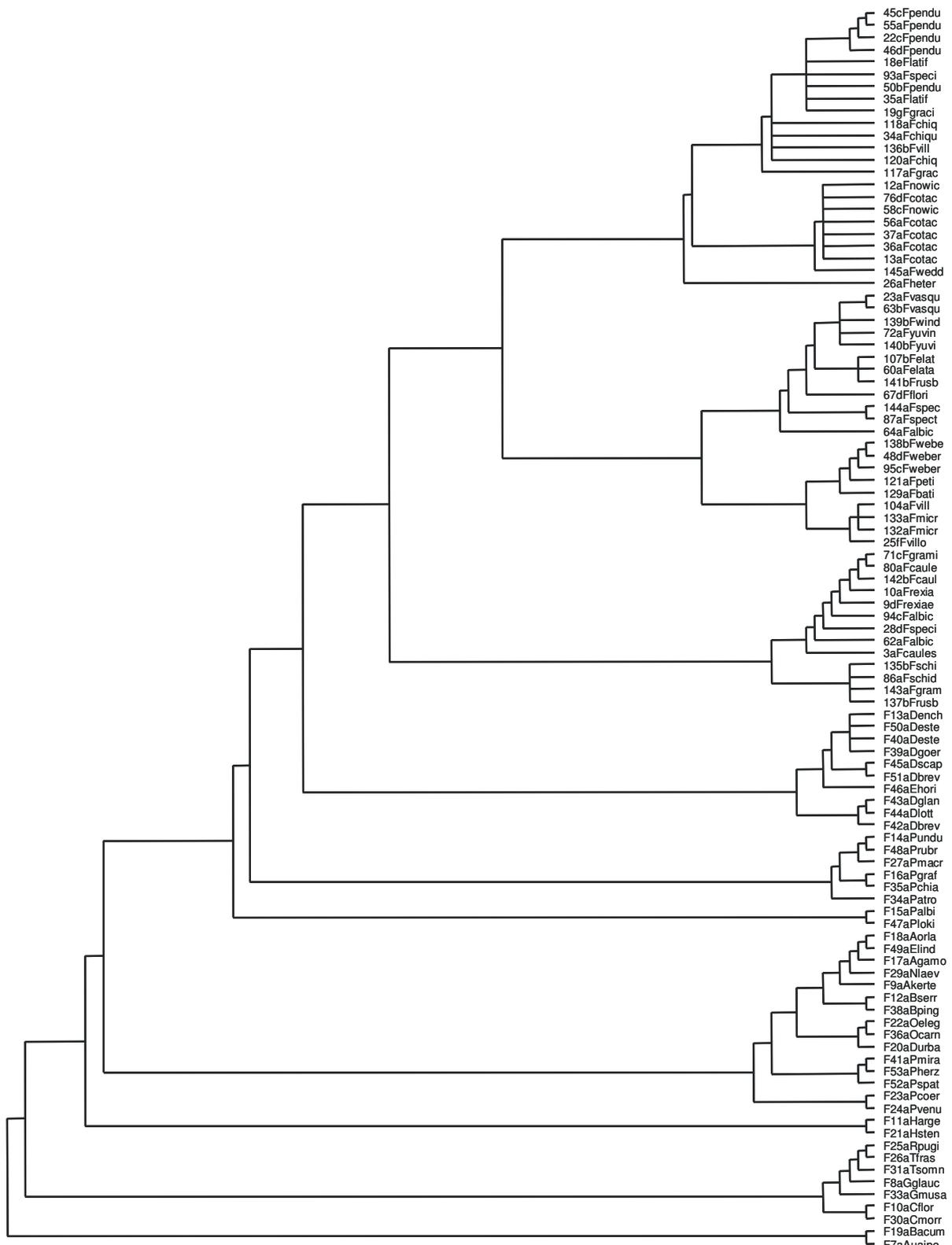


Abb. 36: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: ein zufällig ausgewählter Baum der Maximum Parsimonie-Analyse ohne kodierte Indels.

