

**Untersuchungen zur Systematik und Phylogenie der Bromeliaceae unter
besonderer Berücksichtigung molekularer Merkmale**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Ralf Horres
aus Eschweiler / Rheinland

Frankfurt am Main 2003

vom Fachbereich Biologie und Informatik der
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. B. Streit
Gutachter: Prof. Dr. G. Zizka
Prof. Dr. K. Weising
Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Merkmale und systematische Stellung der Bromeliaceae	1
1.2	Rekonstruktion der Phylogenie der Bromeliaceae - ein Überblick	5
1.3.	Intrafamiliäre Gliederung der Bromeliaceae	8
1.4	Problem-/Fragestellung	12
1.5.	Konzeption der Untersuchungen	14
1.5.1.	Auswahl der molekularen Marker	14
1.5.1.1.	Sequenzanalysen	14
1.5.1.2.	Fragmentanalysen	17
1.5.2.	Auswahl der zu untersuchenden Taxa	19
1.5.2.1.	Sequenzanalysen	19
1.5.2.2.	Fragmentanalysen	19
2	Material und Methode	25
2.1	Untersuchungsmaterial	25
2.2	Probenvorbereitung	25
2.3	DNA-Isolation und Aufreinigung	25
2.4	Spezifische Amplifikation und Sequenzierung	28
2.4.1	PCR-Protokolle (spezifische Amplifikationen)	29
2.4.2	Aufreinigung der Amplifikate für die Sequenzierung und Klonierung von PCR-Amplifikaten	29
2.4.3	Klonierung von PCR-Amplifikaten	30
2.4.4	Sequenzierreaktionen	32
2.5	Dokumentation der Sequenzierung	33
2.6	Sequenzanalysen	33
2.6.1	Editierung der Sequenzen und Anordnung in Alignments	33
2.6.2	Analyse der Sequenzdaten	34
2.7	Fragmentanalysen	36
2.7.1	Random amplified polymorphic DNA (RAPDs)	36
2.7.2	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLPs)	37
2.8	Cytogenetische Untersuchungen	39
3	Ergebnisse	42
3.1	Sequenzdaten	42
3.1.1	Sequenzdaten und Analysen des <i>trnT</i> (UGU)- <i>trnL</i> (UAA)-Intergenischen Spacers zwischen <i>trnT</i> (UGU) und <i>trnL</i> (UAA)-5'-Exon; AB-Fragment]	45
3.1.2	Sequenzdaten und Analysen des <i>trnL</i> (UAA)-Intron [zwischen <i>trnL</i> (UAA)-5'-Exons und <i>trnL</i> (UAA)-3'-Exon; CD-Fragment]	46

3.1.3	Sequenzdaten und Analysen des <i>trnL</i> (UAA)- <i>trnF</i> (GAA)-Intergenischen Spacers [zwischen <i>trnL</i> (UAA)-5'- Exon und <i>trnF</i> (GAA)-Gen]	52
3.1.4	Kombinierte Analysen	55
3.1.4.1.	Kombinierte Analyse von <i>trnT</i> - <i>trnL</i> -Intergenischem Spacer, <i>trnL</i> -Intron und <i>trnL</i> - <i>trnF</i> -Intergenischem Spacer [AB-, CD- und EF-Fragment]	55
3.1.4.2	Kombinierte Analyse von <i>trnL</i> -Intron und <i>trnL</i> - <i>trnF</i> -Intergenischem Spacer [CD- und EF-Fragment]	58
3.1.5	Analyse eines Kern-Markers: der „Internal Transcribed Spacer“ (ITS)	68
3.2	Fragmentanalysen	71
3.2.1	RAPD-Analysen der Gattungen <i>Fascicularia</i> , <i>Ochagavia</i> und <i>Greigia</i>	71
3.2.2	AFLP-Analysen der Gattungsgruppe <i>Fascicularia</i> , <i>Ochagavia</i> und <i>Greigia</i>	76
3.2.3	AFLP-Analysen der Gattungsgruppe <i>Deuterocohnia</i> , <i>Dyckia</i> und <i>Pitcairnia</i>	82
3.3	Cytogenetische Charakteristika der Bromeliaceae	92
4	Diskussion	95
4.1	Sequenzanalysen	95
4.2	Fragmentanalysen	97
4.2.1	RAPD Analysen der Gattungen <i>Fascicularia</i> , <i>Ochagavia</i> und <i>Greigia</i>	97
4.2.2	AFLP -Analysen der Gattungsgruppe <i>Fascicularia</i> , <i>Ochagavia</i> und <i>Greigia</i>	98
4.2.3	AFLP-Analysen der Gattungsgruppe <i>Abromeitiella</i> , <i>Deuterocohnia</i> , <i>Dyckia</i> und <i>Pitcairnia</i>	99
4.3	Cytogenetische Charakteristika der Bromeliaceae	102
4.4	Gliederung der Bromeliaceae: Abgrenzung der Unterfamilien und Gattungen	104
4.5	Molekulare Merkmale in der Familie der Bromeliaceae - Perspektiven und Grenzen	119
5	Zusammenfassung	121
6	Literatur	123
7	Verwendete Abkürzungen	133
8	Verzeichnis der Tabellen, Abbildungen und Anlagen	134
	Danksagung	137
	Anlagen	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Merkmale und systematische Stellung der Bromeliaceae

Die mit einer Ausnahme (*Pitcairnia feliciana* in Westafrika, Guinea) rein neuweltliche Familie der Bromeliaceae (Abb.1) umfaßt heute rund 2800 Arten. Auf der Basis von Blüten-, Frucht- und Samenmerkmalen werden bisher drei Unterfamilien und 58 Gattungen unterschieden (SMITH & TILL 1998; LEME 1997, 1998 ; Tab.1).

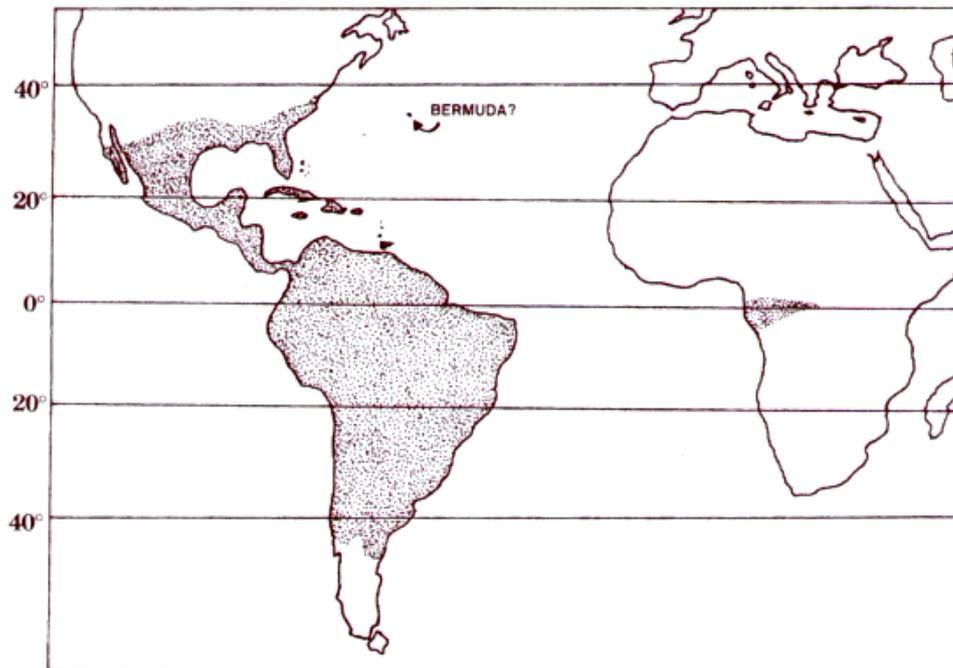


Abb.1: Geographische Verbreitung der Bromeliaceae: In Afrika (Guinea) findet sich nur *Pitcairnia feliciana* (Pitcairnioideae). Ob eine kleine Population von *Tillandsia usneoides* (Tillandsioideae) auf den Bermudas ursprünglich vorkommt, ist unklar (aus BENZING 2000: 4).

Bromelien sind zum größten Teil krautige, ausdauernde Rosettenpflanzen. Die Größe der Pflanzen erstreckt sich von wenigen Zentimetern (z.B. *Tillandsia bryoides*) bis zu 10 m Höhe (*Puya raimondii*). Die Sproßachse ist in der Regel gestaucht und vielfach nur wenige Zentimeter lang. Bei einer Reihe von Arten kann sie aber auch Längen von über einem Meter erreichen. Dabei handelt es sich dann aber um ein Sympodium. Die Sproßachse schließt bei der überwiegenden Zahl der Arten ihr Wachstum mit der Bildung einer endständigen Infloreszenz ab. Für die vegetative Vermehrung sorgen Seitentriebe, sog. Kindel. Seitenständige Infloreszenzen sind aus den Gattungen *Greigia* und *Dyckia* sowie von *Tillandsia complanata* und *T. multicaulis* bekannt.

Die wechselständigen Blätter sind meist deutlich in Blattscheide und -spreite gegliedert. Eine zweizeilige (distiche) Anordnung tritt nur in Ausnahmefällen auf (*Dyckia estevesii*, *Tillandsia*-Arten v.a. der Untergattung *Diaphoranthema*). Die Blattränder sind bestachelt oder unbestachelt, die Spreitenform variiert von linealisch über zungenförmig bis hin zu breit dreieckig. Besonders die Blätter sind mehr oder weniger dicht mit Saugschuppen bedeckt.

Bromelioideae 33 Gattungen 740 Arten		Tillandsioideae 9 Gattungen 1066 Arten	Pitcairnioideae 16 Gattungen 946 Arten
Acanthostachys (2)	Hohenbergia (47)	Alcantarea (12)	Ayensua (1)
Aechmea (182)	Hohenbergiopsis (1)	Catopsis (17)	Brewcaria [✱] (2)
Ananas (8)	Lymania (6)	Glomeropitcairnia (2)	Brocchinia (21)
Androlepis (1)	Neoglaziovia (3)	Guzmania (167)	Connellia [✱] (5)
Araeococcus (6)	Neoregelia (97)	Mezobromelia (9)	Cottendorfia [✱] (1)
Billbergia (62)	Nidularium (50) *	Racinaea (60)	Deuterocohnia (14)
Bromelia (49)	Ochagavia (4) ***	Tillandsia (540)	Dyckia (124)
Canistropsis [✱] (12)*	Orthophytum (24)	Vriesea (193)	Encholirium [✱] (29)
Canistrum (10)	Portea (9)	Werauhia [✱] (66)	Fosterella (16)
Chevaliera (22)	Pseudaechmea [✱] (1)		Hechtia (51)
Cryptanthus (41)	Pseudananas (1)		Lindmania [✱] (38)
Deinacanthon (1)	Quesnelia (15)		Navia (98)
Disteganthus [✱] (3)	Ronnbergia (12)		Pepinia (68)
Edmundoa (3) *	Streptocalyx (20)		Pitcairnia (285)
Fascicularia (1) **	Ursulaea (2)		Puya (190)
Fernseea (2)	Wittrockia (11)		Steyerbromelia [✱] (3)
Greigia (32)			

Tab.1: Die Unterfamilien und Gattungen der Bromeliaceae mit der zugehörigen Artenzahl (in Klammern) nach SMITH & TILL (1998) unter Berücksichtigung der Arbeiten von LEME (1997, 1998*) sowie NELSON & ZIZKA 1997, ZIZKA et al. 1999**, 2002***. LEME stellt 2 Arten von *Canistrum* in die Gattung *Edmundoa* und Teile der Gattung *Nidularium* in die Gattung *Canistropsis* (✱ = Gattungen, die in dieser Studie nicht untersucht wurden).

Das Wurzelsystem der Bromeliaceae besteht, wie es für die Liliopsida typisch ist, aus Adventivwurzeln (sekundäre Homorhizie). Bei vielen epiphytisch lebenden Bromelien ist die Funktion der Wurzel als Organ für die Wasser- und Nahrungsaufnahme stark reduziert oder geht wie bei *Tillandsia usneoides* nach dem Keimlingsstadium sogar vollständig verloren. Die Wurzeln sind bei den Epiphyten meist hart, besitzen keine Wurzelhaare und dienen in erster Linie als Haftorgane. Bei Arten mit deutlichem Stamm finden sich Wurzeln, die zunächst innerhalb der Rinde wachsen (intracauline Adventivwurzeln, engl. „intracauline adventitious roots“; SMITH & TILL 1998).

Als Blütenstände finden sich Ähren oder Trauben bzw. aus diesen Typen zusammengesetzte Infloreszenzen. Bei einigen Arten findet eine Reduktion bis auf eine Blüte (z.B. *Tillandsia usneoides*) statt. Auffälliger Teil der Bromelieninfloreszenzen sind oft gefärbte Hoch- und Tragblätter, die z.T. die Anlockungsfunktion der Blüten übernehmen.

Die Blüten sind zwittrig und +/- radiärsymmetrisch, nur die Gattungen *Androlepis* und *Hechtia* sowie Vertreter von *Catopsis* sind eingeschlechtig bzw. funktionell eingeschlechtig. Das Perigon ist in einen äußeren und inneren Wirtel (Calyx und Corolla) mit je drei Sepalen bzw. Petalen gegliedert. Die Sepalen sind frei oder mehr oder weniger weit verwachsen. Die Petalen sind nur bei Vertretern der Gattungen *Cryptanthus*, *Greigia*, *Guzmania*, *Mezobromelia*, *Navia*, *Neoregelia* und *Nidularium* miteinander verwachsen, sonst frei.

Das Androeceum besteht aus zwei Kreisen zu je drei Staubblättern mit dorsi- oder basifixen Staubbeuteln und linearem, selten verlängertem Konnektiv. Das Gynoeceum besteht aus drei miteinander verwachsenen Karpellen. Typisch für die Familie sind Septalnektarien in den Scheidewänden des Fruchtknotens (s. dazu BÖHME 1988). Der Griffel ist zylindrisch und gerade oder entsprechend der Ausrichtung der Corolla gebogen (*Pitcairnia*-Arten).

Die Narbe (Stigma) ist unterschiedlich gebaut und besteht aus drei Narbenlappen, die frei oder +/- miteinander verwachsen sind. Die distalen Ränder bilden die rezeptive Narbenoberfläche. Es gibt z.B. einfach aufrechte (engl. „simple erect“), kelchförmige (engl. „convolute-blade“; z.T. papillöse) oder korallenförmige (engl. „coralliform“; nur bei *Tillandsia* Untergattung *Phytarrhiza*) Narben.

Diese Stigma-Strukturen sind von taxonomischer Relevanz und wurden von SCHILL et al. (1988) und BROWN & GILMARTIN (1984, 1989) bearbeitet.

Bromelienpollen sind im turgeszenten Zustand kugelig oder \pm ellipsoid. Basierend auf der Form der Keimstelle (Apertur) und der äußeren Pollenschicht (Exine) können verschiedene Grundtypen unterschieden werden. Monocolpate Pollen (mit einer langgestreckten Apertur) finden sich bei den Pitcairnioideae und Tillandsioideae. Bei den Bromelioideae finden sich auch runde Keimstellen oder Poren (sog. „porate Pollen“). Die Exine weist meist ein reticulates Muster auf. Bei einigen Arten finden sich Pollentetraden (z.B. *Androlepis skinneri*, *Hohenbergiopsis guatemalensis*).

Eine erste umfassende Bearbeitung der Pollenmorphologie lieferten EHLER & SCHILL (1973).

Die Bearbeitung von HALBRITTER (1992) schließt wesentlich mehr Arten und Gattungen ein.

HALBRITTER stützte sich bei ihren Untersuchungen auf nicht azetolysiertes Material und konnte daher wesentlich differenziertere Formen der Aperturausbildungen und des Übergangs zwischen Exine und Apertur erfassen.

Die wichtigsten Bestäuber der Bromelien sind Vögel. Dementsprechend überwiegt das ornithophile Syndrom mit „Papageienfarben“, Tagblütigkeit, reichlichem dünnflüssigem Nektar und fehlendem Duft. Weniger bedeutend sind Sphingophilie und Chiropterophilie. Selbstbestäubung findet sich bei Arten der Gattungen *Aechmea*, *Guzmania*, *Tillandsia* (v.a. Untergattung *Diaphoranthema*) und *Racinaea*. BROWN & GILMARTIN (1984) haben für *Tillandsia capillaris* (Untergattung *Diaphoranthema*) Kleistogamie nachgewiesen.

Der Fruchtknoten kann ober- oder unterständig sein. Im ersten Fall entwickelt er sich dann zu einer meist septiziden Kapsel (Tillandsioideae, Pitcairnioideae), im zweiten Fall zu einer Beerenfrucht (Bromelioideae).

Eine sehr bekannte Bromelienfrucht ist die *Ananas*, die einen Sonderfall darstellt: Hier handelt es sich um einen Sammelfruchtstand (Synkarpium), bei dem Blüten, Brakteen und Infloreszenzachse insgesamt fleischig werden.

Bromeliensamen sind klein und besitzen vielfach Anhängsel von taxonomischer Bedeutung. Die Samen der zoochoren Beerenfrüchte der Bromelioideae besitzen meist keine Anhängsel. Die der Pitcairnioideae sind feilspanförmig und in der Regel mit häutigen Anhängseln oder Hautrand versehen

(nicht appendiculat: *Navia*, *Pepinia*). Die Verbreitung erfolgt hier durch den Wind. Ebenfalls anemochor sind die Samen der Tillandsioideae, deren Besonderheit ein „Flugschirm“ aus ungefalteten, weißlichen Haaren am mikropylaren Pol ist. Eine Ausnahme findet sich in der Gattung *Catopsis* mit gefalteten Haaren am chalazalen Pol der Samen.

Bromeliaceae faszinieren durch ihre morphologische, ökologische und physiologische Plastizität. Ihre Vertreter besiedeln eine breite Palette von Lebensräumen, die von ariden Wüstenstandorten bis zu perhumiden Nebelwäldern reicht. Die Familie stellt einen beträchtlichen Teil der neotropischen Epiphytendiversität (artenreichste Gruppe nach den Orchideen; BENZING 1990) und hat in diesem extremen Lebensraum offensichtlich eine sehr erfolgreiche adaptive Radiation erfahren.

Grundlage dafür waren eine Reihe wichtiger Errungenschaften (Präadaptationen) im Laufe der Evolution: Zisternenhabitus, Sukkulenz und CAM (Crassulacean Acid Metabolism) sowie die einzigartigen Saugschuppen.

Aber auch die terrestrischen Vertreter der Familie haben sich - vor allem in Trockengebieten - erfolgreich etabliert.

Die vielzelligen, hoch spezialisierten Saugschuppen der Bromelioideae und Tillandsioideae stellen eine besondere Anpassung zur Aufnahme von tropfbar flüssigem Wasser durch die Blattoberfläche dar. Es handelt sich dabei um umgewandelte schildförmige Haare. Besonders hoch entwickelte Saugschuppen besitzen Vertreter der Tillandsioideen („graue“ oder „atmosphärische“ Tillandsien, Abb.2), die durch den dichten Besatz mit Saugschuppen grau oder weiß erscheinen.

Atmosphärische Tillandsien haben die Wasser- und Nährstoffaufnahme fast ganz auf die mit Saugschuppen besetzten Blätter verlagert. Der Bau der Saugschuppen, der mit seinen Schild- und Stielzellen mit einem Reißnagel verglichen werden kann, ermöglicht eine sehr effektive kapillare Wasseraufnahme (z.B. von kondensiertem Nebel oder Tau) über lebende Stiel- und Fußzellen in das Blattgewebe. Dadurch ist es vielen *Tillandsia*-Arten möglich, auch extrem aride Standorte zu besiedeln.

Dem Wasserstreß arider oder epiphytischer Standorte begegnen die Bromelien mit zwei Strategien: einem xeromorphen Bau zur Vermeidung von Austrocknung verbunden mit Blattsukkulenz, also einer Form der Wasserspeicherung „in der Pflanze“. Diese Anpassung ist oft verbunden mit CAM.

Eine zweite Strategie verfolgen die sogenannten Zisternenbromelien. Sie formen mit ihrer Blattrosette einen wasserdichten, nach oben offenen Behälter (Zisterne, engl. "tank"), in dem sich das Regenwasser sammelt. Eine Aufnahme von Wasser ist der Pflanze durch die Saugschuppen und durch sproßbürtige Wurzeln möglich. Diese kleinen Wasserkörper (sog. Phytotelmata) stellen aquatische Kleinstlebensräume dar, die eine reiche Fauna besitzen. Detritus und Tierleichen reichern nach

bakterieller Zersetzung Stickstoffverbindungen in der Zisterne an und verbessern die Nährstoffversorgung der epiphytischen Zisternenbromelien.



Abb.2: Graue Tillandsien in einem Trockenwald bei Comarapa, Bolivien (links), *Tillandsia samaipatensis* an einer Felswand in Samaipata, Bolivien (rechts).

Bemerkenswert ist die Besiedelung von Bromelientrichtern mit Insektivoren der Gattung *Utricularia* (Lentibulariaceae). Diese wurzellosen Schwimmpflanzen fangen kleine Wassertiere mit speziellen Schluckfallen, die sie an ihren zerschlitzen Blättern tragen. *Utricularia humboldtii* findet sich in Trichtern von *Brocchinia tatei* und *U. reniformis* und *U. nelumbifolia* zeigen ein interessantes Verbreitungsmuster mit der Bevorzugung von Zisternen der Gattungen *Vriesea* oder *Alcantarea* auf Granitfelsen nahe Rio de Janeiro in Brasilien (BENZING 2000).

Einige Arten haben über diese Präadaptationen hinaus auch den Schritt zur Carnivorie bewältigt (z.B. *Catopsis berteroniana*, *Brocchinia reducta*).

Während die Physiologie der Familie recht gut untersucht ist, gibt es im Bereich der Systematik und Phylogenie große Defizite.

Dies war der Grund für die vorliegende Untersuchung.

1.2 Rekonstruktion der Phylogenie der Bromeliaceae - ein Überblick

Die Monophylie der Bromeliaceae ist heute allgemein anerkannt und wird durch alle neueren molekularsystematischen Untersuchungen gestützt (CHASE et al. 1993, 1995a, 1995b, 2000, CLARK et al. 1993, DUVALL et al. 1993, LINDER & KELLOGG 1995, GIVNISH et al. 1999).

Problematisch ist aber immer noch sowohl die großsystematische Stellung der Familie als auch ihre Gliederung auf Gattungsniveau und darüber. In beiden Fällen haben neueste molekularsystematische Untersuchungen überraschende Erkenntnisse geliefert. Eindeutig ist, dass die Bromeliaceae innerhalb der Monokotylen (Liliopsida) einen gut charakterisierten Verwandtschaftskreis darstellen, der aber an keine andere Familie unmittelbar anzuschließen ist.

Dem wird vielfach mit der Einordnung in einer monotypischen Ordnung Bromeliales Rechnung getragen. Die Stellung der Familie auf höherem taxonomischen Niveau ist immer noch ungeklärt. Vor Einbeziehung molekularer Marker stützte sich die systematische Gliederung im Wesentlichen auf morphologische, anatomische und mikromorphologische Merkmale sowie auf chemische Inhaltsstoffe: während CRONQUIST (1981) Bromeliales und Zingiberales in die Unterklasse Zingiberidae stellte, fassen DAHLGREN et al. (1985) die Bromeliales mit Typhales, Phylidrales, Haemodorales, Pontederiales und Velloziales in der Überordnung Bromeliiflorae zusammen.

Bei THORNE (1992) sind die Bromeliales dagegen Bestandteil der Commelinanae.

Basierend auf einer kladistischen Analyse morphologischer Merkmale stuften BROWN & GILMARTIN (1987) die Velloziaceae als nächstverwandte Familie der Bromeliaceae ein. Zwischen Vertretern beider Familien gibt es gewisse Ähnlichkeiten in Habitus und Blütenbau. In diesem Zusammenhang bemerkenswert ist die Tatsache, dass die isoliert stehende Art *Ayensua uaipanensis* von den Tepuis Venezuelas zunächst als Art der Velloziaceen-Gattung *Barbacenia* beschrieben wurde (MAGUIRE & WURDACK 1957, AYENSU 1969, SMITH 1969, HORRES & SCHNEIDER 1996).

Eine wesentliche Veränderung der Sichtweise brachten molekularsystematische Daten. In der Klassifikation der APG (1998), basierend auf einer kombinierten Analyse chloroplastidärer (*rbcL*, *atpB*) und nukleärer Sequenzen (18S rDNA), sind die Bromeliaceae ein Teil des „Commelinoid clade“, nehmen hier jedoch eine isolierte Stellung ein. Sie konnten keiner der 40 aufgestellten Ordnungen direkt zugeordnet werden, zeigen aber auf der Basis des Sequenzvergleiches eine Nähe zu den Ordnungen Arecales, Poales, Zingiberales und Commelinales. Als Schwestergruppen kommen Mayacaceae und Rapataceae in Frage, nicht jedoch die Velloziaceae. Letztere finden sich in dieser Phylogenie als Bestandteil der Ordnung Pandanales relativ „weit entfernt“.

Vergleichende Studien von *rbcL*-Daten weisen auf eine nahe Verwandtschaft zu den Rapataceae und Mayacaceae (CHASE et al. 1993, CLARK et al. 1993) sowie zu den Commelinaceae (DUVALL et al. 1993) hin.

In einer Studie zur Phylogenie der Commelinoids fanden LINDER & KELLOGG (1995) sowohl auf der Basis von *rbcL*-Daten als auch in ihrer kombinierten Analyse dieses Datensatzes mit morphologischen Daten eine Schwestergruppenbeziehung der Bromeliaceae zu den Poales, Cyperales und Typhales. Die breiter angelegte Studie von GIVNISH und Koautoren aus dem Jahre 1999 untersucht die Commelinales und Commelinidae erneut, um offene Fragen zur Monophylie der Commelinales und ihre Einordnung innerhalb der Liliopsida zu klären. Die anhand von *rbcL*-Sequenzen berechneten Phylogenien vergleichen die Autoren mit morphologischen, anatomischen, chemischen, cytologischen, ökologischen und biogeographischen Befunden. Einbezogen waren 7 Arten der Bromeliaceae (entsprechend der Studie von DUVALL et al. 1993), vier Arten aus vier Gattungen der Rapataceae und *Mayaca fluviatilis* (Mayacaceae). Nach diesen Ergebnissen bilden Mayacaceae und Bromeliaceae die Schwestergruppe der Rapataceae. Doch diese Beziehung ist statistisch schwach mit nur 28% „Jackknife support“ unterstützt.

Schon in ihren Studien von *rbcL*-Daten bzw. kombinierten Analysen von *rbcL*- und morphologischen Merkmalen (CHASE et al. 1995b, 1995a) fanden sich Hinweise auf eine engere Verwandtschaft der Bromeliaceae und Poaceae. Auf der Datenbasis der kombinierten Analyse von einem nukleären (18S rDNA) und zwei chloroplastidären Sequenzdatensätzen (*rbcL*, *atpB*) fanden CHASE et al. (2000) schließlich weitere Belege für die Verwandtschaft von Bromeliaceae und den Poales (Abb.3). Die Mayacaceae sind diesen Daten zufolge Schwestergruppe der Cyperaceae, Juncaceae und Thurniaceae, während die Rapateaceae die Schwestergruppe der Poales (incl. der Bromeliaceae) bilden.

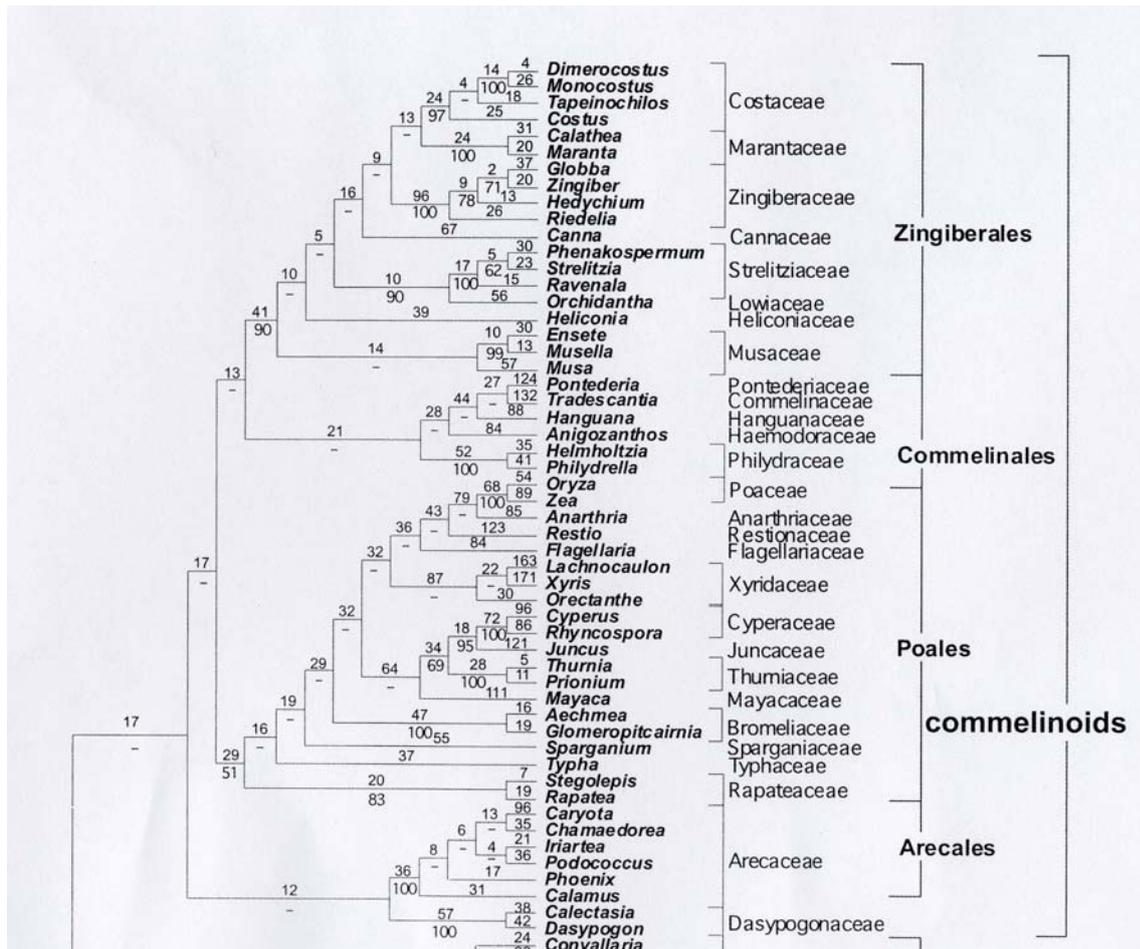


Abb.3: Analyse zur suprafamiliären Gliederung der Liliidae. Darstellung der Beziehungen der Asparagales und Commelinoids. Der kürzeste Baum, der bei einer Maximum Parsimonie-Analyse mit PAUP 4.0d64 gefunden wurde (Favorisierte Topologie nach Gewichtung und schrittweiser Näherung (engl. „successive approximation weighting“ SW, FARRIS 1969). Die Benennung der Ordnungen und Familien folgt weitgehend der in APG 1998. Die Bromeliaceae sind demnach, ebenso wie die Typhaceae und Sparganiaceae, klar den Poales zuzuordnen. Die Mayacaceae sind Schwestergruppe der Cyperaceae, Juncaceae und Thurniaceae. Die Rapateaceae sind Schwestergruppe der gesamten Poales (incl. der Bromeliaceae). Aus: CHASE et al. 2000: Fig.3B, S.9 (Ausschnitt ohne die Asparagales im unteren Teil des Baumschemas).

Auch in der Studie von STEVENSON et al. (2000), einer kombinierten Analyse von 152 morphologischen Merkmalen, chloroplastidären Sequenzen (*rbcL*), mitochondrialen Sequenzen (*atpA*) und Restriktionsfragmenten des „inverted repeat“ (IR, Abb.6) des Chloroplastengenoms, finden sich die Bromeliaceae (nur 1 Art untersucht: *Catopsis*) auf einem Ast mit den Poaceae, Rapateaceae, Sparganiaceae, Typhaceae, Eriocaulaceae und Xyridaceae.

Während die Analyse unterschiedlicher molekularer Marker - auch in Kombination mit weiteren Merkmalen - zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Schwestergruppe(n) der Bromeliaceae führt, kann die vergleichsweise isolierte Stellung dieser Familie als gesichert gelten.

Die Frage der großsystematischen Stellung der Bromeliaceae war für die vorliegende Untersuchung nur im Zusammenhang mit der Auswahl der Außengruppe(n) für die kladistischen Analysen von Bedeutung. Nach dem damaligen Kenntnisstand wurden Arten der Velloziaceae und Rapataceae untersucht und in die Analysen als Außengruppe einbezogen. Material von Mayacaceae stand für molekulare Untersuchungen nicht zur Verfügung.

1.3. Intrafamiliäre Gliederung der Bromeliaceae

Nach einer wechselvollen Geschichte der Zuordnung heutiger Bromeliaceae-Gattungen zu verschiedenen Gruppen der Monokotylen wurde die Familie Bromeliaceae 1805 von SAINT-HILAIRE begründet. Bei nachfolgenden Bearbeitern, z.B. noch bei REICHENBACH (1828/29), werden in der Familie Bromeliaceae Gattungen zusammengefaßt, die heute ganz anderen Monokotylen-Familien zugeordnet werden. Eine Unterteilung in drei Triben findet sich schon bei BENTHAM & HOOKER (1883). Ein wichtiger Fortschritt für die Bromeliaceae-Systematik war die Revision von BAKER (1889). Er unterteilte die Familie basierend auf der Stellung des Ovariums, des Fruchttyps und blattmorphologischen Merkmalen in drei Triben (Bromelieae, Pitcairnieae und Tillandsieae). Die von ihm akzeptierten 31 Gattungen charakterisierte er im Wesentlichen anhand von Blütenmerkmalen.

Meilensteine der Bromeliaceen-Systematik sind die Revisionen der Familie von MEZ (1896, 1934/35) und von SMITH & DOWNS (1974-1979), die sich in vielen Teilen decken. MEZ (1896) berücksichtigte schon Pollenmerkmale und Samenmorphologie und unterteilte zunächst die von BAKER (1889) eingeführten Triben in Subtriben; in der späteren Revision von 1934/35 findet sich dann - ebenso wie bei SMITH & DOWNS (1974-1979) - die Unterteilung in die drei Unterfamilien Pitcairnioideae (mit den Triben Pitcairnieae, Puyeeae, Navieae), Tillandsioideae und Bromelioideae.

Seit Jahrzehnten hat sich diese Gliederung der Familie in Unterfamilien durchgesetzt und wurde durchgehend in der Bromelienliteratur verwendet. Die Abgrenzung von Triben fand dagegen keine solche Zustimmung.

Eine erwähnenswerte Abweichung ist die Sichtweise von HARMS (1930), der die Sonderstellung der Gattung *Navia* durch Aufstellung einer vierten Unterfamilie Navioideae dokumentierte. Damit vergleichbar ist das Konzept von HUTCHINSON (1973).

Eine aktualisierte Zusammenstellung der Kenntnisse über die Familie zu Anfang der 90er Jahre geben SMITH & TILL (1998). Diese Bearbeitung reicht allerdings nur bis zum Gattungsniveau und wurde vor dem Erscheinen der meisten heute vorliegenden molekularen Untersuchungen erstellt. Bemerkenswert ist, dass diese Autoren innerhalb der Pitcairnioideae wieder die Triben Brocchinieae, Pitcairnieae (mit Einbeziehung der Gattung *Navia*) und Puyeeae unterscheiden.

Sucht man in der Literatur weitergehende Hypothesen zur Phylogenie der Familie, so fehlten diese bis vor kurzem fast völlig. Eine Ursache dafür ist sicher die große morphologische Plastizität der Bromelien, so dass sich anhand der „klassischen“ Merkmalskomplexe keine überzeugenden Phylogenien entwickeln ließen.

Eine der wenigen Ausnahmen sind die Untersuchungen von GILMARTIN & BROWN (1986) zur Phylogenie der Gattung *Tillandsia* (Subgenus *Phytharrhiza*) und die kladistischen Analysen von VARADARAJAN & GILMARTIN (1988a). Letztere leiten aus ihren Untersuchungen eine Gliederung der Pitcairnioideae in die Triben Brocchinieae, Pitcairnieae und Puyeeae ab (VARADARAJAN & GILMARTIN 1988b).

Erwähnenswert ist auch die Arbeit von ROBINSON (1969), der die vegetativen Merkmale (insbesondere Blattanatomie) der Gattungen *Connellia*, *Cottendorfia* und *Navia* eingehend untersuchte. Seine Ergebnisse vergleicht er mit den Merkmalen anderer Pitcairnioideae-Gattungen, von denen er in der Regel eine bis mehrere Arten bearbeitete. Anhand der vegetativen Merkmale erstellte ROBINSON einen Bestimmungsschlüssel. Er gliederte die Pitcairnioideae auf der Basis ihrer Blattanatomie in drei Gruppen:

- **Dyckia-Typ:** keine scharfe Abgrenzung von Wasserspeichergewebe (WG) und Assimilationsparenchym (AP).
- **Navia-Typ:** scharfe Abgrenzung von WG und AP. Die Leitbündel (LB) sind vom AP bedeckt (nur LB 1. Ordnung können in das WG reichen).
- **Cottendorfia-Typ:** säulenartige Ausbildung des AP zwischen den LB zur adaxialen Seite hin. Die Zellen des Wassergewebes grenzen an die Leitbündel.

Diese Arbeit greifen ROBINSON & TAYLOR 1999 wieder auf und stellen in Ablehnung der Gliederung der Pitcairnioideae von VARADARAJAN & GILMARTIN (1988b) nur zwei Triben auf:

Die **Pitcairnieae** (unter Einbeziehung der Brocchinieae sensu VARADARAJAN & GILMARTIN 1988b) mit scharfer Abgrenzung von WG und AP und die neue Tribus **Dyckieae** für die Gattungen ohne scharfe Abgrenzung zwischen dem AP (Chlorenchym) und dem adaxialen WG (*Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Encholirium* und *Hechtia*).

Seit dem Erscheinen der Monographie von SMITH & DOWNS (1974-1979) wurden zwar bis heute mehr als 500 Arten und eine Reihe von Gattungen in allen drei Unterfamilien neu beschrieben (siehe hierzu auch Übersicht Tab.1), die Defizite unserer Kenntnis der Phylogenie sind jedoch geblieben. In diesem Zusammenhang steht auch das Fehlen eines für die ganze Familie anwendbaren Gattungskonzeptes, was sich gerade in den letzten Jahren durch nomenklatorische Instabilität im Gattungsbereich niederschlägt.

Dies wird am Beispiel der Unterfamilie Bromelioideae deutlich. Sie umfasst derzeit 33 Gattungen (Tab.1). Drei Gattungen wurden nach der letzten Revision (SMITH & DOWNS 1974-1979) neu beschrieben: *Lymania* (READ 1984; Neubeschreibungen und Bearbeitung durch LEME 1989), *Pseudaechmea* (SMITH & READ 1982) und *Ursulaea* (READ & BAENSCH 1994).

Nach der Bearbeitung der Gattung *Cryptanthus* durch RAMIREZ (1996, 2000) erhöhte sich die Zahl der bekannten Arten auf 41 (bei SMITH & DOWNS 1978: 20 Arten). *Cryptanthus duartei* wurde von LEME (1995) zu *Orthophytum* gestellt (= *O. supthutii*).

Im Glauben, dass die Gattung *Aechmea* ein künstliches Taxon ist, erhoben SMITH & KRESS (1989, 1990) die acht Untergattungen von *Aechmea* auf Gattungsrang. SMITH & SPENCER vereinigten 1992 *Streptocalyx* mit *Aechmea* s.str., weil sie das Fehlen oder Vorhandensein von Schuppen an der inneren Basis der Petalen (Ligulae; engl. "petal appendages") als einziges Unterscheidungsmerkmal nicht länger als Rechtfertigung für den Gattungsstatus erachteten. Diese Vorgehensweise - das Umkombinieren ohne eine kritische, umfassende Untersuchung der betreffenden Arten - wurde von BROWN et al. (1993) als nicht akzeptabel kritisiert.

Mit der Nutzung molekularer Marker für systematisch-phylogenetische Fragestellungen hat sich die Situation in den letzten Jahren geändert. Für die Revision der morphologischen, anatomischen, mikromorphologischen, cytogenetischen und biogeographischen Daten stehen mit den molekularen Markern neue wichtige Informationsquellen zur Verfügung.

Erste Untersuchungen bei Bromeliaceae befaßten sich mit Restriktionsfragmentanalysen des Chloroplastengenoms (RANKER et al. 1990, GIVNISH et al. 1990) und erarbeiteten auf dieser Datenbasis Phylogenien. Die Ergebnisse der Untersuchungen weichen allerdings z.T. von unserem heutigen Kenntnisstand ab. Wesentlicher Nachteil dieser frühen Arbeiten war die geringe Zahl untersuchter Sippen (RANKER et al. 1990: 10 Arten / 9 Gattungen, GIVNISH et al. 1990: wenige Arten / 7 Gattungen).

Mit der rasanten Entwicklung der molekularen Methoden stiegen die Zahl der untersuchten Marker und die Größe der Stichprobe (d.h. die Zahl untersuchter Bromeliaceae-Arten) an. Sequenzdaten lagen zuerst vom *rbcL*-Gen vor (CLARK & CLEGG 1990, CLARK et al. 1993, DUVALL et al. 1993, BEHNKE et al. 2000). Später folgten Untersuchungen der Marker *ndhF* (TERRY et al., 1997a,b) und *matK* (CRAYN et al. 2000). Mit Ausnahme der Arbeiten von CRAYN et al. (2000; 40 Arten / 15 Gattungen, davon Pitcairnioideae: 36/11), TERRY et al. (1997a; 30 Arten / 29 Gattungen aus allen drei Bromeliaceae-

Unterfamilien; 1997b: 25 Arten / 6 Gattungen, nur Tillandsioideae) sowie BEHNKE et al. (2000; 11 Arten / 11 Gattungen) beziehen diese Studien nur wenige Bromeliaceae-Taxa ein bzw. berücksichtigen nur eine oder wenige Arten pro Gattung (siehe Übersicht Tab.2).

Einen bemerkenswerten Sonderfall stellt die Studie von GIVNISH et al. (1997) zur Adaptiven Radiation der Gattung *Brocchinia* (Pitcairnioideae) dar. Sie untersuchten 15 der nach SMITH & TILL (1998) 21 Arten umfassenden Gattung *Brocchinia* aus dem Guayana-Hochland sowie je einen Vertreter der Gattungen *Brewcaria*, *Lindmania* und *Navia*. Zum ersten Mal konnten hier bei einigen Arten bis zu 4 Herkünfte (Akzessionen) untersucht werden, insgesamt stand Material aus 27 Populationen zur Verfügung. Morphologische und ökologische Merkmalskomplexe sowie darauf basierende phylogenetische Rekonstruktionen wurden mit den anhand molekularer Daten (Restriktionsfragmentanalysen chloroplastidärer und nukleärer, ribosomaler DNA) ermittelten Phylogenien verglichen.

GIVNISH et al. (1997) konnten zeigen, dass sich Merkmalskomplexe wie Zisternenhabitus, Karnivorie, Myrmekophilie und Stammbildung / baumförmiger Wuchs mehrfach unabhängig innerhalb der Gattung *Brocchinia* entwickelten und sich deutliche Korrelationen zu der Verbreitung und dem Ökotyp der jeweiligen Arten herstellen lassen. Zwei Schlüssel-Innovationen, die Nährstoffaufnahme mit Hilfe spezialisierter Saugschuppen und den Zisternenhabitus (*Brocchinia* ist die einzige Gattung der Pitcairnioideae mit Zisternenhabitus), sehen die Autoren als die wichtigsten Faktoren für die Adaptive Radiation der Gruppe im Guayana Hochland an.

Wegen der in der Gruppe festgestellten Homoplasie wäre nach Meinung von GIVNISH et al. (1997) ohne die Analyse molekularer Merkmale ein Verständnis der Adaptiven Radiation bei *Brocchinia* nicht möglich gewesen.

Alle bisherigen Untersuchungen von DNA-Markern bei Bromeliaceae hatten mit drei grundsätzlichen Schwierigkeiten zu kämpfen:

1. Die untersuchte Artenzahl ist angesichts der Größe der Familie ungenügend. Wichtige, wahrscheinlich isoliert stehende Sippen konnten wegen fehlendem Material nicht einbezogen werden. Kaum untersucht ist bisher die Unterfamilie der Bromelioideae.
2. Alle vorliegenden Untersuchungen stützen sich auf Marker im Chloroplastengenom. Die aus den Sequenzdaten errechneten Phylogenien spiegeln also nicht zwangsläufig die Phylogenie der Arten wider.
3. Die Variabilität der bisher analysierten Sequenzen ist außerordentlich gering. Eine geringe Zahl an informativen Merkmalen (Synapomorphien) führt zu schlecht aufgelösten oder schwach gestützten Phylogenien.

Molekulare Daten		
Autor(en)	Untersuchter Marker	Untersuchte Gattungen/Arten der Bromeliaceae
RANKER et al. (1990)	Restriktionsfragmentanalyse (chloroplastidäre DNA)	9/10 (T: 4/5, P: 3/3, B: 2/2)
GIVNISH et al. (1990)	Restriktionsfragmentanalyse (chloroplastidäre DNA)	7/7
CLARK & CLEGG (1990)	<i>rbcL</i>	3/3 ?
CLARK et al. (1993)	<i>rbcL</i>	7/7
DUVALL et al. (1993)	<i>rbcL</i>	7/7 (T: 3/3, P: 2/2, B: 2/2)
TERRY & BROWN (1996)	<i>ndhF</i>	30/51 (T: 7/28, P: 8/8, B: 15/15)
GIVNISH et al. (1997)	Restriktionsfragmentanalyse (chloroplastidäre & nukleäre, ribosomale DNA)	4/19 (nur Pitcairnioideae, v.a. <i>Brocchinia</i>)
TERRY et al. (1997a)	<i>ndhF</i>	29/30 (T: 6/7, P: 8/8, B: 15/15)
TERRY et al. (1997b)	<i>ndhF</i>	6/ 25 nur Tillandsioideae
BEHNKE et al. (2000)	<i>rbcL</i>	11/11 (T: 2/2, P: 5/5, B: 4/4)
CRAYN et al. (2000)	<i>matK</i>	15/40 (T: 3/3, P: 11/36, B: 1/1)
HORRES et al. (2000)	<i>trnL</i> -Intron	32/62 (T: 7/23, P: 9/19, B: 16/20)
Morphologisch-anatomische Daten		
VARADARAJAN & GILMARTIN (1988)		17/17 (P: 16/16, T: 1/1)
BROWN & LEME (2000)		8/102 (nur Bromelioideae)

Tab.2: Phylogenetische Rekonstruktionen der Bromeliaceae auf der Basis molekularer Daten und morphologisch-anatomischer Untersuchungen, T = Tillandsioideae, P = Pitcairnioideae, B = Bromelioideae.

1.4 Problemstellung

Ziel meiner Arbeit war es, geeignete molekulare Merkmale zu finden und diese zu untersuchen, um neue Hypothesen zur Phylogenie der Bromeliaceae zu erarbeiten. Die Untersuchung einer möglichst großen Artenzahl und die Einbeziehung seltener, bisher nicht erfasster Vertreter (z.B. *Ayensua uaipanensis*) sollten dazu beitragen, eine möglichst umfassende, aussagekräftige Phylogenie zu erstellen.

Bei der Auswahl der molekularen Marker war die Einbeziehung eines Markers aus dem Kerngenom anzustreben, um die Schwachstellen einer nur auf chloroplastidäre Marker gestützten Phylogenie zu beseitigen.

Da die Untersuchungen sich über mehrere taxonomische Ebenen erstrecken sollten (infraspezifisch bis supragenerisch), waren auch im Bereich der Arten und Populationen geeignete Marker zu ermitteln.

Nach der vorliegenden Literatur war in diesem Bereich mit dem Instrument der vergleichenden Sequenzierung keine befriedigende Auflösung zu erwarten. Es zeichnete sich ab, dass hier Fragmentanalysen als geeignete Methoden in Frage kommen.

Neben diesen grundsätzlichen Überlegungen zur Markerauswahl war die Optimierung geeigneter DNA-Isolationsmethoden und -Aufreinigungsprotokolle sowie die Erstellung geeigneter PCR-Strategien zur Amplifikation der ausgewählten Marker Teil der Untersuchung.

Unabhängig von diesen methodischen Fragestellungen war die Auswahl der zu untersuchenden Arten entscheidend für die Aussagefähigkeit der Studie. Zunächst war davon auszugehen, dass auch hier nur ein Bruchteil der Arten der Familie bearbeitet werden konnte. Es sollten aber deutlich mehr Arten und Gattungen einbezogen werden als bei allen bisher vorliegenden Arbeiten. Aufbauend auf die vorliegende Systematik war es das Ziel, mindestens eine Art jeder Gattung, nach Möglichkeit mindestens zwei Arten einzubeziehen. Die bisher kaum oder gar nicht untersuchten Verwandtschaftskreise (z.B. *Ayensua uaipanensis*, diverse Bromelioideae) und die „Problemgruppen“ der klassischen Bromeliensystematik wurden bei der Artenauswahl dann schwerpunktmäßig berücksichtigt. So z.B. die polyphyletische, 182 Arten umfassende Gattung *Aechmea*. Ein weiterer pragmatischer Aspekt war die Abstimmung mit anderen Bromelien-Arbeitsgruppen (s.u. Kap. 1.5.2), die u.a. zu verstärkter Bearbeitung der Bromelioideae führte.

Neben der Rekonstruktion einer Phylogenie der Bromeliaceae war es ein weiteres Ziel meiner Arbeit, im Abgleich mit in der Arbeitsgruppe durchgeführten morphologisch-anatomischen Untersuchungen und meinen molekularen Daten in ausgewählten Gruppen ein verlässlicheres Gattungskonzept zu entwickeln.

Oft lassen sich gerade Fragen zur Art- und Gattungsabgrenzung wegen fehlender Erfassung der morphologischen Merkmalsvariabilität in vielen Gruppen der Bromeliaceae nur unzureichend beantworten. Deutlich wird dies an der Statistik der Abb.4, erhoben aus der letzten Monographie der Unterfamilie der Bromelioideae (SMITH & DOWNS 1979). Bei mehr als 150 der insgesamt 553 untersuchten Arten basiert die Beschreibung nur auf der Bearbeitung des Typusbeleges.

Molekulare Marker stellen neben umfassenden klassischen Revisionen mit genauer Erfassung der morphologischen und anatomischen Merkmalsvariabilität unverzichtbare Informationsquellen zur Klärung von systematischen und phylogenetischen Fragestellungen dar.

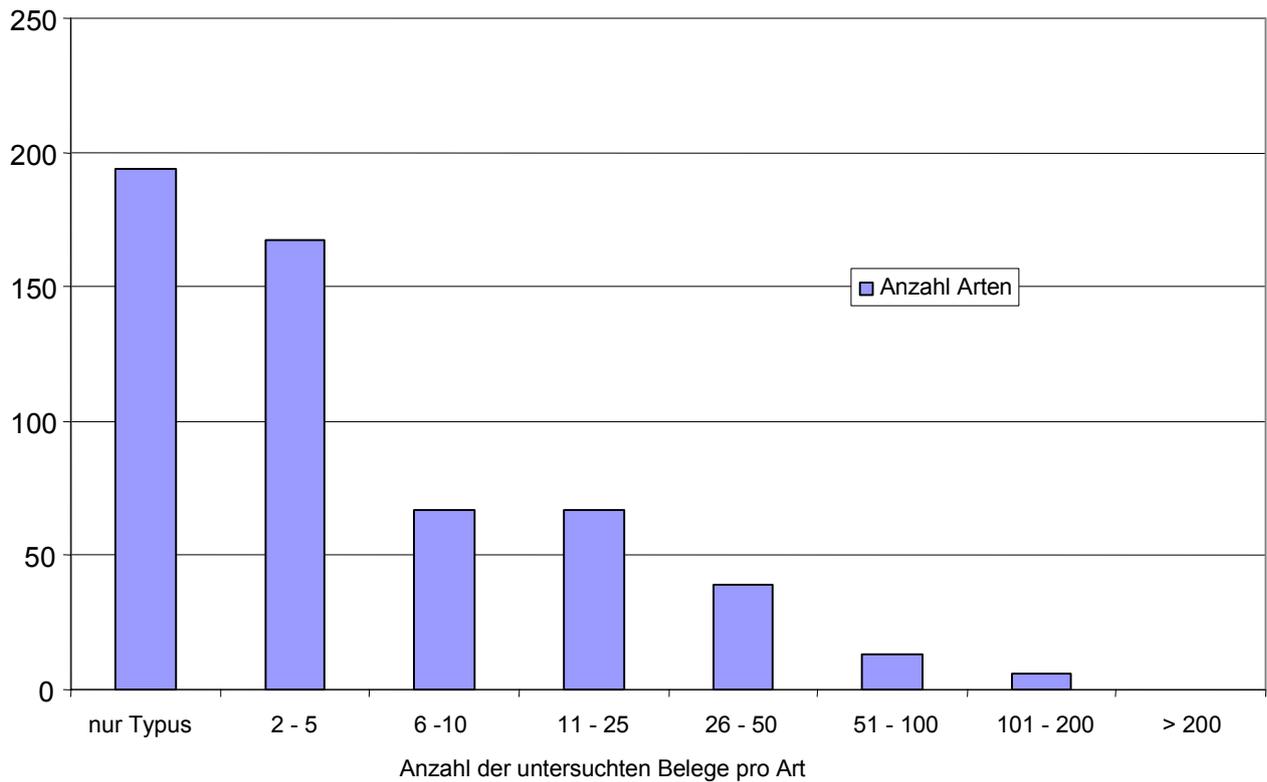


Abb.4: Untersuchte Belege pro Art der für die Flora Neotropica bearbeiteten 553 Arten der Unterfamilie Bromelioideae (Daten erhoben aus SMITH & DOWNS (1974, 1977, 1979; Vol.3: 1979). Für mehr als 150 der beschriebenen Arten lag nur der Typusbeleg vor.

1.5 Konzeption der Untersuchungen

1.5.1 Auswahl der molekularen Marker

1.5.1.1 Sequenzanalysen

Bromelien verfügen über ein relativ kleines Genom. Für *Ananas* wurden 441-526 Mbp (1C-Wert) fluoreszenzspektroskopisch bestimmt (ARUMUGANATHAN & EARLE 1991, BENNETT & LEITCH 1995, 2003).

Anhand einschlägiger Originalarbeiten wurde die Auflösung der üblicherweise verwendeten Marker bewertet und eine entsprechende Auswahl für die Sequenzanalysen und Fragmentanalysen getroffen. Für vergleichende taxonomische Untersuchungen sollte der ausgewählte Marker für Sequenzanalysen folgende Kriterien erfüllen:

- eine ausreichende Länge mit entsprechendem Informationsgehalt (als optimal werden Sequenzdivergenzen von 5 bis 15% angesehen)
- ein möglichst einfaches, zweifelsfreies Alignment
- orthologe Sequenzen (hier liegt der große Vorteil von Chloroplasten-Genen, da sie als einheitliche Rekombinationseinheit vererbt werden)

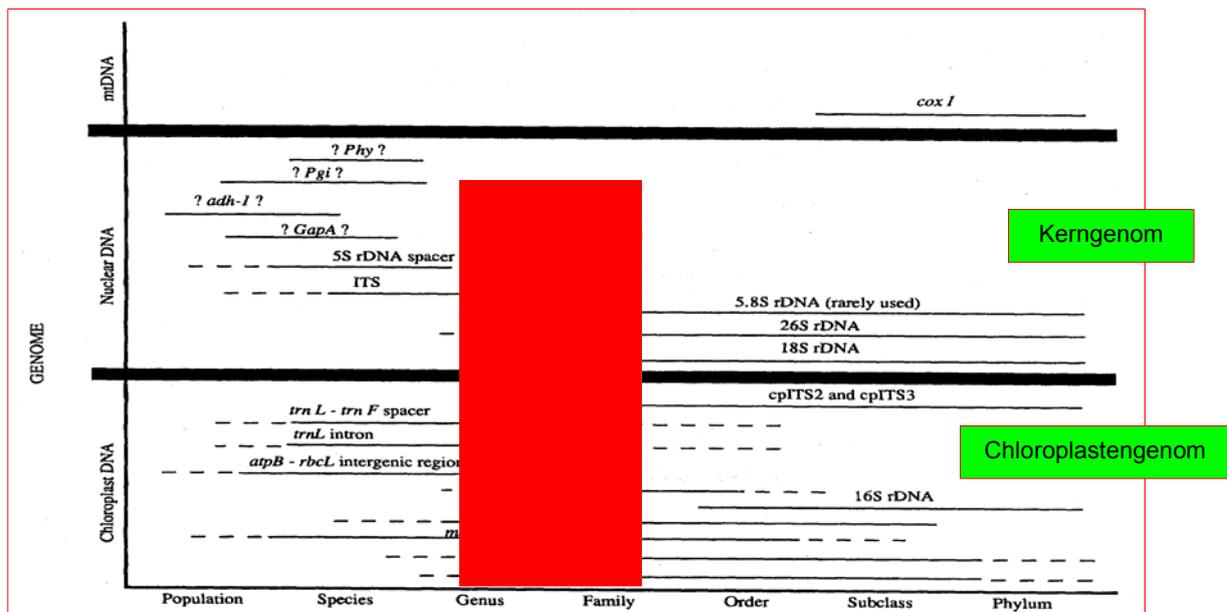


Abb.5: Eignung von Sequenzdaten zur Charakterisierung taxonomischer Rangstufen. Rot hervorgehoben sind die Rangstufen Gattung und Familie, für die derzeit keine geeigneten Marker des Kerngenoms verfügbar sind (aus: SOLTIS et al. 1998, verändert).

Die Übersicht der Abb.5 zeigt die oft in systematischen Studien verwendeten Sequenzen und ihre Auflösung auf verschiedenen taxonomischen Ebenen. Die bisher am häufigsten verwendeten Sequenzen des Kerngenoms sind 26S rDNA Sequenzen und ITS, die "internal transcribed spacer"-Bereiche (ITS 1 & ITS 2).

Von den Markern des Chloroplastengenoms wurden auf höheren taxonomischen Ebenen (oberhalb der Familie) für die Samenpflanzen vor allem vergleichende Sequenzierungen des *rbcL*-Gens, das die große Untereinheit der RubisCO (Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase) kodiert, herangezogen.

Ein Chloroplast enthält im Stroma - je nach Größe und Alter - zwischen 10 und 200 identische DNA-Kopien, hat also eine polyploide Konstitution. Die Kodierungskapazität des als typisch geltenden Tabak (*Nicotiana*)-Chloroplasten-Genoms liegt bei 113 verschiedenen Genen (SUGIURA 1992).

Bei einer typisch strukturierten Plastiden-DNA findet sich ein großer und ein kleiner unikaler Sequenzabschnitt (engl. „large single copy“, LSC, sowie „small single copy“, SSC). Diese Bereiche werden von zwei längeren Sequenzabschnitten, die sich in inverser Orientierung wiederholen (engl. „inverted repeat“, IR), getrennt. Im Bereich der IRs finden sich neben Genen der tRNAs und einigen Polypeptiden vor allem alle Sequenzen für die plastidalen Ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNAs) in der Anordnung: 16S, 23S, 4,5 S und 5 S.

Die Mehrzahl der Angiospermen-Arten weist uniparental mütterliche Plastiden-Vererbung auf.

Biparentale Plastiden-Vererbung wurde nur bei wenigen Gattungen sicher nachgewiesen: bei *Pelargonium*, *Oenothera*, *Hypericum*, *Medicago*, *Rhododendron* und *Plumbago*.

Uniparental väterliche Vererbung ist erst selten bei einigen Gattungen der Gymnospermen nachgewiesen worden, z.B. bei *Pseudotsuga*, *Pinus* und *Larix*.

Für den Bereich der Gattungen (in Abb.5 rot markiert) sind bisher keine geeigneten Bereiche des Kerngenoms verfügbar. Auch auf dieser taxonomischen Rangstufe wurden Marker des Chloroplastengenoms erfolgreich eingesetzt.

Die zu fordernde hohe Variabilität auf Gattungsniveau bieten nichtkodierende chloroplastidäre Sequenzdaten, die in neuerer Zeit zunehmend für taxonomisch systematische Fragestellungen verwendet werden (OLMSTEAD & PALMER 1994). Neben dem *atpB-rbcL* intergenischen Spacer sind dies besonders 3 Marker aus dem *trnT-trnL-trnF*-Bereich (TABERLET et al. 1991). Letztere erwiesen sich auf infragenerischer Ebene und bei nah verwandten Gattungen als informativ (v.a. BÖHLE 1996, CROS 1998, GIELLY & TABERLET 1996, MCDADE & MOODY 1999, RENNER 1999, SCHWARZBACH & RICKLEFS 2000).

Nach den Erkenntnissen aus verschiedenen vollständig sequenzierten Chloroplastengenomen (z.B. SUGIURA 1992) liegen die drei ausgewählten tRNA-Gene hintereinander angeordnet auf der großen "Large single Copy" (siehe Abb.6 und 7).

Für vergleichende Sequenzierungen fiel die Wahl auf das *trnL*-Intron und die intergenischen Spacer *trnT-trnL* und *trnL-trnF*. Für diese Marker sind von TABERLET et al. (1991) entwickelte universelle Primer verfügbar (Abb.7).

