

# **Phylogenie und Evolution der Gattung *Dyckia* (Bromeliaceae)**

## **Dissertation**

angefertigt in der Abteilung Morphologie und Systematik der Pflanzen,  
Institut für Biologie, FB 10: Mathematik und Naturwissenschaften, Universität Kassel

zur Erlangung des akademischen Grades eines

## **Doktors der Naturwissenschaften**

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Florian Krapp**

Kassel, im Oktober 2012

Dekan: Prof. Dr. Friedrich W. Herberg

Betreuer: Prof. Dr. Kurt Weising

Promotionskommission: Prof. Dr. Kurt Weising (1. Gutachter)  
Prof. Dr. Georg Zizka (2. Gutachter)  
Prof. Dr. Ewald Langer (Beisitzer)  
Prof. Dr. Rüdiger Wagner (Beisitzer)

Tag der Disputation: 20. Dezember 2012

Für meine Mutter



# Inhalt

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Familie der Bromeliaceae	1
1.1.1 Merkmale und Ökologie	1
1.1.2 Systematik und Biogeographie	3
1.1.3 Die Unterfamilie Pitcairnioideae	4
1.2 Die Gattung <i>Dyckia</i>	6
1.2.1 Morphologie	6
1.2.2 Lebensraum	12
1.2.3 Physiologie, Ökologie und Fortpflanzungsbiologie	18
1.2.4 Taxonomische Geschichte	20
1.3 Ziele dieser Arbeit	23
1.3.1 Bisherige wissenschaftliche Arbeiten zu <i>Dyckia</i>	23
1.3.2 Bisherige molekulare Arbeiten an <i>Dyckia</i>	24
1.3.3 Fragestellung	25
1.3.4 Einführung in die Methodik dieser Arbeit	26
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1 Pflanzenmaterial	28
2.2 Molekulare Methoden	33
2.2.1 DNA-Isolation	33
2.2.2 Gelelektrophorese	35
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.3.1 Untersuchte plastidäre Loci	37
2.2.3.2 Untersuchte nukleäre Loci	43
2.2.3.3 Verwendete Reagenzien und Durchführung	47
2.2.4 DNA-Sequenzierung	49
2.2.5 Plastidäre Mikrosatelliten (cpSSRs)	51
2.2.5.1 Entwicklung von Primerpaaren für cpSSR-Loci	51
2.2.5.2 Primer-Tests und Charakterisierung	52
2.3 Datenanalyse	54
2.3.1 DNA-Sequenzen, Alignments und Außengruppen	54
2.3.2 Behandlung von Heterozygotie	55
2.3.3 Distanzanalysen, Bootstrap- und Jackknife-Verfahren	57
2.3.4 Parsimonieanalyse, Abschätzung von Homoplasie	58
2.3.5 Maximum Likelihood-Analyse und Substitutionsmodelle	60
2.3.6 Bayes'sche Analyse	61
2.3.7 Datierte Phylogenien mit BEAST	63
2.3.8 Netzwerke	64
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>66</b>
3.1 DNA-Isolation	66
3.2 Sequenzierung plastidärer Loci	66
3.2.1 Charakterisierung verschiedener plastidäre Loci	66
3.2.2 Phylogenetische Untersuchungen	72

3.3 Sequenzierung nukleärer Loci.....	85
3.3.1 Pilotexperimente.....	85
3.3.2 Phylogenie auf Basis von <i>phyC</i> .....	87
3.4 Plastidäre Mikrosatelliten (cpSSRs).....	96
3.4.1 Etablierung von cpSSR-Loci.....	96
3.4.2 Anwendung ausgewählter cpSSRs für Verwandtschaftsanalysen.....	101
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>106</b>
4.1 Methodische Aspekte.....	106
4.1.1 DNA-Isolation.....	106
4.1.2 Charakterisierung verschiedener plastidärer Loci.....	107
4.1.3 <i>Phytochrom C (phyC)</i> .....	109
4.1.4 Verwendete Methoden zur Datenanalyse.....	110
4.1.5 Plastidäre Mikrosatelliten (cpSSRs).....	112
4.2 Phylogenetische Untersuchungen.....	116
4.2.1 Erzielte Auflösung der Phylogenien.....	116
4.2.2 Phylogenie auf Basis plastidärer Sequenzen.....	117
4.2.3 Phylogenie auf Basis von <i>phyC</i> .....	119
4.2.4 Schlussfolgerungen zur Phylogenie von <i>Dyckia</i> und <i>Encholirium</i> .....	125
4.2.5 Phylogenie und Merkmalsevolution innerhalb von <i>Dyckia</i> .....	128
4.3 Evolution und Geschichte von <i>Dyckia</i> .....	133
4.3.1 Historische Biogeographie von <i>Dyckia</i> und <i>Encholirium</i> .....	133
4.3.2 Klima- und Habitatgeschichte im Verbreitungsgebiet von <i>Dyckia</i> .....	135
4.3.3 Diversifizierung anderer Pflanzengruppen im Verbreitungsgebiet von <i>Dyckia</i> .....	139
4.3.4 Die besonders hohe Diversität von <i>Dyckia</i> .....	143
4.3.5 Artkonzepte für <i>Dyckia</i> .....	146
4.4 Ausblick.....	148
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>150</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
<b>7 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>169</b>
<b>8 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>170</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>171</b>
<b>10 Anhang.....</b>	<b>173</b>
<b>11 Referenzen.....</b>	<b>196</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>199</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>200</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Familie der Bromeliaceae

Die Familie der Bromeliaceae wurde erstmals durch Antoine Laurent de Jussieu publiziert (Jussieu 1789). Der Name leitet sich von der durch Charles Plumier beschriebenen Gattung *Bromelia* ab, welche nach dem schwedischen Botaniker Olaf Bromel benannt ist (Linnaeus 1753). Innerhalb der Liliidae (Monokotyle) werden die Bromelien aktuell zur Ordnung der Poales (Süßgrasartigen) gerechnet (APG 2009). Bis auf *Pitcairnia feliciana*, welche in Guinea in Westafrika wächst, ist die Familie endemisch für die Neotropis (Abbildung 1).

Nach einer im Juni 2008 vorgenommenen Zusammenstellung umfasste die Familie der Bromeliaceae nahezu 3200 anerkannte Arten in 58 Gattungen (Luther 2008). Alleine in den drei Folgejahren wurden jedoch etwa 200 neue Arten beschrieben (IPNI 2012). Die einzige in großem Umfang wirtschaftlich genutzte Art ist *Ananas comosus* (Abbildung 1), welche heute weltweit in den Tropen und Subtropen angebaut wird. Weiterhin werden einige Bromelien als Zier- und Zimmerpflanzen genutzt, wie etwa die als Lanzenrosette bekannte *Aechmea fasciata* und verschiedene Arten von *Tillandsia* (Abbildung 2).



**Abbildung 1: *Ananas comosus* und die Verbreitung der Bromeliaceae**

A: *Ananas comosus*, der einzige in großem Umfang wirtschaftlich genutzte Vertreter der Bromeliaceae. Kolorierte Tuschezeichnung (Blanco 1880). B: Disjunktes Verbreitungsgebiet der Bromeliaceae in der Neotropis und Westafrika. Karte verändert auf Basis der in der Datenbank der GBIF (2007) enthaltenen Datensätze.

### 1.1.1 Merkmale und Ökologie

Alle Bromelien weisen für Monokotyle typische Merkmale wie etwa dreizählige Blüten, parallelnervige Blätter und Adventivwurzeln auf (Sitte et al. 2002). Innerhalb der Familie gibt es eine Fülle an Lebensformen und damit verbunden eine große morphologische Bandbreite. So lassen sich Vertreter von den ariden Savannen bis hinein in die tropischen Regenwälder und von den Küsten und dem Flachland bis hoch hinauf in die Anden finden. Als Ursache für



**Abbildung 2: Vertreter der Bromeliaceae**

Habitus von verschiedenen Vertretern der Bromeliaceae in Botanischen Gärten. Prchtige Infloreszenzen von *Aechmea weibachii* (A) und *Aechmea fasciata* (B) aus Brasilien, die in ganz Mittel- und Südamerika verbreitete epiphytische *Tillandsia usneoides* im trockenen (C) und feuchten (D) Zustand, *Tillandsia cyanea* aus Ecuador in Blüte mit anderen Tillandsien (E), Bromeliensammlung (F) und Tillandsien-Schauhaus (G) im Botanischen Garten Heidelberg.

diese Vielfalt wird eine adaptive Radiation der Familie innerhalb der Neotropis angenommen, im Zuge derer die Bromelien Anpassungen an die unterschiedlichsten Lebensräume entwickelten (Benzing 2000).

Viele Bromelien leben epiphytisch, darunter die weitaus meisten Arten der der Tillandsioideae (Abbildung 2), aber auch Vertreter anderer Unterfamilien (Givnish et al. 2007). Die Wurzeln sind bei epiphytischen Arten häufig reduziert oder zu Haftorganen umgebildet. Mit der epiphytischen Lebensweise verbunden ist oft auch die Bildung von

Blatttrichtern, die von den Basen der eng zusammenstehenden Rosettenblätter gebildet werden. Diese fungieren als Zisternen, das darin gesammelte Wasser und gelöste Nährstoffe können über Saugschuppen aufgenommen werden. Die als Saugschuppen ausgebildeten Trichome sind ein vielen, aber nicht allen Bromelien eigenes Merkmal. Sie finden sich entweder nur in den Blatttrichtern oder auf der gesamten Blattoberfläche. Zisternenbildung und Saugschuppen sind sicherlich entscheidende Faktoren für den Erfolg der epiphytischen Arten (Benzing 2000).

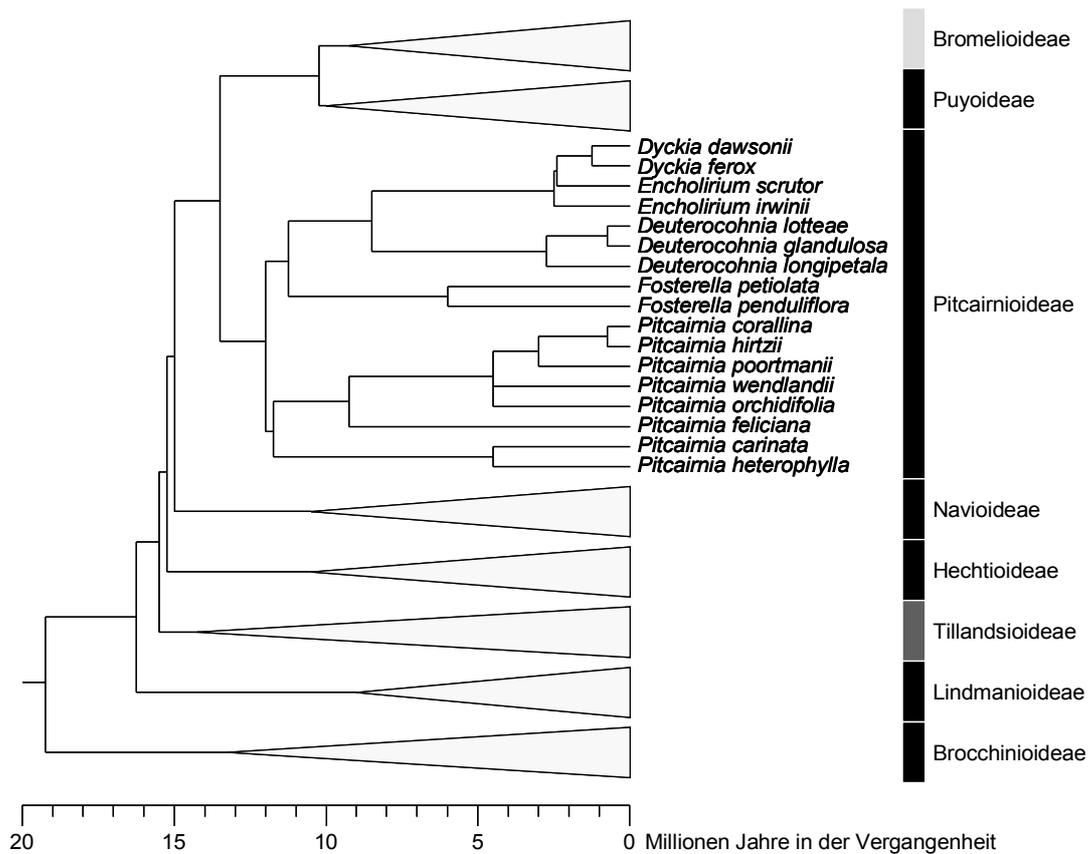
Die Infloreszenzen der Bromeliaceae sind meistens auffällig bunt gefärbt, was die Beliebtheit als Zimmerpflanzen erklärt (Abbildung 2). Bei vielen Gattungen sind die Blüten selbst jedoch klein und relativ unscheinbar. Die Schauwirkung geht dann von pigmentierten Hochblättern und Infloreszenzachsen aus.

### 1.1.2 Systematik und Biogeographie

Die Bromeliaceae wurden bis in die jüngste Zeit anhand von Fruchtmerkmalen in drei Unterfamilien eingeteilt. So standen die beerenfrüchtigen Bromelioideae den übrigen, durchweg kapselfrüchtigen Arten gegenüber. Letztere unterscheiden sich ihrerseits durch die Art der Anhängsel an ihren Samen, die bei den Tillandsioideae haarig und bei den Pitcairnioideae häutig sind (Smith & Downs 1974; 1977; 1979).

Diese traditionelle Unterteilung der Bromeliaceae in drei Unterfamilien gilt heute als überholt. Während zwar Bromelioideae und Tillandsioideae offenbar monophyletisch sind, handelt es sich bei den klassischen Pitcairnioideae um eine paraphyletische Gruppe. Die häutigen Samenanhängsel müssen demnach als symplesiomorpher Zustand angenommen werden. Anhand molekularer Untersuchungen der plastidären DNA wurden die ursprünglichen Pitcairnioideae in die sechs Unterfamilien Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae und Puyoideae aufgeteilt (Givnish et al. 2007; 2011), womit die Bromeliaceae derzeit aus acht anerkannten Unterfamilien bestehen (Abbildung 3).

Als phylogenetisch zuerst abzweigende Gruppe gelten die Brocchinioideae, welche in den tiefer gelegenen Gegenden des geologisch sehr alten Guayana-Schildes im Nordosten Südamerikas vorkommen (Givnish et al. 2004). In dieser Gegend wird auch der Ursprung der Bromeliaceae als solche angenommen. Von dort aus eroberte die Familie zunächst die höher gelegenen Bereiche des Guayana-Schildes und diversifizierte sich in verschiedene Linien. Einige dieser Linien verbreiteten sich unabhängig voneinander über ganz Mittelamerika, so etwa die Hechtioideae. Die Vorläufer der Gattung *Cottendorfia* (Navioideae) und möglicherweise auch einige Linien der Tillandsioideae überbrückten die



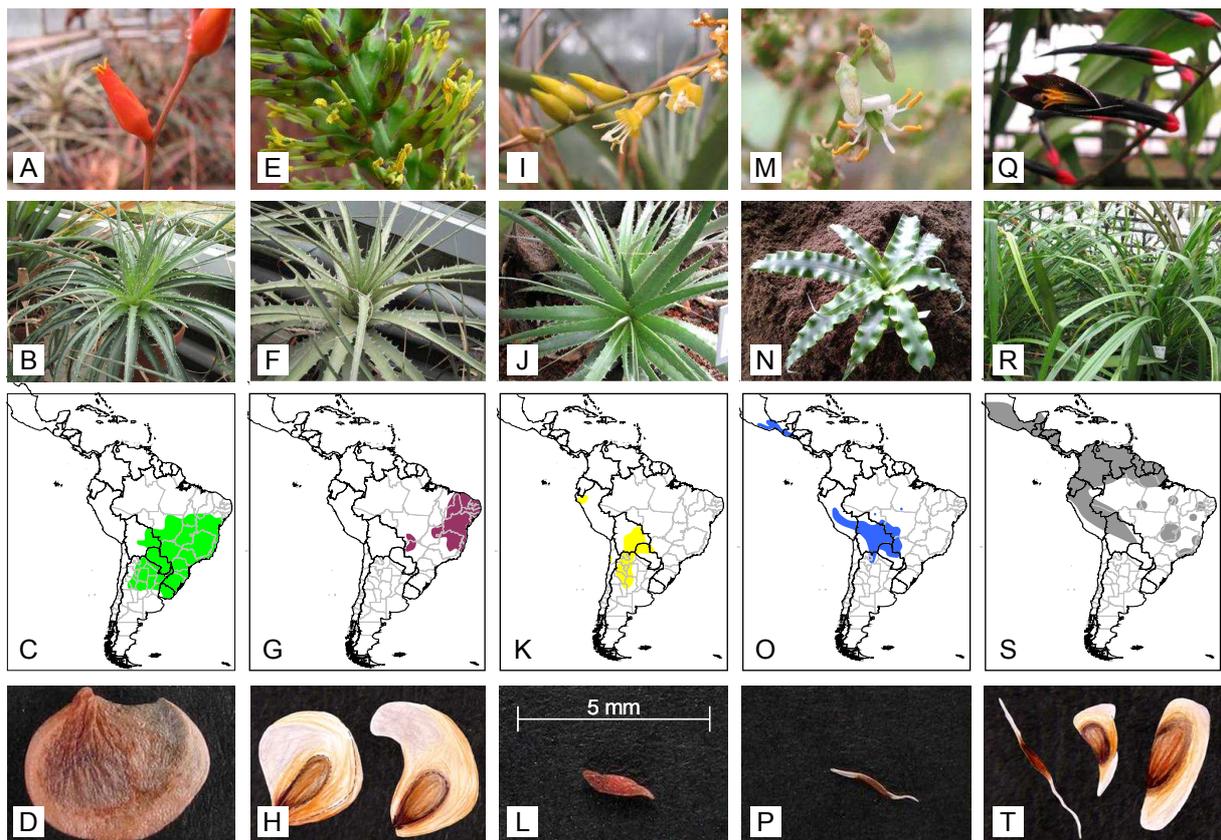
**Abbildung 3: Systematik der Bromeliaceae**

Systematik der Bromeliaceae, vereinfacht nach Givnish et al. (2011). Der hier dargestellte Stammbaum beruht auf einer Parsimonieanalyse auf Basis von Sequenzen von acht plastidären Loci. Er wurde mittels des penalized likelihood in ultrametric Form gebracht. Auf der rechten Seite sind die acht derzeit anerkannten, jeweils monophyletischen Unterfamilien markiert. Schwarze Balken stehen für die sechs Unterfamilien, die früher als Pitcairnioideae zusammengefasst wurden. Der hellgraue Balken steht für die Bromelioideae und der dunkelgraue Balken für die Tillandsioideae.

tiefen Landstriche und den Amazonas und gelangten direkt in die höheren Lagen des Brasilianischen Schildes. Die gemeinsamen Vorläufer der Bromelioideae, Pitcairnioideae und Puyoideae drangen vom Guayana-Schild aus nach Westen in die Anden vor. Von dort aus besiedelten sowohl die Bromelioideae als auch die Linie der Pitcairnioideae, die sich später in *Dyckia* und *Encholirium* auftrennte, unabhängig voneinander den Brasilianischen Schild (Givnish et al. 2004; 2007; 2011).

### 1.1.3 Die Unterfamilie Pitcairnioideae

Die Unterfamilie Pitcairnioideae besteht in ihrer heutigen Form (sensu Givnish, im folgenden einfach als Pitcairnioideae bezeichnet) aus fünf anerkannten Gattungen (Abbildungen 3 und 4). Eine zumindest im plastidären Genom monophyletische Gruppe bilden die drei Gattungen *Dyckia*, *Encholirium* und *Deuterocohnia* (z. B. Givnish et al. 2011). Deren Vertreter zeichnen sich durch xeromorphe Anpassungen wie CAM-Photosynthese und stark



**Abbildung 4: Vertreter der Pitcairnioideae und deren Verbreitung**

Verbreitungsgebiet der fünf Gattungen der Unterfamilie Pitcairnioideae sowie Blüten, vegetative Organe und Samen von typischen Vertretern. Alle Samen sind im selben Maßstab gezeigt. A-D: *Dyckia*. A: Blüten von *D. estevesii*, B: Blattrosette von *D. microcalyx*, C: Verbreitung, D: Samen von *D. remotiflora*. E-H: *Encholirium*. E: Infloreszenz von *E. spec.*, F: Blattrosette von *E. spec.*, G: Verbreitung nach Forzza (2005), H: Samen von *E. magalhaesii* (links) und *E. erectiflorum* (rechts, jeweils Zeichnungen nach Forzza 2005). I-L: *Deuterocohnia*. I: Blüten von *D. recurvipetala*, J: Blattrosette von *D. longipetala*, K: Verbreitung nach Schütz (2012), L: Samen von *D. recurvipetala*. M-P: *Fosterella*. M: Blüten von *F. robertreadii*, N: Blattrosette von *F. rusbyi*, O: Verbreitung nach Peters (2009), P: Samen von *F. penduliflora*. Q-T: *Pitcairnia*. Q: Blüten von *P. rubronigriflora*, R: Blätter von *P. spicata*, S: Verbreitung modifiziert von Kai Schubert (persönliche Mitteilung) nach Smith & Downs (1974), T: Samen von *P. maidifolia* (links, Zeichnung nach Taylor & Robinson 1999) sowie *P. turbinella* (mittig) und *P. agavifolia* (rechts, Zeichnung wie vorherige nach Smith & Downs 1974). Bild E mit freundlicher Genehmigung von Kurt Weising.

bewehrte, derbe Blätter mit unterschiedlich ausgeprägter Sukkulenz aus. Crayn et al. (2004) fassten diese Gattungen informell als „*Dyckia* clade“ zusammen. Die überwiegend andin verbreitete Gattung *Deuterocohnia* enthält inklusive *Abromeitiella* aktuell 17 Arten (Schütz 2012). Für *Encholirium* werden derzeit 25 Arten anerkannt, *Dyckia* stellt mit 158 Arten die bei Weitem größte Gattung in dieser Gruppe dar (vgl. 1.2.4).

Die Arten der beiden übrigen Gattungen der Unterfamilie, *Fosterella* und *Pitcairnia*, besitzen überwiegend mesophytischen Charakter und betreiben  $C_3$ -Photosynthese. Die meisten Arten von *Fosterella* kommen in den Yungas Boliviens vor, insgesamt werden derzeit 31 Arten anerkannt (Peters 2009). Ungleich umfangreicher ist mit über 400 Arten die Gattung *Pitcairnia* (Luther 2008), deren Arten sich auf ein großes Verbreitungsgebiet in Mittel- und

Südamerika verteilen (Abbildung 4). Die umstrittene Gattung *Pepinia* wurde kürzlich wieder in *Pitcairnia* eingegliedert (Taylor & Robinson 1999).

## 1.2 Die Gattung *Dyckia*

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Gattung *Dyckia*, welche daher in den folgenden Abschnitten ausführlich vorgestellt wird. Die letzte umfassende Behandlung der Gattung erfolgte durch Smith & Downs (1974). Eine moderne Revision ist nicht verfügbar.

### 1.2.1 Morphologie

#### Habitus

Charakteristische vegetative Merkmale der Vertreter der Gattung *Dyckia* sind in Abbildung 5 zusammengestellt. Die Arten der Gattung besitzen ein dickes, oftmals kriechendes Rhizom und sprossbürtige Wurzeln (Winkler 1982). Viele Arten sind stammlos, einige besitzen jedoch besonders im Alter mehr oder weniger ausgeprägte Stämme. Ein Extrem stellt beispielsweise *D. edwardii* dar, deren Stamm bei einer Dicke von 17 cm bis zu 50 cm lang werden kann (Braun et al. 2008a).

Die Blätter stehen in mehr oder weniger dichten Rosetten, deren Durchmesser typischerweise 15-100 cm beträgt. Als seltene Ausnahme kann ein Durchmesser von bis zu 300 cm bei freistehenden Rosetten von *D. maritima* gelten (Winkler 1982). Tote Blätter verbleiben häufig am Spross und umhüllen diesen, wie beispielsweise bei *D. edwardii* (Braun et al. 2008a). Durch die vegetative Vermehrung über Kindel bilden viele *Dyckia*-Arten Kolonien oder dichte Polster aus (Abbildung 5 A und E). Eine einzigartige Abweichung vom rosettenförmigen Wuchs kommt bei *D. estevesii* vor, deren Pflanzen teilweise distich beblättert sind (Abbildung 5 C). Dieses Merkmal variiert aber gelegentlich sogar innerhalb eines Individuums (Rauh 1987).

Die Pflanzen erreichen inklusive ihrer Infloreszenzen typischerweise eine Höhe von 50-100 cm. Es kommen aber auch sehr kleine Vertreter vor, wie etwa *D. odorata* mit ca. 10 cm. Besonders groß werden Arten wie *D. maritima* und *D. selloa* mit 200 cm, *D. irwinii* mit 225 cm oder *D. goiana* mit bis zu 250 cm. Die Höhe der Infloreszenz ist aber auch innerartlich variabel, bei *D. microcalyx* wurde eine Bandbreite von 40-200 cm beobachtet (Smith & Downs 1974).

#### Blätter

Die Blätter sind deutlich in Spreite und Scheide unterteilt. Die Blattspreiten haben ein zumeist derbes Erscheinungsbild, entweder sind sie sehr starr oder aber ledrig und biegsam.

Die Blattlänge reicht typischerweise von 10-50 cm. Bei *D. nana* sind die Blätter lediglich 3-5 cm lang (Leme et al. 2010), bei *D. microcalyx* dagegen bis 150 cm (Smith & Downs 1974). Ihre Breite variiert zwischen 5 mm bei den linealischen Blättern von *D. choristaminea* und mehr als 40 mm bei der großwüchsigen *D. edwardii* (Braun et al. 2008a). Farblich sind die Blattspreiten sehr variabel, so gibt es völlig silbrig-weiße Blätter bei stark beschuppten Arten. Ansonsten kommen hellgrüne bis sehr dunkelgrüne, leicht rötliche bis sehr dunkelrote oder bräunliche bis hin zu dunkel schokoladenbraunen Blättern vor. Die Farbe kann aber zum Teil innerartlich stark variieren und ist auch vom Standort abhängig. Solche Farbmorphen scheinen innerhalb der gesamten Bromeliaceae ohnehin häufig zu entstehen und sich zu verändern, ein in vielen Lebenssammlungen beobachtbares Phänomen (Barbará et al. 2007).



**Abbildung 5: Die Gattung *Dyckia*: Vegetative Organe**

Vegetative Organe und Besonderheiten einiger Vertreter von *Dyckia*. A: Klonale Koloniebildung bei *D. choristaminea*, B: Wenig beschuppte, grüne Blätter bei *D. microcalyx*, C: Distiche Beblätterung bei *D. estevesii*. D: Die stark sukkulente und beschuppte *D. marnier-lapostollei*. E: Kindelbildung bei *D. marnier-lapostollei*. F: Rot pigmentierte Rosette bei *D. goehringii*.

Die Blattränder sind fast immer mit Stacheln bewehrt, nur selten finden sich völlig glatte Ränder. Aber auch sonst bestachelte Arten sind teilweise im oberen Bereich der Spreite glattrandig oder besitzen einzelne Blätter ganz ohne Stacheln. Bei einigen Arten finden sich eher kleine Stacheln, bei *D. atratiflora* sind sie nur etwa 1 mm lang, gerade und weich (Braun et al. 2009). Typisch sind jedoch deutlich größere Stacheln von etwa bei *D. ferruginea* bis zu

10 mm Länge (Smith & Downs 1974). Sie sind häufig gebogen, zum Teil in entgegengesetzte Richtungen, und extrem hart und stabil.

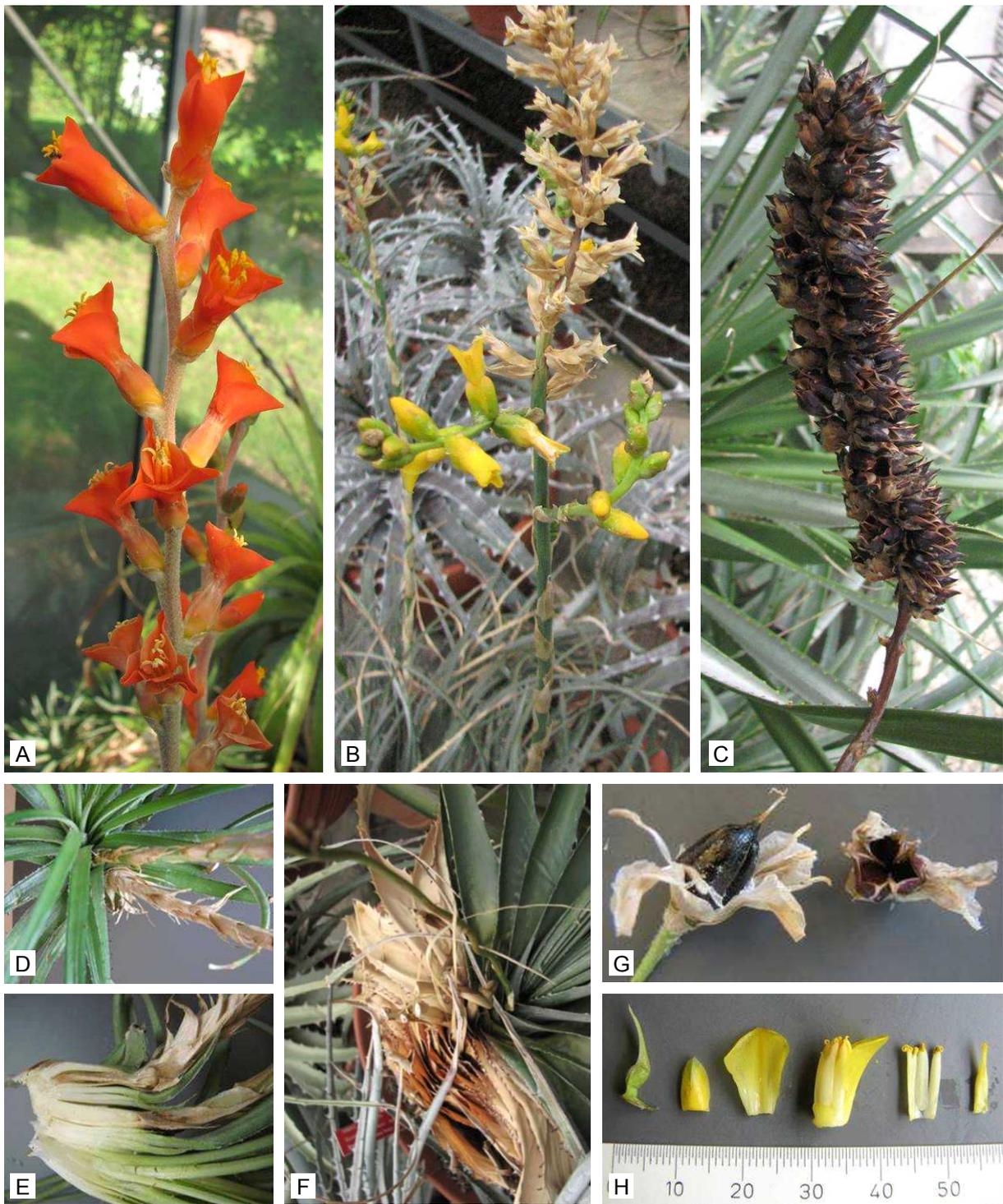
Die Blätter von *Dyckia*-Arten zeigen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Sukkulenz. So gibt es einerseits sehr dünne linealische Blätter, wie etwa bei *D. choristaminea*, die nur sehr wenig Feuchtigkeit speichern können (Abbildung 5 A). Besonders stark ausgeprägte Sukkulenz findet sich bei nordbrasilianischen Arten wie *D. marnier-lapostollei* (Abbildung 5 D und E) oder *D. joanae-marcioi* (Braun et al. 2008b).

Weiterhin finden sich unterschiedliche Grade von Beschuppung. Es gibt völlig kahle, grüne Pflanzen, Arten mit ausschließlich abaxial beschuppten Blättern und extreme beidseitige Beschuppung bei nordbrasilianischen Arten wie *D. marnier-lapostollei*, *D. braunii* und *D. joanae-marcioi*, die im trockenen Zustand silbrig-weiß erscheinen (Smith & Downs 1974; Braun et al. 2008b).

Die Blattscheiden sind zumeist stängelumfassend und 15-60 mm lang. Selten weisen sie Stacheln auf, zum Teil finden sich aber Schuppen. Form, Größe und Beschaffenheit der Blattscheiden werden oftmals als wichtiges Merkmal zur Artbestimmung angeführt (Smith & Downs 1974).

### Infloreszenzen

Merkmale der Infloreszenzen von *Dyckia* sind in den Abbildungen 6 und 7 zusammengestellt. Die Infloreszenzen entspringen bei allen Arten der Gattung *Dyckia* lateral am Spross (Abbildung 6 D-F). Dies ist das sicherlich augenscheinlichste Unterscheidungsmerkmal zu *Encholirium* mit Ausnahme von *E. heloisae*, welche ebenfalls laterale Infloreszenzen bildet (Forzza 2005) und damit eine intermediäre Position zwischen den Gattungen einnimmt. Die Infloreszenzen sind bei *Dyckia* meist schlank und aufrecht, selten niedrig und gedrungen. In der Regel handelt es sich um einfache Trauben oder Ähren oder um zweifach zusammengesetzte Rispen. Eine mit nur 4-6 Blüten besonders armbütige Art ist *D. nana* (Leme et al. 2010), typischerweise finden sich aber deutlich mehr Blüten, beispielsweise über 200 bei *D. floribunda* (Abbildung 6 C, Vesprini et al. 2003). Mehrfach zusammengesetzte Rispen sind vergleichsweise selten und kommen etwa bei der großwüchsigen *D. maritima* vor (Winkler 1982). Der Verzweigungsgrad kann aber auch innerartlich variieren. So zeigen Arten welche am natürlichen Standort nur einfache Infloreszenzen ausbilden unter den besseren Bedingungen in Kultur teilweise verzweigte Blütenstände (Esteves & Hofacker 2011). Viele Vertreter von *Dyckia* weisen extraflorale



**Abbildung 6: Die Gattung *Dyckia*: Infloreszenzen, Blüten und Früchte**

A: Typische orangerotblütige *Dyckia*-Infloreszenz bei *D. remotiflora*. B: Wenig verzweigte gelbblütige Infloreszenz bei *D. choristaminea*. C: Infruktessenz der reichblütigen Art *D. floribunda*. D: Laterale Infloreszenzen zweier aufeinanderfolgender Jahre bei *D. brevifolia*. E: Längsschnitt durch dieselbe Achse. F: Teilweise abgeschnittene Infloreszenzen aus fünf verschiedenen Jahren bei *D. estevesii*. G: Früchte von *D. brevifolia*. H: Blütenorgane von *D. brevifolia*. Von links nach rechts: Florale Braktee, Sepale, Petale, aufgeschnittene Blüte mit sichtbarer Verwachsung von Petalen und Filamenten, zur Röhre verwachsene Stamina, Griffel mit Narbe.

Nektarien an verschiedenen Teilen ihrer Infloreszenzen auf (Bernadello et al. 1991; Vesprini et al. 2003).

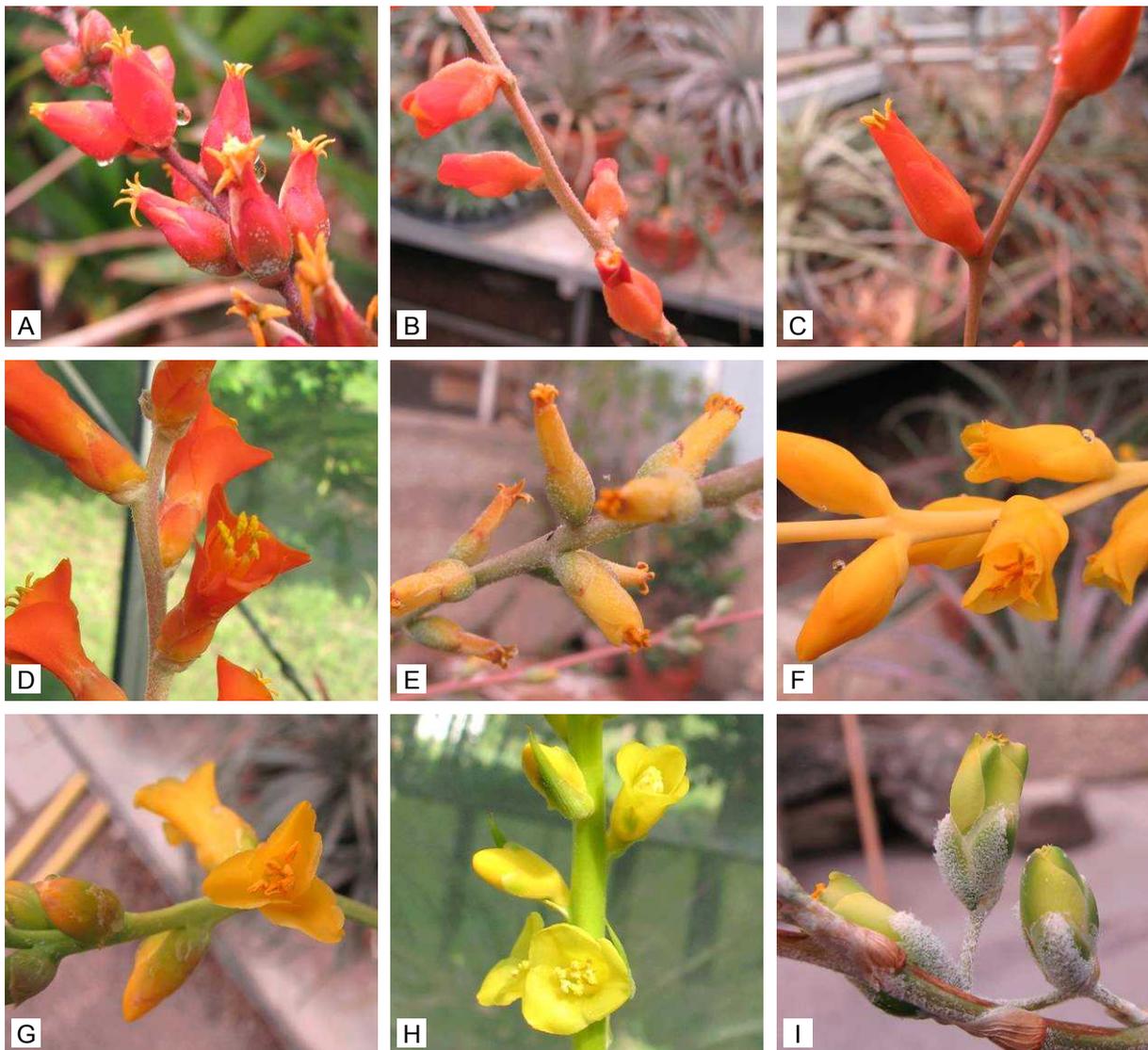
Der Blütenschaft, die Blütenstandsachse und die verschiedenen Typen von Brakteen können kahl, behaart oder beschuppt sein. Ihre Beschaffenheit sowie die Längen und Längenverhältnisse innerhalb der Infloreszenz gelten als häufig wichtige Merkmale zur Artunterscheidung (Smith & Downs 1974). Oft sind weder der Blütenschaft noch die Blütenschaft-Brakteen besonders auffällig gefärbt, wie es bei anderen Bromelien der Fall ist (Winkler 1982). Die Blütenstandsachse dagegen ähnelt häufig farblich den Blüten, kann aber auch ungefärbt grün sein. Die floralen Brakteen können aufrecht, zurückgeschlagen oder unscheinbar klein sein, bei einigen Arten überragen sie die Sepalen oder gar die Petalen.

### Blüten, Früchte und Samen

Merkmale der Blüten, Früchte und Samen von *Dyckia* sind in den Abbildungen 6, 7 und 8 zusammengestellt. Die Blüten sind bei *Dyckia* wie bei fast allen Bromelien zwittrig. Nur bei einigen Arten, darunter *D. hebdingii*, *D. maritima* und *D. selloa*, kommen andromonözische oder eingeschlechtliche Blüten vor (Smith & Downs 1974; Winkler 1982; Robinson & Taylor 1999). Diese seltene Ausnahme war auch der Grund für die zeitweilige Ausgliederung in eine eigene Gattung *Prionophyllum* (Koch 1873). Die Blüten sind meistens sehr kurz gestielt oder sitzend, gelegentlich auch länger gestielt. Häufig verlängern sich die Blütenstiele zur Fruchtreife. Die Blüten können aufrecht an der Achse anliegen, abstehen oder zurückgeschlagen sein (Abbildungen 6 und 7).

Die Sepalen zeigen über die Gattung hinweg eine große morphologische Bandbreite. So können sie kurz und unauffällig, beinahe so lang wie die Petalen oder in Ausnahmen, wie etwa bei *D. ursina*, teilweise sogar länger sein. Farblich ähneln sie meist in etwa den Petalen, wirken aber durch Schuppen oder Haare teilweise deutlich blasser. Die Petalen sind in der Regel intensiv gefärbt. Typisch sind kräftig leuchtende rote, orangerote, gelborangefarbene oder gelbe Töne. Dabei bilden rote Pigmente in den Petalen innerhalb der Bromeliaceae eine Ausnahme (Sazima et al. 1989). Bei *Dyckia* selten sind beinahe schwarze Blüten, etwa bei *D. atratiflora* (Braun et al. 2009), bräunliche, schwefelgelbe und gelbgrüne Blüten (Abbildung 7).

Das Androeceum besteht aus zwei Kreisen mit jeweils drei Stamina (Abbildung 6 H). Die Filamente sind basal zu einer Röhre verwachsen, was ein wichtiger Unterschied zu Blüten von *Encholirium* ist. Diese Verwachsung kann basal begrenzt sein oder fast bis an die Antheren heranreichen, zudem kann eine Verwachsung mit den Petalen vorkommen. Grad



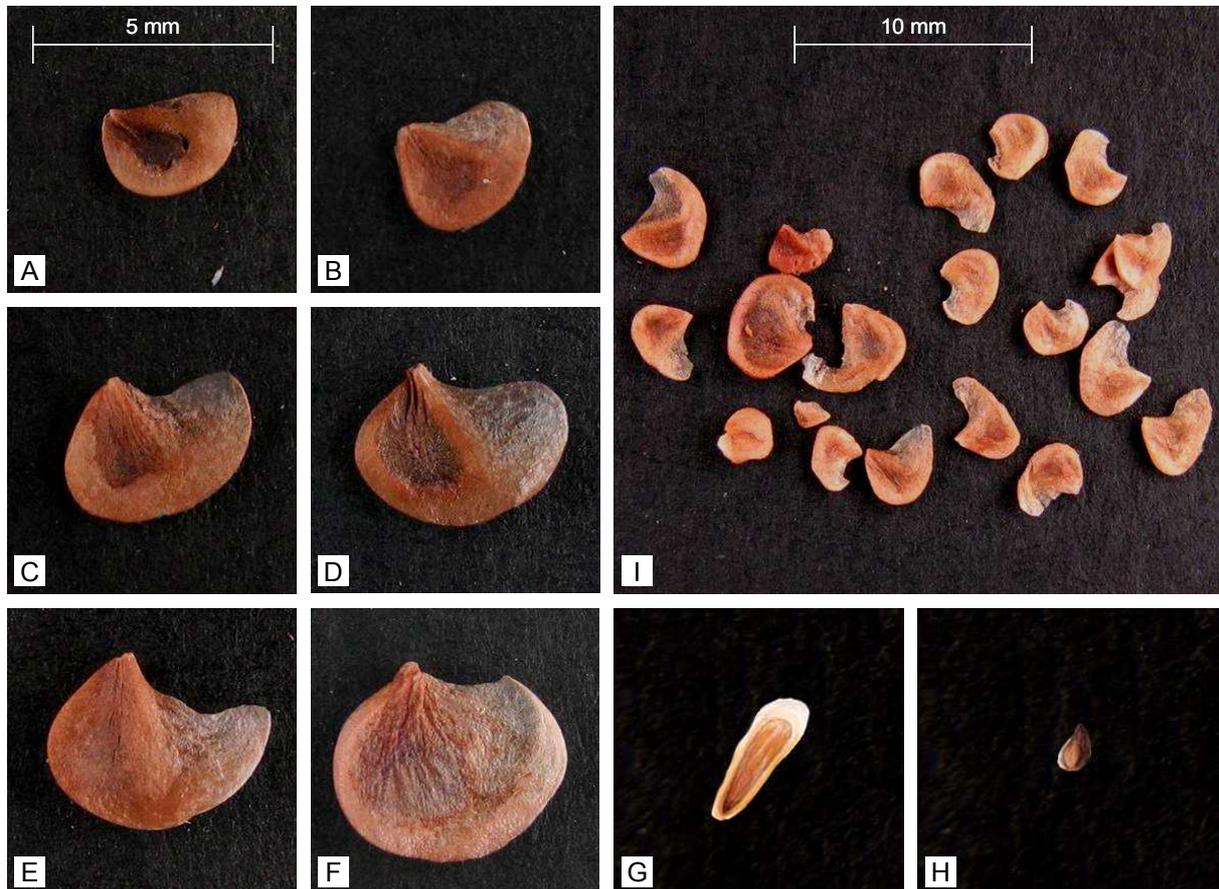
**Abbildung 7: Die Gattung *Dyckia*: Blüten**

Blüten verschiedener in dieser Arbeit untersuchter Vertreter von *Dyckia*. A: *D. goehringii*. B: *D. granmogulensis*. C: *D. estevesii*. D: *D. remotiflora*. E: *D. hebdingii*. F: *D. aff. leptostachya*. G: *D. choristaminea*. H: *D. brevifolia*. I: *D. spec.*

und Typ der Verwachsung stellen wichtige Bestimmungsmerkmale dar (Smith & Downs 1974). Die Antheren können entweder in der Blüte eingeschlossen bleiben oder diese überragen. Das Gynoeceum ist ein aus drei verwachsenen Karpellen bestehender oberständiger Fruchtknoten. Die meist kurzen Griffel tragen eine dreilappige Narbe.

Die dreifächrigen Kapsel Früchte (Abbildung 6 G) enthalten eine Vielzahl an Samen, etwa bei *D. floribunda* über 120 Stück (Vesprini et al. 2003). Die Samen sind mit bis zu 5 mm Durchmesser vergleichsweise groß und meist asymmetrisch geflügelt, selten kommen auch gleichmäßige Hautränder vor (Abbildung 8). Als Ausnahme gibt es längliche Samen mit schmalen Rändern bei den ehemals unter der separaten Gattung *Prionophyllum* geführten

Arten wie *D. maritima*. Vereinzelt kommen auch untypisch kleine Samen mit stark reduzierten Hauträndern vor, so etwa bei *D. delicata* (Larocca & Sobral 2002). Die Form insbesondere geflügelter Samen ist stark durch die Fruchtwand beeinflusst und hängt von der individuellen Lage innerhalb der Frucht ab.



**Abbildung 8: Die Gattung *Dyckia*: Samen**

Samen verschiedener *Dyckia*-Arten. Die Bilder A-H sind im selben Maßstab dargestellt, um die unterschiedlichen Samengrößen zu illustrieren. A: *D. velascana*, B: *D. aff. leptostachya*, C: *D. choristaminea*, D: *D. floribunda*, E: *D. spec.*, F: *D. remotiflora*, G: *D. maritima* (Zeichnung nach Strehl & Beheregaray 2006), H: *D. delicata* (Zeichnung nach Larocca & Sobral 2002) I: Bandbreite der Variation von Form und Größe bei Samen von *D. choristaminea* innerhalb eines einzelnen Individuums.

### 1.2.2 Lebensraum

Informationen zu Klima, Ökoregionen und der Geländetopographie im Verbreitungsgebiet von *Dyckia* sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Typische Habitate von *Dyckia* zeichnen sich durch zumindest saisonale Wasserknappheit und einen Mangel an Nährstoffen aus (Abbildung 10). Häufig gibt es eine ausgeprägte Trockenzeit zwischen Mai und August (z. B. Sazima et al. 1989). Die Sonnenexposition ist zumeist sehr stark und die Tagestemperaturen können hohe Werte erreichen, was durch die häufig nackten felsigen Böden noch verstärkt wird (Winkler 1980).

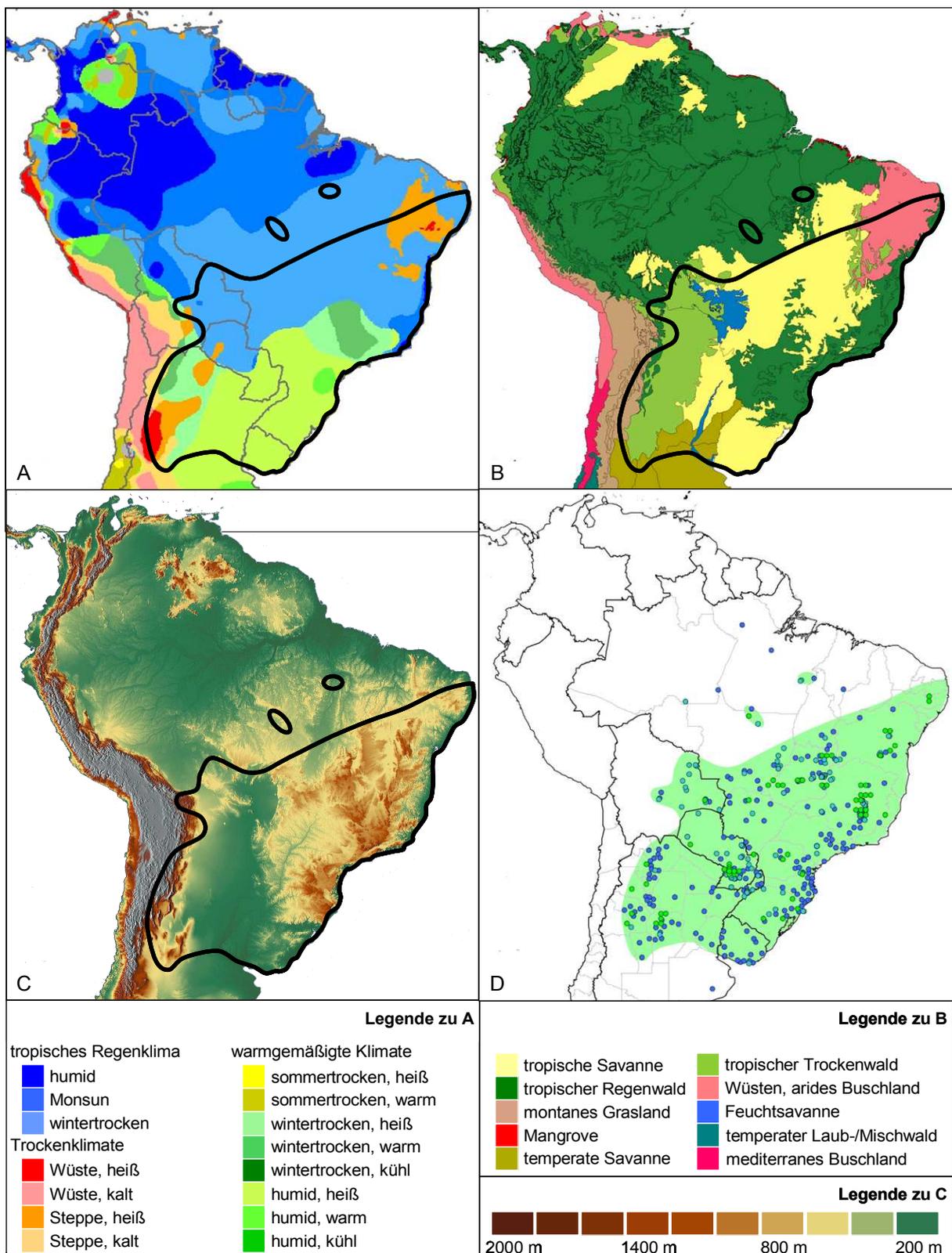
### Verbreitungsgebiet

Das Verbreitungsgebiet von *Dyckia* umfasst mehrere Ökoregionen nach Olson et al. (2001). Die weitaus meisten Arten sind im Cerrado beheimatet, einem großflächigen semiariden Savannengebiet im Südosten Brasiliens. Weiterhin kommen Vertreter der Gattung in Trockenwäldern und aridem Buschland Nordostbrasiliens (Caatinga), dem Atlantischen Regenwald Südostbrasiliens (Mata Atlântica), dem Chaco Boliviens, Nordargentinens und Paraguays sowie der Pampa in Nordargentinien, Südbrasilien und Uruguay vor (Abbildung 9 B). Auch Grenzregionen, wie etwa der Brejo de Altitude genannte Übergang zwischen Caatinga und Mata Atlântica bieten Standorte für *Dyckia*. Allerdings ist *Dyckia* in der Regel auf azonale Standorten beschränkt und gehört nicht zur typischen zonalen Vegetation dieser Ökoregionen. Standorte für *Dyckia* finden sich von Meereshöhe bis hinauf auf 3.000 m, wo etwa *D. velascana* im der argentinischen Provinz La Rioja lebt. Die meisten Arten bewohnen aber mittlere Höhenlagen von 800-1.500 m, Höhen über 2.000 m sind eine sehr seltene Ausnahme (Smith & Downs 1974).

### Campos Rupestres

Die Campos Rupestres (portugiesisch für „steinige Felder“) bilden das Zentrum der Diversität von *Dyckia* und auch *Encholirium* und beherbergen einen großen Teil der Arten (Smith & Downs 1974; Versieux & Wendt 2006; Versieux & Wendt 2007). Innerhalb der ohnehin artenreichen Neotropis gilt die azonale Vegetation dieser Habitate als besonders divers und reich an endemischen Arten. So sind beispielsweise zwei Drittel aller in der als Cerrado bezeichneten Ökoregion vorkommenden Gefäßpflanzen auf die Campos Rupestres beschränkt (Alves et al. 2007). Viele Pflanzenarten sind sogar nur von der Typuslokalität bekannt und kommen streng endemisch auf einzelne Berge beschränkt vor (Alves & Kolbek 1994). Typische Pflanzen dieser offenen, steinigen Savannen sind beispielsweise Vertreter der Eriocaulaceae, Velloziaceae und Xyridaceae (Alves & Kolbek 2010).

Es handelt sich bei den Campos Rupestres um mehr oder weniger isolierte Habitate in den höheren Lagen des Cerrados, aber auch von Caatinga, Mata Atlântica und anderen Ökoregionen. Als Kern der Campos Rupestres bezeichnen Alves & Kolbek (2010) die Serra do Espinhaço in den brasilianischen Bundesstaaten Minas Gerais und Bahia. Aber auch in anderen Gebirgszügen wie der Serra da Mantiqueira, Serra do Mar, Serra de Diamantina und Serra da Canastra kommen Campos Rupestres in größerem Umfang vor. Viele der Plateaus (portugiesisch: Chapada) und Hochebenen (portugiesisch: Planalto) sind durch steile Abhänge von der Umgebung abgesetzt und haben somit mehr oder weniger insularen Charakter. Diese Regionen werden auch als Mar de Morros (portugiesisch für „Meer der



**Abbildung 9: Klima, Biome und Geländehöhe im Verbreitungsgebiet von *Dyckia***

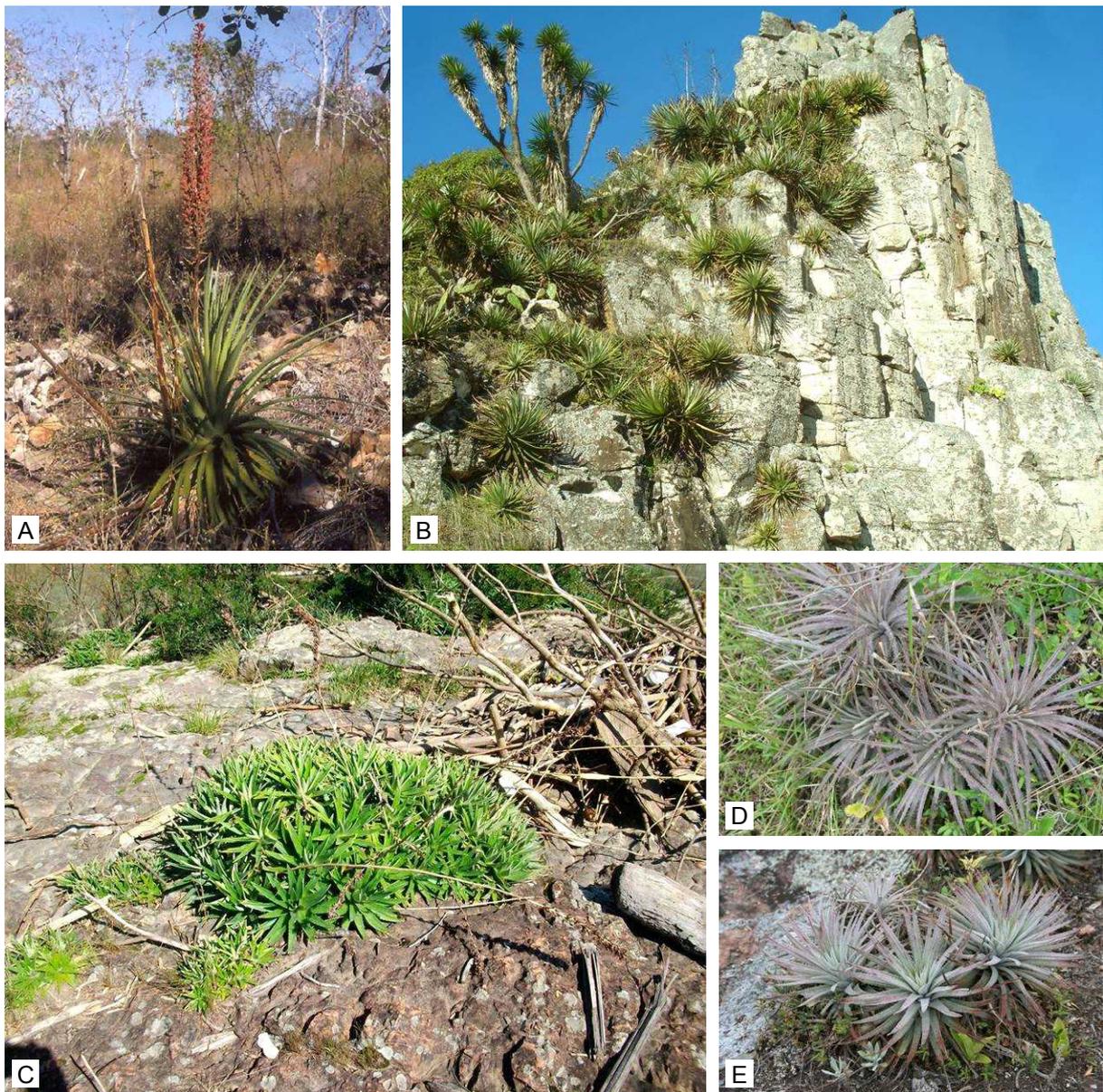
A: Effektive Klimaklassifikation nach Köppen und Geiger (Karte nach Kottek et al. 2006; Peel et al. 2007). Die Legende enthält nur die drei in der Karte auftretenden Hauptgruppen. B: Haupt-Habitattypen (Biome) nach Olson et al. (2001). C: Reliefkarte basierend auf SRTM- und GTOPO30-Daten (erstellt nach Braxmeier 2012). Höhen über 2000 m sind auf die Anden beschränkt und grau dargestellt. D: Fundorte von *Dyckia* (grün: in dieser Arbeit analysierte Pflanzen, türkis: Fundorte nach GBIF(2007), blau: Fundorte nach Smith & Downs(1974)). Das auf Basis der Fundortdaten angenommene Verbreitungsgebiet ist grün hinterlegt. Siehe auch Abbildung 13.

Hügel“) bezeichnet. Aber selbst weit entfernt von diesen Gegenden gibt es kleinere isolierte Campos Rupestres, so etwa in der Serra dos Carajas im Westen von Pará in Amazonien.

Charakteristisch für die Campos Rupestres sind der felsige und flachgründige Untergrund, der aus Quarzit oder Sandstein, seltener aus Granitgneis oder Eisenstein besteht. Die aus der Verwitterung dieser Gesteine resultierenden Böden unterscheiden sich grundlegend von den Böden des umgebenden Cerrados, die überwiegend von nährstoffarmem Laterit mit hohen Konzentrationen an Eisen und Aluminium gebildet werden. Insbesondere Aluminium kann für Pflanzen problematisch sein (Haridasan 2008). In heutiger Zeit befinden sich die Campos Rupestres in Höhen von 800-2.000 m (Alves & Kolbek 1994; 2010). Antonelli et al. (2010) geben als Untergrenze 1.000 m an. Die meisten Vertreter von *Dyckia* leben typischerweise in Höhen zwischen 800-1.500 m, was sich mit der Verbreitung der Campos Rupestres deckt.

### Savannengebiete

Die Campos Rupestres stellen ein sehr offenes Gelände mit exponiertem Fels und nur wenigen kleinen Sträuchern dar. In geringerer Vielfalt finden sich Arten von *Dyckia* auch in den die Campos Rupestres umgebenden Savannen, insbesondere dem Cerrado. Dabei finden sich unter den zur Ökoregion Cerrado zusammengefassten teils sehr unterschiedlichen Savanntypen gänzlich baumlose Grasländer bis hin zu halbimmergrünen Wäldern. Furley (1999) beschreibt fünf Untertypen, die vom gänzlich offenen Campo Limpo (portugiesisch für „sauberes Feld“), über die zunehmend mit Gehölzen bedeckten Typen Campo Sujo (portugiesisch für „schmutziges Feld“), Campo Cerrado (portugiesisch für „geschlossenes Feld“) und Cerrado sensu stricto (portugiesisch für „geschlossen“) bis hin zur Cerradão (portugiesisch für „großes Cerrado“) genannten Baumsavanne reichen. Sowohl die Nährstoffarmut der Böden als auch die Feuergefahr nehmen vom Grasland hin zum Cerradão ab. Arten von *Dyckia* kommen zumindest in den offeneren Formationen bis hin zum Cerrado sensu stricto vor, für gewöhnlich in besonders trockenen Gebieten. Beispielsweise *D. irwinii* wächst in offenem Buschland und Rändern von Büschen freier Bereiche in Höhen von 400-525 m, kommt in gänzlich offenen Gebieten aber nicht vor. Auch *D. linearifolia* ist auf offenes Buschland in 575-650 m beschränkt. *D. grandidentata* lebt in etwa 240 m Höhe auf felsigem Untergrund zwischen Bäumen und Sträuchern, also einem eher geschlossenen Cerrado (Braun & Pereira 2008).



**Abbildung 10: Lebensraum von *Dyckia***

Verschiedene Vertreter von *Dyckia* im Habitat. A: *D. edwardii* in einem sehr xeromorphen Campo Cerrado (Typusstandort, nördliches Goiás, Brasilien). B: *D. maritima* auf exponiertem Fels nahe der Küste (Praia da Guarita, Torres, Rio Grande do Sul, Brasilien). C: *D. brevifolia* in einem saisonal ausgetrockneten Flussbett (Tal des Itajaí, Brasilien). D: *D. julianae* in einem eher mesomorphen Habitat. E: *D. hebdingii* in Gesellschaft mit Moosen und Flechten. Bild A aus Braun et al. (2008a) mit freundlicher Genehmigung von Pierre Braun (Kerpen, Deutschland), Bilder B und C mit freundlicher Genehmigung von Constantino Gastaldi (Joinville, Santa Catarina, Brasilien), Bilder D und E mit freundlicher Genehmigung von Holger Sachs (Hamburg, Deutschland).

### Azonale Standorte in anderen Ökoregionen

Während Arten von *Dyckia* in den Campos Rupestres und auch Teilen der umgebenden Savannen zur typischen Vegetation gehören, sind sie in anderen Ökoregionen auf azonale Standorte mit untypischen Bedingungen beschränkt. Porembski et al. (1998) beschrieben *Dyckia* und auch *Encholirium* als Teil der Vegetation von Inselbergen der Mata Atlântica.

Selbst in Amazonien kommt *Dyckia* auf geeigneten felsigen Habitaten wie kleinflächigen Vorkommen von Cerrado und Campos Rupestres vor (Smith & Downs 1974), während ansonsten Regenwälder dominieren.

Einige Vertreter von *Dyckia* leben nahezu auf Meereshöhe entlang der Atlantikküste im Süden Brasiliens und Uruguays. So finden sich beispielsweise *D. maritima* und *D. encholirioides* in felsigen Küstenhabitaten, zumeist in unmittelbarer Nähe zum Meer. Für den Süden Brasiliens, Uruguay und Teile Argentiniens ist ansonsten die Vegetation der Pampas typisch, durchsetzt von überwiegend granitischen Felskuppen (Olson et al. 2001; Overbeck et al. 2007). Winkler (1982) beschreibt die Pampa von Rio Grande do Sul, die den größten Teil dieses Bundesstaates bedeckt, als völlig frei von Vertretern der Bromeliaceae. Felsige Extremitope dieser Region werden dagegen fast immer von *Dyckia* besiedelt. Ein Beispiel ist die streng endemische *D. choristaminea*, welche auf Standorten bis zu 80 m über dem Meeresspiegel lebt. Weit verbreitet im südöstlichen Bolivien, dem nordöstlichen Argentinien, dem Süden Brasiliens und in Paraguay ist *D. leptostachya*, welche ebenfalls bis hinab auf Meereshöhe auftritt (Smith & Downs 1974).

Schließlich kommen auch einige Vertreter von *Dyckia* bis hoch in die Vorgebirge der Anden vor. Beispiele sind *D. floribunda* und *D. velascana*, welche im Nordwesten Argentiniens weit verbreitet sind.

### Rheophyten

Einen ungewöhnlichen Lebensraum besiedeln die rheophytischen *Dyckia*-Arten im Süden Brasiliens. Die Pflanzen wachsen in 30-400 m über Meereshöhe direkt in Flussbetten oder auf kleinen Sandbänken und überstehen die Regenzeit komplett untergetaucht. Für den Rest des Jahres zeichnen sich solche Biotope durch extreme Trockenheit aus (Abbildung 10 C). Zwei Arten finden sich am Rio Itajaí, *D. ibiramensis* ist ein strenger Endemit in einem kurzen Abschnitt des Oberlaufes um die Stadt Ibirama (Smith & Downs 1974; Hmeljevski et al. 2011). *D. brevifolia* besitzt ein größeres Verbreitungsgebiet flussabwärts bis nach Blumenau (Smith & Downs 1974; Rogalski 2007; Hmeljevski et al. 2011). Die ähnliche *D. distachya* kam geographisch deutlich getrennt von diesen beiden Arten an den Flüssen Rio Uruguay, Rio Parana und Rio Pelotas vor. Durch intensive Denaturierung der Flussläufe im Zuge von Dammbauten ist diese Art aber in ihrem natürlichen Habitat bis auf eine letzte Population ausgestorben (Smith & Downs 1974; Pompelli & Guerra 2004; 2005; Lobo et al. 2008; Wiesbauer 2008; Voltolini et al. 2009).

### 1.2.3 Physiologie, Ökologie und Fortpflanzungsbiologie

Als Bewohner überwiegend trockener und heißer Standorte verfügen Vertreter von *Dyckia* über eine Reihe physiologischer und morphologischer Anpassungen. Wie auch *Deuterocohnia* und *Encholirium* betreiben alle bisher untersuchten *Dyckia*-Arten CAM-Photosynthese (Crayn et al. 2004). Eine vergleichende Studie zum Stoffwechsel von *D. distachya* und *Vriesea platynema* zeigte, dass *D. distachya* einen hohen Grad an Anpassungsfähigkeit und effektive Mechanismen zum Überleben unter widrigen Bedingungen aufweist (Uarrota et al. 2012). Als xeromorphe Anpassungen sind vor allem die Blattsukkulenz und der Fraßschutz durch die teils extreme Bestachelung zu nennen (Abbildung 11 A-C, vgl. 1.2.1). Ferner kann die starke Beschuppung vieler Arten als Schutz vor intensiver Strahlung und vor übermäßiger Verdunstung interpretiert werden. Die Bildung von Kolonien oder Polstern schafft ein günstiges Mikroklima und kann der Verdunstung auch aus dem unter der Pflanze befindlichen Substrat vorbeugen (Abbildung 11 D).

Für die Pflanzengesellschaften des Cerrados stellen verheerende Flächenbrände eine ständige Bedrohung dar. Simon et al. (2009) vermuten eine Zunahme von Bränden in den letzten vier Millionen Jahren in Zusammenhang mit dem verstärkten Aufkommen leicht entzündlicher C4-Gräser in den Savannen. Widerstandsfähigkeit gegen Feuer stellt demnach eine wichtige Schlüsselinnovation für viele Bewohner dieser Lebensräume dar und mag auch als Motor zur schnellen Diversifizierung in vielen Pflanzengruppen gedient haben. Benzing (2000) beschreibt für die in den Campos Rupestres vorkommenden Vertreter von *Dyckia* und *Encholirium* eine ausgeprägte Resistenz gegen Feuer. So isolieren die stängelumfassenden Blattscheiden die Sprossachse gegen die Hitze, die Pflanzen können anschließend wieder austreiben. Teilweise bieten die Wände von mit den Pflanzen assoziierten Termitennestern zusätzlichen Schutz vor Feuer.

Für *D. maritima* wurde eine besondere Anpassung an die teils extrem nährstoffarmen Böden beobachtet. So wachsen diese Pflanzen regelmäßig auf Nestern von Termiten der Art *Cortaritermes silvestrii*, welche ein ausreichendes Angebot an Nährstoffen bereitstellen. Diese Gemeinschaft ist ein gutes Beispiel für einen fakultativen Mutualismus, da die stark bewehrten Pflanzen einen guten Schutz für die Nester darstellen. Nur äußerst selten finden sich Termitennester ohne assoziierte Pflanzen von *D. maritima* (Waldemar & Irgang 2003). Auch für *D. brasiliiana* wurde eine häufige Assoziation mit Termitennestern beschrieben (Smith 1966).

Die Blütezeit der meisten Arten von *Dyckia* liegt meistens zwischen Oktober und Januar. Ausnahmen bilden beispielsweise *D. reitzii* sehr früh im September und *D. selloa* bis in den



**Abbildung 11: Xeromorphe Anpassungen , extraflorale Nektarien und Bestäubung**

A: Stark bewehrte Blattränder als Fraßschutz bei *D. goehringii*, B: Querschnitt durch ein stark sukkulenten Blatt von *D. marnier-lapostollei* mit ausgedehntem Speichergewebe, C: Ausgeprägte Beschuppung bei *D. marnier-lapostollei*, D: Bildung einer dichten Kolonie aus Blattrosetten durch vegetative Proliferation bei *D. rariflora*. E: Nektartropfen aus extrafloralen Nektarien bei *D. choristaminea* . F: Zahlreiche Ameisen auf einer *D. spec.* in der Sammlung von Elton Leme (Teresópolis, Brasilien), G: *Colibri serrirostris* an Blüten von *D. tuberosa*. Bild F mit freundlicher Genehmigung von Nicole Schütz. Bild G mit freundlicher Genehmigung von Leandro Freitas (Rio de Janeiro, Brasilien).

April hinein (Winkler 1982). Als Bestäuber fungieren insbesondere Kolibris (beispielsweise *Colibri serrirostris*, *Clorostilbon aureoventris*, *Augastes scutatus* oder *Sappho sparganura*), Bienen und Schmetterlinge (beispielsweise *Papilio thoas*), aber auch andere Insekten wie

das Neozoon *Apis mellifera* (Sazima et al. 1989; Bernadello et al. 1991; Vesprini et al. 2003; Freitas & Sazima 2006). Die meisten Arten gelten als selbstfertil, bei einigen Arten wie etwa *D. tuberosa*, *D. mauriziae* oder *D. braunii* konnte aber auch Selbstinkompatibilität beobachtet werden, was innerhalb der gesamten Bromeliaceae vergleichsweise selten ist (Vosgueritchian & Buzato 2006; Braun et al. 2008b; Esteves & Hofacker 2011). Die Spezifität bezüglich der Bestäuber ist vermutlich meist gering. So wurden an *D. distachya* diverse Schmetterlingsarten, Schwebfliegen, verschiedene Bienenarten und Kolibris beobachtet (Wiesbauer 2008).

Bei vielen Arten von *Dyckia* befinden sich extraflorale Nektarien entlang der Infloreszenzen (Abbildung 11 E). Die produzierte Menge an Nektar ist teils beträchtlich und stellt eine hohe Investition an Energie dar. Vesprini et al. (2003) beobachteten eine deutlich gesteigerte Samenproduktion bei *D. floribunda*, wenn die Pflanzen regelmäßig von Ameisen besucht werden. Dies wird auf die erfolgreiche Verteidigung der aggressiven Insekten gegen Herbivoren zurückgeführt. Im Gegensatz zu den unbewehrten und exponierten Infloreszenzen weisen die Blattrosetten keine extrafloralen Nektarien auf. Auch bei in botanischen Gärten kultivierten Pflanzen können häufig Ameisen auf den Infloreszenzen von *Dyckia* beobachtet werden (Abbildung 11 F).

Alle Arten von *Dyckia* sind Windstreuer. Der Wind bewegt die elastischen Blütenstände und die Samen werden dann über kurze Distanzen geschleudert (Sitte et al. 2002). Boleochorie gilt jedoch als ineffektive Form der Samenverbreitung (Versieux & Wendt 2006), was in Anbetracht der verhältnismäßig großen Samen für *Dyckia* besonders zutreffend sein mag (vgl. Abbildung 4). Die Samen von *Dyckia* sind zur Keimung in völliger Dunkelheit fähig, während *Encholirium* ausschließlich im Licht keimt. Dieser Umstand kann beispielsweise relevant für die Keimung in Felsspalten sein (Tarré et al. 2007). Für *D. encholirioides*, welche nahe den Küsten des südlichen Brasiliens vorkommt, konnte eine hohe Resistenz der Samen gegen Salz gezeigt werden. Zwar reduziert ein salines Milieu die Keimfähigkeit, jedoch ist dieser Einfluss reversibel. So überleben die Samen und können erfolgreich keimen, wenn der Salzgehalt in der Umgebung abnimmt (Pompelli et al. 2006).

### 1.2.4 Taxonomische Geschichte

Die gültige Erstbeschreibung der Gattung *Dyckia* lieferte 1830 Julius Hermann Schultes (\*1804, †1840) durch die Publikation dreier Arten (Schultes & Schultes 1830). Er benannte die Gattung nach dem deutschen Adligen und Amateurbotaniker Joseph zu Salm-Reifferscheidt-Dyck (\*1773, †1861). Von den drei publizierten Arten wurde erst sehr viel

später *D. densiflora* als Lectotypus für die Gattung definiert (Smith 1979; Grant & Zijlstra 1998).

Im selben Jahr beschrieb Karl Friedrich Philipp von Martius (\*1794, †1868) die Gattung *Encholirium* als monotypisch mit dem einzigen Vertreter *E. spectabile* (Schultes & Schultes 1830).

Karl Heinrich Koch (\*1809, †1879) beschrieb 1873 *Prionophyllum* als monotypische Gattung mit dem einzigen Vertreter *P. selloum* und grenzte sie durch das Vorhandensein andromonöischer Blüten gegen *Dyckia* mit zwittrigen Blüten ab (Koch 1873). Wenig später synonymisierten George Bentham (\*1800, †1884) und Joseph Dalton Hooker (\*1817, †1911) *Encholirium* und *Prionophyllum*, was jedoch nie wieder aufgegriffen wurde. Ferner führten sie die griechische Schreibweise *Encholirion* ein, die zwar taxonomisch gesehen falsch ist, aber in der Literatur immer noch vereinzelt auftaucht (z. B. Terry et al. 1997).

Im 1889 erschienenen Handbook of the Bromeliaceae (Baker 1889) findet sich eine erste umfassende taxonomische Bearbeitung von *Dyckia*. John Gilbert Baker (\*1834, †1920) listet insgesamt 34 überwiegend von ihm selbst beschriebene Arten und drei Varietäten auf, verteilt auf fünf Untergattungen (*Dyckia*, *Prionophyllum*, *Navia*, *Cephalonavia* und *Encholirion*). Von diesen 34 Arten wurden viele im Laufe der Zeit in andere, teils weit entfernte Gattungen wie *Connellia* und *Navia* gestellt. Die Gattung *Encholirium* wurde später nie wieder in *Dyckia* mit einbezogen.

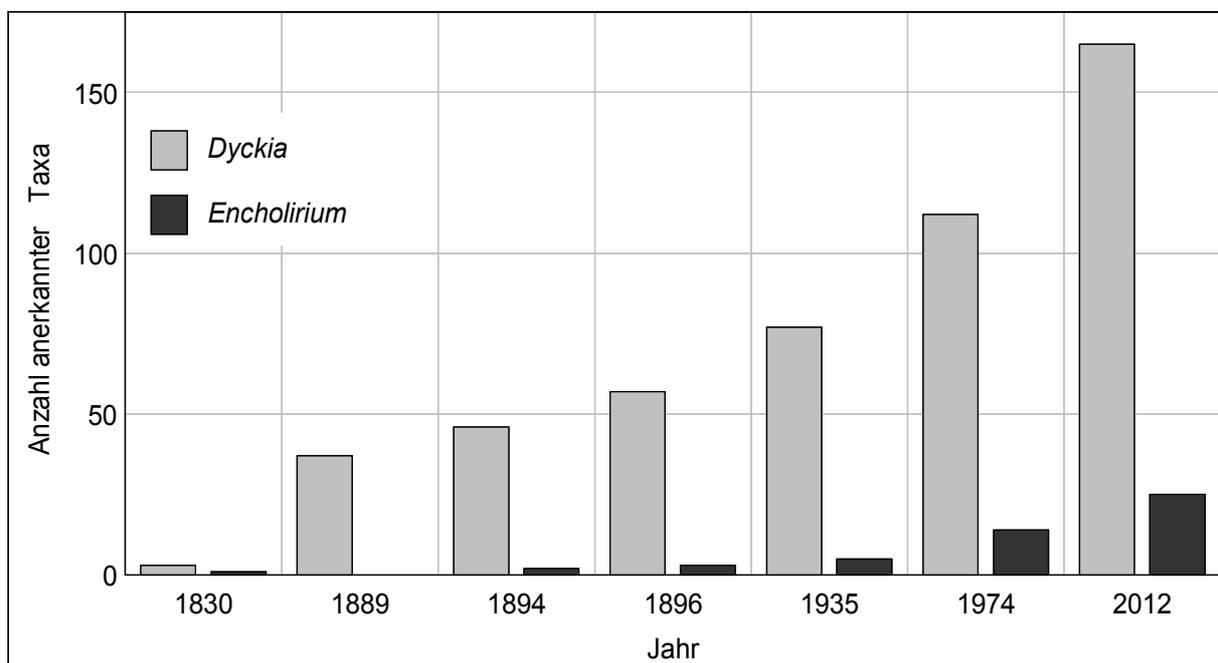
Die nächste umfassende Bearbeitung von *Dyckia* veröffentlichte Carl Christian Mez (\*1866, †1944) im dritten Band der Flora Brasiliensis (Mez 1894). Hier finden sich 46 Arten innerhalb von *Dyckia*, darunter 19 von Mez neu beschriebene. *Prionophyllum* wird in dieser Arbeit als eigenständige monotypische Gattung mit *P. selloum* geführt. *Encholirium* wird mit den zwei Arten *E. spectabile* und *E. glaziovii* erwähnt.

Bereits kurze Zeit später führt Mez in einer eigenen Monographie der Bromeliaceae bereits 57 Arten für *Dyckia* auf, darunter 15 hier erstmals beschriebene (Mez 1896). *Prionophyllum* enthält mit der neu beschriebenen *P. maritimum* nun zwei Arten. Die 1851 als monotypisch beschriebene Gattung *Garrelia* (Gaudichaud-Beaupré 1851) wird als *D. encholirioides* nun zu *Dyckia* gestellt. *Encholirium* wird hier mit drei Arten angegeben, darunter die neu beschriebene *E. subsecundum*.

Carl Christian Mez publizierte später noch eine weitere Monographie der gesamten Bromeliaceae (Mez 1935). Innerhalb von *Dyckia* zählt er 77 Arten auf. *Prionophyllum* wird

hier unverändert mit zwei Arten angegeben. *Encholirium* enthält fünf Arten. Damit beschrieb Mez im Laufe seines Lebens insgesamt 49 Taxa innerhalb von *Dyckia*.

In der folgenden Zeit machte sich in besonderem Maße Lyman Bradford Smith (\*1904, †1997) um die Gattung *Dyckia* und die Bromeliaceae verdient. So beschrieb er insgesamt 55 Taxa innerhalb von *Dyckia*. Die bis heute umfassendste und aktuellste Monographie der Bromeliaceae und damit auch die bisher letzte Bearbeitung der Gattung *Dyckia* findet sich schließlich in Band 14 der Flora Neotropica (Smith & Downs 1974; 1977; 1979). Für *Dyckia* finden sich hier 106 Arten und sechs nicht typische Varietäten, *Encholirium* ist mit 14 Arten vertreten. Die drei ehemals zu *Prionophyllum* gestellten Arten sind nun in *Dyckia* enthalten.



**Abbildung 12: Historische Entwicklung der Anzahl anerkannter Arten von *Dyckia* und *Encholirium***

Gezeigt ist der Umfang der Gattungen *Dyckia* und *Encholirium* in verschiedenen historischen Werken und heute. Die Jahreszahlen stehen für folgende Werke: *Systema vegetabilium* (Schultes & Schultes 1830), *Handbook of the Bromeliaceae* (Baker 1889), *Flora Brasiliensis* (Mez 1894), *Monographiae Phanerogamarum* (Mez 1896) und *Flora Neotropica* (Smith & Downs 1974). Die Angaben für 2012 beziehen die jüngste Literatur mit ein.

Seit 1991 publizierte Harry Luther regelmäßig neue Versionen einer Liste anerkannter Gattungen und Arten der Bromeliaceae. Die aktuelle und vermutlich finale 11. Ausgabe (Luther 2008) enthält für *Dyckia* 131 Arten und sieben nicht typische Varietäten. Seit deren Veröffentlichung wurden allerdings schon 27 weitere Arten für *Dyckia* neu beschrieben (Braun & Pereira 2008; Braun et al. 2008a; Strehl 2008; Braun & Pereira 2009; Braun et al. 2009; 2010; Leme 2010; Leme et al. 2010; Esteves & Hofacker 2011; Leme & Kollmann 2011; Guarçoni et al. 2012; Leme et al. 2012), so dass derzeit 158 gültige Arten und sieben

Varietäten für *Dyckia* existieren. Während der gesamten taxonomischen Geschichte von *Dyckia* waren insgesamt über 240 Taxa beschrieben worden.

Während die Flora Neotropica für *Dyckia* die letzte Bearbeitung darstellt, existiert für *Encholirium* eine aktuelle taxonomische Revision (Forzza 2005). Hier werden 23 der 47 während der gesamten taxonomischen Geschichte von *Encholirium* beschriebenen Arten anerkannt, eine davon mit vorläufiger Beschreibung (als *E. sp. nov. ined.*). Seitdem wurden drei weitere Arten beschrieben (Leme 2010; Forzza & Zappi 2011). Abschließend lässt sich feststellen, dass die Gattung *Dyckia* seit der letzten taxonomischen Bearbeitung von 112 auf 165 Taxa erweitert wurde. Insbesondere in jüngster Zeit hat die Publikation neuer Arten stark zugenommen, was eine umfassende taxonomische Revision der Gattung mehr als wünschenswert macht (Abbildung 12).

### **1.3 Ziele dieser Arbeit**

#### **1.3.1 Bisherige wissenschaftliche Arbeiten zu *Dyckia***

Abgesehen von taxonomischen Bearbeitungen (vgl. 1.2.4) wurden bisher keine die gesamte Gattung umfassenden Arbeiten zu *Dyckia* durchgeführt. Nichtsdestotrotz lässt sich aus bisher zu den unterschiedlichsten Aspekten publizierten Arbeiten ein recht genaues Bild von *Dyckia* zeichnen.

Insbesondere Erstbeschreibungen jüngerer Datums enthalten neben der Diagnose häufig eine Fülle weiterer Informationen zu Standort, Vergesellschaftung, Ökologie und mutmaßlichen Verwandtschaftskreisen innerhalb der Gattung (z. B. Rauh 1985; 1987; 1988; Till & W. Morawetz 1990; Rauh & Groß 1991; Braun et al. 2008a; 2008b; 2009; Strehl 2008; Leme et al. 2010; 2012). Informationen zur Gattung *Dyckia* finden sich auch in diversen Arbeiten, die sich mit den Bromeliaceae im Allgemeinen beschäftigen, wenngleich diese Arbeiten meist lokal begrenzte Gebiete abhandeln (Smith 1934; Winkler 1980; 1982; Versieux & Wendt 2006; 2007).

Ferner gibt es Studien zur Keimungsfähigkeit von *Dyckia* und *Encholirium* unter verschiedenen Bedingungen und zum Einfluss von Lagerung und Kryokonservierung (Tarré et al. 2007). Ebenfalls einen Vergleich zwischen *Dyckia* und *Encholirium* zieht eine Arbeit zur Wurzelanatomie beider Gattungen (Pita & Menezes 2002). Immerhin 12 Vertreter von *Dyckia* wurden in eine Arbeit zur Samenmorphologie einbezogen (Strehl & Beheregaray 2006). In dieser Studie versuchten die Autoren, über biometrische Analysen die untersuchten Arten in Gruppen einzuteilen.

Eine häufige Motivation, sich mit einzelnen *Dyckia*-Arten auseinanderzusetzen, liegt wohl in auch der anhaltenden Bedrohung ihrer natürlichen Standorte. So wurden an *D. agudensis*, *D. distachya* und *D. maritima* diverse Arbeiten zu ex situ-Konservierung, somatischer Embryogenese und Mikropropagation durchgeführt (Pompelli & Guerra 2004; 2005; Pompelli et al. 2005; Silva et al. 2007; 2008).