Legende s. Tab. 20. Strict Consensus- von 786 besten Bäumen mit einer Schrittlänge von 723.

Anhang 12: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: ein zufällig ausgewählter Baum einer Bayes'schen Analyse.

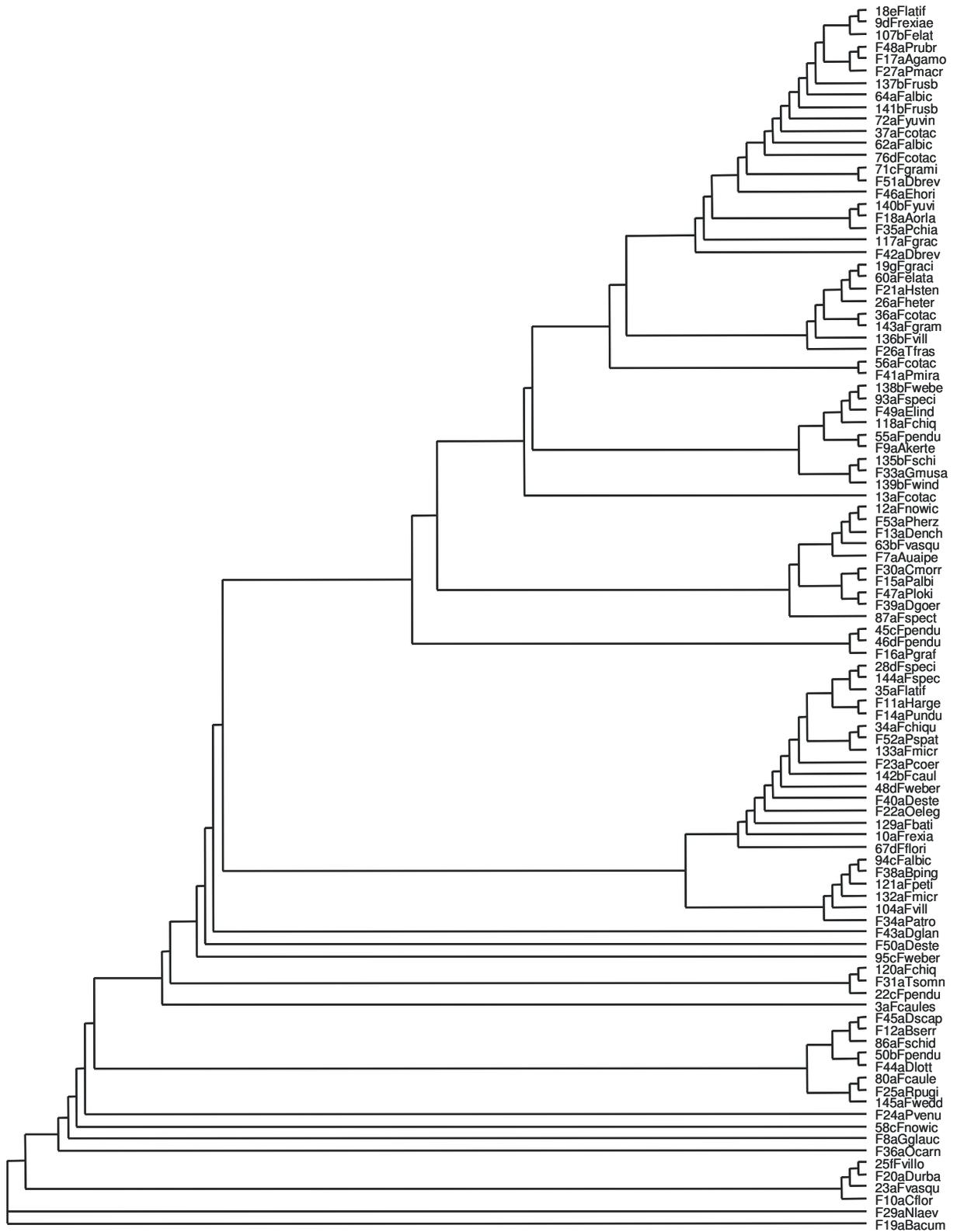


Abb. 38: Kombinierte Chloroplastenuntersuchung: ein zufällig ausgewählter Baum einer Bayes'schen Analyse.