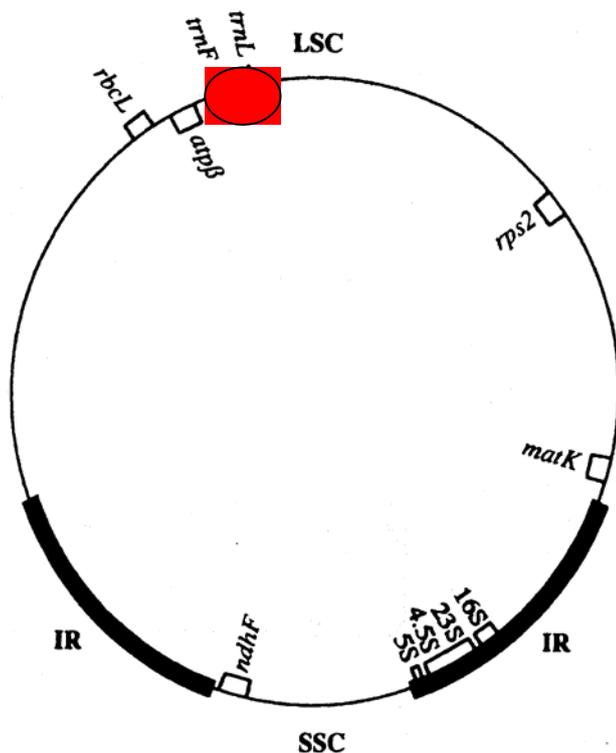
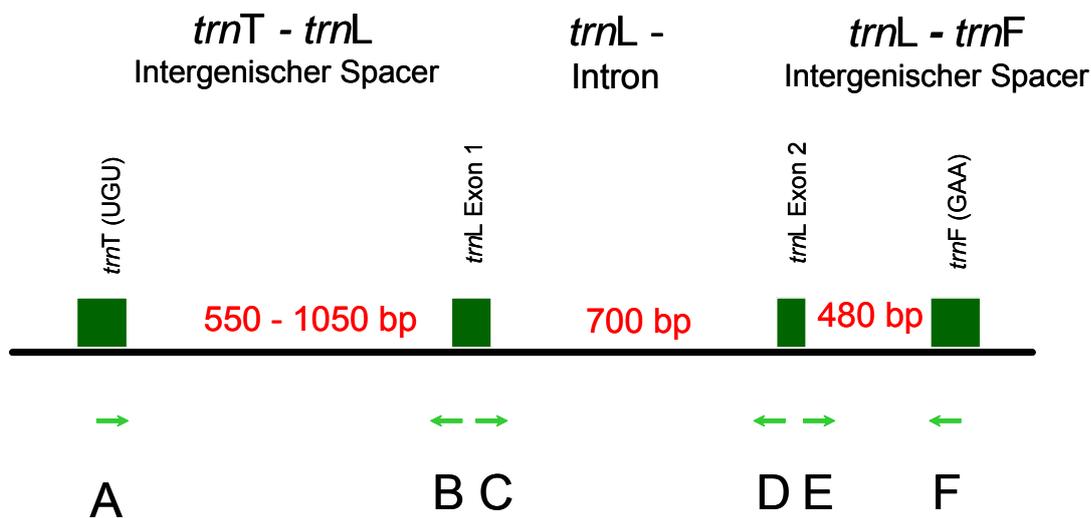


Abb.6: Schematische Darstellung des Chloroplastengenoms: Die für Studien zur Systematik und Phylogenie am häufigsten verwendeten Regionen sind kartiert. Der *trnT-trnL-trnF*-Bereich (rot markiert) befindet sich auf der LSC unweit der *rbcL*-Sequenz. (aus: SOLTIS et al. 1998, verändert).



Primers by Taberlet et al. (1991)

Abb.7: Detailschema zum *trnT-trnF*-Bereich. Die Position der von TABERLET et al. (1991) entwickelten Primer (A bis F) und die durchschnittlichen Größen der für Bromeliaceae amplifizierten Fragmente (in bp) sind kartiert.

Nach der Literaturlauswertung schien ein nicht kodierender Bereich der rDNA, der „internal transcribed spacer“ (ITS; BALDWIN et al. 1995) als Marker aus dem Kerngenom geeignet.

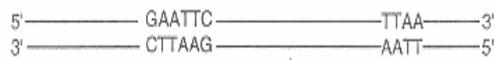
Die Amplifikation und Sequenzierung des ITS war jedoch nicht möglich. Trotz Einsatz zahlreicher Primer, diverser PCR-Variationen und Klonierung von Fragmenten gelang es weder mir noch anderen Arbeitsgruppen verwertbare Sequenzen zu erhalten.

1.5.1.2 Fragmentanalysen

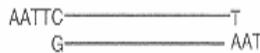
Einige ausgewählte, taxonomisch besonders problematische Gattungsgruppen wurden zusätzlich mit DNA-Fingerprint-Techniken (AFLPs, RAPDs) bearbeitet. Ein wichtiger Vorteil dabei ist, dass mit dieser Methode Merkmale des gesamten Genoms erfasst werden. Die zu erwartende hohe Auflösung der Fragmentanalysen auf infragenerischem Niveau und für nah verwandte Gattungen sollte zu einem Vergleich mit den anhand „klassischer“ Merkmalskomplexe entwickelten Gliederungskonzepten genutzt werden. Am Anfang standen Versuche mit der RAPD-Methode (ZIZKA, HORRES, NELSON & WEISING 1999). Aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit und der größeren Zahl an informativen Merkmalen (Banden) pro Primerpaar verlagerte sich der Schwerpunkt der Fragmentanalysen jedoch rasch auf AFLPs.

Die AFLP-Methode, basierend auf einem Restriktionsverdau und zwei selektiven Amplifikationsschritten (siehe 2.7.2 und Abb.8), ist seit ihrer Einführung durch VOS et al. 1995 zu einer Standard-Methode in der Kultivaridentifikation geworden und wird zunehmend für systematisch-phylogenetische Fragestellungen auf interspezifischer Ebene und z.T. auch auf intergenerischer Ebene eingesetzt (z.B. HILL et al. 1996, SHARMA et al. 1996, KARDOLUS et al. 1998, AGGARWAL et al. 1999, MACE et al. 1999a, 1999b, LOH et al. 2000a, 2000b).

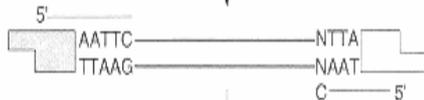
Ablauf einer AFLP - Analyse



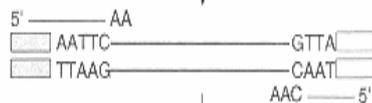
+EcoRI
 MseI



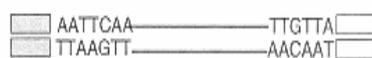
+EcoRI adapter
 MseI adapter



preselective
 amplification with
 EcoRI primer
 MseI primer +C



selective
 amplification with
 EcoRI primer+2
 MseI primer +3



denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

□ MseI adapter sequences
 ■ EcoRI adapter sequences

Genomische DNA wird mit Restriktionsenzymen geschnitten, die "sticky ends" haben.



Passend zur überhängenden Schnittstelle werden Adapter anligiert, notwendig als Primer-Bindestellen.

Um nicht zu viele Restriktionsfragmente zu amplifizieren, werden in einer "Preselective amplification" Primer verwendet, die am 3'-Ende je um 1 Base verlängert sind.

Statistisch passt jeder Primer nur auf 1/4 aller Restriktionsfragmente.

Da die PCR keine Fehlpaarungen am 3'-Ende eines Primers zulässt, wird die Zahl der Amplifikate so statistisch auf 1/16 reduziert.

Bei der "Selective amplification" wird dann einer der beiden Primer (meist EcoRI, da dann die sehr häufigen Mse-Mse Fragmente auf dem Autoradiogramm nicht sichtbar werden, aber die größeren, weniger häufigen Eco-Eco und Eco-Mse Fragmente) radioaktiv markiert.

Mit weiteren, bis zu max. 3 selektiven Basen pro Primer wird die Zahl der amplifizierten Fragmente weiter reduziert (bei 3 selektiven Basen pro Primer statistisch um 1/4096 da die statistische Chance des Passens auf beiden Seiten 1:64 ist).

Auftrennung der Fragmente auf einem hochauflösenden, denaturierenden Polyacrylamid-Gel (Sequenziergel).

Nach dem Trocknen des Gels kann man das Bandenmuster mit einem Autoradiogramm (Röntgenfilm) sichtbar machen.

Im Idealfall hat man - je nach der Wahl der Primer - 50 bis 100 informative Banden pro Gel.

Figure 1. Example of the AFLP procedure using one primer pair.

Abb.8: Schema zum Ablauf einer AFLP-Analyse (Abbildung aus dem Handbuch des Herstellers zum „AFLP small Genome Kit“ (GIBCO BRL; vertrieben von INVITROGEN), verändert).

1.5.2 Auswahl der zu untersuchenden Taxa

1.5.2.1 Sequenzanalysen

Ziel meiner Untersuchungen war es, Vertreter möglichst vieler Gattungen der Familie in die Studie einzubeziehen. Wie oben schon ausgeführt wurden im Verlauf der Studie im Rahmen von internationalen Kooperationen Absprachen bezüglich der Artauswahl getroffen. Diese Absprachen, aber auch laufende Untersuchungen an Gattungen der Bromelioideae in der Arbeitsgruppe, führten zur Fokussierung auf die Bromelioideae.

Arbeitsgruppen in Wien (STUESSY/TILL) und Neuchâtel (GRANT) arbeiten seit Ende 1999 an einer molekularen Phylogenie der Tillandsioideae (speziell der Kerngruppe um *Tillandsia*). Auf die Pitcairnioideae konzentrieren sich amerikanische Arbeitsgruppen (GIVNISH et al. 1997; CRAYN et al. 2000) in Fortsetzung der Arbeiten von VARADARAJAN & GILMARTIN (1988a, b, c). Der Schwerpunkt meiner Arbeit lag seitdem auf der Unterfamilie der Bromelioideae.

Eine Übersicht aller sequenzierten Arten ist der Tabelle der Anlage I zu entnehmen.

1.5.2.2 Fragmentanalysen

Für Fragmentanalysen wurden Gattungsgruppen aus der Unterfamilie Bromelioideae (*Fascicularia*, *Ochagavia*, *Greigia*) sowie der Unterfamilie Pitcairnioideae (*Abromeitiella* und *Deuterocohnia*) ausgewählt. AFLPs der Gattung *Racinaea* (Tillandsioideae) brachten bisher keine verwertbaren Ergebnisse. Bei diesen Gattungsgruppen handelt es sich um taxonomisch schwierige Verwandtschaftskreise mit morphologisch ähnlichen und höchstwahrscheinlich nah verwandten Arten. In diesen Bereichen ist mit Sequenzanalysen keine gute Auflösung zu erwarten. Neben der Erzielung einer deutlich besseren Auflösung war es das Ziel anhand der gewählten systematischen Gruppen allgemeine Erkenntnisse zum Gattungskonzept bei Bromelien zu gewinnen. Aus diesem Grunde wurden auch jeweils einige Akzessionen von Gattungen einbezogen, die die geringste Sequenzdivergenz bei den zuerst ermittelten *trnL*-Intron-Sequenzen aufwiesen. Es sollte überprüft werden, ob sich auf der Basis der genetischen Distanzen eine mit den Sequenzdaten vergleichbare - ggf. nur besser aufgelöste - oder eine völlig andere verwandtschaftliche Beziehung vermuten läßt.

Gattungsgruppe 1: *Fascicularia*, *Ochagavia* und *Greigia* (Unterfamilie Bromelioideae)

Die Gattungen *Fascicularia*, *Ochagavia* und *Greigia* bilden die südwestliche Verbreitungsgrenze der Familie. BENZING et al. (2000) diskutieren ein Diversitätszentrum der Bromelioideae in Südost-Brasilien mit einer West- und Nordwärtswanderung von Vorfahren der Gattungen *Greigia*, *Ochagavia* und *Fascicularia*, merken jedoch an, dass die bis dato wenig verstandene (und bearbeitete) Taxonomie der Bromelioideae eine Analyse ihrer Ausbreitungsgeschichte erschwert.

Im Rahmen der Untersuchungen für die Flora von Chile wurden die chilenischen Vertreter dieser Gattungen morphologisch-taxonomisch bearbeitet (NELSON & ZIZKA 1997, ZIZKA, HORRES, NELSON & WEISING. 1999, WILL & ZIZKA 1999, ZIZKA et al. 2002) und eine umfassende Lebendsammlung angelegt, die im Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main kultiviert wird.

Ochagavia und *Fascicularia* sind morphologisch außerordentlich ähnlich und die insgesamt 5 Arten beider Gattungen sind schwer zu unterscheiden. Dennoch lassen Sie sich auch anhand ihrer Morphologie, Ökologie und Verbreitung charakterisieren. Die Gattung *Greigia* weicht in einigen morphologischen Merkmalen ab. Am auffälligsten ist das Vorkommen seitenständiger Infloreszenzen, eine Besonderheit bei Bromeliaceae (vgl. Kap.1.1).

Fascicularia bildet zusammen mit der Gattung *Ochagavia* und den vier chilenischen Vertretern der Gattung *Greigia* (*G. berteroi*, *G. landbeckii*, *G. pearcei* und *G. sphacelata*) die südwestliche Verbreitungsgrenze der Familie. Vor diesem biogeographischen Hintergrund wurden auch fünf Akzessionen von *Ochagavia* und ein Individuum von *Greigia sphacelata* in die RAPD-Analyse einbezogen, v.a. um die Beziehung zur morphologisch sehr ähnlichen Gattung *Ochagavia* zu beleuchten.



Abb.9: Blühende Vertreter von *F. bicolor* ssp. *bicolor* (links) und *Ochagavia litoralis* (rechts). Diese vegetativ sehr ähnlichen Gattungen unterscheiden sich im blühenden Zustand deutlich: *Fascicularia* hat blaue bis violette Petalen, die Stamina sind in der Blütenkrone eingeschlossen. *Ochagavia* hat rosa Petalen und die Stamina ragen über die Blütenkrone hinaus. Diese Merkmale sind jedoch an herbarisiertem Material oft nur schlecht oder gar nicht erkennbar.

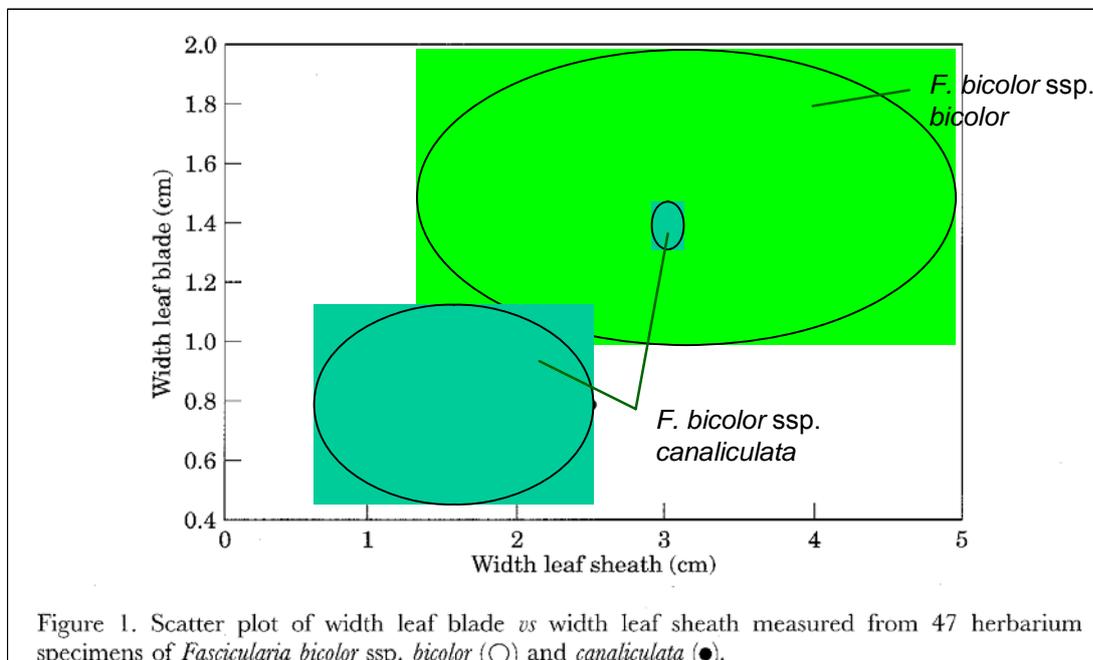
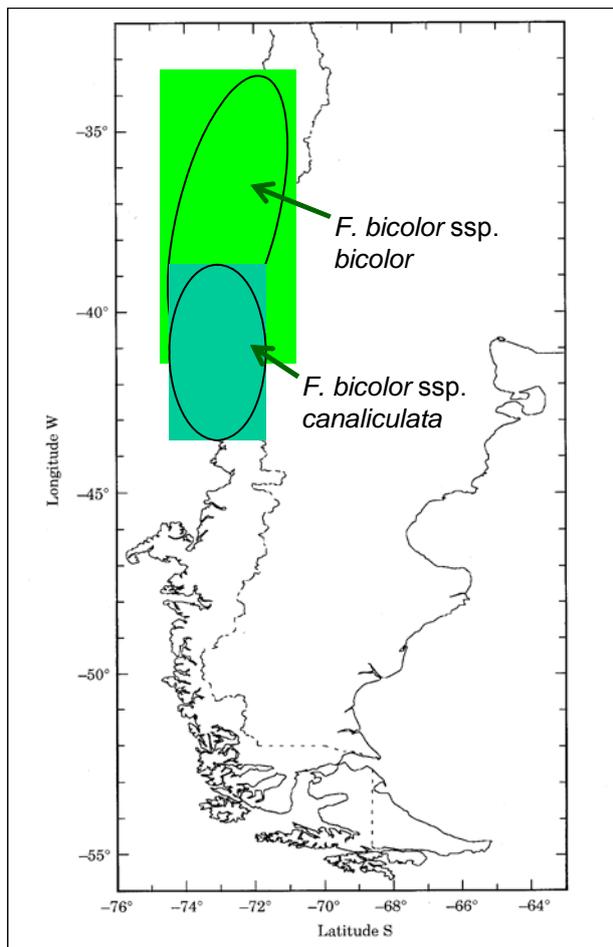


Figure 1. Scatter plot of width leaf blade *vs* width leaf sheath measured from 47 herbarium specimens of *Fascicularia bicolor* ssp. *bicolor* (○) and *canaliculata* (●).

Abb.10: Verbreitung der Gattung *Fascicularia* in Chile (oben). Trotz Überschneidung der Verbreitungsgebiete kommt die Unterart *F. bicolor* ssp. *bicolor* tendenziell weiter nördlich vor als die Unterart *F. bicolor* ssp. *canaliculata*. Die beiden Unterarten unterscheiden sich deutlich in der Blattbreite: unten dargestellt in einem Streudiagramm von Blattscheidenbreite auf der x-Achse und Blattspreitenbreite auf der Y-Achse. Die Unterart *bicolor* weist deutlich breitere Blätter auf. (aus: ZIZKA, HORRES, NELSON und WEISING 1999, verändert)

Gattungsgruppe 2: *Abromeitiella*, *Deuterocohnia*, *Dyckia* und *Pitcairnia* (Unterfamilie Pitcairnioideae)

Die Gattung *Deuterocohnia* hat ihren Verbreitungsschwerpunkt in den niederschlagsarmen Westabhängen der Anden Perus und den Trockengebieten des westlichen Argentinien, Bolivien und Chile. Bei *Abromeitiella* handelt es sich um extreme Xerophyten der Hochanden Argentinien und Boliviens mit polsterförmigem Wuchs.

Die Gattung *Abromeitiella* wurde 1992 von SPENCER & SMITH mit *Deuterocohnia* vereinigt, allerdings wurde dieses Konzept nicht einhellig akzeptiert. Im Vordergrund meiner Untersuchung stand die genetische Ähnlichkeit von *Deuterocohnia*- und *Abromeitiella*-Arten und die Klärung der Gattungsabgrenzung.

Bei den vorausgegangenen Untersuchungen der *trnL*-Intron-Sequenzen konnte eine nähere Verwandtschaft zu *Dyckia* und *Pitcairnia* ermittelt werden, weshalb auch einige Akzessionen dieser Gattungen in die Analyse einbezogen wurden.

Die Unterscheidung von *Deuterocohnia* und *Abromeitiella* stützte sich im Wesentlichen auf das Vorhandensein eines Infloreszenzschafes bei *Deuterocohnia* und das Fehlen eines Infloreszenzschafes bei den *Abromeitiella*-Arten. Weitere Unterscheidungsmerkmale waren die Anzahl der Blüten (*Abromeitiella*: 1-2blütige Infloreszenzen; *Deuterocohnia*: mehr- bis vielblütige Infloreszenzen) und die Wuchsform (*Abromeitiella*: dicht polsterförmiger Wuchs; *Deuterocohnia*: ringförmiger Wuchs). Eine Besonderheit der Gattung *Deuterocohnia* ist der Besitz über viele Jahre ausdauernder, verholzender Infloreszenzen, die immer wieder Blüten hervorbringen. Dieses Phänomen, basierend auf einer kambiumähnlichen Schicht, findet sich nach bisherigen Erkenntnissen nur noch bei einigen Arten der Gattung *Hohenbergia* (Unterfamilie Bromelioideae; BENZING 1980).

Die von HROMADNIK entdeckte und 1987 von RAUH & HROMADNIK beschriebene *Abromeitiella scapigera* besitzt einen 4 cm langen Infloreszenzschaf. SPENCER & SMITH (1992) fanden bei *Deuterocohnia digitata* L.B. Sm. und *D. strobilifera* Mez var. *inermis* L.B. Sm. ebenfalls einen nur annähernd 5 cm langen Infloreszenzschaf, während die meisten anderen Arten von *Deuterocohnia* einen mehr als 30 cm langen Infloreszenzschaf besitzen. Das Fehlen eines Infloreszenzschafes konnte nach Meinung der Autoren daher schlecht als Gattungsmerkmal angesehen werden. Auch die Blütenzahl erwies sich bei genauerer Untersuchung durch SPENCER & SMITH (1992) als Gattungsmerkmal ungeeignet, weil sich bei *Abromeitiella lorentziana* 7 Blüten, bei *Deuterocohnia strobilifera* aber nur 5 Blüten an einer Infloreszenz fanden. Die Wuchsform (dicht polsterförmig - ringförmig) ist nach Auffassung von SPENCER & SMITH (1992) ebenfalls kein ausreichendes Unterscheidungsmerkmal, das für die Aufrechterhaltung einer eigenen Gattung herangezogen werden kann.

Diese Ansicht wird durch Beobachtungen von *Deuterocohnia chrysantha* am natürlichen Standort in Chile gestützt. Die Art wächst in ariden Habitaten und kann mehr oder weniger halbkugelige Polster

ausbilden (G. Zizka, pers. Mitt.), zeigt also nicht das sonst für *Deuterocohnia*-Arten „typische“ ringförmige Wachstum.

Die Vertreter der Gattung *Abromeitiella* bilden Polster mit einer sehr gleichmäßigen, dichten Oberfläche der Triebspitzen. Dieses entsteht aus der akrotonen, also zur Spitze hin geförderten Verzweigung der kleinen Einzelrosetten nach jeder Blühperiode. Die älteren Sproßgenerationen verwittern im Inneren der Polster und der entstehende Humus dient als Wasserreservoir, das sich in der Regenzeit mit Wasser füllt. In das Polsterinnere senden die lebenden Sprosse ihre Wurzeln. Daher vergleicht RAUH (1978) diese Lebensform mit den polsterbildenden hochandinen Kakteen der Gattung *Tephrocactus*. Die Polsteroberfläche dient wie die grüne Rinde der Kakteen der Assimilation, während das Polsterinnere mit dem zentralen Wasserspeicher der Kakteen vergleichbar ist, auch wenn bei *Abromeitiella* die Wasserspeicherung außerhalb des Vegetationskörpers (aber innerhalb des Polsters) erfolgt.

Alle untersuchten Arten der Gattungen *Abromeitiella* und *Deuterocohnia* speichern auch in ihren bewehrten Blättern erhebliche Mengen Wasser. Ihre Kennwerte zur Bestimmung der Sukkulenz, Sukkulenzquotient (SQ) und Sukkulenzgrad (SG), gehören zu den höchsten, die in der Unterfamilie Pitcairnioideae bestimmt wurden. Der Anteil des Wassergewebes (WG) der Blattoberseite macht 32 bis 48 % der Querschnittsfläche aus. Das WG enthält Chloroplasten, deren Anzahl mit der weiteren Entfernung vom Assimilationsparenchym abnimmt. Dies findet sich auch bei den Arten der Gattungen *Dyckia* und *Hechtia*. Der Umfang des Abschlußgewebes aus der unterseits verdickten Epidermis und den darauf folgenden, ebenfalls verdickten Zellreihen (den sog. hypodermalen Zellreihen) ist bei den Arten der Gattung *Abromeitiella* und *Deuterocohnia meziana* sowie *D. spec.* gleichermaßen stark entwickelt. Mit 2 bis 4 hypodermalen Zellreihen ist ein sehr effektiver Verdunstungsschutz in den Blattspreiten ausgebildet (HORRES & ZIZKA 1995, HORRES 1997c).

Die Arten der Gattung *Dyckia* zeichnen sich durch meist seitenständige Infloreszenzen aus. Nach SMITH & TILL (1998) umfasst *Dyckia* 124 Arten in den Trockengebieten von Zentral- und Ostbrasilien, Argentinien, Bolivien, Paraguay und Uruguay.

Pitcairnia ist mit 285 Arten eine der größten Bromeliaceae-Gattungen. Ihre meist terrestrischen, selten auch saxicol oder epiphytisch wachsenden Vertreter besiedeln von Mexiko bis Argentinien, Brasilien und Peru die verschiedensten Habitate: *Pitcairnia flammea* z.B. besiedelt amphibische Standorte an Bergbächen als sog. Rheophyt, *Pitcairnia heterophylla* kommt bis in Höhenlagen von 1500 bis 2500m in semiaridem Klima vor (BENZING 2000, RAUH 1990, SMITH & TILL 1998).

1. *Deuterocohnia brevifolia* (Griseb.) Spencer & L.B.Sm.
3. *Deuterocohnia lotteae* (Rauh) Spencer & L.B.Sm.
2. *Deuterocohnia lorentziana* (Mez) Spencer & L.B.Sm.
5. *Deuterocohnia scapigera* (Rauh & Hrom.) Spencer & L.B.Sm.

11. *Deuterocohnia brevispicata* Rauh & L.Hrom.

⇒ *Deuterocohnia seramisiana* Vásquez, Ibisch & Gross

13. *Deuterocohnia chrysantha* (Philippi) Mez in Martius

4. *Deuterocohnia digitata* L.B. Sm.

9. *Deuterocohnia glandulosa* E. Gross

8. *Deuterocohnia haumanii* Castellanos

6. *Deuterocohnia longipetala* (Baker) Mez

7a. *Deuterocohnia meziana* Kuntze ex Mez

7b. *Deuterocohnia meziana* Kuntze ex Mez var. *carmineo-viridiflora* Rauh

⇒ *Deuterocohnia recurvipetala* E. Gross

10. *Deuterocohnia schreiteri* Castellanos

12a. *Deuterocohnia strobilifera* Mez

12b. *Deuterocohnia strobilifera* Mez var. *inermis* L.B. Sm.

⇒ *Deuterocohnia bracteosa* W.Till & L.Hrom. -

Nach VÁSQUEZ, IBISCH & GROSS (Die Bromelie 1/2002: 4-10) ist *Deuterocohnia bracteosa* vermutlich ein Synonym von *Deuterocohnia strobilifera* Mez.

Abb.11: Übersicht der bisher wirksam veröffentlichten Binome der Gattung *Deuterocohnia* Mez. Die Arten Nr. 1 bis 13 sind hier entsprechend dem Bestimmungsschlüssel zu den Arten der Gattung nach SPENCER & SMITH (1992) aufgeführt. Die vier in *Deuterocohnia* aufgegangenen Arten der Gattung *Abromeitiella* Mez sind Nr. 1, 2, 3 und 5. ⇒ kennzeichnet Taxa späterer Publikationen.

Bemerkenswert ist die einzige afrikanische Vertreterin der Familie, *Pitcairnia feliciana*, die in der Republik Guinea (Westafrika) vorkommt. *Pitcairnia feliciana* findet sich nahe der kleinen Stadt Kindia im Fouta Djallon-Hochland an den Hängen des Gangan-Gebirges und ist typischerweise mit Geophyten vergesellschaftet. Die stammlosen Pflanzen bilden ausgedehnte Rhizome in erdgefüllten Felsspalten. Trockenzeiten von bis zu 5 Monaten überdauert *P. feliciana* mit chlorophyllfreien, bewehrten 2,5 bis 3 cm breiten und 7 bis 20 cm langen Niederblättern. Die Laubblätter in der Regenzeit sind 0,6 bis 1,6 cm breit und 22 bis 52 cm lang (POREMSKI & BARTHLOTT 1999). Bis vor kurzem war kein Lebendmaterial dieser Art zugänglich. Durch Unterstützung des Botanischen Gartens Bonn konnte auch diese Art in die Studie einbezogen werden.

2 Material und Methode

Eine Auflistung aller verwendeten Puffer, Lösungen und Chemikalien findet sich in Anlage II „Verwendete Enzyme, Puffer und Lösungen“.

2.1 Untersuchungsmaterial

Die untersuchten Pflanzen stammen hauptsächlich aus der Lebendsammlung des Palmengartens der Stadt Frankfurt am Main und dem Botanischen Garten der Universität Heidelberg. Für die Untersuchung wurde die Bromeliensammlung des Palmengartens mit dem Ziel eines möglichst repräsentativen Gattungs- und Artinventars in den letzten Jahren systematisch ausgebaut. Von allen untersuchten Pflanzen wurden Belege angelegt und im Herbarium Senckenbergianum (FR) oder dem Herbarium des Palmengartens der Stadt Frankfurt am Main (FRP) hinterlegt. Angaben zu den genauen Quellen sowie weitere Daten zu den untersuchten Pflanzen können der Tabelle der Anlage I entnommen werden.

2.2 Probenvorbereitung

Von gesunden Pflanzen wurden Blattproben genommen und gründlich mit entionisiertem Wasser gewaschen. Nach einer groben Zerkleinerung wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff übergossen und gefriergetrocknet. Vor allem bei stark sukkulentem Blattgewebe ermöglicht eine vorherige Gefrierdrying einen besseren Aufschluß (leichteres Mörsern) des Gewebes und höhere DNA-Ausbeuten. Nur bei etwa 10 bis 15 % der untersuchten Pflanzen wurde sofort frisches Blattmaterial, das zuvor ebenfalls mit entionisiertem Wasser gewaschen wurde, verwendet.

2.3 DNA-Isolation und Aufreinigung

Die DNA-Isolationen wurden mit geringen Modifikationen entsprechend der klassischen "CTAB-Methode" von DOYLE & DOYLE 1987 (siehe auch WEISING et al. 1995) durchgeführt.

In flüssigem Stickstoff wurde das Pflanzenmaterial mit etwas sterilem Seesand gemörsert und in einem 60°C heißen Puffer aufgeschlossen, der als Detergens Hexadecyltrimethylammoniumbromid (kurz CTAB = Cetyltrimethylammoniumbromid genannt) sowie als Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (MET) enthält.

Die Zell- und Kernstruktur wird hierbei zerstört und die DNA freigesetzt. Nukleasen werden durch EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) im Puffer gehemmt. Nach mindestens 30 Minuten Lyse in je 12,5 ml CTAB-Puffer bei 60°C (Wasserbad; der Lyse-Puffer wurde vorgewärmt) erfolgte die Extraktion nach Zugabe von je 12,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durch vorsichtiges Schütteln (Schüttler und/oder von Hand - bei guter Mischung der organischen und wässrigen Phase) für 15-20 Minuten.

Nach Überführung in sterile 30 ml Corex-Röhrchen und Zentrifugation für 20 Minuten bei 5000 rpm und Kühlung auf 16°C erhält man eine obere wässrige Phase, die u.a. Nukleinsäuren und gelöste Polysaccharide enthält sowie eine untere Phase mit im Chloroform gelösten Proteinen, Lipiden und Chlorophyll. Die mittlere, feste Phase enthält Zellreste. Die obere Phase wurde mit sterilen 10 ml Glaspipetten abpipettiert und in ein neues steriles 30 ml Corex-Röhrchen überführt. Die Fällung erfolgte nach Zugabe von 0,6 bis 0,7 Volumen Isopropanol (Isopropanol hatte Raumtemperatur [RT] - dies verringert das Präzipitieren von zu vielen Polysacchariden) und vorsichtigem Schütteln (dazu wurde das Corex-Röhrchen mit Parafilm abgedeckt), bis sich eine homogene Phase ergab. Nach 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 5000 rpm und Kühlung auf 16°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und die weißen bis durchsichtigen - oft noch gefärbten - Pellets mit 70%igem Ethanol (ebenfalls nur Raumtemperatur) gewaschen: Zugabe von 5 bis 10 ml 70%igem Ethanol (ohne zu schütteln) und Zentrifugieren für 20 Minuten/5000 rpm/16°C. Nach Dekantieren des 70%igen Ethanols wurden die Pellets ca. 20 bis 30 Minuten an der Luft getrocknet bis zur vollständigen Verdunstung des Ethanols. Die Rücklösung erfolgte in 1x TE-Puffer (je nach Größe der Pellets 0,4 bis 0,8 ml). Die Corex-Röhrchen wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert, bis das Pellet gelöst war.

Nach Überführung der DNA in ein steriles, dichtes 2 ml Reaktionsgefäß (engl. "safe seal tube") erfolgte ein RNase-Verdau, um die ebenfalls präzipitierte RNA zu entfernen.

Es wurden je ca. 5 - 10 µl RNaseA (Konz.: 10 mg/ml) zugegeben und das Enzym baute die RNA entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 - 3 Stunden bei 37 °C im Wasserbad ab.

Bei der Reproduktion von Amplifikationen (RAPDs) zeigte sich bei meinen Studien an den Gattungen *Racinaea*, *Ochagavia* und *Fascicularia*, dass sich Bandenmuster nach einiger Zeit nicht mehr reproduzieren ließen. Daher war es nötig, die DNA-Isolate mit einem weiteren Schritt besser aufzureinigen, um v.a. Polypeptide, die sich vermutlich an die DNA anlagern und eine Primerbindung behindern, zu entfernen. Polysaccharide, die ebenfalls eine Amplifikation hemmen können, sollten hierbei durch Präzipitation bei RT ebenfalls minimiert werden.

Es wurde eine Phenol-/Chloroform-Fällung durchgeführt:

Auf die in TE gelöste DNA wurde je 1 Volumen "Rotiphenol" (= TE-gesättigtes Phenol von ROTH) gegeben und die beiden Phasen durch zehnmütiges Schütteln (von Hand oder auf einem Schüttler) gut gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten/ 13000 rpm bei Kühlung auf 16°C. Von den entstehenden 2 Phasen, die durch eine Schicht von weißem Schlier (= v.a. Proteine) getrennt sind, wurde die obere wässrige Phase mit der DNA abpipettiert, in ein neues steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach gutem Schütteln zur Durchmischung der organischen und der wässrigen Phase erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm und Kühlung auf 16°C. Die obere Phase wurde erneut in ein neues steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2 Volumen 100%igem Ethanol versetzt (Ethanol hatte Raumtemperatur). Die Fällung der DNA erfolgte durch vorsichtiges Schütteln. Um eine vollständige

Präzipitation sicherzustellen, wurden die Reaktionsgefäße vor der nächsten Zentrifugation 10 - 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen- bei gelegentlichem vorsichtigem Schütteln.

Nach erneuter Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 rpm/16°C erfolgte vorsichtiges Dekantieren oder Abpipettieren der Ethanol-/Wasserphase. Die durchsichtigen, selten noch gefärbten DNA - Pellets wurden gewaschen: durch Zugabe von 400 - 800 µl 70%igem Ethanol (Raumtemperatur) je nach Größe der Pellets und Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 rpm/16°C und erneutes vorsichtiges Dekantieren oder Abpipettieren des Überstandes. Nach Trocknung der Pellets an der Luft (Tubes aufrecht, für 20 bis 30 Minuten, bis kein Ethanol mehr zu riechen war) wurde die gereinigte DNA je nach Größe der Pellets mit 100 - 400 µl 1x TE-Puffer (pH 8,0) gelöst und bei 4°C gelagert.

Bei mehreren Arten der Gattungen *Aechmea*, *Araeococcus*, *Catopsis*, *Fernseea* und *Fosterella* erwies sich diese DNA-Aufreinigung als immer noch nicht ausreichend. Eine spezifische Amplifikation des cpDNA-Bereiches zwischen dem *trnL*(UAA)-5'- Exons und dem *trnF*(GAA)-Gen (CF-Fragment; siehe 2.4.1) war auch nach PCR-Optimierung nicht möglich. Um vermutete Inhibitoren in den DNA-Isolationen zu entfernen, wurden diese DNAs zusätzlich mit Hilfe des „NucleoSpin[®]-Extract-Kit 2 in 1“ von Macherey und Nagel entsprechend dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Folgende Abweichungen vom Standard-Protokoll wurden durchgeführt:

Nach dem Waschen mit NT3 - Puffer und der 2. Zentrifugation wurden die Säulchen auf neue Auffangröhrchen (engl. „collection-tubes“) gesteckt und mit geöffnetem Säulchendeckel für ca. 5 Minuten bei 70°C in den Trockenschrank gestellt. Danach erfolgte die Rücklösung mit auf 70°C vorgewärmtem 1x TE Puffer (pH auf 8,5 eingestellt): 100 –150 µl - je nach eingesetzter DNA-Menge. Dies stellte sicher, dass kein inhibierend wirkender Alkohol und/oder chaotropische Salze des NT3-Puffers in die DNA-Stocks gelangten.

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen erfolgte nach Auftrennung von Aliquots in 1%igen Agarose-Gelen durch Vergleich mit ebenfalls aufgetragener, nichtrestrictierter λ-DNA bekannter Konzentration als Referenz.

Die Verdünnungen von Aliquots der DNAs als Template für die PCR erfolgten mit 0,2 x TE-Puffer.

2.4 Spezifische Amplifikation und Sequenzierung

Für die spezifische Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (**Polymerase Chain Reaction, PCR**; MULLIS et al. 1994) wurden die für die cpDNA der meisten höheren Pflanzen universellen Primer nach TABERLET et al. (1991; Abb.7) verwendet (Herstellung: BIOSPRING GmbH, Frankfurt am Main):

5' ⇌ 3'

A: CATTACAAATGCGATGCTCT

B: TCTACCGATTTGCCATATC

C: CGAAATCGGTAGACGCTACG

D: GGGGATAGAGGGACTTGAAC

E: GGTTCAAGTCCCTCTATCCC

F: ATTTGAACTGGTGACACGAG

A: homolog zu Sequenzen im *trnT*(UGU)-Gen [Produkt: **Thr-tRNA**], endet 20 bp vor dem 5'-Ende des intergenischen Spacers zwischen *trnT*(UGU) und dem *trnL*(UAA)-5'-Exon [Produkt: **Leu-tRNA**]

B: homolog zu Sequenzen 4 bp nach Anfang des *trnL*(UAA)-5'-Exons

C: homolog zu Sequenzen 24 bp vor dem Ende des *trnL*(UAA)-5'-Exons

D: bindet 29 bp innerhalb des *trnL*(UAA)-3'-Exon

E: bindet 21 bp vor dem Ende des *trnL*(UAA)-3'-Exon

F: bindet 40 bp **innerhalb** des *trnF*(GAA)-Gens [Produkt: **Phe-tRNA**]

Die einzelnen Marker wurden zunächst separat amplifiziert und sequenziert:

A-B-Fragment = **Intergenischer Spacer *trnT* - *trnL***

C-D-Fragment = ***trnL* - Intron**

E-F-Fragment = **Intergenischer Spacer *trnL* - *trnF***

Da bei einigen Arten die zyklischen Sequenzierungen bei der Dokumentation der DNA-Sequenzen eine zu geringe Qualität aufwiesen (zu geringe Leseweiten), wurde mit den Primern C und F ein Gesamtamplikon von ***trnL* - Intron** und **intergenischem Spacer *trnL* - *trnF*** (CF-Fragment) amplifiziert. Nach der Aufreinigung (2.4.2) konnten mit diesen Eluatn das CD- und EF-Fragment sequenziert werden. Außerdem steigerte sich z.T. die Qualität der Sequenzierungen mit dem D- und E-Primer (2.4.4).

Zur Sequenzierung des ITS-Bereiches wurden diverse Primer eingesetzt. Neben den Primern ITS1 bis ITS4 nach WHITE et al. (1990) und den von MÖLLER & CRONK (1997) modifizierten Primern wurden auch eigene Primer (vgl. Anlage III) eingesetzt. Die Sequenzfolge basierte auf Datenbankanalysen der 18S und 26S Region.

2.4.1 PCR-Protokolle (spezifische Amplifikationen)

Für die spezifische Amplifikation der AB-, CD-, EF- und CF-Fragmente wurden folgende PCR-Bedingungen verwendet (vgl. auch Anlage II: „Verwendete Enzyme, Puffer und Lösungen“):

Templat-DNA:	10 (5) μ l	[50 - (25) ng]
Primer (A+B, C+D, E+F oder C+F)	je 4 μ l	[je 20 pM]
Bidest steril:	4,4 (9,4) μ l	
MgCl ₂ [50mM]:	2 μ l	[2 mM]
10xPuffer:	5 μ l	[50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)]
dNTPs:	20 μ l	[0,2 mM]
Taq DNA-Polymerase	0,6 μ l*	[3 Units*]
	<hr/>	
	50 μ l	

* Es zeigte sich, dass in 50 μ l-Ansätzen i.d.R. auch 0,1 bis 0,2 μ l [0,5 bis 1 Unit] ausreichend sind - ohne Einbußen bei der Amplikon-Ausbeute, was erhebliche Kosten sparte.

Die PCR erfolgte auf dem Mastercycler (Eppendorf):

1'/96°C (Denaturieren). Dann folgen 35 Zyklen: 1'/94°C (Denaturieren), 1'/50°C (Annealing), 2'/72°C (Synthese). Schließlich: 7'/72°C Elongation (engl. „final elongation“)

Die PCR-Protokolle zur Amplifikation der ITS-Region können Anlage IV entnommen werden.

2.4.2 Aufreinigung der Amplifikate für die Sequenzierung und Klonierung

Bevor spezifische PCR - Produkte sequenziert oder kloniert werden können, müssen unerwünschte Nebenprodukte und Bestandteile (zu kurze Fragmente, nicht eingebaute Primer und Template, Puffersalze) entfernt werden. Dazu wurde der PCR-Ansatz mit einem Auftragspuffer (AP) versetzt und auf einem 1 %igen präparativen Agarose-Gel elektrophoretisch in 1x TBE Puffer (SAMBROOK et al. 1989) aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurden die klaren Einzelbanden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit (QIAGEN; entsprechend QIAquick Spin Handbook 03/2001: 23-24) aufgereinigt. Die Rücklösung der Eluate erfolgte in 20 bis 30 μ l EB-Puffer (10 mM TRIS-Cl, pH 8,5).

Die Bestimmung der Eluat-Konzentrationen erfolgte durch eine Testgelelektrophorese von Aliquots (1 μ l) zusammen mit nichtrestringierter λ - DNA bekannter Konzentrationen als Referenz in 1%igen Agarose-Gelen.

2.4.3 Klonierung von ITS-Amplifikaten

Einige ITS-Amplikons (eindeutige, reproduzierbare Einzelbanden nach PCR-Optimierung) wurden aufgereinigt (QIAGEN Gel-Extraktion) und kloniert. Die Arbeiten mit rekombinanter DNA wurden streng nach den Richtlinien des Gentechnik-Gesetzes (GenTG) durchgeführt.

Die mit folgenden Primerkombinationen (Anlage III) amplifizierten Amplikons ergaben reproduzierbare aber nicht direkt sequenzierbare Einzelbanden und wurden kloniert:

Primer 5P & 8P (ca. 850 bp):	011	<i>Ayensua uaipanensis</i>
	120	<i>Ronnbergia petersii</i>
	138	<i>Hohenbergiopsis guatemalensis</i>
Primer 18S1 & 8P (ca.1050 bp):	15a	<i>Ochagavia elegans</i>
Primer 18S2 & 8P (ca.1070 bp):	136	<i>Ananas comosus</i>

Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen (Stamm dH5 alpha):

In einem Liter LB-Medium wurden 1,5 ml einer dH5 alpha-Kultur von *E.coli* auf einem Rotationsschüttler bei 37°C bis zur deutlichen Trübung inkubiert. Die Kultur wurde für 30 Minuten auf Eis gestellt und 15 Minuten bei 4°C/4000rpm abzentrifugiert. Nach Resuspendierung des resultierenden Bakterienpellets in einem Liter sterilem, auf Eis vorgekühltem VE-Wasser wurde erneut zentrifugiert. Dieses Pellet wurde dann noch einmal in 500 ml sterilem, auf Eis vorgekühltem VE-Wasser gewaschen und zentrifugiert. Die Pellets wurden nach Aufnahme in 4 ml 10%igem Glycerin und Aufteilung auf 50 µl -Aliquots (in sterilen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen) bei -80°C eingefroren. Die so hergestellten kompetenten Zellen mit einer Konzentration von deutlich über 3×10^{10} konnten über viele Monate ohne Verlust ihrer Kompetenz für Transformationen/Elektroporationen verwendet werden.

Klonierung mit Post-Script-Vektor System: pGEM[®]-T Easy (PROMEGA):

Ligationsansatz [10 µl - Volumen]

10x Puffer:	1 µl
ATP [10mM]	1 µl
pGEM-T Vektor	1 µl
T4 - Ligase	1 µl
ITS-Amplikon	6 µl

10 µl ⇒ über Nacht auf Eis (Kühlraum)

Die Transformation erfolgte in 50 µl - Aliquots von kompetenten *E. coli* - Bakterien (Stamm dH5 alpha). Für die Elektroporation wurde das Elektroporationsgerät „GenePulser“ von BIORAD verwendet. Je 2 µl der Ligationsansätze kamen auf ein dH5 alpha-Aliquot. Nach Durchmischung

wurden diese für 1 Minute auf Eis gesetzt und in sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Nach dem Einsatz der Küvetten in den „GenePulser“ wurde der elektrische Impuls ausgelöst (Puls-Controller des Elektroporationsgerätes war auf 200 Ohm eingestellt), die Zeitkonstante auf 4,5 bis 5 msec, bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm. Es wurde sofort SOC-Medium dazugegeben (750 µl). Nach vorsichtigem Durchmischen wurde der Ansatz in vorbereitete sterile Reaktionsgefäße dekantiert und kam sofort für 1 Stunde in ein 37°C Wasserbad.

Es folgte das Ausplattieren von Aliquots (25 / 50 / 100 / 150 µl) auf vorbereitete sterile AGAR-Platten mit Selektionsmedium. Die Kultur erfolgte über Nacht bei 37°C.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte über das Wochenende bei 4°C im Kühlschrank, was größere und klarer abgegrenzte Kolonien ergab (Blau = kein Plasmid; weiß = „positive Klone“ mit Plasmid und Insert).

Mit sterilen Zahnstochern wurden weiße, „positive Klone“ aufgenommen ("gepickt") und in sortierter Reihenfolge auf neuen AGAR- Platten angezogen.

Von je 8 Kolonien aller untersuchten Taxa wurde eine Kolonie - PCR gemacht:

Die zum Picken der positiven Klone benutzten Zahnstocher wurden kurz in vorbereitete PCR-Tubes, in denen 20 µl Bidest steril vorgelegt war, gehalten. Die wenigen *E.coli*-Zellen reichten als Templat aus. Zuerst wurde das Templat für 5 Minuten auf 96°C erhitzt, was die *E.coli*-Zellen aufschließt und die DNA denaturiert.

Danach wurde folgender Ansatz („Mastermix“) ergänzt:

		1x
MgCl ₂	[50 mM]	2,5 µl
10xPuffer		5,0 µl
dNTPs	[0,5 mM]	15,0 µl
Primer T7	[10 pM/µl]	1,0 µl
" SP6	[10 pM/µl]	1,0 µl
Taq	[5 U/µl]	0,08 µl
Bidest		5,25 µl
		<hr/>
		30,1 µl

Zur Amplifikation wurden vom Vektor abgeleitete Primer verwendet (5' → 3'):

VPCR3 / SP6-Primer: GATTTAGGTGACACTATAG

VPCR4 / T7-Primer: TAATACGACTCACTATAGGG

Die PCR erfolgte mit dem Mastercycler (Eppendorf):

Nach einer ersten Denaturierung für 2 Minuten bei 96°C folgen 35 Zyklen mit je

20 Sekunden bei 94°C (Denaturieren), 20 Sekunden bei 50°C (Annealing) und 1 Minute 10 Sekunden bei 72°C (Synthese). Nach dem 35. Zyklus folgte noch ein Schritt von 2 Minuten bei 72°C um begonnene Amplifikate zu Ende synthetisieren zu lassen (engl. „final elongation“).

Nach einer QIAquick Gel-Extraktion (entspr. 2.4.2) der eindeutigen Einzelbanden wurden zum Sequenzieren die näher am Insert des Vektors liegenden Primer („nested“ Primer) verwendet (5' → 3'):

VPCR1 (= M13 universal): GTAAAACGACGGCCAGT
 VPCR2 (= M13 revers): GGAAACAGCTATGACCATG

2.4.4 Sequenzierreaktionen

Die Direktsequenzierung der aufgereinigten spezifischen PCR-Amplifikate basiert auf dem Prinzip der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode nach SANGER et al. (1977). In einer sog. zyklischen Sequenzierung (engl. "cycle-sequencing") unter Einsatz von 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen im BigDye[®] Terminator Premix (PE Biosystems) kann die Kettenabbruch-Reaktion hier in einem Reaktionsansatz erfolgen:

Templat (aufgereinigte Eluate)	5 - 7 µl	[0,2 bis 0,5 µg]
Primer (A, B, C, D, E, F, VPCR1 oder VPCR2)	1 µl	[5 pMol]
BigDye [®] Terminator Premix	4 - 5 µl	
Insg.:	<u>10 - 13 µl</u>	

In der Sequenzierreaktion wurden dieselben universellen Primer nach TABERLET et al. (1991) verwendet (A bis F ; vgl. 2.4 und Abb.7), die auch zur Amplifikation eingesetzt wurden.

Zum Sequenzieren der ITS Amplikons wurden die zur Amplifikation verwendeten Primer, weiter innen liegende („nested“) Primer und - im Falle der klonierten Amplifikate - nahe am Insert des Vektors liegende Primer (vgl. 2.4.3), verwendet. Zur Sicherung einer gleichbleibend guten Qualität der Sequenzierreaktionen wurden nur speziell aufgereinigte Primer eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden nach der Synthese HPLC-gereinigt (Synthese und Aufreinigung durch die BIOSPRING GmbH, Frankfurt am Main). Diese Form der Aufreinigung stellt sicher, dass nur Oligonukleotide mit der vollständigen Primersequenz vorliegen. Verkürzte Sequenzen (sog. "n-x Primer"), die herstellungstechnisch bedingt entstehen, werden ausgeschlossen. Verkürzte Primersequenzen können auch bei länger gelagerten und chemisch degradierten Primern vorkommen und führen zu einer verringerten Ausbeute der (Einzelstrang-) Sequenzierreaktionen oder zu Sequenzüberlagerungen. Bei den CF-Fragmenten konnte z.T. mit den Sequenzierprimern D und E eine bessere Qualität der Sequenzen erreicht werden, da ihr Annealing innerhalb des Amplikons erfolgt (sog. „nested“ Primer). Dadurch wird der Polymerase-Templat-Komplex während der Sequenzierreaktion stabilisiert.

Die Sequenzierreaktion erfolgte im PE 2400 oder Eppendorf Mastercycler:

Jeweils 25 Zyklen: 96°C für 10 Minuten (Denaturieren), 50°C für 5 Minuten (Annealing) und 60°C für 4 Minuten (Synthese bis zum Kettenabbruch).

Sofort nach der Sequenzierreaktion erfolgte eine Ethanol-fällung, um den Reaktionsansatz v.a. von nicht eingebauten fluoreszenzmarkierten Terminatoren zu befreien. Dazu wurde die Sequenzierreaktion in ein steriles 1,5 ml Tube überführt, mit 1 µl 3 M Natriumacetat versetzt (pH 5,2) und das Volumen mit Bidest steril auf 20 µl erhöht. Nach Zugabe von 50 µl 100%igem Ethanol (reinst, unvergällt, ROTH) und kurzem Mischen durch Vortexen wurde für 20 Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend bei 16°C/13000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen (Zugabe und sofort Zentrifugation für 3 Minuten 16°C/13000 rpm) und danach für 20 bis 25 Minuten an der Luft getrocknet. Bis zur Resuspendierung in einem Auftragspuffer für Denaturierende PAA-Gele (98% Formamid, 10 mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau und 0,1% Xylencyanol) und dem Gelauftrag zur Dokumentation der DNA-Sequenzen wurden die Reaktionsgefäße mit den getrockneten Pellets bei -20°C gelagert.

2.5 Dokumentation der Sequenzierung

Die Dokumentation der DNA-Sequenzen erfolgte nach Auftrennung auf hochauflösenden denaturierenden (PAA)-Gelen in einem automatischen Sequenzierer vom Typ ABI 377 (PE Biosystems) der Firma SRD (Biozentrum, Frankfurt am Main und Oberursel). Elektropherogramme der einzelnen Sequenzierungen und nicht editierte Textdateien der Sequenzfolge wurden von SRD geliefert.

2.6 Sequenzanalysen

2.6.1 Editierung der Sequenzen und Anordnung in Alignments

Die Teilsequenzen wurden zuerst anhand der ausgedruckten Elektropherogramme überprüft, editiert und in das sog. „Fasta-Format“ (Datenformat u.a. für Clustal-Alignments) überführt. Eine der beiden sich überlappenden Sequenzen wurde mit Hilfe des Programms Winclone 4.0 (Microsoft) invertiert. Beim *trnT-trnL*-intergenischen Spacer (AB-Fragment) wurde die Sequenz des B-Primers invertiert; beim *trnL*-Intron (CF-Fragment) die Sequenz des C-Primers und beim *trnL-trnF*-intergenischen Spacer (EF-Fragment) die Sequenz des F-Primers.

Das Alignment der beiden sich i.d.R. zu 80% bis 90% überlappenden Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Clustal W bzw. Clustal X (THOMPSON et al. 1994, HIGGINS et al. 1996). Wenn es hier noch zu Widersprüchen kam, wurden die Sequenzen anhand der Elektropherogramme erneut editiert. Die zweifelsfrei editierten AB, CD oder EF-Sequenzen wurden wiederum in das Fasta-Format überführt, jeweils die zu vergleichenden OTUs der einzelnen Marker in einer Textdatei zusammengefaßt und mit Clustal W / Clustal X ein Alignment durchgeführt. Auf diese Weise liegen die ermittelten Sequenzen

so vor, dass homologe Positionen in Spalten untereinander angeordnet sind. Um dies zu erreichen werden vom Programm „gaps“ eingefügt, die Insertions-/Deletionsereignisse widerspiegeln und informativ sein können. Die Alignments wurden für jede Position überprüft und im Textverarbeitungsprogramm Word optimiert.

Die so optimierten Alignments wurden in Clustal X geladen und als Datenmatrix für verschiedene Analyseprogramme im entsprechenden Format gespeichert (z.B. für PAUP 3.1 bzw. PAUP 4.0 im sog. „Nexus“-Format und für die Phylip-Programme im sog. „Phylip-Format“).

2.6.2 Analyse der Sequenzdaten

Die computergestützte Datenauswertung und die statistische Überprüfung der Sequenzdaten erfolgte unter Anwendung von allgemein anerkannten und in der Literatur diskutierten Verfahren (z.B. SOLTIS et al. 1998, SWOFFORD et al. 1996, FELSENSTEIN 1981, 1985, 1989 und 1993, NEI 1991, 2000, NEI & KUMAR 2000).

Zur Analyse der Sequenzdaten mit Distanzmethoden und kladistischen Methoden wurden die Analyse-Programm-Pakete MEGA 2 (NEI & KUMAR 2000), PHYLIP (Version 3.5 FELSENSTEIN 1993) und PAUP (Versionen 3.1, 4.0Beta 6 und 4.0Beta10 SWOFFORD & BEGLE 1993, SWOFFORD 1998) eingesetzt.

Distanzmethoden, wie sie in Neighbor-Joining-Analysen (NJ; SAITOU & NEI 1987) angewendet werden, spiegeln die genetische Distanz der untersuchten OTUs im paarweisen Vergleich des jeweils untersuchten Markers wider. Bei der NJ-Methode werden im Unterschied zur UPGMA-Methode (siehe Kap. 2.7) keine "Cluster" von den OTUs mit der geringsten genetischen Distanz erstellt, sondern auf der Basis der Distanzmatrix werden die Distanzen direkt für alle Verzweigungen (engl. "internal nodes") des Baumdiagramms berechnet.

Hierbei berechnet NJ zuerst für jede OTU eine sog. Netzdivergenz (engl. "net divergence"), und zwar als die Summe aller Einzeldistanzen von diesem OTU. Diese Netzdivergenz dient dann NJ zur Berechnung einer korrigierten Distanzmatrix. NJ bildet dann ein Paar von OTUs mit der geringsten Distanz auf der Basis der korrigierten Distanzmatrix und berechnet die Distanz von jedem dieser zwei OTUs zu dem sie verbindenden Knoten. Im weiteren Fortgang der Erstellung des Dendrogramms wird die Datenmatrix schrittweise reduziert, wobei jeweils die beiden verbundenen OTUs einen gemeinsamen Knoten repräsentieren.

Auf der Basis der geringsten genetischen Distanz werden, wie der Name der Analyse schon sagt, Paare und Gruppen von OTUs, "Nachbarn" (engl. neighbors") gebildet. NJ setzt keine gleichen Mutationsraten voraus und berechnet Phylogenien nach dem Prinzip von "Minimum Evolution" (HALL 2001, NEI & KUMAR 2000).

Bei kladistischen Methoden nach dem Prinzip der „größten Sparsamkeit“ (engl. „maximum parsimony“, MP) werden ausschließlich die mindestens zwei der untersuchten OTUs gemeinsamen (abgeleiteten) Merkmale (Synapomorphien) berücksichtigt, wobei nur zwei Merkmalszustände pro Merkmalsposition zugelassen werden. Bei Parsimonie-Analysen werden keine Evolutionsmodelle zugrunde gelegt, sondern basierend auf der Hypothese einer Evolution nach dem Prinzip der „Sparsamkeit“ werden mit geeigneten Algorithmen die Topologie(n) rekonstruiert, welche auf der Grundlage der geringsten Anzahl von Merkmalsänderungen möglich sind.

Bei gleicher Evolutionsrate ist diese Methode der Stammbaumrekonstruktion sehr zuverlässig, es kann aber aufgrund von Homoplasien in einem gegebenen Datensatz dazu kommen, dass nicht verwandte OTUs auf einem Ast zusammengruppiert werden, was als „long branch attraction“ bezeichnet wird (FARRIS 1970, SWOFFORD et al. 1996).

Die Anzahl der untersuchten OTUs ist so groß, dass keine exakte Methode (Option „Exhaustive Search“ und „Branch und Bound“ im Analyseprogramm PAUP) angewendet werden konnte, die alle möglichen Topologien für einen Datensatz durchrechnet. Größere Datensätze mit deutlich mehr als 20 Taxa (wie in dieser Studie) lassen sich nur mit einer heuristischen Methode bewältigen. Diese Algorithmen sollen es ermöglichen in den vielen Millionen Möglichkeiten von Baumtopologien diejenige zu finden, die den Baum mit der kürzesten Topologie darstellt.

Die Maximum-Parsimony-Analysen mit PAUP wurden mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

- Berechnung einer „Startbaumtopologie“ auf der Basis der geringsten genetischen Distanz mit der Option „Stepwise Addition - Random“
- Die Auffindung von Optima, d.h. sog. Inseln von kürzesten Bäumen (engl. „tree islands“) erfolgte mit dem TBR-Swapping-Algorithmus (engl. „tree bisection- and reconnection“). Hierbei werden die Verknüpfungspunkte des Startbaumes getrennt, die so entstandenen zwei Teilbäume (engl. „subtrees“) willkürlich wieder zusammengefügt und die Astlängen des so entstandenen Baumes neu berechnet um ggf. einen noch kürzeren Baum zu finden.
- Alle MP-Bäume wurden unter der „ACCTRAN“-Option (engl. „optimization with **accelerated** character transformation“) berechnet, einem Algorithmus, der die gegebenen Merkmalszustände unter der Annahme von Rückmutationen berechnet. Die alternative Option ist DELTRAN (engl. „optimization with delayed transformation“), eine Hypothese, die die Merkmalszustände als Analogien (Parallelismen) interpretiert. Beide Hypothesen setzen die gleiche Anzahl von Mutationsschritten für einen Datensatz voraus. Bei ACCTRAN-Optimierung werden Merkmalsänderungen im gegebenen Datensatz früh, bei DELTRAN-Optimierung als später in Erscheinung tretend angenommen.
- Bei den Berechnungen wurden alle in einem lokalen Optimum (engl. „tree island“) gefundenen kürzesten Bäume mit gleicher Anzahl von Mutationsschritten gespeichert (MULPARS-Option) und daraus Konsensusbäume berechnet. Der „Strict Consensus“ zeigt nur Topologien auf, die

in allen kürzesten Bäumen gefunden wurden, der „Majority Rule Consensus“ (gibt alle Topologien wieder, die in mindestens 50% aller kürzesten Bäume gefunden wurden).

Eine Analyse nach der Maximum Likelihood-Methode (ML; CAVALLI-SFORZA & EDWARDS 1967, FELSENSTEIN 1981) berechnet dagegen unter Zugrundelegung verschiedener Substitutionsmodelle die Topologie nach dem Prinzip der größten Wahrscheinlichkeit. Es wird die Baumtopologie ausgewählt, die für ein bestimmtes Substitutionsmodell die größte Wahrscheinlichkeit liefert, wobei die berücksichtigten Parameter auf die Astlängen der in der Analyse berechneten möglichen Topologien abgestimmt sind, nicht auf die Topologie (NEI & KUMAR 2000).

Die in den Baumtopologien wiedergegebenen Verwandtschaftsbeziehungen stellen Hypothesen zur Phylogenie der untersuchten Gruppe auf der Basis der analysierten Sequenzbereiche dar.

2.7 Fragmentanalysen

2.7.1 Random amplified polymorphic DNA (RAPDs)

Die RAPD-Methode (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA) ist seit ihrer Beschreibung durch WILLIAMS et al. (1990) die wohl am häufigsten benutzte Markertechnik, die erst in den letzten Jahren von der AFLP-Technik (s.u.) zunehmend abgelöst wird. Mit dieser Variante der PCR (MULLIS et al. 1994) werden unter Einsatz von Dekamer-Primern zufälliger Sequenz spezifische DNA-Fragmente aus dem Gesamtgenom amplifiziert. Die anschließende Gelelektrophorese und Anfärbung liefert bei geeigneten Primern reproduzierbare Bandenmuster.