Besonders interessant für die vorliegende Arbeit sind Studien zur Ökologie und Reproduktion von *Dyckia*. Für *D. floribunda* wurde beispielsweise der positive Einfluss von auf den Pflanzen lebenden Ameisen auf den Reproduktionserfolg erforscht (Vesprini et al. 2003). Bei *D. maritima* wurde ein fakultativer Mutualismus zwischen den Pflanzen und Termiten, auf deren Bauten sie wachsen, ausgemacht (Waldemar & Irgang 2003). An *D. tuberosa* wurden Blütenökologie und Bestäubung (Vosgueritchian & Buzato 2006) sowie das Keimungsverhalten ihrer Samen in Abhängigkeit von Licht und Temperatur studiert (Vieira et al. 2007). Für *D. encholirioides* wurde ebenfalls der Einfluss von unterschiedlichen Temperaturen und auch der Salzkonzentration auf das Keimungsverhalten untersucht (Pompelli et al. 2006). Für *D. pseudococcinea* schließlich existieren Arbeiten zur Beschaffenheit der Samen und der Entwicklung der Embryonen (Conceição et al. 2007; Mendes et al. 2010).

Besonders gut untersucht sind die drei südbrasilianischen rheophytischen Arten *D. brevifolia*, *D. distachya* und *D. ibiramensis* betrachten. Hier gibt es ausgedehnte Studien zu anatomischen (Lobo 2007; Lobo et al. 2008; Voltolini et al. 2009) und ökologischen Besonderheiten (Rogalski 2007; Rogalski et al. 2009). Auch die Struktur von Populationen und der Genfluss zwischen solchen wurden an diesen Arten untersucht (Rogalski et al. 2007; Hmeljevski et al. 2011). Für *D. distachya* wurden detaillierte Untersuchungen zum Stoffwechsel durchgeführt (Uarrota et al. 2012).

### **1.3.2 Bisherige molekulare Arbeiten an *Dyckia***

Größere molekulare Untersuchungen zur Phylogenie von *Dyckia* und auch *Encholirium* wurden bisher nicht durchgeführt. In Arbeiten, welche andere Gattungen oder die gesamte Familie der Bromeliaceae zum Gegenstand hatten, wurden jeweils nur eine, zwei oder maximal vier Akzessionen von *Dyckia* und *Encholirium* in die Untersuchungen eingeschlossen (Terry et al. 1997; Horres et al. 2000; Crayn et al. 2004; Givnish et al. 2004; 2007; 2011; Rex et al. 2009). Im Rahmen einer kürzlich als Dissertation publizierten taxonomischen Revision der Gattung *Deuterocohnia* wurden acht Akzessionen von *Dyckia* und zwei Arten von *Encholirium* in eine molekulare Phylogenie einbezogen, die allerdings nur eine geringe Auflösung zeigte (Schütz 2012).

Die bisher umfangreichste Studie zu *Dyckia* wurde im Rahmen der Diplomarbeit des Verfassers durchgeführt und basiert auf den beiden plastidären Loci *rp132-trnL* und *matK* (Krapp 2009). Eine begrenzte Auflösung und statistische Unterstützung der ermittelten Phylogenie sowie die limitierte Zahl an Proben, insbesondere von *Encholirium*, ließen aber keine belastbare Hypothesen zu. So konnten weder das Verhältnis von *Dyckia* und *Encholirium* zueinander geklärt werden, noch wurden Gruppierungen innerhalb von *Dyckia* mit ausreichender Unterstützung gefunden. Ferner brachte die Verwendung zahlreicher, aus Botanischen Gärten stammenden Pflanzen ohne gesicherte Dokumentation Probleme bezüglich der Interpretation mit sich.

### 1.3.3 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Rekonstruktion der Phylogenie der Gattung *Dyckia* und ihre Evaluierung in Bezug auf folgende Fragen:

#### Verhältnis von *Dyckia* und *Encholirium*

- Stellen die Gattungen *Dyckia* und *Encholirium* jeweils monophyletische Abstammungsgemeinschaften dar und wie ist ihr Verhältnis zueinander? Wann und wo trennten sich die Gattungen voneinander?

#### Verwandtschaftliche Beziehungen innerhalb von *Dyckia*

- Können mittels vergleichender Sequenzierung plastidärer oder nukleärer DNA gut aufgelöste Phylogenien innerhalb von *Dyckia* rekonstruiert werden? Zeichnen sich Kladen innerhalb von *Dyckia* durch morphologische Synapomorphien aus?

#### Historische Biogeographie von *Dyckia*

- Auf welchen Wegen gelangten die rezenten Vertreter von *Dyckia* in ihre heutigen Verbreitungsgebiete? In welchem zeitlichen Rahmen spielten sich die Ausbreitung und Diversifizierung von *Dyckia* ab?

#### Artenzahl und Artabgrenzung

- Welche Faktoren führten zur außergewöhnlich hohen Artenzahl von *Dyckia* verglichen mit *Encholirium*? Gab es Radiationen?
- Stellen die vielen beschriebenen Morphospezies distinkte genetische Abstammungseinheiten dar? Spiegelt sich die Plastizität morphologischer Merkmale auch in der genetischen Situation wider?

### **1.3.4 Einführung in die Methodik dieser Arbeit**

Zur Bearbeitung der gegebenen Fragestellung kamen molekulare Methoden zum Einsatz. Um die Auflösung der aus Sequenzdaten gewonnenen Phylogenien zu erhöhen, kamen neben der vergleichenden Sequenzierung von Bereichen des plastidären und des nukleären Genoms auch plastidäre Mikrosatellitenmarker zum Einsatz.

#### Plastidäre Sequenzen

Der große Vorteil plastidärer DNA ist die einfache Handhabbarkeit. Die hohe Kopienzahl des Plastoms pro Zelle erlaubt eine problemlose Amplifikation spezifischer Zielsequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) selbst aus DNA-Proben von geringer Qualität. Ferner tragen für gewöhnlich alle Plastiden einer Pflanze dieselbe Information. Dies liegt an der geringen Geschwindigkeit der Sequenzevolution, fehlenden Rekombinationsereignissen und den regelmäßigen genetischen Flaschenhälsen, die Plastiden-Populationen bei der Weitergabe über Samen durchlaufen (z. B. Small et al. 2004). Zudem bietet die strukturelle Uniformität sowie die hohe Konservierung von Sequenz und Abfolge von bestimmten Genen auf dem Plastom die Möglichkeit, universelle Primer zu entwickeln, die in vielen Pflanzengruppen funktionieren (Shaw et al. 2007; Knoop & Müller 2009). Die vergleichende Sequenzierung plastidärer Loci ist eine Standardmethode der Molekularsystematik bei Pflanzen und wurde innerhalb der Bromeliaceae für eine Vielzahl an Fragestellungen verwendet (z. B. Barfuss et al. 2005; Rex et al. 2009; Schulte et al. 2009; Givnish et al. 2011).

#### Nukleäre Sequenzen

Phylogenetische Analysen mit Sequenzen des Plastoms spiegeln nur die Evolution der maternalen Linie wider, da Plastiden in den meisten Angiospermen ausschließlich von der Mutterpflanze weitergegeben werden. Diese Art der Vererbung wird auch für die Bromeliaceae angenommen (z. B. Jabaily & Sytsma 2010). Um die Evolution sowohl der maternalen, als auch der paternalen Linie nachvollziehen zu können, müssen biparental vererbte Teile des Genoms untersucht werden, also das Genom des Zellkerns. Im Vergleich zur Sequenzierung von Abschnitten des Plastoms weisen nukleäre Loci allerdings eine Reihe von Besonderheiten und technischen Schwierigkeiten auf, die berücksichtigt werden müssen (vgl. 2.2.3.2). Trotz des höheren methodischen Aufwands rücken nukleäre Loci zunehmend in den Fokus für molekularsystematische Studien, auch innerhalb der Bromeliaceae (z. B. Schulte et al. 2009; Chew et al. 2010; Jabaily & Sytsma 2010; Sass & Specht 2010).

Plastidäre Mikrosatelliten (SSRs)

So genannte Mikrosatelliten (simple sequence repeats, SSRs) bestehen aus kurzen, tandemartig aufeinanderfolgenden repetitiven DNA-Sequenzmotiven. Es handelt sich dabei um besonders schnell evolvierende Bereiche des Genoms. Das Plastom der Pflanzen enthält insbesondere Mononukleotid-Wiederholungen vom Typ  $(AT)_n$ . Diese plastidären SSRs (cpSSRs) stellen oft wertvolle Werkzeuge für Studien auf niedrigem taxonomischem Niveau dar. So variiert ihre Länge häufig sogar zwischen Individuen der selben Population, wo DNA-Sequenzen anderer plastidärer Loci keinerlei Variabilität zeigen. Bei einem Mangel an Auflösung in auf Sequenzierung basierenden Phylogenien können cpSSRs auch mit Sequenzdaten kombiniert werden (z. B. Bänfer et al. 2006). Von Analysen variablerer Datensätze werden SSRs dagegen häufig ausgeschlossen (z. B. Rex et al. 2009).

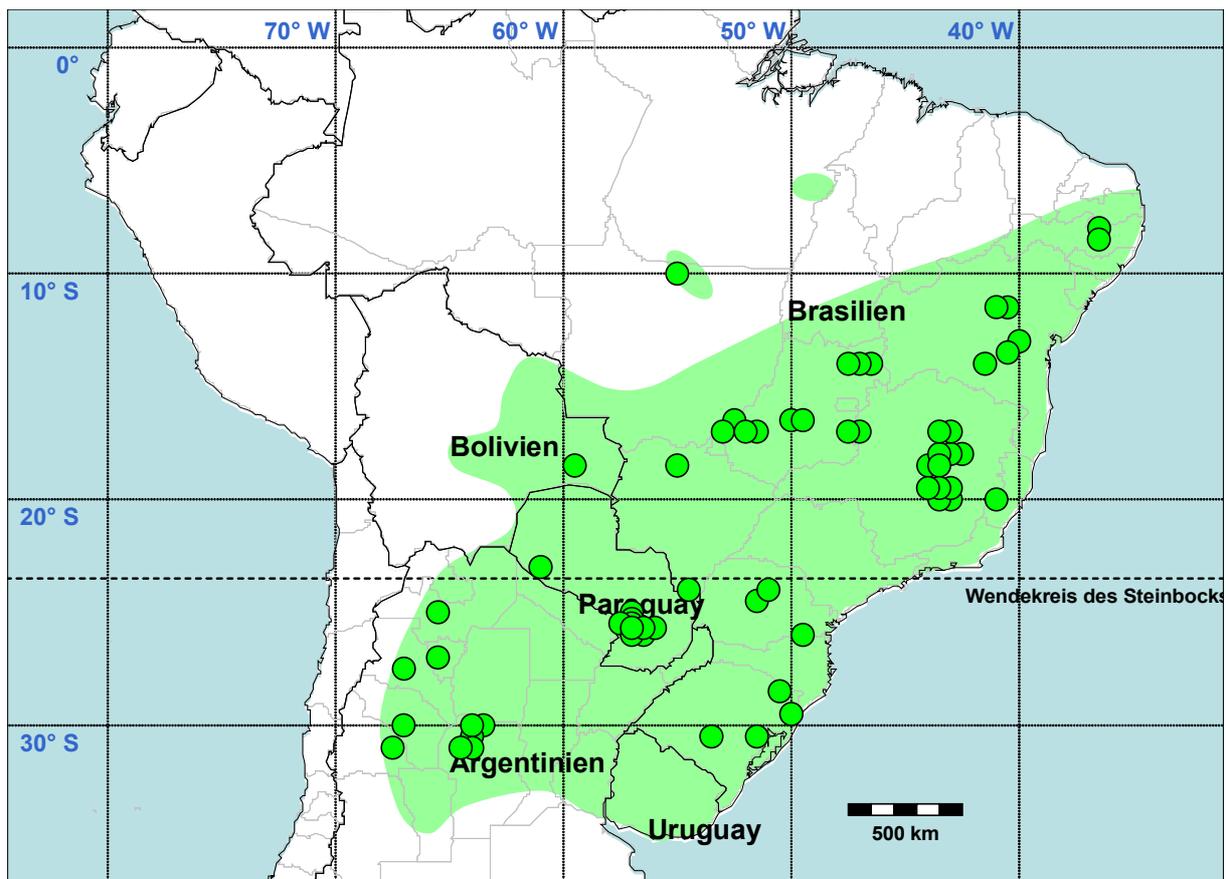
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

Das für die vorliegende Arbeit verwendete Pflanzenmaterial umfasste neben der Gattung *Dyckia* auch Vertreter nahe verwandter Gattungen (Tabelle 1). Das für die vergleichende Sequenzierung verwendete 124 Proben umfassende Set enthielt 97 Akzessionen aus 58 verschiedene Arten von *Dyckia*. Dies entspricht einer Abdeckung von 37% aller 158 derzeit gültigen Arten. Auch das Verbreitungsgebiet von *Dyckia* ist durch diese Auswahl gut abgedeckt (vgl. Abbildung 13). Die Gattung *Encholirium* war mit neun Akzessionen vertreten, darunter vier verschiedene Arten und fünf nicht genau identifizierte Pflanzen. Eine weitere Probe (*Gen. nov. spec. nov.*, FK0257) repräsentiert möglicherweise eine neue Gattung innerhalb der Unterfamilie Pitcairnioideae (Wanderley, unveröffentlichte Daten). Die Gattungen *Deuterocohnia*, *Fosterella* und *Pitcairnia* waren durch jeweils fünf Arten repräsentiert. Als Außengruppe für die Analysen plastidärer Daten wurden ferner zwei Arten der Gattung *Puya* eingeschlossen.

Für die Pilotexperimente zur Charakterisierung plastidärer Loci wurde ein aus acht *Dyckia*-Proben bestehendes Testset (TS2) zusammengestellt (vgl. gekennzeichnete Proben in Tabelle 1). Weitere 28 Proben von *Dyckia* wurden für die Etablierung der cpSSR-Marker verwendet. Diese setzten sich aus je vier Individuen von je drei Populationen der Arten *D. disstiflora* und *D. pernambucana* sowie aus vier Individuen einer Population von *D. limae* zusammen (vgl. gekennzeichnete Proben in Tabelle 1). Für die Sequenzierung mittels 454-Technologie wurde eine Akzession von *D. marnier-lapostollei* var. *estevessii* (FK0030) ausgewählt. Dieses Individuum ist eine im Botanischen Garten Heidelberg kultivierte Nachkommenschaft des Typusexemplares und verfügt über eine ausgezeichnete Dokumentation. Weiterhin nimmt der Plastiden-Haplotyp dieser Pflanze eine zentrale Stellung in einem auf plastidären Daten basierenden phylogenetischen Netzwerk ein (vgl. 3.2.2). Dieser Umstand wurde als Indiz dafür gewertet, dass eine gute Übertragbarkeit von für diese Pflanze entwickelten cpSSR-Markern und flankierenden PCR-Primerpaaren auf andere *Dyckia*-Arten wahrscheinlich sein würde (vgl. auch 4.1.5).

Bei Pflanzen aus Botanischen Gärten, insbesondere solchen, die schon lange in Kultur sind, ergeben sich oft Lücken in der Dokumentation. Pflanzen mit nicht eindeutig gekläarter Herkunft wurden für diese Arbeit zumeist nicht verwendet. Nur in Ausnahmefällen wurde Akzessionen ohne Sammler-Nummer oder Fundortangaben eingeschlossen, etwa wenn die entsprechende Art anderweitig nicht verfügbar war. Ein Problem stellt auch der Austausch



**Abbildung 13: Fundorte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzen von *Dyckia***

Schwarz umrandete grüne Kreise markieren die Fundorte derjenigen 62 Akzessionen, für welche Koordinaten verfügbar waren. Für weitere 35 Pflanzen waren die Fundorte nicht ausreichend dokumentiert, um ihnen Koordinaten zuordnen zu können. Dies betraf 25 Pflanzen aus verschiedenen Bundesstaaten Brasiliens, vier aus Argentinien, zwei aus Paraguay und je eine aus Bolivien und Uruguay. Der hellgrün hinterlegte Bereich markiert das Verbreitungsgebiet von *Dyckia*.

von Pflanzen der Botanischen Gärten untereinander dar, sofern keine eindeutigen Sammlernummern bekannt sind. Durch einen besonderen Augenmerk hierauf und den genauen Abgleich aller verfügbaren Daten konnte aber weitgehend ausgeschlossen werden, dass solche Duplikate im Probensatz enthalten waren.

Die Gefahr, dass in Kultur befindliche Pflanzen hybridisieren und aus Samen gezogene Nachkommen somit die genetische Identität der Elternpflanze verloren haben, besteht für *Dyckia* kaum. Eine Vermehrung in Botanischen Gärten erfolgt in der Regel rein vegetativ, also durch vereinzelte Kindel oder Teilung von Horsten und Polstern. Aus Samen gezogene Pflanzen werden für gewöhnlich entsprechend gekennzeichnet und wurden in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Vermehrung über Samen wegen der maternalen Vererbung der Chloroplasten keinen Einfluss auf Analysen auf Basis plastidärer Daten hat.

## Material und Methoden

**Tabelle 1: Pflanzenmaterial**

Die nachstehende Tabelle listet alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pflanzen auf. Zuerst sind die untersuchten Vertreter von *Dyckia* in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt, dann die Außengruppentaxa und zuletzt einige Populationsproben, die für die Charakterisierung plastidärer Mikrosatelliten (cpSSRs) verwendet wurden. Die in Klammern hinter den Artnamen angegebenen Abkürzungen (3-Buchstaben-Code) wurden für einige Abbildungen im Ergebnisteil verwendet. Die fortlaufend vergebene DNA-ID diente zur Identifikation der Proben im Labor und während der Datenanalyse (Ind.: Individuum-Nummer bei Populationen). Unter den DNA-IDs ist unter Verwendung der folgenden Abkürzungen vermerkt, für welche Projekte die entsprechenden Proben jeweils verwendet wurden (S: Sequenzierung an sechs plastidären Loci und *phyC*; C: Kombinierte Analyse von sechs plastidären Loci und 12 cpSSR-Loci, P: Entwicklung und Charakterisierung von cpSSR-Loci; T: Verwendung im Testset TS2 zur Etablierung von Loci zur Sequenzierung). Alle Fundorte sind jeweils als Kombination von Land (BR: Brasilien, BOL: Bolivien, DOM: Dominikanische Republik, MEX: Mexico, PE: Peru, PY: Paraguay, RA: Argentinien, RG: Guinea (Westafrika), ROU: Uruguay), Bundesstaat sowie Stadt oder Gegend angegeben (\*: Lokalität wurde anhand der bekannten Verbreitung der jeweiligen Art angenommen). Die Sammlernummern sind angegeben, falls bekannt (s. n.: ohne bekannte Nummer). Für alle Pflanzen, die in Lebendsammlungen kultiviert wurden, ist die Garten-ID angegeben (B: Botanischer Garten Berlin-Dahlem, BGHD: Botanischer Garten Heidelberg, BONN: Botanischer Garten Bonn, KAS: Botanischer Garten der Universität Kassel, Leme: Lebendsammlung von Dr. Elton Leme (Teresópolis, Brasilien), MB: Botanischer Garten Marburg, WU: Botanischer Garten der Universität Wien). Verweise auf bekannte Herbarbelege enthalten den Namen des Herbariums und eine Nummer, soweit bekannt (Leme: Herbarbeleg angefertigt von Elton Leme (Aufbewahrungsort unbekannt), B: Herbarium des Botanischen Gartens Berlin-Dahlem, FR: Herbarium Senckenbergianum (Frankfurt), HD: Herbarium des Botanischen Gartens Heidelberg, HB: Herbarium Bradeanum (Universität Rio de Janeiro), LGBV/UPFE: Herbarium der Universität Pernambuco (Recife, Brasilien), RB: Herbarium des Botanischen Gartens Rio de Janeiro (Brasilien), SP: Herbarium der Universität Sao Paulo, WU: Herbarium der Universität Wien).

Art Autor (Abkürzung)	DNA-ID (Verwendung)	Fundort (Koodinaten)	Sammler-Nummer Garten-ID/Herbarbeleg
<i>Dyckia aurea</i> L. B. Smith ( <i>aur</i> )	FK0194 (S)	BR, Goiás, Cristalina (-16,7536; -47,4975)	E. Leme 6445 Leme 6445 / (Leme)
<i>Dyckia beateae</i> E. Gross & Rauh ( <i>bea</i> )	FK0091 (SC)	BR, Mato Grosso do Sul, Coxim (-18,5; -54,75)	E. Estenes s. n. Leme 1961 / (Leme)
<i>Dyckia beateae</i> E. Gross & Rauh ( <i>bea</i> )	FK0044 (SC)	BR, Mato Grosso, Araquainha (-16,8167; -53,0833)	P. Braun 560 BONN 4338 / nicht vorhanden
<i>Dyckia brachyphylla</i> L. B. Smith ( <i>brc</i> )	FK0045 (SC)	BR, Minas Gerais, Itacambira (-17,0667; -43,3)	P. Braun 836 BONN 3644 / nicht vorhanden
<i>Dyckia braunii</i> Rauh ( <i>bra</i> )	FK0042 (SCT)	BR, Goiás	P. Braun 690 BONN 4339 / nicht vorhanden
<i>Dyckia brevifolia</i> ( <i>aff.</i> ) Baker ( <i>bre</i> )	FK0010 (SCP)	BR, Minas Gerais, Itacambira (-17,0667; -43,3)	P. Braun 840 BGHD 130223 / HD 602993
<i>Dyckia brevifolia</i> Baker ( <i>bre</i> )	FK0067 (SC)	BR	s. n. KAS s. n. / nicht vorhanden
<i>Dyckia choristaminea</i> Mez ( <i>cho</i> )	FK0021 (SC)	BR*, Rio Grande do Sul*	s. n. BGHD 130018 / nicht vorhanden
<i>Dyckia choristaminea</i> Mez ( <i>cho</i> )	FK0040 (SC)	BR*, Rio Grande do Sul*	s. n. BONN 2410 / nicht vorhanden
<i>Dyckia cinerea</i> Mez ( <i>cin</i> )	FK0047 (SC)	BR*, Minas Gerais*	s. n. BONN 4348 / nicht vorhanden
<i>Dyckia dawsonii</i> L. B. Smith ( <i>daw</i> )	FK0043 (SC)	BR*, Goiás*	s. n. BONN 16540 / nicht vorhanden
<i>Dyckia delicata</i> Larocca & Sobral ( <i>del</i> )	FK0184 (S)	BR, Rio Grande do Sul	E. Leme 6492 Leme 6492 / (Leme)
<i>Dyckia densiflora</i> Schult. f. ( <i>den</i> )	FK0213 (S)	BR, Minas Gerais, Serra da Piedade	E. Leme 4249 Leme 4249 / (Leme)
<i>Dyckia distachya</i> Hassl. ( <i>dit</i> )	FK0126 (S)	PY, Paraguari, Chololo	Ahlgrimm s.n. B 236-17-85-23 / Gartenherbarbeleg Berlin 26179
<i>Dyckia elisabethae</i> S. Winkl. ( <i>eli</i> )	FK0219 (S)	BR, Rio Grande do Sul, Barra do Ribeiro (-30,2911; -51,3011)	E. Leme 4461 Leme 4461 / (Leme)
<i>Dyckia encholirioides</i> (Gaudichaud) Mez ( <i>enc</i> )	FK0095 (SC)	BR	E. Leme s. n. Leme s. n. / (Leme)
<i>Dyckia espiritosantensis</i> Leme et al. ( <i>esp</i> )	FK0207 (S)	BR, Espírito Santo, São Roque do Canaã (-19,7506; -40,7541)	E. Leme 6930 Leme 6930 / (Leme)
<i>Dyckia estevesii</i> var. <i>braunii</i> nom. nud. Rauh ( <i>bra</i> )	FK0004 (SC)	BR, Goiás	P. Braun s. n. BGHD 130025 / HD 602437
<i>Dyckia estevesii</i> Rauh ( <i>est</i> )	FK0005 (SCT)	BR, Goiás, Caiaponia (-16,95; -51,8167)	E. Esteves Pereira s. n. BGHD 105012 / HD 602151
<i>Dyckia estevesii</i> Rauh ( <i>est</i> )	FK0001 (SCPT)	BR	P. Braun s. n. BGHD 105188 / HD 602392
<i>Dyckia estevesii</i> Rauh ( <i>est</i> )	FK0033 (SC)	BR*, Goiás*	P. Braun s. n. BONN 1477 / nicht vorhanden
<i>Dyckia ferox</i> Mez ( <i>fer</i> )	FK0027 (SC)	BR, Bahia, Morro do Chapéu (-11,55; -41,15)	L. Horst 375 BGHD 130028 / nicht vorhanden
<i>Dyckia ferox</i> Mez ( <i>fer</i> )	FK0020 (SCPT)	RA, Cordoba, Cerro Colorado (-30,1; -63,9333)	W. Rauh 64237 BGHD 130031 / HD 602990
<i>Dyckia ferox</i> Mez ( <i>fer</i> )	FK0056 (SC)	PY, Paraguari, Paraguari (-25,6333; -57,15)	W. Till 6016 WU AB 60 / WU 0004637
<i>Dyckia ferruginea</i> Mez ( <i>feu</i> )	FK0090 (SC)	BR, Mato Grosso do Sul	E. Estenes s. n. Leme 1958 / (Leme)
<i>Dyckia floribunda</i> Griseb. ( <i>flo</i> )	FK0107 (SC)	RA, Cordoba, Dept. Jesus Maria, Ascochinga (-30,95; -64,2667)	W. Till 5012 WU 52/90 / nicht vorhanden
<i>Dyckia floribunda</i> Griseb. ( <i>flo</i> )	FK0052 (SC)	RA, La Rioja, Patquia (-29,9; -67,15)	W. Till 5069 WU 115/90 / nicht vorhanden

## Material und Methoden

Art Autor (Abkürzung)	DNA-ID (Verwendung)	Fundort (Koodinaten)	Sammler-Nummer Garten-ID/Herbarbeleg
<i>Dyckia floribunda</i> Griseb. (flo)	FK0108 (SC)	RA, San Juan, Chucuma (-31,0667; -67,3333)	W. Till 5144 WU AB 17/90 / nicht vorhanden
<i>Dyckia fosteriana</i> L. B. Smith (fos)	FK0094 (SC)	BR, Pará	E. Leme 6461 Leme 6461 / (Leme)
<i>Dyckia goehringii</i> E. Gross & Rauh (goe)	FK0031 (SCP)	BR, Minas Gerais, Diamantina (-18,25; -43,6)	W. Rauh 67622 BGHD 105013 / HD 602160
<i>Dyckia grandidentata</i> Braun, P.J. & E. Esteves Pereira (grn)	FK0183 (S)	BR, Mato Grosso do Sul, Sete Quedas (-23,9702; -55,0356)	E. Leme 6840 Leme 6840 / (Leme)
<i>Dyckia granmogulensis</i> Rauh (gra)	FK0007 (SCP)	BR, Minas Gerais, Grao Mogol (-16,5667; -42,9)	W. Rauh 56484 BGHD 130019 / HD 602161
<i>Dyckia hebdingii</i> L. B. Smith (heb)	FK0013 (SCT)	BR	s. n. BGHD 103913 / nicht vorhanden
<i>Dyckia hebdingii</i> L. B. Smith (heb)	FK0038 (SC)	BR*, Rio Grande do Sul*	s. n. BONN 3259 / nicht vorhanden
<i>Dyckia hebdingii</i> L. B. Smith (heb)	FK0112 (SC)	BR	s. n. WU 130030 / nicht vorhanden
<i>Dyckia ibiramensis</i> (aff.) Reitz (ibi)	FK0025 (SCP)	BR, Minas Gerais, Diamantina (-18,25; -43,6)	L. Horst 1287 BGHD 130023 / HD 602979
<i>Dyckia jonesiana</i> Strehl (jon)	FK0217 (S)	BR, Rio Grande do Sul, Caçapava do Sul (-30,61; -53,4722)	E. Leme 2959 Leme 2959 / (Leme)
<i>Dyckia leptostachya</i> (aff.) Baker (lep)	FK0035 (SC)	RA, Cordoba, Dean Funes (-30,4333; -64,35)	J. Piltz s. n. BONN 4355 / nicht vorhanden
<i>Dyckia leptostachya</i> (aff.) Baker (lep)	FK0016 (SC)	RA, Cordoba, Cerro Colorado (-30,1; -63,9333)	W. Rauh s. n. BGHD 130017 / nicht vorhanden
<i>Dyckia leptostachya</i> (cf.) Baker (lep)	FK0115 (SC)	BOL, Santa Cruz, Mobote (-18,4167; -59,4167)	H. Amerhauser 6 WU B 266/95 / WU 9962
<i>Dyckia leptostachya</i> Baker (lep)	FK0053 (SCPT)	PY, Cordillera, Caacupé (-25,3833; -57,15)	H. Amerhauser s. n. WU B 395/96 / WU 0013898
<i>Dyckia lindevaldae</i> Rauh (lin)	FK0019 (SCP)	BR, Goiás, Alto Paraíso (-14,1167; -47,5167)	P. Braun BR 691 BGHD 108614 / HD 600180
<i>Dyckia lunaris</i> Leme (lun)	FK0193 (S)	BR, Goiás, Alto Paraíso (-14,1167; -47,5167)	E. Leme 4951 Leme 4951 / (Leme)
<i>Dyckia macedoi</i> L. B. Smith (mac)	FK0099 (SCP)	BR, Minas Gerais, Santana do Riacho (-19,3539; -43,6237)	R.B. Louzada, Sotero, D. & Medeiros, M. 151 Feldsammlung / RB Louzada - 151
<i>Dyckia macedoi</i> L. B. Smith (mac)	FK0100 (SC)	BR, Minas Gerais, Santana do Riacho (-19,3539; -43,6237)	R.B. Louzada, Sotero, D. & Medeiros, M. 151 Feldsammlung / RB Louzada - 151
<i>Dyckia macedoi</i> L. B. Smith (mac)	FK0101 (SC)	BR, Minas Gerais, Santana do Riacho (-19,356; -43,608)	R.B. Louzada, Sotero, D. & Medeiros, M. 153 Feldsammlung / SP 423596
<i>Dyckia macedoi</i> L. B. Smith (mac)	FK0102 (SC)	BR, Minas Gerais, Santana do Riacho (-19,356; -43,608)	R.B. Louzada, Sotero, D. & Medeiros, M. 153 Feldsammlung / SP 423596
<i>Dyckia machrisiana</i> L. B. Smith (mah)	FK0189 (S)	BR, Goiás	E. Esteves s. n. Leme 3291 / (Leme)
<i>Dyckia maracasensis</i> Ule (maa)	FK0087 (SC)	BR, Bahia, Maracás (-13,4333; 40,45)	G. Martinelli s. n. Leme 0274 / (Leme)
<i>Dyckia maritima</i> Baker (mar)	FK0092 (SC)	BR, Rio Grande do Sul, Tórres (-29,5; -50,1)	E. Leme 3319 Leme 3319 / (Leme)
<i>Dyckia maritima</i> Baker (mar)	FK0113 (SC)	BR*	s. n. WU Genf / nicht vorhanden
<i>Dyckia marnier-lapostollei</i> var. <i>estevesii</i> L. B. Smith/Rauh (man)	FK0030 (SCP)	BR, Goiás, Goiania (-16,6667; -49,2667)	L. Horst 5 BGHD 130151 / HD 602165
<i>Dyckia marnier-lapostollei</i> var. <i>marnier-lapostollei</i> L. B. Smith (man)	FK0029 (SCP)	BR, Goiás, Cristalina (-16,75; -47,6)	L. Horst 4 BGHD 130234 / HD 603051
<i>Dyckia microcalyx</i> (cf.) Baker (mic)	FK0051 (SC)	PY, Paraguari, Yaguarón (-25,6; -57,3)	W. Till 6066 a WU AB 55 / WU 0004620
<i>Dyckia microcalyx</i> var. <i>indet.</i> Baker (mic)	FK0009 (SC)	PY, Paraguari, Acahay (-25,9167; -57,15)	W. & S. Till 6021 BGHD 102970 / nicht vorhanden
<i>Dyckia microcalyx</i> Baker (mic)	FK0054 (SCP)	PY, Paraguari, Acahay (-25,9167; -57,15)	W. Till 6020 WU AB 57 / WU 0004631
<i>Dyckia microcalyx</i> Baker (mic)	FK0111 (SC)	PY, Paraguari, Yaguarón (-25,6; -57,3)	W. Till 6066 WU AB 54 / nicht vorhanden
<i>Dyckia milagrensis</i> Leme (mil)	FK0096 (SC)	BR, Bahia, Milagres (-12,9559; -39,8178)	E. Leme s. n. Leme s. n. / (Leme)
<i>Dyckia mirandiana</i> Leme & Z. J. G. Miranda (mir)	FK0202 (S)	BR, Goiás, Alto Paraíso (-14,1167; -47,5167)	E. Leme 6379 Leme 6379 / (Leme)
<i>Dyckia monticola</i> L. B. Smith & Reitz (mon)	FK0088 (SC)	BR, Santa Catarina, Campo Alegre (-26,1936; -49,2661)	E. Leme 1664 Leme 1664 / (Leme)
<i>Dyckia nana</i> Leme et al. (nan)	FK0191 (S)	BR, Minas Gerais, Diamantina (-18,3139; -43,8952)	E. Leme 7485 Leme 7485 / (Leme)
<i>Dyckia niederleinii</i> Mez (nie)	FK0103 (SC)	RA*, Misiones*	s. n. MB 1982-166 / nicht vorhanden
<i>Dyckia niederleinii</i> Mez (nie)	FK0110 (SC)	RA*, Misiones*	s. n. WU 184/95 / nicht vorhanden
<i>Dyckia paraensis</i> L. B. Smith (par)	FK0190 (S)	BR, Pará, Guarantan do Norte (-9,7875; -54,91)	E. Leme 7647 Leme 7647 / (Leme)
<i>Dyckia pectinata</i> L. B. Smith & Reitz (pec)	FK0188 (S)	BR, Minas Gerais	E. Leme 6490 Leme 6490 / (Leme)
<i>Dyckia pernambucana</i> L. B. Smith (per)	FK0097 (SC)	BR, Pernambuco, Brejo da Madre de Deus (-8,1894; -36,3931)	Diego Pinangé Dyckia Pe-1 Feldsammlung / LGBV/UFPE DCKA - 09.2009
<i>Dyckia pernambucana</i> L. B. Smith (per)	FK0098 (SC)	BR, Pernambuco, Pesqueira (-8,32542; -36,7562)	Diego Pinangé Dyckia Pe-2 Feldsammlung / LGBV/UFPE DCKA - 09.2009
<i>Dyckia platyphylla</i> L. B. Smith (pla)	FK0209 (S)	BR*, Bahia*	E. Leme s. n. Leme s. n. / (Leme)
<i>Dyckia pulquinenses</i> Wittm. (pul)	FK0199 (S)	BOL	William Backer s. n. Leme 2415 / (Leme)
<i>Dyckia pumila</i> (aff.) L. B. Smith (pum)	FK0017 (SCP)	BR, Mato Grosso, Ponte Branca (-16,45; -52,6667)	P. Braun BR 696 BGHD 104592 / HD 603087
<i>Dyckia pumila</i> L. B. Smith (pum)	FK0093 (SC)	BR, Goiás, Caiapônia (-17,2; -51,7833)	E. Leme 4706 Leme 4706 / (Leme)
<i>Dyckia rariflora</i> Schult. f. (rar)	FK0039 (SC)	BR*, Minas Gerais*	s. n. BONN 2411 / nicht vorhanden
<i>Dyckia reitzii</i> (aff.) L. B. Smith (rei)	FK0050 (SC)	BR, Rio Grande do Sul, Cambará do Sul (-28,7; -50,4)	A. Hofacker 386 WU B 02/62-1 / nicht vorhanden
<i>Dyckia remotiflora</i> var. <i>indet.</i> Otto & A. Dietr. (rem)	FK0015 (SC)	BR	L. Horst 345 BGHD 130010 / nicht vorhanden
<i>Dyckia remotiflora</i> var. <i>indet.</i> Otto & A. Dietr. (rem)	FK0011 (SCP)	BR	L. Horst s. n. BGHD 130009 / HD 603049

## Material und Methoden

Art Autor (Abkürzung)	DNA-ID (Verwendung)	Fundort (Koodinaten)	Sammler-Nummer Garten-ID/Herbarbeleg
<i>Dyckia remotiflora</i> Otto & A. Dietr. (rem)	FK0055 (SC)	unbekannt	s. n. WU AB 3/86 / nicht vorhanden
<i>Dyckia remotiflora</i> Otto & A. Dietr. (rem)	FK0068 (SCT)	ROU	s. n. KAS s. n. / nicht vorhanden
<i>Dyckia rojasii</i> Mez (roj)	FK0195 (S)	BR, Paraná, Rio Branco do Ivaí (-24,3241; -51,3125)	E. Leme 6465 Leme 6465 / (Leme)
<i>Dyckia saxatilis</i> Mez (oli)	FK0036 (SC)	BR, Minas Gerais, Serro (-18,6167; -43,3833)	W. Barthlott 10327 BONN 4346 / nicht vorhanden
<i>Dyckia secunda</i> L. B. Smith (sec)	FK0192 (S)	BR, Bahia, Contendas do Sincorá (-13,7958; -41,05)	E. Leme 3682 Leme 3682 / (Leme)
<i>Dyckia spec. (Encholirium inerme)</i>	FK0086 (SC)	BR, Minas Gerais, Diamantina (-18,25; -43,6)	L. Horst 386 BGHD 130035 / HD 602169
<i>Dyckia spec.</i>	FK0049 (SC)	PY, Boquerón, Fortín Capitan Demattei (-22,7; -60,7667)	H. Amerhauser 96-15 WU 401/96 / nicht vorhanden
<i>Dyckia spec.</i>	FK0024 (SC)	RA, Catamarca, Belen (-27,65; -67,0333)	Leuenberger, Arroyo & Eggli 4254 a BGHD 104100 / nicht vorhanden
<i>Dyckia spec.</i>	FK0116 (SC)	unbekannt	s. n. WU 1088 / nicht vorhanden
<i>Dyckia spec.</i>	FK0023 (SC)	RA, Salta, Salta (-24,7833; -65,4167)	W. Rauh 64142 BGHD 130026 / nicht vorhanden
<i>Dyckia tobatiensis</i> Hassl. (tob)	FK0018 (SCP)	PY, Cordillera, Tobati (-25,25; -57,0667)	W. & S. Till 6050 BGHD 102969 / WU 0004624
<i>Dyckia tomentella</i> Mez (tom)	FK0114 (SC)	PY*	s. n. WU 210/91 / nicht vorhanden
<i>Dyckia tuberosa</i> (aff.) (Vellozo) Beer (tub)	FK0206 (S)	BR, Paraná, São Gerônimo da Serra (-23,7275; -50,7411)	E. Leme 6837 Leme 6837 / (Leme)
<i>Dyckia ursina</i> L. B. Smith (urs)	FK0089 (SC)	BR, Minas Gerais, Jaboticatubas (-19,5; -43,75)	E. Leme 1837 Leme 1837 / HB 75959
<i>Dyckia ursina</i> L. B. Smith (urs)	FK0012 (SC)	BR	s. n. BGHD 103809 / nicht vorhanden
<i>Dyckia velascana</i> (cf.) Mez (vel)	FK0106 (SC)	RA, Tucumán, Famaillá (-27,05; -65,4)	W. Till 10245 WU B 13/93 / nicht vorhanden
<i>Dyckia velascana</i> Mez (vel)	FK0104 (SC)	RA*	s. n. WU 68/88 / nicht vorhanden
<i>Dyckia velascana</i> Mez (vel)	FK0105 (SC)	RA*	s. n. WU B 183/95 / nicht vorhanden
<i>Dyckia velascana</i> Mez (vel)	FK0006 (SCTP)	RA, Cordoba, Ascochinga (-30,95; -64,2667)	W. & S. Till 5012 BGHD 103740 / WU 1996
<i>Dyckia vestita</i> Hassl. (ves)	FK0032 (SCP)	PY, Paraguari, Paraguari (-25,6333; -57,15)	W. & S. Till 6018 BGHD 103741 / WU 0004633
<i>Dyckia vestita</i> Hassl. (ves)	FK0109 (SC)	PY, Paraguari, Paraguari (-25,6333; -57,15)	W. Till 6019 WU AB 59 / nicht vorhanden
<i>Encholirium erectiflorum</i> L. B. Smith (Eer)	FK0123 (SC)	BR*	P. Braun 4072 BGHD s. n. / nicht vorhanden
<i>Encholirium horridum</i> L. B. Smith (Eho)	FK0070 (SCP)	BR, Minas Gerais, Pedra Azul (-15,9867; -41,4069)	W. Schindhelm s. n. BGHD 108213 / HD 602384
<i>Encholirium magalhaesii</i> (crassiscapum) L. B. Smith (Ema)	FK0122 (SCP)	BR*	s. n. BONN 4344 / nicht vorhanden
<i>Encholirium maximum</i> Forzza & Leme (Emx)	FK0124 (SC)	BR*	P. Braun 4063 BGHD s. n. / nicht vorhanden
<i>Encholirium spec. (Dyckia spec.)</i>	FK0014 (SC)	BR, Bahia, Brumado (-14,2167; -41,6667)	W. Rauh 56468 BGHD 130033 / nicht vorhanden
<i>Encholirium spec.</i> (Esp)	FK0078 (SC)	BR*	R. Schulz s. n. BGHD 125585 / nicht vorhanden
<i>Encholirium spec.</i> (Esp)	FK0079 (SC)	BR*	R. Schulz s. n. BGHD 143704 / nicht vorhanden
<i>Encholirium spec.</i> (Esp)	FK0080 (SC)	BR*	R. Schulz s. n. BGHD 112920 / nicht vorhanden
<i>Encholirium spec.</i> (Esp)	FK0125 (SC)	BR*	s. n. B 232-39-94-60 / nicht vorhanden
<i>Deuterocohnia brevifolia</i> (Grisebach) M.A. Spencer & L. B. Smith	FK0074 (S)	BOL, Tarija, Aniceto Arce (-21,96015; -64,68135)	N. Schütz 06/060 KAS NiSch 06/060 / FR
<i>Deuterocohnia brevispicata</i> Rauh & L. Hromadnik (Dbr)	FK0071 (SCP)	BOL, Santa Cruz, Samaipata (-18,01537; -64,10005)	N. Schütz 06/028 KAS NiSch 06/028 / FR
<i>Deuterocohnia cf. haumanii</i> Castellanos	FK0075 (S)	RA, Salta, Cafayate (-25,67935; -65,69088)	N. Schütz 06/122 KAS NiSch 06/122 / FR
<i>Deuterocohnia glandulosa</i> E. Gross	FK0072 (SP)	BOL, Santa Cruz, Ipati (-19,70633; -63,65212)	N. Schütz 06/019 KAS NiSch 06/019 / FR
<i>Deuterocohnia meziana</i> Kuntze ex Mez (Dme)	FK0073 (S)	BOL, Chuquisaca, Monteagudo (-19,78683; -64,0397)	N. Schütz 06/009 KAS NiSch 06/009 / FR
<i>Fosterella albicans</i> (Grisebach) L. B. Smith	FK0117 (S)	BOL, Santa Cruz, Pampagrande (-18,1486; -63,93)	J. Peters 06.0005 KAS JP06.0005 / HD 916972 (als JP 06.0003)
<i>Fosterella penduliflora</i> (C.H. Wright) L. B. Smith	FK0081 (S)	BOL, Tarija, Aniceto Arce (-22,20639; -64,62306)	J. Peters 06.0054 KAS JP06.0054 / HD
<i>Fosterella spectabilis</i> H. Luther	FK0118 (S)	BOL, Chuquisaca, Monteagudo (-19,5386; -64,1244)	J. Peters 06.0046 KAS JP06.0046 / HD 916948 (als JP 06.0047)
<i>Fosterella villosula</i> (Harms) L. B. Smith	FK0076 (SP)	BOL, Cochabamba, Cochabamba (-17,0611; -65,6444)	J. Peters 06.0105 KAS JP06.0105 / HD 916960 (als JP06.0108)
<i>Fosterella weddelliana</i> (Brongniart ex Baker) L. B. Smith	FK0077 (SP)	BOL, Solacana	M. Miyagawa s. n. BGHD 104866 / HD 602059
<i>Gen. nov. spec. nov. Wanderley</i> (Nov)	FK0257 (S)	BR, Piauí	M. G. L. Wanderley & Sousa, G. M. 2630 Feldsammlung / SP
<i>Pitcairnia feliciana</i> (A. Chevalier) Harms & Mildbraed	FK0119 (SP)	RG, Prefecture de Kindia, Kindia (10,0667; -12,85)	I. Ebert & D. Bangoura s. n. ex coll. P. Bak WU s. n. / nicht vorhanden
<i>Pitcairnia fuertesii</i> Mez	FK0120 (S)	DOM, Prov. Puerto Plata, Puerto Plata (19,7833; -70,7)	W. Till 18087 WU s. n. / WU 0013678
<i>Pitcairnia heterophylla</i> (Lindley) Beer	FK0083 (SP)	MEX, Guerrero, Cruz de Ocotte (17,55; 99,8833)	K. Senghas O-11230 BGHD 104945 / HD 104945
<i>Pitcairnia pipenbringii</i> Rauh & E. Gross	FK0085 (S)	BR, Bahia, Barreiras (-12,128; -44,989)	W. Rauh 67430 BGHD 103786 / HD 602406
<i>Pitcairnia pungens</i> Link, Klotzsch & Otto	FK0084 (S)	PE, Lambayeque, valley of Olmos river	W. Rauh 69140 BGHD 130648 / HD 130648
<i>Puya ferruginea</i> (Ruiz & Pavón) L. B. Smith	FK0082 (SP)	PE, valley of Rio Marañon	W. Rauh s. n. BGHD 130165 / nicht vorhanden
<i>Puya herzogii</i> Wittm.	FK0121 (SP)	BOL, Cochabamba, Carrasco (-17,1933; -64,9731)	T. Krömer 6581 BGHD 105240 / HD 602390

## Material und Methoden

Art Autor (Abkürzung)	DNA-ID (Verwendung)	Fundort (Koordinaten)	Sammler-Nummer Garten-ID/Herbarbeleg
<i>Dyckia dissitiflora</i> (Population "Morrao") <i>Schult. f. (dis)</i>	FK0153 (Ind. 02)	BR, Bahia, Morro do Chapéu (-11,59014; -41,20722)	A.M. Iseppon, Pinangé, D. & Cruz, G. 1562 Feldsammlung / LGBV/UFPE 1562
	FK0154 (Ind. 06)		
	FK0155 (Ind. 10)		
	FK0156 (Ind. 01)		
	(P)		
<i>Dyckia dissitiflora</i> (Population "Lajes") <i>Schult. f. (dis)</i>	FK0147 (Ind. 01)	BR, Bahia, Morro do Chapéu (-11,60097; -41,16447)	A.M. Iseppon, Pinangé, D. & Cruz, G. 1598 Feldsammlung / LGBV/UFPE 1598
	FK0148 (Ind. 02)		
	FK0149 (Ind. 03)		
	FK0150 (Ind. 04)		
	(P)		
<i>Dyckia dissitiflora</i> (Population "Cachocheira") <i>Schult. f. (dis)</i>	FK0141 (Ind. 12)	BR, Bahia, Morro do Chapéu (-11,62792; -41,0005)	A.M. Iseppon, Pinangé, D. & Cruz, G. 1605 Feldsammlung / LGBV/UFPE 1605
	FK0143 (Ind. 06)		
	FK0145 (Ind. 05)		
	FK0244 (Ind. 19)		
	(S (nur Ind. 12) P)		
<i>Dyckia limae</i> (Population "Jerusalém") <i>L. B. Smith (lim)</i>	FK0247 (Ind. 02)	BR, Pernambuco, Buíque (-8,58372; -37,23836)	A.M. Wanderley s.n. Feldsammlung / SP
	FK0248 (Ind. 04)		
	FK0255 (Ind. 05)		
	FK0256 (Ind. 06)		
	(P)		
<i>Dyckia pernambucana</i> (Population "Papagaio") <i>L. B. Smith (per)</i>	FK0251 (Ind. 01)	BR, Pernambuco, Triunfo (-7,82275; -38,05536)	A.M. Wanderley s.n. Feldsammlung / SP
	FK0252 (Ind. 02)		
	FK0253 (Ind. 03)		
	FK0254 (Ind. 04)		
	(P)		
<i>Dyckia pernambucana</i> (Population "Aldeia") <i>L. B. Smith (per)</i>	FK0171 (Ind. 01)	BR, Pernambuco, Pesqueira (-8,32542; -36,75617)	D. Pinangé, R.B.Louzada & Cruz, G. DCK1B (D90) Feldsammlung / LGBV/UFPE DCKB - 09.2009
	FK0176 (Ind. 06)		
	FK0249 (Ind. 08)		
	FK0250 (Ind. 09)		
	(P)		
<i>Dyckia pernambucana</i> (Population "Brejo") <i>L. B. Smith (per)</i>	FK0178 (Ind. 03)	BR, Pernambuco, Brejo da Madre de Deus (-8,18936; -36,39311)	D. Pinangé, R.B.Louzada & Cruz, G. DCK3A Feldsammlung / LGBV/UFPE DCKA - 09.2009
	FK0180 (Ind. 05)		
	FK0181 (Ind. 06)		
	FK0246 (Ind. 08)		
	(P)		

## 2.2 Molekulare Methoden

### 2.2.1 DNA-Isolation

Für einige Pflanzen (DNA-Nummern von FK0087-0102 und FK0141-0257 sowie alle Populationsproben von *D. dissitiflora*, *D. limae* und *D. pernambucana*, vgl. Tabelle 1) wurde die Gesamt-DNA von Kooperationspartnern isoliert. Hier kam ein gängiges Protokoll mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) zur Lyse der Biomembranen zum Einsatz, das auf Murray & Thompson (1980) zurückgeht. Verwendet wurde eine abgewandelte Prozedur (Saghai-Maroo et al. 1984; Doyle & Doyle 1987), auf die an dieser Stelle aber nicht näher eingegangen werden soll.

Für die übrigen Proben kam eine speziell für sukkulente Pflanzen angepasste Variante der CTAB-Methode zum Einsatz, welche auf Tel-Zur et. al. (1999) zurückgeht. Vor der Lyse der Zellmembranen wird hier in mehreren Waschschritten ein großer Teil von Cytoplasma und Vakuoleninhalt entfernt.

#### Lösungen und Reagenzien:

- Sorbitol-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0,35 M Sorbitol)
- Sorbitol-Waschpuffer (Sorbitol-Puffer zuzüglich 1% v/v 2-Mercaptoethanol, 1% w/v PVP-40)

## Material und Methoden

- Hoch-Salz 3x CTAB-Puffer, pH 8 (100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 3 M NaCl, 3% w/v CTAB)
- Extraktionspuffer (Hoch-Salz 3x CTAB-Puffer zuzüglich 1% v/v 2-Mercaptoethanol, 1% w/v PVP-40)
- Sarkosyl (30% wässrige Lösung)
- Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v)
- 3 M Natriumacetatlösung, pH 5,2
- Isopropanol
- 70% Ethanol
- TE-Puffer, pH 8 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)
- RNase A (5 mg/ml, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)

### Durchführung:

Von frischem oder gefrorenem Pflanzenmaterial wurden 500 mg, von Trockenmaterial 50 mg unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Überführung in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen wurde 4 °C kalter Sorbitol-Waschpuffer bis zum Endvolumen von 14 ml zugegeben, geschüttelt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Konzentration des Zuckeralkohols Sorbitol entspricht in etwa der natürlichen physiologischen Osmolarität von Pflanzenzellen und verhindert ein Platzen der Zellorganellen durch osmotischen Wassereinstrom. Polyvinylpyrrolidon (PVP-40) dient der Absorption von Polyphenolen. Das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol dient der Inhibition von Oxidationsprozesse und dem Schutz von Proteinen wie etwa Histonen. Durch Zentrifugation (4.000 rpm für 25 min bei 4 °C, Variofuge 3.0 R, Heraeus Instruments, München) wurden Zellwandtrümmer und Organellen sedimentiert, der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt.

Das nach der letzten Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in 600 µl Extraktionspuffer und 30 µl 30%igem Sarkosyl gelöst und die verbliebenen Membranen für etwa 60 min bei 60 °C im Wasserbad lysiert. Die hohe Konzentration von NaCl vermindert die Kopräzipitation von Polysacchariden, das anionische Tensid Sarkosyl dient als salz-unempfindliches Detergens.

Nach Zugabe von 600 µl Chloroform/Isoamylalkohol und Inkubation für 20 min unter Schwenken erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation (4.000 rpm für 20 min bei Raumtemperatur, Variofuge 3.0 R, Heraeus Instruments, München). Von der wässrigen oberen Phase wurden bis zu 1.000 µl in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Interphase, welche unter anderem Fasern und größere Gewebetrümmer enthielt, sowie die

## Material und Methoden

organische untere Phase, in welcher sich ein Großteil der Proteine und hydrophobe Substanzen wie Chlorophyll und Lipide angereichert hatten, wurden verworfen. Gelegentlich wurden auch Teile von organischer Phase und Interphase mit überführt, weshalb generell eine zweite Zentrifugation durchgeführt wurde (10.000 g für 10 min bei Raumtemperatur, Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Bis zu 800 µl der danach erhaltenen wässrigen Phase wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt ohne ein eventuell vorhandenes Pellet zu stören.

Aus dieser Lösung wurde die DNA durch Zugabe von 80 µl Natriumacetatlösung und 600 µl Isopropanol gefällt. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht erfolgte eine Zentrifugation (14.000 g für 20 min bei 4 °C, Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Der resultierende Überstand wurde verworfen, dem Pellet wurden 500 µl 70% Ethanol zugegeben und es wurde erneut zentrifugiert (14.000 g für 10 min bei Raumtemperatur, Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg). Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, um letzte Reste des Extraktionspuffers und der enthaltenen Salze zu entfernen.

Nach dem erneuten Abgießen des Überstandes wurde die DNA getrocknet (10 min bei 50 °C, Savant SpeedVac SPD101B, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Nach dem Lösen in 100 µl TE-Puffer wurden 2 µl RNase A zugegeben und die RNA über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Die Konzentration und Qualität der gewonnenen DNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (vgl. 2.2.2). Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Für die meisten Anwendungen wurden Arbeitslösungen mit einer Verdünnung der Stammlösung von 1:10 in TE-Puffer verwendet.

### 2.2.2 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese lassen sich elektrisch geladene Makromoleküle nach Ladung oder Größe auftrennen. Nukleinsäuren besitzen in Lösung eine einheitliche negative Ladung pro Masse. Im elektrischen Feld werden DNA-Moleküle also gleichermaßen zur Anode hin beschleunigt. Passieren die Fragmente auf ihrem Weg eine hinreichend engmaschige Matrix, so werden sie in ihrer Bewegung gehindert. Je länger ein Fragment ist, desto langsamer bewegt es sich durch die Matrix hindurch. Für die Auftrennung großer DNA-Fragmente eignen sich weitmaschige Agarosegele, kleine Fragmente werden mittels engmaschiger Polyacrylamidgele (PAA) aufgetrennt (Polyacrylamidgelelektrophorese, PAGE).

Nach der Auftrennung wird die DNA im Gel gefärbt. Hierzu wird meistens der Farbstoff Ethidiumbromid verwendet, der mit DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Es gibt auch alternative Farbstoffe, die wegen ihrer geringeren Giftigkeit

## Material und Methoden

heutzutage teilweise bevorzugt werden, aber auch viel teurer und häufig qualitativ nicht besser als Ethidiumbromid sind (Mülhardt 2006). Zur Abschätzung der Fragmentgrößen werden auf parallelen Bahnen DNA-Längenstandards (DNA-Ladder) aufgetragen, die aus einem Gemisch von Fragmenten bekannter Größe bestehen. Auf ähnliche Weise können DNA-Mengen abgeschätzt werden, indem Proben bekannter DNA-Konzentration als Referenzproben aufgetragen werden.

### Lösungen und Reagenzien:

- 0,5x TBE-Puffer, pH 8 (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA)
- Agarose (Agarose NEEO Roti@garose, Carl Roth, Karlsruhe)
- 6x Auftragspuffer (40% v/v Glycerin, 0,1% w/v Bromphenolblau, 0,1% w/v Xylencyanol in 0,5x TBE-Puffer)
- Ethidiumbromid-Färbelösung (1µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TBE-Puffer)
- 100 bp Längenstandard (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- 1 kb Längenstandard (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- Phage λ-DNA (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) in den Konzentrationen 5, 10, 20, 50 und 100 ng/µl in TE-Puffer

### Durchführung:

Die jeweilige Menge an Agarose wurde zunächst in 0,5x TBE-Puffer aufgekocht und anschließend auf etwa 60 °C gekühlt. Nach dem Gießen und einer Polymerisationszeit von mindestens 30 min wurden die Gele in einer Flachbettelektrophoreseapparatur mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet und beladen. Sofern der Ladepuffer nicht schon im PCR-Ansatz enthalten war (vgl. 2.2.3) wurden je 2 µl der Probe mit 3 µl Wasser und 1 µl 6x Auftragspuffer vermischt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele für etwa 10 min in Ethidiumbromid-Färbelösung geschwenkt und unter UV-Licht fotografiert (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen).

PCR-Produkten wurden für gewöhnlich in 1,5%igen Gelen in einem elektrischen Feld von etwa 6 V/cm für 30-45 min aufgetrennt. Die Fragmentgrößenbestimmung erfolgte mittels eines komigrierenden 100 bp Längenstandards. Besonders große Produkte wurden in 1,0%igen Gelen für längere Zeit aufgetrennt und mit einem 1 kb Längenstandard verglichen. Aus DNA-Isolationen wurden jeweils 2 µl der erhaltenen Stammlösung in 0,8%igen Agarosegelen in einem elektrischen Feld von etwa 4 V/cm für etwa 30 min aufgetrennt. Die Abschätzung der aufgetragenen DNA-Menge und der Konzentration der Stammlösung

erfolgte durch Vergleich mit jeweils 2 µl DNA bekannter Konzentration (5, 10, 20, 50 und 100 ng/µl) aus dem Phagen λ.

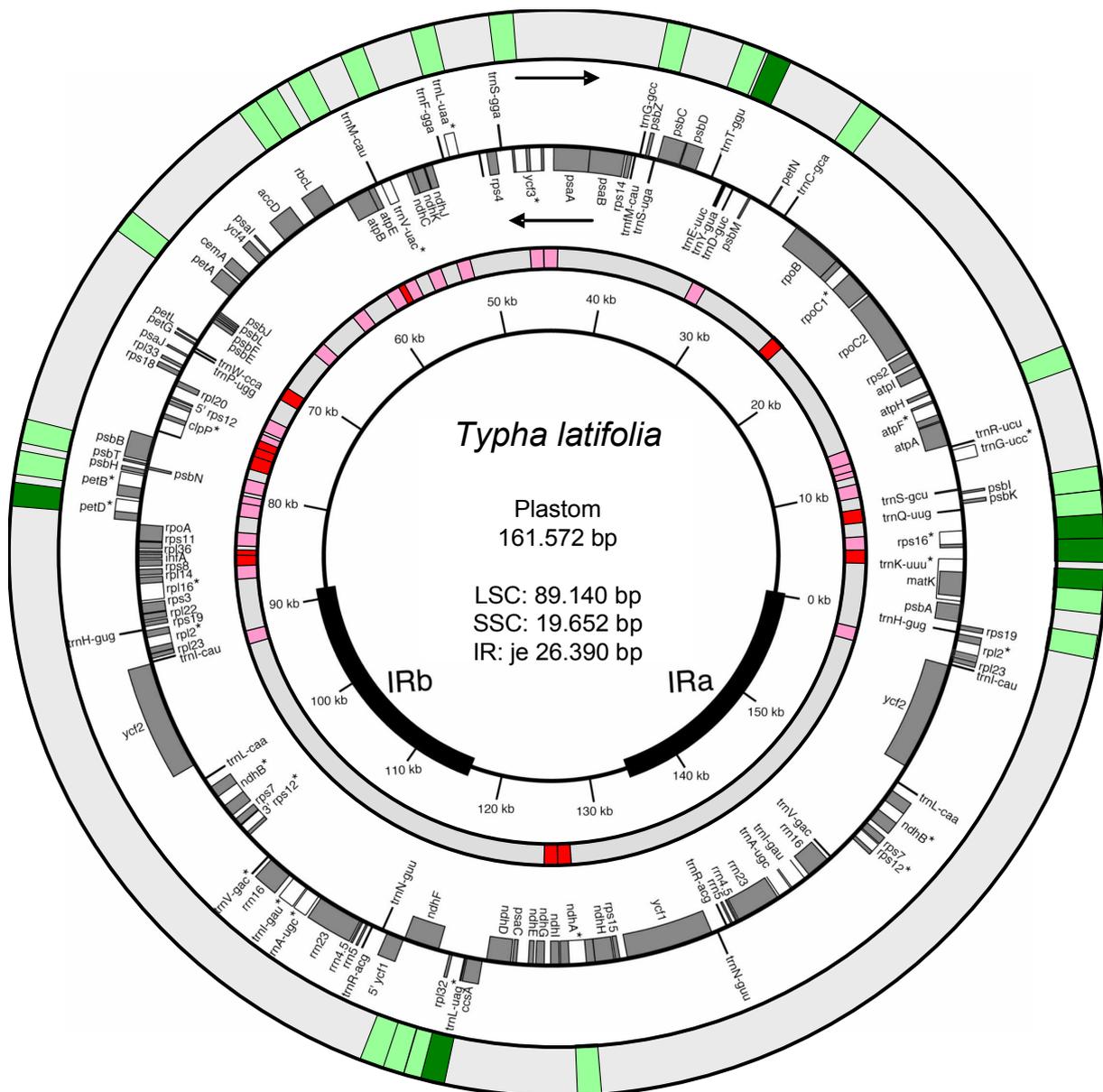
### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) können DNA-Abschnitte gezielt *in vitro* vervielfältigt werden (Mullis et al. 1986). Durch hohe Temperatur werden zunächst die Doppelstränge der zu kopierenden Templat-DNA in zwei Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Nach Absenkung der Temperatur können sich die Primer, kurze einzelsträngige Oligodesoxynukleotide, an die Templat-DNA anlagern (Annealing). Das zu vervielfältigende Fragment wird durch die gewählten Primersequenzen determiniert, die komplementär zu den Flanken der Zielregion sind. Im Anschluss werden die Primer durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Die Verwendung thermostabiler Polymerasen (Saiki et al. 1988) erlaubt die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte und eine exponentielle Amplifikation der Zielregion (Mülhardt 2006).

#### 2.2.3.1 Untersuchte plastidäre Loci

Das als Plastom bezeichnete Genom der Plastiden verfügt in höheren Pflanzen über eine konservierte Struktur (Abbildung 14). Es handelt sich um ein zirkuläres Molekül doppelsträngiger DNA. In der Regel verfügt es über einen großen (large single-copy, LSC) und einen kleinen (small single-copy, SSC) Einzelkopiebereich, welche durch zwei inverse duplizierte Bereiche (inverted repeats, IR) voneinander getrennt sind. Die IRs besitzen normalerweise identische Sequenzen und dieser Zustand wird durch konzertierte Evolution aufrechterhalten. Wegen dieses Phänomens ist die Variabilität innerhalb der IRs allerdings um den Faktor 2,3 geringer als in den Einzelkopiebereichen (Perry & Wolfe 2002), was sie für phylogenetische Untersuchungen auf niedriger taxonomischer Ebene vergleichsweise wenig interessant macht.

Prinzipiell gibt es auf dem Plastom drei Arten von Regionen, nämlich kodierende Bereiche (Exons von Genen), Introns und intergenische Bereiche. Die beiden letzteren gelten aufgrund des geringeren oder fehlenden Selektionsdrucks als deutlich variabler (z. B. Knoop & Müller 2009). An Genen finden sich etwa auf dem in Abbildung 14 dargestellten Plastom von *Typha latifolia* (Guisinger et al. 2010) solche für ribosomale Proteine (*rpl*, *rps*), eine RNA-Polymerase prokaryotischen Typs (*rpo*), eine ATP-abhängige Protease (*clpP*), Proteine der Photosysteme I und II (*psa*, *psb*), den Cytochrom-bf<sub>6</sub>-Komplex (*pet*), die große RuBisCo-Untereinheit (*rbcL*), eine NADH-Dehydrogenase (*ndh*) sowie einige offene Leseraster mit teilweise ungeklärter Funktion (*ycf*, *ccsA*, *cemA*). Ferner existiert eine große Zahl an Genen für tRNAs (*trn*) und für einige katalytische ribosomale RNAs (*rrn*).



**Abbildung 14: Genkarte des Plastoms von *Typha latifolia* (nach Guisinger et al. 2010)**

Die Rechtecke im äußeren Kreis markieren diejenigen Bereiche des Plastoms, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf ihre Eignung für die vergleichende Sequenzierung für Arten von *Dyckia* hin untersucht wurden. Die sechs für die endgültigen Analysen ausgewählten Loci sind dunkelgrün hervorgehoben. Die Rechtecke im zweiten Kreis von Innen markieren diejenigen Bereiche des Plastoms, in denen plastidäre Mikrosatelliten (cpSSRs) gefunden wurden und für die Primerpaare zur Amplifikation entworfen wurden. Die 12 für die endgültigen Analysen ausgewählten Loci sind rot hervorgehoben (vgl. 2.2.5 und 3.4).

Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit untersuchten Abschnitte des Plastoms kurz beschrieben:

*rp132-trnL*

Das Gen *rp132* kodiert für ein Protein der großen ribosomalen Untereinheit, *trnL* kodiert für eine tRNA für die Aminosäure Leucin (Anticodon UAG). Der intergenische Bereich dazwischen wurde von Shaw et al. (2007) als besonders variabel identifiziert. Zur

## Material und Methoden

Amplifikation mittels PCR wurde von denselben Autoren ein universelles Primerpaar für Angiospermen publiziert. Der Locus *rp32-trnL* wird seitdem zunehmend für phylogenetische Studien innerhalb der Bromeliaceae verwendet (z. B. Givnish et al. 2011; Schütz 2012; Wagner et al. 2012). Für die Amplifikation und Sequenzierung in zwei Teilstücken wurden zusätzliche interne Primer benutzt, die von Schütz (2012) entworfen wurden.

### *rps16-trnK*

Das Gen *rps16* kodiert für ein Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit, *trnK* kodiert für eine tRNA für die Aminosäure Lysin (Anticodon UUU). Zur Amplifikation des sehr variablen Bereiches dazwischen wurden ebenfalls universelle Primer publiziert (Shaw et al. 2007). Innerhalb der Bromeliaceae wurde der Locus bisher vor allem für die Gattungen *Deuterocohnia* und *Fosterella* (beide Pitcairnioideae) eingesetzt (Schütz 2012; Wagner et al. 2012). Zur Amplifikation und Sequenzierung in drei Teilstücken wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzliche interne Primerpaare entworfen (Tabelle 2).

### *matK*

Das Gen *matK* ist im *trnK*-Intron lokalisiert und codiert für die einzige Maturase des Plastoms. Diese spielt eine universale Rolle beim Spleißen von Klasse II-Introns (Hausner et al. 2006; Borsch & Quandt 2009). Obwohl es sich hierbei um eine kodierende Region handelt, zeigte *matK* in diversen Studien an Bromelien eine relativ hohe Variabilität mit einem hohen Anteil an Substitutionen (Barfuss et al. 2005; Rex 2007; Schulte et al. 2009). Für die vorliegende Arbeit wurde der Locus in drei Teilstücken amplifiziert und sequenziert. Für das 5'-Ende des Locus (Teil a) wurden publizierte Bromelien-spezifische Primer verwendet (Crayn et al. 2000; Schulte et al. 2005). Für die Amplifikation des 3'-Endes (Teile b und c) wurden auf Basis publizierter Sequenzen (Crayn et al. 2004; Rex et al. 2009) neue Primerpaare entwickelt (Tabelle 2).

### *rps16*-Intron

Sequenzen des Introns im *rps16*-Gen haben sich bereits in vielen phylogenetischen Arbeiten an diversen Bromeliaceae bewährt (z. B. Crayn et al. 2004; Barfuss et al. 2005; Rex et al. 2009; Jabaily & Sytsma 2010; Givnish et al. 2011; Schütz 2012). Zur Amplifikation wurden universelle Primer verwendet, die von Oxelman et al. (1997) entwickelt wurden (Tabelle 2).

## Material und Methoden

**Tabelle 2: PCR-Primer zur Amplifikation plastidärer DNA-Abschnitte**

Die Bezeichnungen für die aufgelisteten Primer entsprechen der von den jeweiligen Autoren verwendeten Nomenklatur. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die Primer auch mit angehängten M13-Sequenzen verwendet (vgl. erste und zweite Tabellenzeile).

Locus	Primer	Sequenz (5'-3')	Quelle	Programme
M13	M13f	TGTAACACGACGGCCAGT	Fartmann et al. 1999	n/a
	M13r	CAGGAAACAGCTATGACC	Fartmann et al. 1999	
<i>atpB-rbcL</i>	<i>atpB_fwd</i>	GAAGTAGTAGGATTGATTCTC	Manen et al. 1994	UniPCRFK
	<i>atpB-rbcL a rev</i>	TATAATGATAGAGAAATGAAACAC	diese Arbeit	
	<i>atpB-rbcL b fwd</i>	ATTGCAAGTAGATGAAATCGTG	diese Arbeit	
	<i>rbcL_rev</i>	CAACACTTGCTTTAGTCTCTG	Manen et al. 1994	
<i>atpF</i> -Intron	<i>sak21F (exon/D1)</i>	AAAGGGAGTGTGTGYGAGTT	Watts et al. 2008	UniPCRFK
	<i>sak22R (D5)</i>	CCCCAACCAGAAATGAATCTTTC	Watts et al. 2008	
<i>matK</i>	<i>matK5(F)</i>	ATACCCTGTCTGACCATATTG	Crayn et al. 2000	UniPCRFK (alle Teile), Crayn_2000 (Teil a)
	<i>BROM1(R)</i>	GGTTCCAGAAGATGTTAATCG	Schulte et al. 2005	
	<i>matK_b_fwd</i>	TCTGAATGYGAATTTKTATTTCG	diese Arbeit	
	<i>matK_b_rev</i>	TCTACATATCCGACCAAATCG	diese Arbeit	
	<i>matK_c_fwd</i>	GTACTGTATCGGGACACCC	diese Arbeit	
<i>ndhA</i> -Intron	<i>ndhAx1</i>	CACATATCAAATTTACATCCCG	diese Arbeit	UniPCRFK
	<i>ndhAx2</i>	GCYCAATCWATTAGTTATGAAATACC	Shaw et al. 2007	
<i>ndhF</i>	<i>ndhF 032F</i>	GGTTGACGCCAMARATTCCA	Shaw et al. 2007	Wagner_2005
	<i>ndhF 745F</i>	TACCTTTTCTTCCACTTCCAGTT	Terry et al. 1997	
	<i>ndhF 1101R</i>	TGGTTACCTGATGCTATGGAAGG	Terry et al. 1997	
	<i>ndhF 1927R</i>	GGTGAATATCCAACAATAGGTTCC	Terry et al. 1997	
	<i>ndhF 1927R</i>	CACATTTTTTATTCGGTCCACAAG	Terry et al. 1997	
<i>nhdF-rp132</i>	<i>ndhF</i>	GAAAGGTATKATCCAYGMATATT	Shaw et al. 2007	UniPCRFK
	<i>rp132-R</i>	CCAATATCCCTTYTTTTCCAA	Shaw et al. 2007	
<i>petB</i> -Intron	<i>sak23F (exon/D1)</i>	GGARTATGAGTGTGTGACTTG	Watts et al. 2008	UniPCRFK
	<i>sak24R (D5)</i>	ATRTGAGANTTTCATCTCGTAC	Watts et al. 2008	
<i>petD</i> -Intron	<i>sak17F (exon/D1)</i>	GGATTATGGGAGTGTRYGACTTG	Watts et al. 2008	UniPCRFK
<i>psbA-trnH</i>	<i>sak18R (D6/exon)</i>	CTTTGTTATTGGGATAGGTGAA	Watts et al. 2008	Wagner_2007
	<i>psbA fwd</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang et al. 1997	
<i>psbB-psbH</i>	<i>trnH rev</i>	CGCGCATGGTGGATTACAAAATC	Sang et al. 1997	Xu_2000
	<i>psbBf</i>	AGATGTTTTGCTGGTATTGA	Shinozaki et al. 1986	
<i>psbD-trnT</i>	<i>psbHr</i>	TTCAACAGTTTGTGTAGCCA	Shinozaki et al. 1986	UniPCRFK
	<i>psbD fwd</i>	CTCCGTARCCAGTCATCCATA	Shaw et al. 2007	
<i>psbJ-petA</i>	<i>trnT(GGU) rev</i>	CCCTTTTAACTCAGTGGTAG	Shaw et al. 2007	UniPCRFK
	<i>psbJ</i>	ATAGGTACTGTARCYGGTATT	Shaw et al. 2007	
<i>rbcL</i>	<i>petA</i>	AACARTTYGARAAGGTTCAATT	Shaw et al. 2007	Barfuss_2007
	<i>rbcl 1F</i>	ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC	Fay et al. 1998	
	<i>rbcl 636F</i>	CGGTGGAGAGATCGTTTCT	Fay et al. 1998	
	<i>rbcl 724R</i>	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	Fay et al. 1998	
	<i>rbcl 1460R</i>	TCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG	Fay et al. 1998	
<i>rp132-trnL</i>	<i>rp132-F</i>	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	Shaw et al. 2007	UniPCRFK
	<i>trnL(UAG)</i>	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	Shaw et al. 2007	
	<i>rp132 internal rev</i>	TTTCATATCTATCACAATTTTCATCA	Schütz 2012	
	<i>trnL internal fwd</i>	GAGATTGAAACTCTTTTGTATATGC	Schütz 2012	
<i>rpoB-trnC</i>	<i>rpoB fwd</i>	CKACAAAAYCCYTCRAATTG	Ohsako & Ohnishi 2000	Wagner_2007
	<i>trnCGCA rev</i>	CACCCRGATTYGAACACTGGGG	Ohsako & Ohnishi 2000	
<i>rps16</i> -Intron	<i>rpsF (fwd)</i>	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	Oxelman et al. 1997	UniPCRFK
	<i>rpsR2 (rev)</i>	TGCGGATCGAACATCAATTGCAAC	Oxelman et al. 1997	
<i>rps16-trnK</i>	<i>rps16x2F2</i>	AAAGTGGGTTTTTATGATCC	Shaw et al. 2007	UniPCRFK
	<i>trnK(UUU)x1</i>	TTAAAAGCCGAGTACTCTACC	Shaw et al. 2007	
	<i>rps16-trnK b fwd</i>	GGGAAGGGTAACTAGTATC	diese Arbeit	
	<i>rps16-trnK a rev</i>	AAGAAAAGGAAAATGGTGTG	diese Arbeit	
	<i>rps16-trnK c fwd</i>	CTTTTCCTTAATTTTTTCCATTCC	diese Arbeit	
<i>trnD-trnT</i>	<i>rps16-trnK b rev</i>	AAAGACTTGTGTTGGATTGGC	diese Arbeit	Wagner_2007, UniPCRFK
	<i>trnDGUC fwd</i>	ACCAATTGAACTACAATCCC	Demesure et al. 1995	
<i>trnL-trnF</i>	<i>trnTGGU rev</i>	CTACCAGTGTAAAAGGG	Demesure et al. 1995	Wagner_2007
	<i>TabC fwd</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet et al. 1991	
<i>trnQ-5'rps16</i>	<i>TabF rev</i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet et al. 1991	UniPCRFK
	<i>trnQ(UUG)</i>	GCGTGGCCAAAGYGGTAAGGC	Shaw et al. 2007	
<i>trnS-trnG</i>	<i>rps16x1</i>	GTTGCTTTYTACCACATCGTTT	Shaw et al. 2007	Wagner_2007
	<i>trnS* fwd</i>	AACTCGTACAACGGATTAGCAATC	Shaw et al. 2007	
<i>trnV-ndhC</i>	<i>trnG* rev</i>	GAATCGAACCCGCATCGTTAG	Shaw et al. 2007	UniPCRFK
	<i>trnV(UAC)x2</i>	GTCACGGTTCGARTCCGTA	Shaw et al. 2007	
<i>ycf3-trnS (rps4-trnT)</i>	<i>ndhC</i>	TATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCATATTC	Shaw et al. 2007	Saltonstall_2001
	<i>rps4 fwd</i>	TCSTATTCTGCAGTACAGG	Saltonstall 2001	
	<i>trnT2 rev</i>	CTGTAGGTGTAACCTTTCGC	Saltonstall 2001	

## Material und Methoden

**Tabelle 3: PCR-Programme zur Amplifikation plastidärer DNA-Abschnitte**

Die Programme wurde teils von den angegebenen Autoren übernommen, teils selbst entworfen. Nach Ablauf des jeweiligen Programmes wurden die Proben auf 10 °C heruntergekühlt.

Programm	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl	Quelle	Verwendet für
matK_Crayn_2000	90 s	94 °C	} 26x	Crayn et al. 2000	matK Teil a
	30 s	94 °C			
	60 s	42 °C			
	120 s	72 °C			
ndhF_Wagner_2005	30 s	92 °C	} 39x	Wagner 2007	ndhF
	60 s	92 °C			
	60 s	45 °C			
	60 s	72 °C			
psbA-trnH_Wagner_2007	240 s	72 °C	} 35x	Wagner 2007	psbA-trnH
	300 s	80 °C			
	30 s	94 °C			
	30 s	50 °C			
psbB-psbH_Xu_2000	60 s	72 °C	} 35x	Xu et al. 2000	psbB-psbH
	600 s	72 °C			
	300 s	94 °C			
	60 s	94 °C			
rbcL_Barfuss_2007	60 s	58 °C	} 36 x	Barfuss et al. 2005	rbcL
	120 s	72 °C			
	600 s	72 °C			
	180 s	94 °C			
rpoB-trnC_Wagner_2007	840 s	72 °C	} 35x	Wagner 2007	rpoB-trnC
	300 s	80 °C			
	60 s	96 °C			
	120 s	52 °C			
trnD-trnT_Wagner_2007	180 s	72 °C	} 30x	Wagner 2007	trnD-trnT
	300 s	72 °C			
	45 s	94 °C			
	60 s	52 °C			
trnL-F_Wagner_2007	60 s	72 °C	} 35x	Wagner 2007	trnL-trnF
	600 s	72 °C			
	300 s	80 °C			
	60 s	94 °C			
trnS-trnG_Wagner_2007	120 s	50 °C	} 35x	Wagner 2007	trnS-trnG
	600 s	65 °C			
	60 s	95 °C			
	60 s	50 °C			
trnS-ycf3_Saltonstall_2001	120 s	65 °C	} 35x	Saltonstall 2001	trnS-ycf3
	600 s	65 °C			
	300 s	80 °C			
	60 s	94 °C			
UniPCRFK	60 s	52 °C	} 30 x	diese Arbeit	atpB-rbcL, atpF-Intron, matK Teil a, b und c, ndhA-Intron, ndhF-rpl32, petB-Intron, petD-Intron, psbD-trnT, psbJ-petA, rpl32-trnL, rps16-Intron, rps16-trnK, trnD-trnT, trnQ-5'rps16, trnV-ndhC
	150 s	65 °C			
	600 s	65 °C			
	300 s	80 °C			
	60 s	95 °C			

### petD-Intron

Für Klasse II-Introns wurde gezeigt, dass der größte Teil der hier auftretenden Variabilität auf Bereiche entfällt, welche sich bei der Ausbildung der Sekundärstruktur in ungepaarten Schleifen (loops) befinden (Kelchner & Wendel 1996; Löhne & Borsch 2005). Intramolekular paarende Bereiche sind dagegen stärker konserviert. Watts et al. (2008) entwickelten aus

## Material und Methoden

diesem Grund universelle Primerpaare (Tabelle 2), welche die Domäne IV diverser Introns amplifizieren, die eine besonders große Schleife enthält. Im *trnK*-Intron liegt in dieser Domäne das offene Leseraster für die Maturase *matK*, welches aber in allen anderen Introns degeneriert und funktionslos ist (Hausner et al. 2006). Die unterliegende Sequenz steht damit nicht unter Selektionsdruck und sollte neutral und schnell evolvieren (Watts et al. 2008). Das hier untersuchte Gen *petD* kodiert für ein Protein des Cytochrom-bf<sub>6</sub>-Komplexes und wurde für Studien innerhalb der Bromeliaceae bisher nicht verwendet.

### *trnD-trnT*

Der Bereich zwischen den Genen für eine tRNA für Asparaginsäure (Anticodon GUC) und für eine tRNA für Threonin (Anticodon GGU) wird seit langem für phylogenetische Analysen in unterschiedlichsten Pflanzengruppen verwendet. Ein universelles Primerpaar (Demesure et al. 1995) erlaubt meistens eine problemlose Amplifikation (Tabelle 2). Für die Variabilität des Locus fanden Shaw et al. (2007) überdurchschnittliche Werte. Für Studien innerhalb der Bromeliaceae wurde bislang keine Arbeit mit diesem Locus publiziert.

#### **Tabelle 4: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation plastidärer DNA-Abschnitte**

Da die DNA-Konzentrationen nicht exakt bestimmt wurden, ist die Menge an zugefügter Templat-DNA als Richtwert zu verstehen (\*).

Zutat	Stammkonzentration	Volumen pro 20 µl-Ansatz	Endkonzentration
5x Mango-Taq gefärbter Puffer (Bioline, Taunton)	5x	4,0 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,6 µl	1,5 mM
dNTPs (Carl Roth, Karlsruhe)	2,5 mM	1,6 µl	0,2 mM
Primer 1	10 µM	0,5 µl	0,25 µM
Primer 2	10 µM	0,5 µl	0,25 µM
BSA (Invitrogen, Carlsbad)	20 µg/ml	0,5 µl	0,5 µg/µl
Mango-Taq DNA Polymerase (Bioline, Taunton)	5 U/µl	0,4 µl	0,1 U/µl
DNA-Templat (Arbeitslösung)	*	2,0 µl	*
Aqua bidest	-	9,9 µl	-

### Sonstige verwendete plastidäre Loci

Im Rahmen von Pilotversuchen wurden ferner die intergenischen Bereiche *atpB-rbcL*, *nhdF-rpl32*, *psbA-trnH*, *psbB-psbH*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *rpoB-trnC*, *trnS-ycf3* (von Saltonstall (2001) als *rps4-trnT* publiziert), *trnL-trnF*, *trnQ-5'rps16*, *trnS-trnG* und *3'trnV-ndhC*, die exonischen Bereiche *ndhF* und *rbcL*, sowie die intronischen Bereiche *atpF*-Intron, *ndhA*-Intron und *petB*-Intron verwendet. Die dafür eingesetzten Primer sind Tabelle 2 zu entnehmen. Auf diese Regionen soll hier nicht im Detail eingegangen werden, da sie sich aus verschiedenen Gründen als nicht geeignet erwiesen und daher für die endgültigen Analysen nicht verwendet wurden.

### 2.2.3.2 Untersuchte nukleäre Loci

Das Genom des Zellkerns bietet eine Vielzahl unterschiedlichster Loci, deren vergleichende Sequenzierung sich für phylogenetische Analysen prinzipiell eignet. Die klaren Vorteile sind die schnellere Evolution vieler Bereiche im Vergleich zum Plastom, die vielen unabhängigen Loci und die biparentale Vererbung. Methodisch ist die Untersuchung nukleärer DNA allerdings deutlich anspruchsvoller. Dies liegt zum einen in der allelischen Variation der allermeisten Loci begründet. In einem diploiden Organismus gibt es wenigstens zwei verschiedene Kopien (Allele) eines jeden nukleären DNA-Abschnitts. Unterscheiden sich diese Allele hinsichtlich ihrer Länge, so lassen sich die mit flankierenden Primerpaaren erzeugten PCR-Produkte nicht direkt sequenzieren, sondern müssen kloniert werden. Ferner muss bei nukleären Loci besonderes Augenmerk auf die Homologie verglichener Sequenzen gelegt werden. Durch Genduplikationen können zwei oder mehrere Paraloge entstehen, die dann unabhängig voneinander evolvieren. Daher muss stets beachtet werden, dass für phylogenetische Analysen nur orthologe Sequenzen verglichen werden (z. B. Small et al. 2004; Hughes et al. 2006; Knoop & Müller 2009).

Im methodisch einfachsten Fall werden Gene untersucht, von denen es nur eine einzige Version (single copy) oder wenige Versionen (low copy) gibt. Zeigen die vorkommenden Allele keine Längenvariabilität innerhalb einzelner Akzessionen, so ist keine aufwändige Klonierung nötig. Für die in dieser Arbeit untersuchten nukleären Loci wurde aufgrund von publizierten Untersuchungen vermutet, dass sie als Einzelkopie vorliegen.

#### *Phytochrom C (phyC)*

Gene der *Phytochrom*-Familie codieren für eine Reihe an Photorezeptor-Proteinen, welche in die Steuerung diverser Entwicklungsprozesse der Pflanzen involviert sind (Kutschera 2002). Alle Proteine der Genfamilie können in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen und absorbieren dann entweder kurzwelliges (666 nm) oder langwelliges (730 nm) rotes Licht (in *Arabidopsis thaliana*, Sharrock & Quail 1989). Besonders gut erforscht sind die Proteine Phytochrom A und Phytochrom B. Phytochrom A wird bei Licht schnell abgebaut, kommt also insbesondere in etiolierten Pflanzen vor, während Phytochrom B photostabil ist. Das Protein Phytochrom C ist ebenfalls photostabil und hat in *Arabidopsis thaliana* bedeutenden Einfluss auf Blütezeit und Wachstumsantwort von Keimlingen (Balasubramanian et al. 2006). Für die Duplikation des Vorläufers aller *Phytochrom*-Gene wird ein Zeitpunkt vor der Trennung von monokotylen und dikotylen Pflanzen angenommen. Im paarweisen Vergleich der Aminosäuresequenzen der Phytochrome A, B und C zeigen sich lediglich Ähnlichkeiten von 49-52% (Sharrock & Quail 1989). Somit sind auch die

## Material und Methoden

paralogen *Phytochrom*-Gene ausreichend unterschiedlich, um einzelne Versionen gezielt und eindeutig durch spezifische PCR-Primerpaare anzusprechen und zu amplifizieren.