Legende s. Abb. 24.

Anhang 13: Indelkodierung

Tab. 21: Kodierung der Indels im Sequenzalignment.

Die Indelkodierung in eine 0/1-Matrix wurde mit dem Programm Gapcoder (Young und Healy 2003) durchgeführt.

Indelposition und -länge	Position Indelkodierung	Indelposition und -länge	Position Indelkodierung	Indelposition und -länge	Position Indelkodierung
<i>atpB-rbcL</i>		<i>psbB-psbH</i>		<i>rps16-Intron</i>	
27-27	714	755-755	1478	1510-1510	2434
86-87	715	757-757	1479	1514-1514	2435
87-92	716	764-764	1480	1516-1517	2436
89-102	717	796-796	1481	1516-1516	2437
89-92	718	812-812	1482	1517-1517	2438
117-278	719	825-825	1483	1518-1518	2439
119-123	720	885-885	1484	1531-1531	2440
121-295	721	885-886	1485	1546-1550	2441
133-140	722	889-889	1486	1564-1601	2442
187-285	723	891-891	1487	1567-1570	2443
194-194	724	892-892	1488	1568-1583	2444
195-204	725	892-893	1489	1573-1579	2445
196-200	726	928-932	1490	1574-1579	2446
259-263	727	948-949	1491	1709-1709	2447
289-293	728	949-949	1492	1709-1710	2448
290-295	729	988-1006	1493	1712-1719	2449
290-294	730	1157-1161	1494	1712-1718	2450
291-294	731	1187-1187	1495	1713-1716	2451
293-294	732	1192-1195	1496	1722-1722	2452
294-294	733	1192-1194	1497	1723-1723	2453
301-301	734	1198-1198	1498	1733-1748	2454
320-326	735	1204-1204	1499	1733-1740	2455
320-321	736	1401-1401	1500	1734-1754	2456
333-336	737	1442-1442	1501	1779-1782	2457
411-415	738	1462-1462	1502	1795-1796	2458
451-451	739	1464-1467	1503	1795-1795	2459
459-463	740	1465-1467	1504	1796-1796	2460
478-481	741	1472-1472	1505	1857-1857	2461
509-513	742			1858-1887	2462
595-599	743			1860-1887	2463
608-612	744			1864-1879	2464
647-647	745			1907-1907	2465
682-683	746			1910-1930	2466
683-683	747			1910-1910	2467
700-700	748			1910-1917	2468
				1910-1931	2469
				1911-1932	2470
				1911-1930	2471
				1913-1915	2472
				1914-1914	2473
				1936-1936	2474
				2195-2196	2475
				2218-2237	2476
				2218-2238	2477
				2219-2238	2478
				2263-2270	2479
				2286-2289	2480
				2354-2354	2481
				2389-2389	2482

Tab. 21 Fortsetzung:

Indelposition und -länge	Position Indelkodierung	Indelposition und -länge	Position Indelkodierung	Indelposition und -länge	Position Indelkodierung
	<i>atpB-rbcL</i>		<i>psbB-psbH</i>		<i>rps16</i> -Intron
				2418-2418	2484
				2427-2427	2485
				2429-2431	2486
				2429-2432	2487
				2431-2431	2488

Anhang 14: Elektronischer Anhang

Elektronischer Anhang: Sequenzalignment aller drei Chloroplastenregionen kombiniert in der Reihenfolge: *atpB-rbcL*, *psbB-psbH*, *rps16*-Intron. Oberhalb der Sequenzen sind die Positionsnummern angegeben. Am Ende der jeweiligen Loci sind die Indels in einer 0/1-Matrix kodiert angefügt. Die Positionen der Indels und ihre Länge, sowie die Position der jeweiligen Kodierung sind in Tab. 21 im Anhang 13 aufgelistet.

Anhang 15: NCBI-Datenbanknummern

Tab. 22: NCBI-Datenbanknummern der einzelnen Sequenzen.