Die Gattung *Fascicularia* wurde unter Einbeziehung von Akzessionen der Gattungen *Ochagavia* und *Greigia* mit RAPDs untersucht (Gattungsgruppe 1, Kap.1.5.2). Es wurden 14 verschiedene Dekamer-Primer des Kits der Firma OPERON (Alameda, CA, USA) mit einem GC-Gehalt von 60-70% und ohne selbstkomplementäre Enden zunächst an einigen repräsentativen OTUs getestet. Die 8 Primer mit dem deutlichsten reproduzierbaren Muster wurden ausgewählt und für die Gattungsgruppe 1 eingesetzt (Tab.11 ; Kap.1.5.2 und 3.2.1). Gebrauchsfertige DNA-Lösungen in aqua bidest steril hatten eine Konzentration von 5 pM/µl und wurden bei 4°C gelagert. Die Gesamt-DNA-Isolate wurden mit bidest steril auf 5 ng/µl verdünnt. Die von RAMSER et al. (1996, 1997) für *Dioscorea* optimierten PCR-Bedingungen erwiesen sich als geeignet für Bromeliaceae.

Die PCR wurde in 25 µl-Volumen durchgeführt:

20 mM TRIS-HCl (pH 8,4)
50 mM KCl
2 mM MgCl₂
0,2 mM dNTPs
0,8 µM Primer (entspr. 20 pM / Reaktion)
0,06 U/µl Taq-Polymerase (entspr. 1,5 U / Reaktion; GIBCO-BRL)
50 ng Templat-DNA

Die Amplifikationen erfolgten in PE 2400-Thermocyclern der Firma Perkin Elmer Cetus nach folgendem Temperatur-Profil:

Denaturierung:	1 Minute bei 94°C
1. bis 3. Zyklus:	30 Sekunden/94°C (Denaturierung), 30 Sekunden/35°C (Annealing) und 1,5 Minuten/72°C (Synthese)
4. bis 28 Zyklus:	15 Sekunden/94°C, 30 Sekunden bei 35°C und 1,5 Minuten/72°C
Finale Extension:	2,5 Minuten/72°C

Zur Sicherung der Reproduzierbarkeit wurden alle Stammlösungen und die Primer aliquotiert. Es wurden Filterpipettenspitzen und bei jedem Ansatz parallele Negativkontrollen mit aqua bidest statt Templat eingesetzt. Zur Kontrolle wurden erst 7 µl der Reaktionsansätze mit DNA-Auftragspuffer (engl. "loading buffer", vgl. Anlage II) auf 1,4 %igen Agarosegelen in 1x TBE-Puffer aufgetrennt. Präparative Auftrennungen erfolgten dann bei 8 bis 10°C mit 18 µl der Reaktionen + LB in 1,8%igen Agarose-Gelen in 1x TBE-Puffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid angefärbt, 2x 20 bis 30 Minuten mit kaltem aqua bidest gewaschen und dann photographisch dokumentiert. Die RAPDs aller 8 Primerpaare wurden 2x durchgeführt und ließen sich klar reproduzieren.

Die Anwesenheit und Abwesenheit von Banden bei den jeweiligen OTUs wurde in eine 0/1-Matrix überführt (Anlage V: Datenmatrix RAPDs), paarweise Distanzmatrizes mit NTSYSpc berechnet (Jaccard-Index) und nach einer Cluster-Analyse (UPGMA) in Form eines Phänogramms dargestellt. NJ-Analysen und die Überprüfung der statistischen Absicherung (Bootstrap-Unterstützung; Felsenstein 1985) erfolgten mit PAUP 4.0Beta10 auf der Basis des Nei-Li-Koeffizienten (Nei & Li 1979).

2.7.2 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLPs)

Die Durchführung der AFLPs erfolgte unter Verwendung des AFLP small Genome Kit (GIBCO BRL; vertrieben von INVITROGEN) unter folgenden, vom Standardprotokoll z.T. abweichenden Bedingungen:

Jeweils 60 bis 65 ng Gesamt-DNA-Extrakt wurden in 6,25 µl Volumina mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *MseI* geschnitten [2h oder über Nacht bei 37°C]. Die Ligation der Adapter erfolgte in einem Endvolumen von 12,5 µl.

10% des Restriktions-Ligationsansatzes wurden in der präselektiven Amplifikation eingesetzt (*EcoRI* *MseI* + c). Testreihen (Beurteilung der Auflösung auf 4%igen PAA-Gelen) ergaben, dass eine 1:20-Verdünnung der Präselektiven PCR optimal als Templat für die Selektive PCR ist.

Die selektive ("touch-down") - PCR erfolgte mit Primern, die komplementär zu den anligierten Adaptoren sind und 2 bzw. 3 sog. "selektive Basen" aufweisen: *EcoRI*-Primern (*EcoRI* + cc, dieser wurde radioaktiv markiert) und *MseI*-Primern (*MseI* + ccc) (abweichend vom Standard-Protokoll 1/2 Volumen = 10 µl). Vergleiche auch "Ablauf einer AFLP-Analyse" im Anhang, Abb.8.

Die Markierung der *EcoRI*-Primer erfolgte durch eine radioaktive Endmarkierung, wobei eine besondere Eigenschaft des Enzyms T₄-Polynukleotidkinase ausgenutzt wird. Das γ -³²P-ATP dient bei dieser Reaktion als Phosphat-Donor (ALI et al. 1986).

Nach der Zugabe von je 1 Volumen Denaturierungspuffer (10 µl) wurden die Reaktionen für 3 Minuten bei 96°C denaturiert und danach bis zum Gelauftrag auf Eis gestellt.

Aliquots (meist 1 - 1,2 µl - je nach Frische des zum Endlabeln der *EcoRI*-Primer verwendeten γ -³²P ATPs) der selektiven PCR-Amplifikate + Denaturierungspuffer (Volumen 20 µl) wurden auf 4 %igen denaturierenden PAA-Gelen (Herstellung der Stocks und Vorbereitung der Gele siehe Anlage 2) von 0,4 mm Stärke aufgetrennt. Hierzu wurden SequiGen-GT Sequenzierapparaturen von BIORAD verwendet. Eine optimale Auftrennung der Fragmente erfolgt bei 50°C, weshalb ein Vorlauf der aufgebauten Apparatur mit dem Laufpuffer (1x TBE) bei 110 Watt nötig ist.

Die Auftrennung erfolgte über 2 Stunden bei 110 Watt, wobei je nach Außentemperatur in der letzten Stunde auf 100 oder 90 Watt Leistung reduziert werden musste, um das Temperaturoptimum einzuhalten. Nach Abbau der Apparatur und Überführung des PAA-Gels auf Blotting-Papier (MAGV) wurde das Gel auf einem Geltrockner von BIOMETRA getrocknet und mit einem Röntgenfilm belegt. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Frische des verwendeten γ -³²P-ATP. In der Regel reichte eine Belegung über Nacht bei - 80°C für eine weniger intensive und eine Belegung für 36 Stunden für eine stärkere Schwärzung des Röntgenfilms aus.

Nach Entwicklung der Autoradiogramme erfolgte die Auswertung der AFLP-Profile: Dazu wurde anhand der Röntgenfilme die Anwesenheit oder Abwesenheit von Banden an den jeweiligen Positionen für alle OTUs wie auch bei der RAPD-Analyse in eine 0/1-Matrix überführt (AnlageV: Datenmatrix AFLPs). Im NTSYSpc-Dateiformat wurden aus dieser 0/1-Matrix paarweise Distanzmatrizes mit NTSYSpc berechnet (Jaccard- und Dice-Index) und nach einer Cluster-Analyse (UPGMA) in Form eines Phänogramms dargestellt. Wie bei den RAPDs erfolgten NJ-Analysen und die Bestimmung der Bootstrap-Unterstützung (FELSENSTEIN 1985) mit PAUP 4.0Beta10 auf der Basis des Nei-Li-Koeffizienten (NEI & LI 1979).

2.8 Cytogenetische Untersuchungen

In Kooperation mit Prof. Ana Maria Benko-Iseppon und Jailson Gitaí dos Santos Frazão (Departamento de Genética, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasilien) konnten cytogenetische Untersuchungen an präparierten Wurzelspitzen einiger Bromeliaceae-Arten (siehe Tab.3) durchgeführt werden.

Junge, frische Wurzelspitzen wurden dazu in den frühen Morgenstunden (zwischen 7 Uhr 30 und 11 Uhr) von geeigneten ausgetopften Pflanzen mit einer Pinzette entnommen.

Zu dieser Tageszeit sind in den teilungsaktiven Meristemzellen der jungen Wurzelspitzen besonders viele Metaphasekerne vorhanden. Auch anderes teilungsaktives Gewebe, wie etwa Blattbasen oder Blütenknospen, ist geeignet und wurde getestet. Die besten Ergebnisse wurden jedoch mit Wurzelspitzenpräparaten erreicht. Zur Synchronisierung und Arretierung von vielen Zellkernen in der Metaphase (engl. „mitotic arrest“) wurden die Wurzelspitzen in 8-Hydroxychinolin (8-Chinolinol, 8-HQ) oder Colchicin gegeben; zuerst für etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei 4°C.

Das 8-HQ bzw. Colchicin hemmt die Ausbildung der Spindelfasern und synchronisiert die Zellzyklen innerhalb des Gewebes, so dass Metaphasekerne angereichert werden.

Am nächsten Morgen erfolgte die Fixierung des synchronisierten Gewebes mit Carnoy (3:1; Anlage II). Dazu wurde das 8 HQ abpipettiert, die Wurzelspitzen mit einem Aliquot Carnoy gewaschen und dann in einem dichten Reaktionsgefäß mit 35 ml Carnoy für ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Dann wurden die Wurzelspitzen in Carnoy bei -20°C eingefroren.

Für die Versendung der Wurzelspitzenpräparate wurde das Carnoy abpipettiert, zuerst mit etwas 70%igem Ethanol (angesetzt mit unvergälltem Ethanol) gewaschen und anschließend in einem dichten Reaktionsgefäß mit 45-50 ml 70%igem Ethanol (reinst, unvergällt) bis zur weiteren Präparation gelagert.

Die Herstellung von Standard-Chromosomenpräparaten erfolgte nach dem Protokoll von BENKO-ISEPPON & MORAWETZ (2000) durch Jailson Gitaí dos Santos Frazão (AG Prof. Ana Maria Benko-Iseppon). Zur Präparation wurden von den Wurzelspitzenfixierungen durch enzymatischen Aufschluß der Zellwände und weiterer Zellbestandteile Zellsuspensionen hergestellt. Durch Auftropfen der so vorbereiteten Wurzelspitzenzellsuspensionen auf vorbereitete Objektträger platzen die Protoplasten und es wird eine Trennung von Zellresten und Zellkernen erreicht.

Die so auf Objektträgern aufgespreiteten und fixierten Chromosomenpräparate wurden mit verschiedenen Chromosomen-Bänderungs-Methoden untersucht. Eine spezielle Giemsa-Färbung (engl. „C-banding“) erfolgte nach SCHWARZACHER et al. (1980). Fluorochrome-Färbungen mit Chromomycin A₃ (CMA), ActinomycinD (AMD) und 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) erfolgte nach dem von DEUMLING & GREILHUBER 1982 beschriebenen Verfahren.

Silbernitratfärbungen (AgNO_3) zur Untersuchung der Ausprägung von Interphase-Nuclei erfolgte nach dem von HIZUME et al. (1980) beschriebenen Verfahren. Die photographische Dokumentation erfolgte mit Kodak Technical Pan bzw. mit Kodak T-Max 400 Filmen bei den Fluorochrom-Färbungen.

Taxon	Herkunft, Sammler, Beleg	Chromosomenzahl		Autor(en)	
		Diese Studie	Vorherige Bestimmungen		
			Für die Art		Für die Gattung
Bromelioideae					
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Rudge) Baker	Wildaufsammlung, Brasilien, Bahia, Rio de Contas, Benko-Iseppon, A.M., Nr. BRO-1220.	2n=50	-	2n=50 ^{a,b,c,d,f} , 54 ^a n=25 ^{c,e}	^a Lindschau 1933, ^b Weiss 1965; ^c Brown <i>et al.</i> , 1984; ^d Brown <i>et al.</i> , 1997; ^e Brown & Gilmartin 1989; ^f Cotias-de-Oliveira, 2000.
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrel	Kultivierte Pflanze, Brasilien, Pernambuco, Recife, lokaler Markt, Benko-Iseppon, A.M. Nr. BRO-1246	2n=50	2n=48 ^a , 50 ^{a,b,c,d,f} , 75 ^{a,b} , 100 ^b , n=25 ^c	-	^a Lin <i>et al.</i> , 1987; ^b Collins & Kerns, 1931, 1936, 1938; ^c Bhowmik, 1977; ^d Chen <i>et al.</i> 1985; ^e Brown & Gilmartin, 1989; ^f Cotias-de-Oliveira <i>et al.</i> , 2000.
<i>A. nanus</i> (L.B. Sm.) L.B. Sm.	Kultivierte Pflanze, Brasilien, Pernambuco, Recife, Campus UFPE; Gitaf, J., BRO-001	2n=50	-	-	
<i>Deinacanthon urbanianum</i> (Mez) Mez	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, FRP 98-17786-0, Brasilien, leg. Horst 08.09.1972, ohne weitere Angaben, H018	2n≅160	-	-	-
<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pavon) Mez ssp. <i>bicolor</i>	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, FRP 98-16846-3, Samen aus dem RBG Kew, FR 6a	2n=50	-	-	-
<i>F. bicolor</i> (Ruiz & Pavon) Mez ssp. <i>canaliculata</i> E. C. Nelson & Zizka	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, FRP 90-17118-3, Samen aus dem RBG Kew, FR16a	2n=50	-	-	-
<i>Greigia</i> spec. nov..	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, Kolumbien, Cundina marca, Monserrate, 04°36'035"N, 074°03'238"W, leg. J.R. Grant 30.04.1999, FRP 99-19040-0, H157	2n=50	-	-	-
<i>G. sphacelata</i> (Ruiz & Pavon) Regel	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, aus Chile, Provinz Concepcion, Wald bei Hualqui, FRP 98-16855-1, Beleg Horres H27a.	2n=50	-	-	-
<i>Bromelia laciniosa</i> Mart.ex Schultes	Wildaufsammlung, Brasilien, Bahia; Paulo Afonso, Benko-Iseppon, A.M., 15-05/03/98	2n≅150	2n=150 ^c	2n=48 ^a , 2n=94 ^a 2n=96 ^b , 2n=50+1-2B ^c , 2n=150 ^c	^a McWilliams 1974; ^b Lin <i>et al.</i> , 1987, ^c Cotias-de-Oliveira <i>et al.</i> , 2000
<i>Ochagavia litoralis</i> (Phil.) Zizka, Trumpler & Zoellner	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, FRP 94-14614-3, Beleg H115 (Horres)	2n=50	-	-	-
<i>O. elegans</i> R. Philippi	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, FRP 98-16852-3a, II 93 RBG Kew 1987-2763, FR23a	2n=50	-	-	-
<i>Orthophytum disjunctum</i> L.B.Sm.	Wildaufsammlung, Brasilien, Pernambuco, Camocin de São Félix; Sales de Melo, M.R.C., BRO-009.	2n=50	-	2n=50 ^a	^a Morillo, 1996
Pitcairnioideae					
<i>Ayensua uipainensis</i> (Maguire) L.B. Sm.	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, Venezuela, Auyantepui, 2000 m N.N.; leg. Bütschi (Bern) 1992, FRP 92- 9510-2, Beleg H011 (Horres)	2n=46	-	-	-
<i>Deuterocohnia lorentziana</i> (Mez) Spencer & L.B.Sm.	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, o.Nr., ex B.G. Heidelberg (130007), Beleg Horres 2002	2n=50 2n≅100	-	n=25 ^{a,b}	^a Brown <i>et al.</i> , 1984; ^b Brown & Gilmartin 1989.
<i>Dyckia saxatilis</i> Mez.	Wildaufsammlung, Brasilien, Bahia; Rio de Contas, Benko-Iseppon, A.M., BRO-1228.	2n=50	-	2n=50 ^a , n=25 ^{b,c}	^a Lindschau, 1933; ^b Brown 1984; ^c Brown & Gilmartin 1989.
<i>Pitcairnia atrorubens</i> (Beer) Baker	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, Costa Rica, FRP 89-16095-2, 20.07.1988 (Aus Samen angezogen durch Herrn Billensteiner).	2n=50	-	2n=50 ^{a,b,c} , n=25 ^d	^a Lindschau, 1933; ^b Brown <i>et al.</i> , 1987; ^c Varadarajan & Brown 1985; ^d Brown & Gilmartin, 1989
<i>Puya mirabilis</i> (Mez) L. B. Sm.	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, FRP 86-418-1-3, Bestimmung und Beleg Horres 2002	2n=50	-	50 ^{a,b,c} , n=25 ^d	^a Lindschau 1933; ^b Diers 1961, ^c Huynh 1965; ^d Brown & Gilmartin 1989.
Tillandsioideae					
<i>Catopsis floribunda</i> L.B. Sm.	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, o.Nr., Bestimmung und Beleg Horres 2002	2n=50	-	n=25 ^{a,b}	^a Brown <i>et al.</i> , 1984; ^b Brown & Gilmartin 1989.
<i>Tillandsia dodsonii</i> L.B. Sm.	Kultivierte Pflanze, Deutschland, Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main, FRP 90-9649-4-2, Bestimmung und Beleg Horres 2002	2n=50	n=, 25 ^{h,i} , 2n=, 50 ^h	2n=32 ^a , 48 ^{b,c} , 50 ^{d,i} , 56 ^e , 64 ^{e,f} , 96 ^{c,e,f} , n=18 ^g , 19 ^h , 20 ^d , 22 ^h , 25 ^{h,i} , 50 ^h	^a Billings 1904; ^b Doutreigne 1939; ^c Weiss 1965; ^d Brown <i>et al.</i> 1984; ^e Gauthé 1965; ^f Lindschau 1933; ^g Brown & Gilmartin 1983; ^h Brown & Gilmartin, 1989, ⁱ Brown <i>et al.</i> 1997

Tab.3: Bromeliaceae-Arten in der cytogenetischen Untersuchung. Aus: GITAF, J., BENKO-ISEPPON, A. M. & HORRES R.: Cytogenetics and Evolution of Bromeliaceae.- in Vorbereitung; wird eingereicht bei Plant Systematics and Evolution. Legende: - = nicht untersucht, ca.= ungefähre Zahl.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzdaten

Die drei untersuchten molekularen Marker (*trnL*-Intron, CD-Fragment; *trnT*-*trnL* und *trnL*-*trnF* Intergenischer Spacer, AB- und EF-Fragment) erwiesen sich als in unterschiedlicher Weise variabel und für die Fragestellung verwendbar. Für das CD- und EF-Fragment differiert das erfolgreich bearbeitete Artenset leicht, so dass es sinnvoll ist die Alignments und Analysen für die Marker zunächst jeweils einzeln zu betrachten und anschließend auf kombinierte Analysen der Marker einzugehen.

Es wurden Sequenzen von bis zu 909 bp beim CD-Fragment (H126, *Racinaea spiculosa*; bei dieser Sequenzierung des CF-Amplikons reichte die Sequenz des C-Primers bis in den Bereich des EF-Fragmentes hinein) und 772 bp beim EF-Fragment (H076, *Puya densiflora*; hier reichte die Sequenz des F-Primers beim Sequenzieren des CF-Amplikons an das CD-Fragment heran) analysiert.

In der Anlage I ist aufgeführt, von welchen Akzessionen Sequenzen des AB-, CD- bzw. CF-Fragmentes analysiert werden konnten. Zur Polarisierung der Lesrichtung - Außengruppe bei den kladistischen Analysen - wurden die Sequenzen von *Rapatea paludosa* (Rapateaceae), *Barbacenia elegans* (Velloziaceae) und *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) verwendet.

Beim Alinieren mussten Lücken (engl. „gaps“) eingefügt werden, die Insertions- bzw.

Deletionsereignisse (InDels) darstellen. Einige dieser InDels traten bei mehreren Arten auf und wurden als Synapomorphien interpretiert. Nach Kodierung als 0/1-Matrix wurden diese Merkmale in die Sequenzanalysen einbezogen (s. u. Kap. 3.1 und Anlage VI).

Nach dem von HILLIS & HÜLSENBECK (1992) entwickelten Permutationstestverfahren auf der Basis der "g1-Statistik" von SOKAL & ROHLF (1981) lassen sich Sequenzdatensätze daraufhin überprüfen, ob es sich bei den Basensubstitutionen um Zufallsverteilungen ohne evolutionären Zusammenhang handelt oder ob der Datensatz Gesetzmäßigkeiten aufweist, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein phylogenetisches Signal hinweisen. Mit diesem Verfahren kann die Asymmetrie oder „Linksschiefe“ der Baumhöhenverteilung (engl. „skewness“) bewertet werden. Dieses Verfahren ist in PAUP 4.0 Beta 6 und 4.0 Beta 10 (SWOFFORD & BEGLE 1993, SWOFFORD 1998) implementiert (Option „Random trees“). Sind die Frequenzen von zufällig ermittelten 1000 Baumhöhen (auf der Basis des Datensatzes) zu größeren Werten hin verschoben, wird der ermittelte g1-Wert < 0. Dies bedeutet, dass die Merkmale in nicht zufälliger Weise korreliert sind und mit großer Wahrscheinlichkeit ein phylogenetisches Signal enthalten (siehe auch WÄGELE 2001: 298-299). Die g1-Werte aller drei untersuchten molekularen Marker - allein und in den jeweiligen untersuchten kombinierten Datensätzen (mit und ohne Definition von *Rapatea paludosa* (Rapateaceae), *Barbacenia elegans* (Velloziaceae) und/oder *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) als Außengruppe) - sind negativ (Abb. 12 bis 19).

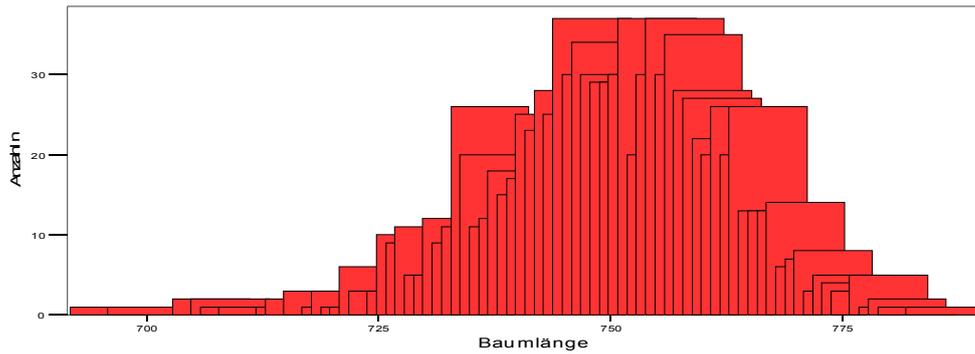


Abb.12: Verteilungskurve von 1000 zufällig mit der „Random trees“-Option ermittelten Bäumen für den *trnL*-Intron (CD) Gesamtdatensatz ohne Definition der Außengruppe (135 OTUs ; Mittelwert = 752 ; $s = 12,8$; $g1 = -0,502$)

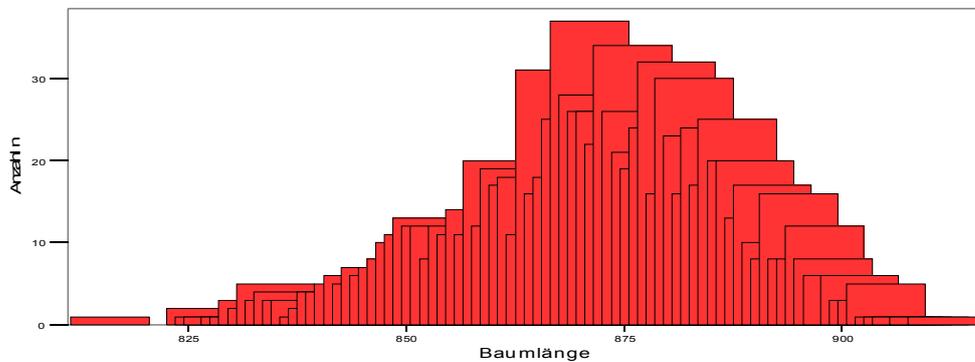


Abb.13: Verteilungskurve von 1000 zufällig mit der „Random trees“-Option ermittelten Bäumen für den *trnL*-Intron (CD) Gesamtdatensatz ohne 079 und 141 und mit Definition der Außengruppe (133 OTUs ; Mittelwert = 873,3; $s = 15,7$; $g1 = -0,411$).

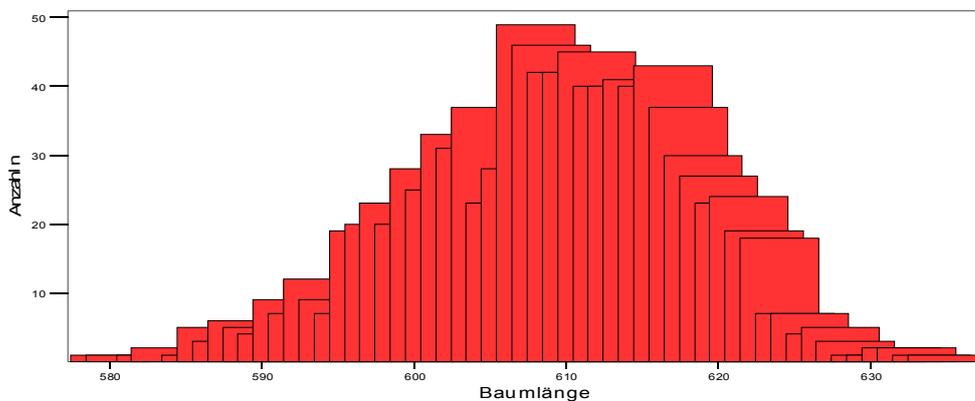


Abb.14: Verteilungskurve von 1000 zufällig mit der „Random trees“-Option ermittelten Bäumen für den *trnT-trnL* Intergenischen Spacer (EF) Datensatz ohne Definition der Außengruppe (126 OTUs; Mittelwert = 619; $s = 9,10$; $g1 = -0,298$).

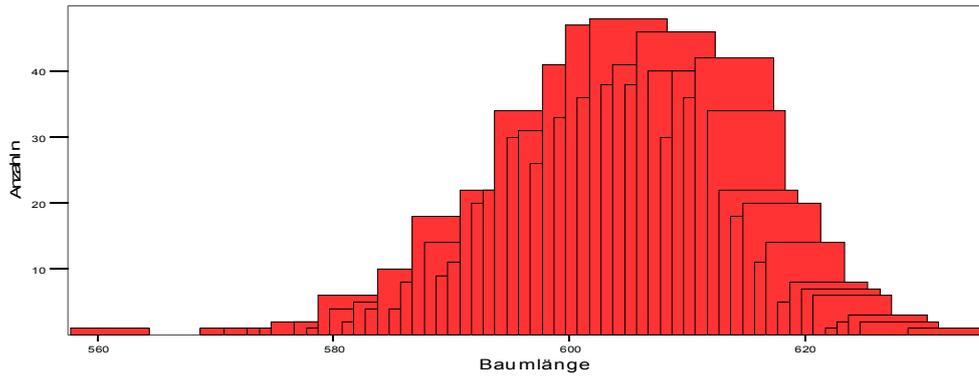


Abb.15: Verteilungskurve von 1000 zufällig mit der „Random trees“-Option ermittelten Bäumen für den *trnT-trnL* Inter-genischen Spacer (EF) Datensatz mit Definition der Außengruppe und ohne 079, 080 und 141 (123 OTUs ; Mittelwert = 605,5; $s = 9,3$; $g1 = -0,377$).

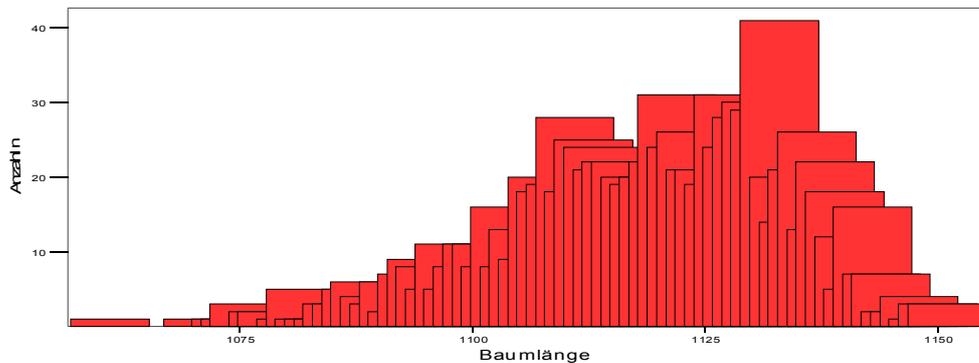


Abb.16: Verteilungskurve von 1000 zufällig mit der „Random trees“-Option (PAUP) ermittelten Bäumen für den kombinierten Datensatz von *trnL*-Intron (CD) und *trnL-trnF* Inter-genischem Spacer (EF) mit Definition der Außengruppe und ohne 079, 080 und 141 (111 OTUs; Mittelwert=1120,5, $s = 15,1$; $g1 = -0,584$).

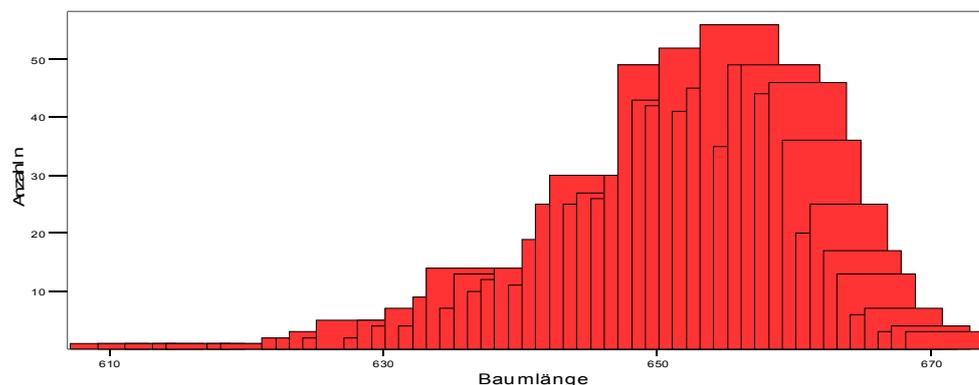


Abb.17: Verteilungskurve von 1000 zufällig mit der „Random trees“-Option ermittelten Bäumen für den kombinierten Datensatz von *trnT-trnL* Inter-genischem Spacer (AB), *trnL*-Intron (CD) und *trnL-trnF* Inter-genischem Spacer (EF) ohne Definition der Außengruppe (36 OTUs; Mittelwert = 652,3, $s = 9,2$; $g1 = -0,926$).

In den folgenden Abbildungen mit Darstellungen von NJ- und Maximum-Parsimonie-Analysen auf der Basis von Sequenzdaten sind die Unterfamilienzugehörigkeiten der untersuchten OTUs sensu SMITH & TILL (1998) farblich kodiert: Bromelioideae rot, Tillandsioideae grün und Pitcairnioideae blau.

3.1.1 Sequenzdaten und Analysen des *trnT*(UGU)-*trnL*(UAA)-Intergenischen Spacers [zwischen *trnT*(UGU) und *trnL*(UAA)-5'-Exon; AB-Fragment]

Das AB-Fragment erwies sich zum größten Teil als extrem variabel und es konnte in vielen Bereichen kein zufriedenstellendes Alignment erstellt werden. Zudem wurden nur bei einem Teil der Arten verwertbare Sequenzen erzielt. Lange Bereiche von Poly-A- und Poly-T -Regionen finden sich hier häufig, ebenso wie Insertionen/Deletionen unterschiedlicher Länge, was die Ursache für Unterschiede von bis zu 500 bp beim AB-Amplikon ist. Einzig mit einem 262 bp langen Bereich (siehe Anlage VI: Alignment des AB Fragmentes), der vergleichsweise wenig variabel ist, konnte ein sicheres Alignment erstellt werden. Die wenigen informativen Merkmale erlauben keine sinnvolle Analyse nur auf der Basis dieses Markers. Das Alignment ist in Anlage VI wiedergegeben.

Länge des gesamten untersuchten Alignments	262 bp
Länge des gesamten Alignments (nur Bromeliaceae)	245 bp
Anzahl Synapomorphien (mit Außengruppe)	23
Anzahl Autapomorphien (mit Außengruppe)	71
Anzahl Synapomorphien Bromeliaceae	10
Anzahl Synapomorphien nur Bromelioideae (17 Arten/Unterarten)	2
Anzahl Autapomorphien Bromeliaceae	53
Anzahl Autapomorphien nur Bromelioideae (17 Arten/Unterarten)	23
Insertionen / Deletionen nur Bromeliaceae (Länge Min./Max. in bp)	1 bis 5
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromeliaceae)	34
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromeliaceae)	33
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromeliaceae)	27
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromelioideae)	17
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromelioideae)	16
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromelioideae)	15

Tab.4: Zusammenfassung der Sequenzanalyse des *trnT*- *trnL* Intergenischen Spacers (AB-Fragment); Alignment in Anlage VI. Berücksichtigt ist hier nur der in die Analysen einbezogene Teil des Alignments, der für die kombinierten Analysen verwendet wurde.

3.1.2 Sequenzdaten und Analysen des *trnL*(UAA)-Intron [zwischen *trnL*(UAA)-5'- Exon und *trnL*(UAA)-3'-Exon; CD-Fragment]

Hier wurden die besten Ergebnisse, d.h. das längste Alignment mit der größten Zahl an informativen Merkmalen, erzielt. Erste Ergebnisse mit 64 untersuchten Arten / Unterarten wurden bereits publiziert (HORRES et al. 2000; Anlage VII). Die Zahl der untersuchten Arten konnte bis zum Ende der Untersuchungen auf 129 erhöht werden. Wie schon erwähnt wurden dabei die Vertreter der Bromelioideae besonders berücksichtigt: Bromelioideae 72 Akzessionen / 69 Arten / 30 Gattungen, Tillandsioideae 30 Akzessionen / 29 Arten / 8 Gattungen, Pitcairnioideae 31 Akzessionen / 31 Arten / 10 Gattungen (vgl. Tab.1).

Die bereits publizierten Daten werden hier nicht noch einmal dargestellt, sämtliche im Folgenden präsentierten phylogenetischen Rekonstruktionen stützen sich auf den umfangreichsten, aktuellsten Datensatz.

Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung relevanter Sequenzdaten für das CD-Fragment.

Für das CD-Fragment wurden 12 InDels als 0/1 Matrix kodiert. Die Positionen in bp beziehen sich auf das 651 bp lange Alignment (Tab.6).

Bei den Insertions- bzw. Deletionsereignissen handelt es sich oft um direkte Wiederholungen von kurzen Sequenzfolgen, zusätzlich mit Basensubstitutionen in einigen Akzessionen (Positionen mit Basensubstitutionen sind rot markiert; siehe auch Anlage VI: InDel-Kodierung CD-Fragment).

Länge des gesamten untersuchten Alignments	651 bp
Anzahl Synapomorphien (mit Außengruppe)	77
Anzahl Autapomorphien (mit Außengruppe)	93
Anzahl Synapomorphien (nur Bromeliaceae)	71
Anzahl Autapomorphien (nur Bromeliaceae)	62
Anzahl Synapomorphien nur Bromelioideae	25
Anzahl Autapomorphien nur Bromelioideae	51
Insertionen / Deletionen nur Bromeliaceae (Länge Min./Max. in bp)	1 bis 59
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromelioideae)	72
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromelioideae)	69
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromelioideae)	30
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromeliaceae)	133
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromeliaceae)	129
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromeliaceae)	48
Anzahl der kodierten InDels (Vgl. Anlage VI)	12

Tab.5: Zusammenfassung der Sequenzanalyse des *trnL*-Introns (CD-Fragment); Alignment in AnlageVI.

Kodierte InDel Nr. (Position im 661 bp langen Alignment)	Sequenz
InDel 1 (120-123 bp)	ATAT
InDel 2 (132-138 bp)	TCTTTCA
InDel 3 (198-204 bp)	ATTTCAT
InDel 4 (205-207 bp)	GAT/AAT
InDel 5 (210-214 bp)	TTCAT
InDel 6 (249-253bp)	ATAAA (1xT; 070).
InDel 7 (285-288 bp)	ATAA (1xG; 088)
InDel 8 (303-317 bp)	GATTTATATGATATG
InDel 9 (345-349 bp)	TTGAT
InDel 10 (391-394 bp)	ATCC, ATCT bei 034 (<i>Navia</i>), 211, 135)
InDel 11 (410-414 bp)	TTTCG
InDel 12 (430-434 bp)	TTCCA

Tab.6: Sequenz der 12 als 0/1 Matrix kodierten Insertionen/Deletionen des CD-Fragmentes. Abweichende Basen bei einzelnen Akzessionen sind rot markiert (vgl. AnlageVI: CD-Alignment und InDel-Kodierung).

Bei Einbeziehung aller 133 Bromeliaceae-Akzessionen mit *Rapatea paludosa* und *Zingiber officinale* als Außengruppe finden sich sowohl bei NJ-Analysen des CD-Fragmentes auf der Basis von vier verschiedenen Distanzmatrizes (*p*-, Jukes-Cantor-, HKY- und ML [HKY85+G Modell]- Distanz) als auch bei den Maximum-Parsimonie-Analysen für einige OTUs Positionen außerhalb der erwarteten Unterfamilienzugehörigkeit. Abbildung 18 zeigt die NJ-Analyse auf der Basis der *p*-Distanz.

Brocchinia und *Ayensua* bilden eine gut gestützte Gruppe (Bootstrapwert 99%) an der Basis.

Alle untersuchten Tillandsioideae - bis auf *Mezobromelia hutchisonii* - finden sich auf einem Ast (Bootstrapwert 72%). Eine der zwei untersuchten Arten der Gattung *Chevaliera* (Bromelioideae), *Chevaliera cariocae*, findet sich auf diesem Ast mit allen Vertretern der Tillandsioideae.

Eine Zusammengehörigkeit der drei untersuchten *Hechtia*-Arten und *Navia splendens*, die hier die Schwestergruppe der Tillandsioideae bilden, wird nicht statistisch gestützt. Auch der Ast mit den drei *Hechtia*-Arten hat nur eine Wiederfindungswahrscheinlichkeit von 58%.

Auf der Basis der Bootstrapanalyse findet sich *Mezobromelia hutchisonii* ohne eindeutige Zuordnung auf einem Ast mit den Bromelioideae, *Fosterella*, *Puya* und den Pitcairnioideae s.str., die in dieser Analyse vier Gruppen mit Bootstrapunterstützung bilden: *Dyckia* und *Deuterocohnia* (95%), *Deuterocohnia* (78 %), *Pepinia* und *Pitcairnia* (52%) und *Pitcairnia* (86%).

Hervorzuheben ist hier, dass *Pseudananas sagenarius* in dieser wie in allen NJ-Analysen des CD-Fragmentes innerhalb der Bromelioideae gruppiert. In allen Maximum-Parsimonie-Analysen des CD-Fragmentes alleine und in kombinierten Analysen des CD- und EF-Fragmentes findet sich diese monotypische Gattung der Bromelioideae auf einem Ast mit den untersuchten Vertretern der Gattung *Puya* (Pitcairnioideae sensu SMITH & TILL 1998; s.u. und Diskussion Kap. 4.1).

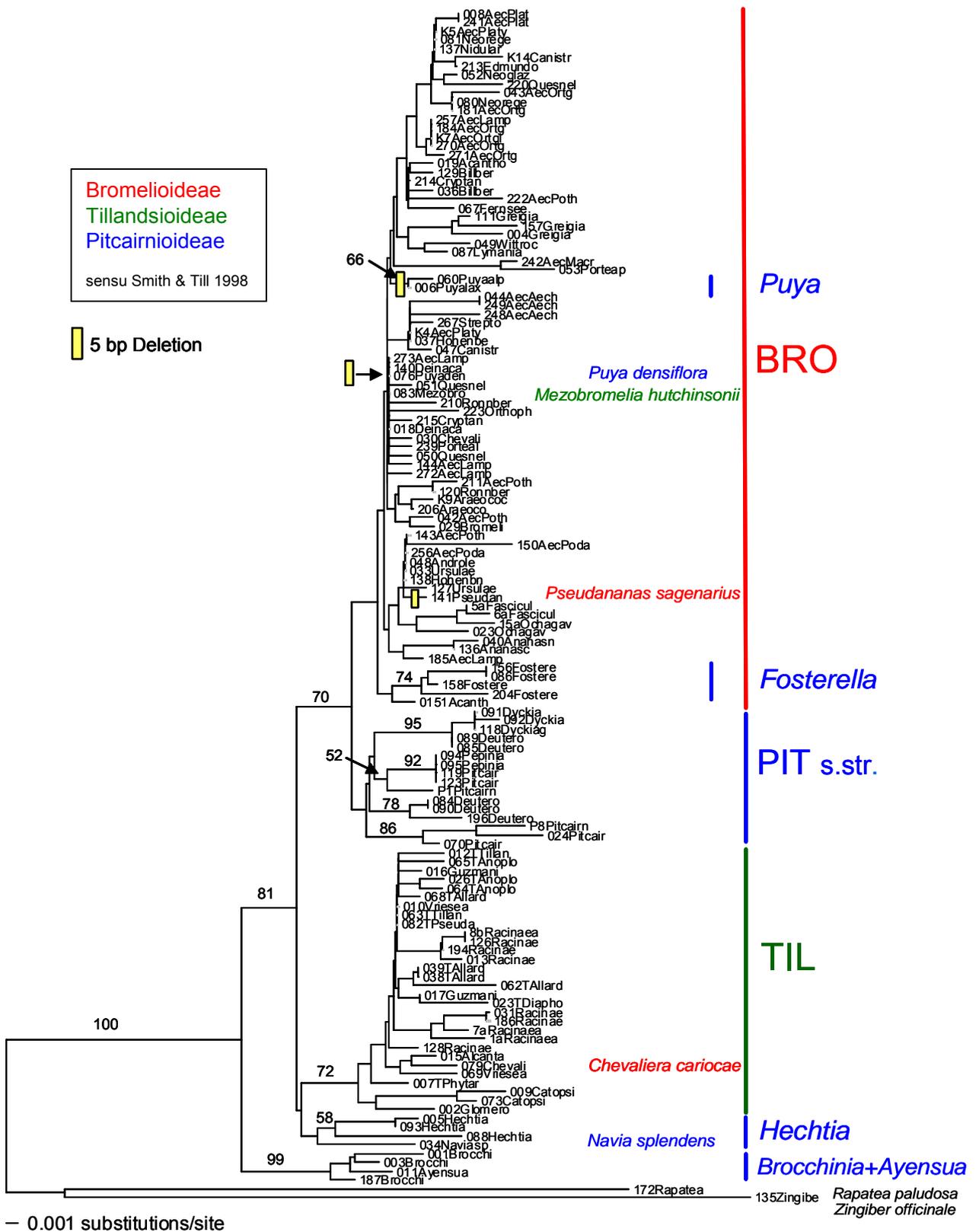


Abb.18: NJ-Analyse des CD-Fragmentes auf der Basis der p -Distanzmatrix. Die Zahlen oberhalb der Äste kennzeichnen Bootstrapwerte > 50% (an den terminalen Enden wegen der graphischen Darstellung weggelassen oder mit Pfeilen zugeordnet). Eine 5 bp Deletion (InDel 6), die sich nur bei den untersuchten Akzessionen von *Puya* und *Pseudananas* findet, ist gelb kartiert.

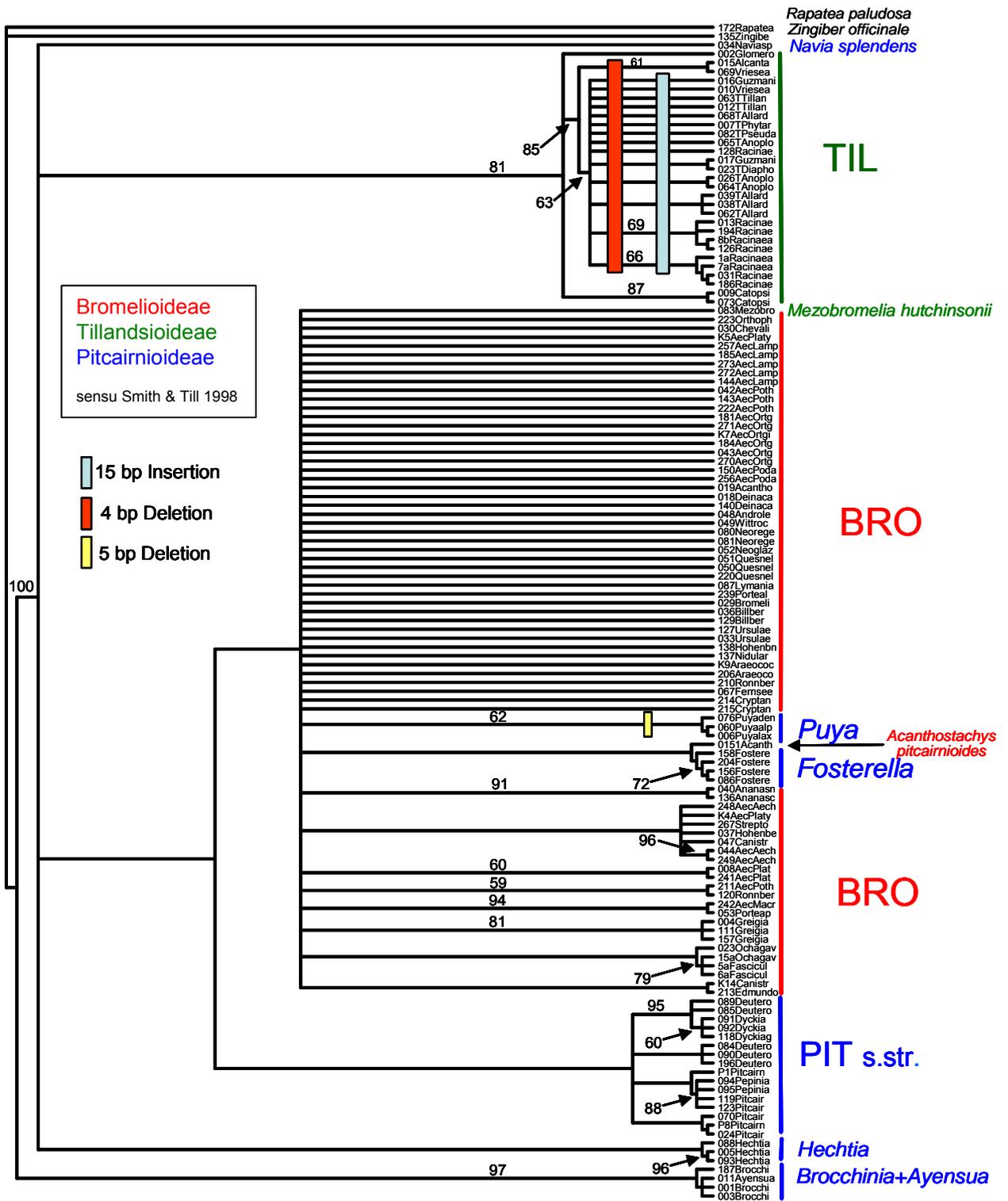


Abb.19: Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Intron (CD)-Gesamtdatensatzes ohne die Akzessionen 079 und 141. Strict Konsensus-Baum berechnet aus 2297 MPT mit einer Länge von 332 Schritten, CI 0,705, RI 0,859, RC 0,606; (erhalten nach der PAUP-Filter-Option „Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist“). Die Zahlen oberhalb der Äste kennzeichnen Bootstrapwerte >50 % (an den terminalen Ästen wegen der graphischen Darstellung weggelassen oder mit Pfeilen zugeordnet). Drei informative InDels (6, 8 und 10; vgl. Tab. 6) sind kartiert.

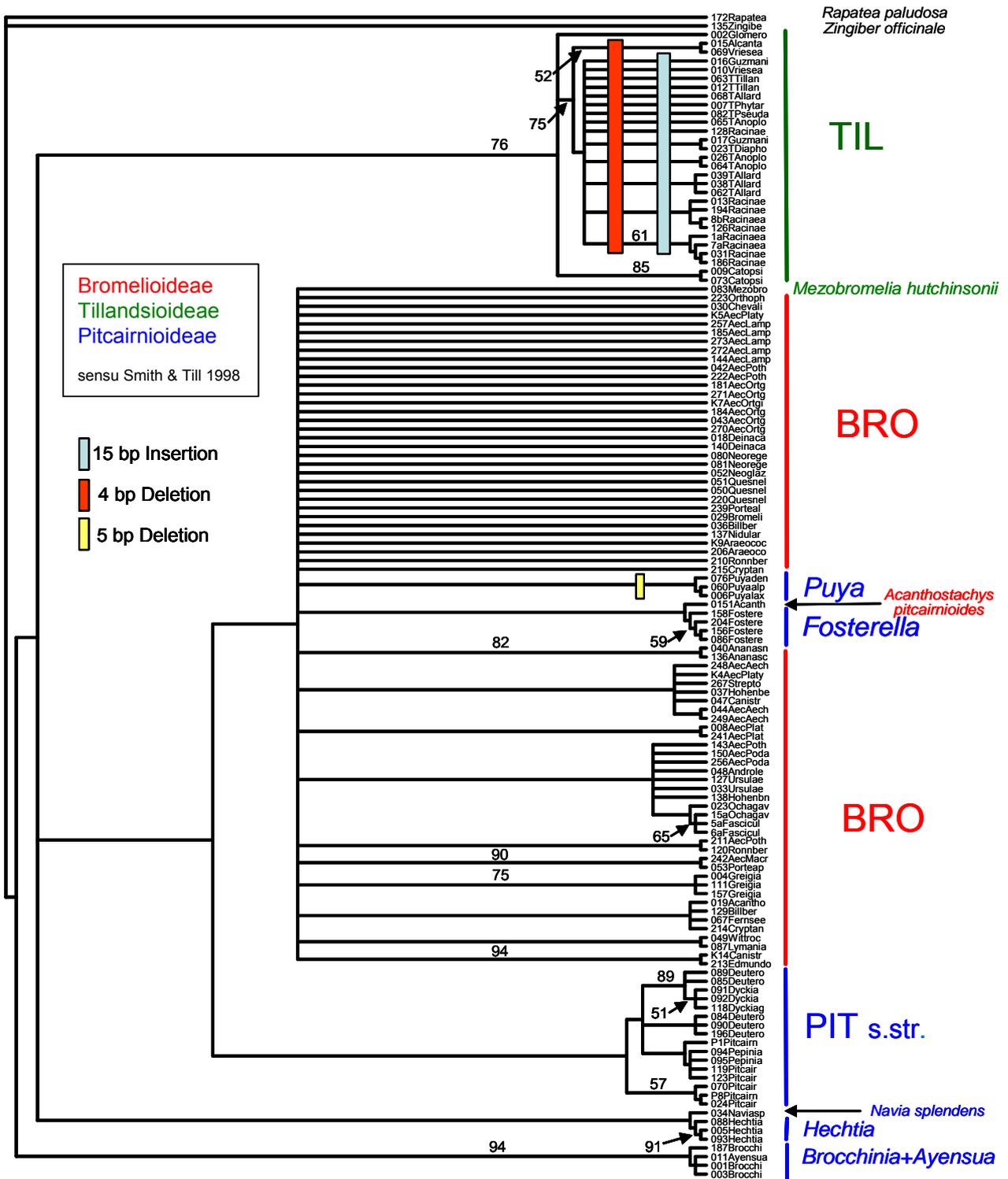


Abb.20: Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Intron (CD) Gesamtdatensatzes ohne die Akzessionen 079 und 141. 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum berechnet aus 2297 MPT mit einer Länge von 332 Schritten, CI 0,705, RI 0,859, RC 0,606; (erhalten nach der PAUP-Filter-Option „Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist“). Die Zahlen oberhalb der Äste kennzeichnen Jackknife-Werte >50 % (an den terminalen Ästen wegen der graphischen Darstellung weggelassen oder mit Pfeilen zugeordnet). Drei informative InDels (6, 8 und 10; vgl. Tab. 6) sind kartiert.

Die hier gezeigte Maximum-Parsimonie-Analyse des CD-Fragmentes wurde unter Ausschluss der beiden Bromelioideae-Akzessionen 079 (*Chevaliera cariocae*) und 141 (*Pseudananas sagenarius*) durchgeführt. Berechnet auf der Basis von 2297 MPT-Baumtopologien mit einer Länge von 332 Schritten sind in den Abbildungen 19 und 20 der Strict Konsensus-Baum und der 60 % Majority-Rule Konsensus-Baum wiedergegeben. Diese Analyse liefert im Wesentlichen die gleichen Informationen wie die NJ-Analysen:

An der Basis findet sich die mit einer hohen Wiederfindungswahrscheinlichkeit gut gestützte Gruppe *Brocchinia/Ayensua* (Bootstrap-Wert: 97% / Jackknife-Wert: 94 %). Die Schwestergruppenbeziehung von *Navia splendens* zur Gattung *Hechtia* und auch die Monophylie der *Hechtia*-Gruppe wird nicht gestützt, weil die Zugehörigkeit der Akzession 088 (*Hechtia guatemalensis*) in Bootstrap- und Jackknife-Analyse ohne Auflösung ist. Innerhalb der Pitcairnioideae s.str. werden nur einige terminale Äste gestützt. Die Bromelioideae weisen nur wenige gut gestützte Gattungen auf (*Ananas* und *Greigia*) und auch die Position von *Fosterella*, *Mezobromelia hutchisonii* und *Puya* ist ohne Auflösung. Gut gestützt sind die Tillandsioideae ohne *Mezobromelia hutchisonii* (Bootstrap-Wert: 81% / Jackknife-Wert: 76 %). An der Basis dieser Äste finden sich *Catopsis* und *Glomeropitcairnia*, *Alcantarea regina* und *Vriesea racinae* bilden die Schwestergruppe zu den übrigen untersuchten Tillandsioideae. Die Gliederung der Tillandsioideae wird zusätzlich durch eine 15 bp Insertion (InDel 8, Position 303 bis 317 im Alignment) und eine 4 bp Deletion (InDel 10, Position 391 bis 394 im Alignment) gestützt. Die untersuchten Akzessionen von *Catopsis* und *Glomeropitcairnia* haben weder Insertion noch Deletion, *Alcantarea regina* und *Vriesea racinae* weisen im *trnL*-Intron nur die 4 bp Deletion auf. *Mezobromelia hutchisonii* weist im *trnL*-Intron wie die untersuchten Vertreter der Gattung *Catopsis* und *Glomeropitcairnia erectiflora* weder die 15 bp Insertion noch die 4 bp Deletion auf.

3.1.3 Sequenzdaten und Analysen des *trnL*(UAA)-*trnF*(GAA)-Intergenischen Spacers [zwischen *trnL*(UAA)-5'- Exon und *trnF*(GAA)-Gen, EF-Fragment]

Im endgültigen Datensatz für das EF-Fragment befinden sich 124 Bromeliaceae-Akzessionen von 120 Arten: Bromelioideae 78 Akzessionen / 74 Arten / 30 Gattungen, Tillandsioideae 21 Akzessionen / 21 Arten / 8 Gattungen, Pitcairnioideae 25 Akzessionen / 25 Arten / 10 Gattungen (vgl. Tab.1).

Länge des gesamten untersuchten Alignments	542 bp
Anzahl Synapomorphien (mit Außengruppe)	62
Anzahl Autapomorphien (mit Außengruppe)	91
Anzahl Synapomorphien (nur Bromeliaceae)	51
Anzahl Autapomorphien (nur Bromeliaceae)	60
Anzahl Synapomorphien nur Bromelioideae	24
Anzahl Autapomorphien nur Bromelioideae	32
Insertionen / Deletionen (nur Bromeliaceae) (Länge Min./Max. in bp)	1 bis 255
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromelioideae)	78
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromelioideae)	74
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromelioideae)	48
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromeliaceae)	124
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromeliaceae)	120
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromeliaceae)	48
Anzahl der kodierten InDels (Vgl. Anlage VI)	9

Tab.7: Zusammenfassung der Sequenzanalyse des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers (EF-Fragment); Alignment in Anlage VI.

Das EF-Fragment ist stärker längenkonserviert als das AB-Fragment. Von wenigen Ausnahmen abgesehen (z.B. *Bromelia serra* und *Hohenbergiopsis guatemalensis* mit Deletionen von 255 bzw. 131 bp im analysierten Teil des Alignments) war das Amplikon durchschnittlich 480 bp lang. Tabelle 7 zeigt eine Zusammenfassung relevanter Sequenzdaten für das EF-Fragment. Im 542 bp langen Alignment wurden für diesen Sequenzabschnitt 9 InDels als 0/1 Matrix kodiert (Tab.8). Auffällig sind in diesem Sequenzabschnitt lange Insertionen/Deletionen, z.T. mit informativen, sich wiederholenden Basenfolgen sowie vielen Poly-A- und Poly-T-Regionen. Das Alignment ist in Anlage VI wiedergegeben. Die angegebenen Positionen in bp beziehen sich auf dieses Alignment. Eine Analyse des EF-Fragmentes erwies sich als weniger informativ als die des CD-Fragmentes. Das kürzere Alignment weist innerhalb der Bromeliaceae 20 Synapomorphien (51, vgl. Tab.7) weniger auf als das *trnL*-Intron (71, Tab.5). Dementsprechend ergibt sich eine unzureichende Auflösung für diesen Marker alleine. Die Abbildung 21 zeigt den 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum einer Maximum-Parsimonie-Analyse. Von den Gruppen, die auf der Datenbasis des CD-Fragmentes eine gute statistische Absicherung haben, z.B die Tillandsioideae, *Brocchinia* und *Ayensua*, *Fosterella* und

innerhalb der Bromelioideae *Greigia*, weisen bei der Bootstrapanalyse des EF-Datensatzes nur einzelne Äste eine Wiederfindungswahrscheinlichkeit auf.

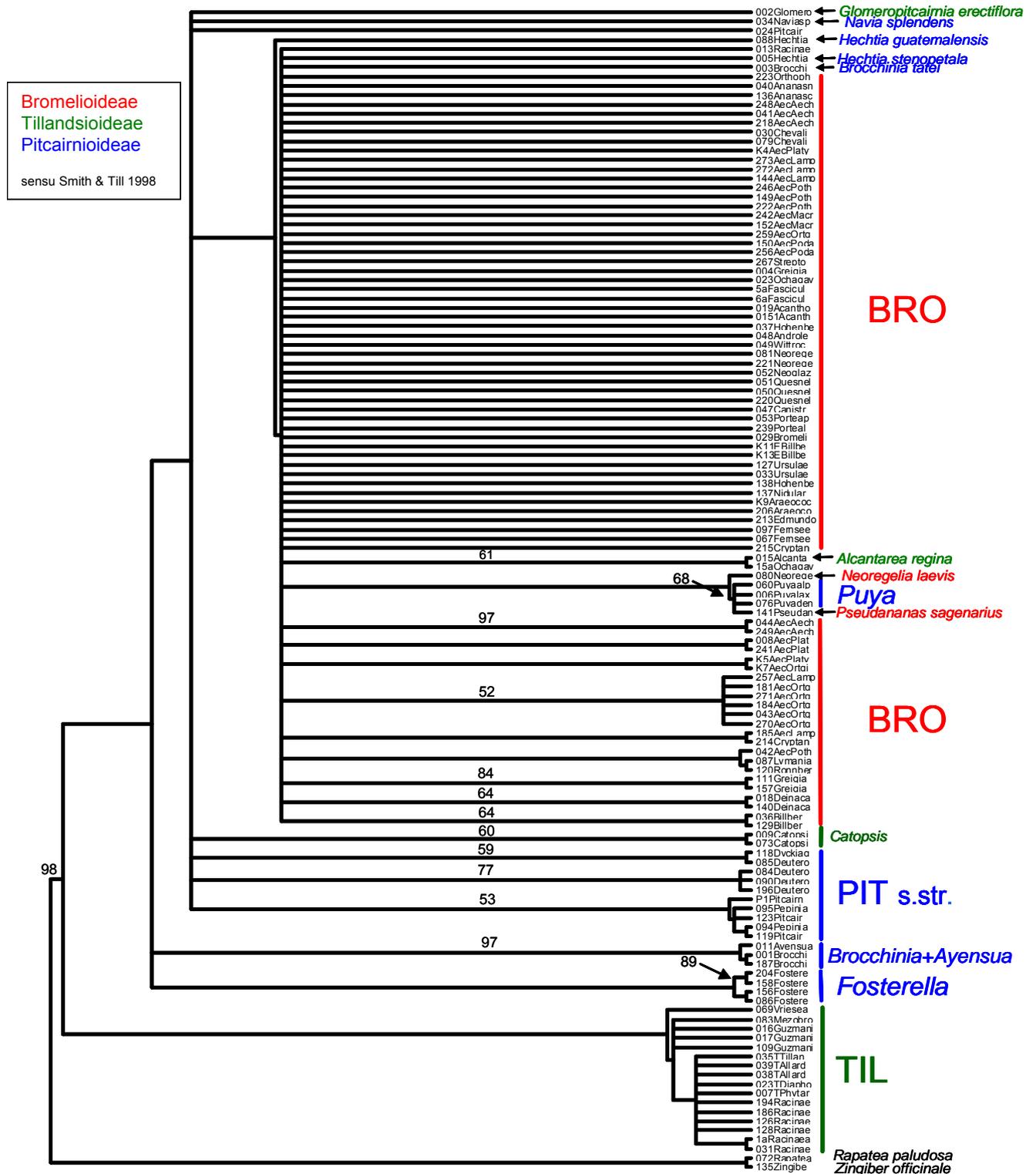


Abb.21: Maximum-Parsimonie-Analyse des Gesamtdatensatzes des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers (EF) incl. der kodierten InDels. 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum berechnet aus 998 MPT mit einer Länge von 310 Schritten, CI 0,771, RI 0,829, RC 0,639; (erhalten nach der PAUP-Filter-Option „Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist“). Die Zahlen oberhalb der Äste kennzeichnen Bootstrap-Werte >50 % (500 Wiederholungen; an den terminalen Ästen wegen der graphischen Darstellung weggelassen oder mit Pfeilen zugeordnet).

Bemerkenswert ist, dass *Mezobromelia hutchisonii* hier auf einem Ast mit den Tillandsioideae s.str. ist, *Alcantarea*, *Catopsis* und *Glomeropitcairnia* jedoch außerhalb der Tillandsioideae - ohne gestützte Auflösung. Im Falle von *Alcantarea regina*, die sich auf einem Ast mit *Ochagavia litoralis* (15a) befindet, ist keine sinnvolle Auflösung gegeben. Hier liegen eindeutig Homoplasien vor.