Das Gen *phyC* wurde in der Vergangenheit mehrfach für phylogenetische Arbeiten sequenziert. Für monokotyle Pflanzen wurden beispielsweise Sequenzen von *phyC* verwendet, um bei allohexaploidem Weizen (*Triticum aestivum*) den evolutionären Zusammenhang seiner drei Vorläufer zu untersuchen (Devos et al. 2005). Bei phylogenetischen Untersuchungen in der dikotylen Familie Phyllanthaceae kam für *phyC* eine direkte Sequenzierung ohne Klonierung zum Einsatz (Kathriarachchi et al. 2005; Samuel et al. 2005). Für phylogenetische Studien innerhalb der Bromeliaceae erlebt *phyC* derzeit einen regelrechten Boom, da auch hier Amplifikation und Sequenzierung ohne vorherige Klonierung möglich sind. So wurde kürzlich eine auf dem *phyC*-Gen basierende Arbeit an *Puya* publiziert (Jabaily & Sytsma 2010). Für die Unterfamilien Tillandsioideae, Bromelioideae sowie alle weiteren Gattungen der Pitcairnioideae laufen derzeit ebenfalls Projekte mit *phyC* (z. B. Schütz et al., unveröffentlichte Daten).

**Tabelle 5: PCR-Primer zur Amplifikation nukleärer Loci**

Die Bezeichnungen für die aufgelisteten Primer entsprechen der von den jeweiligen Autoren verwendeten Nomenklatur. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die Primer auch mit angehängten M13-Sequenzen verwendet (vgl. erste und zweite Tabellenzeile in Tabelle 2).

Locus	Primer	Sequenz (5'-3')	Quelle
<i>ETS</i>	ETS_Sass_fwd	GTTTCGGCCTCCCAGTCTAGC	Sass & Specht 2010
	ETS_Sass_rev	CAACCAGGTAGCATGTCCCTTTG	Sass & Specht 2010
	Baldwin_S26-IGS_fwd	GGATTGTTTACCCACCAATAGGGAACGTGAGCTG	Baldwin & Markos 1998
	Baldwin_S18-IGS_rev	GAGACAAGCATATGACTACTGGCAGGATCAACCAG	Baldwin & Markos 1998
	Chew_Till1_fwd	TCGCACGCCCCGYGGGCTCCCT	Chew et al. 2010
	Chew_Till2_rev	CTCCCTGCCTCCGCGCAGYCGA	Chew et al. 2010
<i>ITS</i>	5A	CCTTATCATTTAAGAGGAAGGAG	Jabaily & Sytsma 2010
	5.8SR	ACGGGATTCTGCAATTCACAC	Jabaily & Sytsma 2010
	5.8SF	TCACGGCAACGGATATCTCGG	Jabaily & Sytsma 2010
	241R	CAGTGCCTCGTGGTGCGACA	Jabaily & Sytsma 2010
<i>Malatsynthase</i>	ms526f	GGACTATAAGCTTCCATGACCTC	Lewis & Doyle 2001
	ms943r	GTCTTNA CRTAGCTGAADATRTARTCCC	Lewis & Doyle 2001
<i>Phytochrom C</i>	PHYC-F	CCAGCTACTGATATACCTCAAGCTTC	Samuel et al. 2005
	PHYC-R	CCAGCTTCCATAAAGGCTATCAGTACT	Samuel et al. 2005
<i>Phytochrom C</i>	phyc515f2	AAGCCCTTYTACGCTATCCTGCACCG	Barfuss unpubliziert
	phyc1699r2	ATWGCATCCATTTCAACATCTTCCCA	Barfuss unpubliziert
	phyc524f	GCTATCCTGCACCGGATCGAYGT	Barfuss unpubliziert
	phyc1690r	TCAACATCTTCCCAAYGGGAGGCT	Barfuss unpubliziert
	phyc974f2	GCTCCTCAGGCTGCCACGCTCA	Barfuss unpubliziert
	phyc1145r	CCTGMARCARGAACTCACAAGCATATC	Barfuss unpubliziert

Für die vorliegende Arbeit wurden Bereiche des ersten Exons von *Phytochrom C* verwendet. Als Primer wurden zunächst von Samuel et al. (2005) publizierte Sequenzen getestet, die bereits in *Puya* funktioniert hatten (fälschlicherweise als intronisch bezeichnet bei Jabaily & Sytsma 2010). Des Weiteren kamen speziell für Bromeliaceae entwickelte Primer zum Einsatz, welche sowohl die Amplifikation eines etwa 1.200 bp langen Fragmentes von

## Material und Methoden

Exon 1 erlauben, als auch die Amplifikation von zwei Einzelteilen innerhalb dieses Bereiches (Michael Barfuss, Universität Wien, persönliche Mitteilung). Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

**Tabelle 6: PCR-Programme zur Amplifikation nukleärer Loci**

Einige Programme wurden in verschiedenen Modifikationen verwendet, die durch hochgestellte Buchstaben markiert sind. So wurden für jedes Programm mit vorangestelltem Buchstaben jeweils diejenigen Parameter verwendet, die in den mittleren Spalten mit eben diesem Buchstaben gekennzeichnet sind. Zur genauen Identifikation ist das Datum der jeweils ersten Verwendung im Programmnamen enthalten. Nach Ablauf des jeweiligen Programms wurden die Proben auf 10 °C heruntergekühlt.

Programm	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl	Quelle
ETS_HF	120 s	95 °C		
High Fidelity (Rovalab HF) (für ETS Baldwin/Chew)	20 s	95 °C	31x	diese Arbeit
	40 s	58 °C		
	300 s	72 °C		
	300 s	72 °C		
ETS_Krapp	300 s	94 °C	35x	diese Arbeit
	60 s	94 °C		
	60 s	55 °C		
	60 s	72 °C		
MS_Lewis	420 s	72 °C	35x	Lewis & Doyle 2001
	240 s	94 °C		
	60 s	94 °C		
	60 s	55 °C		
MS_Krapp	120 s	72 °C	45x	diese Arbeit
	420 s	72 °C		
	240 s	94 °C		
	60 s	94 °C		
PHYC_Samuel	60 s	50 °C	35x	Samuel et al. 2005
	30 s	48 °C		
	60 s	72 °C		
	600 s	72 °C		
PHYC_Barfuss	120 s	94 °C	15x	Barfuss unpubliziert
	15 s	94 °C		
	30 s	59 °C		
	120 s	70 °C ramp 1 °C/s		
	15 s	94 °C		
	30 s	59 °C		
Einfache Amplifikation A: phyc_20100518 B: phyc_20100527 C: phyc_20100531 D: phyc_nest_1_20100906 E: phyc_bandstab_1_20101110 F: phyc_bandstab_1_20110121	120 s + 10 s/Zyklus	70 °C ramp 1 °C/s	20x	diese Arbeit
	490 s	70 °C		
	120 s	94 °C		
	15 s <sup>A,B,C,F</sup> , 30 s <sup>D,E</sup>	94 °C		
	30 s	50 °C <sup>A,B,E,F</sup> , 55 °C <sup>C</sup> , 59 °C <sup>D</sup>		
	120 s	72 °C		
Zweistufige Amplifikation A: phyc_nest_1_20100608 B: phyc_nest_1_20100715 C: phyc_bandstab_1_20101111 D: phyc_20100607	480 s	72 °C	35x <sup>D</sup> , 45x <sup>F</sup>	diese Arbeit
	120 s	94 °C		
	15 s	94 °C		
	30 s	59 °C		
	120 s	70 °C ramp 1 °C/s		
	15 s	94 °C		
Reamplifikation nested PCR A: phyc_nest_2_20100608 B: phyc_nest_2_20100614 C: phyc_nest_2_20100906	30 s	59 °C	15x <sup>A,B,C</sup> , 20x <sup>D</sup>	diese Arbeit
	120 s	70 °C ramp 1 °C/s		
	15 s	94 °C		
	30 s	59 °C		
	120 s + 10 s/Zyklus	70 °C ramp 1 °C/s		
	490 s	70 °C		
Reamplifikation bandstab PCR A: phyc_bandstab_2_20101109 B: phyc_bandstab_2_20101110	120 s	94 °C	20x <sup>A,D</sup> , 25x <sup>B,C</sup>	diese Arbeit
	15 s <sup>A</sup> , 30 s <sup>B</sup>	94 °C		
	30 s	59 °C <sup>A</sup> , 50 °C <sup>B</sup>		
	120 s	70 °C ramp 1 °C/s <sup>A</sup> , 72 °C <sup>B</sup>		
	490 s <sup>A,B</sup> , 480 s <sup>C</sup>	70 °C <sup>A,B</sup> , 72 °C <sup>C</sup>		
	120 s	94 °C		
Reamplifikation nested PCR A: phyc_nest_2_20100608 B: phyc_nest_2_20100614 C: phyc_nest_2_20100906	120 s	94 °C	30x <sup>A</sup> , 35x <sup>B</sup> , 25x <sup>C</sup>	diese Arbeit
	15 s <sup>A,B</sup> , 30 s <sup>C</sup>	94 °C		
	30 s	59 °C		
	120 s	70 °C ramp 1 °C/s <sup>A,B</sup> , 72 °C <sup>C</sup>		
Reamplifikation bandstab PCR A: phyc_bandstab_2_20101109 B: phyc_bandstab_2_20101110	490 s <sup>A</sup> , 480 s <sup>B</sup>	70 °C <sup>A</sup> , 72 °C <sup>B</sup>	25x	diese Arbeit
	120 s	94 °C		
	15 s <sup>A</sup> , 30 s <sup>B</sup>	94 °C		
	30 s	59 °C <sup>A</sup> , 50 °C <sup>B</sup>		

## Material und Methoden

**Tabelle 7: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation nukleärer Loci**

Als Templat wurden entweder DNA-Stammlösungen, DNA-Arbeitslösungen, Aliquots kompletter PCR-Ansätze (nested PCR, vgl. Text) oder aus Agarosegel gestanzte Banden (band-stab-PCR, vgl. Text) verwendet. Da die DNA-Konzentrationen nicht exakt bestimmt wurden, ist die Menge an zugefügter Templat-DNA als Richtwert zu verstehen (\*).

Rezept zur Verwendung mit Mango-Taq			
Zutat	Stammkonzentration	Volumen pro 20 µl-Ansatz	Endkonzentration
5x Mango-Taq gefärbter Puffer (Bioline, Taunton)	5x	4,0 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,6 µl	1,5 mM
dNTPs (Carl Roth, Karlsruhe)	2,5 mM	1,6 µl	0,2 mM
Primer 1	10 µM	0,5 µl	0,25 µM
Primer 2	10 µM	0,5 µl	0,25 µM
DMSO (Carl Roth, Karlsruhe)	20 µg/ml	0,5 µl	0,5 µg/µl
Mango-Taq DNA Polymerase (Bioline, Taunton)	5 U/µl	0,4 µl	0,1 U/µl
DNA-Templat	*	2,0 µl	*
Aqua bidest	-	9,9 µl	-
Rezept zur Verwendung mit Long High Fidelity RCR Enzyme Mix			
Zutat	Stammkonzentration	Volumen pro 20 µl-Ansatz	Endkonzentration
10x HF Reaction Buffer (Roalab, Teltow)	10x	5,0 µl	1x
dNTPs (Carl Roth, Karlsruhe)	2,5 mM	1,0 µl	0,05 mM
Primer 1	10 µM	2,0 µl	0,4 µM
Primer 2	10 µM	2,0 µl	0,4 µM
Long High Fidelity PCR Enzyme Mix (Roalab, Teltow)	2,5 U/µl	0,5 µl	0,025 U/µl
DNA-Templat	*	3,0 µl	*
Aqua bidest	-	9,9 µl	-

### Malatsynthase (MS)

Das Protein Malatsynthase katalysiert im Glyoxylatzyklus die Bildung des vier Kohlenstoff-Atome enthaltenden Malatmoleküls aus zwei Molekülen Acetyl-Coenzym A (z. B. Kutschera 2002). Die entsprechende Genregion liegt beispielsweise bei den Palmen (Arecaceae) als Einzelkopie vor und eignet sich dort für phylogenetische Studien (Lewis & Doyle 2001). Die von diesen Autoren publizierten Primer zur Amplifikation eines exonischen Teilbereichs wurden für die vorliegende Arbeit getestet (Tabelle 5).

### ITS und ETS

Eine Sonderstellung unter den nukleären Loci nehmen die Gencluster ein, die für die ribosomalen RNAs (rRNA) kodieren und als rDNA bezeichnet werden (Baldwin et al. 1995). Eine einzelne Einheit besteht bei Pflanzen aus einem externen transkribierten Spacer (ETS), der 18S-rDNA, dem ersten internen transkribierten Spacer (ITS1), der 5.8S-rDNA, dem zweiten internen transkribierten Spacer (ITS2) und der 26S-rRNA. Diese Einheiten finden sich in vielfacher, tandemartiger Wiederholung hintereinander, jeweils getrennt von einem nicht transkribierten Spacer (NTS). Da rDNA-Sequenzen in einigen hundert bis tausend Kopien im Kerngenom vorkommen, lassen sie sich für gewöhnlich einfach amplifizieren,

## Material und Methoden

vergleichbar mit plastidären Loci. Weiterhin existiert normalerweise nur eine prädominante Version dieser Region, die meisten Kopien sind identisch. Auftretende Mutationen werden rasch durch Rekombinationsereignisse angeglichen, es findet eine konzertierte Evolution statt (z. B. Knoop & Müller 2009). Allerdings gibt es auch Ausnahmen hiervon, was teils zu einer unerwarteten Diversität an Allelen führt (z. B. Small et al. 2004).

Die hoch konservierten Sequenzen der kodierenden Regionen innerhalb der rDNA erlauben die Entwicklung von Primerpaaren, welche über weite taxonomische Gruppen hinweg universell funktionieren (Baldwin & Markos 1998). Mit deren Hilfe lassen sich die dazwischen liegenden Bereiche (*ETS*, *ITS1* und *ITS2*) meist gut amplifizieren. Die konzertierte Evolution erlaubt ferner eine direkte Sequenzierung der PCR-Produkte ohne vorhergehende Klonierung, was einen großen methodischen Vorteil darstellt. Als nachteilig ist die mehr oder weniger zufällige Angleichung der Kopien aneinander zu sehen, wodurch phylogenetische Informationen während der Evolution verloren gehen. Wie bei plastidären Sequenzen liefert die vergleichende Sequenzierung der rDNA-Abschnitte nur Informationen über eine Abstammungslinie. Nach Hybridisierungsereignissen ist zumeist nicht klar, ob sich die paternale oder die maternale Version der rDNA im Rahmen der konzertierten Evolution durchsetzt. Ein weiteres Problem stellt die mögliche Existenz von Paralogen dar, welche bei direkter Sequenzierung nicht erkannt werden (Small et al. 2004).

Die Amplifikation und Sequenzierung von *ITS* sowie die Auswertung der Daten gilt als problematisch innerhalb der Bromeliaceae (Michael Barfuss, Universität Wien, persönliche Mitteilung). Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

### 2.2.3.3 Verwendete Reagenzien und Durchführung

Die PCR wurde zumeist in Volumina von 20 µl durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ansätze ist den Tabellen 4 und 7 zu entnehmen. Sollten die PCR-Fragmente anschließend sequenziert werden, so wurden Primer mit M13-Anhängen eingesetzt (Fartmann et al. 1999). Dabei handelt es sich um bekannte Sequenzen, welche am 5'-Ende der eigentlichen PCR-Primer angehängt sind. Dies ermöglicht eine spätere Sequenzierreaktion mit universellen fluoreszenzmarkierten Primern. Eine Zusammenstellung der für die PCR verwendeten Primer findet sich in den Tabellen 2 und 5. Alle Reaktionen wurden in einem T-1 oder T-Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Programme sind in den Tabellen 3 und 6 aufgelistet. Welche Programme jeweils für die Amplifikation einzelner untersuchter plastidären Loci eingesetzt wurden, ist den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

## Material und Methoden

Für den nukleären Locus *phyC* wurde zunächst eine PCR mit Primern nach Samuel et al. (2005) und dem von diesen Autoren beschriebenen Programm (PHYC\_Samuel) durchgeführt. Ferner wurde die direkte Amplifikation und Sequenzierung sowohl des Gesamtfragmentes, als auch der beiden Einzelteile jeweils mit für die Bromeliaceae spezifischen Primern (Michael Barfuss, Universität Wien, persönliche Kommunikation) durchgeführt. Neben vielen Ausfällen, schwachen Amplifikaten und extrem schlechter Qualität der Sequenzierung zeigten sich häufig auch unspezifische und unerwünschte zusätzliche PCR-Produkte. Insgesamt fünf unterschiedliche Programme wurden zur direkten Amplifikation getestet (vgl. Tabelle 6: PHYC\_Barfuss und alle Programme, deren Namen mit „*phyC*“ beginnen).

Zur Optimierung der PCR-Amplifikation des Locus *phyC* wurden diverse Proben eingesetzt und zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Einerseits wurde eine verschachtelte (nested) PCR durchgeführt (z. B. Mülhardt 2006). Mit normaler DNA-Stammlösung als Templat wurde dazu jeweils zunächst eine erste PCR mit den Primern *phyC515f* und *phyC1699r2* ohne M13-Anhang durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls verschiedene Programme eingesetzt (Programme *phyC\_nest\_1...* in Tabelle 6). Für die verschachtelte PCR wurde das Produkt dieser Reaktion als Templat für zwei zweite Reaktionen mit den Primern *phyC524f* und *phyC1145r* zur Amplifikation von Teil a einerseits und *phyC974f2* und *phyC1690r* für Teil b andererseits verwendet. Hierfür kamen relativ kurze Programme zum Einsatz (Programme *phyC\_nest\_2...* in Tabelle 6). Alle in diesen Reaktionen verwendeten Primer trugen einen M13-Anhang und die Produkte wurden anschließend sequenziert.

Für den zweiten Ansatz zur Optimierung kam die so genannte band-stab-Methode zum Einsatz (Bjournson & Cooper 1992). Zunächst erfolgte die Amplifikation des Gesamtfragmentes analog zum ersten Schritt der oben genannten verschachtelten PCR (Programme *phyC\_bandstab\_1...* in Tabelle 6). Für die zweite Reaktion wurden Reaktionsansätze entsprechend Tabelle 7 vorbereitet. Es wurden die gleichen Primer verwendet wie in der zweiten Reaktion der verschachtelten PCR, jedoch wurde der Anteil an Aqua bidest für jede Probe um 2 µl erhöht. Die Produkte der ersten Reaktion wurden auf Agarose aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (vgl. 2.2.2). Unter UV-Licht wurden mit sterilen Pipettenspitzen Bereiche des Gels ausgestanzt, in denen die Banden des erwarteten Fragmentes sichtbar waren. Die Spitzen wurden für etwa 10 min in die entsprechenden Reaktionsgefäße für die zweite PCR gestellt, wobei DNA aus den ausgestanzten Gelstückchen in den Reaktionsansatz diffundierte. Mit diesem wurde dann die Amplifikation der beiden einzelnen Abschnitte a und b aus dem Gesamtfragment durchgeführt (Programme *phyC\_bandstab\_2...* in Tabelle 6).

## Material und Methoden

Für die meisten Proben wurde die PCR des Locus *phycC* letztlich mittels der Bandstab-Methode durchgeführt. Dabei kamen die Programme *phyc\_bandstab\_1\_20101111* für die Amplifikation des Gesamtfragmentes und *phyc\_bandstab\_2\_20101110* für die zweite Reaktion zum Einsatz (Tabelle 6). Eine detaillierte Übersicht über alle verwendeten Kombinationen von Primern und Programmen findet sich in Anhang 1.

Für den nukleären Locus *MS* wurde zunächst das von Lewis & Doyle (2001) zusammen mit den Primern publizierte Programm für das Testset TS2 verwendet. Danach wurde ein Programm mit reduzierter Annealingtemperatur und höherer Zyklenzahl für ein breiteres Probenstet aus Arten von *Dyckia* (FK0001, FK0005, FK0006, FK0013), *Deuterocohnia* (FK0071), *Fosterella* (FK0081), *Puya* (FK0082) und *Pitcairnia* (FK0083) eingesetzt (Programme *MS\_Lewis* und *MS\_Krapp* in Tabelle 6).

Für die Regionen *ITS1* und *ITS2* der rDNA wurden Reaktionen für das Testset TS2 unter Standardbedingungen (Programm *UniPCRFK* in Tabelle 3) durchgeführt. Für die *ETS*-Region wurde eine PCR mit für die Unterfamilie Bromelioideae etablierten Primern (Sass & Specht 2010) mit einem eigenen Programm (*ETS\_Krapp* in Tabelle 6) für Proben der Gattungen *Dyckia* (FK0108-FK0111), *Fosterella* (FK0117-FK0118), *Pitcairnia* (FK0119) und *Puya* (FK0121) durchgeführt. Ferner kamen für die Gattung *Tillandsia* entwickelte Primer (Chew et al. 2010) zum Einsatz. Für die PCR der *ETS*-Region wurde aufgrund der erwarteten großen Fragmentlänge eine leistungsfähigere DNA-Polymerase (Long High Fidelity RCR Enzyme Mix, Rovalab, Teltow) mit angepasstem Rezept (Tabelle 7) und Programm (*ETS\_HF* in Tabelle 6) verwendet. Die gleiche PCR wurde auch mit universellen Primern zur Amplifikation des gesamten Bereiches aus *ETS* und *NTS* (Baldwin & Markos 1998) durchgeführt. Für beide Ansätze wurde ein kleines Testset mit den Gattungen *Dyckia* (FK0108 und FK0109) und *Pitcairnia* (FK0119 und FK0120) verwendet.

### 2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die hier angewendete Art der Sequenzierung basiert auf einer Variante der Kettenabbruch-Synthese (Sanger et al. 1977). Wie bei einer PCR werden spezifische Primer an den Flanken der Zielregion angelagert und dann durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase elongiert. Der essentielle Unterschied zur PCR ist der Zusatz geringer Mengen an 2'-3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs) neben den normalen dNTPs (vgl. 2.2.3). Da diesen die 3'-Hydroxygruppe fehlt, können an eingebaute ddNTPs keine weiteren Nukleotide angefügt werden, die Synthese bricht ab. In vier Ansätzen pro zu sequenzierender Probe wird jeweils ein Typ an ddNTPs für die Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) eingesetzt. Bei jedem Ansatz entstehen somit verkürzte

## Material und Methoden

Fragmente, die an ihrem Ende alle die gleiche Base aufweisen. Die in den vier Ansätzen synthetisierten Fragmente werden auf einem hochauflösenden Sequenziergel aus Polyacrylamid (PAA) in vier Spuren nebeneinander aufgetrennt. Dabei entsteht ein typisches Bandenmuster. Für jede Fragmentgröße existiert in genau einem der Ansätze eine Bande. Aus diesem Muster lässt sich die DNA-Sequenz der Probe ablesen.

### Lösungen und Reagenzien:

- 1  $\mu$ M M13-IRD700 fwd-Primer-Lösung
- 1  $\mu$ M M13-IRD800 rev-Primer-Lösung
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)
- Formamid-Ladepuffer (98% (v/v) Formamid, 0,025% (v/v) basisches Fuchsin, 10 mM EDTA)
- PAA-Gel (5 ml Ultra Pure SequaGel® Complete Buffer Reagent, 20 ml Ultra Pure SequaGel XR (beides National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA), 200  $\mu$ l Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) 100 mg/ml in Aqua bidest (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)
- 1x TBE-Puffer pH 8,3 (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA)

### Durchführung:

Aus ökonomischen Gründen wurden für alle Sequenzierreaktionen universelle Primer verwendet, die komplementär zu den beiden verschiedenen M13-Anhängen der für die PCR verwendeten Primer waren (vgl. 2.2.3.3). Beide Primer trugen eine Fluoreszenzmarkierung an ihrem 5'-Ende (IRDye 700 am Vorwärts-Primer M13-IRD700 fwd und IRDye 800 am Rückwärts-Primer M13-IRD800 rev).

Für jede zu sequenzierende Probe wurden 3  $\mu$ l des nicht aufgereinigten PCR-Produktes mit 3  $\mu$ l der M13-IRD700 fwd-Primer-Lösung, 5  $\mu$ l der M13-IRD800 rev-Primer-Lösung, 0,9  $\mu$ l DMSO und 8,1  $\mu$ l Aqua bidest vermischt. Je 4,5  $\mu$ l davon wurden mit einer der vier Lösungen (A, C, G und T) des Thermo Sequenase-Kits vermischt. Es wurde jeweils 16 Proben gleichzeitig in einer Mikrotiterplatte mit 96 Reaktionsgefäßen verarbeitet. Die Sequenzierreaktionen wurden in einem T-1 oder T-Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung für 5 min bei 95 °C folgten 25 Synthese-Zyklen, bestehend aus jeweils 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 57 °C und 60 s Elongation bei 72 °C. Nach einer finalen Elongation für 10 min bei 72 °C wurden die Proben auf 10 °C gekühlt. Eine dauerhafte Denaturierung der Produkte wurde

## Material und Methoden

durch Zugabe von 5 µl Formamid-Ladepuffer pro Ansatz und Erhitzen für 5 min auf 85 °C erreicht. Pro Ansatz wurden 0,8 µl auf ein PAA-Sequenziergel (41 cm Länge, 0.2 mm Dicke, 64 Taschen, Haifischzahn-Kamm) des Sequenzierers geladen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in Abhängigkeit der zu erwartenden Sequenzlänge für 3-8 Stunden auf einem automatischen Gel-Sequenzierer (IR<sup>2</sup> DNA Sequenzierer Long Readir 4200, LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) unter standardisierten Bedingungen (25 mA, 45 °C).

### 2.2.5 Plastidäre Mikrosatelliten (cpSSRs)

Für die Identifizierung von Mikrosatelliten (SSRs) im Plastom von *Dyckia* wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Zum einen wurden die Sequenzalignments der verschiedenen unter 2.2.3.1 beschriebenen Loci auf das Vorhandensein von SSRs hin überprüft. Zum anderen wurden zahlreiche durch 454-Sequenzierung (next-generation sequencing, NGS) erhaltene Sequenzen einer Art von *Dyckia* auf die Anwesenheit plastidärer SSRs untersucht. Diese Daten wurden in Rahmen eines Kooperationsprojektes mit T. Wöhrmann (Universität Kassel) und Dr. B. Huettel (MPI für Züchtungsforschung Köln) produziert.

#### 2.2.5.1 Entwicklung von Primerpaaren für cpSSR-Loci

Da die 454-Sequenzierung selbst nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, soll hier nur am Rande darauf eingegangen werden. Aus Blattmaterial der Art *Dyckia marnier-lapostollei* var. *estevessii* (FK0030 in Tabelle 1) wurde in vier parallelen Ansätzen eine ausreichende Menge an Gesamt-DNA isoliert (nach 2.2.1). Davon wurden 5 µg DNA durch Zerstäubung fragmentiert und die Bruchstücke in eine vorgefertigte Bibliothek ligiert (entsprechend den Vorgaben im Rapid Library Preparation Method Manual, Roche Diagnostics, Mannheim). Die resultierende DNA-Bibliothek wurde mittels Fluorometrie quantifiziert (TBS-380, Turner Biosystems, Sunnyvale, Kalifornien, USA). Die Sequenzierung nach dem Schrotschuss-Prinzip erfolgte auf einem Roche 454 GSFLX mit dem Titanium Sequencing Kit XLR70 und dem Titanium PicoTiterPlate Kit (alles Roche Diagnostics, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Herstellung und 454-Sequenzierung der Bibliothek erfolgte durch einen Kooperationspartner am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln.

Aus den resultierenden Einzelsequenzen wurden zunächst all jene plastidären Ursprungs ausgefiltert. Als Referenz diente das Plastom von *Typha latifolia* (GenBank-Nummer GU195652.1 Guisinger et al. 2010). Diese Art ist vermutlich der nächste Verwandte der Bromeliaceae, für die die komplette Sequenz des Plastoms publiziert ist (z. B. Givnish et al. 2010). Mittels der Software Geneious 5.4 (Drummond et al. 2011) wurde eine Datenbank aus allen Einzelsequenzen aus der 454-Analyse generiert. Gegen diese wurde dann das Plastom

## Material und Methoden

von *T. latifolia* mittels des BLAST-Algorithmus (Altschul et al. 1997) abgeglichen. Für signifikant ähnliche Sequenzen wurde angenommen, dass sie eine plastidäre Herkunft haben. Für alle diese wurde dann die Contig Assembly-Funktion von Geneious 5.4 genutzt, um überlappende Einzelsequenzen zu größeren Fragmenten zusammenzufassen. Dafür wurden Standardeinstellungen verwendet. Der endgültige Datensatz der plastidären Sequenzen von *Dyckia marnier-lapostollei* var. *estevesii* enthielt schließlich alle Contigs und alle jene Einzelsequenzen, die nicht in eine der Contigs eingeflossen waren. Dieser Datensatz wurde dann erneut mit dem Genom von *T. latifolia* verglichen, um die Abdeckung und Lage der Fragmente im Plastom zu überprüfen.

Die Suche nach SSRs in diesem Datensatz wurde mit der Find-String-Suchfunktion von PhyDE 0.9971 (Müller et al. 2011) durchgeführt. Dabei wurden alle SSRs mit sieben oder mehr Adenin- oder Thymin-Basen berücksichtigt. Alle SSRs mit 10 oder mehr Wiederholungen wurden zur Entwicklung von cpSSR-Primerpaaren für Variabilitätstests ausgewählt, sofern flankierende Regionen für das Primerdesign vorhanden waren und die Loci noch nicht aus früheren Analysen (siehe 2.2.3.1) bekannt waren. Für diese Loci und die aus der Sanger-Sequenzierung bekannten cpSSR-Loci wurden manuell Primerpaare entwickelt. Als Kriterien für das Design von Primern wurden eine Länge von 20 Nukleotiden und ein hoher GC-Gehalt gefordert. Sofern möglich wurde das 3'-Ende der Primer jeweils so gewählt, dass es mindestens zwei Cytosin- oder Guanin-Basen aufwies. Für alle Primerpaare wurde jeweils auch die Kompatibilität ihrer 3'-Enden überprüft, um die Bildung von Primer-Dimeren in der PCR zu minimieren (z. B. Mülhardt 2006).

### 2.2.5.2 Primer-Tests und Charakterisierung

Die neu entwickelten Primerpaare wurden zunächst in Pilotexperimenten auf ihre Funktionalität überprüft. Hierzu wurden PCR mit je einer Akzession von *D. marnier-lapostollei* var. *estevesii* (FK0030), *D. dissitiflora* (FK0141) und *D. pernambucana* (FK0171) durchgeführt. Als günstige Alternative zu direkt fluoreszenzmarkierten Primern wurde die indirekte Markierung nach Schuelke (2000) verwendet. Bei dieser Methode werden ein normaler Rückwärts-Primer, ein Vorwärts-Primer mit einer M13-Sequenz am 5'-Ende und ein M13-Vorwärts-Primer mit Fluoreszenzmarkierung kombiniert (siehe auch 2.2.3.3 und 2.2.4). Die Reaktionen wurden im 10 µl-Maßstab in einem T-1 oder T-Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt (Tabelle 8). Dabei kam ein Standardprogramm (UniPCRFK in Tabelle 3) zum Einsatz. Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.2.2).

## Material und Methoden

Jeweils 1 µl der PCR-Ansätze wurden dann mit 30 µl Formamid-Ladepuffer vermischt und für 5 min bei 85 °C denaturiert. Jeweils 0,2-0,6 µl davon wurden auf einem PAA-Sequenziergel (41 cm Länge, 0.2 mm Dicke, 48 Taschen, Haifischzahn-Kamm) aufgetrennt. Hierfür kamen sowohl ein 4300 DNA Analyzer, als auch ein IR<sup>2</sup> DNA Sequenzierer Long Readir 4200 (beide LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) zum Einsatz. Elektrophoresebedingungen, Gelzusammensetzung und Pufferlösungen entsprachen den für die DNA-Sequenzierung verwendeten Parametern (2.2.4).

**Tabelle 8: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation plastidärer Mikrosatelliten (cpSSRs)**

Da die DNA-Konzentrationen nicht exakt bestimmt wurden, ist die Menge an zugefügter Templat-DNA als Richtwert zu verstehen (\*).

Zutat	Stamm- konzentration	Volumen pro 10 µl-Ansatz	End- konzentration
5x Mango- <i>Taq</i> gefärbter Puffer (Bioline, Taunton)	5x	2,0 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,3 µl	1,5 mM
dNTPs (Carl Roth, Karlsruhe)	2,5 mM	0,8 µl	0,2 mM
Primer fwd	10 µM	0,04 µl	0,04 µM
Primer IRD700-M13-fwd	10 µM	0,16 µl	0,16 µM
Primer rev	10 µM	0,16 µl	0,16 µM
BSA (Invitrogen, Carlsbad)	20 µg/ml	0,25 µl	0,5 µg/µl
Mango- <i>Taq</i> DNA Polymerase (Bioline, Taunton)	5 U/µl	0,1 µl	0,05 U/µl
DNA-Templat (Arbeitslösung)	*	1,0 µl	*
Aqua bidest	-	5,19 µl	-

Neben den Proben wurde in einigen Spuren ein Fragmentlängenstandard aufgetragen, der eigens für diesen Zweck wie folgt hergestellt wurde. Zunächst wurde mit Templat-DNA von *Fosterella villosula* (FK0076) eine PCR für den Locus *rps16-trnK* Teil a durchgeführt (2.2.3.1 und 2.2.3.3). Das resultierende Produkt wurde für eine Sequenzierreaktion nur mit der T-Lösung des Thermo Sequenase-Kits verwendet (2.2.4). Deren Produkt wiederum wurde 1:1 mit Formamid-Ladepuffer vermischt und vor Gebrauch wie oben angegeben denaturiert. Anhand der bekannten Sequenz der Probe an diesem Locus konnten die Größen von komigrierenden PCR-Produkten im PAA-Gel unproblematisch abgeleitet werden. Das Prinzip fragmentreicher externer Längenstandards ist verbreitet für SSR-Analysen auf Gelsequenzierern (z. B. Guicking et al. 2008; Prinz et al. 2009; Wöhrmann & Weising 2011).

Erfolgversprechende Loci wurden für eine weitergehende Charakterisierung ausgewählt. Als Auswahlkriterien dienten die gute Amplifizierbarkeit in allen drei Proben, das Ausmaß an Variabilität zwischen den drei Arten und die absolute Länge der SSRs. Für diese Loci wurde eine Fragmentlängenanalyse mit einem erweiterten Set von insgesamt 58 Proben durchgeführt, das je vier Individuen aus drei Populationen von *D. dissitiflora*, drei Populationen von *D. pernambucana* und einer Population von *D. limae* enthielt. Dieser

## Material und Methoden

Ansatz diene als Eignungstest der Loci für Populationsstudien an den genannten Arten. Ferner wurden 17 Akzessionen von 16 weiteren *Dyckia*-Arten verwendet, um die Eignung der cpSSR-Loci für Studien oberhalb der Artebene zu evaluieren. Je zwei Arten von *Encholirium*, *Deuterocohnia*, *Fosterella*, *Pitcairnia* (alles Pitcairnioideae) und *Puya* (Puyoideae), sowie je eine Akzession von *Ananas* (Bromelioideae), *Hechtia* (Hechtioideae) und *Tillandsia* (Tillandsioideae) dienten ferner dem Testen der Übertragbarkeit zwischen Gattungen und Unterfamilien. Alle verwendeten Pflanzen finden sich in Tabelle 1 oder Anhang 19.

Für die Proben FK0030 und FK0178 wurden die PCR-Produkte aller cpSSR-Loci resequenziert (2.2.4). Hiermit wurde einerseits eine unabhängige Überprüfung der möglicherweise teils ungenauen 454-Daten gewährleistet. Andererseits konnte auf diese Weise die absolute Länge der aus Sanger-Sequenzen entwickelten SSRs ermittelt werden, welche aufgrund mangelnder Überschneidung mit dem Testset TS2 (siehe 2.2.3.3) noch nicht bekannt waren. Amplifikate aus der Probe FK0178 wurden bei allen folgenden Elektrophoresen als Referenzprobe aufgetragen. Durch direkten Vergleich konnte somit für alle anderen Proben die absolute Fragmentlänge ermittelt werden.

Eine Fragmentlängenanalyse aller 12 cpSSR-Loci wurde noch für weitere Proben durchgeführt. Eine Übersicht über alle eingesetzten Proben findet sich in Tabelle 1.

## 2.3 Datenanalyse

### 2.3.1 DNA-Sequenzen, Alignments und Außengruppen

Die Rohdaten aus den Sequenzierläufen wurden zunächst mittels der Software e-Seq 2.0 (LICOR Biotechnology, Lincoln, Nebraska, USA) automatisch ausgewertet. Die so erhaltenen Sequenzen wurden dann grob überprüft und gegebenenfalls von Hand nachbearbeitet, wobei qualitativ schlechte Bereiche entfernt wurden.

Mittels der Computerprogramme AlignIR 1.2 und AlignIR 2.0 (beide LICOR Biotechnology, Lincoln, Nebraska, USA) wurden die Einzelsequenzen anschließend detailliert überprüft und editiert. Eventuell enthaltene Primer-Sequenzen wurden entfernt. Die Vorwärts- und Rückwärtssequenzen sowie die Einzelsequenzen bei geteilten Loci wurden für jede Probe einzeln aligniert. Nach einer visuellen Kontrolle und gegebenenfalls weiterer Editierung wurde für jede Probe und jeden Locus eine Konsensussequenz gebildet.

Für das automatische Alignment der Konsensussequenzen für jeden Locus wurde zunächst der in AlignIR implementierte Algorithmus verwendet (Huang 1992; 1994). Nach Vergleich der Proben untereinander wurden eventuell noch vorhandene Fehler in den

Einzelsequenzen bereinigt. Das endgültige Alignment für die einzelnen Loci und für die kombinierte Analyse wurde mit der Software PhyDE 0.9971 (Müller et al. 2011) durchgeführt. Nach einem automatischen Abgleich mittels des Algorithmus MUSCLE 3.8.31 (Edgar 2004) wurden uneindeutige Bereiche und Indels von Hand aligniert. Indels, variable SSRs und Inversionen wurden allesamt nicht kodiert und somit aus allen phylogenetischen Analysen ausgeschlossen.

Als Außengruppen wurden für alle Analysen plastidärer Sequenzen *Puya ferruginea* (FK0082) und *Puya herzogii* (FK0121) verwendet. Für Analysen des *phyC*-Datensatzes wurden *Pitcairnia feliciana* (FK0119), *P. fuertesii* (FK0120), *P. heterophylla* (FK0083), *P. piepenbringii* (FK0085) und *P. pungens* (FK0084) als Außengruppentaxa angenommen. Dies war gerechtfertigt durch Ergebnisse einer ausgedehnten Analyse von *phyC* für ein erweitertes Probenet (Schütz et al., unveröffentlichte Daten), nach der alle untersuchten Vertreter von *Puya* zwischen den übrigen Gattungen der Pitcairnioideae stehen (vgl. Anhänge 2 und 3). Vergleichsweise kam für *phyC* auch die Mittelpunktswurzelung (midpoint rooting) zum Einsatz, welche lediglich mit den beobachteten Astlängen arbeitet, ohne eine zuvor definierte Außengruppe anzunehmen (vgl. Knoop & Müller 2009).

Die Daten aus den Fragmentlängenanalysen plastidärer SSR-Loci wurden ebenfalls in die Form eines Sequenzalignments überführt. Für jeden Locus wurde zunächst ein leeres Alignment mit 25 Positionen Länge angelegt. In dieses wurden für jede Probe zunächst Adenin-Basen entsprechend der beobachteten SSR-Länge eingefügt. Dann wurden jeweils Thymin-Basen bis zu einer Gesamtlänge von 25 Nukleotiden aufgefüllt. Beispielsweise wurde so ein zwölf Adenin-Basen langer Mikrosatellit ( $A_{12}$ ) in der Form  $A_{12}T_{13}$  notiert. Ausgefallene Proben wurden entsprechend als Lücke mit 25 Positionen Länge angegeben. Die einzelnen Blöcke wurden im Anschluss zu einem einzigen Alignment zusammengefügt.

### 2.3.2 Behandlung von Heterozygotie

Bei der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten nukleärer Loci stellt sich das Problem möglicher allelischer Variation. Besitzen alle amplifizierte Allele dieselbe Länge, liefert die direkte Sequenzierung eine durchweg lesbare Sequenz. Für Positionen, an welchen sich die Allele durch Basensubstitutionen unterscheiden, zeigen sich Banden in mehr als einer Spur des Gels, im diploiden Organismus in zwei Spuren. Die fertig editierte Konsensussequenz zeigt hier dann das entsprechende Symbol für eine Ambiguität. Im diploiden Organismus sind zwei Konstellationen möglich, die auf Transitionen zurückzuführen sind (R für A oder G, Y für C oder T). Vier Konstellationen können auf Transversionen zurückgeführt werden (S für C oder G, W für A oder T, M für A oder C und K für G oder T).

## Material und Methoden

In einem für den sequenzierten Locus homozygoten Organismus sind beide Allele identisch und die Sequenz ist eindeutig lesbar. Unterscheiden sich zwei Allele an exakt einer Position, so lassen sich die beiden der Überlagerung zugrunde liegenden Allele einfach rekonstruieren. Die überlagerte Sequenz wird dupliziert und an der betreffenden Stelle bekommt jede Tochtersequenz einen anderen der beiden Zustände zugeordnet. Unterscheiden sich zwei Allele an  $n$  Positionen, gibt es hingegen  $2^n$  verschiedene aus der Überlagerung ableitbare Sequenzen. Bei allen Konstellationen mit  $n > 1$  kann daher ohne Klonierung der PCR-Produkte nicht festgestellt werden, wie die Sequenz der beiden überlagerten Allele tatsächlich aussieht.

Bei der beobachteten Heterozygotie handelt es sich um natürliche innerartliche Variation, solange keine künstlichen Hybride untersucht werden. Insbesondere bei einer Gattung wie *Dyckia*, wo offenbar weitgehende Interfertilität zwischen den meisten Arten und sogar mit Arten von *Encholirium* herrscht (Grant & Zijlstra 1998; Versieux & Wendt 2006), ist hier aber a priori keine sichere Annahme zu treffen.

Bei innerartlicher Variation sind zwei Zustände zu unterscheiden. Unterschiedliche Allele im gleichen Individuum stellen für phylogenetische Untersuchungen dann kein Problem dar, wenn sie beide auf ein ursprüngliches Allel zurückzuführen sind, das bereits privat für die betreffende Art war. Ein Test auf diesen Zustand kann durchgeführt werden, indem zunächst alle heterozygoten Sequenzen in zwei Tochtersequenzen geteilt werden. An unsicheren Positionen werden die beiden möglichen Zustände zufällig den abgeleiteten Sequenzen zugeordnet. Werden alle abgeleiteten Sequenzen zur Rekonstruktion einer Phylogenie verwendet, sollten alle Paare abgeleiteter Sequenzen in einer gemeinsamen Klade vereinigt sein. Die Trennung sollte mehrfach wiederholt werden, da es sich um einen Zufallsprozess handelt und Wiederholungen unterschiedliche Ergebnisse hervorrufen (vgl. Jabaily & Sytsma 2010).

Intraspezifische Variation, bei der die beteiligten Allele nicht exklusiv in einer Art vorkommen, wirkt sich dagegen negativ auf die Auflösung der Phylogenie aus. Dann gehören die jeweils beteiligten Allele eigentlich in zwei unterschiedliche Kladen der Phylogenie, was sich durch Klonierung und Sequenzierung zeigen lässt. Bei der Verwendung überlagerter Sequenzen ziehen sich die beiden betreffenden Kladen an und verschmelzen gegebenenfalls. Die Auflösung sinkt so unter Umständen massiv ab. Solche Zustände können entweder durch kürzliche Hybridisierung oder durch Introgression eines Allels durch Hybridisierung in der Vergangenheit verursacht werden. Oder aber es handelt sich um ursprüngliche allelische Variation (ancient alleles). Die ursprüngliche Allelvariation einer Klade entspricht der allelischen Variation innerhalb der letzten gemeinsamen Vorfahren derselben. Sie erklärt das

Vorhandensein einzelner Allele in verschiedenen Arten, selbst wenn diese genetisch isoliert sind. Verlieren verschiedene abgeleitete Linien durch genetische Flaschenhälse und Gendrift nämlich unterschiedliche Teile des ursprünglichen Genpools, so wirken die Arten dieser Linien genetisch durchmischt, obwohl sie möglicherweise reproduktiv isoliert voneinander sind. Somit entspricht die Evolution der Allele eines Gens nicht unbedingt der Evolution der sie führenden Arten. Eine aus nukleären Sequenzen berechnete Phylogenie zeigt in erster Linie immer den Stammbaum der Allele, den Genbaum (gene tree). Wie dieser mit der Phylogenie der beteiligten Organismen (species tree) zusammenhängt, muss immer individuell betrachtet werden (z. B. Rosenberg & Nordborg 2002).

Für das Sequenzalignment von *phyC* wurden verschiedene Methoden angewendet, um die Auflösung der Phylogenie zu optimieren und den Einfluss der Heterozygotie zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurde die Software SeqSplitter 1.0 entwickelt, die das originale Alignment statistisch auswertet und modifiziert (die Spezifikationen sind Anhang 4 zu entnehmen). Einerseits wurden Positionen im Alignment gelöscht, die in mehr als einer bestimmten Zahl  $n_{\text{pos}}$  von Sequenzen Unsicherheiten enthielten. Für verschiedene Werte von  $n_{\text{pos}}$  (0, 1, 2, 5, 10) wurden mit den so modifizierten Datensätzen Bayes'sche Analysen (2.3.6) durchgeführt. Andererseits wurden Sequenzen gelöscht, die an mehr als einer bestimmten Zahl  $n_{\text{seq}}$  an Positionen Unsicherheiten aufwiesen. Für unterschiedliche  $n_{\text{seq}}$  (0, 1, 3, 5, 7, 10) wurden ebenfalls Bayes'sche Analysen gerechnet. In einem dritten Ansatz wurden alle Sequenzen von *Dyckia* und *Encholirium* mit  $n_{\text{seq}} \leq 1$  eindeutig in zwei Allele aufgeteilt. Diese waren für  $n_{\text{seq}}=0$  jeweils paarweise identisch, für  $n_{\text{seq}}=1$  unterschieden sie sich in einer Position und waren daher eindeutig identifizierbar. In einer weiteren Modifikation wurden schließlich Alignmentpositionen, die für exakt eine Probe heterozygot und für alle anderen uniform waren, manuell als nicht heterozygot gewertet. Dieses Vorgehen erhöhte die Anzahl an Sequenzen, die das Kriterium  $n_{\text{seq}} \leq 1$  erfüllten. Es erscheint dadurch gerechtfertigt, dass autapomorphe Merkmalsänderungen die interne Topologie eines Baumes generell nicht beeinflussen. Auch für die beiden letztgenannten Modifikationen wurden Bayes'sche Analysen durchgeführt.

Allen diesen Vorgehensweisen lag die Bestrebung zugrunde, auch ohne eine vorherige Klonierung eine möglichst hohe Zahl der untersuchten Akzessionen für die Erstellung des Genbaums verwenden zu können.

### 2.3.3 Distanzanalysen, Bootstrap- und Jackknife-Verfahren

Distanzanalysen sind unkomplizierte und schnelle Methoden zur Erstellung phylogenetischer Bäume. Im einfachsten Fall werden p-Distanzen, also prozentuale Sequenzunterschiede

zwischen jeweils zwei Sequenzen verwendet. Es gibt aber auch aufwändigere Algorithmen, die die unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten des Auftretens verschiedener Mutationstypen in die Distanzberechnung mit einbeziehen (Knoop & Müller 2009). Alle Sequenzen des Datensatzes werden paarweise miteinander verglichen und in eine so genannte Distanzmatrix überführt. Nun werden die beiden ähnlichsten Sequenzen als Konsensussequenz zusammengefasst und eine neue Distanzmatrix mit dieser und den verbliebenen ungruppierten Sequenzen berechnet. Dieser Schritt wird wiederholt, bis alle Sequenzen in einem einzigen Cluster zusammengefasst sind. Das am häufigsten verwendete Clustering-Verfahren ist der Neighbour Joining-Algorithmus (NJ, Saitou & Nei 1987).

Unter den Verfahren, Verzweigungen innerhalb von Phylogenien auf ihre Stabilität hin zu überprüfen, ist die Bootstrap-Analyse (BS, Felsenstein 1985) sicherlich die bekannteste. Für diese Methode kommt derselbe Algorithmus wie in der Einzelanalyse zum Einsatz, aber der Datensatz wird modifiziert. Beim Bootstrapping wird bei der Erstellung eines modifizierten Datensatzes  $n$  mal eine zufällige Spalte aus einem  $n$  Basen langen Original-Alignment gezogen („Ziehen mit Zurücklegen“). Anschließend wird mit dem modifizierten Datensatz eine phylogenetische Rekonstruktion durchgeführt. Dieses Vorgehen wird in mehreren Replikaten wiederholt. Für jeden Knoten der originalen Phylogenie wird dann überprüft, in welchem Prozentsatz der erhaltenen Bootstrap-Bäume er vorkommt. Dieser Prozentsatz heißt Bootstrap-Wert und stellt ein Maß für die statistische Absicherung einer einzelnen Verzweigung auf der Grundlage des verwendeten Datensatzes dar. Das Jackknife-Verfahren (JK) ist sehr ähnlich, hier werden die modifizierten Datensätze aber durch „Ziehen ohne Zurücklegen“ generiert. Praktisch wird dazu einfach ein gewisser Anteil an Alignmentpositionen gelöscht. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Jackknife-Analysen wurde für jedes Replikat die Hälfte des Datensatzes verworfen. Für beide Verfahren gelten Werte unter 50% als nicht gesicherte Knoten und werden häufig nicht angegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden Neighbour Joining-Analysen mit dem Computerprogramm PAUP\* 4.0 Beta 10 (Swofford 2003) durchgeführt. Es wurden jeweils unkorrigierte  $p$ -Distanzen verwendet. Außerdem wurden eine Bootstrap- und eine Jackknife-Analyse mit jeweils 10.000 Replikaten und den gleichen Einstellungen wie in der Einzelberechnung vorgenommen.

### **2.3.4 Parsimonieanalyse, Abschätzung von Homoplasie**

Das der Parsimonieanalyse (maximum parsimony, MP, Edwards & Cavalli-Sforza 1963a) zugrunde liegende Optimalitätskriterium ist das Sparsamkeitsprinzip, auch Ockhams

## Material und Methoden

Rasiermesser genannt. Demnach ist die einfachste Erklärung für ein Phänomen in der Regel auch als die wahrscheinlichste anzusehen. Übertragen auf phylogenetische Bäume bedeutet dies, dass derjenige Baum als der wahrscheinlichste gelten kann, der mit den wenigsten evolutiven Schritten den gegebenen Datensatz erklären kann, also am sparsamsten ist. Bei der in der Phylogenetik meistens verwendeten Fitch-Parsimonie entspricht ein evolutiver Schritt der Umwandlung von einem Nukleotid in ein anderes ohne Zwischenstufen. Alle denkbaren Übergänge zwischen den vier Basen werden gleich bewertet (Fitch 1971).

Theoretisch müssen alle denkbaren Bäume erstellt und hinsichtlich ihrer Länge bewertet werden. Da mit steigender Zahl von Taxa  $n$  die Zahl der denkbaren Bäume mit  $(2n-3)!!$  rasant ansteigt, ist eine erschöpfende Baumsuche auch mit leistungsstarken Computern nur für sehr kleine Datensätze möglich. In der Praxis werden daher heuristische Baumsuchen durchgeführt, die ebenfalls eine Vielzahl an verschiedenen Bäumen liefern. Während der Suche werden aber wenig versprechende Pfade der Baumsuche frühzeitig abgebrochen, was viel Zeit erspart. Für gewöhnlich liefert eine Parsimonieanalyse nicht nur einen kürzesten Baum, sondern mitunter sehr viele verschiedene. Diese können durch Konsensbildung zusammengefasst werden. Der Strict-Konsensusbaum enthält nur diejenigen Verzweigungen, die in allen gefundenen kürzesten Bäumen enthalten sind. Im 50%-Majority Rule-Konsensusbaum sind alle Verzweigungen enthalten, die in mindestens der Hälfte der Einzelbäume vorkommen (Knoop & Müller 2009).

Ein grundlegendes Problem bei allen phylogenetischen Analysen stellt Homoplasie dar. Darunter versteht man das Auftreten von identischen Merkmalszuständen, etwa Basenpositionen in einer DNA-Sequenz, das nicht auf eine gemeinsame Herkunft zurückzuführen ist, sondern zweimal oder mehrfach unabhängig entstanden ist. Homoplasie suggeriert demnach genetische Verwandtschaft, wo keine ist. Für Parsimonieanalysen lassen sich diverse Indizes zur Abschätzung des Anteils an Homoplasie im Datensatz berechnen. Eine einfache Maßzahl hierfür ist der Konsistenzindex (ensemble consistency index, CI). Er berechnet sich als Summe der theoretisch minimal möglichen Schrittzahlen aller Merkmale auf einem Baum, geteilt durch die Summe der tatsächlich beobachteten Schrittzahlen aller Merkmale. Ein von Homoplasie freier Datensatz hätte einen CI von eins. Direkt aus dem CI folgt der Homoplasieindex (homoplasy index, HI), er berechnet sich als eins minus dem CI. Problematisch bei diesen Indizes ist die mangelnde Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Datensätzen (vgl. Knoop & Müller 2009). Verbessert ist diese beim Retentionsindex (retention index, RI). Auch hier steht ein Wert von eins für einen von Homoplasie freien Datensatz. Der rescaled consistency index (RC) berechnet sich schließlich als Produkt von CI und RI.

## Material und Methoden

Für die Parsimonieanalysen wurde die Software PAUP\* 4.0 Beta 10 (Swofford 2003) verwendet. Es wurden jeweils heuristische Baumsuchen durchgeführt. Durch schrittweises Hinzufügen von Sequenzen in zufälliger Reihenfolge (stepwise addition) wurden in 1.000 Replikaten Startbäume generiert. Ausgehend von jedem dieser Bäume wurde durch den Austausch von Ästen (branch swapping) eine Vielzahl an Bäumen generiert. Mittels des TBR-Algorithmus (tree bisection and reconnection) mit steepest-descent-Modifikation wurden diese Bäume dann rearrangiert. Nach allen Analysen wurden jeweils der Strict- und der 50% Majority Rule-Konsensusbaum generiert. Weiterhin wurden die vier verfügbaren Indizes (CI, HI, RI und RC) zur Abschätzung von Homoplasie berechnet. Ferner wurden jeweils eine Bootstrap- und eine Jackknife-Analyse mit 1.000 Replikaten durchgeführt. Um die Rechenzeit zu verringern, wurde die maximale Zahl pro Replikat gespeicherter Bäume auf 100 begrenzt und es wurden pro Replikat nur 10 Startbäume generiert. Ansonsten wurden die gleichen Einstellungen wie in der einfachen Analyse verwendet. In den Jackknife-Analysen wurden in jedem Replikat 50% der Merkmale gelöscht.

### **2.3.5 Maximum Likelihood-Analyse und Substitutionsmodelle**

Das der Maximum Likelihood (ML, Edwards & Cavalli-Sforza 1963b) zugrunde liegende Optimalitätskriterium ist das der höchsten Wahrscheinlichkeit eines Datensatzes angesichts eines phylogenetischen Baumes (Likelihood). Gesucht wird demnach der phylogenetische Baum, für den die zugrunde liegende Hypothese zur Evolution mit der größten Wahrscheinlichkeit zu dem beobachteten Datensatz geführt hätte. Dafür wird analog zur Parsimonieanalyse eine heuristische Baumsuche durchgeführt. Für jeden resultierenden Baum oder Teilbaum wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der der gegebene Datensatz aus der Topologie und den Astlängen des jeweiligen Baumes hervorgegangen ist (z. B. Knoop & Müller 2009).

Diesen Berechnungen wird ein Substitutionsmodell zugrunde gelegt. Solche Modelle enthalten Annahmen, auf welche Art und Weise DNA-Sequenzen evolvieren. Ein häufig verwendetes Modell ist das sehr komplexe und damit auch sehr allgemeine GTR-Modell (general time reversible Tavaré 1986). Es erlaubt für alle Basenübergänge eine individuelle Substitutionsrate und berücksichtigt die unterschiedlichen Frequenzen, mit denen bestimmte Basen im Alignment auftauchen. Häufig findet eine Kombination mit der Berücksichtigung invarianter Alignmentpositionen statt (GTR+I). Ferner können für unterschiedliche Alignmentpositionen unterschiedliche Substitutionsraten angenommen werden (z. B. GTR+G oder GTR+CAT, siehe unten). Ein weiteres in dieser Arbeit verwendetes Modell ist das weniger komplexe HKY-Modell (Hasegawa et al. 1985). Hier werden ebenfalls

unterschiedliche Basenfrequenzen berücksichtigt, bei den Basenübergängen werden aber nur Transitionen und Transversionen unterschieden.

Für eine Analyse sollte aus der Vielzahl existierender Modelle stets jenes ausgewählt werden, welches mit der geringsten Zahl an Parametern auskommt und dabei trotzdem eine optimale Anpassungsgüte an den Datensatz liefert. Zu diesem Zweck werden vor den eigentlichen Analysen unterschiedliche Modelle auf einen Datensatz angewendet und die Ergebnisse verglichen. Die Anzahl verwendeter Parameter wird jeweils als Strafterm mit der Anpassungsgüte zu einem so genannten Informationskriterium kombiniert. Aus der Menge getesteter Modelle wird dann das mit dem höchsten Wert des Informationskriteriums ausgewählt. Praktisch werden also solche Modelle bevorzugt, die einen optimalen Kompromiss aus hoher Anpassungsgüte und niedriger Zahl an Parametern bieten. Das älteste und heute trotzdem noch regelmäßig verwendete Kriterium ist Akaikes Informationskriterium (AIC, Akaike 1973).

Eine Phylogenierekonstruktion mittels des ML-Kriterium wurde mit der Software RAxML 7.2.6 durchgeführt (Stamatakis 2006b). Als Substitutionsmodell diente hier GTR+CAT (Stamatakis 2006a). Bei vielen Modellen wird eine Gamma-Verteilung der Substitutionsraten über die einzelnen Alignmentpositionen angenommen (z. B. GTR+G). Bei GTR+CAT (CAT für categorized) werden stattdessen einige wenige Kategorien von Positionen definiert, deren Substitutionsraten sich jeweils in gewissen Schranken bewegen. Diese Kategorien werden während der Laufzeit des Programms ständig angepasst. Die Verwendung von GTR+CAT stellt eine enorme Ersparnis an Rechenaufwand und vielfache Beschleunigung der Analysen dar. Ebenfalls mit RAxML 7.2.6 wurde jeweils eine schnelle Bootstrap-Analyse (rapid RAxML bootstrapping Stamatakis et al. 2008) mit 1.000 Wiederholungen durchgeführt.

### **2.3.6 Bayes'sche Analyse**

Bei einer ML-Analyse wird nach demjenigen einzigen Baum gesucht, der unter a priori zu definierenden Bedingungen wie dem Substitutionsmodell einen gegebenen Datensatz am wahrscheinlichsten reflektiert. Phylogenetische Analysen mittels Bayes'scher Statistik (Bayesian inference, BI) verfolgen einen anderen Ansatz. Statt nach einem simplen Baum wird hier nach einem optimalen Satz an Parametern gesucht, welcher neben Topologie und Astlängen weitere Größen wie Substitutionsparameter enthält. Aus einer großen Zahl an Parameterkombinationen, die einer so genannten Posterioriwahrscheinlichkeitsverteilung um die optimale Kombination folgen, wird eine hinreichend große Stichprobe gezogen. Aus dieser lassen sich dann nicht nur ein phylogenetischer Konsensusbaum, sondern auch die Mittelwerte der anderen Parameter ableiten, etwa der Substitutionsraten. Weiterhin kann

## Material und Methoden

auch das Glaubwürdigkeitsintervall (credibility interval) jeder dieser Größen errechnet werden. Eine vollständige Simulation der besagten Wahrscheinlichkeitsverteilung würde die Evaluierung aller möglichen Bäume nötig machen. Da dies für reale Datensätze rechnerisch nicht lösbar ist, werden die Stichproben durch so genannte Markov-Ketten (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) generiert.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Programm MrBayes 3.2.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) verwendet eine Variante der MCMC, die als Metropolis-Hastings-Green-Algorithmus bezeichnet wird. Ausgehend von einem Startzustand, beispielsweise einem zufällig generierten Baum mit zufälligen Astlängen und zufälligen Substitutionsparametern, wird in jeder Iteration der jeweils aktuelle Satz an Parametern leicht modifiziert. Dann werden die Posterioriwahrscheinlichkeiten des ursprünglichen und des neuen Zustandes miteinander verglichen. Besitzt der neue Zustand dieselbe oder eine höhere Posterioriwahrscheinlichkeit als der alte, wird er angenommen. Ist jedoch die Posterioriwahrscheinlichkeit des alten Satzes an Parametern höher, wird der neue Zustand nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit akzeptiert, welche umso kleiner ist, je mehr sich die Posterioriwahrscheinlichkeiten beider Zustände unterscheiden. In die Evaluierung jedes Zustandes fließt auch die jeweilige Likelihood des aktuellen Baumes ein (vgl. 2.3.5), deren Berechnung einen Großteil der insgesamt benötigten Rechenzeit ausmacht (Knoop & Müller 2009). Da es sich um einen Selbstoptimierungsprozess handelt, sollten sich die Zustände der Markov-Kette von einem beliebigen Startzustand ausgehend dem optimalen Zustand annähern und dann um diesen pendeln. Die Kette befindet sich dann in der stationären Phase. Werden dann nach Beendigung der Analyse die Mittelwerte und Konfidenzintervalle der Bäume und Parameter berechnet, so sollte der Teil der Stichprobe verworfen werden, welcher vor Erreichen der stationären Phase gezogen wurde. Diese Phase wird als Burn-in bezeichnet.

Als problematisch wirkt sich wie bei anderen Analysemethoden das mögliche Vorhandensein lokaler Optima aus, welche nicht dem globalen Optimum entsprechen. Wenn der Umfang an Modifikationen, die in jeder Iteration durchgeführt werden, zu gering ist, um das lokale Optimum zu verlassen, ist die Markov-Kette gefangen. Dem begegnet MrBayes durch die Verwendung parallel laufender Ketten (Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo, MC<sup>3</sup>). Jeweils eine dieser Ketten (heated chain) erhält künstlich erhöhte Posterioriwahrscheinlichkeiten für ihre Bäume, was die Variabilität ihrer Zustände stark erhöht. Alle Ketten laufen unabhängig voneinander, gelegentlich tauscht aber die erhitzte Kette ihre Identität mit einer der übrigen, was Sprünge in der

## Material und Methoden

Posterioriwahrscheinlichkeitsverteilung und damit das Verlassen lokaler Optima gewährleistet (Knoop & Müller 2009).

Mit dem Programm MrModeltest 2.3 (Nylander 2004) wurde für jeden untersuchten Locus unabhängig das optimale Substitutionsmodell unter Akaikes Informationskriterium gesucht. Das kombinierte Alignment der plastidären Loci wurde partitioniert (*rpl32-trnL*, *matK* Teil a, *rps16-trnK*, *rps16*-Intron, *petD*-Intron und *trnD-trnT*) und für jeden Locus das entsprechende Substitutionsmodell definiert. Die Bayes'schen Analysen wurden mit der Software MrBayes 3.2.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) durchgeführt. Dafür wurden alle Analyseparameter außer Topologie und Astlänge entkoppelt, durften also zwischen den verschiedenen Partitionen variieren. Pro Lauf wurden drei erhitzte Markov-Ketten (heated chains) mit einem Heizparameter von 0,2 und eine kalte Kette (cold chain) initialisiert. Für jede Analyse wurden jeweils zwei unabhängige Läufe mit je 2.500.000 Generationen durchgeführt, deren Resultate anschließend kombiniert wurden. Die Analysen der einzelnen plastidären Loci, der cpSSR-Daten und des kombinierten Datensatzes aus plastidären Sequenzdaten und cpSSR-Daten erfolgten jeweils in zwei Läufen mit je 1.000.000 Generationen. Nach jeweils 100 Generationen wurden der aktuelle Baum mit Astlängen sowie alle Analyseparameter gespeichert. Im Anschluss an den Lauf wurde ein Plot erstellt, bei dem die Likelihoods der resultierenden Einzelbäume gegen die Generationsnummer grafisch aufgetragen wurden (likelihood-by-generation plot), um den als Burn-in zu verwerfenden Teil des Datensatzes zu evaluieren. Für alle Analysen stellte sich ein Burn-in von 10% als ausreichend heraus. Aus den verbleibenden Bäumen wurde jeweils ein 50%-Majority Rule-Konsensusbaum erstellt.

### 2.3.7 Datierte Phylogenien mit BEAST

Aus der Idee, dass sich DNA-Sequenzen im Laufe der Evolution mit konstanten Substitutionsraten ändern, wurde das Prinzip der strikten molekularen Uhr abgeleitet (Zuckerlandl & Pauling 1962; Margoliash 1963). Unter Annahme einer solchen lassen sich ultrametrische Bäume mit Zeitskala, also Chronogramme erstellen. Durch Kalibrierung anhand datierbarer Knoten, etwa durch Fossilien, lassen sich so Hypothesen zum zeitlichen Ablauf der Evolution einer Organismengruppe aufstellen. Zwar gilt das Modell der strikten Uhr heute als überholt, da eine Reihe von Faktoren erheblichen Einfluss auf die Substitutionsraten haben und diese somit keineswegs konstant sind (vgl. Ayala 1999). Durch unterschiedliche Methoden, welche Änderungen der Substitutionsraten berücksichtigen, ist dennoch eine Rekonstruktion des zeitlichen Ablaufs der Evolution möglich. Mittels NPRS (nonparametric rate smoothing, Sanderson 1997) und PL (penalized likelihood, Sanderson 2002) können bereits bestehende Phylogenien in ultrametrische Form überführt werden.

## Material und Methoden

Relativ jung ist der in der vorliegenden Arbeit verwendete Ansatz der Relaxed Phylogenetics (Drummond et al. 2006; Drummond & Rambaut 2007). Bei dieser Methode werden die Topologie des Chronogramms und die den Knoten zugeordneten Zeiten im gleichen Vorgang mit Hilfe von Bayes'scher Statistik generiert.

Für den kombinierten Datensatz der Chloroplasten-Sequenzen wurde eine Analyse mit dem Programmpaket BEAST 1.6.1 (Drummond & Rambaut 2007) durchgeführt. Zunächst wurde mit dem Programm BEAUTi die XML-Datei für die Analyse in BEAST generiert. Als einziger Kalibrationspunkt wurde das von Givnish et al. (2011) für die Kronengruppe der Pitcairnioideae ermittelte Alter von 11,8 Millionen Jahren mit einer Standardabweichung in der Normalverteilung von  $\pm 0,5$  Millionen Jahren verwendet. Als Substitutionsmodell wurde GTR+I+G mit empirisch determinierten Basenfrequenzen verwendet (vgl. 2.3.5). Für die a-priori-Wahrscheinlichkeiten des Baumes wurde als Speziationsmodell ein Yule-Prozess angenommen, bei dem eine konstante Rate an Verzweigungen existiert, die pro Zeiteinheit von einem Ast ausgehen. Die Analyse wurde unter Annahme logarithmisch normalverteilter, unkorrelierter Substitutionsraten durchgeführt (Drummond et al. 2006).

Jede Analyse wurde viermal unabhängig mit jeweils 10.000.000 Generationen durchgeführt, wobei jeder eintausendste Baum gespeichert wurde. Die Konvergenz der Einzelanalysen und ihrer Parameter sowie die effektiven Stichprobengrößen aller Parameter wurden mit dem Programm Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2009) überprüft. Für jeden der jeweils vier Läufe wurden die ersten 1.001 ermittelten Bäume als Burn-in verworfen und die übrigen mit dem Programm LogCombiner 1.6.1 in einer Datei zusammengefasst. Aus diesen Einzelbäumen wurde ein Konsensusbaum (maximum clade credibility tree) mit TreeAnnotator 1.6.1 erstellt. Bei der Konsensbildung wurden die mittleren Knotenalter (median node heights) verwendet und eine minimale Posterioriwahrscheinlichkeit (posterior probability limit) von 0,5 für annotierte Kladen vorausgesetzt. In einer zweiten Analyse wurden die Topologien der von BEAST generierten Bäume zunächst mit PAUP\* 4.0 Beta 10 (Swofford 2003) einem 50%-Majority Rule-Konsensusbaum verrechnet. Die von BEAST ermittelten Substitutionsraten und mittleren Knotenalter wurden dann mittels TreeAnnotator 1.6.1 auf diesen Zielbaum projiziert. Die graphische Aufarbeitung erfolgte mit dem Programm FigTree 1.3.1 (Rambaut 2006) und in manueller Nacharbeit.

### 2.3.8 Netzwerke

Bei phylogenetischen Bäumen spiegelt die Darstellung mit unbesetzten internen Knoten die Annahme wider, dass ursprüngliche Sequenzvarianten (Haplotypen) extinkt sind. Rezente Taxa stehen nur an den Endästen. Besitzt ein Endast die Länge null, steht das

## Material und Methoden

entsprechende Taxon zwar mit dem Knoten auf einer Höhe. Die Tatsache aber, dass dieses Taxon einen plesiomorphen Haplotyp repräsentiert, ist durch die Darstellungsweise nicht klar erkennbar. Bei der Darstellung als phylogenetisches Netzwerk wird direkt deutlich, wenn ursprüngliche Haplotypen in rezenten Taxa vorkommen. Insbesondere auf niedrigem taxonomischem Niveau haben sich phylogenetische Netzwerke als gute Alternative zu Bäumen erwiesen. Für intraspezifische und phylogeographische Untersuchungen ist die Erstellung von Netzwerken auf Basis von Haplotypen häufig die erste Wahl (z. B. Avise 2000; Posada & Crandall 2001).

Ein solches Netzwerk besteht aus Kanten und Knoten. Jeder Knoten entspricht einem Haplotyp und wird zumeist als Kreis dargestellt. Je zwei benachbarte Knoten sind durch eine Kante verbunden, dargestellt als Linie. Jede Kante, die zwei Haplotypen verbindet, steht für exakt einen evolutiven Schritt. Unterscheiden sich zwei Haplotypen durch mehr als einen Schritt und der fehlende Knoten kann nicht durch eine real gefundene Sequenzvariante besetzt werden, so wird ein fehlender Haplotyp postuliert und meist durch einen kleineren Kreis dargestellt. Enthält der Datensatz Homoplasie, so gibt es zwischen manchen Haplotypen alternative Verbindungen und es entstehen Maschen. Die Anzahl und die Position solcher Maschen zeigen die Anwesenheit von Homoplasie direkt graphisch an. Durch Annahme mehrfacher unabhängiger Substitutionen lässt sich prinzipiell jeder Haplotyp mit jedem anderen verbinden. Nimmt man aber die einfachste Erklärung für den Datensatz als die wahrscheinlichste an, so können die meisten Verknüpfungen ausgeschlossen werden (Parsimonieprinzip, vgl. auch 2.3.4). Gesucht wird das Netzwerk, welches alle beobachteten Haplotypen enthält und miteinander verbindet, dabei aber insgesamt möglichst wenige Schritte und postulierte Haplotypen benötigt. Ein solches Netzwerk lässt sich mittels statistischer Parsimonie finden, auf welcher das Programm TCS 1.2.1 (Clement et al. 2000) beruht. Hier werden in Grenzen neben dem sparsamsten Netzwerk auch weniger parsimonische Alternativen berücksichtigt, um eine statistisch belastbare Hypothese abzuschätzen (Templeton et al. 1992).

Eine Analyse mit TCS wurde für den kombinierten plastidären Datensatz durchgeführt. In die Analyse wurden lediglich die Gattungen *Dyckia* und *Encholirium*, sowie *Deuterocohnia brevispicata* (FK0071) und *Deuterocohnia meziana* (FK0073) eingeschlossen. Lücken im Alignment wurden als fehlende Information gewertet. Verbindungen zwischen Haplotypen wurden nur bis zu einer bestimmten Zahl an einzufügenden fehlenden Haplotypen und Substitutionen erstellt. Die Grenze hierfür wurde so hoch gelegt, wie durch das Parsimoniekriterium gerade noch gerechtfertigt ist (calculate 95% connection limit, siehe auch Templeton et al. 1992).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 DNA-Isolation

Die verwendete Variante der DNA-Isolationsmethode von Tel-Zur et al. (1999) lieferte gute Ergebnisse für alle Proben. In allen Fällen zeigte sich eine deutliche Bande im hochmolekularen Bereich und nur wenig niedermolekularer Schmier. Durch den Vergleich mit DNA aus dem Phagen  $\lambda$  wurden Konzentrationen von unter 5 ng/ $\mu$ l bis über 100 ng/ $\mu$ l ermittelt. Die entspricht einer Ausbeute von unter 0,5  $\mu$ g bis über 10  $\mu$ g DNA pro Isolation. Eine Zusammenstellung der Gelbilder aller isolierten Proben findet sich in Anhang 5.

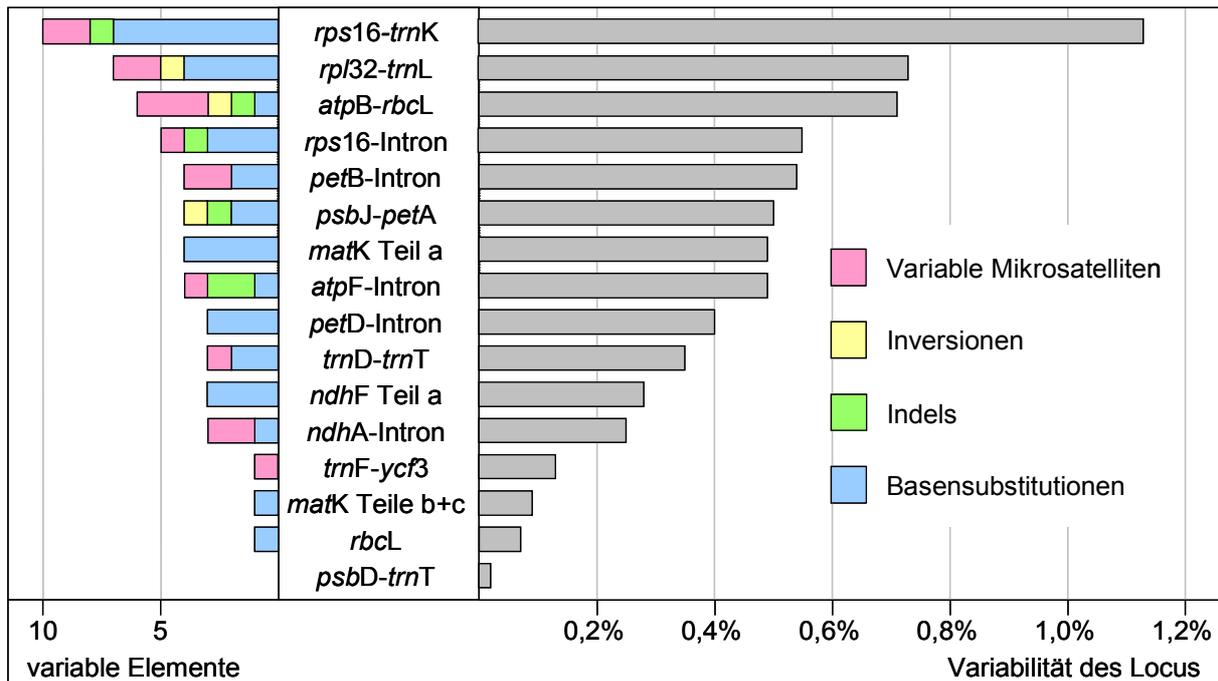
Für die von Kooperationspartnern nach der klassischen CTAB-Methode isolierte DNA wurde zumeist ein höherer Anteil an niedermolekularen Anteilen in den Proben beobachtet. Die gewonnene Menge an DNA war dabei in einigen Fällen so gering, dass sie nicht mehr durch Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen und quantifiziert werden konnte. Insbesondere die Amplifikation von *phyC* erwies sich für einige dieser Proben als problematisch (vgl. 3.3.1). Beispiele für von Kooperationspartnern isolierte DNA auf Agarose finden sich ebenfalls in Anhang 5.

### 3.2 Sequenzierung plastidärer Loci

#### 3.2.1 Charakterisierung verschiedener plastidäre Loci

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Amplifizierbarkeit und Sequenzierbarkeit sowie die Sequenzvariation an zahlreichen plastidären Loci innerhalb eines kleinen Testsets von acht *Dyckia*-Akzessionen bestimmt (zum Testset vgl. 2.1 und Tabelle 1, zu den verwendeten Loci vgl. Tabelle 2). Für 16 Loci konnten lesbare Sequenzen generiert werden, deren Variabilität im Testset in Abbildung 15 zusammengestellt ist. Auf Basis dieser Pilotexperimente wurden sechs Loci für die phylogenetischen Untersuchungen ausgewählt, nämlich *rpl32-trnL*, *rps16-trnK*, *matK* Teil a, *rps16*-Intron, *petD*-Intron und *trnD-trnT* (jeweils dunkelgrün markiert in Abbildung 14). Für diese sechs Loci wurden für 124 Akzessionen Sequenzdaten erzeugt und einem multiplen Alignment unterworfen. Wesentliche Eigenschaften der Alignments sind in Tabelle 9 zusammengestellt, ein beispielhafter Ausschnitt ist in Abbildung 16 gezeigt. Für jeden einzelnen Locus wurde eine separate Bayes'sche Analyse durchgeführt, um das jeweilige Auflösungsvermögen zu evaluieren (Abbildung 17, Anhang 13-18). Im Folgenden wird auf die einzelnen Loci detailliert eingegangen.

## Ergebnisse



**Abbildung 15: Sequenzvariabilität verschiedener plastidärer Loci innerhalb von acht Arten von *Dyckia***

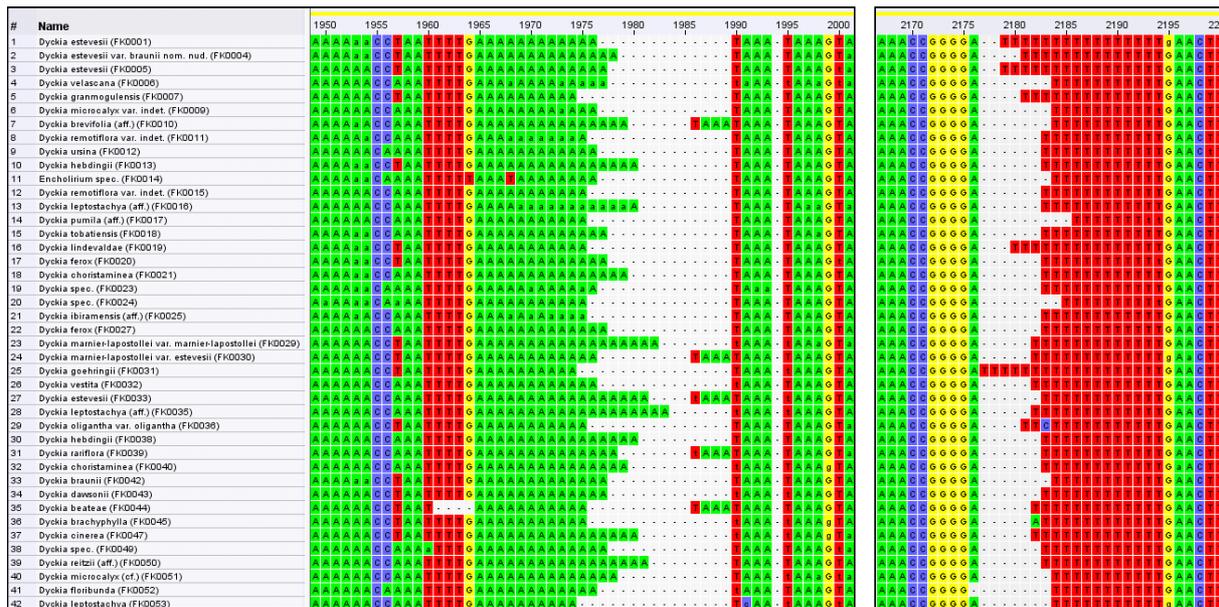
In den Vergleich einbezogen wurden jeweils Sequenzen aller acht Proben des Testsets TS2, mit Ausnahme von *psbJ-petA*, wo die Sequenzierung für zwei Proben nicht funktionierte. Die farbigen Balken auf der linken Seite geben die absolute Zahl an beobachteten Merkmalsänderungen an. Die Farben entsprechen den Farben der Legende auf der rechten Seite und zeigen an, welche Art von Mutationen der Merkmalsänderung zugrunde lagen. Die grauen Balken auf der rechten Seite geben die Variabilität als prozentualen Anteil von Merkmalsänderungen an, bezogen auf die Gesamtlänge des sequenzierten Abschnitts im Alignment.

### *rpl32-trnL*

Die für den in zwei Teilen amplifizierten Locus *rpl32-trnL* gewonnenen Sequenzen ließen sich in allen Fällen gut auswerten. Die assemblierten Sequenzen wiesen Längen von 860-952 bp auf (929-952 bp innerhalb von *Dyckia*, Tabelle 9). Innerhalb von *Dyckia* wurden drei variable SSRs ( $T_{6-7}$ ,  $T_{6-8}$  und  $A_{8-10}$ ) gefunden. Ferner wurde eine Region von sechs Nukleotiden Länge identifiziert, welche offenbar mehrfach unabhängig invertiert wurde. So finden sich in allen sechs untersuchten Gattungen jeweils zwei Versionen dieses Bereiches. Die invertierte Region wurde aus den nachfolgenden Berechnungen und aus dem Alignment ausgeschlossen.

Über den vollen Datensatz und das gesamte Alignment von 1.002 Positionen Länge hinweg betrug die Variabilität von *rpl32-trnL* 12,4% (2,6% innerhalb von *Dyckia*). Die aus einer Bayes'schen Analyse dieses Locus resultierende Phylogenie zeigte wenig Auflösung innerhalb von *Dyckia*, keine größere Klade wurde gefunden. Allerdings konnten 12 sehr gut gestützte Verzweigungen und zwei früh abzweigende Linien identifiziert werden (Abbildung 17 und Anhang 13).

## Ergebnisse



**Abbildung 16: Ausschnitt aus dem Alignment für den Locus *rps16-trnK***

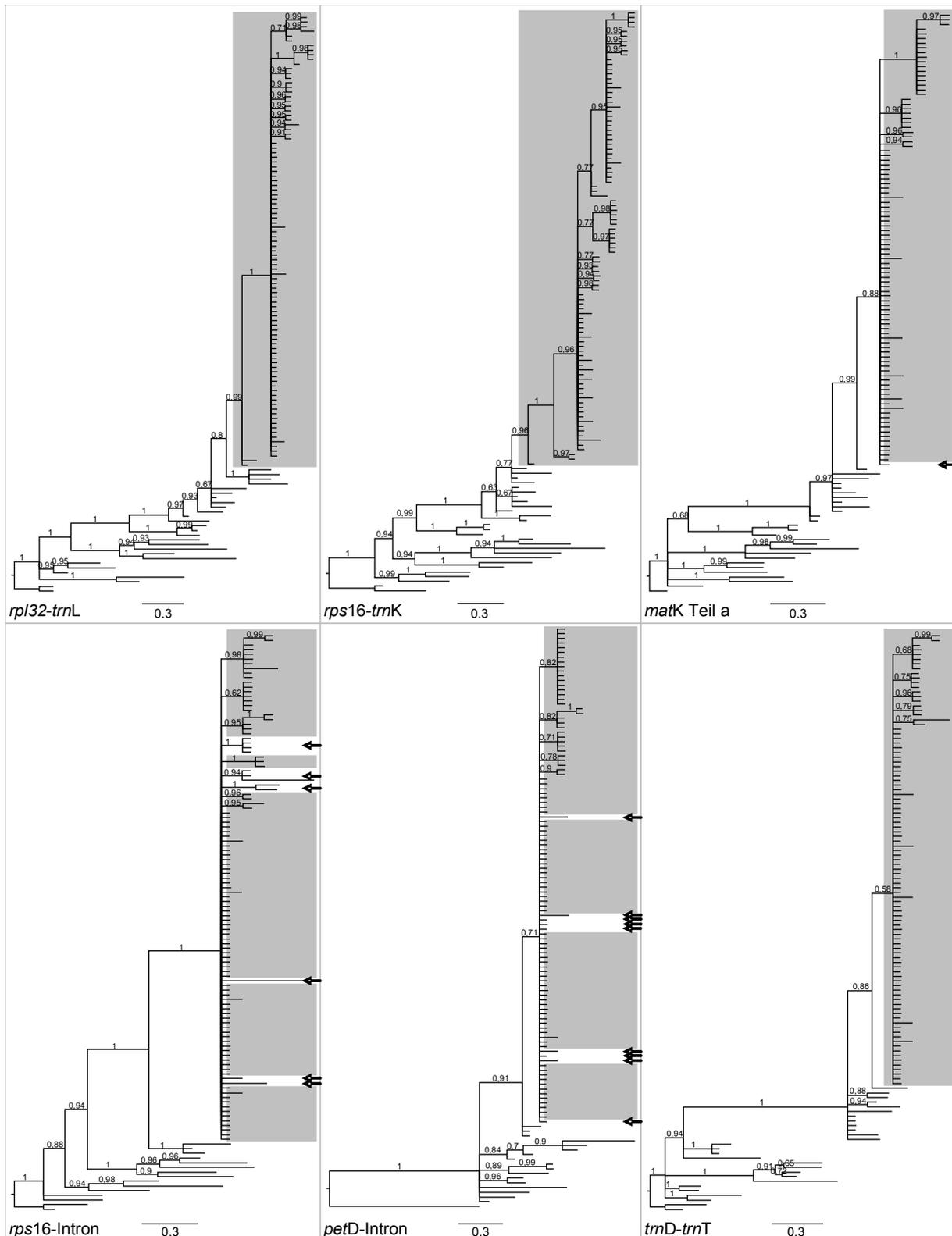
Gezeigt sind zwei Bereiche des Locus *rps16-trnK*, die jeweils einen besonders variablen Mikrosatelliten (cpSSR) enthalten. Der auf der linken Seite gezeigte SSR liegt in Teil a des Locus, der auf der rechten Seite gezeigte in Teil b. Die angegebenen Alignmentpositionen beziehen sich auf den kombinierten Datensatz aus allen sechs plastidären Loci.