Art	Akzessionsnummer	Datenbanknummern		
		<i>atpB-rbcL</i>	<i>psbB-psbH</i>	<i>rps16</i> -Intron
<i>F. villosula</i>	FAN RV 4623	EF639729	EF643018	EF643119
<i>F. elata</i>	FAN RS 251002-3	EF639730	EF643019	EF643120
<i>F. rexiae</i>	FAN RV 3666	EF639731	EF643020	EF643121
<i>F. gracilis</i>	FAN RS 281002-6	EF639732	EF643021	EF643122
<i>F. chiquitana</i>	FAN RS 301002-3	EF639733	EF643022	EF643123
<i>F. chiquitana</i>	FAN RV 4685	EF639734	EF643023	EF643124
<i>F. weberbaueri</i>	FAN RV 4656	EF639735	EF643024	EF643125
<i>F. spec.B</i>	Leme 5078	EF639736	EF643025	EF643126
<i>F. nowickii</i>	FAN RV 3636	EF639737	EF643026	EF643127
<i>F. micrantha</i>	BGB 079-02-92-34	EF639738	EF643027	EF643128
<i>F. micrantha</i>	BGHD 103726	EF639739	EF643028	EF643129
<i>F. schidosperma</i>	BGOS 94-17-0050-80	EF639740	EF643029	EF643130
<i>F. villosula</i>	BGO 94-05-0016-20	EF639741	EF643030	EF643131
<i>F. rusbyi</i>	BGHD 103751	EF639742	EF643031	EF643132
<i>F. weberbaueri</i>	FAN TK 7286	EF639743	EF643032	EF643133
<i>F. windischii</i>	FAN PI 03.0016	EF639744	EF643033	EF643134
<i>F. cotacajensis</i>	FAN RV 3612	EF639745	EF643034	EF643135
<i>F. yuvinkae</i>	FAN RV 4510	EF639746	EF643035	EF643136
<i>F. rusbyi</i>	BGO 94-17-0049-80	EF639747	EF643036	EF643137
<i>F. caulescens</i>	BGHD 103532	EF639748	EF643037	EF643138
<i>F. graminea</i>	BGB 115-19-83-80	EF639749	EF643038	EF643139
<i>F. spectabilis</i>	BGB 290-08-00-84	EF639750	EF643039	EF643140
<i>F. cf. weddelliana</i>	BGHD 104866	EF639751	EF643040	EF643141
<i>F. latifolia</i>	FAN PI 98.0098	EF639752	EF643041	EF643142
<i>F. spec.D</i>	FAN RV 3729a	EF639753	EF643042	EF643143
<i>F. penduliflora</i>	FAN RV 3817	EF639754	EF643043	EF643144
<i>F. vasquezii</i>	FAN PI 98.0117	EF639755	EF643044	EF643145
<i>F. villosula</i>	FAN PI 98.0173	EF639756	EF643045	EF643146
<i>F. heterophylla</i>	FAN RV 3661	EF639757	EF643046	EF643147
<i>F. spec. A</i>	FAN TK 1398b	EF639758	EF643047	EF643148
<i>F. chiquitana</i>	FAN RV 3762	EF639759	EF643048	EF643149
<i>F. latifolia</i>	FAN RV 3406	EF639760	EF643049	EF643150
<i>F. weddelliana</i>	FAN RV 3627	EF639761	EF643050	EF643151
<i>F. weddelliana</i>	FAN CN 2034	EF639762	EF643051	EF643152
<i>F. caulescens</i>	FRP 99-18434-3	EF639763	EF643052	EF643153
<i>F. penduliflora</i>	FAN RV 4003	EF639764	EF643053	EF643154
<i>F. penduliflora</i>	FAN RV 4051	EF639765	EF643054	EF643155
<i>F. weberbaueri</i>	FAN RV 3570	EF639766	EF643055	EF643156
<i>F. penduliflora</i>	FAN PI 00.0036	EF639767	EF643056	EF643157
<i>F. penduliflora</i>	FAN RV 3624	EF639768	EF643057	EF643158
<i>F. weddelliana</i>	FAN RV 3620	EF639769	EF643058	EF643159
<i>F. nowickii</i>	FAN CN 2076 II	EF639770	EF643059	EF643160
<i>F. elata</i>	FAN CN 2061	EF639771	EF643060	EF643161