Neighbor-Joining Einzelanalysen dieses Intergenischen Spacers mit verschiedenen Distanzmodellen und Maximum-Parsimonie-Analysen ohne InDels und unter Ausschluss vom Anfangsbereich des EF-Alignments brachten keine bessere Auflösung. Daher wird hier nicht auf weitere Einzelanalysen eingegangen. Die kombinierten Analysen des EF-Datensatzes mit dem AB- und CD- Datensatz finden sich in Kap. 3.1.4.

Kodierte InDel Nr. (Position im 542 bp langen Alignment)	Sequenz
InDel 1 (35-38 bp)	TATT
InDel 2 (74-77 bp)	GTTC
InDel 3 (81-83 bp)	AAA
InDel 4 (163-170 bp)	CCATACAA
InDel 5 (231-243 bp)	TCATTCATTCTAC
InDel 6 (244-276 bp)	TCTTTCACAAATGGATCCGAACAGAAATCTTTG
InDel 7 (279-285bp)	TCTTATC
InDel 8 (463-467 bp)	ACTAG
InDel 9 (468-487 bp)	AGATACAAGTACTCTACTAG

Tab.8: Sequenz der 9 als 0/1 Matrix kodierten Insertionen/Deletionen des EF-Fragmentes. Abweichende Basen bei einzelnen Akzessionen sind rot markiert (vgl. AnlageVI: EF-Alignment und InDel-Kodierung).

3.1.4 Kombinierte Analysen

3.1.4.1. Kombinierte Analyse vom *trnT-trnL*-Intergenischen Spacer, *trnL*-Intron und *trnL-trnF*-Intergenischen Spacer [AB-, CD- und EF-Fragment]

Wie bereits erwähnt konnte eine kombinierte Analyse aller drei Marker nur von einem Teil des Artensets durchgeführt werden, da die Sequenzierung des AB-Fragmentes nicht in allen Fällen gelang. Abb.22 zeigt die Ergebnisse dieser kombinierten Untersuchung, in Tab.7 sind die wichtigsten Daten zusammengestellt.

Länge des gesamten untersuchten Alignments	1159 bp
davon: AB - Fragment	262 bp
CD - Fragment	509 bp
EF - Fragment	386 bp
Anzahl Synapomorphien (mit Außengruppe)	87
Anzahl Synapomorphien nur Bromeliaceae	51
davon: AB - Fragment (nur Bromeliaceae)	22 (10)
CD - Fragment (nur Bromeliaceae)	30 (25)
EF - Fragment (nur Bromeliaceae)	25 (16)
Anzahl Autapomorphien (nur Bromeliaceae)	280 (130)
*Sequenzvariabilität nur Bromeliaceae (%)	0,1 bis 5,6
*Sequenzvariabilität nur Bromelioideae (%)	0,1 bis 1,1
Insertionen / Deletionen nur Bromeliaceae (Länge Min./Max. in bp)	1 bis 25
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromelioideae)	16
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromelioideae)	17
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromelioideae)	15
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromeliaceae)	33
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromeliaceae)	32
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromeliaceae)	28

Tab.9: Zusammenfassung der Sequenzanalyse des *trnT-trnL* Intergenischen Spacers, des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers (AB-,CD- und EF-Fragment).

*Sequenzvariabilität: *p*-Distanz; Alignment in Anlage VI.

Die größte Sequenzdivergenz (*p*-Distanz) zeigen *Guzmania monostachia* (Tillandsioideae) und *Acanthostachys strobilacea* (Bromelioideae) mit 5,6 %. Die geringste Sequenzdivergenz weisen die Bromelioideae mit Werten von 0,1 % (*Ursulaea tuitensis* und *Androlepis skinneri*) bis max. 3,0 % (*Acanthostachys strobilacea*, *Greigia sphacelata* und *Ochagavia elegans*) auf.

Die Sequenzdivergenz zu *Rapatea paludosa* liegt zwischen 10,9 % (*Guzmania wittmackii*) und 13,2 % (*Acanthostachys strobilacea*). Die Velloziaceae *Barbacenia elegans* weist als zweite Außengruppe deutlich höhere Sequenzdivergenzwerte von 21,6 % (*Brocchinia tatei*) bis 23,6 %

(*Acanthostachys strobilacea*) auf (vgl. Anlage VIII).

Obwohl insgesamt wesentlich weniger gemeinsame abgeleitete Merkmale (Synapomorphien) dieser Analyse zugrunde liegen (siehe Tab.4), ist die bei der kombinierten Analyse erzielte Auflösung in einzelnen Bereichen besser als die auf der Basis des *trnL*-Introns alleine. Besonders interessant sind hier die Beziehungen der Bromelioideae-Gattungen und deren möglicher Schwestergruppen *Fosterella* und *Puya*. Von der Gattung *Fosterella* konnten in der kombinierten Analyse von CD und EF drei weitere Arten genauer untersucht werden (s.u. Kap. 3.1.3.2).

Die kombinierte AB-CD-EF-Analyse mit Maximum Parsimonie (Abb.22) zeigt folgende phylogenetische Zusammenhänge:

An der Basis stehen *Brocchinia* und *Ayensua*, deren Zusammengehörigkeit auf der Grundlage der Sequenzdaten statistisch sehr gut abgesichert ist (Bootstrap-Werte 93 und 98 %).

Die Tillandsioideae sind nach dieser Analyse monophyletisch (Bootstrap-Wert 76 %) und es lässt sich auch eine gut gestützte Gliederung erkennen. *Catopsis nitida*, *Glomeropitcairnia erectiflora* (ohne Bootstrap-Unterstützung) und *Alcantarea* (Bootstrap-Wert 63 %) stehen an der Basis dieses Astes, während *Guzmania* und *Tillandsia* weiter abgeleitet erscheinen.

Die Äste von *Puya* und *Hechtia* sind mit Bootstrapwerten von 72 % und 60 % relativ gut gestützt, während der Ast mit Arten von *Deuterocohnia* und *Pitcairnia* als Vertreter der „Pitcairnioideae s. str.“ mit einem Bootstrap-Wert unter 50 % keine statistische Absicherung hat.

Die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der Bromelioideae sind ohne statistische Absicherung - wenn man von dem mit einem Bootstrap-Wert von 57 % gering gestützten Ast mit den Gattungen *Ochagavia* und *Fascicularia* absieht. Schwache Bootstrap-Unterstützung mit nur 56 % weist auch der gemeinsame Ast von *Fosterella*, *Puya* und den Bromelioideae auf, so dass Aussagen zu einer möglichen verwandtschaftlichen Beziehung basierend auf dieser Analyse entsprechend unsicher sind.

Bei der Durchsicht der mit der Filteroption „Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist“ in PAUP4.0Beta10 erhaltenen 4203 kürzesten Bäume (MPTs) mit dem Programm TreeView fiel auf, dass sich die Topologien im Wesentlichen bezüglich der Position von *Hechtia* unterscheiden. *Hechtia* nimmt drei verschiedene Positionen ein, die in Anlage X exemplarisch mit je einem Baum (189, 198 und 203) dokumentiert sind:

1. *Hechtia* gruppiert als Schwestergruppe der Tillandsioideae und dieser Ast bildet die Schwestergruppe zu *Fosterella*, den Bromelioideae, *Puya* und *Deuterocohnia/Pitcairnia* - mit *Brocchinia* und *Ayensua* an der Basis (Baum Nr. 189).
2. *Hechtia* gruppiert auf einem Ast mit *Fosterella*, den Bromelioideae, *Puya* und *Deuterocohnia/Pitcairnia* als Vertreter der „Pitcairnioideae s. str.“ mit den Tillandsioideae als Schwestergruppe und *Brocchinia* und *Ayensua* an der Basis (Baum Nr. 198).
3. *Hechtia* ist Schwestergruppe zu dem Ast mit allen übrigen Bromeliaceae außer *Brocchinia* /

Ayensua, die an der Basis stehen (Baum Nr. 203).

Die kombinierte Analyse von AB-, CD- und EF-Fragment stützt deutlich die Monophylie der Tillandsioideae, den polyphyletischen Status der Pitcairnioideae und die enge Verbindung von *Ayensua* und *Brocchinia* an der Basis der Bromeliaceae.

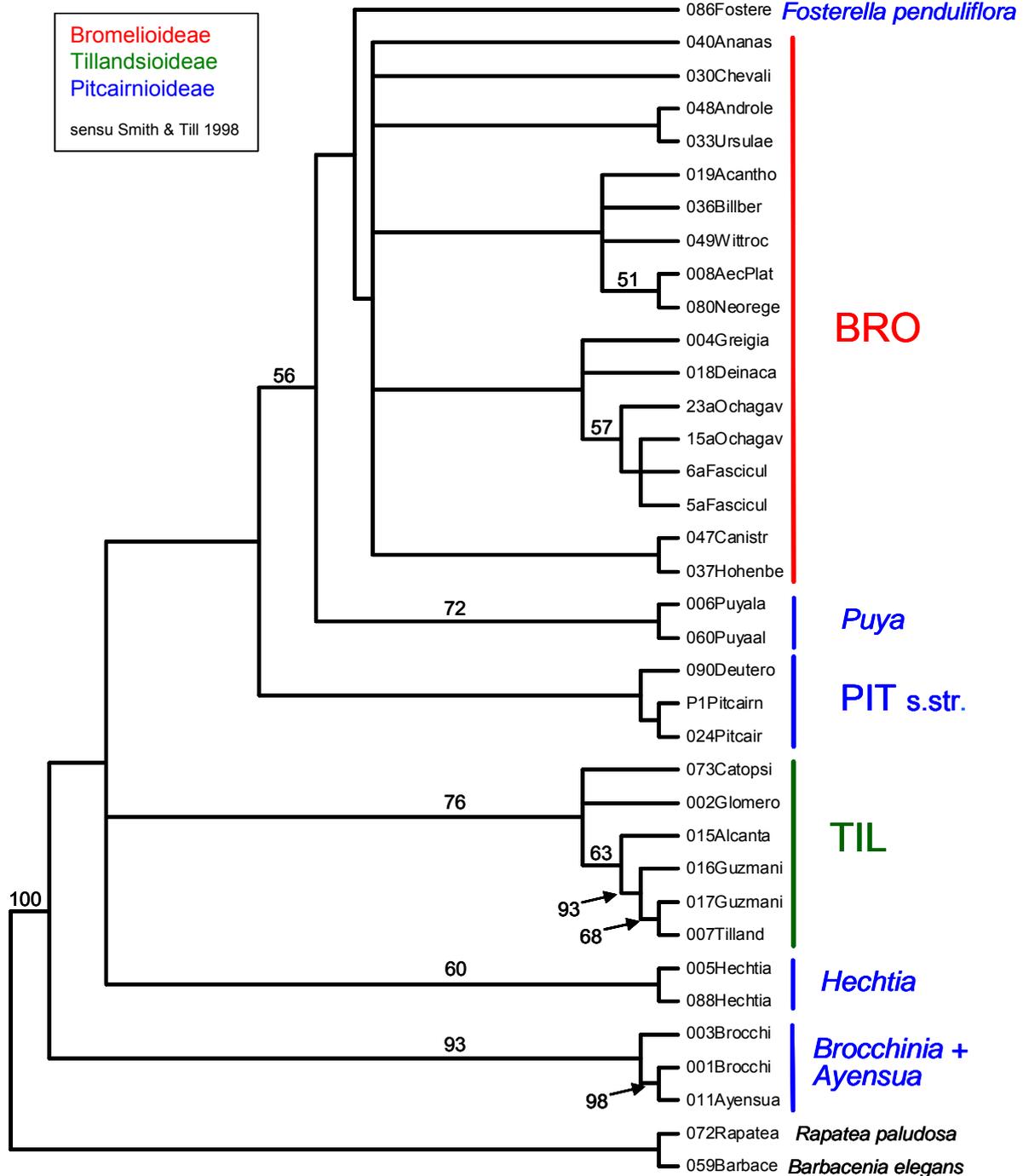


Abb.22: Kombinierte Analyse des AB-, CD- und EF-Datensatzes: Strict Consensus Baum von 4203 kürzesten Bäumen (MPT) mit einer Länge von 498 Schritten, die nach der PAUP-Filter-Option „Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist“ von 21366 MPTs übrig blieben. CI 0,871, RI 0,736, RC 0,641. Die Zahlen oberhalb der Äste oder mit Pfeilen zugeordnet kennzeichnen Bootstrap Werte > 50% (1000 Bootstrap-Wiederholungen).

3.1.4.2 Kombinierte Analyse von *trnL*-Intron und *trnL-trnF*-Intergenischem Spacer [CD- und EF-Fragment]

Die beiden hier berücksichtigten Marker ließen sich im Vergleich zum AB-Fragment ohne größere Probleme sequenzieren und es konnte ein eindeutiges Alignment erstellt werden. Bei der hier durchgeführten Analyse konnte daher ein größeres Artenset als bei der kombinierten Analyse der AB-, CD- und EF-Fragmente berücksichtigt werden. Den daraus ermittelten Phylogenien ist wegen des deutlich höheren Informationsgehaltes (vergleiche Anzahl der Synapomorphien, Tab.8) der größere Aussagewert zuzumessen.

Länge des gesamten untersuchten Alignments inklusive InDels	1195 bp
davon: CD - Fragment	632 bp
EF - Fragment	542 bp
Anzahl Synapomorphien mit Außengruppe	130 (68 CD / 62 EF)
Anzahl Synapomorphien nur Bromeliaceae	112
CD - Fragment nur Bromeliaceae	61
EF - Fragment nur Bromeliaceae	51
Anzahl Autapomorphien nur Bromeliaceae	124
Anzahl Autapomorphien nur Bromelioideae	79
Insertionen / Deletionen nur Bromeliaceae (Länge Min./Max. in bp)	1 - 255
*Sequenzvariabilität nur Bromeliaceae (%)	0,1 bis 6,1
*Sequenzvariabilität nur Bromelioideae (%)	0,1 bis 2
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromelioideae)	68
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromelioideae)	65
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromelioideae)	30
Anzahl der untersuchten Akzessionen (nur Bromeliaceae)	112
Anzahl der untersuchten Arten (nur Bromeliaceae)	109
Anzahl der untersuchten Gattungen (nur Bromeliaceae)	48
Anzahl der kodierten INDELS	21 (12 CD / 9 EF)
Anzahl informativer INDELS (Synapomorphien im Alignment für 114 OTUs)	13 (7 CD / 6 EF)

Tab.10: Zusammenfassung der kombinierten Sequenzanalyse des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers (CD- und EF-Fragment). *Sequenzvariabilität: *p*-Distanz; Alignment in Anlage VI.

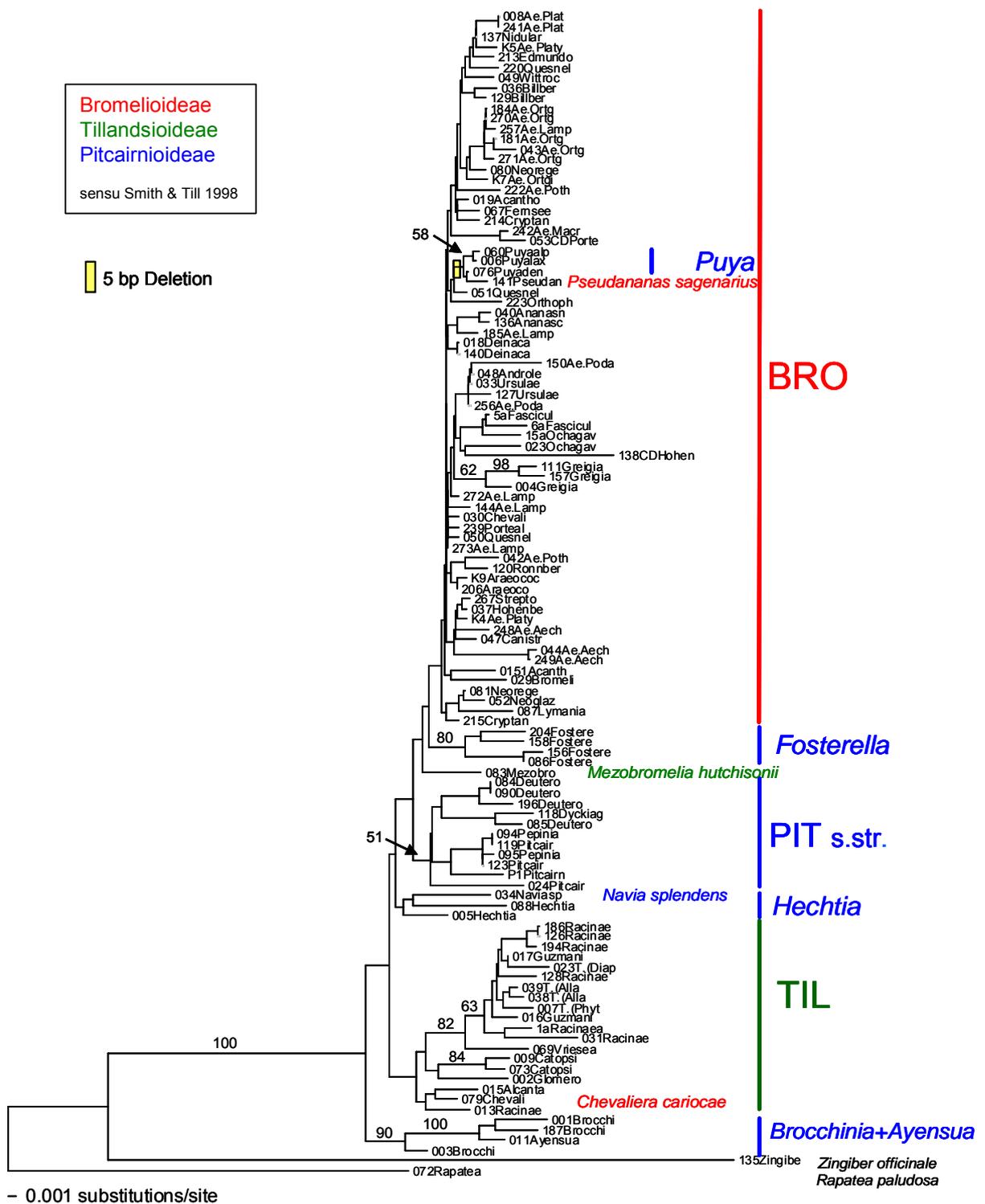


Abb.23: NJ-Analyse des kombinierten Datensatzes von CD- und EF-Fragment auf der Basis der *p*-Distanzmatrix. Die Zahlen oberhalb der Äste kennzeichnen Bootstrapwerte > 50% (an den terminalen Enden wegen der graphischen Darstellung weggelassen oder mit Pfeilen zugeordnet). Eine 5 bp Deletion des CD-Datensatzes (InDel 6), die sich nur bei den untersuchten Akzessionen von *Puya* und *Pseudananas* findet, ist gelb kartiert.

Die NJ-Analyse des kombinierten Datensatzes vom *trnL*-Intron und dem *trnL-trnF* Inter-genischen Spacers in Abbildung 23 zeigt für viele Gruppen das gleiche Bild wie die NJ-Analyse des *trnL*-Intron alleine: *Brocchinia/Ayensua* finden sich gut gestützt an der Basis und die Tillandsioideae ohne *Mezobromelia hutchisonii* sind monophyletisch und bilden die Schwestergruppe zu dem Ast mit den Bromelioideae, Pitcairnioideae s.str., *Hechtia* + *Navia splendens*, *Puya* und *Fosterella*. Die vier *Fosterella*-Arten bilden einen gut gestützten Ast (80% Wiederfindungswahrscheinlichkeit) an der Basis der Bromelioideae und *Puya*. Alle *Puya*-Arten und *Pseudananas sagenarius* finden sich hier auf einem Ast mit *Quesnelia* (051) und *Orthophytum* (223) - allerdings ohne Bootstrapunterstützung.

Der kombinierte Datensatz weist eine Sequenzdivergenz (*p*-Distanzwerte) von max. 6,1% innerhalb der Bromeliaceae und 0,1 bis max. 2% innerhalb der Bromelioideae (Tabelle 10) auf - was die geringe Auflösung zur Folge hat.

Der kombinierte CD-EF-Datensatz hat 112 Synapomorphien, die in den Maximum Parsimonie-Analysen berücksichtigt werden. Von den kodierten InDels sind in diesem Datensatz nur 13 informativ (vgl. Tab.10). Abbildung 24 zeigt eine Analyse mit den kodierten InDels und ohne Ausschluss von Alignmentpositionen, Abbildungen 25 und 26 zeigen eine Analyse ohne die InDels und unter Ausschluss der Alignment-Positionen 531-534. Diese vier Synapomorphien zeigen ein CCAA-Muster für die meisten Bromeliaceae, TCAA für *Brocchinia/Ayensua*, CTAA für zwei *Puya*-Arten CCCC bei *Ananas* und CAAA bzw. AAAA für diverse Bromelioideae-Arten (siehe Anlage VI und IX).

Der 60 % Majority-Rule-Konsensus-Baum beider Analysen (Abb.24 und 26) zeigt im Wesentlichen die gleiche Topologie - bei vergleichbar guten „Goodness of fit“-Indizes (CI = 0,725 bzw. 0,735) und ähnlicher Anzahl von Mutationsschritten (in der Analyse unter Ausschluss der InDels und Positionen 531-534 16 Schritte weniger).

Das Phylogramm der Abb.25 zeigt einen zufällig ausgewählten kürzesten Baum (MPT) von insgesamt 570 MPTs dieser Analyse. *Hechtia* und *Navia splendens* sind hier an der Basis der Tillandsioideae ohne *Mezobromelia hutchisonii* - allerdings ist dies eine nicht statistisch gestützte Auflösung und findet sich daher auch nicht in den 60% Majority-Rule-Konsensus-Bäumen beider Analysen. *Puya* und *Fosterella* sind in diesem MPT innerhalb der Bromelioideae aufgelöst. Die Pitcairnioideae s.str. sind hier - wie auch im 60% MR-Konsensus-Baum beider Analysen (Abb.24 und Abb.26) die Schwestergruppe zu dem Ast mit *Mezobromelia hutchisonii*, den Bromelioideae, *Puya* und *Fosterella*. Für die Bromelioideae gibt es auf der Basis des kombinierten Datensatzes nur wenige mit Bootstrapwerten gestützte Gruppen. Die höchsten Werte (100% und 95% bzw. 99%) erreichen die beiden Varietäten von *Aechmea mertensii* (044, 249, Untergattung *Aechmea*; Individuen gleicher Herkunft) und 053 *Portea petropolitana* / *Aechmea lamarchei* (242, Untergattung *Macrochordion*). Die beiden Varietäten von *Aechmea distichantha* (008, 241 Untergattung *Platyaechmea*) haben 84/85% Wiederfindungswahrscheinlichkeit. Werte über 60 % erreichen nur noch *Billbergia* (036, 129), *Deinacanthos* (018, 140), *Fascicularia* und *Ochagavia litoralis* (5a, 6a, 15a) sowie *Greigia* (004, 111, 157). Die Vertreter der in Südost-Brasilien verbreiteten Arten der *Aechmea*-Untergattung *Ortgiesea* (043, 181, 184, 270, 271) und *Aechmea filicaulis* (248, Untergattung *Aechmea*) befinden sich auf

einem Ast (ohne Bootstrapunterstützung). Die sehr formenreiche *Aechmea recurvata* (K7), die nach SMITH & DOWNS (1979) in die Untergattung *Ortgiesea* gestellt wird, ist außer in Brasilien noch in Paraguay, Uruguay und bis Nordost-Argentinien verbreitet. Diese Akzession findet sich nur in der Analyse mit allen Alignmentpositionen und den kodierten InDels (Abb.24) auf einem Ast mit den übrigen Arten der Untergattung *Ortgiesea* (ebenfalls keine Bootstrapunterstützung). Diese Auflösung zeigt auch die NJ-Analyse (Abb.23): außer allen *Ortgiesea*-Akzessionen (einschließlich *Aechmea recurvata*) und *Aechmea filicaulis* gruppiert hier noch *Neoregelia laevis* (080) auf diesem Ast. Die vier untersuchten *Fosterella*-Arten haben in beiden Analysen Bootstrapwerte > 80%.

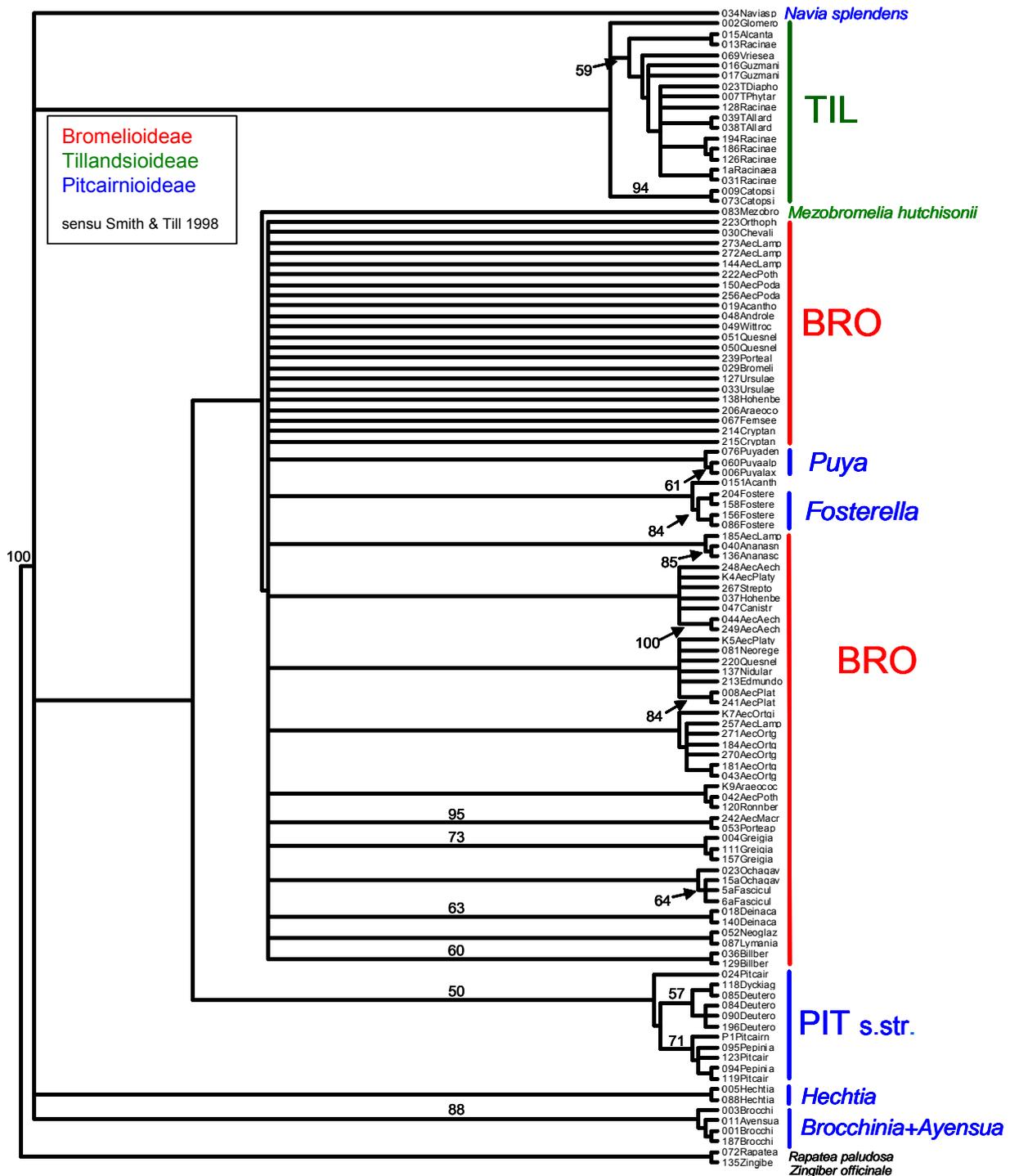


Abb.24: Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers (CD & EF) ohne die Akzessionen 079, 080 und 141. 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum berechnet aus 930 MPT mit einer Länge von 593 Schritten, CI 0,725, RI 0,779, RC 0,565; (erhalten nach der PAUP-Filter-Option „Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist“). Diese Analyse erfolgte mit den kodierten InDels ohne Ausschluss von Alignment-Positionen. Die Zahlen oberhalb der Äste kennzeichnen Bootstrap-Werte >50 % (500 Bootstrap-Wiederholungen; an den terminalen Ästen wegen der graphischen Darstellung weggelassen oder mit Pfeilen zugeordnet).

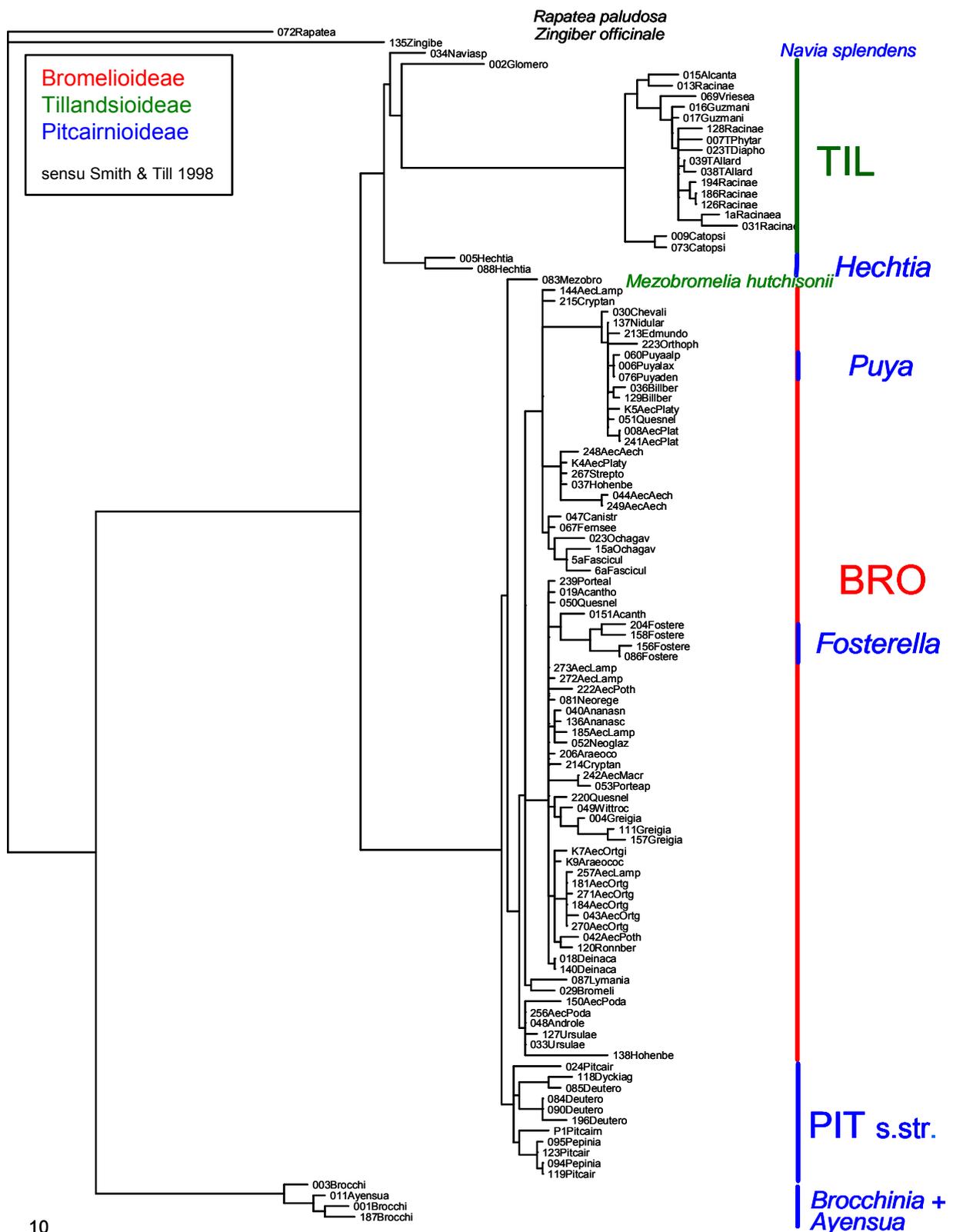


Abb.25: Phylogramm der Maximum-Parsimonie-Analyse des kombinierten Datensatzes des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers (CD & EF) ohne 079, 080 und 141. Baum 507 von 570 kürzesten Bäumen mit einer Länge von 577 Schritten, CI = 0,735, HI = 0,265, RC = 0,573; (erhalten nach der PAUP-Tree-Filter-Option "Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist"). Analyse ohne die kodierte InDels und ohne die Alignment-Positionen 531-534. Die Länge der Äste gibt entsprechend der Skala die Anzahl der Mutationsschritte wieder.

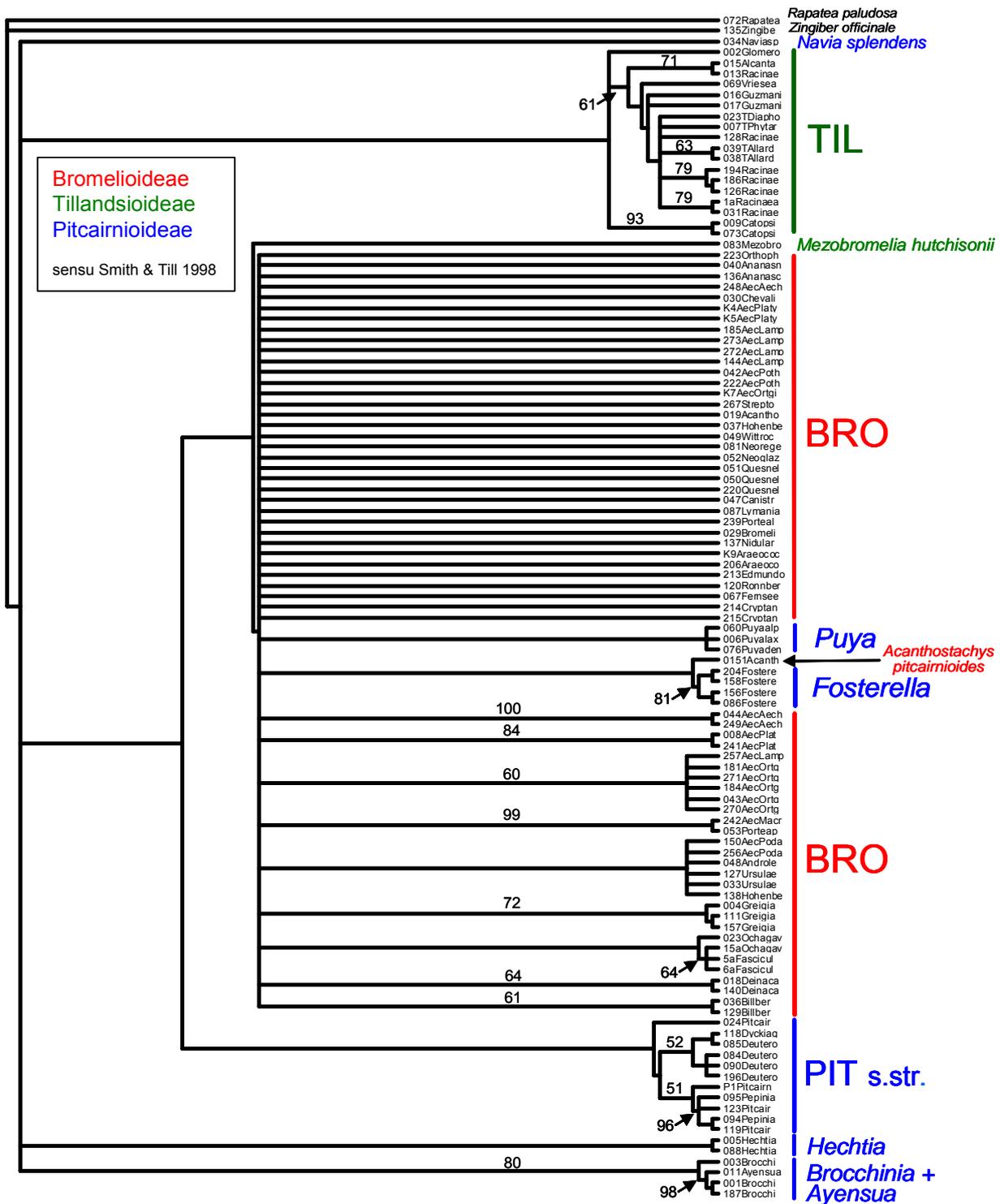


Abb.26: Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Inter-genischen Spacers (CD & EF) ohne 079, 080 und 141. 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum berechnet aus 570 kürzesten Bäumen (MPT) mit einer Länge von 577 Schritten, CI = 0,735, HI = 0,265, RC = 0,573; (erhalten nach der PAUP-Tree-Filter-Option "Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist"). Diese Analyse erfolgte ohne die kodierten InDels und ohne die Alignment-Positionen 531-534. Die Zahlen oberhalb der Äste kennzeichnen Bootstrap-Werte (500 Wiederholungen; an den terminalen Ästen wegen der graphischen Darstellung weggelassen oder mit Pfeilen zugeordnet).

In allen Analysen nehmen die Tillandsioideae zu den Bromelioideae, *Fosterella* und *Puya* eine basale Position ein. Dies deckt sich mit dem Ergebnis von TERRY et al. (1997a und b) auf der Basis von *ndhF*-Daten. Zur Klärung der Beziehungen innerhalb der Bromelioideae und der Bromelioideae zu *Fosterella* und *Puya* wurde eine Analyse unter Ausschluss der sonstigen Gruppen und einigen

Bromelioideae-Arten mit geringer Auflösung durchgeführt. Vier Vertreter der Tillandsioideae (*Glomeropitcairnia erectiflora*, *Catopsis morreniana*, *Guzmania wittmackii*, *Tillandsia tragophoba*) wurden als Außengruppe definiert.

Die mit den Tillandsioideae als Außengruppe veränderte Lesrichtung der Merkmale führt zu einer deutlich besseren Auflösung. Abbildung 27 zeigt den 60% MR-Konsensus-Baum dieser Analyse berechnet aus 4709 kürzesten Bäumen mit 292 Schritten. *Fosterella* und *Puya* bilden jeweils klar abgegrenzte Gruppen mit hoher Bootstrapunterstützung von 95% und 91%. Beide sind hier gleichermaßen als die Schwestergruppen zu dem Ast mit allen Bromelioideae aufgelöst.

Innerhalb der Bromelioideae sind vier Gruppen als basal aufgelöst: *Bromelia serra*, *Deinacanthon*, ein Ast mit *Fascicularia*, *Ochagavia* und *Fernsea* sowie *Greigia*.

Wie in den anderen kombinierten CD und EF-Analysen (Abb. 24 bis 26) gibt es innerhalb der übrigen Bromelioideae nur wenig Auflösung. Die beiden Varietäten von *Aechmea mertensii* (044, 249, Untergattung *Aechmea*), von *Aechmea distichantha* (008, 241 Untergattung *Platyaechmea*) und die Arten *Portea petropolitana* (053) und *Aechmea lamarchei* (242, Untergattung *Macrochordion*) bilden gut gestützte Gruppen mit Wiederfindungswahrscheinlichkeiten von 85 bis 100%. Mit einem Bootstrapwert von 90% als monophyletische Gruppe gestützt sind die beiden *Ananas*-Arten (040 *Ananas nanus* und 136 *A. comosus*). Die Äste mit *Billbergia* (036, 129), *Acanthostachys strobilacea* (019) und *Cryptanthus bahianus* (214) sind ohne Bootstrapunterstützung.

Der Ast mit allen untersuchten Arten (außer K7, *Aechmea recurvata*) der *Aechmea*-Untergattung *Ortgiesea* (043, 181, 184, 270, 271) und *Aechmea filicaulis* (248, Untergattung *Aechmea*) hat hier ebenfalls keine Bootstrapunterstützung.

Ebenso der Ast mit den Vertretern der *Aechmea*-Untergattung *Podaechmea* (150, 256), *Ursulaea* (033, 127) sowie *Androlepis skinneri* (049) und *Hohenbergiopsis guatemalensis* (138).

Die Abbildung 28 zeigt eine weitere Analyse mit veränderter Polarisierung der Merkmale. Im Vergleich zu der in Abb.27 wiedergegebenen Analyse sind zusätzlich zu den 4 Tillandsioideae *Ayensua uaipanensis*, *Brocchinia acuminata* und *B. tatei* einbezogen und ebenfalls als Außengruppe definiert. *Acanthostachys pitcairnioides* (151) ist hier nicht von der Analyse ausgeschlossen. Der 60% MR-Konsensus-Baum der Analyse berechnet aus 5189 kürzesten Bäumen (MPT) mit einer Länge von 333 Schritten zeigt bezüglich der Beziehungen der Bromelioideae, *Fosterella* und *Puya* die identische Topologie. *Acanthostachys pitcairnioides* gruppiert auch hier nicht zusammen mit der zweiten Art der Gattung (*Acanthostachys strobilacea*, 019) sondern innerhalb der nur als Polytomie aufgelösten Bromelioideae.

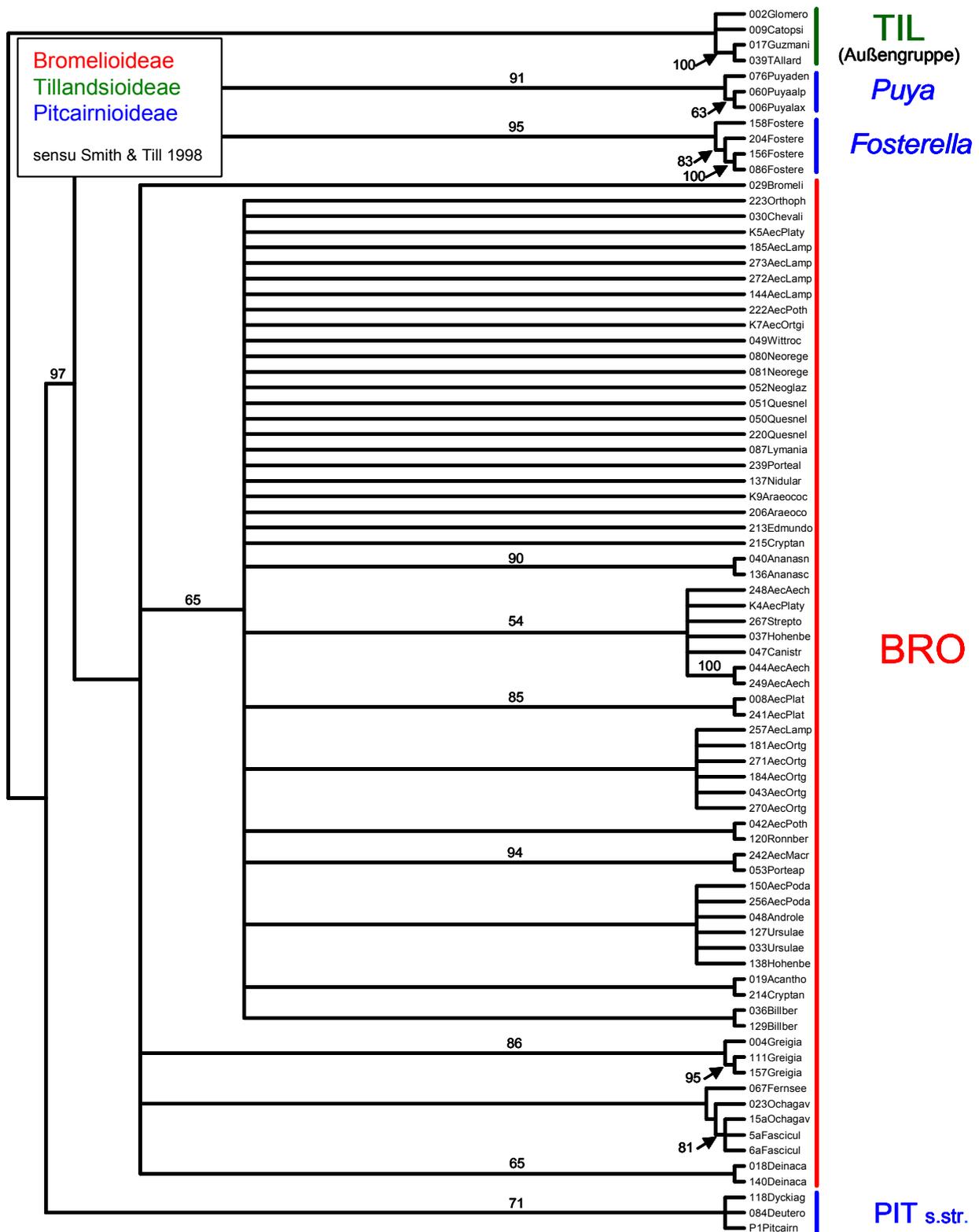


Abb.27: Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers (CD & EF) mit Fokus auf die Beziehungen der Bromelioideae zu den Pitcairnioideae-Gattungen *Fosterella* und *Puya*. Einbezogen sind hier 28 Gattungen (60 Arten) der Bromelioideae (ohne die Akzessionen 079, 141, 151), 4 Arten der Tillandsioideae (*Glomeropitcairnia erectiflora*, *Catopsis morreniana*, *Guzmania wittmackii*, *Tillandsia tragophoba*), die als Außengruppe definiert wurden, *Fosterella* (4 Arten), *Puya* (3) und *Deuterocohnia lotteae*, *Dyckia goehringii* sowie *Pitcairnia feliciana* als Vertreter der Pitcairnioideae s.str. 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum berechnet aus 4709 kürzesten Bäumen (MPT) mit einer Länge von 292 Schritten, CI = 0,750, HI = 0,250, RC = 0,583 (erhalten nach der PAUP-Tree-Filter-Option "Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist"). Die Zahlen oberhalb der Äste oder mit Pfeilen zugeordnet kennzeichnen Bootstrap-Werte >50% (1000 Bootstrap-Wiederholungen).

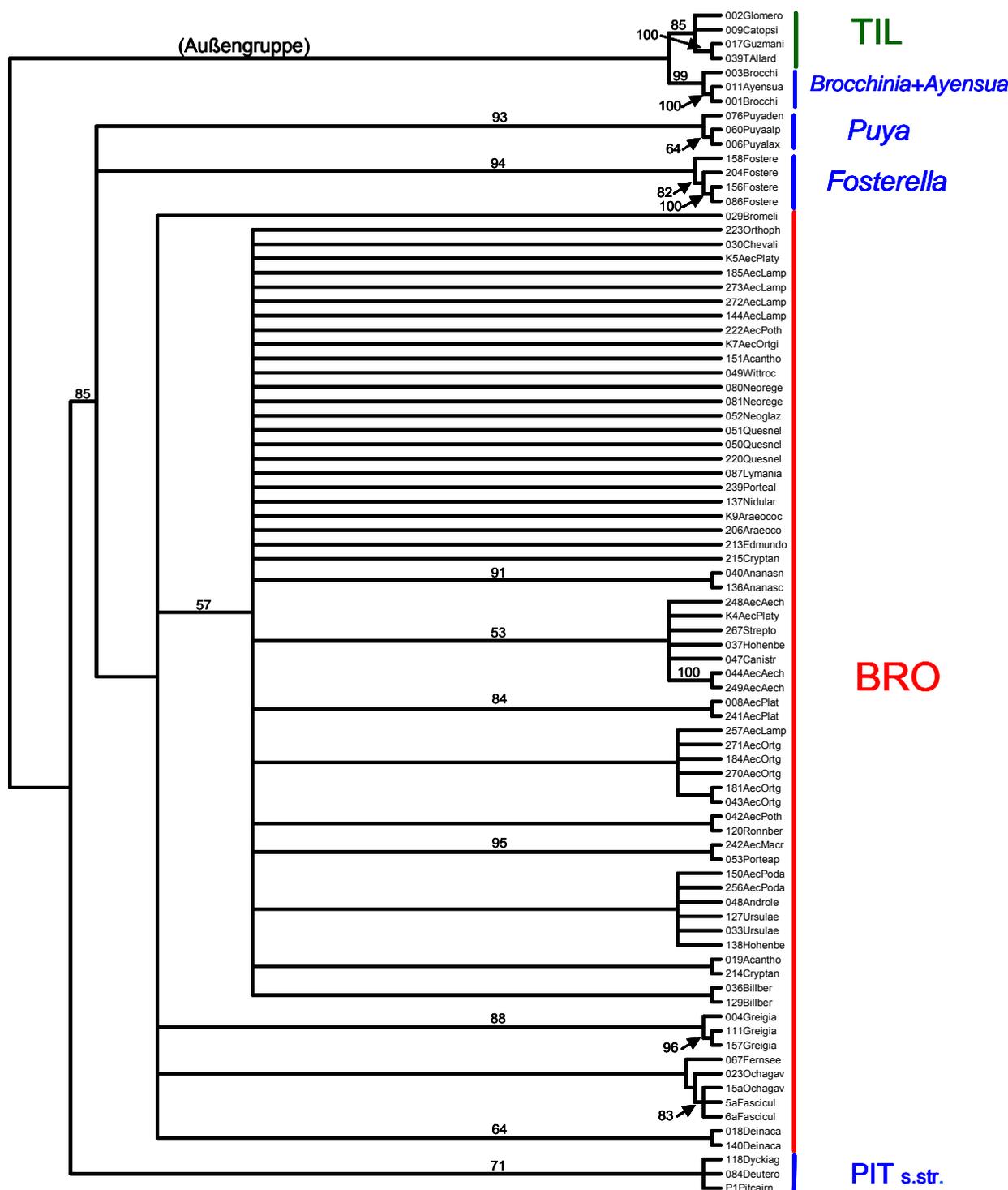


Abb.28: Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers (CD & EF) mit Fokus auf die Beziehungen der Bromelioideae zu den Pitcairnioideen-Gattungen *Fosterella* und *Puya*. Einbezogen sind hier 28 Gattungen (61 Arten) der Bromelioideae (ohne die Akzessionen 079, 141), 4 Arten der Tillandsioideae (*Glomeropitcairnia erectiflora*, *Catopsis morreniana*, *Guzmania wittmackii*, *Tillandsia tragophoba*), *Ayensua uaipanensis*, *Brocchinia acuminata* und *B. tatei*, die als Außengruppe definiert wurden, sowie *Fosterella* (4 Arten), *Puya* (3) und *Deuterocohnia lotteae*, *Dyckia goehringii*, *Pitcairnia feliciania* (als Vertreter der Pitcairnioideae s.str.). 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum berechnet aus 5189 kürzesten Bäumen (MPT) mit einer Länge von 333 Schritten, CI = 0,745, HI = 0,255, RC = 0,578 (erhalten nach der PAUP-Tree-Filter-Option "Polytomous trees retained only if more highly resolved compatible trees do not exist"). Die Zahlen oberhalb der Äste oder mit Pfeilen zugeordnet kennzeichnen Bootstrap-Werte >50% (1000 Bootstrap-Wiederholungen).

3.1.5 Analyse eines Kern-Markers: der „Internal Transcribed Spacer“ (ITS)

Die ersten Versuche mit Standard-ITS-Primern (WHITE et al. 1990) ergaben keine Amplifikation oder multiple Banden. Nach Optimierung der PCR konnten mit dem ITS-Primerpaar 5P und 8P nach MÖLLER und CRONK (1997) schwache Einzelbanden bei *Brocchinia acuminata* und *Pitcairnia feliciana* amplifiziert werden. Versuchsreihen wurden daher mit diesen Primern und mit einem Testset von sieben Bromeliaceae-Akzessionen (4 Bromelioideae, 1 Tillandsioideae, 2 Pitcairnioideae) sowie rDNA aus Weizen als Positivkontrolle durchgeführt. Erste ITS-Sequenzen von Bromelien sollten eine bessere Datengrundlage zum Design Bromelien-spezifischer ITS-Primerpaare bilden.

Die Annealing-Temperaturen wurden mit einem Gradienten von 57°C bis 60°C unter Einsatz des Mastercyclers von Eppendorf variiert. Bei einer Annealingtemperatur von 58,5°C ergaben sich sehr schwache Amplifikationen bei den vier Bromelioideae-Arten des Testsets. Diese Amplifikate konnten aber nicht reproduziert werden. Ein deutliches Amplikon wurde nur bei *Brocchinia acuminata* und einer Annealing-Temperatur von 59°C generiert. Mit der Positivkontrolle konnten dagegen deutliche Amplifikationen bei Annealing-Temperaturen von 58°C bis 59°C erzielt werden.

Die Einzelbande von *Brocchinia acuminata* wurde aus dem Agarose-Gel eluiert (QIAquick Gelextraktion; vgl. Kap. 2.4.2) und das Eluat als Templat eingesetzt (gleiche PCR-Bedingungen). Dies führte erwartungsgemäß nach Auftrennung auf einem Agarose-Gel zu einer stärkeren, eindeutigen Einzelbande. Nach erneuter Gel-Extraktion wurde unter Einsatz der Primer 5P und 8P sequenziert. Die Sequenzprotokolle lieferten keine auswertbaren Ergebnisse. Anhand der Elektropherogramme konnte dies als Folge sich überlagernder Sequenzen interpretiert werden. Demnach waren bei der Eluation aus dem Gel zwei oder mehr Amplifikate von rDNA-Allelen mit gleichen Primer-Bindungsstellen und +/- gleicher Länge isoliert worden.

Beim Einsatz speziell entworfener Primer für die 18S- und 26S-Region (vgl. Alignments in Anlage IV) konnten nach PCR-Optimierung reproduzierbare Einzelbanden generiert werden. Bei der direkten Sequenzierung ergaben sich aber auch hier stets nicht auswertbare Sequenzen o.g. Art.

Dies stützte die Hypothese von im Kern-Genom der Bromeliaceae vorhandenen multiplen rDNA-Versionen, die eine Klonierung mit einem Post-Script-Vektor notwendig machen.

Nach der Klonierung (s.o. Kap. 2.4.3 und 2.4.4) wurden die so erhaltenen Sequenzen analysiert (NCBI-Datenbankrecherchen und vergleichende Alignments mit CLUSTAL X).

Der größte Teil der so erhaltenen Sequenzen erwies sich eindeutig als ITS von *Cicer*. Obwohl mit eigenen Chemikalien, Pipetten, etc. unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde, amplifiziert *Cicer*-ITS scheinbar so viel leichter als Bromelien-ITS, dass möglicherweise schon Aerosole von *Cicer*-DNA (im Labor wurde viel mit *Cicer* gearbeitet) ausreichen. Diese Annahme wurde durch Versuche von Frank Blattner am IPK in Gatersleben (Abteilung Experimentelle Taxonomie) bestätigt:

Nach der Sequenzierung von ITS Amplikons - generiert mit seinen eigenen optimierten Primern und Standard PCR-Bedingungen (mit Aliquots verschiedener von mir zur Verfügung gestellten Bromelioideae-DNAs als Template) - stellte er bei der Analyse der erhaltenen Sequenzen eine

Homologie zu ITS von *Microseris*-Arten fest, deren DNA zur damaligen Zeit in seinem Molekularlabor verwendet wurde (Frank Blattner, pers. Mitteilung).

Ein Teil der von mir nach Klonierung erhaltenen Sequenzen war nicht mit *Cicer*-ITS identisch. Die NCBI-Datenbank-Analysen und Alignments dieser Sequenzen zeigten eine 96%ige Homologie von Teilbereichen dieser Sequenzen (z.B. 292 bp einer 615 bp-Sequenz von 138, *Hohenbergiopsis guatemalensis*, "Klon 7", die als Abfrage verwendet wurde) zu Sequenzbereichen auf Chromosom 4 von *Oryza sativa*. Andere Teilbereiche haben eine 95 %ige Homologie zu mitochondrialer rDNA von *Triticum aestivum* oder *Secale cereale*.

Bei diesen Sequenzen handelt es sich möglicherweise um ein Pseudogen von ITS, das amplifiziert und kloniert wurde. Denkbar ist, dass es sich hier um eine inaktive Kopie auf dem Mitochondrium- oder Kerngenom der untersuchten Bromeliaceae handelt. Aber auch ein PCR-Artefakt ist nicht auszuschließen.

Die Annahme, dass es sich bei den Amplifikaten, die nicht eindeutig auf Kontamination mit Fremd-DNA zurückzuführen waren, möglicherweise um ITS-Pseudogene handelt, wird allerdings nicht durch Ergebnisse von Frank Blattner gestützt.

Frank Blattner gelang die Amplifikation einer kurzen Sequenz mit seinen eigenen, für *Hordeum* optimierten ITS-Primern unter Standard PCR-Bedingungen und Aliquots verschiedener Bromelioideae-DNAs von mir als Template, s.o. So konnte er von *Ananas comosus* folgendes kurzes Amplikon sequenzieren:

```
TCGAGACCCCrCGGAAGGACGACCCGCGGCACCCTgTGACCGAACCGTCGGGCGCGCCCCCTCCTCTCG  
GGGGCCGAGGACCTCTCCTCGGcCGCCGGAGGGGGTA  
(Potentiell ITS-1 von A. comosus, 136)
```

Die Analyse dieses kurzen Sequenzabschnittes ergab, dass keine Ähnlichkeit mit der zuvor von mir sequenzierten *Oryza*-homologen Sequenz vorhanden ist.

Dieses Sequenzfragment könnte also tatsächlich von Bromelien-ITS stammen. Problematisch ist aber der hohe GC-Gehalt, der in der 106 bp langen Sequenz bei 75% liegt. Auch wenn nach PCR-Optimierung die Amplifikation größerer ITS-Bereiche vieler Bromeliaceae-Arten gelänge, wäre mit großen Schwierigkeiten bei der Erstellung eines Alignments zu rechnen.

Zahlreiche weitere Versuchsreihen und auch ein Laborwechsel zur Vermeidung von Kontaminationen mit Fremd-DNA führten nicht zum Erfolg. Entweder wurden keine Amplifikate erzielt, oder es ergaben sich multiple Banden. Die Aufreinigung und Sequenzierung solcher multiplen Banden (nach einer Gel-Extraktion der jeweils stärksten Einzelbanden) ergab jedoch immer unleserliche oder wenig brauchbare, qualitativ schlechte Sequenzen.

Abb.28 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Sequenzanalyse solcher multipler Banden. Auffällig ist hier ebenfalls der sehr hohe GC-Gehalt.

```

c2      CCGGGGTTTCCTCCTGA--CCGAGGTCAC--CTTACAAA---TGG-GGNTGNTNTACNGC
a1      -----C--CTGA-----TTG-GGGTNCNGN-CGAC
a2      -----TACAC-NTTGCTNCGC--CTGA-----TTG-GGGTACGGTACGAC
c1      CGACTTTTACTTCCAGNGTTNGNANTCGCGCCAAACAACCCTNANCGNNGGCNNTGCAAC
          *      *                      *          *

b      NTTA---CCCTCC--CNNANACCCTTTANNNAATANNTTNCAC--ATCNC TTANGGGAC-
c2      GNAG---ACNTTC--CNNACACCCTTTAGCGAATAGTTTCCAC--AACGCTTAGGGGAC-
a1      G-----CCGCCC--CGACCGCCC-CACGGGGGTGGGTGGGAG--GTGCC TC GGAANAT-
a2      G-----CCGCCC--CGACCGCCCACACGGGGGTGGGTGGGAG--GTGCC TC GGAANAT-
c1      CTATTGCNCTTNNTTCGAGCGTCCGNANTANNGATGTNATCANCAANCNGNCAGNGANGA
          *      *      **          *

b      -AGAGAGACCCACA-----NCG--GNCTATTN-----GAGG--GACGC-----CC
c2      -AGA-AGACCCAG-----CCG--GACGATTN-----GAGG--CACGC-----G-
a1      AACA-AGGCCCTCCA----TCGAAGGGGCCTC-----NATG--CACGA-----C-
a2      AACA-AGGCCCTTCA----TCGAAGGGGCCTC-----GATG--CACGA-----C-
c1      AGAGCGNCTNAAGAACGCTCGNACNNGCTTGCCTATCAAANGGCCACGCTGATGTATNT-
          * * * *          **          *      * * ***

```

Abb.29: Ausschnitt aus einem Alignment von sequenzierten multiplen Banden, amplifiziert mit Primerpaar ITS1 / ITS4. a, b und c sind verschiedene Bromeliaceae-Arten, 1 und 2 kennzeichnen jeweils die beiden stärksten aus dem Agarose-Gel eluierten Banden

Versuche, Bromelien-ITS im Labor von Kurt Weising (Universität Kassel) zu amplifizieren, führten ebenfalls nicht zum Erfolg (pers. Mitteilung).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nach erheblichem zeitlichen und finanziellen Aufwand eine vergleichende Sequenzierung des ITS von Bromeliaceae aufgegeben.

3.2 Fragmentanalysen

Die in Kap. 1.5.2 beschriebenen Gattungsgruppe 1 (Bromelioideae) und Gattungsgruppe 2 (Pitcairnioideae) wurden mit DNA-Fingerprint-Techniken (AFLPs, RAPDs) untersucht, um Fragen zur Art- und Gattungsabgrenzung zu klären. Vorteil dieser Fragmentanalysemethoden ist, dass Merkmale des gesamten Genoms erfasst werden. Bei der Analyse der aus der 0/1-Matrix der Fragmentverteilung paarweise berechneten Distanzmatrizes mit der UPGMA-Cluster-Methode werden also keine Hypothesen zur Phylogenie zugrunde gelegt, wie dies bei kladistischen Analysen nach dem Maximum Parsimonie-Prinzip der Fall ist. In den nachfolgend dargestellten Phänogrammen sind die untersuchten Individuen entsprechend ihrer genetischen Ähnlichkeit gruppiert.

3.2.1 RAPD - Analysen der Gattungen *Fascicularia*, *Ochagavia* und *Greigia*

Im Rahmen der Revision der in Chile endemischen Gattung *Fascicularia* konnten anhand blattanatomischer und blattmorphologischer Merkmale zwei Unterarten unterschieden werden. *Fascicularia*-Individuen der Lebenssammlungen des Palmengartens der Stadt Frankfurt am Main und des Botanischen Gartens von Edinburgh (Schottland) - zum Teil Wildaufsammlungen - zeigten schon als Jungpflanzen blattanatomische und blattmorphologische Unterschiede, die auf zwei Gruppen hinweisen, während sich eine Trennung anhand der Blütenmorphologie als schwierig erwies. RAPD-Analysen sollten die genetische Variabilität innerhalb der Gattung *Fascicularia* untersuchen. Die Frage war, ob sich die beiden blattanatomisch und blattmorphologisch so deutlich verschiedenen Gruppen auch auf der Basis genetischer Unterschiede trennen lassen. Die Revision der Gattung *Fascicularia* liegt bereits publiziert vor (NELSON & ZIZKA 1997, ZIZKA, HORRES, NELSON & WEISING 1999).