### *rps16-trnK*

Die für den in drei Teilen amplifizierten Locus *rps16-trnK* gewonnenen Sequenzen ließen sich in allen Fällen auswerten. Die assemblierten Sequenzen wiesen Längen von 848-861 bp auf (830-861 bp innerhalb von *Dyckia*, Tabelle 9). Innerhalb von *Dyckia* wurden zwei hoch variable SSRs von teilweise beträchtlicher Länge ( $A_{9-21}$  und  $T_{9-18}$ ) gefunden. Ein Ausschnitt des Alignments mit den betreffenden Regionen ist in Abbildung 16 gezeigt. Jeweils eine der beiden SSR-Regionen befand sich in den Teilen a und b des Locus. Insbesondere bei Proben mit langen SSRs nahm die Sequenzqualität an diesen Bereichen jeweils abrupt ab. Durch die kurzen Fragmentlängen (Teil a: 236 bp, Teil b: 226 bp, Teil c: 486 bp, jeweils ohne Primer-Anteil im gesamten Alignment) und die bidirektionale Sequenzierung konnte jedoch in allen Fällen eine zuverlässige und eindeutige Sequenz gelesen werden.

Über den vollen Datensatz und das gesamte Alignment von 896 Positionen Länge hinweg betrug die Variabilität von *rps16-trnK* 13,3% (3,7% innerhalb von *Dyckia*). Die aus einer Bayes'schen Analyse dieses Locus resultierende Phylogenie zeigte eine moderate Auflösung innerhalb von *Dyckia*. Zwei größere Kladen und 11 weitere Verzweigungen wurden identifiziert, dazu zwei früh abzweigende Linien (Abbildung 17 und Anhang 14).

## Ergebnisse



**Abbildung 17: Bayes'sche Analyse der Einzel-Alignments der sechs sequenzierten plastidären Loci**

Gezeigt ist jeweils der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1. Die Analysen wurden in zwei unabhängigen Läufen mit je 1.000.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden je 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posteriori-wahrscheinlichkeiten. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Zahl an Substitutionen, entsprechend der Maßstabsleiste unter dem jeweiligen Baum. Graue Flächen markieren Akzessionen von *Dyckia*. Pfeile markieren Linien von *Encholirium*, die im Baum eine Position innerhalb von *Dyckia* einnehmen.

## Ergebnisse

### matK Teil a

Die für *matK* Teil a gewonnenen Sequenzen ließen sich in allen Fällen gut auswerten. Es wurden Fragmentlängen von 775-796 bp beobachtet (konstant 786 bp innerhalb von *Dyckia*). Innerhalb von *Dyckia* wurden keinerlei Indels oder SSRs an diesem Locus gefunden.

Über den vollen Datensatz und das gesamte Alignment von 803 Positionen Länge hinweg betrug die Variabilität von *matK* Teil a 9,2% (2,0% innerhalb von *Dyckia*). Die aus einer Bayes'schen Analyse dieses Locus resultierende Phylogenie zeigte eine sehr geringe Auflösung innerhalb von *Dyckia*. Lediglich eine größere Klade und vier weitere Verzweigungen wurden identifiziert (Abbildung 17 und Anhang 15).

Die Teile b und c von *matK* ließen sich ebenfalls sehr gut sequenzieren und auswerten. Wegen des Mangels an Variabilität innerhalb des Testsets von acht *Dyckia*-Akzessionen wurden diese Bereiche aber nicht weiter verwendet (vgl. Abbildung 15).

### rps16-Intron

Die für den Locus *rps16*-Intron gewonnenen Sequenzen ließen sich in allen Fällen gut auswerten. Es wurden Fragmentlängen von 810-884 bp (842-884 bp innerhalb von *Dyckia*, Tabelle 9) beobachtet. Innerhalb von *Dyckia* wurde ein variabler SSR (G<sub>7-8</sub>) identifiziert.

Über den vollen Datensatz und das gesamte Alignment von 976 Positionen Länge hinweg betrug die Variabilität des Locus *rps16*-Intron 9,4% (2,0% innerhalb von *Dyckia*). Die aus einer Bayes'schen Analyse dieses Locus resultierende Phylogenie zeigte acht kleine Kladen mit Akzessionen von *Dyckia*. *Encholirium* und *Deuterocohnia* sind hier nicht von *Dyckia* getrennt (Abbildung 17 und Anhang 16). Einige Akzessionen von *Encholirium* stehen in abgeleiteter Position zwischen Vertretern von *Dyckia* (in Abbildung 17 durch Pfeile gekennzeichnet), beide Gattungen sind damit paraphyletisch.

### petD-Intron

Die für den Locus *petD*-Intron gewonnenen Sequenzen ließen sich in allen Fällen gut auswerten, einen einzelnen Ausfall gab es für die Probe von *Puya fuertesii*. Hier waren trotz Wiederholungen auch der PCR jeweils nur kurze Stücke in jede Richtung lesbar, danach wurde die Qualität schlagartig schlecht. Es wurden Fragmentlängen von 703-767 bp (719 bp innerhalb von *Dyckia*, Tabelle 9) beobachtet. Innerhalb von *Dyckia* wurden keinerlei Indels oder SSRs an diesem Locus gefunden.

Über den vollen Datensatz und das gesamte Alignment von 788 Positionen Länge hinweg betrug die Variabilität des Locus *petD*-Intron 9,6% (0,9% innerhalb von *Dyckia*). Die aus

## Ergebnisse

einer Bayes'schen Analyse dieses Locus resultierende Phylogenie zeigte eine sehr geringe Auflösung innerhalb von *Dyckia* (Abbildung 17 und Anhang 17). Lediglich eine größere Klade und fünf weitere Verzweigungen wurden identifiziert. Alle Akzessionen von *Dyckia* und die meisten Akzessionen von *Encholirium* stehen in einer gemeinsamen unaufgelösten Polytomie.

### *trnD-trnT*

Die für den Locus *trnD-trnT* gewonnenen Sequenzen ließen sich in den meisten Fällen gut auswerten. Für einige Proben der Gattungen *Fosterella*, *Pitcairnia* und *Puya* war der sequenzierte Bereich jedoch infolge von Insertionen deutlich länger als bei den übrigen Proben. Die Sequenzqualität im Bereich der Überlappung von Vorwärts- und Rückwärts-Sequenz war hier gerade noch ausreichend. Es wurden Fragmentlängen von 845-1.376 bp (845-907 bp innerhalb von *Dyckia*, Tabelle 9) beobachtet. Innerhalb von *Dyckia* wurde ein sehr variabler SSR (T<sub>9-17</sub>) identifiziert.

Über den vollen Datensatz und das gesamte Alignment von 1.538 Positionen Länge hinweg betrug die Variabilität von *trnD-trnT* 8,3% (1,1% innerhalb von *Dyckia*). Die aus einer Bayes'schen Analyse dieses Locus resultierende Phylogenie zeigte eine sehr geringe Auflösung innerhalb von *Dyckia*. Lediglich sechs Verzweigungen wurden hier identifiziert (Abbildung 17 und Anhang 18).

### Sonstige verwendete plastidäre Loci

Keine Amplifikate lieferte die PCR der Loci *nhdF-rpl32*, *psbA-trnH* und *rpoB-trnC*. Einige Ausfälle und generell schwache PCR-Banden wurden für *nhdF* Teil b beobachtet. Die Amplifikation der Loci *trnQ-5'rps16*, *trnS-trnG* und *3'trnV-ndhC* resultierte in multiplen Banden auf dem Agarosegel. Für die intergenischen Bereiche *atpB-rbcL*, *psbB-psbH*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *trnS-ycf3* und *trnL-trnF*, die exonischen Bereiche *nhdF* Teil a und *rbcL* sowie die intronischen Bereiche *atpF*-Intron, *ndhA*-Intron und *petB*-Intron zeigte sich nach der PCR jeweils eine diskrete Einzelbande auf dem Agarosegel. Die Sequenzierung der Fragmente für *psbB-psbH* und *trnL-trnF* lieferte jedoch keine auswertbaren Sequenzen.

Für *psbD-trnT* konnten jeweils Teile der Vorwärts- und Rückwärts-Sequenzen gelesen werden (maximal 518 bp und 587 bp Länge), die schlechte Qualität erlaubte es aber nicht, den überlappenden Bereich zu rekonstruieren. Das Alignment der Fragmente an das Plastom von *Typha latifolia* wies eine Lücke von mindestens 48 bp zwischen den beiden Fragmenten auf.

## Ergebnisse

Für *psbJ-petA* waren ebenfalls nur Teile der Vorwärts- und Rückwärts-Sequenzen lesbar (maximal 483 bp und 327 bp Länge), die ebenfalls nicht assembliert werden konnten. Das Alignment der Fragmente an das Plastom von *Typha latifolia* wies eine Lücke von mindestens 320 bp zwischen den beiden Fragmenten auf.

Für die intergenischen Bereiche *atpB-rbcL* und *trnS-ycf3*, die exonischen Bereiche *ndhF* Teil a und *rbcL* und die intronischen Bereiche *atpF*-Intron, *ndhA*-Intron und *petB*-Intron konnten jeweils Sequenzen für alle acht Proben des Testsets gewonnen werden. Eine Übersicht der beobachteten Variabilität dieser Loci findet sich in Abbildung 15.

### 3.2.2 Phylogenetische Untersuchungen

#### Eigenschaften des kombinierten Alignments sechs plastidärer Loci

Das kombinierte Alignment sechs plastidärer Loci zeigte eine Länge von 6.009 Positionen (Tabelle 9). Ein offenbar häufig invertierender Bereich von 6 bp Länge im Locus *rpl32-trnL* wurde aus den Analysen ausgeschlossen (siehe auch 3.2.1). Von den verbliebenen 6.003 Positionen waren 10,2% variabel (2,0% innerhalb von *Dyckia*). Insgesamt 293 Positionen erwiesen sich als parsimonie-informativ (61 innerhalb von *Dyckia*). Von insgesamt 76 identifizierten Indels (16 innerhalb von *Dyckia*) erwiesen sich nur fünf als parsimonie-informativ innerhalb von *Dyckia*. Von 22 gefundenen variablen SSRs (sieben innerhalb von *Dyckia*) waren sechs parsimonie-informativ innerhalb von *Dyckia*. Aufgrund des geringen Informationsgehaltes dieser wenigen Indels und des hohen Risikos von Homoplasie insbesondere bei SSRs, wurden bei den phylogenetischen Analysen weder Indels noch SSRs berücksichtigt (siehe auch 4.1.5).

#### **Tabelle 9: Alignment-Statistiken**

Gezeigt sind verschiedene Eigenschaften der Alignments von 124 Proben für unterschiedliche plastidäre Loci, den kombinierten plastidären Datensatz (cp total) und *phyC*. Werte ohne Klammern beziehen sich auf die enthaltenen Akzessionen von *Dyckia*, in Klammern sind jeweils die Werte für den gesamten Datensatz angegeben. Die angegebene Alignment-Länge bezieht sich jeweils auf das Alignment aller Proben. Für den Locus *rpl32-trnL* wurde eine 6 bp lange Inversion bei der Berechnung der Daten ausgeschlossen.

Locus	Sequenz-Längen	Alignment-Länge	Merkmale konstant	Merkmale variabel	Merkmale uninformativ	Merkmale informativ	Indels	variable SSRs
<i>rpl32-trnL</i>	923-946 (854-946)	1002	976 (878)	26 (124)	11 (62)	15 (62)	3 (10)	3 (4)
<i>rps16-trnK</i>	848-861 (830-861)	896	863 (777)	33 (119)	15 (53)	18 (66)	6 (14)	2 (5)
<i>matK</i>	786 (775-796)	803	787 (729)	16 (74)	10 (38)	6 (36)	0 (4)	0 (1)
<i>rps16</i> -Intron	842-884 (810-884)	976	956 (884)	20 (92)	10 (50)	10 (42)	4 (18)	1 (4)
<i>petD</i> -Intron	719 (703-767)	788	781 (712)	7 (76)	1 (51)	6 (25)	1 (9)	0 (1)
<i>trnD-trnT</i>	845-907 (845-1376)	1538	1521 (1410)	17 (128)	11 (66)	6 (62)	2 (21)	1 (7)
cp total	4973-5054 (4939-5449)	6003	5884 (5390)	119 (613)	58 (320)	61 (293)	16 (76)	7 (22)
<i>phyC</i>	1159 (1159)	1159	1093 (970)	66 (189)	32 (75)	34 (114)	0 (0)	0 (0)

## Ergebnisse

### Substitutionsmodelle für die Likelihood- und die Bayes'sche Analyse

Mit dem Programm MrModeltest 2.3 (Nylander 2004) wurde als optimales Substitutionsmodell für den gesamten kombinierten Datensatz das Modell GTR+I+G ermittelt, welches in der BEAST-Analyse Verwendung fand. Für die Bayes'schen Analysen wurde mit MrModeltest für jeden Locus individuell ein optimales Substitutionsmodell gesucht. Insgesamt wurden drei verschiedene Modelle empfohlen, nämlich das HKY+G-Modell für *matK* und *rps16*-Intron, GTR+G für *rpl32-trnL* und GTR+I+G für *rps16-trnK*, *trnD-trnT* und *petD*-Intron.

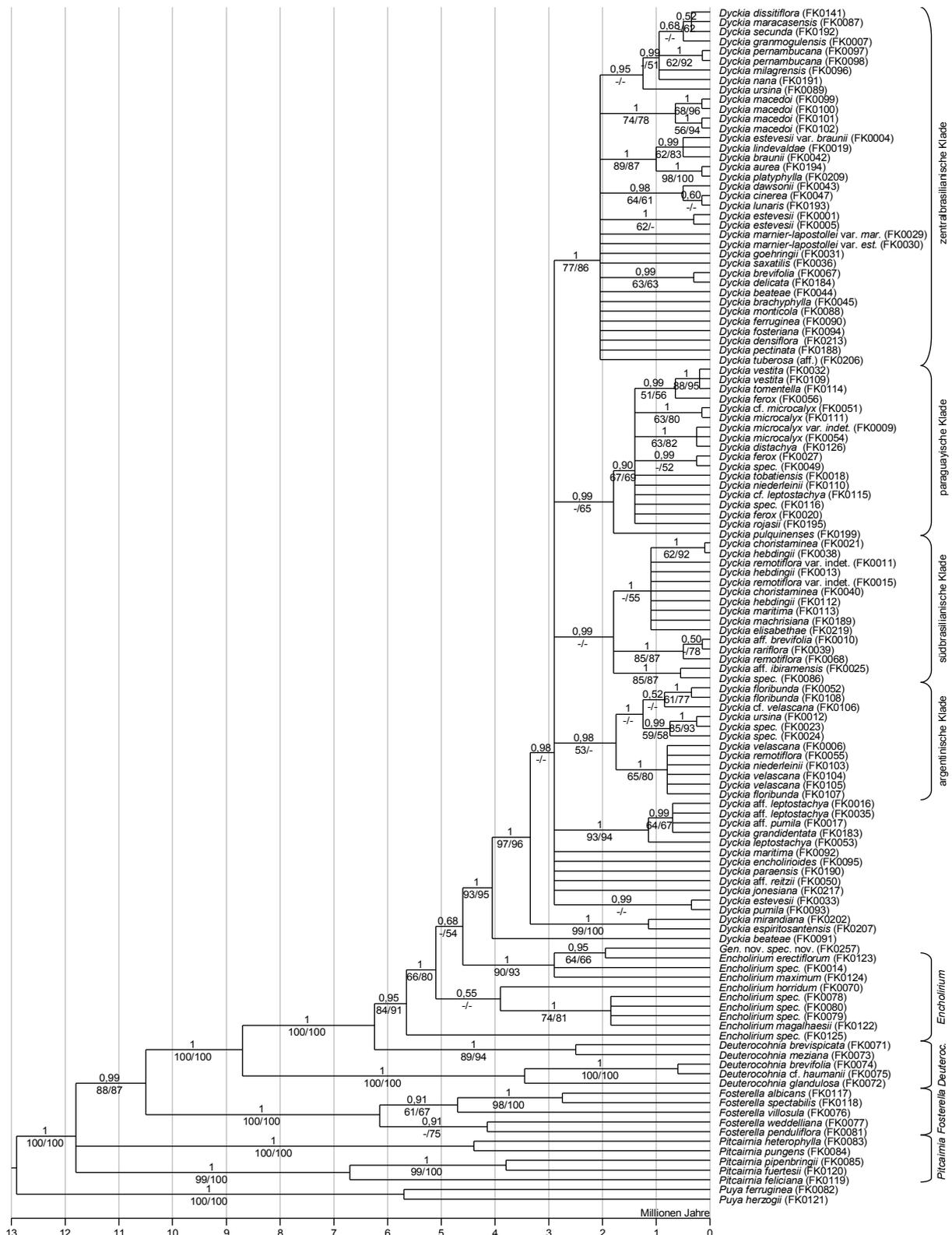
### Topologie aus der BEAST-Analyse und statistische Unterstützung

Das kombinierte Alignment mit 6.003 Positionen Länge wurde einer Reihe unterschiedlicher Algorithmen zur Rekonstruktion phylogenetischer Bäume unterworfen. Dabei handelte es sich um Neighbour Joining-Analysen (NJ, 2.3.3), Parsimonieanalysen (MP, 2.3.4), Maximum Likelihood-Analysen (RAxML, 2.3.5) und Bayes'sche Analysen mit den Programmen MrBayes (2.3.6) und BEAST (2.3.7). Die Topologie der mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Phylogramme stimmten in fast allen Aspekten überein. Die folgende Beschreibung bezieht sich auf die datierte Phylogenie aus der BEAST-Analyse (Abbildung 18), deren Topologie repräsentativ für die Mehrzahl aller durchgeführten Analysen ist. Neben den in dieser Analyse ermittelten Posteriori-Wahrscheinlichkeiten (PP) sind auch die Bootstrap-Werte in Prozent aus der Parsimonieanalyse (MPBS) und der RAxML-Analyse (MLBS) in der Abbildung enthalten. Die Angabe dieser Werte im folgenden Text in der Form (PP/MPBS/MLBS) bezieht sich jeweils auf die unmittelbar zuvor getroffene Aussage.

Nach Bewurzelung mit den beiden als Außengruppe dienenden Vertretern der Gattung *Puya* bildet die Unterfamilie Pitcairnioideae eine klar monophyletische Abstammungsgemeinschaft (1,00/100/100). Innerhalb der Pitcairnioideae finden sich drei Linien in einer Polytomie, darunter zwei jeweils monophyletische Gruppen von *Pitcairnia* (1,00/100/100 und 1,00/99/100) sowie eine Klade, in welcher alle übrigen Gattungen vereinigt sind (0,99/88/87). Innerhalb der letztgenannten Klade steht die eindeutig monophyletische Gattung *Fosterella* (1,00/100/100) in einer Schwestergruppenposition zu einer Klade aus den drei xerophytischen Gattungen *Deuterocohnia*, *Dyckia* und *Encholirium* (1,00/100/100). *Deuterocohnia* besteht aus zwei jeweils gut gestützten paraphyletischen Linien (1,00/100/100), die basal zu einer gemeinsamen Klade aus *Dyckia* und *Encholirium* abzweigen (0,95/84/91).

*Encholirium* besteht aus drei paraphyletischen Linien, die durch zwei interne Knoten voneinander getrennt sind (1,00/66/80 und 0,68/-/54). Eine erst vor kurzem gefundene

## Ergebnisse



**Abbildung 18: Datierte Phylogenie auf Basis sechs plastidärer Loci**

Die hier dargestellte datierte Phylogenie wurde mit dem Programmpaket BEAST 1.6.1 erstellt. Als Kalibrationspunkt für die Datierung diente das von Givnish et al. (2011) ermittelte Alter der Unterfamilie Pitcairnioideae (11,8 Millionen Jahre). Die Skala am unteren Bildrand beschreibt das Alter in Millionen Jahren. Über den Ästen finden sich Posteriorwahrscheinlichkeiten der BEAST-Analyse, unter den Ästen Bootstrap-Werte aus je 1.000 Wiederholungen einer Parsimonieanalyse und einer RAxML-Analyse des gleichen Datensatzes (Parsimonieanalyse/RAxML-Analyse).

## Ergebnisse

Pflanze, die möglicherweise eine neue Gattung repräsentiert (FK0257), steht gemeinsam mit *E. erectiflorum* in abgeleiteter Position in derjenigen Linie von *Encholirium*, welche *Dyckia* am nächsten steht. In den folgenden Ausführungen wird diese Pflanze jeweils zu *Encholirium* gerechnet.

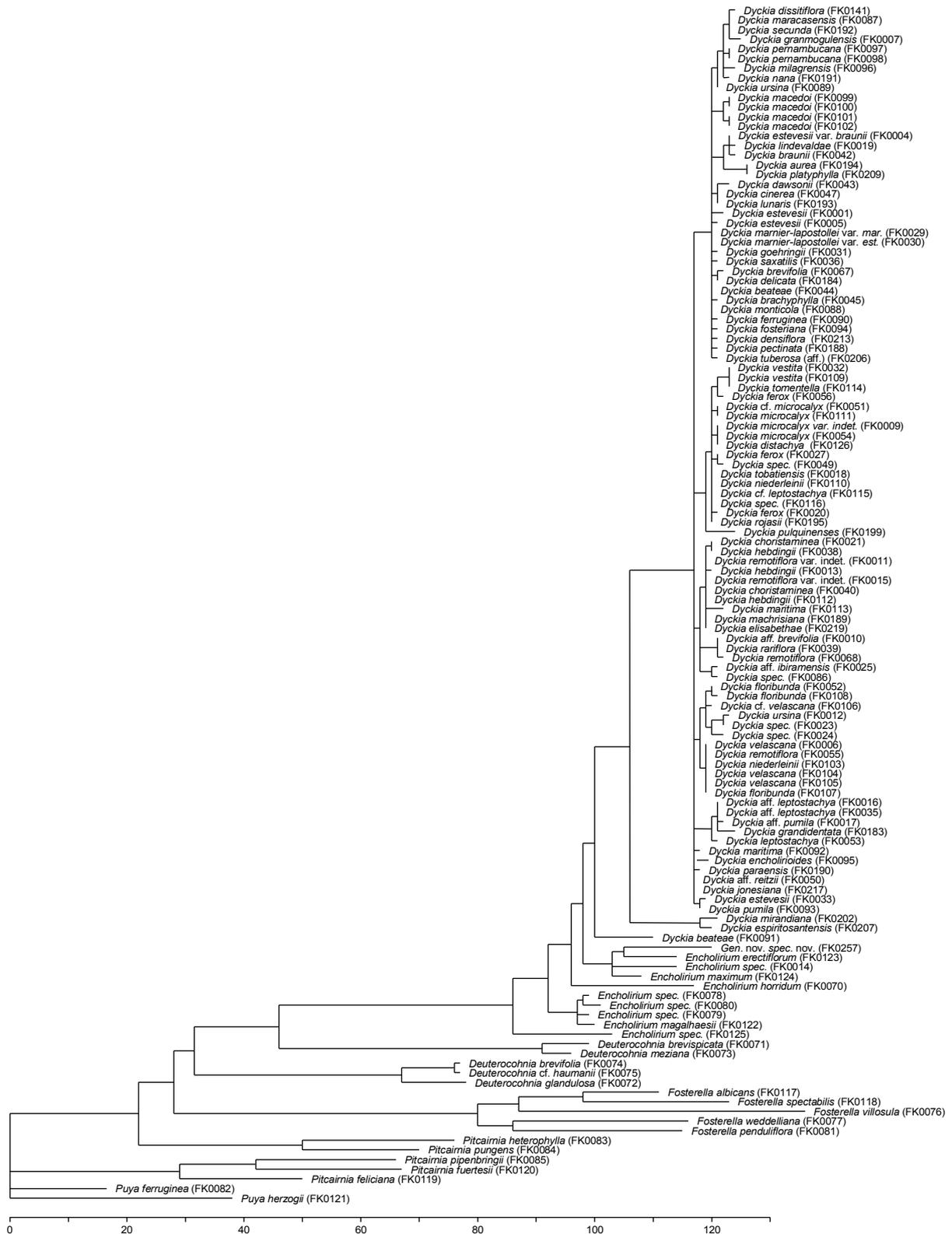
Die Monophylie von *Dyckia* wird sehr gut gestützt (1,00/93/95). Eine einzelne Akzession von *D. beateae* steht in Schwestergruppenposition zum monophyletischen Rest der Gattung (1,00/97/96). In diesem wiederum steht eine Linie, die *D. mirandiana* und *D. espiritosantensis* als Monophylum enthält (1,00/99/100), in Schwestergruppenposition zum gesamten monophyletischen Rest der Gattung (0,98/-/-), der von hier an als „Core-*Dyckia*“ bezeichnet wird und eine umfangreiche Polytomie aus diversen Kladen und einzelnen Akzessionen bildet. Vier Kladen sind relativ gut gestützt und zeigen eine deutliche Korrelation mit der geographischen Herkunft ihrer Vertreter. So gibt es eine große zentralbrasilianische Klade (1,00/77/86), die insgesamt 37 Akzessionen enthält. Die paraguayische Klade (0,99/-/65) enthält *D. pulquinensis* in Schwesterposition zu den übrigen 17 Akzessionen (0,90/67/69). In der südbrasilianischen Klade (0,99/-/-) findet sich eine Tritomie, deren Linien insgesamt 15 Akzessionen enthalten. Die argentinische Klade schließlich (0,98/53/-) umfasst 12 Akzessionen in zwei Schwestergruppen etwa gleicher Größe. Ferner gibt es eine nicht näher bezeichnete Klade, die aus fünf Akzessionen besteht (1,00/93/94). Die Auflösung innerhalb der genannten Gruppen ist jeweils sehr gering.

### Unterschiede in anderen Analysen

Die Ergebnisse der Parsimonieanalyse (Abbildung 19 und Anhang 8), der RAxML-Analyse (Abbildung 20), der Bayes'schen Analyse (Abbildung 21) und der NJ-Analyse (Anhang 6 und Anhang 7) weisen nur einen einzigen nennenswerten Widerspruch gegenüber der BEAST-Analyse oder untereinander auf. Dieser besteht in der Stellung von *E. horridum*, welche in der BEAST-Analyse mit vier anderen *Encholirium*-Akzessionen eine schlecht gestützte Klade bildet (PP=0,55, Abbildung 18). In allen anderen Analysen bildet *E. horridum* entweder eine unabhängige Linie innerhalb der paraphyletischen Gattung *Encholirium* oder steht in einer unaufgelösten Polytomie mit anderen Linien.

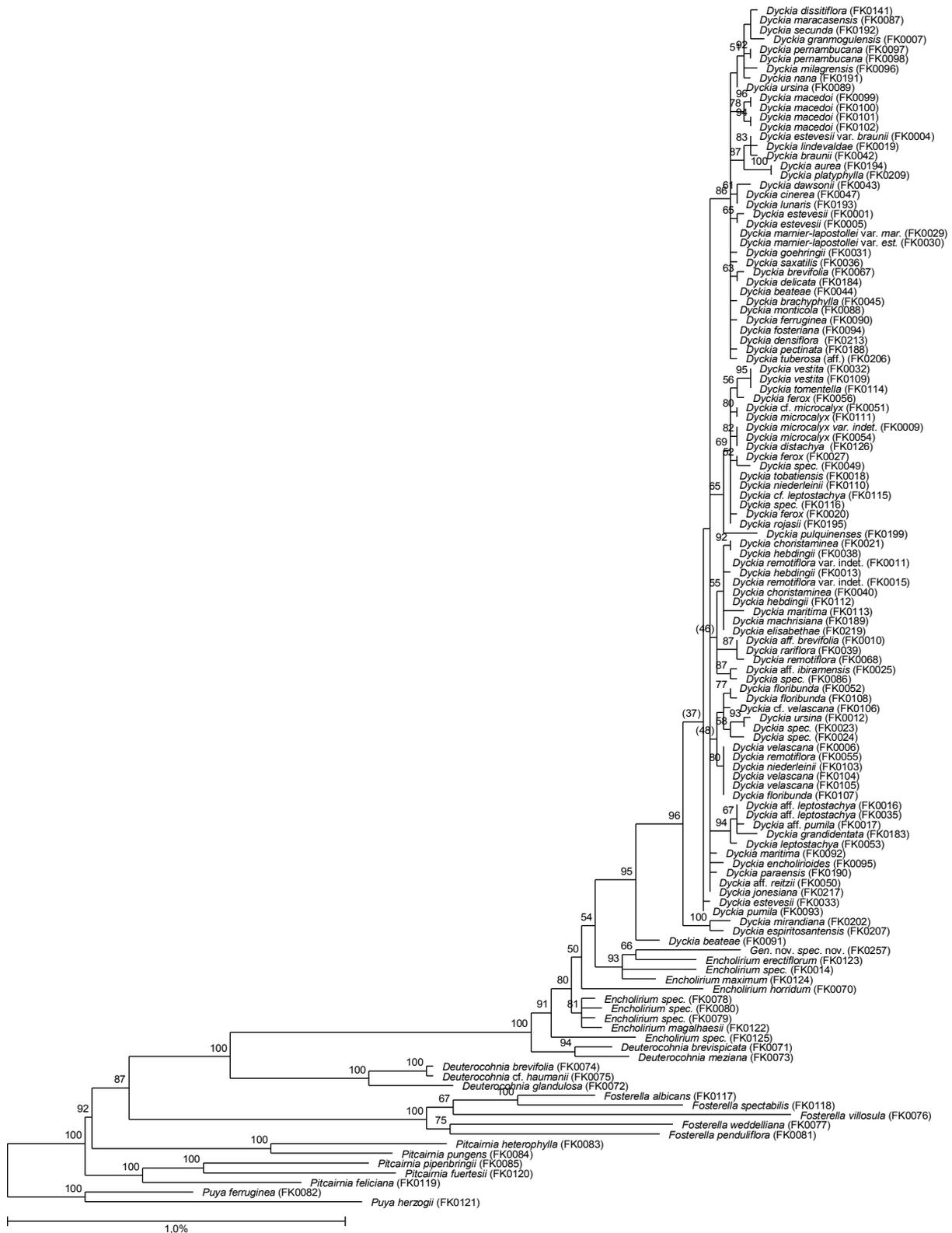
Alle übrigen topologischen Unterschiede zwischen den mit verschiedenen Analysemethoden erzeugten Bäumen betreffen nur die unterschiedlich gute Auflösung an einzelnen Knoten und die statistische Unterstützung von Verzweigungen. Während *Pitcairnia* in der BEAST-Analyse aus zwei Linien besteht, die mit den übrigen Pitcairnioideae in einer Tritomie stehen, ist die Gattung in allen anderen Analysen paraphyletisch (MrBayes PP=0,78, MPBS=78%, MLBS=92%, NJBS=97%). Innerhalb von *Encholirium* finden sich vier unabhängige Linien,

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Einzelner kürzester Baum aus einer Parsimonieanalyse auf Basis sechs plastidärer Loci**  
 Der hier gezeigte Baum ist einer von 100.000 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 807, die aus einer Parsimonieanalyse mit PAUP\* 4.0b resultierten. Die Astlängen entsprechen der Zahl evolutionärer Schritte entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Ende der Abbildung.

## Ergebnisse



**Abbildung 20: RAxML-Analyse auf Basis sechs plastidärer Loci**

Gezeigt ist der beste gefundene Baum aus einer Maximum Likelihood-Analyse durchgeführt mit RAxML 7.2.6 unter Verwendung des GTR-CAT-Substitutionsmodells. Über den Ästen finden sich Bootstrap-Werte aus 1.000 rapid bootstrap-Replikaten, Werte unterhalb von 50% sind nur in Ausnahmefällen gezeigt und stehen dann in Klammern. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand.

## Ergebnisse



**Abbildung 21: Bayes'sche Analyse auf Basis sechs plastidärer Loci**

Gezeigt ist der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1. Die Analyse wurde in zwei unabhängigen Läufen mit je 2.500.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posteriori-wahrscheinlichkeiten. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand.

## Ergebnisse

zwei davon enthalten nur jeweils eine Akzession, nämlich *E. horridum* beziehungsweise *E. spec.* (FK0125). Der Zusammenhang zwischen diesen Linien und damit der Grad an Paraphylie von *Encholirium* variiert zwischen den Analysen. Eine basale Abspaltung von *E. spec.* (FK0125) wurde in allen Berechnungen mit Ausnahme der NJ-Analyse gefunden. In der Bayes'schen und der RAxML-Analyse sind alle vier erwähnten Linien durch gestützte Knoten gegeneinander getrennt.

Das frühe Abzweigen von *D. mirandiana* und *D. espiritosantensis* von der als *Core-Dyckia* bezeichneten Gruppierung findet sich nur in der BEAST-Analyse und der Bayes'schen Analyse (jeweils gestützt mit PP=0,98). Der beste in der RAxML-Analyse gefundene Baum weist diese Verzweigung ebenfalls auf, die zugehörige Bootstrap-Analyse liefert aber keine Unterstützung (MLBS=37%). Die fünf großen, geographisch determinierten Kladen innerhalb von *Core-Dyckia* wurden in allen Analysen gefunden. Die RAxML-Analyse ergab allerdings keine statistische Unterstützung für die südbrasilianische (MLBS=46%) und die argentinische Klade (MLBS=48%). In der Parsimonieanalyse wiesen die südbrasilianische und die paraguayische Klade jeweils Bootstrap-Werte unter 50% auf. In den Ergebnissen der NJ-Analyse ist die argentinische Klade nicht durch Bootstrap-Werte gestützt und die Zugehörigkeit von *D. pulquinensis* zur paraguayischen Klade wurde nicht ermittelt, hier steht diese Akzession einzeln innerhalb der Polytomie von *Core-Dyckia*.

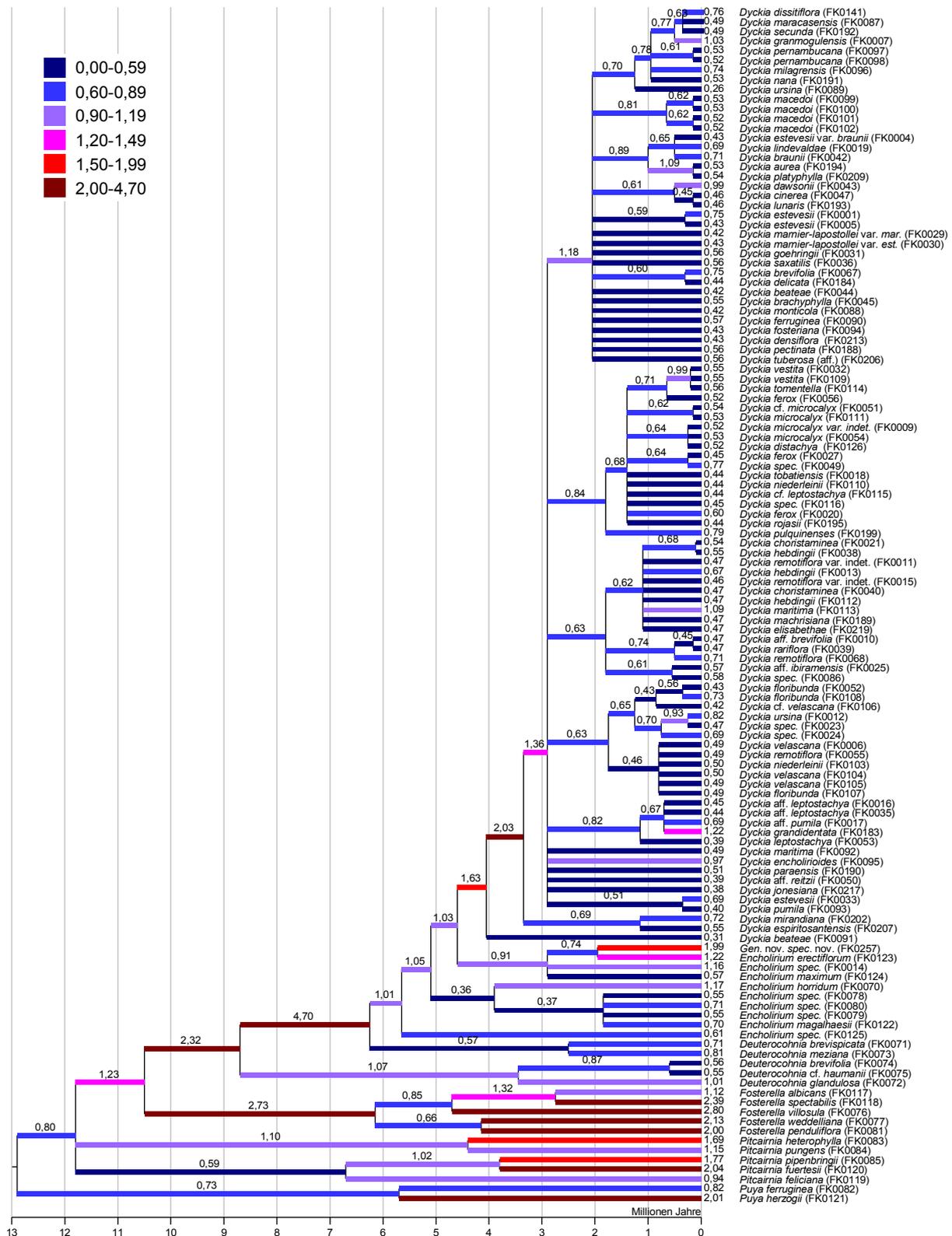
### Homoplasie-Indices aus der Parsimonieanalyse

Die Zahl der aus der Parsimonieanalyse resultierenden kürzesten Bäume musste künstlich auf 100.000 begrenzt werden, da die Analyse sonst zu keinem Ende kam. Zur Abschätzung der im Datensatz enthaltenen Homoplasie wurden in der Parsimonieanalyse diverse Indices für die erhaltenen Bäume berechnet. Für die gefundenen kürzesten Bäume mit einer Schrittlänge von jeweils 807 wurden der Konsistenzindex (ensemble consistency index) mit CI=0,813 und der Homoplasieindex entsprechend mit 0,187 ermittelt. Für den Retentionsindex wurde ein Wert von RI=0,919 und für den rescaled consistency index ein Wert von RC=0,747 errechnet.

### Knotenalter und Substitutionsraten aus der BEAST-Analyse

Für die Erzeugung der in Abbildung 18 und Abbildung 22 gezeigten Chronogramme im Rahmen der BEAST-Analyse wurde das von Givnish et al. (2011) geschätzte Alter der Kronengruppe der Pitcairnioideae (11,8 Millionen Jahre) als Kalibrationspunkt verwendet. Danach entstanden beide Gruppen von *Pitcairnia* nahezu gleichzeitig mit der Aufspaltung der Unterfamilie vor eben 11,8 Millionen Jahren. Die Stammgruppe von *Fosterella* ist etwa 10,5 Millionen Jahre alt, die Kronengruppe 6,2 Millionen Jahre. Die Klade aus den

## Ergebnisse



**Abbildung 22: In der BEAST-Analyse ermittelte Substitutionsraten**

Die hier gezeigte datierte Phylogenie wurde mit dem Programmpaket BEAST 1.6.1 erstellt. Als Kalibrationspunkt für die Datierung diente das von Givnish et al. (2011) ermittelte Alter der Unterfamilie Pitcairnioideae (11,8 Millionen Jahre). Die Skala am unteren Bildrand beschreibt das Alter in Millionen Jahren. Über den Ästen finden sich die vom Programm für den entsprechenden Ast ermittelten Substitutionsraten. Die Substitutionsraten der Endäste sind jeweils rechts neben diesen notiert. Unterschiedliche Bereiche von Substitutionsraten werden durch Farben kodiert, wie in der Legende links oben angezeigt. Alle Raten sind als Substitutionen pro Position im Alignment und pro Milliarden Jahren (substitutions per site per billion years, SSB) angegeben.

## Ergebnisse

xerophytischen Gattungen *Deuterocohnia*, *Encholirium* und *Dyckia* entstand also ebenfalls vor 10,5 Millionen Jahren, ihre hier untersuchten Vertreter begannen vor 8,7 Millionen Jahren sich zu diversifizieren. Zu diesem Zeitpunkt zweigte zunächst die eine der beiden paraphyletischen Linien von *Deuterocohnia* ab, die andere Linie trennte sich erst vor 6,2 Millionen Jahren vom gemeinsamen Vorfahren von *Encholirium* und *Dyckia*. Die Diversifizierung der untersuchten Vertreter der paraphyletischen Gattung *Encholirium* begann vor 5,6 Millionen Jahren. Vor 4,6 Millionen Jahren entstand dann die Linie, die zur heutigen Gattung *Dyckia* führte. Die Kronengruppe der untersuchten Vertreter von *Dyckia* entstand vor 4,0 Millionen Jahren mit der Abspaltung einer einzelnen Linie. Die Vertreter von *Core-Dyckia* begannen vor 2,9 Millionen Jahren, sich zu diversifizieren. Dabei entstanden innerhalb kürzester Zeit 11 unterschiedliche Linien, die in den Abbildungen 18-22 eine gering aufgelöste Polytomie bilden.

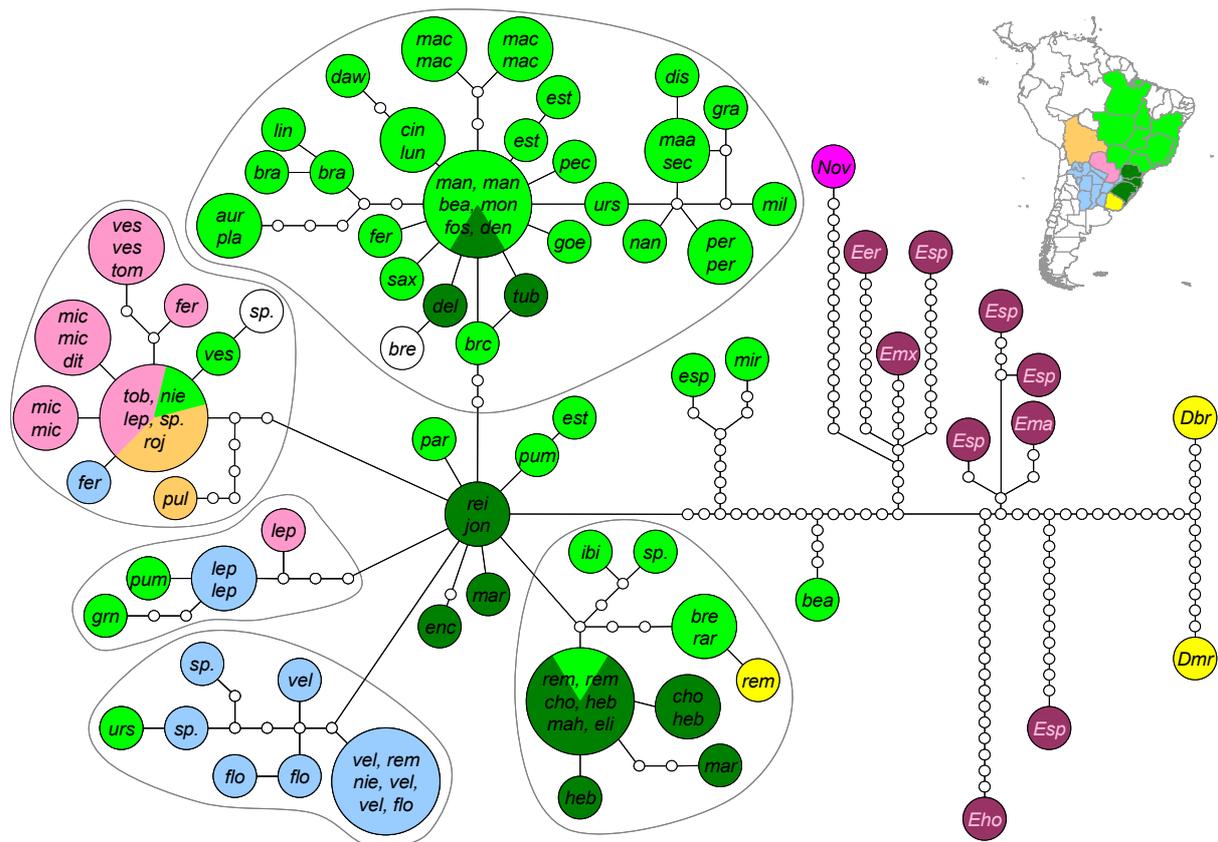
Über den gesamten Baum hinweg variieren die in der BEAST-Analyse abgeschätzten Substitutionsraten der einzelnen Äste zwischen 0,26 und 4,70 Substitutionen pro Alignment-Position und pro Milliarden Jahren (substitutions per site per billion years, SSB, Abbildung 22). Die durchschnittlichen Raten innerhalb der Kronengruppen der monophyletischen Gattungen betragen 1,42 SSB für *Puya*, 2,00 SSB für *Fosterella* und 0,57 SSB für *Core-Dyckia*. Innerhalb von *Dyckia* sind die Raten in den verschiedenen Kladen recht ähnlich, mit 0,58 SSB in der zentralbrasilianischen Klade, 0,57 SSB in der paraguayischen Klade, 0,59 SSB in der südbrasilianischen Klade und 0,58 SSB in der argentinischen Klade. Für die paraphyletischen und unaufgelösten Gattungen fanden sich unter Berücksichtigung aller internen Äste Werte von 0,88 SSB für *Encholirium*, 1,27 SSB für *Pitcairnia* und 1,02 SSB für *Deuterocohnia*. Wird der lange Ast, der die beiden paraphyletischen Linien von *Deuterocohnia* verbindet, von der Berechnung ausgenommen, ergibt sich ein deutlich geringerer Wert von 0,79 SSB.

### Phylogenetisches Netzwerk

Zusätzlich zu den phylogenetischen Bäumen wurde mittels statistischer Parsimonie (TCS, 2.3.8) ein phylogenetisches Netzwerk erstellt (Abbildung 23). Das darin gefundene Verknüpfungsmuster und die einzelnen Gruppen bestätigen die Ergebnissen der anderen phylogenetischen Analysen. Eine Version des Netzwerkes mit DNA-Nummern findet sich im Anhang 9.

Mit *Deuterocohnia* als Außengruppe zweigen zunächst vier unabhängige Linien von *Encholirium* ab. Innerhalb der somit deutlich paraphyletischen Gattung *Encholirium* finden sich 94 verschiedene Haplotypen, von denen lediglich 10 durch untersuchte Pflanzen besetzt

## Ergebnisse



**Abbildung 23: Haplotyp-Netzwerk auf Basis sechs plastidärer Loci**

Das hier gezeigte Haplotyp-Netzwerk wurde mittels des Computerprogramms TCS 1.21 (Clement et al. 2000) erstellt, welches auf statistischer Parsimonie beruht. Das Ergebnis wurde mit den Ergebnissen aus der Bayes'schen Analyse und Parsimonieanalyse abgeglichen. In die Berechnungen einbezogen wurden nur Akzessionen von *Dyckia* und *Encholirium*, sowie *Deuterocohnia brevispicata* und *Deuterocohnia meziana* zur Bewurzelung. Die Farbcodierung der Haplotypen entspricht den geographischen Herkünften der sie tragenden Pflanzen wie auf der kleinen Karte rechts oben angezeigt. Die Abkürzungen für die einzelnen Arten können aus Tabelle 1 entnommen werden.

sind. Einer dieser Haplotypen wurde in einer Pflanze gefunden die möglicherweise als neue Gattung beschrieben wird. Die zwei am weitesten voneinander entfernten besetzten Haplotypen von *Encholirium* (*E. horridum* und *E. spec.* FK0125) trennen 34 Sequenzunterschiede. Zwischen den am nächsten liegenden, aber jeweils hypothetischen Haplotypen von *Encholirium* und *Dyckia* liegen fünf evolutive Schritte. Die am nächsten verwandten Haplotypen der beiden Gattungen, die durch untersuchte Pflanzen besetzt sind (*Dyckia beateae* und *Encholirium maximum*) trennen 18 evolutive Schritte. Der hypothetische Haplotyp, über den die als erstes abzweigende Linie von *Dyckia* und die übrigen *Dyckia*-Haplotypen mit *Encholirium* verknüpft sind, ist durch neun Sequenzunterschiede vom zentralen Haplotypen von Core-*Dyckia* entfernt. Der hypothetische Haplotyp, an welchem die aus *D. mirandiana* und *D. espiritosantensis* gebildete Linie abzweigt, ist durch drei evolutive Schritte vom zentralen Haplotypen von Core-*Dyckia* entfernt.

## Ergebnisse

Innerhalb von Core-*Dyckia* enthält das Netzwerk 99 Haplotypen, von denen 60 besetzt sind. Hier zweigen neun unterschiedliche Linien sternförmig von einem einzelnen zentralen Haplotypen ab, der durch jeweils eine Akzession von *D. reitzii* und *D. jonesiana* besetzt ist. Die neun Linien finden sich allesamt auch in den anderen Analysen wieder (vgl. Abbildung 18). Neben den bereits erwähnten fünf großen, geographisch assoziierten Kladen (zentralbrasilianische, paraguayische, südbrasilianische, argentinische und eine weitere Klade) gehen vier weitere, jeweils nur einen oder zwei Haplotypen enthaltende Linien von dem zentralen Haplotypen aus. Ein deutlich sternförmiges Verzweigungsmuster findet sich auch innerhalb der zentralbrasilianischen Klade. Hier leiten sich 11 Linien aus einem zentralen Haplotyp ab, welcher durch fünf Akzessionen aus vier Arten besetzt ist. Eine mögliche basale Stellung von *D. brachyphylla* und möglicherweise zusätzlich *D. tuberosa* innerhalb der zentralbrasilianischen Klade ist aufgrund einer nicht aufgelösten Masche des Netzwerkes nicht zu klären. In der paraguayischen Klade findet sich ebenfalls ein zentraler Haplotyp, welcher durch fünf Akzessionen aus mindestens vier Arten besetzt ist. Von diesem aus entspringen fünf abgeleitete Linien. *D. pulquinensis* zweigt innerhalb dieser Klade in basaler Stellung ab. Innerhalb der südbrasilianischen Klade existiert ein durch sechs Akzessionen aus fünf Arten besetzter Haplotyp, von welchem sich vier Linien ableiten. Eine zentrale Stellung dieser Sequenzvariante wird aber nicht deutlich. Die argentinische Klade weist keinen deutlichen zentralen Haplotypen auf.

Die unterschiedlichen plastidären Haplotypen zeigen nur eine geringe Korrespondenz zu den sie beherbergenden Arten. Von allen untersuchten Arten von *Dyckia* waren 19 durch jeweils mehr als eine Akzession repräsentiert. Aber nur in zwei Fällen, bei *D. marnier-lapostollei* und *D. pernambucana*, tragen jeweils alle untersuchten Akzessionen denselben Haplotypen. Für *D. marnier-lapostollei* findet sich dieser Haplotyp aber auch in anderen Arten wieder. Die vier Akzessionen von *D. macedoi* tragen Plastiden, deren Haplotypen ein Monophylum bilden und exklusiv in dieser Art vorkommen. Die Arten *D. choristaminea*, *D. ferox*, *D. floribunda*, *D. hebdingii*, *D. microcalyx*, *D. velascana* und *D. vestita* tragen jeweils verschiedene Haplotypen, die zwar jeweils nahe miteinander verwandt sind, aber keine Monophyla bilden. Einige Arten von *Dyckia* sind im Netzwerk durch weit voneinander entfernte Haplotypen repräsentiert. So taucht *D. beateae* sowohl außerhalb von Core-*Dyckia* als auch in der zentralbrasilianischen Klade auf. Plastiden aus jeweils zwei unterschiedlichen der acht Linien von Core-*Dyckia* tragen die Arten *D. brevifolia*, *D. estevesii*, *D. leptostachya*, *D. maritima*, *D. niederleinii*, *D. pumila*, *D. remotiflora* und *D. ursina*. Andererseits gibt es auch viele Haplotypen, die in mehr als einer Art vorkommen, darunter beispielsweise die zentralen Haplotypen der zentralbrasilianischen und der paraguayischen Klade.

## Ergebnisse

### Geographisches Muster

Die mit Hilfe der Analysen plastidärer DNA innerhalb von *Dyckia* identifizierten Kladen spiegeln überwiegend die geographischen Herkünfte der untersuchten Pflanzen wider (Abbildung 23, vgl. auch Abbildung 37). Die Akzession von *D. beateae*, die in der vorliegenden Studie die ursprünglichste Linie der Gattung bildet, stammt aus der Gegend um die Stadt Coxim im brasilianischen Bundesstaat Mato Grosso do Sul. Die beiden anderen ursprünglichen Vertreter von *Dyckia* stammen aus Alto Paraíso im Bundesstaat Goiás (*D. mirandiana*) und São Roque do Canaã im Bundesstaat Espírito Santo (*D. espiritosantensis*). Innerhalb von Core-*Dyckia* ist der im Netzwerk zentrale Haplotyp durch eine Akzession von *D. reitzii* aus der Nähe von Cambará und eine von *D. jonesiana* aus der Region Caçapava do Sul besetzt. Beide Fundorte liegen im südlichsten brasilianischen Bundesstaat Rio Grande do Sul.

Auch zwei der vier kleineren, vom zentralen Haplotypen abgehenden Linien wurden in südbrasilianischen Pflanzen gefunden. Eine dieser Linien wird von einer *D. maritima* aus dem nahe gelegenen Torres gebildet. Eine weitere Linie führt zu einer Akzession von *D. encholirioides*, diese Art ist endemisch für die Küstenregionen der südlichsten Bundesstaaten Brasiliens. Die dritte kleinere Linie beherbergt mit *D. estevesii* und *D. pumila* zwei Pflanzen aus dem zentralbrasilianischen Bundesstaat Goiás. Eine vierte Linie wird von *D. paraensis* aus dem Bundesstaat Pará im äußersten Norden Brasiliens gebildet, was deutlich außerhalb des Hauptverbreitungsgebietes von *Dyckia* liegt.

In der kleinsten der fünf großen Kladen innerhalb von Core-*Dyckia* finden sich Pflanzen aus den Bundesstaaten Mato Grosso und Mato Grosso do Sul in Zentralbrasilien, dem Departamento Cordillera in Paraguay und der Provinz Córdoba in Argentinien. Innerhalb dieser Gruppe ist keine klare geographische Verbindung ersichtlich.

Die zentralbrasilianische Klade enthält eine Pflanze aus der Gegend um Campo Alegre im Bundesstaat Santa Catarina in Südbrasilien. Diese trägt den innerhalb der Klade zentralen Haplotypen. Zwei der vom zentralen Haplotypen ausgehenden Linien enthalten je eine weitere Pflanze aus dem südlichen Brasilien, nämlich *D. delicata* aus Rio Grande do Sul und *D. tuberosa* aus São Gerônimo da Serra in Paraná. Alle anderen Haplotypen der zentralbrasilianischen Klade wurden ausschließlich in Pflanzen aus brasilianischen Bundesstaaten nördlich von Paraná gefunden.

Innerhalb der argentinischen Klade findet sich in abgeleiteter Positionen eine Akzession der für den zentralbrasilianischen Bundesstaat Minas Gerais endemischen Art *D. ursina*. Für eine Akzession von *D. remotiflora* innerhalb der Klade ist der Fundort unbekannt, die Art

## Ergebnisse

kommt weit verbreitet in Südbrasilien, Uruguay und Argentinien vor. Alle anderen Haplotypen der argentinischen Klade sind durch Pflanzen aus Argentinien besetzt.

Die paraguayische Klade enthält überwiegend Pflanzen aus Paraguay. Außerdem wurden Haplotypen dieser Klade in je einer Pflanze aus dem Bundesstaat Bahia in Zentralbrasilien, aus Pará im Norden Brasiliens, der Provinz Córdoba in Argentinien und dem Departamento Santa Cruz in Bolivien gefunden. Für drei weitere Akzessionen fehlen Fundortangaben, darunter ist allerdings eine für Paraguay endemische *D. tomentella*. Die ursprünglichste Linie innerhalb der paraguayischen Klade bildet eine *D. pulquinensis* aus Bolivien.

Die südbrasilianische Klade enthält mehrheitlich Haplotypen, die in Pflanzen aus dem Süden Brasiliens gefunden wurden. Ein zusammenhängendes Sub-Netzwerk bilden zehn Vertreter von *D. choristaminea*, *D. hebdingii*, *D. maritima*, *D. remotiflora*, *D. elisabethae* und *D. machrisiana*. Bis auf die ausschließlich in Goiás vorkommende *D. machrisiana* sind alle zehn Pflanzen endemisch für den äußersten Süden Brasiliens. Lediglich für *D. remotiflora* gibt es auch Fundorte weiter nördlich und in Uruguay. Weiterhin finden sich in der südbrasilianischen Klade drei Pflanzen aus Minas Gerais in Zentralbrasilien, eine Pflanze aus Uruguay und eine weitere ohne Fundortangaben.

### 3.3 Sequenzierung nukleärer Loci

#### 3.3.1 Pilotexperimente

##### *Phytochrom C (phyC)*

Die Amplifikation von Teilbereichen des ersten Exons des *Phytochrom C*-Gens aus Arten von *Dyckia* erwies sich zunächst als schwierig (vgl. 2.2.3.2 und 2.2.3.3). So erbrachte die PCR mit Primern nach Samuel et al. (2005) mit dem verwendeten Programm keine Amplifikate. Eine direkte PCR und anschließende Sequenzierung mit Primern von Michael Barfuss (Universität Wien, persönliche Kommunikation, Tabelle 5) lieferte weder für das Gesamtfragment, noch für die beiden Einzelteile zufriedenstellende Ergebnisse. So zeigten sich bei Annealingtemperaturen von 50 °C viele zusätzliche Banden. Eine Erhöhung der Annealingtemperatur auf 55 °C beziehungsweise 59 °C schlug sich jeweils negativ auf die Qualität der Sequenzen von Teil a aus, die dann nicht mehr eindeutig zu lesen waren. Teil b konnte teilweise ausgewertet werden, die Qualität der Sequenzen war jedoch nur mäßig gut.

Die verschachtelte (nested) PCR ergab mit der Kombination der Programme *phyc\_nest\_1\_20100608* und *phyc\_nest\_2\_20100614* (Tabelle 6) zunächst gut auswertbare Sequenzen für beide Teilstücke. Bei der Wiederholung der ersten Amplifikationsstufe für weitere Proben zeigten sich jedoch auf den Agarosegelen in allen Fällen starke

## Ergebnisse

Zusatzbanden mit Längen von etwa 80 bp und deren Vielfachem, in einigen Proben bis über 800 bp. Obwohl die zweite Amplifikationsstufe jeweils deutliche distinkte Einzelfragmente der erwarteten Größe lieferte, war die Sequenzierung nicht möglich. Weder der Austausch aller Reagenzien, noch die Nutzung anderer Thermocycler oder die Verwendung von Positivkontrollen, also Proben, die vorher bereits einmal funktioniert hatten, lösten dieses Problem. Auch weitere Modifikationen der Programme und die Verwendung von Programmen, welche bereits zuvor funktioniert hatten, waren erfolglos.

Bei der schließlich eingesetzten band-stab-Methode (vgl. 2.2.3.3, Bjourson & Cooper 1992) zeigten sich ebenfalls besagte Zusatzbanden in der ersten Amplifikation. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und dem Ausstanzen des Zielfragmentes wurden in der zweiten Amplifikationsstufe aber keine zusätzlichen Banden mehr beobachtet. Die Sequenzierung dieser Fragmente war in allen Fällen erfolgreich und lieferte für beide Einzelteile jeweils in beide Richtungen bis zum Ende lesbare Sequenzen. Für einige Proben konnte das Gesamtfragment nicht gewonnen werden, vermutlich aufgrund mangelnder DNA-Qualität. Die DNA dieser Proben (Proben FK0090-94, 100-102, 141, 184, 188-195, 199, 200, 202, 207, 209, 213, 217, 219, 236, 241 und 257) war von Kooperationspartnern mit einer einfachen Isolationsmethode extrahiert worden (vgl. 2.2.1). Für diese Proben wurden im ersten Amplifikationsschritt die beiden Einzelfragmente a und b unter Verwendung von Primern ohne M13-Anhang getrennt amplifiziert, so dass am Ende auch hier die vollständige Sequenz erhalten wurde. Eine detaillierte Übersicht über alle verwendeten Kombinationen von Primern und Programmen und die damit erhaltenen deren Ergebnisse finden sich in Anhang 1.

### Malatsynthase (MS), ITS und ETS

Alle Versuche, den Locus *MS* mit einem der beiden verwendeten Programme (MS\_Krapp und MS\_Lewis in Tabelle 6) und den verwendeten Primern (Lewis & Doyle 2001) in einer der untersuchten Pflanzen in Pilotexperimenten zu amplifizieren, schlugen fehl. Der Locus wurde daher nicht weiter verwendet.

Ebenso wenig gelang es, die Regionen *ITS1* und *ITS2* von *Dyckia*-Arten mit den von Jabaily & Sytsma (2010) konstruierten Primerpaaren zu amplifizieren.

Für die Amplifikation der *ETS*-Region wurden Primerpaare verwendet, die von Sass & Specht (2010) für die Unterfamilie Bromelioideae entworfen und dort erfolgreich eingesetzt wurden. Für Vertreter der Pitcairnioideae und Puyoideae konnten mit diesen Primer jedoch keine PCR-Produkte erzeugt werden. Der Einsatz einer leistungsfähigeren DNA-Polymerase in Verbindung mit für die Gattung *Tillandsia* spezifischen Primern (Chew et al. 2010) lieferte

## Ergebnisse

zwar je ein Amplifikat für die untersuchten Proben von *Pitcairnia*, nicht jedoch für *Dyckia*. Die Agarose-Gelelektrophorese zeigte schwache distinkte Einzelbanden auf einer Höhe entsprechend etwa 1.500 bp. Eine Sequenzierung wurde wegen der großen Länge des Fragments und der geringen Menge an Produkt nicht durchgeführt.

Die Amplifikation der gesamten *ETS-NTS*-Region mit universellen Primern (Baldwin & Markos 1998) erbrachte für *Dyckia* keine Fragmente, für *Pitcairnia feliciana* eine schwache Bande auf Höhe von 1.300 bp und für *P. fuertesii* eine starke Bande auf Höhe von etwa 1.100 bp. Versuche diese PCR-Produkten zu sequenzieren schlugen fehl.

### 3.3.2 Phylogenie auf Basis von *phyC*

#### Eigenschaften des Alignments und Heterozygotie

Alle 124 für den gewählten Bereich von *phyC* erzeugten Sequenzen einschließlich der Außengruppen wiesen eine identische Länge von 1159 bp auf. Somit enthielt das Alignment keinerlei Lücken. Die Sequenzvariabilität betrug 16,3% für das gesamte Probenaset und 5,7% innerhalb von *Dyckia*. Es waren insgesamt 114 parsimonie-informative Positionen enthalten, davon 34 innerhalb von *Dyckia*. Ein Ausschnitt des Alignments von Position 159 bis 249 ist in Abbildung 24 gezeigt.

Name	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	2
Dyckia estevesii FK0001	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia estevesii var braunii nom nud FK0004	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia estevesii FK0005	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia velascana FK0006	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia grämogulensis FK0007	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia microcalyx var indet FK0009	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia brevifolia aff FK0010	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia remotifera var indet FK0011	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia usina FK0012	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia hebdingii FK0013	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Encholirium spec FK0014	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia remotifera var indet FK0015	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia leptostachya aff FK0016	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia pumila aff FK0017	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia tobatiensis FK0018	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia lindvaldae FK0019	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia ferax FK0020	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia choistaminea FK0021	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia spec FK0023	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia spec FK0024	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia bitarimensis aff FK0025	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia ferax FK0027	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia mamier lapostollei var mamier lapostollei FK0029	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia mamier lapostollei var estevesii FK0030	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia goehringii FK0031	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia vestita FK0032	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia estevesii FK0033	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia leptostachya aff FK0035	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia elegantula var elegantula FK0036	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia hebdingii FK0038	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia rariflora FK0039	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia choistaminea FK0040	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia braunii FK0042	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia dawsonii FK0043	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia bracteata FK0044	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia brachyphylla FK0045	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia cinerea FK0047	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia spec FK0049	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia reitzii aff FK0050	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia microcalyx cf FK0051	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia floribunda FK0052	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Dyckia leptostachya FK0053	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

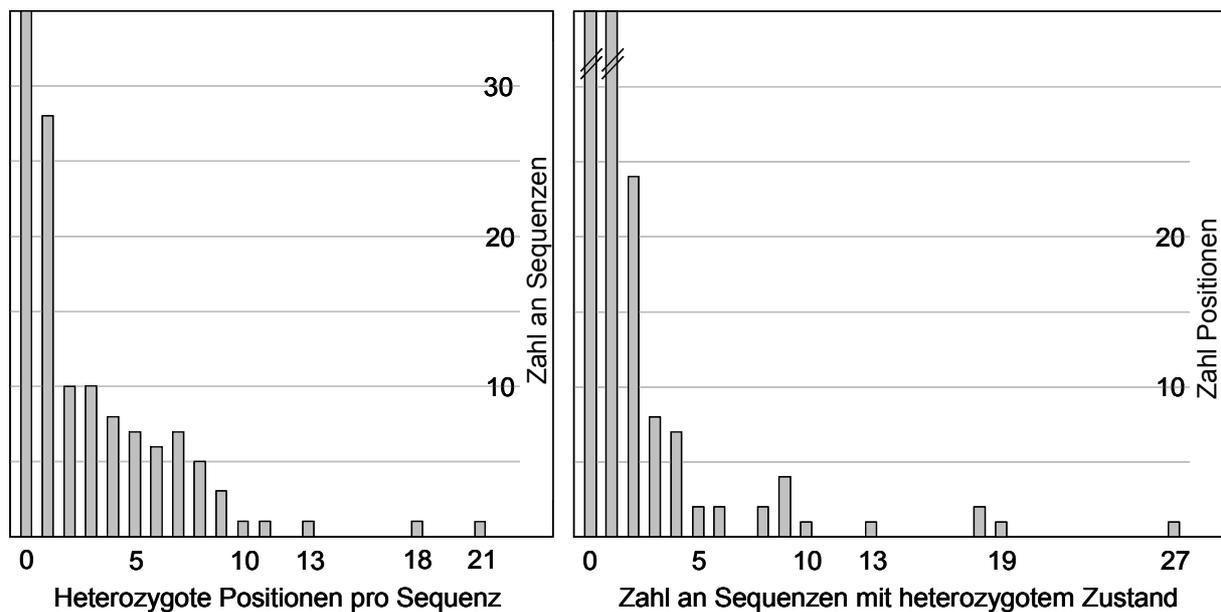
**Abbildung 24: Ausschnitt des Alignments für den Locus *phyC***

In dem hier gezeigten Ausschnitt des Alignments am Locus *phyC* sind die Positionen 175 und 230 bemerkenswert. Sie zeigen ein extremes Maß an Variabilität und Heterozygotie.

Als problematisch erwies sich der in vielen Proben hohe Anteil von heterozygoten Positionen, die sich in Form von nahezu gleichstarken Signalen in zwei Spuren äußerte (vgl. 2.3.2 und Abbildung 25). Von allen 124 gewonnenen Sequenzen für *phyC* zeigten

## Ergebnisse

35 Sequenzen keinerlei heterozygote Positionen, insgesamt 28 wiesen an exakt einer Alignmentposition einen heterozygoten Zustand auf. Insgesamt fünf Sequenzen zeigten 10 oder mehr heterozygote Positionen, darunter eine *Dyckia leptostachya* mit 21 und eine *Fosterella villosula* mit 18 Positionen. Von den insgesamt 189 variablen Positionen im Alignment wiederum zeigten 145 in mindestens einer Probe einen heterozygoten Zustand. Insgesamt 16 Positionen zeigten für fünf oder mehr Proben einen heterozygoten Zustand bis hin zu einem Extrem von 27 Sequenzen, welche an Position 521 des Alignments einen heterozygoten Merkmalszustand (A oder G) aufweisen (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Beobachtete Heterozygotie am Locus *phyC***

Das linke Diagramm zeigt, wie viele Sequenzen jeweils mit bestimmten Zahlen an heterozygoten Positionen gefunden wurden. Im rechten Diagramm ist gezeigt, wie viele Positionen des Alignments jeweils heterozygote Zustände in einer bestimmten Zahl an Sequenzen enthielten. Es wurden 1.014 Alignment-Positionen völlig ohne heterozygote Sequenzen gefunden. 90 Alignmentpositionen wiesen in jeweils einer Sequenz einen heterozygoten Zustand auf (in beiden Fällen sind die Balken verkürzt dargestellt).

### Substitutionsmodelle für die Likelihood- und die Bayes'sche Analyse

Mit dem Programm MrModeltest 2.3 (Nylander 2004) wurde als optimales Substitutionsmodell für *phyC* das Modell GTR+I+G ermittelt, welches in der BEAST-Analyse und der Bayes'schen Analyse Verwendung fand.

### Topologie aus den durchgeführten Analysen und statistische Unterstützung

Das Alignment mit 1.159 Positionen Länge wurde einer Reihe unterschiedlicher Algorithmen zur Rekonstruktion phylogenetischer Bäume unterworfen. Dabei handelte es sich um Neighbour Joining-Analysen (NJ, 2.3.3), Parsimonieanalysen (MP, 2.3.4), Maximum Likelihood-Analysen (RAxML, 2.3.5) und Bayes'sche Analysen (2.3.6). Zum Teil ergaben

## Ergebnisse

sich dabei Unterschiede bezüglich der Topologie der Phylogramme und der statistischen Unterstützung der einzelnen Äste. Im Folgenden diskutiert werden die Parsimonieanalyse (Abbildung 26 und Anhang 12), die Likelihood-Analyse (Abbildung 27) und die Bayes'sche Analyse (Abbildung 28). Die Angaben zu Posterioriwahrscheinlichkeiten (PP) aus der Bayes'schen Analyse und zu den Bootstrap-Werte in Prozent aus der Parsimonieanalyse (MPBS) und der RAxML-Analyse (MLBS) beziehen sich jeweils auf die unmittelbar zuvor getroffene Aussage (jeweils notiert als PP/MPBS/MLBS).

Eine Bewurzelung der Phylogenie mit *Pitcairnia* als Außengruppe einerseits und Mittelpunktsbewurzelung andererseits zeigten ein identisches Bild. Die Bewurzelung mit *Pitcairnia* wurde wegen der Stellung von *Puya* innerhalb der Pitcairnioideae in anderen Analysen durchgeführt (vgl. 2.3.1). Mit *Pitcairnia* als Außengruppe bilden die übrigen vier Gattungen der Unterfamilie Pitcairnioideae gemeinsam mit *Puya* ein Monophylum (1/100/100). In diesem stehen zwei Kladen in Schwestergruppenverhältnis zueinander. Die eine davon ist mäßig gestützt (0,76/62/65) und enthält die monophyletische (1/99/100) Gattung *Fosterella* und die ebenfalls monophyletische (1/97/98) Gattung *Deuterocohnia*. Die andere Klade ist nur schwach gestützt (0,65/58/-) und enthält die monophyletische Gattung *Puya* (0,99/74/81) als Schwestergruppe zu einem Monophylum aus *Dyckia* und *Encholirium* (1/93/99).

Die Gattung *Encholirium* ist in allen Analysen paraphyletisch. Die Arten *E. erectiflorum*, *E. horridum*, *E. maximum* sowie eine weitere unbestimmte Akzession stehen in der RAxML-Analyse und der Bayes'schen Analyse jeweils außerhalb einer Klade, die die möglicherweise eine neue Gattung repräsentierenden Akzession FK0257 (vgl. 2.1), alle verbleibenden *Encholirium*-Proben und alle *Dyckia*-Akzessionen vereinigt (PP=0,59, MLBS=63%). Innerhalb der letztgenannten Klade befindet sich die in den Abbildungen provisorisch als *Gen. nov. spec. nov.* bezeichnete FK0257 in Schwestergruppenposition zu einer Klade aus allen übrigen Pflanzen (PP=0,83, MLBS=90%). In der Parsimonieanalyse steht FK0257 mit den vier basal abzweigenden *Encholirium*-Akzessionen und der Klade aller verbleibender Proben von *Encholirium* und *Dyckia* (MPBS=50%) in einer unaufgelösten Polytomie. Innerhalb der zuletzt genannten Klade nimmt *E. magalhaesii* in der Bayes'schen Analyse und der Parsimonieanalyse jeweils eine vom monophyletischen Rest (PP=0,90, MPBS=52%) getrennte ursprüngliche Stellung ein. In der RAxML-Analyse steht diese Probe hingegen in abgeleiteter Position gemeinsam mit anderen Proben von *Dyckia* und *Encholirium*. Somit ist *Dyckia* in dieser Analyse paraphyletisch, jedoch ohne Unterstützung aus der Bootstrap-Analyse. In den übrigen Analysen kann über eine Monophylie oder Paraphylie von *Dyckia* keine Aussage getroffen werden, da die Gattung nicht deutlich von *Encholirium* getrennt ist.

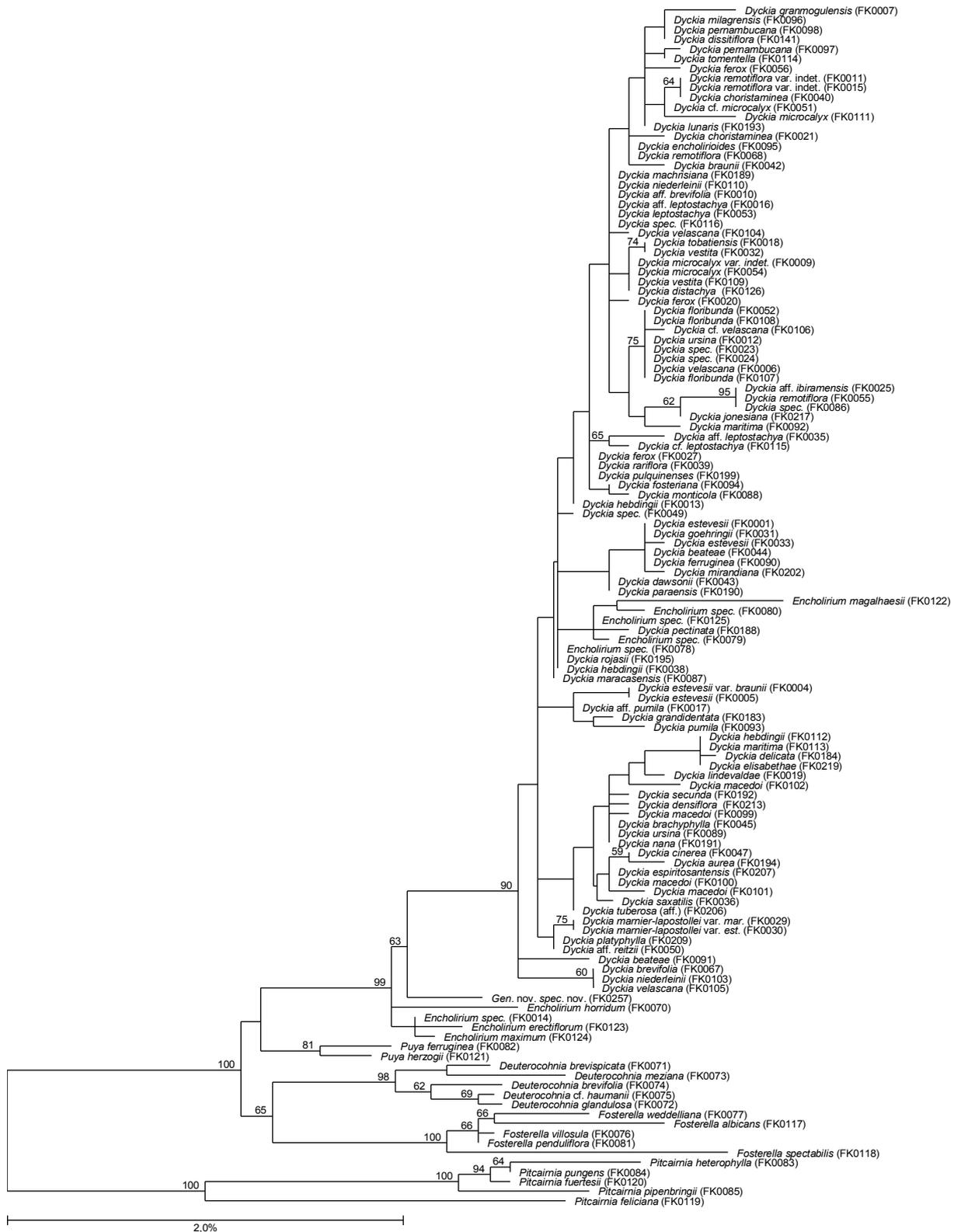
## Ergebnisse



**Abbildung 26: Einzelner Baum aus einer Parsimonieanalyse auf Basis von *phyc***

Gezeigt ist einer von 100.000 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 285 aus einer Parsimonieanalyse durchgeführt mit PAUP\* 4.0b. Die Astlängen entsprechen der Zahl evolutiver Schritte entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Ende der Abbildung.

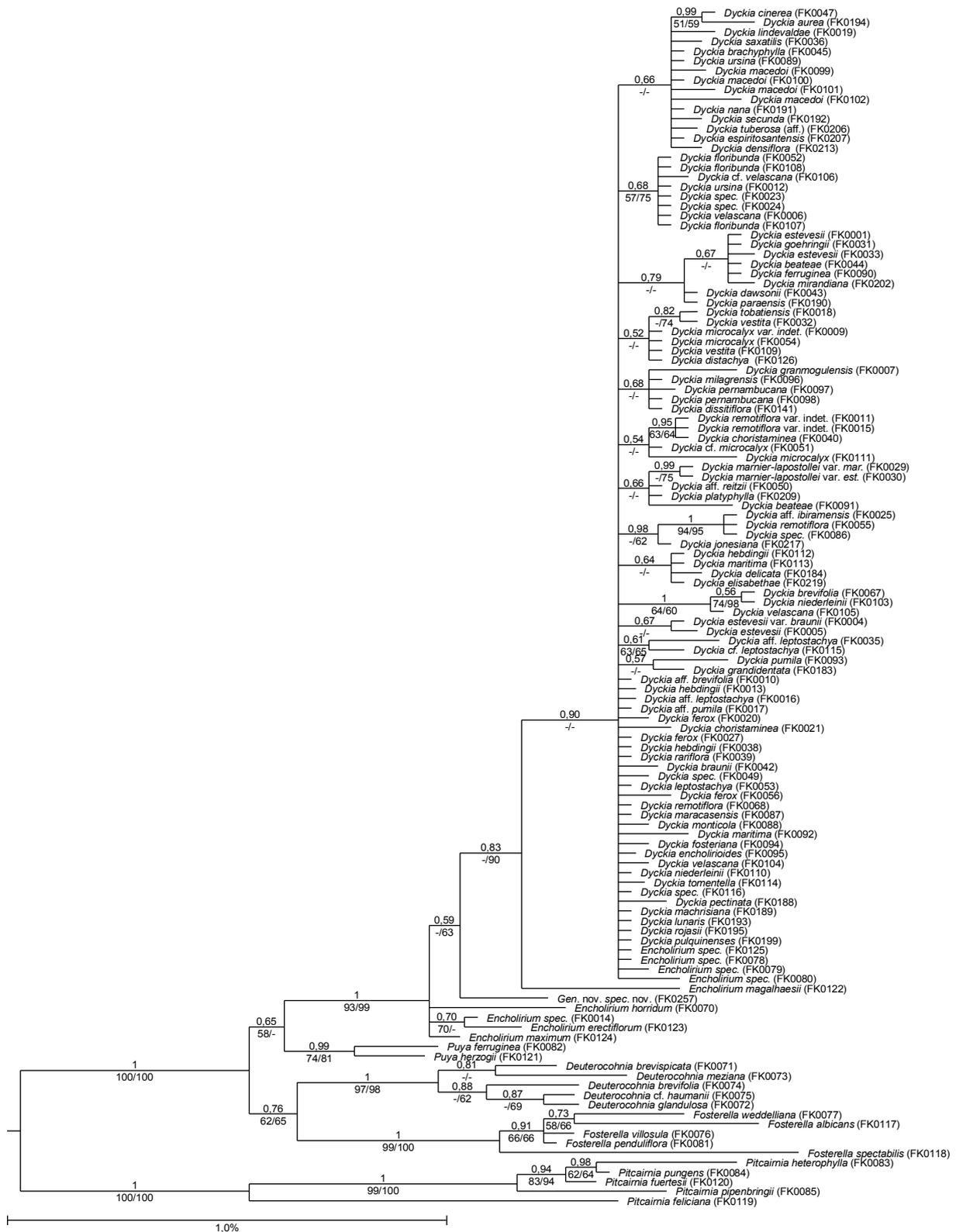
## Ergebnisse



**Abbildung 27: RAxML-Analyse auf Basis von *phyC***

Gezeigt ist der beste gefundene Baum aus einer Maximum Likelihood-Analyse durchgeführt mit RAxML 7.2.6 unter Verwendung des GTR-CAT-Substitutionsmodells. Über den Ästen finden sich Bootstrap-Werte aus 1.000 rapid bootstrap-Replikaten, Werte unter 50% sind nicht gezeigt. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand.

## Ergebnisse



**Abbildung 28: Bayes'sche Analyse auf Basis von *phyC***

Gezeigt ist der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1. Die Analyse wurde in zwei unabhängigen Läufen mit je 2.500.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posterioriwahrscheinlichkeiten aus dieser Analyse, unter den Ästen Bootstrap-Werte aus je 1.000 Wiederholungen einer Parsimonieanalyse und einer RAxML-Analyse des gleichen Datensatzes (Parsimonieanalyse/RAxML-Analyse). Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand.

## Ergebnisse

Innerhalb von *Dyckia* finden sich in allen Bäumen diverse Gruppierungen, jedoch gibt es zwischen den einzelnen Analysen teils gravierende Unterschiede bezüglich Auflösung und statistischer Unterstützung dieser Gruppen. Strenge Widersprüche zwischen den mit den verschiedenen Methoden erzeugten Bäumen gibt es aber nur wenige. Die geringste Auflösung zeigt der Strict-Konsensusbaum der Parsimonieanalyse (Anhang 12). Hier wurden innerhalb von *Dyckia* lediglich acht Verzweigungen gefunden, von denen wiederum nur vier Äste Bootstrap-Werte von über 50% aufweisen. Die Bayes'sche Analyse ergibt innerhalb von *Dyckia* 13 zumeist kleine Kladen, die mit allen übrigen Vertretern von *Dyckia* und einigen von *Encholirium* in einer großen unaufgelösten Polytomie stehen (Abbildung 28). Eine höhere Auflösung ergibt sich aus der RAxML-Analyse, jedoch liegen die Bootstrap-Werte der meisten Knoten unter 50% und keine der tieferen Verzweigungen ist durch die Bootstrap-Analyse gestützt (Abbildung 27).

### Topologische Unterschiede in der Neighbour Joining-Analyse

Die ebenfalls durchgeführte NJ-Analyse zeigt *Puya* als paraphyletisch (62% Bootstrap-Wert) außerhalb einer Klade aus *Fosterella*, *Deuterocohnia*, *Encholirium* und *Dyckia* (81% BS, Anhang 10 und Anhang 11). Das erwähnte Schwestergruppenverhältnis von *Fosterella* und *Deuterocohnia* tritt hier nicht auf. Die Gattungen *Encholirium* und *Dyckia* bilden wie in den anderen Analysen ein gemeinsames Monophylum (93% BS). *Encholirium* besteht aus drei paraphyletischen Linien, die jeweils durch schwach gestützte Äste voneinander getrennt sind (52% und 55% BS). Die vier *Encholirium*-Proben, die in den übrigen Analysen zu *Dyckia* gruppieren, stehen auch hier in einer gemeinsamen Klade mit den *Dyckia*-Proben.

### Indices und Einzelbäume aus der Parsimonieanalyse

Die Zahl der aus der Parsimonieanalyse resultierenden kürzesten Bäume musste künstlich auf 100.000 begrenzt werden, da die Analyse sonst zu keinem Ende kam. Für die gefundenen Bäume mit einer Schrittlänge von jeweils 299 wurden der Konsistenzindex (ensemble consistency index) mit  $CI=0,689$  und der Homoplasieindex entsprechend mit  $HI=0,311$  ermittelt. Für den Retentionsindex wurde ein Wert von  $RI=0,890$  und für den rescaled consistency index ein Wert von  $RC=0,613$  errechnet.