Tab. 22: Fortsetzung

Art	Sammlernummer	Datenbanknummern		
		<i>atpB-rbcL</i>	<i>psbB-psbH</i>	<i>rps16-Intron</i>
<i>F. albicans</i>	FAN RV 3617	EF639772	EF643061	EF643162
<i>F. vasquezii</i>	FAN PI 98.0116	EF639773	EF643062	EF643163
<i>F. albicans</i>	FAN PI 98.0204	EF639774	EF643063	EF643164
<i>F. floridensis</i>	FAN PI 02.0001	EF639775	EF643064	EF643165
<i>F. graminea</i>	FAN RM 216	EF639776	EF643065	EF643166
<i>F. yuvinkae</i>	FAN SR1	EF639777	EF643066	EF643167
<i>F. cotacajensis</i>	FAN MK 9620b	EF639778	EF643067	EF643168
<i>F. caulescens</i>	MSBG 1989-0220	EF639779	EF643068	EF643169
<i>F. schidosperma</i>	MSBG 1978-0905	EF639780	EF643069	EF643170
<i>F. spectabilis</i>	MSBG 1995-0415	EF639781	EF643070	EF643171
<i>F. spec.C</i>	FAN RM 150	EF639782	EF643071	EF643172
<i>F. albicans</i>	FAN RV 4626b	EF639783	EF643072	EF643173
<i>F. weberbaueri</i>	FAN RM 217/2	EF639784	EF643073	EF643174
<i>F. rexiae</i>	FAN RV 3673	EF639785	EF643074	EF643175
<i>Dy. encholiroides</i>	FRP 94-49369-3	EF639786	EF643075	EF643176
<i>Dy. estevesii</i>	BGHD 105188	EF639787	EF643076	EF643177
<i>Dy. goehringii</i>	BGHD 105013	EF639788	EF643077	EF643178
<i>Dy. estevesii</i>	BGHD 105012	EF639789	EF643078	EF643179
<i>Deu. scapigera</i>	BGHD 130020	EF639790	EF643079	EF643180
<i>Deu. brevispicata</i>	BGHD 102379	EF639791	EF643080	EF643181
<i>E. horridum</i>	BGHD 108213	EF639792	EF643081	EF643182
<i>Deu. glandulosa</i>	BGHD 103854	EF639793	EF643082	EF643183
<i>Deu. lotteae</i>	BGHD 103817	EF639794	EF643083	EF643184
<i>Deu. brevifolia</i>	BGHD 107170	EF639795	EF643084	EF643185
<i>Pit. undulato-sepala</i>	FRP 1-19497-3	EF639796	EF643085	EF643186
<i>Pit. rubro-nigriflora</i>	BGHD 103787	EF639797	EF643086	EF643187
<i>Pit. macrochlamys</i>	FRP 93-12596-3	EF639798	EF643087	EF643188
<i>Pit. grafii</i>	BGHD 102579	EF639799	EF643088	EF643189
<i>Pit. chiapensis</i>	BGS 41677	EF639800	EF643089	EF643190
<i>Pit. atrorubens</i>	FRP 89-16095-2	EF639801	EF643090	EF643191
<i>Pit. albiflora</i>	FRP s/n	EF639802	EF643091	EF643192
<i>Pit. loki-schmidtiae</i>	BGHD 104044	EF639803	EF643092	EF643193
<i>Ae. orlandiana</i>	FRP 90-1666-2	EF639804	EF643093	EF643194
<i>Ed. lindenii var. rosaea</i>	BGHD 07435	EF639805	EF643094	EF643195
<i>N. laevis</i>	FRP 98-16962-3	EF639806	EF643095	EF643196
<i>Ae. kertesziae</i>	FRP 98-16935-3	EF639807	EF643096	EF643197
<i>Ae. gamosepala</i>	FRP 89-16960-3	EF639808	EF643097	EF643198
<i>B. serra</i>	FRP 98-17751-0	EF639809	EF643098	EF643199
<i>B. pinguin</i>	BGHD 103787	EF639810	EF643099	EF643200
<i>O. carnea</i>	FRP 98-16853-2	EF639811	EF643100	EF643201
<i>O. cf. carnea</i>	FRP 94-14614-3	EF639812	EF643101	EF643202
<i>Dei. urbanianum</i>	FRP 98-17768-2	EF639813	EF643102	EF643203
<i>Pu. mirabilis</i>	BGHD 130080	EF639814	EF643103	EF643204
<i>Pu. herzogii</i>	BGHD 105240	EF639815	EF643104	EF643205
<i>Pu. spathacea</i>	BGHD 103912	EF639816	EF643105	EF643206
<i>Pu. coerulea var. violacea</i>	FRP 91-18506-3	EF639817	EF643106	EF643207
<i>Pu. venustra</i>	FRP 86-18503-3	EF639818	EF643107	EF643208
<i>R. pugiformis</i>	FRP 4-21908-3	EF639819	EF643108	EF643209
<i>T. fraseri</i>	FRP 90-1326-2	EF639820	EF643109	EF643210
<i>T. somnians</i>	Blass 1447	EF639821	EF643110	EF643211
<i>G. glaucophylla</i>	BGHD 102386	EF639822	EF643111	EF643212
<i>G. musaica</i>	FRP 92-10645-0	EF639823	EF643112	EF643213
<i>C. floribunda</i>	FRP 90-2846-2	EF639824	EF643113	EF643214
<i>C. morreniana</i>	FRP 92-12302-0	EF639825	EF643114	EF643215
<i>H. argentea</i>	FRP 88-19332-3	EF639826	EF643115	EF643216
<i>H. stenopetala</i>	FRP 94-19369-3	EF639827	EF643116	EF643217
<i>Bro. acuminata</i>	FRP 95-15043-3	EF639828	EF643117	EF643218
<i>A. uaipanensis</i>	FRP 92-9510-2	EF639829	EF643118	EF643219