OTUs (Anzahl der untersuchten Akzessionen)	Anzahl der in allen untersuchten Akzessionen vorkommenden Fragmente	Anzahl der einzigartigen Fragmente (in keiner anderen untersuchten Akzession vorkommend)
<i>Fascicularia</i> (12)	8	2
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i> (8)	14	3
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i> (4)	16	1
<i>Ochagavia</i> (5)	9	4
<i>Ochagavia</i> ohne <i>O. elegans</i> (4)	17	4
<i>Ochagavia elegans</i> (1)	-	11
<i>Greigia sphacelata</i> (1)	-	14
Alle OTUs (18)	2	

Tab.11.: Übersicht der Anzahl untersuchter Akzessionen und Fragmente der RAPD-Analyse (ZIZKA, HORRES, NELSON und WEISING 1999) (bezogen auf 8 Primer/98 kodierte Fragmente), die in allen untersuchten Akzessionen der aufgeführten Sippen vorkommen, sowie die Anzahl der einzigartigen Fragmente der jeweiligen Sippen, die in keiner anderen untersuchten Akzession vorkommen.

Verwendete Operon-Primer (Alameda/California) 5' → 3'	Anzahl der berücksichtigten Fragmente (Größe in [bp])
01 TTCGAGCCAG	8 (480 - 1700)
07 GAACCTGCGG	21 (420 - 1850)
11 AAAGCTGCGG	9 (380 - 1800)
20 ACTTCGCCAC	13 (700 - 1800)
07 GAACCTGCGG	17 (750 - 2200)
09 CTGACGTCAC	12 (400 - 1850)
10 AGGGCCGTCT	12 (300 - 1800)
15 ACTGGGACTC	6 (950 - 2000)
alle	98

Tab.12: Verwendete Primer und Längenverteilung der jeweils amplifizierten Fragmente in der RAPD-Analyse (ZIZKA, HORRES, NELSON und WEISING 1999).

OTUs	Anzahl der untersuchten Akzessionen	D _J (Min. und Max.)
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i>	8	0,04 - 0,47
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i>	4	0,14 - 0,35
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i> ↔ <i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i>	8 ↔ 4	0,43 - 0,58
<i>Fascicularia</i> ↔ <i>Greigia sphacelata</i>	1 ↔ 12	0,82 - 0,85
<i>Fascicularia</i> ↔ <i>Ochagavia</i>	5 ↔ 12	0,67 - 0,81
<i>Greigia sphacelata</i> ↔ <i>Ochagavia</i>	1 ↔ 5	0,82 - 0,84
<i>Ochagavia elegans</i> ↔ <i>Fascicularia</i>	1 ↔ 12	0,84 - 0,91
<i>Ochagavia litoralis</i> + <i>Ochagavia carnea</i>	4	0,19 - 0,42
<i>Ochagavia carnea</i> ↔ <i>Ochagavia litoralis</i>	1 ↔ 3	0,33 - 0,42
<i>Ochagavia litoralis</i> + <i>Ochagavia carnea</i> ↔ <i>Ochagavia elegans</i>	4 ↔ 1	0,73 - 0,77
<i>Ochagavia elegans</i> ↔ <i>Greigia sphacelata</i>	1 ↔ 1	0,88

Tab.13: Genetische Distanzen D_J auf der Basis der RAPD-Fragmentanalyse (D_J = 1 - Jaccard*) innerhalb der untersuchten Akzessionen der Gattungen *Fascicularia*-*Ochagavia*-*Greigia*. (*Jaccard-Index (J): J = a / (n - d). a = Anzahl aller gemeinsamer Merkmale, d = Anzahl nicht gemeinsamer Merkmale, n = alle Merkmale.)

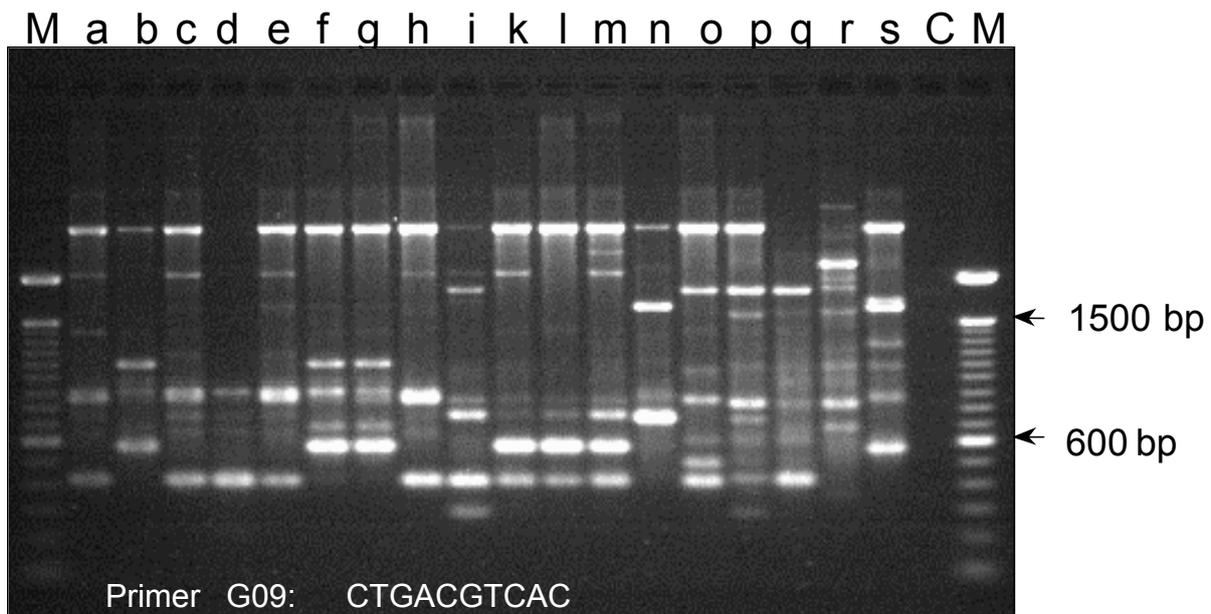


Abb.30: Gelbild einer RAPD-Analyse: Die Größe der amplifizierten Fragmente kann anhand der mit M gekennzeichneten Längenmarker bestimmt werden. a - h *Fascicularia bicolor* ssp. *bicolor*, i - m *Fascicularia bicolor* ssp. *canaliculata*, n *Ochagavia elegans*, o - r *Ochagavia carnea* und s *Greigia sphacelata*. (Aus ZIZKA, HORRES, NELSON und WEISING 1999; verändert)

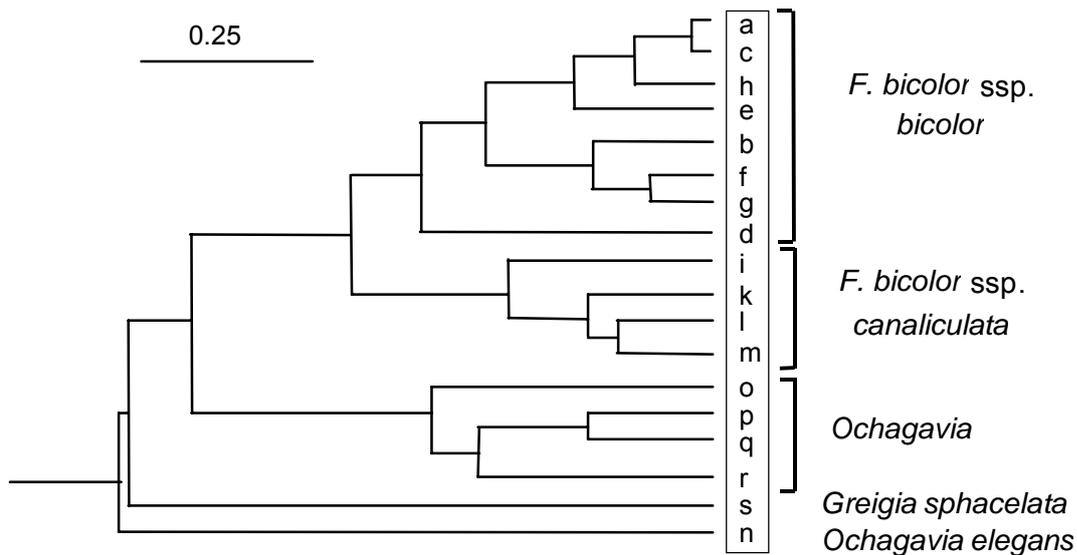


Abb.31: Phänogramm einer UPGMA-Analyse der RAPD-Daten: 98 Merkmale generiert mit 8 Primern wurden in eine 0/1 Matrix übersetzt, die genetische Distanz mit dem Jaccard-Koeffizient ($D_J = 1 - J$; vergleiche Kap. 2.7) ermittelt. Die Analyse erfolgte mit der UPGMA-Option des Analyseprogrammpaketes NTSYSpc (Rohlf 1993). **a - h** *Fascicularia bicolor* ssp. *bicolor*, **i - m** *Fascicularia bicolor* ssp. *canaliculata*, **n** *Ochagavia elegans*, **o - q** *O. litoralis*, **r** *Ochagavia carnea* und **s** *Greigia sphacelata*. Die relative genetische Distanz kann anhand der Skala bestimmt werden. (Aus ZIZKA, HORRES, NELSON und WEISING 1999; verändert)

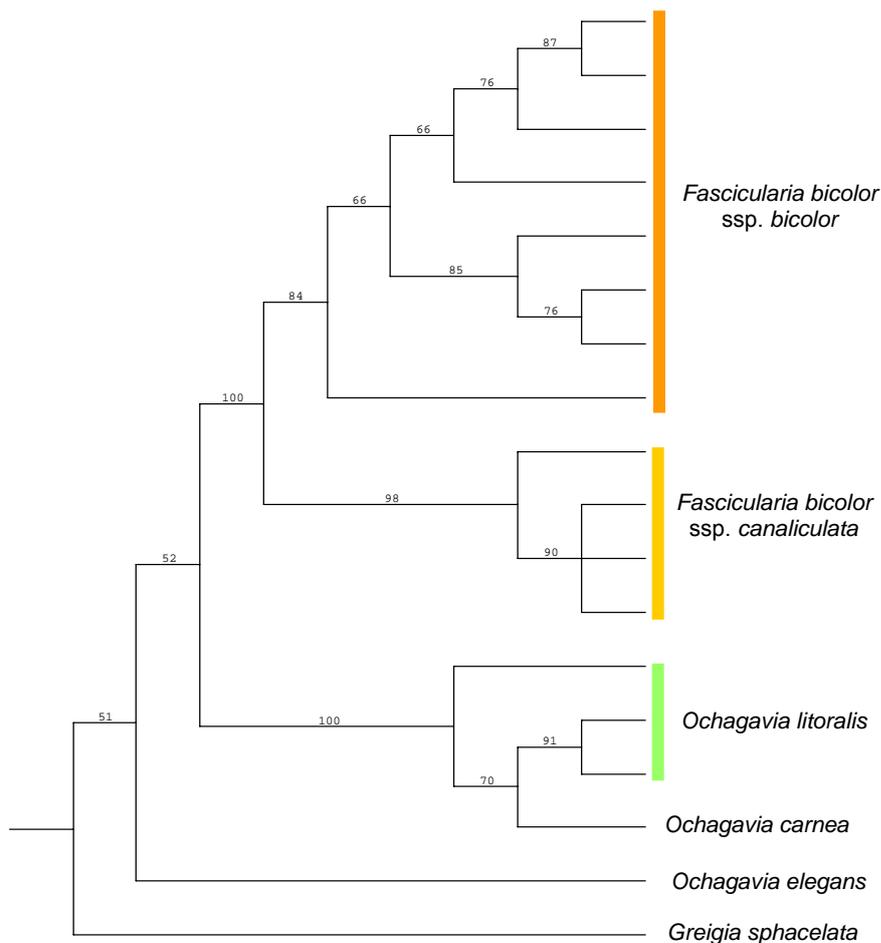


Abb.32: UPGMA-Analyse der RAPD-Daten unter Verwendung des Nei-Li-Koeffizienten (NEI & LI 1979). Die Zahlen auf den Ästen kennzeichnen Bootstrap-Werte (1000 Bootstrap-Wiederholungen). Der Bootstrap Konsensus-Baum behandelt alle Dichotomien mit einer Wiederfindungswahrscheinlichkeit $< 50\%$ als nicht aufgelöst.

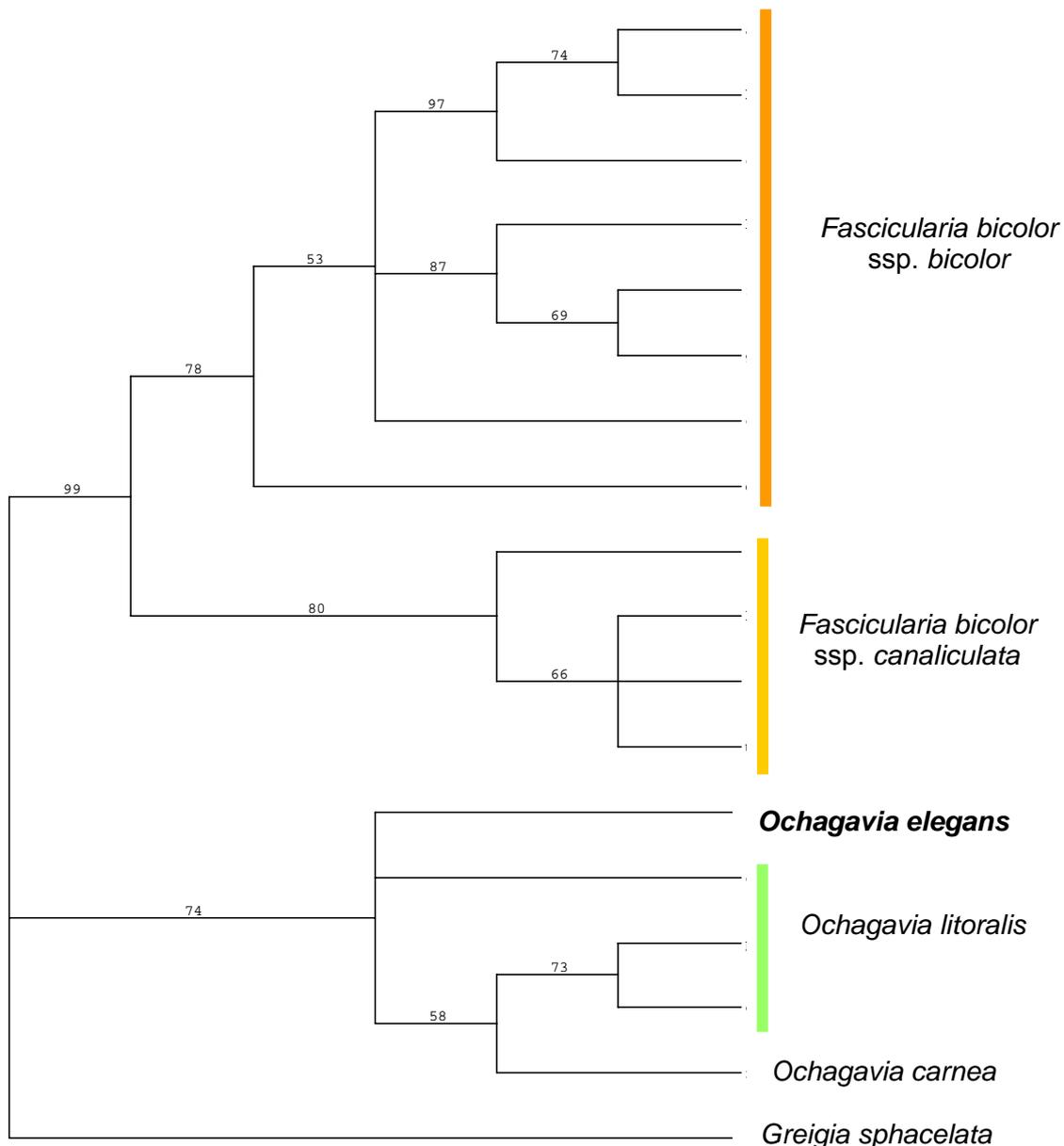


Abb.33: NJ-Analyse der RAPD-Daten unter Verwendung des Nei-Li-Koeffizienten (NEI & LI 1979). Die Zahlen auf den Ästen kennzeichnen Bootstrap-Werte (1000 Bootstrap-Wiederholungen). Der Bootstrap Konsensus-Baum behandelt alle Dichotomien mit einer Wiederfindungswahrscheinlichkeit < 50% als nicht aufgelöst. Als Außengruppe wurde *Greigia sphacelata* gewählt.

Die RAPD-Daten stimmten bezüglich *Fascicularia* sehr gut mit den Ergebnissen der morphologischen, anatomischen und biogeographischen Untersuchungen überein. Diese stützen eine Auftrennung von *Fascicularia bicolor* in die beiden Unterarten *F. bicolor* ssp. *bicolor* und *F. bicolor* ssp. *canaliculata*.

Bei der Umgrenzung der Gattung *Ochagavia* ergaben die RAPD-Daten eine von den morphologischen Ergebnissen abweichende Stellung der auf Juan Fernández endemischen Art *Ochagavia elegans*.

Die genetische Distanz zu den 4 untersuchten Akzessionen von *Ochagavia carnea* und *O. litoralis* liegt zwischen 0,73 und 0,77 (D_J : Min./Max.), während die Distanz zu *Greigia sphacelata* im gleichen Bereich wie zu *Fascicularia* liegt (D_J 0,88, Tab.13).

Dieses Ergebnis war überraschend, weil *Ochagavia elegans* keine deutlichen morphologischen Unterschiede zu den kontinentalen *Ochagavia*-Arten aufweist. Eine ähnlich große genetische Distanz zu *Fascicularia* und den kontinentalen *Ochagavia*-Arten wie zur Gattung *Greigia* mit ihren seitenständigen Infloreszenzen erschien unwahrscheinlich und widerspricht auch den Ergebnissen der Sequenzanalysen (s.u., Kap.3.1 und Abb.24 bis 28).

Dies spiegeln auch die niedrigen Bootstrap-Werte von nur knapp über 50 % für *Ochagavia elegans* und *Greigia* in der UPGMA-Analyse (Abb.31) wider. Die kontinentalen Arten von *Ochagavia* und auch die beiden Unterarten von *Fascicularia* sensu ZIZKA, HORRES, NELSON und WEISING 1999 werden dagegen durch hohe Bootstrap-Werte (100, 84 und 98 %) sehr gut gestützt.

In der NJ-Analyse der RAPD-Daten (Abb.33) fällt *Ochagavia elegans* - anders als in der UPGMA-Analyse - mit den kontinentalen *Ochagavia*-Arten zusammen. Dieser Ast ist mit einem Bootstrap-Wert von 74% statistisch relativ gut gestützt.

Die schlechtere Auflösung der NJ-Analyse der RAPD-Daten im Vergleich zur AFLP-Analyse kann im Zusammenhang mit der geringen Stichprobe für die Gattungen *Greigia* und *Ochagavia* sowie der deutlich geringeren Anzahl an berücksichtigten Merkmalen erklärt werden.

Im Fokus der RAPD-Analyse stand die Gattung *Fascicularia*, weshalb v.a. die Stichprobenzahl der Gattung *Greigia* unzureichend war. Die Einbeziehung weiterer Akzessionen von *Ochagavia*, besonders von *Ochagavia elegans*, sollte hier mehr Klarheit bringen.

In Übereinstimmung mit der taxonomischen Bearbeitung der zuvor fünf Arten umfassenden Gattung *Fascicularia* ergab die RAPD-Analyse, dass alle untersuchten Akzessionen von *Fascicularia bicolor* auf einem Ast des Phänogramms gruppieren. Es können 2 Sippen unterschieden werden, denen nach ZIZKA et al. 1999 der Rang von Unterarten (*F. bicolor* ssp. *bicolor* und *F. bicolor* ssp. *canaliculata*) zuerkannt wird.

Mit AFLP-Fragmentanalysen wurden die Verwandtschaftsbeziehungen der drei Gattungen genauer untersucht (s.u. Kap. 3.2.2 und Kap. 2.7.2).

3.2.2 AFLP - Analysen der Gattungsgruppe *Fascicularia*, *Ochagavia* und *Greigia*

Die AFLP-Methode ist eine Standardmethode der Kultivaridentifikation, wurde aber in einigen Studien auch für systematisch-phylogenetische Fragestellungen auf interspezifischer Ebene (z.B. HILL et al. 1996, SHARMA et al. 1996, KARDOLUS et al. 1998, ANGIOLILLO et al. 1999, AGGARWAL et al. 1999, CAICEDO et al. 1999, MACE et al. 1999a, b, GIMENES et al. 2002,) und intergenischer Ebene (z.B. LOH et al. 2000a, b) eingesetzt.

AFLPs schienen hier die geeignete Markermethode zu sein, da aufgrund von Morphologie und Verbreitung eine enge Verwandtschaft der Gattungen *Ochagavia* und *Fascicularia* vermutet wurde. Wenn die AFLP-Methode eine gute Auflösung für nah verwandte Gattungen der Bromeliaceae bietet, so könnten diese Analysen als Markersystem des Gesamtgenoms eine gute Alternative zu dem bisher bei Bromeliaceae nicht anwendbaren Kernmarker ITS sein.

In dieser Analyse wurden einige weitere *Ochagavia*- und *Greigia*-Akzessionen untersucht. Zur Klärung der Beziehung der Gattungsgruppe zu weiteren Gattungen der Bromelioideae wurden zusätzlich die drei Bromelioideae-Arten mit der geringsten Sequenzdivergenz beim *trnL*-Intron (*Androlepis skinneri*, *Wittrockia superba* und *Lymania alvimii*) in die AFLP-Analyse einbezogen.

Name	Sequenz
<i>EcoRI</i> Adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
<i>MseI</i> Adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'

Tab.14: Verwendete Oligonukleotid-Adapter in der AFLP-Analyse.

<i>EcoRI</i>	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
<i>MseI</i> + C	5'-GATGAGTCCTGAGTAA + C-3'

Tab.15: Verwendete Primer in der Präamplifikation der AFLP-Analyse.

Primerpaare	Sequenz	Anzahl der kodierten Fragmente
E-AT / M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTC + AT-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CAT-3'	145
E-AT / M-CTA	5'-GACTGCGTACCAATTC + AT-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CTA-3'	103
E-AT / M-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTC + AT-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CTC-3'	118
E-TA / M-CAG	5'-GACTGCGTACCAATTC + TA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CAG-3'	78
E-TA / M-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTC + TA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CTC-3'	80
E-TA / M-CTG	5'-GACTGCGTACCAATTC + TA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CTG-3'	109
E-TA / M-CTT	5'-GACTGCGTACCAATTC + TA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CTT-3'	82

Tab.16: Verwendete Primerpaare in der Selektiven Amplifikation (*EcoRI* = E / *MseI* = M mit 2 / 3 selektiven Basen) mit der Anzahl der jeweils kodierten Fragmente.

	OTU	Akzessions-Nr.	Beleg-Nr.
048	<i>Androlepis skinneri</i> (K.Koch) Brongn. ex Houillet	FRP 97-16793-2	FR H048
4a*	<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez ssp. <i>bicolor</i>	FRP 98-16845-2	FR 4a
6a*	<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez ssp. <i>bicolor</i>	FRP 98-16846-3	FR 6a
9a*	<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez ssp. <i>bicolor</i>	FRP 98-16847-2	FR 9a
10a*	<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez ssp. <i>bicolor</i>	FRP 98-16848-3	FR 10a
11a*	<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez ssp. <i>bicolor</i>	FRP 98-16849-0	FR 11a
5a*	<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez ssp. <i>canaliculata</i> Nelson & Zizka	FRP 93-12574-3	FR 5a
14a*	<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez ssp. <i>canaliculata</i> Nelson & Zizka	FRP 90-16851-3	FR 14a
16a*	<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez ssp. <i>canaliculata</i> Nelson & Zizka	FRP 90-17118-3	FR 16a
17a*	<i>Fascicularia bicolor</i> (Ruiz & Pav.) Mez ssp. <i>canaliculata</i> Nelson & Zizka	FRP 90-17119-3	FR 17a
111	<i>Greigia mulfordii</i> L.B. Sm.	WU WT13090	WU WT13090
27a*	<i>Greigia sphacelata</i> (Ruiz & Pav.) Regel	FRP 98-16855-1	FR 27a
004	<i>Greigia sphacelata</i> (Ruiz & Pav.) Regel	FRP 92-10171-4-0	FR H004
087	<i>Lymania alvimii</i> (L.B.Sm. & Read) Read	HEID 103784	FR H087
112*	<i>Ochagavia litoralis</i> (Phil.) Zizka, Trumpler & Zoellner	FRP 98-16853-2	FR H112
113*	<i>Ochagavia litoralis</i> (Phil.) Zizka, Trumpler & Zoellner	FRP 94-14614-3a	FR H113
114*	<i>Ochagavia litoralis</i> (Phil.) Zizka, Trumpler & Zoellner	FRP 98-16854-2	FR H114
115*	<i>Ochagavia carnea</i> (Beer) L.B. Sm. & Looser	FRP 94-14614-3b	FR H115
117	<i>Ochagavia carnea</i> (Beer) L.B. Sm. & Looser	FRP 94-12461-4-8	FR H117
23a*	<i>Ochagavia elegans</i> Phil.	FRP 98-16852-3a	FR 23a
077	<i>Ochagavia elegans</i> Phil.	FRP 98-16852-3b	FR H077
049	<i>Wittrockia superba</i> Lindm.	FRP 93-12641-0	FR H049

Tab.17: Mit AFLPs untersuchte Akzessionen aus der Lebensammlung: FRP = Palmengarten, Frankfurt/Main, HEID = Botanischer Garten der Universität Heidelberg, WU = Botanischer Garten Wien. Alle Belege - außer WU WT 13090 - sind im Herbarium Senckenbergianum (FR) hinterlegt. Mit * markierte Akzessionen waren schon in der RAPD-Analyse einbezogen (siehe auch Anlage I).

Es wurden untersucht: *Fascicularia bicolor* ssp. *bicolor* 5 Akzessionen, *F. bicolor* ssp. *canaliculata* 4, *Ochagavia litoralis* 3, *O. carnea* 2 und *O. elegans* 2.

Nach der Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Introns (Anlage VII zeigt den Strict Consensus dieser Analyse von 64 Bromeliaceae-Akzessionen, HORRES et al. 2000) bilden *Ochagavia*, *Fascicularia* und *Androlepis skinneri* sowie *Greigia sphacelata*, *Wittrockia superba* und *Lymania alvimii* jeweils eine (schwach gestützte) Gruppe.

Im Laufe des Projektes konnte - allerdings erst nach der Erstellung der AFLPs - eine noch unbeschriebene *Greigia*-Art aus Kolumbien in die Sequenzanalysen einbezogen werden (siehe Kap. 3.1 und Kap. 4.1).

Bei der Einbeziehung aller 7 Primerpaare mit insgesamt 715 Merkmalen bestätigt sich die enge Verwandtschaft der Gattungen *Ochagavia* und *Fascicularia*. Dies zeigt sich deutlich in den Phänogrammen der UPGMA-Analysen (Abb.34 und 36) sowie der NJ-Analyse mit gleicher Topologie (Abb.35).

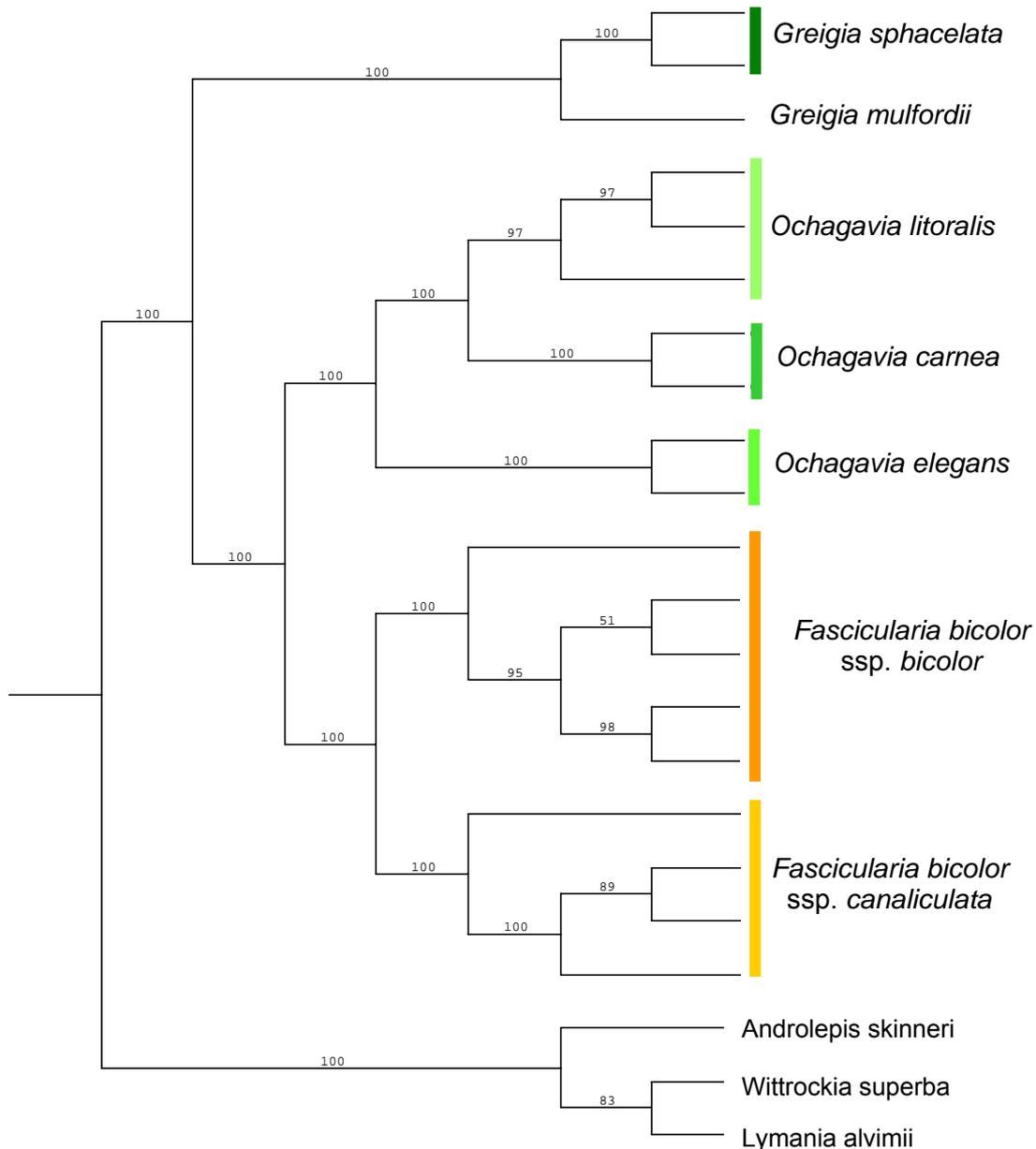


Abb.34: Phänogramm einer UPGMA-Analyse des AFLP-Datensatzes der Gattungsgruppe I (Bootstrap 50% MR Konsensus-Baum). 715 kodierte Fragmente generiert mit 7 Primer-Paaren. Die genetische Distanz wurde unter Verwendung des Nei-Li-Koeffizienten (Nei & Li 1979) ermittelt. Die Zahlen auf den Ästen kennzeichnen Bootstrap-Werte (1000 Wiederholungen). Der Bootstrap Konsensus-Baum behandelt alle Dichotomien mit einer Wiederfindungswahrscheinlichkeit < 50% als nicht aufgelöst.

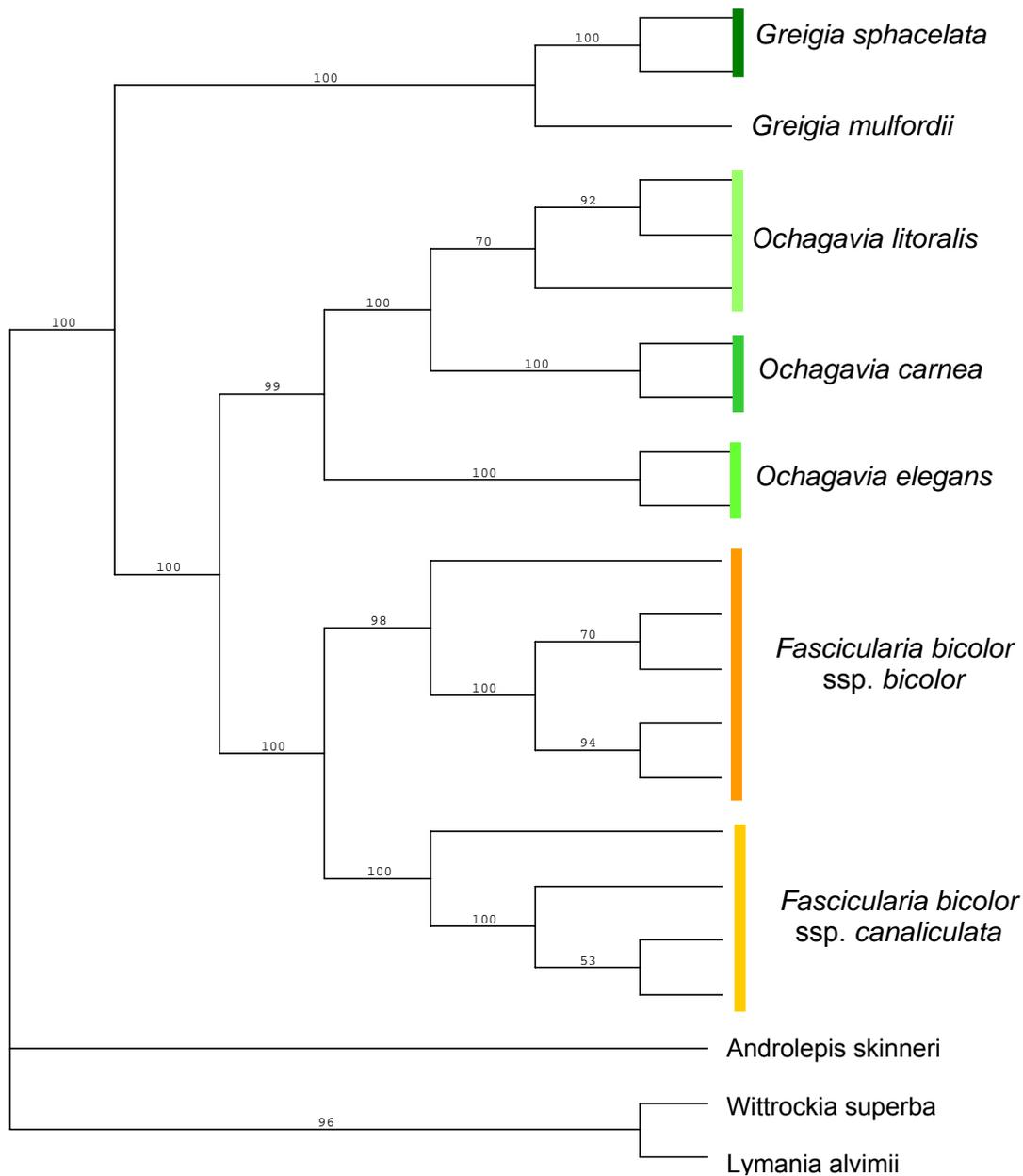


Abb.35: Phänogramm einer NJ-Analyse des AFLP-Datensatzes der Gattungsgruppe I (Bootstrap 50% MR Konsensus Baum). 715 kodierte Fragmente generiert mit 7 Primer-Paaren. Die genetische Distanz wurde unter Verwendung des Nei-Li-Koeffizienten (NEI & LI 1979) ermittelt. Die Zahlen auf den Ästen kennzeichnen Bootstrap-Werte (1000 Wiederholungen). Der Bootstrap Konsensus-Baum behandelt alle Dichotomien mit einer Wiederfindungswahrscheinlichkeit < 50% als nicht aufgelöst

OTUs	Anzahl der untersuchten Akzessionen	D _J (Min. und Max.)
<i>Ochagavia litoralis</i>	3	0,29 - 0,38
<i>Ochagavia carnea</i>	2	0,26
<i>Ochagavia carnea</i> ↔ <i>Ochagavia litoralis</i>	2 ↔ 3	0,39 - 0,47
<i>Ochagavia elegans</i>	2	0,06
<i>Ochagavia carnea</i> ↔ <i>Ochagavia elegans</i>	5 ↔ 2	0,54 - 0,58
<i>Ochagavia</i> ↔ <i>Fascicularia</i>	7 ↔ 9	0,56 - 0,67
<i>Greigia</i> ↔ <i>Ochagavia</i>	3 ↔ 7	0,73 - 0,79
<i>Ochagavia</i> ↔ <i>Androlepis skinneri</i>	7 ↔ 1	0,80 - 0,84
<i>Ochagavia</i> ↔ <i>Wittrockia superba</i>	7 ↔ 1	0,82 - 0,85
<i>Ochagavia</i> ↔ <i>Lymania alvimii</i>	7 ↔ 1	0,83 - 0,86
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i>	5	0,22 - 0,46
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i>	4	0,07 - 0,33
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i> ↔ <i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i>	5 ↔ 4	0,48 - 0,57
<i>Greigia</i> ↔ <i>Fascicularia</i>	3 ↔ 9	0,75 - 0,80
<i>Fascicularia</i> ↔ <i>Androlepis skinneri</i>	9 ↔ 1	0,79 - 0,82
<i>Fascicularia</i> ↔ <i>Wittrockia superba</i>	9 ↔ 1	0,81 - 0,84
<i>Fascicularia</i> ↔ <i>Lymania alvimii</i>	9 ↔ 1	0,81 - 0,85
<i>Greigia sphacelata</i>	2	0,46
<i>Greigia mulfordii</i> ↔ <i>Greigia sphacelata</i>	1 ↔ 2	0,57 + 0,63
<i>Greigia</i> ↔ <i>Androlepis skinneri</i>	3 ↔ 1	0,81 - 0,83
<i>Greigia</i> ↔ <i>Wittrockia superba</i>	3 ↔ 1	0,79 - 0,83
<i>Greigia</i> ↔ <i>Lymania alvimii</i>	3 ↔ 1	0,81 - 0,85

Tab.18: Genetische Distanzen D_J (D = 1 - Jaccard*; Min. und Max.) innerhalb der untersuchten Akzessionen der Gattungsgruppe *Fascicularia* - *Ochagavia* - *Greigia*. (*Jaccard-Index (**J**): $J = a / (n - d)$. **a** = Anzahl aller gemeinsamer Merkmale, **d** = Anzahl nicht gemeinsamer Merkmale, **n** = alle Merkmale.)

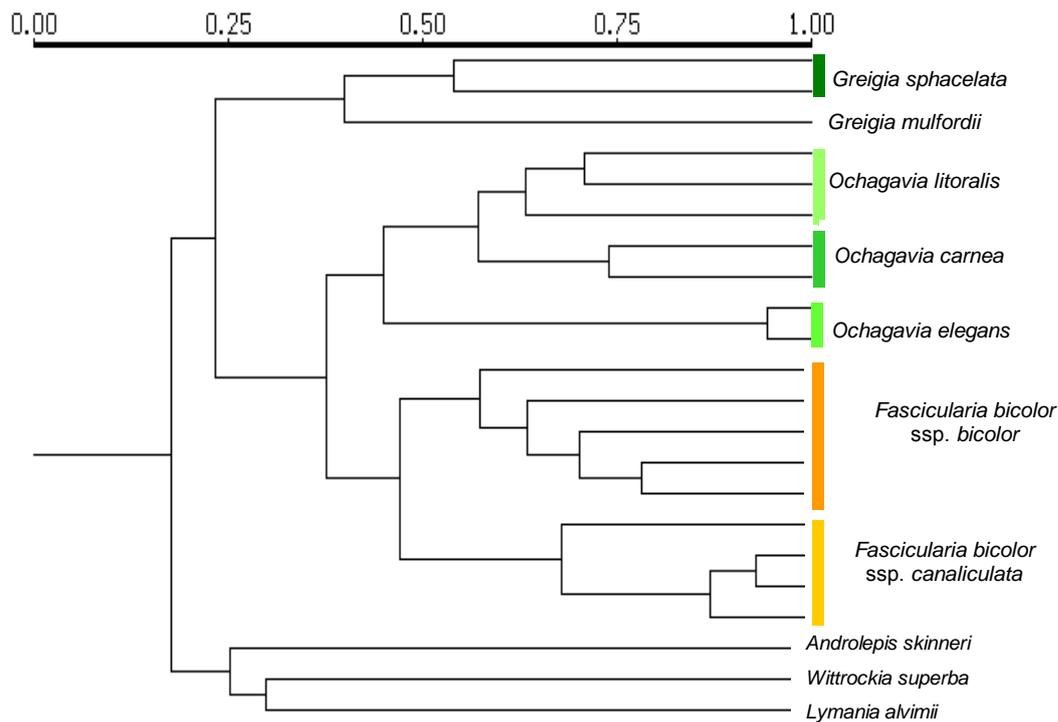


Abb.36: Phänogramm einer UPGMA-Clusteranalyse basierend auf den kodierten 715 Fragmenten von sieben Primer-Kombinationen in der selektiven PCR. Die Distanz-Matrix basiert auf dem Jaccard- Index (D_J , vergleiche Tab.18). Die Clusteranalyse erfolgte mit der UPGMA Option von NTSYS-pc (Rohlf, 1993).

Gattungsgruppe (Anzahl der untersuchten Akzessionen)	Anzahl der in allen untersuchten Akzessionen vorkommenden Fragmente	Anzahl der einzigartigen Fragmente (in keiner anderen untersuchten Akzession vorkommend)
<i>Greigia</i> (3)	100	14
<i>Greigia sphacelata</i> (2)	144	9
<i>Ochagavia</i> (7)	92	0
<i>Ochagavia litoralis</i> . (3)	150	1
<i>Ochagavia carnea</i> (2)	187	3
<i>Ochagavia elegans</i> (2)	233	22
<i>Fascicularia bicolor</i> (9)	89	4
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i> (5)	122	2
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i> (4)	163	2
Alle OTUs	5	
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i> (5), aber in keiner Akz. von <i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i> (4)		13
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i> (4), aber in keiner Akz. von <i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i> (5)		28

Tab.19: Anzahl der Fragmente, die in allen untersuchten Akzessionen der aufgeführten Arten, Gattungen und Gattungsgruppen vorkommen (715 berücksichtigte Fragmente) sowie Anzahl der einzigartigen Fragmente der jeweiligen Sippen, die in keiner anderen untersuchten Akzession vorkommen.

Die AFLP-Daten unterstützen eine Zusammenfassung der Akzessionen in einer Sippe (*Fascicularia bicolor*) mit zwei Untergruppen (*F. bicolor* ssp. *bicolor* und *F. bicolor* ssp. *canaliculata*).

Dies wird auch bei einer Betrachtung der Verteilung der Fragmente deutlich. Bezogen auf die 715 kodierten Fragmente finden sich 13 Fragmente, die nur in den 5 untersuchten Akzessionen von *F. bicolor* ssp. *bicolor* vorkommen, aber in keiner der 4 untersuchten Akzessionen von *F. bicolor* ssp. *canaliculata*.

Die 4 Akzessionen von *F. bicolor* ssp. *canaliculata* weisen wiederum 28 Fragmente auf, die in keiner untersuchten Akzession von *F. bicolor* ssp. *bicolor* vorkommen (Tab.19).

In Übereinstimmung mit den im Rahmen der Revision der Gattung *Ochagavia* erhobenen morphologischen Daten (ZIZKA et al. 2002) unterscheidet sich die auf der Juan Fernández-Insel endemische *Ochagavia elegans* genetisch deutlich von den beiden kontinentalen Arten *Ochagavia carnea* und *Ochagavia litoralis*.

Die Gattung *Greigia* zeigt nach diesen Daten eine größere genetische Distanz (D_j) zu *Ochagavia* und *Fascicularia*, die im gleichen Bereich wie die zu den Vertretern der Gattungen *Androlepis*, *Wittrockia* und *Lymania* liegt (siehe Tab.18).

In beiden Analysen finden sich die gleichen Topologien / Gruppierungen - gestützt durch sehr hohe Bootstrap-Werte. Für diese nah verwandten Gattungen der Bromelioideae haben sich AFLPs als gut geeignete Marker erwiesen.

3.2.3 AFLP - Analysen der Gattungsgruppe *Deuterocohnia*, *Dyckia* und *Pitcairnia*

Unter Einbeziehung der umfangreichen Lebendsammlung des B.G. der Universität Heidelberg konnten Vertreter fast aller Arten der Gattungen *Abromeitiella* und *Deuterocohnia* in die Analyse einbezogen werden (Tab.24). Die geringste Sequenzdivergenz beim *trnL*-Intron wiesen Vertreter von *Dyckia* und *Pitcairnia* auf, weshalb einige Akzessionen dieser Gattungen ebenfalls untersucht wurden.

Von *Abromeitiella* (4 Arten), *Deuterocohnia* (11/12 Arten, vgl. Tab.5), *Dyckia* (124 Arten) und *Pitcairnia* (285 Arten) wurden untersucht: *Abromeitiella* 4 Arten/10 Akzessionen, *Deuterocohnia* 10/20, *Dyckia* 3/3, *Pitcairnia* 4/4.

Zur Fehlerabschätzung und Prüfung der Reproduzierbarkeit wurden die Restriktions-Ligationsansätze von 11 der untersuchten Akzessionen als Template in zwei verschiedenen Präamplifikationsansätzen eingesetzt. Diese zusätzlichen Präamplifikationen wurden in allen folgenden Schritten (selektive Amplifikationen, gelelektrophoretische Auftrennung auf 4 %igen denaturierenden PAA-Gelen, Erstellung der 0-1-Matrizen und Datenauswertung; vgl. Kap. 2.7) gleich behandelt und sind in AnlageV (Tabelle mit den Distanzwerten für diese Gattungsgruppe) auf der Basis des Jaccard-Index (D_j) sowie den Phänogrammen mit "b" gekennzeichnet. Bei einer Akzession von *Abromeitiella brevifolia* (K) wurden für den Restriktions-Ligationsansatz zwei verschiedene DNA-Isolationen

eingesetzt: Standard-DNA-Isolation (KI, siehe Kap. 2.3) und eine mit dem DNeasy-Kit von QIAGEN über Säulchen gereinigte DNA (K1, Isolation und Aufreinigung durch Frau M. Rex, Kassel). Wie der Tab.20 zu entnehmen ist, findet sich der größte Unterschied im Vergleich der beiden Wiederholungen von H173, *Deuterocohnia longipetala*. Von den kodierten Fragmenten fehlen 30 in einer der beiden Wiederholungen, was 6,9% der insgesamt 437 kodierten Fragmente ausmacht. Bei vier Akzessionen lag der Unterschied deutlich unter 1% mit nur 2 bis 3 unterschiedlichen Banden. Fünf weitere Akzessionen hatten 8 bis 23 unterschiedliche Fragmente (1,8 bis 5,3% Unterschied). Die beiden unterschiedlichen DNA-Isolationen von *Abromeitiella brevifolia* (KI bzw. K1) wiesen 17 Unterschiede im Fragmentmuster auf (3,9 % aller Fragmente) mit Unterschieden im D_f -Wert von 0,02 bis 0,27 (Tab.23). Der Unterschied der beiden Wiederholungen bei unterschiedlichen DNA-Isolationen weist einen mittleren Wert auf, was die absolute Zahl der Fragmentunterschiede betrifft. Was die Topologie angeht finden sich hier jedoch größere Unterschiede. Beide Wiederholungen finden sich auch in der NJ-Analyse auf einem gut gestützten Ast, jedoch zeigt K1 eine größere genetische Ähnlichkeit zu H 147. Bei beiden Akzessionen handelt es sich um lange im Botanischen Garten kultivierte Individuen ohne gesicherte Herkunft, so dass eine mögliche Erklärung ist, dass hier vegetativ vermehrte Pflanzen der gleichen Herkunft vorliegen.

In der Studie von JONES et al. (1998) zur Reproduzierbarkeit von AFLPs in 7 europäischen Laboratorien werden verschiedene DNA-Isolationsmethoden als einzige mögliche Quelle für einen gefundenen Unterschied im Fragmentmuster diskutiert. Welche Ursache(n) für die in dieser AFLP-Studie gefundenen Unterschiede verantwortlich sind, lässt sich nicht genau bestimmen. Die radioaktive Markierung in Kombination mit der hochauflösenden PAA-Gelelektrophorese macht auch das Erkennen sehr schwacher Banden möglich. Als mögliche Ursache für die abweichenden Fragmentmuster in den Wiederholungen kommen die beiden Amplifikationsschritte in Frage. Denkbar ist, dass nach der Restriktion/Ligation und/oder nach der Präamplifikation einzelne Fragmente nicht oder in zu geringer Konzentration als Template vorlagen und daher in der selektiven Amplifikation fehlen.

In keiner Analyse zeigen die mit "b" gekennzeichneten Wiederholungen eine abweichende Position in den Phänogrammen. Somit konnte gezeigt werden, dass es zwar zu Unterschieden im Verlauf der Amplifikationen, der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente und ihrer Kodierung kommt, sich diese aber nicht auf die relative Position (Topologie) in den Phänogrammen auswirken.

Nr.	OTU:	Anzahl unterschiedlicher Fragmente	Unterschied [Prozent]	Unterschied D_J (1 - Jaccard-Index)
K 1	<i>Abromeitiella brevifolia</i> (DNA-Isolation 1 / "Quiagen")	17	3,89%	0,15
K I	<i>Abromeitiella brevifolia</i> (DNA-Isolation 2 / Standard)			
159	<i>Deuterocohnia digitata</i>	2	0,46%	0,02
159b	<i>Deuterocohnia digitata</i>			
085	<i>Abromeitiella scapigera</i>	3	0,69%	0,04
085b	<i>Abromeitiella scapigera</i>			
190	<i>Deuterocohnia longipetala</i>	23	5,26%	0,17
190b	<i>Deuterocohnia longipetala</i>			
173	<i>Deuterocohnia longipetala</i>	30	6,86%	0,27
173b	<i>Deuterocohnia longipetala</i>			
174	<i>Deuterocohnia longipetala</i>	9	2,06%	0,08
174b	<i>Deuterocohnia longipetala</i>			
090	<i>Deuterocohnia glandulosa</i>	2	0,46%	0,02
090b	<i>Deuterocohnia glandulosa</i>			
153	<i>Deuterocohnia spec.</i>	8	1,83%	0,11
153b	<i>Deuterocohnia spec.</i>			
196	<i>Deuterocohnia chrysantha</i>	3	0,69%	0,05
196b	<i>Deuterocohnia chrysantha</i>			
163	<i>Deuterocohnia recurvipetala</i>	13	2,97%	0,15
163b	<i>Deuterocohnia recurvipetala</i>			
P1	<i>Pitcairnia feliciana</i>	9	2,06%	0,1
P1b	<i>Pitcairnia feliciana</i>			
Zum Vergleich: Unterschiede bei verschiedenen Individuen vom gleichen Standort				
099	<i>Deuterocohnia meziana</i> var. <i>carmino-viridiflora</i>	9	2,06%	0,08
100	<i>Deuterocohnia meziana</i> var. <i>carmino-viridiflora</i>			

Tab.20: Unterschiede der erfaßten Fragmente (von 437 kodierten Fragmenten insgesamt) bei zwei verschiedenen Präamplifikationen (bei K1/I zwei verschiedenen DNA-Isolationen/Aufreinigungen) und ihre Auswirkung auf die genetischen Distanzen (D_J).

Primerpaar	Sequenz	Anzahl der kodierten Fragmente
E-TG / M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTC + TG-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CAT-3'	111
E-TA / M-CTG	5'-GACTGCGTACCAATTC + TA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CTG-3'	162
E-TA / M-CTA	5'-GACTGCGTACCAATTC + TA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + CTA-3'	164

Tab.21: Primerpaare in der Selektiven Amplifikation (*EcoRI* = E, *MseI* = M mit 2 bzw. 3 selektiven Basen) und die Anzahl der kodierten Fragmente pro Primerpaar.

Bezüglich der Abgrenzung der Gattungen *Abromeitiella* und *Deuterocohnia* zeigen die Phänogramme der AFLP-Analysen die Vertreter beider Gattungen auf einem Zweig - mit z.T. nur unbefriedigender Auflösung.

Ein Ergebnis dieser AFLP-Studie ist, dass die untersuchte Akzession der geographisch isolierten Art *Deuterocohnia chrysantha* die größte Distanz zu den anderen Arten der Verwandtschaft aufweist und dass die Akzessionen von *Abromeitiella* untereinander die größte Ähnlichkeit besitzen.

In der UPGMA-Analyse auf der Basis des Jaccard-Index (Abb.36) gruppieren alle ehemals zu *Abromeitiella* gestellten Vertreter auf einem Ast. Die genetische Distanz der *Abromeitiella*-Akzessionen zu den untersuchten *Deuterocohnia*-Akzessionen (D_J : Min./Max.) 0,57/0,78) ist etwas geringer als zu *Deuterocohnia chrysantha* (0,72/0,79; Tab.23).

Die in der Provinz Potosi / Bolivien gesammelte Akzession H 209 von *Abromeitiella scapigera* weist einige morphologische Besonderheiten auf: sie ist insgesamt etwa ein Drittel größer und hat eine andere Blütenfarbe als die beiden ebenfalls aus dem Dept. Potosi, Bolivien, stammenden *A. scapigera*-Akzessionen. Die Frage war, ob es sich bei der Akzession H 209 um eine neue Art oder eine Unterart von *A. scapigera* handelt oder ob eine geringe genetische Distanz dieser Akzession zu den beiden anderen *A. scapigera*-Akzessionen auf eine große phänotypische Plastizität in dieser Sippe hinweist.

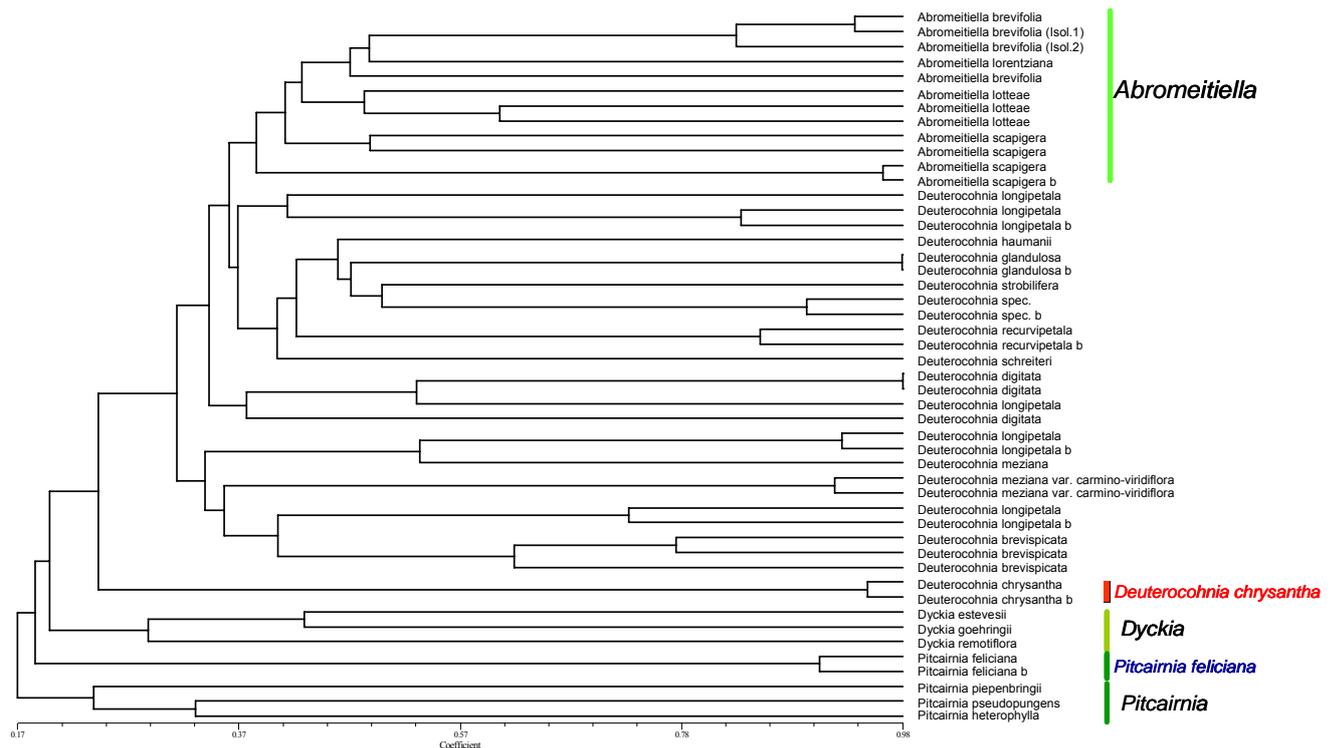


Abb.37: Phänogramm einer UPGMA-Clusteranalyse basierend auf den kodierten 437 Fragmenten von 3 Primer-Kombinationen in der selektiven PCR. Die Distanz-Matrix basiert auf dem Jaccard- Index (D_J , siehe Anlage V). Die Clusteranalyse erfolgte mit der UPGMA-Option von NTSYS-pc (ROHLF, 1993)

Die Abbildungen 38 und 39 zeigen jeweils den Bootstrap-Konsensus-Baum der UPGMA- bzw. der NJ-Analyse auf der Basis des Nei-Li-Koeffizienten (Nei & Li 1979), durchgeführt mit PAUP.

In der UPGMA-Analyse und in der NJ-Analyse finden sich die beiden in 2400 m Höhe (H 172 und

H 209, Tab. 22) gesammelten *A. scapigera*-Akzessionen auf einem gut gestützten Ast (64% bzw. 78% Bootstrap-support), während die in 3300 m Höhe gesammelte Akzession H 085 eine andere Position im Phänogramm einnimmt (100% Bootstrap-support, da Wiederholung). Die Sequenzdivergenz dieser drei Akzessionen liegt zwischen 0,51 und 0,62 (D_J Min./Max., Tab. 23) und ist damit geringfügig höher als die Sequenzdivergenz innerhalb der drei *A. lotteae*-Akzessionen, die im Bereich von 0,39 bis 0,54 liegt. Im Vergleich zu den D_J -Werten zwischen den beiden Unterarten von *Fascicularia bicolor*, *F. bicolor* ssp. *bicolor* und *F. bicolor* ssp. *canaliculata*, die mit 0,48 bis 0,57 (Min./Max; Tab.23) sogar geringfügig niedriger liegen, wird deutlich, dass sich wegen der geringen Stichprobe keine weitergehenden Aussagen auf der Basis der Sequenzdivergenz zu einer möglichen infraspezifischen Gliederung von *Abromeitiella scapigera* machen lassen.

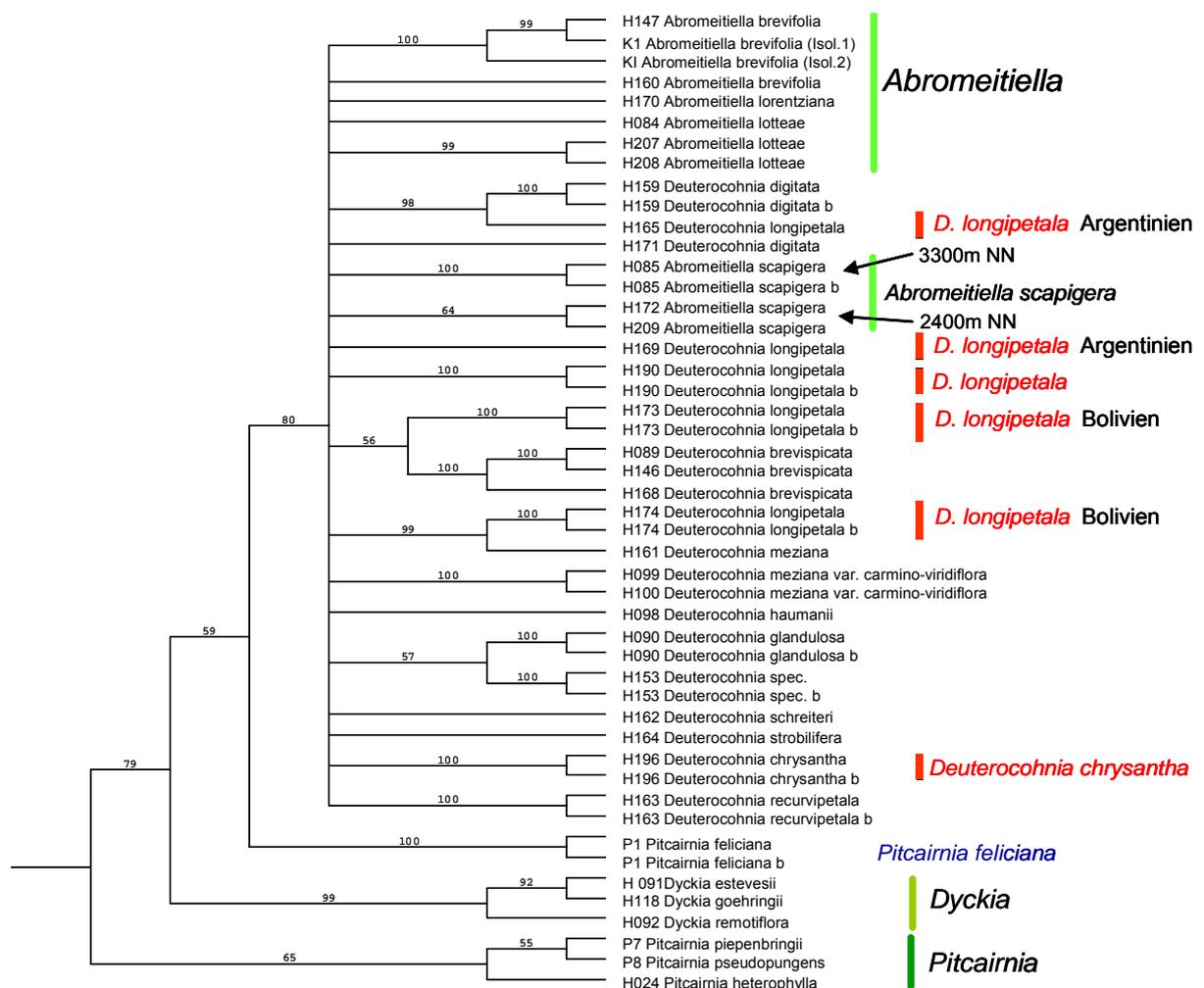


Abb.38: Phänogramm einer UPGMA-Analyse des AFLP-Datensatzes. 437 kodierte Fragmente generiert mit 3 Primer-Paaren. Die genetische Distanz wurde unter Verwendung des Nei-Li-Koeffizienten (NEI & LI 1979) ermittelt. Die Zahlen auf den Ästen kennzeichnen Bootstrap-Werte (1000 Wiederholungen). Der Bootstrap Konsensus-Baum behandelt alle Dichotomien mit einer Wiederfindungswahrscheinlichkeit < 50% als nicht aufgelöst; mit b sind Wiederholungen derselben Akzessionen gekennzeichnet.