### Beobachtete Heterozygotie und Analysen mit reduziertem Datensatz

Es wurden mehrere Versuche unternommen, der Problematik des hohen Anteils von heterozygoten Alignmentpositionen zu begegnen. Einerseits wurden Positionen gelöscht, die in vielen Proben Heterozygotie aufwiesen. Andererseits wurden ganze Sequenzen solcher

## Ergebnisse

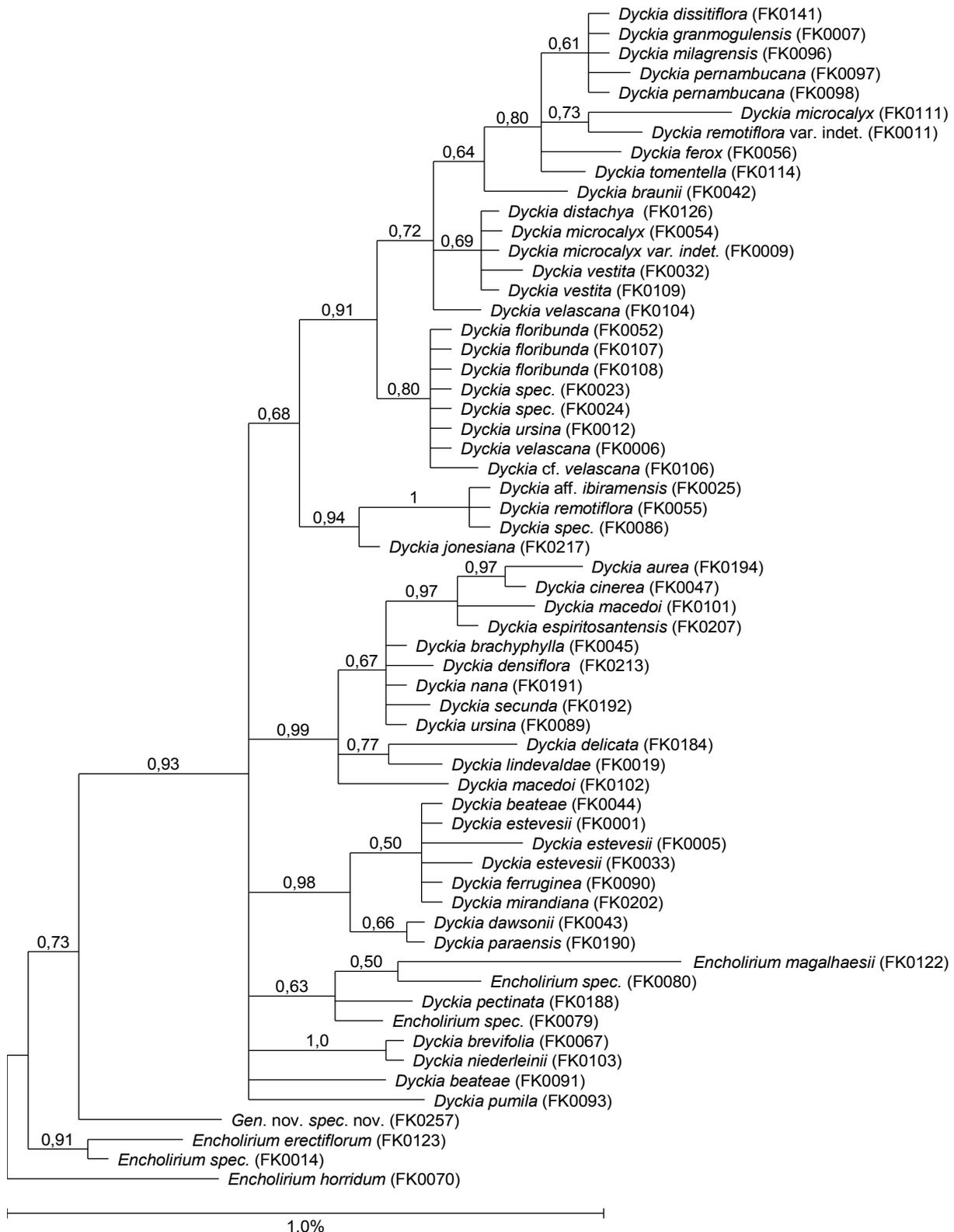
Akzessionen entfernt, die einen besonders hohen Anteil an heterozygoten Positionen aufwiesen.

Das Löschen von Alignmentpositionen, die in mehr als  $n_{\text{pos}}$  Sequenzen Unsicherheiten enthielten (mit  $n_{\text{pos}} = 0, 1, 2, 5, 10$ ), brachte keine Verbesserung der Auflösung oder statistischen Unterstützung. Selbst für hohe Werte von  $n_{\text{pos}}$ , was einer geringen Zahl gelöschter Positionen entspricht, sank die Auflösung in der Bayes'schen Analyse dagegen ab (keine Abbildung). Die vollständige Entfernung aller derjenigen Sequenzen, die an mehr als einer bestimmten Zahl  $n_{\text{seq}}$  heterozygote Positionen aufwiesen (mit  $n_{\text{seq}} = 0, 1, 3, 5, 7, 10$ ) wirkte sich dagegen positiv auf Auflösung und statistische Unterstützung aus. So resultierte die Entfernung der 26 Sequenzen mit dem größten Anteil heterozygoter Positionen ( $n_{\text{seq}} = 5$ ) in der Bayes'schen Analyse in zusätzliche Verzweigungen und generell erhöhten Posterioriwahrscheinlichkeiten (keine Abbildung). Eine zufällige Aufteilung überlagerter Sequenzen in Allele mit dem Programm SeqSplitter erwies sich als nicht praktikabel (vgl. 2.3.2). Aufgrund der teils stark heterozygoten Proben führte diese Methode bei unabhängigen Wiederholungen regelmäßig zu widersprüchlichen Topologien (keine Abbildungen).

Als optimaler Weg zur Erhöhung der mit *phyC* erzielbaren Auflösung erwies sich eine kombinierte Methode. Zunächst wurde der Datensatz auf 107 Akzessionen von *Dyckia* und *Encholirium* beschränkt, was die Gesamtzahl an Alignmentpositionen mit heterozygoten Proben erheblich reduzierte. In diesem Datensatz waren 28 vollständig homozygote Sequenzen enthalten sowie 25 Sequenzen, die an exakt einer Position einen heterozygoten Zustand aufwiesen. Innerhalb des verbliebenen Datensatzes wurden alle heterozygoten Positionen, die auf autapomorphe Merkmalsänderungen zurückzuführen waren, als nicht heterozygot gewertet (zur Erläuterung vgl. 2.3.2). Dies erlaubte die Einbeziehung sieben weiterer Proben. Auf diese Weise konnten insgesamt 60 Proben von *Dyckia* und *Encholirium* identifiziert werden, deren Sequenzen sich eindeutig in zwei Allele aufteilen ließen. Inklusive aller sequenzierter Außengruppentaxa entsprachen 70 Proben diesen Kriterien.

Die Bayes'sche Analyse des so modifizierten Datensatzes ausschließlich für *Dyckia* und *Encholirium* ist in Abbildung 29 gezeigt. Wie in der Analyse des kompletten Datensatzes ist *Encholirium* auch hier paraphyletisch. Drei *Encholirium*-Proben bilden die Schwestergruppe zu einer Klade aus der Akzession FK0257, den übrigen drei *Encholirium*-Proben und allen Akzessionen von *Dyckia* (Posterioriwahrscheinlichkeit von 0,73). Innerhalb dieser steht die als *Gen. nov. spec. nov.* bezeichnete FK0257 in Schwestergruppenposition zu einem

## Ergebnisse



**Abbildung 29: Bayes'sche Analyse auf Basis von *phyC* mit reduziertem Probenset**

Gezeigt ist der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1. Verwendet wurde ein reduziertes Set von *Dyckia*- und *Encholirium*-Sequenzen mit geringem Grad an Heterozygotie. Die Analyse wurde in zwei unabhängigen Läufen mit je 2.500.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posteriori-wahrscheinlichkeiten. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand.

## Ergebnisse

moderat gestützten Monophylum (Posterioriwahrscheinlichkeit von 0,93) aus allen verbleibenden Proben von *Encholirium* und *Dyckia*.

Aus der Analyse des reduzierten Probensets ergeben sich tiefere Verzweigungen und eine tendenziell bessere statistische Unterstützung im Vergleich zur Analyse des vollständigen Datensatzes. Eine komplette Auflösung wird jedoch nicht erreicht. Drei große Kladen von *Dyckia*, dazu eine kleinere Klade und zwei einzelne Pflanzen sowie eine von *Dyckia* und *Encholirium* gemeinsam gebildete Klade stehen in einer großen Polytomie. Infolge der gemeinsamen Gruppierung von *D. pectinata* mit einigen Vertretern von *Encholirium* wird *Dyckia* paraphyletisch, allerdings mit schlechter Unterstützung (Posterioriwahrscheinlichkeit von 0,63).

### 3.4 Plastidäre Mikrosatelliten (cpSSRs)

#### 3.4.1 Etablierung von cpSSR-Loci

Bereits aus der optischen Kontrolle der Alignments aller unter 2.2.3.1 angegebenen plastidären Loci ergaben sich insgesamt neun Bereiche mit variablen SSRs ausreichender Länge (Tabelle 10, markierte Loci in Abbildung 14). Bei einem der so identifizierten cpSSRs handelte es sich um einen zusammengesetzten Mikrosatelliten am Locus *atpB-rbcL* (DSSR-L01). Hier war ein Poly-A-Bereich durch ein einzelnes Cytosin oder Guanin von einem Poly-T-Bereich abgegrenzt (vgl. auch 3.2.1).

**Tabelle 10: Gefundene cpSSR-Loci und entwickelte Primer aus Alignments**

Basis für das Design der Primer war jeweils die Konsensussequenz aus acht *Dyckia*-Akzessionen (Testset TS2). Die Angabe des Motivs bezieht sich auf das zugehörige Alignment. Die Lage und die zugehörigen Positionen der Loci beziehen sich auf das Plastom von *Typha latifolia* (Guisinger et al. 2010) und wurden durch Alignments mit diesem ermittelt.

Locus	Lage ( <i>T. latifolia</i> )	Positionen ( <i>T. latifolia</i> )	Motiv	Primer-Name	Primer-Sequenz (5'-3')	Fragment- längen
DSSR-L01	<i>atpB-rbcL</i>	58112-58188	(T) <sub>9-13</sub> S(A) <sub>8-13</sub>	DSSR-L01_fwd DSSR-L01_rev	GTCAATTTTCAAGTTCAGCC TCACGATTTTCATCTACTTGC	70-77
DSSR-L02	<i>atpB-rbcL</i>	58275-58354	(T) <sub>11-16</sub>	DSSR-L02_fwd DSSR-L02_rev	TTATTTTCGATCTTATTGGCC AGGGTATAATATAAAGACGG	75-80
DSSR-L03	<i>atpF</i> -Intron	13435-13503	(A) <sub>11-14</sub>	DSSR-L03_fwd DSSR-L03_rev	ACAGAAAAGAGAGGGCAGGC TTTTTGTTATGGGTATTCCC	66-69
DSSR-L04	<i>ndhA</i> -Intron	126918-127011	(T) <sub>9-12</sub>	DSSR-L04_fwd DSSR-L04_rev	AAAGGATGAGATCAATTCCG AAGATACATCGGAAAGTCCC	91-94
DSSR-L05	<i>pefB</i> -Intron	80446-80554	(A) <sub>9-10</sub> ...(A) <sub>11-21</sub>	DSSR-L05_fwd DSSR-L05_rev	AGAGTAAATTTGCAGTACGC TATGTTGATCGTTACAGGCC	98-108
DSSR-L06	<i>trnK<sup>UUU</sup>-rps16</i>	4526-4602	(T) <sub>11-16</sub>	DSSR-L06_fwd DSSR-L06_rev	ATTGATTGAATAAACCGGGG TAAATAAGAAATTGGAATGG	72-77
DSSR-L07	<i>trnK<sup>UUU</sup>-rps16</i>	4719-4803	(A) <sub>10-18</sub>	DSSR-L07_fwd DSSR-L07_rev	AACTTCGAGTTAATTAAGG AGATACTAGTTACCCCTCCC	78-86
DSSR-L08	<i>ycf3</i> -Intron 1	46913-46982	(T) <sub>9-10</sub>	DSSR-L08_fwd DSSR-L08_rev	CCTATTACAGAGATGGTGCG TTTCTCGTAAGACTGAGGGC	69-70
DSSR-L09	<i>trnE<sup>UUC</sup>-trnT<sup>GGU</sup></i>	33645-33767	(T) <sub>11-16</sub>	DSSR-L09_fwd DSSR-L09_rev	AGATCCAAAAGTCTTTCCC ATTCAGGACCAAAAATGGG	118-123

## Ergebnisse

Weitere cpSSRs konnten durch 454-Sequenzierung einer Akzession der Art *Dyckia marnier-lapostollei* in Kooperation mit T. Wöhrmann (Universität Kassel) und Dr. B. Huettel (MPI für Züchtungsforschung Köln) ermittelt werden (vgl. 2.2.5.1). Die 454-Sequenzierung lieferte insgesamt 59.624 Einzelsequenzen. Der Abgleich des Plastoms von *Typha latifolia* gegen diesen Datensatz mittels des BLAST-Algorithmus (Altschul et al. 1997) identifizierte 3.826 (6,4%) der Sequenzen als plastidären Ursprungs. Die Assemblierung der plastidären Sequenzen lieferte 77 Contigs mit Längen zwischen 89 und 14.880 bp. Insgesamt 12 Fragmente blieben als Singletons übrig. Diese insgesamt 89 Sequenzen wiesen zusammen eine Länge von 139.839 bp auf. Bei einer Länge des Plastoms von *T. latifolia* von 161.572 bp entspricht dies einer Abdeckung von 86,55%, wenn die aus IR-Bereichen stammenden Sequenzen doppelt gezählt werden (vgl. 2.2.3.1).

Die Suche nach Mononukleotid-Repeats in diesem Datensatz resultierte in einer Gesamtzahl von 181 SSRs mit sieben oder mehr Einheiten. Eine Übersicht über deren Längenverteilung findet sich in Tabelle 11. Von den 30 gefundenen SSRs mit 10 oder mehr Nukleotiden Länge waren drei schon aus den mit Sanger-Sequenzierung gewonnenen Alignments bekannt (Tabelle 10). Zwei weitere befanden sich am unmittelbaren Anfang oder Ende der Sequenzen, flankierende Regionen fehlten. Für die 25 verbliebenen cpSSRs wurden flankierende Primerpaare entwickelt (Tabelle 12, markierte Loci in Abbildung 14).

**Tabelle 11: Gefundene SSRs im 454-Datensatz**

Gezeigt ist, wie viele Mononukleotid-Repeats (A- oder T-Motive) bestimmter Länge innerhalb des mittels 454-Pyrosequenzierung gewonnenen Datensatzes für *Dyckia marnier-lapostollei* gefunden wurden.

SSR-Länge	7 bp	8 bp	9 bp	10 bp	11 bp	12 bp	13 bp	14 bp	15 bp	16 bp	≥7 bp	≥ 10 bp
Anzahl	88	37	26	12	7	6	1	1	1	2	181	30

Die Amplifikationstests lieferten für 30 der 34 untersuchten Loci distinkte Einzelbanden für alle drei untersuchten Arten (Abbildung 30 und Tabelle 13). Neun Loci zeigten keine Längenvariabilität zwischen den drei Arten, in acht Fällen waren die Mononukleotid-Repeats in *D. dissitiflora* und *D. pernambucana* teils deutlich kürzer als in *D. marnier-lapostollei*. In einem Fall (DSSR-L05) waren die SSR-Bereiche insgesamt deutlich kürzer als erwartet. Die zehn Loci, die für alle Proben Amplifikate zeigten und gleichzeitig Längenpolymorphismen aufwiesen, wurden zur genaueren Charakterisierung weiter verwendet. Weitere zwei Loci waren zwar innerhalb der drei Arten zwar nicht variabel, wiesen aber vielversprechende absolute SSR-Längen auf und wurden daher ebenfalls als aussichtsreiche Kandidaten angesehen und weiter verwendet.

## Ergebnisse

**Tabelle 12: Gefundene cpSSR-Loci und entwickelte Primer aus 454-Daten**

Die Lage und die zugehörigen Positionen der Loci beziehen sich auf das Plastom von *Typha latifolia* (Guisinger et al. 2010) und wurden durch Alignments mit diesem ermittelt. Für weiter verwendete Loci wurde das Motiv durch Re-Sequenzierung verifiziert (\*). Der Locus DSSR-N22 liegt in den IR-Regionen des Plastoms, weshalb zwei Positionen angegeben sind.

Locus	Lage ( <i>T. latifolia</i> )	Positionen ( <i>T. latifolia</i> )	Motiv	Primer-Name	Primer-Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge
DSSR-N01	<i>rpoC1</i> -Intron	24007-24108	(T) <sub>14</sub> *	DSSR-N01_fwd DSSR-N01_rev	GTTCCCAGTAAGAACCAACC CTCAATAATTTTCACATTTCC	102
DSSR-N02	<i>psaA-ycf3</i>	45054-45150	(T) <sub>10</sub> N	DSSR-N02_fwd DSSR-N02_rev	TTTATTTGATTGATGGATCC GGTTGAAAATCAGCAAGCGC	97
DSSR-N03	<i>atpF</i> -Intron	13648-13745	N(T) <sub>12</sub> C(T) <sub>8</sub> Y(T) <sub>2</sub>	DSSR-N03_fwd DSSR-N03_rev	TATAATCAACNATGNTTTC CCAATGCCGAATCGACGACC	98
DSSR-N04	<i>clpP</i> -Intron 1	76254-76340	(T) <sub>11</sub> *	DSSR-N04_fwd DSSR-N04_rev	GAAATCAATGTGTCGATTCC TTTNAATAGAAAGAAGACCC	87
DSSR-N05	<i>clpP</i> -Intron 1	76345-76429	(A) <sub>12</sub> *	DSSR-N05_fwd DSSR-N05_rev	TGAGATGAGTTTTGGCTCCC AACATACATCAATGATAGG	85
DSSR-N06	<i>psbB-psbT</i>	79072-79134	(T) <sub>10</sub>	DSSR-N06_fwd DSSR-N06_rev	TTGTTGTGGTATCTTTCGCC CAAGATTTCTCTGATACCCG	63
DSSR-N07	<i>trnP<sup>UGG</sup>-psaJ</i>	71717-71790	(A) <sub>13</sub> *	DSSR-N07_fwd DSSR-N07_rev	ATTATATACATCTGAAACCC CTTCTCCTGAGCATTACGG	74
DSSR-N08	<i>rpl20-rps12</i>	74198-74261	(A) <sub>10</sub> N	DSSR-N08_fwd DSSR-N08_rev	GAAAATAAGAAATTAGAACC CCATAGAAACGATGGAACCC	64
DSSR-N09	<i>clpP</i> -Intron 2	75545-75624	TN(T) <sub>12</sub>	DSSR-N09_fwd DSSR-N09_rev	CAAAGTTTCTTTTGTATACG GCTATGTCAGAAAGAGTACG	80
DSSR-N10	<i>clpP</i> -Intron 2	75828-75906	(T) <sub>10</sub> *	DSSR-N10_fwd DSSR-N10_rev	TNAATCAATATGGCGAAGGC ATTCCTCAGCCTTGCGGCC	79
DSSR-N11	<i>ndhG-ndhI</i>	125148-125247	(A) <sub>18</sub> *	DSSR-N11_fwd DSSR-N11_rev	ATAGATAAAATATCGGGCC AAATTTAAACTACATATTC	100
DSSR-N12	<i>trnG<sup>GCC</sup></i> -Intron	10253-10317	N(T) <sub>10</sub>	DSSR-N12_fwd DSSR-N12_rev	CAACTTAAATAGTTAAGGGG GAAATAAAGTTTTTGTATCGG	65
DSSR-N13	<i>atpF</i> -Intron	13436-13507	(N) <sub>3</sub> (T) <sub>10</sub>	DSSR-N13_fwd DSSR-N13_rev	TTTTTGTATGGGTATTTCC ACAAACAGAAAAGAGAGGGC	72
DSSR-N14	<i>ndhK/ndhC</i>	53433-53515	N(T) <sub>10</sub>	DSSR-N14_fwd DSSR-N14_rev	CAATGTAATCTTTTCTTCC ATGCATGGCGAAAAGGAGCG	84
DSSR-N15	<i>rpl16</i> -Intron	87614-87677	(T) <sub>11</sub> *	DSSR-N15_fwd DSSR-N15_rev	CTTCCATTTATCCATATCCC AAAATAAATCTGATTATGGG	64
DSSR-N16	<i>rpl16-rps3</i>	87898-87987	(T) <sub>13</sub> *	DSSR-N16_fwd DSSR-N16_rev	TTATACCAATGATCAATCG ACTCTTTCATCTTTTTTCCG	90
DSSR-N17	<i>rps3-rpl22</i>	88679-88847	(T) <sub>12</sub>	DSSR-N17_fwd DSSR-N17_rev	GTGGATTTATTTTTGTCCC AGACCCCGGGCTCGAGGACG	169
DSSR-N18	<i>psbK-psbI</i>	8104-8166	(A) <sub>15</sub> *	DSSR-N18_fwd DSSR-N18_rev	AAATAGGTAATCTATTTCCC GTAAGCATTACACAATCTCC	63
DSSR-N19	<i>accD-psaI</i>	62553-62645	(T) <sub>10</sub> N	DSSR-N19_fwd DSSR-N19_rev	CAGTTATTTTATTTGTAGCG AAAGTGTAACCTATATCACC	93
DSSR-N20	<i>petA-psbJ</i>	67780-67879	(W) <sub>2</sub> (T) <sub>11</sub>	DSSR-N20_fwd DSSR-N20_rev	TCTTGTGTCGTCTTNGTATC AGGAGTTCCGATAGACCCGG	100
DSSR-N21	<i>rps11-rpl36</i>	84628-84688	(T) <sub>10</sub>	DSSR-N21_fwd DSSR-N21_rev	ATCCATTTCATGAGGATCCC GACTTTCTAAAATAAGTACC	61
DSSR-N22	<i>ycf2</i>	92144-92221 158484-158856	(T) <sub>10</sub>	DSSR-N22_fwd DSSR-N22_rev	TATAGAAAGAAGGAAGCCCC ATATTTCATATTAACAATCG	78
DSSR-N23	<i>trnM<sup>CAU</sup>-atpE</i>	55856-55960	(T) <sub>15</sub>	DSSR-N23_fwd DSSR-N23_rev	TTAGATACCATTGATTCCGG GACAGCATGTTTTGATTCCG	105
DSSR-N24	<i>atpB</i>	57242-57338	(T) <sub>11</sub>	DSSR-N24_fwd DSSR-N24_rev	ATTTGACCATAGACTAGAGC GGGAACGTACTCGTGAAGG	97
DSSR-N25	<i>petB</i> -Intron	80181-80240	(A) <sub>10</sub>	DSSR-N25_fwd DSSR-N25_rev	TATTCAGACCTCGCAACCCG CGTTTGATTTAGGAAATACC	60

## Ergebnisse

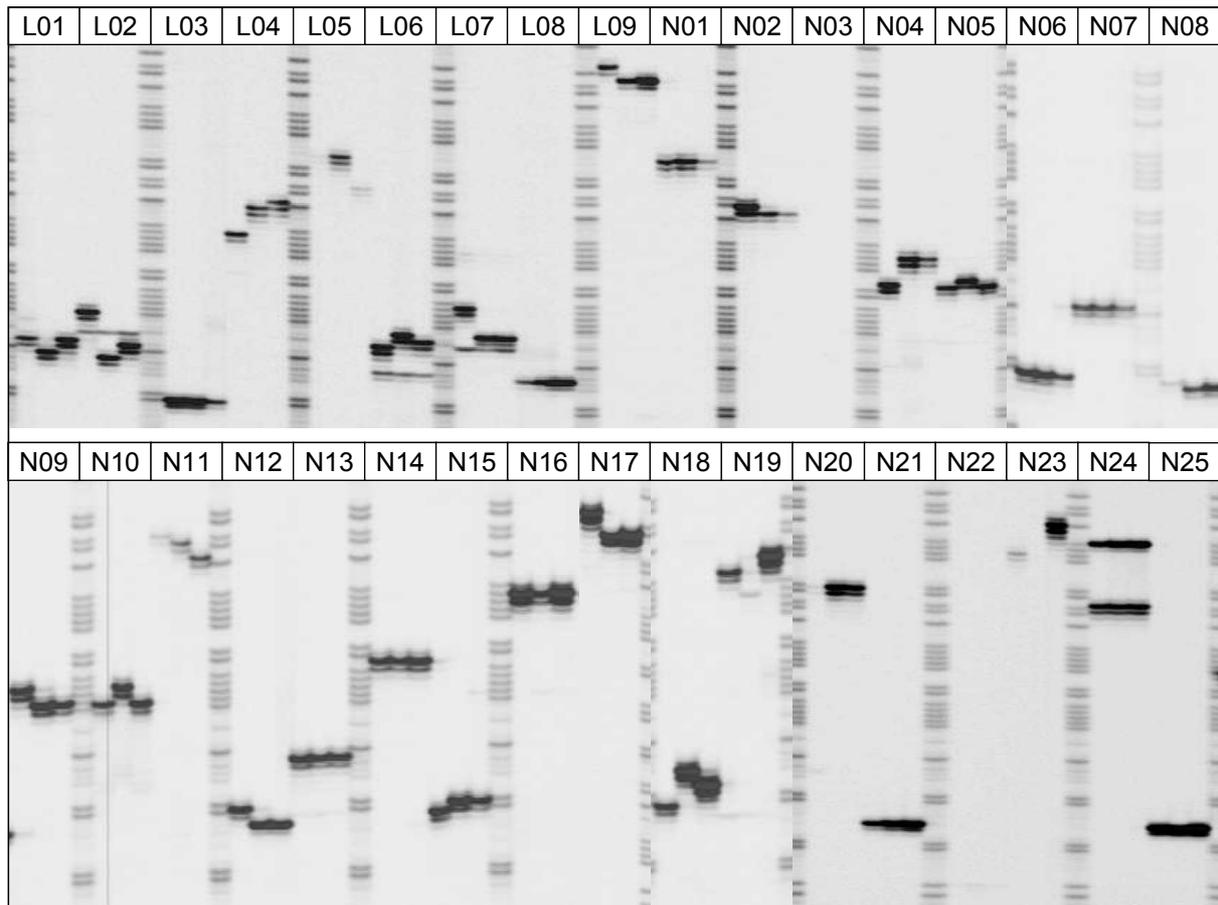
**Tabelle 13: Test aller entwickelter cpSSR-Primer auf Funktionalität und Variabilität**

Beobachtete Amplifizierbarkeit von cpSSR-Bereichen mittels spezifisch entwickelter flankierender Primer und Variabilität zwischen den drei Arten *Dyckia marnier-lapostollei* (FK0030), *D. dissitiflora* (FK0141) und *D. pernambucana* (FK0171). Legende: <sup>1</sup>: Die Länge des cpSSRs für *D. marnier-lapostollei* ist nicht bekannt, angegeben ist die Längenvariabilität innerhalb von acht Akzessionen des Testsets TS2 (vgl. 2.1). <sup>2</sup>: Die Länge des cpSSRs für *D. marnier-lapostollei* wurde aus dem 454-Datensatz entnommen, obwohl die Primer aus dem Alignment des Testsets TS2 entwickelt wurden. <sup>3</sup>: Die Länge des cpSSRs für *D. marnier-lapostollei* wurde durch klassische Sequenzierung ermittelt.

Locus Name	FK0030	FK0141	FK0171	Bemerkungen	charakterisiert
DSSR-L01	75	73	75		ja
DSSR-L02	76 <sup>2</sup>	69	71	deutlich kürzer in FK0141 und FK0171	-
DSSR-L03	66-69 <sup>1</sup>	±0	±0	monomorph zwischen drei Arten	-
DSSR-L04	94	98	99		ja
DSSR-L05	98-108 <sup>1</sup>	±0	-5	insgesamt kurze SSR-Längen	-
DSSR-L06	77	79	78		ja
DSSR-L07	78-86 <sup>1</sup>	-5	-5	deutlich kürzer in FK0141 und FK0171	-
DSSR-L08	69-70 <sup>1</sup>	±0	±0	monomorph zwischen drei Arten	-
DSSR-L09	119 <sup>3</sup>	117	117	kürzer in FK0141 und FK0171	-
DSSR-N01	102	102	102	monomorph zwischen drei Arten	ja
DSSR-N02	97	96	96	kürzer in FK0141 und FK0171	-
DSSR-N03	98	Ausfall	Ausfall	keine Amplifikate für FK0141 und FK0171	-
DSSR-N04	87	91	91		ja
DSSR-N05	85	86	85		ja
DSSR-N06	63	63	63	monomorph zwischen drei Arten	-
DSSR-N07	74	74	74	monomorph zwischen drei Arten	ja
DSSR-N08	64	63	63	kürzer in FK0141 und FK0171	-
DSSR-N09	80	78	78	kürzer in FK0141 und FK0171	-
DSSR-N10	79	81	79		ja
DSSR-N11	100	99	97		ja
DSSR-N12	65	63	63	kürzer in FK0141 und FK0171	-
DSSR-N13	72	72	72	monomorph zwischen drei Arten	-
DSSR-N14	83	83	83	monomorph zwischen drei Arten	-
DSSR-N15	64	65	65		ja
DSSR-N16	90	90	90		ja
DSSR-N17	169	166	166	kürzer in FK0141 und FK0171	-
DSSR-N18	63	68	66		ja
DSSR-N19	93	90	95	schwaches Amplifikat für FK0141	-
DSSR-N20	100	100	100	schwaches Amplifikat für FK0030	-
DSSR-N21	61	61	61	monomorph zwischen drei Arten	-
DSSR-N22	78	Ausfall	Ausfall	keine Amplifikate für FK0141 und FK0171	-
DSSR-N23	105	Ausfall	110	schwaches Amplifikat für FK0030, kein Amplifikat für FK0141	-
DSSR-N24	97	97	97	zwei Banden, jeweils monomorph	-
DSSR-N25	60	60	60	monomorph zwischen drei Arten	-

Die 12 ausgewählten Loci wurden für den gesamten unter 2.2.5.2 beschriebenen Probensatz analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengestellt, die Lage dieser Loci auf dem Plastom ist in Abbildung 14 durch rote Rechtecke gekennzeichnet. Innerhalb von *Dyckia* wurden bei 540 einzelnen Reaktionen lediglich sechs Ausfälle beobachtet. Von den 156 Reaktionen für Außengruppentaxa ergaben 29 kein Produkt. Innerhalb von *D. dissitiflora* waren sieben der 12 Loci monomorph. Drei Loci zeigten je zwei verschiedene Allele und zwei Loci jeweils drei verschiedene Allele. Für die vier Proben von *D. limae* waren neun Loci

## Ergebnisse



**Abbildung 30: Amplifikation von cpSSR-Loci für ein Set aus drei *Dyckia*-Arten**

Pro Locus ist jeweils das PCR-Produkt von *D. marnier-lapostollei* var. *estevesii* (FK0030), *D. dissitiflora* (FK0141) und *D. pernambucana* (FK0171) aufgetragen (von links nach rechts). Die Elektrophorese erfolgte auf Polyacrylamid-Sequenziergel. Als Längenstandard wurde hier abweichend von anderen Analysen die T-Sequenzierreaktion am Locus ccmp2 (Weising & Gardner 1999) von *Macaranga indistincta* verwendet (GenBank-Nummer: DQ358512).

monomorph und drei zeigten jeweils zwei verschiedene Allele. Innerhalb von *D. pernambucana* waren sechs Loci monomorph. Vier Loci zeigten je zwei verschiedene Allele und zwei Loci jeweils drei verschiedene Allele. Die Variabilität innerhalb aller 45 untersuchten *Dyckia*-Proben aus 19 Arten lag je nach Locus zwischen drei und 10 verschiedenen Allelen (Tabelle 14). Innerhalb der übrigen Pitcairnioideae lag die Erfolgsquote für *Encholirium* bei 96%, für *Deuterocohnia* bei 79%, für *Fosterella* bei 71% und für *Pitcairnia* bei 79%. Die Übertragbarkeit der cpSSR-Marker war auch für Mitglieder anderer Unterfamilien hoch. Für *Puya* lieferten 79% der Reaktionen ein Produkt, für *Ananas* 83%, für *Hechtia* 92% und für *Tillandsia* 75% (Tabelle 14 und Anhang 19).

Die Sequenzierung der PCR-Produkte aller 12 Loci für die Proben FK0030 (*D. marnier-lapostollei*) und FK0178 (*D. pernambucana*) verlief in allen Fällen erfolgreich und die Sequenzen waren gut auswertbar. Insbesondere die Länge der SSR-Bereiche ließ sich in allen Fällen eindeutig bestimmen. Durch Vergleich der so für *D. marnier-lapostollei* (FK0030)

## Ergebnisse

gewonnenen Sequenzen mit den 454-Daten ließen sich Rückschlüsse auf die Qualität letzterer ziehen. So wurde deutlich, dass die mittels der 454-Methode gewonnenen Sequenzen in Bereichen von Mononukleotid-Repeats häufig weniger Nukleotide aufwiesen als gemäß der Re-Sequenzierung tatsächlich vorhanden waren. Die Ergebnisse der Re-Sequenzierung wurden zur Eichung aller gewonnenen Daten verwendet, indem die für FK0178 sequenzierten Produkte auf allen Gelen als Referenz mit aufgetragen wurden. Die absoluten Fragmentlängen aller anderen Proben wurden dann durch Vergleich mit dieser Probe bestimmt. Für *D. marnier-lapostollei* (FK0030) wurden Sequenzen aller 12 Loci in der GenBank hinterlegt (GenBank-Nummern JQ743912-JQ743923).

**Tabelle 14: Eigenschaften 12 näher charakterisierter cpSSR-Loci**

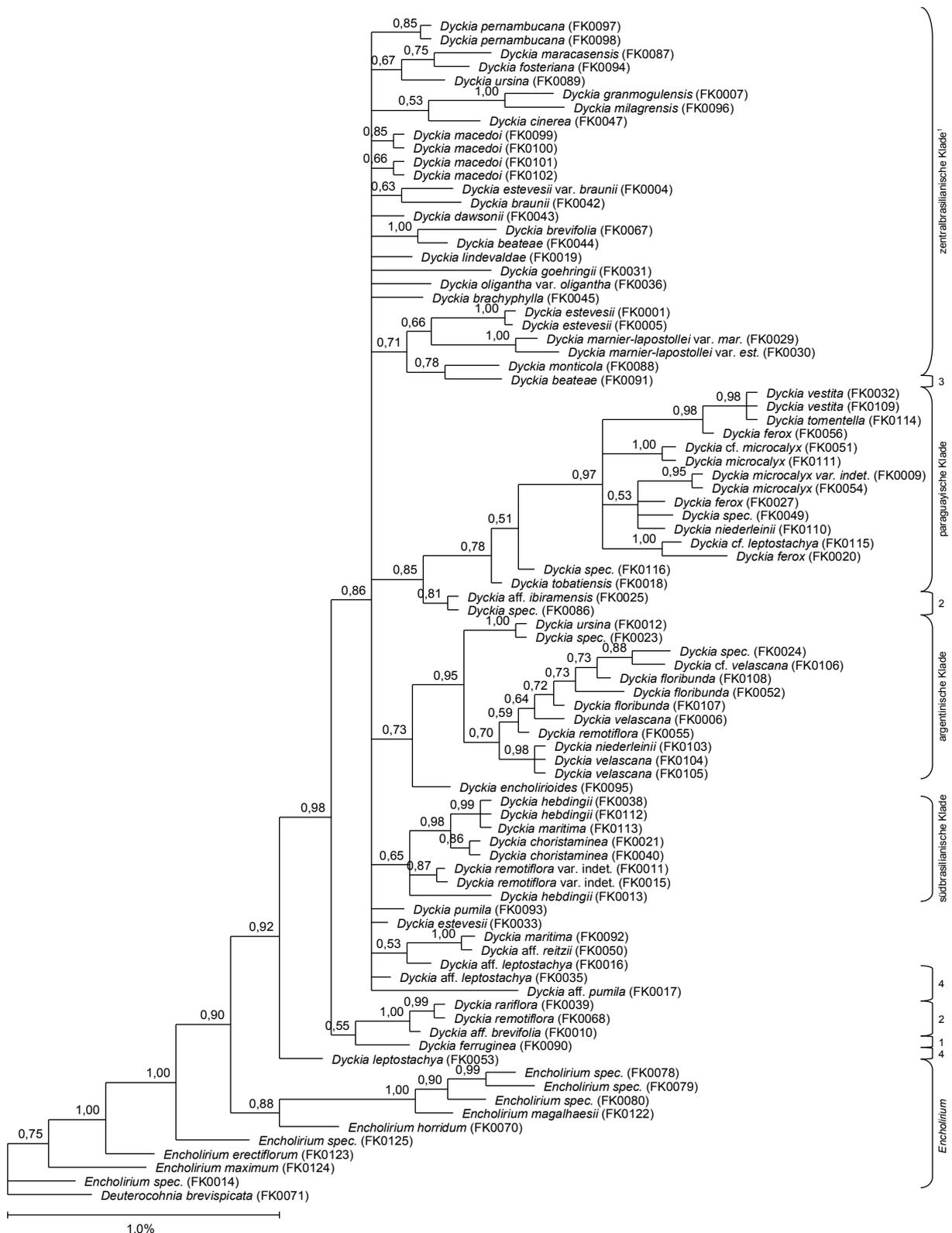
Angegeben sind jeweils die Zahl der gefundenen Allele und der Bereich beobachteter Längen. Für *D. dissitiflora* wurden drei Populationen mit je vier Individuen untersucht. Für *D. limae* wurde eine Population mit vier Individuen und von *D. pernambucana* drei Populationen mit je vier Individuen untersucht. Die Variabilität innerhalb von *Dyckia* bezieht sich auf alle 28 Proben von *D. dissitiflora*, *D. limae* und *D. pernambucana* zuzüglich 17 weiterer Akzessionen aus 16 verschiedenen Arten der Gattung, also insgesamt 19 Arten in 45 Akzessionen. Für weitere Gattungen der Unterfamilien Pitcairnioideae (*En: Encholirium*, *De: Deuterocohnia*, *Fo: Fosterella*, *Pi: Pitcairnia*), Puyoideae (*Pu: Puya*), Bromelioideae (*An: Ananas*), Hechtioideae (*He: Hechtia*) und Tillandsioideae (*Ti: Tillandsia*) wurde lediglich angegeben, ob aus der PCR für wenigstens eine Probe ein Fragment in der erwarteten Größenordnung resultierte.

	<i>D. dissitiflora</i>		<i>D. limae</i>		<i>D. pernambucana</i>		<i>Dyckia</i>		<i>En</i>	<i>De</i>	<i>Fo</i>	<i>Pi</i>	<i>Pu</i>	<i>An</i>	<i>He</i>	<i>Ti</i>
	Allele	Längen	Allele	Längen	Allele	Längen	Allele	Längen								
DSSR-L01	2	75, 76	2	76, 77	3	75, 76, 77	9	70-78	+	+	+	+	+	+	+	-
DSSR-L04	1	98	1	99	3	97, 98, 99	6	94-99	+	+	+	+	+	+	+	+
DSSR-L06	2	79, 80	1	78	1	78	8	73-82	+	+	+	+	+	+	+	+
DSSR-N01	1	102	1	102	1	102	8	98-109	+	+	+	+	+	+	+	+
DSSR-N04	1	91	1	91	2	91, 92	8	87-98	+	+	-	-	-	-	-	-
DSSR-N05	1	86	2	85, 86	2	85, 86	4	84-87	+	+	+	+	+	+	+	+
DSSR-N07	1	74	1	74	1	74	5	71-75	+	+	-	+	+	+	+	+
DSSR-N10	2	79, 81	1	79	1	79	3	79-81	+	+	+	+	+	+	+	+
DSSR-N11	3	96, 99, 100	1	98	2	97, 98	10	94-104	+	+	+	-	-	-	+	-
DSSR-N15	1	65	1	65	1	65	3	64-66	+	+	+	+	+	+	+	+
DSSR-N16	1	90	1	90	1	90	5	87-91	+	+	+	+	+	+	+	+
DSSR-N18	3	68, 72, 73	2	62, 66	2	66, 67	9	62-73	+	+	+	+	+	+	+	+

### 3.4.2 Anwendung ausgewählter cpSSRs für Verwandtschaftsanalysen

Die 12 etablierten cpSSR-Loci wurden für weitere Proben von *Dyckia* und *Encholirium* untersucht. Insgesamt ergab sich ein Satz von 77 Akzessionen von *Dyckia*, neun von *Encholirium* und einer *Deuterocohnia brevispicata*, für die sowohl Sequenzen sechs plastidärer Loci sowie Daten aller cpSSR-Loci vorlagen (vgl. Tabelle 1). Für diese 87 Proben wurden Bayes'sche Analysen sowohl des reinen cpSSR-Datensatzes (Abbildung 31), als auch des kombinierten Datensatzes aus Sequenzdaten und cpSSR-Daten durchgeführt (Abbildung 32). Für diesen Zweck wurden die Daten in die Form eines Alignments überführt

## Ergebnisse



**Abbildung 31: Bayes'sche Analyse auf Gattungsebene mit 12 cpSSR-Loci**

Gezeigt ist der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1. Die Analyse wurde in zwei unabhängigen Läufen mit je 1.000.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posteriori-wahrscheinlichkeiten. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand. Die Markierungen am rechten Bildrand entsprechen denen aus Abbildung 18. Nummern verweisen auf Gruppenzugehörigkeit (1: zentralbrasilianische Klade, 2: südbrasilianische Klade, 3: basale Linie, 4: zueinander gehörig).

## Ergebnisse



**Abbildung 32: Kombinierte Bayes'sche Analyse von cpSSR- und Sequenzdaten**

Untersucht wurden 12 cpSSR-Loci und die sechs sequenzierten plastidären Loci. Gezeigt ist der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1. Die Analyse wurde in zwei unabhängigen Läufen mit je 1.000.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posteriori-wahrscheinlichkeiten. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand. Die Markierungen am rechten Bildrand entsprechen denen aus Abbildung 18.

## Ergebnisse

wie in 2.3.1 beschrieben. Als Substitutionsmodell für die cpSSR-Daten kam jeweils GTR+I+G zum Einsatz, für die übrigen Loci jeweils das optimale gefundene Modell (vgl. 3.2.2). Der reine cpSSR-Datensatz wies 106 variable Merkmale auf, von denen 91 potentiell parsimonie-informativ waren. Der kombinierte Datensatz zeigte 262 variable Merkmale, von denen 157 parsimonie-informativ waren.

Die Analyse der reinen cpSSR-Daten (Abbildung 31) zeigt gewisse Übereinstimmungen mit den auf Basensubstitutionen beruhenden Bäumen (Abbildungen 18-21) insbesondere in abgeleiteten kleineren Kladen, aber auch gravierende Unterschiede. In allen Analysen ist *Dyckia* monophyletisch und *Encholirium* paraphyletisch. Die Reihenfolge, in der die einzelnen Linien von *Encholirium* zwischen *Deuterocohnia brevispicata* und *Dyckia* angeordnet sind, unterscheidet sich allerdings. Innerhalb der monophyletischen Gattung *Dyckia* (PP=0,92) zweigen zwei frühe Linien ab. Die sich zuerst abspaltende Linie wird von *D. leptostachya* (FK0053) gebildet, welche in den anderen Bäumen innerhalb einer kleinen Klade von *Core-Dyckia* steht. Eine weitere früh abzweigende Linie fasst vier Akzessionen zusammen, die sonst innerhalb der zentralbrasilianischen und der südbrasilianischen Klade stehen. Alle übrigen Akzessionen von *Dyckia* bilden ein gestütztes Monophylum (PP=0,86). Die in den auf Substitutionen beruhenden Bäumen außerhalb von *Core-Dyckia* stehende *D. beateae* (FK0091) steht hier in abgeleiteter Position gemeinsam mit einigen Vertretern der zentralbrasilianischen Klade. Weder die zentralbrasilianische noch die südbrasilianische Klade werden in der Analyse der reinen cpSSR-Daten gefunden. Die argentinische und die paraguayische Klade bleiben dagegen mit schwacher bis moderater statistischer Unterstützung (PP=0,95 und PP=0,78) erhalten.

Die Analyse des kombinierten Datensatzes weist keine wesentlichen Widersprüche zur Analyse der reinen Sequenzdaten auf, stellenweise unterscheiden sich aber Auflösung und statistische Unterstützung (Abbildung 33). *Dyckia beateae* (FK0091) steht wie in der Analyse der reinen Sequenzdaten in Schwestergruppenposition zum Monophylum von *Core-Dyckia* (PP=1). Hierin nehmen *D. aff. reitzii* (FK0050) und *D. maritima* (FK0092) eine Stellung als Schwestergruppe zu den übrigen Proben ein, was aber kaum gestützt ist (PP=0,53). Alle übrigen größeren Kladen innerhalb von *Core-Dyckia* sind identisch mit der Analyse der reinen Sequenzdaten.

Innerhalb der paraguayischen Klade finden sich keinerlei Widersprüche zwischen allen drei Analysen. Die Klade selbst und die meisten Verzweigungen werden in beiden Einzelanalysen gefunden, der kombinierte Datensatz liefert die beste Auflösung und Unterstützung. Die Topologie innerhalb der argentinischen Klade widerspricht sich teilweise

### Ergebnisse

zwischen den Analysen. Die kombinierte Analyse zeigt allerdings keine Widersprüche zur ausschließlich auf Sequenzdaten beruhenden Phylogenie.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodische Aspekte

#### 4.1.1 DNA-Isolation

Das Protokoll zur DNA-Isolation mit vorhergehenden Waschschritten nach Tel-Zur et al. (1999) war bereits in der vorausgegangenen Diplomarbeit optimiert und ausgiebig getestet worden (Krapp 2009). Die Qualität der mit dieser Methode isolierten DNA erwies sich auch in der vorliegenden Arbeit als durchgehend sehr hoch. So zeigte sich auf den Agarosegelen kaum niedermolekularer Schmier. Die deutet auf eine sehr effektive Verhinderung von Degradation durch DNasen hin, was in den vorgeschalteten Waschschritten begründet sein mag. Ferner zeigte sich nach dem Trocknen der DNA während der Isolation regelmäßig ein völlig hyalines Pellet, ein Indiz für besonders reine DNA. Nach der Lösung der DNA in TE-Puffer zeigte sich jeweils eine völlig klare Lösung. Somit scheint die Entfernung cytoplasmatischer Bestandteile und des Vakuoleninhalts vor der Lyse der Organellen sehr gut funktioniert zu haben. Aus sämtlichen DNA-Lösungen ließen sich alle für die phylogenetischen Studien verwendeten plastidären und nukleären Loci gut mittels PCR amplifizieren. Dies zeigt die konstante Qualität bezüglich der Menge an hochmolekularer DNA und der erfolgreichen Entfernung PCR-inhibitorischer Bestandteile des Pflanzengewebes.

Für die von Kooperationspartnern nach der klassischen CTAB-Methode nach Doyle & Doyle (1987) isolierte DNA zeigte die Mengenanalyse auf Agarosegelen stark variierende Konzentrationen. Einige Proben zeigten gar keine detektierbaren Mengen an DNA. Der Anteil an degradierter DNA, der als Schmier im niedermolekularen Bereich sichtbar wurde, war in vielen Fällen recht hoch. Die PCR für plastidäre Loci funktionierte für die meisten dieser Proben gleichwohl recht gut. Dagegen erwies sich die Amplifikation des nukleären Locus *phyC* teilweise als schwierig. Ein Einfluss inhibitorischer Stoffe erscheint hier eher unwahrscheinlich, da auch die Verdünnung der Templat-DNA in der PCR keine Verbesserung brachte. Eine Erhöhung der eingesetzten Templatmenge hingegen verbesserte die Ergebnisse für die meisten Proben in ausreichendem Maße. In einigen Fällen gelang die Amplifikation von *phyC* jedoch nur für die beiden Teilabschnitte a und b, das Gesamtfragment war nicht zu gewinnen. Dies könnte in einer zu geringen Konzentration an Templat-DNA oder einem Mangel an ausreichend hochmolekularen DNA-Fragmenten begründet sein.

## Diskussion

Im direkten Vergleich damit zeigt die Variante der CTAB-Methode mit vorgeschalteten Waschschritten nach Tel-Zur et al. (1999) die eindeutig besseren Ergebnisse. Während die DNA-Ausbeute in der gleichen Größenordnung liegt wie bei der Anwendung der klassischen CTAB-Methode für andere Bromelienarten (z. B. Wagner 2007), ist die DNA deutlich weniger degradiert und zeigt keine auf Kontaminationen hindeutende Verfärbung. Die Amplifikation insbesondere nukleärer Loci wie *phyC* erfordert eine solche hohe DNA-Qualität, was den hohen Aufwand der verwendeten Methode rechtfertigt und nötig macht.

### 4.1.2 Charakterisierung verschiedener plastidärer Loci

#### *rpl32-trnL*

Die in dieser Arbeit mit 12,4% beobachtete Variabilität über den gesamten Probensatz inklusive Außengruppen hinweg deckt sich in etwa mit den Erwartungen für die Familie der Bromeliaceae, die ja generell für eine geringe Variabilität im Plastom bekannt ist (Givnish et al. 2011). Die Akzessionen von *Dyckia* zeigen mit 2,6% aber nur wenige Sequenzunterschiede. In einem anderen Verwandtschaftskreis (Cistaceae) wurde ein vergleichbar niedriger Wert von 2,2% bereits innerhalb einer einzelnen Art, *Cistus creticus*, gefunden (Falchi et al. 2009). Innerhalb von drei auf Hawaii endemischen Arten der Gattung *Plantago* (Plantaginaceae) ermittelten Dunbar-Co et al. (2008) sogar eine beachtliche Variabilität von 8,4%. Unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Loci zeigt *rpl32-trnL* gleichwohl die zweithöchste Variabilität. Zwar ist der methodische Aufwand infolge der Notwendigkeit einer Sequenzierung in zwei Teilstücken sehr hoch, dennoch liefert der Locus einen wertvollen Beitrag zum gesamten Datensatz.

#### *rps16-trnK*

Der Locus *rps16-trnK* wurde bisher selten in phylogenetischen Studien eingesetzt, obwohl Shaw et al. (2007) ihn als überdurchschnittlich variabel diagnostizierten. Die Sequenzierung in drei Teilstücken stellt einen erheblichen methodischen Aufwand dar, ist aber aufgrund der zwei teils sehr langen und für die Sequenzierung problematischen SSR-Bereiche erforderlich. Der Aufwand erscheint dadurch gerechtfertigt, dass *rps16-trnK* unter den getesteten plastidären Loci die mit Abstand höchste für *Dyckia* beobachtete Variabilität von 3,7% aufweist und einen großen Teil der aus dem gesamten Datensatz resultierenden Auflösung beisteuert.

#### *matK* Teil a

Schulte et al. (2009) ermittelten für *matK* eine Variabilität von 7,5% innerhalb von 48 Taxa der Bromelioideae. Dieser Wert ist durchaus mit dem hier für die Pitcairnioideae und *Puya*

## Diskussion

beobachteten Wert von 9,2% vergleichbar. Die Variabilität innerhalb von *Dyckia* liegt mit 2,0% im Vergleich mit den übrigen hier untersuchten Loci im Mittelfeld. Verglichen mit anderen Pflanzengruppen ist *Dyckia* aber auch hier sehr merkmalsarm. So fanden Müller & Borsch (2005) innerhalb der Gattung *Utricularia* (Lentibulariaceae) eine Variation von 10,5%. Der Locus *matK* ist einfach zu amplifizieren und die Sequenzqualität ist durchweg hoch. Zwar ist die ausschließlich mit diesem Locus erzielte Auflösung gering, dennoch steuert *matK* wertvolle Merkmale zum gesamten Datensatz bei.

### rps16-Intron

Für 122 Proben aus drei Unterfamilien der Bromeliaceae beobachteten Barfuss et al. (2005) eine Variabilität innerhalb des *rps16*-Introns von 20,5%. Berücksichtigt man die größere taxonomische Spannweite in der Arbeit von Barfuss et al. (2005), so ist dies durchaus mit dem hier für die Pitcairnioideae und *Puya* ermittelten Wert von 9,4% vergleichbar. Watts et al. (2008) ermittelten im Vergleich von sechs Arten der Gattung *Chusquea* (Poaceae) eine Variabilität von 3,8% für die als besonders variabel geltende Domäne IV dieses Introns. Innerhalb von *Dyckia* zeigt sich mit 2,0% lediglich knapp die Hälfte dieses Wertes. Unter den verwendeten Loci liegt das *rps16*-Intron damit im Mittelfeld, liefert aber wichtige Merkmale insbesondere zur Identifikation kleinerer Kladen innerhalb von *Dyckia*.

### petD-Intron

Das *petD*-Intron wurde von Watts et al. (2008) als weniger variabel im Vergleich zu anderen Klasse II-Introns des Plastoms beschrieben. Zwischen sechs Arten der Gattung *Chusquea* (Poaceae) zeigte sich bei Watts et al. (2008) eine Variabilität von lediglich 1,2%. Bei den Vortests in *Dyckia* erwies sich der Locus aber als durchschnittlich variabel und technisch sehr einfach handhabbar. Die Variabilität des *petD*-Introns ist innerhalb von *Dyckia* mit nur 0,9% allerdings geringer als in allen anderen verwendeten Loci. Nichtsdestotrotz stützen die Sequenzdaten dieses Locus einige Kladen. Mit 9,6% Variabilität im gesamten Probensatz liefert das *petD*-Intron auch wichtige Merkmale für Beziehungen zu den Außengruppen. Auch die einfache Amplifikation und hohe Sequenzqualität rechtfertigen die Verwendung.

### trnD-trnT

Für den Locus *trnD-trnT* wurde von Watts et al. (2008) eine Variabilität von 4,0% zwischen sechs Arten der Gattung *Chusquea* (Poaceae) gefunden. Auch Shaw et al. (2007) beschrieben den Locus als überdurchschnittlich variabel. Innerhalb von *Dyckia* ist die Variabilität mit 1,1% aber sehr gering. Auch für den gesamten Probensatz zeigt sich mit 8,3% ein besonders geringer Wert. Relativiert werden diese Werte aber durch die große

## Diskussion

Länge des Alignments, die aus großen Insertionen in Sequenzen von Außengruppentaxa resultiert. Betrachtet man die absolute Zahl an Substitutionen, so ist *trnD-trnT* durchaus vergleichbar mit *matK*.

### Eignung der ausgewählten Loci

Die Sequenzvariabilität der Plastome innerhalb der Gattung *Dyckia* ist offenbar generell sehr gering. So wurden vergleichbare Werte für andere Pflanzengruppen teilweise schon innerhalb einzelner Arten gefunden. Innerhalb von Gattungen anderer Pflanzenfamilien wurden häufig vielfach höhere Werte beobachtet. Innerhalb der Bromeliaceae ist die Variabilität des Plastoms zwar ohnehin bekanntermaßen gering (z. B. Givnish et al. 2011), doch *Dyckia* scheint selbst für diese Verhältnisse ein ausgesprochen uniformes Plastom zu besitzen.

Unter den hier untersuchten Bereichen des Plastoms erwiesen sich die sechs letztlich ausgewählten Loci als vergleichsweise vielversprechend. Allerdings reicht auch die in den über 6.000 bp Alignment-Länge enthaltene Information noch nicht aus, um eine bis ins Detail aufgelöste Phylogenie von *Dyckia* zu rekonstruieren. Eine vergleichbare Datenmenge lieferte für die gleichfalls zu den Pitcairnioideae zählenden Gattung *Fosterella* sehr viel besser aufgelöste Bäume (Rex et al. 2009; Wagner et al. 2012). Für eine deutliche Erhöhung der Auflösung wäre entweder die intensive Suche nach weiteren besonders variablen Loci oder die vergleichende Sequenzierung kompletter Plastome nötig. Ob sich dieser enorme Aufwand aber lohnen würde, bleibt fraglich.

### **4.1.3 Phytochrom C (*phyC*)**

Der Locus *phyC* wurde bereits bei einer breiten Palette von Pflanzenarten sequenziert, unter anderem auch bei Bromelien. Jabaily & Sytsma (2010) sequenzierten das Exon 1 von *phyC* für ein Probenet aus Puyoideae, Bromelioideae, Pitcairnioideae und einer *Hechtia* und beobachteten eine Variabilität von 17,0%. Innerhalb von *Puya* alleine zeigte sich ein Wert von 5,6%. Innerhalb der 75 von Jabaily & Sytsma (2010) untersuchten Proben wiesen 24 Sequenzen allelische Variation auf. Diese enthielten dann jeweils 1-15 heterozygote Positionen (durchschnittlich 3,5) pro Sequenz.

Edwards et al. (2005) ermittelten innerhalb von 34 Vertretern der Cactaceae eine Variabilität von 35,3% im Exon 1 von *phyC*. Die PCR-Produkte wurden für diese Arbeit vor der Sequenzierung kloniert und die allelische Variation wurde als gering angegeben. Innerhalb von 91 Akzessionen der Gattungen *Macaranga* und *Mallotus* sowie einiger weiterer Euphorbiaceae fanden Kulju et al. (2007) für ein kürzeres Stück des Exons 1 von *phyC* einen

## Diskussion

Anteil parsimonie-informativer Merkmale von 18,5%. Die allelische Variation innerhalb einzelner Sequenzen, sofern vorhanden, betrug bis zu 14 Positionen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit 16,3% Variabilität für den gesamten Probensatz und 5,7% innerhalb von *Dyckia* beinahe identische Werte wie bei Jabaily & Sytsma (2010) für *Puya* ermittelt. Innerhalb von *Dyckia* wiesen 74% der Sequenzen zwischen einer und 21 heterozygote Positionen auf (durchschnittlich 3,9). Auf den gesamten Probensatz bezogen zeigten 72% der Sequenzen durchschnittlich 4,2 heterozygote Positionen. Somit scheint der Umfang heterozygoter Positionen pro Sequenz zwischen Gattungen und Unterfamilien der Bromeliaceae vergleichbar zu sein. Auch für die Euphorbiaceae wurden vergleichbare Werte gefunden. Der Anteil völlig homozygoter Proben ist aber für *Dyckia* und andere Pitcairnioideae offenbar sehr viel geringer als beispielsweise für *Puya*.

Für das Exon 1 des nukleären Gens *phyC* konnten letztlich für alle untersuchten Proben gute Sequenzdaten produziert werden. Als besonders günstig erwies sich der Umstand, dass auf die Klonierung der PCR-Produkte verzichtet werden konnte. Die teilweise schwierige Amplifikation, die hohen Ansprüche an die Qualität der Templat-DNA und die nötige besonders sorgfältige Editierung machen Untersuchungen dieses Locus dennoch sehr aufwändig. Bedauerlicherweise wurde trotz der hohen Sequenzvariabilität nur eine recht geringe Auflösung der Phylogenien beobachtet, insbesondere innerhalb der Gattung *Dyckia* selbst. Bisher wurde aber noch kein nukleärer Locus identifiziert, der für *Dyckia* besser geeignet wäre. Zwar konnte Klein (2012) im Rahmen einer Diplomarbeit zeigen, dass die Loci *g3pdh* (kodierend für Glyceraldehyd-3-Phosphodehydrogenase) und *rpb2* (kodierend für die große Untereinheit der RNA-Polymerase II) für *Dyckia* prinzipiell verwendbar sind, die bisher erzielte Auflösung ist jedoch für beide Loci noch geringer als bei *phyC*.

### 4.1.4 Verwendete Methoden zur Datenanalyse

#### Alignment und Behandlung von Indels

Das Alignment der plastidären Sequenzen war in fast allen Fällen zweifelsfrei möglich. In sehr wenigen Fällen gab es mehr als eine Möglichkeit, einzelne Bereiche unter Annahme eines Minimums zur Erklärung nötiger evolutiver Schritte zu alignieren. Zumeist fanden sich solche Probleme bei Substitutionen innerhalb von SSR-Bereichen, welche ohnehin nicht in die Analysen einbezogen wurden. Eine Veränderung der erzielten phylogenetischen Bäume durch abweichendes Alignment einzelner Bereiche kann aber faktisch ausgeschlossen werden. Für den Locus *phyC* wurden keinerlei Indels beobachtet, was das Alignment ohnehin eindeutig macht.

## Diskussion

Indels und SSRs wurden in allen Analysen generell nicht berücksichtigt. Innerhalb von *Dyckia* fanden sich ohnehin nur fünf potentiell informative Indels. Eine versuchsweise durchgeführte Bayes'sche Analyse unter Berücksichtigung dieser Bereiche durch Kodierung zeigte keine zusätzliche Auflösung (keine Abbildung). Bei der Verwertung von cpSSRs als potentiell phylogenetisch informative Merkmale tritt das Problem eines erhöhten Risikos von Homoplasie auf (vgl. 4.1.5). Daher wurde auch hier von einer Kodierung abgesehen.

### Vergleich verschiedener Algorithmen zur Phylogenierekonstruktion

Die mit verschiedenen Analysemethoden aus dem Datensatz plastidärer Sequenzen erstellten phylogenetischen Bäume und Netzwerke enthalten keine wesentlichen Widersprüche in der Topologie (vgl. 3.2.2). Hinsichtlich der Auflösung zeigen sich leichte Unterschiede. Die Darstellung als Netzwerk ist für *Dyckia* besonders vorteilhaft, da erfolgte Radiationen hier als sternförmige Verzweigungsmuster erkennbar sind.

Bei der Analyse des Datensatzes von nukleären *phyC*-Sequenzen zeigte sich hingegen eine Reihe an Unterschieden in der Topologie von Bäumen, die nach unterschiedlichen Algorithmen berechnet wurden. Insbesondere die Parsimonieanalyse scheint für einen Datensatz mit vielen heterozygoten Positionen nicht gut geeignet zu sein. Die einzelnen gefundenen Bäume widersprechen sich insbesondere bei den Verzweigungen innerhalb von *Dyckia*. Dies äußert sich in einer extrem schlechten Auflösung des Konsensusbaumes. Auch in der schnellen Bootstrap-Analyse mit RAxML zeigen sich starke Unterschiede zwischen den einzelnen gefundenen Bäumen. Dies resultiert in einer äußerst geringen Zahl an gestützten Knoten des besten in der RAxML-Analyse gefundenen Baumes, der eine moderate Auflösung zeigt. Als guter Kompromiss kann der aus der Bayes'schen Analyse gewonnene Baum gesehen werden, da hier Knoten ohne Unterstützung nicht enthalten sind.

### Qualität der absoluten Datierung

Die Datierung ultrametrischer molekularer Bäume erfordert neben der mit Unsicherheiten belasteten Abschätzung der Evolutionsraten auch eine Kalibrierung etwa mittels eindeutig zuordenbarer Fossilien. Eine solche Kalibrierung und damit absolute Datierung von phylogenetischen Bäumen der Bromeliaceae ist nicht ohne weiteres möglich, da es innerhalb der Familie an Fossilien mangelt. Ein auf etwa 36 Millionen Jahre vor heute datiertes Fossil aus Costa Rica steht wohl außerhalb der Kronengruppe der Bromeliaceae, was eine Nutzung zur Kalibrierung ausschließt (Smith & Till 1998; Givnish et al. 2011). Somit ist eine indirekte Kalibrierung über Fossilien aus anderen Familien der monokotylen Pflanzen derzeit die einzige Option. Givnish et al. (2011) ermittelten auf diese Weise ein Alter der

## Diskussion

Stammgruppe der Bromeliaceae von etwa 100 Millionen Jahren und der Kronengruppe von etwa 19 Millionen Jahren.

Das mit der Methode von Givnish et al. (2011) ermittelte relativ geringe Alter der Kronengruppe im Vergleich zur Stammgruppe lässt den Ansatz der indirekten Datierung bei Bromeliaceae zunächst als höchst unzuverlässig erscheinen. Interessanterweise findet sich aber eine Reihe an gut datierbaren geologischen Ereignissen, deren vermutliche klimatische Folgen mit der ermittelten Phylogenie der Bromeliaceae in Verbindung zu bringen sind (vgl. 4.3.2). Möglicherweise noch aussagekräftiger ist der Vergleich mit datierten Phylogenien anderer Organismen. Zeitlich sehr gut korreliert ist die zweifache unabhängige Entstehung von Blatttrichtern mit zwei Diversifizierungswellen darin lebender endemischer Schwimmkäfer (Balke et al. 2008; Givnish et al. 2011). Weitere Untersuchungen an verschiedenen tierischen und pflanzlichen Organismen geben unabhängige Hinweise auf den zeitlichen Rahmen der Entstehung von Cerrado und Mata Atlântica in Brasilien, die sich ebenfalls grob mit den von Givnish et al. (2011) angegebenen Daten decken (Berry et al. 2004; Almeida et al. 2007; Elias et al. 2009; Maraví 2010; Roncal et al. 2011). Insgesamt ist es als wahrscheinlich anzunehmen, dass die von Givnish et al. (2011) vorgenommene Datierung recht gut mit den tatsächlichen Werten übereinstimmt. Zumindest gravierende Abweichungen können wohl weitgehend ausgeschlossen werden. Demnach kann auch die für die vorliegende Arbeit durchgeführte Datierung als recht zuverlässig gelten.

### 4.1.5 Plastidäre Mikrosatelliten (cpSSRs)

#### Etablierung von cpSSR-Loci

Die verwendete Methode zur Identifikation plastidärer SSRs mittels 454-Sequenzierung erwies sich als zuverlässig und effizient. Da das primäre Ziel bei der 454-Sequenzierung die Entwicklung nukleärer SSRs war, wurde das Verfahren nicht auf die Gewinnung plastidärer DNA hin optimiert. Durch Anreicherung von Plastiden vor der DNA-Isolation könnte der Anteil an Sequenzen plastidären Ursprungs im gesamten Datensatz stark erhöht werden. Naheliegender wäre beispielsweise die Isolation von Plastiden mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, welche häufig zu diesem Zweck angewendet wird (z. B. Guisinger et al. 2010).

Innerhalb der durch 454-Sequenzierung gewonnenen Daten fanden sich 30 cpSSRs mit 10 oder mehr Wiederholungen in etwa 87% des Plastoms. Somit ist für das gesamte Plastom eine Zahl von etwa 35 cpSSRs anzunehmen. Dieser Wert deckt sich mit Zahlen solcher Mikrosatelliten in Plastomen anderer monokotyle Pflanzenfamilien, welche zwischen sechs und 51 betragen (Ebert & Peakall 2009).

## Diskussion

Aufgrund der überschaubaren Zahl an identifizierten SSRs ausreichender Länge erwies sich das Design flankierender Primer von Hand als praktikable Methode. Die Primer wurden jeweils so gewählt, dass sie einen möglichst hohen GC-Gehalt aufwiesen. Bei einer Länge von jeweils 20 bp resultierte dies in generell hohen theoretischen Schmelz- und Annealingtemperaturen. Für jedes der entwickelten Primerpaare konnte dasselbe PCR-Programm mit einheitlicher Annealingtemperatur verwendet werden, was einen großen methodischen Vorteil darstellte. Eine Optimierung der PCR-Bedingungen war nicht erforderlich, es traten keine unspezifischen Zusatzbanden auf. Der hohe Anteil an funktionierenden Primerpaaren (88%) und die offensichtlich hohe Spezifität zeigen, dass die manuelle Erstellung von Primern durchaus erfolgreich ist und der Einsatz von spezieller Software wie etwa Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000) zumindest für plastidäre DNA nicht unbedingt notwendig ist.

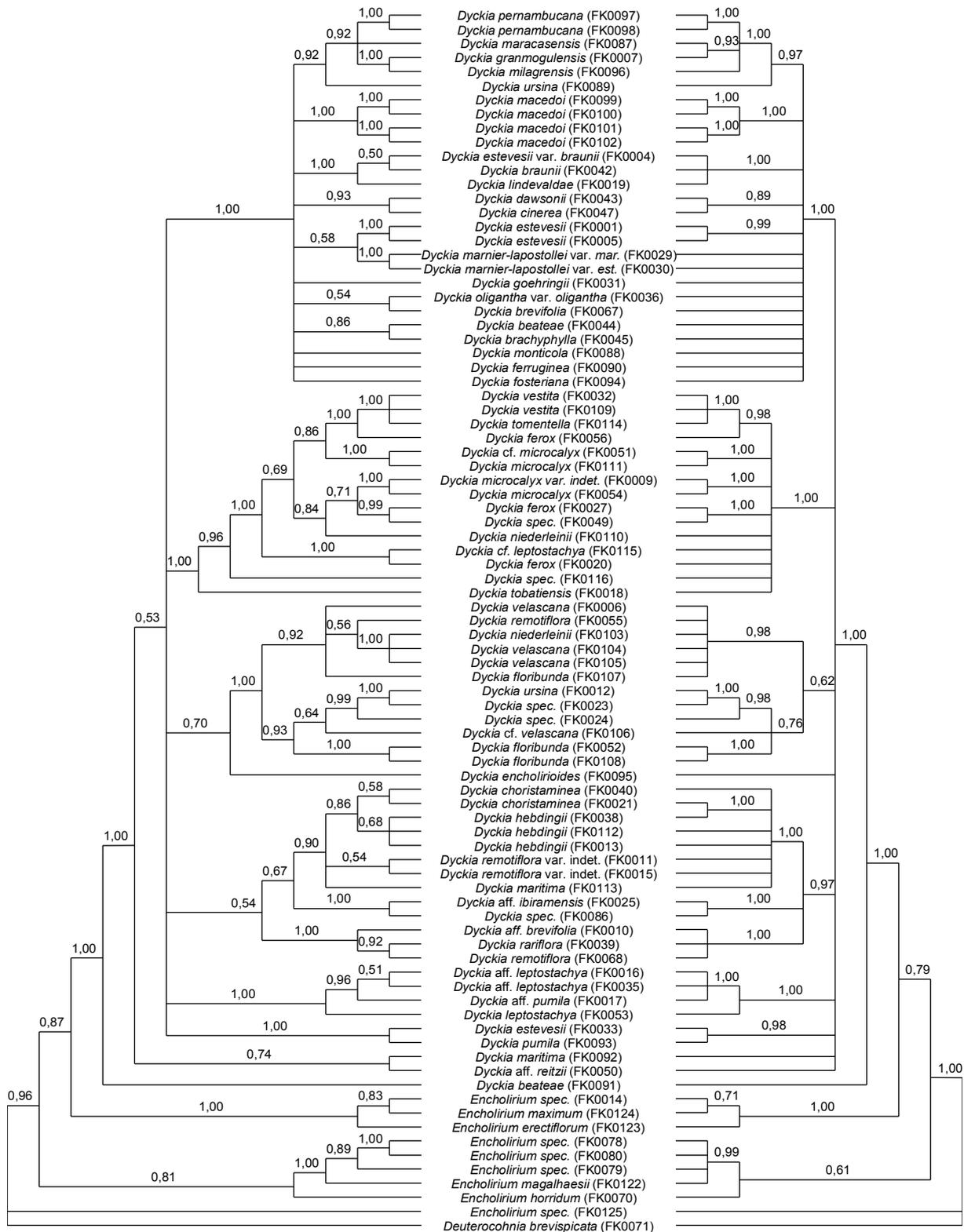
### Anwendung von cpSSRs für Verwandtschaftsuntersuchungen

Phylogenetische Analysen ausschließlich mit cpSSR-Markern werden offenbar nur selten durchgeführt. Für die Gattung *Anthyllis* (Fabaceae) untersuchten Nanni et al. (2004) sieben von Weising & Gardner (1999) publizierte cpSSR-Loci. Die aus diesen Daten gewonnene Phylogenie deckte sich grob mit Erkenntnissen aus Untersuchungen der *ITS*-Region. Ob die beobachteten Längenpolymorphismen der PCR-Fragmente aber aus Unterschieden in der Zahl an Mononukleotid-Wiederholungen in den SSRs oder aber in Mutation in den flankierenden Regionen begründet waren, wurde nicht untersucht.

Cubas et al. (2005) verwendeten die von Weising & Gardner (1999) publizierten universellen Primerpaare zur Amplifikation möglicher cpSSRs in verschiedenen Arten der Gattung *Ulex* (Fabaceae). Durch Sequenzierung einiger PCR-Produkte zeigten sie, dass die Längenvariation weitgehend durch Unterschiede in der Zahl an Mononukleotid-Wiederholungen in den SSRs verursacht wird. Die Plastiden einzelner Arten von *Ulex* stellten jeweils keine monophyletischen Abstammungslinien dar. Vielmehr zeigte sich eine extreme Diskrepanz zwischen der plastidären Phylogenie einerseits und den taxonomischen Artgrenzen andererseits. Da keine anderen plastidären Loci sequenziert wurden, ist jedoch schwer zu beurteilen, wie zuverlässig die alleine aus den cpSSR-Daten gewonnenen Erkenntnisse sind.

Ein Grund für die Entwicklung von cpSSR-Markern für *Dyckia* in der vorliegenden Arbeit war, diese zur Verbesserung von Auflösung und Unterstützung der Phylogenie aus plastidären Sequenzen zu nutzen. Dahinter steckte die Idee, den erstaunlich invarianten Datensatz der

## Diskussion



**Abbildung 33: Einfluss von cpSSR-Daten auf den Datensatz aus plastidären Sequenzen**

Gezeigt ist jeweils der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1 (vgl. 3.2.2 und 3.4.2). Auf der linken Seite ist der Baum gezeigt, welcher aus dem kombinierten Datensatz aus plastidären Sequenzen und cpSSRs resultierte. Rechts ist das Ergebnis der Analyse ausschließlich der Sequenzdaten gezeigt.

## Diskussion

DNA-Sequenzen mit den sehr viel variableren cpSSR-Daten zu kombinieren. Da beide Datensätze aus dem Plastom resultieren, sollte dieses Vorgehen legitim sein.

Die ausschließlich aus cpSSR-Daten rekonstruierte Phylogenie (Abbildung 31) zeigt deutliche Unterschiede gegenüber den auf Substitutionen in den DNA-Sequenzen basierten Phylogenien (Abbildungen 18-21). Während kleinere Kladen und jüngere Knoten häufig identisch sind, finden sich vor allem bei den tieferen Knoten Widersprüche. Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass der Einfluss der Homoplasie im Laufe der Zeit zunimmt. In älteren Teilen der Phylogenie erreicht der Anteil an Homoplasie unter den cpSSR-Längenpolymorphismen ein kritisches Maß. Gleiche Fragmentlängen sind dann häufig kein Indiz mehr für Verwandtschaft, sondern zufällig entstanden. Somit ist eine Nutzung der 12 cpSSR-Marker als ausschließliche Datenquelle für phylogenetische Studien zwischen Arten der Gattung *Dyckia* nicht empfehlenswert.

Eine Kombination der Daten aus Sequenzierung plastidärer DNA und cpSSR-Analyse resultierte hingegen in einer verbesserten Auflösung insbesondere der terminalen Kladen (Abbildung 32). Ein direkter Vergleich der kombinierten Analyse mit der Phylogenie, die ausschließlich auf Substitutionen beruht, ist in Abbildung 33 gezeigt. Die Zahl der Widersprüche ist gering und das Rückgrat der beiden Phylogenien ist sogar identisch. Die in den cpSSRs enthaltene Homoplasie scheint im kombinierten Baum nur wenig störenden Einfluss zu haben. Eine mögliche Vorgehensweise wäre es, die cpSSR-Daten nur jeweils innerhalb einzelner Kladen zu verwenden und bei der Berechnung des Rückgrates der Phylogenie auszuschließen.

Die Zahl an Substitutionen im Plastom von *Dyckia* ist zur Rekonstruktion hoch aufgelöster Stammbäume offenbar zu gering. Dies resultiert in einem Mangel an Auflösung insbesondere in den jüngeren Teilen der Phylogenie. Im Gegensatz dazu ist die Rate, mit der einzelnen Nukleotidbausteine innerhalb längerer cpSSRs hinzukommen oder verlorengehen, für verlässliche Verwandtschaftsanalysen offenbar zu hoch. Die daraus resultierende Homoplasie führt damit zu Fehleinschätzungen insbesondere im Bereich des Rückgrates der Phylogenie. Die mangelnde Auflösung der Bäume auf Basis plastidärer DNA-Sequenzdaten ist zwar wenig befriedigend, resultiert aber offenbar aus der interessanten Natur und dem jungen Alter der Gattung *Dyckia*. Durch Homoplasie verursachte Fehler und Unsicherheiten sind dagegen nicht akzeptabel. Deshalb wurde von der weiteren Anwendung der cpSSRs in der vorliegenden Untersuchung abgesehen.

### Mögliche zukünftige Anwendungen

Die entwickelten 12 cpSSR-Loci für die Gattung *Dyckia* stellen gleichwohl wertvolle Werkzeuge für zukünftige Studien auf einem sehr niedrigen taxonomischen Niveau dar, insbesondere auf Populationsebene und bei sehr nahe verwandten Arten. Die Chloroplasten der *Dyckia*-Arten sind ja offenbar nach einem recht strikten geographischen Muster verteilt (vgl. Abbildung 23). Daher sollten Studien mit cpSSRs in mehr oder weniger eng begrenzten geographischen Arealen gute Aussichten auf Erfolg haben. Eine vergleichbare Arbeit existiert bereits für Populationen von vier Arten von *Pitcairnia*, die auf engem Raum in der Umgebung von Rio de Janeiro sympatrisch vorkommen (Palma-Silva et al. 2011).

## 4.2 Phylogenetische Untersuchungen

### 4.2.1 Erzielte Auflösung der Phylogenien

Wie die hier vorgenommenen Analysen zeigen, ist die genetische Variabilität innerhalb der Gattung *Dyckia* außerordentlich gering, insbesondere für die plastidären Loci. Somit ist auch die erzielte Auflösung der Phylogenien weniger detailliert als bei vielen vergleichbaren Studien.

### Einzelne und kombinierte plastidäre Datensätze

Die mit der vergleichenden Sequenzierung einzelner plastidärer Loci erzielte Auflösung und statistische Stützung ist in vielen Studien insbesondere auf geringem taxonomischem Niveau häufig sehr begrenzt. Insbesondere junge Gruppen, die noch wenig Zeit zur genetischen Differenzierung hatten, und Gruppen, die aus raschen Radiationseignissen resultieren, erweisen sich hier als schwierig (Dunbar-Co et al. 2008; Antonelli et al. 2010). Aber auch in älteren und vergleichsweise artenarmen Gruppen, wie etwa der im Vergleich zu *Dyckia* älteren Gattung *Fosterella* liefern einzelne plastidäre Loci nur selten informative Ergebnisse (Rex 2007). In *Fosterella* ergab erst die kombinierte Analyse von vier plastidären Loci eine gut aufgelöste Phylogenie mit gestützten Ästen (Rex et al. 2009). Für die artenreiche Unterfamilie der Tillandsioideae konnte nur durch die Kombination von sieben Loci eine Phylogenie mit akzeptabler Auflösung und Unterstützung erzeugt werden (Barfuss et al. 2005). Sogar auf Familienebene kommen für die Bromeliaceae aufwändige Analysen zum Einsatz, etwa mit acht unterschiedlichen Loci bei Givnish et al. (2011). Die gesamte Familie wird häufig als Produkt einer adaptiven Radiation angesehen (Benzing 2000).

Durch die Kombination sechs plastidärer Loci konnten auch für *Dyckia* aussagekräftige Phylogenien rekonstruiert werden, jedoch mit einer teils sehr eingeschränkten Auflösung. Die Ursache dafür ist vermutlich in dem geringen Alter und der raschen Diversifizierung der

## Diskussion

Gattung zu suchen. Somit ist die Natur von *Dyckia*, welche die Gattung so interessant und erforschenswert macht, verantwortlich für die auf den ersten Blick erschreckend geringe Auflösung. Aufgrund der extremen Armut an variablen Merkmalen erwies sich die Darstellung als phylogenetisches Netzwerk als besonders günstig.

### *Phytochrom C (phyC)*

Die im Vergleich zu Sequenzen des Plastoms recht hohe Variabilität von *phyC* innerhalb von *Dyckia* ließ zunächst eine ordentliche Auflösung in den phylogenetischen Analysen erwarten. Dies war jedoch nicht der Fall, es zeigte sich eine weitgehend unaufgelöste Polytomie mit nur wenigen kleinen Kladen. Auch ist die statistische Unterstützung von Verzweigungen innerhalb von *Dyckia* und *Encholirium* sehr gering, nur wenige Verzweigungen zeigen Posteriori-wahrscheinlichkeiten von 0,90 und darüber. Die aus den Bootstrap-Analysen (MPBS und MLBS) resultierenden Werte liegen überwiegend unter 50%.

Die selektive Entfernung von Proben mit hoher allelischer Variation resultierte in einer massiven Verbesserung sowohl der Auflösung als auch der statistischen Unterstützung (vgl. Abbildungen 28 und 29). Daraus lässt sich folgern, dass ein Mangel an Variabilität nicht die Hauptursache für die unbefriedigende Auflösung der auf dem kompletten Datensatz beruhenden Bäume ist. Vermutlich würde sich durch Klonierung der PCR-Produkte von Proben mit einem höheren Anteil an heterozygoten Positionen eine halbwegs gut aufgelöste Phylogenie für alle Proben finden lassen. Dieses wäre dann aber keine Phylogenie der Arten (species tree), sondern einer Phylogenie der heute existenten Allele von *phyC* (gene tree). Teilweise zeigen die beiden im gleichen Individuum von *Dyckia* gefunden Allele sehr große Unterschiede und würden demzufolge an unterschiedlichen Stellen des Baums stehen. Es ist daher sehr zweifelhaft, ob es einen klar erkennbaren Zusammenhang zwischen der Phylogenie der Allele von *phyC* und der hypothetischen Phylogenie der sie tragenden Vertreter von *Dyckia* gibt. Von ausgedehnten Klonierungsexperimenten wurde infolgedessen abgesehen.

### **4.2.2 Phylogenie auf Basis plastidärer Sequenzen**

Die durch die Analyse sechs plastidärer Loci gewonnenen Erkenntnisse zur Phylogenie innerhalb der Pitcairnioideae decken sich weitgehend mit den in früheren Arbeiten erzielten Befunden. Die Monophylie der Unterfamilie wurde bisher in praktisch jeder Untersuchung von Sequenzen des Plastoms einschließlich der vorliegenden Studie gezeigt (Terry et al. 1997; Givnish et al. 2004; 2007; 2011; Rex 2007; Rex et al. 2009) und kann als gesichert gelten.

## Diskussion

### Verwandtschaft innerhalb der Pitcairnioideae und Monophylie der Gattungen

Der Status von *Pitcairnia* wurde auch in der Vergangenheit nicht restlos aufgeklärt, eine Monophylie kann aber als wahrscheinlich angenommen werden. Eine paraphyletische Gattung *Pitcairnia* ermittelten Horres et al. (2000) und Rex et al. (2009). In anderen Arbeiten mangelte es an ausreichender Probenzahl oder phylogenetischer Auflösung (z. B. Terry et al. 1997; Crayn et al. 2004). Eine Monophylie von *Pitcairnia* ermittelten dagegen Givnish et al. (2004; 2007; 2011). Die relativ hohe Probenzahl und die Verwendung acht plastidärer Loci kennzeichnen die Arbeit von Givnish et al. (2011) als die bisher aussagekräftigste Studie. Erste belastbare Ergebnisse einer derzeit im Rahmen einer Doktorarbeit am Institut für Biologie der Universität Kassel laufenden Untersuchung zur Phylogenie von *Pitcairnia* deuten ebenfalls auf eine monophyletische Abstammung der Plastiden von *Pitcairnia* hin (Schubert, unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit kristallisiert sich auch die Existenz zweier großer Kladen innerhalb von *Pitcairnia* heraus. Diese trennten sich wohl bereits kurz nach der Entstehung der Gattung. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich *Pitcairnia* in der Bayes'schen Analyse, der Parsimonieanalyse und der RAxML-Analyse jeweils paraphyletisch mit schlechter statistischer Unterstützung (PP=0,74, MPBS=78%, MLBS=92%). In der BEAST-Analyse mangelt es hier an Auflösung (Abbildungen 18-21).

Die beobachtete Monophylie von *Fosterella*, die Paraphylie von *Deuterocohnia* sowie die gemeinsame Monophylie der drei xerophytischen Gattungen *Deuterocohnia*, *Encholirium* und *Dyckia* deckt sich mit Ergebnissen früherer Arbeiten (Horres et al. 2000; Crayn et al. 2004; Givnish et al. 2004; 2007; 2011; Rex 2007; Rex et al. 2009; Schütz 2012; Wagner et al. 2012).

### Status von Encholirium

Zum Status von *Encholirium* existierten in der Literatur bisher keine belastbaren Aussagen. Nur in einer einzigen Arbeit wurde bisher überhaupt mehr als eine Pflanze dieser Gattung untersucht (Givnish et al. 2011). Dort zeigte sich eine Paraphylie der beiden untersuchten Proben, die statistische Unterstützung war aber ausgesprochen schlecht. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Phylogenien zeigen für nur neun untersuchte Akzessionen von *Encholirium* drei (Abbildungen 18, 19 und 21) oder vier (Abbildungen 20 und 23) unabhängige paraphyletische Linien. Damit kann ein paraphyletischer Ursprung der Plastiden von *Encholirium* als gesichert angenommen werden.

### Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung Dyckia

Ein monophyletischer Ursprung der in *Dyckia* vorkommenden Plastiden kann derzeit als wahrscheinlich angenommen werden. Allerdings ist insbesondere aufgrund der

## Diskussion

offensichtlichen Nähe zu *Encholirium* nicht auszuschließen, dass bei Einbeziehung weiterer Akzessionen auch weitere zusätzliche früh abzweigende Linien identifiziert werden. Durch Ereignisse wie incomplete lineage sorting (z. B. Jakob 2005) könnten Plastiden jüngerer Linien auch in Arten von *Encholirium* gelangt sein, wodurch beide Gattungen jeweils Plastiden paraphyletischen Ursprungs tragen würden. Derzeit spricht jedoch alles für eine Monophylie der Plastiden in *Dyckia*.

Die phylogenetischen Beziehungen der Plastiden innerhalb von *Dyckia* spiegeln recht genau die geographische Verteilung der sie tragenden Pflanzen wider. Eine detaillierte Hypothese zur Interpretation dieses Musters findet sich unter 4.3.1. Dagegen ist eine jeweils monophyletische Abstammung der in einzelnen Arten vorkommenden Plastiden offenbar keinesfalls die Regel. Vielmehr tragen unterschiedliche Akzessionen ein und derselben Art häufig Plastiden paraphyletischen Ursprungs, die teilweise nur entfernt verwandt sind (vgl. 4.3.5). Die Phylogenie auf Basis plastidärer Sequenzen weist erhebliche Unterschiede zur Phylogenie auf Basis des nukleären Gens *phyC* auf (Abbildung 34), die in Abschnitt 4.2.3 näher diskutiert werden.

Deutliche Unterschiede finden sich ebenfalls im Vergleich mit einer noch unveröffentlichten AFLP-Analyse (Pinangé et al., unveröffentlichte Daten, Abbildung 35). Der in der AFLP-Analyse verwendete Probensatz überschneidet sich mit demjenigen, der für die vorliegende Arbeit eingesetzt wurde. Insgesamt 44 Akzessionen wurden jeweils in beiden Studien untersucht, im übrigen wurden unterschiedliche Proben verwendet. Die auf AFLP-Daten basierte Phylogenie zeigt eine Reihe an Kladen, welche sich nicht mit denen der plastidären Phylogenie aus der vorliegenden Arbeit decken (gekennzeichnet durch kleine Buchstaben an den terminalen Ästen von Abbildung 35). Sowohl ein erheblicher Mangel an Auflösung in der auf AFLP-Daten basierten Phylogenie als auch die unvollständige Überschneidung der Probensätze lassen detaillierte Rückschlüsse an dieser Stelle aber nicht zu.