Danksagung

Diese Dissertation entstand in der Abteilung Systematik und Morphologie der Pflanzen des Fachbereichs 18, Naturwissenschaften, der Universität Kassel.

Ich möchte mich bei allen Menschen ganz herzlich bedanken, die große und kleine Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Kurt Weising für die Bereitstellung und Betreuung dieser Arbeit, für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die vielen kleinen und großen Tipps und Tricks während der Durchführung der Arbeit und vor allem während des Zusammenschreibens.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Georg Zizka und Prof. Dr. Pierre Ibisch für die hervorragende Kooperation, die Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei der Klärung von Fragen danken.

Ein ganz besonders großer Dank gilt Katharina Schulte. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden. Sie hat es geschafft, mich mehr als einmal davon abzuhalten, alles hinzuschmeißen, mich davon zu überzeugen, dass die Arbeit gut ist und es sich auf jeden Fall lohnt, weiter zu machen und durchzuhalten. Sie hat mich wieder aufgebaut und mir neuen Mut gemacht.

Außerdem hat Katharina einen großen Anteil am *Fosterella*-Projekt und uns alle mit ihren guten Ideen vorangebracht.

Dr. Roberto Vasquez, Arturo Osinaga, Fabiola Perrez und Jose danke ich für die Unterstützung und die tolle Zeit in Bolivien.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Systematik und Morphologie der Pflanzen, allen ehemaligen und den momentanen Mitgliedern. Ihr seid eine wirklich duftige Truppe und es hat mir immer viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten! Ich werde euch vermissen!

Gurdrun und Peter, mit denen ich die ersten Jahre meiner Zeit in der Arbeitsgruppe geteilt habe, die immer für einen Spaß, einen Kaffee, aber auch für ernsthafte Diskussionen zu haben waren. Zudem haben sie die Computer, bei denen ich mit meiner anfänglich sehr schlechten Aura zugesetzt habe, wieder zum Leben erweckt.