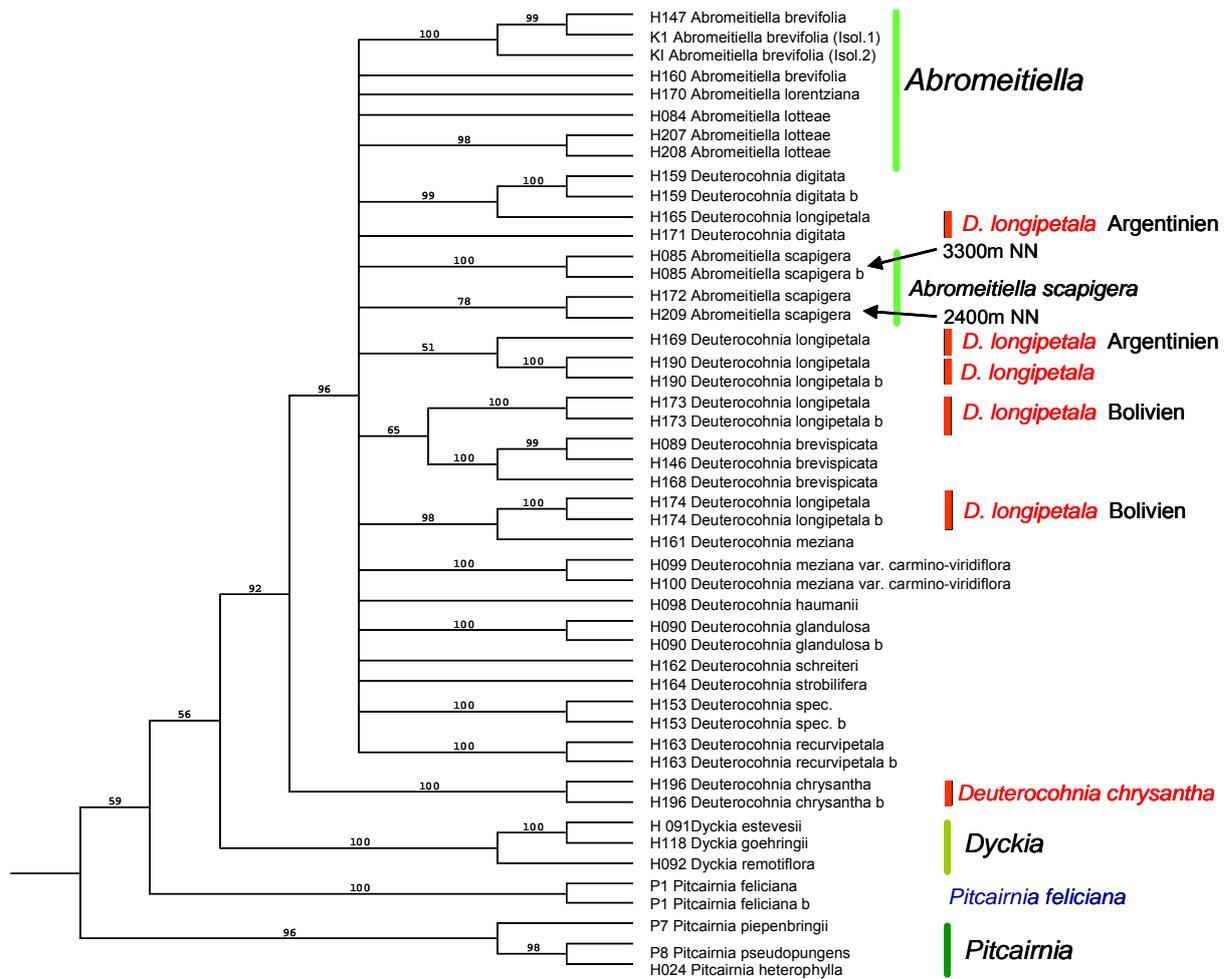


Abb.39: Phänogramm einer NJ-Analyse des AFLP-Datensatzes. 437 kodierte Fragmente generiert mit 3 Primer-Paaren. Die genetische Distanz wurde unter Verwendung des Nei-Li-Koeffizienten (NEI & LI 1979) ermittelt. Die Zahlen auf den Ästen kennzeichnen Bootstrap-Werte (1000 Wiederholungen) Der Bootstrap Konsensus-Baum behandelt alle Dichotomien mit einer Wiederfindungswahrscheinlichkeit < 50% als nicht aufgelöst; mit b sind Wiederholungen derselben Akzessionen gekennzeichnet.

Gattungsgruppe (Anzahl der untersuchten Akzessionen)	Anzahl der in allen untersuchten Akzessionen vorkommenden Fragmente	Anzahl der einzigartigen Fragmente (in keiner anderen untersuchten Akzession vorkommend)
<i>Abromeitiella</i> (10)	11	0
<i>Deuterocohnia</i> (20)	11	0
<i>Abromeitiella</i> (10) und <i>Deuterocohnia</i> (20)	11	0
<i>Dyckia</i> (3)	33	0
<i>Pitcairnia</i> (4)	13	0
Nur <i>Pitcairnia feliciana</i> * (1)		3
Nur <i>Deuterocohnia chrysantha</i> * (1)		1
Alle untersuchten OTUs (37)	1	

Tab.22: Anzahl der Fragmente, die in allen untersuchten Akzessionen der aufgeführten Gattungsgruppen vorkommen (437 berücksichtigte Fragmente) sowie Anzahl der einzigartigen Fragmente der jeweiligen Sippen, die in keiner anderen untersuchten Akzession vorkommen. (*Werte bei *Pitcairnia feliciana* und *Deuterocohnia chrysantha* nur bezogen auf beide Wiederholungen.)

Auch für eine Beurteilung auf der Basis der Verteilung der Fragmente (Anzahl der gemeinsamen Fragmente; Tab.22) ist die untersuchte Stichprobe von Individuen nicht ausreichend.

OTUs	Anzahl der untersuchten Akzessionen	D _J (Min. und Max.)
<i>Abromeitiella</i>	10	0,51 - 0,65
<i>Abromeitiella</i> ↔ <i>Deuterocohnia digitata</i>	10 ↔ 1	0,60 - 0,70
<i>Abromeitiella</i> ↔ <i>Deuterocohnia schreiteri</i>	10 ↔ 1	0,57 - 0,65
<i>Abromeitiella</i> ↔ <i>Deuterocohnia</i> ohne <i>D. chrysantha</i>	10 ↔ 19	0,57 - 0,78
<i>Abromeitiella</i> ↔ <i>Deuterocohnia chrysantha</i>	10 ↔ 1	0,72 - 0,79
<i>Deuterocohnia</i>	20	0,46 - 0,83
<i>Deuterocohnia</i> ohne <i>Deuterocohnia chrysantha</i>	19	0,46 - 0,82
<i>Deuterocohnia</i> ↔ <i>Deuterocohnia chrysantha</i>	19 ↔ 1	0,72 - 0,83
<i>Deuterocohnia longipetala</i>	5	0,54 - 0,72
<i>D. longipetala</i> (Bolivien) ↔ <i>D. longipetala</i> (Argentinien)	2 ↔ 2	0,66 - 0,72
<i>Abromeitiella</i> ↔ <i>Dyckia</i>	10 ↔ 3	0,72 - 0,84
<i>Deuterocohnia</i> ↔ <i>Dyckia</i>	20 ↔ 3	0,74 - 0,89
<i>Abromeitiella</i> ↔ <i>Pitcairnia</i>	10 ↔ 4	0,77 - 0,86
<i>Deuterocohnia</i> ↔ <i>Pitcairnia</i>	20 ↔ 4	0,74 - 0,88
<i>Dyckia</i> ↔ <i>Deuterocohnia chrysantha</i>	3 ↔ 1	0,86 - 0,89
<i>Pitcairnia</i> ↔ <i>Deuterocohnia chrysantha</i>	4 ↔ 1	0,84 - 0,88

Tab.23: Genetische Distanzen D_J (D = 1 - Jaccard*) innerhalb der untersuchten Akzessionen der Gattungsgruppe *Deuterocohnia*, *Dyckia* und *Pitcairnia* : Min. und Max. nur zwischen verschiedenen Arten (D_J innerhalb der untersuchten *A. brevifolia*-Akzessionen z.B. 0,19 bis 0,54; für alle paarweisen Werte siehe Anlage V. *Jaccard-Index (J): $J = a / (n - d)$. **a** = Anzahl aller gemeinsamer Merkmale, **d** = Anzahl nicht gemeinsamer Merkmale, **n** = alle Merkmale).

Die 5 untersuchten Akzessionen von *Deuterocohnia longipetala* finden sich auf verschiedenen Ästen des Baumschemas wieder. Innerhalb der *D. longipetala*-Akzessionen beträgt die genetische Distanz 0,54/0,72 (Min./Max.), ein mittlerer Distanzwert im Vergleich zur genetischen Distanz innerhalb von *Deuterocohnia* - mit und ohne *Deuterocohnia chrysantha* (Tab.23).

Interessant ist hier ein möglicher geographischer Bezug: die beiden Aufsammlungen aus Bolivien (H173 und H174; Tab.24) sind sich genetisch deutlich ähnlicher (D_J Min./Max.: 0,54/0,61) und zeigen eine höhere Distanz zu den beiden Aufsammlungen aus Argentinien (H165 und H 169 mit D_J Min./Max.: 0,66/0,72) und der Aufsammlung unsicherer Herkunft (H190, D_J Min./Max.: 0,62/0,72; Tab.23). Es konnten keine *D. longipetala*-Akzessionen gesicherter Herkunft aus Nordperu (Vgl. Abb. 44) in die Untersuchung einbezogen werden.

Bemerkenswert ist die Stellung von *Deuterocohnia chrysantha*. Diese Art besiedelt ein isoliertes Areal in Nordchile (also westlich der Anden) und besitzt mit Distanzwerten (D_J: Min./Max.) von 0,72/0,79 zu *Abromeitiella* bzw. 0,72/0,83 zu *Deuterocohnia* die geringste relative genetische Ähnlichkeit zu den übrigen Vertretern der Gattung. Eine ähnlich große Distanz weisen nur noch *Deuterocohnia recurvipetala* und *D. meziana* (H163 und H161) mit D_J-Werten von 0,81/0,82 auf. Innerhalb der

Gruppe fand sich nur bei *D. chrysantha* ein Fragment, das allen anderen Akzessionen fehlte (Tab.23). Die Äste mit den offenbar weniger nahe verwandten Gattungen *Pitcairnia* und *Dyckia* weisen niedrige Bootstrap-Werte auf.

Dies tangiert nicht die Aussagen bezüglich *Abromeitiella/Deuterocohnia* und deckt sich mit Aussagen in der Literatur zur eingeschränkten Nutzbarkeit von AFLPs bei verwandtschaftlich weiter entfernt stehenden Gruppen, möglicherweise verursacht durch nichthomologe Banden.

Bezüglich der Gattungen *Dyckia* und *Pitcairnia* und ihrer Beziehung zu *Abromeitiella/Deuterocohnia* lassen sich keine weitergehenden Aussagen auf der Basis der AFLP-Untersuchungen machen. Dies war auch nicht beabsichtigt, weshalb für beide Gattungen nur ein geringer Stichprobenumfang gewählt worden war.

Die relative genetische Distanz von *Abromeitiella* zu *Dyckia* bzw. *Pitcairnia* liegt zwischen 0,72 und 0,84 bzw. 0,77 bis 0,86. Bei *Deuterocohnia* liegt der D_J -Wert im gleichen Bereich (0,74 bis 0,89 bzw. 0,74 bis 0,88. (Tab.23).

Die als einzige Vertreterin der Bromeliaceae in Westafrika vorkommende Art *Pitcairnia feliciana* war ebenfalls Bestandteil der Untersuchung. Bei der einen untersuchten Akzession der Art traten 3 Banden auf, die in den drei anderen *Pitcairnia*-Akzessionen fehlten (Tab.22).

Zu den verwendeten Oligonukleotid Adaptern und den Primern in der präselektiven Amplifikation siehe Tabelle 14.

	OTU	Akzessions-Nr.	Beleg-Nr.	geogr. Herkunft und Bemerkungen
H 147	<i>Abromeitiella brevifolia</i> Griseb.	HEID 130077	H 147	ohne dokumentierte Herkunft; (Verbreitung: S-Bolivien bis NW-Argentinien auf Fels, 1500 bis 2450 m NN)
H 160	<i>Abromeitiella brevifolia</i> Griseb.	HEID 130002	H 160	ohne gesicherte Herkunft
K 1	<i>Abromeitiella brevifolia</i> Griseb.	BG Kassel o.Nr.	K 1	ohne gesicherte Herkunft
H 170	<i>Abromeitiella lorentziana</i> Mez	HEID 130007	H 170	Altbestand ohne genaue Herkunft / Verbreitung NW Argentinien
H 084	<i>Abromeitiella lotteae</i> Rauh	HEID 103817	H 084	"Cumbre del Condor" / 2700 m / S-Bolivien Dept. Tarija / zw. Tarija und Navarez
H 207	<i>Abromeitiella lotteae</i> Rauh	HEID 105682	H 207	Bolivien / Dept. Tarija / Cumbro del Condor, ca. 25 km westl. von Navarez, 65 km westl. von Entre Rios; an steilen Felsen / 2700 m
H 208	<i>Abromeitiella lotteae</i> Rauh	HEID 130016 / Rauh50828	H 208	ohne gesicherte Herkunft, da falsches Etikett; vermutlich von L. Hromadnik
H 085	<i>Abromeitiella scapigera</i> Rauh & Hromadnik	HEID 104591 Rauh 50825	H 085	Bolivien / Dept. Potosi / zw. Mojo und Toro / 3300 m
H 172	<i>Abromeitiella scapigera</i> Rauh & Hromadnik	HEID 130020	H 172	Bolivien, Dept. Potosi / Steile Felswände westl. von Palca Grande / 2400 m
H 209	<i>Abromeitiella</i> spec. nov. oder <i>A. scapigera</i> Rauh & Hromadnik ?	HEID 130003 / Rauh 50861	H 209	Bolivien / Dept. Potosi / R. Tumusla-Canon / 2400 m
H 089	<i>Deuterocohnia brevispicata</i> Rauh & Hromadnik	HEID 102379	H 089	zw. Mujupampa (?) und Monteagudo / 1300 m / Bolivien / Dept. Santa Cruz
H 146	<i>Deuterocohnia brevispicata</i> Rauh & Hromadnik	HEID 102379	H 146	lt. Hromadnik 01.03.1999: Bolivien / Dept. Santa Cruz, zw. Muchopampa(?) und Monteagudo (aber: lt. Erstbeschreibung [Rauh & Hromadnik 1988]: Dept. Chuquisaca, bei Serrania Inca Huasi) / 1300 m
H 168	<i>Deuterocohnia brevispicata</i> Rauh & Hromadnik	HEID 104992	H 168	Bolivien / zw. Mujupampa und Monteagudo / 1300 m / Dept. Santa Cruz / Sämlinge der Typuspflanze 102379
H 196	<i>Deuterocohnia chrysantha</i> (Philippi) Mez in Martius	Pflanze im BG Bochum / Sukkulentenhaus	H 196	leg. Katz, Chile 1993
H 159	<i>Deuterocohnia digitata</i> L.B. Sm.	HEID 130000 Rauh 64142	H 159	Argentinien / nahe Tin Tin / 2400 m
H 171	<i>Deuterocohnia digitata</i> L.B. Sm.	HEID 130001	H 171	Bolivien / Dept. Chuquisaca, nördlich Camargo / 2500 m
H 090	<i>Deuterocohnia glandulosa</i> Gross	HEID 103854	H 090	Bei Campo Serere auf dem Weg nach Villa Montez / Dept. Tarija / 1200 m / Bolivien
H 098	<i>Deuterocohnia haumanii</i> Castellanos	HEID 130119	H 098	Argentinien / Prov. Salta und Prov. Catamarca / ca. 1400 m
H 165	<i>Deuterocohnia longipetala</i> (Baker) Mez in Martius	HEID 103725	H 165	Argentinien / La Rioja / Dept. General J. Facundo Quiroga / 820 m
H 169	<i>Deuterocohnia longipetala</i> (Baker) Mez in Martius	HEID 104983	H 169	Argentinien / ohne genaue Angaben
H 173	<i>Deuterocohnia longipetala</i> (Baker) Mez in Martius	HEID 130200 / Rauh 50853	H 190	Bolivien / Dept. Cochabamba / Puente Arce, Rio Grande / 1700 m

	OTU	Akzessions-Nr.	Beleg-Nr.	Herkunft und Bemerkungen
H 174	<i>Deuterocohnia longipetala</i> (Baker) Mez in Martius	HEID 130181 / Rauh 50824	H 173	Bolivien / Dept. Cochabamba / Villa Granado-Omereque / 2000 m
H 190	<i>Deuterocohnia longipetala</i> (Baker) Mez in Martius	o. Nr. BG Bochum	H 174	ex BG Leipzig ; junge Pfl. aus Samen gezogen: 1998 (159); T10; 17.03.1993
H 161	<i>Deuterocohnia meziana</i> O. Kuntze ex Mez	HEID 130181	H 161	Bolivien / Dept. Cochabamba, Villa Granado-Omereque / 2000 m
H 099	<i>Deuterocohnia meziana</i> O. Kuntze ex Mez var. <i>carmino-viridiflora</i> Rauh	HEID 103808	H 099	NO-Bolivien / Steilhänge bei Pocho / 200 m
H 100	<i>Deuterocohnia meziana</i> O. Kuntze ex Mez var. <i>carmino-viridiflora</i> Rauh	HEID 103653	H 100	NO-Bolivien / Steilhänge bei Pocho / 200 m
H 163	<i>Deuterocohnia recurvipetala</i> Gross	HEID 130120	H 163	Argentinien / Cerro Colorado / 550 m
H 162	<i>Deuterocohnia schreiteri</i> Castellanos	HEID 130148	H 162	Herkunft unbekannt
H 153	<i>Deuterocohnia spec.</i>	ohne Nr., Sukkulentsammlung (Palmengarten Frankfurt a. M.)	H 153	Sukkulentsammlung PG; keine gesicherte Herkunft
H 164	<i>Deuterocohnia strobilifera</i> Mez	HEID 130015	H 164	Bolivien / ohne weitere Angaben
H 091	<i>Dyckia estevesii</i> Rauh	HEID 105188	H 091	bisher nur vom Typus-Standort bekannt: Brasilien / Est. Goias / im Trockental zwischen der Stadt Caiaponia und dem Rio Araguaia; terrestrisch
H 092	<i>Dyckia remotiflora</i> Otto & F.Dietr.	HEID 130010	H 092	Brasilien / ohne weitere Angaben
H 118	<i>Dyckia goehringii</i> Rauh	HEID 105013 / Rauh 67622	H 118	Brasilien / Est. Minas Gerais, bei Diamantina
P1	<i>Pitcairnia feliciana</i> (A.Chev.) Harms & Mildbr.	BG Bonn: 12804	BG Bonn 12804	Republik Guinea (Westafrika) / nahe Kindia im Fouta Djallon-Hochland, leg. Porembski
P7	<i>Pitcairnia piepenbringii</i> Rauh & E.Gross	Rauh 67340		Brasilien, „Fissuris rupium arenosarum, 50 km in directione meridionalia Barreiras“ leg. Rauh (04.05.1986), Klon der Typuspflanze
P8	<i>Pitcairnia pseudopungens</i> Rauh	HEID 52797a und FRP 92-11299-4-0	-	
H 024	<i>Pitcairnia heterophylla</i> (Lindley) Beer	FRP 93-12984-0	H 024	

Tab.24 (S.90/91): Gattungsgruppe *Abromeitiella* (sensu SMITH & DOWNS 1974, RAUH 1983, 1987) *Deuterocohnia*, *Dyckia* und *Pitcairnia*. Mit AFLPs untersuchte Akzessionen aus der Lebendsammlung: FRP = Palmengarten, Frankfurt/Main, HEID = Botanischer Garten der Universität Heidelberg. Alle Belege sind im Herbarium Senckenbergianum (FR) hinterlegt. Vgl. auch Anlage I: sequenzierte *Abromeitiella*-Akzessionen sind dort sensu SMITH & TILL 1998 unter *Deuterocohnia* aufgeführt, Akz.-Nr. ohne "H".

3.3 Cytogenetische Charakteristika der Bromeliaceae

In der Tabelle 25 sind die Chromosomenzahlen und karyologischen Merkmale der 19 untersuchten Arten/Unterarten zusammengefaßt. Für 15 Taxa sind dies die ersten cytogenetischen Analysen: *Aechmea bromeliifolia*; *Ananas nanus*, *Deinacanthon urbanianum*, *Fascicularia bicolor* ssp. *bicolor*, *F. bicolor* ssp. *canaliculata*, *Greigia* spec. nov., *G. sphacelata*, *Ochagavia elegans*, *O. carnea* und *Orthophytum disjunctum* var. *disjunctum* (Bromelioideae, 10 Taxa). *Ayensua uaipanensis*, *Deuterocohnia lorentziana*, *Dyckia saxatilis* und *Puya mirabilis* (Pitcairnioideae 4 Taxa) und *Catopsis floribunda* (Tillandsioideae). Für die Gattungen *Ayensua*, *Deinacanthon*, *Fascicularia*, *Greigia* und *Ochagavia* liegen somit die ersten karyologischen Befunde vor. Die Mehrzahl der untersuchten Arten weist einen diploiden Chromosomensatz mit $2n = 50$ auf. Polyploid sind die beiden Bromelioideae *Deinacanthon urbanianum* ($2n = \text{ca. } 160$) und *Bromelia laciniosa* ($2n = \text{ca. } 150$).

Die Karyotyp-Architektur wurde nur bei ausreichend gut ausgespreiteten Präparaten bestimmt. Alle untersuchten Bromelioideae zeigten einen einheitlichen Karyotypen mit Chromosomen einheitlicher Größe, vergleichbar mit dem von *Tillandsia dodsonii*, der einzigen diesbezüglich untersuchten Tillandsioideae. Bemerkenswert ist, dass von den vier untersuchten Pitcairnioideae drei einen bimodalen Karyotyp aufweisen. Bei *Greigia* spec. nov. (Bromelioideae) und *Dyckia saxatilis* (Pitcairnioideae) konnten je 2 Paare von Satelliten beobachtet werden.

Bromeliaceae haben kleine Chromosomen mit in dieser Studie bestimmten Längen zwischen 2,72 und 0,25 μm . Größere Chromosomen fanden sich bei *Aechmea bromeliifolia* mit 2,72 bis 1,36 μm Länge, kleinere Chromosomen bei *Greigia* spec. nov. (1,14 bis 0,57 μm Länge), beide mit $2n = 50$.

Die polyploide *Bromelia laciniosa* ($2n = \text{ca. } 150$) weist die kleinsten Chromosomen mit 1,25 bis 0,25 μm Länge auf. Bemerkenswert ist die Polyploidie von *Deuterocohnia lorentziana*. Individuen der gleichen Art, die im selben Topf kultiviert wurden, wiesen verschiedene Chromosomenzahlen ($2n = 50$ und $2n = 100$) auf. Überraschenderweise unterscheiden sich beide Genome auch in Bezug auf Chromosomengröße und -morphologie. Die Diploiden haben mit 2,29 bis 1,14 μm Länge größere Chromosomen und weisen einen bimodalen Karyotyp mit 19 großen und 6 kleinen Chromosomenpaaren auf, während die Tetraploiden mit 1,94 bis 0,5 μm Länge deutlich kleinere Chromosomen mit nur einem größeren Chromosomenpaar besitzen.

Alle untersuchten Arten zeigten eine semiretikulate Chromatinstruktur in der Interphase und die frühe Kondensation am proximalen Ende in der Prophase bis Prometaphase.

Ayensua uaipanensis hat mit $2n = 46$ eine deutlich von der Basiszahl $x = 25$ der Bromeliaceae abweichende Chromosomenzahl, ansonsten sind die karyologischen Merkmale wie bei vielen Bromeliaceae: kleine Chromosomen (1,62 bis 0,81 μm), eine vergleichbare Chromatinstruktur in der Interphase und eine ähnliche Chromosomenkondensation.

Eine Dreifachfärbung mit CMA₃/Actinomycin/DAPI ließ in den 6 untersuchten Arten ein oder zwei CMA⁺/DAPI⁻ Banden erkennen, die wahrscheinlich den Nukleolus-Organisator-Regionen (NORs) zuzuordnen sind. Dies wurde durch die Silbernitratfärbung (AgNO₃) bestätigt.

Mit AgNO₃ konnten 4 Kerne von Chromosomen mit Nukleolus-Organisator-Regionen (NO-

Chromosomen) bei *Ananas comosus* und 2 Kerne bei *Dyckia saxatilis* angefärbt werden. Da angenommen wird, dass jeder Chromosomensatz ursprünglich ein Paar NO-Chromosomen hatte, bestätigt dieses Vorhandensein von AgNO₃-anfärbbaren Chromosomenpaaren, dass Bromeliaceae Paläopolyploide mit der Basiszahl $x = 25$ sind, die wahrscheinlich aus Vorfahren mit niedrigeren Basiszahlen hervorgegangen sind.

Art	2n	Länge Chrom. (µm)	Chromozentrum des Interphasekerns		Anzahl der Chromosomenpaare mit		Maximale Anzahl von AgNO ₃ anfärbbaren Kernen	Karyotyp-Architektur
			Form	Verteilung	CMA ⁺ /DAPI terminale Banden	Satelliten		
Bromelioideae								
<i>Aechmea bromeliifolia</i>	50	2.72-1.36	Kugelförmig oder stäbchenförmig	Irregulär	2	-	4	-
<i>Ananas comosus</i>	50	1.38-0.83	Klein, fast kugelförmig	Regulär	1	-	-	-
<i>Ananas nanus</i>	50	1.6-1.1	Klein, kugel- bis punktförmig	Regulär	1	-	-	± einheitlich groß
<i>Deinacanthon urbanianum</i>	ca.160	1.6-0.5	Kugel- bis stäbchenförmig	Regulär	-	-	-	± einheitlich groß
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i>	50	1.47-0.59	Klein, fast kugelförmig	Regulär	-	-	-	± einheitlich groß
<i>Fascicularia bicolor</i> ssp. <i>canaliculata</i>	50	2.06-0.88	Klein, kugel- bis punktförmig	Regulär	-	-	-	± einheitlich groß
<i>Greigia spec.</i>	50	1.14-0.57	Klein, kugelförmig oder stäbchenförmig	Irregulär	-	2	-	-
<i>Greigia sphacelata</i>	50	1.71-0.86	Klein, kugelförmig oder stäbchenförmig	Irregulär	1	-	-	-
<i>Bromelia laciniosa</i>	ca.150	1.25-0.25	Klein, fast kugelförmig	Irregulär	-	-	-	± einheitlich groß
<i>Ochagavia litoralis</i>	50	2.61-1.18	Klein, kugelförmig oder stäbchenförmig	Regulär bis polarisiert	1	-	-	± einheitlich groß
<i>Ochagavia elegans</i>	50	1.38-0.83	Klein, fast kugelförmig	Regulär	-	-	-	-
<i>Orthophytum disjunctum</i>	50	1.61-0.97	Klein, fast kugelförmig	Regulär	-	-	-	-
Pitcairnioideae								
<i>Ayensua uaipainensis</i>	46	1.62-0.81	Kugelförmig oder stäbchenförmig	Regulär bis polarisiert	-	-	-	-
<i>Deuterocohnia lorentziana</i> (= <i>Abromeitiella lorentziana</i> Mez)	50	2.29-1.14	Groß, faden- oder stäbchenförmig, "wolkenartig"	Irregulär	-	-	-	Bimodal, mit 6 kleinen und 19 größeren Paaren, hauptsächlich submeta- bis metazentrische
	ca.100	1.94-0.5	Klein, kugel- oder stäbchenförmig	Irregulär	-	2	-	Bimodal, mit einem größeren Chromosomenpaar
<i>Dyckia saxatilis</i>	50	2.25-1.25	Klein, kugelförmig bis oval und gedreht	Irregulär	-	-	2	± einheitlich groß
<i>Pitcairnia atrorubens</i>	50	1.43-1.14	Klein, kugelförmig oder stäbchenförmig	Regulär	-	-	-	-
<i>Puya mirabilis</i>	50	1.71-0.86	Fast punktförmig	Irregulär	-	-	-	Bimodal, mit 2 größeren Chromosomenpaaren
Tillandsioideae								
<i>Catopsis floribunda</i>	50	1.43-0.86	Klein, kugelförmig bis oval und gedreht	Regulär	-	-	-	-
<i>Tillandsia dodsonii</i>	50	1.71-0.86	Klein, stäbchenförmig bis oval und gedreht	Regulär	-	-	-	± einheitlich groß

Tab. 25: Cytogenetische Merkmale der untersuchten Bromeliaceae. Aus: GITAÍ, J., BENKO-ISEPPON, A. M. & HORRES R.: Cytogenetics and Evolution of Bromeliaceae.- in Vorbereitung; wird eingereicht bei Plant Systematics and Evolution. - = nicht untersucht, ca.= ungefähre Zahl, Chrom.= Chromosomen

4 Diskussion

4.1 Sequenzanalysen

Die statistische Absicherung (engl. „Goodness of Fit“-Indizes) und die Wiederfindungswahrscheinlichkeit der in den Einzelanalysen und den kombinierten Analysen ermittelten Topologien hängt entscheidend von zwei Faktoren ab: Dem Umfang und der Qualität der Stichprobe (wie repräsentativ die einbezogenen OTUs für die untersuchten Gruppen sind) sowie der Variabilität des Datensatzes.

Problematisch ist die geringe Sequenzdivergenz aller bisher untersuchten chloroplastidären Marker bei Bromeliaceae. So liegt die Divergenz der *ndhF* Sequenzen nur zwischen 0,1 und 2,5% im Gattungsvergleich, bei 61 paarweisen Vergleichen sogar nur unter 0,7% (TERRY et al. 1997a).

Für *rbcL* wurden ebenfalls geringe Sequenzdivergenzen von nur 0,1 % (zwischen *Neoregelia pineliana* und *Nidularium selloanum* (Bromelioideae) und max. 2,5 % zwischen Vertretern der Bromelioideae und Tillandsioideae (*Billbergia macrolepis* und *Vriesea malzini*, *Orthophytum gurkenii* und *Tillandsia complanata*) gefunden (BENZING 2000: 524).

Die Sequenzdivergenz ist auch bei den in dieser Studie untersuchten Sequenzen gering. So liegt die *p*-Distanz in paarweisen Vergleichen des *trnL*-Introns (CD-Fragment) mit dem größten Informationsgehalt z.B. innerhalb der Bromelioideae meist unter oder bei knapp 1%. Auch bei den kombinierten Analysen der AB-, CD- und EF-Fragmente werden hier max. 1,1% erreicht (Tab.9, Anlage VIII).

Mit dem kombinierten Datensatz von CD und EF werden innerhalb der Bromeliaceae max. 6,1% Sequenzdivergenz erreicht (zwischen Akzession 267 *Streptocalyx poeppigii*, Bromelioideae und 038 *Tillandsia somnians*, Tillandsioideae; vgl. Anlage VIII: *p*-Distanz des CD- und EF-Datensatzes).

Für die untersuchten Bromelioideae weist der CD-EF Datensatz *p*-Distanzwerte von max. 2% auf, mit entsprechend geringer Auflösung innerhalb dieser Unterfamilie.

Eine ähnlich geringe Sequenzdivergenz fand NYFFELER 2002 in seiner Studie von *trnK/matK* und *trnL-trnF*-Sequenzen zur Phylogenie der Cactaceae. Seine Ergebnisse unterstützen die Hypothese von HERSHKOVITZ & ZIMMER (1997) auf der Basis von ITS-Sequenzen, dass die Radiation der Cactaceae schon im mittleren Tertiär vor ca. 30 Millionen Jahren eingesetzt hat.

Zur Struktur des Chloroplastengenoms bei Bromeliaceae lieferten die vergleichenden Studien des Bereichs des ORF 2280 von HAHN et al. (1995) einige Informationen. Beim Vergleich des auf dem IR lokalisierten Gens ORF 2280 zeigte sich im Vergleich zu *Nicotiana*, dass bei Poaceae, Joinvilleaceae, Restionaceae, Cyperaceae, Juncaceae, Flagellariaceae, Typhaceae, Eriocaulaceae und Xyridaceae Deletionen von einigen hundert Basenpaaren (bp) bis zu annähernd 7 Kilobasenpaaren (kb) zu finden sind. Nach Meinung der Autoren sind zumindest einige dieser Deletionen phylogenetisch informativ. Eine starke Deletion bei Poaceae und Joinvilleaceae mit Reduktion der Sequenzlänge von ca. 5 kb auf nur ca. 250 bp sehen sie als Synapomorphie an. Interessant ist, dass im Bereich des ORF 2280 weder bei den Bromeliaceae noch bei den Rapateaceae Deletionen gefunden wurden.

Auf der Basis des Vergleichs von Mutationsraten für *ndhF* berechnet Wolf (1991) einen gemeinsamen Vorfahren der beiden Familien Rapateaceae und Bromeliaceae im Eozän vor etwa 41 Millionen Jahren. Die Annahme der Hypothese gemeinsamer Vorfahren von Rapateaceae und Bromeliaceae im Eozän deckt sich mit der hauptsächlich neotropischen Verbreitung beider Familien und stützt nach BENZING, BROWN & TERRY (2000) die Annahme, dass die Bromeliaceae eine relativ junge Familie ist. Aber *ndhF*-Substitutionsraten variieren zu stark zwischen verschiedenen Familien, was *ndhF* für solche Berechnungen relativ unbrauchbar erscheinen lässt.

Die Neighbor-Joining Analysen (NJ; SAITOU & NEI 1987) der in dieser Studie untersuchten Sequenzdaten wurden mit verschiedenen Distanzmatrizes (*p*-, Jukes-Cantor-, HKY- und ML [HKY85+G Modell]) durchgeführt. Für Datensätze mit vielen OTUs und geringer Sequenzdivergenz empfehlen NEI & KUMAR (2000: 112) die *p*-Distanz zu verwenden, weil dieses einfache Distanzmodell in diesem Fall die geringste Varianz aufweist und eine gute Auflösung bietet.

Neben den NJ-Analysen auf der Basis der *p*-Distanz (Kap. 3.1) waren Maximum Parsimonie Analysen die Auswertungsmethoden der Wahl.

Die mit Maximum Likelihood (ML) durchgeführten Analysen konnten mit PAUP 4.0 wegen der Größe des Datensatzes nicht durchgerechnet werden (Arbeitsspeicher nicht ausreichend). Die bis zum Versagen des Arbeitsspeichers berechneten Topologien zeigten eine ähnlich geringe Auflösung wie die Maximum Parsimonie-Analyse des EF-Fragmentes in Abb.21.

NEI & KUMAR (2000) sehen ein Problem darin, bei phylogenetischen Analysen mit Maximum Likelihood (ML) die richtigen Topologien zu rekonstruieren, weil in der ursprünglichen Fassung der ML-Methode von CAVALLI-SFORZA & EDWARDS (1967) die Topologie als Zufallsvariable behandelt wird. Dies basiere auf der Annahme, dass Artbildung nach dem Yule-Prozess in der Wahrscheinlichkeitstheorie erfolge, was aber nicht der Realität entspricht. RANNALA & YANG (1996), YANG & RANNALA (1997) und LARGET & SIMON (1999) berücksichtigen dies in neueren Ansätzen, indem sie annehmen, dass Artbildungsprozesse nach einem „birth-death“ genannten Prozess ablaufen (Yule = ein nur „birth“-Prozess). Die Topologie wird nach diesen Ansätzen berücksichtigt, indem ihre Wahrscheinlichkeit über einen Bayesian-Ansatz bestimmt wird.

Artbildungsprozesse sind nach Meinung von NEI & KUMAR (2000) jedoch komplizierter und werden auch mit diesen neueren mathematischen Ansätzen nicht realistisch erfasst.

In den letzten Jahren sind die Analysemethoden in dieser Richtung noch weiter verfeinert worden. Ein aktuell weit verbreitetes Programm ist MrBayes von John Huelsenbeck und Fredrik Ronquist (<http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes>, zur aktuellen Diskussion siehe auch HUELSENBECK et al. 2002). Ebenso wie die Analysen mit ML führten Analysen mit MrBayes zu keiner besseren Auflösung. Man sollte sich stets bewusst sein, dass die Phylogenie einer Sequenz oder eines Gens nicht in jedem Fall auch die Phylogenie der untersuchten Organismen widerspiegelt (DOYLE 1993).

4.2 Fragmentanalysen

Die Bromelioideae zeigen eine für die ohnehin wenig variablen Bromeliaceae besonders geringe Sequenzvariabilität in allen von uns und anderen Autoren (TERRY et al. 1997a, 1997b: *ndhF*, BEHNKE et al. 2000: *rbcL*, CRAYN et al. 2000: *matK*) untersuchten molekularen Markern. Dies hat eine geringe phylogenetische Auflösung innerhalb der Bromelioideae zur Folge, die ja im Zentrum unseres Interesses standen.

Für Gattungsgruppen, die in der Arbeitsgruppe im Rahmen von Revisionen untersucht wurden, lieferten die Sequenzdaten keine befriedigenden Ergebnisse, aufgrund des Scheiterns der ITS-Analysen konnten auch keine Informationen eines Kernmarkers gewonnen werden.

Zur Beantwortung von Fragestellungen auf niedrigerem taxonomischen Niveau und als mögliche Alternative zu ITS wurden zunächst RAPDs, später AFLP angewendet.

Weitere Optionen wären ISSR (Inter-simple Sequence Repeats) oder andere mikrosatellitenbasierte Markermethoden gewesen (siehe Review von WOLFE & LISTON 1998).

Eine Alternative zu AFLPs bietet die SAMPL-Methode, Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci (ebenfalls auf Mikrosatelliten basierend, US-Patent von MORGANTE & VOGEL 1994) mit ggf. besserer Auflösung auf der infragenerischen Ebene.

Mikrosatellitenbasierte Markermethoden bringen gute Ergebnisse auf der infragenerischen Rangstufe, etwa bei populationsgenetischen Untersuchungen (z.B. AJIBADE et al. 2000, HUANG & HUANG 2000).

Basierend auf AFLP-Präamplifikationen entwickelten BONEH et al. (2003) Mikrosatellitenmarker, die sie für populationsgenetische und ökologische Untersuchungen von *Tillandsia fasciculata* und *Guzmania monostachya* einsetzen wollen. DESPRES et al. (2003) setzten AFLPs erfolgreich ein um die phylogenetischen Beziehungen von *Trollius*-Arten (Ranunculaceae) zu untersuchen, wo ITS-Daten und *trnL* Intron und *trnL-trnF*-Daten nicht genügend Auflösung brachten.

Beide eingesetzten Fragmentanalysemethoden erwiesen sich als für die Beantwortung der Fragestellung geeignet und besonders AFLPs erfüllten die Erwartungen bezüglich der Analyse nah verwandter Sippen (s. 4.2.2.).

4.2.1 RAPD Analysen der Gattungsgruppe *Fascicularia*, *Ochagavia* und *Greigia*

Auf die Probleme der Reproduzierbarkeit von RAPDs soll hier nicht näher eingegangen werden, diese sind in der Literatur hinreichend diskutiert (siehe z.B. Review von WOLFE & LISTON 1998, RIESEBERG 1996, PÉREZ et al. 1998).

Im Vordergrund meiner RAPD-Untersuchungen stand die Frage der genetischen Ähnlichkeit der Akzessionen von *Fascicularia bicolor*. Hier standen auch 12 Akzessionen dieser schwer vom natürlichen Standort zu beschaffenden Pflanzen zur Verfügung. Die ermittelten genetischen Ähnlichkeiten innerhalb von *Fascicularia* decken sich mit den übrigen morphologischen und

anatomischen sowie den AFLP-Untersuchungen (s. Kap. 4.2.2.). Die Anzahl der berücksichtigten Fragmente liegt mit 98 nicht sehr hoch, bewegt sich jedoch im auch in anderen Analysen herangezogenen Bereich. Nach der Methode von RAMSER et al. (1996) wurden alle RAPDs reproduziert. Insgesamt hat sich diese Methode bewährt und kann zur Bearbeitung von nah verwandten Bromeliensippen gut eingesetzt werden. Dies erfolgt aktuell auch z.B. bei der Bearbeitung der Gattung *Fosterella* (Pitcairnioideae; REX et al. 2001).

Die unbefriedigende Gruppierung der *Ochagavia* Akzessionen (im Hinblick auf *O. elegans*) kann auf mehrere Gründe zurückgeführt werden. Neben dem unzureichenden Sampling von nur 5 Akzessionen ist die vergleichsweise geringe Zahl der berücksichtigten Merkmale zu nennen. Die Auflösung war ausreichend zur Abgrenzung der beiden Unterarten von *Fascicularia*, für eine bessere Auflösung bezüglich der Stellung der *Ochagavia*-Arten hätte das Heranziehen von deutlich mehr Fragmenten möglicherweise auch hier zum Erfolg geführt. Wegen der vieldiskutierten Vorteile von AFLPs bezüglich Reproduzierbarkeit und einer besseren Auflösung auf PAA-Gelen zur Vermeidung der Komigration nicht homologer Banden wurde der Versuchsumfang für RAPDs daher nicht vergrößert. Mit einem für *Ochagavia* und *Greigia* erweiterten Sampling wurden AFLPs durchgeführt (s. 4.2.2.).

4.2.2 AFLP -Analysen der Gattungsgruppe *Fascicularia*, *Ochagavia* und *Greigia*

Die Vorteile der AFLP-Fragmentanalyse gegenüber der RAPD-Analyse sind eindeutig, lassen sich jedoch sicher z.T. auf das veränderte Sampling und die deutlich größere Datenbasis zurückführen. Die Bootstrapwerte der Analyse belegen die außerordentliche Robustheit der Daten (36 und 37). In ihrer AFLP-Studie der Gattung *Beta* erzielten HANSEN et al. (1999) mit 500 kodierten Merkmalen robuste Dendrogramme. Die interspezifischen AFLP-Studien von HILL et al. (1996; 320 Fragmente kodiert), KARDOLUS et al. (1998; 551 kodierte Fragmente), ANGIOLILLO et al. (1999; 290 kodierte Fragmente) und CAICEDO et al. (1999; 179 kodierte Fragmente) berücksichtigen meist deutlich weniger Merkmale. Dieser Vergleich mit anderen AFLP-Studien mit systematisch-taxonomischer Fragestellung zeigt, dass mit 715 kodierten Fragmenten die Anzahl der berücksichtigten Merkmale in dieser Studie vergleichsweise hoch liegt.

Fraglich bleibt der Aussagewert der Analyse bezüglich der genetischen Ähnlichkeit zu *Greigia*, *Androlepis*, *Wittrockia* und *Lymania*. Bei 67 von den 715 kodierten Fragmenten kamen nur in den Gattungen *Androlepis*, *Wittrockia* und *Lymania* Banden vor (Kodierung mit 1), keine in *Fascicularia*, *Ochagavia* und *Greigia* (Kodierung mit 0; vgl. Anlage V), so dass die genetische Distanz von *Fascicularia-Ochagavia-Greigia* auf der Analyse von 649 Merkmalen basieren.

Für weitergehende Aussagen zur natürlichen Verwandtschaft dieser Gattungen und ihrer Beziehung zu *Fascicularia* und *Ochagavia* wäre neben einer breiteren, repräsentativen Stichprobe auch eine Homologieprüfung mit *Southernblot*-Analysen (SOUTHERN 1975, SAMBROOK et al. 1989, 2001) der berücksichtigten Fragmente nötig. Bei genetisch weiter entfernt stehenden Sippen steigt die Wahrscheinlichkeit an, dass nicht homologe Banden in größerem Umfang in die Analyse eingehen und

das Ergebnis verfälschen.

Ein ursprüngliches Ziel der Untersuchung war es, genauere Erkenntnisse zur Verwandtschaft von *Greigia* auf der einen und *Ochagavia* und *Fascicularia* auf der anderen Seite zu gewinnen. Wegen der geringen Stichprobe der Gattung *Greigia* konnte dies weder auf der Basis der AFLP-Daten noch auf der Basis der Sequenzdaten sicher analysiert werden und wurde daher nicht weiterverfolgt.

Nach den vorliegenden Erfahrungen sollten mindestens 300 Merkmale einbezogen werden.

Es lassen sich keine weitergehenden Aussagen zur Ausbreitungsgeschichte der untersuchten Gattungen machen.

Ein allgemeiner Schwachpunkt dieser Analysen liegt also im limitierten Umfang der Stichprobe. Hier ist allerdings zu bedenken, dass bereits die herangezogenen Akzessionen praktisch alle in Botanischen Gärten zur Verfügung stehenden Ressourcen ausschöpften und zudem auch noch eigene Aufsammlungen des Betreuers vom Standort bearbeitet werden konnten. Mit vertretbarem Aufwand war keine bessere Stichprobe zu erzielen.

4.2.3 AFLP-Analysen der Gattungsgruppe *Abromeitiella*, *Deuterocohnia*, *Dyckia* und *Pitcairnia*

Die Analyse diente der Beantwortung der Frage nach der Gattungsabgrenzung von *Deuterocohnia* und *Abromeitiella*. Die Aussagen sind unter dem Vorbehalt der untersuchten Stichprobe zu treffen.

Im Falle von *Abromeitiella* waren alle 4 Arten (10 Akzessionen) vertreten, bei *Deuterocohnia* immerhin 10 von insgesamt 12 Arten und 20 Akzessionen (vgl. Abb.11). Damit ist die Stichprobe als recht umfassend zu bewerten. Wünschenswert wären mehrere Akzessionen pro Art und jeweils auch verschiedene Herkünfte gewesen. Dies ist jedoch z.Zt. ohne aufwändige Geländeaufsammlungen nicht zu realisieren.

Anhand der Bootstrap-Werte ist erkennbar, dass die Topologie bezüglich der Gattungen *Dyckia* und *Pitcairnia* schlecht gestützt ist. SMITH & TILL (1998) fassen die Gattungen *Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Pitcairnia* zusammen mit *Brewcaria*, *Encholirium* und *Hechtia* im Tribus Puyee zusammen.

Die in dieser Studie analysierten Sequenzdaten widersprechen dieser Auffassung. Die Gattungen *Puya* und *Hechtia* bilden auf dieser Datenbasis eigene, von den als Pitcairnioideae s.str. gefassten Gattungen *Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Pitcairnia* und *Pepinia* deutlich getrennte Gruppen.

Auch aus der AFLP-Untersuchung ist zu schließen, dass *Pitcairnia* nicht so eng mit *Deuterocohnia* und *Abromeitiella* verwandt ist wie *Dyckia*. In 6 Fragmentpositionen finden sich Banden in allen drei untersuchten *Dyckia*- und allen zwölf *Abromeitiella*-Akzessionen. Zwei dieser Fragmente finden sich auch in allen 20 *Deuterocohnia*-Akzessionen.

In den Sequenzanalysen dieser Studie und auch bei der *matK*-Studie von CRAYN et al. (2000) gruppieren Vertreter von *Deuterocohnia* und *Dyckia* stabil auf einem Ast mit hoher Wiederfindungswahrscheinlichkeit, was sich mit den Ergebnissen der AFLPs deckt.

Für weitergehende Interpretationen ist die Stichprobe der Gattung *Dyckia* jedoch unzureichend, und

auch hier gilt, dass wegen der steigenden Wahrscheinlichkeit für das Auftreten nichthomologer Banden Homologieprüfungen notwendig wären. Für die Auswertung dieser Studie ist das jedoch weniger relevant, weil die Frage nach der Gattungsabgrenzung von *Deuterocohnia* und *Abromeitiella* im Vordergrund stand, zu der uns die AFLP-Analysen wichtige Erkenntnisse liefern.

Gut gestützt ist zunächst die nähere Verwandtschaft von *Deuterocohnia* und *Abromeitiella* untereinander. Für die Beziehungen innerhalb der Artengruppe liefern die AFLPs trotz z.T. unzureichender Auflösung zwei wichtige neue Informationen. Die größten genetischen Unterschiede bestehen zwischen *Deuterocohnia chrysantha* auf der einen und den übrigen Arten der Gruppe auf der anderen. Dies deckt sich sehr eindrucksvoll mit der isolierten geographischen Verbreitung dieser Art westlich der Anden (Abb.40). Die sehr interessante Frage nach der Ausbreitungsgeschichte von *D. chrysantha* lässt sich jedoch noch nicht beantworten. Es kann hier nicht auf ein reliktäres Vorkommen, das durch Klimaveränderung zunehmend isoliert wurde, geschlossen werden, da die *Deuterocohnia*-Arten vielfach Anpassungen an arides Klima zeigen. Anders liegt der Fall bei der Art *Tillandsia tragophoba*, die im gleichen Gebiet wie *D. chrysantha* beheimatet ist, jedoch einem anderen ökologischen Typ entspricht und verwandtschaftlich an Arten feuchterer Habitate anzuschließen ist (siehe auch RUNDEL et al. 1998).

Die Frage nach der Gattungsumgrenzung kann anhand meiner Ergebnisse ebenfalls beantwortet werden. Zwar weisen die *Abromeitiella*-Arten untereinander große genetische Ähnlichkeit auf und gruppieren in der UPGMA-Analyse auf einem Ast. Diese Topologie besitzt allerdings keine ausreichende Bootstrap-Unterstützung - weder in der UPGMA noch in der NJ-Analyse.

Würde man *Abromeitiella* als eigene Gattung belassen, so würde damit die verbleibende Artengruppe paraphyletisch, und zumindest die deutlicher verschiedene *Deuterocohnia chrysantha* müsste auch als eigene Gattung gefasst werden. Vor diesem Hintergrund ist die Vereinigung beider Gattungen in der älteren *Deuterocohnia* gut gestützt. Hinzu kommt noch die Tatsache, dass alle Akzessionen dieser Artengruppe 11 gemeinsame charakteristische Banden besitzen, die Arten der Gattung *Abromeitiella* und *Deuterocohnia* für sich alleine genommen jedoch keine.

Ein weiteres interessantes Ergebnis betrifft die Art *Deuterocohnia longipetala*. Akzessionen dieser Art besetzen innerhalb des *Deuterocohnia*-Zweiges weit verstreute Positionen. Betrachtet man das auffällig disjunkte und außerordentlich große Areal dieser Art (Abb.40), so bietet sich hier folgende Erklärung an: Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass bisher unter *D. longipetala* eine ganze Reihe von Sippen/Arten zusammengefaßt werden.

Die beiden in der Provinz Cochabamba (Bolivien) gesammelten Akzessionen befinden sich zusammen mit *D. meiziana* auf einem gut gestützten Ast klar getrennt von den anderen, darunter zwei argentinischen *Deuterocohnia longipetala*-Akzessionen.

Auch diese AFLP-Studie zeigt die Bedeutung einer repräsentativen Stichprobe. Nur mit Hilfe eines breiteren „Samplings“, möglichst im Rahmen einer umfassenden Revision der Sippe, das die morphologische und genetische Variabilität der Populationen in allen Teilen des Verbreitungsgebietes berücksichtigt, ließen sich die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der Gattung

Deuterocohnia Mez (SPENCER & SMITH 1992) klären.

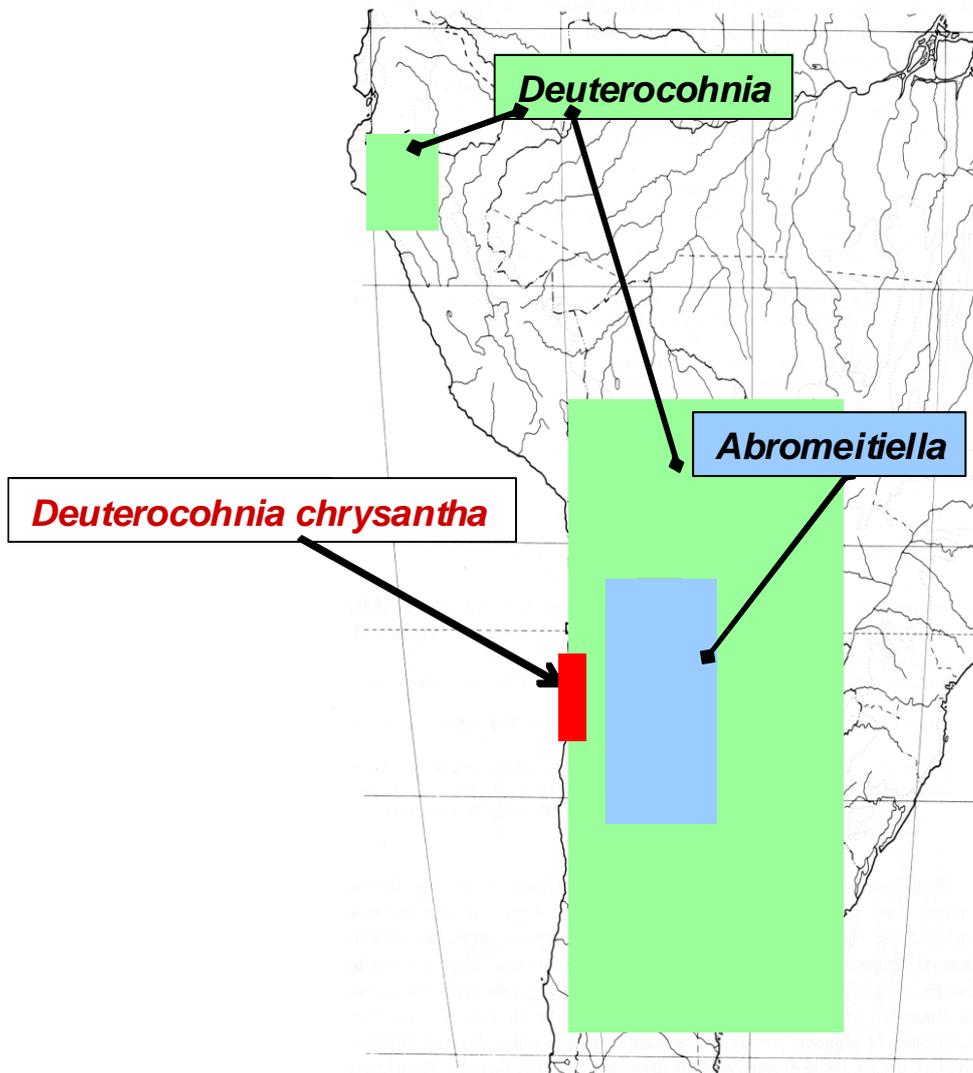


Abb.40: Geographische Verbreitung der Gattungen *Abromeitiella* und *Deuterocohnia*. *Deuterocohnia chrysantha* weist westlich der Anden eine isolierte Verbreitung auf.

4.3 Cytogenetische Charakteristika der Bromeliaceae

Die in Zusammenarbeit mit Jailson Gitaí und Benko-Iseppon durchgeführten Untersuchungen verdeutlichen, dass die Wiederholung von Chromosomenzählungen genauso wichtig ist wie neue Zählungen - möglichst mit der Erhebung weiterer cytogenetischer Merkmale durch Einsatz spezieller Färbetechniken.

Über die Kerngenomstruktur der Bromeliaceae ist wenig bekannt. In *Ananas* konnten dispers verteilte Retrotransposons nachgewiesen werden (THOMSON et al. 1998). Nach Sequenzvergleichen zeigten diese Elemente die größte Ähnlichkeit zu Retrotransposons vom Typ *dell Liliium henryi* und der *gypsy/Ty3* Gruppe. In 5' nach 3' Orientierung bestanden sie aus den Elementen Reverse Transkriptase, Ribonuklease H und Integrase-Domäne. Von diesen und ähnlichen Elementen sind hohe Kopienzahlen (>10.000) aus dem Kerngenom von *Lilium* und *Pinus* bekannt, weshalb die Autoren auch hohe Kopienzahlen dieses Retrotransposons in *Ananas* vermuten. Dieses erste in *Ananas* nachgewiesene Retrotransposon nennen THOMSON et al. (1998) **deal** für (engl.) **d**ispersed **e**lement of *A**nanas*.

EBERT & TILL (1997, nur Abstract) bestimmten den 1C-Gehalt von 31 Arten der Gattung *Pitcairnia* und 16 Arten der Gattungen *Ayensua*, *Brocchinia*, *Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Encholirium*, *Fosterella*, *Hechtia*, *Navia* und *Puya*. Den geringsten DNA-Gehalt von 300 Mbp (1C = 0,3 pg; bei 2n = ca. 50) wies danach *Pitcairnia feliciana* auf, während bei den übrigen Vertretern der Gattung *Pitcairnia* 420 bis 680 Mbp (0,42 bis 0,68 pg) bestimmt wurden. Zwei untersuchte Arten der Gattung *Fosterella* zeigten mit 930 Mbp (0,93 pg) eine relativ hohe Genomgröße, während *Brocchinia* mit 380 bis 390 Mbp und *Deuterocohnia* mit 370 bis 400 Mbp ein relativ kleines Genom besitzen. (*Ayensua* 430 Mbp, *Puya* 440-470 Mbp, *Hechtia* 470 bis 480 Mbp, *Dyckia* 790 bis 800 Mbp, *Encholirium* 860 bis 870 Mbp und *Navia* 710 Mbp).

Die *rbcL*-Daten von BEHNKE et al. (2000) und die in dieser Studie analysierten Daten belegen eine enge Beziehung von *Ayensua uaipanensis* und *Brocchinia*.

Für die Gattung *Brocchinia* liegt nur eine einzige Chromosomenzählung vor. OBERPRIELER & VOGT (1993) bestimmten $2n = 18$ für *Brocchinia cinerea* (Delile) Vis. Dies ist eine deutliche Abweichung von der Basiszahl $x = 25$. Chromosomenzahlen von weiteren Vertretern der Gattung *Brocchinia* fehlen, so dass zum Vergleich mit *Ayensua uaipanensis* und der hier bestimmten Chromosomenzahl $2n = 46$ eine solide Datenbasis fehlt. Trotz mehrfacher Versuche gelang es nicht, von den im Palmengarten der Stadt Frankfurt am Main kultivierten *Brocchinia*-Arten auswertbare Präparate zu erstellen.

Mit Spannung zu erwarten sind gesicherte cytogenetische Daten von *Brocchinia*-Arten im Vergleich zu *Ayensua uaipanensis* und ihrer von der Basiszahl $x = 25$ reduzierten Chromosomenzahl von $2n = 46$. Im Rahmen eines Folgeprojektes ab April 2004 wird Jailson Gitaí dos Santos Frazão hierzu erneut Versuche durchführen. Ein bimodaler Karyotyp wurde bisher für die Tillandsioideae (*Tillandsia* und *Vriesea*) und bei den Bromelioideae nachgewiesen (BROWN & GILMARTIN 1986, 1989b). In unserer Studie wiesen nur die beiden Pitcairnioideae *Deuterocohnia lorentziana* und *Puya mirabilis* einen bimodalen Karyotyp auf, aber keine der untersuchten Bromelioideae und Tillandsioideae.

Die Untersuchung von COTIAS-DE-OLIVEIRA et al. (2000) lieferte weitere Chromosomenzählungen für

Vertreter der Bromelioideae. Die Autoren konnten für 17 Arten erstmals Chromosomenzahlen bestimmen, darunter 16 Arten aus 8 Gattungen der Bromelioideae. Die meisten Bromelioideae-Arten (aus den Gattungen *Aechmea*, *Ananas*, *Billbergia* und *Hohenbergia*) zeigten $2n = 50$. Für *Bromelia laciniosa* wurde wie in unserer Studie die Chromosomenzahl mit $2n = 150$ bestimmt. Die ebenfalls untersuchte *B. plumierii* hat mit $2n = 50$ einen anderen Ploidiegrad und zusätzlich 1-2 B-Chromosomen. Wie der Übersicht der Tab.3 zu entnehmen ist, zeigt sich die Gattung *Bromelia* karyologisch sehr heterogen: es wurden auch Chromosomenzahlen von $2n = 48$, $2n = 94$ und $2n = 96$ bestimmt (MCWILLIAMS 1974, LIN et al. 1987). Polyploidie wurde für *Orthophytum* nachgewiesen, *Neoglaziovia variegata* mit $2n = 100$ und alle 3 untersuchten *Aechmea*-Arten (alle mit $2n = 50$) zeigten Größenvariabilität bei gleichem Karyotyp, aber keine Tendenz zur Bimodalität. Für *Cryptanthus bahianus* wiesen sie $2n = 34 + 1-4$ B Chromosomen nach, was die Autoren als Unterstützung der Hypothese einer Paläopolyploidie bei Bromeliaceae mit der Basiszahl $x = 25$ interpretieren. Die von dieser Basiszahl abweichende reduzierte Chromosomenzahl bei *Cryptanthus* ($2n = 34$, $2n = 36$) sehen COTIAS-DE-OLIVEIRA et al. (2000) als durch Aneuploidie abgeleiteten Zustand an. Diese These vertreten auch RAMÍREZ-MORILLO & BROWN (2001) auf der Basis ihrer fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen.

Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass Polyploidisierung eine bedeutende Rolle bei der Evolution der Bromeliaceae zu spielen scheint. Dies bestätigt auch die Studie natürlicher Populationen von *Pitcairnia*-Arten, in der Hybride mit intermediären Genotypen beider Eltern nachgewiesen werden konnten (WENDT et al. 2001).

Betrachtet man die im Rahmen dieser Studie erhobenen cytogenetischen Merkmale und die aus der Literatur ersichtlichen Daten, so lassen sich die karyologischen Evolutionstendenzen für die Bromeliaceae vorläufig folgendermaßen zusammenfassen (vgl. Tab.25):

1. Eine semiretikulate Chromatinstruktur in der Interphase und die frühe Kondensation am proximalen Ende in der Prophase bis Prometaphase wurde als allgemeine Tendenz bei allen untersuchten Arten festgestellt.
2. Von wenigen Ausnahmen abgesehen ist bisher nur eine geringe Variabilität der Chromosomenzahl festgestellt worden; es dominiert $2n = 50$.
3. Die Chromosomen sind mit bestimmten Längen von 2,72 bis 0,25 μm sehr klein und weisen wenig Heterochromatin auf.
4. Arten mit $2n = 50$ weisen ein bis zwei Paare von Chromosomen mit Nukleolus-Organisator-Regionen (NORs) auf.
5. Polyploide mit $2n = 100$ oder $2n = 150$ haben Chromosomen einheitlicher Größe, bei diploiden Arten gibt es die Tendenz zu bimodalen Karyotypen.