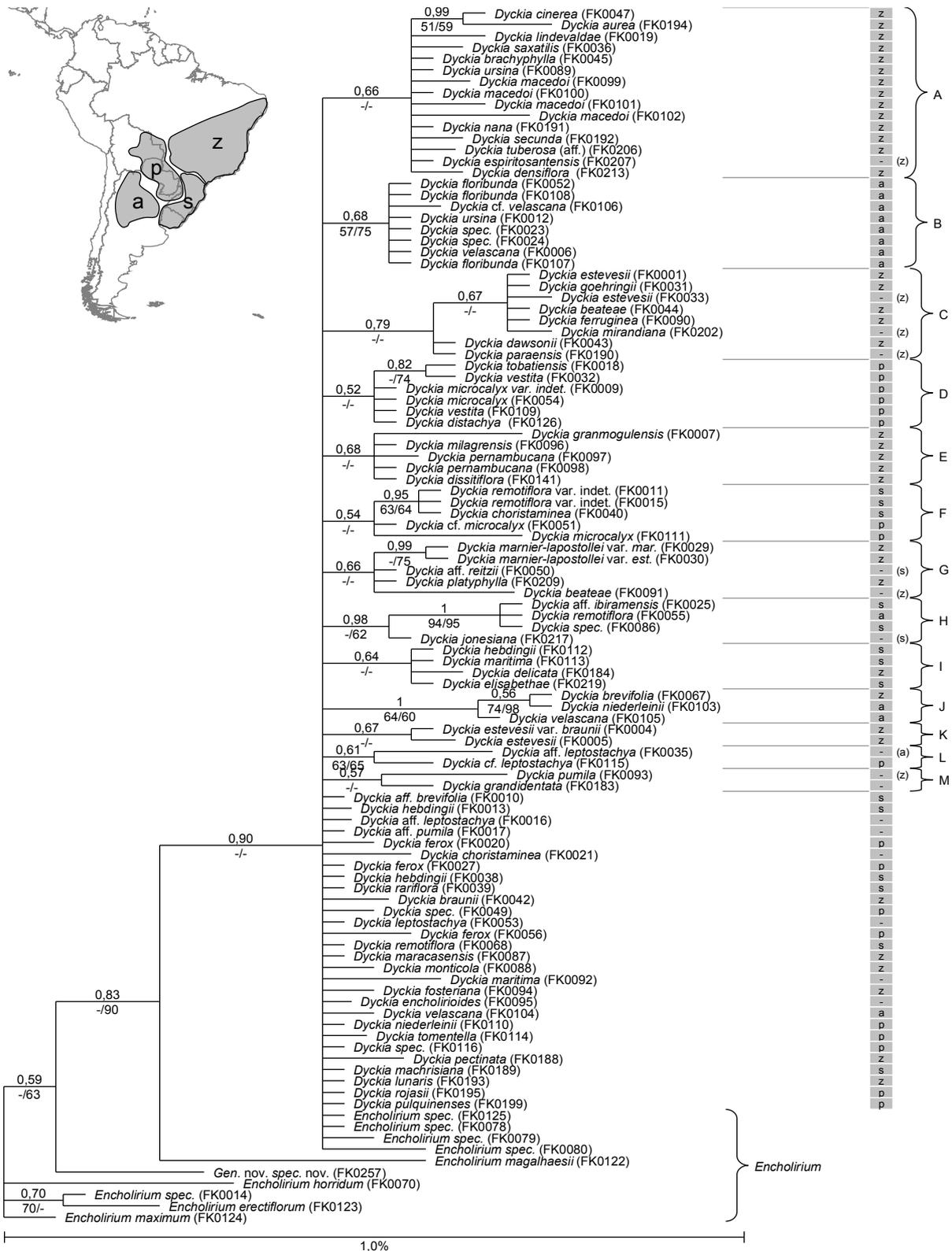
### **4.2.3 Phylogenie auf Basis von *phyC***

Die aus der Untersuchung von *phyC* resultierende Phylogenie zeigt eine Reihe von gravierenden Unterschieden zur Phylogenie der Plastiden (Abbildung 34). Insbesondere ist die Unterfamilie Pitcairnioideae hier paraphyletisch, da auch die beiden untersuchten Vertreter von *Puya* darin enthalten sind.

#### Verwandtschaft innerhalb der Pitcairnioideae und Monophylie der Gattungen

Mit Ausnahme von *Encholirium* sind alle Gattungen der Pitcairnioideae in allen durchgeführten Analysen auf Basis von *phyC* monophyletisch mit jeweils sehr hoher

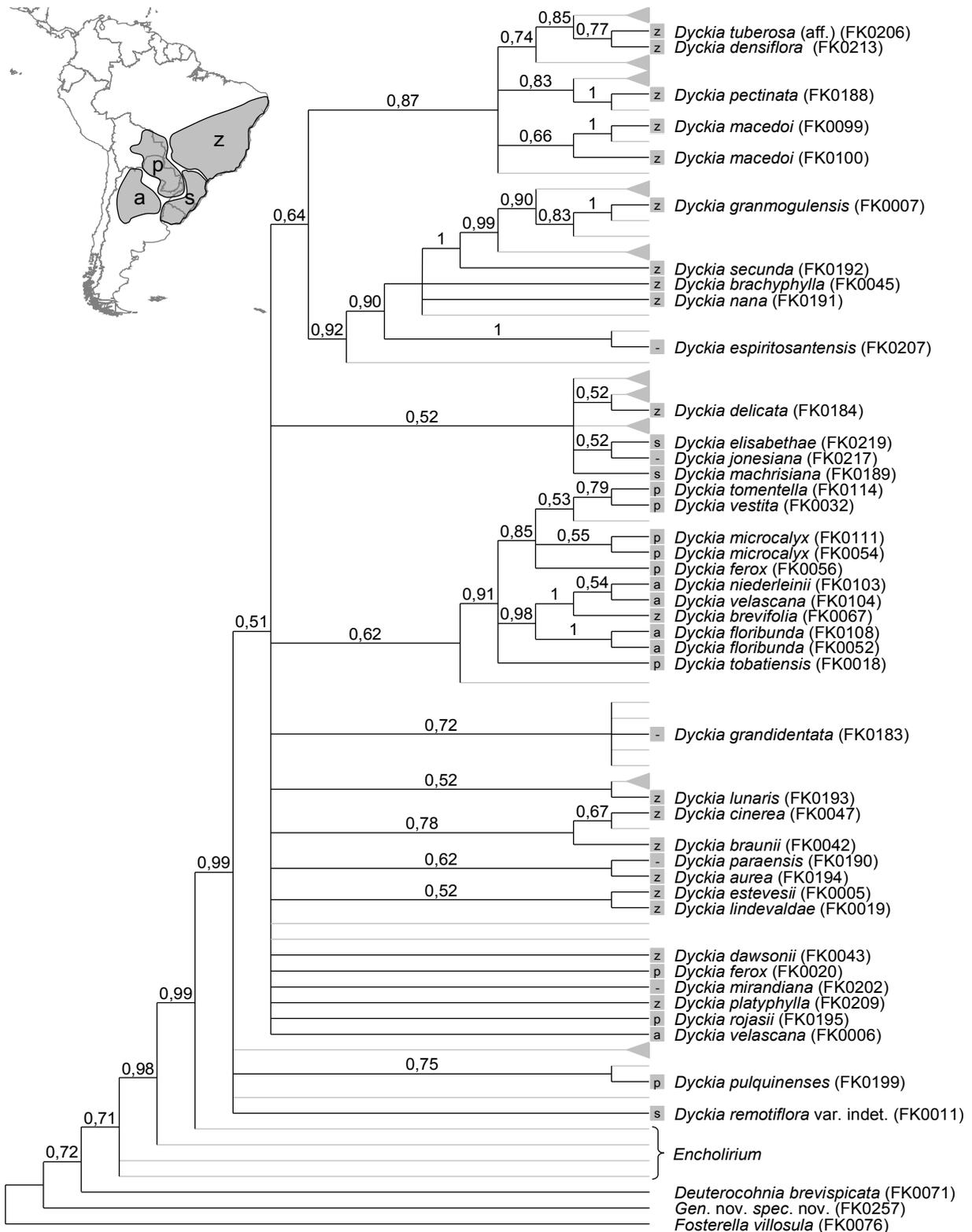
## Diskussion



**Abbildung 34: Vergleich der Phylogenien aus plastidären Daten und *phyC***

Gezeigt ist das Ergebnis der Bayes'schen Analyse von *phyC* (für weitere Informationen siehe Abbildung 28). Die kleinen Buchstaben am rechten Rand indizieren, in welcher Klade der plastidären Phylogenie die jeweilige Probe steht (z: zentralbrasilianisch, s: südbrasilianisch, p: paraguayisch, a: argentinisch, -: zu keiner der vier großen Kladen gehörig). Die Karte oben links zeigt die entsprechenden Verbreitungsgebiete. Falls die entsprechende Akzession zu keiner der vier großen Kladen gehört ist jeweils rechts daneben in Klammern angegeben, mit welcher Klade sich der Fundort der jeweiligen Probe deckt. Die in *Dyckia* gefundenen Kladen sind mit Buchstaben A-M beschriftet.

## Diskussion



**Abbildung 35: Vergleich der Phylogenien aus AFLP- und plastidären Daten**

Gezeigt ist das Ergebnis einer Bayes'schen Analyse von AFLP-Daten diverser Akzessionen von *Dyckia* und anderen Gattungen der *Pitcairnioideae* (Pinangé et al., unveröffentlichte Daten). Schwarze Endäste mit Beschriftung verweisen auf Proben, welche auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Graue Äste weisen auf Proben hin, welche für die vorliegende Arbeit nicht untersucht wurden. Dreiecke repräsentieren jeweils mehr als eine Probe, weitere eventuell darin enthaltene Verzweigungen sind nicht gezeigt. Die Buchstaben links der Taxon-Namen indizieren die Gruppenzugehörigkeit in der Analyse plastidärer Sequenzdaten (z: zentralbrasilianisch, s: südbrasilianisch, p: paraguayisch, a: argentinisch, -: zu keiner der vier großen Kladen gehörig). Die Karte oben links zeigt die entsprechenden Verbreitungsgebiete.

## Diskussion

Unterstützung. Größere Untersuchungen mit weiteren nukleären Genen wurden innerhalb der Pitcairnioideae bisher nur in der Gattung *Deuterocohnia* durchgeführt (Klein 2012; Schütz 2012). Diese Gattung ist im plastidären Baum paraphyletisch, in einem nukleären Baum auf Basis des Locus *PRK* hingegen monophyletisch (Schütz 2012). In einer auf dem nukleären Locus *rpb2* basierenden Arbeit von Klein (2012) wiederum erwies sich *Deuterocohnia* als paraphyletisch. Eine Akzession von *Deuterocohnia chrysantha* bildete die Schwestergruppe zu *Dyckia* und *Encholirium*, während die übrigen Akzessionen von *Deuterocohnia* außerhalb dieser Klade standen. Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die gemeinsamen Vorläufer von *Dyckia* und *Encholirium* noch lange nach der Abspaltung von *Deuterocohnia* in sporadischem Austausch von genetischem Material standen (vgl. auch Schütz 2012).

Ein unerwarteter Unterschied zur plastidären Phylogenie findet sich bei der Stellung von *Deuterocohnia* innerhalb der Unterfamilie Pitcairnioideae. Diese Gattung findet sich in allen für *phyC* durchgeführten Analysen in Schwestergruppenposition zu *Fosterella*, die statistische Unterstützung ist allerdings jeweils schwach. Dies steht in deutlichem Widerspruch zu ökophysiologischen und morphologischen Merkmalen. So sprechen vor allem die Ausprägung der CAM-Photosynthese und der stark xerophytische Charakter von *Deuterocohnia*, *Encholirium* und *Dyckia* für eine gemeinsame Monophylie dieser drei Gattungen (vgl. auch 4.2.4). Die geringe genetische Distanz der in *Deuterocohnia* und *Fosterella* gefundenen Allele von *phyC* ist möglicherweise auf Ereignisse wie incomplete lineage sorting oder Introgression zurückzuführen, die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse der kompletten Genome spiegeln sich hier vermutlich nicht wider.

Offenbar sind die Phylogenien unterschiedlicher nukleärer Loci innerhalb der Pitcairnioideae generell widersprüchlich. Für den Locus *rpb2* etwa zeigt sich ein klares gemeinsames Monophylum von *Fosterella* und *Pitcairnia* (Klein 2012). Dies steht im Widerspruch zu den Phylogenien sowohl auf Basis von *phyC*, als auch auf Basis plastidärer Loci. In Anbetracht des gemeinsamen mesophytischen Charakters der beiden Gattungen erscheint diese Beobachtung jedoch durchaus plausibel.

### Stellung von Puya

Der gravierendste Unterschied zu allen bisherigen Erkenntnissen ist die gut gestützte Stellung der in *Puya* gefundenen Allele von *phyC* inmitten derer der Pitcairnioideae (vgl. Abbildungen 26-28). Zum einen wirft dieser Umstand die Frage auf, ob sich einzelne besonders variable nukleäre Loci überhaupt für Studien auf diesem taxonomischen Niveau

## Diskussion

eignen. Insbesondere der Verzicht auf eine Klonierung der PCR-Produkte kann hier offenbar negative Einflüsse haben (z. B. Samuel et al. 2005). Über die relative Stellung von Puyoideae und Pitcairnioideae in nukleären Phylogenien können aus anderen Arbeiten kaum Erkenntnisse gezogen werden, da in keine der bisherigen Studien genügend Proben aus beiden Unterfamilien einbezogen wurden. Klein (2012) rekonstruierte eine Phylogenie der Pitcairnioideae auf Basis eines kurzen Abschnitts des *PRK*-Gens und fand ebenfalls eine Stellung der sieben untersuchten Akzessionen von *Puya* innerhalb der Pitcairnioideae, wenngleich ohne statistische Unterstützung. In der auf *phyC* basierenden Arbeit von Jabaily & Sytsma (2010) wiederum bilden *Puyoideae* und *Bromelioideae* ein Monophylum, es wurden aber lediglich zwei Akzessionen von *Pitcairnia* analysiert.

Zur Aufklärung dieser Problematik ist eine Sequenzierung mehrerer unabhängiger nukleärer Loci für Vertreter der gesamten Bromeliaceae wünschenswert. Die plastidäre Phylogenie von Givnish et al. (2011) legt nahe, dass sich die drei Unterfamilien Pitcairnioideae, Puyoideae und Bromelioideae innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums voneinander trennten. Auch Jabaily & Sytsma (2010) verweisen auf die kurzen Astlängen in denjenigen Bereichen der Phylogenie, wo sich die ersten Linien innerhalb der Puyoideae und Bromelioideae voneinander trennen. Die Phylogenie der Plastiden der Pitcairnioideae zeigt für die Trennung von *Pitcairnia* vom Rest der Unterfamilie und die Entstehung der beiden großen Kladen dieser Gattung ein ähnliches Bild (vgl. auch 4.2.2). Es ist demnach durchaus wahrscheinlich, dass auch einige Zeit nach der Trennung der drei Linien Pitcairnioideae, Puyoideae und Bromelioideae noch gelegentlich genetisches Material zwischen Vertretern dieser Unterfamilien ausgetauscht wurde (vgl. auch 4.3.5). Wie bei *Deuterocohnia* könnten auch hier Plastiden und Allele einzelner nukleärer Gene durch Introgression in andere Linien gelangt sein. Je nachdem, wie intensiv dieser Austausch war, könnte eine ganze Reihe an unabhängigen Loci nötig sein, um hier zuverlässige Hypothesen aufzustellen.

### Status von *Encholirium*

Trotz der geringen Auflösung kann *Encholirium* für den Locus *phyC* als klar paraphyletisch bezeichnet werden. In der Bayes'schen Analyse stützen insgesamt drei interne Äste mit Posterioriwahrscheinlichkeiten von 0,59, 0,83 und 0,90 diese Aussage (Abbildung 28). Eine Paraphylie von *Encholirium* findet sich auch an allen anderen bisher untersuchten nukleären Loci, wie etwa *PRK* (Schütz 2012) und *rpb2* (Klein 2012).

### Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung *Dyckia*

Die durch die Bayes'sche Analyse von *phyC* erzielte Auflösung innerhalb von *Dyckia* ist sehr gering (Abbildungen 28 und 34). In einer großen Polytomie finden sich 13 meist kleine

## Diskussion

Kladen (A-M in Abbildung 34), 28 einzelne Proben von *Dyckia* und fünf von *Encholirium*. Keine der größeren Kladen der plastidären Phylogenie taucht hier auf (vgl. die Buchstaben an den terminalen Ästen in Abbildung 34). Andererseits stehen einige der bei der Analyse von *phyC* gefundenen Kladen in einem gewissen Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchung plastidärer DNA. So enthalten die *phyC*-Kladen A, C, E und K jeweils nur Pflanzen aus der zentralbrasilianischen cpDNA-Klade oder wenigstens aus dem Verbreitungsgebiet der zentralbrasilianischen cpDNA-Klade. Die *phyC*-Klade B enthält acht der 12 Akzessionen der argentinischen cpDNA-Klade. Die *phyC*-Klade D enthält sechs der 18 Akzessionen der paraguayischen cpDNA-Klade. Die *phyC*-Klade F ist praktisch nicht gestützt, enthält aber eine gut gesicherte Subklade mit drei weiteren Akzessionen der cpDNA-paraguayischen Klade. Die *phyC*-Kladen G, H, I, J und L enthalten jeweils Akzessionen, die zu unterschiedlichen cpDNA-Kladen gehören.

Der Mangel an Auflösung und statistischer Unterstützung der auf *phyC* basierten Phylogenie macht es unmöglich, gesicherte Hypothesen über verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den untersuchten Pflanzen von *Dyckia* aufzustellen. Es ist nicht auszuschließen, dass bei verbesserter Auflösung etwa durch Sequenzierung weiterer Teile des *phyC*-Gens einige der schlecht gestützten Widersprüche verschwinden. Andererseits finden sich aber auch in den wenigen sehr gut gestützten Verzweigungen der auf *phyC* basierten Phylogenie deutliche Widersprüche zur Phylogenie der Plastiden. Als Beispiel kann hier die enge Beziehung von *D. cinerea* und *D. aurea* innerhalb der *phyC*-Klade A genannt werden. Diese beiden Arten sind in der plastidären Phylogenie klar voneinander getrennt. Noch deutlicher ist der Widerspruch bezüglich der Stellung von *D. remotiflora* (FK0055), deren Plastiden eindeutig der argentinischen cpDNA-Klade zuzuordnen sind. In der auf *phyC* basierten Phylogenie findet sich diese Pflanze hingegen gemeinsam mit zwei südbrasilianischen Vertretern in *phyC*-Klade H.

Abschließend lässt sich festhalten, dass aus der hier vorgenommenen Analyse des nukleären Gens *phyC* eine Phylogenie resultiert, die innerhalb von *Dyckia* extrem schlecht aufgelöst ist. Zwar finden sich eine Reihe an Parallelen zur plastidären Phylogenie, aber auch zahlreich teils gut gestützte Widersprüche. Auch die ungewöhnlich hohe allelische Variation und die dadurch häufig vorkommenden heterozygoten Alignmentpositionen schränken die Möglichkeiten zur Interpretation der Topologie der gefundenen Phylogenie erheblich ein. Jedenfalls sprechen die Daten dafür, dass in *Dyckia* ein reger Austausch von genetischem Material auch nach der Trennung einzelner Arten erfolgt (vgl. 4.3.5).

#### 4.2.4 Schlussfolgerungen zur Phylogenie von *Dyckia* und *Encholirium*

##### Monophylie der der xerophytischen Klade aus *Dyckia*, *Encholirium* und *Deuterocohnia*

Innerhalb der Pitcairnioideae zeichnen sich die drei Gattungen *Deuterocohnia*, *Encholirium* und *Dyckia* durch eine Reihe an Synapomorphien gegenüber den überwiegend mesophytischen Gattungen *Fosterella* und *Pitcairnia* aus. Dazu zählen die in parallelen Reihen angeordneten Trichome der Blätter und deren ausgedehnte Überlappung, die Präsenz internen Wasserspeichergewebes im Chlorenchym sowie das Fehlen einer Differenzierung in Schwamm- und Palisadenparenchym (Givnish et al. 2007). Ein weiteres wichtiges Merkmal stellt der CAM-Photosyntheseweg dar, der als synapomorph für die drei xerophytischen Gattungen gilt (z. B. Crayn et al. 2004). Auch rein habituell unterscheiden sich die Vertreter von *Deuterocohnia*, *Encholirium* und *Dyckia* durch ihre xeromorphen Anpassungen deutlich von den Vertretern der beiden mesophytischen Gattungen. Dazu zählen insbesondere robuste, meist stark sukkulente Blätter mit mehr oder weniger stark bewehrten Rändern. Schließlich kann auch die ausgeprägte Tendenz zur vegetativen Vermehrung über die Bildung von Kolonien und Polstern hier angeführt werden. Trotz der für *phyC* beobachteten Nähe von *Deuterocohnia* zu *Fosterella* ist eine gemeinsame Monophylie der drei xerophytischen Gattungen als xerophytische Klade wohl sehr wahrscheinlich. Aus den Untersuchungen auf Basis von *PRK* (Schütz 2012) und *rpb2* (Klein 2012) lässt sich aufgrund zu geringer Probenzahl und Auflösung keine fundierte Aussage hierzu ableiten.

In Zukunft besonders interessant könnte eine genauere Untersuchung der in der vorliegenden Arbeit als *Gen. nov. spec. nov.* bezeichneten Pflanze mit der DNA-Nummer FK0257 sein. Sowohl in der plastidären als auch in der aus *phyC* basierten Phylogenie steht diese Pflanze inmitten von *Encholirium*. Morphologisch ähnelt sie aber eher Arten von *Deuterocohnia* (Wanderley, persönliche Mitteilung). In einer noch unveröffentlichten AFLP-Analyse steht diese Pflanze ganz außerhalb der xerophytischen Klade (Pinangé et al., unveröffentlichte Daten, siehe auch Abbildung 35). Hier stellt sich allerdings die Frage, inwieweit sich hoch sensible Marker wie AFLPs für die Aufklärung verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen Gattungen eignen.

##### Gemeinsame Monophylie von *Dyckia* und *Encholirium*

Die drei Gattungen der xerophytischen Klade lassen sich durch eine Reihe von Merkmalen voneinander differenzieren. Als plesiomorphe Zustände können terminale, nicht verholzende und einjährige Infloreszenzen, das Fehlen von Petalenanhängseln sowie nicht verwachsene Filamente angesehen werden. Diese Merkmalszustände sind auch typisch für die Arten von *Fosterella* und *Pitcairnia* (z. B. Smith & Downs 1974). Als Synapomorphien für

## Diskussion

*Deuterocohnia* gelten die verholzende mehrjährige Infloreszenz und die eine einzelne Schuppe tragenden Petalenanhängsel. Auf *Deuterocohnia* beschränkt, aber nicht in allen Arten vorkommend ist außerdem die ausgeprägte Polsterbildung der ehemals zur Gattung *Abromeitiella* gezählten Arten (Schütz 2012). Ein synapomorphes Merkmal der gemeinsamen Klade aus *Encholirium* und *Dyckia* wurde bisher nicht beschrieben, in den gängigen Schlüsseln zu den Gattungen der Bromeliaceae war eine solche Abgrenzung aber auch nie nötig (Smith 1967; Smith & Downs 1974; Robinson & Taylor 1999). Die Abgrenzung zu *Deuterocohnia* erfolgt daher durch die Präsenz der für die gesamte xerophytische Klade synapomorphen Merkmalsausprägungen in Verbindung mit der Abwesenheit der für *Deuterocohnia* spezifischen Eigenschaften. Alle bisher durchgeführten molekularen Studien auf Basis plastidärer und nukleärer DNA-Sequenzen inklusive der vorliegenden Untersuchung bestätigen den gemeinsamen monophyletischen Ursprung von *Encholirium* und *Dyckia* (Givnish et al. 2004; 2007; 2011; Rex et al. 2009; Klein 2012; Schütz 2012). Das gleiche gilt für die Analyse von AFLP-Daten (Pinangé et al., unveröffentlichte Daten, Abbildung 35). Es gibt daher derzeit keine Veranlassung, die gemeinsame Monophylie der beiden Gattungen anzuzweifeln.

### Paraphylie von *Encholirium*

In den molekularen Untersuchungen von Givnish et al. (2011) waren nur zwei Arten von *Encholirium* einbezogen, gleichwohl deutete sich bereits eine Paraphylie der Gattung mit zwei unabhängigen plastidären Linien an. Auch in der vorliegenden Arbeit sind die Plastiden der Gattung *Encholirium* deutlich paraphyletisch. So zeigen die Phylogenien für nur neun untersuchte Akzessionen von *Encholirium* je nach Analysemethode drei (Abbildungen 18, 19 und 21) oder vier (Abbildungen 20 und 23) unabhängige paraphyletische Linien. Auch für die in *Encholirium* gefundenen Allele des nukleären Gens *phyC* konnte ein paraphyletischer Ursprung deutlich gezeigt werden (Abbildungen 26-28). Ebenfalls paraphyletisch zeigte sich *Encholirium* bei der Sequenzanalyse der nukleären Gene *rpb2* (Klein 2012) und *PRK* (Klein 2012; Schütz 2012) sowie in einer AFLP-Analyse (Pinangé et al., unveröffentlichte Daten). Bei nur vier untersuchten Proben zeigen sich in der AFLP-Studie drei unabhängige Linien, die durch zwei sehr gut gestützte interne Äste voneinander getrennt sind (Abbildung 35).

Unter Berücksichtigung all dieser molekularen Befunde muss die Gattung *Encholirium* nach dem derzeitigen Kenntnisstand als paraphyletisch angesehen werden. Diese Paraphylie wird auch von der Ausprägung morphologischer Merkmale nahe gelegt (Forzza 2001). So wurde bisher kein einziges morphologisches oder anderweitiges Merkmal beschrieben, das für *Encholirium* einen eindeutig synapomorphen Zustand aufweisen würde. Dagegen existiert mit *E. heloisae* ein morphologisches Intermediat zwischen den übrigen Vertretern von

## Diskussion

*Encholirium* und allen Arten von *Dyckia* (siehe auch 1.2.1). Bezeichnenderweise wurde *E. heloisae* ursprünglich als *Dyckia heloisae* beschrieben und auch erst kürzlich zu *Encholirium* gestellt (Forzza & Wanderley 1998; Forzza 2005). Die Gattung *Encholirium* wird demnach lediglich durch Symplesiomorphien definiert, wie etwa die nicht miteinander verwachsenen Filamente. Das im Vergleich zu *Dyckia* offensichtlichere Merkmal der terminalen Infloreszenz kann eben nicht angeführt werden, da letztere auch in *E. heloisae* auftritt. Der Umstand, dass sich die laterale Infloreszenz innerhalb der Gattung *Encholirium* entwickelte, ist ein weiterer deutlicher Hinweis auf eine abgeleitete Stellung von *Dyckia* innerhalb von *Encholirium*.

Die Prinzipien der kladistischen Systematik verlangen monophyletische Taxa. Legt man sie streng aus, dann ist *Encholirium* als eigene Gattung nicht akzeptabel. Vielmehr müssten alle derzeit in *Encholirium* und *Dyckia* enthaltenen Arten gemeinsam in *Dyckia* gestellt werden. Zwar wurden beide Gattungen zeitgleich publiziert, (Schultes & Schultes 1830), womit die einfache Prioritätsregel der biologischen Nomenklatur nicht greift (McNeill 2006). Da jedoch Baker (1889) die beiden Gattungen erstmals vereinte und dabei den Gattungsnamen *Dyckia* wählte, hat dieser Name Priorität (Artikel 11.5 in McNeill 2006).

Die vermutliche Paraphylie von *Encholirium* und die damit verbundenen notwendigen taxonomischen Konsequenzen wurden bereits zuvor von Forzza (2001) diskutiert. Eine Vereinigung mit *Dyckia* wurde bisher aber nicht durchgeführt und von zukünftigen Studien abhängig gemacht (Forzza 2005). Eine offizielle Zusammenfassung der beiden Gattungen wäre zum derzeitigen Zeitpunkt vermutlich immer noch verfrüht und würde zu Kontroversen führen. Hier kann insbesondere die mangelnde Berücksichtigung der morphologisch intermediären *E. heloisae* sowie der geographisch isolierten *E. lymanianum* als problematisch gesehen werden. Obwohl *Encholirium* nicht durch synapomorphe Merkmalsausprägungen definiert werden kann, sind ihre Vertreter in der Praxis recht gut als *Encholirium* zugehörig zu erkennen. Zukünftige phylogenetische Untersuchungen unter Einbeziehung zusätzlicher Arten insbesondere von *Encholirium* und unabhängiger nukleärer Marker könnten eine Vereinigung der beiden Gattungen aber sinnvoll machen.

### Monophylie von *Dyckia*

Für *Dyckia* stellt die Verwachsung der Filamente sowohl mit den Petalen als auch untereinander die einzige derzeit beschriebene Synapomorphie dar. Die für *Dyckia* typischen lateralen Infloreszenzen können nicht als Synapomorphie bezeichnet werden, da sie auch bei *Encholirium heloisae* auftreten. Die von Robinson & Taylor (1999) angeführten löffelförmigen Petalen stellen keinen uniformen Zustand innerhalb der Gattung dar und die

## Diskussion

Eingrenzung der Farbe der Petalen in selbiger Arbeit auf gelb oder orange kann nur als falsch bezeichnet werden (siehe 1.2.1). Eine Reihe von Merkmalsausprägungen sind innerhalb der xerophytischen Klade auf *Dyckia* beschränkt, kommen aber bei weitem nicht bei allen Arten dieser Gattung vor. Darunter fallen beispielsweise die roten oder orangefarbenen Kronblätter vieler *Dyckia*-Arten. Derzeit gibt es keinerlei Indizien, eine monophyletische Abstammung aller Arten von *Dyckia* anzuzweifeln. Auch Forzza (2001) beschreibt *Dyckia* auf Basis morphologischer Studien als monophyletisch.

Eine Monophylie von *Dyckia* wird durch die vergleichende Sequenzierung plastidärer Sequenzen im Rahmen der vorliegenden Arbeit klar gestützt. Die auf *phyC* basierende Phylogenie kann mangels Auflösung zur Klärung dieser Frage nicht herangezogen werden. Ebenfalls deutlich monophyletisch zeigen sich die jeweils untersuchten Vertreter von *Dyckia* in zwei Studien des nukleären Locus *PRK* (Klein 2012; Schütz 2012). Die Sequenzierung des nukleären Locus *rpb2* zeigte keine ausreichende Auflösung. Auch die Ergebnisse der AFLP-Analyse sprechen deutlich für eine monophyletische Gattung *Dyckia* (Pinangé et al., unveröffentlichte Daten, Abbildung 35).

Alle derzeit verfügbaren Erkenntnisse auf Basis morphologischer und molekularer Merkmale sprechen damit für eine Monophylie von *Dyckia*. Die verwandtschaftliche Nähe und mangelnde räumliche Trennung zu *Encholirium* macht einen zumindest sporadischen Austausch von genetischem Material zwischen den beiden Gattungen aber durchaus wahrscheinlich. Auch wenn hypothetische F1-Hybride vermutlich nicht genügend konkurrenzfähig sind, um stabile Hybridpopulationen zu etablieren, könnten bei Rückkreuzung mit einem der Eltern Plastiden oder nukleäre Gene durch Introgression in eine andere Linie gelangen.

### 4.2.5 Phylogenie und Merkmalsevolution innerhalb von *Dyckia*

#### Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb von *Dyckia*

Wie bereits in vorhergegangenen Kapiteln näher erläutert wurde, lassen sich die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb von *Dyckia* durch die vergleichende Sequenzierung sechs plastidärer Loci und des nukleären Locus *phyC* nicht erschöpfend rekonstruieren. Während zur historischen Biogeographie der Gattung *Dyckia* und ihrer plastidären Evolutionslinien gleichwohl interessante Schlüsse gezogen werden können, bieten die bisherigen Erkenntnisse für eine detaillierte Diskussion der Beziehung zwischen den einzelnen Arten keine solide Basis. Problematisch sind sowohl der Mangel an Auflösung als auch die Gruppierung verschiedener Akzessionen einzelner Arten in unterschiedlichen Kladen (vgl. 4.3.5).

## Diskussion

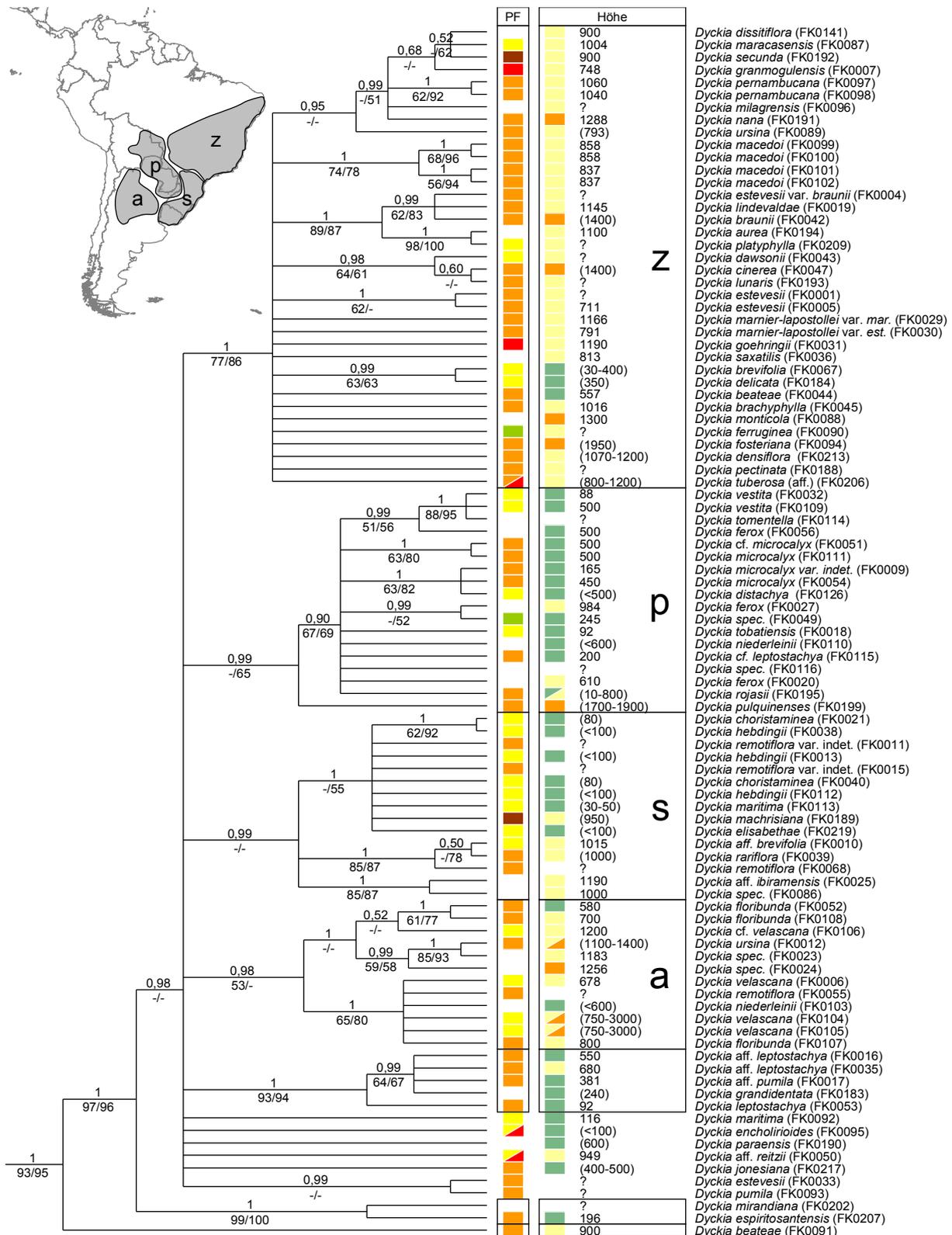
Nichtsdestotrotz bieten wenigstens die gut gestützten Kladen aus der Analyse plastidärer Sequenzen einen Ansatzpunkt für die Evaluation morphologischer Merkmale. Durch Kartierung der Zustände von Merkmalen mit möglicher systematischer Relevanz auf die Phylogenie können Zusammenhänge zwischen der Verwandtschaft der Plastiden und gemeinsamen Merkmalszuständen einzelner Kladen aufgedeckt werden (z. B. Rex et al. 2009). Die Ergebnisse der Kartierung einiger auffälliger Merkmale auf die plastidäre Phylogenie sind in Abbildung 36 dargestellt. Aufgrund der hohen allelischen Variation innerhalb einzelner Pflanzen und der ausgesprochen schlechten statistischen Unterstützung der gefundenen Kladen wurde für die auf *phyC* basierte Phylogenie von einer Kartierung abgesehen.

### Evolution der Farbe der Petalen innerhalb von *Dyckia*

Typisch für einen großen Teil der *Dyckia*-Arten sind leuchtend orangefarbene oder rote Petalen. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu *Encholirium* dar, deren Arten vorwiegend grünliche und gelbe Farben aufweisen (siehe auch 1.2.1 und 4.2.4). Allerdings kommen rote Petalen auch in einzelnen anderen Arten der Pitcairnioideae vor, wie etwa in *Deuterocohnia lotteae*, *Fosterella spectabilis* und in zahlreichen Arten von *Pitcairnia*. Die Fähigkeit zur Synthese roter Pigmente in den Petalen könnte daher innerhalb der Unterfamilie als plesiomorpher Zustand angesehen werden. Nichtsdestotrotz stellen die auffälligen Blüten von *Dyckia* und die damit verbundene Bestäubung durch Kolibris vermutlich ein wichtiges Schlüsselmerkmal dar.

Der Vergleich zwischen der plastidären Phylogenie und der Blütenfarbe der untersuchten Pflanzen von *Dyckia* zeigt kein klares Muster (Abbildung 36). In allen vier großen Kladen kommen jeweils sowohl gelbe auch als orangefarbene Petalen vor. Die beiden untersuchten Pflanzen mit braunen Petalen gruppieren in unterschiedliche Kladen. Analoges gilt für die beiden Pflanzen mit grünlichen Petalen. Deutlich rote Petalen kommen ausschließlich in der zentralbrasilianischen Klade vor sowie in zwei Pflanzen, die außerhalb der großen Kladen stehen. Zusätzlich ist zu bemerken, dass die rote Petalenfarbe nicht immer für alle Individuen der betreffenden Art zutrifft. So kommen in *Dyckia tuberosa* neben roten Petalen auch orangefarbene vor, und in *D. encholirioides* und *D. aff reitzii* sind neben roten Petalen auch gelbe Petalen zu finden. Hier zeigen sich also jeweils zwei unterschiedliche Merkmalszustände in ein und derselben Art. Die beiden zuerst abzweigenden und vermutlich ursprünglichsten untersuchten Vertreter von *Dyckia* weisen jeweils orangefarbene Petalen auf.

## Diskussion



**Abbildung 36: Merkmalskartierung auf die plastidäre Phylogenie**

Der gezeigte phylogenetische Baum entspricht dem aus der BEAST-Analyse (Abbildung 18). Die linke Spalte farbiger Rechtecke repräsentiert die Farbe der Petalen (braun, rot, orange, gelb, gelbgrün). In einigen Fällen ist die Farbe innerartlich variabel, hier sind beide Zustände angegeben. In der rechten Spalte farbiger Rechtecke ist die Höhe über dem Meeresspiegel kodiert (grün: 0-599-m, gelb: 600-1.199, orange: 1.200-3.000 m). Zahlen ohne Klammern stammen aus individuellen Fundortangaben, Werte in Klammern aus Literaturquellen, Fragezeichen und fehlende Rechtecke verweisen auf mangelnde Daten. Die Karte oben links zeigt die Verbreitungsgebiete der markierten Klade (z: zentralbrasilianisch, s: südbrasilianisch, p: paraguayisch, a: argentinisch).

## Diskussion

Unter der Annahme, dass die Phylogenie der Plastiden von *Dyckia* zumindest annähernd die Phylogenie der Arten repräsentiert, besitzt das Merkmal der Blütenfarbe keine systematische Relevanz auf der betrachteten Ebene. Auch das Verzweigungsmuster der Infloreszenz und die relative Länge der Staubblätter im Vergleich zur gesamten Blüte zeigen keinen ersichtlichen Zusammenhang mit der plastidären Phylogenie (hier nicht gezeigt, vgl. Krapp 2009).

### Zusammenhänge zwischen der Höhenverbreitung und der Phylogenie

Vertreter von *Dyckia* kommen in Höhen vom Meeresspiegel bis hinauf auf 3.000 m vor. Allerdings wachsen die meisten Arten im Tiefland und Höhen über 2.000 m werden nur selten erreicht (Smith & Downs 1974). Die Arten von *Encholirium* sind in Hinsicht auf ihre Höhenverbreitung sehr viel weniger variabel. Lediglich zwei Arten, *E. horridum* und *E. spectabile* kommen unterhalb von 600 m vor, als maximale Höhe gibt Forzza (2005) 1.480 m für *E. vogelii* an. Die Fähigkeit zum Leben in besonders geringen oder großen Höhen scheint daher erst innerhalb von *Dyckia* entstanden zu sein, wobei bisher unklar ist, welche Faktoren und möglichen Schlüsselmerkmale hier eine Rolle spielen.

Auch innerhalb von *Dyckia* gibt es zwischen der plastidären Phylogenie und der Höhenverbreitung der untersuchten Pflanzen einige Zusammenhänge (Abbildung 36). So wachsen die Vertreter der paraguayischen Klade fast ausschließlich unterhalb von 600 m Höhe. Lediglich *D. pulquinensis*, die Schwestergruppe aller anderen Vertreter dieser Klade, kommt in einer selbst für *Dyckia* außergewöhnlich großen Höhe von 1.700 m und darüber vor. Innerhalb der südbrasilianischen Klade wachsen alle diejenigen Pflanzen, die auch tatsächlich aus den drei südlichsten Bundesstaaten Brasiliens stammen unter 100 m Höhe und bilden eine gut gestützte Subklade. Die beiden anderen Subkladen der südbrasilianischen Klade enthalten dagegen Pflanzen, die aus weiter nördlich gelegenen Regionen stammen und in 1.000-1.200 m Höhe wachsen. In der zentralbrasilianischen und der argentinischen Klade dominieren jeweils Pflanzen, die oberhalb von 600 m wachsen, zumeist in Höhen von 800-1.000 m. Von den Pflanzen, die keiner der vier großen Kladen von Core-*Dyckia* angehören, wachsen fünf unterhalb von 600 m. Eine der beiden Pflanzen, die den zentralen Haplotypen des cpDNA Netzwerkes trägt (vgl. Abbildung 23) wurde in 949 m Höhe gefunden. Von den beiden innerhalb von *Dyckia* zuerst abzweigenden kleinen Linien stammt *D. espiritosantensis* aus 196 m im Tiefland, *D. beateae* aus 900 m Höhe.

Diese Zusammenhänge zwischen Phylogenie und Höhe der Standorte stehen grob im Einklang mit der in 4.3.1 aufgestellten Hypothese zur historischen Biogeographie. Demnach migrierten die Vorläufer von Core-*Dyckia* nach der Trennung von *Encholirium* in die tieferen

## Diskussion

Regionen des südlichen Brasiliens. Dabei ist für die frühen Vorläufer eine Anpassung an mittlere Höhen wie bei *Encholirium* anzunehmen, wie sie in der zuerst abzweigenden Linie beobachtet wurde. Danach entwickelten sich die für das Leben im Tiefland nötigen Errungenschaften und die Radiation von *Core-Dyckia* begann. Dies spiegelt sich darin wieder, dass sowohl die Schwestergruppe von *Core-Dyckia* als auch sieben der 10 Linien innerhalb von *Core-Dyckia* Bewohner tiefer gelegener Regionen sind. Somit lebten die ursprünglichen Vertreter von *Dyckia* im Hochland, die ursprünglichen Vertreter von *Core-Dyckia* dagegen im Tiefland.

### Generelle Anmerkungen zur Merkmalskartierung in *Dyckia*

Eine Kartierung insbesondere morphologischer Merkmale auf die in dieser Arbeit ermittelte plastidäre Phylogenie bringt diverse Probleme mit sich. Zum einen stellt sich die Frage, inwiefern die ermittelte Phylogenie der Plastiden überhaupt die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Arten widerspiegelt. Zweitens ist die Auflösung insbesondere innerhalb der großen Kladen von *Core-Dyckia* sehr begrenzt. Drittens bestand bei einigen der untersuchten Pflanzen keine Möglichkeit, blühende Exemplare zu untersuchen. In diesen Fällen musste die Blütenfarbe aus den angegebenen Artnamen über Literaturrecherchen ermittelt werden (z. B. Smith & Downs 1974; Winkler 1982). Im Falle der Blütenfarbe besteht das besondere Problem, dass viele Arten von *Dyckia* ausschließlich auf Basis von Herbarbelegen beschrieben wurden und Farben nicht angegeben sind. Auch bei vielen anderen Merkmalen sind die Beschreibungen stark von ihren Autoren abhängig und häufig unvollständig. Die genannten Unsicherheiten werden schließlich noch dadurch verschärft, dass viele Arten von *Dyckia* mit den verfügbaren Schlüsseln ausgesprochen schwer zu bestimmen sind (vgl. 1.2.4). Im Falle einer Fehlbestimmung und anschließender Rekonstruktion von Merkmalen durch Literaturarbeit ergeben sich nicht abschätzbare Fehler. Weniger gravierend sind die oben genannten Probleme bezüglich der Höhenverbreitung, da Fundorte zumeist gut dokumentiert sind. Trotzdem musste die Höhe in einigen Fällen aus Literaturangaben über die jeweilige Art abgeschätzt werden, sofern solche Angaben überhaupt existierten (Smith & Downs 1974).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Datenlage für belastbare Hypothesen zur Evolution morphologischer Merkmale innerhalb von *Dyckia* derzeit nicht ausreicht. Sowohl eine höher aufgelöste Phylogenie als auch die direkte Beobachtung der unter vergleichbaren Bedingungen kultivierten Lebendpflanzen sind nötig um hier gesicherte Erkenntnisse zu erlangen.

### 4.3 Evolution und Geschichte von *Dyckia*

#### 4.3.1 Historische Biogeographie von *Dyckia* und *Encholirium*

Aus den bisher verfügbaren Daten, insbesondere der plastidären Phylogenie und dem Haplotypennetzwerk, lässt sich eine Hypothese zur historischen Biogeographie entwickeln, die im Folgenden näher ausgeführt und in Abbildung 37 illustriert wird. Nach der Trennung von *Deuterocohnia*, vermutlich in Bolivien, gelangten die gemeinsamen Vorläufer von *Dyckia* und *Encholirium* vor 6,2-5,6 Millionen Jahren nach Zentralbrasilien (Abbildung 37 A). Danach begann die zunächst vergleichsweise langsame Differenzierung von *Encholirium* (Abbildung 37 B). Die drei beziehungsweise vier in dieser Arbeit gefundenen Hauptlinien von *Encholirium* entstanden vermutlich in der Zeit bis vor 4,6 Millionen Jahren. Die weitere Diversifizierung dieser Linien erfolgte dann innerhalb der letzten 3,0 Millionen Jahre.

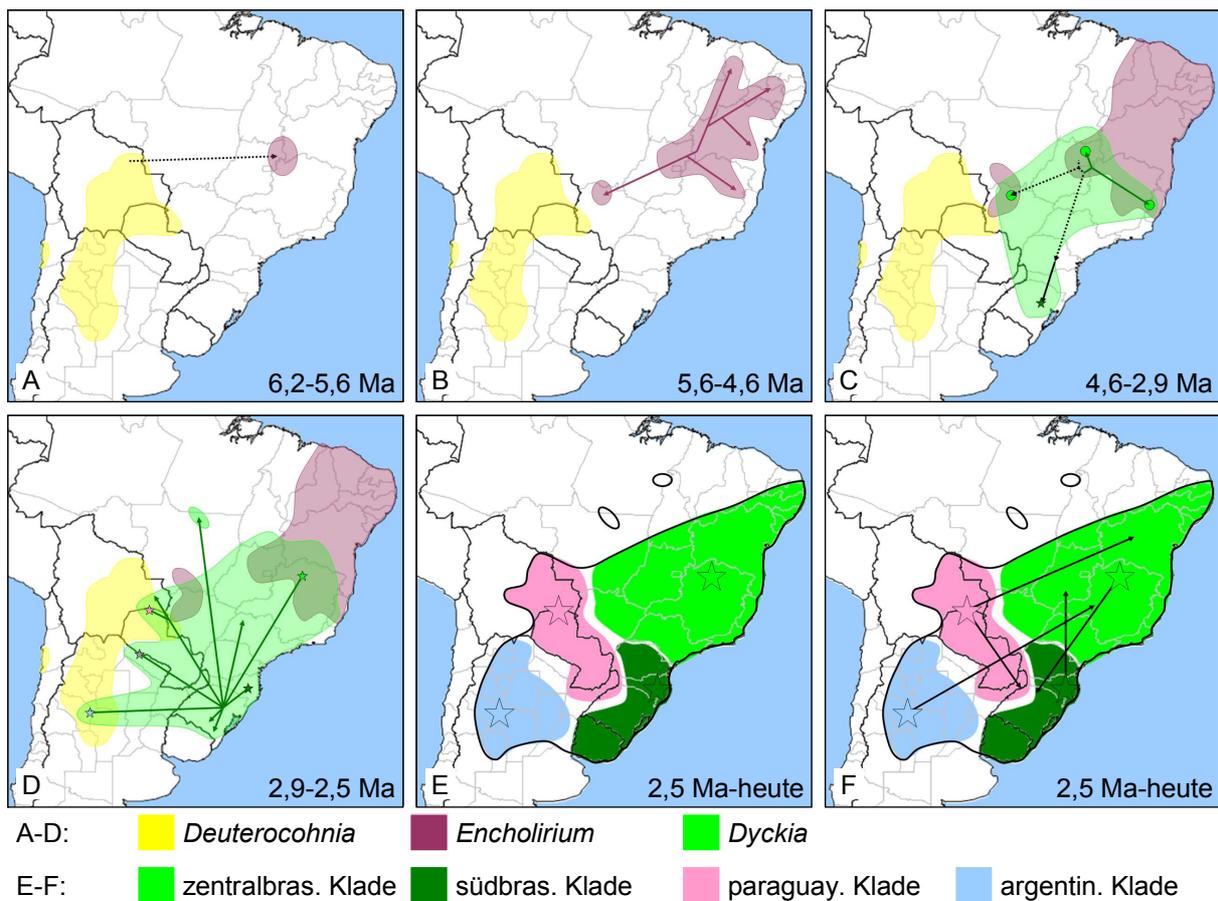
Wo genau die Abtrennung des Vorläufers aller heutigen *Dyckia*-Arten von *Encholirium* stattfand, lässt sich aus den gewonnenen Daten nicht folgern. Zur Klärung dieser Frage wäre eine Einbeziehung von *E. lymanianum* in die Untersuchung von besonderem Interesse. Diese Art kommt disjunkt in Mato Grosso und Mato Grosso do Sul vor, also in genau jenem Gebiet, das auch die Heimat der zuerst abgespaltene Linie von *Dyckia* ist. Allerdings ist *E. lymanianum* nur schwer von Vertretern von *Dyckia* in dieser Region zu unterscheiden. Forzza (2005) mutmaßt, dass *E. lymanianum*, *D. exserta* und *D. ferruginea* tatsächlich ein und dieselbe Art repräsentieren könnten. In diesem Fall wäre der ursprünglichste Vertreter von *Dyckia* wohl von Goiás oder Minas Gerais ausgehend nach Süden gelangt. Leider stand von *E. lymanianum* kein Material für die vorliegende Untersuchung zur Verfügung.

Die rezenten Arten von *Dyckia* begannen vor etwa 4,0 Millionen Jahren, sich zu diversifizieren (Abbildung 37 C). Die nur drei gefundenen rezenten Vertreter der zwei zuerst abgespaltenen Linien leben heute in den zentralbrasilianischen Bundesstaaten Mato Grosso do Sul, Goiás und Espírito Santo.

Der zentrale Haplotyp von Core-*Dyckia* finden sich heute in Pflanzen aus dem südlichsten Brasilien (Abbildung 23). Die massive Radiation, während der alle großen Hauptlinien von Core-*Dyckia* entstanden, fand demnach vor etwa 2,9 Millionen Jahren vom Süden Brasiliens ausgehend statt (Abbildung 37 D).

Die weitere Diversifizierung der Gattung ereignete sich dann innerhalb der letzten 2,5 Millionen Jahre. Die vier großen Kladen begannen mit der Besiedlung ihrer jeweiligen Verbreitungsgebiete, die heute klar voneinander getrennt sind und sich nicht überlappen (Abbildung 37 E, vgl. auch 4.2.2). Für die zentralbrasilianische Klade kann eine intensive sekundäre Radiation angenommen werden. In den übrigen Kladen verlief die Diversifizierung

## Diskussion



### Abbildung 37: Hypothese zur historischen Biogeographie

Gezeigt ist das aus den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten rekonstruierte Szenario der Diversifizierung von *Dyckia* und *Encholirium*. Die Farbkodierung entspricht in den Bildern A-D den drei gezeigten Gattungen. In den Bildern E und F ist ausschließlich *Dyckia* gezeigt, die Farbkodierung weist auf die gefundenen Kladen innerhalb von *Dyckia* hin, entsprechend der Legende am unteren Rand. Kleine Sterne stehen für beginnende Diversifizierungsereignisse, große Sterne für fortgeschrittene. Gepunktete Linien verweisen auf Unsicherheiten über Besiedelungswege. A: Ausbreitung des gemeinsamen Vorläufers von *Dyckia* und *Encholirium* von Bolivien ausgehend nach Brasilien. B: Entstehung der Hauptlinien von *Encholirium*. C: Abspaltung von *Dyckia* und Ausbreitung nach Süden unter Abspaltung zweier heute wenig diversifizierter Linien. D: Erste Radiation von *Dyckia* im Süden Brasiliens, Entstehung aller Hauptlinien. E: Verbreitungsgebiete der vier großen Kladen in heutiger Zeit. F: Fernausbreitung oder Migration einzelner Linien nach Etablierung der großen Kladen.

offensichtlich langsamer. Aus jeder der vier großen Kladen verließen nur einzelne kleinere Linien innerhalb der letzten 2,5 Millionen Jahre das jeweilige Verbreitungsgebiet (Abbildung 37 F).

Insgesamt ist die strikte Limitierung von plastidär definierten Kladen auf distinkte Regionen bemerkenswert. Zur Erklärung können zwei sich ergänzende Erklärungen herangezogen werden. Zum einen sind die Kladen innerhalb von *Dyckia* außergewöhnlich jung. Somit war nur wenig Zeit etwa für Fernausbreitungsereignisse oder anderweitige zu Durchmischung führende Mechanismen. Zum anderen scheint die Samenausbreitung bei *Dyckia* recht ineffektiv zu sein (vgl. 1.2.3) und plastidäre DNA wird in den Bromeliaceae vermutlich wie in den meisten anderen Angiospermen nur maternal, also über die Samen verbreitet. Die aus

## Diskussion

der Sequenzierung des nukleären Locus *phyC* gewonnenen Erkenntnisse weisen hingegen auf einen vielfach höheren Austausch von genetischem Material des Zellkerns hin (vgl. 4.3.5). Dieses wird über Pollen und über Samen ausgebreitet.

Extinktionen, weitere Fernausbreitungsereignisse, Migrationen und möglicherweise neue Diversifizierungswellen werden vermutlich dazu führen, dass sich dieses derzeit klare geographische Muster in der Zukunft langsam auflöst. Eine ähnliche Situation wie bei *Dyckia* findet sich in *Deuterocohnia* (Schütz 2012). Die beiden Kronengruppen dieser in der plastidären Phylogenie paraphyletischen Gattung sind ebenfalls sehr jung. Die Samen von *Deuterocohnia* haben stark reduzierte Anhängsel und sind vermutlich ebenfalls wenig mobil. Für die ältere Gattung *Fosterella* zeigt sich hingegen eine weniger klare geographische Limitierung der gefundenen Kladen (Wagner et al. 2012). In ersten Untersuchungen an *Pitcairnia* wurde kein erkennbarer Bezug zwischen der Plastiden-Phylogenie und der geographischen Verbreitung beobachtet (Schubert, unveröffentlichte Daten). Dies kann einerseits durch das höhere Alter, aber auch durch die möglicherweise mobileren Samen von *Pitcairnia* erklärt werden (vgl. Abbildung 4).

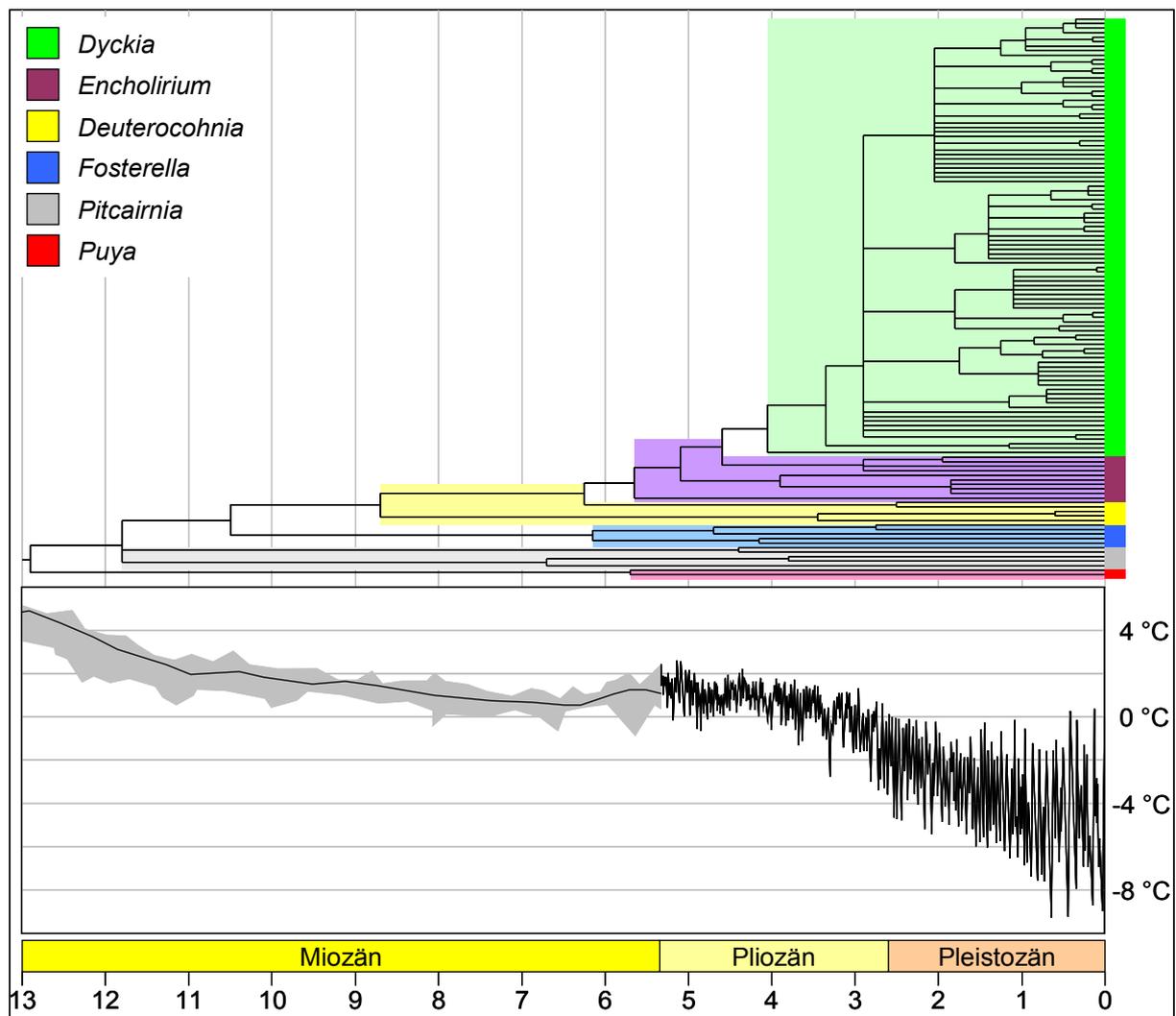
### 4.3.2 Klima- und Habitatgeschichte im Verbreitungsgebiet von *Dyckia*

#### Klimageschichte in Miozän, Pliozän und Pleistozän

Der Ursprung der Kronengruppe der Bromeliaceae liegt nach den Berechnungen von Givnish et al. (2011) etwa 19 Millionen Jahre zurück. Dieser Zeitpunkt liegt in der Serie des Miozän, das sich über den Zeitraum von 20,03-5,332 Millionen Jahren vor heute erstreckte (Gradstein et al. 2004). Die meisten der heutigen Unterfamilien der Bromeliaceae entstanden vor etwa 16 bis 14 Millionen Jahren (Givnish et al. 2011). Während dieser Zeit, nämlich vor 15 Millionen Jahren, trat ein klimatisches Optimum mit hohen Temperaturen und hoher Feuchtigkeit auf (Zachos et al. 2001). Danach wurde es zunehmend kühler und trockener (Abbildung 38). Zwischen 10 und 6 Millionen Jahren vor heute fand die bisher letzte rapide Phase der Auffaltung der Anden statt (Ghosh et al. 2006). Als direkte Folge der Anhebung der Anden und den damit einhergehenden Veränderungen der Windsysteme wurde das Klima im atlantischen Regenwald und der Serra do Mar entlang der Küste des südlichen Brasiliens gegen Ende des Miozäns lokal kühler, aber auch feuchter (Ehlers & Poulsen 2009).

Die auf das Miozän folgende Serie des Pliozän (5,332-2,588 Millionen Jahre vor heute, Gradstein et al. 2004) zeichnete sich durch ein relativ stabiles Klima aus. Die globale Durchschnittstemperatur lag immer noch etwa 5 °C über der heutigen (Lisiecki & Raymo 2005). In diesen Zeitraum fällt auch die Schließung des Isthmus von Panama vor etwa 3,5

## Diskussion



**Abbildung 38: Klimaentwicklung während der Geschichte von *Dyckia***

Im oberen Bereich der Abbildung ist die datierte Phylogenie aus der BEAST-Analyse gezeigt (vgl. 3.2.2). Die Farbkodierung der Gattungen ist im linken oberen Teil erklärt. Der Graph im unteren Bereich zeigt die Entwicklung der globalen Durchschnittstemperatur, rekonstruiert aus Verhältnissen von Sauerstoffisotopen in benthischen Sedimentbohrkernen. Für die Zeit von 13,0-5,5 Millionen Jahren ist die gemittelte Temperatur als Linie und der Schwankungsbereich als graue Fläche dargestellt (Zachos et al. 2001). Für die Zeit von 5,5 Millionen Jahren bis heute ist der exakte Temperaturverlauf gezeigt (Lisiecki & Raymo 2005). Die Temperaturskala wurde mit Daten aus Eisbohrkernen geeicht (Petit et al. 1999; EPICA community 2004). Angegeben ist die Abweichung von der mit 0 °C bezeichneten heutigen globalen Durchschnittstemperatur. Die erdgeschichtlichen Zeitabschnitte entsprechen der Definition von Gradstein et al. (2004).

Millionen Jahren (Antonelli et al. 2009), was teils gravierende Veränderungen insbesondere der Fauna Südamerikas nach sich zog. Als prägendes Ereignis für das Cerrado muss die in dieser Periode erfolgende rapide Ausbreitung von C<sub>4</sub>-Photosynthese betreibenden Gräsern gesehen werden. Während diese Pflanzen in Savannen in anderen Teilen der Welt schon früher dominant geworden waren (z. B. Zachos et al. 2001), setzten sie sich im Cerrado wohl erst vor etwa 4 Millionen Jahren großflächig durch (Simon et al. 2009). Als drastischer Umbruch wird in diesem Zusammenhang die Zunahme von Bränden gesehen, denn die weiten mit Gräsern bestandenen Flächen sind besonders anfällig für die Entzündung durch

## Diskussion

Blitzschlag. Der Einfluss von Feuer wurde bereits mehrfach als prägend für die Vegetation des Cerrados beschrieben (z. B. Abreu Ferreira et al. 2010).

Die Serie des Pleistozän (2,588 Millionen-11.672 Jahre vor heute, Gradstein et al. 2004) zeichnete sich durch eine starke Verringerung der globalen Durchschnittstemperatur aus. Weiterhin war die durchschnittliche Temperatur starken Schwankungen unterworfen (Abbildung 38). So wechselten sich in zyklischen Abständen Warm- und Kaltzeiten ab. Innerhalb dieser Zyklen, welche innerhalb der letzten 1 Million Jahre etwa 100.000 Jahre, davor etwa 41.000 Jahre dauerten, variierte die globale Durchschnittstemperatur teils um mehr als 5 °C innerhalb kürzester Zeit (Lisiecki & Raymo 2005).

### Das Klima während der Trennung von *Dyckia*, *Encholirium* und *Deuterocohnia*

Die globale Abkühlung gegen Ende des Miozäns eröffnete möglicherweise Korridore für die Migration an Trockenheit angepasster Pflanzen und Tiere in den tieferen Regionen Boliviens und im Westen Brasiliens. So dehnten sich trockene Habitate von den Höhenlagen zunehmend ins Tiefland hin aus und ermöglichten xerophytischen Pflanzen, sich dort zu etablieren (z. B. Winkler 1986). Es ist anzunehmen, dass die gemeinsamen Vorläufer von *Dyckia* und *Encholirium* durch solche Korridore von Bolivien ausgehend ins heutige Brasilien gelangten. Über die Gründe, warum *Deuterocohnia* sich nicht in diese Richtung ausbreiten konnte, kann nur spekuliert werden (Schütz 2012). Eine mögliche Erklärung könnte in den verholzenden Infloreszenzen von *Deuterocohnia* zu suchen sein. Hier investieren die Pflanzen viel Energie in die Ausbildung eines mehrjährigen Blütenstandes. Sollten die Infloreszenzen aber im Tiefland in verstärktem Maße der Gefahr der Zerstörung durch Feuer oder große Herbivoren ausgesetzt sein, könnten einjährige Blütenstände einen Selektionsvorteil bedeuten. Forzza (2005) beobachtete beispielsweise an Infloreszenzen von *Encholirium vogelii* häufig starke Zerstörungen durch Tierfraß.

Das erste Auftreten des gemeinsamen Vorläufers von *Dyckia* und *Encholirium* im Osten Brasiliens fällt in die Zeit nach dem Abschluss der letzten raschen Phase der Hebung der Anden. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich das Klima dort vermutlich stärker als im globalen Mittel abgekühlt und es war feuchter geworden, dennoch lag die Durchschnittstemperatur noch über der heutigen. Ein Grund für das Durchsetzen und dauerhafte Verbleiben des Vorläufers der beiden Gattungen und seiner Nachkommen in ihrem neuen Verbreitungsgebiet mag die Resistenz gegen die im späteren Pliozän verstärkt auftretenden Brände gewesen sein (vgl. 1.2.3). Die Trennung der Hauptlinien von *Encholirium*, die Entstehung von *Dyckia* und die Abspaltung zweier bis heute kaum diversifizierter Linien innerhalb von *Dyckia* verliefen fast komplett im Pliozän. Also fällt diese Phase langsamer

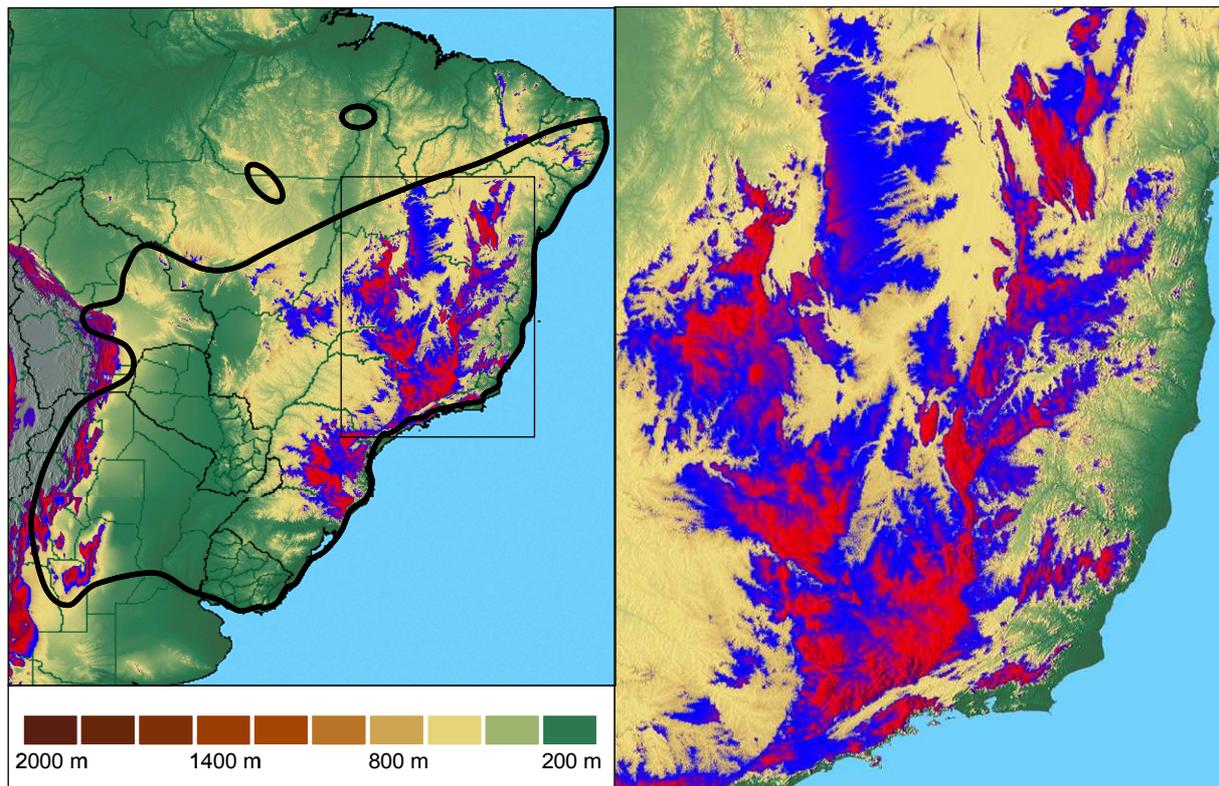
## Diskussion

Diversifizierung in einen Zeitraum stabilen Klimas. Die Radiationen von *Dyckia*, aber auch die weitere Diversifizierung von *Encholirium* ereigneten sich dagegen fast komplett im Pleistozän, einem Zeitalter rapider Klimaschwankungen. Diese Zusammenhänge legen den Schluss nahe, dass der periodische Wechsel von Warm- und Kaltzeiten eine treibende Kraft hinter der raschen Diversifizierung insbesondere von *Dyckia* war.

### Historische Entwicklung der Campos Rupestres

Antonelli et al. (2010) modellierten die Ausdehnung der Campos Rupestres während kühlerer Perioden der Erdgeschichte. Während diese Ökoregion heute für gewöhnlich auf Höhenlagen oberhalb von 1.000 m Höhe beschränkt ist, lag ihre Untergrenze während der Kaltzeiten der letzten Millionen Jahre vermutlich bei etwa 800 m. Diese Absenkung resultierte in einer enormen Flächenzunahme und Verschmelzung vieler heute isolierter Fragmente der Campos Rupestres (Abbildung 39). Für *Dyckia* und *Encholirium* geeignete Habitate im Osten Brasiliens waren zu diesen Zeiten demnach weniger fragmentiert als heute. In der Serra do Caiapó im äußersten Westen des Bundesstaates Goiás gibt es zudem große Bereiche in 800-1000 m Meereshöhe, auf denen sich in kälteren Zeiten potentiell Campos Rupestres etablieren konnten. Selbst im Südosten von Mato Grosso existieren solche Gebiete, kleinere Fragmente finden sich verstreut bis in den Südwesten an die Grenze Boliviens, die Heimat von *Deuterocohnia*. Möglicherweise dienten diese Gebiete als Trittsteine für die Migration des gemeinsamen Vorläufers von *Dyckia* und *Encholirium* nach Osten (blau unterlegte Bereiche in Abbildung 39). Allerdings lag die globale Durchschnittstemperatur in dieser Periode nicht deutlich unter der heutigen. Es ist aber durchaus möglich, dass auch andere, derzeit ungeklärte Faktoren eine Ausdehnung der Campos Rupestres bewirkt haben könnten.

Die Frequenz der periodischen Ausdehnung und Kontraktion der Campos Rupestres war zweifellos im Pleistozän am höchsten (Antonelli et al. 2010). Dasselbe ist für die entsprechenden Areale der Arten von *Dyckia* anzunehmen. In kälteren und trockeneren Zeiten bildeten sich möglicherweise Korridore zwischen ansonsten isolierten Habitaten. Durch solche Korridore konnte *Dyckia* einerseits bis dato unbesiedelte Campos Rupestres erreichen. Andererseits dürften solche Verbindungen auch zu verstärktem Genfluss und sogar der Verschmelzung von Arten infolge von sekundärem Kontakt geführt haben. Stebbins (1984) postulierte für solche Szenarien eine verstärkte Artbildungsrate durch Hybridisierung und Polyploidisierung. Länger voneinander isolierte Populationen könnten demnach divergente Umstrukturierungen ihrer Chromosomen anhäufen. Bei sekundärem Kontakt würde dies in einer reduzierten Fitness von Hybriden resultieren, was durch Polyploidisierung aber umgangen würde. Für *Dyckia* scheint dieser Mechanismus wohl keine



**Abbildung 39: Modellierung der Ausdehnung von Campos Rupestres in vergangener Zeit**

Gezeigt sind die Höhenstufen im Verbreitungsgebiet von *Dyckia* (mit dicken schwarzen Linien umrandet). Rot markiert sind Bereiche über 1.000 m, wo sich die Campos Rupestres in heutiger Zeit zumeist befinden. Blau eingefärbt sind Höhen von 800-1.000 m, in die sich die Campos Rupestres während der Klimaschwankungen des Pleistozäns zeitweise ausdehnten (z. B. Antonelli et al. 2010). Höhen über 2.000 m sind grau dargestellt. Im Übrigen entsprechen die Farben der am linken unteren Rand gezeigten Legende. Im rechten Bildteil ist die Region um den Bundesstaat Minas Gerais, das Diversitätszentrum von *Dyckia*, vergrößert dargestellt. Reliefkarte basierend auf SRTM- und GTOPO30-Daten (erstellt nach Braxmeier 2012).

große Rolle gespielt zu haben, da polyploide Arten wohl eher selten sind (Sharma & Ghosh 1969; Brown & Gilmartin 1989; Cotias-de-Oliveira et al. 2000; Gitaí et al. 2005). Eine umfassende Studie zu Chromosomenzahlen und Genomgrößen in *Dyckia* und *Encholirium* existiert allerdings nicht. Der offenbar dennoch gravierende Einfluss der Klimaschwankungen auf die Evolution von *Dyckia* wird in Abschnitt 4.3.5 diskutiert.

#### 4.3.3 Diversifizierung anderer Pflanzengruppen im Verbreitungsgebiet von *Dyckia*

Bisher haben sich nur wenige molekulare Untersuchungen mit Organismengruppen befasst, die im gleichen Verbreitungsgebiet wie *Dyckia* vorkommen und ähnlich rasche Diversifikationen erfahren haben. Beheregaray (2008) moniert gar einen generellen Mangel an phylogeographischen Studien für Organismengruppen der südlichen Hemisphäre. Zudem sind nicht viele zuverlässig datierte Phylogenien verfügbar (z. B. Antonelli & Sanmartín 2011). Von besonderer Relevanz für einen Vergleich mit *Dyckia* sind Studien an Pflanzengruppen mit ähnlicher Verbreitung und Standortansprüchen, etwa andere Bewohner der Campos Rupestres. Solche Vergleiche könnten Hinweise auf mögliche

## Diskussion

Schlüsselinnovationen und Speziationsmechanismen geben. Aber auch andere Organismengruppen können von Interesse sein.

### Hoffmannseggella (Antonelli et al. 2010; Gustafsson et al. 2010)

Ein typischer Bestandteil der Vegetation der Campos Rupestres sind Vertreter der Gattung *Hoffmannseggella* (Orchidaceae). Basierend auf einer Analyse der nukleären *ITS*-Region erstellten Antonelli et al. (2010) eine datierte Phylogenie der Gattung. Das erhaltene Alignment ist mit weniger als 700 bp vergleichsweise kurz und die erhaltene Auflösung des Stammbaums extrem gering. Eine BEAST-Analyse des Datensatzes mit einem einzelnen sekundären Kalibrierungspunkt deutet auf ein Alter der Gattung von etwa 11 Millionen Jahren hin (Gustafsson et al. 2010). Das 95%-Konfidenzintervall dieses Wertes wird allerdings mit 5-20 Millionen Jahren angegeben. Trotz der erheblichen Mängel der Analyse hinsichtlich erzielter Auflösung und Zuverlässigkeit der Datierung können interessante Vergleiche zu *Dyckia* gezogen werden.

Antonelli et al. (2010) beschreiben die zuvor erwähnte rhythmische Ausdehnung und Kontraktion der Campos Rupestres als treibende Kraft hinter der Diversifizierung von *Hoffmannseggella* (siehe auch 4.3.2). So spalteten sich die neun zu Beginn des Pliozäns existenten Linien bis heute in insgesamt 41 verschiedene Arten auf. Die immer stärker werdenden periodischen Klimaschwankungen zu Beginn des Pliozäns und deren besondere Intensivierung im Pleistozän (vgl. Abbildung 38) werden als Ursache hierfür angegeben. Da sich *Dyckia* überwiegend im Pleistozän diversifizierte, hatten diese Veränderungen sicher auch einen Einfluss auf die Ausdehnung passender Habitate für *Dyckia*. Ein direkter Vergleich mit *Hoffmannseggella* ist aber nur bedingt zulässig.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen *Hoffmannseggella* und *Dyckia* liegt im jeweiligen Ursprung der Pflanzen. Die frühen Vertreter von *Hoffmannseggella* wuchsen offenbar schon im heutigen Verbreitungsgebiet, bevor das Cerrado, die Mata Atlântica und wohl auch die Campos Rupestres ihre heutige Form annahmen. Die Vorläufer von *Dyckia* und *Encholirium* hingegen gelangten erst vor etwa 6 Millionen Jahren in diese Region, als die vorerst letzte Phase der Auffaltung der Anden gerade abgeschlossen war und die periodischen Klimaschwankungen zunahmen (siehe 4.3.1). Die Rückkehr von *Dyckia* in die Campos Rupestres nach der zwischenzeitlichen Migration ins Tiefland im Süden Brasiliens fand gar erst vor weniger als 3 Millionen Jahren statt.

Somit kann *Hoffmannseggella* als Beispiel für eine Gattung dienen, deren Anpassungen sich bereits vor oder spätestens mit der Entstehung des Habitates entwickelten. Die Diversifizierung erfolgte dann im Kontext der zunächst nur langsam einsetzenden

## Diskussion

klimatischen Veränderungen. Dagegen entwickelten sich zumindest einige wichtige Eigenschaften von *Dyckia* vermutlich außerhalb der Campos Rupestres, nämlich einerseits vor und kurz nach der Trennung von *Deuterocohnia* in Bolivien und später im Tiefland im Süden Brasiliens. Bei der Ankunft der Vorgänger der zentralbrasilianischen Klade in den Campos Rupestres dürften diese Habitate ihrem heutigen Erscheinungsbild bereits stark geähnelt haben. Die oszillierenden Klimaveränderungen waren ferner bereits in vollem Gange. Es ist also von einer Radiation der Gattung *Dyckia* in ein bestehendes Ökosystem hinein auszugehen.

### Sukkulente Caryophyllales (Arakaki et al. 2011)

Arakaki et al. (2011) publizierten eine sehr umfassende datierte Phylogenie sukkulenter Pflanzen der Caryophyllales, insbesondere der Cactaceae. Innerhalb der Cactaceae bilden die Notocactaceae und die Cereeae gemeinsam eine große, auf Südamerika beschränkte Klade. Deren Diversifizierung begann mit der Aufspaltung in zwei Linien vor etwa 15 Millionen Jahren, die meisten Linien entstanden aber deutlich später. Für die nahezu auf Brasilien beschränkten Cereinae wird ein Alter von 7,5-6,5 Millionen Jahren angegeben, die meisten Linien entstanden innerhalb der letzten 5 Millionen Jahre. In diesem Zusammenhang kann auch die Arbeit von Roncal et al. (2011) genannt werden. Hier wird die Palmenart *Geonoma brevispatha* (Arecaceae) als Indikatorart für das Cerrado identifiziert und das Alter dieser Ökoregion darauf basierend mit 5,2 Millionen Jahren angegeben. Innerhalb der Caryophyllales ist die Präadaption zur Ausbildung von Sukkulenz offenbar sehr alt. Daher sehen Arakaki et al. (2011) in der Ausbildung sukkulenter Sprosse keine Schlüsselinnovation für eine rapide Diversifizierung. Vielmehr wird die rasche Ausbreitung arider Habitate als Motor zur Diversifizierung gesehen.

### Resistenzen gegen Feuer in Fabaceae und Melastomataceae (Simon et al. 2009)

Simon et al. (2009) verglichen datierte Phylogenien der Gattungen *Mimosa*, *Andira* und *Lupinus* (alle Fabaceae) und des Tribus Microlicieae (Melastomataceae). Die Diversifizierung der innerhalb dieser Gattungen im Cerrado auftretenden Linien begann hier jeweils vor weniger als 10 Millionen Jahren, der weitaus größte Teil der Linien entstand jedoch erst innerhalb der letzten 4 Millionen Jahre. Die Autoren der Studie nehmen an, dass die Ausbildung von Resistenzen gegen Feuer die Schlüsselinnovation für den Erfolg und die Diversifizierung insbesondere der artenreichen Gattung *Mimosa* und der Microlicieae war (siehe auch Fritsch et al. 2004). Solche Resistenzen entstanden innerhalb von *Mimosa* und *Andira* mehrfach. Die Autoren gehen davon aus, dass sich diese Innovationen jeweils in situ,

## Diskussion

also innerhalb des Cerrados entwickelten. Eine Einwanderung bereits an Feuer angepasster Linien in das entstehende Cerrado wird dagegen als unwahrscheinlich angesehen.

### Rückschlüsse in Bezug auf *Dyckia*

Für Organismengruppen insbesondere des Cerrados, aber auch der Mata Atlântica und der Campos Rupestres gibt es letztlich doch eine ganze Reihe an datierten Phylogenien (Berry et al. 2004; Fritsch et al. 2004; Almeida et al. 2007; Elias et al. 2009; Simon et al. 2009; Antonelli et al. 2010; Gustafsson et al. 2010; Maraví 2010; Arakaki et al. 2011; Roncal et al. 2011). Als Konsens aus der Mehrzahl dieser Arbeiten kann eine parallele Entstehung dieser drei eng miteinander verbundenen und verzahnten Ökoregionen angenommen werden. Viele der untersuchten Organismengruppen traten vor etwa 10 Millionen Jahren erstmals in der Region auf, so etwa *Hoffmannseggella* (Antonelli et al. 2010; Gustafsson et al. 2010), *Fuchsia* (Berry et al. 2004), *Mimosa*, *Andira*, *Lupinus* und die Microlicieae (Simon et al. 2009). Eine teils starke Erhöhung der Diversifizierungsraten wurde ab etwa 6 Millionen Jahren vor heute beobachtet, so für die dort lebenden Vertreter der Bromelioideae (Bromeliaceae, Givnish et al. 2011) und die Gattung *Hoffmannseggella* (Gustafsson et al. 2010). Dies fällt in etwa mit dem vermutlichen Zeitpunkt der Entstehung der Habitate dieser Region in ihrer heutigen Form zusammen (Ehlers & Poulsen 2009; Givnish et al. 2011; Roncal et al. 2011). Einige der Organismengruppen zeigen ferner eine stark zunehmende Diversifizierung ab etwa 3 Millionen Jahren vor heute, so beispielsweise *Mimosa* (Simon et al. 2009). Dies markiert in etwa die beginnende Intensivierung der Klimaschwankungen des Pleistozäns.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich sehr gut mit den anhand anderer Organismengruppen gewonnenen Erkenntnissen. So fällt die beginnende Diversifizierung der gemeinsamen Vorläufer von *Dyckia* und *Encholirium* in die Zeit der Entstehung der Pflanzengesellschaften dieser Gegend. In der Phase bis zur beginnenden Radiation von *Dyckia* durchliefen diese Pflanzen eine ähnliche Diversifizierung wie andere dort heimische Lebewesen. Die vor etwa 2,6 Millionen Jahren einsetzenden rapiden Klimaschwankungen des Pleistozäns spiegeln sich auch in der Phylogenie anderer Pflanzengattungen wider. Eine explosive Radiation wie bei *Dyckia* bleibt aber in den bisher untersuchten Taxa eine sehr seltene Ausnahme.

Hypothesen über die Gründe für die rasche Diversifizierung wurden bereits für einige Pflanzengruppen erörtert, die in den trockenen Habitaten Brasiliens Radiationen durchlaufen haben. Im Cerrado stellt eine in situ entwickelte Resistenz gegen Feuer sicherlich eine plausible Erklärung für den Erfolg dar. Die heutigen Habitate von *Dyckia* und *Encholirium*

## Diskussion

sind weniger stark durch regelmäßige Brände beeinflusst (vgl. 1.2.2, 1.2.3 und 4.3.2). Obwohl die Arten beider Gattungen eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegen Feuer zeigen, spielten Brände für die beginnende Diversifizierung des Komplexes aus *Dyckia* und *Encholirium* wohl keine so große Rolle. Wichtiger war sicherlich der in kurzen zeitlichen Abständen abwechselnd schrumpfende und sich ausdehnende Lebensraum. Dieser exogene Faktor wird auch für Vertreter der Caryophyllales dieser Region angenommen (Arakaki et al. 2011). Die Pflanzen mussten also im Wesentlichen die Fähigkeit zur xerophytischen Lebensweise mitbringen. Für die besonders schnelle Radiation von *Dyckia*, aber auch für die zunehmende Diversifizierung von *Encholirium* findet sich in der von Antonelli et al. (2010) rekonstruierten Geschichte der Campos Rupestres eine plausible Begründung.