Ein besonderer Dank gilt Christine für die Organisation von allen möglichen und zum Teil auch unmöglichen Dingen, die jedem in der Arbeitsgruppe irgendwie geholfen haben und außerdem für die intensive Unterstützung im Labor und das eine oder andere auch mal nicht fachliche Gespräch.

Sabine und Ralf möchte ich für die tolle Pflege der *Fosterellen* im Gewächshaus danken.

Jule danke ich für die geduldige Beantwortung aller meiner nervigen Fragen in Sachen *Fosterella* und das zur Verfügung stellen von Fotos.

Frau Maier-Stolte für die bereitwillige Beantwortung jeglicher Frage und die Bereitschaft mich zu prüfen.

Bei Anna bedanke ich mich für die lange Leihgabe der Kamera, mit der die schönsten *Fosterella*-Fotos entstanden sind.

Meinen Korrekturlesern Gero, Masch, Kathleen, Jule, Daniela, Sanja und Anke danke ich für die große Unterstützung und die guten Hilfen zum Verfassen der Arbeit.

Mandy und Sonja, haben die initiale Arbeit an den chloroplastidären Regionen geleistet. Das Praktikum mit Euch hat außerordentlich viel Spaß gemacht. Dankeschön dafür!

Mandy und Kathleen danke ich für die stets lustigen Cappuccino-Sitins mit immer wechselndem Publikum und für die Cocktail-Abende, von denen hoffentlich noch einige folgen werden.

Bei den Weibers möchte ich mich für die stets lustige Weiberabende bedanken.

Bei Harry bedanke ich mich für die eingehenden Gespräche und Diskussionen auch auf zwischenmenschlicher Ebene und die seelische Unterstützung, fürs Mut machen und Anspornen und vor allem für die Überlebenspäckchen mit leckeren Aalener Spionlen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Gero für jegliche Art von Unterstützung, vor allem das programmieren von sehr hilfreichen arbeitssparenden Programmen und dafür, dass du meine Launen und Zicken vor allem der letzten Wochen ertragen hast und mich trotzdem noch magst!

Meinem Bruder Volker danke ich dafür, dass er immer für mich da ist!

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mich fortwährend und in jeglicher Hinsicht unterstützt und gefördert haben.

Publikationen:

Ibisch, P.L., Vasquez, R., Gross, E., Krömer, T. und **Rex, M.** (2002):Novelties in Bolivian *Fosterella* (Bromeliaceae). *Selbyana* 23(2): 204-219.

Ibisch, P.L., Peters, J., **Rex, M.**, Schulte, K., Osinaga, A., und Vasquez, R. (2006): Die Bromelien Boliviens (V): *Fosterella gracilis* (Rusby) L.B. Smith. *Die Bromelie* (2):40-45.

Rex, M., Patzold, K., Schulte, K. Zizka, G., Vasquez, R. Ibisch, P.L., und Weising, K. (2007): AFLP analysis of genetic relationships in the genus *Fosterella* L.B. Smith (Pitcairnioideae, Bromeliaceae). *Genome* 50: 90-105.

Rex, M., Schulte, K., Zizka, G., Vasquez, R., Ibisch, P.L., und Weising, K.: Phylogenetic analysis of the genus *Fosterella* (Bromeliaceae) based on molecular, morphological, anatomical and biogeographical data. In Vorbereitung.

Kreier, H.-P., **Rex, M.**, Weising, K., Kessler, M., Smith, A. und Schneider, H.: Inferring the diversification of the epiphytic fern genus *Serpocaulon* in South America using chloroplast sequences and AFLPs. In Vorbereitung.

Peters, J., Ibisch, P.L., Vasquez, R., Osinaga, A., Leme, E., **Rex, M.** und Weising, K.: Towards a taxonomic revision of the genus *Fosterella* (Bromeliaceae). In Vorbereitung.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, im Juni 2007