4.4 Gliederung der Bromeliaceae: Abgrenzung der Unterfamilien und Gattungen

Die Ergebnisse der drei untersuchten chloroplastidären Sequenzbereiche bestätigen im Wesentlichen die Ergebnisse der *trnL*-Intron-Studie von 64 Arten/Unterarten der Bromeliaceae (Horres et al. 2000; Anlage VII). Ein wichtiges Ergebnis war, dass die Pitcairnioideae polyphyletisch sind und eine enge Beziehung zwischen *Ayensua waipanensis* und *Brocchinia* besteht.

Wegen gemeinsamen Blütenmerkmalen wie gestielten Samenanlagen, ungleichen Staubblattkreisen und der \pm einfachen Blütenhülle vermutete schon SMITH (1969) eine nähere Verwandtschaft von *Ayensua* und der Gattung *Brocchinia*, deren Verbreitung ebenfalls auf das Guayana-Hochland beschränkt ist.

Die *rbcL*-Analyse von BEHNKE et al. 2000 hatte die Systematik und Evolution der Velloziaceae als zentrale Fragestellung. Doch diese Studie beleuchtet mit 11 untersuchten Arten aus 11 Gattungen auch mögliche Beziehungen innerhalb der Bromeliaceae (siehe auch Übersicht Tab.2). Die *rbcL* -Daten stützen ebenfalls eine enge Beziehung von *Brocchinia* und *Ayensua*, wobei im Strict Consensus Baum der Maximum-Parsimonie-Analyse *Navia phelpsiae* die basale Position im Ast der Bromeliaceae einnimmt. *Fosterella caulescens* und *Pepinia corallina* bilden die Schwestergruppen der hypothetischen Vorfahren aller übrigen untersuchten Arten. Allerdings ist diese Auflösung wegen der geringen Sequenzdivergenz (keine Bootstrap-Unterstützung in der NJ-Analyse mit Kimura-2 Parametern als Distanz-Algorithmus) nicht statistisch abgesichert.

Einige Ergebnisse der phylogenetischen Beziehungen der Pitcairnioideae zeigen die Ausschnitte der kombinierten Analysen des CD- und EF-Fragmentes in Abbildung 40.

Die Zugehörigkeit der Akzession 088 (*Hechtia guatemalensis*) ist in den Analysen des CD-Fragmentes und der kombinierten Analyse von CD und EF ohne Auflösung. Dies wirft die Frage nach der Monophylie der *Hechtia*-Gruppe auf. Nach der *matK*-Studie von CRAYN et al. (2000), der einzigen molekularen Studie mit mehreren (4) untersuchten Akzessionen der Gattung, ist *Hechtia* eine künstliche Gruppe.

Für eine Monophylie der Gattung *Navia* gibt es auf der Basis von *matK*-Daten keine Unterstützung. Allerdings untersuchten CRAYN et al. (2000) nur 2 Arten, *N. arida* und *N. phelpsiae*. In dieser Studie konnte nur *Navia splendens* untersucht werden, so dass hier keine weiteren Aussagen möglich sind. Eine engere verwandtschaftliche Beziehung der Gattungen *Navia* und *Hechtia* (Abb. 40 oben) ist ohne Bootstrapunterstützung.

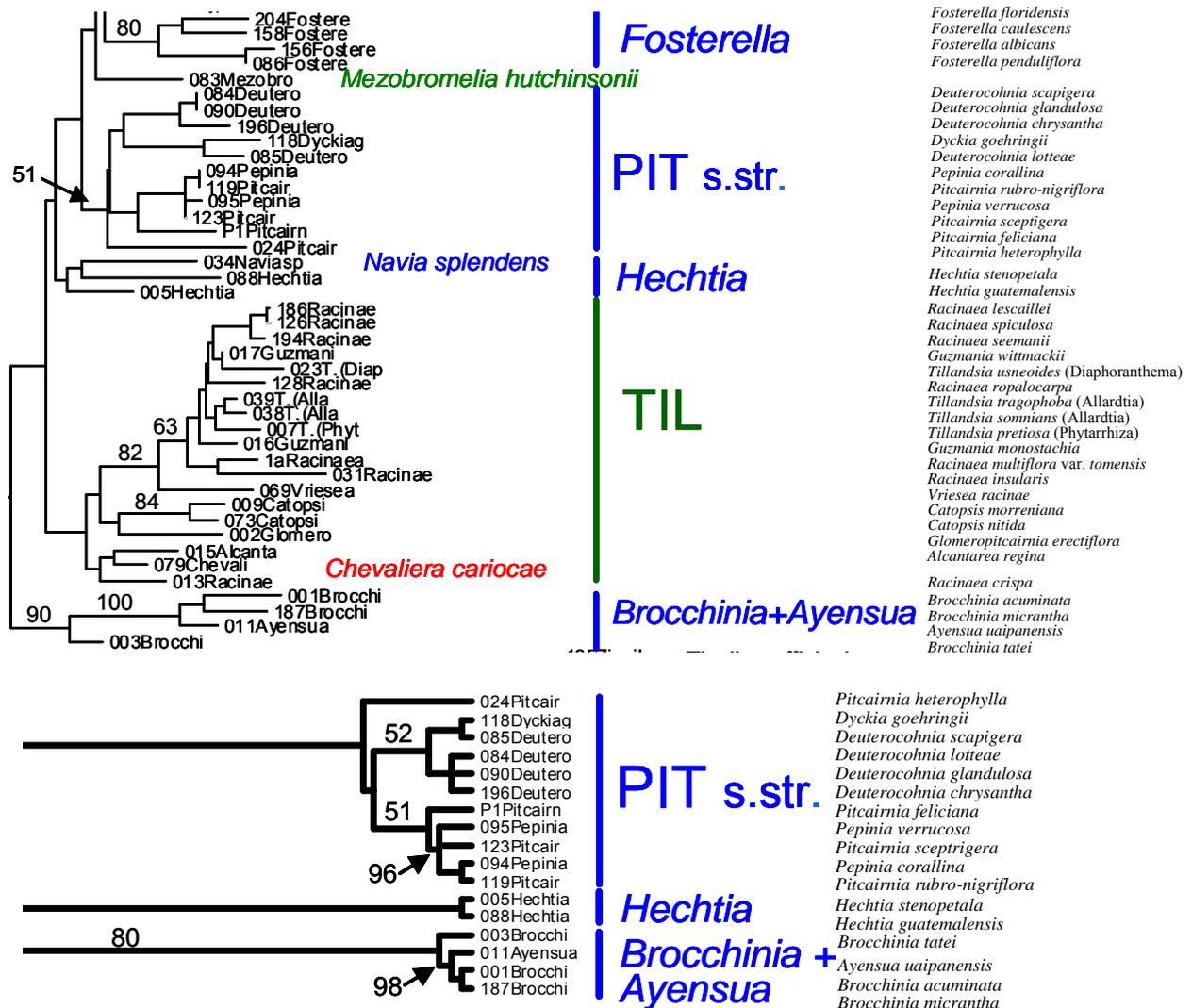


Abb.41: Ausschnitte der kombinierten Analyse des *trnL* Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers mit den systematischen Beziehungen der untersuchten Pitcairnioideae: Pitcairnioideae s.str., *Navia*, *Hechtia* und *Brocchinia* + *Ayensua*: Aus dem 60% MR-Konsensus-Baum der Maximum-Parsimonie-Analyse der Abb.26 (unten) und der NJ-Analyse der Abb.23 (oben). Die Zahlen oberhalb der Äste oder mit Pfeilen zugeordnet kennzeichnen Bootstrap-Werte > 50%.

In der *matK*-Studie von CRAYN et al. (2000) findet sich *Pitcairnia heterophylla* auf einem anderen Ast als die 5 weiteren untersuchten Vertreter der Gattung. *Pepinia* ist basierend auf *matK*-Daten monophyletisch.

Während sich für *P. heterophylla* ein ähnliches Bild abzeichnet, ergeben die Daten des CD- und EF-Fragmentes bezüglich *Pepinia* ein anderes Bild. Die beiden untersuchten *Pepinia*-Arten befinden sich auf einem gut gestützten Ast (Bootstrap-Wert 96 %, Abb.41 unten) mit *Pitcairnia rubro-nigriflora* und *P. sceptrigera*. Dies legt nahe, dass die Trennung der Gattungen *Pitcairnia* und *Pepinia* künstlich ist. Die Beziehung der Gattungen *Pitcairnia*, *Pepinia*, *Dyckia* und *Deuterocohnia* (Pitcairnioideae s.str., PIT s.str., Abb.41) ist sonst ohne hohe Wiederfindungswahrscheinlichkeit. Wie in der *matK*-Studie gibt es auch nach dieser Analyse eine engere Beziehung der Gattungen *Dyckia* und *Deuterocohnia*.

Vorbehaltlich der geringen Stichprobe weisen darauf auch die AFLP-Daten hin. Neben einer etwas geringeren genetischen Distanz weisen *Deuterocohnia* und *Dyckia* auch deutlich mehr gemeinsame Fragmente auf als *Deuterocohnia* und *Pitcairnia*.

Die Fassung der Gattungen *Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Encholirium* und *Hechtia* im Tribus Dyckieae, die ROBINSON & TAYLOR (1999) auf der Basis des gemeinsamen blattanatomischen Merkmals "keine scharfe Abgrenzung zwischen dem Assimilationsparenchym (Chlorenchym) und dem adaxialen Wassergewebe" vorschlagen, wird durch die molekularen Daten widerlegt.

Hechtia ist in allen durchgeführten Analysen deutlich von *Deuterocohnia* und *Dyckia* getrennt.

Die einzige westafrikanische Bromeliaceae, *Pitcairnia feliciana*, ist in der MP-Analyse unter Einbeziehung der kodierten InDels und ohne Ausschluss von Alignmentpositionen (Abb.24) auf einem Ast mit *Pitcairnia rubro-nigriflora*, *P. scepstrigera*, *Pepinia corallina* und *Pepinia verrucosa* (71% Bootstrapunterstützung). In der Analyse ohne die kodierten InDels und unter Ausschluss der Alignmentpositionen 531-534 (Abb.26 und Abb.41 unten) ergibt sich die gleiche Topologie, aber die Wiederfindungswahrscheinlichkeit ist mit nur 51% deutlich geringer. Dies stützt die Hypothese von POREMSKI & BARTHLOTT (1999), die eine Fernausbreitung von *Pitcairnia feliciana* in jüngerer Zeit annehmen. Die AFLP-Daten unterstützen dagegen eine Sonderstellung von *Pitcairnia feliciana*.

Da hier die Beziehung der Gattungen *Abromeitiella* und *Deuterocohnia* im Vordergrund stand und der Stichprobenumfang für die sehr heterogene Gattung *Pitcairnia* mit nur je einer untersuchten Akzession von vier Arten zu gering ist, kann diese Hypothese mit den vorliegenden Daten aber nicht ausreichend geprüft werden.

Fosterella und *Puya* als gut gestützte monophyletische Gruppen und potentielle Schwestergruppen der Bromelioideae sind auch in der Studie von CRAYN et al. (2000) monophyletisch.

Die Gattung *Fosterella* ist besonders interessant. In den interandinen Trockentälern Boliviens scheint diese Gruppe mesophytischer Arten eine adaptive Radiation durchlaufen zu haben.

In der kombinierten CD-EF-Analyse bei Polarisierung der Daten mit den Tillandsioideae zeigen die vier untersuchten Arten eine gut gestützte Auflösung, was darauf schließen lässt, dass die untersuchten Sequenzbereiche auch Informationen zu einer Gattungsgliederung liefern können (siehe Abb.27 und Abb.43 sowie Anlage VI und IX). Die untersuchte *Fosterella caulescens* (Akzession 158) weist z.B. als einzige der untersuchten Bromeliaceae eine 60 bp Insertion als Autapomorphie im Bereich des *trnL*-Introns auf (Anlage VI, Seite 13, Alignment Positionen 555-614:

CATTGAGTCTCTGCACCTATCCTTTTTTTATTCTAGTTTTATACCCTTGTTTTCCCAA).

Fosterella konnte nicht in die cytogenetischen Untersuchungen einbezogen werden, aber der Literatur ist zu entnehmen, dass *F. villosula* mit $2n = 150$ hexaploid ist (BROWN & PALACI 1997), während *F. rusbyi* mit $2n = 50$ diploid ist (BROWN & GILMARTIN 1989). Welche Rolle könnte Polyploidisierung bei der Artbildung von *Fosterella* spielen? Diese interessante Sippe wird derzeit unter Einbeziehung natürlicher Populationen aus dem gesamten Verbreitungsgebiet von Martina Rex im Arbeitskreis von

Prof. Kurt Weising intensiver untersucht (REX et al. 2001, IBISCH et al. 2002).

Die Gattungen *Brewcaria*, *Connelia*, *Cottendorfia*, *Encholirium*, *Lindmania* und *Steyerbromelia* konnten noch nicht untersucht werden. Trotz der klaren Befunde zur Polyphyly der Pitcairnioideae und der nahen Verwandtschaft sowie basalen Position von *Ayensua/Brocchinia* wurden bewusst noch keine taxonomischen und nomenklatorischen Konsequenzen gezogen. Vor der Untersuchung auch dieser Gattungen sind alle Rückschlüsse vorläufiger Natur. Auch von den Gattungen *Dyckia*, *Hechtia* und *Navia* ist eine breitere Stichprobe notwendig, um ihre Gattungsabgrenzung besser aufzulösen.

Die Tillandsioideae sind nach der Analyse von RANKER et al. (1990) ohne *Glomeropitcairnia* an der Basis der Familie, die Bromelioideae und Pitcairnioideae sind Schwestergruppen und die Pitcairnioideae (*Puya* und *Dyckia* / *Hechtia*!) sind paraphyletisch. Die Gattung *Glomeropitcairnia*, die aufgrund morphologischer Merkmale in die Tillandsioideae gestellt wird, hätte dieser Studie zufolge eine Sonderstellung höheren taxonomischen Ranges.

Der Stichprobenumfang und die Datenbasis waren in dieser Studie aber sehr gering. Die in die Analyse einbezogenen 10 Arten aus 9 Gattungen wurden auf der Basis von nur 12 phylogenetisch informativen Merkmalen gruppiert (elf Mutationen der untersuchten chloroplastidären Restriktionsschnittstellen und eine 1,8 kb große Längenmutation).

In der Abbildung 42 ist ein Ausschnitt der Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Introns (CD-Gesamtdatensatz, Abb.19) mit den systematischen Beziehungen der untersuchten Tillandsioideae wiedergegeben. Die Analyse des CD-Gesamtdatensatz berücksichtigt die größte Stichprobe für die Tillandsioideae, u.a. mit Vertretern aller Untergattungen der artenreichsten Gattung *Tillandsia*.

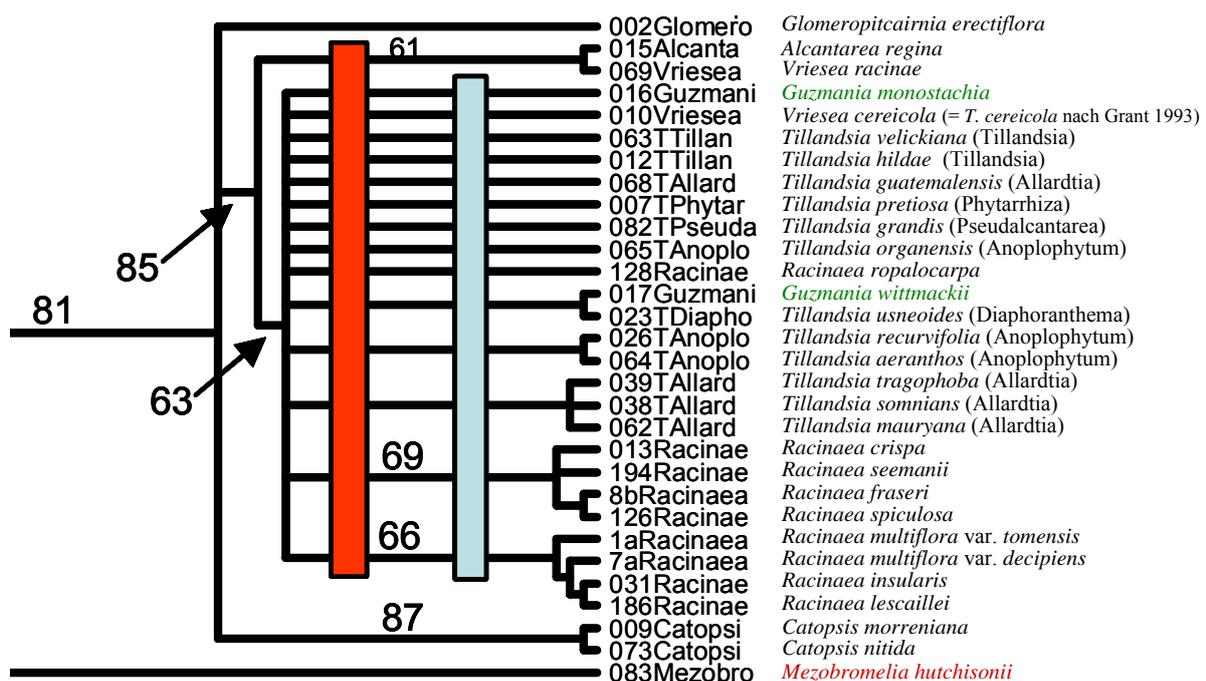


Abb.42: Ausschnitt des Strict-Konsensus-Baumes der Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Introns (CD-Gesamtdatensatz, Abb.19) mit den systematischen Beziehungen der untersuchten Tillandsioideae. Einbezogen waren 30 Akzessionen / 29 Arten aus 8 Gattungen. Von *Tillandsia* sind in dieser Analyse Akzessionen aller 6 Untergattungen (SMITH & TILL 1998) vertreten. Die Zahlen oberhalb der Äste (oder mit Pfeilen zugeordnet) kennzeichnen Bootstrap-Werte >50%. Zwei informative InDels (8 und 10; vgl. Tab. 6) sind kartiert.

Die Tillandsioideae sind in allen neueren Studien monophyletisch, so auch in der Analyse des *trnL*-Introns (HORRES et al. 2000, Anlage VII) - vor der Einbeziehung von einer Akzession der Gattung *Mezobromelia* (*M. hutchisonii*, 083). In der Analyse des *trnL*-Introns und auch der kombinierten Analyse mit dem *trnL-trnF* Intergenischen Spacer befindet sich *M. hutchisonii* immer außerhalb der übrigen Tillandsioideae, allerdings ohne gestützte Auflösung.

In der kombinierten Analyse von 6 chloroplastidären Sequenzbereichen (*trnL*-Intron, *trnL-trnF* Intergenischer Spacer, *atpB-rbcL* Intergenischer Spacer, *rps16* Intron, Bereiche des 5' und 3' *trnK*) einer umfassenden Stichprobe der Tillandsioideae durch BARFUß, SAMUEL & TILL befindet sich *Mezobromelia* eindeutig auf dem Ast der Tillandsioideae (noch unveröffentlicht; mündliche Mitteilung von G. Zizka).

Die Tillandsioideae bilden drei Gruppen. *Catopsis* und *Glomeropitcairnia* stehen ohne Auflösung an der Basis und die dritte nur schwach gestützte Gruppe bildet eine Dichotomie: *Alcantarea regina* und *Vriesea racinae* bilden die Schwestergruppe zu allen übrigen Tillandsioideae, die nur eine geringe Auflösung zeigen.

Nach SCHILL et al. (1988) sind die Tillandsioideae narbenmorphologisch sehr heterogen und die Autoren halten eine monophyletische Entstehung von *Vriesea* und *Tillandsia* auf Grund ihrer Befunde für unwahrscheinlich.

Diese Annahme wird durch die molekulare Analyse bestätigt. Die Gattungen *Alcantarea*, *Vriesea*, *Tillandsia* und *Guzmania* stellen in ihrer jetzigen Fassung demnach keine natürlichen Gruppen dar. GRANT (1993) hatte unter Ablehnung der Schüppchen am Grunde der Blütenblätter („Ligulae“; engl. „petal appendages“) als diakritisches Merkmal zur Abgrenzung der Gattungen *Tillandsia* und *Vriesea* 26 Arten von *Vriesea* zu *Tillandsia* gestellt, darunter auch die untersuchte *Vriesea cereicola* (Abb.42). *Vriesea cereicola* findet sich nach der molekularen Analyse auf einem Ast mit allen übrigen *Tillandsia*-Arten, *Guzmania* und *Racinaea* und weist im Gegenteil zu *Vriesea racinae* keine 15 bp Deletion (siehe InDel 8 [blau], Tab.6 und Anlage VI) auf.

Für eine Bestätigung dieser Fassung der Gattungen *Vriesea* und *Tillandsia* ist die Stichprobe und die Auflösung auch in den kombinierten Analysen nicht ausreichend.

Die Gattung *Racinaea* umfasst etwa 60 Arten, deren Verbreitungsgebiet von Mexiko über Guayana bis Südost-Brasilien reicht. Einige Arten finden sich auch auf den Großen Antillen.

Verbreitungsschwerpunkt dieser überwiegend epiphytisch lebenden Arten sind die andinen Berg- und Nebelwälder von Ecuador und Peru. Die Vorkommen liegen meist zwischen 400 und 3200 m ü.d.M.

1889 stellte ANDRÉ die Sektion *Pseudo-Catopsis* innerhalb der Gattung *Tillandsia* auf. BAKER wies dem Taxon im selben Jahr den Rang einer Untergattung (*Tillandsia* subgenus *Pseudo-Catopsis*) zu. Nach BAKER sind die ledrigen, zugespitzten, +/- dicht beschuppten, rosettig angeordneten Blätter und die kleinen, distich in Ähren angeordneten Blüten und Kapseln, welche 3-4 mal länger sind als die Sepalen, die Unterscheidungsmerkmale zu den anderen Untergattungen von *Tillandsia*.

Auch MEZ akzeptierte 1896 bei seiner Bearbeitung der Bromeliaceae für DECANDOLLE's „*Monographiae Phanerogamarum*“ das Subgenus *Pseudo-Catopsis*, stufte aber andere Merkmale als taxonomisch relevant ein. Daher ordnete er einige Arten anderen Untergattungen von *Tillandsia* zu.

MEZ definierte Stamina, die kürzer als die Petalen sind, und asymmetrische Sepalen als die taxonomisch relevanten Merkmale der Untergattung *Pseudo-Catopsis*.

Die Monographie von SMITH & DOWNS (1977) stützt sich im Wesentlichen auf die MEZ'sche Bearbeitung. Als weiteres Merkmal der Untergattung *Pseudo-Catopsis* werden „Sepalen, die zur Spitze hin am breitesten sind“ eingeführt.

SPENCER & SMITH trennten 1993 *Pseudo-Catopsis* als neue Gattung *Racinaea* von *Tillandsia* ab.

Diese Vorgehensweise war aber aus mehreren Gründen umstritten:

1. Es wurden keine neuen Merkmale zur Charakterisierung und Unterscheidung der Gattungen benannt.
2. Die Autoren führten keine vollständige Umbenennung der relevanten Arten durch.
3. Es wurde kein Konzept zur infragenerischen Gliederung von *Racinaea* vorgelegt.

Eine Teilbearbeitung der Gattung (3 Arten der *R. adpressa*-Gruppe) findet sich bei GRANT (1994).

GROß (1988) fand bei *Racinaea* drei Samentypen, BROWN & GILMARTIN (1989) wiesen 2 Stigma-Typen innerhalb der Gattung nach (engl. „simple-erect“ und „conduplicate-spiral“) - bei immerhin 15 untersuchten Arten und Varietäten.

Auf der Basis des *trnL*-Introns bilden *Racinaea crispa*, *R. seemannii*, *R. fraseri*, *R. spiculosa* und *R. multiflora*, *R. insularis*, *R. lescaillei* zwei moderat gestützte Gruppen (Bootstrapwert 69% bzw 66%). *R. ropalocarpa* (128) ist ohne Auflösung.

Dies weist darauf hin, dass *Racinaea* entweder ebenfalls keine natürliche Gruppe darstellt, oder aber hinsichtlich der genetischen und morphologischen Variabilität sehr plastisch ist. Mehr Aufschluss wird erst eine Analyse geben, die deutlich mehr Marker und informative Synapomorphien einbezieht.

Die Phylogenie der Bromelioideae und ihre Gattungsabgrenzung ist bisher am wenigsten verstanden. Mit der Frage der Evolution und dem Ursprung der Bromelioideae beschäftigte sich SMITH schon 1934. Er vermutete den Ursprung der Unterfamilie im Amazonasbecken.

Nach LEME (2000) und BENZING (2000) befindet sich das Diversitätszentrum der Bromelioideae mit vielen Endemiten in den atlantischen Regenwäldern und angrenzenden Habitaten.

Die Abbildung 43 zeigt den für die Bromelioideae wichtigen Ausschnitt der kombinierten Analyse von CD- und EF-Fragment ohne die kodierten Indels und die Alignmentpositionen 531-534 (Abb.26).

Diese Analyse verdeutlicht die geringe Auflösung der Gattungsbeziehungen zu den möglichen Schwestergruppen *Fosterella* und *Puya* und den Bromelioideae-Gattungen in ihrer jetzigen Fassung. Interessant ist die Stellung von *A. pitcairnioides* und *Acanthostachys strobilacea*.

In allen paarweisen Vergleichen haben sie die größte Sequenzdivergenz, was sich gut mit der Sonderstellung der Gattung aufgrund des abweichenden Habitus innerhalb der Bromelioideae deckt. Beide Arten weisen stark abgeleitete Merkmale des Frucht- und Samenbaus auf. Der Fruchtstand beider Arten ist ein beerenartiges, zapfenförmiges Synkarpium - gelblich gefärbt und essbar bei *A. strobilacea*, weiß, beerenartig und mit wenigen in Schleim gehüllten Samen bei *A. pitcairnioides*. Nach RAUH & BARTHLOTT (1982) sind die fadenförmigen Anhängsel am chalazalen Ende der Samenanlagen funktionell als Anpassung an Epi-Ornithochorie zu deuten, eine für Epiphyten charakteristische Verbreitungsstrategie.

Als extreme Form der Anpassung an den vorwiegend epiphytischen Lebensraum ist auch die spezielle Blattanatomie zu nennen. Bei *Acanthostachys* ist ein innerhalb der Bromeliaceae einmaliger Mechanismus zur Wasseraufnahme über sukkulente Rollblätter zu finden. Die Wasseraufnahme erfolgt direkt über cuticulare Absorption (ohne die typischen wasserabsorbierenden Saugschuppen) in ein adaxial gut ausgebildetes Wasserspeichergewebe (RAUH & BARTHLOTT 1982, HORRES & ZIZKA 1995). *Acanthostachys pitcairnioides* weist innerhalb der Bromelioideae mit durchschnittlich 5,8 mm die längsten Anhängsel der Samenanlagen auf (R. Duque-Thüs, persönliche Mitteilung).

Die stark abgeleitete Position von *Acanthostachys pitcairnioides* spiegelt sich auch in den Topologien wider: in allen Analysen des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF*-Intergenischen Spacers finden sich die beiden Arten innerhalb der Bromelioideae an verschiedenen Stellen der Baumschemata wieder.

Acanthostachys pitcairnioides findet sich auf einem Ast mit *Fosterella* (ohne Bootstrapunterstützung), während *A. strobilacea* (019) ohne Auflösung ist (Abb.43).

Bei der in Abb.44 gezeigten Analyse (Ausschnitt der Abb.27) wurde *Acanthostachys pitcairnioides* ausgeschlossen, um Homoplasien zu verringern. Die Polarisierung der Daten mit den Tillandsioideae als Außengruppe bringen eine deutlich bessere Auflösung.

Im 60% Majority-Rule Konsensus Baum bilden *Bromelia*, *Deinacanthon*, *Greigia*, *Fascicularia*-*Ochagavia-Fernseea* und eine wenig aufgelöste Kerngruppe der übrigen Bromelioideae eine basale Polytomie.

Von der karyologisch sehr heterogenen Gattung *Bromelia* wurde nur *Bromelia serra* analysiert. Daher

lassen sich zur Monophylie dieser Gattung innerhalb der Bromelioideae keine Aussagen machen. Auch in der *ndhF*-Studie von TERRY et al. (1997) nimmt die einzige untersuchte *Bromelia*-Art eine basale Stellung ein.

Die zwei Akzessionen von *Deinacanthon urbanianum*, der einzigen Art der Gattung, bilden einen mit 65% Wiederfindungswahrscheinlichkeit mäßig gestützten Ast. Diese sukkulente, in Paraguay, NW-Argentinien und Brasilien in trockenen, offenen Wäldern und auf steinigem Bergrücken verbreitete Art zeichnet sich durch eine besondere Blattanatomie aus (HORRES & ZIZKA 1995). *Deinacanthon* könnte demnach eine eigene Abstammungslinie innerhalb der Bromelioideae sein.

Die Gattung *Greigia*, die durch das Vorkommen seitenständiger Infloreszenzen charakterisiert ist, bildet einen weiteren gut gestützten Ast.

Zusammen mit *Fascicularia bicolor* und *Ochagavia* finden sich 4 Arten der Gattung *Greigia* innerhalb der südlichen Verbreitungsgrenze der Bromeliaceae. *Greigia* weist dabei eine auffällige disjunkte Verbreitung auf: die 4 chilenischen Arten (*G. berteroi*, *G. landbeckii*, *G. pearcei* und *G. sphacelata*) bilden eine separate Gruppe - über 2000 km vom Rest der Gattung entfernt (WILL & ZIZKA 1999). Die in Südchile endemische *Greigia sphacelata* ist die Schwestergruppe des Astes mit den beiden andinen, aus Kolumbien stammenden *G. mulfordii* und *G. spec. nov.*

Die Charakterisierung von *Greigia* als eigenständige Gruppe auf der Basis der molekularen Daten deckt sich mit den Befunden zur Morphologie und Ökologie (B. Will, pers. Mitteilung).

Weitere Sequenzdaten und AFLP-Studien mit Vertretern dieser biogeographisch interessanten Gattung wären wünschenswert, erfordern aber gezielte Sammelreisen, da diese Pflanzen sehr selten in Kultur zu finden sind.

Fascicularia-Ochagavia-Fernseea bilden ebenfalls eine basale Gruppe - ohne Bootstrapunterstützung für die auf der Robison Crusoe-Insel endemische *O. elegans* und *Fernseea itatiaia*, ein Endemit vom Berg Itatiaia (Provinz Rio de Janeiro, Brasilien).

Fascicularia, *Ochagavia* und *Orthophytum* haben nach BENZING (2000: 98) relativ trockene Früchte, was als ursprüngliches Merkmal interpretiert werden könnte.

Die Kerngruppe der übrigen Bromelioideae weist nur wenige gestützte Gruppen auf.

Die durch ihren Fruchtstand, ein Synkarpium, morphologisch sehr gut charakterisierte Gattung *Ananas* ist mit 90% Wiederfindungswahrscheinlichkeit als eigenständige Linie gut gestützt.

Die Auflösung für die Gattung *Aechmea* ist deutlich schwächer. Statistisch gestützt sind hier nur die beiden untersuchten Akzessionen von *Aechmea mertensii* und die beiden Varietäten von *Aechmea*

distichantha (85% Bootstapunterstützung, Abb.44)

Bemerkenswert ist, dass fast alle Vertreter der Untergattung *Ortgiesia* auf einem Ast mit *Aechmea racinae* (Untergattung *Lamprococcus*) gruppieren. Nur *Aechmea recurvata* befindet sich außerhalb dieser Gruppe ohne Auflösung. *Aechmea recurvata* ist der einzige weiter verbreitete Vertreter der Untergattung *Ortgiesia*, die ansonsten auf ein begrenztes Gebiet in Südost-Brasilien beschränkt ist. (Vergleiche Anlage I und Abb. 44).

Die Zusammengehörigkeit der *Ortgiesia*-Gruppe und *Aechmea racinae* wird auch durch AFLP-Daten gestützt (HORRES, SCHULTE, WEISING & ZIZKA: Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - molecular, anatomical and morphological studies.- eingereicht bei ALISO, 08/2003).

Aechmea recurvata gehört zu den schon länger in Kultur befindlichen Vertretern der Gattung von der viele Varietäten und Hybride existieren. Dies könnte eine Erklärung für die Gruppierung außerhalb der übrigen untersuchten Vertreter von *Ortgiesia* sein.

Die durchgeführten AFLP-Studien (HORRES, SCHULTE, WEISING & ZIZKA, s.o.) stützen auch die Ergebnisse der Untersuchung von Alloenzymen der Gattungen *Ursulaea* und der *Aechmea*-Untergattung *Podaechmea* durch IZQUIERDO & PIÑERO (1998), die die Erhebung von *Ursulaea* auf Gattungsrang durch READ & BAENSCH (1994) ablehnen. *Ursulaea* und die untersuchten Vertreter der *Aechmea*-Untergattung *Podaechmea* befinden sich in der Sequenzanalyse auf einem (statistisch nicht gestützten) Ast mit *Androlepis skinneri* und *Hohenbergiopsis guatemalensis*, so dass hierzu keine gesicherte Aussage möglich ist.

In der Abbildung 44 ist die Verbreitung der *Aechmea*-Untergattungen neben einige Äste kartiert. Die Auflösung in der kombinierten Sequenzanalyse weist zwar auf einen Zusammenhang zwischen Verbreitung und der jetzigen Fassung in Untergattungen hin, doch dies trifft immer nur für einzelne Artengruppen zu - ohne ausreichend gestützte Auflösung. Die Einbeziehung blattanatomischer Merkmale und AFLPs scheint hier eine bessere Auflösung zu bringen (HORRES, SCHULTE, WEISING & ZIZKA, s.o.).

Die Analysen der Sequenzdaten zeigen deutlich, dass *Aechmea* in der jetzigen Fassung keine natürliche Gruppe ist und eine Revision dieser großen Gruppe erforderlich ist.

Die Studie von GELLI DE FARIA et al. (2003; Poster-Abstract), die 60 morphologische Merkmale an 52 Arten von *Aechmea* untersuchen, gibt weitere Informationen. Einbezogen sind in dieser Studie 6 der 7 Untergattungen sensu SMITH & TILL (1998), insgesamt 88 Bromelioideae-Arten aus 12 Gattungen. Auf der Basis des Strict Konsensus-Baumes der Parsimonie-Analysen dieser Daten (*Cryptanthus* als Außengruppe; vorläufige Ergebnisse) ergibt sich, dass vermutlich nur vier Gattungen monophyletisch sind: *Acanthostachys*, *Billbergia*, *Chevaliera* und *Portea*. Von den untersuchten *Aechmea*-Untergattungen scheint nur *Macrochordion* potentiell monophyletisch zu sein. Dieser morphologischen

Studie zufolge sind *Aechmea*, *Hohenbergia*, *Streptocalyx*, *Quesnelia* und *Ronnbergia* entweder para- oder polyphyletisch. Die Autoren unterstützen ebenfalls nicht die gegenwärtige Umgrenzung von *Aechmea* s.l.

Der Monophylie von *Portea* widersprechen die hier analysierten Daten: *Portea leptantha* befindet sich nicht auf einem Ast mit *Portea petropolitana* (053). Dies deckt sich mit Befunden von BÖHME (1988) auf der Basis ihrer Untersuchungen an Septalnektarien. Sie stellt auf der Basis ihrer Daten den Gattungsrang von *Portea* in Frage.

Sollte BROWN & GILMARTINS (1989a) „Hypothese 2“, dass die mit n=17 oder n=18 niedrige Chromosomenzahl einen altertümlichen tetraploiden Status von *Cryptanthus* widerspiegelt, zutreffen, plädiert RAMÍREZ (2000) dafür, die Gattung zur Unterfamilie Cryptanthoideae zu erheben. Er vermutet aber auf der Basis seiner (bisher unveröffentlichten) kladistischen Analysen morphologischer Merkmale und den *ndhF*-Daten von TERRY et al. (1997a) eine enge Beziehung von *Cryptanthus* und *Orthophytum* innerhalb der Bromelioideae. Wie in Kapitel 4.3 weiter ausgeführt wird, legen die cytogenetischen Daten dieser Studie und weitere Studien neueren Datums nahe, dass *Cryptanthus* als innerhalb der Bromelioideae abgeleitet anzusehen ist.

Die Daten dieser Studie stützen die Annahme einer engeren verwandtschaftlichen Beziehung von *Cryptanthus* und *Orthophytum* nicht. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Stichprobe mit 2 Arten von *Cryptanthus* und nur einer Art von *Orthophytum* (*O. supthutii*) gering ist.

Pseudananas teilt interessanterweise viele Synapomorphien mit *Puya*, u.a. eine 5 bp Deletion (InDel 6, Tab.6), weshalb sich diese monotypische Gattung der Bromelioideae auf einem Ast mit den untersuchten Vertretern der Gattung *Puya* befindet. Dies widerspricht allen morphologischen Befunden, die diese monotypische Gattung eindeutig in die Bromelioideae stellt (LEAL et al. 1998). Inwieweit hier Homoplasie oder angestammte Polymorphismen eine Rolle spielen, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

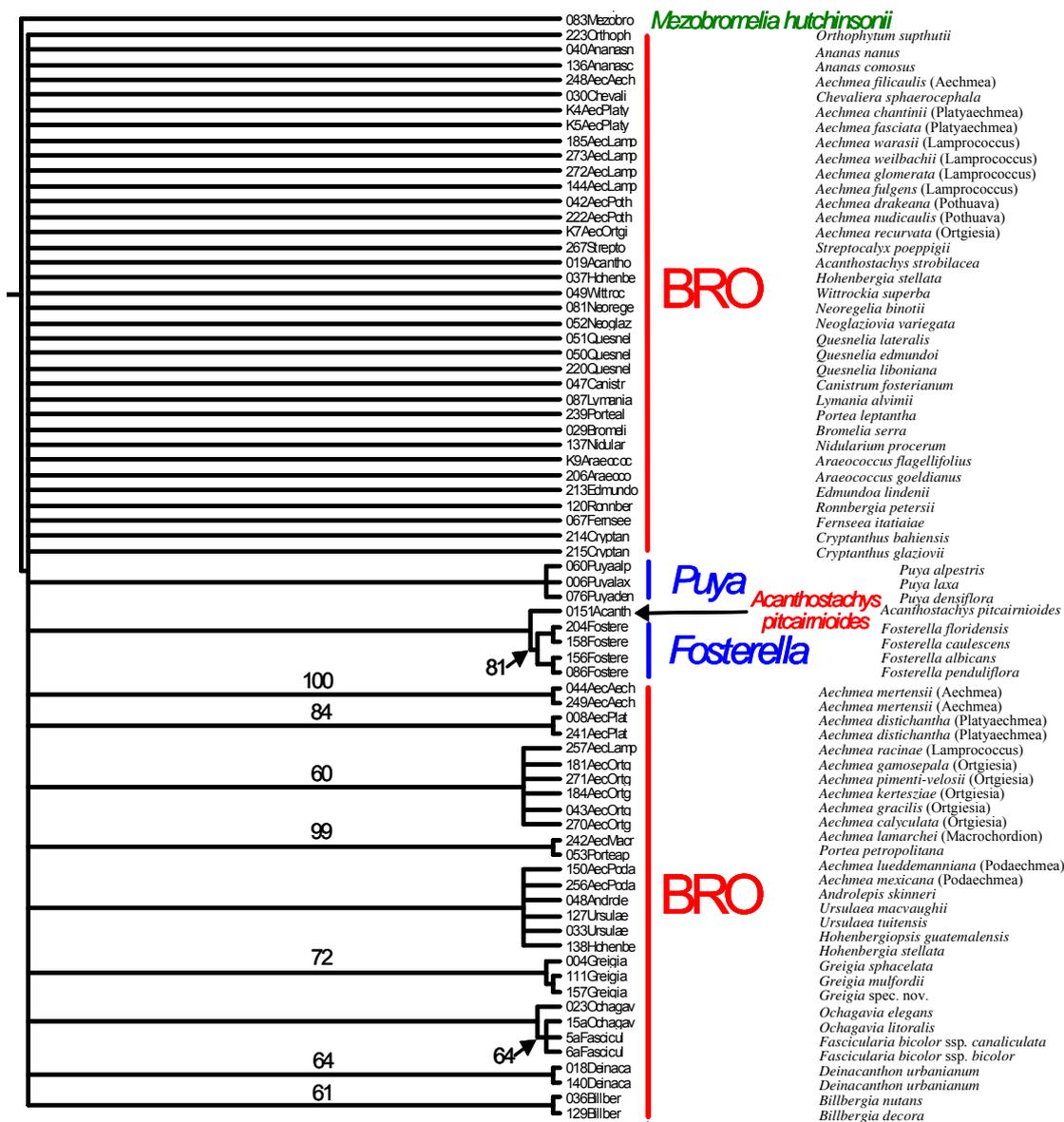


Abb.43: Ausschnitt der kombinierten Analyse des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers mit den systematischen Beziehungen der untersuchten Bromelioideae, *Fosterella* und *Puya*: 60% MR-Konsensus-Baumes der Maximum-Parsimonie-Analyse (Abb.26). Die Zahlen oberhalb der Äste (oder mit Pfeilen zugeordnet) kennzeichnen Bootstrap-Werte >50%.

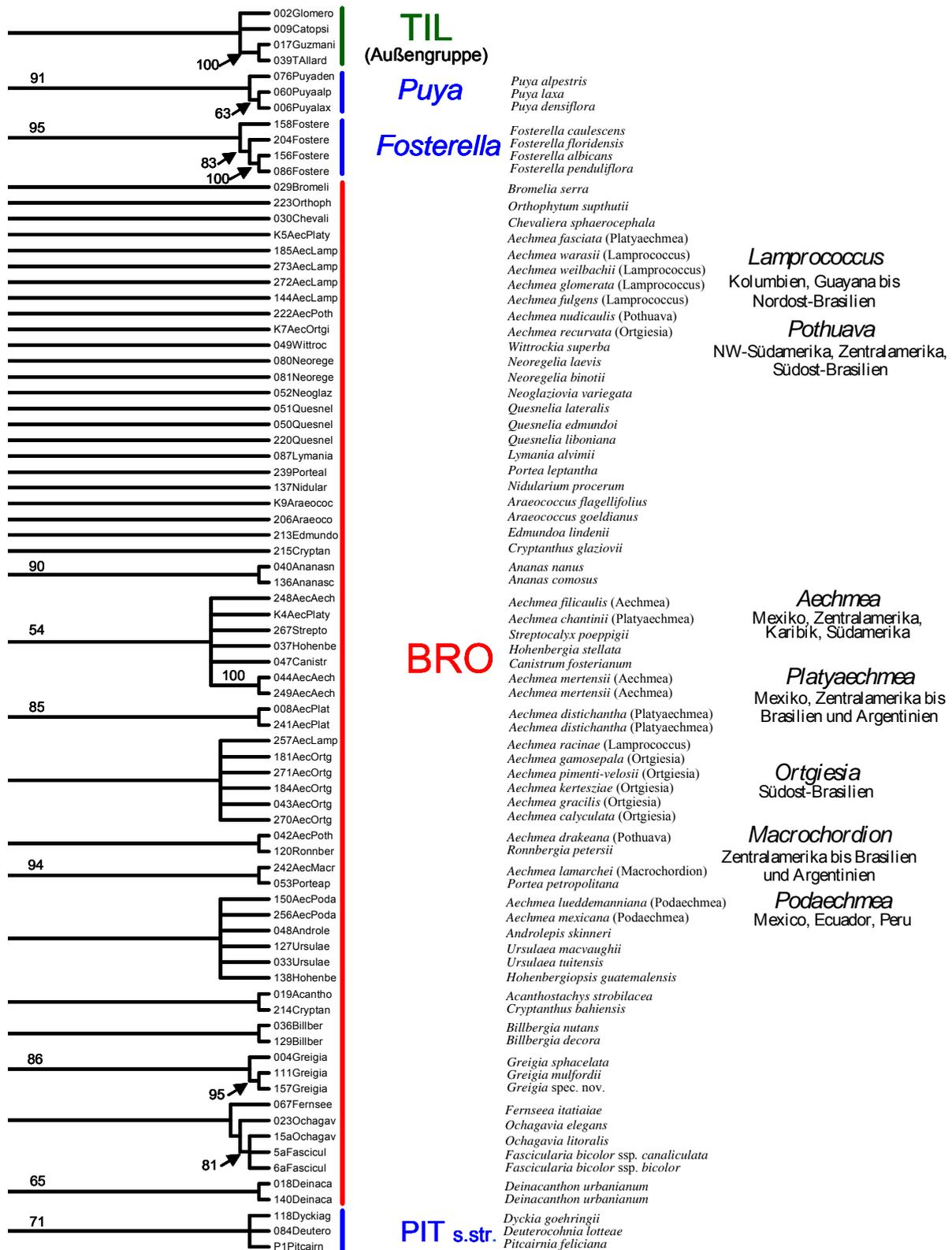


Abb.44: Ausschnitt der Abb.27. Maximum-Parsimonie-Analyse des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers (CD & EF) mit Fokus auf die Beziehungen der Bromelioideae zu den Pitcairnioideae-Gattungen *Fosterella* und *Puya* und Arten der Tillandsioideae (*Glomeropitcairnia erectiflora*, *Catopsis morreniana*, *Guzmania wittmackii*, *Tillandsia tragophoba*) als Außengruppe. 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum berechnet aus 4709 kürzesten Bäumen (MPT) mit einer Länge von 292 Schritten, CI = 0,750, HI = 0,250, RC = 0,583. Die Zahlen oberhalb der Äste oder mit Pfeilen zugeordnet kennzeichnen Bootstrap-Werte >50% (1000 Bootstrap-Wiederholungen).

Die schematische Darstellung der Abb.45 zeigt vereinfacht das allgemein anerkannte systematische Konzept zur Gliederung der Bromeliaceae vor der Einbeziehung molekularer Daten.

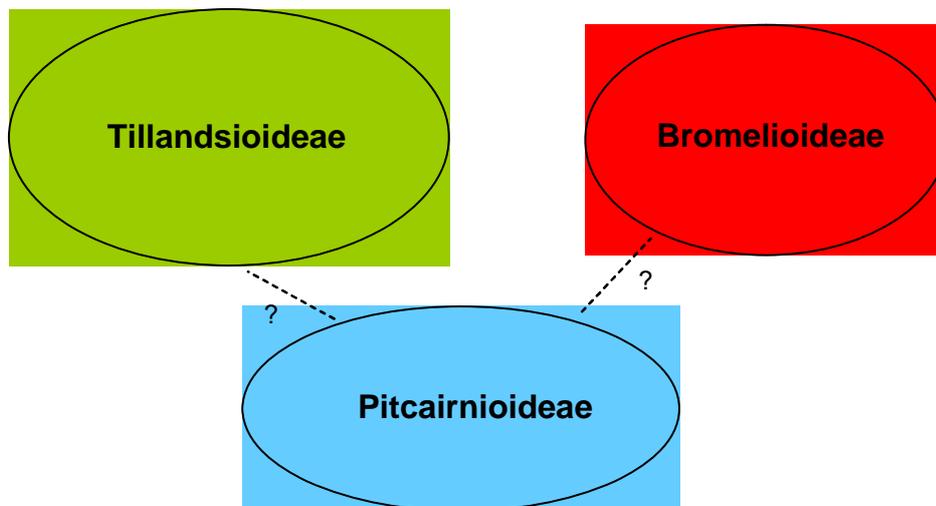


Abb.45: Das Systematische Konzept der Bromeliaceae vor der Einbeziehung molekularer Daten. Basierend auf den Arbeiten von HARMS (1930), MEZ (1934) und SMITH & DOWNS (1974, 1977, 1979) werden im Wesentlichen auf der Basis von Blüten-, Frucht- Pollen- und Samenmerkmalen die drei Unterfamilien Bromelioideae, Tillandsioideae und Pitcairnioideae unterschieden.

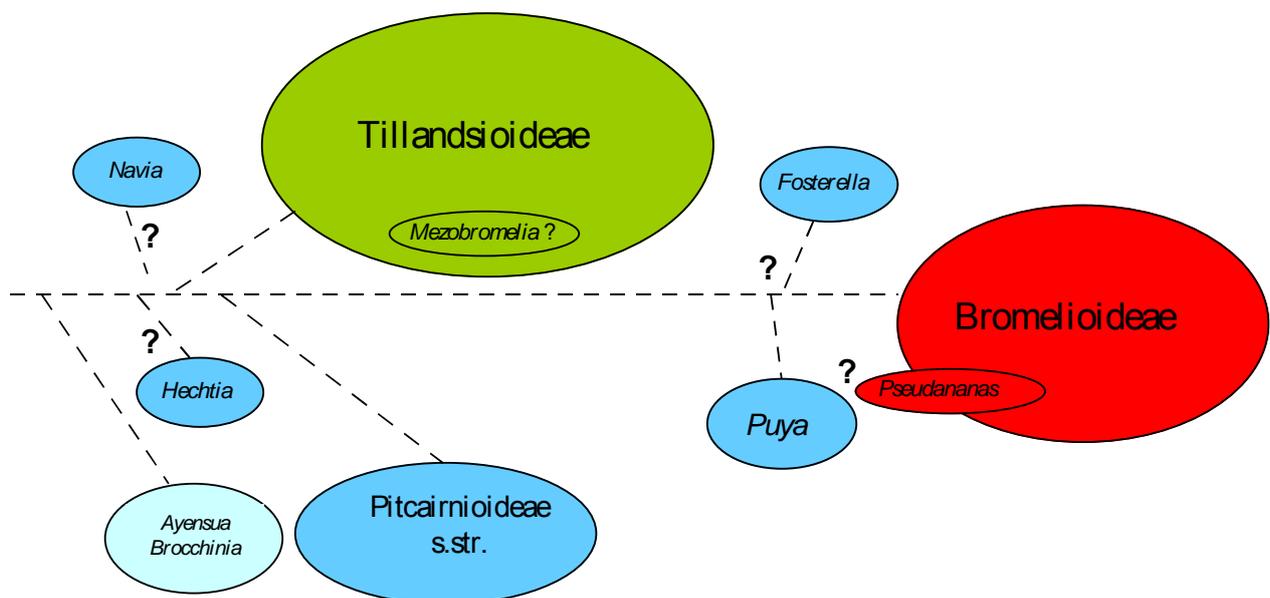


Abb.46: Übersicht zum systematischen Konzept der Bromeliaceae unter Berücksichtigung der in dieser Studie analysierten molekularen Daten in einer schematischen Übersicht. Die Pitcairnioideae sind eindeutig polyphyletisch - mit *Ayensua* und *Brocchinia* an der Basis der Familie. Die Positionen von *Hechtia* und *Navia* sind statistisch schwach gestützt. Die Sequenzdaten ergeben daher auch keine Auflösung bezüglich ihrer Beziehungen zu den anderen Gruppen. Die Zugehörigkeit von *Mezobromelia* zu den Tillandsioideae ist nach Analyse des AB-, CD- und EF-Fragmentes nicht gegeben - wegen der geringen Auflösung der analysierten Sequenzdaten sind aber Aussagen dazu unsicher. Eine mögliche verwandtschaftliche Beziehung der Gattung *Pseudananas* (Bromelioideae) und *Puya* bedarf einer breiteren Stichprobe und der Analyse weiterer Marker.

Die Abbildung 46 fasst das mögliche systematische Konzept der Bromeliaceae auf der Basis der in dieser Untersuchung analysierten Sequenzen des *trnT-trnL* Inter-genischen Spacers, des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Inter-genischen Spacers (AB-, CD- und EF-Fragment) zusammen.

Die Pitcairnioideae sind eindeutig polyphyletisch. *Ayensua* und *Brocchinia* sind nah verwandt und nehmen innerhalb der Familie eine basale Position ein. *Hechtia* und *Navia* stellen demnach ebenfalls eigene Gruppen dar, aber ihre Beziehungen zu den übrigen Gruppen der Bromeliaceae ist ohne ausreichende Auflösung und statistisch schwach gestützt.

Die Pitcairnioideae s.str. (*Deuterocohnia*, *Dyckia*, *Pepinia*, *Pitcairnia*) stellen eine weitere Gruppe mit nur geringer Auflösung der Gattungsbeziehungen.

Die Tillandsioideae sind monophyletisch, nur die Stellung von *Mezobromelia* kann mit den hier untersuchten Sequenzbereichen nicht aufgelöst werden. Sie nehmen in allen Analysen eine basale Position zu den Bromelioideae, *Fosterella*, *Puya* und den Pitcairnioideae s.str. ein. An der Basis der Tillandsioideae stehen *Catopsis* und *Glomeropitcairnia*, die Beziehung der übrigen Gattungen ist ansonsten wenig gestützt.

Die Bromelioideae zeigen wegen geringer Sequenzdivergenz ebenfalls nur wenig Auflösung.

Bei Polarisierung der Daten mit den Tillandsioideae als Außengruppe bilden *Bromelia*, *Deinacanthon*, *Greigia*, *Fascicularia-Ochagavia-Fernseea* und eine wenig aufgelöste Kerngruppe der übrigen Bromelioideae eine basale Polytomie.

Fosterella und *Puya* sind gut gestützte Gruppen und mögliche Schwestergruppen der Bromelioideae.

Eine verwandtschaftliche Beziehung von *Puya* und *Pseudananas* ist wegen morphologischer Befunde wenig wahrscheinlich und müsste mit weiteren Daten überprüft werden.

Insgesamt haben die molekularen Untersuchungen zwar einiges zur Auflösung der phylogenetischen Beziehungen der Bromeliaceae beigetragen, doch es bleiben viele Fragen offen, die eingehende weitere Untersuchungen erfordern.

4.5 Molekulare Merkmale in der Familie der Bromeliaceae - Perspektiven und Grenzen

In den letzten Jahren konnte durch die Einbeziehung molekularer Merkmale viel zum Verständnis der Phylogenie der Liliopsida ("Monocots") beigetragen werden. Eine Einbeziehung von weiteren molekularen Markern und auch die Weiterentwicklung der Analysemethoden wird hier in Zukunft die Datenbasis noch erweitern.

Die auf der mittlerweile 3. internationalen Konferenz zur vergleichenden Biologie der Monokotylen vorgestellten Arbeiten (zuletzt organisiert vom "Rancho Santa Ana Botanic Garden", 29.03. bis 04.04.2003 im Ontario Convention Center, California, Claremont, USA) dokumentieren diesen Fortschritt.

Die hier vorliegende Studie untersucht erstmals selten in Kultur befindliche oder schwer zugängliche Arten von Gattungen wie *Ayensua*, *Deinacanthon*, *Fascicularia*, *Fernseea*, *Greigia* und *Ochagavia* mit molekularen Markern. Obwohl diese Studie immerhin Arten aus 48 der 58 Gattungen untersucht (30/33 Gattungen der Bromelioideae, darunter Vertreter aller Untergattungen der artenreichsten Gattung *Aechmea*, 10/16 Gattungen der Pitcairnioideae, und 8/9 Gattungen der Tillandsioideae, darunter Vertreter aller Untergattungen der artenreichsten Gattung *Tillandsia*; siehe auch Tab.1), ist die gezeigte Auflösung für viele Gruppen noch unbefriedigend. Für das Verständnis der Systematik und Phylogenie der Bromeliaceae wäre eine noch umfassendere Stichprobe möglichst aller Gattungen notwendig.

Neben der Erfassung weiterer molekularer Marker des Chloroplastengenoms ist die Etablierung eines Kernmarkers - als Ersatz für ITS, dessen vergleichende Sequenzierung bei Bromeliaceae bisher noch keiner Arbeitsgruppe gelungen ist - ein vorrangiges Ziel.

In meiner Studie konnte gezeigt werden, dass AFLPs für nah verwandte Gattungen eine gute Auflösung bringen können. Gegenwärtig werden im AK Zizka neben klassischen Revisionen (z.B. der Gattung *Greigia* durch B. Will) blattanatomische Studien der Bromelioideae durchgeführt (K. Schulte). Diese werden ergänzt durch AFLP-Studien mit Schwerpunkt auf der Gattung *Aechmea* und der vergleichenden Sequenzierung von *matK*, mit Fokus auf die Bromelioideae (HORRES, SCHULTE, WEISING & ZIZKA: Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - molecular, anatomical and morphological studies.- eingereicht bei ALISO, 08/2003).

DEPRES et al. (2003) setzten erfolgreich AFLPs ein, um die phylogenetischen Beziehungen von *Trollius*-Arten (Ranunculaceae) zu untersuchen. Sequenzdaten (ITS, *trnL* Intron und *trnL-trnF* Intergenischer Spacer) brachten keine ausreichende Auflösung in dieser Gruppe. Trotz der Anfälligkeit für Homoplasie sehen die Autoren AFLPs als geeignete Marker an. In Kombination mit morphologischen Markern könnten nach Meinung der Autoren AFLPs bei Pflanzen durchaus die Rolle übernehmen, die mitochondriale Marker in der Zoologie auf niedrigerer taxonomischer Ebene haben. Problematischer ist ihrer Auffassung nach eher, dass bei abgeleiteten Gruppen angestammte

Polymorphismen beibehalten werden, die die Anzahl der diakritischen Merkmale zwischen Gruppen reduzieren können.

In ihrer Studie trennten nur 23,9% der polymorphen Fragmente Gruppen, die übrigen stellten Polymorphismen innerhalb der Gruppen dar. Die klaren Vorteile von AFLPs sehen die Autoren in der Verfügbarkeit von Daten über die Variabilität des gesamten Genoms und der großen Anzahl von Merkmalen.

Das von LEME (1997, 1998, 2000) im Rahmen seines „Projeto *Nidularium*“ entwickelte Verfahren einer Kombination von detailliert dokumentierten Beobachtungen lebender Pflanzen und die Erhebung diakritischer morphologischer und anatomischer Merkmale unter Einsatz neuer Methoden zur Konservierung von Gewebeproben (frisch und/oder in geeigneten flüssigen Medien konserviert) stellt einen guten Standard für eine umfassende Bearbeitung der Bromelioideae und der Bromeliaceae insgesamt dar. Nach BENZING & LEME (2000) können von den 71 morphologischen Merkmalen, die sie zur Analyse des „Nidularioid-Komplex“ einsetzten, nur 33 (= 46,5%) auch an gut angelegten Herbarbelegen in traditioneller Weise erhoben werden. Von den übrigen 38 Merkmalen erforderten 23 entweder o.g. geeignete Konservierung in flüssigen Medien oder eine umfassende Aufarbeitung und Dokumentation an der lebenden Pflanze vor der Herbarisierung im Feld. 15 weitere Merkmale erfordern detaillierte und gut dokumentierte Feldbeobachtungen an den Lebendpflanzen. Die Probleme mit der Kodierung der Merkmale und nicht erkannter Homoplasien sind hier allerdings wie in jeder kladistischen Analyse gegeben.

Wie diese Untersuchung in Ansätzen zeigen konnte, kann die weitergehende Untersuchung cytogenetischer Merkmale informative Merkmale liefern. Eine bessere Kenntnis der karyologischen Evolutionstendenzen innerhalb der Bromeliaceae kann zum Verständnis ihrer Systematik und Phylogenie beitragen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Systematik und phylogenetischen Beziehungen der Familie der Bromeliaceae auf der Basis chloroplastidärer DNA-Sequenzdaten des *trnT-trnL*-Intergenischen Spacers (33 untersuchte Arten aus 28 Gattungen), des *trnL*-Introns (129 untersuchte Arten aus 48 Gattungen) und des *trnL-trnF*-Intergenischen Spacers (120 Arten aus 48 Gattungen). Untersucht wurden Vertreter aller Untergattungen der artenreichsten Gattungen *Aechmea* (Bromelioideae) und *Tillandsia* (Tillandsioideae). Nach DNA-Isolation und -Aufreinigung wurden die jeweiligen Sequenzbereiche mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und direkt sequenziert. Informative Insertionen und Deletionen des *trnL*-Introns und des *trnT-trnL* Intergenischen Spacers wurden kodiert und ebenfalls analysiert. Mit den editierten Alignments der drei Sequenzdatensätze wurden Analysen zu den Verwandtschaftsverhältnissen durchgeführt. Alle drei untersuchten Marker lieferten phylogenetisch informative Signale.

Der *trnT-trnL*-Intergenische Spacer erwies sich als sehr variabel bezüglich der Größe des Amplikons (550 bis 1050 bp Länge). Er weist bei Bromeliaceae lange Poly-A- und Poly-T-Bereiche auf, die zu unvollständigen Sequenzen führten, so dass ein sicheres und eindeutiges Alignment für große Sequenzbereiche nicht möglich war. Daher konnte nur ein Teil des Alignments einer sinnvollen Analyse in Kombination mit den beiden anderen Markern unterzogen werden.

Das *trnL*-Intron ist bei Bromeliaceae stark längenkonserviert. Die Amplifikate hatten durchschnittlich 700 bp Länge und die ermittelten Sequenzen ergaben ein eindeutiges Alignment mit dem höchsten Informationsgehalt von allen drei untersuchten Sequenzbereichen.

Der *trnL-trnF*-Intergenische Spacer ist bei Bromeliaceae durchschnittlich 480 bp lang, und nur bei einigen Bromelioideae finden sich Insertionen/Deletionen von bis zu 255 bp.

Die Pitcairnioideae sind eindeutig polyphyletisch. *Ayensua* und *Brocchinia* sind nah verwandt und nehmen innerhalb der Familie eine basale Position ein. *Hechtia* und *Navia* stellen jeweils eigene Gruppen dar, aber ohne ausreichende Auflösung ihrer Beziehungen zu den übrigen Bromeliaceae.

Fosterella und *Puya* sind gut gestützte Gruppen mit möglicher Schwesterguppenbeziehung zu den Bromelioideae. Die Gattungen *Pitcairnia/Pepinia* und *Deuterocohnia/Dyckia* bilden als Pitcairnioideae s.str. einen gut gestützten Ast.

Die Tillandsioideae sind monophyletisch, nur die einzige untersuchte Akzession der Gattung *Mezobromelia* liegt außerhalb dieses statistisch gut gestützten Astes. Innerhalb der Tillandsioideae nehmen *Catopsis*, *Glomeropitcairnia erectiflora* und *Alcantarea regina/Vriesea racinae* basale Positionen ein. Die Gattungen *Guzmania*, *Racinaea*, *Tillandsia* und *Vriesea* sind keine natürlichen Gruppen, doch für eine neue Gliederung ist die Auflösung nicht ausreichend.