Sowohl *Hoffmannseggella* als auch *Dyckia* und *Encholirium* gelten als typische Bewohner der Campos Rupestres. Diese stellen allerdings kein einheitliches Ökosystem dar, sondern vielmehr eine fragmentierte Ansammlung zumindest floristisch stark unterschiedlicher Habitate (vgl. Alves & Kolbek 2010). Dies wird auch bei der Betrachtung der enormen Biodiversität im Vergleich zur recht geringen von Campos Rupestres bedeckten Fläche deutlich (siehe 1.2.2). Aufgrund der Heterogenität der Campos Rupestres ist unklar, wie ähnlich die Habitate von *Dyckia* und *Hoffmannseggella* tatsächlich sind. Selbst zwischen *Dyckia* und *Encholirium* scheinen bisher unerkannte Unterschiede in den besiedelten Habitaten zu bestehen. Und so ist nicht auszuschließen, dass die Ausdehnung und Kontraktion der Habitate für jede der Gattungen ein unterschiedliches Maß erreichte.

### 4.3.4 Die besonders hohe Diversität von *Dyckia*

Die hohe Artenzahl von *Dyckia* ist bemerkenswert. Zwar sind die Neotropis und insbesondere die hochgradig fragmentierten Campos Rupestres bekanntermaßen Zentren außergewöhnlicher Biodiversität. Auch die Bromeliaceae als Ganzes sind ein beeindruckendes Beispiel für eine diverse neotropische Organismengruppe. Selbst innerhalb der Pitcairnioideae existiert mit *Pitcairnia* ein weiteres Beispiel von besonders intensiver Diversifikation. Aber nicht zuletzt der Vergleich von *Dyckia* mit den am nächsten verwandten und sehr ähnlichen Gattungen *Encholirium* und *Deuterocohnia* wirft Fragen auf. So ist die Artenzahl von *Dyckia* um ein Vielfaches höher als jene der beiden anderen Gattungen, obwohl *Dyckia* vermutlich die jüngste Linie innerhalb dieser xerophytischen Klade darstellt.

#### Die Diversität von *Dyckia* im Vergleich mit *Encholirium*

Die hohe Artenzahl von *Dyckia* resultiert möglicherweise in großem Maße aus den Eigenschaften und der Geschichte der besiedelten Habitate. So stellt sich nun einerseits die

## Diskussion

Frage, was die Arten von *Dyckia* dazu befähigte, sich in diesem Lebensraum zu behaupten. Andererseits scheint sich *Dyckia* aber auch viel schneller diversifiziert zu haben als *Encholirium*. So muss es zwischen den beiden Gattungen Unterschiede geben, welche dieses Phänomen erklären.

Die Zahl offensichtlicher Unterschiede zwischen den beiden Gattungen ist gering. Am augenscheinlichsten ist die Präsenz anderer Blütenfarben und die tendenziell intensivere Blütenfärbung bei *Dyckia*. Dies könnte gegenüber von *Encholirium* zur Anlockung von zusätzlichen oder anderen Bestäubern geführt haben. Ein anderer bemerkenswerter Umstand ist, dass *Encholirium* ausschließlich nördlich des 21. südlichen Breitengrades vorkommt. *Dyckia* wächst dagegen in Uruguay und Argentinien bis hinunter zum 35. südlichen Breitengrad. Zwar liegt das Biodiversitätszentrum von *Dyckia* im Überlappungsbereich mit *Encholirium* in Minas Gerais, das erste große Radiationseignis ging aber offenbar vom Flachland im Süden Brasiliens in der Gegend um den 30. Breitengrad herum aus (vgl. 4.2.5). So scheint es, als wäre die Gattung *Dyckia* erst nach ihrer Migration in den Süden vor etwa 3 Millionen Jahren zu ihrer enormen Diversifizierung fähig gewesen. *Encholirium* war offenbar zu keiner Zeit in der Lage, so weit nach Süden zu gelangen. Möglicherweise sind die gleichen Schlüsselinnovationen, die die Migration in den Süden ermöglichten, auch der Motor für die rapide Diversifikation von *Dyckia* nach der Rückkehr nach Zentralbrasilien vor etwa 2 Millionen Jahren.

Ein eher trivialer Grund für die höhere Artenzahl bei *Dyckia* im Vergleich zu *Encholirium* ist sicherlich die schiere Größe des Verbreitungsgebietes. So kommen viele *Dyckia*-Arten auch oder nur in Argentinien, Paraguay, Bolivien, Uruguay und dem südlichen Brasilien vor, während *Encholirium* auf Zentral- und Ostbrasilien beschränkt ist. Aber auch dort, wo beide Gattungen gemeinsam vorkommen, ist *Dyckia* artenreicher. In Minas Gerais etwa, wo beide Gattungen ihre Diversitätszentren haben, existieren 42 Arten von *Dyckia*, aber nur 15 Arten von *Encholirium* (Versieux & Wendt 2006; 2007), obwohl *Encholirium* hier nach Maßgabe der plastidären Phylogenie deutlich mehr Zeit zur Diversifizierung hatte.

### Unterschiedliche Höhenverbreitung

Die Arten von *Encholirium* besiedeln ähnliche Standorte wie die Arten von *Dyckia*, wengleich die Gattungen selten oder fast niemals sympatrisch auftreten (Pinangé, persönliche Mitteilung). Einige Vertreter von *Dyckia* wachsen jedoch in größeren Höhen als *Encholirium* (z. B. Smith & Downs 1974; Forzza 2005). Inwiefern *Dyckia* vielleicht eine gesteigerte Resistenz gegen Kälte aufweist, ist unbekannt. Interessanterweise bezeichnete aber schon Beer (1857) *Dyckia rariflora* als die Art mit der höchsten Widerstandsfähigkeit

## Diskussion

gegen Kälte innerhalb der gesamten Bromeliaceae. Zu dieser Zeit war allerdings erst ein Bruchteil der heute beschriebenen Bromelien bekannt. In Botanischen Gärten kultivierte Vertreter einiger *Dyckia*-Arten erwiesen sich als resistent gegen leichten Frost (Jenkins 1998). Im Vergleich zu Vertretern von *Deuterocohnia* konnte *Dyckia* teilweise sogar noch etwas geringere Temperaturen ohne größere Schäden verkraften. Dies ist insofern bemerkenswert, als *Deuterocohnia* in teils sehr viel höher gelegenen Habitaten lebt. Arten von *Encholirium* wurden in diesem Zusammenhang leider nicht untersucht. Der Umstand, dass *Dyckia* so weit in den deutlich kälteren Süden vordrang und erst danach zur Radiation in Zentralbrasilien fähig war, macht mögliche zukünftige Untersuchungen zur Kälteresistenz aber äußerst interessant.

### Effektiverer Genfluss bei *Encholirium*

Da Arten von *Encholirium* generell in geringeren Höhen vorkommen als Vertreter von *Dyckia* im jeweils selben Gebiet, sind die Habitate der Arten von *Encholirium* möglicherweise weniger stark voneinander isoliert (vgl. auch 4.3.2). Dies könnte in einem im Vergleich zu *Dyckia* verstärkten Genfluss zwischen einzelnen Populationen führen. Eine aktuelle Studie an *E. spectabile* weist auf einen sehr effektiven Genfluss hin (Gonçalves-Oliveira & Benko-Iseppon, unveröffentlichte Daten). Eine kürzlich durchgeführte Studie an den sympatrisch lebenden Arten *E. heloisae* und *E. vogelii* demonstriert die große Bedeutung unterschiedlicher Strategien zur Bestäubung für die Trennung von Arten (Christianini et al. 2012). Während die divergierende Phänologie und die Fähigkeit zur Selbstung nicht ausschlaggebend zu sein scheint, spielen die Chiropterophilie und Sphingophilie bei *E. vogelii* im Gegensatz zur ausschließlich ornithophilen *E. heloisae* bei der genetischen Isolation dieser beiden Arten möglicherweise eine entscheidende Rolle. Die Bestäubung durch Fledermäuse kommt in *Encholirium* häufiger vor, fehlt aber offenbar in *Dyckia* (Sazima et al. 1989).

Ein infolge geringerer geographischer Distanzen effizienterer Genfluss innerhalb der Arten in Verbund mit einem höheren Grad an Isolation zwischen den Arten, vermittelt durch unterschiedliche Bestäuber, könnten Schlüsselfaktoren für den besseren Zusammenhalt der Arten von *Encholirium* im Vergleich zu *Dyckia* sein. All dies würde die offenbar deutlich geringeren Diversifikationsraten bei *Encholirium* erklären. Somit würde die Vielfalt von *Dyckia* nicht etwa aus einer gesteigerten Fitness, sondern aus der geringeren Fähigkeit zum Austausch von genetischem Material zwischen Populationen, einer somit höheren Speziationsrate und daraus folgendem vermehrtem Endemismus resultieren. Zwar stehen möglicherweise selbst entfernt verwandte Arten von *Dyckia* noch in genetischem Kontakt miteinander. Ein Verschmelzen der Arten findet aber offenbar nicht statt (vgl. auch 4.3.5).

#### 4.3.5 Artkonzepte für *Dyckia*

##### Hinweise auf genetische Durchmischung bei Arten von *Dyckia*

Innerhalb der ermittelten Phylogenien auf Basis plastidärer Sequenzen und des nukleären Locus *phyC* sind die untersuchten Arten von *Dyckia* häufig paraphyletischen Ursprungs. Von den 19 durch jeweils mehr als eine Akzession repräsentierten Arten trugen lediglich zwei Arten Plastiden eindeutig monophyletischen Ursprungs. In acht Fällen mangelte es für eine solche Aussage an Auflösung und in neun Fällen trugen Arten klar paraphyletische Plastiden. Im Falle von *phyC* wurden nur in einer einzigen Art Allele monophyletischen Ursprungs gefunden, nämlich den beiden Varietäten von *D. marnier-lapostollei*. In vier Fällen kann aufgrund mangelnder Auflösung keine Aussage getroffen werden, aber in 14 Arten waren *phyC*-Allele klar paraphyletischen Ursprungs.

In Einzelfällen könnten durchaus Fehlbestimmungen die Ursache hierfür sein. Die Häufigkeit, mit der die untersuchten Arten nicht monophyletischen Ursprungs sind, deutet aber auf ein generelles Phänomen hin. Dafür spricht auch die extreme allelische Variation des Locus *phyC* innerhalb einzelner Individuen (siehe 3.3.2 und 4.1.3, Abbildung 25). So gehören die beiden innerhalb der gleichen Pflanze gefundenen Allele von *phyC* manchmal ganz unterschiedlichen Kladen innerhalb der Phylogenie an. Auch die deutlich erhöhte Auflösung der Phylogenie mit reduziertem Probensatz (Abbildung 29) spricht gegen einen jeweils monophyletischen Ursprung der beiden Allele bei heterozygoten Proben. Dies alles gilt für im Freiland gesammelte Pflanzen in gleichem Maße wie für in Botanischen Gärten kultivierte Akzessionen.

Zwischen der Phylogenie der Plastiden und der Phylogenie von Allelen des Gens *phyC* treten teils erhebliche Diskrepanzen auf. Aufgrund der nicht monophyletischen Abstammung der Arten ist außerdem davon auszugehen, dass keiner der beiden Bäume die tatsächliche hypothetische Phylogenie der Arten von *Dyckia* (species tree) widerspiegelt. Demnach ist von einem gewissen Grad von genetischer Durchmischung auszugehen. Für einige dieser Unterschiede kann vermutlich incomplete lineage sorting verantwortlich gemacht werden (vgl. 4.2.2 und 4.2.3). In anderen Fällen könnte ein gelegentlicher Genfluss zwischen Arten und Introgression durch Hybridisierung und Rückkreuzung verantwortlich sein. Hierunter fällt auch der häufig als chloroplast capture bezeichnete Fall der Introgression von Plastiden (z. B. Tsitrone et al. 2003; Bänfer et al. 2006).

##### Introgression oder incomplete lineage sorting?

Zwischen Introgression und incomplete lineage sorting zu unterscheiden, ist sehr schwierig, beide Mechanismen können ähnliche Phänomene bewirken (Holder et al. 2001). Eine

## Diskussion

zuverlässige Aussage darüber, welche der Möglichkeiten für spezifische Inkongruenzen zwischen Phylogenien verantwortlich ist, ist nur durch hohen methodischen Aufwand zu treffen. Rückschlüsse können etwa über einen Vergleich mehrerer, durch Untersuchung unterschiedlicher Loci gewonnener Phylogenien gewonnen werden (z. B. Buckley et al. 2006). Dabei kann jedoch unter Umständen eine große Zahl an verschiedenen nukleären Loci nötig sein (Holder et al. 2001).

Bei *Dyckia* sprechen eine Reihe an Erkenntnissen und Überlegungen für den Mechanismus der Introgression als dominierenden Faktor. Hier ist zum einen die bekannte Interfertilität zwischen Arten von *Dyckia* und auch mit Vertretern von *Encholirium* zu nennen (Grant & Zijlstra 1998; Versieux & Wendt 2006). Die räumliche Nähe vieler Arten zueinander in Verbindung mit wenig spezifischer Bestäubung und großer Reichweite einiger Bestäuber machen einen sporadischen Austausch von genetischem Material über Pollen sehr wahrscheinlich (siehe 1.2.3). Auch die häufig hohe allelische Variation bei *phyC* innerhalb einzelner Individuen ist durch einen eher kürzlichen Austausch von genetischem Material besser zu erklären als durch das Überdauern alter Allele. Eine Introgression über große Distanzen der Phylogenie hinweg wird auch als Grund für die Paraphylie der Plastiden in *Deuterocohnia* angenommen (Schütz 2012). Auch bei der Gattung *Puya* wurde Introgression als Erklärung für Widersprüche zwischen Phylogenien auf Basis von plastidären Daten und *phyC* angeführt (Jabaily & Sytsma 2010).

Eine periodische Ausdehnung und Kontraktion der Habitate im Pleistozän könnte ein wichtiger, die Introgression begünstigender Faktor gewesen sein (vgl. 4.3.2). So kamen zuvor getrennte Populationen auf periodisch auftretenden Korridoren immer wieder in sekundären Kontakt miteinander (Antonelli et al. 2010). Dabei hatten Arten regelmäßig die Möglichkeit, in die Verbreitungsgebiete anderer getrennter Arten einzudringen. Excoffier et al. (2009) beschreiben für solche Fälle eine massive Introgression von lokalen Genen in das Genom der invasiven Arten. Auf diese Art und Weise könnten auch Plastiden in zuvor klar getrennte Linien gelangt sein, die ansonsten durch die limitierte Fähigkeit zur Samenausbreitung wenig mobil sind (vgl. 1.2.3 und 4.3.1). Weiterhin könnte der genetische Fluss zwischen den Arten in solchen Episoden deutlich höher gewesen sein, als dies aufgrund der heute stark isolierten Habitate erwartet würde.

### Zusammenhalt der Arten trotz regelmäßigen Genflusses

Die Arten von *Dyckia* sind im allgemeinen morphologisch schwer auseinanderzuhalten. Einzelne diagnostische Merkmale überlappen sich regelmäßig und erst ihre Kombination erlaubt eine mehr oder minder gute Abgrenzung (z. B. Smith & Downs 1974; Winkler 1986).

## Diskussion

Ferner zeigt sich eine enorme innerartliche Variation bei vielen der Merkmale. Es drängt sich daher die Vermutung auf, dass nur die allerwenigsten der beschriebenen Morphospezies auch dem biologischen Artkonzept nach Mayr (1963) genügen. Dieses würde eine strikte reproduktive Isolation voraussetzen.

Die unscharfen Grenzen zwischen den einzelnen Arten von *Dyckia* spiegeln sich auch in den molekularen Daten wider. So gibt es Hinweise auf regelmäßigen und intensiven Austausch von genetischem Material selbst zwischen phylogenetisch weit entfernten Arten. Mit welcher Regelmäßigkeit sich Linien von *Dyckia* aufspalten oder fusionieren, lässt sich anhand der gewonnenen Daten schwer abschätzen. Allerdings spricht vieles dafür, dass zuvor getrennte Linien bei sekundärem Kontakt nicht wieder komplett miteinander verschmelzen. Vielmehr scheinen die Arten ihre Gene in großem Umfang miteinander auszutauschen, ohne ihre phänotypische Identität als eigene Art zu verlieren. Über die exakten Mechanismen, welche diese Kohäsion der Arten trotz Genfluss bewirken, können derzeit noch keine zuverlässigen Aussagen gemacht werden. Ein ähnliches Phänomen wurde aber auch bei vielen anderen sympatrisch vorkommenden Arten beobachtet, etwa innerhalb der Gattung *Pitcairnia* (Palma-Silva et al. 2011; Southcott & Ostevik 2011).

Das biologische Artkonzept erwies sich in der Vergangenheit schon für viele Organismen als problematisch, insbesondere bei Pflanzen. Besonders in tropischen Pflanzen scheinen reproduktive Barrieren zwischen nahe verwandten Arten häufig zu fehlen (Lexer & Widmer 2008). Die Ausbildung einer vollständigen, Genom-weiten reproduktiven Isolation zwischen Arten scheint demnach außerhalb des Tierreichs keinesfalls die Regel zu sein. Vielmehr deutet sich an, dass vielfach nur eine kleine Zahl von phänotypisch relevanten Genen für die Identität einer Art verantwortlich ist. Die übrigen Teile der Genome sind hingegen mehr oder weniger frei zwischen Arten austauschbar, einschließlich der plastidären Gene (porous genome concept, Wu 2001; Morjan & Rieseberg 2004; Wu & Ting 2004). Die wenigen Loci, welche eine Art ausmachen, tragen jeweils ein Set an koadaptierten Allelen. Diese bewirken ihrer Gesamtheit die spezifische Anpassung und Konkurrenzfähigkeit. Gelangen Allele dieser Gene durch Introgression aus anderen Arten in ein solches Set, so kann das empfindliche Gleichgewicht gestört werden. Die Hybride zeichnen sich dann in Bezug auf das spezielle Habitat durch eine reduzierte Fitness aus.

### 4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die Rekonstruktion einer Phylogenie der Arten von *Dyckia* (species tree) mit Hilfe vergleichender DNA-Sequenzierung von Genen und nicht-kodierenden Abschnitten der nukleären und plastidären Genome nicht ohne weiteres

## Diskussion

möglich ist. Wie weiter oben diskutiert wurde, könnten diese Probleme auf andauernden interspezifischen Genfluss im Sinne des porous genome concepts zurückzuführen sein, nach dem eine Art durch einen Satz koadaptierter Allele definiert ist und der Rest austauschbar ist. Möglicherweise würde die vergleichende Sequenzierung eines Gens mit Einfluss auf den Phänotyp in einer Phylogenie resultieren, die sich mit der Phylogenie der Arten deckt. Da eine neutrale Evolution selbst nicht-kodierender Bereiche solcher Gene aber nicht zu erwarten ist, könnte bei diesem Vorgehen wiederum ein erhöhtes Maß an Homoplasie und Konvergenz zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Ein denkbarer Ausweg aus diesem Dilemma stellt die kombinierte Analyse vieler unabhängiger nukleärer Loci dar, mit ihr ist noch am ehesten eine Phylogenie zu erwarten, die die tatsächlichen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Arten von *Dyckia* reflektiert. Dies würde jedoch einen kaum zu rechtfertigenden Aufwand bedeuten.

Ein wichtiger Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen ist auch eine detaillierte ökophysiologische Charakterisierung unterschiedlicher Arten von *Dyckia*. Selbst wenn sich Arten morphologisch stark ähneln, könnten sie durchaus an völlig unterschiedliche Habitate angepasst sein. Faktoren wie Bodeneigenschaften, Nährstoffversorgung oder Zusammensetzung des Nektars und damit verbundene Anpassung an bestimmte Bestäuber könnten sich zwischen morphologisch und molekular ähnlichen Arten unterscheiden. Solche hypothetischen Unterschiede könnten dann auch Hinweise auf Gene liefern, die an der Kohäsion einzelner Arten beteiligt sind.

Ein vielversprechender Ansatz könnte darin bestehen, die Verwandtschaftsuntersuchungen auf ein relativ kleines geographisches Gebiet mit einem überschaubaren Artenspektrum zu konzentrieren. In diesem Fall wäre die Problematik der schwierigen Identifikation der Arten weniger gravierend. Von jeder Art sollten mehrere Populationen besammelt und mit sensiblen Werkzeugen wie AFLP- und Mikrosatelliten-Markern untersucht werden. Bei beiden Methoden werden jeweils viele unabhängige Loci untersucht, was der in 4.3.5 erwähnten Problematik der porösen reproduktiven Barrieren entgegenwirken könnte. Erste interessante Ergebnisse wurden bereits mit beiden Methoden gewonnen (Wöhrmann et al. 2012; Pinangé et al., unveröffentlichte Daten). Ein besseres Verständnis der Dynamik von Populationen und Arten könnte neue Wege aufzeigen, die letztlich zu einer umfassenden Phylogenie der Gattung *Dyckia* führen.

## 5 Zusammenfassung

Die in Südamerika heimische Pflanzengattung *Dyckia* (Bromeliaceae) weist mit derzeit 158 anerkannten Arten eine besonders hohe Biodiversität auf. Insbesondere im Vergleich zur am nächsten verwandten Gattung *Encholirium* ist diese Artenzahl erstaunlich hoch. Bisher wurden an der taxonomisch als äußerst schwierig geltenden Gattung *Dyckia* keine detaillierten Untersuchungen zur Phylogenie durchgeführt. Selbst das Verhältnis zu *Encholirium* und die Monophylie der beiden Gattungen waren bisher weitestgehend unverstanden. Erste Hinweise auf eine geringe genetische Variabilität und ein junges Alter von *Dyckia* fanden sich im Rahmen einer vorausgegangenen Diplomarbeit (Krapp 2009). Die vorliegende Arbeit bietet nun deutlich tiefere Einblicke in die Natur und die Geschichte der interessanten Gattung *Dyckia* und stellt zukünftige Studien auf eine solide Basis.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 58 Arten von *Dyckia* in 97 Akzessionen sowie 27 Vertreter nahe verwandter Gattungen untersucht. Für alle Pflanzen wurde eine vergleichende DNA-Sequenzierung von insgesamt sechs Abschnitten des Plastoms sowie des Exons 1 aus dem nukleären Gen *Phytochrom C* (*phyC*) durchgeführt. Die Länge der Alignments betrug 6.009 bp für den plastidären Datensatz und 1.159 bp für *phyC*. Aus den gewonnenen Daten wurden mittels verschiedener Algorithmen phylogenetische Bäume erstellt. Auf Basis der plastidären Sequenzen wurden zudem eine datierte Phylogenie und ein Haplotyp-Netzwerk zur Rekonstruktion der historischen Biogeographie der Gattung *Dyckia* ermittelt. Ferner wurde ein Set von 12 Primerpaaren zur Untersuchung längenpolymorpher plastidärer Mikrosatelliten (cpSSRs) entwickelt und dessen Einsetzbarkeit zur Verbesserung der phylogenetischen Auflösung geprüft.

Zu den Fragen, die die wichtigsten Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit markieren, konnten folgende Ergebnisse und daraus folgende Hypothesen erarbeitet werden:

- Stellen die Gattungen *Dyckia* und *Encholirium* jeweils monophyletische Abstammungsgemeinschaften dar und wie ist ihr Verhältnis zueinander?

Die ermittelten Phylogenien auf Basis plastidärer und nukleärer Sequenzdaten sowie morphologische Merkmale sprechen deutlich für eine Paraphylie von *Encholirium*. Dagegen ist die weitaus größere Gattung *Dyckia* aller Wahrscheinlichkeit nach monophyletisch und entstand aus *Encholirium* heraus.

- Wann und wo trennten sich die Gattungen voneinander?

### Zusammenfassung

Die beiden Gattungen trennten sich vor etwa 4,0-4,5 Millionen Jahren. Die letzten gemeinsamen Vorfahren lebten vermutlich in Zentralbrasilien. Früh abzweigende Linien von *Dyckia* wurden in Mato Grosso do Sul nahe Paraguay und in Minas Gerais gefunden.

- Können mittels vergleichender Sequenzierung plastidärer oder nukleärer DNA gut aufgelöste Phylogenien innerhalb von *Dyckia* rekonstruiert werden? Zeichnen sich Kladen innerhalb von *Dyckia* durch morphologische Synapomorphien aus?

Die außergewöhnlich geringe Variabilität der Genome von *Dyckia* erlaubte es nicht, mittels der untersuchten Loci gut aufgelöste Phylogenien zu erzeugen. Der weitaus größte Teil der untersuchten Arten und Akzessionen bildete eine, hier als *Core-Dyckia* bezeichnete terminale Polytomie aus einzelnen Linien und größeren, geographisch definierten Gruppen. Die mangelnde Auflösung erschwerte auch die Identifikation möglicher Synapomorphien. In exemplarischen Merkmalskartierungen konnten keine Merkmale mit systematischer Relevanz auf Gattungsebene identifiziert werden.

- Auf welchen Wegen gelangten die rezenten Vertreter von *Dyckia* in ihre heutigen Verbreitungsgebiete?

Innerhalb von *Dyckia* zeigt sich eine sehr deutliche Korrelation zwischen der Phylogenie der Plastiden und dem geographischen Verbreitungsmuster. Ein phylogenetisches Netzwerk basierend auf plastidären Haplotypen erlaubt den Schluss, dass die allermeisten rezenten Linien vom äußersten Süden Brasiliens ausgehend in ihre heutigen Verbreitungsgebiete eingewandert sind.

- In welchem zeitlichen Rahmen spielten sich die Ausbreitung und Diversifizierung von *Dyckia* ab?

Eine erste, noch langsame Diversifizierung begann vermutlich vor 4,0 Millionen Jahren und wird nur durch die Abspaltung zweier kleiner rezenter Linien bezeugt. Alle Hauptlinien von *Core-Dyckia* entstanden etwa gleichzeitig vor etwa 2,9 Millionen Jahren. Die Diversifizierung der vier großen Kladen von *Dyckia* fand erst innerhalb der letzten 2,5 Millionen Jahre statt.

- Welche Faktoren führten zur außergewöhnlich hohen Artenzahl von *Dyckia* verglichen mit *Encholirium*?

Ein wesentlicher Grund für die höhere Artenzahl von *Dyckia* im Vergleich zu *Encholirium* ist zweifelsohne das größere Verbreitungsgebiet. Über weitere Gründe kann bisher nur spekuliert werden. So könnten die kleinräumigen Habitate von *Dyckia*-Arten stärker von den Klimaschwankungen des Pleistozäns beeinflusst worden sein.

## Zusammenfassung

- Gab es Radiationen?

Innerhalb von *Dyckia* kam es mindestens zweimal zu besonders intensiven Diversifizierungswellen. Eine führte zur Entstehung aller Hauptlinien von Core-*Dyckia* im Süden Brasiliens. Die zweite große Radiation fand innerhalb der zentralbrasilianischen Klade statt und legte den Grundstein für die extrem hohe heutige Diversität insbesondere in den Campos Rupestres dieser Region.

- Stellen die vielen beschriebenen Morphospezies distinkte genetische Abstammungseinheiten dar? Spiegelt sich die Plastizität morphologischer Merkmale auch in der genetischen Situation wider?

Die Mehrzahl der einzelnen Morphospezies sind weder in der plastidären noch in der nukleären Phylogenie genetisch distinkt. Deutliche Unterschiede zwischen plastidärer und nukleärer Phylogenie sowie eine hohe allelische Variation am Locus *phyC* und das Auftreten zahlreicher heterozygoter Individuen sprechen für einen bemerkenswerten Grad an genetischer Durchmischung. Insofern spiegelt sich die Plastizität morphologischer Merkmale auch in der genetischen Situation wider.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abreu Ferreira, P. M. d., S. C. Müller, I. I. Boldrini & L. Eggers (2010):** Floristic and vegetation structure of a granitic grassland in Southern Brazil. *Revista Brasil. Bot.* 33 (1): 21-36.
- Akaike, H. (1973):** Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: B. N. Petrov and F. Csaki (Hrsg.) (1973): Proceedings of the Second International Symposium on Information Theory. *Akademiai Kiado, Budapest.* 267-281.
- Almeida, F. C., C. R. Bonvicino & P. Cordeiro-Estrela (2007):** Phylogeny and temporal diversification of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae): Implications for the biogeography of an endemic genus of the open/dry biomes of South America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42: 449-466.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman (1997):** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389-3402.
- Alves, R. J. V. & J. Kolbek (1994):** Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. *Vegetatio* 113: 125-139.
- Alves, R. J. V., L. Cardin & M. S. Kropf (2007):** Angiosperm disjunction “Campos rupestres - restingas”: a re-evaluation. *Acta Bot. Bras.* 21 (3): 675-685.
- Alves, R. J. V. & J. Kolbek (2010):** Can campo rupestre vegetation be floristically delimited based on vascular plant genera? *Plant Ecol.* 207: 67-79.
- Antonelli, A., J. A. A. Nylander, C. Persson & I. Sanmartín (2009):** Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. *PNAS* 106 (24): 9749-9754.
- Antonelli, A., C. F. Verola, C. Parisod & A. L. S. Gustafsson (2010):** Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). *Bot. J. Linn. Soc.* 100: 597-607.
- Antonelli, A. & I. Sanmartín (2011):** Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60 (2): 403-414.
- APG (2009):** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 161: 105-121.
- Arakaki, M., P.-A. Christin, R. Nyffeler, A. Lendel, U. Eggli, R. M. Ogburn, E. Spriggs, M. J. Moore & E. J. Edwards (2011):** Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *PNAS* 108 (20): 8379-8384.
- Avise, J. C. (2000):** Phylogeography: The history and formation of species. *Harvard University Press, Cambridge, MA.*
- Ayala, F. J. (1999):** Molecular clock mirages. *BioEssays* 21: 71-75.
- Baker, J. G. (1889):** Handbook of the Bromeliaceae. *George Bell and Sons, London.*
- Balasubramanian, S., S. Sureshkumar, M. Agrawal, T. P. Michael, C. Wessinger, J. N. Maloof, R. Clark, N. Warthmann, J. Chory & D. Weigel (2006):** The PHYTOCHROME C photoreceptor gene mediates natural variation in flowering and growth responses of *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 38 (6): 711-715.

- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell & M. J. Donoghue (1995):** The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82 (2): 247-277.
- Baldwin, B. G. & S. Markos (1998):** Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 10 (3): 449-63.
- Balke, M., J. Gómez-Zurita, I. Ribera, A. Vilorio, A. Zillikens, J. Steiner, M. García, L. Hendrich & A. P. Vogler (2008):** Ancient associations of aquatic beetles and tank bromeliads in the Neotropical forest canopy. *PNAS* 105 (17): 6356-6361.
- Bänfer, G., U. Moog, B. Fiala, M. Mohamed, K. Weising & F. R. Blattner (2006):** A chloroplast genealogy of myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae) in Southeast Asia reveals hybridization, vicariance and long-distance dispersals. *Mol. Ecol.* 15: 4409-4424.
- Barbará, T., G. Martinelli, M. F. Fay, S. J. Mayo & C. Lexer (2007):** Population differentiation and species cohesion in two closely related plants adapted to neotropical high-altitude 'inselbergs', *Alcantarea imperialis* and *Alcantarea geniculata* (Bromeliaceae). *Mol. Ecol.* 16: 1981-1992.
- Barfuss, M. H. J., R. Samuel, W. Till & T. F. Stuessy (2005):** Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *Am. J. Bot.* 92: 337-351.
- Beer, J. G. (1857):** Die Familie der Bromeliaceen. *Tendler & Comp., Wien.*
- Beheregaray, L. B. (2008):** Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol. Ecol.* 17: 3754-3774.
- Benzing, D. H. (2000):** Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. *Cambridge University Press, New York.*
- Bernadello, L. M., L. Galetto & H. R. Juliani (1991):** Floral Nectar, Nectary Structure and Pollinators in Some Argentinean Bromeliaceae. *Ann. Bot.* 67: 401-411.
- Berry, P. E., W. J. Hahn, S. K. J., H. J. C. & M. A. (2004):** Phylogenetic relationships and biogeography of *Fuchsia* (Onagraceae) based on noncoding nuclear and chloroplast DNA data. *Am. J. Bot.* 91 (4): 601-614.
- Bjourson, A. J. & J. E. Cooper (1992):** Band-stab PCR: a simple technique for the purification of individual PCR products. *Nucleic Acids Res* 20 (17): 4675.
- Blanco, F. M. (1880):** Flora de Filipinas, por el P. Fr. Manuel Blanco, agustino calzado, adicionada con el manuscrito inédito del P. Fr. Ignacio Mercado, las obras del P. Fr. Antonio Llanos y de un apéndice con todas las nuevas investigaciones botánicas referentes al Archipiélago Filipino. Gran edicion, hecha á expensas de la provincia de agustinos calzados de Filipinas bajo la direccion científica del P. Fr. Andrés Naves. Atlas II. *Establecimiento tipográfico de Plana y C., Manila (Filipinas).*
- Borsch, T. & D. Quandt (2009):** Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA. *Plant Syst. Evol.* 282: 169-199.
- Braun, P. J., E. E. Pereira & U. Scharf (2008a):** *Dyckia edwardii* - Eine neue, großwüchsige und xerophytische Art aus Goiás, Zentral-Brasilien. *Bromelie* (3): 116-123.

- Braun, P. J. & E. E. Pereira (2008):** Succulent and xeromorphic bromeliads of Brazil part 4. *Dyckia richardii* and *D. grandidentata* - two new succulent and heavy armed species from west-central Brazil. *Cact. Succ. J.* 80 (6): 319-324.
- Braun, P. J., E. E. Pereira & U. Scharf (2008b):** *Dyckia joanae-marcioi*. Eine neue, sukkulente Bromelie aus dem nördlichen Minas Gerais, Brasilien. *Bromelie* (1): 33-46.
- Braun, P. J., E. E. Pereira & U. Scharf (2009):** *Dyckia atratiflora*. Eine neue, „schwarz“-blühende Art aus Goiás, Zentral-Brasilien. *Bromelie* (2-3): 82-89.
- Braun, P. J. & E. E. Pereira (2009):** Succulent and xeromorphic bromeliads of Brazil part 6. *Dyckia stolonifera* - a new and nearly extinct species from Mato Grosso do Sul. *Cact. Succ. J.* 81 (6): 301-304.
- Braun, P. J., E. E. Pereira & U. Scharf (2010):** *Dyckia cangaphila* - a new xeromorphic species from Goias, Central Brazil *Bromelie* (3): 104-111.
- Braxmeier, Hans (2012):** Maps-For-Free. URL: <http://www.maps-for-free.com/> (zugegriffen am: 07.2012-08.2012).
- Brown, G. K. & A. J. Gilmartin (1989):** Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Am. J. Bot.* 76 (5): 657-665.
- Buckley, T. R., M. Cordeiro, D. C. Marshall & C. Simon (2006):** Differentiating between hypotheses of lineage sorting and introgression in New Zealand alpine Cicadas (*Maoricicada* Dugdale). *Syst. Biol.* 55 (3): 411-425.
- Chew, T., E. D. Luna & D. González (2010):** Phylogenetic relationships of the pseudobulbous *Tillandsia* species (Bromeliaceae) inferred from cladistic analyses of ITS 2, 5.8S ribosomal RNA gene, and ETS sequences. *Syst. Bot.* 35 (1): 86-95.
- Christianini, A. V., R. C. Forzza & S. Buzato (2012):** Divergence on floral traits and vertebrate pollinators of two endemic *Encholirium* bromeliads. *Plant Biol. published online first* (DOI 10.1111/j.1438-8677.2012.00649.x).
- Clement, M., D. Posada & K. A. Crandall (2000):** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9 (10): 1657-1660.
- Conceição, S. P., K. L. G. De Toni & C. G. Costa (2007):** Particularidades do nucelo de *Dyckia pseudococcinea* L. B. Smith (Bromeliaceae). *Revista Brasil. Bioci.* 5 (supl. 1): 846-848.
- Cotias-de-Oliveira, A. L. P., J. G. A. d. Assis, M. C. Bellintani, J. C. S. Andrade & M. L. S. Guedes (2000):** Chromosome numbers in Bromeliaceae. *Genet. Mol. Biol.* 23 (1): 173-177.
- Crayn, D. M., R. G. Terry, J. A. C. Smith & K. Winter (2000):** Molecular systematic investigations in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) as a basis for understanding the evolution of crassulacean acid metabolism (CAM). In: K. L. Wilson and D. A. Morrison (Hrsg.) (2000): *Monocots: Systematics and Evolution. CSIRO, Melbourne.* 569-579.
- Crayn, D. M., K. Winter & J. A. C. Smith (2004):** Multiple origins of crassulacean acid metabolism and the epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. *PNAS* 101: 3703-3708.
- Cubas, P., C. Pardo & H. Tahiri (2005):** Genetic variation and relationships among *Ulex* (Fabaceae) species in southern Spain and northern Morocco assessed by chloroplast microsatellite (cpSSR) markers. *Am. J. Bot.* 92 (12): 2031-2043.

- Demesure, B., N. Sodzi & R. J. Petit (1995):** A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4 (1): 129-131.
- Devos, K. M., J. Beales, Y. Ogihara & A. N. Doust (2005):** Comparative sequence analysis of the Phytochrome C gene and its upstream region in allohexaploid wheat reveals new data on the evolution of its three constituent genomes. *Plant Mol. Biol.* 58: 625-641.
- Doyle, J. J. & J. L. Doyle (1987):** A rapid DNA isolation procedure for small amount of fresh leaf issue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Drummond, A. J., S. Y. W. Ho, M. J. Phillips & A. Rambaut (2006):** Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4 (5): e88.
- Drummond, A. J. & A. Rambaut (2007):** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7: 214.
- Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. Kearse, S. Markowitz, R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer & A. Wilson (2011):** Geneious v5.4. Verfügbar unter: <http://www.geneious.com/>.
- Dunbar-Co, S., A. M. Wieczorek & C. W. Morden (2008):** Molecular phylogeny and adaptive radiation of the endemic Hawaiian *Plantago* species (Plantaginaceae). *Am. J. Bot.* 95 (9): 1177-1188.
- Ebert, D. & R. Peakall (2009):** Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. *Mol. Ecol. Resour.* 9: 673-690.
- Edgar, R. C. (2004):** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32 (5): 1792-1797.
- Edwards, A. W. F. & L. L. Cavalli-Sforza (1963a):** The reconstruction of evolution. *Heredity* 18 (4): 553.
- Edwards, A. W. F. & L. L. Cavalli-Sforza (1963b):** The reconstruction of evolution. *Ann. Hum. Genet.* 27 (1): 104-105.
- Edwards, E. J., R. Nyffeler & M. J. Donoghue (2005):** Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *Am. J. Bot.* 92 (7): 1177-1188.
- Ehlers, T. A. & C. J. Poulsen (2009):** Influence of Andean uplift on climate and paleoaltimetry estimates. *Earth Planet. Sc. Lett.* 281: 238-248.
- Elias, M., M. Joron, K. Willmott, K. L. Silva-Brandão, V. Kaiser, C. F. Arias, L. M. Gomez Piñeres, S. Uribe, A. V. Z. Brower, A. V. L. Freitas & C. D. Jiggins (2009):** Out of the Andes: patterns of diversification in clearwing butterflies. *Mol. Ecol.* 18: 1716-1729.
- EPICA community (2004):** Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature* 429: 623-628.
- Esteves, E. & A. Hofacker (2011):** *Dyckia mauriziae* - a new and almost extinct secund growing bromeliad from the cerrado in the state of Goiás, Brazil. *Bromelie* (1): 39-45.
- Excoffier, L., M. Foll & R. J. Petit (2009):** Genetic consequences of range expansions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40: 481-501.

- Falchi, A., J. Paolini, J. M. Desjobert, A. Melis, J. Costa & L. Varesi (2009):** Phylogeography of *Cistus creticus* L. on Corsica and Sardinia inferred by the TRNL-F and RPL32-TRNL sequences of cpDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52 (2): 538-43.
- Fartmann, B., K. Nikoleit & K. Rehfeldt (1999):** Sequencing brochure by MWG-Biotech AG - Instructions for DNA template preparation, primer design and sequencing with LI-COR DNA Sequencer 4000 and 4200 series.
- Fay, M. F., C. Bayer, W. S. Alverson, A. Y. de Bruijn & M. W. Chase (1998):** Plastid *rbcL* sequence data indicate a close affinity between *Diegodendron* and *Bixa*. *Taxon* 47: 43-50.
- Felsenstein, J. (1985):** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fitch, W. M. (1971):** Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20 (4): 406-416.
- Forzza, R. C. & M. d. G. L. Wanderley (1998):** Flora da Serra do Cipo, Minas Gerais: Bromeliaceae-Pitcairnioideae. (Flora of the Serra do Cipo, Minas Gerais: Bromeliaceae-Pitcairnioideae.). *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 17: 255-270.
- Forzza, R. C. (2001):** Filogenia da tribo Puyeeae Wittm. e revisão taxonômica do gênero *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae). *Instituto de Biosciências, Universidade de São Paulo, São Paulo*.
- Forzza, R. C. (2005):** Revisão taxonômica de *Encholirium* Mart. ex. Schult. & Schult. f. (Pitcairnioideae - Bromeliaceae). *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 23 (1): 1-49.
- Forzza, R. C. & D. Zappi (2011):** Side by side: two remarkable new species of *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae) found in the Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brazil. *Kew Bull.* 66 (2): 281-287.
- Freitas, L. & M. Sazima (2006):** Pollination biology in a tropical high-altitude grassland in Brazil: Interactions at the community level. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 93 (3): 465-516.
- Fritsch, P. W., F. Almede, S. R. Renner, A. B. Martins & B. C. Cruz (2004):** Phylogeny and circumscription of the near-endemic Brazilian tribe Microlicieae (Melastomataceae). *Am. J. Bot.* 91 (7): 1105-1114.
- Furley, P. A. (1999):** The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian cerrados. *Global Ecol. Biogeogr.* 8: 223-241.
- Gaudichaud-Beaupré, C. (1851):** Voyage autour du monde execute pendant les années 1836 et 1837 sur la covette la Bonite, comandée par H. Vaillant. Atlas. *Arthus Bertrand, Éditeur, Paris*.
- GBIF (2007):** Global biodiversity information facility. URL: <http://www.gbif.org/> (zugegriffen am: 05.2011-08.2012).
- Ghosh, P., C. N. Garziona & J. M. Eiler (2006):** Rapid uplift of the altiplano revealed through <sup>13</sup>C-<sup>18</sup>O bonds in paleosol carbonates. *Science* 311: 511-515.
- Gitaí, J., R. Horres & A. M. Benko-Iseppon (2005):** Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. *Plant Syst. Evol.* 253: 65-80.
- Givnish, T. J., K. C. Millam, T. M. Evans, J. C. Hall, J. C. Pires, P. E. Berry & K. J. Sytsma (2004):** Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunction in Rapateaceae and Bromeliaceae based on *ndhF* sequence data. *Int. J. Pl. Sci.* 165: 35-54.

- Givnish, T. J., K. C. Millam, P. E. Berry & K. J. Sytsma (2007):** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence Data. *Aliso* 23: 3-26.
- Givnish, T. J., M. Ames, J. R. McNeal, M. R. McKain, P. R. Steele, C. W. dePamphilis, S. W. Graham, J. C. Pires, D. W. Stevenson, W. B. Zomlefer, B. G. Briggs, M. R. Duvall, M. J. Moore, J. M. Heaney, D. E. Soltis, P. S. Soltis, K. Thiele & J. H. Leebens-Mack (2010):** Assembling the tree of the Monocotyledons: Plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 97: 584-616.
- Givnish, T. J., M. H. J. Barfuss, B. V. Ee, R. Riina, K. Schulte, R. Horres, P. A. Gonsiska, R. S. Jabaily, D. M. Crayn, J. A. C. Smith, K. Winter, G. K. Brown, T. M. Evans, B. K. Holst, H. Luther, W. Till, G. Zizka, P. E. Berry & K. J. Sytsma (2011):** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am. J. Bot.* 98 (5): 872-895.
- Gradstein, F. M., J. G. Ogg, A. G. Smith, W. Bleeker & L. J. Lourens (2004):** A new geologic time scale, with special reference to Precambrian and Neogene. *Episodes* 27 (2): 83-100.
- Grant, J. R. & G. Zijlstra (1998):** An annotated catalogue of the generic names of the Bromeliaceae. *Selbyana* 19 (1): 91-121.
- Guarçoni, E. A. E., M. A. Sartori & C. C. d. Paula (2012):** *Dyckia inflexifolia* (Bromeliaceae), a new species from Brazil. *Ann. Bot. Fennici* 49: (Preprint).
- Guicking, D., T. Kröger-Kilian, K. Weising & F. R. Blattner (2008):** Single nucleotide sequence analysis: a cost- and time-effective protocol for the analysis of microsatellite- and indel-rich chloroplast DNA regions. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 62-65.
- Guisinger, M. M., T. W. Chumley, J. V. Kuehl, J. L. Boore & R. K. Jansen (2010):** Implications of the plastid genome sequence of *Typha* (Typhaceae, Poales) for understanding genome evolution in Poaceae. *J. Mol. Evol.* 70: 149-166.
- Gustafsson, A. L. S., C. F. Verola & A. Antonelli (2010):** Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossils and a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus *Hoffmannseggella* (Orchidaceae: Epidendroideae). *BMC Evol. Biol.* 10: 177-189.
- Haridasan, M. (2008):** Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Braz. J. Plant Physiol.* 20 (3): 183-195.
- Hasegawa, M., H. Kishino & T.-A. Yano (1985):** Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160-174.
- Hausner, G., R. Olson, D. Simon, I. Johnson, E. R. Sanders, K. G. Karol, R. M. McCourt & S. Zimmerly (2006):** Origin and evolution of the chloroplast *trnK* (*matK*) intron: A model for evolution of group II intron RNA structures. *Mol. Biol. Evol.* 23 (2): 380-391.
- Hmeljevski, K. V., A. Reis, T. Montagna & M. S. dos Reis (2011):** Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. *Conserv. Genet.* 12: 761-769.
- Holder, M. T., J. A. Anderson & A. K. Holloway (2001):** Difficulties in detecting hybridization. *Syst. Biol.* 50 (6): 978-982.

- Horres, R., G. Zizka, G. Kahl & K. Weising (2000):** Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from *trnL* (UAA) intron sequences of the chloroplast genome. *Plant Biol.* 2: 306-315.
- Huang, X. (1992):** A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics* 14: 18-25.
- Huang, X. (1994):** On global sequence alignment. *CABIOS* 10: 227-235.
- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist (2001):** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (8): 754-5.
- Hughes, C. E., R. J. Eastwood & C. D. Bailey (2006):** From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361: 211-225.
- IPNI (2012):** The international plant names index. URL: <http://www.ipni.org> (zugegriffen am: 01.2009-08.2012).
- Jabaily, R. S. & K. J. Sytsma (2010):** Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): Placement, major lineages, and evolution of Chilean species. *Am. J. Bot.* 97 (2): 337-356.
- Jakob, S. S. (2005):** Grundlagen zur Analyse von Artbildungsprozessen in der Gattung *Hordeum* L. Dissertation. *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät (mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich), Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.*
- Jenkins, D. W. (1998):** Cold sensitivity of Bromeliads. *Sarasota Bromeliad Society newsletter* (December 1998).
- Jussieu, A. L. d. (1789):** Genera Plantarum, secundum ordines naturales disposita juxta methodum in Horto Regio Parisiensi exaratam. *Hérissant & Barrois, Paris.*
- Kathriarachchi, H., P. Hoffmann, R. Samuel, K. J. Wurdack & M. W. Chase (2005):** Molecular phylogenetics of Phyllanthaceae inferred from five genes (plastid *atpB*, *matK*, *3'ndhF*, *rbcL*, and nuclear *PHYC*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 36: 112-134.
- Kelchner, S. A. & J. F. Wendel (1996):** Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. *Curr. Genet.* 30: 259-262.
- Klein, C. (2012):** Charakterisierung nukleärer DNA-Loci für phylogenetische Untersuchungen in der Unterfamilie Pitcairnioideae (Bromeliaceae). Diplomarbeit. *Systematik und Morphologie der Pflanzen, Fachbereich 18, Naturwissenschaften, Universität Kassel, Kassel.*
- Knoop, V. & K. Müller (2009):** Gene und Stammbäume - Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik. 2. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.*
- Koch, K. H. E. (1873):** *Prionophyllum*. *Ind. Sem Hort. Berol. App.* IV (7).
- Kottek, M., J. Grieser, C. Beck, B. Rudolf & F. Rubel (2006):** World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol. Zeit.* 15 (3): 259-263.
- Krapp, F. (2009):** Molekulare Verwandtschaftsanalysen in der Gattung *Dyckia* (Bromeliaceae). Diplomarbeit. *Systematik und Morphologie der Pflanzen, Fachbereich 18, Naturwissenschaften, Universität Kassel, Kassel.*
- Krapp, F., T. Wöhrmann, D. S. d. B. Pinangé, A. M. Benko-Iseppon, B. Huettel & K. Weising (2012):** A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. *Zur Publikation angenommen bei Am. J. Bot.*

- Kulju, K. K. M., S. E. C. Sierra, D. S. G. A., R. Samuel & P. C. van Welzen (2007):** Molecular phylogeny of *Macaranga*, *Mallotus*, and related genera (Euphorbiaceae s.s.): insights from plastid and nuclear DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 94 (10): 1726-1743.
- Kutschera, U. (2002):** Prinzipien der Pflanzenphysiologie. 2. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin.*
- Larocca, J. & M. Sobral (2002):** *Dyckia delicata* (Bromeliaceae), a new species from Rio Grande do Sul, Brazil. *Novon* 12: 234-236.
- Leme, E. M. C. (2010):** Miscellaneous new species in the Brazilian Bromeliaceae. *Selbyana* 30 (2): 129-133.
- Leme, E. M. C., C. N. d. Fraga, L. J. C. Kollmann, G. K. Brown, W. Till, O. B. C. Ribeiro, M. C. Machado, F. J. S. Monteiro & A. P. Fontana (2010):** Miscellaneous new species in the Brazilian Bromeliaceae. *Rodriguésia* 61 (1): 21-67.
- Leme, E. M. C. & L. J. C. Kollmann (2011):** New species and a new combination of Brazilian Bromeliaceae. *Phytotaxa* 16: 1-36.
- Leme, E. M. C., O. B. C. Ribeiro & Z. J. G. Miranda (2012):** New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. *Phytotaxa* 67: 9-37.
- Lewis, C. E. & J. J. Doyle (2001):** Phylogenetic utility of the nuclear gene Malate Synthase in the palm family (Arecaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 19 (3): 409-420.
- Lexer, C. & A. Widmer (2008):** The genic view of plant speciation: recent progress and emerging questions. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 3023-3036.
- Linnaeus, C. (1753):** Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. *Lars Salvius, Stockholm.*
- Lisiecki, L. E. & M. E. Raymo (2005):** A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic  $\delta^{18}\text{O}$  records. *Paleoceanography* 20: PA1003 (1-17).
- Lobo, G. M. (2007):** Morfoanatomia da reófitas *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae). Dissertation. *Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina UFSC, Florianópolis, SC.*
- Lobo, G. M., C. H. Voltolini, A. Reis & M. Santos (2008):** Morfoanatomia de raízes adventícias das reófitas *Dyckia brevifolia* Baker e *D. distachya* Hassler (Bromeliaceae). *Insula (Florianópolis)* 37: 81-94.
- Löhne, C. & T. Borsch (2005):** Molecular evolution and phylogenetic utility of the *petD* group II intron: A case study in basal angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* 22 (2): 317-332.
- Luther, H. E. (2008):** An alphabetical list of bromeliad binomials, ed. 11. *The Bromeliad Society International.*
- Manen, J. F., A. Natali & F. Ehrendorfer (1994):** Phylogeny of Rubiaceae-Rubieae inferred from the sequence of a cpDNA intergene region. *Plant Syst. Evol.* 190 (3-4): 195-211.
- Maraví, P. F. M. (2010):** Elucidating the phylogenetic relationships in the group of "Taygetis" butterflies (Nymphalidae: Satyrinae: Euptychiina) and dating its phylogeny. Masterarbeit. *Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Turku, Turku.*

- Margoliash, E. (1963):** Primary structure and evolution of Cytochrome C. *PNAS* 50 (4): 672-679.
- Mayr, E. (1963):** Animal species and evolution. *The Belknap Press, Cambridge*.
- McNeill, J. (Hrsg.) (2006):** International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code). Regnum Vegetabile 146. A. R. G. *Gantner Verlag KG, Ruggell, Liechtenstein*.
- Mendes, S. P., C. G. Costa & K. L. G. De Toni (2010):** Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered Brazilian species. *Aust. J. Bot.* 58: 485–492.
- Mez, C. C. (1894):** Bromeliaceae. In: C. F. P. Martius (Hrsg.) (1894): Flora Brasiliensis. Enumeratio plantarum in Brasilia hactenus detectarum quas suis aloirumque botanicis studiis descriptas et methodo naturali digestas partim icone illustratas. *Frid. Fleischer in Comm., Monachii et Lipsiae*. 3, Pars 3: 173-286 (1891), 281-430 (1892), 425-634 (1894).
- Mez, C. C. (1896):** Bromeliaceae. In: A. d. Candolle and C. d. Candolle (Hrsg.) (1896): Monographiae Phanerogamarum Prodrromi nunc continuatio, nunc revisio auctoribus Alphonso et Casimir de Candolle aliisque botanicis ultra memoratis. *Masson, Paris*. 9: 1-990.
- Mez, C. C. (1935):** Bromeliaceae. In: A. Engler and L. Diels (Hrsg.) (1935): Das Pflanzenreich. Regni vegetabilis conspectus. *Wilhelm Engelmann, Leipzig*. 100: 1-667.
- Morjan, C. L. & L. H. Rieseberg (2004):** How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Mol. Ecol.* 13: 1341-1356.
- Mülhardt, C. (2006):** Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics. 5. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München*.
- Müller, J., K. Müller & D. Quandt (2011):** PhyDE - Phylogenetic data editor. Version 0.9971. Program distributed by the author. Verfügbar unter: <http://www.phyde.de/>.
- Müller, K. & T. Borsch (2005):** Phylogenetics of *Utricularia* (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the *trnK* intron in a lineage with high substitutional rates. *Plant Syst. Evol.* 250: 39-67.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn & H. Erlich (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1: 263-73.
- Murray, M. G. & W. F. Thompson (1980):** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8 (19): 4321-4325.
- Nanni, L., N. Ferradini, F. Taffetani & R. Papa (2004):** Molecular phylogeny of *Anthyllis* ssp. *Plant Biol.* 6: 454-464.
- Nylander, J. A. A. (2004):** MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evolutionary Biology Centre, Uppsala University*.
- Ohsako, T. & O. Ohnishi (2000):** Intra- and interspecific phylogeny of wild *Fagopyrum* (Polygonaceae) species based on nucleotide sequence of noncoding regions in chloroplast DNA. *Am. J. Bot.* 87 (4): 573-582.
- Olson, D. M., E. Dinerstein, E. D. Wikramanayake, N. D. Burgess, G. V. N. Powell, E. C. Underwood, J. A. D'amico, I. Itoua, H. E. Strand, J. C. Morrison, C. J. Loucks, T. F. Allnutt, T. H. Ricketts, Y. Kura, J. F. Lamoreux, W. W. Wettengel, P. Hedao & K. R. Kassem (2001):** Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on earth. *Bioscience* 51: 933-938.

- Overbeck, G. E., S. C. Müller, A. Fidelis, J. Pfadenhauer, V. D. Pillar, C. C. Blanco, I. I. Boldrini, R. Both & E. D. Forneck (2007):** Brazil's neglected biome: the south Brazilian Campos. *Perspect. Plant. Ecol. 9*: 101-116.
- Oxelman, B., M. Lidén & D. Berglund (1997):** Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Syst. Evol. 206*: 393-410.
- Palma-Silva, C., T. Wendt, F. Pinheiro, T. Barbará, M. F. Fay, S. Cozzolino & C. Lexer (2011):** Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Mol. Ecol. 20*: 3185-3201.
- Peel, M. C., B. L. Finlayson & T. A. McMahon (2007):** Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci. 11*: 1633-1644.
- Perry, A. S. & K. H. Wolfe (2002):** Nucleotide substitution rates in Legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat. *J. Mol. Evol. 55* (5): 501-508.
- Peters, J. (2009):** Revision of the genus *Fosterella* L. B. Sm. Bromeliaceae. Dissertation. *Systematik und Morphologie der Pflanzen, Fachbereich 18, Naturwissenschaften, Universität Kassel, Kassel*.
- Petit, J. R., J. Jouzel, D. Raynaud, N. I. Barkov, J.-M. Barnola, I. Basile, M. Bender, J. Chappellaz, M. Davisk, G. Delaygue, M. Delmotte, V. M. Kotlyakov, M. Legrand, V. Y. Lipenkov, C. Lorius, L. Pépin, C. Ritz, E. Saltzman & M. Stievenard (1999):** Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature 399*: 429-436.
- Pita, P. B. & N. L. Menezes (2002):** Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. *Revista Brasil. Bot. 25* (1): 25-34.
- Pompelli, M. F. & M. P. Guerra (2004):** Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. *Crop. Breed. Appl. Biotechnol. 4*: 273-279.
- Pompelli, M. F. & M. P. Guerra (2005):** Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. *Crop. Breed. Appl. Biotechnol. 5*: 117-126.
- Pompelli, M. F., D. Fernandes & M. P. Guerra (2005):** Somatic embryogenesis in *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae) - an endangered bromeliad from south Brazil. *Propag. Ornam. Plants 5* (4): 192-198.
- Pompelli, M. F., D. Fernandes & M. P. Guerra (2006):** Germination of *Dyckia encholirioides* (Gaudichaud) Mez var. *encholirioides* under saline conditions. *Seed Sci. Technol. 34*: 759-763.
- Porembski, S., G. Martinelli, R. Ohlemüller & W. Barthlott (1998):** Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Divers. Distrib. (4)*: 107-119.
- Posada, D. & K. A. Crandall (2001):** Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol. 16* (1): 37-45.
- Prinz, K., S. Schie, T. Debener, I. Hensen & K. Weising (2009):** Microsatellite markers for *Spergularia media* (L.) C. Presl. (Caryophyllaceae) and their cross-species transferability. *Mol. Ecol. Resour. 9*: 1424-1426.
- Rambaut, A. (2006):** FigTree 1.3.1. Program distributed by the author. Verfügbar unter: <http://beast.bio.ed.ac.uk/FigTree>.

- Rambaut, A. & A. J. Drummond (2009):** Tracer 1.5. *Program distributed by the author.* Verfügbar unter: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rauh, W. (1985):** Bromelienstudien I. Neue und wenig bekannte Arten aus Peru und anderen Ländern (XVII. Mitteilung). 4. *Dyckia* Schult. f. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 53: 51-62.
- Rauh, W. (1987):** Bromelienstudien I. Neue und wenig bekannte Arten aus Peru und anderen Ländern (XIX. Mitteilung). 3. *Dyckia* Schult. f. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 60: 16-24.
- Rauh, W. (1988):** Bromelienstudien I. Neue und wenig bekannte Arten aus Peru und anderen Ländern (XX. Mitteilung). 2. *Dyckia* Schult. f. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 65: 8-18.
- Rauh, W. & E. Groß (1991):** Bromelienstudien I. Neue und wenig bekannte Arten aus Peru und anderen Ländern (XXII. Mitteilung). 2. *Dyckia* Schult. f. *Trop. Subtrop. Pflanzenwelt* 79: 7-14.
- Rex, M. (2007):** Molekulare Untersuchungen zur Phylogenie der Gattung *Fosterella* (Bromeliaceae). Dissertation. *Systematik und Morphologie der Pflanzen, Fachbereich 18, Naturwissenschaften, Universität Kassel, Kassel.*
- Rex, M., K. Schulte, G. Zizka, J. Peters, R. Vásquez, P. L. Ibisch & K. Weising (2009):** Phylogenetic analysis of *Fosterella* L. B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51: 472-485.
- Robinson, H. & D. C. Taylor (1999):** The status of the Pitcairnioid genera of the Bromeliaceae. *Harv. Pap. Bot.* 4 (1): 195-202.
- Rogalski, J. M. (2007):** Biologia da conservação da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), Rio Itajaí-Açu, SC. Dissertation. *Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina UFSC, Florianópolis, SC.*
- Rogalski, J. M., A. Reis, M. S. d. Reis & C. D. Neto (2007):** Estrutura demográfica da bromélia clonal *Dyckia brevifolia* Baker, Rio Itajaí-Açu, SC. *Revista Brasil. Bioci.* 5 (supl. 1): 264-266.
- Rogalski, J. M., A. Reis, M. S. d. Reis & K. V. Hmeljevski (2009):** Biologia reprodutiva da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae), no Rio Itajaí-Açu, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasil. Bot.* 32 (4): 691-702.
- Roncal, J., A. Blach-Overgaard, F. Borchsenius, H. Balslev & J.-C. Svenning (2011):** A dated phylogeny complements macroecological analysis to explain the diversity patterns in *Geonoma* (Arecaceae). *Biotropica* 43 (3): 324-334.
- Rosenberg, N. A. & M. Nordborg (2002):** Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.* 3: 380-390.
- Rozen, S. & H. J. Skaletsky (2000):** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: K. S. and M. S. (Hrsg.) (2000): *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ. 365-386.
- Saghai-Marooif, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen & R. W. Allard (1984):** Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS* 81: 8014-8018.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487-91.

- Saitou, N. & M. Nei (1987):** The Neighbor-Joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Saltonstall, K. (2001):** A set of primers for amplification of noncoding regions of chloroplast DNA in the grasses. *Mol. Ecol. Notes* 1: 76-78.
- Samuel, R., H. Kathriarachchi, P. Hoffmann, M. H. J. Barfuss, K. J. Wurdack, C. C. Davis & M. W. Chase (2005):** Molecular phylogenetics of Phyllanthaceae: Evidence from plastid *matK* and nuclear *PHYC* sequences. *Am. J. Bot.* 92 (1): 132-141.
- Sanderson, M. J. (1997):** A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Mol. Biol. Evol.* 14 (12): 1218-1231.
- Sanderson, M. J. (2002):** Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: A penalized likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 19 (1): 101-109.
- Sang, T., D. J. Crawford & T. F. Stuessy (1997):** Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 84 (8): 1120-1136.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74 (12): 5463-5467.
- Sass, C. & C. D. Specht (2010):** Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 55: 559-571.
- Sazima, I., S. Vogen & M. Sazima (1989):** Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. *Plant Syst. Evol.* 168: 167-179.
- Schuelke, M. (2000):** An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18: 233-234.
- Schulte, K., R. Horres & G. Zizka (2005):** Molecular phylogeny of Bromelioideae and its implications on biogeography and the evolution of CAM in the family (Poales, Bromeliaceae). *Senckenb. Biol.* 85: 113-125.
- Schulte, K., M. H. J. Barfuss & G. Zizka (2009):** Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51: 327-339.
- Schultes, J. A. & J. H. Schultes (1830):** Bromeliaceae. In: J. J. Roemer and J. A. Schultes (Hrsg.) (1830): *Caroli a Linné, equitis, Systema vegetabilium secundem classes, ordines, genera, species; cum characteribus, differentiis et synonymiis. Editio nova, speciebus inde ab editione XV. detectis aucta et locupletata. Cotta, Stuttgart.* 7, Pars 2: 1193-1287.
- Schütz, N. (2012):** Systematics, morphology and taxonomy of the genus *Deuterocohnia* L. B. Sm. Bromeliaceae. Dissertation. *Systematik und Morphologie der Pflanzen, Fachbereich 18, Naturwissenschaften, Universität Kassel, Kassel.*
- Sharma, A. K. & I. Ghosh (1969):** Cytotaxonomy of the family Bromeliaceae. *Cytologia* 36: 237-247.
- Sharrock, R. A. & P. H. Quail (1989):** Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Gene. Dev.* 3: 1745-1757.
- Shaw, J., E. B. Lickey, E. E. Schilling & R. L. Small (2007):** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.* 94: 275-288.

- Shinozaki, K., M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Ohto, K. Torazawa, B. Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdoh, H. Shimada & M. Sugiura (1986):** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5 (9): 2043-2049.
- Silva, A. L. L., E. B. Dornelles, D. A. Bisognin, E. T. H. Franco & M. A. Horbach (2007):** Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral - an extinction threatened bromeliad. *Iheringia Ser. Bot.* 62 ((1-2)): 39-43.
- Silva, A. L. L., E. T. H. Franco, E. B. Dornelles & J. P. A. Gesing (2008):** Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker - Bromeliaceae. *Iheringia Ser. Bot.* 63 (1): 135-138.
- Simon, M. F., R. Grether, L. P. de Queiroz, C. Skemae, R. T. Pennington & C. E. Hughes (2009):** Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *PNAS* 106 (48): 20359–20364.
- Sitte, P., E. W. Weiler, J. W. Kadereit, A. Bresinsky & C. Körner (2002):** Strasburger - Lehrbuch der Botanik. 35. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg & Berlin.*
- Small, R. L., R. C. Cronn & J. F. Wendel (2004):** Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Aust. Syst. Bot.* 17: 145-170.
- Smith, L. B. (1934):** Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. *Bot. Jahrb. Syst.* 66: 446-468.
- Smith, L. B. (1966):** Notes on Bromeliaceae XXIII. *Phytologia* 13 (2): 84-161.
- Smith, L. B. (1967):** Notes on Bromeliaceae. *Phytologia* 14 (8): 457-491.
- Smith, L. B. & R. J. Downs (1974):** Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Fl. Neotrop. Monogr.* 14 Part 1: 1-662.
- Smith, L. B. & R. J. Downs (1977):** Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Fl. Neotrop. Monogr.* 14 Part 2: 663-1492.
- Smith, L. B. & R. J. Downs (1979):** Bromelioideae (Bromeliaceae). *Fl. Neotrop. Monogr.* 14 Part 3: 1493-2142.
- Smith, L. B. (1979):** *Dyckia* Schult. f. In: F. E. R., J. A. Leussink and F. A. Stafleu (Hrsg.) (1979): Index nominum genericorum (Plantarum) [ING] Vol. 1-3. Regnum Veg. *Bohn, Scheltema & Holkema, Utrecht, The Netherlands.* 100-102: 1-1896.
- Smith, L. B. & W. Till (1998):** Bromeliaceae. In: K. Kubitzki (Hrsg.) (1998): The Families and Genera of Vascular Plants. Volume IV. Flowering Plants. Monokotyledons. Alismatanae and Comelinanae (except Gramineae). *Springer, Berlin.* 74-99.
- Southcott, L. & K. L. Ostevik (2011):** Bromeliad population genetics reveals species cohesion against the odds. *Mol. Ecol.* 20: 3081-3083.
- Stamatakis, A. (2006a):** Phylogenetic models of rate heterogeneity: A high performance computing perspective. *International Parallel & Distributed Processing Symposium (IPDPS) 2006. Rhodes, Greece,*
- Stamatakis, A. (2006b):** RAXML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22 (21): 2688-2690.

- Stamatakis, A., P. Hoover & J. Rougemont (2008):** A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. *Syst. Biol.* 57 (5): 758-771.
- Stebbins, G. L. (1984):** Polyploidy and the distribution of the arctic-alpine flora: new evidence and a new approach. *Bot. Helv.* 94: 1-13.
- Strehl, T. & R. C. P. Beheregaray (2006):** Morphologia de sementes do gênero *Dyckia*, subfamília Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Pesquisas-Botânica, São Leopoldo* 57: 103-120.
- Strehl, T. (2008):** New bromeliads, genus *Dyckia*, from Rio Grande do Sul, Brazil. *Bromeliaceae* 42 (5): 8-19.
- Swofford, D. L. (2003):** PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0 Beta 10. *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts*.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou & J. Bouvet (1991):** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105-1109.
- Tarré, E., B. B. M. Pires, A. P. M. Guimarães, L. A. Carneiro, R. C. Forzza & E. Mansur (2007):** Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *Dyckia* Schult. & Schult. f. species (Bromeliaceae). *Acta Bot. Bras.* 21 (4): 777-783.
- Tavaré, S. (1986):** Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lectures Math. Life Sci.* 17: 57-86.
- Taylor, D. C. & H. Robinson (1999):** A rejection of *Pepinia* (Bromeliaceae: Pitcairnioideae) and taxonomic revisions. *Harv. Pap. Bot.* 4 (1): 203-217.
- Tel-Zur, N., S. Abbo, D. Myslabodski & Y. Mizrahi (1999):** Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 249-254.
- Templeton, A. R., K. A. Crandall & C. F. Sing (1992):** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. *Genetics* 132: 619-633.
- Terry, R. G., G. K. Brown & R. G. Olmstead (1997):** Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *Am. J. Bot.* 84: 664-670.
- Till, W. & W. Morawetz (1990):** Eine neue *Dyckia* aus Pernambuco, Brasilien: *Dyckia rupestris* W. Till & W. Morawetz, spec. nov. *Bromelie* (3): 66-68.
- Tsitrone, A., M. Kirkpatrick & D. A. Levin (2003):** A model for chloroplast capture. *Evolution* 57 (8): 1776-1782.
- Uarrota, V. G., R. d. O. Rodrigues, M. Shibata, R. Cipriani, D. Nerling, L. d. S. d. Sousa & R. Pescador (2012):** Physiological characterization of two tropical epiphyte species: *Dyckia distachya* and *Vriesea platynema* (Bromeliaceae). *Asian J. Plant Sci.* 11 (2): 70-76.
- Versieux, L. M. & T. Wendt (2006):** Checklist of Bromeliaceae of Minas Gerais, Brazil, with notes on taxonomy and endemism. *Selbyana* 27 (2): 107-146.
- Versieux, L. M. & T. Wendt (2007):** Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. *Biodivers. Conserv.* 16: 2989-3009.

- Vesprini, J. L., L. Galetto & G. Bernardello (2003):** The beneficial effect of ants on the reproductive success of *Dyckia floribunda* (Bromeliaceae), an extrafloral nectary plant. *Can. J. Bot.* 81: 24-27.
- Vieira, D. C. M., F. Socolowski & M. Takaki (2007):** Germinação de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. *Revista Brasil. Bot.* 30 (2): 183-188.
- Voltolini, C. H., A. Reis & M. Santos (2009):** Leaf morphoanatomy of the rheophyte *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae). *Revista Brasil. Bioci.* 7 (4): 335-343.
- Vosgueritchian, S. B. & S. Buzato (2006):** Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. *Revista Brasil. Bot.* 29 (3): 433-442.
- Wagner, N. (2007):** Etablierung von Chloroplasten DNA-Markern für molekulare Verwandtschaftsanalysen in der Gattung *Deuterocohnia* (Bromeliaceae). Diplomarbeit. *Systematik und Morphologie der Pflanzen, Fachbereich 18, Naturwissenschaften, Universität Kassel, Kassel.*
- Wagner, N., D. Silvestro, D. Brie, P. L. Ibisch, G. Zizka, K. Weising & K. Schulte (2012):** Spatiotemporal evolution of *Fosterella* (Bromeliaceae) in the Central Andean biodiversity hotspot. *In preparation.*
- Waldemar, C. C. & B. E. Irgang (2003):** A ocorrência do mutualismo facultativo entre *Dyckia maritima* Backer (Bromeliaceae) e o cupim *Cortaritermes silvestrii* (Holmgren), Nasutitermitinae, em afloramentos rochosos no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS. *Acta Bot. Bras.* 17 (1): 37-48.
- Watts, C. D., A. E. Fisher, C. D. Shrum, W. L. Newbold, S. Hansen, C. Liu & S. A. Kelchner (2008):** The D4 set: primers that target highly variable intron loops in plant chloroplast genomes. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 1344-1347.
- Weising, K. & R. C. Gardner (1999):** A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42 (1): 9-19.
- Wiesbauer, M. B. (2008):** Biologia reprodutiva e diversidade genética de *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae) como subsídio para conservação e reintrodução de populações extintas na natureza. Dissertation. *Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina UFSC, Florianópolis, SC.*
- Winkler, S. (1980):** Ursachen der Verbreitungsmuster einiger Bromeliaceae in Rio Grande do Sul (Südbrasilien). *Flora* 170: 371-393.
- Winkler, S. (1982):** Die Bromeliaceae von Rio Grande do Sul (S-Brasilien). *Doc. Nat.* (3): 1-80.
- Winkler, S. (1986):** Differenzierungen und deren Ursachen innerhalb der Bromeliaceen. *Beitr. Biol. Pflanzen* 61: 283-314.
- Wöhrmann, T. & K. Weising (2011):** In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across Bromeliaceae. *Theor. Appl. Genet.* 123: 635-647.
- Wöhrmann, T., D. S. d. B. Pinangé, F. Krapp, A.-M. Benko-Iseppon, B. Huettel & K. Weising (2012):** Development of 15 nuclear microsatellite markers in the genus *Dyckia*

(Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conserv. Genet. Resour. published online first* (DOI 10.1007/s12686-012-9738-y).

**Wu, C.-I. (2001):** The genic view of the process of speciation. *J. Evol. Biol.* 14: 851-865.

**Wu, C.-I. & C.-T. Ting (2004):** Genes and speciation. *Nat. Rev. Genet.* 5: 114-122.

**Xu, D. H., J. Abe, M. Sakai, A. Kanazawa & Y. Shimamoto (2000):** Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes. *Theor. Appl. Genet.* 101: 724-732.

**Zachos, J., M. Pagani, L. Sloan, E. Thomas & K. Billups (2001):** Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292: 686-693.

**Zuckerlandl, E. & L. B. Pauling (1962):** Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In: M. Kasha and B. Pullman (Hrsg.) (1962): Horizons in Biochemistry. *Academic Press, New York.* 189-225.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Ananas comosus</i> und die Verbreitung der Bromeliaceae.....	1
Abbildung 2: Vertreter der Bromeliaceae.....	2
Abbildung 3: Systematik der Bromeliaceae.....	4
Abbildung 4: Vertreter der Pitcairnioideae und deren Verbreitung.....	5
Abbildung 5: Die Gattung <i>Dyckia</i> : Vegetative Organe.....	7
Abbildung 6: Die Gattung <i>Dyckia</i> : Infloreszenzen, Blüten und Früchte.....	9
Abbildung 7: Die Gattung <i>Dyckia</i> : Blüten.....	11
Abbildung 8: Die Gattung <i>Dyckia</i> : Samen.....	12
Abbildung 9: Klima, Biome und Geländehöhe im Verbreitungsgebiet von <i>Dyckia</i> .....	14
Abbildung 10: Lebensraum von <i>Dyckia</i> .....	16
Abbildung 11: Xeromorphe Anpassungen , extraflorale Nektarien und Bestäubung.....	19
Abbildung 12: Historische Entwicklung der Anzahl anerkannter Arten von <i>Dyckia</i> und <i>Encholirium</i> .....	22
Abbildung 13: Fundorte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzen von <i>Dyckia</i> .....	29
Abbildung 14: Genkarte des Plastoms von <i>Typha latifolia</i> (nach Guisinger et al. 2010).....	38
Abbildung 15: Sequenzvariabilität verschiedener plastidärer Loci innerhalb von acht Arten von <i>Dyckia</i> .....	67
Abbildung 16: Ausschnitt aus dem Alignment für den Locus <i>rps16-trnK</i> .....	68
Abbildung 17: Bayes'sche Analyse der Einzel-Alignments der sechs sequenzierten plastidären Loci.....	69
Abbildung 18: Datierte Phylogenie auf Basis sechs plastidärer Loci.....	74
Abbildung 19: RAxML-Analyse auf Basis sechs plastidärer Loci.....	77
Abbildung 20: Einzelner kürzester Baum aus einer Parsimonieanalyse auf Basis sechs plastidärer Loci.....	76
Abbildung 21: Bayes'sche Analyse auf Basis sechs plastidärer Loci.....	78
Abbildung 22: In der BEAST-Analyse ermittelte Substitutionsraten.....	80
Abbildung 23: Haplotyp-Netzwerk auf Basis sechs plastidärer Loci.....	82
Abbildung 24: Ausschnitt des Alignments für den Locus <i>phyC</i> .....	87
Abbildung 25: Beobachtete Heterozygotie am Locus <i>phyC</i> .....	88
Abbildung 26: Einzelner Baum aus einer Parsimonieanalyse auf Basis von <i>phyC</i> .....	90
Abbildung 27: RAxML-Analyse auf Basis von <i>phyC</i> .....	91
Abbildung 28: Bayes'sche Analyse auf Basis von <i>phyC</i> .....	92
Abbildung 29: Bayes'sche Analyse auf Basis von <i>phyC</i> mit reduziertem Probenset.....	95
Abbildung 30: Amplifikation von cpSSR-Loci für ein Set aus drei <i>Dyckia</i> -Arten.....	100
Abbildung 31: Kombinierte Bayes'sche Analyse von cpSSR- und Sequenzdaten.....	103
Abbildung 32: Bayes'sche Analyse auf Gattungsebene mit 12 cpSSR-Loci.....	102
Abbildung 33: Einfluss von cpSSR-Daten auf den Datensatz aus plastidären Sequenzen.....	114
Abbildung 35: Vergleich der Phylogenien aus AFLP- und plastidären Daten.....	121
Abbildung 34: Vergleich der Phylogenien aus plastidären Daten und <i>phyC</i> .....	120
Abbildung 36: Merkmalskartierung auf die plastidäre Phylogenie.....	130
Abbildung 37: Hypothese zur historischen Biogeographie.....	134
Abbildung 38: Klimaentwicklung während der Geschichte von <i>Dyckia</i> .....	136
Abbildung 39: Modellierung der Ausdehnung von Campos Rupestres in vergangener Zeit.....	139

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pflanzenmaterial.....	30
Tabelle 2: PCR-Primer zur Amplifikation plastidärer DNA-Abschnitte.....	40
Tabelle 3: PCR-Programme zur Amplifikation plastidärer DNA-Abschnitte .....	41
Tabelle 4: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation plastidärer DNA-Abschnitte.....	42
Tabelle 5: PCR-Primer zur Amplifikation nukleärer Loci.....	44
Tabelle 6: PCR-Programme zur Amplifikation nukleärer Loci .....	45
Tabelle 7: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation nukleärer Loci.....	46
Tabelle 8: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Amplifikation plastidärer Mikrosatelliten (cpSSRs).....	53
Tabelle 9: Alignment-Statistiken.....	72
Tabelle 10: Gefundene cpSSR-Loci und entwickelte Primer aus Alignments.....	96
Tabelle 11: Gefundene SSRs im 454-Datensatz.....	97
Tabelle 12: Gefundene cpSSR-Loci und entwickelte Primer aus 454-Daten.....	98
Tabelle 13: Test aller entwickelter cpSSR-Primer auf Funktionalität und Variabilität.....	99
Tabelle 14: Eigenschaften 12 näher charakterisierter cpSSR-Loci.....	101

## 9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aff.	affinis (lat., ähnlich mit, eng verwandt mit (aber nicht identisch))
AFLP	amplified fragment-length polymorphism
AIC	Akaike information criterion, Akaikes Informationskriterium
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
bp	base pairs, Basenpaare
BI	Bayesian inference, Bayes'sche Statistik
BS	Bootstrap-Analyse/Bootstrap-Wert
BSA	bovine serum albumine
C	Cytosin
CAM	Crassulacean acid metabolism
+CAT	categorized distribution (bei Substitutionsmodellen)
cf.	collectio formarum (lat., ähnlich mit (Formenkreis))
CI	ensemble consistency index, Konsistenzindex
cpSSR	chloroplast simple sequence repeat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
<i>D.</i>	<i>Dyckia</i>
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E.</i>	<i>Encholirium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETS	external transcribed spacer
fwd	forward, vorwärts
G	Guanin
+G	Gamma-Verteilung (bei Substitutionsmodellen)
GTR	general time reversible
GTRCAT	general time reversible, categorized
HI	homoplasy index, Homoplasielindex
HKY	Substitutionsmodell nach Hasegawa, Kushino & Yano
+I	invariant sites (bei Substitutionsmodellen)
IR	inverted repeat
ITS	internal transcribed spacer
JK	Jackknife-Analyse/Jackknife-Wert
lat.	lateinisch, aus dem Lateinischen
LSC	large single-copy
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MC <sup>3</sup>	Metropolis-coupled Markov Chain Monte Carlo
ML	Maximum Likelihood
MLBS	Bootstrap-Wert aus einer Maximum Likelihood-Analyse
MP	maximum parsimony, Parsimonieanalyse

## Abkürzungsverzeichnis

MPBS	Bootstrap-Wert aus einer Parsimonieanalyse
NGS	next-generation sequencing
NJ	Neighbour Joining
nom. nud.	nomen nudum (lat., ungültiger Name)
NJBS	Neighbour Joining Bootstrap-Wert
NPRS	non-parametric rate smoothing
NTS	non-transcribed spacer
<i>P.</i>	je nach Zusammenhang entweder <i>Prionophyllum</i> oder <i>Pitcairnia</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PIC	potentially parsimony-informative character
PL	penalized likelihood
PP	posterior probability
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RC	rescaled consistency index
rDNA	ribosomale DNA
rev	reverse, rückwärts
RI	retention index, Retentionsindex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
s. n.	sine nomine (lat., ohne Namen)
spec.	species (lat., (unbekannte) Art)
SSB	substitutions per site per billion years
SSC	small single-copy
SSR	simple sequence repeat
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBR	tree bisection and reconnection
TE	Tris-HCl-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
var.	varietas (lat., Varietät)
vgl.	vergleiche
v/v	volume per volume, Volumen pro Gesamtvolumen
w/v	weight per volume, Gewicht pro Gesamtvolumen
z. B.	zum Beispiel

## 10 Anhang

### 10.1 Elektronischer Anhang

Im elektronischen Anhang befinden sich folgende Daten:

- kombiniertes Alignment sechs plastidärer Loci für alle 124 Proben im NEXUS-Format (alignment\_cp\_kombiniert.nex)
- Alignment der *phyC*-Sequenzen für alle 124 Proben im NEXUS-Format (alignment\_phyc.nex)
- cpSSR-Daten in Tabellenform (Tabstopp-getrenntes Textformat, cpsr.txt)

### 10.2 Übrige Anhänge

Anhang 1: Verwendete Primer-Programm-Kombinationen für <i>phyC</i> .....	174
Anhang 2: Phylogenie auf Basis von <i>phyC</i> für ein erweitertes Probenet.....	175
Anhang 3: Erweitertes Probenet für <i>phyC</i> : Pflanzentabelle.....	176
Anhang 4: Spezifikationen der Software SeqSplitter 1.0.....	178
Anhang 5: Gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten DNA-Proben.....	180
Anhang 6: Kombiniertes plastidärer Datensatz: Neighbour Joining-Analyse.....	181
Anhang 7: Kombiniertes plastidärer Datensatz: NJ Bootstrap-/Jackknife-Analyse.....	182
Anhang 8: Kombiniertes plastidärer Datensatz: Parsimonieanalyse: Strict-Konsensusbaum.....	183
Anhang 9: Kombiniertes plastidärer Datensatz: Haplotyp-Netzwerk mit DNA-Nummern.....	184
Anhang 10: <i>PhyC</i> -Datensatz: Neighbour Joining-Analyse.....	185
Anhang 11: <i>PhyC</i> -Datensatz: Neighbour Joining Bootstrap-/Jackknife-Analyse.....	186
Anhang 12: <i>PhyC</i> -Datensatz: Parsimonieanalyse: Strict-Konsensusbaum.....	187
Anhang 13: Einzelner plastidärer Locus: <i>rp132-trnL</i> : Bayes'sche Analyse.....	188
Anhang 14: Einzelner plastidärer Locus: <i>rps16-trnK</i> : Bayes'sche Analyse.....	189
Anhang 15: Einzelner plastidärer Locus: <i>matK</i> : Bayes'sche Analyse.....	190
Anhang 16: Einzelner plastidärer Locus: <i>rps16</i> -Intron: Bayes'sche Analyse.....	191
Anhang 17: Einzelner plastidärer Locus: <i>petD</i> -Intron: Bayes'sche Analyse.....	192
Anhang 18: Einzelner plastidärer Locus: <i>trnD-trnT</i> : Bayes'sche Analyse.....	193
Anhang 19: Detaillierte Ergebnisse der cpSSR-Analyse.....	194

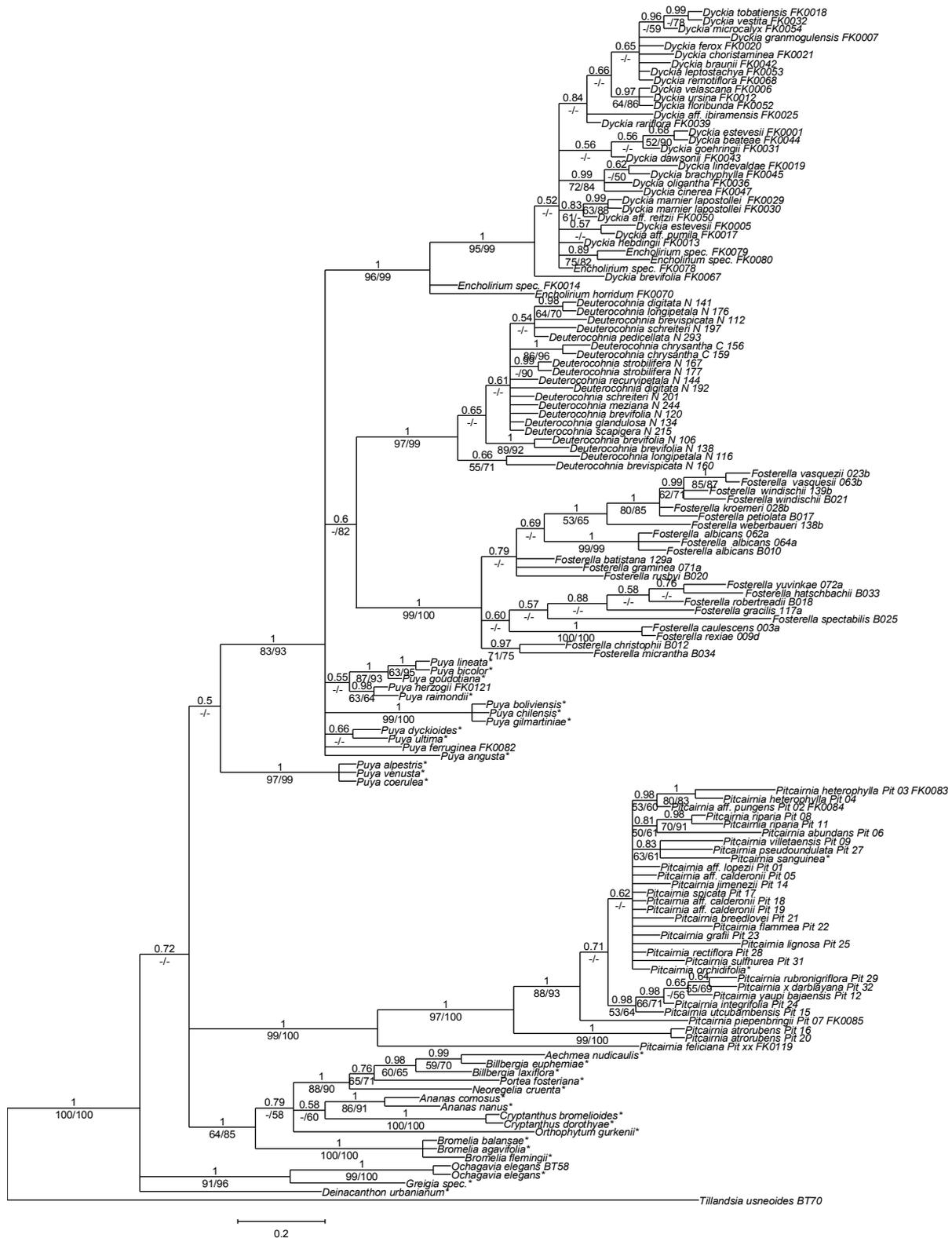
## Anhang

### Anhang 1: Verwendete Primer-Programm-Kombinationen für *phyc*

Die Ansätze sind chronologisch geordnet, die ältesten Versuche stehen ganz oben. In der ersten Spalte ist die Art des Ansatzes vermerkt (D: direkt, N: nested PCR, B: band-stab-Methode). Die Programme finden sich in Tabelle 6, die Primer in Tabelle 5. Nicht durchgeführte oder nicht zutreffende Schritte sind mit n/a gekennzeichnet. Die angegebenen Änderungen sind jeweils gegenüber dem vorhergehenden Programm zu verstehen (T<sub>A</sub>: Annealingtemperatur, n: Zyklenzahl, ↑: Erhöhung, ↓: Verringerung, Stammlösung: Verwendung von zehnfach höher konzentrierter DNA in der ersten Stufe als sonst, Teil-Loci: Amplifikation der Einzelteile anstatt des Gesamtfragmentes in der ersten Stufe einer band-stab-PCR).

Typ	Programm 1. Stufe	Primer 1. Stufe	Ergebnis 1. Stufe	Programm 2. Stufe	Primer 2. Stufe	Ergebnis 2. Stufe	Sequenzierung	Änderung
D	PHYC_Barfuss	komplett	keine Banden	n/a	n/a	n/a	n/a	
D	phyc_20100518	komplett Teil a Teil b	gut gut gut	n/a	n/a	n/a	n/a	n↑, T <sub>A</sub> ↓
D	phyc_20100527	M13-komplett M13-Teil a M13-Teil b	viele Zusatzbanden einige Zusatzbanden kaum Zusatzbanden	n/a	n/a	n/a	n/a schwach schlecht	n↑, +M13
D	phyc_20100531	M13-Teil a M13-Teil b	gut gut	n/a	n/a	n/a	schwach, Ausfälle ok	T <sub>A</sub> ↑
D	phyc_20100607	M13-Teil a M13-Teil b	gut gut	n/a	n/a	n/a	schwach, Ausfälle ok	T <sub>A</sub> ↑
N	phyc_nest_1_20100608	komplett	sehr schwach	phyc_nest_2_20100608	M13-Teil a M13-Teil b	gut gut	einige Ausfälle einige Ausfälle	
N	phyc_nest_1_20100608	komplett	sehr schwach	phyc_nest_2_20100614	M13-Teil a M13-Teil b	gut gut	ok, schwach ok, schwach	2. PCR n↑
N	phyc_nest_1_20100715	komplett	starke Stotterbanden	phyc_nest_2_20100608	M13-Teil a M13-Teil b	gut gut	schlecht schlecht	1. PCR n↑
N	phyc_nest_1_20100608	komplett	starke Stotterbanden	phyc_nest_2_20100608	M13-Teil a M13-Teil b	gut gut	schlecht schlecht	1. PCR n↓
N	phyc_nest_1_20100906	komplett	sehr schwach	phyc_nest_2_20100906	M13-Teil a M13-Teil b	gut gut	n/a	2. PCR n↓
N	phyc_20100518	komplett Teil a Teil b	starke Stotterbanden kein Fragment gut	n/a	n/a	n/a	n/a	T <sub>A</sub> ↓
B	phyc_20100518	komplett	starke Stotterbanden	phyc_bandstab_2_20101109	M13-Teil a M13-Teil b	Ausfälle ok	n/a schwach	Stamm- lösung
B	phyc_bandstab_1_20101110	Teil a Teil b	keine Fragmente keine Fragmente	n/a	n/a	n/a	n/a	Teil-Loci in 1. PCR
B	phyc_bandstab_1_20101111	komplett	gut, Stotterbanden	phyc_bandstab_2_20101110	M13-Teil a M13-Teil b	gut gut	gut gut	2. PCR T <sub>A</sub> ↓
B	phyc_bandstab_1_20110121	Teil a Teil b	gut, Zusatzbanden gut, Zusatzbanden	phyc_bandstab_2_20101110	M13-Teil a M13-Teil b	gut gut	gut gut	Teil-Loci in 1. PCR

## Anhang



### Anhang 2: Phylogenie auf Basis von *phyC* für ein erweitertes Probenaset

Gezeigt ist der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.1.2. Die Analyse wurde in zwei unabhängigen Läufen mit je 2.500.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posteriori-wahrscheinlichkeiten. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand. Unter den Ästen Bootstrap-Werte aus je 1.000 Wiederholungen einer Parsimonieanalyse und einer RAxML-Analyse des gleichen Datensatzes (Parsimonieanalyse/RAxML-Analyse).

### Anhang 3: Erweitertes Probenet für *phyC*: Pflanzentabelle

Gezeigt ist eine Auflistung aller im erweiterten Probenet für *phyC* enthaltenen Pflanzen (Anhang 2). Die Sammler-Nummern sind angegeben, falls bekannt (s. n.: ohne bekannte Nummer). Die Garten-ID ist für in Lebenssammlungen kultivierte Pflanzen angegeben (B: Botanischer Garten Berlin-Dahlem, BGHD: Botanischer Garten Heidelberg, BONN: Botanischer Garten Bonn, FAN: Fundacion Amigos de la Naturaleza (Santa Cruz, Bolivia), KAS: Botanischer Garten der Universität Kassel, Leme: Lebenssammlung von Dr. Elton Leme (Teresópolis, Brasilien), MB: Botanischer Garten Marburg, WU: Botanischer Garten der Universität Wien). Fundorte sind jeweils als Kombination von Land (BR: Brasilien, BOL: Bolivien, CO: Kolumbien, DOM: Dominikanische Republik, EC: Ecuador, GT: Guatemala, HN: Honduras MEX: Mexico, PE: Peru, PY: Paraguay, RA: Argentinien, RCH: Chile, RG: Guinea (Westafrika), ROU: Uruguay, YV: Venezuela) und Bundesstaat angegeben. Die DNA-ID dient der eindeutigen Identifizierung der Proben im Labor, FK-Nummern entsprechen denen aus Tabelle 1. Im Falle der aus der Publikation von Jabaily & Sytsma (2010) entnommenen Sequenzen sind jeweils nur die GenBank-Nummern vermerkt.

Art, Autor	Sammler-Nummer, Lebendpflanze Genbankeintrag	Fundort	DNA-ID	Publikation
<i>Aechmea nudicaulis</i> (L.) Grisebach	FJ968256			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	FJ968247			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Ananas nanus</i> (L.B. Smith) L.B. Smith	FJ968242			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Billbergia euphemiae</i> E. Morren	FJ968246			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Billbergia laxiflora</i> L.B. Smith	FJ968236			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Bromelia agavifolia</i> Brongniart ex Houlet	FJ968241			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Bromelia balansae</i> Mez	FJ968248			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Bromelia flemingii</i> I. Ramirez & Carnevali	FJ968240			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Cryptanthus bromelioides</i> Otto & Dietrich	FJ968245			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Cryptanthus dorothyae</i> Leme	FJ968238			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Deinacanthus urbanianum</i> (mez) Mez	FJ968244			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Deuterocohnia brevifolia</i> (Griseb.) M.A. Spencer & L.B. Sm.	s. n., B 118-02-74-83	unbekannt	N 120	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia brevifolia</i> (Griseb.) M.A. Spencer & L.B. Sm.	M. Balfanz 075, BGHD 107170	BOL, Tarija	N 138	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia brevifolia</i> (Griseb.) M.A. Spencer & L.B. Sm.	s. n., KAS NiSch 106	unbekannt	N 106	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia brevispicata</i> Rauh & L. Hrom.	L. Hromadnik 5213, B 164-09-98-30	BOL, Chuquisaca	N 112	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia brevispicata</i> Rauh & L. Hrom.	N. Schütz 06-022, Feldsammlung	BOL, Santa Cruz	N 160	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia chrysantha</i> (Phil.) Mez	G. Zizka 8156, Feldsammlung	RCH, Antofagasta	C 156	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia chrysantha</i> (Phil.) Mez	G. Zizka 8159, Feldsammlung	RCH, Antofagasta	C 159	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia digitata</i> L.B. Sm.	W. Rauh 64142, BGHD 130000	RA, Salta	N 141	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia digitata</i> L.B. Sm.	N. Schütz 06-098, Feldsammlung	RA, Salta	N 192	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia glandulosa</i> E. Gross	L. Hromadnik 5167, BGHD 103854	BOL, Tarija	N 134	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia longipetala</i> Mez	s. n., B 285-01-89-83	unbekannt	N 116	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia longipetala</i> Mez	N. Schütz 06-067, Feldsammlung	BOL, Tarija	N 176	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia meziana</i> ssp. <i>pedicellata</i> (W. Till) N. Schütz	N. Schütz 09 / 009, Feldsammlung	BOL, Chuquisaca	N 293	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia recurvipetala</i> E. Gross	W. Rauh 64236, BGHD 130120	RA	N 144	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia sanctae-crucis</i> (R. Vásquez & Ibsch) N. Schütz	R. Müller 259, Privatsammlung R. Vásquez	BOL, Santa Cruz	N 215	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia schreiteri</i> A. Cast.	N. Schütz 06-104, Feldsammlung	RA, Salta	N 197	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia schreiteri</i> A. Cast.	N. Schütz 06-108, Feldsammlung	RA, Salta	N 201	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia strobilifera</i> Mez	N. Schütz 06-046, Feldsammlung	BOL, Chuquisaca	N 167	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia strobilifera</i> Mez	N. Schütz 06-072, Feldsammlung	BOL, Chuquisaca	N 177	Schütz (2012)
<i>Deuterocohnia meziana</i> ssp. <i>meziana</i> Kuntze ex Mez	E. Gouda 95-21, BGHD 104977	BOL, Santa Cruz	N 244	Schütz (2012)
<i>Dyckia</i> aff. <i>ibiramensis</i> Reitz	L. Horst 1287, BGHD 130023	BR, Minas Gerais	FK0025	diese Arbeit
<i>Dyckia</i> aff. <i>pumila</i> L.B. Sm.	P. Braun BR 696, BGHD 104592	BR, Mato Grosso	FK0017	diese Arbeit
<i>Dyckia</i> aff. <i>reitzii</i> L.B. Sm.	A. Hofacker 386, WU B 02/62-1	BR, Rio Grande do Sul	FK0050	diese Arbeit
<i>Dyckia beateae</i> E. Gross & Rauh	P. Braun 560, BONN 4338	BR, Mato Grosso	FK0044	diese Arbeit
<i>Dyckia brachyphylla</i> L.B. Sm.	P. Braun 836, BONN 3644	BR, Minas Gerais	FK0045	diese Arbeit
<i>Dyckia braunii</i> Rauh	P. Braun 690, BONN 4339	BR, Goiás	FK0042	diese Arbeit
<i>Dyckia brevifolia</i> Baker	s. n., KAS s. n.	BR	FK0067	diese Arbeit
<i>Dyckia choristaminea</i> Mez	s. n., BGHD 130018	BR, Rio Grande do Sul	FK0021	diese Arbeit
<i>Dyckia cinerea</i> Mez	s. n., BONN 4348	BR, Minas Gerais	FK0047	diese Arbeit
<i>Dyckia dawsonii</i> L.B. Sm.	s. n., BONN 16540	BR, Goiás	FK0043	diese Arbeit
<i>Dyckia estevesii</i> Rauh	E. Esteves Pereira s. n., BGHD 105012	BR, Goiás	FK0005	diese Arbeit
<i>Dyckia estevesii</i> Rauh	P. Braun s. n., BGHD 105188	BR, Goiás	FK0001	diese Arbeit
<i>Dyckia ferox</i> Mez	W. Rauh 64237, BGHD 130031	RA, Cordoba	FK0020	diese Arbeit
<i>Dyckia floribunda</i> Grieseb.	W. Till 5069, WU 115/90	RA, La Rioja	FK0052	diese Arbeit
<i>Dyckia goehringii</i> E. Gross & Rauh	W. Rauh 67622, BGHD 105013	BR, Minas Gerais	FK0031	diese Arbeit
<i>Dyckia granmogulensis</i> Rauh	W. Rauh 56484, BGHD 130019	BR, Minas Gerais	FK0007	diese Arbeit
<i>Dyckia hebdingii</i> L.B. Sm.	s. n., BGHD 103913	BR, Rio Grande do Sul	FK0013	diese Arbeit
<i>Dyckia leptostachya</i> Baker	H. Amerhauser s. n., WU B 395/96	PY, Cordillera	FK0053	diese Arbeit
<i>Dyckia lindevaldae</i> Rauh	P. Braun BR 691, BGHD 108614	BR, Goiás	FK0019	diese Arbeit
<i>Dyckia marnier-lapostollei</i> var. <i>estevessii</i> Rauh	L. Horst 5, BGHD 130151	BR, Goiás	FK0030	diese Arbeit
<i>Dyckia marnier-lapostollei</i> var. <i>marnier-lapostollei</i> L.B. Sm.	L. Horst 4, BGHD 130234	BR, Goiás	FK0029	diese Arbeit
<i>Dyckia microcalyx</i> Baker	W. Till 6020, WU AB 57	PY, Paraguari	FK0054	diese Arbeit
<i>Dyckia oligantha</i> L.B. Sm.	W. Barthlott 10327, BONN 4346	BR, Minas Gerais	FK0036	diese Arbeit
<i>Dyckia rariflora</i> Schult f.	s. n., BONN 2411	BR, Minas Gerais	FK0039	diese Arbeit
<i>Dyckia remotiflora</i> Otto & A. Dietr.	s. n., KAS s. n.	ROU	FK0068	diese Arbeit
<i>Dyckia tobatiensis</i> Hassl.	W. & S. Till 6050, BGHD 102969	PY, Cordillera	FK0018	diese Arbeit
<i>Dyckia ursina</i> L.B. Sm.	s. n., BGHD 103809	BR, Minas Gerais	FK0012	diese Arbeit
<i>Dyckia velascana</i> Mez	W. & S. Till 5012, BGHD 103740	RA, Cordoba	FK0006	diese Arbeit
<i>Dyckia vestita</i> Hassl.	W. & S. Till 6018, BGHD 103741	PY, Paraguari	FK0032	diese Arbeit
<i>Encholirium horridum</i> L.B. Sm.	W. Schindhelm s. n., BGHD 108213	BR, Minas Gerais	FK0070	diese Arbeit
<i>Encholirium spec.</i>	R. Schulz s. n., BGHD 112920	BR	FK0080	diese Arbeit
<i>Encholirium spec.</i>	R. Schulz s. n., BGHD 125585	BR	FK0078	diese Arbeit
<i>Encholirium spec.</i>	W. Rauh 56468, BGHD 130033	BR, Bahia	FK0014	diese Arbeit
<i>Encholirium spec.</i>	R. Schulz s. n., BGHD 143704	BR	FK0079	diese Arbeit
<i>Fosterella albicans</i> (Griseb.) L.B. Smith	P. Ibsch 98.0204, FAN PI 98.0204	BOL, Santa Cruz	064a	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella albicans</i> (Griseb.) L.B. Smith	R. Vásquez 3617, FAN RV 3617	BOL, La Paz	062a	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella albicans</i> (Griseb.) L.B. Smith	J. Peters 06.0005, KAS JP06.005	BOL, Santa Cruz	B010	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella batistana</i> Ibsch, Leme & J. Peters	F. da Silva s. n., Leme 5078	BR, Pará	129a	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella caulescens</i> Rauh	W. Rauh 40579 a, FRP 99-18434-3	BOL, La Paz	003a	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella christophii</i> Ibsch, R. Vásquez & J. Peters	P. Ibsch 02.0002, KAS PI 0.0002	BOL, Santa Cruz	B012	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella gracilis</i> (Rusby) L.B. Smith	RS 281002-6, FAN RS 281002-6	BOL, Beni	117a	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella graminea</i> (L.B. Smith) L.B. Smith	Müller 216, FAN RM 216	BOL, La Paz	071a	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella hatschbachii</i> L.B. Smith & R.W. Read	E. Leme 7100, Leme 7100	BR, Mato Grosso	B033	Wagner et al. (2012)

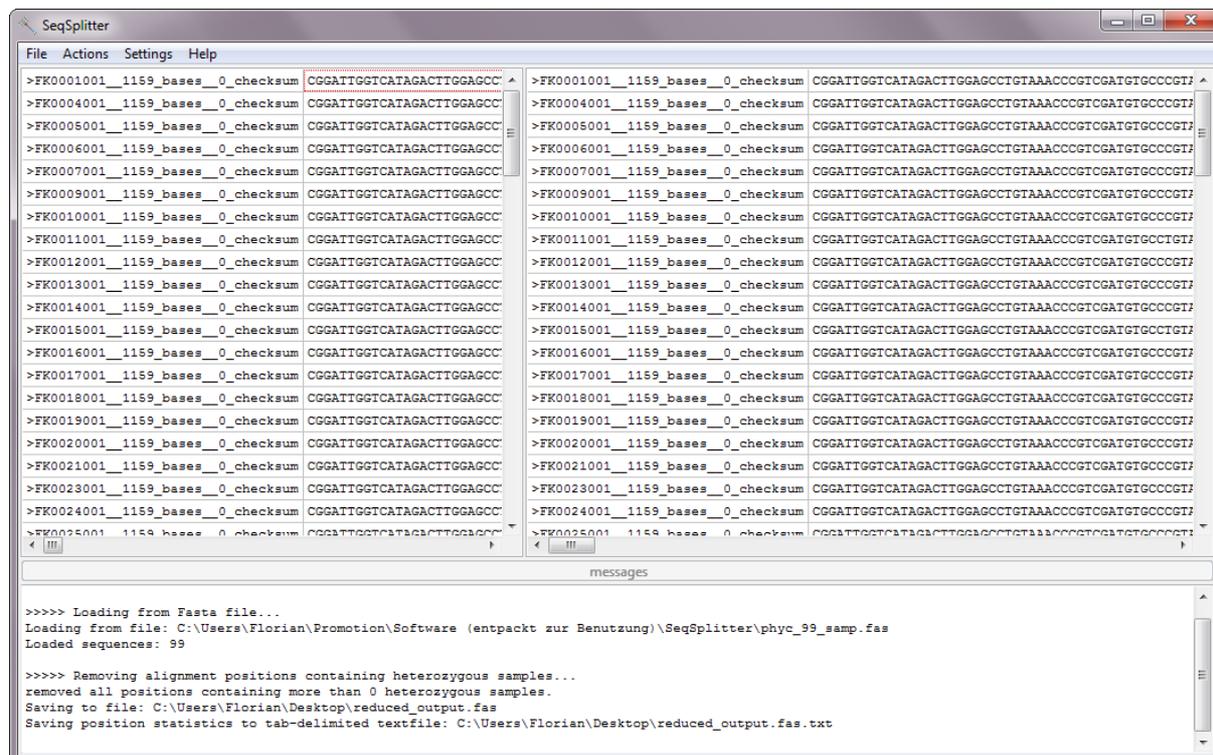
## Anhang

Art, Autor	Sammler-Nummer, Lebendpflanze Genbankeintrag	Fundort	DNA-ID	Publikation
<i>Fosterella kroemeri</i> Ibsch, R. Vásquez & J. Peters	THO 1398b, FAN TK 1398b	BOL, La Paz	028b	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella micrantha</i> (Lindl.) L.B. Smith	Welz 3124, BGHD 103726	GCA, Suchitepequez	B034	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella petiolata</i> (Mez) L.B. Smith	J. Peters 06.0115, KAS JP 06.0115	PE, Cusco	B017	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella rexiae</i> Ibsch, R. Vásquez & E. Gross	R. Vásquez 3673, FAN RV 3673	BOL, La Paz	009d	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella robertreadii</i> Ibsch & J. Peters	J. Peters 06.0126, KAS JP 06.0126	PE, Cuzco	B018	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella rusbyi</i> (Mez) L.B. Smith	J. Peters 06.0076, KAS JP06.0076	BOL, La Paz	B020	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella spectabilis</i> H. Luther	J. Peters 06.0045, KAS JP 06.0045	BOL, Chuquisaca	B025	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella vasquesii</i> E. Gross & Ibsch	P. Ibsch 98.0116, FAN PI 98.0116	BOL, Santa Cruz	063b	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella vasquesii</i> E. Gross & Ibsch	P. Ibsch 98.0117, FAN PI 98.0117	BOL, Santa Cruz	023b	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella weberbaueri</i> (Mez) L.B. Smith	T. Krömer 7286, BGHD 105332	BOL, Cochabamba	138b	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella windschii</i> L.B. Smith & R.W. Read	P. Ibsch 03.0016, FAN PI 03.0016	BOL, Santa Cruz	139b	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella windschii</i> L.B. Smith & R.W. Read	E. Leme 7144, Leme 7144	BR, Mato Grosso	B021	Wagner et al. (2012)
<i>Fosterella yuvinkae</i> Ibsch, R. Vásquez, E. Gross & S. Reichle	S. Reichle SR1, FAN SR1	BOL, Santa Cruz	072a	Wagner et al. (2012)
<i>Greigia spec.</i>	FJ968284			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Neoregelia cruenta</i> (Graham) L.B. Sm.	FJ968239			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Ochagavia elegans</i> Phil.	D. Bruhin s. n., BGHD 102663	RCH, Valparaiso	BT 58	Krapp, unveröffentlicht
<i>Ochagavia elegans</i> Phil.	FJ968237			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Orthophytum gurkenii</i> Hutchison	FJ968272			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Pitcairnia abundans</i> L.B. Sm.	s. n., BGHD 130636	unbekannt	Pit_06	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia aff. calderonii</i> Standl. & L.B. Sm.	W. Rauh s. n., BGHD 130607	unbekannt	Pit_05	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia aff. calderonii</i> Standl. & L.B. Sm.	G. Noller s. n., BGHD 132607	MEX, Chiapas	Pit_18	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia aff. calderonii</i> Standl. & L.B. Sm.	E. Kamm, BGHD 132612	HN	Pit_19	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia aff. lopezii</i> L.B. Sm.	Goebel s. n., BGHD 130622	PE, La Libertad	Pit_01	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia aff. pungens</i> Kunth	W. Rauh 69140, BGHD 130648	PE, Lambayeque	FK0084	diese Arbeit
<i>Pitcairnia atrorubens</i> (Beer) Baker	W. Rauh 38861, BGHD 104598	GCA, Escuintla	Pit_20	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia atrorubens</i> (Beer) Baker	s. n., BGHD 130379	unbekannt	Pit_16	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia breedlovei</i> L.B. Sm.	W. Rauh 52598, BGHD 132652	MEX, Oaxaca	Pit_21	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia feliciana</i> (A. Chev.) Harms & Mildbr.	I. Ebert & D. Bangoura s. n., WU s. n.	RG, Monte Gangan	FK0119	diese Arbeit
<i>Pitcairnia flammea</i> Lindl. var. <i>glabrior</i> L.B. Sm.	R. Kautzky s. n., BGHD 130368	BR	Pit_22	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia grafii</i> Rauh	E. Graf s. n., BGHD 102579	YV, Tachira	Pit_23	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia heterophylla</i> Beer	K. Senghas 11230, BGHD 104945	MEX, Guerrero	FK0083	diese Arbeit
<i>Pitcairnia heterophylla</i> Beer	s. n., BGHD 130626	unbekannt	Pit_04	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia integrifolia</i> Ker Gawl.	C. Innes s. n., BGHD 132666	St. Vincent (Kleine Antillen)	Pit_24	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia jimenezii</i> L.B. Sm.	L. Ariza-Julia s. n., BGHD 104140	unbekannt	Pit_14	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia lignosa</i> L.B. Sm.	Leist s. n., BGHD 103586	EC, Imbabura/Carchi	Pit_25	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia orchidifolia</i> Mez	FJ968253			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Pitcairnia piepenbringii</i> Rauh & Gross	Rauh 67430, BGHD 103786	BR, Bahia	FK0085	diese Arbeit
<i>Pitcairnia pseudoundulata</i> Rauh	W. Rauh 40159, BGHD 132642	PE, Amazonas	Pit_27	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia rectiflora</i> Rauh	W. Rauh 53673, BGHD 103565	PE, San Martin	Pit_28	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia riparia</i> Mez	M. Miyagawa s. n., BGHD 103060	BOL, Beni	Pit_11	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia riparia</i> Mez	K. Senghas, BGHD 103083	EC, Morona Santiago	Pit_08	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia rubronigriflora</i> Rauh	W. Rauh 53676, BGHD 103787	PE, San Martin	Pit_29	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia sanguinea</i> (H. Luther) D.C. Taylor & H. Robinson	FJ968252			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Pitcairnia spicata</i> (Lam.) Mez	L. Ariza-Julia s. n., BGHD 130021	Martinique (Kleine Antillen)	Pit_17	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia sulphurea</i> Mez	s. n., BGHD 104601	unbekannt	Pit_31	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia utcubambensis</i> Rauh	W. Rauh 53566, BGHD 104868	PE, Amazonas	Pit_15	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia villetaensis</i> Rauh	W. Rauh 37089, BGHD 104225	CO, Cundinamarca	Pit_09	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia x darblayana</i> Sallier	s. n., BGHD 132641	unbekannt	Pit_32	Krapp, unveröffentlicht
<i>Pitcairnia yaupi-bajaensis</i> Rauh	W. Rauh 25718, BGHD 103785	PE, Pasco	Pit_12	Krapp, unveröffentlicht
<i>Portea fosteriana</i> L.B. Smith	FJ968235			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya alpestris</i> (Poeppig) Gay	FJ968269			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya angusta</i> L.B. Smith	FJ968288			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya bicolor</i> Mez	FJ968282			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya boliviensis</i> Baker	FJ968270			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya chilensis</i> Molina	FJ968268			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya coerulea</i> Lindl.	FJ968263			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya dyckioidea</i> (Baker) Mez	FJ968258			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) L.B. Sm.	W. Rauh s. n., BGHD 130165	PE, Valley of Rio Marañon	FK0082	diese Arbeit
<i>Puya gilmartinii</i> G.S. Varadarajan & Flores	FJ968262			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya goudotiana</i> Mez	FJ968281			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya herzogii</i> Wittm.	T. Krömer 6581, BGHD 135240	BOL, Cochabamba	FK0121	diese Arbeit
<i>Puya lineata</i> Mez	FJ968283			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya raimondii</i> Harms	FJ968293			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya ultima</i> L.B. Smith	FJ968251			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Puya venusta</i> R. Philippi	FJ968267			Jabaily & Sytsma (2010)
<i>Tillandsia usneoides</i> L.	W. Rauh s. n., BGHD 130959	RA, Yungas Cachi	BT70	Krapp, unveröffentlicht

## Anhang 4: Spezifikationen der Software SeqSplitter 1.0

### Einsatzgebiet des Programms

Das Programm SeqSplitter 1.0 dient der Auswertung und Modifikation von Sequenzalignments. Einsatz findet es für durch direkte Sequenzierung von PCR-Produkten gewonnene Daten, welche überlagerte Sequenzen von Allelen identischer Länge enthalten. Das Programm wurde in der Entwicklungsumgebung Lazarus (Version 0.9.30 win 64, GPL/LGPL-Lizenz) für die Programmiersprache Free Pascal (Version 2.4.2 win 64, GPL/LGPL-Lizenz) entwickelt. SeqSplitter 1.0 ist ausschließlich für das Betriebssystem Microsoft Windows 7 Home Premium (64 Bit) getestet worden.



**Abbildung: Benutzeroberfläche von SeqSplitter 1.0 unter Microsoft Windows 7**

Auf der linken Seite finden sich die originalen Sequenzdaten, auf der rechten Seite die modifizierten Daten. Im unteren Bereich werden die Arbeitsschritte protokolliert.

### Funktionen

#### *File* → *Load fasta*

Lädt ein Sequenzalignment im Fast-Format, welches dann im linken Teil des Fensters dargestellt wird.

#### *File* → *Quit*

Beendet das Programm.

#### *Actions* → *Log sequence statistics*

Diese Funktion analysiert jede Sequenz einzeln und schreibt diverse Eigenschaften in eine Tabelle (Tabstoppgetrenntes Textformat, standardmäßig als `statistics_output.txt`). Für jede Sequenz werden angegeben: Name (Sequence name), Länge (Length), GC-Gehalt (GC value), Anzahl homozygoter Positionen (Homozygous positions), Anzahl heterozygoter Positionen insgesamt (Heterozygous positions), Zahl unsicherer Positionen mit zwei möglichen Nucleotiden (BiState positions), Zahl unsicherer Positionen mit drei möglichen Nucleotiden (TriState positions) und Vorkommen der einzelnen Nucleotide in der Sequenz (A, C, G, T, M, R, W, S, Y, K, B, D, H, V, N, Gaps, unbekannte (nicht-IUPAC-) Symbole).

#### *Actions* → *Split and export as fasta*

Jede der geladenen Sequenzen wird in zwei Tochtersequenzen (Allele) zerlegt. An eindeutigen Positionen (A, C, G, T und Gap (-, . oder ?)) erhält die Tochtersequenz das entsprechende Nucleotid. Dasselbe gilt für die uneindeutigen Symbole, welche mehr als zwei mögliche Nucleotide repräsentieren (B, D, H, V und N, sowie unbekannte (nicht-IUPAC-) Symbole). Für die übrigen (M, R, W, S, Y und K) erhält jede Tochtersequenz nach

dem Zufallsprinzip je ein anderes der beiden möglichen Nukleotide. Die generierten Sequenzen werden direkt im Fasta-Format abgespeichert (standardmäßig als splitted\_output.fas).

### Actions → Reduce to homozygous positions

Diese Funktion löscht alle Positionen des geladenen Alignments, an der mehr als n Sequenzen ein uneindeutiges Nukleotid aufweisen (M, R, W, S, Y, K, B, D, H oder V). Der Wert n entspricht der Einstellung „Reduction threshold“ (siehe unten). Ein Wert von n=0 entspricht der Einstellung „Reduce any heterozygous position“. Das modifizierte Alignment wird direkt im Fasta-Format abgespeichert (standardmäßig als reduced\_output.fas).

### Actions → Save log to file

Speichert alle Informationen, welche im unteren Bereich des Fensters protokolliert wurden, als Textdokument (standardmäßig als log.txt).

### Settings → Randomize/Use seed (/)/Set seed

Diese Einstellungen betreffen den Zufallsgenerator des Programms. Wird die „Randomize“-Funktion verwendet, wird der Zufallsgenerator mit einem zufälligen Wert initialisiert. Jede wiederholte Modifikation (die zufällige Aufspaltung in zwei Allele, „Funktion Split and export as fasta“) des gleichen Datensatzes führt dann zu unterschiedlichen Ergebnissen. Wird die „Use seed“-Funktion verwendet, führt die wiederholte Modifikation eines Datensatzes mit demselben Startwert immer zum selben Ergebnis. Mit der „Set seed“-Funktion kann ein beliebiger Startwert des Zufallsgenerators ausgewählt werden.

### Settings → Reduce any heterozygous position/Reduction threshold (/)/Set reduction threshold

Hier kann eingestellt werden, welche Art von Alignmentpositionen mit der Funktion „Reduce to homozygous positions“ gelöscht werden (siehe auch dort).



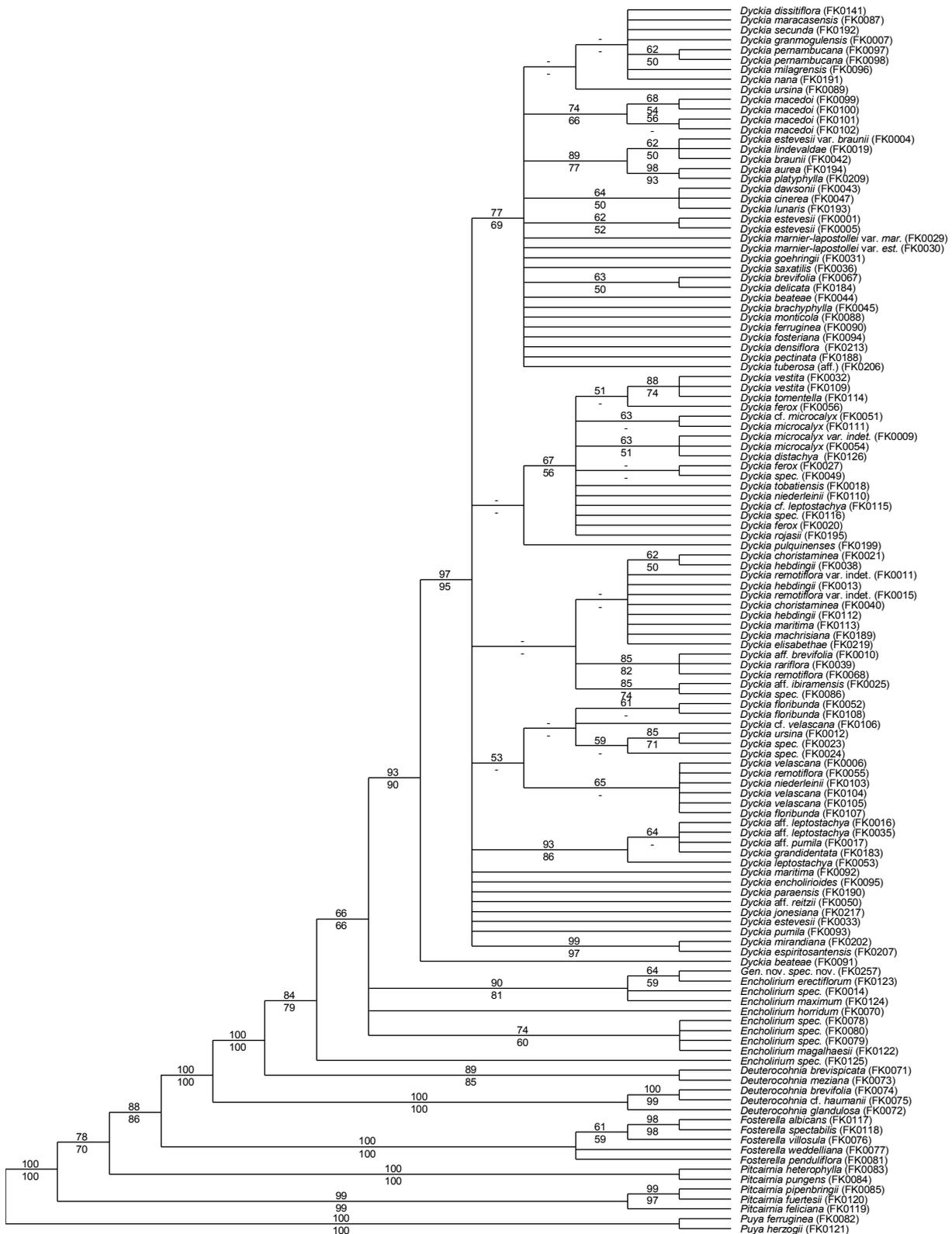
## Anhang



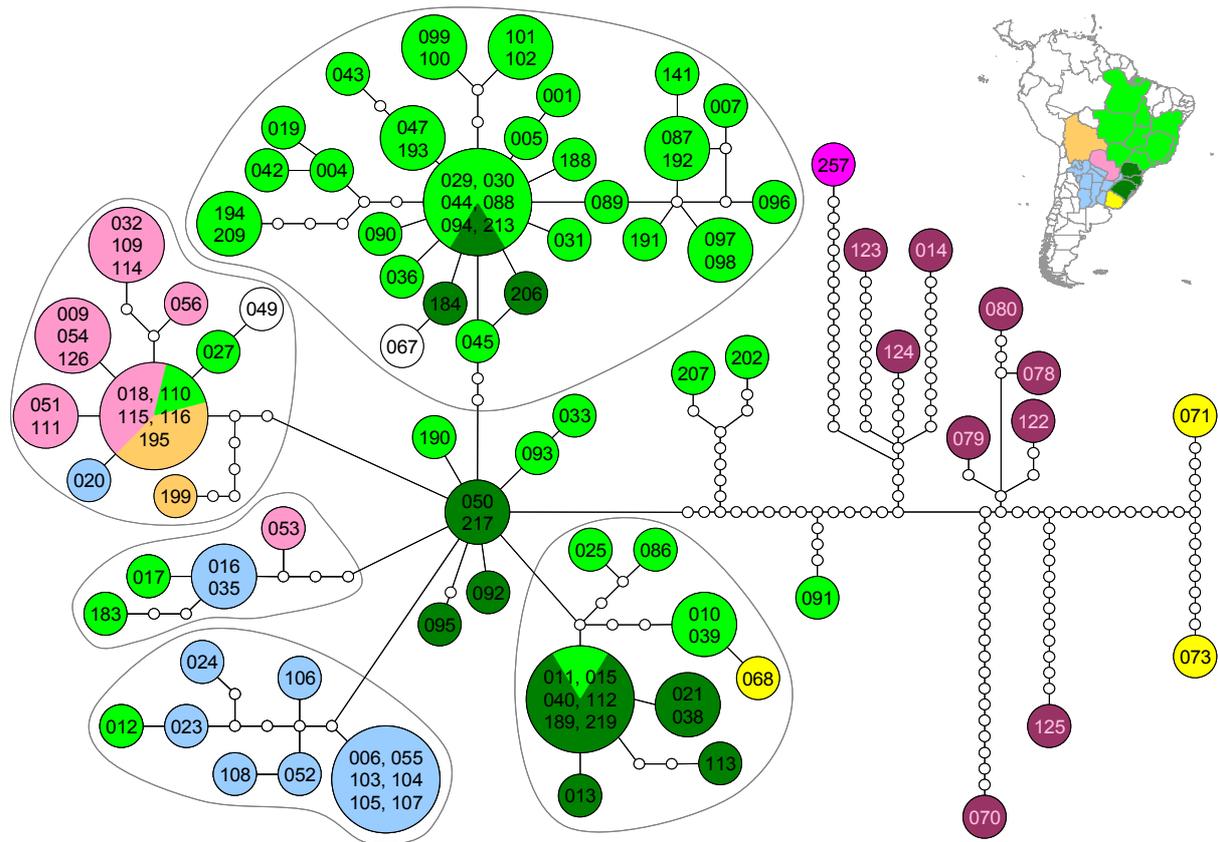
### Anhang 6: Kombierter plastidärer Datensatz: Neighbour Joining-Analyse

Gezeigt ist der Baum aus einer Neighbour Joining-Analyse durchgeführt mit PAUP\* 4.0b. Die Astlängen repräsentieren p-Distanzen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Ende der Abbildung.





**Anhang 8: Kombiniertes plastidärer Datensatz: Parsimonieanalyse: Strict-Konsensusbaum**  
 Gezeigt ist der Strict-Konsensusbaum aus 100.000 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 807 aus einer Parsimonieanalyse durchgeführt mit PAUP\* 4.0b. Über den Ästen finden sich Bootstrap-Werte, unter den Ästen Jackknife-Werte aus jeweils 1.000 Replikaten. Werte unter 50% sind nicht gezeigt.



**Anhang 9: Kombinerter plastidärer Datensatz: Haplotyp-Netzwerk mit DNA-Nummern**

Das Haplotyp-Netzwerk wurde mittels des Computerprogramms TCS 1.21 erstellt. Verwendet wurden nur Akzessionen von *Dyckia* und *Encholirium*, sowie *Deuterocohnia brevispicata* und *Deuterocohnia meziana* zur Bewurzelung. Die gezeigten Nummern entsprechen den DNA-Nummern der Proben.

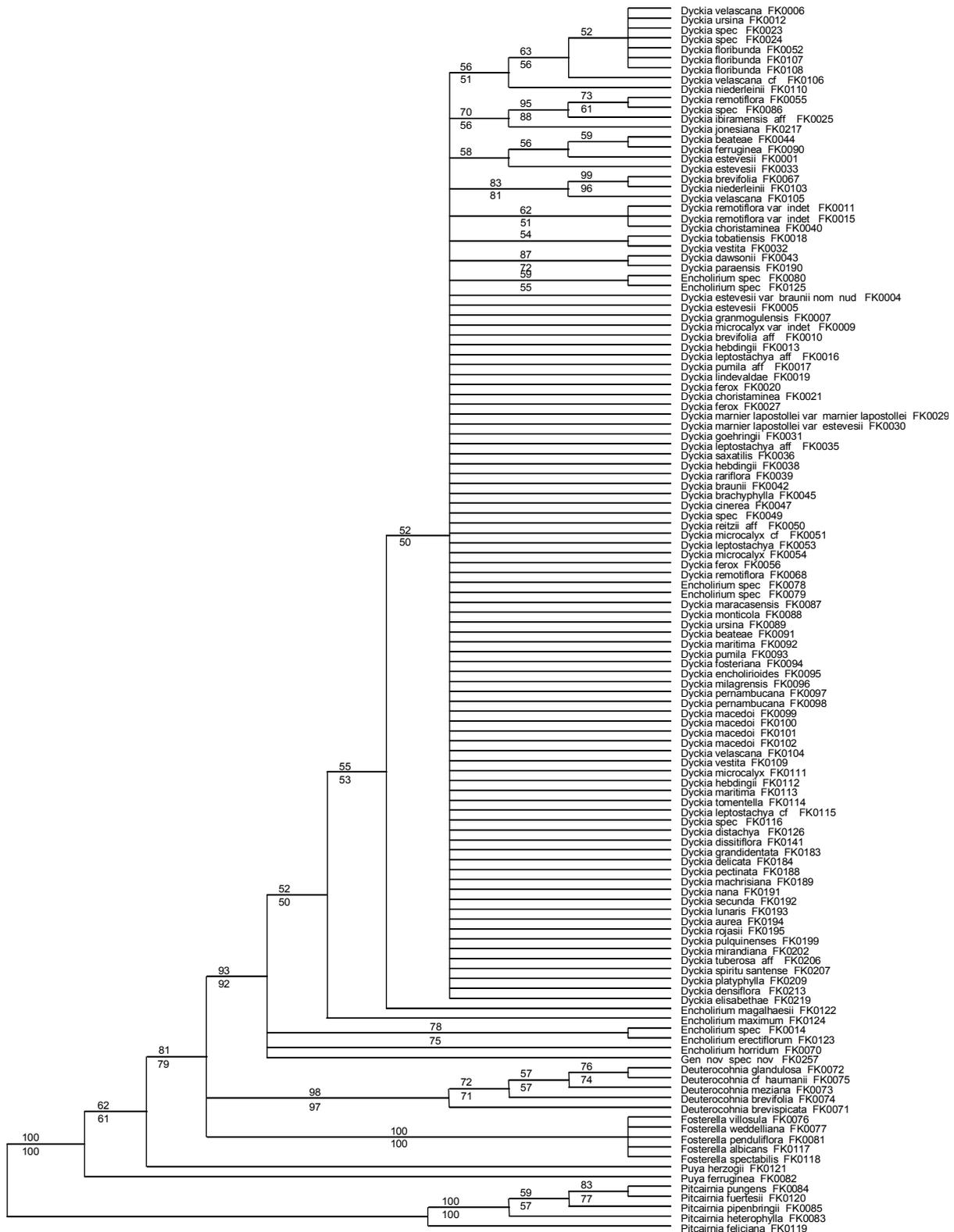
## Anhang



### Anhang 10: *PhyC*-Datensatz: Neighbour Joining-Analyse

Gezeigt ist der Baum aus einer Neighbour Joining-Analyse durchgeführt mit PAUP\* 4.0b. Die Astlängen repräsentieren p-Distanzen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Ende der Abbildung.

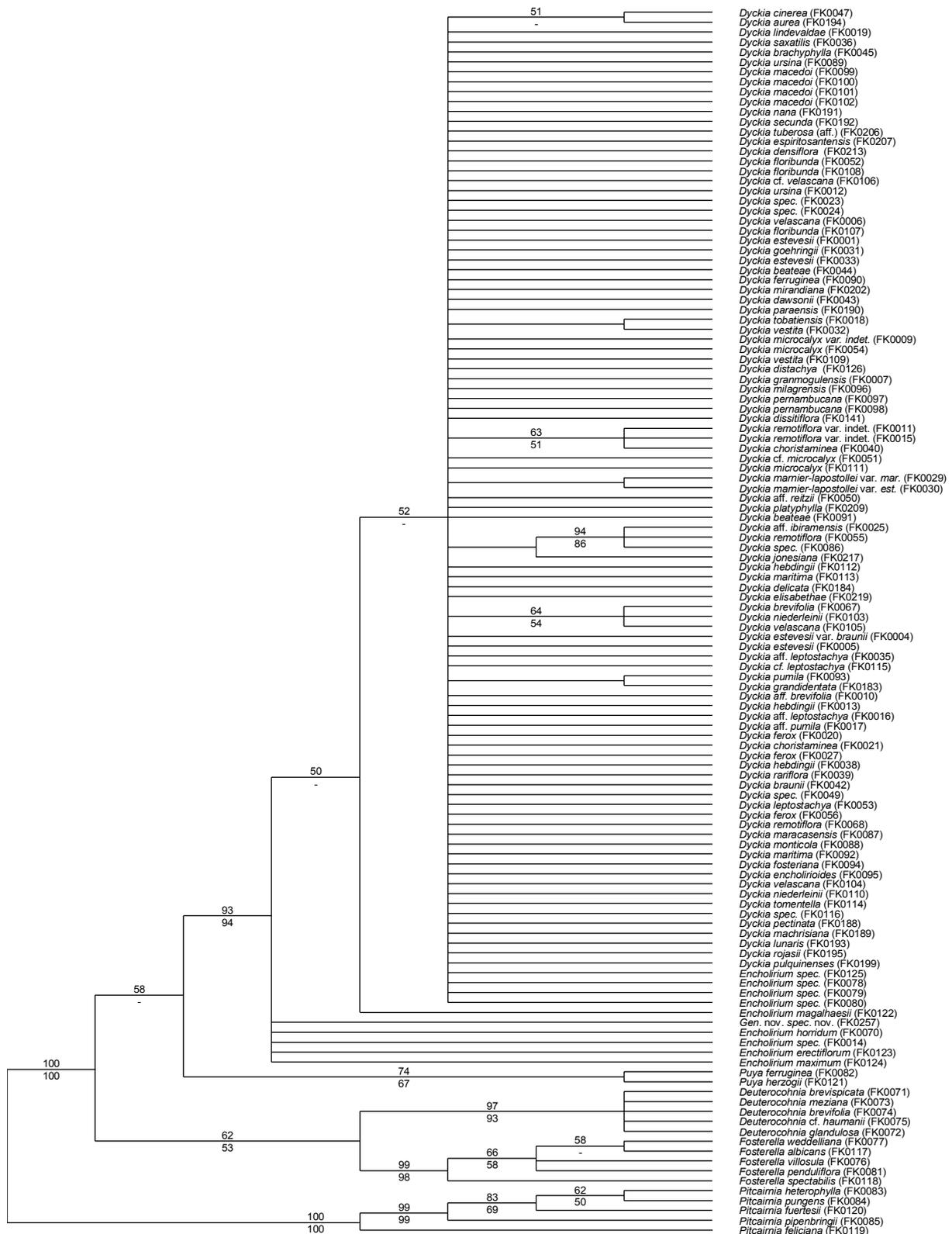
## Anhang



### Anhang 11: *PhyC*-Datensatz: Neighbour Joining Bootstrap-/Jackknife-Analyse

Gezeigt ist ein 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus 10.000 Bootstrap-Replikaten durchgeführt mit PAUP\* 4.0b. Bootstrap-Werte finden sich über den Ästen. Jackknife-Werte aus 10.000 Replikaten finden sich unter den Ästen, Werte unter 50% sind nicht gezeigt.

## Anhang



### Anhang 12: *PhyC*-Datensatz: Parsimonieanalyse: Strict-Konsensusbaum

Gezeigt ist der Strict-Konsensusbaum aus 100.000 kürzesten Bäumen mit einer Schrittlänge von 285 aus einer Parsimonieanalyse durchgeführt mit PAUP\* 4.0b. Über den Ästen finden sich Bootstrap-Werte, unter den Ästen Jackknife-Werte aus jeweils 1.000 Replikaten. Werte unter 50% sind nicht gezeigt.

## Anhang



### Anhang 13: Einzelner plastidärer Locus: *rp/32-trnL*: Bayes'sche Analyse

Gezeigt ist der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1. Die Analyse wurde in zwei unabhängigen Läufen mit je 1.000.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posteriori-wahrscheinlichkeiten. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand.









**Anhang 17: Einzelner plastidärer Locus: *petD*-Intron: Bayes'sche Analyse**

Gezeigt ist der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1. Die Analyse wurde in zwei unabhängigen Läufen mit je 1.000.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posteriori-wahrscheinlichkeiten. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand.

## Anhang



### Anhang 18: Einzelner plastidärer Locus: *trnD-trnT*: Bayes'sche Analyse

Gezeigt ist der 50% Majority Rule-Konsensusbaum aus einer Analyse mit MrBayes 3.2.1. Die Analyse wurde in zwei unabhängigen Läufen mit je 1.000.000 Generationen durchgeführt. Von den resultierenden Bäumen wurden 10% als Burn-in verworfen. Über den Ästen finden sich die Posteriori-wahrscheinlichkeiten. Die Astlängen repräsentieren die erwartete Menge an substituierten Alignmentpositionen entsprechend der Maßstabsleiste am unteren Bildrand.

## Anhang

### Anhang 19: Detaillierte Ergebnisse der cpSSR-Analyse

Für jede Akzession wurden 12 verschiedene cpSSR-Loci untersucht. Hinter den Artnamen sind die jeweiligen DNA-Nummern vermerkt (FK-Nummern entsprechend Tabelle 1). BT- und D-Nummern verweisen auf nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierte Proben (Details vgl. Krapp et al. 2012). Angegeben sind jeweils die absolute Fragmentlänge und in Klammern die vermutliche Zahl der Mononukleotid-Wiederholungen. Letztere wurde jeweils durch Re-Sequenzierung der PCR-Produkte für *D. pernambucana* (FK0178) und Vergleich der absoluten Fragmentlängen abgeschätzt. Fehlgeschlagene PCR sind mit einem n markiert.

Akzession	DSSR-L01	DSSR-L04	DSSR-L06	DSSR-N01	DSSR-N04	DSSR-N05	DSSR-N07	DSSR-N10	DSSR-N11	DSSR-N15	DSSR-N16	DSSR-N18
<i>Ananas ananasoides</i> (BT27)	70 (9)	95 (10)	73 (9)	98 (10)	n	82 (9)	72 (11)	82 (13)	n	63 (10)	89 (12)	64 (16)
<i>Deuterocohnia brevispicata</i> (FK0071)	74 (13)	94 (9)	72 (8)	100 (12)	85 (9)	82 (9)	77 (16)	79 (10)	93 (11)	63 (10)	86 (9)	61 (13)
<i>Deuterocohnia glandulosa</i> (FK0072)	74 (13)	94 (9)	n	99 (11)	n	82 (9)	n	79 (10)	92 (10)	76 (23)	n	n
<i>Dyckia beateae</i> (FK0044)	73 (12)	94 (9)	77 (13)	104 (16)	89 (13)	85 (12)	74 (13)	80 (11)	96 (14)	65 (12)	90 (13)	71 (23)
<i>Dyckia beateae</i> (FK0091)	72 (11)	94 (9)	79 (15)	103 (15)	90 (14)	85 (12)	76 (15)	81 (12)	n	64 (11)	91 (14)	63 (15)
<i>Dyckia brachyphylla</i> (FK0045)	73 (12)	94 (9)	77 (13)	102 (14)	93 (17)	85 (12)	75 (14)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	69 (21)
<i>Dyckia braunii</i> (FK0042)	73 (12)	94 (9)	75 (11)	102 (14)	90 (14)	85 (12)	75 (14)	79 (10)	93 (11)	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia brevifolia</i> (aff.) (FK0010)	72 (11)	97 (12)	75 (11)	102 (14)	88 (12)	85 (12)	75 (14)	79 (10)	94 (12)	65 (12)	88 (11)	65 (17)
<i>Dyckia brevifolia</i> (FK0067)	72 (11)	94 (9)	75 (11)	105 (17)	88 (12)	86 (13)	74 (13)	80 (11)	96 (14)	67 (14)	90 (13)	69 (21)
<i>Dyckia choristaminea</i> (FK0021)	70 (9)	97 (12)	76 (12)	101 (13)	92 (16)	85 (12)	72 (11)	79 (10)	95 (13)	65 (12)	89 (12)	65 (17)
<i>Dyckia choristaminea</i> (FK0040)	70 (9)	97 (12)	76 (12)	101 (13)	92 (16)	85 (12)	72 (11)	79 (10)	95 (13)	65 (12)	89 (12)	65 (17)
<i>Dyckia cinerea</i> (FK0047)	72 (11)	95 (10)	77 (13)	104 (16)	91 (15)	86 (13)	75 (14)	81 (12)	97 (15)	64 (11)	90 (13)	67 (19)
<i>Dyckia dawsonii</i> (FK0043)	71 (10)	95 (10)	76 (12)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	81 (12)	96 (14)	64 (11)	89 (12)	65 (17)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 01 (FK0141)	73 (12)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	81 (12)	99 (17)	65 (12)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 01 (FK0143)	73 (12)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	81 (12)	99 (17)	65 (12)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 01 (FK0145)	73 (12)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	81 (12)	n	65 (12)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 01 (D39)	73 (12)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	81 (12)	99 (17)	65 (12)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 02 (FK0147)	73 (12)	98 (13)	80 (16)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	100 (18)	65 (12)	90 (13)	72 (24)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 02 (FK0148)	74 (13)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	96 (14)	65 (12)	90 (13)	73 (25)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 02 (FK0149)	74 (13)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	96 (14)	65 (12)	90 (13)	73 (25)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 02 (FK0150)	74 (13)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	96 (14)	65 (12)	90 (13)	73 (25)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 03 (FK0153)	73 (12)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	81 (12)	99 (17)	65 (12)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 03 (FK0154)	74 (13)	98 (13)	80 (16)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	n	65 (12)	90 (13)	72 (24)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 03 (FK0155)	74 (13)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	81 (12)	99 (17)	65 (12)	90 (13)	72 (24)
<i>Dyckia dissitiflora</i> Pop. 03 (FK0156)	73 (12)	98 (13)	79 (15)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	81 (12)	99 (17)	65 (12)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia encholirioides</i> (FK0095)	71 (10)	94 (9)	n	103 (15)	91 (15)	85 (12)	73 (12)	80 (11)	n	64 (11)	89 (12)	63 (15)
<i>Dyckia estevesii</i> (FK0001)	74 (13)	94 (9)	80 (16)	102 (14)	94 (18)	86 (13)	75 (14)	79 (10)	97 (15)	65 (12)	91 (14)	63 (15)
<i>Dyckia estevesii</i> (FK0005)	74 (13)	94 (9)	80 (16)	102 (14)	94 (18)	86 (13)	75 (14)	79 (10)	97 (15)	65 (12)	91 (14)	63 (15)
<i>Dyckia estevesii</i> (FK0033)	71 (10)	95 (10)	76 (12)	101 (13)	91 (15)	85 (12)	74 (13)	80 (11)	97 (15)	65 (12)	88 (11)	66 (18)
<i>Dyckia estevesii</i> var. <i>braunii</i> nom. nud. (FK0004)	75 (14)	94 (9)	78 (14)	101 (13)	90 (14)	85 (12)	76 (15)	79 (10)	95 (13)	65 (12)	90 (13)	67 (19)
<i>Dyckia ferox</i> (FK0020)	77 (16)	94 (9)	76 (12)	109 (21)	94 (18)	86 (13)	72 (11)	80 (11)	102 (20)	66 (13)	88 (11)	71 (23)
<i>Dyckia ferox</i> (FK0027)	77 (16)	94 (9)	76 (12)	101 (13)	92 (16)	86 (13)	72 (11)	79 (10)	101 (19)	66 (13)	88 (11)	69 (21)
<i>Dyckia ferox</i> (FK0056)	78 (17)	94 (9)	77 (13)	105 (17)	92 (16)	87 (14)	71 (10)	79 (10)	104 (22)	65 (12)	89 (12)	66 (18)
<i>Dyckia ferruginea</i> (FK0090)	72 (11)	97 (12)	75 (11)	103 (15)	89 (13)	86 (13)	72 (11)	79 (10)	95 (13)	63 (10)	87 (10)	65 (17)
<i>Dyckia floribunda</i> (FK0052)	71 (10)	94 (9)	n	99 (11)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	93 (11)	66 (13)	89 (12)	62 (14)
<i>Dyckia floribunda</i> (FK0107)	71 (10)	94 (9)	75 (11)	102 (14)	n	86 (13)	73 (12)	79 (10)	93 (11)	66 (13)	88 (11)	62 (14)
<i>Dyckia floribunda</i> (FK0108)	71 (10)	94 (9)	74 (10)	103 (15)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	93 (11)	66 (13)	88 (11)	62 (14)
<i>Dyckia fosteriana</i> (FK0094)	73 (12)	95 (10)	79 (15)	100 (12)	90 (14)	87 (14)	74 (13)	79 (10)	n	64 (11)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia goehringii</i> (FK0031)	72 (11)	95 (10)	82 (18)	98 (10)	89 (13)	86 (13)	73 (12)	79 (10)	94 (12)	65 (12)	89 (12)	65 (17)
<i>Dyckia granmogulensis</i> (FK0007)	72 (11)	99 (14)	78 (14)	104 (16)	90 (14)	86 (13)	73 (12)	80 (11)	100 (18)	65 (12)	90 (13)	67 (19)
<i>Dyckia hebdingii</i> (FK0013)	70 (9)	97 (12)	76 (12)	101 (13)	93 (17)	85 (12)	73 (12)	79 (10)	95 (13)	65 (12)	89 (12)	64 (16)
<i>Dyckia hebdingii</i> (FK0038)	70 (9)	97 (12)	76 (12)	101 (13)	93 (17)	85 (12)	73 (12)	79 (10)	95 (13)	65 (12)	89 (12)	64 (16)
<i>Dyckia hebdingii</i> (FK0112)	70 (9)	97 (12)	76 (12)	101 (13)	93 (17)	85 (12)	73 (12)	79 (10)	95 (13)	65 (12)	89 (12)	64 (16)
<i>Dyckia ibiramensis</i> (aff.) (FK0025)	70 (9)	94 (9)	76 (12)	102 (14)	92 (16)	85 (12)	74 (13)	80 (11)	99 (17)	65 (12)	89 (12)	68 (20)
<i>Dyckia leptostachya</i> (aff.) (FK0016)	71 (10)	94 (9)	76 (12)	103 (15)	88 (12)	85 (12)	73 (12)	79 (10)	96 (14)	64 (11)	88 (11)	67 (19)
<i>Dyckia leptostachya</i> (aff.) (FK0035)	73 (12)	94 (9)	77 (13)	102 (14)	89 (13)	85 (12)	73 (12)	79 (10)	96 (14)	65 (12)	88 (11)	68 (20)
<i>Dyckia leptostachya</i> (cf.) (FK0115)	76 (15)	94 (9)	76 (12)	108 (20)	91 (15)	86 (13)	72 (11)	79 (10)	102 (20)	66 (13)	88 (11)	70 (22)
<i>Dyckia leptostachya</i> (FK0053)	75 (14)	96 (11)	75 (11)	101 (13)	90 (14)	86 (13)	73 (12)	79 (10)	95 (13)	64 (11)	88 (11)	63 (15)
<i>Dyckia limae</i> Pop. 01 (D182)	74 (13)	99 (14)	78 (14)	102 (14)	91 (15)	85 (12)	74 (13)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	62 (14)
<i>Dyckia limae</i> Pop. 01 (D183)	75 (14)	99 (14)	78 (14)	102 (14)	91 (15)	85 (12)	74 (13)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia limae</i> Pop. 01 (D185)	74 (13)	99 (14)	78 (14)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia limae</i> Pop. 01 (D186)	74 (13)	99 (14)	78 (14)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	62 (14)
<i>Dyckia lindevaldæ</i> (FK0019)	73 (12)	95 (10)	79 (15)	100 (12)	90 (14)	85 (12)	75 (14)	79 (10)	96 (14)	65 (12)	91 (14)	65 (17)
<i>Dyckia macedoi</i> (FK0099)	73 (12)	94 (9)	78 (14)	102 (14)	89 (13)	84 (11)	74 (13)	79 (10)	97 (15)	66 (13)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia macedoi</i> (FK0099)	72 (11)	94 (9)	78 (14)	102 (14)	89 (13)	85 (12)	74 (13)	79 (10)	97 (15)	66 (13)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia macedoi</i> (FK0100)	72 (11)	94 (9)	78 (14)	102 (14)	89 (13)	85 (12)	74 (13)	79 (10)	97 (15)	66 (13)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia macedoi</i> (FK0101)	73 (12)	94 (9)	79 (15)	102 (14)	90 (14)	84 (11)	74 (13)	79 (10)	96 (14)	66 (13)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia macedoi</i> (FK0101)	72 (11)	94 (9)	79 (15)	102 (14)	90 (14)	85 (12)	74 (13)	79 (10)	96 (14)	n	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia macedoi</i> (FK0102)	72 (11)	94 (9)	79 (15)	102 (14)	90 (14)	85 (12)	74 (13)	79 (10)	n	n	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia maracasensis</i> (FK0087)	73 (12)	98 (13)	79 (15)	101 (13)	91 (15)	87 (14)	74 (13)	79 (10)	n	n	90 (13)	69 (21)
<i>Dyckia maritima</i> (FK0092)	71 (10)	94 (9)	n	n	90 (14)	85 (12)	76 (15)	79 (10)	n	n	64 (11)	66 (18)
<i>Dyckia maritima</i> (FK0113)	72 (11)	94 (9)	n	101 (13)	93 (17)	85 (12)	72 (11)	79 (10)	94 (12)	66 (13)	90 (13)	67 (19)
<i>Dyckia marnier-lapostollei</i> var. <i>estevessii</i> (FK0030)	75 (14)	94 (9)	77 (13)	102 (14)	87 (11)	85 (12)	74 (13)	79 (10)	100 (18)	64 (11)	90 (13)	63 (15)
<i>Dyckia marnier-lapostollei</i> var. <i>marnier-lapostollei</i> (FK0029)	74 (13)	95 (10)	77 (13)	102 (14)	87 (11)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	99 (17)	65 (12)	90 (13)	63 (15)
<i>Dyckia microcalyx</i> (cf.) (FK0051)	76 (15)	94 (9)	75 (11)	104 (16)	94 (18)	86 (13)	72 (11)	80 (11)	104 (22)	65 (12)	88 (11)	69 (21)
<i>Dyckia microcalyx</i> (FK0054)	76 (15)	94 (9)	75 (11)	102 (14)	n	86 (13)	71 (10)	79 (10)	101 (19)	65 (12)	88 (11)	65 (17)
<i>Dyckia microcalyx</i> (FK0111)	76 (15)	94 (9)	75 (11)	n	94 (18)	86 (13)	72 (11)	80 (11)	104 (22)	65 (12)	88 (11)	69 (21)
<i>Dyckia microcalyx</i> var. <i>indet.</i> (FK0009)	76 (15)	94 (9)	75 (11)	102 (14)	92 (16)	86 (13)	71 (10)	79 (10)	101 (19)	65 (12)	88 (11)	65 (17)
<i>Dyckia milagrensis</i> (FK0096)	73 (12)	100 (15)	77 (13)	104 (16)	91 (15)	87 (14)	73 (12)	81 (12)	n	65 (12)	89 (12)	66 (18)
<i>Dyckia monticola</i> (FK0088)	71 (10)	94 (9)	79 (15)	104 (16)	90 (14)	86 (13)	74 (13)	80 (11)	97 (15)	66 (13)	90 (13)	64 (16)
<i>Dyckia niederleinii</i> (FK0103)	72 (11)	94 (9)	75 (11)	103 (15)	91 (15)	86 (13)	73 (12)	79 (10)	96 (14)	66 (13)	88 (11)	61 (13)
<i>Dyckia niederleinii</i> (FK0110)	76 (15)	94 (9)	76 (12)	101 (13)	91 (15)	86 (13)	72 (11)	79 (10)	102 (20)	65 (12)	88 (11)	69 (21)
<i>Dyckia oligantha</i> var. <i>oligantha</i> (?) (FK0036)	72 (11)	94 (9)	78 (14)	102 (14)	90 (14)	86 (13)	76 (15)	79 (10)	98 (16)	66 (13)	91 (14)	69 (21)
<i>Dyckia pernambucana</i> (FK0097)	73 (12)	97 (12)	n	102 (14)	92 (16)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia pernambucana</i> (FK0098)	73 (12)	97 (12)	78 (14)	102 (14)	92 (16)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	n	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia pernambucana</i> Pop. 01 (FK0171)	75 (14)	99 (14)	78 (14)	102 (14)	91 (15)	85 (12)	74 (13)	79 (10)	97 (15)	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia pernambucana</i> Pop. 01 (FK0176)	75 (14)	99 (14)	78 (14)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	97 (15)	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia pernambucana</i> Pop. 01 (D97)	75 (14)	99 (14)	78 (14)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	97 (15)	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia pernambucana</i> Pop. 01 (D98)	75 (14)	99 (14)	78 (14)	102 (14)	n	86 (13)	74 (13)	79 (10)	97 (15)	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia pernambucana</i> Pop. 02 (FK0178)	73 (12)	97 (12)	78 (14)	102 (14)	92 (16)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	66 (18)
<i>Dyckia pernambucana</i> Pop. 02 (												

## Anhang

Akzession	DSSR-L01	DSSR-L04	DSSR-L06	DSSR-N01	DSSR-N04	DSSR-N05	DSSR-N07	DSSR-N10	DSSR-N11	DSSR-N15	DSSR-N16	DSSR-N18
<i>Dyckia pemambucana</i> Pop. 03 (D162)	75 (14)	98 (13)	78 (14)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	67 (19)
<i>Dyckia pemambucana</i> Pop. 03 (D163)	75 (14)	98 (13)	78 (14)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	67 (19)
<i>Dyckia pemambucana</i> Pop. 03 (D164)	75 (14)	98 (13)	78 (14)	n	91 (15)	86 (13)	74 (13)	79 (10)	98 (16)	65 (12)	90 (13)	67 (19)
<i>Dyckia pumila</i> (aff.) (FK0017)	71 (10)	94 (9)	73 (9)	100 (12)	98 (22)	87 (14)	74 (13)	80 (11)	97 (15)	66 (13)	89 (12)	65 (17)
<i>Dyckia pumila</i> (FK0093)	72 (11)	96 (11)	77 (13)	101 (13)	91 (15)	85 (12)	74 (13)	81 (12)	97 (15)	64 (11)	88 (11)	66 (18)
<i>Dyckia rariflora</i> (FK0039)	72 (11)	97 (12)	76 (12)	102 (14)	88 (12)	84 (11)	75 (14)	79 (10)	94 (12)	65 (12)	88 (11)	65 (17)
<i>Dyckia reitzii</i> (aff.) (FK0050)	71 (10)	94 (9)	n	104 (16)	90 (14)	85 (12)	76 (15)	79 (10)	96 (14)	64 (11)	88 (11)	66 (18)
<i>Dyckia remotiflora</i> (FK0055)	72 (11)	94 (9)	75 (11)	102 (14)	91 (15)	86 (13)	73 (12)	79 (10)	94 (12)	66 (13)	88 (11)	62 (14)
<i>Dyckia remotiflora</i> (FK0068)	n	97 (12)	76 (12)	102 (14)	88 (12)	84 (11)	75 (14)	79 (10)	94 (12)	65 (12)	88 (11)	65 (17)
<i>Dyckia remotiflora</i> var. indet. (FK0011)	70 (9)	95 (10)	76 (12)	101 (13)	92 (16)	85 (12)	73 (12)	80 (11)	95 (13)	65 (12)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia remotiflora</i> var. indet. (FK0015)	70 (9)	95 (10)	76 (12)	101 (13)	92 (16)	85 (12)	73 (12)	80 (11)	95 (13)	65 (12)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia</i> spec. ( <i>Encholirium inerme</i> ) (FK0086)	70 (9)	94 (9)	76 (12)	102 (14)	92 (16)	85 (12)	74 (13)	80 (11)	99 (17)	65 (12)	89 (12)	68 (20)
<i>Dyckia</i> spec. (FK0023)	72 (11)	94 (9)	76 (12)	102 (14)	92 (16)	87 (14)	74 (13)	80 (11)	95 (13)	67 (14)	89 (12)	62 (14)
<i>Dyckia</i> spec. (FK0024)	71 (10)	94 (9)	74 (10)	104 (16)	92 (16)	86 (13)	74 (13)	80 (11)	94 (12)	68 (15)	88 (11)	62 (14)
<i>Dyckia</i> spec. (FK0049)	76 (15)	95 (10)	76 (12)	102 (14)	92 (16)	86 (13)	71 (10)	79 (10)	101 (19)	66 (13)	88 (11)	70 (22)
<i>Dyckia</i> spec. (FK0116)	72 (11)	94 (9)	76 (12)	106 (18)	92 (16)	87 (14)	73 (12)	80 (11)	101 (19)	65 (12)	89 (12)	68 (20)
<i>Dyckia tobatensis</i> (FK0018)	72 (11)	94 (9)	76 (12)	106 (18)	92 (16)	87 (14)	73 (12)	80 (11)	99 (17)	65 (12)	89 (12)	68 (20)
<i>Dyckia tomentella</i> (FK0114)	78 (17)	94 (9)	77 (13)	105 (17)	92 (16)	87 (14)	71 (10)	79 (10)	104 (22)	65 (12)	89 (12)	62 (14)
<i>Dyckia ursina</i> (FK0012)	72 (11)	94 (9)	76 (12)	102 (14)	92 (16)	87 (14)	74 (13)	80 (11)	95 (13)	67 (14)	89 (12)	62 (14)
<i>Dyckia ursina</i> (FK0089)	74 (13)	94 (9)	79 (15)	103 (15)	91 (15)	87 (14)	73 (12)	79 (10)	97 (15)	65 (12)	90 (13)	68 (20)
<i>Dyckia velascana</i> (cf.) (FK0106)	71 (10)	94 (9)	76 (12)	104 (16)	92 (16)	85 (12)	74 (13)	80 (11)	93 (11)	66 (13)	88 (11)	62 (14)
<i>Dyckia velascana</i> (FK0006)	71 (10)	94 (9)	75 (11)	102 (14)	90 (14)	86 (13)	73 (12)	79 (10)	94 (12)	66 (13)	87 (10)	62 (14)
<i>Dyckia velascana</i> (FK0104)	72 (11)	94 (9)	75 (11)	103 (15)	91 (15)	86 (13)	73 (12)	79 (10)	96 (14)	66 (13)	88 (11)	61 (13)
<i>Dyckia velascana</i> (FK0105)	72 (11)	94 (9)	75 (11)	103 (15)	91 (15)	86 (13)	73 (12)	79 (10)	96 (14)	66 (13)	88 (11)	61 (13)
<i>Dyckia vestita</i> (FK0032)	78 (17)	94 (9)	77 (13)	105 (17)	92 (16)	87 (14)	71 (10)	79 (10)	104 (22)	65 (12)	89 (12)	62 (14)
<i>Dyckia vestita</i> (FK0109)	78 (17)	94 (9)	77 (13)	105 (17)	92 (16)	87 (14)	71 (10)	79 (10)	104 (22)	65 (12)	89 (12)	62 (14)
<i>Encholirium erectiflorum</i> (FK0123)	n	94 (9)	74 (10)	102 (14)	86 (10)	83 (10)	74 (13)	78 (9)	91 (9)	64 (11)	86 (9)	65 (17)
<i>Encholirium horridum</i> (FK0070)	76 (15)	96 (11)	74 (10)	101 (13)	n	81 (8)	74 (13)	80 (11)	95 (13)	62 (9)	87 (10)	66 (18)
<i>Encholirium magalhaesii</i> ( <i>crassiscapum</i> ) (FK0122)	81 (20)	98 (13)	73 (9)	102 (14)	92 (16)	83 (10)	72 (11)	79 (10)	97 (15)	62 (9)	86 (9)	64 (16)
<i>Encholirium maximum</i> (FK0124)	75 (14)	94 (9)	75 (11)	99 (11)	85 (9)	83 (10)	79 (18)	80 (11)	92 (10)	64 (11)	87 (10)	67 (19)
<i>Encholirium</i> spec. ( <i>Dyckia</i> spec.) (FK0014)	76 (15)	94 (9)	75 (11)	100 (12)	86 (10)	83 (10)	77 (16)	78 (9)	97 (15)	65 (12)	86 (9)	62 (14)
<i>Encholirium</i> spec. (FK0078)	85 (24)	97 (12)	73 (9)	101 (13)	92 (16)	83 (10)	71 (10)	80 (11)	96 (14)	63 (10)	86 (9)	63 (15)
<i>Encholirium</i> spec. (FK0079)	85 (24)	98 (13)	73 (9)	101 (13)	89 (13)	83 (10)	71 (10)	79 (10)	96 (14)	62 (9)	86 (9)	64 (16)
<i>Encholirium</i> spec. (FK0080)	82 (21)	97 (12)	73 (9)	101 (13)	92 (16)	83 (10)	71 (10)	79 (10)	94 (12)	62 (9)	86 (9)	62 (14)
<i>Encholirium</i> spec. (FK0125)	76 (15)	95 (10)	75 (11)	101 (13)	86 (10)	84 (11)	71 (10)	78 (9)	98 (16)	63 (10)	88 (11)	65 (17)
<i>Fosterella villosula</i> (FK0076)	70 (9)	93 (8)	73 (9)	99 (11)	n	81 (8)	n	79 (10)	n	60 (7)	87 (10)	61 (13)
<i>Fosterella weddelliana</i> (FK0077)	n	96 (11)	n	101 (13)	n	81 (8)	n	80 (11)	101 (19)	61 (8)	87 (10)	61 (13)
Gen. nov. ( <i>Graca Wanderley</i> )	n	96 (11)	77 (13)	104 (16)	85 (9)	83 (10)	79 (18)	81 (12)	n	64 (11)	87 (10)	62 (14)
<i>Hechtia caerula</i> (BT49)	67 (6)	93 (8)	73 (9)	99 (11)	n	83 (10)	72 (11)	81 (12)	90 (8)	65 (12)	91 (14)	61 (13)
<i>Pitcairnia feliciana</i> (FK0119)	65 (4)	93 (8)	72 (8)	98 (10)	n	83 (10)	73 (12)	78 (9)	n	63 (10)	85 (8)	60 (12)
<i>Pitcairnia heterophylla</i> (FK0083 (Pit_03))	n	94 (9)	73 (9)	100 (12)	n	82 (9)	73 (12)	80 (11)	n	63 (10)	88 (11)	62 (14)
<i>Puya ferruginea</i> (FK0082)	70 (9)	96 (11)	72 (8)	99 (11)	n	86 (13)	73 (12)	81 (12)	n	63 (10)	86 (9)	64 (16)
<i>Puya herzogii</i> (FK0121)	n	98 (13)	72 (8)	102 (14)	n	86 (13)	73 (12)	79 (10)	n	63 (10)	87 (10)	63 (15)
<i>Tillandsia usneoides</i> (BT70)	n	92 (7)	72 (8)	109 (21)	n	83 (10)	72 (11)	79 (10)	n	64 (11)	87 (10)	63 (15)

## 11 Referenzen

### 11.1 Curriculum vitae

#### Person

Name: Florian Krapp  
Geburtsdatum: 13.05.1980  
Geburtsort: Kassel

#### Schule

1986-1990 Grundschule Auefeldschule, Kassel  
1990-1999 Gymnasium Albert-Schweitzer-Schule, Kassel  
Abschluss: 18.06.1999 (Abitur)  
1999-2000 Zivildienst

#### Studium

2000-2002 Studium der Ingenieurinformatik an der TU Ilmenau  
2002-2007 Studium der Informatik an der Universität Kassel  
2003-2009 Studium der Biologie an der Universität Kassel  
Abschluss: 20.08.2009 (Diplom, Dipl.-Biol.)  
2007-2009 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Kassel

#### Promotion

2009-2012 Promotion in der Abteilung Systematik und Morphologie der Pflanzen,  
Universität Kassel (Zulassung zur Promotion: 08.01.2010)  
2009-2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Wissenschaftliche Hilfskraft und  
Lehrauftrag an der Universität Kassel  
2010-2012 Promotionsstipendium des Otto-Braun-Fonds

## 11.2 Qualifikationsarbeiten

**Krapp, F. (2009):** Molekulare Verwandtschaftsanalysen in der Gattung *Dyckia* (Bromeliaceae). Diplomarbeit. *Systematik und Morphologie der Pflanzen, Fachbereich 18, Naturwissenschaften, Universität Kassel, Kassel.*

## 11.3 Publikationen in Fachzeitschriften (chronologisch)

**Wöhrmann, T., N. Wagner, F. Krapp, B. Huettel & K. Weising (2012):** Development of microsatellite markers in *Fosterella rusbyi* (Mez) L.B. Sm. (Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Am. J. Bot.* 99 (4): e160–e163.

**Krapp, F., T. Wöhrmann, D. S. d. B. Pinangé, A. M. Benko-Iseppon, B. Huettel & K. Weising (2012):** A set of plastid microsatellite loci for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) derived from 454 pyrosequencing. *Am. J. Bot.* 99 (12): e470-473.

**Wöhrmann, T., D. S. d. B. Pinangé, F. Krapp, A.-M. Benko-Iseppon, B. Huettel & K. Weising (2012):** Development of 15 nuclear microsatellite markers in the genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) using 454 pyrosequencing. *Conserv. Genet. Resour.: Online first* (DOI 10.1007/s12686-012-9738-y).

**Krapp, F.:** The silver ghost of Serra do Lenheiro: *Dyckia mezii*, nom. nov. *Im Druck* (*Ann. Bot. Fennici*).

**Krapp, F., G. A. d. S. Cruz, T. Wöhrmann, A. M. Benko-Iseppon & K. Weising:** A set of variable plastid SSR loci for the genus *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *In Vorbereitung.*

**Krapp, F., D. S. d. B. Pinangé, A. M. Benko-Iseppon, E. M. C. Leme & K. Weising:** Phylogeny and evolutionary history of the large genus *Dyckia* (Bromeliaceae) in eastern South America, inferred from chloroplast and nuclear sequence data. *In Vorbereitung.*

**Schütz, N., N. Wagner, F. Krapp & K. Weising:** Detailed phylogeny of subfamily Pitcairnioideae s.str. (Bromeliaceae). *In Vorbereitung.*

**Pinangé, D. S. d. B., A. M. Benko-Iseppon, E. M. C. Leme, F. Krapp, K. Weising & G. Zizka:** AFLP analysis of genetic relationships in the genus *Dyckia* (Bromeliaceae). *In Planung.*

**Pinangé, D. S. d. B., T. Wöhrmann, F. Krapp, K. Weising, G. Zizka & A. M. Benko-Iseppon:** Population genetic analysis of different species of *Dyckia* (Bromeliaceae) based on AFLP analysis and highly variable nuclear and chloroplast microsatellites. *In Planung.*

## 11.4 Vorträge und Poster auf Konferenzen (chronologisch)

**Krapp, F. & K. Weising (2010):** Phylogeny and biogeography of *Dyckia* (Bromeliaceae). *19th International Symposium "Biodiversity and Evolutionary Biology" of the German Botanical Society (DBG). Wien, 16.-19. September 2010.*

**Krapp, F. & K. Weising (2011):** Young and successful: Phylogeny and evolutionary history of the large genus *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequence data. *BioSystematics Berlin 2011. Berlin, 21.-27. Februar 2011.*

**Krapp, F. & K. Weising (2011):** Extreme levels of homoplasy among chloroplast SSRs within the genetically invariant genus *Dyckia* (Bromeliaceae). *BioSystematics Berlin 2011. Berlin, 21.-27. Februar 2011.*

**Weising, K., N. Schütz, N. Wagner, F. Krapp, S. Blank, I. Michalak, D. Silvestro, G. Zizka, P. Ibisch & K. Schulte (2011):** Phylogeny and evolutionary history of Pitcairnioideae s. str. (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear data. *XVIII International Botanical Congress. Melbourne, 23.-30. Juli 2011.*

**Krapp, F. & K. Weising (2011):** Phylogeny and evolutionary history of the large genus *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae) in eastern South America, inferred from chloroplast and nuclear sequence data. *XVIII International Botanical Congress. Melbourne, 23.-30. Juli 2011.*

**Wöhrmann, T., F. Krapp, B. Huettel & K. Weising (2011):** Development of large sets of simple sequence repeat (SSR) markers for three species of subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) using high-throughput 454 pyrosequencing. *XVIII International Botanical Congress. Melbourne, 23.-30. Juli 2011.*

**Krapp, F., J. Wojacki & K. Weising (2011):** Phylogeny and evolutionary history of *Dyckia* (Bromeliaceae) in eastern South America, inferred from chloroplast and nuclear sequence data. *Botanikertagung 2011. Berlin, 18.-23. September 2011.*

**Schütz, N., F. Krapp, N. Wagner, G. Zizka & K. Weising (2011):** Phylogeny and evolutionary history of Pitcairnioideae s.str. (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear data. *Botanikertagung 2011. Berlin, 18.-23. September 2011.*

**Wöhrmann, T., F. Krapp, B. Huettel, S. Möller & K. Weising (2011):** Development of microsatellite markers for three species of subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) using high-throughput pyrosequencing. *Botanikertagung 2011. Berlin, 18.-23. September 2011.*

**Weising, K., F. Krapp, D. S. d. B. Pinangé, G. Zizka & A. M. Benko-Iseppon (2012):** Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Pitcairnioideae; Bromeliaceae): understanding rapid diversification in the Brazilian Cerrado. *21st International Symposium „Biodiversity and Evolutionary Biology“ of the German Botanical Society (DBG). Mainz, 16.-19. September 2012.*

**Wöhrmann, T., D. S. d. B. Pinangé, F. Krapp, B. Huettel, S. Möller, A. M. Benko-Iseppon & K. Weising (2012):** A set of nuclear microsatellite markers for the genus *Dyckia* (Bromeliaceae) developed by 454 pyrosequencing. *21st International Symposium „Biodiversity and Evolutionary Biology“ of the German Botanical Society (DBG). Mainz, 16.-19. September 2012.*

## 11.5 Stipendien und Auszeichnungen

- Promotionsstipendium des Otto-Braun-Fonds (01.10.2010-30.09.2012)
- 2. Posterpreis bei der BioSystematics Berlin 2011 (12. Jahrestagung der GfBS)

## Erklärung

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

Kassel, den 26. Oktober 2012

## Danksagung

Für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium aus dem Otto-Braun-Fonds und die damit verbundene Unabhängigkeit danke ich der Firma B. Braun (Melsungen).

Herrn Prof. Dr. Kurt Weising danke ich herzlich für die gute Betreuung und konstruktive Zusammenarbeit, die eingeräumten Freiheiten bei der Konzeption und Durchführung meines Projektes und die Hilfe beim Verfassen dieser Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe Morphologie und Systematik der Pflanzen sowie den Mitarbeitern der Gewächshausanlage der Universität Kassel danke ich für ihre Unterstützung und das hervorragende Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt Tina Wöhrmann, Natascha Wagner, Nicole Schütz und Kai Schubert für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Forschung an Bromelien und die gemeinschaftliche Publikationstätigkeit.

Herrn Prof. Dr. Georg Zizka danke ich für die wertvolle Kooperation und die Betreuung der vorliegenden Arbeit als Zweitgutachter.

Für regen Austausch von Erfahrungen und fruchtbare Kooperationen sowie die Bereitstellung von Pflanzenmaterial, Literatur und Bildern danke ich Dr. Elton Leme, Diego Sotero de Barros Pinangé, Timm Stolten, Prof. Dr. Walter Till, Dr. Jule Peters, Dr. Pierre Braun, Dr. Urs Eggli, Michael Barfuss, Geyner Alves dos Santos Cruz, Prof. Dr. Ana Maria Benko-Iseppon, Dr. Maria das Graças Lapa Wanderley, Corinna Klein, Holger Sachs, Constantino Gastaldi und Leandro Freitas sowie der Abteilung Botanik und molekulare Evolutionsforschung der Universität Frankfurt, dem Botanischen Garten der Universität Heidelberg, den Botanischen Gärten der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, dem Botanischen Garten der Universität Wien, dem Botanischen Garten und Botanischen Museum Berlin-Dahlem, dem Botanischen Garten der Ruhr-Universität Bochum, dem Botanischen Garten Marburg sowie den Royal Botanic Gardens in Kew. Dem DAAD danke ich für die finanzielle Förderung des Projektes im Rahmen des Programmes PROBRAL.

Besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinem Vater und meinen Schwiegereltern danke ich für die großartige Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Meinen Söhnen Constantin und Jonathan danke ich dafür, dass sie meine Aufmerksamkeit immer wieder auf die wirklich wichtigen Dinge gelenkt haben. Meiner Frau Monika danke ich für ihre Liebe, den bedingungslosen Rückhalt und dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen kann.