In allen molekularen Untersuchungen nehmen die Tillandsioideae zu den Bromelioideae eine basale Position ein.

Für die Bromelioideae liegt die Sequenzdivergenz bei 0,1 bis max. 2% mit entsprechend geringer Auflösung. Die beste Auflösung erreichte die kombinierte Analyse des *trnL*-Introns und des *trnL-trnF* Intergenischen Spacers bei Polarisierung der Daten mit den Tillandsioideae als Außengruppe. Die Gattungen *Bromelia*, *Deinacanthon*, *Greigia*, *Fascicularia-Ochagavia-Fernseea* und eine wenig aufgelöste Kerngruppe der übrigen Bromelioideae bilden eine basale Polytomie. Mit höheren Wiederfindungswahrscheinlichkeiten gestützt sind *Ananas*, *Greigia* und von der Gruppe *Fascicularia-Ochagavia-Fernseea* die Gattung *Fascicularia* und die kontinentale *Ochagavia litoralis*.

Die Gattungen *Fascicularia-Ochagavia-Greigia* (Bromelioideae, Gattungsgruppe 1) und *Abromeitiella-Deuterocohnia* (Pitcairnioideae, Gattungsgruppe 2) wurden mit Fragmentanalysen (AFLPs, RAPDs) untersucht. Die Analysen von RAPDs und AFLPs mit UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages) und NJ (Neighbor-Joining) stützen die Fassung der Gattung *Fascicularia* als eine Art (*Fascicularia bicolor*) mit zwei Unterarten (*F. bicolor* ssp. *bicolor* und *F. bicolor* ssp. *canaliculata*). *F. bicolor* ssp. *canaliculata* weist 28 Fragmente auf, die in keiner untersuchten Akzession von *F. bicolor* ssp. *bicolor* vorkommen, *F. bicolor* ssp. *bicolor* hat 13 Fragmente, die nur in den 5 untersuchten Akzessionen vorkommen und in den 4 untersuchten Akzessionen von *F. bicolor* ssp. *canaliculata* fehlen. *Fascicularia* und die vegetativ sehr ähnliche Gattung *Ochagavia* weisen in dieser Analyse eine geringe genetische Distanz auf, während die untersuchten Vertreter der Gattung *Greigia* deutlichere genetische Unterschiede aufweisen. Die AFLP-Analysen der Gattungsgruppe 2 stützen die Vereinigung der Gattungen *Abromeitiella* und *Deuterocohnia* in der älteren *Deuterocohnia*. Die untersuchten *Abromeitiella*-Arten weisen untereinander eine große genetische Ähnlichkeit auf und gruppieren in der UPGMA-Analyse auf einem Ast. Diese Topologie besitzt allerdings keine ausreichende Bootstrap-Unterstützung - weder in der UPGMA noch in der NJ-Analyse. Alle untersuchten Akzessionen dieser Artengruppe besitzen 11 gemeinsame charakteristische Banden, die Arten der Gattung *Abromeitiella* und *Deuterocohnia* für sich alleine genommen jedoch keine. Die größten genetischen Unterschiede bestehen zwischen der in Chile isoliert vorkommenden *Deuterocohnia chrysantha* und allen übrigen Arten der Gruppe.

Der Informationsgehalt der analysierten chloroplastidären Sequenzen erwies sich für eine Auflösung der phylogenetischen Beziehungen von offenbar schnell evolvierenden Gattungsgruppen der Bromelioideae und Tillandsioideae als unzureichend. Fragmentanalysen, besonders AFLPs, zeigten auf der taxonomischen Ebene nah verwandter Gattungen eine gute Auflösung. Die AFLP-Technik mit dem Vorteil, Merkmale des gesamten Genoms zu erfassen, hat sich als eine gute Alternative zu einem für Bromeliaceae noch nicht etablierten Marker des Kerngenoms erwiesen.

6 Literatur

- AGGARWAL, R.K., BRAR, D.S., NANDI, S., HUANG, N. & KHUSH, G.S. (1999): Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers.- *Theor. Appl. Genet.* 98: 1320-1328.
- AJBADE, S. R., WEEDEN, N. F. & CHITE, S. M. (2000): Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*.- *Euphytica* 111: 47-55.
- ANGIOLILLO, A., MENCUCINI, M. & BALDONI, L. (1999): Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphism.- *Theor. Appl. Genet.* 98: 411-421
- APG (1998): An ordinal classification for the families of flowering plants.- *Ann. Missouri Bot. Gard.* 85: 531-553.
- APG II (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.
- ARUMUGANATHAN, K. & EARLE, E.D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species.- *Plant Mol. Biol. Reporter* 9: 208-218.
- AYENSU, E.S. (1969): The Identity of *Vellozia uaipanensis*. Anatomical evidence.- *Mem. NY Bot. Gard.* 18(2): 291-298.
- BAKER, J. (1889): *Handbook of the Bromeliaceae*.-London.
- BALDWIN B.G., SANDERSON M.J., PORTER J.M., WOJCIECHOWSKI M.F., CAMPBELL CH. S. & DONOGHUE M.J. (1995): The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny.-*Ann. Missouri Bot. Gard.* 82(2): 247-277
- BEHNKE, H.D., TREUTLEIN, J., WINK, M., KRAMER, K., SCHNEIDER, C. & KAO, P.C. (2000): Systematics and evolution of Velloziaceae, with special reference to sieve-element plastids and *rbcL* sequence data.- *Bot. J. Linn. Soc.* 134: 93-129.
- BENNETT M.D. & LEITCH I.J. (1995): Nuclear DNA amounts in angiosperms.- *Annals of Botany* 76: 113-176.
- BENNETT M.D. & LEITCH I.J. (2003): Angiosperm DNA C-values database (release 4.0, Jan. 2003).- <http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>
- BENKO-ISEPPON, A.M. & MORAWETZ, W. (2000): Viburnales: Cytological features and a new circumscription.- *Taxon* 49: 5-16.
- BENTHAM, G. & HOOKER, J.D. (1883): *Genera Plantarum* 3(2).- Reeve & Co., Williams & Norgate, London.
- BENZING, D.H. (1980): *The biology of the bromeliads*.- Mad River Press, California.
- BENZING, D.H. (1990): *Vascular Epiphytes*. - Cambridge Univ. Press, New York.
- BENZING, D.H. (ed.) (2000): *Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation*.-With contributions by B. Bennett, G. Brown, M. Dimmitt, H. Luther, I. Ramirez, R. Terry and W. Till. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- BENZING, D.H., BROWN, G. & TERRY, K. (2000): History and evolution.- In BENZING, D.H. (ed.): *Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation*: 463-541.- Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- BILLINGS, F.H. (1904): A study in *Tillandsia usneoides*.- *Bot. Gaz.* 38, 8: 99-121.
- BOLE, U.R., HILGER, H., and MARTIN, W.F. (1996): Island colonization and evolution of the insular woody habit in *Echium* L. (Boraginaceae).- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11740-11745.
- BÖHME, S. (1988): Bromelienstudien III. Vergleichende Untersuchungen zu Bau, Lage und systematischer Verwertbarkeit der Septalnektrien von Bromeliaceae.- *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 62: 1-154.
- BHOWMIK, G. (1977): Meiosis in two varieties of pineapple.- *Indian J. Genet. Pl. Breed.* 37: 1-4.
- BONEH, L., KUPERUS, P. & VAN TIENDEREN, P.H. (2003): Microsatellites in the bromeliads *Tillandsia fasciculata* and *Guzmania monostachya*.- *Mol.Ecol.Notes* 3 (2): 302-303.
- BROWN, G.K., LUTHER, H.E. & KRESS, W.J. (1989): Comments on the Responsibilities of Taxonomists.- *J. Brom. Soc.* 43(4): 154-156.
- BROWN, G.K. & GILMARTIN, A. (1984): Stigma structure and variation in Bromeliaceae - neglected taxonomic characters.- *Brittonia* 36(4): 364-374.
- BROWN, G.K. & GILMARTIN, A. (1986): Chromosomes of the Bromeliaceae. *Selbyana* 9: 89.
- BROWN, G.K. & GILMARTIN, A. (1989a): Stigma Types in Bromeliaceae: a Systematic Survey.- *Syst. Bot.* 14(1): 110-132.
- BROWN, G.K. & GILMARTIN, A.J. (1989b) Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Amer. J. Bot.* 76: 657-665.

- BROWN, G.K & LEME, E.M.C. (2000): Cladistic Analyses in the Nidularioid Complex.-In LEME, E.M.C.: Bromeliads of the Atlantic Forests: *Neoregelia*: 239-247.- Rio de Janeiro: Salamandra.
- BROWN, G.K. & TERRY, R.G. (1992): Petal appendages in Bromeliaceae.- Amer. J. Bot. 79: 1051-1071.
- BROWN, G.K., LUTHER, H.E. & KRESS, W.J. (1993): Comments on the Responsibilities of Taxonomists.- J. Brom. Soc. 43(4): 154-156.
- BROWN, G.K., PALACÍ, C.A. & LUTHER, H.E. (1997): Chromosome numbers in Bromeliaceae.- Selbyana, 18(1): 85-88.
- BROWN, G. K., VARADARAJAN, G.S., GILMARTIN, A. J. (1984): Chromosomes Numbers Reports LXXXV.- Taxon 33: 756-760.
- BROWN, T.A. (1993): Moderne Genetik.- Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- CAICEDO, A. L., GAITAN, E., DUQUE, M. C., TORO, O., CHICA, D., DEBOUCK, G. & TOHME, J. (1999): AFLP Fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and Related Wild Species from South America.- Crop Science 39: 1497-1507
- CAVALLI-SFORZA, L.L. & EDWARDS, A.W.F.(1967): Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures.- Am. J. Hum. Genet. 19: 233-257.
- CHASE, M.W., SOLTIS, D.E., OLMSTEAD, R.A., MORGAN, D.E., LES, D.H., MISHLER, B., DUVALL, M.R., PRICE, R.A., HILLS, H.G., QIU, Y-L., KRON, K.A., RETTIG, J.H., CONTI, E., PALMER, J.D., MANHART, J.R., SYTSMAN, K.J., MICHAELS, H.J., KRESS, W.J., CAROL, K.G., CLARK, W.D., HEDRÉN, M., GAUT, B.S., JANSEN, R.K., KIM, K-J., WIMPEE, C.F., SMITH, J.F., FURNIER, G.R., STRAUS, S.H., XIANG, Q-J, PLUNKETT, G.M., SOLTIS, P.S., SWENSON, S.M., WILLIAMS, S.E., GADEK, P.A., QUINN, C.J., EGUIARTE, L.E., GOLENBERG, E., LEARN, G.H., GRAHAM, S.W., BARRETT, S.C.H., DAYANANDAN, S., & ALBERT, V.A. (1993): Phylogenetics of seed plants: an analysis of of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*.- Ann. Missouri Bot. Gard. 80: 528-580.
- CHASE, M.W., STEVENSON, D.W., WILKIN, P. & RUDDALL, P.J. (1995a) Monocot systematics: a combined analysis.- In Monocotyledons: Systematics and Evolution (RUDALL, P.J., CRIBB, P.J., CUTLER, D.F. & HUMPHRIES, C.J. , eds.) Kew: Royal Botanic Gardens, 685-730.
- CHASE, M.W., DUVALL, M.R., HILLS, H.G., CONRAN, J.G., COX, A.V., EGUIARTE, L.E., HARTWELL, J., FAY, M.F., CADDICK, L.R., CAMERON, K.M. & HOOT, S. (1995b): Molecular phylogenetics of Liliaceae.- In Monocotyledons: Systematics and Evolution (RUDALL, P.J., CRIBB, P.J., CUTLER, D.F. & HUMPHRIES, C.J. , eds.) Kew: Royal Botanic Gardens, 109-137.
- CHASE, M.W., SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S., RUDDALL, P.J., FAY, M.F., HAHN, W.H., SULLIVAN, S., JOSEPH, J., MOLVRAJ, M., KORES, P.J., GIVNISH, T.J., SYTSMAN, K.J. & PIRES, J.C. (2000): Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification.- In WILSON, K.L. & MORRISON, D.A. (eds.): Monocots. Systematics and Evolution: 3-16.- CSIRO Publishing, Collingwood.
- CHEN, R.Y., LI, X.L. Song, W.Q. & Lin, S.H. (1985): Studies on chromosomes of tropical fruit trees in China.-J. Wuhan Bot. Res. 3: 423-428.
- CLARK, W.D. & CLEGG, M.T. (1990): Phylogenetic comparisons among *rbcL* sequences in the Bromeliaceae. Amer. J. Bot. 77: 115 (Abstract).
- CLARK, W.D., GAUT, B.S., DUVALL, M.R., & CLEGG, M.T. (1993): Phylogenetic relationships of the Bromeliiflorae - Commeliniflorae - Zingiberiflorae complex of monocots based on *rbcL* sequence comparisons.- Ann. Missouri Bot. Gard. 80: 987-998.
- COLLINS, J.L. (1933): Morphological and cytological characteristics of triploid pineapples.- Cytologia 4 (3): 248-256.
- COLLINS, J.L. & KERNS, K.R. (1931): Genetics studies in pineapples. I. A preliminary report upon the chromosome number and meiosis in seven pineapples varieties. (*Ananas sativus* Lidl. and in *Bromelia pinguin* L.)- J. Heredity 225: 139-142.
- COLLINS, J.L. & KERNS, K.R. (1936): Origin and nature of tetraploid pineapples.- Amer. Nat. 70: 726-745.
- COLLINS, J.L. & KERNS, K.R. (1938): The origin and breeding characteristics of polyploid pineapples *Ananas comosus* (L.) Merr.- Genetics 23 (2): 145.
- COTIAS-DE-OLIVEIRA, A.L.P., ASSIS, J.G.A. BELLINTANI, M.C.; ANDRADE, J.C.S., GUEDES, M.L.S. (2000): Chromosome numbers in Bromeliaceae.- Genetics and Molecular Biology 23(1): 173-177.
- CRAYN, D.M., TERRY, R.G., SMITH, J.A.C. & WINTER, K. (2000): Molecular systematic investigations in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) as a basis for understanding the evolution of crassulacean acid

- metabolism (CAM).- In WILSON, K.L. & MORRISON, D.A. (eds.): *Monocots. Systematics and Evolution*: 569-579.- CSIRO Publishing, Collingwood.
- CRONQUIST, A. (1981): *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, - Columbia University Press, New York.
- CROS, J., COMBES, M.C., TROUSLOT, P., ANTHONY, F., HAMON, S., CHARRIER, A., LASHERMES, P. (1998): Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L.- *Mol. Phylogenet. Evol.* 9: 109-117.
- DAHLGREEN, R. CLIFFORD, T.H & YEO, P.F. (1985): *The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution and Taxonomy*.- Springer Verlag, Berlin.
- DESPRES, L., GIELLY, L., REDOUTET, W. & 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. Phylogenet. Evol.* 27 (2): 185-196.
- DEUMLING, B. & GREILHUBER, J. (1982): Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by in situ hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding.- *Chromosoma* 84: 535-555.
- DICE, L.R. (1945): Measures of the amount of ecological association between species.- *Ecology* 26: 297-302.
- DIERS, L. (1961): Der Anteil an Polyploidien in den Vegetationsgürteln der Westkordillere Perus.- *Zeitschr. Bot.* 49(5): 437-488.
- DOUTRELIGNE J. (1939): Les divers "types" de structure nucléaire et de mitose somatique chez les Phanérogames.- *Cellule* 48 (2): 191-212.
- DOYLE, J.J. (1993): DNA, phylogeny, and the flowering of plant systematics.- *BioScience* 43: 380-389.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.- *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- DUVALL, M.R., CLEGG, M.T., CHASE, M.W., CLARK, W.D., KRESS, W.J., HILLS, H.G., EGUIARTE, L.E., SMITH, J.F., GAUT, B.S., ZIMMER, E.A., and LEARN jr., G.H. (1993): Phylogenetic hypotheses for the monocotyledons constructed from *rbcL* sequence data. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 607-619.
- EBERT, I., & TILL, W., (1997): Nuclear genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) with emphasis on the genus Pitcairnia. - C Value. Angiosperm Genome Size Discussion Meeting (Abstracts). - Kew: Royal Botanic Gardens (HBV, WU).
- EHLER, N. & SCHILL, R. (1973): Die Pollenmorphologie der Bromeliaceae. - *Pollen et Spores* 15(1): 13-45.
- FARRIS, J.S. (1969): A successive weighting approximations approach to character analysis.-*Syst. Zool.* 18:374-385.
- FARRIS, J.S. (1970): Methods for computing Wagner trees.- *Syst. Zool.* 18: 83-92.
- FELSENSTEIN, J. (1981): Evolutionary trees from DNA-Sequences: A maximum likelihood approach.- *J.Mol.Evol.* 17: 368-376.
- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.- *Evolution* 39: 783-791.
- FELSENSTEIN, J. (1989): PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2).- *Cladistics* 5: 164-166.
- FELSENSTEIN, J. (1993): PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5.- Dept. of Genetics, University of Washington, Seattle
- GARDNER, C.S. (1989): Preliminary classification of *Tillandsia* based on floral characters.- *Selbyana* 9: 130-146.
- GAUTHE, J. (1965): Contribution à l'étude caryologique des Tillandiées.- *Mem. Mus. Natl. Hist. Nat. Ser. B. Bot.*, 1(16): 39-59.
- GELLI DE FARIA, A. P., WENDT, T. & BROWN, G. (2003): Morphological data and phylogenetic analysis of *Aechmea* (Bromeliaceae subfamily Bromelioideae) - a first approximation.- Abstract Nr. 61, Poster auf der Jahrestagung der Botanical Society of America im Juli 2003, Systematics Section / ASPT (<http://www.2003.botanyconference.org/engine/search/detail.php?aid=61>)
- GIELLY, L. & TABERLET, P. (1996): A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast *trnL* (UAA) intron sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 120: 57-75.
- GILMARTIN, A.J. (1983): Evolution of mesic and xeric habitats in *Tillandsia* and *Vriesea* (Bromeliaceae).- *Syst. Bot.* 8: 233-244.
- GILMARTIN, A.J. & BROWN, G.K. (1987): Bromeliales, related monocots, and resolution of relationships among Bromeliaceae subfamilies.- *Syst. Bot.* 12: 493-500.

- GILMARTIN & BROWN (1985): Cleistogamy in *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae).- *Biotropica* 17: 256-259.
- GILMARTIN & BROWN (1986): Cladistic tests of hypotheses concerning evolution of xerophytes and mesophytes within *Tillandsia* Subg. *Phythrarrhiza* (Bromeliaceae).- *Amer. J. Bot.* 73: 387-397.
- GILMARTIN, A.J., BROWN, G.K., VARADARAJAN, G.S. & NEIGHBORS, N. (1989): Status of *Glomeropitcairnia* within evolutionary history of Bromeliaceae.- *Syst. Bot.* 14: 339-348.
- GIMENES, M.A., LOPES, C.R. & VALLS, J.F.M. (2002): Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP.- *Genet Mol. Biol.* 25 (3): 349-353.
- GIVNISH, T.J., EVANS, T.M., PIRES, J.C. & SYTSMA, K.J. (1999): Polyphyly and convergent morphological evolution in Commelinales and Commelinidae: Evidence from rbcL Sequence Data.- *Mol. Phylogenetics and Evol.* 12(3): 360-385.
- GIVNISH, T.J., EVANS, T.M., ZIHRA, M.L., PATTERSON, T.B., BERRY, P.E. & SYTSMA, K.J. (2000): Molecular evolution, adaptive radiation, and geographic diversification in the amphiatlantic family Rapateaceae: evidence from *ndhF* sequences and morphology.- *Evolution* 54(6): 1915-1937.
- GIVNISH, T.J., SYTSMA, K.J. & SMITH, J.F. (1990): A re-examination of phylogenetic relationships among bromeliad subfamilies using ptDNA restriction site variation.- *Amer. J. Bot.* 77: 133 (Abstract).
- GIVNISH, T.J., SYTSMA, K.J., SMITH, J.F., HAHN, W.J., BENZING, D.H. & BURKHARDT, E.M. (1997): Molecular evolution and adaptive radiation in *Brocchinia* (Bromeliaceae: Pitcairnioideae) atop tepuis of the Guayana shield.- In GIVNISH, T.J. & SYTSMA, K.J. (eds.): *Molecular evolution and adaptive radiation*: 259-311.- Cambridge Univ. Press; Cambridge.
- GRANT, J. R. (1993a): New combinations in *Mezobromelia* and *Racinaea* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). *Phytologia* 74(6): 428-430.
- (1993b): True Tillandsias misplaced in *Vriesea* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). *Phytologia* 75: 170-175.
- (1993c): Olof Ole Bromell, whose name became Bromeliad.- *J.Brom.Soc.* 43(6): 261-262.
- (1994a): The *Racinaea adpressa* Assemblage: A Review and New Combinations in *Racinaea* (Bromeliaceae: Tillandsioideae).- *Novon* 4(4): 362-364.
- (1994b) Three new species of *Racinaea* (Bromeliaceae: Tillandsioideae) from Ecuador and Peru.- *Phytologia* 76(4): 284-289.
- (1995a): The resurrection of *Alcantarea* and *Werauhia*, a new genus (Bromeliaceae: Tillandsioideae).- *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 91: 16-58.
- (1995b): Addendum to "The resurrection of *Alcantarea* and *Werauhia*, a new genus (Bromeliaceae: Tillandsioideae).- *Phytologia* 78(2): 119-123.
- (1995c): New combinations and new taxa in the Bromeliaceae. *Phytologia* 79(3): 254-256.
- GRANT, J. R. & ZIJLSTRA, G. (1998): An annotated catalogue of the generic names of the Bromeliaceae.- In: *Selbyana* 19(1): 91-121.
- GROß, E. (1988): Zur Morphologie der Bromeliaceen-Samen unter Berücksichtigung taxonomisch-systematischer Aspekte.- *Bromeliestudien IV*; *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 64.
- GROß, E. (1994): *Chevaliera (Aechmea) strobilacea*, a monumental species from Ecuador.- *J. Bromeliad Soc.* 44(2): 53-57.
- HAGEMANN, R. (1993): Neuere molekulare und cytologische Aspekte der Plastiden-Genetik. Eine Übersicht.- *Biol. Zentralblatt* 112: 244-287.
- HAHN, W.J., GIVNISH, T.J. & SYTSMA, K.J. (1995): Evolution of the Monocot Chloroplast Inverted Repeat: I. Evolution and Phylogenetic Implications of the ORF 2280 Deletion.- In *Monocotyledons: Systematics and Evolution* (RUDALL, P.J., CRIBB, P.J., CUTLER, D.F. & HUMPHRIES, C.J., eds.) Kew: Royal Botanic Gardens, 579-587.
- HALBRITTER, H. (1992): Morphologie und systematische Bedeutung des Pollens der Bromeliaceae.- *Grana* 31: 197-212
- HALL, B.G. (2001): *Phylogenetic trees made easy: A How-To Manual for Molecular Biologists*.- Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- HANSEN, M., KRAFT, T., CHRISTIANSSON, M. & NILSSON, N.-O. (1999): Evaluation of AFLP in *Beta*.- *Theor. Appl. Genet.* 98: 845-852.
- HARMS, H. (1930): Bromeliaceae.- In: ENGLER, A. & K. PRANTL, *Nat. Pflanzenfam.* 15a: 65-132.
- HASEGAWA, M., KISHINO, H., YANO, T. (1985): Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA.- *J. Mol. Evol.* 22, 160-174.

- HERSHKOVITZ, M.A. & ZIMMER, E.A. (1997): On the evolutionary origins of the cacti.- *Taxon* 46: 217-232.
- HIGGINS, D.G., THOMPSON, J.D., & GIBSON, T.J. (1996): Using CLUSTAL for multiple sequence alignments.- *Meth. Enzymol.* 266: 383-402
- HILL, M., WITSENBOER, H., ZABEAU, M., VOS, P., KESSELI, R. & MICHELMORE, R. (1996): PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp.- *Theor. Appl. Genet.* 93: 1202-1210.
- HILLIS, D.M. & HUELSENBECK, J.P. (1992): Signal, noise and reliability in molecular phylogenetic analyses.- *J. Hered.* 83: 189-195.
- HORRES, R. (1996/1997): Sukkulenz bei Bromelien. (Teil 1-3).- *Die Bromelie* 2/1996: 56-59, 3/1996: 67-72 und 1/1997: 19-21.
- HORRES, R. & SCHNEIDER, J. (1996): *Ayensua uaipanensis*, eine besondere Bromelie der venezolanischen Tafelberge.- *Der Palmengarten* 60(2): 29-31.
- HORRES, R. & ZIZKA, G. (1995): Untersuchungen zur Blattsukkulenz bei Bromeliaceae.- *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 69: 43-76.
- HORRES, R., ZIZKA, G., KAHL, G. & WEISING, K. (2000): Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from trnL(UAA) intron sequences of the chloroplast genome.- *Plant Biol.* 2: 306-315.
- HUANG, J., & HUANG, S. M. (2000): Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA.- *Theor Appl. Genet.* 100: 1050-1060.
- HUELSENBECK, J., LARGET, P.B, MILLER, R.E. & RONQUIST, F.(2002): Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny.- *Syst. Biol.* 51(5): 673-688.
- HUTCHINSON, J. (1973): The families of flowering plants.- Band 3, Oxford University Press, London.
- HUYNH K. L. (1965): Contribution à l'étude caryologique et embryologique des Phanérogames du Perou.- *Schweiz. Naturforsch. Ges. Mém. Soc. Helvétique Sci. Nat.* 85: 1-178.
- IBISCH, P.L., VASQUEZ, R., GROSS, E., KROMER, T. & REX, M. (2002): Novelties in Bolivian *Fosterella* (Bromeliaceae).- *Selbyana* 23(2): 204-219.
- IZQUIERDO, L. Y. & PIÑERO, D. (1998): Allozym divergence among four species of *Podaechmea* s.l. and the status of *Ursulaea* (Bromeliaceae, Bromelioideae).- *Pl. Syst. Evol.* 213: 207-215.
- JACCARD, P. (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale.- *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44: 223-270.
- JONES, C.J., EDWARDS, K.J., CASTAGLIONE, S., WINFIELD, M.O., SALA, F., VAN DER WIEL, C., VOSMAN, B., MATHES, M., DALY, A., BRETTSCHEIDER, R., MAESTRI, E., MARMIROLI, N., AERT, R., VOLCKAERT, G. & KARP, A. (1998): Reproducibility testing of AFLPs by a network of european laboratories.- In: *Molecular tools for screening biodiversity.* (KARP, A., ISAAC, P.E. & INGRAM, D.S., eds.), Chapman & Hall, London, S. 191-192.
- JUKES, T.H. & CANTOR, C.R. (1969): Evolution of Protein molecules.- In: *Mammalian Protein Metabolism*, (Munro, H.N. ed., Vol 3), Academic Press, New York, S. 21-132.
- JUSSIEU, A. (1789): *Gen. Pl.* 35: 49-51. Neudruck, 1964. – Verlag J. Cramer, Weinheim.
- KARDOLUS, J.P., VAN ECK, H.J. & VAN DEN BERG, R.G. (1998): The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy.- *Pl. Syst. Evol.* 210: 87-103.
- KELLOGG, E.A. & LINDER, H.P.(1995): Phylogeny of Poales.- In: *Monocotyledons: Systematics and Evolution* (RUDALL, P.J., CRIBB, P.J., CUTLER, D.F. & HUMPHRIES, C.J., eds.), Kew: Royal Botanic Gardens, 511-542.
- KUBITZKI, K. (1989): Amazonas-Tiefeland und Guayana-Hochland - historische und ökologische Aspekte ihrer Florenzentwicklung.- *Amazoniana* XI(1): 1-12.
- LARGET, B. & SIMON, D.L. (1999): Markov Chain Monte Carlo-algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees.- *Mol. Biol. Evol.* 16: 750-759.
- LEAL, F., D'EECKENBRUGGE G.C. & HOLST, B.K. (1998): Taxonomy of the genera *Ananas* and *Pseudananas* - an historical review.- *Selbyana* 19(2): 227-235.
- LEME, E.M.C. (1989): New *Lymania* species and identification key.- *J. Brom. Soc.* 39(6): 262-264.
- LEME, E.M.C. (1995): A new identity for a mysterious species.- *J. Brom. Soc.* 45(1): 3-5.
- LEME, E.M.C. (1997): *Canistrum* - Bromeliads of the Atlantic Forest.- Rio de Janeiro: Salamandra.
- LEME, E.M.C. (1998): Bromeliads of the Atlantic Forests: *Canistropsis*.- Rio de Janeiro: Salamandra.
- LEME, E.M.C. (2000): Bromeliads of the Atlantic Forests: *Neoregelia*.- Rio de Janeiro: Sextante Artes.
- LIN, B.Y., RITSCHEL, P.S. & FERREIRA, F.R. (1987): Número cromossômico de exemplares da familia Bromeliaceae.- *Rev. Bras. Fruticult.* 9: 49-55.

- LINDER, H.P. & KELLOGG, E.A. (1995): Phylogenetic patterns in the commelinoid clade.- In: Monocotyledons: Systematics and Evolution (RUDALL, P.J., CRIBB, P.J., CUTLER, D.F. & HUMPHRIES, C.J., eds.), Kew: Royal Botanic Gardens, 473-497.
- LINDSCHAU, M. (1933): Beitrage zur Zytologie der *Bromeliaceae*.- *Planta* 20(3): 506-530.
- LOH, J.P., KIEW, R., HAY, A., KEE, A., GAN, L.H. & GAN, Y.-Y. (2000a): Intergeneric and interspecific relationships in Araceae tribe Caladieae and development of molecular markers using Amplified Fragment Length Polymorphism.- *Ann. Bot.* 85: 371-378.
- LOH, J.P., KIEW, R., SET, O., GAN, L.H. & GAN, Y.-Y. (2000b): A study of genetic variation and relationships within the Bamboo subtribe Bambusinae using Amplified Fragment Length Polymorphism.- *Ann. Bot.* 85: 607-612.
- LUTHER, H.E. (1998a): Miscellaneous new taxa of Bromeliaceae (XII).- *Selbyana* 19(1): 83-90.
- LUTHER, H.E. (1998b): Miscellaneous new taxa of Bromeliaceae (XIII).- *Selbyana* 19(2): 218-226.
- MACE, E.S., LESTER, R.N. & GEBHARDT, C.G. (1999a): AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae).- *Theor. Appl. Genet.* 99: 626-633.
- MACE, E.S., GEBHARDT, C.G. & LESTER, R.N. (1999b): AFLP analysis of genetic relationships in the tribe Datureae.- *Theor. Appl. Genet.* 99: 634-641.
- MAGUIRE, B. & WURDACK, J.J.(1957): *Barbacenis uaipanensis*.-*Mem. NY Bot. Gard.* 9: 477-478.
- MCDADE, L.A. & MOODY, M.L. (1999): Phylogenetic relationships among Acanthaceae: Evidence from noncoding *trnL-trnF* chloroplast DNA sequences. *Amer. J. Bot.* 86: 70-80.
- MCWILLIAMS, E. (1974): Chromosome number and evolution.- In: L.B Smith and J.R. Downs (eds.) *Bromeliaceae (Pitcairnioideae)*. *Flora Neotropica Monograph* 14: 33-40, New York: Hafner Press
- MEZ, C. (1896): Bromeliaceae .- In: DECANDOLLE, C.: *Monographiae Phanerogamarum*. Vol. 9. Paris.
- MEZ, C. (1934/35): Bromeliaceae.- In: *Das Pflanzenreich* (Engler, A., ed.), Leipzig: W. Engelmann, vol. 4(32): 1-667.
- MÖLLER, M. & CRONK, Q.C.B. (1997): Origin and relationships of *Saintpaulia* (Gesneriaceae) based on ribosomal DNA internal transcribed (ITS) sequences.- *Amer. J. Bot.* 84: 956-965.
- MORGANTE, M. & VOGEL, J (1994): Compound microsatellite primers for the detection of genetic polymorphisms.- U.S. Patent Appl 08/326456.
- MORILLO, I. M. R. (1996): Systematics, Phylogeny and Chromosome Number Evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae).-PhD Thesis, Graduate School of the University of Missouri.
- MULLIS, K.B., FERRE, F. & GIBBS, R.A. (1994): *The polymerase chain reaction*. Boston: Birkhäuser.
- NEI, M. & KUMAR, S. (2000): *Molecular evolution and phylogenetics*.- Oxford Univ. Press, Oxford. Inc. New York.
- NEI, M., KUMAR, S. & TAKAHASHI, K. (1998): The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12390-12397.
- NEI, M. & LI, W.H. (1979): Mathematical model for studying variation in terms of restriction endonucleases.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- NELSON, E.C. & ZIZKA, G. 1997: *Fascicularia* (Bromeliaceae): which species are cultivated and naturalized in northwestern Europe?- *New Plantsman* 1:232-239.
- NYFFELER, R. (2002): Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences.-*Am. J. Bot.*89(2): 312-326.
- OBERPRIELER, C. & VOGT, R. (1993): Chromosomes of north African phanerogams II.- *Willdenowia* 23: 211:238.
- OLMSTEAD, R.G. & PALMER, J.D. (1994): Chloroplast DNA Systematics: A Review of Methods and Data Analysis.- *Am. J. Bot.* 81(9): 1205-1224.
- PAGLIA G. & MORGANTE, M.(1998): PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes.- *Molecular Breeding* 4:173-177.
- PALMER, J.D. (1985): Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae.- In: MACINTYRE, R.J. (ed.): *Molecular evolutionary genetics*. Plenum, New York: 131-240.
- PEREIRA, E. & LEME, E.M.C. (1986): Contribuição ao estudo do gênero *Nidularium* (Bromeliaceae): parte 1. Subgenero *Canistropsis*.- *Bradea* 4(32): 219-254.
- POREMBSKI, S. & BARTHOLOTT, W. (1999): *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous african bromeliad.- *Harv. Pap. Bot.* 4: 175-184.
- RAMÍREZ, I. (1996): Systematics, phylogeny, chromosome number, and evolution of *Cryptanthus* (Bromeliaceae). PHD thesis, St. Louis, MO: University of Missouri.

- RAMÍREZ, I. (2000): *Cryptanthus*.-In: Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. Cambridge Univ. Press, Cambridge: 551-553.
- RAMÍREZ-MORILLO, I.M. & G. K. BROWN (2001): The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Syst. Bot.* **26**: 722-726.
- RAMSER, J., LOPEZ-PERALTA, C., WETZEL, R., WEISING, K., & KAHL, G. (1996): Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera*) detected by random amplified polymorphic DNA.- *Genome* 39: 17-25.
- RAMSER, J., WEISING, K., LOPEZ-PERALTA, C., TERHALLE, W., TERAUCHI, R. & KAHL, G. (1997): Molecular marker based taxonomy and phylogeny of Guinea yam (*Dioscorea rotundata-D. cayenensis*).- *Genome* 40: 903-915.
- RANKER, T.A., SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S. & GILMARTIN, A.J. (1990): Subfamilial phylogenetic relationships of the Bromeliaceae: evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *Syst. Bot.* 15: 425-434.
- RANNALA, B. & YANG, Z. (1996): Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference.- *J. Mol. Evol.* 43: 304-311.
- RAUH, W. (1978): Sind Bromelien Sukkulenten?- In: Kakteen und andere Sukkulenten 29: 142-146, 166-171 (1.+ 2. Teil).
- RAUH, W. (1979): Bromelienstudien. I. - Neue und wenig bekannte Arten aus Peru und anderen Ländern. IX. Mitteilung.- *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 31: 23-29. Abh. Akad. D. Wiss. u. d. Lit., Mainz-Wiesbaden. (Protolog zu *Fosterella caulescens* Rauh).
- RAUH, W. & BARTHLOTT, W. (1982): Zur Kenntnis der Gattung *Acanthostachys* Klotzsch mit Beschreibung einer zweiten ökologisch bemerkenswerten Art.- Bromelienstudien. I. - Neue und wenig bekannte Arten aus Peru und anderen Ländern. XI. Mitteilung. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 39: 477-507. Abh. Akad. D. Wiss. u. d. Lit., Mainz-Wiesbaden.
- RAUH, W. (1983): Bromelienstudien. I. - Neue und wenig bekannte Arten aus Peru und anderen Ländern. XIII. Mitteilung *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 42: 37-44.
- RAUH, W. (1987): Bromelienstudien. I. - Neue und wenig bekannte Arten aus Peru und anderen Ländern. XVIII. Mitteilung.- *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 60: 907-910.
- RAUH, W. (1990): Bromelien.- 3. Auflage 458 S., E. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- READ, R.W. (1984): The 'evolution' of a new genus. *Lymania* gen. nov. .- *J. Brom. Soc.* 34(5): 199-201, 212-216.
- READ, R.W. & BAENSCH, H.U. (1994): *Ursulaea*; a new genus of Mexican Bromeliads.- *J. Brom. Soc.* 44(5): 205-211.
- REICHENBACH, H. G. (1828/29): *Conspectus regni vegetabilis per gradus naturales evoluti: tentamen / auctore H. Th. L. REICHENBACH. - Lipsiae : Cnobloch.*
- RENNER, S.S. (1999): Circumscription and Phylogeny of the Laurales: Evidence from molecular and morphological Data.- *Amer. J. Bot.* 86(9): 1301-1315.
- REX, M., HORRES, R., ZIZKA, G., IBISCH, P.L. & WEISING, K. (2001): RAPD and MP-PCR analysis of Bolivian *Fosterella* (Bromeliaceae).- Poster beim 15. Internationalen Symposium "Biodiversität und Evolutionsbiologie" vom 23.-28.09.2001 an der Ruhr-Universität Bochum.
- RICHARDSON, T., CATO, S., RAMSER, J., KAHL, G. & WEISING, K. (1995): Hybridization of microsatellites to RAPD : a new source of polymorphic markers.-*Nucleic Acid Res.* 23: 3798-3799.
- ROBINSON, H. (1969): A monograph of foliar anatomy of the genera *Connelia*, *Cottendorfia* and *Navia* (Bromeliaceae).- *Smithsonian Contr. Bot.* 2: 1-41.
- ROBINSON, H. & TAYLOR, D.C. (1999): The status of the pitcairnioid genera of the Bromeliaceae.- *Harv. Pap. Bot.* 4: 195-202.
- RODRÍGUEZ, F.J., OLIVER, J.L., MARÍN, A. & MEDINA, J.R. (1990): The general stochastic model of nucleotide substitution.- *Journ. Theor. Biol.* 142: 485-501.
- ROHLF, F.J. (1993): NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system.- Exeter, New York.
- ROZAN, S. & SKALETZKY, H. (1998): Primer3.- Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3
- RUNDEL, P. W. & DILLON, M. (1998): Ecological patterns in the Bromeliaceae of the lomas formations of Coastal Chile and Peru.- *Pl. Syst. Evol.* 212: 261-278.
- SAINT-HILAIRE, J.H.J. (1805): *Expos. Fam. Nat.*- Paris (chez Treuttel et Würtz,), Strasbourg (meme Maison de Commerce).

- SAITOU, N. & NEI, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989): *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.- 2. Aufl., Band 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. (2001): *Molecular Cloning: a laboratory manual*.- 3. Aufl., Band 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977): DNA-Sequencing with chain termination inhibitors.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SCHILL, R., DANNENBAUM, C. & E. JENTZSCH (1988): Untersuchungen an Bromeliennarben.- *Beitr. Biol. Pflanzen* 63: 221-252.
- SCHWARZACHER, T., AMBROS, P. & SCHWEIZER, D. (1980): Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis.- *Pl. Syst. Evol.* 134: 293-297.
- SCHWARZBACH, A.E. & RICKLEFS, R.E. (2000): Systematic affinities of Rhizophoraceae and Anisophylleaceae, and intergeneric relationships within Rhizophoraceae, based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA, and morphology. – *Am. J. Bot.* 87(4): 547-564.
- SHARMA, S.K., KNOX, M.R. & ELLIS, T.H.N. (1996): AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis.- *Theor. Appl. Genet* 93(5-6): 751-758.
- SMITH, L.B. (1934): Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae.- *Bot. Jahrb.* 66: 446-468.
- SMITH, L.B. (1969): *The Botany of the Guayana Highland*.- Part VIII Bromeliaceae.
- SMITH, L.B. & KRESS, W.J. (1989): New or restored genera of Bromeliaceae.- *Phytologia* 66(1): 70-79.
- SMITH, L.B. & KRESS, W.J. (1990): New genera of Bromeliaceae.- *Phytologia* 69(4): 271-274.
- SMITH, L.B. & DOWNS, R.J. (1974, 1977, 1979): Bromeliaceae.- In: *Flora Neotropica Monographs*. 14 (Vol. 1 - 3: Pitcairnioideae, Tillandsioideae, Bromelioideae).- New York: Hafner Press (Vol. 1+2), New York: Bot. Gard. (Vol. 3).
- SMITH, L.B. & READ, R.W. (1982): Notes on Bromeliaceae XLI.- *Phytologia* 52: 49-60. (*Pseudaechmea* S. 53)
- SMITH, L.B. & SPENCER, M.A. (1992): Reduction of *Streptocalyx* (Bromeliaceae: Bromelioideae).- *Phytologia* 72(2): 96-98.
- SMITH, L.B. & TILL, W. (1998): Bromeliaceae.- In: *The Families and Genera of Vascular Plants* (Kubitzki, K., ed.), Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 4: 74-99.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, J.J. (1981): *Biometry*.- 2nd Ed. W.H. Freeman, San Francisco, USA.
- SOUTHERN, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.- *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- SPENCER, M.A. & SMITH, L.B. (1992): A revision of the genus *Deuterocohnia* MEZ (Bromeliaceae: Pitcairnioideae).- *Bradea* 6(16): 141-146.
- STEVENSON, D.W., DAVIS, J.I., FREUDENSTEIN, J.V., HARDY, C.R., SIMMONS, M.P. & SPECHT, C.D. (2000): A phylogenetic analysis of the monocotyledons based on morphological and molecular character sets, with comments on the placement of *Acorus* and Hydatellaceae.- In WILSON, K.L. & MORRISON, D.A. (eds.): *Monocots. Systematics and Evolution*: 17-24.- CSIRO Publishing, Collingwood.
- SUGIURA, M. (1992): The chloroplast genome.-*Plant Mol. Biol.* 19: 149-168.
- SWOFFORD, D.L. (1998): *PAUP 4.0 Phylogenetic analysis using parsimony*.- Sunderland (M.A.): Sinauer Publications.
- SWOFFORD, D.L. & BEGLE, D.P. (1993): *PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1*.- Smithsonian Institute, Champaign, Illinois.
- SWOFFORD D.L., OLSEN, G.J., WADDELL P.J. & HILLIS, D.M. (1996): *Phylogenetic Inference*.-In: *Molecular Systematics*.- Eds. HILLIS, D.M. & MORITZ, C., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA: S. 407-514.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G. & BOUVET, J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA.- *Plant Mol. Biol.* 17: 1105-1109.
- TAYLOR, D.C. & ROBINSON, H. (1999): A rejection of *Pepinia* (Bromeliaceae: Pitcairnioideae) and taxonomic revisions.- *Harv. Pap. Bot.* 4: 203-217.
- TERRY, R.G. & 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(3): 107-112, 123.

- TERRY, R.G., BROWN, G.K., & OLMSTEAD, R.G. (1997a): Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*.- *Am. J. Bot.* 84: 664-670.
- TERRY, R.G., BROWN, G.K., & OLMSTEAD, R.G. (1997b) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) using *ndhF* sequences. *Syst. Bot.* 22: 333-345.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- THOMSON, K.G., THOMAS, J.E. & DIETZGEN, R.G. (1998): Retrotransposon-like sequences integrated into the genome of pineapple, *Ananas comosus*.- *Plant Mol. Biol.* 38: 461-465.
- THORNE, R.F. (1992): Classification and Geography of the Flowering Plants.- *Bot.Rev.* 58(3): 225-348.
- TRUMPLER, K. (1999): Revision der chilenischen Arten der Gattung *Puya*.- Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/Main.
- URBAN (1900): Bromeliaceae: In: *Symb. Antill.* 2: 161-336.
- (1902): PAUL SINTENIS. In: *Symb. Antill.* (Neudruck 1964) 3: 127-128. – A. Asher, Amsterdam.
- (1920): PLUMIERS Leben und Schriften. In: F. FEDDE (Hrsg.), *Repert. Spec. Nov. Regni Veg.* 5.
- VARADARAJAN, G.S. & BROWN, G. K. (1985): Chromosomes Number Reports LXXXIX.- *Taxon* 34: 727-730.
- VARADARAJAN, G.S. & GILMARTIN, A.J. (1988a): Phylogenetic relationships of groups of genera within the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae).- *Syst. Bot.* 13: 283-293.
- VARADARAJAN, G.S. & GILMARTIN, A.J. (1988b): Taxonomic realignments within the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae).- *Syst. Bot.* 13: 294-299.
- VARADARAJAN, G.S. & GILMARTIN, A.J. (1988c): Seed morphology of subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and its systematic implications.- *Amer. J. Bot.* 75: 808-818.
- VOS, P., HOGERS, P., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.- *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- WÄGELE J.-W. (2001): Grundlagen der Phylogenetischen Systematik.- 2. überarb. Aufl., Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München.
- WEISING, K., ATKINSON, R.G. & GARDNER, R.C. (1995): Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation.- *PCR Methods Applic.* 4: 249-255.
- WEISING, K., GARDNER, R. (1999): A set of universal 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. & MEYER W. (1995): DNA Fingerprinting in Plants and Fungi.- 2.Aufl., Boca Raton, CRC Press (UK), 320 Seiten.
- WEISS H. E. (1965): Étude caryologique et cyto-taxonomique de quelques Bromeliacées.- *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser. B, Bot.*16(1): 9-38.
- WENDT, T. (1997): A review of the subgenus *Pothuava* (Baker) baker of *Aechmea* Ruiz & Pav. (Bromeliaceae) in Brazil.- *Bot. J. Linn. Soc.* 125: 245-271.
- WENDT, T., CANELA, M.B.F., FARIA, A.P.G., RIOS, R.I. (2001): Reproductive biology and natural hybridization between two endemic species of *Pitcairnia* (Bromeliaceae).- *Am. J. Bot.* 88: 1760-1767.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.- In: INNIS, M., GELFAND, D., SNINSKY, J., & WHITE, T. (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*, p. 315-322. Academic Press, San Diego.
- WILL, B. & ZIZKA, G. (1999): The genus *Greigia* REGEL in Chile.- *Harv. Pap. Bot.* 4: 225-240.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.- *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.
- WOLFE, A. D. & LISTON, A. (1998): Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. in D. E. Soltis, P. S. Soltis and J. J. Doyle (eds): *Plant Molecular Systematics II*. p. 43-86. Boston, Kluwer.
- YANG, Z. & RANNALA, B. (1997): Bayesian phylogenetic inference using DNA-Sequences: A Markov Chain Monte Carlo method.- *Mol. Biol. Evol.* 14: 717-724.
- ZIZKA, G., HORRES, R., NELSON, E.C. & WEISING, K. (1999): Revision of the genus *Fascicularia* MEZ (Bromeliaceae).- *Bot. J. Linn. Soc.* 129: 315-332.
- ZIZKA, G., TRUMPLER, K. & ZÖLLNER, O. (2002): Revision of the genus *Ochagavia* (Bromeliaceae, Bromelioideae).- *Willdenowia* 32: 331-350.

7 Verwendete Abkürzungen

Maße und Einheiten

bp	Basenpaare (engl. base pairs)
g (mg, µg, ng, pg)	Gramm (Milli-, Mikro-, Nano-, Piko-)
M	Molar
µl	Mikroliter
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
mmol (pmol)	Millimol (Pikomol)

Chemische Substanzen

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
C	Cytosin
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
G	Guanin
N	A, C, G oder T
PAA	Polyacrylamid
T	Thymin
TBE	Tris-Borat EDTA

Sonstige Abkürzungen

Abb	Abbildung
AB- Fragment	<i>trnT</i> - <i>trnL</i> Intergenischer Spacer
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
bp	Basenpaare
CD-Fragment	<i>trnL</i> -Intron
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF-Fragment	<i>trnL</i> - <i>trnF</i> Intergenischer Spacer
CF-Fragment	Amplikon des Bereiches zwischen <i>trnL</i> (UAA)-5'- Exon und <i>trnF</i> (GAA)-Gen
CI	Consistency Index
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimonie
MPT	Maximum Parsimonie Tree (eine mit MP berechnete Baumtopologie)
NJ	Neighbor-Joining
NOR	Nukleolus-Organisator-Region
RI	Retention Index
RC	Rescaled Consistency Index (Produkt aus CI- und RI-Wert)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RT	Raumtemperatur
Tab	Tabelle
UPGMA	Unweigthed pair group method using arithmetic averages
λ-DNA	DNA des Bakteriophagen Lambda
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen

8 Verzeichnis der Tabellen, Abbildungen und Anlagen

Tabellen	Seite	
Tab.1	Unterfamilien Gattungen und Artenzahlen der Bromeliaceae	2
Tab.2	Phylogenetische Rekonstruktionen der Bromeliaceae auf der Basis molekularer Daten und morphologisch-anatomischer Untersuchungen	12
Tab.3	Bromeliaceae-Arten in der cyto genetischen Untersuchung	41
Tab.4	Zusammenfassung der Sequenzanalysen des <i>trnT-trnL</i> Intergenischen Spacers (AB-Fragment)	45
Tab.5	Zusammenfassung der Sequenzanalyse des <i>trnL</i> -Introns (CD-Fragment)	46
Tab.6	Sequenzen der 12 als 0/1 Matrix kodierten Insertionen/Deletionen des CD-Fragmentes	47
Tab.7	Zusammenfassung der Sequenzanalyse des <i>trnL-trnF</i> Intergenischen Spacers (EF-Fragment)	52
Tab.8	Sequenzen der 9 als 0/1 Matrix kodierten Insertionen/Deletionen des EF-Fragmentes	54
Tab.9	Zusammenfassung der Sequenzanalysen AB, CD und EF-Fragment	55
Tab.10	Zusammenfassung der kombinierten Sequenzanalyse von CD und EF-Fragment	58
Tab.11	Übersicht der Anzahl untersuchter Akzessionen und Fragmente der RAPD-Analyse	71
Tab.12	Verwendete Primer und Längenverteilung der jeweils amplifizierten Fragmente in der RAPD-Analyse	72
Tab.13	Genetische Distanzen D_j auf der Basis der RAPD-Fragmentanalyse ($D = 1 - \text{Jaccard}^*$) innerhalb der untersuchten Akzessionen der Gattungen <i>Fascicularia-Ochagavia-Greigia</i>	72
Tab.14	Verwendete Oligonukleotid-Adapter in der AFLP-Analyse	76
Tab.15	Verwendete Primer in der Präamplifikation der AFLP-Analysen	76
Tab.16	Verwendete Primerpaare in der Selektiven Amplifikation der Gattungsgruppe 1	76
Tab.17	Mit AFLPs untersuchte Akzessionen der Gattungsgruppe 1	77
Tab.18	Genetische Distanzen D_j ($D = 1 - \text{Jaccard}^*$; Min. und Max.) innerhalb der untersuchten Akzessionen der Gattungsgruppe <i>Fascicularia-Ochagavia-Greigia</i>	80
Tab.19	Anzahl der Fragmente, die in allen untersuchten Akzessionen der aufgeführten Arten, Gattungen und Gattungsgruppen vorkommen & einzigartige Fragmente der Gattungsgruppe 1	81
Tab.20	Unterschiede der erfaßten Fragmente (von 437 kodierten Fragmenten insgesamt) bei zwei verschiedenen Präamplifikationen der Gattungsgruppe 2	84
Tab.21	Primerpaare in der selektiven Amplifikation der Gattungsgruppe 2	84
Tab.22	Anzahl der Fragmente, die in allen untersuchten Akzessionen der aufgeführten Gattungsgruppen vorkommen, sowie Anzahl der einzigartigen Fragmente der Gattungsgruppe 2	85
Tab.23	Genetische Distanzen D_j ($D = 1 - \text{Jaccard}^*$) innerhalb der untersuchten Akzessionen der Gattungsgruppe <i>Deuterocohnia, Dyckia</i> und <i>Pitcairnia</i>	86
Tab.24	Tab.24 (S.90/91): Gattungsgruppe <i>Abromeitiella</i> (sensu SMITH & DOWNS 1974, RAUH 1983, 1987) <i>Deuterocohnia, Dyckia</i> und <i>Pitcairnia</i>	90/91
Tab.25	Cyto genetische Merkmale der untersuchten Bromeliaceae	94

Abbildungen	Seite
Abb.1 Die geographische Verbreitung der Bromeliaceae	1
Abb.2 Standortaufnahmen von <i>Tillandsia</i> -Arten (Bolivien)	5
Abb.3 Analyse zur suprafamilären Gliederung der Liliaceae (nach CHASE et.al. 2000)	7
Abb.4 Untersuchte Belege pro Art der für die Flora Neotropica bearbeiteten 553 Arten der Unterfamilie Bromelioideae	14
Abb.5 Die Eignung von Sequenzdaten zur Charakterisierung taxonomischer Rangstufen	15
Abb.6 Schematische Darstellung des Chloroplastengenoms	16
Abb.7 Detailschema zum <i>trnT-trnF</i> -Bereich mit Position der von TABERLET et al. (1991) entwickelten Primer	17
Abb.8 Schema zum Ablauf einer AFLP-Analyse	18
Abb.9 Blühende Vertreter von <i>F. bicolor</i> ssp. <i>bicolor</i> und <i>Ochagavia litoralis</i>	20
Abb.10 Die geographische Verbreitung der Gattung <i>Fascicularia</i> in Chile und blattmorphologische Merkmale der beiden Unterarten	21
Abb.11 Übersicht der bisher wirksam veröffentlichten Binome der Gattung <i>Deuterocohnia</i> Mez	24
Abb.12-17 Skewness-Analyse der untersuchten Sequenzdatensätze	43/44
Abb.18 Neighbor-Joining-Analyse des CD-Fragmentes (<i>trnL</i> -Intron) auf der Basis der <i>p</i> -Distanzmatrix	48
Abb.19 Maximum-Parsimonie-Analyse des CD-Fragmentes (<i>trnL</i> -Intron): Strict-Konsensus Baum	49
Abb.20 Maximum-Parsimonie-Analyse des CD-Fragmentes (<i>trnL</i> -Intron): 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum	50
Abb.21 Maximum-Parsimonie-Analyse des EF-Fragmentes (<i>trnL-trnF</i> Intergenischer Spacer): 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum	53
Abb.22 Kombinierte Analyse des AB-, CD- und EF-Datensatzes: Strict-Konsensus Baum	57
Abb.23 Neighbor-Joining-Analyse des kombinierten Datensatzes von CD- und EF-Fragment auf der Basis der <i>p</i> -Distanzmatrix	59
Abb.24 Maximum-Parsimonie-Analyse des <i>trnL</i> -Introns und des <i>trnL-trnF</i> Intergenischen Spacers (CD & EF) ohne die Akzessionen 079, 080 und 141. 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum berechnet aus 930 MPT mit einer Länge von 593 Schritten	62
Abb.25 Phylogramm der kombinierten Maximum-Parsimonie-Analyse des <i>trnL</i> -Introns und des <i>trnL-trnF</i> Intergenischen Spacers (CD & EF) ohne 079, 080 und 141. Baum 507 von 570 kürzesten Bäumen mit einer Länge von 577 Schritten	63
Abb.26 Maximum-Parsimonie-Analyse des <i>trnL</i> -Introns und des <i>trnL-trnF</i> Intergenischen Spacers (CD & EF) ohne 079, 080 und 141. 60% Majority-Rule-Konsensus-Baum berechnet aus 570 kürzesten Bäumen (MPT) mit einer Länge von 577 Schritten	64
Abb.27 Maximum-Parsimonie-Analyse des <i>trnL</i> -Introns und des <i>trnL-trnF</i> Intergenischen Spacers (CD & EF) mit Fokus auf die Beziehungen der Bromelioideae zu den Pitcairnioideae-Gattungen <i>Fosterella</i> und <i>Puya</i> . Analyse mit Vertretern der Tillandsioideae als Außengruppe	65
Abb.28 Maximum-Parsimonie-Analyse des <i>trnL</i> -Introns und des <i>trnL-trnF</i> Intergenischen Spacers (CD & EF) mit Fokus auf die Beziehungen der Bromelioideae zu den Pitcairnioideae-Gattungen <i>Fosterella</i> und <i>Puya</i> . Analyse mit Vertretern der Tillandsioideae und <i>Brocchinia/Ayensua</i> als Außengruppe	67
Abb.29 Ausschnitt aus einem Alignment von sequenzierten multiplen Banden, amplifiziert mit Primerpaar ITS1 / ITS4	70
Abb.30 Gelbild einer RAPD-Analyse	72
Abb.31 Phänogramm einer UPGMA-Analyse der RAPD-Daten	73
Abb.32 UPGMA-Analyse der RAPD-Daten unter Verwendung des Nei-Li-Koeffizienten	73

Abb.33	NJ-Analyse der RAPD-Daten unter Verwendung des Nei-Li-Koeffizienten (Bootstrap-Konsensus-Baum)	74
Abb.34	Phänogramm einer UPGMA-Analyse des AFLP-Datensatzes der Gattungsgruppe 1 (Bootstrap- Konsensus-Baum)	78
Abb.35	Phänogramm einer NJ-Analyse des AFLP-Datensatzes der Gattungsgruppe 1	79
Abb.36	Phänogramm einer UPGMA-Clusteranalyse des AFLP-Datensatzes der Gattungsgruppe 1	81
Abb.37	Phänogramm einer UPGMA-Clusteranalyse der Gattungsgruppe 2 auf der Basis des Jaccard-Koeffizienten	86
Abb.38	Phänogramm einer NJ-Analyse (Bootstrap-Konsensus-Baum) des AFLP-Datensatzes der Gattungsgruppe 2	87
Abb.39	Phänogramm einer UPGMA-Clusteranalyse des AFLP-Datensatzes der Gattungsgruppe 2 (Bootstrap-Konsensus-Baum)	88
Abb.40	Geographische Verbreitung der Gattungen <i>Abromeitiella</i> und <i>Deuterocohnia</i>	101
Abb.41	Ausschnitte der kombinierten Analyse des <i>trnL</i> -Introns und des <i>trnL-trnF</i> Intergenischen Spacers mit den Beziehungen der untersuchten Pitcairnioideae	105
Abb.42	Ausschnitte des 60% MR-Konsensus-Baumes der Maximum-Parsimonie-Analyse des <i>trnL</i> -Introns (CD-Gesamtdatensatz, Abb.21) mit den Beziehungen der untersuchten Tillandsioideae	108
Abb.43	Ausschnitte der kombinierten Analyse des <i>trnL</i> Introns und des <i>trnL-trnF</i> Intergenischen Spacers mit den Beziehungen der untersuchten Bromelioideae	115
Abb.44	Ausschnitte der kombinierten Analyse des <i>trnL</i> Introns und des <i>trnL-trnF</i> Intergenischen Spacers mit den Beziehungen der untersuchten Bromelioideae mit Vertretern der Tillandsioideae als Außengruppe	116
Abb.45	Das systematische Konzept der Bromeliaceae vor der Einbeziehung molekularer Daten	117
Abb.46	Schema als Übersicht zum systematischen Konzept der Bromeliaceae unter Berücksichtigung der in dieser Studie analysierten molekularen Daten	117

Anlagen:

Anlage I:	Tabelle der mit Sequenzanalysen untersuchten OTUs (Übersicht nach Akzessions/Projektnummer sowie geordnet nach Unterfamilien und Gattungen)
Anlage II:	Verwendete Enzyme, Puffer und Lösungen
Anlage III:	Alignment zum ITS-Primerdesign
Anlage IV:	Datenmatrizes der Fragmentanalysen (RAPDs und AFLPs) der Gattungsgruppen 1 und 2
Anlage V:	D _J -Werte der Fragmentanalysen
Anlage VI:	Alignment des CD- und EF-Fragmentes und der AB-CD-EF und CD-EF- Sequenzdatensätze. Kodierung der Insertionen- und Deletionen (InDels) des CD- und EF-Fragmentes
Anlage VII:	Strict-Consensus-Baum der <i>trnL</i> -Intron-Analyse (HORRES et al. 2000)
Anlage VIII:	Distanzmatrizes (<i>p</i> -Distanz) der analysierten Sequenzdatensätze
Anlage IX:	Synapomorphien des analysierten CD-EF Datensatzes
Anlage X:	Legende und Phylogramme zur kombinierten Sequenzanalyse des AB-CD-EF Datensatzes

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Georg Zizka für die Betreuung der Arbeit und seine Hilfe bei allen auftretenden Problemen.

Allen Mitgliedern des AK Zizka danke ich für die Hilfe und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Günter Kahl für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und die Möglichkeit, von der kreativen Atmosphäre seiner Arbeitsgruppe zu profitieren. Den Mitgliedern des AK Kahl danke ich für Hilfestellungen im Labor und viele anregende Diskussionen zu inhaltlichen Fragen.

Herrn Prof. Dr. Kurt Weising gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und wichtige Anregungen.

Dr. Frank Blattner danke ich für seine Hilfe bei den Versuchen zu ITS und für viele Anregungen zu den durchgeführten Sequenzanalysen.

Dr. Birgit Gemeinholzer für die kritische Durchsicht der Arbeit und Hilfestellung beim Erstellen der Anlagen.

Ich danke dem Direktor des Palmengartens der Stadt Frankfurt am Main, Herrn Dr. Matthias Jenny, und seinen Mitarbeitern für die Möglichkeit, die umfangreiche Bromelien-Lebendsammlung zu nutzen. Hier danke ich besonders den Gärtnermeistern Herrn Klaus Piepenbring und Herrn Karlheinz Schulmeyer für ihre Hilfe.

Für die Möglichkeit, die bedeutende Bromeliensammlung des Botanischen Gartens Heidelberg zu nutzen, danke ich dem Direktor des Botanischen Gartens Heidelberg und seinen Mitarbeitern. Besonderer Dank an Gärtnermeister Herrn Timm Stolten für seine engagierte Hilfe.

Herrn Franz-Josef Haase danke ich für die Bereitstellung von Pflanzen und Pflanzenmaterial für viele Informationen und Diskussionen zu Bromelien.

Für die Bereitstellung von wichtigem Pflanzenmaterial danke ich auch den Mitarbeitern der Botanischen Gärten Berlin, Bochum, Bonn und München.

Herrn Heinrich Rummel danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Sammelreise nach Bolivien.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung.