

**Molekular-Systematische Untersuchungen
an den Familien Nepenthaceae und Ancistrocladaceae sowie
verwandter Taxa aus der Unterklasse Caryophyllidae s. l.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Harald Meimberg
aus München

November 2002

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Günther Heubl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Dittrich

Tag der mündlichen Prüfung: 11.2.2003

Verzeichnis der Abkürzungen und Fachausdrücke

A	Adenin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CI	Consistency Index
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
ETS	external transcribed spacer
G	Guanin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H ₂ O _{bid}	bidestilliertes Wasser
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
I	Inosin
IGS	intergenic spacer
ISSR	inter simple sequence repeat
ITS	internal transcribed spacer
kult.	kultiviert
LMM	Laser-Microbeam-Microdissection
LPC	Laser-Pressure-Catapulting
Ma	vor Millionen Jahren
matK	Gen der MaturaseK
N	unbekanntes Nukleotid,
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NP	Nationalpark
NTP	Nukleotidtriphosphat
p.A.	per analysis
PCR	polymerase chain reaction (Polamerase-Kettenreaktion)
RAPD	random amplified polymorphic DNA
rbcL	Gen der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase
rDNA	für ribosomale RNA kodierende DNA
RI	Retention Index
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient
SSR	simple sequence repeat
T	Thymin
TBR	tree-bisection-reconnection
T _m	Schmelztemperatur
tRNA	Transfer-RNA
trnF	Gen der Transfer-RNA für Phenylalanin
trnK	Gen der Transfer-RNA für Leucin
trnL	Gen der Transfer-RNA für Leucin
trnT	Gen der Transfer-RNA für Threonin
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Die Unterklasse Caryophyllidae	2
1.2 Die Familie Nepenthaceae	5
1.3 Hypothesen zur Evolution der Nepenthaceae	11
1.4 Die Familien Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae	12
1.5 Aufgabenstellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Untersuchtetes Pflanzenmaterial	19
2.2 Isolierung von Gesamt-DNA	26
2.2.1 CTAB-Isolierung nach Doyle und Doyle (1987)	27
2.2.2 DNA-Isolierung mit Nucleospin-Plant-Kit	28
2.2.3 Isolierung von DNA aus altem Herbarmaterial	29
2.3 Amplifikation	30
2.3.1 Inverse PCR	33
2.3.2 ISSR-PCR	34
2.4 Durchführung einer Single-Chloroplasten-PCR	35
2.4.1 Chloroplasten-Isolierung	35
2.4.2 Separierung von Chloroplasten durch Laser Pressure Catapulting (LPC)	36
2.4.3 Amplifikation aus separierten Chloroplasten	37
2.5 Reinigungsverfahren für PCR-Produkte	38
2.6 Klonierung	40
2.6.1 Ligation und Transformation	40
2.6.2 Kolonie-PCR von <i>E. coli</i>	41
2.7 Amplifikations- und Sequenzierungsstrategien	42
2.7.1 Ableitung von Primern	42
2.7.2 Strategien zur Amplifikation und Sequenzierung	44
2.7.2.1 ITS	45
2.7.2.2 Amplifikation von DNA aus Herbarmaterial	46
2.7.2.3 Rpl2	46
2.7.2.4 TrnK	47
2.7.2.5 TrnL	50
2.8 Sequenzierung	50

2.8.1	Sequenzierung mit dem GATC-Direct-Blotter.....	51
2.8.2	Sequenzierung mit dem ABI 377	54
2.8.3	Auswertung der Sequenzdaten	55
2.8.4	Identifizierung paraloger Sequenzen durch Allelsubtraktion.....	56
2.9	Bearbeitung von Sequenzdaten	57
2.9.1	Alinierung und Vorbereitung der Datenmatrizen.....	57
2.9.2	Distanzverfahren.....	57
2.9.3	Phylogenetische Rekonstruktionsverfahren	59
2.9.3.1	Maximum Parsimony Analyse	59
2.9.3.2	Maximum Likelihood Analyse.....	62
3	Ergebnisse	64
3.1	Überprüfung der Verwandtschaftsverhältnisse der carnivoren Taxa der Caryophyllidae	64
3.1.1	Die Phylogenie der Caryophyllidae s. l. auf der Basis vergleichender Sequenzanalysen des Maturase K-Gens (matK)	64
3.1.1.1	Alinierung der matK Daten	65
3.1.1.2	Phylogenetische Analyse partieller matK-Daten.....	67
3.1.1.3	Bestimmung der Leserichtung der Topologie	68
3.1.2	Phylogenetische Analyse von trnK-Intron Sequenzdaten	72
3.1.3	Phylogenetische Rekonstruktionen veröffentlichter Sequenzdaten der Caryophyllidae s. l.....	73
3.1.3.1	Phylogenetische Analyse von rbcL-Sequenzen.....	74
3.1.3.2	Kombination der rbcL- und matK-Daten	76
3.1.3.3	Vergleich der 18S rDNA- und matK-Phylogenie.....	78
3.1.3.4	Vergleich der Variabilität von 18S rDNA, rbcL und matK	80
3.1.4	Deletion des rpl2-Introns	80
3.2	ITS-Polymorphismus bei Nepenthaceae und Dioncophyllaceae	83
3.2.1	Sequenzierung der ITS-Region bei <i>Nepenthes</i> mit Primern nach White <i>et al.</i> (1990)	84
3.2.2	Amplifikation der ITS-Region mit für Angiospermen spezifischen Primern	87
3.2.3	Nachweis von ITS-Pseudogenen in <i>Nepenthes</i>	91
3.2.3.1	Phylogenetische Analyse der 5,8S rDNA.....	91
3.2.3.2	Sekundärstruktur von ITS2.....	94
3.3	TrnK-Polymorphismus bei Nepenthaceae	98
3.3.1	Entwicklung einer Single-Chloroplasten-PCR.....	99
3.3.1.1	Isolierung von Chloroplasten.....	99

3.3.1.2	Amplifikation der trnT-trnF-Region aus einzelnen Chloroplasten von <i>Nicotiana tabacum</i>	101
3.3.2	Amplifikation des trnK-Introns aus einzelnen Chloroplasten von <i>Nepenthes bicalcarata</i>	102
3.3.2.1	Trennung der Koamplifikate des trnK-Introns durch Single-Chloroplasten-PCR	102
3.3.2.2	Nachweis des trnK-Intron Typ 2 als mitochondriales Pseudogen.....	105
3.3.2.2.1	Bestimmung der Lokalisation des trnK-Intron Typ 2 durch Single-Chloroplasten-PCR.....	105
3.3.2.2.2	Identifizierung der flankierenden Sequenzen des trnK-Intron Typ2.....	106
3.4	TrnK-Intron Phylogenie der Nepenthaceae	110
3.4.1	Alinierung des trnK-Introns der Nepenthaceae	110
3.4.2	Phylogenetische Analyse des trnK-Introns der Nepenthaceae	114
3.5	Phylogenetische Analyse der mitochondrialen trnK-Pseudogen-Sequenzen	118
3.5.1	Basenzusammensetzung der mitochondrialen Sequenzen	123
3.5.2	Phylogenetische Analyse der mitochondrialen Kopie des trnK-Introns der Nepenthaceae.....	124
3.6	Kombinierte Analyse der trnK und Pseudogendaten	128
3.7	Molekulare Phylogenie der Ancistrocladaceae	135
3.7.1	ITS-Alinierung und phylogenetische Analyse	135
3.7.2	Phylogenetische Analyse der trnK-Intron-Sequenzen.....	142
3.7.3	ISSR-Fingerprint-Analysen	146
3.7.4	Hinweise auf retikuläre Evolution der Ancistrocladaceae in Asien	149
3.8	Erstellung eines Artkonzepts der Ancistrocladaceae Asiens	154
3.8.1	Einteilung der Sequenzen in Verwandtschaftsgruppen	154
3.8.2	Geographische Verteilung der ITS- und trnK-Intron-Sequenztypen in Südostasien.....	158
3.8.2.1	Geographische Verteilung der Sequenztypen im Norden des Untersuchungsgebietes	158
3.8.2.2	Taxonomische Einteilung der Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes	164
3.8.2.3	Geographische Verteilung der Sequenztypen im Süden des Untersuchungsgebietes	165
3.8.2.4	Taxonomische Einteilung der Proben aus dem Süden des Untersuchungsgebietes.....	169
4	Diskussion	172
4.1	Eignung der verwendeten Marker	172
4.1.1	Das trnK-Intron.....	172
4.1.2	Das Auftreten mehrerer Paraloger und Pseudogene des ITS	176

4.1.3	Verwendung des mitochondrialen trnK-Pseudogens als phylogenetischer Marker	179
4.2	MatK-Phylogenie der Caryophyllidae	183
4.3	Molekulare Phylogenie der Ancistrocladaceae	184
4.3.1	Artkonzept der Ancistrocladaceae in Südostasien.....	184
4.3.2	Artkonzept der Ancistrocladaceae Südostasiens aufgrund molekularer Daten..	188
4.3.3	Evolution der Ancistrocladaceae	194
4.4	Molekulare Phylogenie der Nepenthaceae	198
4.4.1	Bewertung der trnK-Intron-Phylogenie im Hinblick auf introgressive Hybridisierung	198
4.4.2	Vergleich der trnK-Intron-Phylogenie mit der Biogeographie.....	199
4.4.3	Vergleich der molekularen Phylogenie mit bestehenden taxonomischen Konzepten der Nepenthaceae	204
4.5	Evolution der carnivoren Taxa der Caryophyllidae	210
4.5.1	Südostasien als sekundäres evolutives Zentrum der Nepenthaceae	210
4.5.2	Evolution der Nepenthaceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae und Drosophyllaceae	212
4.5.2.1	Abschätzung des Alters der betreffenden Gruppen	213
4.5.3	Hypothesen zur Evolution der carnivoren Taxa der Caryophyllidae	217
4.5.3.1	Die Evolution der Nepenthaceae in Südostasien	219
5	Zusammenfassung	224
6	Literatur	226
Anhang	237
Anhang 1	Chemikalienverzeichnis	237
Anhang 2	Verzeichnis der Lösungen.....	239
Anhang 3	In der Datenbank des NCBI veröffentlichte Sequenzen	241
Danksagung	243
Lebenslauf	244

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	Aktuelle Übersicht der phylogenetischen Beziehungen der Caryophyllidae s. l., aufgrund von Analysen an <i>rbcL</i> , 18S rDNA und ORF 2280-Sequenzen	4
Abb. 2.	Kannen verschiedener <i>Nepenthes</i> -Arten	6
Abb. 3.	<i>Nepenthes</i>	7
Abb. 4.	Kannenlängsschnitt von <i>N. pervillei</i>	5
Abb. 5.	Rezentes Areal der Nepenthaceae (nach Danser 1928, leicht verändert)	10
Abb. 6.	Hypothesen zur Evolution der Nepenthaceae	12
Abb. 7.	<i>Triphyophyllum</i>	13
Abb. 8.	<i>Ancistrocladus</i>	15
Abb. 9.	<i>Ancistrocladus</i>	16
Abb. 10.	Rezentes Areal der Ancistrocladaceae (schematisiert, links) und von <i>A. tectorius</i> basierend auf Fundorten in Südostasien	17
Abb. 11.	Herkunft der Aufsammlungen von <i>Ancistrocladus</i> aus Südostasien	26
Abb. 12.	Prinzip der inversen PCR	33
Abb. 13.	Prinzip des Primer-Annealing der ISSR-PCR	35
Abb. 14.	Separierung von Chloroplasten aus einer Chloroplasten-Isolierung durch LMM und LPC (schematisch)	37
Abb. 15.	Schematische Darstellung der ITS-Region entsprechend der Annotation der für <i>Ancistrocladus</i> ermittelten Sequenzen	45
Abb. 16.	Position und Orientierung der für die vergleichende Sequenzierung des <i>trnK</i> -Introns verschiedener Caryophyllidae verwendeten Primer	47
Abb. 17.	Positionen der zur vergleichenden Sequenzanalyse des <i>trnK</i> -Introns der Ancistrocladaceae und der Nepenthaceae verwendeten Primer	48
Abb. 18.	Positionen der zur Sequenzierung und Amplifikation des mitochondrialen Pseudogens der Nepenthaceae eingesetzten Primer	49
Abb. 19.	<i>TrnT-trnF</i> -Region des Chloroplasten-Genoms schematisch	49
Abb. 20.	Phylogenetische Analyse partieller <i>matK</i> Sequenzen von Taxa der Caryophyllidae s. l.	69
Abb. 21.	Konsensus-Topologie der phylogenetischen Analyse partieller <i>matK</i> Sequenzen von Taxa der Caryophyllidae s. l. dargestellt als Phylogramm	70
Abb. 22.	Konsensus-Topologie aus 15 kürzesten Bäumen der Maximum-Parsimony-Analyse der <i>matK</i> -Datenmatrix mit zusätzlichen Taxa der Ranunculaceae	71
Abb. 23.	Die <i>trnK</i> -Intron Phylogenie ausgewählter Taxa der Caryophyllidae	73
Abb. 24.	Topologie aus der Maximum-Parsimony-Analyse einer Alinierung von <i>rbcL</i> -Sequenzen verschiedener Taxa	75
Abb. 25.	Vergleich der Topologien von <i>matK</i> (A) <i>rbcL</i> (B) und den kombinierten Datensätzen (C)	77
Abb. 26.	Vergleich der Phylogenie von 18S und <i>matK</i> .	79
Abb. 27.	Vergleich der Variabilität von <i>matK</i> , <i>rbcL</i> und 18S rDNA	81
Abb. 28.	Anzahl der für die Konstruktion der jeweils kürzesten Bäume angenommenen Mutationsschritte in Abhängigkeit der Position der Alinierung	81
Abb. 29.	Agarose-Gel-Elektrophorese von Amplifikationsprodukten des <i>rpl2</i> -Gens aus 18 Taxa der Caryophyllidae s. l.	82

Abb. 30.	Schematische Darstellung der Wiederholungseinheit der ribosomalen DNA	84
Abb. 31.	Agarose-Gel-Elektrophorese (2% TAE-Agarose-Gel) von PCR-Produkten aus Amplifikationen mit dem Primerpaar ITS1 / ITS4	86
Abb. 32.	Agarose-Gel-Elektrophorese (2% TAE-Agarose-Gel) der zur Ligation verwendeten Fragmente von <i>N. khasiana</i> und <i>N. thorelii</i>	86
Abb. 33.	Distanzen der, der 5,8S rDNA entsprechenden Abschnitte, der mit den Primern nach White et al. (1990) gewonnenen Produkte	87
Abb. 34.	Häufigkeiten aller paarweisen Distanzen der Alinierung der nach Klonierung ermittelten ITS-Sequenzen von 5 <i>Nepenthes</i> -Arten	89
Abb. 35.	UPGMA-Dendrogramm paarweiser Distanzen der Alinierung durch Klonierung gewonnener Sequenzen von ITS von 5 <i>Nepenthes</i> -Arten	90
Abb. 36.	Konsensus-Topologie der kürzesten Bäume der Maximum-Parsimony-Analyse der 5,8S rDNA ausgewählter Taxa und der Nepenthaceae	93
Abb. 37.	Paarweise durchschnittliche Distanz der 5,8S rDNA verschiedener Gruppen zur 5,8S rDNA der untersuchten Angiospermen ohne <i>Nepenthes</i>	94
Abb. 38.	Mutmaßliche Sekundärstruktur von ITS2 von <i>Phyllanthus amarus</i>	95
Abb. 39.	Beispiele für optimale Faltungen von ITS2 nach dem Zuker-Algorithmus (Programm RNA-Structure)	97
Abb. 40.	Laser-Microbeam-Microdissection (LMM) eines auf eine PEN-Membran aufgebrachten Chloroplasten von <i>N. tabacum</i>	100
Abb. 41.	Agarose-Gel-Elektrophorese einer Amplifikation von jeweils 20 durch LMM und LPC ausgeschnittenen Membranregionen	102
Abb. 42.	Agarose-Gel-Elektrophorese von PCR-Produkten einzelner Chloroplasten	103
Abb. 43.	Phylogramm der Maximum-Parsimony-Analyse des trnK-Introns von 16 verschiedenen <i>Nepenthes</i> -Arten und des Typ1 und Typ2 der trnK-Intron-Sequenz	104
Abb. 44.	Agarose-Gel-Elektrophorese der Re-PCR von einzelnen Chloroplasten von <i>N. bicalcarata</i>	105
Abb. 45.	Schematische Darstellung der bekannten Sequenz des trnK-Introns des Typ2 und die Lage der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme	107
Abb. 46.	Agarose-Gel-Elektrophorese von Amplifikaten der Re-PCR der Ligation des Gesamt-DNA-Verdaus von <i>N. bicalcarata</i>	107
Abb. 47.	Schematische Darstellung der Sequenzen für das trnK-Intron Typ 1 und Typ 2	109
Abb. 48.	Ausschnitt aus der Alinierung des trnK-Introns von <i>Nepenthes</i> , <i>Triphyophyllum peltatum</i> und <i>Ancistrocladus abbreviatus</i>	112
Abb. 49.	Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse des trnK-Introns der Nepenthaceae als Kladogramm	115
Abb. 50.	Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse des trnK-Introns der Nepenthaceae als Phylogramm	116
Abb. 51.	Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) durchschnittlicher Distanzen der Alinierung des mitochondrialen Pseudogens der Nepenthaceae	122
Abb. 52.	GC-Gehalt der unterscheidbaren Sequenzabschnitte des plastidären trnK-Introns und seiner mitochondrialen Kopie	123
Abb. 53.	Vergleich der Anzahl der variablen Positionen der einzelnen unterscheidbaren Sequenzabschnitte	124
Abb. 54.	Konsensus-Topologie der Maximum Parsimony-Analyse des mitochondrialen trnK-Pseudogens der Nepenthaceae	126
Abb. 55.	Anzahl der für die Rekonstruktion eines zufällig ausgewählten kürzesten Baumes angenommenen Mutationsschritte in Abhängigkeit der Position in der Alinierung	128
Abb. 56.	Konsensus-Topologie der kombinierten Datenmatrix (links) im Vergleich zur Konsensus-Topologie der Analyse des plastidären trnK-Introns (rechts)	129

Abb. 57.	Konsensus-Topologie der Analyse des kombinierten Datensatzes mit Angabe des CI der die Äste stützenden Merkmale.	133
Abb. 58.	Konstruiertes Kladogramm aus der trnK-Intron-Phylogenie und der kombinierten Analyse	134
Abb. 59.	Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse von ITS-Sequenzen der Ancistrocladaceae, gezeigt als Kladogramm	139
Abb. 60.	Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse von ITS-Sequenzen der Ancistrocladaceae, gezeigt als Phylogramm	140
Abb. 61.	Mutmaßliche Sekundärstruktur von ITS2 von <i>Ancistrocladus spec</i>	141
Abb. 62.	Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Phylogenie der Ancistrocladaceae als Phylogramm und Kladogramm	145
Abb. 63.	Vergleich der Konsensus-Topologien der Maximum-Parsimony-Analyse der ITS-Region (links) und des trnK-Introns (rechts) der Ancistrocladaceae	146
Abb. 64.	Neighbor-Joining-Analyse basierend auf genetischen Distanzen nach Nei und Li (1979) der ISSR-Bandenmuster von verschiedenen Proben der Ancistrocladaceae	148
Abb. 65.	Häufigkeitsverteilung der paarweisen Distanzen	150
Abb. 66.	Mittelwerte der durchschnittlichen Distanzen der ITS-Region und des trnK-Introns innerhalb der afrikanischen Proben und der Gruppe „cochinchinensis“	152
Abb. 67.	Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) der ITS (oben) und trnK-Intron-Sequenzen (Mitte) und ISSR-Fingerprints (unten) der Ancistrocladaceae Südostasiens	153
Abb. 68.	Einteilung der Sequenzen der Ancistrocladaceae aus Südostasien in verschiedene Sequenztypen	155
Abb. 69.	Karte des Nordens des Untersuchungsgebietes mit den Fundorten für <i>Ancistrocladus</i>	160
Abb. 70.	Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) von Nei-Li-Distanzen der ISSR-Fingerprints der Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes	163
Abb. 71.	Karte des Südens des Untersuchungsgebietes mit den Fundorten für <i>Ancistrocladus</i>	168
Abb. 72.	Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) der Nei-Li-Distanzen der ISSR-Fingerprints der Proben des Südens des Untersuchungsgebietes	170
Abb. 73.	Vergleich der Variabilität des trnK-Introns mit dem intergenischen Spacer	174
Abb. 74.	Anteil variabler Positionen in Alinierungen verschiedener Marker, die für phylogenetische Rekonstruktionen eingesetzt wurden	175
Abb. 75.	Variabilität als durchschnittliche Distanz der einzelnen Codonpositionen des Leserasters	176
Abb. 76.	PCoA von Jukes-Cantor Distanzen des trnK-Introns und der mitochondrialen Sequenzen	182
Abb. 77.	Verschiedene Vertreter von <i>Ancistrocladus</i> aus Südostasien	186
Abb. 78.	Verschiedene Standorte von <i>Ancistrocladus</i> in Südostasien	187
Abb. 79.	Verbreitung der aufgrund von Sequenzanalysen und DNA-Fingerprints charakterisierten Taxa der Ancistrocladaceae Südostasiens	193
Abb. 80.	Vergleich der Phylogenien von ITS und trnK-Intron mit der durch ISSR-Fingerprints angezeigten Verwandtschaftsbeziehungen	196
Abb. 81.	Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Phylogenie der Nepenthaceae im Vergleich zum Verbreitungsgebiet der untersuchten Taxa	202
Abb. 82.	Die trnK-Intron-Phylogenie reduziert auf die von Danser (1928) anerkannten Arten und Vergleich mit seinem taxonomischen Konzept	205
Abb. 83.	Schematisiertes Phylogramm	216
Abb. 84.	Mögliche Evolution der Verwandtschaftsgruppe der Drosophyllaceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae und Nepenthaceae ausgehend von <i>Droseridites spinosus</i> -Pollen	218
Abb. 85.	Szenario der Besiedlung des malaiischen Archipels durch die Nepenthaceae	220

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.	Aufstellung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzenmaterials der Nepenthaceae	20
Tab. 2.	Aufstellung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzenmaterials von <i>Ancistrocladus</i>	22
Tab. 3.	Aufstellung des untersuchten Pflanzenmaterials von <i>Ancistrocladus</i> aus Südostasien	23
Tab. 4.	Aufstellung des Pflanzenmaterials von nicht zu den Nepenthaceae oder Ancistrocladaceae gehörenden Arten	25
Tab. 5.	Liste der verwendeten Oligonukleotide	43
Tab. 6.	Länge, GC-Gehalt und Anzahl nicht erkannter Basen (N) der Sequenzen der in der matK-Alinierung berücksichtigten Taxa	66
Tab. 7.	Positionen der Alinierung mit Indels	67
Tab. 8.	Für die Maximum-Parsimony-Analyse von rbcL verwendete Sequenzen	74
Tab. 9.	Für die phylogenetische Analyse der 18S rDNA verwendete Taxa	79
Tab. 10.	Die für die phylogenetische Analyse der 5,8S rDNA verwendeten Taxa	92
Tab. 11.	Aufstellung der durch die Alinierung des trnK-Introns der Nepenthaceae angenommenen Längenmutationen	113
Tab. 12.	Aufstellung der durch die Alinierung des mitochondrialen Pseudogens des trnK der Nepenthaceae angenommenen Längenmutationen	120
Tab. 13.	Anzahl der für die Konsensus-Topologie der kombinierten Analyse angenommenen Mutationsschritte eingeteilt nach dem CI der zugehörigen Positionen	132
Tab. 14.	Aufstellung der in der Alinierung der ITS-Region der Ancistrocladaceae eingefügten Indels	136
Tab. 15.	Aufstellung der in der Alinierung des trnK-Introns der untersuchten Ancistrocladaceae und <i>Triphyphyllum peltatum</i> auftretenden Indels	143
Tab. 16.	Zuordnung der einzelnen unterschiedlichen ITS-Sequenzen zu den sich aus der phylogenetischen Analyse ergebenden Gruppen	156
Tab. 17.	Zuordnung der einzelnen unterschiedlichen trnK-Intron-Sequenzen zu den sich aus der phylogenetischen Analyse ergebenden Gruppen	157
Tab. 18.	Aufstellung der durch molekulare Methoden charakterisierten Taxa der Ancistrocladaceae in Südostasien	191
Tab. 19.	Aufstellung der von Cheek und Jebb (2001) aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten angenommene natürliche Gruppen	209
Tab. 20.	Aus den Schrittlängen der phylogenetischen Rekonstruktion abgeleitete Schätzung des Alters der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gruppen	215

1 Einleitung

Sequenzanalysen von Abschnitten des plastidären oder nukleären Genoms haben weitverbreitete Anwendung gefunden, um ergänzende Daten für Fragestellungen der Systematischen Botanik zu erhalten. Aus homologen Sequenzen können Merkmale für verschiedene Taxa in Form von Punkt- und Längenmutationen ermittelt werden. Durch eine kladistische Analyse lassen sich mit Hilfe dieser Merkmale, genauso wie mit den „klassischen“ morphologischen Merkmalen, Hypothesen zu Verwandtschaftsbeziehungen und Entwicklungsgeschichte von Taxa aufstellen oder untermauern (Wägele, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Phylogenie eines Genorts häufig mit den aufgrund morphologischer Daten angenommenen Verwandtschaftsverhältnissen korrespondiert und unkonventionelle Gruppierungen, die durch molekulare Daten angezeigt waren, durch eine Neubewertung morphologischer Charaktere häufig unterstützt werden konnten (Wagenitz, 1997).

Genorte des plastidären Genoms haben als phylogenetische Marker in der botanischen Forschung eine größere Bedeutung erlangt als Genorte des nukleären und mitochondrialen Genoms (Bachmann, 1997). Plastidäre DNA wird uniparental vererbt, weshalb sie nicht der Rekombination unterliegt und in einem Individuum immer nur ein Haplotyp vorliegt. Vor allem in der Evolution konservierte Gene des plastidären Genoms werden als geeignet zur Untersuchung der Verwandtschaft von Taxa höherer Kategorie angesehen (Qui *et al.*, 1993). So wurde die Sequenz des Gens für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcL*) von vielen Autoren für die Erstellung einer Phylogenie der Angiospermen vergleichend analysiert (z.B. Chase *et al.*, 1993; Albert *et al.*, 1994). Mittlerweile liegen für diesen Genort sehr viel mehr Daten vor als für andere Genorte (Wagenitz, 1997).

Für die Erstellung von infrafamiliären und infragenerischen Phylogenien, reicht die Variabilität kodierender Abschnitte häufig nicht aus. Nichtkodierende Abschnitte des plastidären Genoms können hier eine größere Menge phylogenetischer Information liefern. Für solche Untersuchungen wurden verschiedene intergenische Spacer des plastidären Genoms eingesetzt, die mit Hilfe von in flankierenden konservierten Regionen lokalisierten Primern amplifiziert werden können (Fofana *et al.*, 1997). Der am häufigsten eingesetzte Abschnitt ist der zwischen dem Gen der tRNA für Threonin (*trnT*) und dem Gen der tRNA für Phenylalanin (*trnF*). Hochvariable intergenische Spacer und Introns wechseln sich hier mit kurzen hochkonservierten Abschnitten, die als Primerbindungsstellen dienen können, ab. Von Taberlet *et al.* (1991) eingeführt, wurde die *trnT-trnF*-Region in der Folge von vielen Autoren zur Erstellung molekularer Phylogenien verwendet (z.B. Bayer und Starr, 1999; Bakker *et al.*, 1999; Kajita *et al.*, 1998). Allerdings zeigte sich dass einige für Proteine kodierende Gene ebenfalls eine hohe Variabilität aufweisen, so dass sie für eine infragenerische Gliederung

geeignet sind. Ein solches Gen stellt beispielsweise das für die MaturaseK kodierende *matK* dar, die im Intron des Gens für die tRNA des Lysin (*trnK*) liegt (z.B. Johnson und Soltis, 1994; Hilu *et al.*, 1999; Cameron *et al.*, 2001; Kores *et al.*, 2001; Azuma *et al.*, 2001).

Zu dem wichtigsten phylogenetischen Marker auf Familien und Gattungsniveau hat sich jedoch die Region der Internal Transcribed Spacer (ITS) der rDNA des nukleären Genoms entwickelt (z.B. Baldwin 1992; Baldwin *et al.*, 1995; Compton *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 1999). Die rDNA bildet zusammen mit den Spacern ITS1 und ITS2 eine Wiederholungseinheit, die sich tandemartig aus mehreren tausend Kopien innerhalb des Genoms zusammensetzt und als eine Einheit transkribiert wird. Diese Einheit wird anschließend prozessiert und die Spacer ITS1 und ITS2 abgetrennt (vgl. auch Kapitel 3.2). Die rDNA unterliegt der *concerted evolution*, so dass im Idealfall nur eine Sequenz für die rDNA erhalten bleibt, obwohl sie in sehr vielen Kopien im Genom vorliegt (Baldwin *et al.*, 1995). Die ITS-Region stellt deshalb, neben der 18S und 26S rDNA der rDNA Wiederholungseinheit, den einzigen Genort des nukleären Genoms dar, der regelmäßig für phylogenetische Untersuchungen verwendet wird (Bachmann, 1997; Nickrent und Soltis, 1995). Bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Olsen und Schaal, 1999; Miyashita *et al.*, 1998) sind andere Abschnitte des nukleären Genoms nicht für die Anwendung für phylogenetische Studien untersucht.

1.1 Die Unterklasse Caryophyllidae

Trotz intensiver morphologischer, chemischer und molekular-kladistischer Studien sind Abgrenzung und verwandtschaftliche Beziehungen der Unterklasse der Caryophyllidae weiterhin Gegenstand der Diskussion. In traditionellen Klassifikationssystemen wurden in dieser Unterklasse die Ordnungen der Caryophyllales, Polygonales und Plumbaginales zusammengefasst (Cronquist, 1988; Dahlgren, 1989). Da diese Ordnungen nur wenige gemeinsame Merkmale aufweisen, wurden sie als monotypische Überordnungen eingeordnet. Die Polygonales und Plumbaginales wurden auch mit anderen Taxa in Beziehung gebracht (Ehrendorfer, 1991). Die Caryophyllales umfassen 11 Familien, die aufgrund einiger gemeinsamer Merkmale, wie z. B. Siebröhrenplastiden des P-Typs, in denen Proteine anstatt Stärke gespeichert werden, schon lange als natürliche Einheit erkannt sind (Bittrich, 1993). In 9 dieser Familien ersetzen Betalaine die ansonsten bei Blütenpflanzen vorkommenden Anthocyane (Clement *et al.*, 1994). Die beiden anderen Ordnungen sind mit je einer Familie, den Polygonaceae bzw. Plumbaginaceae, monotypisch.

Die phylogenetischen Verhältnisse innerhalb der Caryophyllidae wurden durch vergleichende Sequenzanalyse des plastidären *rbcL*-Gens von mehreren Autoren untersucht (Giannasi, 1992; Albert *et al.*, 1992; Chase *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1994; Fay *et al.*, 1997; Nandi *et al.*, 1998; Lledo *et al.*, 1998). Andere Arbeiten wurden mit 18S rDNA (Soltis *et al.*, 1997) und partiellen plastidären ORF 2280 Sequenzen (Downie *et al.*, 1997) durchgeführt. Die Analysen

dieser Marker bestätigten eine Monophylie der Caryophyllidae, zeigten aber eine Reihe von Taxa, die bisher nicht mit den Caryophyllidae in Zusammenhang gebracht wurden, als Teil dieser Monophylie. Folgt man den aktuellen phylogenetischen Rekonstruktionen so sind unter die Caryophyllidae sensu lato (s. l.) auch die Familien Tamaricaceae und Frankeniaceae, Simonsiaceae, Rhabdodendraceae, Droseraceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae und Nepenthaceae einzubeziehen. Einige Autoren schlagen bezüglich der taxonomischen Gliederung der Caryophyllidae ein anderes Konzept vor. Sie unterteilen die Unterklasse in die *core* Caryophyllales mit den ursprünglich zu dieser Ordnung gezählten Familien und die *noncore* Caryophyllales mit ca. 15 Familien, unter anderem den Plumbaginaceae und Polygonaceae (Angiosperm Phylogenetic Group zitiert in Cuénoud *et al.*, 2002). Die *noncore* Caryophyllales enthalten mit den Droseraceae und Nepenthaceae eine Entwicklungslinie carnivor Taxa. Die Beziehungen dieser Taxa zu den übrigen Caryophyllidae s. l. wurden durch die bisher vorliegenden Arbeiten nicht geklärt, oder die dort präsentierten Ergebnisse waren in diesem Punkt widersprüchlich. Abb. 1 zeigt die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Caryophyllidae s. l., wie sie von verschiedenen Autoren aufgrund molekularer Analysen angenommen wurden.

Bereits erste Sequenz-Untersuchungen des *rbcL*-Gens zeigten, dass die Nepenthaceae und Droseraceae offensichtlich nah verwandt zu den Caryophyllales sind (Albert *et al.*, 1992; Chase *et al.*, 1993). Eine Studie mit Schwerpunkt auf den Droseraceae von Williams *et al.*, (1994; Abb. 1a) ergab, dass die Droseraceae (einschließlich *Drosophyllum lusitanicum*), Nepenthaceae und Polygonaceae / Plumbaginaceae eine Schwestergruppe zu den Caryophyllales bilden und die Nepenthaceae dabei die Nachbargruppe der Polygonaceae / Plumbaginaceae sind. Auch nach Fay *et al.* (1997; Abb. 1b), die mit ihrer Analyse des *rbcL*-Gens die Zugehörigkeit der Rhabdodendraceae, Phytolaccaceae, Asteropeiaceae, Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae, Frankeniaceae und Tamaricaceae zu den Caryophyllidae s. l. zeigen konnten, erscheinen die carnivoren Taxa Droseraceae und Nepenthaceae paraphyletisch in Bezug auf die Polygonaceae / Plumbaginaceae. Die Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae bilden eine Nachbargruppe zu den Nepenthaceae und Droseraceae. In einer umfassenden kladistischen Analyse der Angiospermen durch Nandi *et al.* (1998; Abb. 1d) werden Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae abweichend positioniert. Sie erscheinen hier als Schwestergruppe der Polygonaceae / Plumbaginaceae und sind klar von den Droseraceae / Nepenthaceae separiert. Eine neuere Studie der infrafamiliären Beziehungen der Plumbaginaceae (Lledo *et al.*, 1998; Abb. 1c) ergab ebenfalls mit dem Marker *rbcL* eine Monophylie von Nepenthaceae, Droseraceae, Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae, mit den Nepenthaceae als Nachbargruppe zu den übrigen Taxa. Durch vergleichende Sequenzanalyse der 18S rDNA durch Soltis *et al.* (1997; Abb. 1e) und der ORF 2280-Sequenzen durch Downie *et al.* (1997; Abb. 1f) wird eine Monophylie der Caryophyllales bestätigt. Die Droseraceae und Nepenthaceae werden allerdings unterschiedlich eingeordnet. Sie erscheinen bei den

Analysen mit 18S rDNA als Nachbargruppe der Caryophyllales und Polygonaceae / Plumbaginaceae. Bei den Analysen basierend auf ORF 2280-Sequenzen erscheinen sie als Nachbargruppe der Caryophyllales (Droseraceae wurden hier nicht untersucht).

Wegen des Fehlens des rpl2-Introns wurde eine nahe Verwandtschaft zwischen den Caryophyllales und Droseraceae angenommen. Erste Untersuchungen des Chloroplasten- Genoms verschiedener Taxa der Caryophyllales zeigten einen Verlust dieses Introns und ein Vorkommen des Introns bei den Polygonaceae (Zurawski *et al.*, 1984; Zurawski und Clegg, 1987). Nachfolgende Studien (Downie *et al.*, 1991; Downie und Palmer, 1994) bestätigten, dass das rpl2-Intron in 10 Familien der Caryophyllales fehlt, ebenso bei *Drosera filiformis*. Bei den Plumbaginaceae (*Limonium*), Polygonaceae (*Polygonum*, *Rheum*, *Rumex*) und *Nepenthes alata* wurde das Intron allerdings nachgewiesen.

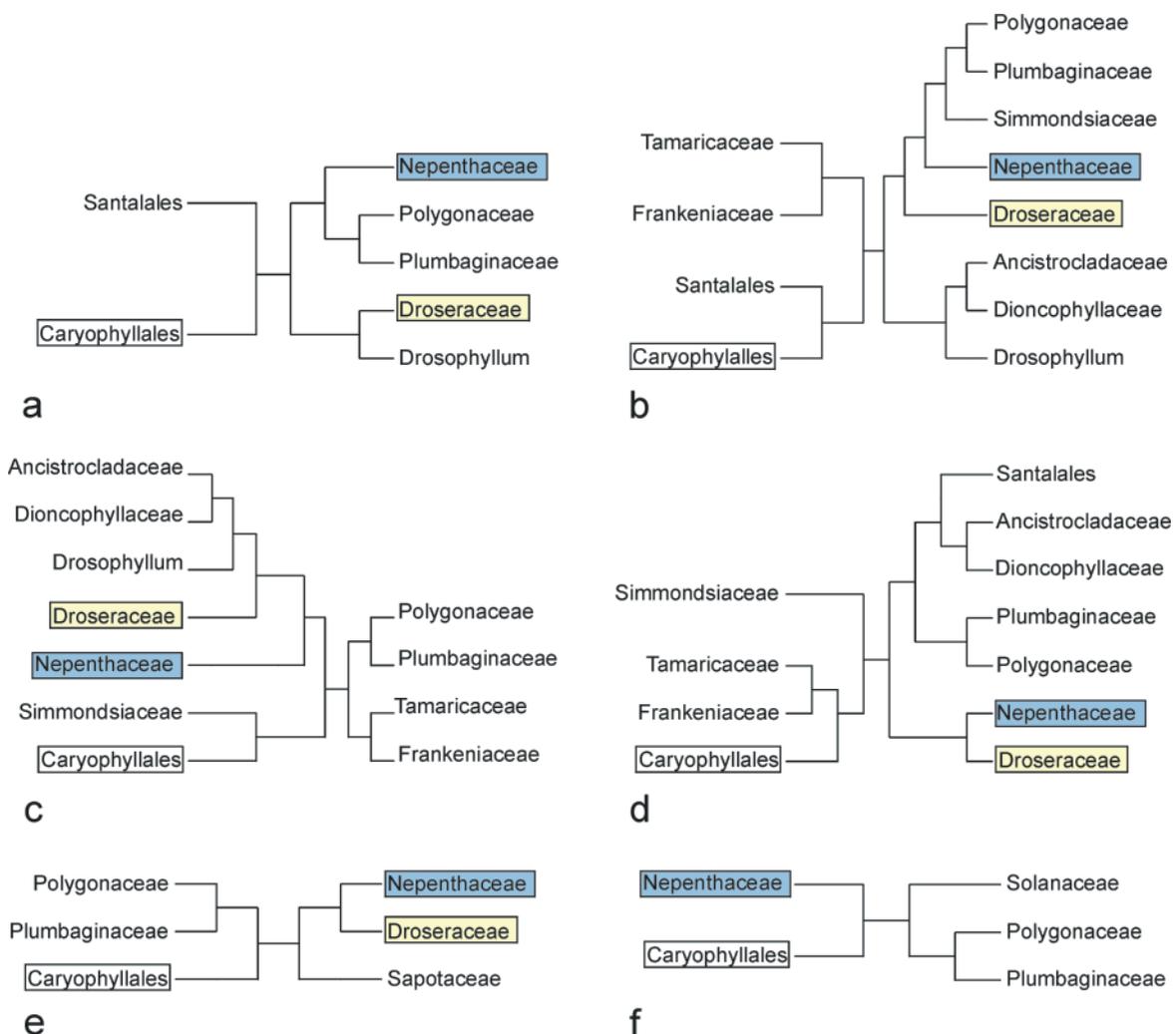


Abb. 1. Aktuelle Übersicht der phylogenetischen Beziehungen der Caryophyllidae s. l., aufgrund von Analysen an rbcL (a - Williams *et al.*, 1994; b - Fay *et al.*, 1997; c - Lledo *et al.*, 1998; d - Nandi *et al.*, 1998;), 18S rDNA (e - Soltis *et al.*, 1997) und ORF 2280-Sequenzen (f - Downie *et al.*, 1997). Die Position der Nepenthaceae und Droseraceae gegenüber den Caryophyllales ist hervorgehoben (Kladogramme vereinfacht nach den Originalarbeiten).

Die bisher für vergleichende Sequenzanalysen verwendeten Marker *rbcL* und 18S rDNA sind, wegen ihres kodierenden Charakters und der ORF 2280 wegen seiner Lokalisation im *inverted repeat* des Chloroplasten, relativ konserviert. Sie wurden daher zur Klärung großsystematischer Zusammenhänge eingesetzt. Für die Einordnung relativ nah verwandter Taxa stehen mit den bisherigen Datensätzen nur wenige potentielle Synapomorphien zur Verfügung. Die sich widersprechenden Verzweigungsstrukturen (Topologien) der in den erwähnten Untersuchungen präsentierten Phylogenien sind alle nicht oder nur schwach durch Bewertungsverfahren der kladistischen Analyse gestützt. Auf die Existenz einer Entwicklungslinie innerhalb der Caryophyllidae s. l., die sich aus verschiedenen carnivoren und nicht carnivoren Taxa zusammensetzt (wie bei Lledo *et al.*, 1998, siehe Abb. 1 c), kann aber durch die existierenden Analysen geschlossen werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Monophylie einer solchen Linie zu überprüfen und eine infrafamiliäre Gliederung der dort enthaltenen Nepenthaceae, Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae mit Hilfe molekularer Marker zu erarbeiten.

1.2 Die Familie Nepenthaceae

Die Nepenthaceae sind eine monotypische Familie mit derzeit 87 anerkannten Arten (Jebb und Cheek, 1997; Cheek und Jebb, 2001). Alle Arten sind immergrüne, verholzte Kletterpflanzen, kriechende Sträucher oder, seltener, Epiphyten mit einer bis zu 20 m langen Sprossachse mit einem Durchmesser von bis zu 3 cm. Sie kommen von Meereshöhe bis zu 3500 m NN vor (*N. lamii* bis 3520 m Höhe auf Irian Jaya). Die meisten Arten wachsen in feuchten und offenen Bergwäldern in 1500-2500 m Höhe, nur wenige Arten kommen in Sekundärwäldern, Sümpfen oder Regenwäldern des Tieflandes vor. Die Anpassung an verschiedene Substrate wird als ein wichtiger Faktor für die Evolution des Genus angesehen (Jebb und Cheek, 1997). Vor allem auf Borneo finden sich Arten obligat auf Kalkstein oder silikatreichen Substraten, wie Serpentin, darunter welche, die für viele Pflanzen toxisch sind. Die hohe Metallkonzentration solcher Standorte wird aber von verschiedenen *Nepenthes*-Taxa toleriert (nach Brooks, zitiert in Cheek und Jebb, 2001).

Die Nepenthaceae sind als diözische Pflanzen obligate Fremdbestäuber. In der Natur kommt interspezifische Hybridisierung sporadisch vor, in Kultur lassen sich Hybride zwischen fast allen Arten erzeugen, d. h. die physiologischen und genetischen Inkompatibilitäten scheinen niedrig zu sein (Cheek und Jebb, 2001). Hybridisierungsereignisse könnten daher eine große Rolle in der Evolution der Nepenthaceae gespielt haben. Karyologische Untersuchungen an verschiedenen *Nepenthes*-Arten ergaben sehr hohe Chromosomenzahlen von $2n=80$. Die Chromosomen sind sehr klein (0,5-0,2 μm) und gleichförmig gestaltet (Heubl und Wistuba, 1995). In Anbetracht der hohen Chromosomenzahlen, scheint die Annahme eines polyploiden

Ursprungs der rezenten Arten wahrscheinlich. Dem widerspricht allerdings das Fehlen duplizierter Loci wie Untersuchungen von Isozymen (Lowrey, 1991) zeigten.



Abb. 2. Kannen verschiedener *Nepenthes*-Arten: Luftkannen von A) *Nepenthes cf. benstonei* aus Südthailand (Khao Sok NP / Surathani), B) *N. mirabilis* (kult. Botanischer Garten Trang, Südthailand), C) *N. veitchii* (kult. Botanischer Garten München), D) Luft- (links) und Bodenkannne von *N. thorelii* (kult. Botanischer Garten München).



Abb. 3. A) Männlicher Blütenstand von *N. mirabilis*, B) Samen von *N. pervillei* und typischer *Nepenthes*-Samen (*N. madagascariensis*) im Vergleich zu Samen von *Drosera spec.*, C) Kapsel Frucht (*N. sanguinea*) und D) weibliche Blüten (*N. villosa*). Fotos B bis D: G. Heubl (mit freundlicher Genehmigung)

Das markanteste Merkmal der Nepenthaceae ist die zu einer kannenförmigen Gleitfalle umgewandelte Blattspreite (vgl. Abb. 2 und 3). Die Kannen sind bei verschiedenen *Nepenthes*-Arten sehr unterschiedlich gestaltet, sie können bis zu 10-15 cm Durchmesser und 30-40 cm Länge erreichen. Der Blattgrund ist als Phyllodium ausgebildet, mit dem die Kanne über den ehemaligen Blattstiel verbunden ist. Dieser kann stark verlängert sein und als Ranke fungieren. Neben Langsprossen bilden die Nepenthaceae rosettenförmige Kurzsprosse aus, deren Kannen anders gebaut sind. Die an den Kurzsprossen ansetzenden Bodenkannen sind bauchi-

ger als die an den Langtrieben gebildeten Luftkannen, der Blattstiel ist nicht gewunden, die Flügel sind stärker ausgebildet und die Kanne ist mit der Ventralseite dem Blattstiel zugewandt. Der Winkel zwischen Blattstiel und Kannen ist bei den Bodenkannen häufig größer als der der Luftkannen. Dadurch können sie nahezu flach am Boden anliegen und dort lebende Tiere aufnehmen. Die Luftkannen sind schlank und meist mehr oder weniger trichterförmig, ihre Ventralseite ist vom Blattstiel abgewandt (vgl. Abb. 2D).

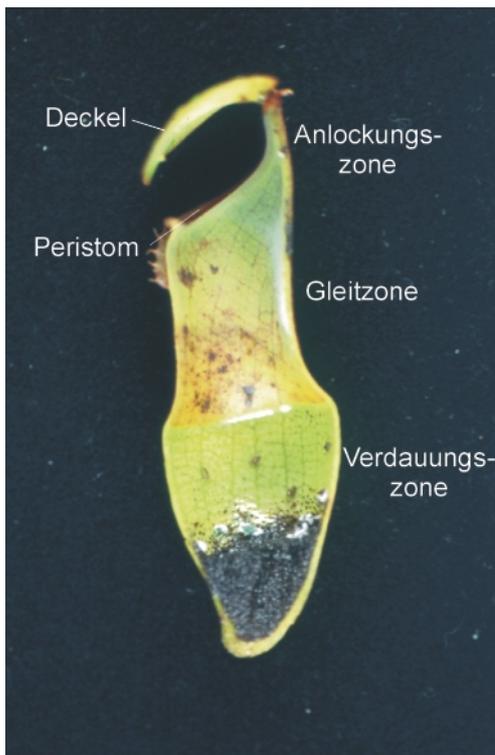


Abb. 4. Kannenlängsschnitt von *N. pervillei* mit Einteilung in die funktionellen Zonen der *Nepenthes*-Kanne. Am Boden der Kanne sind unzersetzte Beutetiere zu sehen (Ameisen).

Die Kanne lässt sich funktionell in drei Zonen gliedern (vgl. Abb. 4). Die Anlockungszone besteht aus Deckel, Peristom und oberem Rand der Kanneninnenseite. An der Deckelunterseite und an der oberen Kanneninnenseite befinden sich Nektardrüsen. Durch diese sowie gegebenenfalls durch auffallende Färbung angezogen, rutschen Insekten ab beim Versuch an die Drüsen zu gelangen. Die Gleitzone ist bei den meisten Arten mit Wachsplättchen belegt, so dass die Insekten weiter abrutschen und in die Verdauungszone gelangen. Hier werden sie durch Enzyme zersetzt und niedermolekulare Stoffe absorbiert (Owen *et al.*, 1999). Dazu werden in den Kannen Aminosäure- und Peptid-Transporter exprimiert, die die Aufnahme der entsprechenden Stoffe katalysieren (Schulze *et al.*, 1999). In der Natur wird der Zersetzungsprozess durch eine kommensalisch in der Kannenflüssigkeit lebende Fauna aus zum Teil speziell an das Leben in diesen Kannen angepassten Arten unterstützt. Ein großer Anteil dieser Fauna wird von Larven verschiedener Dipteren gebildet (Clark, 1997).

Mit *N. bicalcarata*, wahrscheinlich symbiotisch vergesellschaftet, kommt eine Ameisenart vor, *Camponotus schmitzi*, die sich von Dipterenlarven ernährt, die sie schwimmend aus der Kanne erbeutet. Außerdem dienen *C. schmitzi* große, in den Kannen gefangenen Tieren als Nahrung, wodurch diese aus den Kannen entfernt werden. Die Kannen erreichen dadurch eine höhere Lebensdauer als Kannen die nicht von der Ameise besiedelt sind. *C. schmitzi* kommt nur auf *N. bicalcarata* vor und nistet in hohlen Sprossen der Pflanze (Clark, 1997).

Obwohl einige umfassende Revisionen der *Nepenthaceae* (Hooker, 1873; Macfarlane, 1908), sowie mehrere regionale Untersuchungen (Kurata, 1973; Kurata 1976; Shivas, 1984; Tamin und Hotta, 1986; Jebb, 1991; Phillips and Lamb, 1996) vorliegen, ist ihre Klassifizierung immer noch provisorisch. Bis heute ist das von Danser (1928) aufgestellte taxonomische Konzept weitgehend akzeptiert. Er schlägt 6 Gruppen zur Gliederung der *Nepenthaceae* vor:

1. Die *Urceolate* mit 2 Arten, die nur krugförmige Bodenkannen mit an der Innenseite abgeflachtem Peristom und rispige Infloreszenzen aufweisen;
2. die *Insignes* mit 10 Arten mit großen, sitzenden oder gestielten Blättern und großen, glockig bis trichterförmigen Kannen;
3. die *Montanae* mit 10 Arten, die beim Trocknen schwarz werden, mit sitzenden, aber subpetiolaten Blättern, traubiger Infloreszenz mit feiner und spärlicher Behaarung;
4. die *Regiae* mit 15 Arten mit 1/2 Phyllotaxis an kletternden Sprossen gegenüber 2/5 bei den anderen Gruppen, gestielten Blättern mit großen trichterförmigen Kannen, flachem oder verbreitertem Peristom, mit Anhängen am Kannendeckel, traubiger Infloreszenz und rauhem rotbraunem Indument, hierzu gehören die auffallendsten Formen;
5. die *Nobiles* mit 4 Arten, mit schmalen Peristom, Deckel nie mit Anhängen, traubiger Infloreszenz und rotbraunem Indument. Die *Nobiles* vermitteln zwischen den *Montanae* und *Regiae*;
6. die *Vulgatae* als größte Gruppe mit ca. 20 Arten mit kleinen schmalen Blättern, schmalen Peristom, kleinen Kannen und feiner bis fehlender Behaarung.

Das Konzept wurde von Harms (1936) modifiziert, durch stärkere Differenzierung der von Danser den *Vulgatae* zugeordneten Taxa. Nach Harms wird *Nepenthes* in drei Sektionen eingeteilt: *Anourosperma* (*N. pervillei*), *Mesonepenthes* (*N. madagascariensis* incl. *N. masoalensis*) und *Eunepenthes* (alle anderen Taxa). Die Sektion *Eunepenthes* wird in 7 Subsektionen unterteilt. *N. distillatoria* aus Sri Lanka stellt er in die von ihm neu geschaffene Subsektion *Distillatoriae*.

Die größte Diversität erreicht *Nepenthes* im malaiischen Archipel mit 79 der 87 nach Jebb und Cheek (1997) und Cheek und Jebb (2001) anerkannten Arten. Viele dieser Arten sind

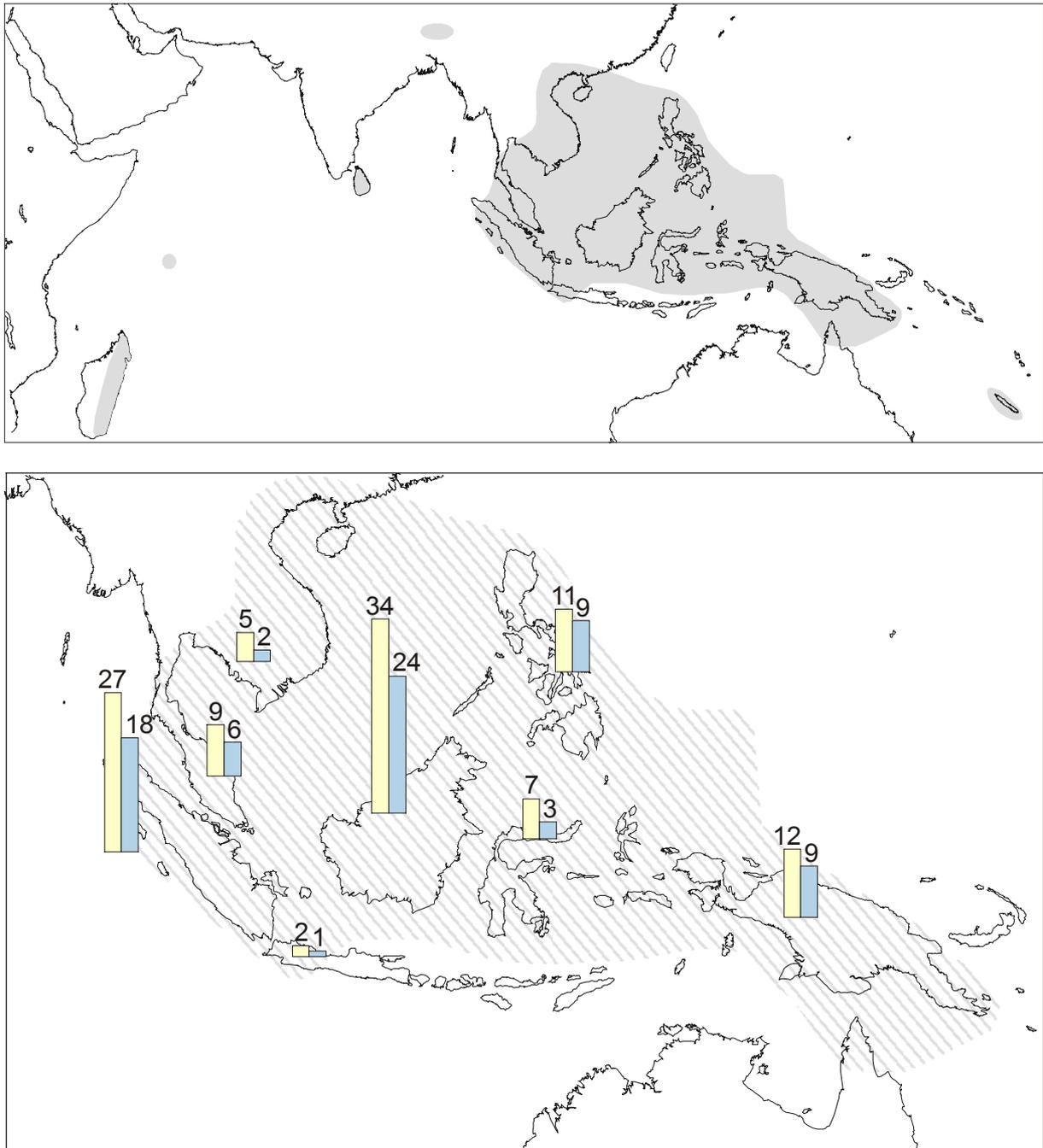


Abb. 5. Oben: Rezenten Areal der Nepenthaceae (nach Danser 1928, leicht verändert); unten: Diversität der Gattung im malaiischen Archipel; gelbe Balken entsprechen der Artenzahl der einzelnen Gebiete, blaue Balken der Anzahl der für diese Gebiete endemischen Arten. Die Artenzahlen entsprechen den Angaben von Cheek und Jebb (2001) sowie Jebb und Cheek (1997). Ausgehend von einem Diversitätszentrum in Sumatra und Borneo nehmen die Artenzahlen nach Norden und Osten ab.

Endemiten mit sehr begrenztem Areal. Das Diversitätszentrum stellt Borneo (mit, je nach Artabgrenzung, bis zu 34 Arten, davon 24 endemisch) und Sumatra (mit 27 Arten, davon 18 endemisch) dar, von dort erstreckt sich das Areal mit abnehmenden Artenzahlen westlich bis nach Sri Lanka (*N. distillatoria*), den Seychellen (*N. pervillei*) und Madagaskar (*N. madagas-*

cariensis, *N. masoalensis*), nördlich zu den Khasi-Hochländern (*N. khasiana*) und Indochina (*N. thorelii*, *N. anamensis*) und östlich über Neu Guinea bis Nordaustralien (*N. mirabilis*) und Neu Kaledonien (*N. vieillardii*). Lediglich 3 Arten der Gattung (*N. mirabilis*, *N. ampullaria*, *N. gracilis*) besiedeln große Teile des malaiischen Archipels. Nur *N. mirabilis* kommt fast im gesamten malaiischen Archipel vor und erreicht als einzige Art Nordaustralien (Abb. 5).

1.3 Hypothesen zur Evolution der Nepenthaceae

Bisher wurden drei Hypothesen zur Evolution der Nepenthaceae aufgestellt, wobei nur die von Danser (1928) auf einer intensiven taxonomisch-biogeographischen Untersuchung beruht (Abb. 6). Danser nimmt einen Gondwana Ursprung der Familie an. Dies leitete er von der Chorologie der rezenten *Nepenthes*-Taxa und dem Auftreten von ihm als ursprünglich angesehener Merkmale bei den Arten aus Madagaskar und den Seychellen ab. Der Zeitpunkt der Entstehung der Nepenthaceae lag demnach nach der Abtrennung des indischen Subkontinents von Afrika. Bei der Teilung in die madagassische und indische Platte waren bereits *Vulgatae* mit traubigen Infloreszenzen vorhanden. *N. madagascariensis* kommt als Relikt dieses Ereignisses auf Madagaskar vor, *N. pervillei* (Seychellen) und *N. distillatoria* (Sri Lanka) stellen Relikte der Nordverlagerung der indischen Platte dar. Bei der Bildung des indischen Subkontinents wanderten ursprüngliche *Vulgatae* und mittlerweile entstandene *Vulgatae* mit Rispen nach Südostasien ein, wo sie, nach Verschlechterung der klimatischen Bedingungen auf dem Indischen Subkontinent, ein zweites evolutives Zentrum bildeten. Von diesem lässt sich das heutige Diversitätszentrum auf Borneo und Sumatra sowie die nicht zu den *Vulgatae* zu rechnenden Formen ableiten. Von hier aus wurde der malaiische Archipel besiedelt. *Nepenthes* erreichte während des Diluvial seine östliche Verbreitungsgrenzen auf Neu Kaledonien.

Krutzsch (1985; 1988) nahm aufgrund von Funden fossiler Pollen aus dem europäischen Eozän an, dass *Nepenthes* ein Element der immergrünen Flora der Nordtethys war. Nach der daraus abgeleiteten Hypothese breitete sich *Nepenthes* von der Nordtethys bis ins tropische Asien aus, bevor die Gebirge und Trockenbarrieren im Gebiet des heutigen Iran und Afghanistan entstanden waren. Krutzsch nimmt an, dass während des mittleren Miozän *Nepenthes* in Europa aufgrund von Klimaveränderungen und zunehmender Konkurrenz mit temperaten Florenelementen ausstarb und Asien zum Refugialgebiet wurde. Dort entstand in der Folgezeit ein zweites evolutives Zentrum, von dem aus, wie bei Dansers Hypothese, die Besiedlung des indomalaiischen Archipels und Neu Kaledoniens erfolgte. Parallel erfolgte die Fernverbreitung einiger relikitärer Spezies bis nach Madagaskar und den Seychellen.

Raven & Axelrod (1974) nehmen für *Nepenthes* den malaiischen Archipel, also ihr heutiges Diversitätszentrum, als primäres evolutives Zentrum an. Die Besiedelung des heutigen Areals wird durch eine Kombination von Wanderungen über Landbrücken und Fernverbreitungsereignissen erklärt. Diese Hypothese wurde nicht im Zusammenhang mit einer eigenständigen Untersuchung der *Nepenthaceae* formuliert. Sie ergibt sich aus der Annahme, dass die heutige Verbreitung nicht durch Phänomene der Kontinentalverschiebung beeinflusst wurde, da dafür typische Disjunktionen im Areal der *Nepenthaceae* fehlen.

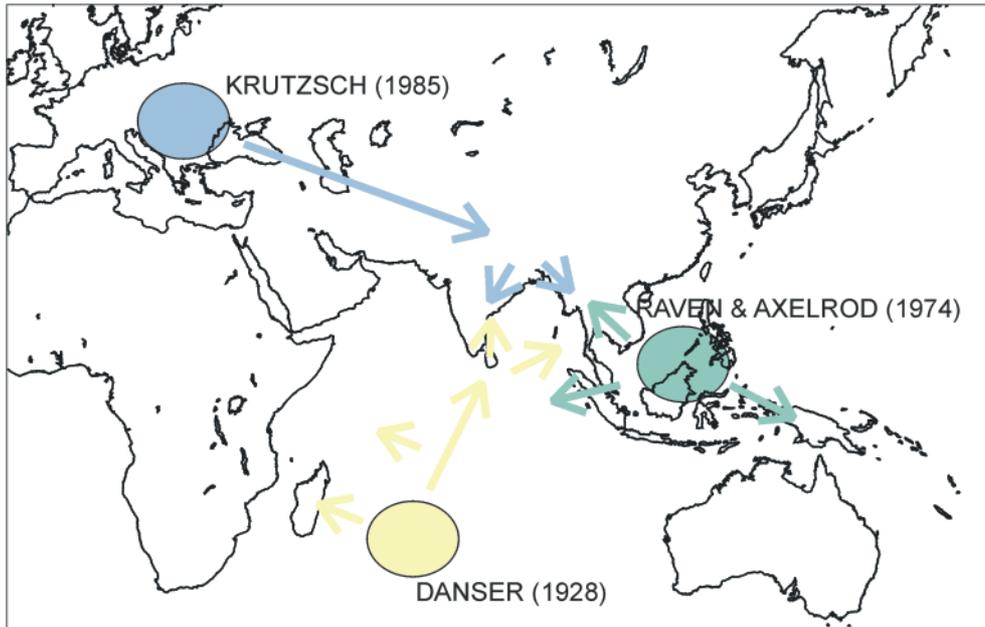


Abb. 6. Hypothesen zur Evolution der *Nepenthaceae*: Lage der primären evolutiven Zentren der *Nepenthaceae* nach Danser (1928), Krutzsch (1985, 1988) sowie Raven und Axelrod (1974). Von den Autoren postulierte Ausbreitungswege sind durch Pfeile markiert.

1.4 Die Familien *Dioncophyllaceae* und *Ancistrocladaceae*

Zur Verwandtschaftsgruppe der carnivoren Taxa innerhalb der *Caryophyllidae* gehören den molekularen Analysen zufolge neben den *Droseraceae* und *Nepenthaceae* auch die *Dioncophyllaceae* und *Ancistrocladaceae* an. Eine nahe Verwandtschaft letzterer Familien ist aufgrund von *rbcL*-Analysen wahrscheinlich (Nandi *et al.*, 1998; Fay *et al.*, 1997; Lledo *et al.*, 1998). Außerdem haben sie eine Reihe pharmakologisch bedeutsamer Inhaltsstoffe gemeinsam. Zu den *Dioncophyllaceae* werden drei monotypische Gattungen gezählt, mit den Arten *Triphyophyllum peltatum* (Hutch. & Dalz.) Airy Shaw, *Habropetalum dawei* (Hutch. & Dalz.) Airy Shaw und *Dioncophyllum thollonii* Baillon (Airy Shaw, 1951) mit jeweils kleinräumiger Verbreitung im tropischen Westafrika. Es handelt sich um Lianen, die an der Blattspitze charakteristische Hakenbildungen tragen, nach denen die Familie auch benannt ist

(vgl. Abb. 7). Die Dioncophyllaceae haben mit *Triphyophyllum peltatum* einen Vertreter, der im Jugendstadium den Droseraceae ähnliche Drüsenblätter ausbilden kann, und dann in diesem Stadium carnivor ist. Drüsenblätter werden bei einer Höhe der Pflanzen von 20-40 cm induziert. In der Natur geschieht dies kurz vor Beginn der Regenzeit. In Kultur konnte beobachtet werden, dass anscheinend abhängig vom Ernährungszustand, das carnivore Stadium ausgelassen werden kann (Risicher, 2002).

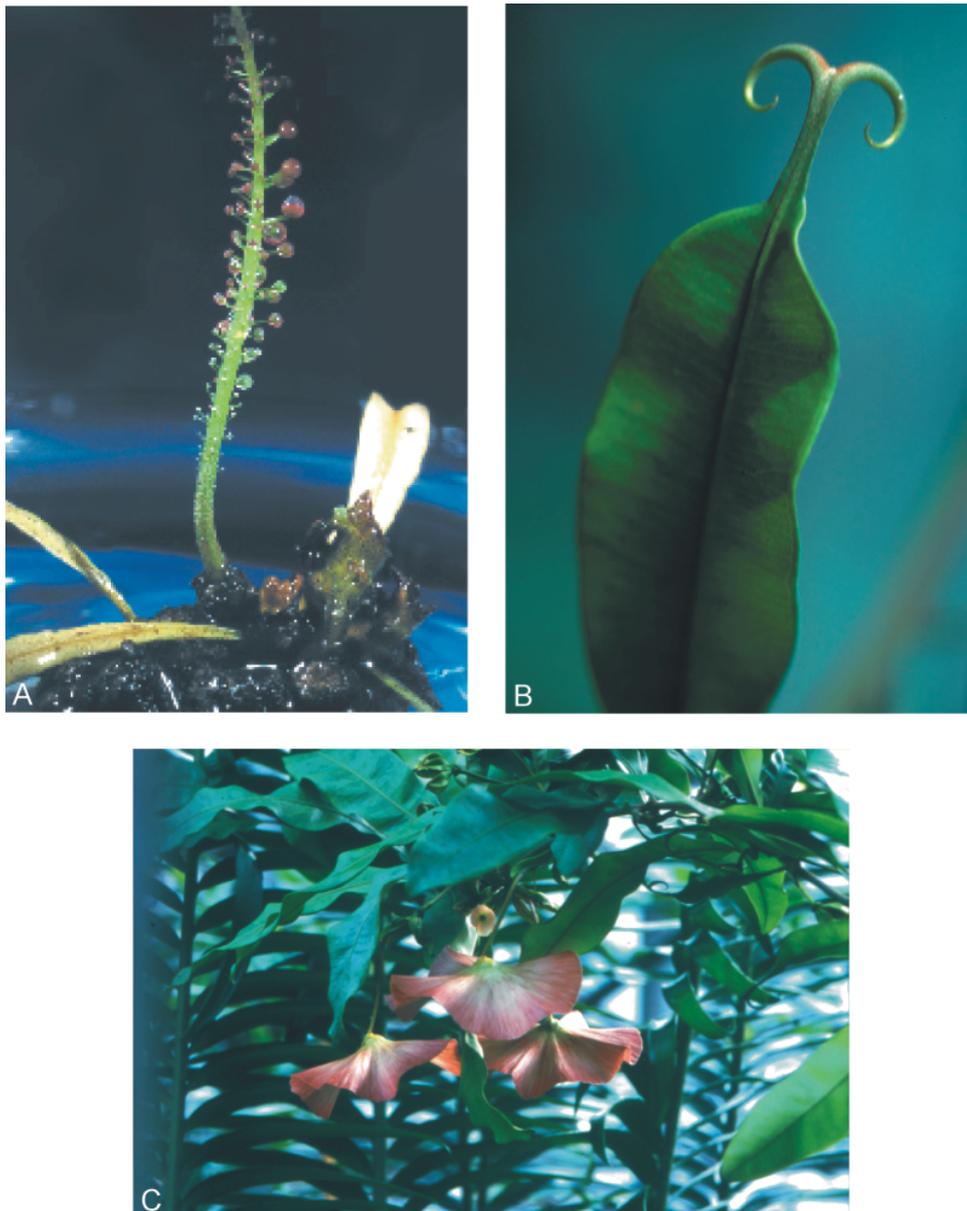


Abb. 7. *Triphyophyllum peltatum*: Drüsenblatt von *Triphyophyllum peltatum* aus *in vitro* Kultur (A), Hochblatt mit typischer Hakenbildung (B), Samen (C) (Fotos: A und B: H. Risicher; C: G. Bringmann, mit freundlicher Genehmigung)

Die Ancistrocladaceae sind in West-, Zentral- und Ostafrika sowie in Indien und Südostasien verbreitet. Es handelt sich, wie bei den Dioncophyllaceae, um große durchwegs verholzte Lianen. Als Halteorgane werden charakteristische Haken ausgebildet, die einen Sprossabschluss nach einer sympodialen Verzweigung darstellen. Der andere Seitenzweig der Verzweigung übernimmt entweder die Rolle der Sprossachse oder wächst zu einem rosettenförmig beblätterten Kurztrieb aus. Jungpflanzen und Langtriebe tragen wenige wechselständige Blätter (Abb. 8 und Abb. 9)

Für die Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae ist das Auftreten von Naphthylisochinolin-Alkaloiden charakteristisch. Bis heute sind mehr als 90 verschiedene Verbindungen dieser Stoffgruppe identifiziert und in ihrer chemischen Struktur aufgeklärt, davon alleine 18 aus *T. peltatum* (Bringmann *et al.*, 1998; Bringmann und Pokorny, 1995; Rischer, 2002). Sie bestehen aus einem Isochinolin- und einem Naphtalin-Teil, die auf verschiedene Weise miteinander verbunden sein können. Die große Anzahl möglicher Kupplungstypen (Lage der Biarylachse), sowie das Auftreten verschiedener Substituenten an verschiedenen Positionen begründen die strukturelle Vielfalt dieser Stoffgruppe in Vertretern der beiden Familien (Rischer, 2002). Bei einigen Arten wurden dimere Naphthylisochinolin-Alkaloide entdeckt, die Michellamine (Bringmann *et al.*, 1993), für die eine antivirale Wirkung nachgewiesen werden konnte. So wurden aus *Ancistrocladus korupensis* (zunächst mit *A. abbreviatus* verwechselt) Extrakte gewonnen, die eine hohe Anti-HIV-Aktivität zeigten (Manfredi *et al.*, 1991; Boyd *et al.*, 1994). Diese Entdeckung erhöhte die Forschungsanstrengungen an *A. korupensis*, so dass diese Art mittlerweile biologisch und chemisch die am besten untersuchte *Ancistrocladus*-Art darstellt. Die Art kommt mit nur 25 000-125 000 Individuen auf einem ca. 10 000 ha großen Areal in Südwestkamerun mit hoher genetischer Uniformität vor (Forster und Sork, 1997). Ohne Bedrohung der Art ist die Nutzung dieses kleinen Bestandes nur eingeschränkt möglich. Im Fall von *A. korupensis* ist ein pharmazeutischer Einsatz wegen potentiell neurotoxischer Nebenwirkungen fraglich, allerdings sind auch Extrakte anderer Vertreter der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae pharmakologisch bedeutsam. So besitzen die Naphthylisochinolin-Alkaloide neben fungiziden und insektiziden Aktivitäten auch ausgeprägte antiparasitäre Wirkungen, wie unter anderem antileishmaniale *in vitro* (Bringmann *et al.*, 2000) und antiplasmodiale *in vivo* (François, zitiert in Rischer, 2002). Aus diesem Grund werden Vertreter beider Familien in der traditionellen Medizin einiger Länder genutzt, so z. B. Wurzeln von *Ancistrocladus tectorius* gegen Dysenterie und Malaria in Thailand (Ruanrunsi, zitiert in Rischer, 2002). Mit zunehmender Anzahl identifizierter Verbindungen aus beiden Familien erscheint es wahrscheinlich, Verbindungen mit weiteren Bioaktivitäten und geringeren Nebenwirkungen zu finden. Außerdem wird angestrebt Arten, die in einer weiteren Verbreitung und Individuenzahl vorkommen, als beispielsweise *A. korupensis*, einer Nutzung zuzuführen. Dementsprechend werden derzeit zunehmend andere Arten der Ancistrocladaceae intensiv chemisch untersucht. So beschäftigt sich auch die AG

Bringmann der Julius–Maximilian Universität Würzburg schon seit mehreren Jahren mit den Naphthylisochinolin-Alkaloiden des Verwandtschaftskreises der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae.



Abb. 8. *Ancistrocladus tectorius* s. l. A) rankend auf dem Gelände des Botanischen Gartens Ubon Ratchathani (Ostthailand), B) im Khao Chong NP (Südthailand), C) als Jungpflanze (Gelände des Botanischen Gartens Trang, Südthailand). D) Seitentrieb von *A. hamatus* (kult. Botanischer Garten Bogor, Indonesien)



Abb. 9. A) Blütenstand von *Ancistrocladus tectorius* s. l. (kult. Botanischer Garten Bogor, Indonesien, B) Einzelblüte von *A. abbreviatus* (Foto: G. Bringmann), C) Samen von *A. tectorius* s. l. (Botanischer Garten Trang) und D) Hakenast von *A. tectorius* s. l. (Khao Lak, Südthailand).

Für die Ancistrocladaceae sind insgesamt 26 Arten gültig beschrieben, 13 afrikanische und 13 asiatische. Bis heute fehlt jedoch eine umfassende taxonomische Bearbeitung der Familie. Blätter einzelner Individuen können eine erhebliche Variabilität aufweisen, was eine Abgrenzung der Taxa erschwert (van Steenis, 1948). Eine Typifizierung und Zusammenstellung der gültigen Artnamen und Synonyme wurde von Gereau (1997) durchgeführt. Unberücksichtigt blieben bei ihm *A. stelligerus* Wallich ex A. DC. und die nach 1997 beschriebenen Arten *A. tanzaniensis* (Cheek *et al.*, 2000) und *A. grandiflorus* (Cheek, 2000). Eine Revision der afrikanischen Arten mit einem Bestimmungsschlüssel liegt seit kurzem vor (Cheek, 2000). Dieser aktuellen Arbeit zufolge sind 11 Arten in West- und Zentralafrika verbreitet, 2 Arten, *A. robertsonianum* und *A. tanzaniensis*, kommen in den Küstenwäldern Ostafrikas vor (vgl. Abb. 10).

Eine Revision der asiatischen Arten fehlt bisher. Es werden nur 3 Arten als gesichert angenommen, nämlich *A. heyneanus* Wallich ex J. Graham aus Indien, *A. hamatus* (Vahl) Gilg aus Sri Lanka und *A. tectorius* (Loureiro) Merrill aus Südostasien. *A. tectorius* wurde 1790 als erste *Ancistrocladus*-Art Südostasiens beschrieben, später beschriebene Arten wurden unter dieser Bezeichnung in den regionalen Floren synonymisiert (van Steenis, 1948). Demnach sind die meisten der in Südostasien gesammelten *Ancistrocladus*-Belege in den Herbarien als

A. tectorius bestimmt. Für diese Art ergibt sich daher ein Areal, das sich von Borneo, Sumatra über die malaiische Halbinsel bis nach Laos, Nordvietnam und Hainan erstreckt, ungeachtet der sehr unterschiedlichen klimatischen Bedingungen von immerfeuchten Klimaten im Süden bis zu Monsun-Klimaten, mit Trockenzeiten von bis zu 7 Monaten, im Norden (vgl. Abb. 10 links).

Phytochemische Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben ergeben, dass als *A. tectorius* angesehene Aufsammlungen in der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe besonders heterogen waren (zusammengefasst von Rischer 2002). So wurden sehr unterschiedliche Alkaloide für *A. tectorius* aus verschiedenen Aufsammlungen isoliert. Demnach scheint es sich dabei um eine in ihren Inhaltsstoffen sehr variable Art zu handeln. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass *A. tectorius* einen Komplex morphologisch schwer unterscheidbarer Arten darstellt. Auch van Steenis (1948) hält die scheinbare Artenarmut der Ancistrocladaceae in Südostasien für unrealistisch und taxonomisch unzureichend gelöst.

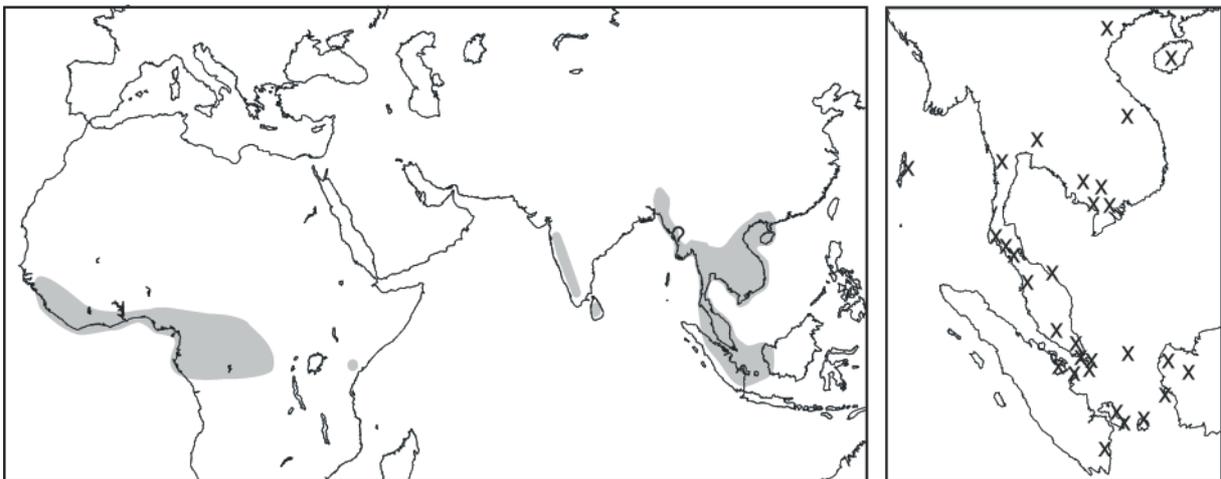


Abb. 10. Rezent Areal der Ancistrocladaceae (schematisiert, links) und von *A. tectorius* basierend auf Fundorten in Südostasien (nach van Steenis, 1948 leicht verändert).

Für die phytochemische Wirkstoffforschung ist die korrekte Artbestimmung und -abgrenzung des Untersuchungsmaterials essentiell, da Ergebnisse sonst nicht reproduziert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, begleitend zu den Arbeiten der AG Bringmann, mit Hilfe molekularer Methoden potentiell unterscheidbare Taxa der Ancistrocladaceae in Südostasien zu charakterisieren und damit die Diversität der Gattung in dieser Region abzuschätzen.

1.5 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die verwandtschaftlichen Beziehungen der carnivoren Taxa und ihre Stellung innerhalb der Unterklasse der Caryophyllidae s. l., unter besonderer Berücksichtigung der Nepenthaceae, Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae, aufzuklären. Mittels Rekonstruktion der Phylogenie verschiedener molekularer Marker sollten die bisher aufgestellten Hypothesen zur Entwicklungsgeschichte und zur Gliederung dieser Taxa überprüft und gegebenenfalls neue Hypothesen aufgestellt werden.

Durch vergleichende Sequenzanalyse ausgewählter Taxa der Caryophyllidae wurden Daten zur Bestimmung der großsystematischen Stellung der carnivoren Taxa innerhalb der Caryophyllidae s. l. ermittelt. Dazu sollte ein verhältnismäßig schnell evolvierender Marker verwendet werden, als Ergänzung zu bereits bestehenden Sequenzierungen konservierter Marker, wie *rbcL*. Außerdem sollte die Verteilung des *rpl2*-Introns genauer untersucht werden. Auf der Basis der Verteilung des Introns wurden Hypothesen der Caryophyllidae s. l. aufgestellt, die von Sequenzanalysen abgeleiteten Hypothesen abweichen.

Bestehende Hypothesen zur Evolution der Nepenthaceae sollten durch vergleichende Sequenzanalysen überprüft werden. Aufgrund der verhältnismäßig geringen Anzahl verwendbarer morphologischer Merkmale der Arten der Gattung *Nepenthes* sind bisher aufgestellte Gliederungskonzepte nur vorläufig. Mittels molekularer Methoden sollte versucht werden, die Berechtigung der einzelnen bisher postulierten Gruppen abzuschätzen und so Anhaltspunkte für eine infragenerische Gliederung der Nepenthaceae zu gewinnen.

Für die Ancistrocladaceae fehlen bisher Vorschläge für ein Gliederungskonzept. Darüber hinaus stellte sich durch phytochemische Studien in dieser Familie heraus, dass auch der Artenbestand der Ancistrocladaceae nur unzureichend erfasst ist. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, neben einer Hypothese zur Phylogenie der Ancistrocladaceae, eine Grundlage für ein Artkonzept unter Anwendung von verschiedenen molekularen Methoden zu erstellen. Dies sollte vor allem für Ancistrocladaceae aus Südostasien durchgeführt werden, wo verschiedene gültig beschriebene Taxa mit *Ancistrocladus tectorius* synonymisiert wurden. Die Untersuchungen sollten begleitend zu phytochemischen Arbeiten der AG Bringmann der Universität Würzburg durchgeführt werden.

Die vergleichenden Analysen zur infrafamiliären Gliederung sollten mit zwei Markern, nach Möglichkeit mit einem plastidären und einem nukleären, durchgeführt werden. Es war daher erforderlich verschiedene Marker im Hinblick auf ihre Eignung für eine Gliederung der Ancistrocladaceae und Nepenthaceae zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchtetes Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial wurde aus verschiedenen Quellen beschafft. Die Proben der Nepenthaceae stammten entweder aus dem Botanischen Garten München oder wurden von Züchtern zur Verfügung gestellt. Bei fast allen Pflanzen konnte sichergestellt werden, dass es sich entweder um Wildaufsammlungen oder um *in vitro* Kulturen, die direkt auf Wildaufsammlungen zurückgeführt werden konnten, handelte (Tab. 1).

Die AG Bringmann untersucht bereits seit längerer Zeit verschiedene Arten der Ancistrocladaceae und hat einige Arten im Botanischen Garten Würzburg in Kultur genommen. Die übrigen Proben der Ancistrocladaceae wurden während fünf Sammelreisen nach Südostasien beschafft, zwei von H. Rischer (Malaysia), eine von C. Bräuchler und zwei vom Autor der vorliegenden Arbeit (Thailand; vgl. Abb. 11). Pflanzenmaterial wurde unter Einhaltung der gesetzlichen Vorschriften ausgeführt. Für die Ausfuhr aus Thailand wurde eine Erlaubnis des Royal Forest Departments erteilt. In Tab. 1 bis Tab. 4 sind alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben aufgeführt. Wenn möglich wurden von den untersuchten Pflanzen Herbarbelege angefertigt. Bei den kultivierten Nepenthaceae war dies nicht immer durchführbar. In diesem Fall ist der Ort der Kultivierung angegeben.

Tab. 1. Aufstellung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzenmaterials der Nepenthaceae. Angegeben sind Artname, Herkunft und Ort der Kultivierung. Belege sind im Herbar Heubl (H) oder Herbarium Wistuba (HV) abgelegt.

Spezies	Quelle und Beleg
<i>Nepenthes adnata</i> Tamin & M. Hotta ex Schlauer	Kelog Sembilan, Sumatra, kult. A. Wistuba, HV-6
<i>Nepenthes alata</i> Blanco	Gunung Perak, Malaysia, kult. Bot. Garten München, H-9
<i>Nepenthes albomarginata</i> T. Lobb ex Lindl.	kult. Bot. Garten München, H-3
<i>Nepenthes ampullaria</i> Jack	Jahore, Malaysia, kult. Bot. Garten München, H-16
<i>Nepenthes ampullaria</i> Jack	Neu Guinea, kult. Bot. Garten Bogor
<i>Nepenthes anamensis</i> Macfarl.	kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes aristolochioides</i> Jebb & Cheek	Sumatra, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes bellii</i> K. Kondo	kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes benstonei</i> C. Clarke	Malaysia, kult. H. Rischer
<i>Nepenthes bicalcarata</i> Hook. f.	kult. Bot. Garten München
<i>Nepenthes bongso</i> Korth.	Gunung Merapi, Sumatra, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes boschiana</i> Korth.	kult. Bot. Garten München, H-15
<i>Nepenthes burbidgeae</i> Hook. f. ex Burb.	kult. Bot. Garten München, H-28
<i>Nepenthes burkei</i> Mast.	kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes clipeata</i> Danser	Gunung Kelam, Borneo, kult. A. Wistuba, HV-26
<i>Nepenthes clipeata</i> Danser	Gunung Kelam, Kalimantan, kult. P. Debbert
<i>Nepenthes danseri</i> Jebb & Cheek	Waigeo, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes densiflora</i> Danser	kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes diatas</i> Jebb & Cheek	Gunung Bandahara, Sumatra, kult. A. Wistuba, HV-27
<i>Nepenthes distillatoria</i> L.	Sri Lanka, kult. Bot. Garten München, H-13
<i>Nepenthes dubia</i> Danser	Gunung Talakmau, Sumatra, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes edwardsiana</i> H. Low ex Hook. f.	Sabah, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes ephippiata</i> Danser	Gunung Rajah, Kalimantan, Borneo, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes eustachya</i> Miq.	Sibolga, Sumatra, kult. A. Wistuba, HV-2
<i>Nepenthes eymae</i> Sh. Kurata	kult. Bot. Garten München, H-12
<i>Nepenthes faizaliana</i> Adam & Wilcock	Gunung Api, Borneo, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes fusca</i> Danser	kult. Bot. Garten München, H-27
<i>Nepenthes glabrata</i> J. R. Turnbull & A.T. Middleton	Sulawesi, kult. A. Wistuba, HV-25
<i>Nepenthes gracilis</i> Korth.	kult. Bot. Garten München, H-22
<i>Nepenthes gracillima</i> Ridl.	kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes gymnamphora</i> Nees	kult. Bot. Garten München
<i>Nepenthes hamata</i> J.R. Turnbull & A.T. Middleton	Gunung Lumut, Sulawesi, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes hirsuta</i> Hook. f.	kult. Bot. Garten München, H-20
<i>Nepenthes inermis</i> Danser	Gunung Talang, Sumatra, kult. P. Debbert
<i>Nepenthes insignis</i> Danser	Tayeve, Irian Jaya, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes insignis</i> Danser	Biak, Irian Jaya, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes khasiana</i> Hook. f.	kult. Bot. Garten München, H-8
<i>Nepenthes lamii</i> Jebb & Cheek	Doormans Top, Irian Jaya, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes lavicola</i> Wistuba & Rischer	Gunung Telong, Sumatra, kult. A. Wistuba, HV-23
<i>Nepenthes longifolia</i> Nerz & Wistuba	Kelog Sembilan, Sumatra, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes lowii</i> Hook. f.	Gunung Trusmadi, Borneo, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes lowii</i> Hook. f.	kult. Bot. Garten Bonn
<i>Nepenthes macfarlanei</i> Hemsl.	Gunung Ulu Kali, Malaysia, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes macrophylla</i> (Marabini) Jebb & Cheek	Gunung Trusmadi, Borneo, kult. A. Wistuba, HV-17
<i>Nepenthes macrovulgaris</i> J. R. Turnbull & A.T. Middleton	Gunung Silam, Sabah, kult. P. Debbert
<i>Nepenthes madagascariensis</i> Poir.	kult. Bot. Garten München, H-17
<i>Nepenthes mapuluensis</i> J.H. Adam & Wilcock	kult. Bot. Garten München
<i>Nepenthes mapuluensis</i> J.H. Adam & Wilcock	East Borneo, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes masoalensis</i> Schmid-Hollinger	Madagaskar, kult. P. Debbert

Fortsetzung Tab. 1

Spezies	Quelle und Beleg
<i>Nepenthes maxima</i> Reinw. ex Nees	kult. Bot. Garten München, H-7
<i>Nepenthes merrilliana</i> Macfarl.	kult. Bot. Garten München
<i>Nepenthes mikei</i> B. Salmon & Maulder	Gunung Bandahara, Sumatra, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes mira</i> Jebb & Cheek	Palawan, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes mirabilis</i> (Lour.) Druce	Sarawak, Kuching, kult. Bot. Garten München, H-24
<i>Nepenthes muluensis</i> M. Hotta	Gunung Mulu, Sarawak, kult. P. Debbert
<i>Nepenthes murudensis</i> Culham ex Jebb & Cheek	Gunung Murud, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes neoguineensis</i> Macfarl.	Angkasa, Irian Jaya, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes northiana</i> Hook.f.	kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes ovata</i> Nerz & Wistuba	Gunung Pangulubao, Sumatra, kult. A. Wistuba, HV-22
<i>Nepenthes pectinata</i> Danser	kult. Bot. Garten München, H-21
<i>Nepenthes pervillei</i> Blume	Seychellen, Mt. Mapolia, kult. Bot. Garten München, H-25
<i>Nepenthes cf. petiolata</i> Danser	kult. Bot. Garten München
<i>Nepenthes pilosa</i> Danser	kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes rafflesiana</i> Jack	kult. Bot. Garten München, H-4
<i>Nepenthes rajah</i> Hook. f.	kult. Bot. Garten Bonn
<i>Nepenthes rajah</i> Hook. f.	kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes reinwardtiana</i> Miq.	kult. Bot. Garten München, H-2
<i>Nepenthes ramispina</i> Ridl.	kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes rhombicaulis</i> Sh. Kurata	kult. Bot. Garten München, H-23
<i>Nepenthes sanguinea</i> Lindl.	Gunung Ulu Kali, Malaysia, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes sibuyanensis</i> Nerz	Sibuyan, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes singalana</i> Becc.	Sumatra, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes spathulata</i> Danser	Sumatra, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes spec. nov. 1</i>	Doormans Top, Irian Jaya, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes spec. nov. 2</i>	East Borneo, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes spec. nov. 3</i>	Neu Guinea, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes spectabilis</i> Danser	kult. Bot. Garten München
<i>Nepenthes stenophylla</i> Mast.	kult. Bot. Garten München, H-5
<i>Nepenthes sumatrana</i> (Miq.) Beck	Sibolga, Sumatra, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes talangensis</i> Nerz & Wistuba	Gunung Talang, Sumatra, kult. A. Wistuba, HV-28
<i>Nepenthes tentaculata</i> Hook. f.	Gunung Trusmadi, Borneo, kult. P. Debbert
<i>Nepenthes thorelii</i> Lecomte	kult. Bot. Garten München, H-10
<i>Nepenthes tobaica</i> Danser	kult. Bot. Garten München, H-18
<i>Nepenthes tomoriana</i> Danser	kult. Bot. Garten München, H-19
<i>Nepenthes treubiana</i> Warb.	Mc Cluers Golf, Sumatra, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes truncata</i> Macfarl.	kult. Bot. Garten München
<i>Nepenthes veitchii</i> Hook. f.	kult. Bot. Garten München, H-11
<i>Nepenthes ventricosa</i> Blanco	kult. Bot. Garten München, H-1
<i>Nepenthes vieillardii</i> Hook. f.	New Caledonia, kult. Bot. Garten München, H-26
<i>Nepenthes villosa</i> Hook. f.	Borneo, kult. A. Wistuba
<i>Nepenthes xiphioides</i> B. Salmon & Maulder	Sumatra, kult. A. Wistuba

Tab. 2. Aufstellung des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzenmaterials von *Ancistrocladus* aus Afrika und Asien denen ein Artnamen zugeordnet werden konnte. Für ISSR-Analysen wurden 5 Individuen von *A. korupensis* und 9 Individuen von *A. congolensis* (coll. Mudogo; kultiviert im Bot. Garten Würzburg) eingesetzt (Sommaro, 2002).

Spezies	Herkunft	Sammler, Beleg*
Afrika		
<i>Ancistrocladus abbreviatus</i> Airy Shaw	Elfenbeinküste	Aké Assi, kult. Bot. Garten Würzburg
<i>Ancistrocladus barteri</i> Scott Elliot	Elfenbeinküste	Aké Assi, HB 7
<i>Ancistrocladus congolensis</i> J. Léonard	Zaire	Nladu, HB 30
<i>Ancistrocladus congolensis</i> J. Léonard M1	Zaire	Mudogo, HB 53
<i>Ancistrocladus congolensis</i> J. Léonard M2	Zaire	Mudogo, HB 54
<i>Ancistrocladus congolensis</i> J. Léonard M3	Zaire	Mudogo, HB 55
<i>Ancistrocladus congolensis</i> J. Léonard M4	Zaire	Mudogo, HB 56
<i>Ancistrocladus ealaensis</i> J. Léonard	Zaire	Babady-Bila, HB 21
<i>Ancistrocladus guineensis</i> Oliver	Nigeria	Alo, HB9
<i>Ancistrocladus korupensis</i> D. W. Thomas & Gereau	Kamerun	Ayafor, HB 40
<i>Ancistrocladus letestui</i> Pellegrin	Zaire	Hangi & Mudogo, HB 45
<i>Ancistrocladus likoko</i> J. Léonard	Zaire	Tentula, HB 16
<i>Ancistrocladus pachyrrhachis</i> Airy Shaw	Sierra Leone	Dumbuya, HB 6
<i>Ancistrocladus robertsoniorum</i> J. Léonard	Kenia	Haller, HB 8
<i>Ancistrocladus spec.</i> Gabun	Gabun	Louis, HB 43
<i>Ancistrocladus spec.</i> Zaire	Zaire	Mudogo, HB 57
<i>Ancistrocladus tanzaniensis</i> Cheek & Frimodt-Moller	Tansania	Mbago, HB42
Asien		
<i>Ancistrocladus heyneanus</i> Wallich ex J. Graham	Indien, Poona	kult. Bot. Garten Würzburg
<i>Ancistrocladus heyneanus</i> Wallich ex J. Graham	Indien, Bombay	kult. Bot. Garten Würzburg
<i>Ancistrocladus hamatus</i> (Vahl) Gilg	Sri Lanka	kult. Bot. Garten Würzburg
<i>Ancistrocladus hamatus</i> (Vahl) Gilg	Sri Lanka	kult. Bot. Garten Bogor
<i>Ancistrocladus hainanensis</i> Hayata	Südchina, Hainan	Bulkmaterial AG Bringmann
<i>Ancistrocladus cochinchinensis</i> Gagnepain	Vietnam, Binh Dinh	Isotypus, Pierre 16, BO
<i>Ancistrocladus attenuatus</i> Dyer	Myanmar, Tenasserim	Isotypus, Helfer s. n., M
<i>Ancistrocladus pinangianus</i> Wallich ex Planchon	Malaysia, Penang	Isotypus, Porter s. n., M
<i>Ancistrocladus stelliger</i> Wallich ex A. DC.	Myanmar, Martaban	Isotypus, Wallich s. n., M

*HB = Herbar Bringmann; M = Herbar der Botanischen Staatssammlung München; BO = Herbar Bogor, Indonesien

Tab. 3. Aufstellung des untersuchten Pflanzenmaterials von *Ancistrocladus* aus Südostasien. Das Pflanzenmaterial wurde im Rahmen mehrerer Sammelreisen beschafft. Individuen aus dem Botanischen Garten Trang und Ubon Ratchathani wachsen wild auf dem Gelände des jeweiligen Botanischen Gartens. P1 ist die Mutterpflanze der Proben Kay1 bis Kay9, P6 der Proben Ben1 bis Ben9 und P3 der Proben P31 bis P35, von denen ISSR-Fingerprints angefertigt wurden (Sommaro, 2002).

Lokalität	Proben-Bezeichnung	Sammler	Datum	Beleg**
Ostthailand/Südlaos				
Khao Yai NP	1051	C. Bräuchler	10.5.01	HM 1051
	1052	C. Bräuchler	10.5.01	HM 1052
	1053	C. Bräuchler	10.5.01	HM 1053
	1054	C. Bräuchler	10.5.01	HM 1054
	1055	C. Bräuchler	10.5.01	HM 1055
	1151	C. Bräuchler	11.5.01	HM 1151
	1152	C. Bräuchler	11.5.01	HM 1152
	P1	H. Rischer	21.3.00	HR P1
Rayong, Khao Chamao NP	1072	V. Chamchumroon	27.6.01	VC 1072
Sakaew, Pangsida NP	1200	V. Chamchumroon	6.01	VC 1200
Khao Kitchakut NP	1098	V. Chamchumroon	28.6.01	VC 1098
	P4	H. Rischer	29.3.00	HR P4
Namtok Philu NP	P2	H. Rischer	26.3.00	HR P2
	1125	V. Chamchumroon	1.7.01	VC 1125
Trat, Namtok Sapanhin	P3	H. Rischer	26.3.01	HR P3
Khao Chang	551	C. Bräuchler	5.5.01	HM 551
	552	C. Bräuchler	5.5.01	HM 552
	553	C. Bräuchler	5.5.01	HM 553
	1155	V. Chamchumroon	6.01	VC 1155
Khong Chiam	1214	H. Meimberg	21.4.01	HM 1214
	2214	H. Meimberg	21.4.01	HM 2214
	3214	H. Meimberg	21.4.01	HM 3214
	4214	H. Meimberg	21.4.01	HM 4214
Ubon Ratchathani	1234	H. Meimberg	23.4.01	HM 1234
	1244	H. Meimberg	24.4.01	HM 1244
	2244	H. Meimberg	24.4.01	HM 2244
	3244	H. Meimberg	24.4.01	HM 3244
	4244	H. Meimberg	24.4.01	HM 4244
Südlaos, Muang Khong	6678	C. Bräuchler	9.6.01	HM 6678
	961	C. Bräuchler	9.6.01	HM 961
	962	C. Bräuchler	9.6.01	HM 962
Südthailand				
Khao Lak NP	<i>A. tectorius</i> KahoLak	H. Rischer	17.3.99	HR LAK
	184	H. Meimberg	8.4.01	HM 184
	584	H. Meimberg	8.4.01	HM 584
	<i>A. griffithii</i>	H. Rischer, H. Meimberg	19.3.99, 6.4.01	HR griffithii

Fortsetzung Tab. 3

Lokalität	Proben- Bezeichnung	Sammler	Datum	Beleg**
Khao Sok NP	KS1	H. Meimberg	22.4.00	HM KS1
	KS2	H. Meimberg	22.4.00, 11.4.01	HM KS2
	KS3	H. Meimberg	22.4.00	HM KS3
	KS4	H. Meimberg	22.4.00	HM KS4
	1114	H. Meimberg	11.4.01	HM 1114
	2114	H. Meimberg	11.4.01	HM 2114
	3114	H. Meimberg	11.4.01	HM 3114
	4114	H. Meimberg	22.4.00, 11.4.01	HM 4114
	5114	H. Meimberg	11.4.01	HM 5114
	6114	H. Meimberg	11.4.01	HM 6114
	7114	H. Meimberg	11.4.01	HM 7114
	8114	H. Meimberg	11.4.01	HM 8114
	9114	H. Meimberg	11.4.01	HM 9114
	1124	H. Meimberg	11.4.01	HM 1124
Klong Prao NP, Surathani	1184	H. Meimberg	18.4.01	HM 1184
	2184	H. Meimberg	18.4.01	HM 2184
	3184	H. Meimberg	18.4.01	HM 3184
	4184	H. Meimberg	18.4.01	HM 4184
	5184	H. Meimberg	18.4.01	HM 5184
	6184	H. Meimberg	18.4.01	HM 6184
	7184	H. Meimberg	18.4.01	HM 7184
Khao Chong NP, Nagong district, Trang	KC1	H. Meimberg,	11.4.00	HM KC1
	KC2	H. Meimberg	11.4.00	HM KC2
	KC3	H. Meimberg	11.4.00	HM KC3
	KC4	H. Meimberg	11.4.00	HM KC4
	KC5	H. Meimberg	11.4.00	HM KC5
	KC6	H. Meimberg	11.4.00	HM KC6
	34	V. Chamchumroon	3.4.01	VC 1052
Trang	Trang	H. Meimberg, V. Chamchumroon	10.4.00	HM Trang ; kult. Bot Garten München
Mu Kho Lanta NP	KL1	H. Meimberg	15.4.00	HM KL1
	KL2	H. Meimberg	15.4.00	HM KL2
Thale Ban NP	36	R. Pooma	3.6.01	R. Pooma et al. Nr. 2010
Ton Puei	16	R. Pooma	1.6.01	R. Pooma et al. Nr. 1938
Malaysia / Indonesien				
Dungun	P7	Hadi		Bulkmaterial AG Bringmann
Jahore	<i>A. tectorius</i> Jahore	H. Rischer	6.3.99	HR tectorius Jahore
Gunung Benom	<i>A. tectorius</i> Benom	H. Rischer	12.3.99	HR tectorius Benom
	P5	H. Rischer	12.4.00	HR P5
	P6	H. Rischer	13.4.00	HR P6
Borneo	<i>A. tectorius</i>	Meijer,		Bulkmaterial AG Bringmann, HB5
Sumatra	<i>A. tectorius</i> Bogor*	H. Meimberg	23.3.99	kult. Bot. Garten Bogor, wahrscheinlich Kulturhybrid

*Bei der aus dem Botanischen Garten Bogor stammenden Pflanze, handelt es sich nach Angaben des Gartenpersonals um eine Aufsammlung aus Südsumatra. Durch die Sequenzanalysen konnte festgestellt werden, dass es sich aber eventuell um einen Kulturhybrid handelt (vgl. Kapitel 3.7.1). Diese Herkunft wurde daher aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

** HB = Herbar Bringmann; HR = Herbar Rischer; HM = Herbar Meimberg; VC = Herbar Chamchumroon; MSB = Herbar Institut für Systematische Botanik, München.

Tab. 4. Aufstellung des Pflanzenmaterials von nicht zu den Nepenthaceae oder Ancistrocladaceae gehörenden Arten, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Belege sind im Herbar Heubl (H) abgelegt.

Familie	Spezies	Quelle und Beleg
Buxaceae	<i>Buxus sempervirens</i>	kult. Bot.Garten München
	<i>Pachysandra spec.</i>	kult. Bot.Garten München
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium bonus-henricus</i> L.	kult. Bot.Garten München; H-31
Amaranthaceae	<i>Amaranthus paniculatus</i> L.	kult. Bot.Garten München; H-32
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea spec.</i>	kult. Bot.Garten München; H-33
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L.	kult. Bot.Garten München; H-34
Simmondsiaceae	<i>Simmondsia chinensis</i> (Link) Schneid.	kult. Bot.Garten München; H-35
Frankeniaceae	<i>Frankenia laevis</i> L.	Italien, Sardinien; H-2215
Tamaricaceae	<i>Tamarix gallica</i> L.	Italien, Sardinien; H-2216
Polygonaceae	<i>Polygonum alpinum</i> All.	kult. Bot.Garten München; H-36
	<i>Polygonum bistorta</i> L.	kult. Bot.Garten München; H-37
	<i>Rheum spec.</i>	kult. Bot. Garten München; H-38
Plumbaginaceae	<i>Plumbago indica</i> L.	kult. Bot.Garten München; H-39
	<i>Goniolimon tataricum</i> (L.) Boiss.	kult. Bot.Garten München; H-40
	<i>Armeria gaditana</i> Boiss.	kult. Bot.Garten München; H-41
	<i>Limonium narbonense</i> Miller	kult. M. Erben, München
	<i>Limonium oblanceolatum</i> Brullo & Erben	kult. M. Erben, München
	<i>Limonium mourettii</i> (Pitard) Maire	kult. M. Erben, München
	<i>Limonium rumicifolium</i> (Svent.) Kunkel & Sunding	kult. M. Erben, München
Droseraceae	<i>Drosera aliciae</i> Hamet	kult. Bot.Garten München; H-42
	<i>Drosera regia</i> Stephens	kult. Bot.Garten München; H-43
	<i>Drosera capillaris</i> Poir.	kult. Bot.Garten München; H-44
	<i>Dionaea muscipula</i> Ellis	kult. Bot.Garten München; H-45
	<i>Aldrovanda vesiculosa</i> L.	kult. Bot.Garten München
Drosophyllaceae	<i>Drosophyllum lusitanicum</i> (L.) Link	kult. Bot. Garten München; H-46
Dioncophyllaceae	<i>Dioncophyllum tholloni</i> Baillon	Bringmann, Würzburg, HB-1
	<i>Habropetalum dawei</i> (Hutch. & Dal.) Airy Shaw	Bringmann, Würzburg, HB-22
	<i>Triphyophyllum peltatum</i> Airy Shaw	kult. Bot. Garten Bonn
	<i>Triphyophyllum peltatum</i> Airy Shaw	kult. Bot. Garten Würzburg

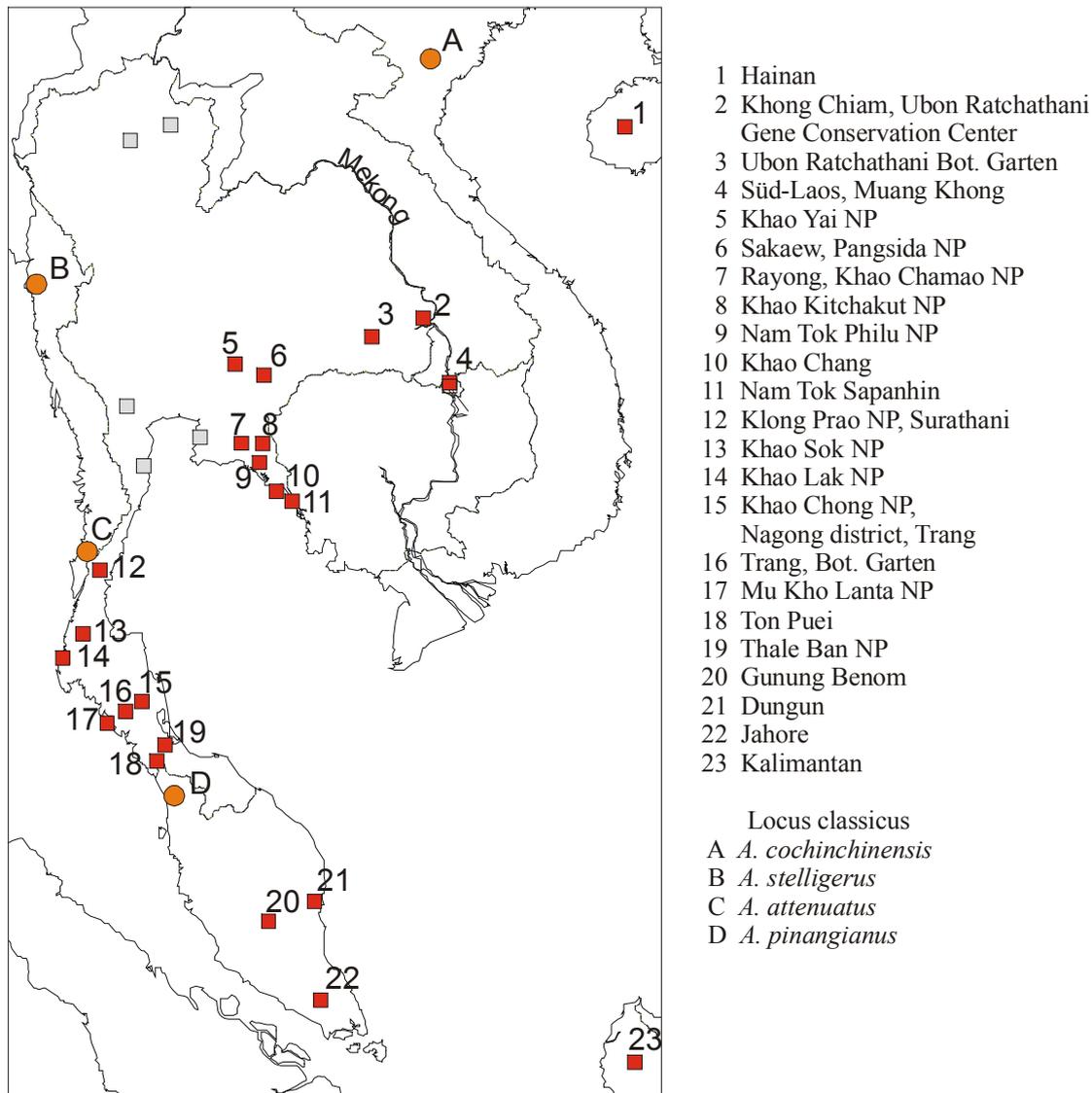


Abb. 11. Herkunft der Aufsammlungen von *Ancistrocladus* aus Südostasien. An den einzelnen Fundorten wurden zwischen 1 und 14 Proben gesammelt. Graue Markierung zeigt die besuchten Lokalitäten an denen keine *Ancistrocladus* angetroffen wurden. Kreise und Großbuchstaben bezeichnen den Locus classicus der Isotypus-Belege die in die Untersuchung aufgenommen wurden.

2.2 Isolierung von Gesamt-DNA

Gesamt-DNA wurde nach verschiedenen Protokollen isoliert, die auf der CTAB-Methode nach Doyle und Doyle (1987) beruhen. CTAB kann Polysaccharide fällen, denaturiert Proteine und bewirkt die Lyse von Membranen, so daß die DNA freigesetzt wird. Durch das im Puffer enthaltene EDTA werden, zweiwertige Kationen gebunden und damit die Aktivität der endogenen Nukleasen gesenkt. Zu Beginn der Arbeit wurde die CTAB-Isolierung in 10 ml Volumen durchgeführt nach Aufschluss des Pflanzenmaterials durch Mörsern unter flüssigem

Stickstoff, wie im Originalprotokoll vorgesehen. Es stellte sich heraus, dass das Einführen eines Phenolisierungsschrittes, vor der für die Entfernung des CTAB essentiellen Chloroformextraktion, für die Nepenthaceae die PCR-Ausbeute erhöht. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Methode an ein kleineres Volumen angepasst, indem das Pflanzenmaterial in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit Hilfe von Mikropistillen in CTAB-Puffer aufgeschlossen wurde. Dies erlaubte, wegen der damit verbundenen Zeitersparnis, einen größeren Probenumsatz und verringerte die Menge an einzusetzendem Phenol erheblich. Die DNA wurde zwar in höherem Ausmaß gesichert, was bei einem Einsatz der DNA als Template für Amplifikationen allerdings keine Rolle spielte. Ein Aufschluss unter flüssigem Stickstoff wurde nur bei Anwendungen, die sensitiv für die Größe isolierter Fragmente waren, wie z. B. Ligationen nach Restriktionsenzym-Verdau, durchgeführt. Bei der DNA-Isolierung wurde zur Vermeidung von Kontaminationen mit Filterpipettenspitzen gearbeitet. Für alle Zentrifugationen wurde eine Hettich-Kühlzentrifuge (EBA 12 R mit 92 mm Radius und Fest-Winkelrotor 24-fach, Tuttlingen) verwendet.

2.2.1 CTAB-Isolierung nach Doyle und Doyle (1987)

Für die DNA-Isolierung wurde frisches, in CTAB-Isolierungslösung fixiertes oder getrocknetes Blattmaterial eingesetzt. Gesamt-DNA-Isolierung nach Doyle und Doyle (1987) wurde wie folgt durchgeführt. Zwischen 50 mg und 300 mg Blattmaterial wurden in 500 µl CTAB-Isolationslösung in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mittels Mikropistillen homogenisiert. Die Mikropistille wurden dazu in fixierten Rührern eingespannt und mit niedriger Geschwindigkeit gedreht. Als Oxidationsschutz wurde 1 µl Mercaptoethanol zugegeben und die Suspension unter mehrmaligem Umschwenken 1 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 500 µl Phenol-Chloroform (Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol, 25:24:1 v/v) zugegeben, vorsichtig geschüttelt und 10 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die wässrigen Überstände wurden von der organischen Phase getrennt und in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, ohne dass Bestandteile der organischen Phase verschleppt wurden. Zur Entfernung von möglichen Phenolresten wurden die wässrigen Überstände mit 500 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1 v/v) versetzt, 10 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert und die wässrigen Phasen in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und diese Chloroformextraktion gegebenenfalls wiederholt. Das nachfolgende Reaktionen störende Phenol konnte dadurch immer vollständig abgetrennt werden.

Der Überstand wurde mit 2 µl RNase A (1 mg/ml) versehen und unter mehrmaligem Schwenken 1 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Hieraus wurde die DNA durch Zugabe von 250 µl (bzw. 0,5 Vol) eisgekühltem 100% Isopropanol gefällt, entweder 2,5 h oder über Nacht bei 4°C. Bei Fällung über Nacht steigt zwar potentiell der Anteil an Salzen, die aus der Lösung mitgefällt wurden, die Ausbeute ließ sich dadurch aber erhöhen. Die ausgefällte DNA

wurde 15 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert, die Überstände verworfen und das Sediment zur Entsalzung mit 500 µl eisgekühltem 70-76% Ethanol versetzt. Nach Aufschütteln des Sediments wurde 15 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die DNA bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde danach in 50 µl 1x TE-Puffer pH 8,0 resuspendiert. Da in einigen Fällen, vor allem bei Isolierungen aus herbarisiertem Material mit geringen Ausbeuten, eine größere Menge der DNA-Lösung bei der Amplifikation eingesetzt werden musste und dann das im TE-Puffer enthaltene EDTA stören konnte, wurde die DNA alternativ dazu in 5-10 mM Tris-Puffer pH 7,5 oder Wasser resuspendiert und das Volumen bis auf 20 µl verringert. Die oben beschriebene Methode erlaubte die Isolierung PCR-fähiger DNA der meisten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Taxa. Allerdings waren die Ausbeuten der PCR teilweise gering.

2.2.2 DNA-Isolierung mit Nucleospin-Plant-Kit

Im Rahmen eines anderen in der Arbeitsgruppe durchgeführten Projektes (eigene Daten), bei dem DNA von an ätherischen Ölen reichen Heilpflanzen isoliert wurde, konnte mit der CTAB-Methode nach Doyle und Doyle (1987) in nur wenigen Fällen PCR-fähige DNA gewonnen werden. Daher wurden hier handelsübliche Isolierungskits eingesetzt, die durch Bindung der DNA an eine Silika-Membran einen besseren Reinigungsgrad der DNA erlauben. Es wurden der *DNeasy Plant Mini Kit* der Firma Qiagen und der *Nucleospin Plant Kit* der Firma Machery-Nagel verwendet. Letzterer war bei einer größeren Anzahl von Taxa erfolgreich einsetzbar und preisgünstiger, der *DNeasy Plant Mini Kit* kam nicht mehr zum Einsatz. Wegen der guten Ergebnisse wurde der *Nucleospin Plant Kit* für alle danach durchgeführten Isolierungen verwendet. Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Taxa musste das Protokoll allerdings in einigen Punkten abgeändert werden, da sonst keine PCR-fähige DNA isoliert werden konnte.

Die DNA-Isolierung mit dem *Nucleospin Plant Kit* wurde in folgender Weise durchgeführt:

100-150 mg Pflanzenmaterial wurden entweder in 400 µl C1 Puffer in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit einem Mikropistill homogenisiert oder unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und als Pulver zur entsprechenden Menge an C1 Puffer zugegeben. Der Puffer C1 enthält Guanidinium-hydrochlorid, CTAB und Detergentien. Er wirkt damit als Lysispuffer, der Proteine denaturiert, Membranen lysiert sowie Polysaccharide und andere Kontaminanten entfernt. Die Suspension wurde nach Zugabe von 10 µl RNase A (0,01 mg/µl) 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert und anschließend 5 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert. In Abweichung vom Protokoll des Kits wurde der Überstand mit 500 µl Phenol-Chloroform versetzt, vorsichtig bis zur vollständigen Vermischung geschüttelt, 5 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert und dieser Schritt mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol wiederholt. Dieser Phenolisierungsschritt erwies sich als essentiell für die Isolierung von DNA bei den

Nepenthaceae. Trotz mehrerer Versuche konnte ohne ihn keine PCR-fähige DNA aus diesen Proben gewonnen werden. Dieser Schritt wurde daher für alle Proben routinemäßig eingeführt.

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und, zur Vorbereiten der Bindung der DNA an die Silika-Membran, mit 400 µl C4-Puffer und 300 µl Ethanol versetzt und geschwenkt. Die *Nucleospin Plant*-Säulen wurden auf 2 ml Eppendorfgefäße gesetzt, schrittweise mit den Proben beladen und 1 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die abzentrifugierte Lösung wurde jeweils verworfen. Die jetzt an die Membran gebundene DNA wurde anschließend in mehreren Schritten gewaschen. Im ersten Schritt wurden 400 µl CW-Puffer zugegeben, im zweiten Schritt 700 µl C5-Puffer. Es wurde jeweils 1 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert und die abzentrifugierte Lösung verworfen. Der zweite Schritt wurde gegebenenfalls wiederholt, vor allem bei Proben, aus denen bei einer ersten Isolierung keine PCR-fähige DNA erhalten werden konnte. Anschließend wurden 200 µl C5-Puffer auf die Säule gegeben und 2-5 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert, um das im C5-Puffer enthaltene Ethanol restlos zu entfernen.

Die Säulen wurden auf neue Eppendorfgefäße gesetzt und zur Elution 10-50 µl Tris-Puffer 5 mM pH 8,0 oder CE-Puffer auf die Mitte der Membran gegeben und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur oder bei 1 min 65°C mit 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Das Elutionsvolumen von 100 µl des Protokolls wurde auf 10-50 µl verringert und damit eine höhere DNA Konzentration erhalten. Bei Proben, die nur geringe Ausbeuten an Amplifikat erbrachten, erwies sich eine erste Elution ohne Inkubation und eine Nachelution mit Inkubation als vorteilhaft. Die DNA-Konzentration in der zweiten Elution war zwar niedriger, erbrachte in einigen Fällen erheblich bessere Amplifikationsergebnisse.

Die DNA-Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt und als Grundlage für nachfolgende Reaktionen verwendet. Durch die erwähnten Modifikationen gelang es von dem unterschiedlich konservierten Pflanzenmaterial aller Taxa, zumindest nach mehreren Versuchen, PCR-fähige DNA zu isolieren.

2.2.3 Isolierung von DNA aus altem Herbarmaterial

Von vier Isotypus-Belegen der Ancistrocladaceae wurde DNA isoliert. Das Probenmaterial dieser Belege war über 100 Jahre alt und überdies zu Konservierungszwecken mit Quecksilber behandelt. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Fremd-DNA wurden alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien ungeöffneten Packungen entnommen und neue, ungebrauchte Mörser und Pistille verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden unter der Steril-Bank durchgeführt, in einem Labor, in dem sonst nicht mit *Ancistrocladus* gearbeitet wurde.

Die Isolierung von DNA aus diesen Proben wurde basierend auf dem *Nucleospin Plant Kit* der Firma Machery-Nagel in folgender Weise durchgeführt: ca. 1 qcm Blattmaterial wurde 4 mal kurz mit 1% SDS Lösung und anschließend mit Wasser gespült und trocken getupft. Damit sollte die Menge an möglicherweise an den Blättern haftendem Quecksilber verringert werden. Das trockene Blattmaterial wurde mit Pistill und Mörser mechanisch pulverisiert und anschließend 500 ml C1-Puffer dazu gegeben. Durch weiteres Mörsern wurde die pulverisierte Probe mit dem Puffer vermischt und anschließend mit einer Pipette in ein 2 ml Eppendorfgefäß verbracht. Der Mörser wurde 2-3 mal mit C1-Puffer gespült, bis die Probe quantitativ in das Eppendorfgefäß überführt war. Die Suspension wurde 60 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert und anschließend 5 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit einem Volumen C4-Puffer und $\frac{3}{4}$ Volumen Ethanol versetzt, vermischt und in Einheiten von je 700 μ l auf die, die Silika-Membran enthaltenden Säulen, gegeben und abzentrifugiert, bis die gesamte Lösung über die Säule gelaufen war. Anschließend wurde mit 400 μ l CW-Puffer und dreimal mit 700 μ l C5-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Ethanol Reste auf der Membran durch 5 min Zentrifugation bei 10000 g entfernt. Eluiert wurde mit 50 μ l Wasser, welches in das Zentrum der Membran pipetiert wurde. Der pH-Wert des Wassers wurde davor überprüft und gegebenenfalls mit 10 mM Tris auf einen pH von etwas über 7 eingestellt. Vor der Zentrifugation wurden die Säulen in den Auffanggefäßen 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert und die DNA-Lösung anschließend durch Zentrifugation wie oben gesammelt. Zur Minimierung eines möglicherweise vorhandenen Quecksilbergehaltes der Lösung wurde sie mit *MicroSpinTM S-400 HR-Columns* der Fa. Amersham Pharmacia entsalzt. Dazu wurde die in den Columns enthaltene Sephacryl-Matrix durch kurzes vortexen resuspendiert, die Columns bei 740 g 1 min zentrifugiert und zum Austausch des in den Columns enthaltenen TE-Puffers viermal Wasser auf die Columns gegeben und bei 740 g abzentrifugiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung auf die Mitte der Matrix gegeben, 2 min stehen gelassen, anschließend 2 min bei 740 g zentrifugiert und die entsalzte DNA-Lösung gesammelt. Die so gewonnene DNA wurde zur Amplifikation eingesetzt. Die hier beschriebene Methode wurde nach mehrmaligen Versuchen unter Änderung verschiedener Parameter entwickelt. Dabei musste eine genaue Untersuchung der optimalen Bedingungen unterbleiben, da möglichst wenig von dem untersuchten Material verwendet werden sollte. Die hier beschriebene Methode stellt damit die Prozedur dar, mit der erstmals auswertbare Sequenzen erhalten wurden.

2.3 Amplifikation

Spezifische DNA Abschnitte wurden mit Hilfe der *Polymerase Chain Reaktion*, PCR, amplifiziert. Die Methode ist beschrieben bei Innis *et al.* (1990) und wurde nach den dort aufgeführten Protokollen mit verschiedenen Modifikationen durchgeführt. Bei allen Arbeitsschritten wurde wie bei der DNA-Isolierung mit Filterpipettenspitzen gearbeitet, um Kontaminatio-

nen zu vermeiden. In der vorliegenden Arbeit wurde in der Regel ein PCR-Ansatz verwendet, der 125 μM jedes dNTP, 0,25-0,5 μM jedes als Primer verwendeten Oligonukleotids und 2-4 U Taq-Polymerase pro 100 μl Reaktionsansatz in PCR-Puffer enthielt. Als Template wurde, mit wenigen Ausnahmen, meist zwischen 0,1 und 2 μl aus der jeweiligen DNA-Isolierung eingesetzt, abhängig von deren Qualität und Ausbeute. Dabei wurde in jedem Fall versucht, möglichst wenig DNA-Lösung zu verwenden, um die Menge an störenden Kontaminanten im Reaktionsansatz niedrig zu halten. In der Regel wurden 0,5 μl DNA-Lösung eingesetzt, was bei Isolierungen aus Frischmaterial bei typischen Ausbeuten einer DNA-Menge von 10-50 ng entsprach.

Sollte das Produkt für eine Sequenzierung oder andere Anwendungen aufgereinigt werden, wurde die Amplifikation in 100 μl Volumen durchgeführt, sonst in 50 μl . Da mit dem Volumen die Zeit, die benötigt wird, um die Temperatur der Lösung mit der des Heizblocks anzugleichen, zunimmt, wurde kein Ansatz mit mehr als 100 μl verwendet. Falls mehr Produkt benötigt wurde, wie für die Sequenzierung mit dem Direct-Blotter, wurden mehrere parallele Reaktionen mit je 100 μl Reaktionsvolumen angesetzt.

Ein typischer Reaktionsansatz für eine PCR mit 100 μl enthielt 10 μl 10x Reaktionspuffer, 5 μl dNTP-Lösung (2,5 mM für jedes Nukleotid in Wasser), 2 μl Taq-Polymerase (1U/ μl), 0,25-0,5 μl jedes Primers (100 pmol/ μl) und 0,5 μl DNA-Lösung. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 100 μl aufgefüllt. Alle Reagenzien wurden in der Regel in einem Mastermix zusammengefasst, nur die DNA wurde in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Taq-Polymerase wurde immer als letztes zum Mastermix zugegeben, vermischt und der Reaktionsansatz auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Sofort danach wurden die Gefäße in den auf 94°C vorgeheizten Heizblock gestellt, der Deckel geschlossen und das Temperaturprofil gestartet. Bis dahin wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt, um unspezifische Reaktionen im Ansatz zu verhindern. Mit dieser Prozedur konnten bei den Standardanwendungen für die Sequenzierung gute Ergebnisse erzielt werden. Bei für unspezifische Reaktionen anfälligen Anwendungen, bei vermutetem Mismatch von Primern oder bei unzulänglicher Template-Qualität wie aus der DNA-Isolierung aus alten Herbarbelegen, wurde ein Hotstart durchgeführt, bei dem die Taq-Polymerase erst im auf 94°C geheizten Block den Reaktionsgefäßen zugegeben wurde. Im Einzelfall wurde auch Hotstart-Taq der Fa. Qiagen verwendet, die erst durch Inkubation bei 94°C aktiviert wird. Bei den meisten Anwendungen war dies aber nicht nötig.

Das Temperaturprofil für die Amplifikation wurde in folgender Weise durchgeführt: Die Reaktion wurde immer mit Inkubation 1,5 min bei 94°C gestartet. Die Zyklen begannen dann mit dem Denaturierungsschritt, der für erwartete Produkte <1000 bp auf 30 sec, für Produkte >1000 bp auf 1 min, bei 94°C gesetzt wurde, so dass sich insgesamt ein initialer Denaturierungsschritt von 2-2,5 min ergab. Das Primer-Annealing wurde bei Produkten <1000 bp mit

einer Dauer von 30 sec und bei Produkten >1000 bp von 1 min durchgeführt, bei der jeweils niedrigeren der Schmelztemperaturen (T_m) der beiden Primer. Dabei wurden, wenn möglich, Oligonukleotide mit ähnlicher T_m in einer Amplifikation eingesetzt. Als Annealing-Temperatur wurde die nach der Berechnungen der die Primer liefernden Firmen (meist Fa. MWG) verwendet. Diese Temperatur war im Falle der Fa. MWG ungefähr 5°C niedriger als die sich nach der $2(A+T)+4(G+C)$ -Regel ergebende T_m . Zur Erhöhung der Stringenz einer Amplifikation wurde die Temperatur auf bis zu 5°C über die nach dieser Regel bestimmten T_m erhöht. Die Elongation wurde immer bei 72°C mit 30 sec Dauer pro 500 bp des zu erwarteten Produkts durchgeführt. Der Zyklus wurde zwischen 30 und 40 mal wiederholt, wobei zur Herstellung von PCR-Produkten für die Sequenzierung bei gut etablierten Amplifikationen 40 Zyklen verwendet, ansonsten zur Begrenzung der Menge unspezifischer Produkte 30 oder 35 Zyklen. Nach Abschluss der Zyklen wurde ein terminaler Elongationsschritt bei 72°C von 5 min für Produkte <2000 bp und 10 min bei Produkten >2000 bp durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit werden Temperaturprofile, wie z. B. bei einer Amplifikation eines Produkts von 1500 bp, einer Annealing-Temperatur von 55°C und 40 Zyklen nach dem Muster 94/1,5 (94/1 55/1 72/1,5)x40 72/5 (Temperatur / Dauer in Minuten) angegeben.

Zur Amplifikation wurden routinemäßig die Thermocycler Primus 25 und Primus 96 der Fa. MWG mit beheizbarem Deckel verwendet. Dieser wurde während der Reaktion auf 110°C geheizt, um Verdunstung von Reaktionsansatz und seiner Kondensation am Deckel des Reaktionsgefäßes zu verhindern. Hotstart Anwendungen wurden nur im Primus 25 durchgeführt, da der Primus 96, ein Gerät neueren Herstelungsdatums, keine eigene Stromversorgung für den Heizdeckel besitzt, der damit während des Pipettierens auskühlte. Der Heizblock hielt dann die Temperatur auf 94°C bis der Heizdeckel seine Betriebstemperatur wieder erreichte. Es konnte dadurch zu sehr langen Inkubationen der Ansätze bei 94°C kommen. Diese Maschine war daher für Hotstart Anwendungen, wie sie hier durchgeführt wurden, ungeeignet, wenn nicht mit sehr wenigen Proben gearbeitet wurde.

Bei verschiedenen Anwendungen wurden Amplifikate einer PCR als Template in einer weiteren PCR (als Re-PCR) eingesetzt. Dafür wurde als DNA-Lösung 0,5-1 µl des Amplifikats unverdünnt oder, bei Entstehen von unspezifischen Produkten, auf bis zu 1/100 verdünnt verwendet. Re-PCR wurde immer mit *nested* Primern durchgeführt also Primern, deren Bindungsstellen innerhalb der Bindungsstellen der Primer der ersten PCR lagen. Die Bindungsstellen waren mindestens 3 Basen in 3'-Richtung verschoben. Re-PCR wurde nicht zur Erhöhung der Menge an Amplifikat einzelner Taxa angewendet, um eine Sequenzierung durchführen zu können. Die Möglichkeit Kontaminationen zu amplifizieren, vor allem, wenn die Bindungsstelle eines Primers bei einem Taxon gegenüber den anderen mutiert ist, steigt bei Durchführung einer Re-PCR stark an. Notfalls wurden die Bedingungen für die Amplifikation oder die Primersequenzen optimiert, so dass die Sequenzierung aus der ersten PCR gelang.

Zur Amplifikation von DNA aus Herbarbelegen wurde bei schlechter Ausbeute der PCR auch die *Titanium Taq* (Fa. Clontech) eingesetzt, unter gleichen Bedingungen wie oben, aber mit nicht mehr als 0,1 μM jedes Primers im Reaktionsansatz. Die Ausbeuten ließen sich dadurch stark erhöhen, wenn auch der Anteil unspezifischer Produkte in vielen Fällen höher war.

2.3.1 Inverse PCR

Inverse PCR bezeichnet eine Strategie zur Identifikation der flankierenden Sequenzen einer bekannten Sequenz. Hierbei wird die Gesamt-DNA einem Restriktionsenzym-Verdau unterworfen und die Restriktionsfragmente ligiert, so dass sie nach der Ligation ringförmig vorliegen. Dann kann mit Primern, die am Ende der bekannten Sequenz lokalisiert sind, das zwischen den Primern liegende Stück des Restriktionsfragmentes amplifiziert werden. Durch eine Primerwalking-Strategie bei Verwendung eines geeigneten Satzes von Restriktionsenzymen kann so prinzipiell ein unbegrenzt großer Abschnitt der flankierenden Sequenz ermittelt werden (vgl. Abb. 12)

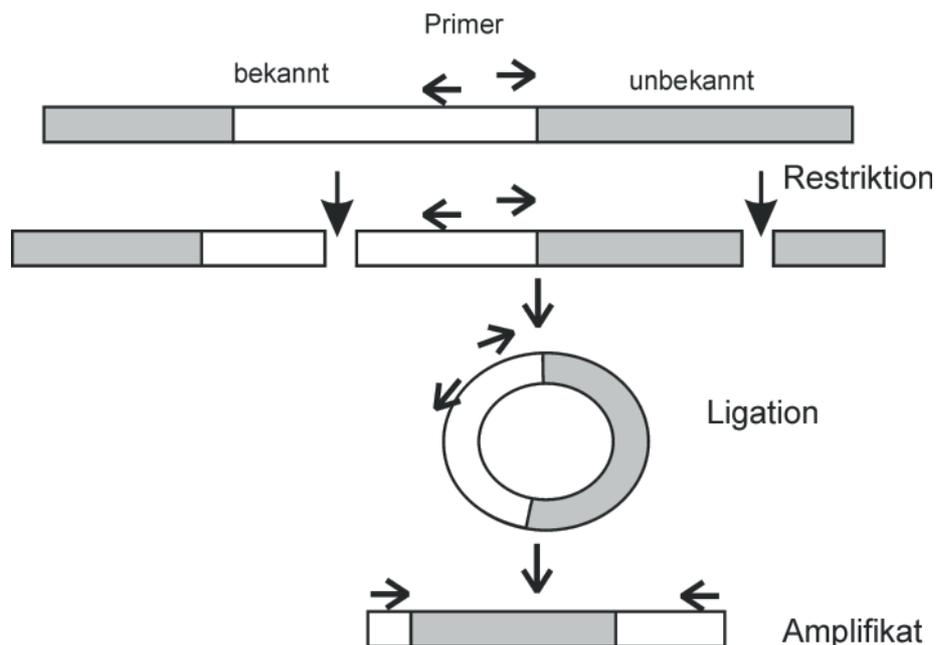


Abb. 12. Prinzip der inversen PCR. Nach Restriktion und Ligation lassen sich Abschnitte amplifizieren, bei denen der unbekannte Abschnitt eines Restriktionsfragmentes von bekannten Abschnitten flankiert wird. Die unbekanntem Abschnitte lassen sich so sequenzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde Gesamt-DNA von *Nepenthes bicalcarata* für Versuche mit inverser PCR eingesetzt. Die DNA wurde mit dem *Nucleospin Plant Kit* (Fa. Machery-Nagel) isoliert, mit einem zusätzlichen Phenolisierungsschritt und nach vorsichtigem Aufschluss unter flüssigem Stickstoff. Die isolierte DNA wurde einem Verdau mit verschiedenen

Restriktionsenzymen (Ergebnisse wurden mit AclI, BclI, Bsh1365I, BstYI und DraI erhalten) unterworfen. Der Verdau wurde mit 30 µl DNA-Lösung und 10 oder 20 U der entsprechenden Enzyme in 50 µl Volumen über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Inkubationstemperatur durchgeführt. Anschließend wurden die Enzyme hitzeinaktiviert und der Verdauansatz in 1 ml Volumen mit 9 U T4-Ligase über Nacht bei 4°C inkubiert. Die DNA des Ligationsansatzes wurde anschließend mit 2,5 ml Ethanol und 100 µl NaAc (3M, pH 7,5) gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet und die DNA in 20 µl Wasser aufgenommen. Davon wurden 2 µl in einer ersten PCR mit 50 µl Volumen eingesetzt und aus der ersten PCR 1 µl in einer Re-PCR, in 2 mal 100 µl, eingesetzt. Wegen der unbekanntem Länge eines zu erwarteten Produkts wurde bei beiden PCR Runden ein Elongationsschritt von 4 min durchgeführt nach folgendem Temperaturprofil 94/1,5 (94/1 X/1 72/4)x35 72/10, mit einer den jeweiligen Primern entsprechenden Annealing-Temperatur. Produkte aus der zweiten PCR wurden sequenziert.

2.3.2 ISSR-PCR

Inter Single Sequence Repeat-PCR (ISSR-PCR) wurde als Methode zur Bestimmung der genetischen Distanz und als phylogenetischer Marker für die Ancistrocladaceae eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine Fingerprint-Analyse, bei der, wie bei RAPD- und AFLP-Analysen, Längenpolymorphismen detektiert werden. Diese können als phylogenetische Marker dienen (Nagaoka und Ogihara, 1997). Das Prinzip der ISSR-PCR beruht auf der Amplifikation der zwischen zwei Mikrosatelliten liegenden Bereiche (SSR, Single Sequence Repeats, Abschnitte von Sequenzwiederholungen von 2-4 Basen langen Motiven, vgl. Hamada *et al.*, 1982). Dazu wird ein Gemisch von Primern hergestellt, die einen zu einer häufigen Mikrosatelliten Sequenz komplementären Abschnitt enthalten, und einen Abschnitt der nur Basen enthält die nicht in der Mikrosatelliten-Sequenz enthalten sind (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Der als Gemisch vorliegende Primer wird dadurch im Mikrosatelliten „geankert“. Das heißt, befindet sich der dem Mikrosatelliten nicht komplementäre Abschnitt auf der 5'-Seite des Primers (5'-geankert), beginnt die Elongation an der durch die Länge des Primers vorgegebenen Position im Mikrosatelliten. Befindet er sich an der 3'-Seite des Primers (3'-geankert) beginnt die Elongation am 5'-Ende der Mikrosatelliten-Sequenz. Durch Einsatz eines Primergemisches lässt sich ein Abschnitt zwischen zwei Mikrosatelliten gleicher Sequenz aber unterschiedlicher Orientierung amplifizieren. Der Anker eines 5'-geankerten Primers besteht in der Regel aus drei Basen, der eines 3'-geankerten aus ein bis zwei Basen. Bei letzterem wird kein Gemisch von Primern mit allen möglichen Kombinationen von nicht der Mikrosatelliten-Sequenz komplementärer Basen hergestellt, sondern nur ein bis zwei Basen einer Sequenz angehängt, die dann als selektive Basen wirken (vgl. Abb. 13). Das Amplifikat wird auf ein Agarose-Gel aufgetragen und das Bandenmuster in einer 0/1-Matrix kodiert, die die Grundlage für eine phylogenetische Analyse bildet.

Phase) und 600 µl 80 % Percoll (untere Phase), beide in Homogenisations-Puffer, aufgetragen. Nach Zentrifugation in einem Ausschwing Rotor (HB4, Sorvall) 10 min bei 4500 g und 4°C, wurde die Chloroplasten enthaltende Schicht oberhalb der 80 % Percoll-Grenze in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml Homogenisations-Puffer überführt und für 1 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal durch Resuspension in Homogenisations-Puffer und Zentrifugation wie oben gewaschen, um alle Percollreste zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet anfangs in ca. 10 µl resuspendiert und direkt auf eine PEN-Membran (Poly-Ethylen-Naphthalat, P.A.L.M. GmbH Bernried, Deutschland) aufgebracht, die mit ihren Rändern mit klarem Nagellack auf einem Objektträger befestigt war. Es erwies sich für eine klare Separierung von Chloroplasten als notwendig, das Pellet vor seinem Auftrag auf die Membran in 200 µl Homogenisations-Puffer zu resuspendieren. Die Probe wurde mit einer Pipettenspitze gleichmäßig über die Membran verteilt und einige Minuten bei 37°C getrocknet.

2.4.2 Separierung von Chloroplasten durch Laser Pressure Catapulting (LPC)

Zur Separierung von Chloroplasten aus der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Präparation wurde ein UV-Laser-Microbeam-System (ROBOT-Microbeam, P.A.L.M. GmbH Bernried, Germany) verwendet, wie in Schütze und Clement-Sengewald (1994) beschrieben. Das System besteht aus einem 337 nm Nitrogen-Laser, der in den Lichtweg eines inversen Mikroskops integriert ist und durch ein Öl-Immersion Objektiv (100x) mit hoher numerischer Apertur fokussiert wird, um eine Punktgröße von weniger als 1 µm Durchmesser zu erreichen (Schütze *et al.*, 1997). Die Positionierung des Objektträgers ist computergesteuert, das mikroskopische Bild wird über eine Videocamera im Computer gespeichert und auf einem Bildschirm angezeigt. So kann die Position des Laserstrahls während der Dissection kontrolliert werden. Durch LMM wurde die Region um einen auf dem Bildschirm erkennbaren Chloroplasten mit dem Laser bei 0,5-0,6 µJ pro Impuls so geschnitten, dass eine den Chloroplasten enthaltende Membran-Insel vollständig separiert war. Von Chloroplasten freie Membran-Inseln wurden als Kontrolle in gleicher Weise ausgeschnitten.

Für LPC wurde der Laser leicht unter die Membran fokussiert. Anschließend wurden die Membran-Inseln mit einem einzigen Laserimpuls von 1-2 µJ beschossen. Die Membran-Inseln ließen sich so um einige mm bewegen und wurden im Inneren eines flachen Deckels eines 0,2 ml Reaktionsgefäßes aufgefangen. Dieser war auf den LPC-Collector montiert und mit Hilfe eines computergesteuerten Robot-Manipulators ca. 1 mm über dem Objektträger positioniert. Die Deckelinnenseite wurde vorher mit 1 µl Mineralöl bedeckt, um die Anheftung der Membran-Inseln an den Deckel zu verbessern (vgl. Abb. 14).

Die Deckel wurden dem Manipulator entnommen und die Mitte des Deckels mit 25 µl 1×

PCR-Reaktionspuffer mit $0,23 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Proteinase K (*PCR-grade*, Fa. Roche) bedeckt. Der Deckel wurde mit dem entsprechenden Reaktionsgefäß verschlossen und bei RT inkubiert bis alle Proben ausgeschnitten waren. Nach Zentrifugation 10 min bei 14000 g und RT wurden die Proben 60 min bei 65°C und anschließend zur Inaktivierung der Proteinase K 10 min bei 94°C inkubiert.

Die Bedienung des Gerätes und die LMM- und LPC-Prozeduren wurden von Herrn Stefan Thalhammer vom Institut für Kristallographie, LMU München durchgeführt.

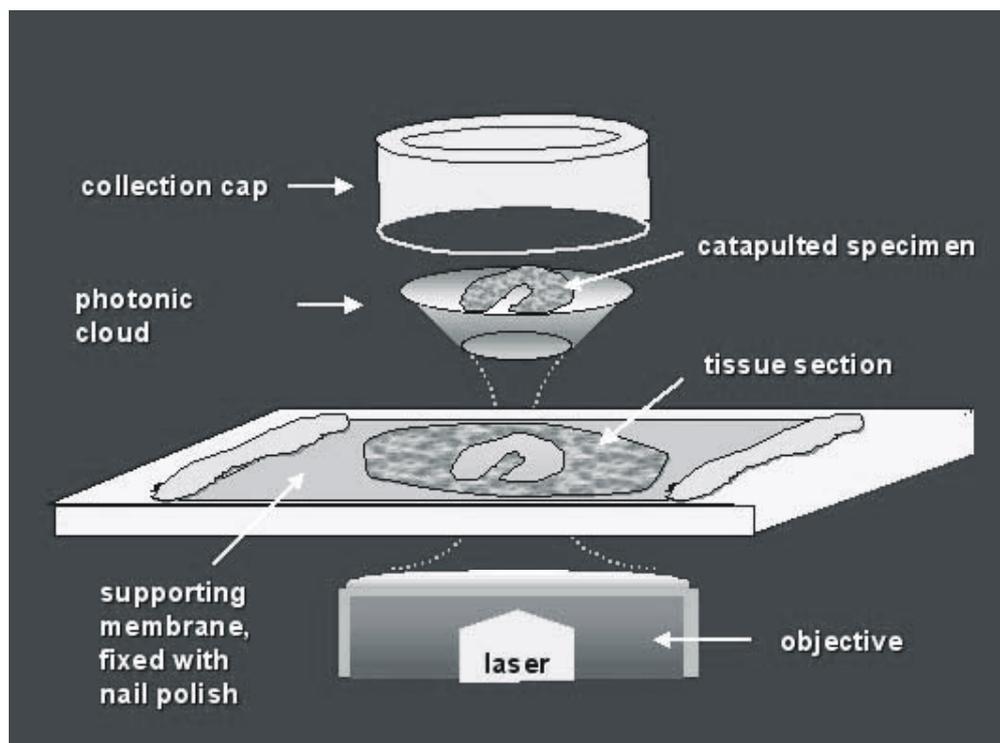


Abb. 14. Separierung von Chloroplasten aus einer Chloroplasten-Isolierung durch LMM und LPC (schematisch). Durch LMM ausgeschnittene Chloroplasten enthaltende Membran-Inseln werden durch LPC in ein Gefäß verbracht, in dem sie weiterverarbeitet werden können. (S. Thalhammer, mit freundlicher Genehmigung).

2.4.3 Amplifikation aus separierten Chloroplasten

Aus separierten Chloroplasten wurde die *trnT-trnF* Region von *Nicotiana tabacum*, *Taraxacum officinale* und *Nepenthes bicalcarata* und die *trnK*-Region bei *N. bicalcarata* amplifiziert. Jede Amplifikation wurde mit der gleichen Anzahl von Proben mit Chloroplasten und von Proben ohne Chloroplasten als Kontrolle, zusätzlich zu einer Negativkontrolle, mit einer Re-PCR Strategie durchgeführt. Für die erste Amplifikation wurde ein PCR-Ansatz für $50 \mu\text{l}$ mit 2 U Taq-Polymerase, $2,5 \mu\text{l}$ dNTPs ($2,5 \text{ mM}$ pro dNTP) und 25 pmol jedes Primers

in 25 µl 1x Reaktionspuffer angesetzt und direkt auf ein Reaktionsgefäß gegeben, das aus der Proteinase K-Inkubation der separierten Chloroplasten bereits 25 µl 1x Reaktionspuffer enthielt. Die trnT-trnF Region wurde in der ersten PCR mit den Primern A2 und F2 (vgl. Tab. 5 und Abb. 19) nach folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 94/2 (94/1 55/1 72/2,5)x2 (94/1 50/1 72/2,5)x2 (94/1 48/1 72/2,5)x10 (94/1 48/1 72/2,5+ 1 sec/Zyklus)x20 72/10. Aus dieser PCR wurden 1 µl einer 1/100 Verdünnung in einer zweiten PCR eingesetzt, in der die Region in zwei Abschnitten von ca. 800 und 1000 bp amplifiziert wurde, in 25 µl Volumen (vgl. Kapitel 2.3). Die Amplifikation wurde mit dem Primerpaar A und B (Temperaturprofil 94/2 (94/0,5 53,2/0,5 72/1,5)x35 72/5) oder C und F3 (Temperaturprofil 94/2 (94/0,5 59/0,5 72/1,5)x35 72/5) durchgeführt. Der Primer F nach Taberlet *et al.* (1991) wurde durch den Primer F3 ersetzt, der eine dem Primer C genau entsprechende Annealing-Temperatur besaß und die Amplifikation dadurch zu besseren Ergebnissen führte. Vorversuche wurden mit dem Primerpaar E2 und F2 in der ersten PCR nach dem Temperaturprofil 94/2 (94/1 60/1 72/1)x2 (94/1 55/1 72/1)x2 (94/1 50/1 72/1,25)x30 72/5 durchgeführt und E und F in der zweiten PCR (vgl. dazu Kapitel 2.7.2.5).

Das trnK-Intron wurde bei *Nepenthes bicalcarata* in einer ersten PCR mit dem Primerpaar 2_{kurz} und 16_{kurz} mit dem Temperaturprofil 94/2 (94/1 60/1 72/2,5)x2 (94/1 55/1 72/2,5)x2 (94/1 50/1 72/2,5)x10 (94/1 47,1/1 72/3) 72/10 durchgeführt. Hieraus wurden 1 µl aus einer 1/100 Verdünnung in einer zweiten PCR (in 25 µl) mit den Primerpaaren 16-trnK-2R / Nep16-1060F und 2-trnK-3914F / Nep2-1270R unter den hierfür routinemäßig verwendeten Bedingungen (vgl. Kapitel 2.7.2.4) eingesetzt.

2.5 Reinigungsverfahren für PCR-Produkte

PCR-Produkte mussten vor dem Einsatz in Sequenzierung oder Ligation für eine Klonierung gereinigt werden. Dabei wurden die Amplifikate entweder aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten oder über handelsübliche Reinigungskits aufbereitet. Da in der vorliegenden Arbeit in der Regel nicht mit markierten Primern sondern mit markierten Didesoxy-Nukleotiden sequenziert wurde, mußten die Primer und in der Amplifikation unspezifisch entstandene Primerdimere quantitativ entfernt werden. Da eine Standardisierung der Amplifikation bei den meisten Projekten, wegen der sehr unterschiedlichen Qualität der DNA aus unterschiedlich konserviertem Pflanzenmaterial unterschiedlicher Taxa, nur begrenzt möglich war, war eine Gelextraktion zur Entfernung von unspezifischen Produkten in den meisten Fällen nötig. PCR-Aufreinigungsprozeduren, die nur Produkte <100 bp entfernten, wie handelsübliche auf Bindung an Silika-Membran beruhenden PCR-Reinigungskits und Fällung der Amplifikate mit Ethanol und NH₄Ac erwiesen sich für die Sequenzierung mit dem Direct-Blotter als ungeeignet (vgl. Kapitel 2.8.1). Um hierbei gute Ergebnisse zu erzielen, musste besonders viel DNA in die Cycle-Sequencing-Reaktion eingesetzt werden. Damit war die

Konzentration von nicht abgetrennten kurzkettigen Oligonukleotiden, die in der Sequenzierungsreaktion mit den Primern konkurrierten, sehr hoch. Diese Formen der Reinigung führten zu einem hohen Anteil unlesbarer Sequenzen. Für die Sequenzierung mit dem ABI 377 konnte die Reinigung häufig auch ohne Gelextraktion durchgeführt werden, diese kam aber erst in der Endphase der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

Zur Gelextraktion wurden die PCR-Produkte (100 µl) mit 5 µl 10x Ladepuffer versetzt und vollständig auf ein 0,7-1 % Agarose-Gel mit Taschen von ca. 100 µl Fassungsvermögen aufgetragen, an das eine Spannung von ca. 100 V angelegt wurde. Nach 45–60 min wurden die dem Amplifikat entsprechenden DNA-Banden über einem UV-Illuminator (360 nm) mit einer sauberen Rasierklinge ausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach verschiedenen Methoden:

Nach der Phenolischen-Squeeze-Freeze-Technik wird die Struktur der das Amplifikat enthaltene Agarose-Gelstücke durch Einfrieren aufgebrochen und anschließend die Amplifikate durch Zentrifugation eluiert. Für diese Methode wurden Siebgefäße verwendet, die aus 0,5 ml Eppendorfgefäßen angefertigt wurden. In den Boden der Gefäße wurde mit einer Kanüle jeweils ein Loch gestochen und anschließend eine Lage Haushaltswatte, eine Lage Whatman-Papier und nochmals eine Lage Haushaltswatte eingebracht. Die Gefäße wurden anschließend autoklaviert, in 2 ml Reaktionsgefäße gestellt und zum Entfernen der Feuchtigkeit 1 min bei 10000 Upm zentrifugiert. In diese Gefäße wurden die ausgeschnittenen Gel-Stücke gegeben und 30 min bei -20°C eingefroren. Die gefrorenen Stücke wurden mit einer Pipettenspitze zu kleinen Fragmenten zerstoßen und nach dem Auftauen 10 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert. Dabei wurden die Amplifikate vom Agarose-Gel getrennt und in den 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Lösungen von Parallelproben wurden vereinigt, mit 1x TE-Puffer pH 8 auf 500 µl aufgefüllt und zur weiteren Reinigung mit 500 µl Phenol/Chloroform (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1 v/v) versetzt, gevortext und 10 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Entfernung des Phenol mit 500 µl Chloroform (Chloroform/Isoamylalkohol, 1:24 v/v) versetzt und wie oben behandelt.

Die Amplifikate wurden mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat pH 8 (~50 µl), 2,5 Vol eiskaltem 96% Ethanol (~1250 µl) und 1/50 Vol linearem Polyacrylamid (~10 µl) über Nacht bei -20°C gefällt. Lineares Polyacrylamid erhöht die Ausbeute kurzer DNA-Stücke.

Nach 15 min Zentrifugation bei 14000 Upm und 4°C wurden die Überstände verworfen und die Pellets der Amplifikate mit 500 µl eiskaltem 76% Ethanol gewaschen. Danach wurde 15 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Pellets bei Raumtemperatur getrocknet und in 10-20 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ gelöst. Die Lösung wurde anschließend zur Entsalzung über MicroSpin™ S-400 HR Säulen gereinigt, analog wie unter Kapitel 2.2.3 beschrieben. Die Matrix der Säulen konnte durch kurzes Waschen mit Wasser regeneriert und für die Reinigung der Produkte zur Sequenzierung wieder verwendet werden. Der

Entsalzungsschritt erwies sich auch für mit anderen Verfahren gereinigten Amplifikaten für die Sequenzierung mit dem Direct-Blotter essentiell, wegen der hohen Salzeempfindlichkeit der eingesetzten Thermostase der Fa. Amersham Pharmacia. Diese Art der Sequenzierung erbrachte außerdem nur bei einer sehr hohen DNA-Konzentration gute Ergebnisse, die mit verschiedenen handelsüblichen Gel-Extraktions-Kits nicht zu erreichen waren. Erst im Verlauf der vorliegenden Arbeit waren Systeme verfügbar, mit denen die hier beschriebene Methode preisgünstig ersetzt werden konnte.

Der *Quantum Prep™ Gel-Slice-Kit* (Fa. Bio-Rad, München) beruht auf dem Lösen des Gelstücks bei 60°C unter Bedingungen, bei der DNA an eine Matrix gebunden wird. Die Matrix wird anschließend auf Siebsäulen geladen und die Pufferlösung und die Agarosereste durch Zentrifugieren von der Matrix getrennt. Nach einem Waschschrift wurde die DNA eluiert. Die Prozedur wurde im Wesentlichen nach dem von der Firma Bio-Rad gelieferten Protokoll durchgeführt. Die Menge der Gel-Slice-Matrix konnte an die zu extrahierende Menge an Amplifikat angepasst werden, was einen Vorteil gegenüber dem auch eingesetzten *Gel-Extract Minielute Kit* der Fa. Quiagen darstellte. Die Elution wurde mit 20 µl 10 mM Tris-Puffer anstatt der empfohlenen Elution mit 50 µl TE-Puffer, der als CE im Kit mitgeliefert wurde, durchgeführt. Sie verlief dadurch zwar nicht quantitativ, die resultierende Lösung hatte aber eine höhere DNA-Konzentration. Der *Gel-Extract Minielute Kit* der Fa. Quiagen wurde für die Sequenzierung mit dem ABI 377 eingesetzt. Hierbei wurde in der Regel nur aus 100 µl PCR-Ansatz (im Gegensatz zu 200 bei Sequenzierung mit dem Direct-Blotter) gearbeitet, was den Einsatz dieses Systems erlaubte. Die Arbeitsschritte wurden nach dem von der Fa. Quiagen mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

2.6 Klonierung

2.6.1 Ligation und Transformation

Amplifikate der ITS-Region und des trnK-Introns wurden von verschiedenen Proben kloniert. Zur Ligation wurde das pGEM®-T Vector System der Firma Promega verwendet. Der pGEM®-T Vektor ist linearisiert und trägt Thymidin-Überhänge an den 3'-Enden. PCR-Produkte, die mit Taq-Polymerase erzeugt wurden, weisen häufig 3'-Adenosin-Überhänge auf und können mit dem Vektor eine Basenpaarung eingehen, wodurch die Effizienz der Ligation erhöht werden kann. Die Vektoren tragen ein Gen zur Ampicillin-Resistenz und die Klonierungsstelle unterbricht das lac-Z-Gen, wodurch eine Identifizierung von Kolonien, die mit Vektoren mit Insert transformiert wurden, ermöglicht wird. PCR-Produkte wurden in der Regel äquimolar mit dem Vektor in die Ligation eingesetzt, nach Mengenabschätzung auf dem Agarose-Gel. Für das trnK-Intron wurde das molare Verhältnis von PCR-Produkt zu Vektor auf 3:1 Mol erhöht, da die Klonierung hier effektiver verlief. Die Ligation wurde mit

3 U T4 Ligase in Ligase-Puffer der Fa. Promega in 10 µl Volumen bei 4°C über Nacht durchgeführt. Der Erfolg der Ligation wurde gegebenenfalls auf einem Agarose-Gel überprüft.

Die Vektoren wurden durch Hitzeschocktransformation in Bakterienzellen gebracht. Für die Transformation wurden *E. coli* DH5α-Zellen der Fa. Promega und für das trnK-Intron *E. coli*-Safe-Zellen der Fa. Stratagene eingesetzt. Letztere bilden eine geringere Menge an Kopien von Plasmiden und eignen sich daher zur Klonierung von potentiell für die Zellen unverträglichen Inserts. Diese Zellen wurden eingesetzt, nachdem bei dem trnK-Intron nach herkömmlicher Klonierung nur Inserts gefunden wurden, die nur Teile des trnK-Introns enthielten. Dies wies daraufhin, dass auf unvollständige Kopien selektiert wurde. Da mit dem trnK-Intron ein funktionsfähiges plastidäres Gen (*matK*) mitsamt den flankierenden Bereichen vorliegt, bestand die Möglichkeit, dass dieses in den Bakterien exprimiert wird und deren Wachstum hemmt.

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut (als ca. 200 µl Aliquot) und je 50 µl in vorgekühlte 15 ml Falcontubes gegeben. Die Ligationsansätze wurden 1:5 in 1x TE verdünnt und von der Verdünnung 2 µl zu den Zellen gegeben. Der Transformationsansatz wurde vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde für 45 sec die Hitzeschock-Transformation im Wasserbad bei 42°C durchgeführt, wobei die Membranen der Zellen kurzzeitig für große Moleküle und damit für den Vektor permeabel werden. Danach wurden die Transformationsansätze schnell auf Eis gestellt, 2 min inkubiert und dann bei RT mit 0,9 ml SOC-Medium versetzt. Anschließend wurde 1 h bei 225 Upm und 37°C geschüttelt. Zwischen 100 und 200 µl der Bakteriensuspension wurden auf LB Agarplatten, die 100 µg/ml Ampicillin, 0,5 mM IPTG und 80 µg/ml X-Gal enthielten, plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die zu Kolonien ausgewachsenen Zellen wurden anschließend durch Blue-White-Screening, bei weißen Kolonien ist das lac-Z-Gen des Vektors durch ein Insert unterbrochen, identifiziert und positive Kolonien weiterverarbeitet. Für das trnK-Intron konnten nur sehr wenige positive Kolonien identifiziert werden, deren Insert der erwarteten Größe entsprach. Da die Trennung von Koamplifikaten durch anderen Strategien zeitgleich gelang, erübrigten sich weitere Versuche zur Klonierung des trnK-Introns. Die Klonierung von ITS verlief in der Regel nach obiger Vorgehensweise problemlos.

2.6.2 Kolonie-PCR von *E. coli*

Zur schnellen Überprüfung von spezifisches Insert tragenden Plasmiden nach Klonierung von PCR-Produkten wurden transformierte Zellen von *E. coli* direkt in eine PCR eingesetzt. Dazu wurde eine Kolonie in 100 µl Wasser gegeben, vermischt und die Suspension 10 min bei 94°C inkubiert. Dadurch platzen die Zellen auf und die DNAsen wurden hitzeinaktiviert. Die Suspension wurde dann in der PCR als DNA-Lösung eingesetzt, meist mit einem Volumen von 1 µl pro 100 µl Reaktionsansatz. Dabei wurden entweder die Primer, mit denen das

Insert amplifiziert worden war, oder die die Insertionsstelle des Plasmids flankierenden Primer Sp7 und T7 eingesetzt. Die DNA-Lösung wurde gelagert und die PCR positiver Klone für eine Sequenzierung wiederholt. Große Mengen an Kolonien wurden in Mikrotiterplatten gepickt und daraus mit einer Mehrkanal-Pipette in die PCR eingesetzt. Dadurch konnte eine große Anzahl an Kolonien gescreent werden. Mit dieser Methode wurde die Plasmidisolierung, die noch zu Anfang dieser Arbeit verwendet wurde, sehr früh ersetzt.

2.7 Amplifikations- und Sequenzierungsstrategien

2.7.1 Ableitung von Primern

Primer wurden entweder nach bekannten, in der Datenbank des National Centre for Biotechnology Information (NCBI) abgelegten, oder nach im Verlauf der vorliegenden Arbeit ermittelten Sequenzen abgeleitet. Zum Teil kamen auch in der Literatur veröffentlichte Primer zum Einsatz. In der Regel wurden mehrere Sequenzen unterschiedlicher Taxa aliniert und konservierte Sequenzabschnitte als Primersequenz verwendet. Selektive Primer wurden so gelegt, dass die Sequenz am 3'-Ende der Primer von den auszuschließenden Taxa abweicht und den einzubeziehenden Taxa entspricht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die letzte Base selektiv wirkt. So wurden die Primer AITS1 und AITS4 aus einer Alinierung von jeweils der 26S rDNA und 18S rDNA aus ca. 10 unterschiedlichen Angiospermen und ca. 10 Asco- und Basidiomyceten sowie einigen Moosen und Grünalgen und einer Gymnosperme abgeleitet. Sie wurden von Positionen ermittelt, die für die Angiospermen gleich waren und von den anderen Gruppen am 3'-Ende an mehreren Positionen, einschließlich der letzten Base, abwichen. Damit wurden die mit anderen Primern beobachteten Koamplifikationen von Pilz und Algensequenzen bei dem Nepenthaceae ausgeschlossen.

Die Primer wurden in der Regel als 20-22 Basen enthaltende Oligonukleotide konstruiert. Dabei sollte die letzte Base nach Möglichkeit ein C oder ein G sein, wegen der höheren Bindungsstärke als A oder T, bei ungefähr gleichem CG- und AT-Gehalt. Um ein Annealing der Primer untereinander zu verhindern, wurden die Primer so konstruiert, dass ihre Sequenz keine größeren, gegen sich selber und gegen den anderen in einer Amplifikation einzusetzenden Primer komplementären Abschnitte besaßen, vor allem am 3'-Ende. Bei Primerpaaren sollten beide Primer eine ähnliche Annealing-Temperatur besitzen. Diese Parameter waren allerdings aufgrund der begrenzten Zahl von Sequenzabschnitten, nach denen die Primer zu ermitteln waren, nicht immer einzuhalten.

Für Re-PCR-Anwendungen wurden in einigen Fällen für die erste PCR solche Primer verwendet, die um 3 Basen gegenüber den Primer der zweiten PCR verkürzt waren. Diese stellten 17mere dar, die eine sehr niedrige Annealing-Temperatur hatten.

Alle Primer wurden prinzipiell auch als Sequenzierungsprimer eingesetzt. Oligonukleotide, die nur zur Sequenzierung eingesetzt werden sollten, wurden prinzipiell nach den gleichen Regeln abgeleitet. Allerdings wirkte sich die Basenkombination hier nicht so stark auf das Ergebnis aus. Eine Aufstellung aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide und deren Anwendung ist in Tab. 5 gezeigt. Die Primer wurden bis auf wenige Ausnahmen von der Fa. MWG synthetisiert.

Tab. 5. Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Region	Primernamen	Sequenz	Tm
ITS	AITs1	AGA AGT CCA CTG AAC CTT ATC	55,9
	AITs3	CAT CGA TGA AGA ACG TAG	51,4
	AITs4	CGC TTC TCC AGA CTA CAA TTC	57,9
	AncseqITS1-150	TCT CGT GAT GCA ACG TTG TG	57,3
	ITS1	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	55,3
	ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	59,4
	ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	59,4
	ITS4	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	61,0
	ITS1Ap13innen	GGA TCA TTG TCG AAA CCT GC	57,3
	ITS3Ap31aussen	GCT ACG TTC TTC ATC GAT GC	57,3
	ITS3Ap31innen	TTC TTC ATC GAT GCG AGA GC	57,3
	ITS3Ap34aussen	ATC GAG TCT TTG AAC GCA AG	55,3
	ITS3Ap34innen	AAC CAT CGA GTC TTT GAA CG	55,3
	ITS4Ap43innen	AAT TCG GAC AGC AAT GTT GC	55,3
	ITS41coch-Typ	CCC CGA TCA CCC CAT GCT AC	63,5
	ITS14coch-Typ	TGC AAC GTT GTG CTA CTT GGG	59,8
	ITS41pinan-Typ	GCC CCA ATC ACC CCA TGC AAA	61,8
	ITS41pinan-Typ	TGC AAC GTT GTG CTA CTT GGT	57,9
ndhF	Ndhf-r	GTG TCT ACC AAT TTC ACC AT	53,2
	Ndhf-f	ATT AAC ATA GGG ACT GGA AG	53,2
pbsK	Pbsk-R	GTT CGA ATC CTT CCG TCC CAG	61,8
rpl2	Rpl2-3.+275R	CAT ACC TAC TCC TCT TAC TAC	54,0
	Rpl2-5.-226F	AGG TCA TAA GCG TCT ATA CCG	57,9
rps16	Rps16-10F	GAA ACG ATG TGG TAG AAA GC	55,3
	Rps16-F	CAC GTT GCT TTC TAC CAC ATC	57,9
trnK	16-700R	TTT AAC ATT TGA CTC CGT A	48,0
	16 _{kurz}	AAC TAG TCG GAT GGA GT	50,4
	16-trnK-2R	AAC TAG TCG GAT GGA GTA G	54,5
	16-Typ1	GTA TAC ATA TAA AAT AAA AC	43,0
	16-Typ2	CCT ATG TAT ACA TAT AAA AC	47,1
	2-500polyR	ATA GGA TAA GAA GAT GGT TAG	52,0
	2-60polyF	TGT AAG ACC ACG ACT GAT CC	57,3
	2 _{kurz}	GGG GTT GCT AAC TCA AC	52,8
	2-trnK-3914F	GGG GTT GCT AAC TCA ACG G	58,8
	2-Typ1	TTT GTT TGA ATT TAT TGC G	45,9
	2-Typ2	CTT TGT TTG AAT TTG AAT TC	47,1
	Anc-16-1270	TTC ACC CAG TAG CGA AGA G	56,7
	Anc-2-1060	GAA ATT CCG TTT TCA CTA CG	53,2
	Bic16-Typ2-1900R	ATA GAT ATC TCG GAG ACA GG	55,3
	Bic16-Typ1-1900R	ATA GAT ATC TTG GAG ACA TC	51,2
	Bic16-Typ2-1560R	TCC CTT TTG AAG CCA GAA TG	55,3
	Bic16-Typ1-1560+4R	GAT GTC CCT TTT GAA GCC AC	57,3
	Bic16-Typ2-970R	ACC CTC TGA TAT CAT TTG AG	53,2
	Bic16-Typ1-970R	ACC CTC TGA TAT CAC TTG AT	53,2
	Bic16-Typ2-220R	TCT TTC CCT ACA ATT AGA GC	53,2
Bic16-Typ1-220R	TCT TTC CCT ACA ATT CGA GT	53,2	

Fortsetzung Tab. 5

Region	Primername	Sequenz	Tm	
trnK	Bic2-Typ2-630F	TCA TTT GAT AAC CCA AG	46,0	
	Bic2-Typ1-630F	TCA TTT GAT AAC CCC AA	46,0	
	Bic2-Typ2-1840F	TTT TAC ATC CCA TTA GTA AAG	50,1	
	Bic2-Typ1-1840F	TTG GAC ATC CAA TTA GTA AGC	54,0	
	Bic2-Typ2-670F	TTG AGT TTC CGG TCC AAT TTG	55,9	
	Bic2-Typ1-670F	TGA GTT TCT GGT CCA ATT GA	53,2	
	Bic2-Typ2-2080F	TTT TTG GAA GAA TTC TTT AAG C	50,1	
	Bic2-Typ1-2080F	TTT TGG AAG AAT TCT TTA AGG	50,1	
	Dio16-800	CAA CCA AGA AGA ATC TAT ATC	52,0	
	H16-750R	CGT ACC ACG GAA GGA TTT AG	57,3	
	H2-1660F	TAA ATG GAA ATA TTA CCT TG	47,1	
	H2-940F	TTT GAT TCT TTC TGC TAA TG	49,1	
	Nep16-1270R	TTC GTC CAG TAG CGA ATA G	54,5	
	Nep2-1060F	GGA TTT GCA TTC ATT GTG G	52,4	
	seq16-1000	TTT TCC TTG ATA CCT AAC	46,9	
	seq16-1220	AAT GAA GAT GGA TTC GTA TTC	52,0	
	seq16-360	TAC AGA AAA TAT CCA AAT ACC	50,1	
	seq16-550	AGC ACA AGA AAG TCG AAG	51,4	
	seq16-870	GAA AGA AAA CCC ATA AAG TC	51,2	
	seq2-320	TAA AAA TAG ATT AGT GAC TG	47,1	
	seq2-548	ATT TCT AAC CAT CTT CTT ATC C	52,8	
	Flank200R	CTT TAT TGG TAG AAG CGA G	55,9	
	Flank1500ohF	CTA ATC CTT CTA CTA GCA GC	55,3	
	Flank1900ohF	CAG TTA TTC AGC TAG GTA GG	55,3	
	Flank2020ohR	GTG CCA GTC GAG GTA AGG AG	61,4	
	Flank2000ohF	AGG ACA GGC CAA TAG AGA TG	57,3	
	unterhalb16	ACC ATC CAA TGT AAA GAC GG	55,3	
	ALD1500F	CGC TAC GAT TAC TAT TGT CC	55,3	
	ALD1500R	AAA TGA GAA AAT TTG TCC TC	49,1	
	trnT- trnL	A	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT	53,2
		A2	CAT TAC AAA TGC GAT GC	47,9
		B	TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	55,3
C		CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	59,4	
D		GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	59,4	
E		GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	59,4	
E2		GGT TCA AGT CCC TCT AT	50,4	
F		ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	55,3	
F2		ATT TGA ACT GGT GAC AC	47,9	
F3		CAG TCC TCT GCT CTA CCA AC	59,4	
Vektor	Sp6	CTA TTT AGG TGA CAC TAT AG	51,2	
	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	53,2	

2.7.2 Strategien zur Amplifikation und Sequenzierung

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Rekonstruktion der Phylogenie der untersuchten Gruppen im Wesentlichen mit zwei Markern gearbeitet: dem plastidären, das matK enthaltende trnK-Intron und dem nukleären ITS (Internal Transcribed Spacer), der Wiederholungseinheit der rDNA. Zur Auswahl eines plastidären Markers für die infragenerischen Untersuchungen wurden auch vergleichende Sequenzierungen mit wenigen Taxa der Nepenthaceae mit den Regionen ndhF, pbsK, rps16 und trnL(UAA) durchgeführt. Da diese eine geringere Variabilität als das trnK-Intron aufwiesen, wurde letzteres als phylogenetischer Marker ver-

wendet. Zur Klärung des Vorkommens des *rpl2*-Introns wurde das *rpl2*-Gen bei verschiedenen Taxa der Caryophyllidae vergleichend sequenziert. Die dafür verwendeten Primer wurden durch Vergleich veröffentlichter Chloroplasten-Genom-Sequenzen abgeleitet oder der Literatur entnommen. *TrnL*(UAA) wurde auch für die Etablierung einer Single-Chloroplasten-PCR verwendet. Sowohl mit dem *trnK*-Intron als auch mit der ITS-Region wurden bei verschiedenen Taxa Koamplifikate festgestellt, die mit selektiven Primern getrennt wurden. Im Folgenden werden die unterschiedlich Amplifikations- und Sequenzierungsstrategien, die für die einzelnen Projekte angewendet wurden, dargestellt.

2.7.2.1 ITS

ITS sollte als Marker für die infragenerische Gliederung der Nepenthaceae und Ancistrocladaceae verwendet werden. Allerdings konnte er für die Nepenthaceae wegen Koamplifikation von Pseudogenen nicht eingesetzt werden (vgl. Kapitel 3.2). Die Amplifikation wurde anfänglich mit den Primern ITS1 und ITS4 nach White *et al.* (1990) durchgeführt. Dies führte zur Koamplifikation von Pilz-DNA, so dass für alle weiteren Arbeiten Primer, die für Angiospermen spezifisch sind, abgeleitet wurden (Abb. 15).

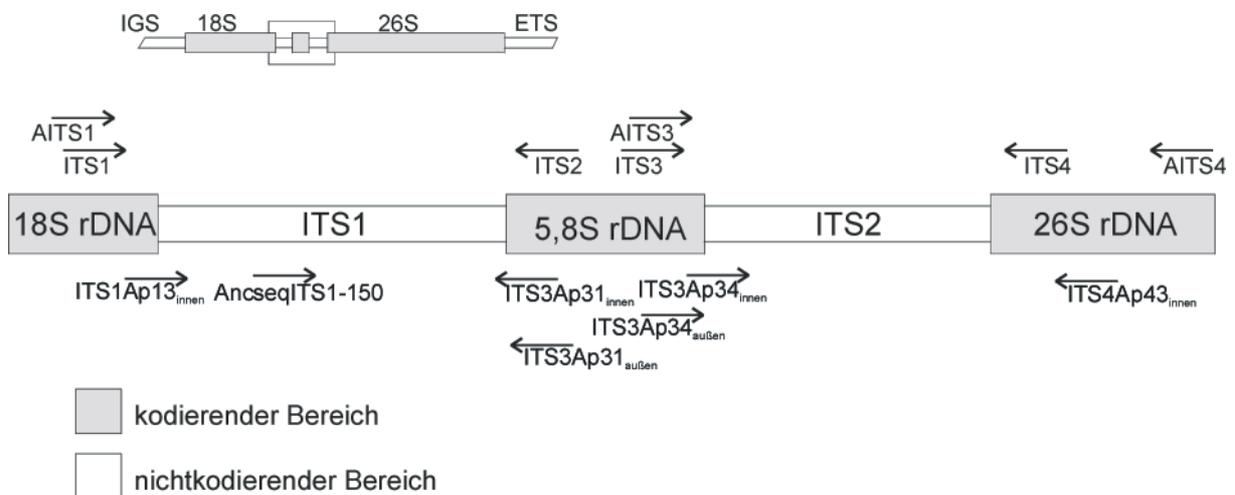


Abb. 15. Schematische Darstellung der ITS-Region entsprechend der Annotation der für *Ancistrocladus* ermittelten Sequenzen sowie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer und deren Orientierung. Oben sind die standardmäßig verwendeten Primer, unten die für die Amplifikation mit Re-PCR-Strategie aus stark degradierter DNA aus Herbarmaterial der Ancistrocladaceae angegeben. Die ITS-Region ist Teil der rDNA-Wiederholungseinheit (oben links).

Die zu sequenzierenden oder klonierenden PCR Produkte wurden mit den Primern AITS1 und AITS4 aus Gesamt-DNA amplifiziert, mit einem Temperaturprofil 94/1,5 (94/30 55/30 72/1)x35-40 72/5. Diese Primer wurden auch zur Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzen

wurden gegebenenfalls mit den Primern ITS2 und AITS3 vervollständigt. Der Primer ITS3 nach White *et al.* (1990) zeigte gegenüber der 5,8S rDNA von *Ancistrocladus* einen Mismatch, so dass er durch den Primer AITS3 ersetzt wurde. Die Sequenzierung von *Ancistrocladus* ergab mit dem Primer AITS3 meist bessere Ergebnisse als mit AITS4, so dass in den meisten Fällen mit den Primern AITS1 und AITS3 sequenziert wurde.

2.7.2.2 Amplifikation von DNA aus Herbarmaterial

Von Isotypen-Material von *Ancistrocladus pinangianus*, *A. stelligerus*, *A. attenuatus* und *A. cochinchinensis* wurde die ITS-Region amplifiziert und sequenziert. Das Material war ca. 100 Jahre alt und zudem mit Quecksilber behandelt, so dass die DNA-Isolierung modifiziert wurde (vgl. Kapitel 2.2.3). Die Region wurde mit einer Re-PCR-Strategie mit eigens abgeleiteten Primern amplifiziert (vgl. Abb. 15).

In der ersten PCR wurde mit den Primern AITS1 und ITS3Ap31aussen die ITS1-Region und mit AITS4 und ITS3Ap34aussen die ITS2-Region amplifiziert. Eingesetzt wurden in mehreren Versuchen zwischen 1 und 5 µl der DNA-Lösung als Template in 50 µl Reaktionsvolumen. In der Re-PCR wurden mit 0,5-1 µl der ersten PCR die ITS1-Region mit den Primern ITS1Ap13innen und ITS3Ap31innen und die ITS2-Region mit ITS4Ap43innen und ITS3Ap34innen amplifiziert. Das Temperaturprofil jeder dieser Amplifikationen war 94/1,5 (94/0,5 X/0,5 72/0,5)x30 72/3 mit den den Primerpaaren entsprechenden Annealing-Temperaturen (vgl. Tab. 5). Sequenziert wurden die Produkte der Re-PCR mit den für die Amplifikation verwendeten Primern. Der Primer AncseqITS1-150 wurde als zusätzlicher Sequenzierungsprimer eingesetzt. Die Amplifikation mit *Titanium-Taq* der Fa. Clontech führte unter gleichen Bedingungen bereits in der ersten PCR zu einem Amplifikat. Dieses wurde mit den sonst für die Re-PCR verwendeten Primern sequenziert.

2.7.2.3 Rpl2

Die Amplifikation des rpl2-Introns wurde mit den Primern rpl2-5-226F und rpl2-3+275R durchgeführt. Die Primer wurden durch Vergleich mit in der Datenbank des NCBI verfügbaren Sequenzen so abgeleitet, dass die Sequenzen mit rpl2-Intron 1150 bp lang waren, die Sequenzen, bei denen das Intron deletiert ist, 500 bp. Amplifikation wurden mit einer Elongation von 1 min 30 sec durchgeführt nach dem Temperaturprofil 94/1,5 (94/1 54/1 72/1,5)x40 72/10. Die Produkte wurden auf einem 3 %igen Agarose-Gel aufgetrennt, um das Vorhandensein des rpl2-Introns zu überprüfen. Zur Verifikation wurden Produkte von *Chenopodium bonus-henricus*, *Portulaca oleracea*, *Dionaea muscipula* und *Drosera capillaris* sequenziert, unidirektional mit dem Primer rpl2-5-226F.

2.7.2.4 TrnK

Sequenzen des trnK-Introns wurden zur Rekonstruktion der Phylogenie von Taxa der Caryophyllidae, Nepenthaceae und Ancistrocladaceae verwendet. Für die Caryophyllidae wurden ca. 1200 bp des für matK kodierenden Bereichs vergleichend sequenziert. Amplifiziert wurde jeweils das gesamte trnK-Intron mit den Primern 2-trnK-3914F und 16-trnK-2R nach Johnson und Soltis (1994) (Temperatur-Profil 94/2 (94/1 54/1 72/2,5)x35 72/10). Die Amplifikate wurden gereinigt und ausgehend vom Primer und 16-trnK-2R mit einem Set überlappender Sequenzierungsprimer unidirektional sequenziert. Dies war nötig, da für die sehr unterschiedlichen Taxa keine konservierten Bindungsstellen für Primer innerhalb des trnK-Introns gefunden werden konnten. Abb. 16 zeigt schematisch die Position der verwendeten Primer.

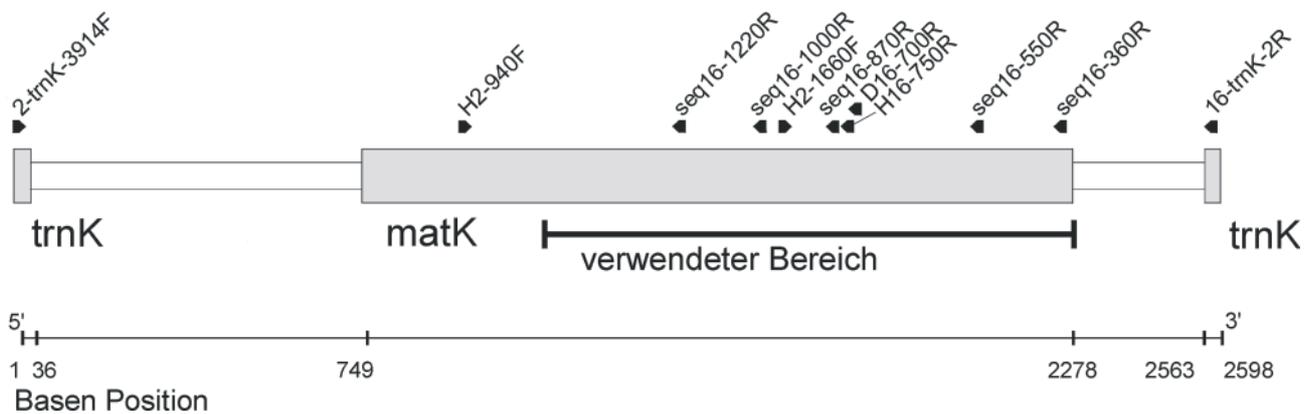


Abb. 16. Position und Orientierung der für die vergleichende Sequenzierung des trnK-Introns verschiedener Caryophyllidae verwendeten Primer und deren Position und Orientierung. Die Darstellung ist nach 5'-3'-Richtung des Leserasters des matK-Gens orientiert.

Der zur Rekonstruktion der Phylogenie der Caryophyllidae verwendete Sequenzabschnitt wurde mit den Primern 16-trnK-2R, seq16-550R und seq16-1000R sequenziert. Die zusätzlichen Primer seq16-360R, seq16-870R und seq16-1220R wurden verwendet, um Lücken zwischen nicht überlappenden Sequenzen zu füllen. Bei einigen Arten wurde die Sequenz des gesamten trnK-Introns ermittelt, unter zusätzlichem Einsatz des Primers seq2-548 (vgl. Abb. 17). Mit DNA aus Herbarmaterial von *Dioncophyllum tholloni* und *Habropetalum dawei* konnte wegen der starken Degradation der DNA nicht das gesamte trnK-Intron amplifiziert werden. Der für die Phylogenie der Caryophyllidae untersuchte Abschnitt des trnK-Introns wurde mit den Primerpaaren 16-trnK-2R / H2-1660F und H16-750R / H2-940F in zwei Schritten amplifiziert. Die Stücke wurden dann bidirektional mit den gleichen Primern wie für die Amplifikation sequenziert. Auch bei den meisten Taxa der Droseraceae (*Dionaea muscipula*, *Drosera capillaris* und *D. aliciae*) konnte mit dem Primerpaar 2-trnK-3914F / 16-

trnK-2R kein Amplifikat erhalten werden. Auch hier wurde der Abschnitt in zwei Stücken amplifiziert, mit den Primerpaaren seq16-360R / H2-1660F und 16-700R / 2-trnK-3914F. *Aldrovanda vesiculosa* wurde mit eigens abgeleiteten Primern amplifiziert, da der Primer 16-trnK-2R nicht passte. Zur Amplifikation wurden die Primerpaare ALD1500F / unterhalb16 und 2-trnK-3914F / ALD1500R. Der Primer unterhalb16 ist ca. 200 Basen in 3'-Richtung vom 3'-Exon des trnK positioniert, die Primer ALD1500R und ALD1500F im mittleren Bereich des trnK-Introns (nicht gezeigt).

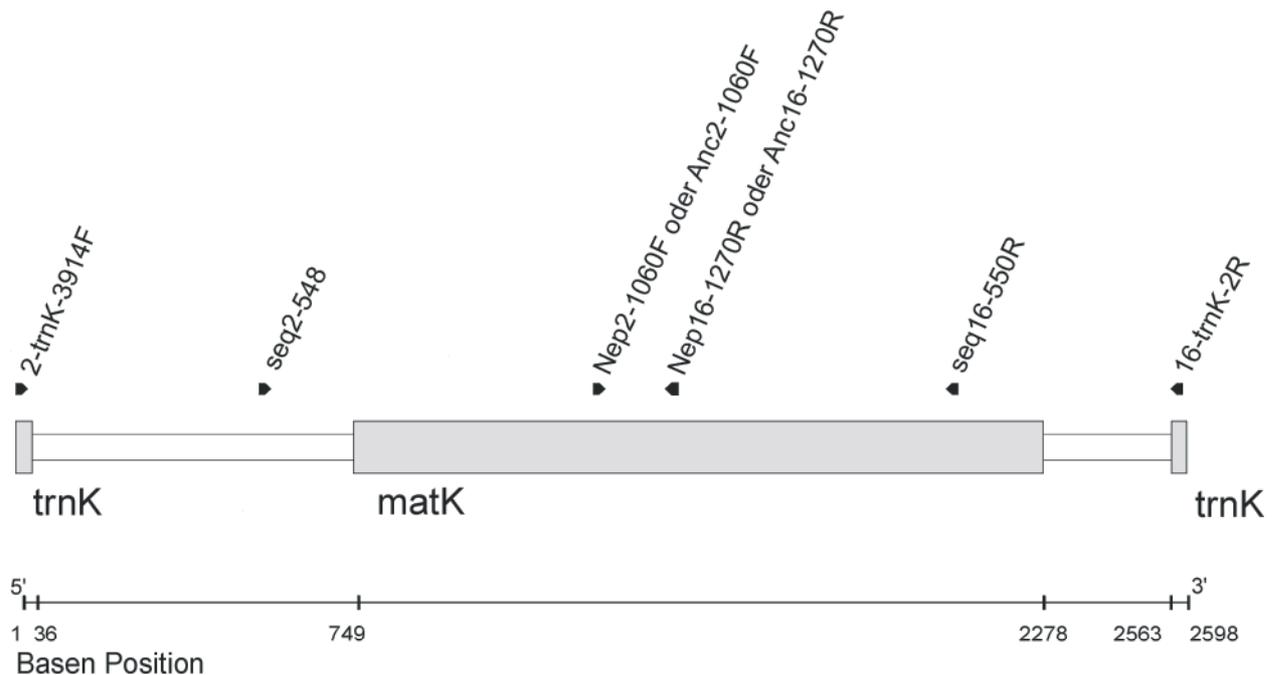


Abb. 17. Positionen der zur vergleichenden Sequenzanalyse des trnK-Introns der Ancistrocladaceae und der Nepenthaceae verwendeten Primer und ihre Orientierung. Die Darstellung ist nach 5'-3'-Richtung des Leserasters des matK-Gens orientiert.

Die Amplifikation des gesamten trnK-Introns bei den Nepenthaceae und bei den Ancistrocladaceae wurde in zwei getrennten Abschnitten durchgeführt, da hier jeweils konservierte Bereiche vorlagen, von denen Primer abgeleitet werden konnten. Die zwei Abschnitte wurden bei *Nepenthes* mit den Primerpaaren 2-trnK-3914F/Nep16-1270 und Nep2-1060/16-trnK-2R amplifiziert, bei *Ancistrocladus* mit den Primerpaaren 2-trnK-3914F/Anc16-1270R und Anc2-1060F/16-trnK-2R. Als zusätzliche Sequenzierungsprimer wurden die auch für die vergleichende Sequenzierung des matK der Caryophyllidae eingesetzt, regelmäßig seq16-550 und zusätzlich seq2-548. (Abb. 17).

Bei den Nepenthaceae konnte für das trnK-Intron ein Polymorphismus festgestellt werden, der auf die Koamplifikation einer mitochondrialen Kopie zurückgeführt werden konnte. Diese wurde durch eine Reihe selektiver Primer von der plastidären Sequenz getrennt. Die

mitochondriale Kopie wurde anschließend als Marker für die Nepenthaceae vergleichend sequenziert. Dabei wurde ein dem trnK-Intron nicht homologer Abschnitt einbezogen. Die Amplifikation wurde ebenfalls in zwei Abschnitten mit den Primerpaaren Flank1500F / Bic16-Typ2-970R und 16Typ2 / Bic2-Typ2-670F amplifiziert und mit diesen Primern sowie zusätzlich mit dem Primer 2-trnK-3914F sequenziert. Verschiedene Primer, die für andere Projekte abgeleitet worden waren, konnten hier als zusätzliche Sequenzierungsprimer eingesetzt werden. In einigen Fällen konnte der Bereich zwischen 16-Typ2 und Bic2-Typ2-670F nicht durch die selektiven Primer von der plastidären Sequenz getrennt werden. In diesen Fällen wurden mit den Primern Flank1500F und 16-trnK-2R der gesamte Bereich amplifiziert und mit diesen Primern und in der Regel mit 2-trnK-3914F, BicTyp2-970R und BicTyp2-670F sequenziert (Abb. 18).

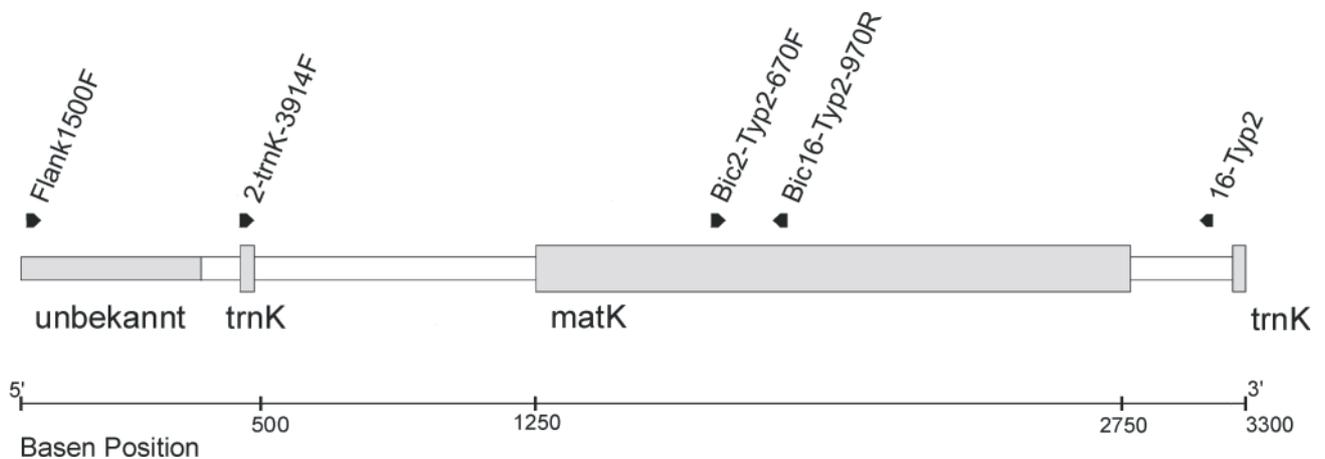


Abb. 18. Positionen der zur Sequenzierung und Amplifikation des mitochondrialen Pseudogens der Nepenthaceae eingesetzten Primer und ihre Orientierung. Die Darstellung ist nach 5'-3'-Richtung des Leserasters des matK-Gens orientiert.

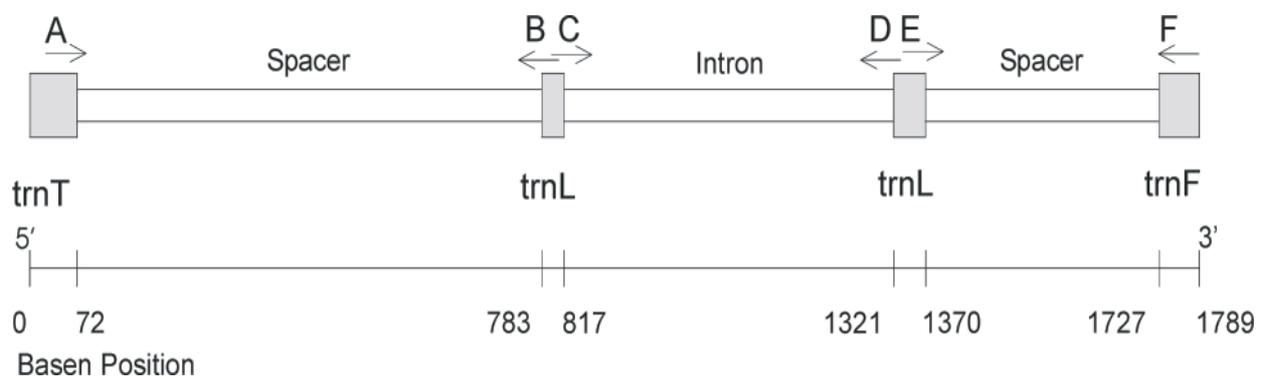


Abb. 19. TrnT-trnF-Region des Chloroplasten-Genoms schematisch. Großbuchstaben oben bezeichnen die Primerbindungsstellen der Primer nach Taberlet *et al.* (1991). An diesen Stellen wurden zusätzliche Primer abgeleitet, deren Position sich aus den Buchstaben und der Orientierung ergibt. Die trnT-trnF-Region wurde in der vorliegenden Arbeit nicht als phylogenetischer Marker eingesetzt, sondern zu Vergleichszwecken bei der Entwicklung einer Single-Chloroplasten-PCR verwendet.

2.7.2.5 TrnL

Die trnT-trnL Region des Chloroplasten-Genoms besteht aus einer Reihe von konservierten Abschnitten, zwei intergenischen Bereichen und einem Intron (vgl. Abb. 19). Die Region wird häufig als phylogenetischer Marker eingesetzt, vor allem der Abschnitt zwischen dem 5'-Exon des trnL und dem trnF-Gen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Amplifikation und die Sequenzierung dieser Region zur Entwicklung einer Single-Chloroplasten-PCR bei *Nicotiana tabacum* und *Nepenthes bicalcarata* eingesetzt (vgl. Kapitel 2.4.3). Es wurden die Primer nach Taberlet *et al.* (1991; benannt nach A bis F) und an deren Bindungsstellen abgeleitete Primer, verwendet.

2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit dem GATC-Direct-Blotter und, gegen Ende der Datenaufnahme der vorliegenden Arbeit, mit dem ABI 377 durchgeführt. Beide Systeme beruhen auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) und arbeiten mit markierten Primern oder mit markiertem Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs). In einer Sequenzierungsreaktion wird ein Primer komplementär zu einem DNA-Template enzymatisch verlängert, wobei die Reaktion durch Einbau der ddNTPs gestoppt wird. Dieser Einbau ist zufällig und findet in Konkurrenz zum Einbau der Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) statt. Am Ende der Sequenzierungsreaktion liegt ein Gemisch von Fragmenten mit durch den Einbau von ddNTPs an jeder Position des Templates gegebenen unterschiedlichen Länge vor. Dieses Gemisch kann auf einem Polyacrylamid-Gel basengenau aufgetrennt und detektiert werden. Durch zyklische Wiederholung der Sequenzierungsreaktion kann durch lineare Vermehrung der Fragmente die Detektionsgrenze weit heraufgesetzt werden (*Cycle Sequencing*; Murray, 1989). Die Detektion der Sequenzreaktion erfolgt beim GATC-Direct-Blotter über das enzymatische Färben von biotinmarkierten, auf einer Membran immobilisierten DNA-Fragmenten (Beck und Pohl, 1984). Beim ABI 377 erfolgt die Detektion durch die Aufnahme des Fluoreszenzspektrums der mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Fragmente aus dem Polyacrylamid-Gel. Die unterschiedlichen Basen an der Position des Abbruchs der Sequenzierungsreaktion werden beim Direct-Blotting-System durch den Ansatz der Reaktion mit je nur einer der vier möglichen ddNTPs, deren Produkte je auf einer eigenen Spur aufgetrennt werden (*4-Lane-Sequencing*), unterschieden. Beim ABI 377-System geschieht dies durch unterschiedliche Markierung der vier verschiedenen ddNTPs (*One-Lane-Sequencing*).

In der vorliegenden Arbeit wurden die meisten Sequenzen mit dem Direct-Blotting-System gewonnen, bei der vergleichenden Sequenzierung des mitochondrialen Pseudogens der

Nepenthaceae und des trnK-Introns der Ancistrocladaceae kam vorwiegend das ABI 377-System zum Einsatz.

2.8.1 Sequenzierung mit dem GATC-Direct-Blotter

Für Sequenzierungsreaktionen wurde der von der Fa. GATC empfohlene *GATC®-BioCycle Sequencing Kit* verwendet. Der Kit enthält alle vier biotinmarkierten ddNTPs, einen Reaktionspuffer, eine Lösung der vier dNTPs (dITP-Mix; zur Vermeidung von Kompressionen bei GC-reichen Abschnitten ist dGTP durch dITP ersetzt) und einen Formamid enthaltenden Stoppuffer zum Abbrechen der Reaktion und Denaturierung der Fragmente. Die Reaktion wurde, mit einigen Änderungen, gemäß dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Das Volumen wurde halbiert, so dass mit weniger Reagenzien und preisgünstiger gearbeitet werden konnte. Als thermostabile DNA-Polymerase wurde die *Thermosequenase™* der Fa. Amersham Pharmacia verwendet, die für den Einbau markierter ddNTPs optimiert ist. 0,5 µl der vier ddNTPs enthaltenden Lösungen wurden jeweils in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde ein Mastermix pipettiert. Dieser bestand in der Regel aus 3-10 µl gereinigtes PCR-Produkt als Template (auf einem Agarose-Gel auf 1 µg geschätzt), 0,5 µl einer 20 pmol/µl enthaltenden Verdünnung des Sequenzierungsprimers, 2 µl Reaktionspuffer, 2 µl dITP-Mix und 6 U Thermosequenase, (ca. 1 µl aus einer Verdünnung der 32 U/µl enthaltenen Stammlösung in von der Fa. Amersham Pharmacia gelieferten Verdünnungspuffer). Der Mastermix wurde mit H₂O_{bid} auf 20 µl aufgefüllt. Zu jedem der vier, die einzelnen ddNTP-Lösungen enthaltenden Reaktionsgefäße wurden 5 µl des Mastermixes gegeben, in den Thermocycler gestellt und die Reaktion nach dem Temperaturprofil 94/2,5 (94/20sec X/10-20sec 60/20sec)x40 60/9 durchgeführt. Als Annealing-Temperatur wurde immer die T_m des jeweiligen Primers und ein Annealingschritt von 10 sec, bei Primern mit T_m unter 55°C von 20 sec, verwendet. Diese Vorgehensweise erbrachte bessere Ergebnisse als die von der Fa. GATC vorgesehene. Die Fa. GATC empfiehlt eine der Annealing-Temperatur entsprechende Elongations-Temperatur für Primer mit einer T_m von 50-60°C (dies entspricht einem Elongations- / Annealingschritt von 30 sec, für Primer mit T_m < 50°C einem Annealingschritt von 30 sec bei 50°C, mit anschließender Elongation von 30 sec bei 60°C).

Nach Beendigung der Sequenzierungsreaktion wurden die Fragmente mit 15 µl 100% Ethanol, 0,6 µl 3 M Natriumacetat pH 8 und 0,5 µl lineares Polyacrylamid über Nacht bei -20°C gefällt. Lineares Polyacrylamid wirkt dabei als Fällungshilfe für kurze DNA-Fragmente. Nach 15 min Zentrifugation bei 14000 Upm und 4°C wurde die flüssige Phase verworfen, die DNA bei 37°C getrocknet und in 1-2 µl 1:1 in H₂O_{bid} verdünnten Stoppmix aufgenommen. Die Proben werden durch das im Stoppmix enthaltene Formamid denaturiert und liegen damit einzelsträngig vor. Von dieser Lösung wurden 0,5-0,7 µl in die Taschen des Polyacrylamid-Gels aufgetragen. Die Fällung der Produkte vor dem Probenauftrag erhöhte das Signal nach der Färbung erheblich und wurde daher routinemäßig durchgeführt.

Zur Vorbereitung des zur Auftrennung verwendeten Polyacrylamid-Gels wurden die Glasplatten der GATC-Apparatur (50 cm lang, eine Platte mit fixierter Pufferkammer), der Abstandhalter und der für den Probenauftrag benötigte Kamm (beide 0,125 mm dick) mit 96 % Ethanol gereinigt und die Glasplatteninnenflächen silanisiert. Dazu wurde 1 ml Silanlösung mit einem Tuch verrieben und nach einer Einwirkzeit von 15 min überschüssiges Silan vorsichtig mit einem mit 96 % Ethanol befeuchteten Tuch abgewischt. Anschließend wurden die Flächen entstaubt. An die Unterkante der Glasplatte ohne Pufferkammer wurde Packklebeband luftblasenfrei befestigt und die Kante an die senkrechte Wand des GATC-Gelgießtisches geschoben, wobei die Glasplatteninnenfläche nach oben gerichtet wurde. Das Klebeband verhinderte das Auslaufen der Gellösung und erleichterte, im Vergleich zur Vorgehensweise nach GATC, das parallele Ausrichten der Plattenunterkanten.

Die Abstandhalter wurden an den Längsseiten der Glasplatte mit einem 1 cm breiten Abstand zur Unterkante befestigt und die zweite Glasplatte mit der Innenfläche nach unten an die Oberkante der ersten angelegt. Die obere Platte wurde unter ständiger Zugabe von Polyacrylamid-Lösung über die untere Platte bewegt und beide Unterkanten so an den Gelgießtisch geschoben, dass sie zueinander parallel waren. Dann wurden sie mit dem Packklebeband abgeklebt. An die obere Kante wurde zwischen die Platten ein Vorkamm geschoben, so dass eine Tasche frei blieb, in die später der Kamm gesetzt werden konnte.

Die Gellösung bestand aus 22,1 ml 3,5 % Harnstoffdiluent (zur Entfernung von festen Verunreinigungen abgenutscht) und 2,9 ml 30 % Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid von GATC. Die Gellösung wurde entgast und auf 4°C abgekühlt, mit 25 µl TEMED und 112,5 µl 10% Ammoniumpersulfat versetzt und auf eine 20 ml und eine 5 ml Einmalspritze aufgezogen. Beide Spritzen wurden mit einer Kanüle versehen und dienten zum Auftrag des Gels an die Überlappungsstellen während des Gießprozesses. Um ein vorzeitiges Polymerisieren zu vermeiden, waren die Spritzen jeweils vorgekühlt.

Die Glasplatten wurden mit 8 Klammern und der zwischen die Oberkanten eingesetzte Vorkamm mit zwei Klammern fixiert. Das Gel polymerisierte innerhalb von 2 h bei RT aus. Die Glasplatten wurden mit Wasser gereinigt, eine zur Vermeidung eines Temperaturgradienten im Gel während des Laufs dienende Aluminiumplatte mit 2 Klammern angebracht und in die GATC®-1500 Apparatur gestellt. In die untere Pufferkammer wurden 700 ml entgasten 1x TBE-Puffer (GATC) gefüllt. 40 cm der Direct-Blotting-Membran wurden auf dem Förderband auf Höhe der hinteren Rolle mit einem speziellen Klebeband (Fa. GATC) mittig und parallel zum Förderband befestigt und die Membran mittels der Schrittmotorsteuerung durch die Pufferkammer auf die Startposition unter der Unterkante des Gels eingefahren, dieses in die Pufferkammer gesenkt und an der Apparatur fixiert. Die obere Pufferkammer wurde mit 500 ml 1x TBE-Puffer (GATC) gefüllt und die durch den Vorkamm gebildete Geltasche mit in einer Spritze aufgezogenem Puffer ausgespült, um Gelreste und Harnstoff zu entfernen. Die

Apparatur wurde an die Gleichstrom-Hochspannungsquelle angeschlossen und 30 min ein Vorlauf zum Aufheizen des Gels bei 35 W, ca. 2,9 kV und 12 mA durchgeführt. Der 0,125 mm dicke 48-Slot-Haifischzahnkamm wurde mit der gezackten Seite nach unten in die Geltasche eingesetzt, wobei die Zähne das Gel oben nur berühren bzw. minimal in die Gelmatrix eindringen. Die durch die Zwischenräume zwischen den Zähnen gebildeten Taschen wurden mit je 0,7 μ l der vorbereiteten Proben beladen. Von einer Probe wurden die vier Sequenzierungsprodukte in der Reihenfolge G-A-T-C aufgetragen. Die Proben wurden bei 0,75 kV langsam in das Gel einlaufen gelassen und anschließend wurde die Spannung für den Hauptlauf auf max. 2,9 kV erhöht. Die Leistung wurde konstant auf 35 W eingestellt. Die Verzögerung für den Membrantransport-Start wurde je nach Spannungshöhe zwischen 70 und 90 min dem Steuerungsgerät eingegeben, der Zeitpunkt an dem die ersten DNA-Fragmente die Gelunterkante erreichten. Der Membrantransport wurde mit 7 cm/h durchgeführt, so dass mit der 40 cm langen Membran bis zu 900 bp gelesen werden konnten. Während der Elektrophorese treten die DNA-Fragmente an der Unterkante des Gels aus, durchlaufen die Membran und werden dort gebunden, durch die Bewegung der Membran jeweils um eine Base Größenunterschied versetzt.

Nach dem Lauf wurde die Membran bei 37°C getrocknet, 2,5 min mit UV-Licht von 320 nm bestrahlt und die DNA damit kovalent an die Membran gebunden. Die optimale Länge der Bestrahlung wurde im Verlauf der Arbeit ermittelt, die von GATC empfohlenen Apparaturen zum Crosslinken und Färben wurden nicht verwendet.

Die enzymatische Färbung der Fragmente und die dazu nötigen Waschschrte wurden in einer Plastikbox, die nur wenig größer war als die Membran und im Trockenschrank bei 37°C auf einem Kippschüttler, durchgeführt. Die Membran wurde mit 50 ml H₂O_{bid} äquilibriert, kurz in 40 ml Maleinsäure-Puffer gewaschen und für 45 min bei 37°C in 50 ml 2 % Blockingpuffer (aus Magermilchpulver in Maleinsäure-Puffer) geschüttelt. Danach wurde sie zweimal kurz in je 40 ml Maleinsäure-Puffer gewaschen und für 2 h bei 37°C mit 14 μ l Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat in 40 ml Maleinsäure-Puffer konjugiert. Dabei bildet Streptavidin mit dem auf der Membran vorhandenen Biotin einen Komplex. Nach der Konjugation wurde die Membran dreimal mit ca. 40 ml Maleinsäure-Puffer gewaschen und einmal mit 50 ml Reaktionspuffer äquilibriert. Zur kolorimetrischen Detektion wurde die Membran bis zur optimalen Färbung zwischen 30 und 90 min im Dunkeln bei 37°C mit 165 μ l NBT Lösung und 165 μ l BCIP Lösung in 50 ml Reaktionspuffer geschüttelt. Das Substrat NBT wurde durch die enzymatische Reaktion der alkalischen Phosphatase in einen blauen Farbstoff umgewandelt. Zum Stoppen der Farbreaktion wurde die Membran zweimal in 50 ml 1x TE-Puffer pH 8 gewaschen, anschließend bei 37°C getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.8.2 Sequenzierung mit dem ABI 377

Für die Sequenzierung mit dem ABI 377 wurde die ABI-BigDye Chemie eingesetzt, d. h. die für den Kettenabbruch verantwortlichen ddNTPs (Dye-Terminatoren) sind in folgender Weise markiert: ddATP mit Dichloro[R6G], ddCTP mit Dichloro[Rox], ddGTP mit Dichloro[R110] und ddTTP mit Dichloro[TAMRA]. Verwendet wurde der ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Version 2.0 der Fa. Applied Biosystems in dem im Dye-Mix alle Reagenzien vorgemischt vorliegen. Von diesem Gemisch werden nach Angaben des Herstellers 8 µl zu 5-20 ng DNA und 3,2 pmol Primer gegeben und mit H₂O_{bid} auf 20 µl aufgefüllt. In Abwandlung von diesem Protokoll wurde die Reaktion in der vorliegenden Arbeit in 10 µl Volumen mit 1 µl des Dye-Mixes durchgeführt. Da der im Reaktionsmix enthaltene Reaktionspuffer dadurch stark verdünnt wurde, wurde 1 µl eines Reaktionspuffers (400 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 9,0) zugegeben. Dadurch konnten die Kosten sehr stark gesenkt werden, bei nur geringem Qualitätsverlust in der Detektion. Das Cycle-Sequencing wurde wie folgt durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 1 µl PCR-Produkt aus einem 100 µl PCR Ansatz und gereinigt über Systeme mit 10 µl Elutionsvolumen, 1,6 µl Primer (1 pmol/µl), 1 µl Dye-Mix, 1 µl Reaktionspuffer und 5,4 µl H₂O_{bid}. Dazu wurden DNA und Primer in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, die restlichen Reagenzien in einem Mastermix vereinigt und daraus 7,4 µl zugegeben. Zur Erhöhung des Signals bei dem verdünnten Ansatz wurde die Reaktion mit 99 Zyklen anstatt der vom Hersteller empfohlenen 20 Zyklen, bei einem Temperaturprofil 95/2 (95/20sec 46/5sec 60/4)x99. Nach Beendigung der Reaktion, die meist über Nacht lief, wurde der Heizblock auf 4°C gekühlt und diese Temperatur bis zur weiteren Verarbeitung der Proben gehalten.

Zur Entfernung nicht inkorporierter Dye-Terminatoren musste der Reaktionsansatz vor dem Probenauftrag gereinigt werden. Das Protokoll wurde der Homepage des *DNA-Sequencing Center* der Birmingham Young University entnommen (<http://dnasc.byu.edu/sephadex.htm>) und leicht abgewandelt. 600 µl Sephadex (3 g, 2 h gequollen in 50 ml H₂O_{bid}) wurden in leere Micro-Spin Säulchen gegeben und 2 min bei 4000 Upm in der Hettich-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Säulchen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße gestellt, mit den Proben beladen und 4 min bei 4000 Upm zentrifugiert. Die Dye-Terminatoren bleiben dabei in der Sephadex Matrix zurück, das Eluat mit der gereinigten DNA wurde in der Speed-Vac lyophilisiert (ca. 20-25 min). Die getrockneten Proben wurden in 1 µl Auftragspuffer aufgenommen und vollständig auf das Polyacrylamid Gel aufgetragen. Der Auftragspuffer wurde aus deionisiertem Formamid und Dextranblau (1 mg in 1 ml 25 mM EDTA pH 8,0) ungefähr im Verhältnis 4:1 gemischt. Vor dem Probenauftrag wurden die Proben 30 sec bei 70°C im Wasserbad denaturiert und auf Eis gestellt.

Zur Vorbereitung des zur Auftrennung verwendeten Polyacrylamid-Gels wurden die Glasplatten des ABI-Systems mit 1 % Alconox-Lösung gewaschen, mit H₂O_{dest} nachgespült

und mit einem fuselfreiem Papiertuch trocken gewischt. Die Platten wurden, mit den Abstandhaltern dazwischen, zusammengelegt, wobei die Gravur in den Platten nach außen zeigen musste, und mit mehreren Klammern auf jeder Seite geklammert. Die geklammerten Platten wurden leicht schräg gestellt und die Gellösung von oben mit einer 20 ml Spritze aufgegeben, so dass sie blasenfrei nach unten lief.

Die Gellösung (6 %-ig) wurde aus 6 ml 10x TBE, 7,1 ml 30 % Acrylamidlösung (der Fa. Roth) und einer Harnstofflösung aus 18 g Urea in 21 ml H₂O_{bid} hergestellt. Die Gellösung mußte hier im Gegensatz zum GATC-System abgenutscht werden, da Staubpartikel beim ABI-System einen größeren Einfluss auf das Ergebnis haben können. Die Gellösung wurde anschließend entgast und auf 4°C gekühlt. Die Polymerisation wurde mit 300 µl APS (10 %) und 20 µl TEMED gestartet, die Lösung in eine 20 ml Spritze aufgezogen und sofort mit dem Gießprozess begonnen. Nach dem Gießen wurden die Platten wieder geradegelegt, der Vorkamm eingesetzt und das untere Ende der oberen Platte mit einem feuchten Tuch bedeckt, der das Austrocknen der unteren Gelkante verhindern sollte. Die Polymerisation war nach ca. 2 h abgeschlossen. Das Gel konnte in Frischhaltefolie gewickelt im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Das Gel wurde vor dem Einsetzen in das ABI 377-Gerät gesäubert, da Verunreinigungen auf den Glasplatten zu einem hohen Hintergrund in der Fluoreszenz-Detektion führen können. Das Gel wurde wie vom Hersteller beschrieben in die Gelkammer des Gerätes gesetzt, mit den Heizplatten versehen, die Pufferkammern angebracht und diese mit 1x TBE (oben ca. 500 ml, unten ca. 700 ml) gefüllt. Mit Hilfe des ABI-377-Steuerungsprogramms wurde der von den Glasplatten ausgehende Hintergrund bei der Detektion überprüft und ein Vorlauf bei 1,2 kV gestartet, bis das Gel seine Betriebstemperatur von 50°C erreicht hatte.

Die Proben wurden vollständig in die durch den Haifischkamm gebildeten Taschen geladen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Typ des ABI-377 war für 36 Proben vorgesehen, bis zu 38 Proben konnten auf das Gerät aufgetragen werden. Dabei wurden zuerst die Proben ungerader Nummerierung geladen und durch ein kurzes (ca. 3 min) Anlegen von Spannung in das Gel laufen gelassen. Erst dann wurden die Proben mit gerader Nummerierung aufgetragen. Dies erleichtert die automatische Bestimmung der einzelnen Spuren durch die Sequence Analyse Software (das Tracking). Der Lauf wurde 11 h bei 18 kV und 50 W durchgeführt. Die Daten wurden während des Laufs im steuernden Computer gesammelt und als Gel-File gespeichert. Dieses wurde mit der Sequence Analysis Software anschließend analysiert und die einzelnen Sequenzen ermittelt.

2.8.3 Auswertung der Sequenzdaten

Die Sequenzen wurden bei Sequenzierung mit dem Direct-Blotter von der Membran abgelesen und manuell in einen Texteditor eingegeben. Durch die Verwendung einer leicht zugäng-

lichen Tastenkombination, die anschließend in die die Basen bezeichnenden Kürzel übersetzt wurde, konnte dies in angemessener Zeit durchgeführt und auf die Verwendung einer computergesteuerten automatischen Einlesung der Membranen daher verzichtet werden. Bei dem ABI-System wurde durch das Modul Sequence Analysis das abgespeicherte Gel-File automatisch ausgewertet und die einzelnen Sequenzen als Chromatogramm und Sequenz im Fasta-Format gespeichert. Hier wurde manuell die Spur der zu lesenden Sequenz nachkorrigiert (Lane-Tracking). Vor allem wenn mehr als 36 Proben aufgetragen wurden, mussten diese manuell nachgetrackt werden. Die Sequenzen wurden automatisch extrahiert. Führte dies nicht zu einer lesbaren Sequenz konnte die Weite zwischen zu detektierenden Banden manuell geändert und dadurch in der Regel die Extraktion verbessert werden. Die Grund-Einstellungen wurden dem zugehörigem Handbuch entnommen.

Die Sequenzen wurden immer in einen Sequenz-Editor importiert und korrigiert. Dazu wurden die Sequenzen gegen andere bereits korrigierte Sequenzen aliniert und abweichende Positionen mit den Originaldaten verglichen. Dabei war der Aufwand bei den mit dem ABI-System gewonnen Sequenzen erheblich höher als bei den manuell gelesenen Sequenzen.

2.8.4 Identifizierung paraloger Sequenzen durch Allelsubtraktion

Bei ITS-Sequenzen der Ancistrocladaceae kam es bei einigen Proben, deren Sequenzen mit dem ABI 377-System gewonnen wurden, an Positionen, an denen bei den übrigen Taxa in der Alinierung Längenmutationen festgestellt werden konnten, zur Überlagerung von Sequenzen, die darauf hindeuteten, dass hier verschiedene paraloge Sequenzen koamplifiziert wurden. In diesem Fall wurden die einzelnen Sequenzen durch Allelsubtraktion voneinander getrennt. Es konnten in jedem Fall gut lesbare Sequenzen anderer Ancistrocladaceae identifiziert werden, die mit einer der möglichen Basenzusammensetzung, die sich aus den „heterozygoten“ Positionen ergab, übereinstimmten. Dem zweiten Paralogon wurden dann die nicht in der bekannten Sequenz vorkommenden Zustände der heterozygoten Positionen zugeordnet. In den meisten Fällen entsprach diese hypothetische Sequenz wiederum einer bekannten Sequenz, wodurch die Vorgehensweise bestätigt wurde. Die überlagerten Bereiche wurden ebenso ausgewertet, da es sich um Abschnitte handelte, bei denen zwei bekannte Sequenzen um eine (in einem Fall auch um zwei Basen) verschoben waren. In diesen Abschnitten war die Auswertung allerdings nicht ohne Fehler durchzuführen, so dass Abweichungen von bekannten Sequenzen hier nicht gesichert sind.

2.9 Bearbeitung von Sequenzdaten

2.9.1 Alinierung und Vorbereitung der Datenmatrizen

Homologe Sequenzen wurden meist per Hand in einem Sequenzeditor, in der Regel in GeneDoc (Nicholas und Nicholas, 1997), aliniert. In Fällen, in denen eine Alinierung durch hohe Variabilitäten erschwert war, wurde mit Alinierungsprogrammen, wie ClustalW, ClustalX oder dem Pairwise Alignment Modul in GeneDoc, gearbeitet und anschließend per Hand nachgebessert. Die Alinierung bildete in jedem Fall die Grundlage für die zur Verrechnung eingesetzte Datenmatrix. Bei der Rekonstruktion der Phylogenie nah verwandter Taxa, wie bei den Nepenthaceae und Ancistrocladaceae, wurden Längenmutationen (Insertion oder Deletion, Indels) in die Analysen einbezogen. Um eine automatische Konvertierung der Daten in die für die Verrechnung nötigen Formate zu ermöglichen, wurden die Indels als A für eine fehlende und T für eine vorhandene Basenfolge kodiert und an das Ende der Alinierung angehängt. Für Analysen, in denen verschiedene Substitutionstypen gewichtet werden, wurden die den Indels entsprechenden Positionen dann ausgeschlossen.

Die phylogenetische Analyse wurde im Wesentlichen mit Hilfe des Computerprogramms PAUP, Version 3.1 und 4.01 Beta (Phylogenetic Analysis Using Parsimony; Swofford, 1993; Swofford, 1998) durchgeführt. Die Datenmatrix wurde mit dem Sequenzeditor Bioedit (Hall, 1999) in das von PAUP verlangte Nexusformat konvertiert. Modifikationen an der Nexus-Datei konnten anschließend im Texteditor durchgeführt werden. Diese Datei bildete jeweils die Grundlage für die Distanzanalyse und für phylogenetische Analysen.

2.9.2 Distanzverfahren

Bei der Sequenzanalyse wurden Distanzverfahren angewendet, um Aussagen über die Ähnlichkeit zweier Sequenzen zu gewinnen, unbeeinflusst durch Annahmen eines Algorithmus zur Rekonstruktion der Phylogenie. Durch phylogenetische Rekonstruktionsverfahren angenommene Distanzen zwischen zwei terminalen Taxa sind durch Analogieannahmen beeinflusst. Wird eine Topologie nach dem Maximum-Parsimony-Verfahren rekonstruiert, wird die Topologie als richtig angenommen, bei der am wenigsten Änderungen angenommen werden müssen. Für Homoplasien (ein in einer Topologie mit anderen Merkmalen nicht kompatibles Merkmal) müssen dabei in jedem Fall mehr als eine Änderung angenommen werden. Die beim Rekonstruktionsverfahren angenommene Distanz zwischen zwei terminalen Taxa ist damit von der Topologie abhängig (patristische Distanz) und kann größer als die sichtbare Distanz sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Sequenzanalyse nur Distanzverfahren angewendet, die auf der sichtbaren Distanz beruhen, d.h. auf dem zählbaren Unterschied zwischen zwei Sequenzen. Distanzen wurden mit Hilfe von PAUP bestimmt als: „absolute Distanz“ (*total distance*, Anzahl der zählbaren Unterschiede), „durchschnittliche Distanz“ (*mean distance*, Anzahl der Unterschiede bezogen auf die Länge der Alinierung, die um die Anzahl der nicht erkannten Basen reduziert wird) und „sichtbare Distanz“ (*p-distance*, Anzahl der Unterschiede bezogen auf die Anzahl der Positionen der Alinierung). Für die Rekonstruktion von Phylogenien entwickelte Distanzverfahren, bei denen beispielsweise Annahmen über die Häufigkeit von Substitutionstypen gemacht werden und Basenverhältnisse berücksichtigt werden, wurden zur Sequenzanalyse in der vorliegenden Arbeit nicht herangezogen. Diese Verfahren errechnen auf der Grundlage verschiedener Evolutionsmodelle aus der sichtbaren Distanz eine Näherung an die evolutive Distanz (*d-distance*). Bei ähnlichen Sequenzen nah verwandter Arten ist die Abweichung der sichtbaren Distanz von der evolutiven Distanz sehr gering. Mit Hilfe der Distanzen wurden in der vorliegenden Arbeit Hypothesen zur Artzugehörigkeit von Aufsammlungen kritischer Taxa aufgestellt oder Variabilitäten von Sequenzabschnitten miteinander verglichen. Zum Aufstellen von Phylogenie-Hypothesen wurde das Maximum-Parsimony-Verfahren angewendet.

Von ISSR-Bandenmustern wurden mit PAUP, ausgehend von der 0/1-Matrix, paarweise Distanzen nach Nei und Li (1979) bestimmt. Die Distanz beruht auf dem Ähnlichkeitskoeffizienten nach Dice (1945) und eignet sich für die Auswertung von Bandenmustern (Wolfe *et al.*, 1998). Es werden nur die vorhandenen Banden gewertet, indem die Anzahl gemeinsamer Banden zweier Taxa auf die Anzahl aller Banden dieser Taxa bezogen werden. Damit fließen bei zwei Taxa gemeinsam fehlende Banden (als 0 kodiert) nicht in die Distanzbestimmung ein, was das Ergebnis verfälschen würde.

Zur graphischen Darstellung der Distanzen wurden verschiedene Methoden angewendet. Bei der UPGMA-Analyse (Unweighted Pairgroup Method Using Arithmetic Averages) wird das ähnlichste Sequenzpaar an einem Knoten zusammengefasst und nun als Einzel-Sequenz behandelt. Die Distanz zu den anderen Sequenzen wird anschließend aus dem Durchschnitt der Distanzen des Sequenzpaares zu diesen berechnet. Jetzt wird wieder das ähnlichste Paar zusammengefasst und so weiter bis eine Topologie für den gesamten Datensatz konstruiert ist. UPGMA-Analyse ergibt damit eine graphische Darstellung der paarweisen Distanzen eines Datensatzes.

Im Gegensatz zur UPGMA-Analyse erlaubt das Neighbor Joining Verfahren eine Topologie-Konstruktion unter Berücksichtigung unterschiedlicher Astlängen, hervorgerufen durch unterschiedliche Mutationsraten. Dieses Verfahren eignet sich damit zur Rekonstruktion der Phylogenie aus einer Distanzmatrix und wurde zur Analyse der Nei-Li Distanzen der ISSR-Fingerprints bei den Ancistrocladaceae eingesetzt.

Durch die Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) werden Distanzen graphisch zweidimensional abgebildet. Dies ist eine statistische Methode, die zur Analyse genetischer Distanzen häufig verwendet wird. In der vorliegenden Arbeit wurden Nei-Li-Distanzen der ISSR-Fingerprints mit PCoA dargestellt. Die Methode wurde auch in einigen Fällen zur Darstellung von Distanzen von Sequenzdaten angewendet. Dies ist zwar nicht üblich, allerdings konnten dadurch beispielsweise die Unterschiede zwischen den Sequenz- und ISSR-Daten der Ancistrocladaceae gut veranschaulicht werden. PCoA wurde mit dem Programm NTSYSpc (Applied Biostatistics inc., 2002) durchgeführt.

2.9.3 Phylogenetische Rekonstruktionsverfahren

Zur Rekonstruktion von Phylogenen wird häufig das Maximum-Parsimony-Verfahren eingesetzt, das die Topologie eines Stammbaumes sucht, für die am wenigsten Mutationsschritte angenommen werden müssen. Es wird davon ausgegangen, dass die sparsamste (kürzeste) Topologie auch die wahrscheinlichste ist. Die sparsamste Topologie wird prinzipiell durch Konstruktion aller möglichen Topologien und die Bestimmung ihrer Länge gefunden. Praktisch wird dies durch die Bildung einer initialen Topologie aus 3 Taxa und der schrittweisen Addition von weiteren Taxa durchgeführt, bis alle Topologien gefunden sind. Die Rechenzeit dafür ist allerdings erheblich und kann mit mehr als ca. 15 Taxa in der Regel nicht durchgeführt werden. Bei heuristischer Suche werden jeweils nur die kürzesten Topologien als Basis für die nächste Addition verwendet, womit die Anzahl der zu speichernden und vergleichenden Topologien stark sinkt. So kann auch eine größere Anzahl Taxa analysiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Topologien wurden zwar mit heuristischer Suche der Programme PAUP 3.1 (für Macintosh; Swofford, 1993) und PAUP 4.0 (Beta; für Windows/PC; Swofford, 1998) durchgeführt. Analysen mit den Programmen Winclada, (Nixon, 1999), Nona (Goloboff, 1993) und Treecon (Van de Peer, 1997; Van de Peer und Wachter, 1993) wurden durchgeführt, unterschieden sich aber nicht oder nur geringfügig von den mit heuristischer Suche gefundenen Topologien.

2.9.3.1 Maximum Parsimony Analyse

Die heuristische Suche nach der sparsamsten Topologie wurde ausgehend von der Nexus-Datei der einzelnen Datensätze in folgender Weise durchgeführt:

Als Sequenz-Additions- Algorithmus wurde prinzipiell *simple addition* nach Farris *et al.* (1970) gewählt, bei dem die Taxa in aufsteigender Reihenfolge einer a-priori durch den Algorithmus bestimmte Distanz gegen ein Referenztaxon angeordnet werden. Die Verwendung von *random addition* (meist mit 10 Replikaten) erbrachte fast immer die gleiche Topologie. Sie wich nur im Fall der Analyse der mitochondrialen Kopie des trnK-Introns bei den Nepenthaceae in einigen Verzweigungen von der mit *simple addition* gewonnenen

Topologie ab. Die Taxa zur Bildung der initialen Topologie wurden schrittweise hinzugefügt (*stepwise addition*) wobei jeweils nur eine kürzeste Topologie bei jedem Schritt gespeichert wurde (*one tree held at each step*). Die heuristische Suche beruht auf der Umlagerung der einzelnen Gruppierungen der Initial-Topologie, um zu testen, ob eine kürzere Topologie existiert (*branch swapping*). Als Branch-Swapping-Algorithmus wurde TBR (*Tree Bisection Reconnection*) angewendet, der als einziger alle möglichen Schnittstellen und paarweisen Verknüpfungen testet. Wird durch die Umgruppierung eine kürzere Topologie gefunden, beginnt Branch-Swapping auf dieser Grundlage von vorne. Die Option *steepest descent*, die in diesem Zusammenhang nach weiteren kürzeren Bäumen in der laufenden TBR-Runde sucht, wurde in der Regel verwendet, brachte aber nie eine Änderung des Ergebnisses im Vergleich zu Analysen ohne *steepest descent*.

Durch die Option *multrees* (entspricht der Option *mulpars* in PAUP 3.1) werden alle kürzesten Topologien gespeichert, was für eine Analyse essentiell war und in jedem Fall durchgeführt wurde. Die Anzahl der gespeicherten Topologien musste bei manchen Analysen allerdings begrenzt werden, wenn die Anzahl der Bäume die Speicherkapazität der verwendeten Rechner überstieg (*treebuffer overflow*) oder sehr lange Rechenzeiten entstanden. Die Anzahl der gespeicherten Bäume wurde dann (Option *maxtree*) auf 1000 oder 10000 begrenzt.

Die Anzahl der gespeicherten Bäume konnte durch die Wahl der Option *collapse* auf *collapse=min* in PAUP 4.0 (Beta) stark reduziert werden. Die in der Regel verwendete Einstellung *collapse=max* faßt Äste zu Polytomien zusammen, wenn ihre maximal mögliche Länge 0 beträgt, bei *collapse=min* geschieht dies bei einer möglichen (minimalen) Astlänge von 0. Diese Einstellung ist in Nona (Goloboff, 1993) implementiert und ist auch in PAUP 4.0 möglich, wird aber dort nicht empfohlen. Bei Verwendung dieser Option wurde in jedem Fall zunächst eine Berechnung mit *collapse=max* durchgeführt und notfalls die Anzahl der zu speichernden Bäume begrenzt. Die Konsensus-Topologien unterschieden sich in keinem Fall, so dass die Option nach Goloboff (1993) regelmäßig dann verwendet wurde und wenn die Anzahl der zu speichernden Bäume begrenzt werden musste, Analysen mit suboptimalen Bäumen (z. B. zur Bestimmung von Decay-Werten) oder Bootstrap-Analysen großer Datensätze durchgeführt wurden. Die gespeicherten kürzesten Topologien konnten bei Verwendung dieser Option unterschiedliche Längen aufweisen. Äste wurden zusammengefasst, wenn ihnen durch unterschiedliche Wertung homoplasischer Positionen eine Astlänge 0 zugeordnet werden konnte, auch wenn dadurch die Topologie länger wurde. In der Menge der kürzesten Topologien konnten sich dadurch einige ergeben die um mehrere Schritte länger waren als die kürzeste. Beispielhafte Überprüfungen ergaben, dass sich dies aber nur auf die Astlängen terminaler Taxa bezog. Daher wirkte sich dies auf die Konsensus-Topologie nicht aus.

Die Konsensus-Topologie gibt (als *strict consensus*) nur die Verzweigungen wieder, die in allen als kürzeste Bäume gespeicherten Topologien gefunden wurden. In der vorliegenden

Arbeit wurde zur Ableitung von Phylogenie-Hypothesen aufgrund molekularer Datensätze immer diese Topologie verwendet. Sie ist bei einer Anzahl gespeicherter Bäume größer 1 immer länger als der kürzeste Baum, da in den verschiedenen kürzesten Bäumen sich widersprechende Positionen als Polytomie gezeigt werden und die potentiellen Synapomorphien in dieser Polytomie dann als analoge Änderungen angenommen werden. Bei einer Polytomie in der Konsensus-Topologie kann nicht beurteilt werden, in welcher Beziehung sie zu den übrigen Taxa der Monophylie, der sie zugeordnet ist, steht. Die Auswahl eines kürzesten Baums verfälscht ein Ergebnis möglicherweise mehr, da die der Topologie widersprechenden Anordnungen, die die gleiche Wahrscheinlichkeit haben, nicht berücksichtigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Polytomien in der Konsensus-Topologie als Taxa angesehen, deren Schwestergruppen-Beziehungen aufgrund des Datensatzes nicht geklärt werden konnten. Gegebenenfalls wurden mögliche Synapomorphien aufgrund des Datensatzes überprüft, um mögliche ungesicherte Schwestergruppen-Beziehungen unabhängig von Rekonstruktionsverfahren zu formulieren und zu bewerten. Die Majority-Rule-Konsensus-Topologie, in der in Prozent angegeben wird, mit welchem Anteil der kürzesten Topologien eine Verzweigung angezeigt ist (ab >50%), wurde zur Veranschaulichung der Frequenz einer möglichen Verzweigung innerhalb der kürzesten Bäume verwendet.

Als statistische Kenngrößen wurden in jedem Fall die Schrittlänge, also die Anzahl der für die Konstruktion der Topologie angenommenen Mutationsschritte, der *Consistency Index* (CI) und der *Retention Index* (RI) der kürzesten Bäume und der Konsensus-Topologie bestimmt. Der CI (nach Kluge und Farris, 1969) einer gegebenen Topologie errechnet sich aus der Summe der Anzahl der Apomorphien einer Position dividiert durch die Summe der in der Topologie angenommenen Änderungen einer Position. Der CI kann auch für eine Position berechnet werden. Er ist gleich 1, wenn für zwei Zustände in einer Position nur eine Änderung in der Topologie angenommen wird. Beide Zustände stellen dann Synapomorphien verschiedener Taxa dar, für die keine analoge Änderungen angenommen werden müssen. Der Homoplasie Index (HI) ist der Kehrwert des CI und wurde nicht berechnet. Der RI (nach Farris, 1989) einer Topologie wird berechnet aus der Differenz der maximal möglichen Länge der Topologie (als Buschdiagramm) und der beobachteten Länge dividiert durch die Differenz aus der maximal möglichen Länge und der Anzahl der aufgrund der Datenmatrix möglichen Merkmalsänderungen. Der Wert wird im Gegensatz zum CI nicht durch Autapomorphien, die nicht homoplasisch sein können, verfälscht.

Die Werte CI und RI sind um so höher, je weniger Positionen in einer gegebenen Topologie als homoplasisch angenommen werden müssen. Allerdings kann mit den Indices keine Aussage über den Wahrheitsgehalt der Topologie getroffen werden. Beide Werte wurden zum Vergleich von Topologien untereinander verwendet. Der CI wurde eingesetzt, um die Anzahl in der Topologie konservierter Synapomorphien bei zweifelhaften Verzweigungen zu überprüfen und gegebenenfalls die Verteilung von Analogien zu bewerten. Bei der Verwendung

der Option *collapse=min* kann der CI und RI der einzelnen gespeicherten Bäume leicht voneinander abweichen, da die Bäume unterschiedlich lang sein können (siehe oben). In diesem Fall wurde der Wertebereich der Indizes angegeben, oder diese auf zwei Stellen hinter dem Komma gerundet.

Zur Bewertung, wie gut die Topologie mit der Struktur der Daten übereinstimmt, wurden Bootstrap-Werte und Decay-Werte der Verzweigungen bestimmt. Bei der Bootstrap-Analyse werden in mehreren Replikaten jeweils Merkmale bzw. Positionen gelöscht und die kürzesten Topologien ohne diese Positionen berechnet. Je weniger Positionen eine Verzweigung stützen, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Verzweigung nicht mehr angezeigt ist. Die Bootstrap-Werte entsprechen dem prozentualen Anteil des Auftretens einer Verzweigung bei allen gespeicherten Topologien aller Replikate. Sie wurden angegeben bei einem Wert ab 50% bei in der Regel 1000 Replikaten. Bei Berechnungen mit sehr langen Rechenzeiten wurde die Anzahl der Replikate auf 100 begrenzt.

Decay-Werte (Bremer Indizes nach Bremer, 1988) geben an, um wieviele Schritte die einer Konsensus-Topologie zugrunde liegenden, kürzesten Topologien länger sein müssen bis eine Verzweigung in der Konsensus-Topologie nicht mehr angezeigt wird. Sie sind damit ein Maß für die Anzahl an Apomorphien, die eine Verzweigung stützen. Dabei ist der Decay-Wert einer Verzweigung höher, wenn diese durch Synapomorphien gestützt wird, als bei gleicher Anzahl Apomorphien, die in der Topologie homoplasisch verteilt sind. Zur Bestimmung der Decay-Werte wurden alle Bäume berechnet, die um einen Schritt länger waren als die kürzeste Topologie und daraus die Konsensus-Topologie gebildet. Verzweigungen die gegenüber der Konsensus-Topologie der kürzesten Topologien nicht mehr angezeigt waren, wurde der Wert 1 zugeordnet. Dies wurde mit jeweils um 1 erhöhte Schrittlänge wiederholt. Dadurch steigt die Anzahl der gespeicherten Topologien stark an, so dass die Werte nicht bei allen Analysen bestimmt werden konnten. Sie korrelierten aber in jedem untersuchten Fall mit der Höhe der Bootstrap-Werte.

2.9.3.2 Maximum Likelihood Analyse

Maximum-Likelihood-Analysen wurden ebenfalls mit den Programmen PAUP 3.1 und PAUP 4.0 beta durchgeführt. Die Methoden wurden zur Überprüfung der mit Maximum-Parsimony gefundenen Topologien eingesetzt, wobei meistens keine Unterschiede gefunden wurden. Im Gegensatz zur in der Maximum-Parsimony-Analyse verwendeten Fitch-Parsimony (gleiche Gewichtung und Reversibilität der möglichen Substitutionsarten) kann beim Maximum-Likelihood-Verfahren das Verhältnis von Transitionen und Transversionen vorgegeben werden und dessen Einfluss auf die Topologie überprüft werden. Dies wurde während der vorliegenden Arbeit mit den Standardeinstellungen von PAUP unter Änderung des Transitions-/Transversionsverhältnisses exemplarisch durchgeführt. Auf Darstellung und Bewertung aus

diesen Analysen wird, bis auf Ausnahmen, verzichtet, wegen ihrer großen Übereinstimmung mit den Maximum-Parsimony-Analysen.

3 Ergebnisse

3.1 Überprüfung der Verwandtschaftsverhältnisse der carnivoren Taxa der Caryophyllidae

In traditionellen Klassifikationssystemen wurden die Caryophyllales, Plumbaginales und Polygonales zu den Caryophyllidae zusammengefaßt (vgl. Kapitel 1.1). In den letzten Jahren durchgeführte molekulare Analysen zeigten, dass auch die Nepenthaceae, ebenso wie die Droseraceae, die Ancistrocladaceae und die Dioncophyllaceae, den Caryophyllidae zugeordnet werden können. Alle bis zum Abschluss der hier vorgestellten Untersuchung vorliegenden Arbeiten anderer Autoren unterscheiden sich voneinander in der Position der Nepenthaceae (vgl. Abb. 1). Die inneren Beziehungen zwischen den Nepenthaceae, Droseraceae, Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae waren in keinem Fall durch Bootstrap-Analyse stützbar. In der vorliegenden Arbeit wurden für verschiedene Taxa der Caryophyllidae vergleichende Sequenzanalysen durchgeführt. Dafür wurde das im trnK-Intron lokalisierte Gen für die MaturaseK (matK) als schnell evolvierender Marker herangezogen. Außerdem wurden relevante bereits veröffentlichte Daten gesondert und mit eigenen Daten kombiniert verrechnet. Dadurch war es möglich, die phylogenetischen Beziehungen der carnivoren Taxa der Caryophyllidae besser als in den bisher erstellten, vor allem auf rbcL und 18S rDNA basierenden, molekularen Phylogenien aufzulösen. Im Vordergrund stand bei dieser Untersuchung die Frage, ob ein monophyletischer Ursprung der Carnivorie durch molekulare Daten stützbar ist.

3.1.1 Die Phylogenie der Caryophyllidae s. l. auf der Basis vergleichender Sequenzanalysen des Maturase K-Gens (matK)

Von insgesamt 41 Taxa (vgl. Tab. 6) der Caryophyllidae s. l. wurden ca. 1100 bp des 3'-Endes des Gens für die MaturaseK (matK) vergleichend sequenziert. Neben dem für matK kodierenden Bereich, besteht das trnK-Intron aus zwei nicht kodierenden Bereichen, von denen ein ca. 700 bp langer Abschnitt das matK-Gen 5'-flankiert und ein ca. 200 bp langer Abschnitt das matK-Gen 3'-flankiert. Der größte Teil der nicht kodierenden Region des 3'-Endes des trnK-Introns wurde in jedem Fall ausgehend von dem im 3'-Exon des trnK-Gens lokalisierten Primer 16-trnK-2R sequenziert. Zwischen den berücksichtigten Taxa variiert die Länge der Sequenzen dieser Region zwischen 161 und 247 bp, was eine eindeutige Homologisierung der Positionen in der Alinierung erschwert. Die nicht kodierende Region des 3'-Endes des trnK-Introns wurde daher in der Analyse von der Alinierung ausgeschlossen.

3.1.1.1 Alinierung der matK Daten

Die Alinierung der matK-Sequenzen der in die Untersuchung einbezogenen 41 Taxa umfaßte 1166 Positionen. Der erfasste Sequenzabschnitt war bei den verschiedenen Taxa zwischen 1122 und 1150 bp lang. An 40 Positionen mussten Gaps eingefügt werden, um die Alinierung zu erhalten. Von den sich nach dem Einfügen von Gaps ergebenden 15 Indels waren 9 autapomorph, traten also nur bei einem Taxon auf (vgl. Tab. 7). Jeweils zwei Indels stellten Synapomorphien für die untersuchten Taxa der Gattung *Polygonum* und für die der Gattung *Drosera* ohne *D. regia* dar. Ein gemeinsames Indel hatten die Droseraceae ohne *Drosophyllum*. Ein weiteres Indel wiesen die Tamaricaceae zusammen mit den Frankeniaceae auf.

Die Indels waren, mit drei Ausnahmen, 3, 6 und 9 bp lang, was den kodierenden Charakter der untersuchten Region unterstreicht. Bei *Limonium rumicifolium* blieb auch bei einer Insertion von 7 Basen an den Positionen von 431 bis 437 der Alinierung das Leseraster durch eine Deletion von einer Base an Position 422 erhalten. Bei *Drosera aliciae* und *D. capillaris* verschob sich das Leseraster in der Nähe des 3'-Endes des Gens durch eine Insertion einer Base an Position 1057. Da die untersuchte Region bei diesen beiden Taxa nicht mit dem im trnK-Exon lokalisierten Primer 16-trnK-2R, sondern mit dem am 3'-Ende des matK-Gens lokalisierten Primer seq16-360R amplifiziert wurde, liegt hier keine Information über das Ende des Leserasters vor. Indels wurden nicht in die Analyse einbezogen, also nicht kodiert. Positionen, an denen Basen gegenüber der Mehrzahl der berücksichtigten Taxa inseriert waren (insgesamt 35), wurden aus der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen.

In Tab. 6 sind für die 41 Taxa die Länge des von matK untersuchten Sequenzabschnitts, der GC-Gehalt und die Anzahl der nicht erkannten Basen, die als N kodiert wurden, gezeigt.

Der GC-Gehalt der einzelnen Sequenzen beträgt zwischen 29 und 34%. Bei 11 Taxa mussten an mehr als 1% der Sequenzpositionen die Basen als fehlend kodiert werden. Mit 5,3 bis 7,1% war dieser Wert bei drei Taxa der Droseraceae am höchsten. Bei diesen wurde aufgrund einer anderen Ampifikationsstrategie ein Abschnitt am 3'-Ende der Alinierung nicht erfasst (vgl. Kapitel 2.7.2.4). Bei den anderen 8 Taxa konnten 1,1 bis 5,1% der Basen nicht erkannt werden. Die Alinierung der matK-Sequenzen wurde in den phylogenetischen Analysen als Datenmatrix für die Maximum-Parsimony-Analyse verwendet.

Tab. 6. Länge, GC-Gehalt und Anzahl nicht erkannter Basen (N) der Sequenzen der in der matK-Alinierung berücksichtigten Taxa.

Taxon	Länge in bp	GC-Gehalt	Anzahl nicht erkannter Basen
<i>Aldrovanda vesiculosa</i>	1137	32,28%	1 (0,09%)
<i>Amaranthus paniculatus</i>	1128	33,16%	0 (0,00%)
<i>Ancistrocladus abbreviatus</i>	1131	33,24%	1 (0,09%)
<i>Ancistrocladus hamatus</i>	1131	32,71%	2 (0,18%)
<i>Ancistrocladus heyneanus</i>	1131	32,71%	0 (0,00%)
<i>Ancistrocladus korupensis</i>	1131	33,24%	0 (0,00%)
<i>Armeria gaditana</i>	1131	33,69%	9 (0,80%)
<i>Bougainvillea spec.</i>	1131	32,10%	0 (0,00%)
<i>Chenopodium bonus-henricus</i>	1131	32,80%	2 (0,18%)
<i>Dionaea muscipula</i>	1137	32,81%	81 (7,12%)
<i>Dioncophyllum tholloni</i>	1131	33,95%	1 (0,09%)
<i>Drosera aliciae</i>	1144	29,28%	78 (6,73%)
<i>Drosera capillaris</i>	1150	30,35%	61 (5,30%)
<i>Drosera regia</i>	1137	33,07%	0 (0,00%)
<i>Drosophyllum lusitanicum</i>	1131	30,77%	46 (4,07%)
<i>Frankenia laevis</i>	1122	32,35%	18 (1,60%)
<i>Goniolimon tataricum</i>	1125	33,51%	40 (3,56%)
<i>Habropetalum dawei</i>	1131	33,42%	3 (0,27%)
<i>Limonium mourettii</i>	1131	34,13%	8 (0,71%)
<i>Limonium narbonense</i>	1131	33,69%	13 (1,15%)
<i>Limonium oblanceolatum</i>	1131	34,48%	2 (0,18%)
<i>Limonium rumicifolium</i>	1137	34,12%	2 (0,18%)
<i>Nepenthes alata</i>	1131	32,98%	2 (0,18%)
<i>Nepenthes distillatoria</i>	1131	33,07%	6 (0,53%)
<i>Nepenthes khasiana</i>	1131	33,24%	10 (0,88%)
<i>Nepenthes macfarlanei</i>	1131	33,07%	7 (0,62%)
<i>Nepenthes madagascariensis</i>	1131	32,98%	4 (0,35%)
<i>Nepenthes pervillei</i>	1131	32,98%	6 (0,53%)
<i>Nepenthes thorelii</i>	1131	32,98%	6 (0,53%)
<i>Nepenthes tobaica</i>	1131	33,24%	4 (0,35%)
<i>Nepenthes tomoriana</i>	1131	33,42%	3 (0,27%)
<i>Nepenthes veitchii</i>	1131	32,71%	11 (0,97%)
<i>Nepenthes ventricosa</i>	1131	33,42%	1 (0,09%)
<i>Plumbago indica</i>	1134	33,42%	58 (5,11%)
<i>Polygonum alpinum</i>	1119	33,42%	1 (0,09%)
<i>Polygonum bistorta</i>	1122	33,51%	5 (0,45%)
<i>Portulaca oleracea</i>	1131	31,21%	26 (2,30%)
<i>Rheum spec.</i>	1125	32,89%	23 (2,04%)
<i>Simmondsia chinensis</i>	1131	32,98%	16 (1,41%)
<i>Tamarix gallica</i>	1122	32,17%	8 (0,71%)
<i>Triphyophyllum peltatum</i>	1131	33,69%	0 (0,00%)

Tab. 7. Positionen der Alinierung mit Indels, Länge der Indels und Art der Längenmutation gegenüber der Mehrzahl der in der Analyse berücksichtigten Taxa.

Position in der Alinierung	Typ	Länge in bp	Taxa
182-188	Deletion	6	<i>Polygonum alpinum</i> , <i>P. bistorta</i>
189-195	Insertion	6	<i>Aldrovanda vesiculosa</i> , <i>Dionaea muscipula</i> , <i>Drosera regia</i> , <i>D. capillaris</i> , <i>D. aliciae</i>
201-204	Deletion	3	<i>Plumbago indica</i>
213-222	Deletion	9	<i>Tamarix gallica</i> , <i>Frankenia laevis</i>
222-228	Deletion	6	<i>Polygonum alpinum</i> , <i>P. bistorta</i>
231-237	Deletion	6	<i>Goniolimon tataricum</i>
394-400	Insertion	6	<i>Drosera capillaris</i>
422	Deletion	1	<i>Limonium rumicifolium</i>
430-437	Insertion	7	<i>Limonium rumicifolium</i>
442-445	Insertion	3	<i>Polygonum bistorta</i>
509-515	Insertion	6	<i>Plumbago indica</i>
576-582	Deletion	6	<i>Rheum spec.</i>
731-737	Insertion	6	<i>Drosera capillaris</i> , <i>D. aliciae</i>
1057	Insertion	1	<i>Drosera capillaris</i> , <i>D. aliciae</i>
1084-1087	Deletion	3	<i>Amaranthus paniculatus</i>

3.1.1.2 Phylogenetische Analyse partieller matK-Daten

Die durch die Alinierung der matK-Sequenzen gewonnene Datenmatrix bestand aus 1131 Positionen (nach Ausschluss von 35). Von diesen 1131 Positionen waren 477 konstant, d.h. sie zeigten bei allen Taxa nur einen Merkmalszustand. 192 Positionen waren variabel und phylogenetisch nicht informativ, d. h. sie enthielten nur Autapomorphien terminaler Taxa. 462 Positionen waren variabel und potentiell phylogenetisch informativ, d. h. sie wiesen für jeweils mehr als ein Taxon verschiedene Merkmalszustände auf, die somit potentielle Synapomorphien darstellten. Die Maximum-Parsimony-Analyse mit den Programmen PAUP 3.0 oder PAUP 4.0 Beta (heuristische Suche) ergab 10 kürzeste Bäume aus 1637 angenommenen Mutationsschritten mit einem CI (*Consistency Index*) von 0,600 und einem RI (*Retention Index*) von 0,711. Die Konsensus-Topologie ist in Abb. 20 und Abb. 21 gezeigt, zum einen als Kladogramm mit den die einzelnen Verzweigungen stützenden Bootstrap- und Decay-Werten, zum anderen als Phylogramm, in dem die Äste mit den der Anzahl der Mutationsschritte proportionalen Strecken gezeigt sind. Die Topologie wurde mit *Tamarix gallica* als Außengruppe dargestellt.

Als monophyletisch erscheinen erwartungsgemäß die Familien, von denen mehrere Arten in die Analyse einbezogen wurden. So werden die Polygonaceae, Plumbaginaceae, Caryophyllales, Droseraceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae und Nepenthaceae jeweils mit Bootstrap-Werten von 99 bis 100 gestützt. Allerdings wären die Droseraceae unter Einbeziehung von *Drosophyllum lusitanicum* polyphyletisch.

D. lusitanicum bildet mit einem Bootstrap-Wert von 91 die Nachbargruppe zu den Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae, die wiederum mit einem Bootstrap-Wert von 99 zu einer Monophylie zusammengefasst werden. Die Tamaricaceae und Frankeniaceae werden, mit einem Bootstrap-Wert von 57 schwach gestützt und werden als Schwestergruppe einer Monophylie aus Polygonaceae und Plumbaginaceae angezeigt. *Simmondsia chinensis* wird mit einem Bootstrap-Wert von 80 als Nachbargruppe zu den Caryophyllales gestellt.

Die Droseraceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae und Nepenthaceae erscheinen als Monophylie mit einem Bootstrap-Wert von 88. Dabei bilden die Droseraceae mit einem Bootstrap-Wert von 74 die Schwestergruppe zu den übrigen Taxa dieser Monophylie. Innerhalb der Droseraceae wird *Aldrovanda vesiculosa* (Wasserfalle) mit einem Bootstrap-Wert von 76 mit *Dionaea muscipula* (Venusfliegenfalle) zusammengefasst. Diese Beziehung, die in der Regel aufgrund des Fangapparates (beide besitzen aktive Klappfallen) angenommen wird, kann durch die vorliegenden Analysen bestätigt werden.

In Anbetracht der kurzen Astlängen, also die geringe Anzahl an Mutationsschritten, die bei der Parsimony-Analyse zur Erklärung der Phylogenie angenommen werden, zeigen sich die Nepenthaceae und die Ancistrocladaceae jeweils als sehr geschlossene Gruppe. Die Ancistrocladaceae und Nepenthaceae betreffenden Ergebnisse wurden durch weitere Analysen verfeinert und werden später besprochen (vgl. Kapitel 3.4 und 3.7).

3.1.1.3 Bestimmung der Leserichtung der Topologie

Zur Bestimmung der Eignung der Tamaricaceae und Frankeniaceae als Außengruppe wurde die matK-Datenmatrix um solche Taxa erweitert, die in rbcL-Topologien eine basale Position haben. Nachteilig ist dabei, dass die große Distanz der sehr entfernt stehenden Taxa zu mehr Homoplasien in der Datenmatrix führt und dadurch die Auflösung innerhalb der Innengruppe abnehmen kann. Es wurde daher eine Datenmatrix erstellt, die zusätzlich zu den 41 Taxa der Caryophyllidae je zwei Vertreter der Familie der Buxaceae und der Ericaceae und als Außengruppe einen Vertreter der Ranunculaceae enthielt. Folgt man aktuellen rbcL-Phylogenien so sind die Ericales Teil einer Nachbargruppe zu den Caryophyllidae (Chase *et al.*, 1993, Nandi *et al.* 1998), die Buxaceae stehen zwischen den Ranunculaceae und der Monophylie, die unter anderem die Ericales und die Caryophyllidae enthält. Die Sequenzen der beiden Taxa der Buxaceae wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt, für die Ericales (*Pieris*

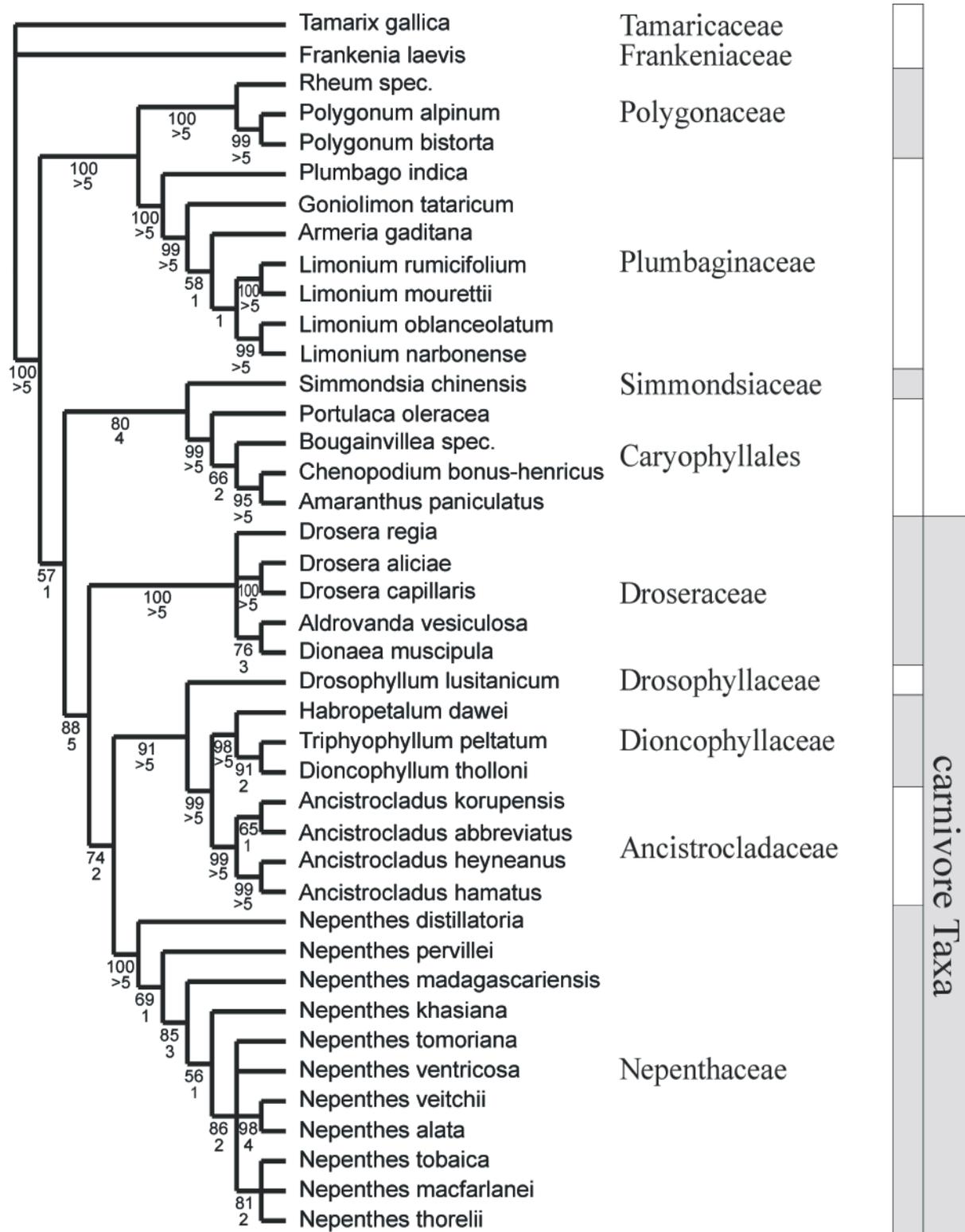
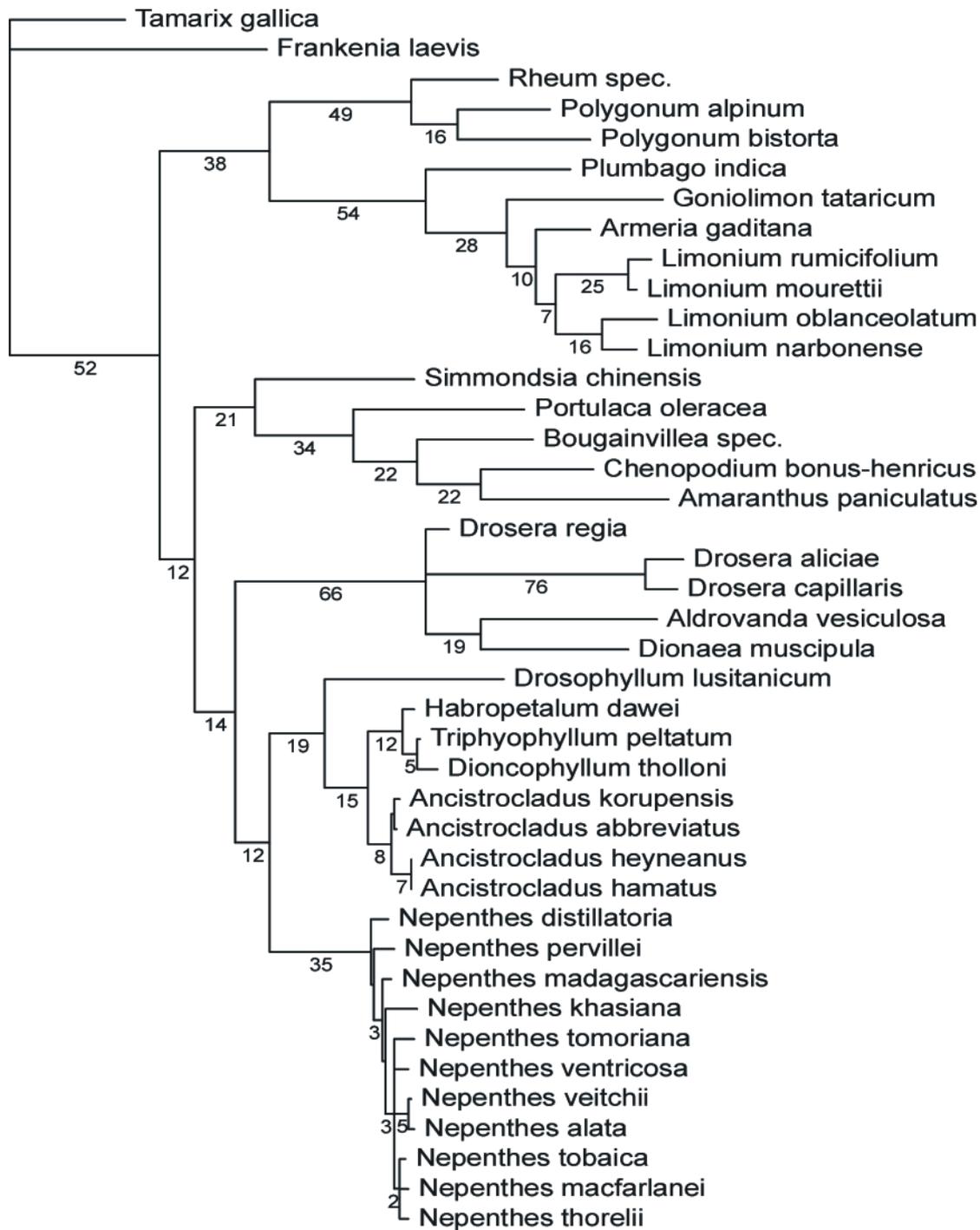


Abb. 20. Phylogenetische Analyse partieller matK Sequenzen von Taxa der Caryophyllidae s. l. Gezeigt ist die Konsensus-Topologie aus 10 kürzesten Bäumen (Baumlänge 1637) und *Tamarix gallica* als Außengruppe als Kladogramm. Bootstrap-Werte sind unter den durch diese Analyse gestützten Ästen angegeben, Decay-Werte unter den Bootstrap-Werten.



10 Mutationsschritte

Abb. 21. Konsensus-Topologie der phylogenetischen Analyse partieller matK Sequenzen von Taxa der Caryophyllidae s. l. dargestellt als Phylogramm. Unter den jeweiligen inneren Ästen sind die in der Analyse angenommenen Mutationsschritte angegeben, wenn mehr als ein Mutationsschritt angenommen wurde.

formosa gi7260604, *Gaultheria strigosa* gi14009891) und die Ranunculaceae (*Cimicifuga simplex* gi14270080) wurde auf bereits veröffentlichte Daten zurückgegriffen.

Die auf 46 Taxa erweiterte Datenmatrix enthielt 1132 Positionen, von denen 405 konstant, 194 variabel und nicht informativ und 533 variabel und potentiell phylogenetisch informativ waren. Die Maximum-Parsimony-Analyse ergab 15 kürzeste Bäume mit 2049 Schritten, einem CI von 0,558 und einem RI von 0,737. In der Konsensus-Topologie stellen die Tamaricaceae und Frankeniaceae die den Ericales benachbarte Gruppe der Caryophyllidae s. l. dar, die Caryophyllales bilden die Nachbargruppe zu den carnivoren Taxa. Diese Beziehungen sind allerdings nur durch niedrige Bootstrap-Werte (53 und 62, bei 100 Replikaten) gestützt und werden in der Konsensus-Topologie der um einen Schritt längeren Bäume nicht mehr angezeigt (Decay-Wert 1). Gemäß der matK-Phylogenie erscheint die Annahme der Tamaricaceae und Frankeniaceae als Nachbargruppe der übrigen Caryophyllidae s. l. dennoch wahrscheinlicher als alternative Anordnungen. Daher erschien es gerechtfertigt, die phylogenetischen Analysen der matK-Sequenzen der Caryophyllidae s. l. mit den Tamaricaceae und Frankeniaceae gewurzelt darzustellen (Abb. 22).

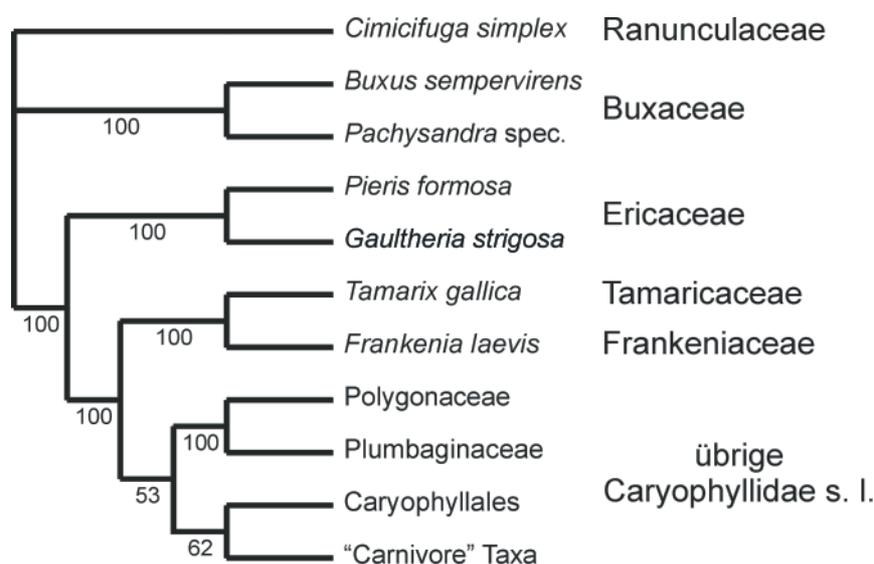


Abb. 22. Konsensus-Topologie aus 15 kürzesten Bäumen der Maximum-Parsimony-Analyse der matK-Datenmatrix mit zusätzlichen Taxa der Ranunculaceae (*Cimicifuga*), Buxaceae (*Buxus*, *Pachysandra*) und Ericaceae (*Pieris*, *Gaultheria*), vereinfacht. Bootstrap-Werte aus 100 Replikaten sind unter den betreffenden Ästen angegeben. Verrechnet wurden 46 Taxa, darunter alle in der Analyse der Caryophyllidae einbezogenen. Die Monophylie der Tamaricaceae und Frankeniaceae bildet demnach in der matK-Phylogenie die basale Gruppe der berücksichtigten Caryophyllidae.

3.1.2 Phylogenetische Analyse von trnK-Intron Sequenzdaten

Aufgrund der phylogenetischen Analysen basierend auf matK-Daten konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Caryophyllidae s. l. eine Monophylie aller carnivor Taxa, den Droseraceae, den Dioncophyllaceae und den Nepenthaceae besteht. Zu dieser Monophylie gehören auch die Ancistrocladaceae. In der Konsensus-Topologie der matK-Phylogenie bilden sie die Nachbargruppe zu den Caryophyllales und wird mit einem Bootstrap-Wert von 88 gestützt.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde von ausgewählten Taxa der gesamte Bereich des das matK-Gen enthaltende trnK-Introns analysiert. Dadurch standen ca. 2500 bp für eine phylogenetische Rekonstruktion zur Verfügung. Neben den mit in die Analyse partieller matK-Sequenzen einbezogenen 10 Nepenthaceae und den 4 Ancistrocladaceae wurden *Triphyophyllum peltatum*, *Dioncophyllum tholloni*, *Drosophyllum lusitanicum*, *Drosera regia* und *Aldrovanda vesiculosa* untersucht, deren Sequenzen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt wurden. Zusätzlich wurden veröffentlichte Daten von *Spinacia oleracea* als Vertreter der Caryophyllales (gi7636084, vollständige Chloroplasten-Genom-Sequenz) und *Cassiope lycopodioides* (gi3089338) als Außengruppe (Ericaceae) verwendet. Als Vertreter der Polygonaceae und Plumbaginaceae wurde die Sequenz von *Fagopyron spec.* (gi4835455) und die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Sequenz des 3'-Endes des trnK-Introns von *Polygonum alpinum* für die Analyse zusammengesetzt.

Die Alinierung der trnK-Intron-Sequenzen der 22 Taxa umfasste 2685 Positionen. Von diesen wurden 360 Positionen in den nichtkodierenden Bereichen ausgeschlossen, da aufgrund der markanten Längenvariabilität in diesen Abschnitten eine Alinierung nicht möglich war. Die zur Maximum-Parsimony-Analyse der trnK-Intron-Sequenzen eingesetzte Datenmatrix enthielt 2325 Positionen, von denen 1247 konstant waren, 561 variabel und nicht informativ und 517 variabel und potentiell phylogenetisch informativ. Im Vergleich dazu waren in dem Abschnitt, der ca. 1150 bp des 3'-Endes des matK-Gens entspricht und der für die phylogenetische Analyse der Caryophyllidae eingesetzt wurde, nur 225 Positionen potentiell informativ.

Die heuristische Suche führte zu 6 kürzesten Bäumen mit 1735 Schritten, einem CI von 0,682 und einem RI von 0,818. Die Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Analyse entspricht in seiner Topologie dem der matK-Analyse (Abb. 23). Für die Monophylie der carnivoren Taxa ist die Bootstrap-Unterstützung mit 100 optimal. In der Konsensus-Topologie der um über 15 Schritte längeren als die kürzesten Bäume bleibt diese Gruppierung erhalten. Die Stellung der Droseraceae als Nachbargruppe zu den übrigen carnivoren Taxa ist mit 85 besser gestützt als in der matK Phylogenie mit 74.

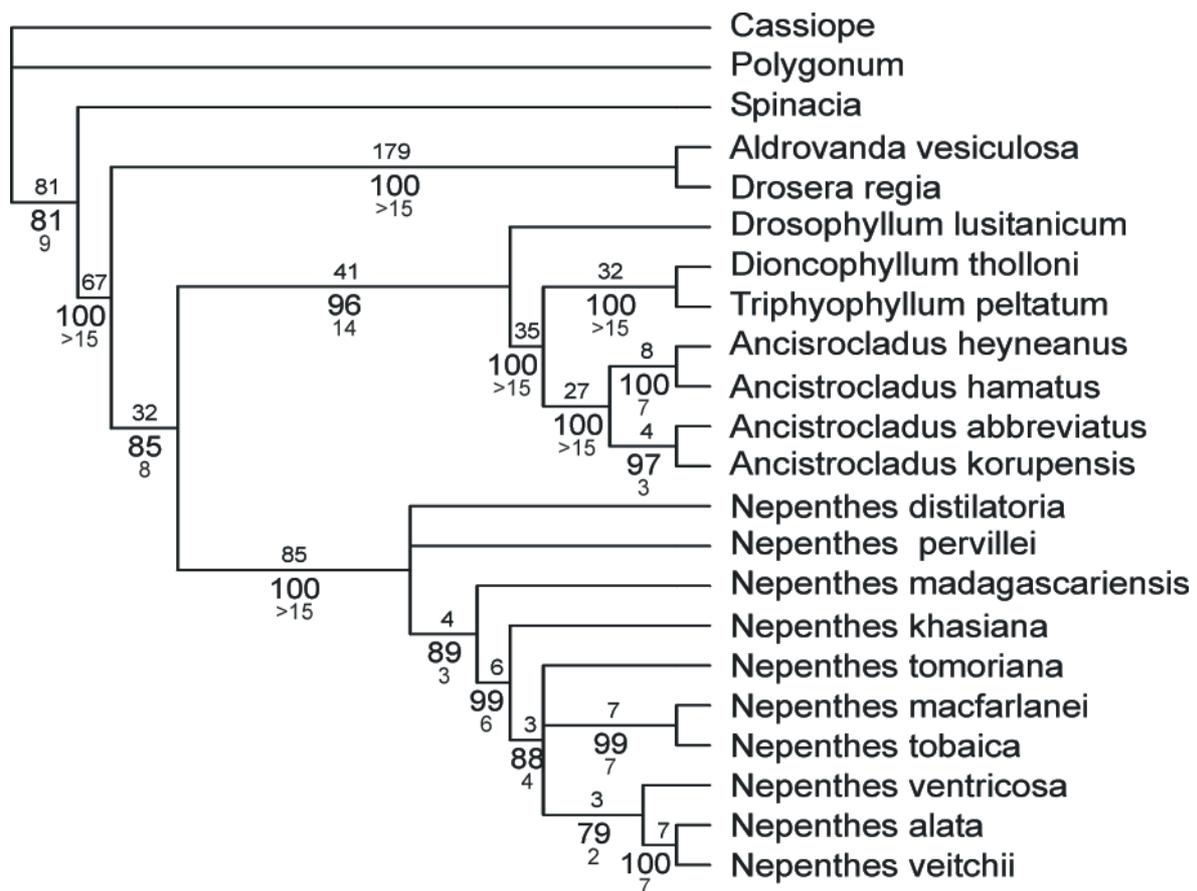


Abb. 23. Die trnK-Intron Phylogenie ausgewählter Taxa der Caryophyllidae. Gezeigt ist die Konsensus-Topologie aus 6 kürzesten Bäumen. Bootstrap-Werte sind unterhalb der Äste angegeben, Decay-Werte unter diesen. Die Anzahl der Mutationsschritte, die für die phylogenetische Rekonstruktion angenommen wurden, ist über den inneren Ästen angezeigt.

3.1.3 Phylogenetische Rekonstruktionen veröffentlichter Sequenzdaten der Caryophyllidae s. l.

Die meisten die Caryophyllidae s. l. betreffenden molekular-systematischen Untersuchungen wurden in einem großsystematischen Kontext bevorzugt mit Sequenzen von rbcL durchgeführt. Zur Überprüfung der matK-Phylogenie wurden aus veröffentlichten Sequenzen von rbcL und 18S rDNA Datenmatrizen erstellt und einzeln sowie mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Sequenzen kombiniert verrechnet. Die veröffentlichten Sequenzen und ihre Kennnummer in der Datenbank des NCBI sind in Tab. 8 aufgeführt. Auf Einbeziehung der atpB Daten (Savolainen *et al.*, 2000) wurde verzichtet, da hier keine Daten für die Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae vorlagen.

3.1.3.1 Phylogenetische Analyse von rbcL-Sequenzen

Die rbcL-Phylogenie unterscheidet sich in einigen Punkten von der matK-Phylogenie. Mit rbcL-Sequenzdaten ist eine Monophylie der carnivoren Taxa der Caryophyllidae nicht stützbare. Die relative Position dieser Taxa ist in den verschiedenen phylogenetischen Analysen unterschiedlich angegeben worden (vgl. Abb. 1). Eine Datenmatrix aus veröffentlichten rbcL-Sequenzen wurde in die Maximum-Parsimony-Analyse eingesetzt. Es wurden 27 Taxa berücksichtigt, darunter 9 Taxa, die nicht zu den in der matK-Phylogenie einbezogenen Caryophyllidae gehören (Tab. 8).

Tab. 8. Für die Maximum-Parsimony-Analyse von rbcL verwendete Sequenzen, Kennnummer der Datenbank des NCBI und die für die Alinierung verwendeten Sequenzpositionen. Für die kombinierte Analyse von rbcL- mit matK-Daten wurden in der matK-Phylogenie unberücksichtigte Taxa ausgeschlossen.

Taxon	Genebank-Accession	Position	Autor	Familie
<i>Buxus sempervirens</i>	gi6017846	29-1426	Hoot <i>et al.</i> , (1999)	Buxaceae
<i>Pachysandra procumbens</i>	gi7688747	15-1412	Xiang <i>et al.</i> , unveröffentlicht, (1999)	
<i>Simmondsia chinensis</i>	gi6017874	29-1426	Hoot <i>et al.</i> , (1999)	Simmondsiaceae
<i>Frankenia pulverulenta</i>	gi2814902	31-1428	Fay <i>et al.</i> , (1997)	Frankeniaceae
<i>Tamarix pentandra</i>	gi2815233	31-1428	Fay <i>et al.</i> , (1997)	Tamaricaceae
<i>Rhabdodendron amazonicum</i>	gi2815231	31-1428	Fay <i>et al.</i> , (1997)	Rhabdodendraceae
<i>Drosophyllum lusitanicum</i>	gi7240197	4-1401	Albert <i>et al.</i> , (1992)	Drosophyllaceae
<i>Triphyophyllum peltatum</i>	gi2814893	31-1428	Fay <i>et al.</i> , (1997)	Dioncophyllaceae
<i>Drosera regia</i>	gi7240213	4-1401	Albert <i>et al.</i> , (1992)	Droseraceae
<i>Drosera gigantea</i>	gi7240225	4-1401	Williams <i>et al.</i> , (1994)	
<i>Dionaea muscipula</i>	gi7240189	4-1401	Albert <i>et al.</i> , (1992)	
<i>Ancistrocladus korupensis</i>	gi2814899	31-1428	Fay <i>et al.</i> , (1997)	Ancistrocladaceae
<i>Nepenthes alata</i>	gi7240346	1-1398	Albert <i>et al.</i> , (1992)	Nepenthaceae
<i>Limonium spectabile</i>	gi2815241	31-1428	Fay <i>et al.</i> , (1997)	Plumbaginaceae
<i>Plumbago capensis</i>	gi169391	31-1428	Giannasi <i>et al.</i> , (1992)	
<i>Rheum x cultorum</i>	gi169831	31-1428	Giannasi <i>et al.</i> , (1992)	
<i>Armeria splendens</i>	gi3115195	7-1331	Lledo <i>et al.</i> , (1998)	
<i>Polygonum cuspidatum</i>	gi4587093	341-1738	Giannasi <i>et al.</i> , (1992)	Polygonaceae
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	gi11313	185-1582	Michalowski <i>et al.</i> , (1990)	Amaranthaceae
<i>Bougainvillea glabra</i>	gi336428	195-1592	Manhart unveröffentlicht, (1992)	Nyctaginaceae
<i>Portulaca grandiflora</i>	gi1196793	35-1432	Rettig <i>et al.</i> , (1992)	Portulacaceae
<i>Dillenia indica</i>	gi7240183	1-1398	Albert <i>et al.</i> , (1992)	Dilleniaceae
<i>Pieris formosa</i>	gi6561358	29-1400	Kron <i>et al.</i> , (1999)	Ericaceae
<i>Gaultheria miqueliana</i>	gi6561376	29-1428	Kron <i>et al.</i> , (1999)	
<i>Trochodendron aralioides</i>	gi7240475	3-1400	Albert <i>et al.</i> , (1992)	Trochodendraceae
<i>Lambertia inermis</i>	gi7240312	1-1397	Morgan und Soltis, (1993)	Proteaceae
<i>Clematis spec</i>	gi11066022	1-1321	Parkinson <i>et al.</i> unveröffentlicht, (1999)	Ranunculaceae

Die Datenmatrix enthielt 1398 Positionen, von denen 903 konstant, 187 variabel und nicht informativ und 308 variabel und potentiell phylogenetisch informativ waren. Die heuristische



Abb. 24. Topologie aus der Maximum-Parsimony-Analyse einer Alinierung von rbcL-Sequenzen verschiedener Taxa. Bootstrap- und Decay-Werte (fett hervorgehoben) sind unterhalb der Äste angegeben. Die Anzahl der Mutationsschritte, die für die phylogenetische Rekonstruktion angenommen wurden, ist über den inneren Ästen gezeigt. Die carnivoren Taxa sind in dieser Analyse monophyletisch, diese Monophylie ist aber nicht durch Bootstrap- und Decay-Werte gestützt.

Suche ergab einen kürzesten Baum mit 1245 Schritten, mit einem CI von 0,535 und einem RI von 0,529. Die carnivoren Taxa der Caryophyllidae erschienen monophyletisch und als Nachbargruppe zu den Tamaricaceae und Frankeniaceae. Diese Beziehungen waren nicht durch Bootstrap-Analyse gestützt und bildeten bereits in der Konsensus-Topologie der um einen Schritt längeren Bäume Polytomien (Decay-Wert 1). Nach Ausschluss einzelner Sequenzen, die als Außengruppen verwendet wurden, änderte sich die Baumstruktur. Nach Verrechnung

der Innengruppe gegen *Rhabdodendron amazonicum* wurden die Tamaricaceae und Frankeniaceae mit sehr großer Astlänge als Nachbargruppe zu *Drosophyllum lusitanicum* gezeigt. Mit einem solchen Datensatz erscheinen die carnivoren Taxa also paraphyletisch (Abb. 24).

In der rbcL-Phylogenie erschien die Sequenz von *Rheum x cultorum* (gi169831) innerhalb der Plumbaginaceae und die von *Plumbago capensis* (gi169391) innerhalb der Polygonaceae. Im Gegensatz zu dieser Anordnung entspricht eine weitere als *Plumbago capensis* (gi3115191) in der Datenbank des NCBI veröffentlichte Sequenz (bei der allerdings nur 50 % des rbcL-Gens vorliegen) zu 100 % der Rheum-Sequenz. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die Sequenzen des rbcL-Gens *Rheum x cultorum* (gi169831) und *Plumbago capensis* (gi169391) von den Autoren (Giannasi *et al.*, 1992) verwechselt wurden. Dieser Punkt spielt für die in der vorliegenden Arbeit behandelten Fragestellungen keine Rolle, zeigt aber auf, dass Verwechslungen von Taxa bzw. Sequenzen zu falschen Topologien führen können. In den folgenden Analysen wurden die beiden Sequenzen untereinander ausgetauscht.

3.1.3.2 Kombination der rbcL- und matK-Daten

Für den Vergleich zwischen rbcL- und matK-Daten wurden drei Matrizen erstellt, eine für matK, eine für rbcL und eine aus diesen beiden kombiniert. Diese enthielten jeweils 17 Taxa der Caryophyllidae, für die Daten für beide Genorte vorlagen.

Die rbcL-Matrix bestand aus 1398 Positionen, von denen 1013 konstant, 164 variabel und nicht informativ und 221 variabel und potentiell phylogenetisch informativ waren. Die Maximum-Parsimony-Analyse ergab einen kürzesten Baum mit 774 Schritten, einem CI von 0,627 und einem RI von 0,526. In der kürzesten Topologie wurde die Monophylie von Tamaricaceae und Frankeniaceae als Nachbargruppe zu *Drosophyllum lusitanicum* angezeigt. Die Analyse der rbcL-Matrix ergab einen kürzesten Baum, in dem die Tamaricaceae und Frankeniaceae als Nachbargruppe der carnivoren Taxa gezeigt wurden. Durch Erhöhung der Anzahl der in die Analyse eingehenden Taxa verschwindet also diese unwahrscheinliche Schwestergruppen-Beziehung zwischen *Drosophyllum lusitanicum* und den Tamaricaceae / Frankeniaceae. Durch Erhöhung der Anzahl der in einer Analyse einbezogenen Taxa lassen sich falsche Positionierungen, die aufgrund zufälliger Analogien entstehen, auflösen (*long branch attraction*; Wägele, 2000, S. 211-212).

Die für den hier angestellten Vergleich erstellte Datenmatrix für matK bestand aus 1131 Positionen, von denen 554 konstant, 223 variabel und nicht informativ und 354 variabel und potentiell phylogenetisch informativ waren. Die Maximum-Parsimony-Analyse ergab einen kürzesten Baum mit 1179 Schritten, einem CI von 0,683 und einem RI von 0,605. Die Topologie entspricht der Baumstruktur, wie sie sich bei der Analyse der 41 Taxa umfassenden Matrix ergab. Die Absicherung durch Bootstrap-Analyse ist allerdings teilweise geringer (Abb. 25).

Die kombinierte Datenmatrix aus rbcL und matK enthielt 2529 Positionen, von denen 1568 konstant, 388 variabel und nicht informativ und 573 variabel und potentiell phylogenetisch informativ waren. Die heuristische Suche ergab 2 kürzeste Bäume mit 1994 Schritten, einem CI von 0,646 und einem RI von 0,546. Entsprechend den Topologien der beiden einzelnen Datensätze (Abb. 25 A, B) ist die Position der Tamaricaceae und Frankeniaceae nicht in der Konsensus-Topologie angezeigt. In dem einem der beiden kürzesten Bäumen aus der kombinierten Analyse (Abb. 25 C) von rbcL und matK wird diese Monophylie als Nachbargruppe der Polygonaceae / Plumbaginaceae und in dem anderen als Nachbargruppe der carnivoren Taxa gezeigt. In diesem Punkt sind beide Datensätze nicht kongruent. Die Annahme der Tamaricaceae / Frankeniaceae als Nachbargruppe der Polygonaceae / Plumbaginaceae ist für die matK-Daten 2 Schritte kürzer als die Annahme der Tamaricaceae / Frankeniaceae als Nachbargruppe der Caryophyllales. Für die rbcL-Daten sind beide Möglichkeiten 2 Schritte länger als die kürzeste Topologie.

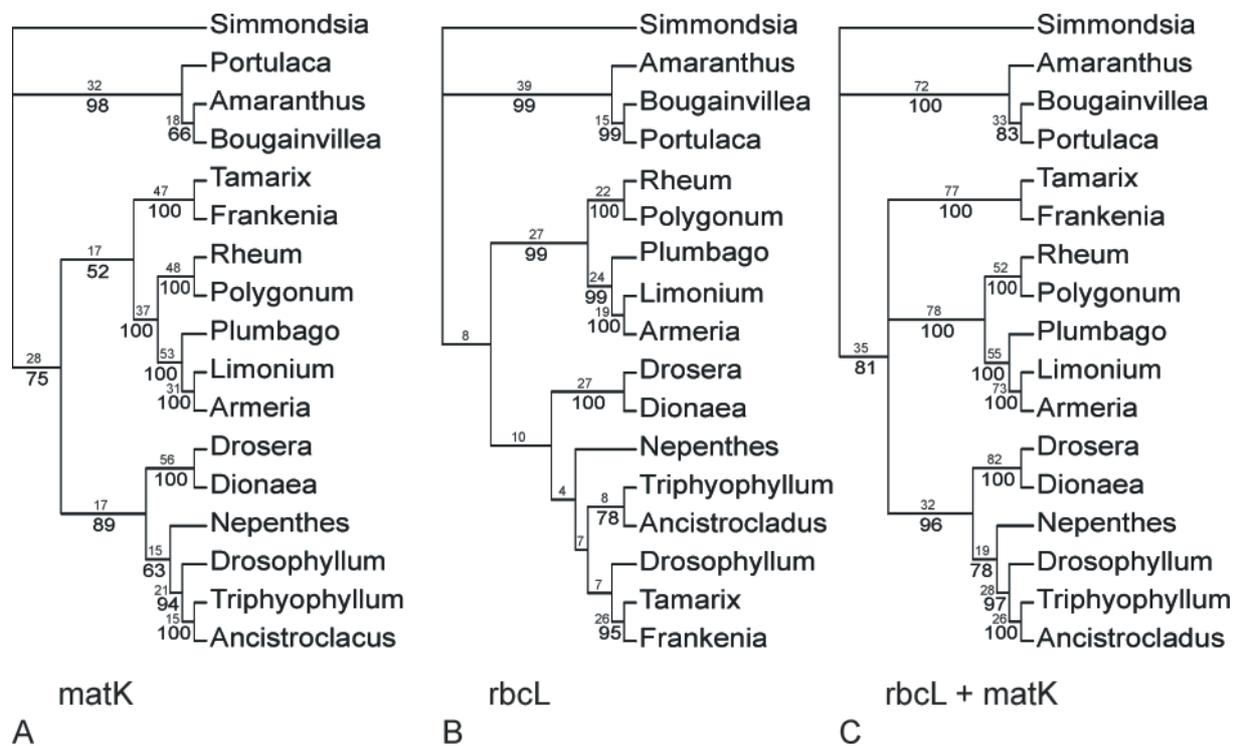


Abb. 25. Vergleich der Topologien von matK (A) rbcL (B) und den kombinierten Datensätzen (C). Im Fall A und B sind die jeweils kürzesten Bäume gezeigt mit 1179 Schritten bei matK und 774 Schritten bei rbcL. In C ist die Konsensus-Topologie aus zwei kürzesten Bäumen mit 1994 Schritten dargestellt. Über den inneren Ästen ist die Anzahl der für die Topologie angenommenen Mutationsschritte angegeben, unter den Ästen die Bootstrap-Werte.

Die Topologie innerhalb der carnivoren Taxa der matK-Phylogenie wird durch rbcL-Daten gestützt. Die Monophylie dieser Taxa ist in der Phylogenie beider Genorte angezeigt. Im

kombinierten Datensatz erhöht sich die Bootstrap-Unterstützung auf 96 gegenüber 89 in der matK Topologie und auf 78 für die basale Position der Droseraceae innerhalb der carnivoren Taxa gegenüber 63. Die Decay-Werte, die angeben bei welchen Schrittlängen in der Konsensus-Topologie eine Gruppierung kollabiert, erhöhen sich für die Monophylie der carnivoren Taxa nach der kombinierten Analyse auf 6 gegenüber 5 für matK und 2 für rbcL und für die Droseraceae als basale Gruppe erhöhen sie sich auf 2 gegenüber jeweils 1 für matK und rbcL. Die drei Topologien sind in Abb. 25 gezeigt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit sind sie mit *Simmondsia* als Wurzel dargestellt.

3.1.3.3 Vergleich der 18S rDNA- und matK-Phylogenie

Die für die Rekonstruktion der 18S rDNA-Phylogenie erstellte Datenmatrix bestand aus 13 Taxa. Im Vergleich zur rbcL-Datenmatrix blieben *Dionaea*, *Drosophyllum*, *Armeria* und *Amaranthus* unberücksichtigt. Die Alinierung enthielt 1683 Positionen, von denen 1531 konstant, 74 variabel und nicht informativ und nur 78 variabel und potentiell phylogenetisch informativ waren. Die Maximum-Parsimony-Analyse ergab einen kürzesten Baum mit 266 Schritten, einem CI von 0,718 und einem RI von 0,592. In der Topologie (Abb. 26 A) steht *Drosera* als Nachbargruppe der Plumbaginaceae und Polygonaceae, die carnivoren Taxa erscheinen dadurch polyphyletisch. Dies wird allerdings nicht durch Bootstrap-Analyse gestützt.

Die Kombination von 18S rDNA mit matK ergab eine Datenmatrix aus 2813 Positionen, von denen 1985 konstant, 464 variabel und nicht informativ und 364 variabel und potentiell phylogenetisch informativ waren. Die heuristische Suche ergab einen kürzesten Baum mit 1442 Schritten, einem CI von 0,776 und einem RI von 0,585. Die Bootstrap-Unterstützung der Monophylie der carnivoren Taxa nahm auf 66 gegenüber 77 der matK-Phylogenie dieser 13 Taxa ab. Die Unterstützung der Nepenthaceae als Nachbargruppe der Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae stieg aber von 70 auf 88.

Die Monophylie der Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae mit den Nepenthaceae wird durch die Phylogenie der 18S rDNA gestützt, die Monophylie aller carnivorner Taxa jedoch nicht. Die Bootstrap-Unterstützung in der Topologie der kombinierten Analyse ist für eine Monophylie der carnivoren Taxa geringer als in der matK-Phylogenie. In der Konsensus-Topologie der um einen Schritt längeren Bäume der 18S rDNA-Alinierung sind die Droseraceae als Polytomie zu der Monophylie aus den übrigen carnivoren Taxa angeordnet, die Position der Droseraceae in der 18S rDNA Phylogenie ist daher nicht gesichert.

Tab. 9. Für die phylogenetische Analyse der 18S rDNA verwendete Taxa und deren Quelle.

Taxon	Genebank-Accession	Position	Author	Familie
<i>Ancistrocladus korupensis</i>	gi7595366	24-1675	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Ancistrocladaceae
<i>Triphyophyllum peltatum</i>	gi7595569	21-1672	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Dioncophyllaceae
<i>Drosera capensis</i>	gi1777664	8-1660	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Droseraceae
<i>Frankenia pulverulenta</i>	gi7595434	18-1668	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Frankeniaceae
<i>Nepenthes spec.</i>	gi1777698	1-1651	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Nepenthaceae
<i>Bougainvillea glabra</i>	gi7595393	26-1678	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Nyctaginaceae
<i>Limonium arborescens</i>	gi7595473	39-1692	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Plumbaginaceae
<i>Rheum rhaponticum</i>	gi6706971	26-1686	Hoot et al., 1999	Plumbaginaceae
<i>Plumbago auriculata</i>	gi1777702	28-1681	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Plumbaginaceae
<i>Polygonum chinense</i>	gi1694920	12-1664	Chaw et al., 1997	Polygonaceae
<i>Portulaca grandiflora</i>	gi7595520	22-1674	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Portulacaceae
<i>Simmondsia chinensis</i>	gi6706975	25-1684	Hoot et al., 1999	Simmondsiaceae
<i>Tamarix pentandra</i>	gi7595553	14-1665	Soltis et al. unveröffentlicht, (1999)	Tamaricaceae

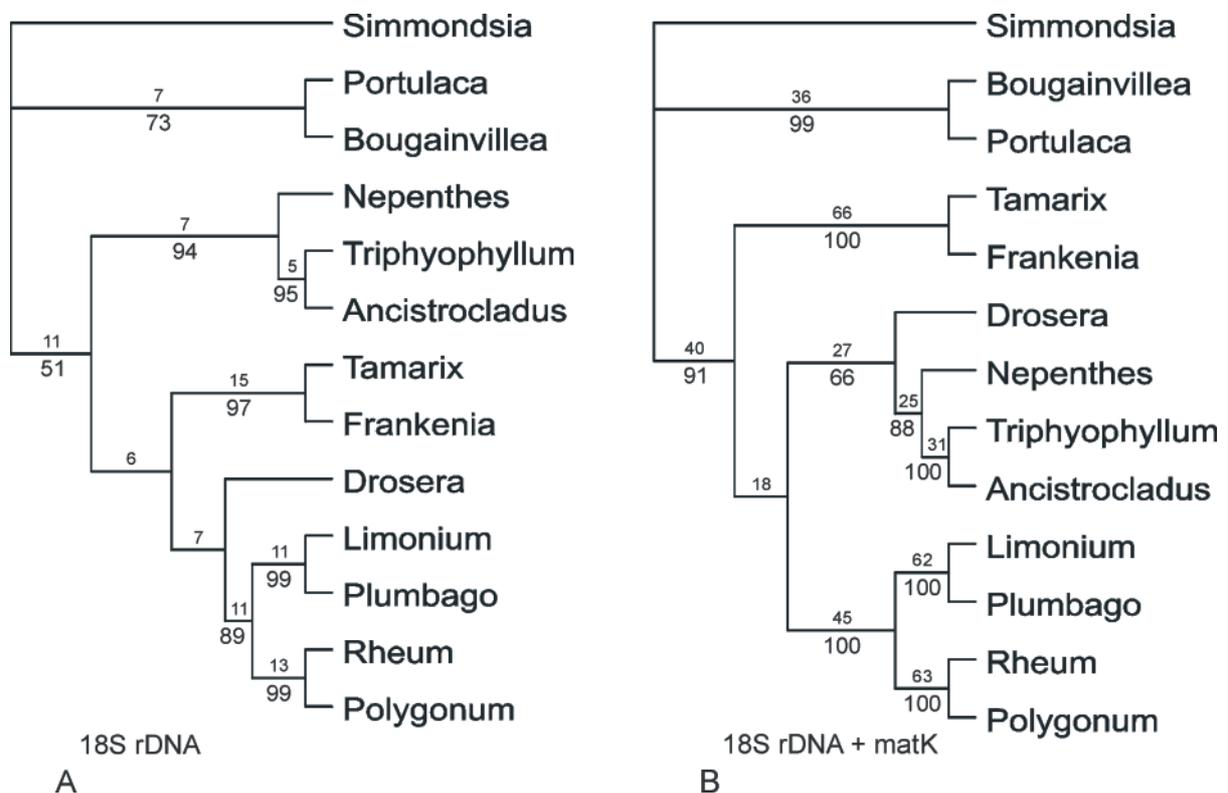


Abb. 26. Vergleich der Phylogenie von 18S und matK. A: kürzester Baum der 18S rDNA Alinierung aus 13 Taxa, B: kürzester Baum eines kombinierten Datensatzes aus 18S rDNA und matK. Oberhalb der Äste sind die zur Rekonstruktion der Phylogenie angenommenen Mutationsschritte und unterhalb die Bootstrap-Werte aus einer Analyse aus 1000 Replikaten angegeben. Die Bootstrap-Unterstützung des kombinierten Datensatzes für die Monophylie der carnivoren Taxa beträgt 66 und ist damit niedriger als die der matK-Phylogenie der betreffenden Taxa (77 nicht gezeigt). Die Position der Nepenthaceae ist mit 88 gegenüber 70 höher gestützt.

3.1.3.4 Vergleich der Variabilität von 18S rDNA, rbcL und matK

Die Variabilität von matK ist höher als die der anderen beiden Genorte. Bei matK sind 48% der Positionen der Alinierung aus 13 Taxa variabel. Bei rbcL sind dies 24% und bei der 18S rDNA nur 9% (Abb. 27). Als ribosomale DNA kodiert die 18S rDNA für ein RNA-Molekül, das aus Doppel- und Einzelsträngen aufgebaut ist. In der Regel sind die an Doppelsträngen beteiligten Abschnitte des Moleküls höher konserviert als die an Einzelsträngen beteiligten. Innerhalb der 18S rDNA wechseln daher einige wenige sehr variable Regionen mit stark konservierten ab (Nickrent und Soltis, 1995). In diesen variablen Regionen können Analogien gehäuft auftreten, vor allem zwischen evolutiv lange getrennten Gruppen, und für diese zu unspezifischen Signalen führen. In den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Datensätzen sind die in der Rekonstruktion der Phylogenie angenommenen Änderungen bei rbcL und matK mehr oder weniger gleichmäßig über die ganze Länge der Alinierung verteilt. In der 18S rDNA sind ausgeprägte Häufungen der Mutationsereignisse zu erkennen (Abb. 28). So finden sich hier in drei Regionen insgesamt 274 Positionen, in denen 168 Änderungen angenommen werden (Pos. 133-244: 62 Änderungen; Pos. 604-752: 78 Änderungen; Pos. 1318-1333: 28 Änderungen). Dies entspricht 63% der Mutationsschritte auf 16% der Länge der Alinierung. Für diese Regionen werden mit 0,6 Änderungen pro Base im Durchschnitt zehnmal so viele Mutationsschritte angenommen wie für den Rest des Moleküls mit 0,07 Änderungen pro Base. Die Einordnung von *Drosera* als Nachbargruppe zu den Polygonaceae / Plumbaginaceae könnte damit auf eine Häufung von Analogien in Positionen mit höherer Evolutionsgeschwindigkeit zurückzuführen sein. Von 7 in der kürzesten Topologie für diese Anordnung angenommenen potentiellen Apomorphien befinden sich 6 in den drei Bereichen hoher Variabilität.

3.1.4 Deletion des rpl2-Introns

Ein das rpl2-Intron enthaltender Abschnitt des rpl2-Gens wurde für 18 Taxa der Caryophyllidae amplifiziert. Die Primer wurden so gelegt, dass die Amplifikate mit rpl2-Intron ca. 1150 bp und ohne ca. 500 bp lang sein sollten, entsprechend der Chloroplasten-Genom-Sequenz von *N. tabacum* (gi2924257). Das Auftreten des rpl2-Introns bei den 18 Taxa wurde durch Agarose-Gel-Elektrophorese ermittelt (Abb. 29), was durch exemplarische Sequenzierung der Amplifikate von 4 ausgewählten Taxa verifiziert wurde.

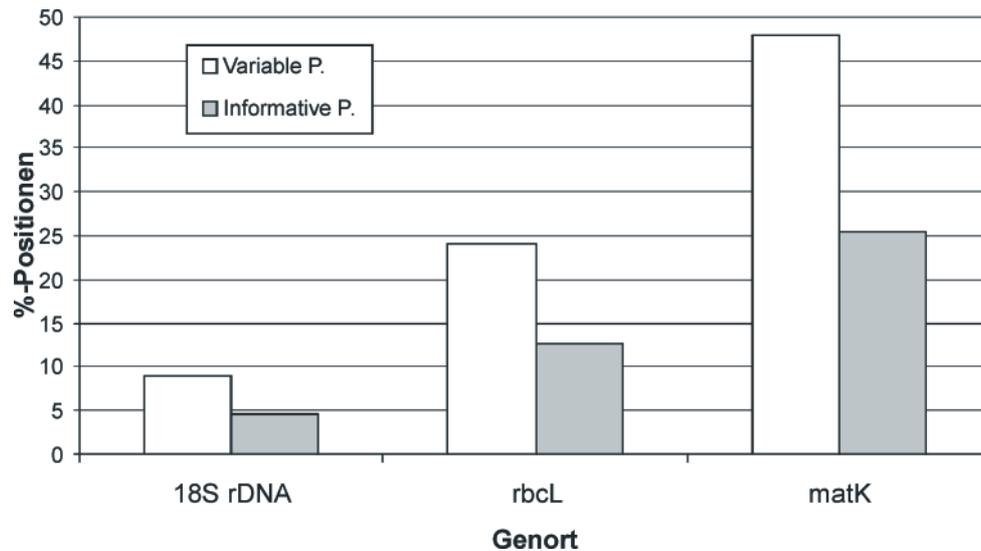


Abb. 27. Vergleich der Variabilität von matK, rbcL und 18S rDNA der Alinierung basierend auf 13 Taxa für die Daten verfügbar waren. Gezeigt ist der Anteil variabler (weiß) und potentiell phylogenetisch informativer Positionen (grau) in Prozent der Länge der Alinierung.

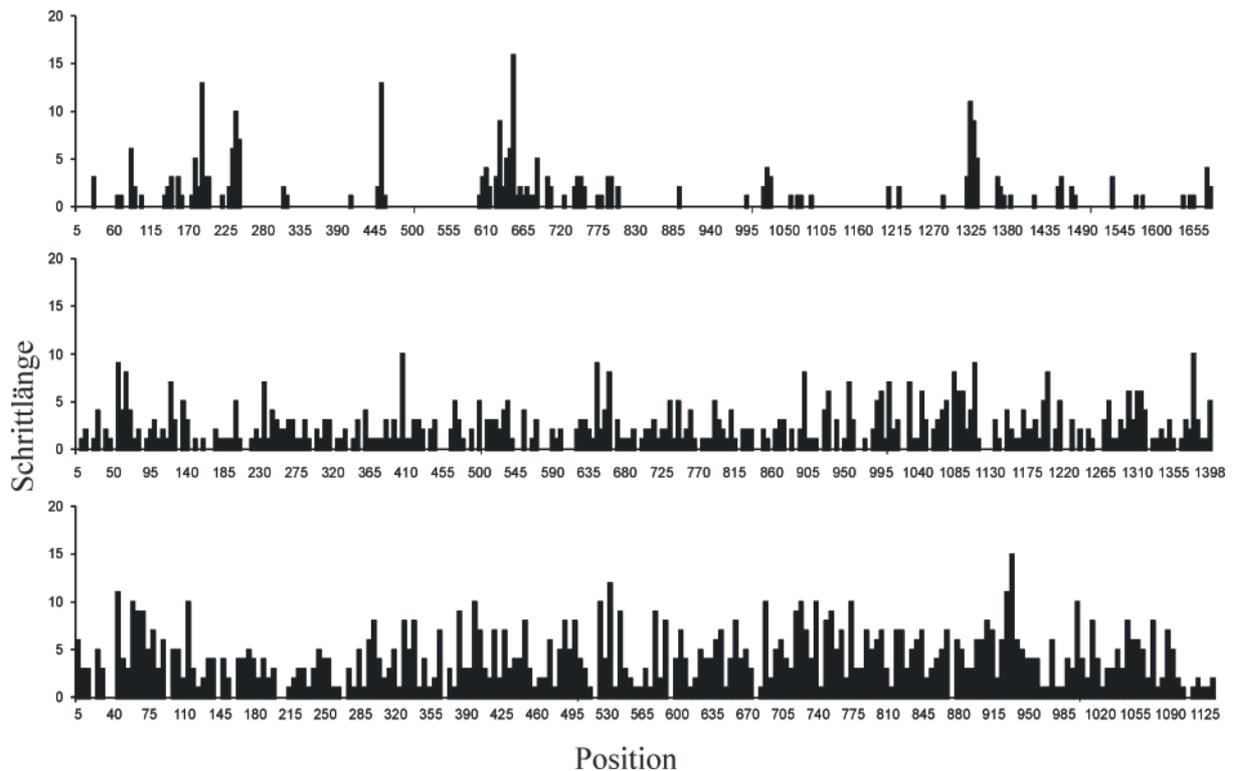


Abb. 28. Anzahl der für die Konstruktion der jeweils kürzesten Bäume angenommenen Mutationsschritte in Abhängigkeit der Position der Alinierung. Aufgetragen ist jeweils die Summe aus 5 Positionen bei 18S rDNA (oben), matK (Mitte) und rbcL (unten). Zugrunde gelegt wurde die Alinierung aus 13 Taxa für die Daten vorlagen. Auffällig ist die ungleichmäßige Verteilung der Mutationen in der 18S rDNA im Vergleich zu matK und rbcL.

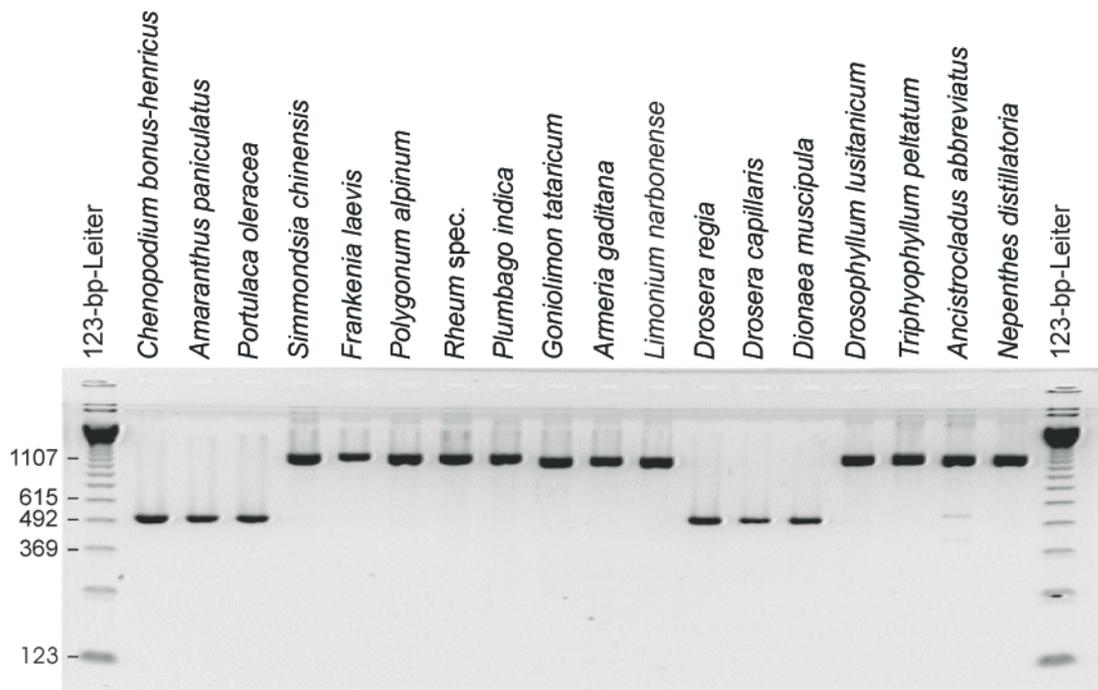


Abb. 29. Agarose-Gel-Elektrophorese von Amplifikationsprodukten des rpl2-Gens aus 18 Taxa der Caryophyllidae s. l. Von kurzen Amplifikaten wurde die Abwesenheit des Introns durch Sequenzierung nachgewiesen.

Die Amplifikation ergab bei 6 Taxa ein Produkt von ca. 500 bp und bei 12 Taxa eines von ca. 1000 bp. Das Ergebnis wurde dahingehend gedeutet, dass demnach bei 6 Taxa, nämlich den Caryophyllales und den Droseraceae das rpl2-Intron fehlt, jedoch bei den anderen Taxa, auch bei *Drosophyllum lusitanicum*, vorhanden ist. Die Sequenzierung des Amplifikats von 4 Taxa (*Chenopodium bonus-henricus*, *Portulaca oleracea*, *Dionaea muscipula* und *Drosera capillaris*) ergab, dass die deletierte Region dem rpl2-Intron von *N. tabacum* homolog ist und auch homolog zwischen diesen 4 untersuchten Taxa. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Arbeiten von Downie *et al.* (1991), die von den carnivoren Taxa nur jeweils einen Vertreter der Droseraceae und der Nepenthaceae einbezogen. Downie *et al.* (1991) begründen aufgrund des Fehlens des rpl2-Introns eine möglicherweise nahe Verwandtschaft der Droseraceae und Caryophyllales. Da aber nicht nur *Nepenthes distillatoria* sondern auch *Triphyophyllum peltatum* und *Drosophyllum lusitanicum* das Intron aufweisen, erscheint diese Deutung unwahrscheinlich. Sie würde auf eine polyphyletische Entstehung der Carnivorie durch Klebfallen von *T. peltatum* und *D. lusitanicum* auf der einen und den Droseraceae auf der anderen Seite bedeuten. Es scheint wahrscheinlicher, dass das rpl2-Intron innerhalb der Caryophyllidae zweimal verloren gegangen ist. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der vergleichenden Sequenzanalyse des matK-Gens.

3.2 ITS-Polymorphismus bei Nepenthaceae und Dioncophyllaceae

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem die Erstellung einer molekularen Phylogenie der Nepenthaceae und Ancistrocladaceae. Dazu sollten sowohl ein plastidären Marker als auch ein nukleärer Marker verwendet werden. Man wählt diesen kombinierten Ansatz, da Phylogenien von Markern unterschiedlicher Kompartimente aufgrund von unterschiedlichem *lineage sorting* und Introgressionen voneinander abweichen können (vgl. dazu z. B. Dolphin *et al.*, 2000).

Die Internal Transcribed Spacer (ITS1 und ITS2) der Wiederholungseinheit der ribosomalen DNA (rDNA) wird sehr häufig verwendet, um eine infragenerische Gliederung von Pflanzengruppen mittels molekularer Marker durchzuführen (Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995). Der Spacer ITS1 trennt die 18S rDNA von der 5,8S rDNA und der Spacer ITS2 die 5,8S von der 26S rDNA (vgl. Abb. 30). Diese drei rDNA-Abschnitte stellen die Transkriptionseinheiten für die ribosomale RNA (rRNA) dar, mit den Sedimentationskoeffizienten 18, 5,8 und 26, und sind aufgrund ihrer Funktion hochgradig konserviert (Kuzoff *et al.*, 1998). Sie bilden zusammen mit ITS1 und ITS2 eine Wiederholungseinheit, die sich tandemartig aus mehreren tausend Kopien innerhalb des Genoms zusammensetzt und als eine Einheit transkribiert wird. Diese Einheit wird anschließend prozessiert und die Spacer ITS1 und ITS2 abgetrennt. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass durch *concerted evolution* das Auftreten von Unterschieden in den einzelnen Einheiten verhindert wird, so dass beispielsweise nach Hybridisierungsereignissen nur ein rDNA-Typ erhalten bleibt (Baldwin *et al.*, 1995). Es gibt inzwischen eine Reihe von Beispielen, bei denen insbesondere für die Internal Transcribed Spacer das Auftreten paraloger Sequenzen nachgewiesen wurde. Bei Hybriden konnten durch Rekombination entstandene rDNA-Einheiten identifiziert werden, so beispielsweise bei somatischen Hybriden von *Nicotiana* und *Atropa* (Borisjuk, 1988), allopolyploiden Vertretern von *Microseris* (Van Houten, 1993), *Gossypium gossypioides* (Wendel *et al.*, 1995) und *Microthalapsi* (Mummenhoff *et al.*, 1997). Neben rekombinanten rDNA-Einheiten können verschiedene paraloge Sequenzen von ITS auch als Vertreter unterschiedlicher funktioneller Loci oder als Pseudogene auftreten (Buckler *et al.*, 1997). Auch nach *concerted evolution* können innerhalb einer Art verschiedene Individuen verschiedene ITS-Sequenzen aufweisen. Die Sequenzen wurden zwar homogenisiert, es wurden dabei bei verschiedenen Individuen verschiedene Sequenzen bevorzugt. Dies konnte für Vertreter der Winteraceae gezeigt werden (Suh *et al.*, 1993).

Aufgrund der Funktion, die ITS1 und ITS2 bei der Prozessierung der rRNA haben, blieb ihre Sekundärstruktur in der Evolution erhalten. Dementsprechend wurden in der ITS2-Sequenz Abschnitte erkannt, die innerhalb der Angiospermen konserviert sind und wahrscheinlich zur

Aufrechterhaltung der Sekundärstruktur dienen (HersHKovitz und Zimmer, 1996; Mai und Coleman, 1997). ITS1 enthält ein konserviertes Motiv (GGCRY (4-7 N) GYGYCAAGGAA), wobei die Basenfolge AAGGAA in der Regel ungepaart an einem inneren Loop lokalisiert ist (Liu und Schardl, 1994). Diese konservierten Abschnitte und ein Vergleich der Sekundärstrukturen können zur Identifikation von ITS-Pseudogenen und, mit Einschränkungen, zur Homologisierung verschiedener Paraloger herangezogen werden (Mayol und Rosselló, 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte die ITS-Region der Nepenthaceae und Ancistrocladaceae vergleichend sequenziert werden. Während dies bei den Ancistrocladaceae problemlos gelang, konnte bei den Nepenthaceae diese Region nicht als phylogenetischer Marker eingesetzt werden. Die Amplifikation von ITS führte bei den Nepenthaceae zur Koamplifikation von Pseudogenen, von denen die funktionelle Kopie nicht getrennt werden konnte.

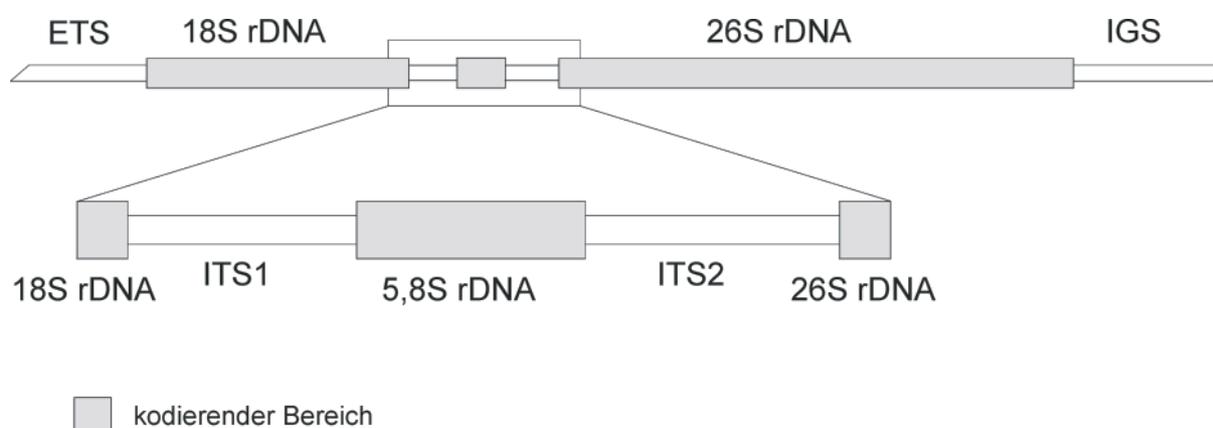


Abb. 30. Schematische Darstellung der Wiederholungseinheit der ribosomalen DNA. Die *Internal Transcribed Spacer* ITS1 und ITS2 trennen die für die 18S, 5,8S und 26S rDNA kodierenden Bereiche voneinander. Die 18S rDNA wird flankiert von einem *External Transcribed Spacer* (ETS). Die Wiederholungseinheiten werden durch einen intergenischen Spacer (IGS, auch *Nontranscribed Spacer* (NTS) genannt) voneinander getrennt.

3.2.1 Sequenzierung der ITS-Region bei *Nepenthes* mit Primern nach White *et al.* (1990)

Die Amplifikation des ITS-Bereichs mit Gesamt-DNA verschiedener *Nepenthes*-Arten mit den universellen Primern ITS1 und ITS4 nach White *et al.* (1990) führte zu reproduzierbaren PCR-Produkten aus 2 bis 5 Fragmenten von 550 bis 750 bp Länge. Die Fragmente waren bei höheren Annealing-Temperaturen und damit bei stringenteren Reaktionsbedingungen zu reproduzieren (vgl. Abb. 31). Direkte Sequenzierung einzelner ausgeschnittener Banden führte zu unleserlichen, weil überlagerten, Sequenzen. Es wurden daher nach PCR von *N.*

khasiana und *N. thorelii* mit den Primern ITS1 und ITS4 die Banden 550 bp und 600 bp bei *N. khasiana* sowie die Banden 550 bp, 600 bp und 750 bp bei *N. thorelii* ausgeschnitten, kloniert und einige positive Kolonien unidirektional sequenziert (Abb. 32). Als Kontrolle wurde eine Probe der Gattung *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) einbezogen, die aus einem anderen gleichzeitig durchgeführten Projekt zur Verfügung stand (Walter 1999).

Es wurden 6 Sequenzen ermittelt, diese in die einzelnen Bereiche der ITS-Region unterteilt und mit öffentlich zugänglichen Sequenzen der Datenbank des National Institute of Health (NCBI) verglichen. Dieser Vergleich erfolgte mit dem BLAST-Programm (Basic Local Alignment Search Tool) BLASTN 2.0.6 – 2.2.1 (Altschul *et al.*, 1997), das über die Homepage des NCBI zur Verfügung steht. Bei den ITS1- und ITS2-Abschnitten aller 6 Sequenzen konnte keine Übereinstimmung mit bekannten Sequenzen gefunden werden. Die 5,8S rDNA-Abschnitte stimmten wegen des höheren Konservierungsgrades erwartungsgemäß mit in der Datenbank des NCBI abgelegten Sequenzen überein (vgl. Abb. 33). Die 5,8S rDNA-Abschnitte aus der 600 bp Bande von *N. thorelii* und *N. khasiana* entsprachen Ascomyceten, die aus der 550 bp Bande von *N. thorelii* Basidiomyceten und die aus der 750 bp Bande von *N. thorelii* entsprachen Angiospermen. Bei der Klonierung der 550 bp-Bande von *N. khasiana* wurde nur ein kurzer Sequenzabschnitt ermittelt, der mit der Sequenz der 550 bp-Bande von *N. thorelii* übereinstimmte. Die zur Kontrolle, *Hippeastrum*, ähnlichste Sequenz hatte *Rodophiala bifida* (gi12024971). *Rodophiala* ist eine zu *Hippeastrum* nah verwandte Gattung aus der gleichen Familie Amaryllidaceae.

Das ca. 750 bp lange Produkt, das mit Gesamt-DNA von *N. thorelii* als Template gewonnen wurde, stellt wahrscheinlich das spezifische Produkt der Amplifikation dar. Die Sequenz umfasste ITS1 und die 5,8S rDNA. Die kürzeren Nebenprodukte stammen aller Wahrscheinlichkeit von Pilz-DNA, die die Gesamt-DNA kontaminiert. Da sowohl Produkte von Asco- wie auch von Basidiomyceten amplifiziert wurden, rührt diese Kontamination möglicherweise von epi- oder endophytischen Pilzen, die in oder auf den ausdauernden Blättern der *Nepenthaceae* wachsen. Solche Koamplifikationen sind auch in der Literatur beschrieben (Zhang *et al.*, 1997) und können, wie in einem Fall für den Einbau von Pilz-Sequenzen in eine Angiospermen-Phylogenie belegt, auch zu falschen Phylogenie-Annahmen führen (z. B. Smith und Klein, 1994; 1996). Daher wurden für die weiteren Arbeiten mit ITS spezifische Primer für Angiospermen abgeleitet.

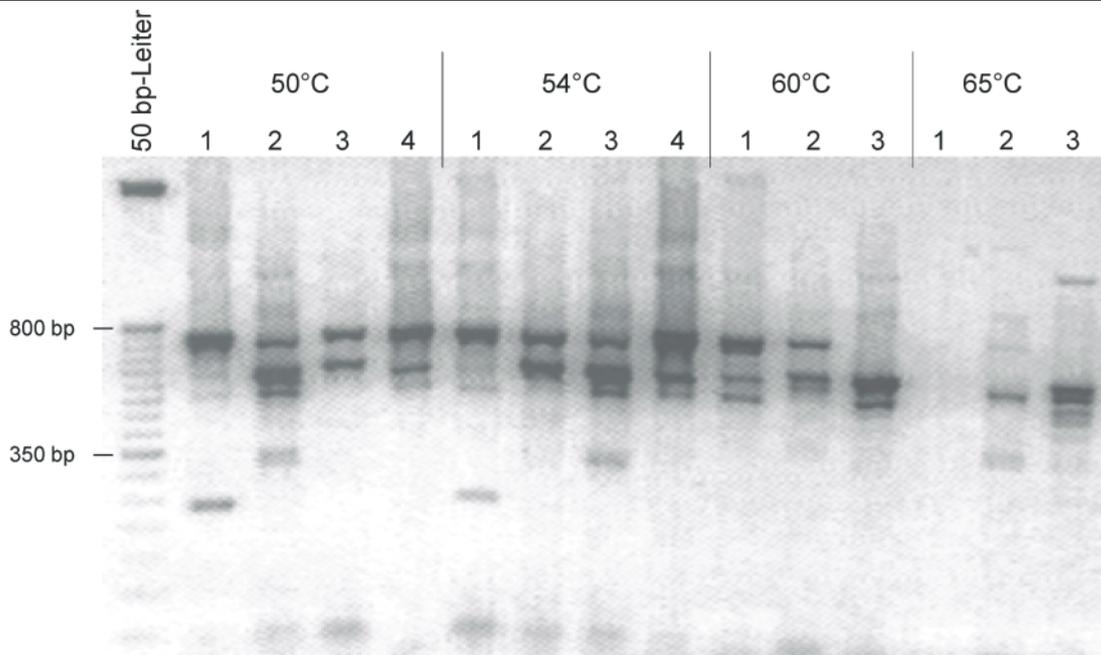


Abb. 31. Agarose-Gel-Elektrophorese (2% TAE-Agarose-Gel) von PCR-Produkten aus Amplifikationen mit dem Primerpaar ITS1 / ITS4 bei Annealing-Temperaturen zwischen 50 und 65°C. Als Template wurde die Gesamt-DNA von *N. distillatoria* (1), *N. khasiana* (2), *N. madagascariensis* (3) und *N. thorelii* (4) eingesetzt. Auch bei steigender Stringenz der PCR-Reaktion werden die Nebenprodukte amplifiziert. Dies deutet darauf hin, dass es sich um spezifische Produkte handelt (T_m ITS1: 55,3°C; T_m ITS4: 61°C).

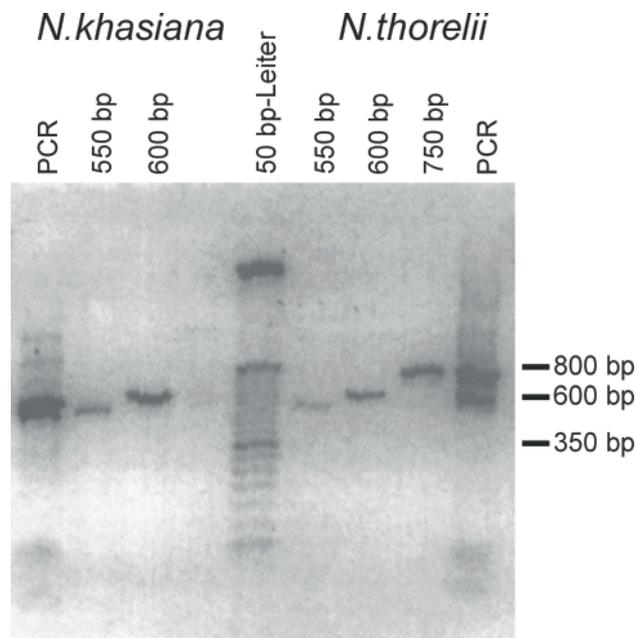
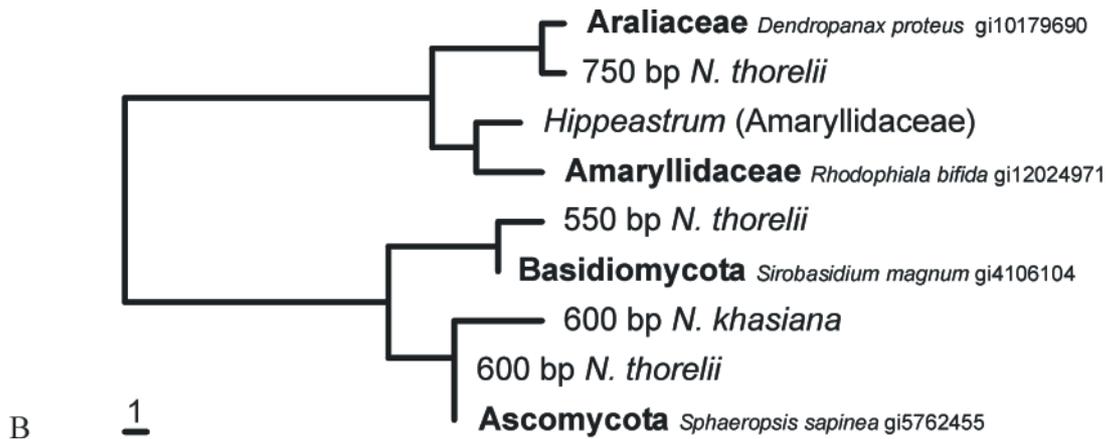


Abb. 32. Agarose-Gel-Elektrophorese (2% TAE-Agarose-Gel) der zur Ligation verwendeten Fragmente von *N. khasiana* und *N. thorelii* und die dazugehörigen PCR-Amplifikate aus Gesamt-DNA (je 1 µl der gereinigten Fragmente und 10 µl des PCR-Ansatzes und Markers auf einem 2% TAE-Agarose-Gel).

	Araliaceae <i>Dendropanax proteus</i> gi10179690	Amaryllidaceae <i>Rhodophiala bifida</i> gi12024971	Basidiomycota <i>Sirobasidium magnum</i> gi4106104	Ascomycota <i>Sphaeropsis sapinea</i> gi5762455
<i>Hippeastrum</i>	94,8	96,8	82,5	82,5
750 bp <i>N. thorelii</i>	98,7	92,9	78,6	77,9
600 bp <i>N. khasiana</i>	77,3	79,9	92,2	97,4
600 bp <i>N. thorelii</i>	86,8	88,7	96,2	100,0
550 bp <i>N. thorelii</i>	77,3	79,9	98,7	93,5

A



B

Abb. 33. Distanzen der, der 5,8S rDNA entsprechenden Abschnitte, der mit den Primern nach White et al. (1990) gewonnenen Produkte und Nebenprodukte von *N. thorelii* und *N. khasiana* zu in der Datenbank des NCBI veröffentlichten Sequenzen. A) durchschnittliche Distanzen in %, B) UPGMA-Dendrogramm aus absoluten Distanzen. Die kürzeren Nebenprodukte stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit von kontaminierenden Asco- und Basidiomyceten (vgl. auch Abb. 36).

3.2.2 Amplifikation der ITS-Region mit für Angiospermen spezifischen Primern

Durch Vergleich von veröffentlichten Sequenzen wurden für Angiospermen spezifische Primer abgeleitet. Es wurde jeweils eine Alinierung aus Sequenzen der 18S und 26S rDNA von Asco- und Basidiomyceten, von Chlorophyteen und von Vertretern der Angiospermen (Di- und Monocotyledonen) erstellt. Primer wurden von Positionen abgeleitet, an denen die Angiospermen-Sequenzen einheitlich waren und sich von den anderen Sequenzen unterschieden. Dabei wurden die Primer so gelegt, dass an ihrem 3'-Ende 3-5 Basen selektiv wirken konnten und beide Primer eine ähnliche Annealing-Temperatur hatten. Der Primer AITS1 (T_m 55,9°C) liegt ca. 30 bp oberhalb des Primers ITS1 in der 18S rDNA, der Primer AITS4 (T_m 57,9°C) liegt ca. 80 bp unterhalb ITS4 in der 26S rDNA. Die Amplifikate waren dadurch 800-900 bp lang.

Diese Primer wurden für alle die ITS-Region betreffenden Untersuchungen verwendet. Direktes Sequenzieren von PCR-Produkten aus Gesamt-DNA von Vertretern der Ancistro-

cladaceae ergab gute und lesbare Sequenzen. Dagegen waren die Sequenzen von PCR-Produkten aus Gesamt-DNA von Vertretern der Nepenthaceae und der Dioncophyllaceae in jedem Fall stark überlagert und nur sehr eingeschränkt lesbar. Zwar konnten in einigen Fällen Sequenzen ermittelt werden, diese hatten jedoch einen hohen Anteil an Basen, die wegen Doppelsignalen nicht aufgelöst werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass bei den Nepenthaceae unterschiedliche Paraloge oder Pseudogene für die rDNA vorliegen.

Nach Baldwin *et al.* (1995) kann durch die Verwendung von jungem Pflanzenmaterial zur DNA-Isolierung die Lesbarkeit der Sequenzen verbessert werden. Dies wurde mit *Nepenthes pervillei*, *N. tobaica* und *Triphyophyllum peltatum* durch Verwendung des jeweils jüngsten Blattes des Vegetationspunktes durchgeführt. Da hierbei der Vegetationspunkt zerstört werden muss, konnten für diesen Versuch nur sehr wenige Arten verwendet werden. Die Sequenzierung aus dem PCR-Produkt aus diesem Material ergab für *N. pervillei* und *T. peltatum* gut lesbare und für *N. tobaica* eingeschränkt lesbare Sequenzen. Die Sequenzen ließen sich mit *Ancistrocladus*-Sequenzen alinieren. Die 5,8S rDNA entsprach bis auf 1 Position bei *T. peltatum* und bis auf 3 Positionen bei *N. pervillei* der 5,8S rDNA von *Ancistrocladus*. Für *N. tobaica* und *N. pervillei* lag die 5,8S rDNA nicht vollständig vor.

Nach Buckler *et al.* (1997) ist unter Standardbedingungen der PCR eine bevorzugte Amplifikation von Pseudogenen mit einer weniger stabilen Sekundärstruktur möglich. Die Lesbarkeit der Sequenzen verbesserte sich allerdings nicht durch den Zusatz von Formamid und von DMSO in einer PCR, wodurch unter denaturierenden Bedingungen die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen verhindert wird. Dieser Versuch wurde mit verschiedenen Konzentrationen bis maximal 10% DMSO oder 1% Formamid Zusatz zum Standard-PCR Ansatz bei *N. lamii* durchgeführt.

Das PCR-Produkt aus der Gesamt-DNA verschiedener *Nepenthes*-Arten wurde kloniert um die in einer Reaktion amplifizierten paralogen ITS-Typen zu separieren. Nach Transformation wurden Inserts positiver Klone sequenziert und die Sequenzen aliniert und analysiert. Insgesamt wurden von *N. distillatoria* 3, von *N. khasiana* 2, von *N. lamii* 11, von *N. ampullaria* 8 und von *N. boschiana* 17 Sequenzen erhalten. Die paarweisen durchschnittlichen Distanzen zwischen diesen Sequenzen betragen zwischen 0 und 29,7 %. Der Vergleich aller möglichen paarweisen Distanzen ergab ca. 100 Sequenzpaare bei denen die Zahl variabler Positionen unter 3 % lag und ca. 600 mit über 19 % variable Positionen. Zwischen diesen beiden Werten wurde nur 1 Sequenzpaar mit 4 % und 4 Sequenzpaare mit 14 bis 15 % variablen Positionen festgestellt (vgl. Abb. 34). Das Fehlen von Sequenzpaaren mittlerer Distanz deutet darauf hin, dass beide Gruppen verschiedenen Grundgesamtheiten angehörten. Alle Sequenzen mit geringer Distanz zueinander stammten immer aus der Klonierung des gleichen PCR-Produkts. Bei einer Distanz von weniger als 3% wurden sie zu Konsensus-Sequenzen zusammengefasst (vgl. Abb. 35). Sequenzen aus durch Klonierung vereinzelt Amplifikaten können aufgrund

von Fehlern der Taq-Polymerase an einzelnen Positionen unterschiedliche Basen aufweisen. Außerdem weichen einzelne Kopien funktioneller rDNA-Loci trotz *concerted evolution* leicht voneinander ab. Die Sequenzierung aus dem PCR-Produkt stellt die Erfassung einer Konsensus-Sequenz aus ähnlichen Sequenzen dar, da Basen, die von der Mehrheit der Kopien abweichen, wegen der geringeren Signalstärke nicht erkannt werden. Bei der Sequenzierung von vereinzelt Kopien werden diese Abweichungen erkannt (Jobst *et al.*, 1998).

Anhand der Konsensus-Sequenzen wurde die Anzahl der verschiedenen Typen für die ITS-Region bei *Nepenthes* bestimmt. Die Sequenz von *N. boschiana* Klon 13 wurde als eigener Typ beibehalten, da diese Sequenz von allen benachbarten Sequenzen mit Distanzen von 2-3 % getrennt wird. Insgesamt konnten bei den 5 Arten von *Nepenthes* 14 verschiedene Typen der ITS-Region identifiziert werden und zwar für *N. khasiana* und *N. distillatoria* jeweils ein Typ und für *N. ampullaria*, *N. lamii* und *N. boschiana* jeweils 4 Typen. Diese Sequenztypen unterscheiden sich untereinander in mehr als 20 % der Positionen, mit Ausnahme eines Unterschiedes von 3 % zwischen *N. boschiana* Typ 3 und *N. boschiana* Typ 4.

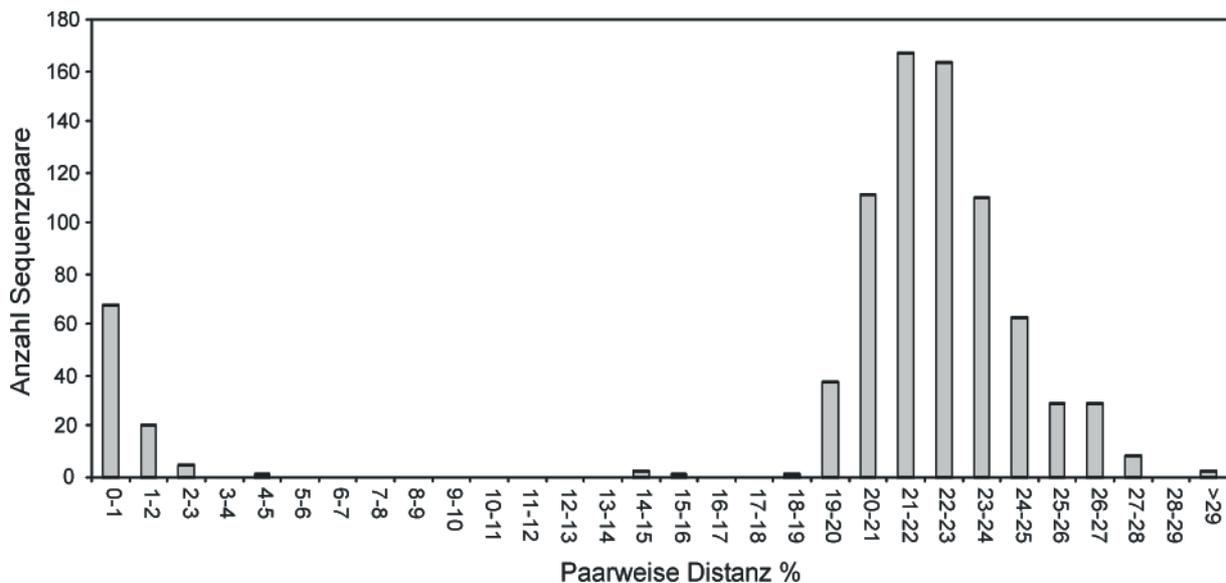
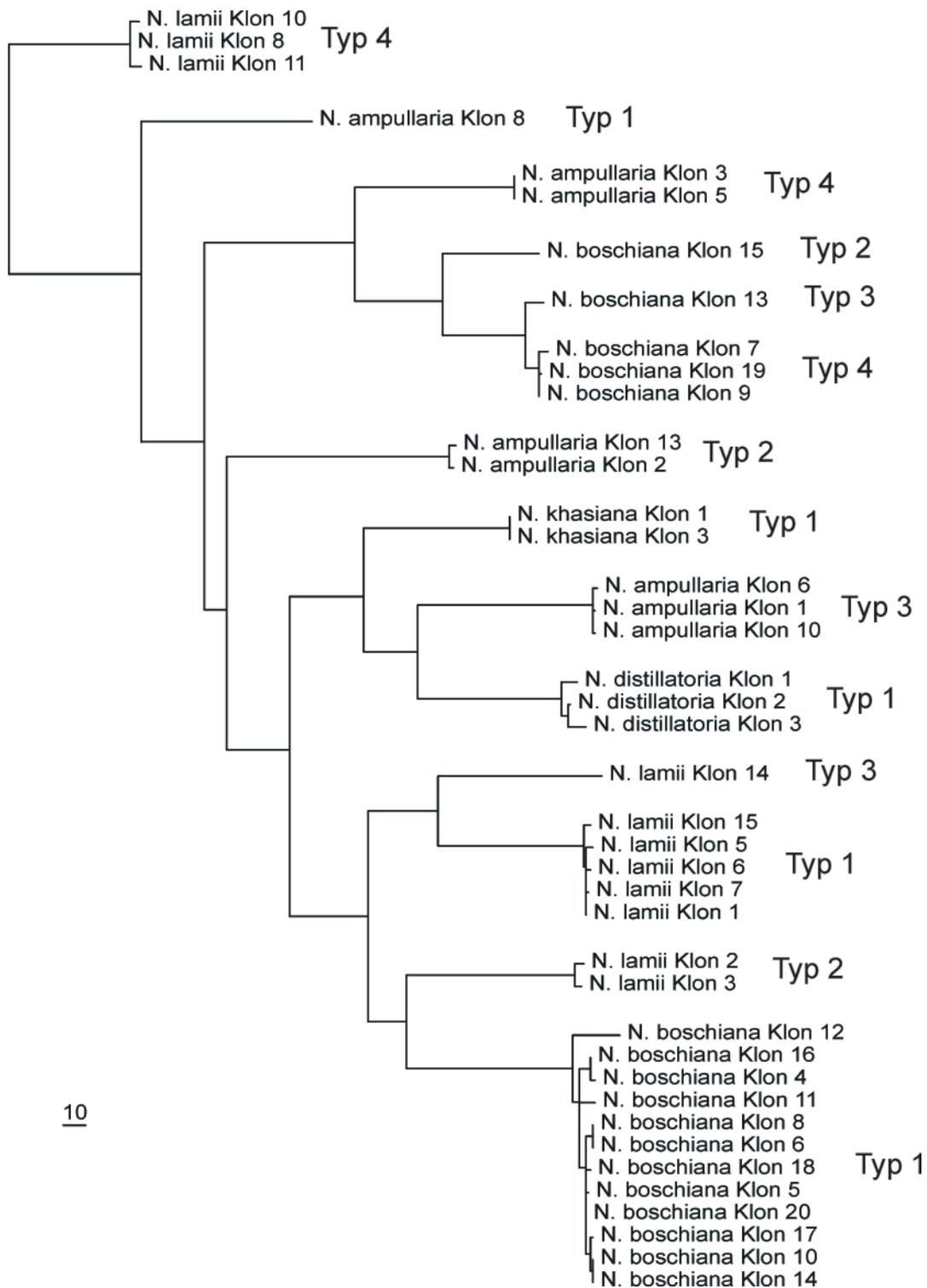


Abb. 34. Häufigkeiten aller paarweisen Distanzen der Alinierung der nach Klonierung ermittelten ITS-Sequenzen von 5 *Nepenthes*-Arten.



10

Abb. 35. UPGMA-Dendrogramm paarweiser Distanzen der Alinierung aller durch Klonierung gewonnener Sequenzen von ITS von 5 *Nepenthes*-Arten. Ähnliche Sequenzen wurden zu Konsensus-Sequenzen zusammengefasst, deren Bezeichnung sich aus dem jeweiligen Namen des verwendeten Taxons und der an den terminalen Ästen gezeigten Typennummerierung zusammensetzt. Die Astlängen entsprechen der Anzahl von Mutationsschritten, die nach Parsimony-Kriterien für diese Topologie angenommen werden.

3.2.3 Nachweis von ITS-Pseudogenen in *Nepenthes*

3.2.3.1 Phylogenetische Analyse der 5,8S rDNA

Bei den durch Klonierung gewonnenen Sequenzen der ITS-Region von *Nepenthes* konnte es sich ähnlich wie bei den Amplifikationen mit dem Primerpaar ITS1 / ITS4 nach White *et al.* (1990) um Kontaminationen mit DNA anderer Organismengruppen handeln. Daher wurde eine Alinierung erstellt, die die 5,8S rDNA veröffentlichter und eigener Sequenzen aus unterschiedlichen systematischen Großgruppen enthielt. In diese Alinierung wurden die zu der 5,8S rDNA homologen Bereiche der aus der Klonierung ermittelten Sequenztypen des ITS-Bereichs von *Nepenthes* einbezogen. Diese Alinierung wurde als Grundlage für eine phylogenetische Analyse verwendet. In die Alinierung wurden auch Produkte aus der Amplifikation mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 einbezogen, nämlich das 600 bp lange Produkt von *N. khasiana*, das 550 bp lange Produkt von *N. thorelii* und das 750 bp lange Produkt von *N. thorelii* (vgl. Kapitel 3.2.1). Für die aus direkter PCR aus DNA von jungem Pflanzenmaterial gewonnenen Sequenzen von *N. pervillei* und *N. tobaica* lag die 5,8S rDNA nicht vollständig vor. Die Alinierung bestand aus insgesamt 54 verschiedenen Sequenzen und 164 Positionen. Davon waren 37 konstant, 34 variabel und nicht informativ und 93 variabel und potentiell phylogenetisch informativ. Tab. 10 zeigt die hierbei verwendeten Sequenzen, die systematische Stellung der Organismen, aus denen Sie gewonnen wurden und Kenn-Nummern, wenn sie in der Datenbank des NCBI abgelegt sind.

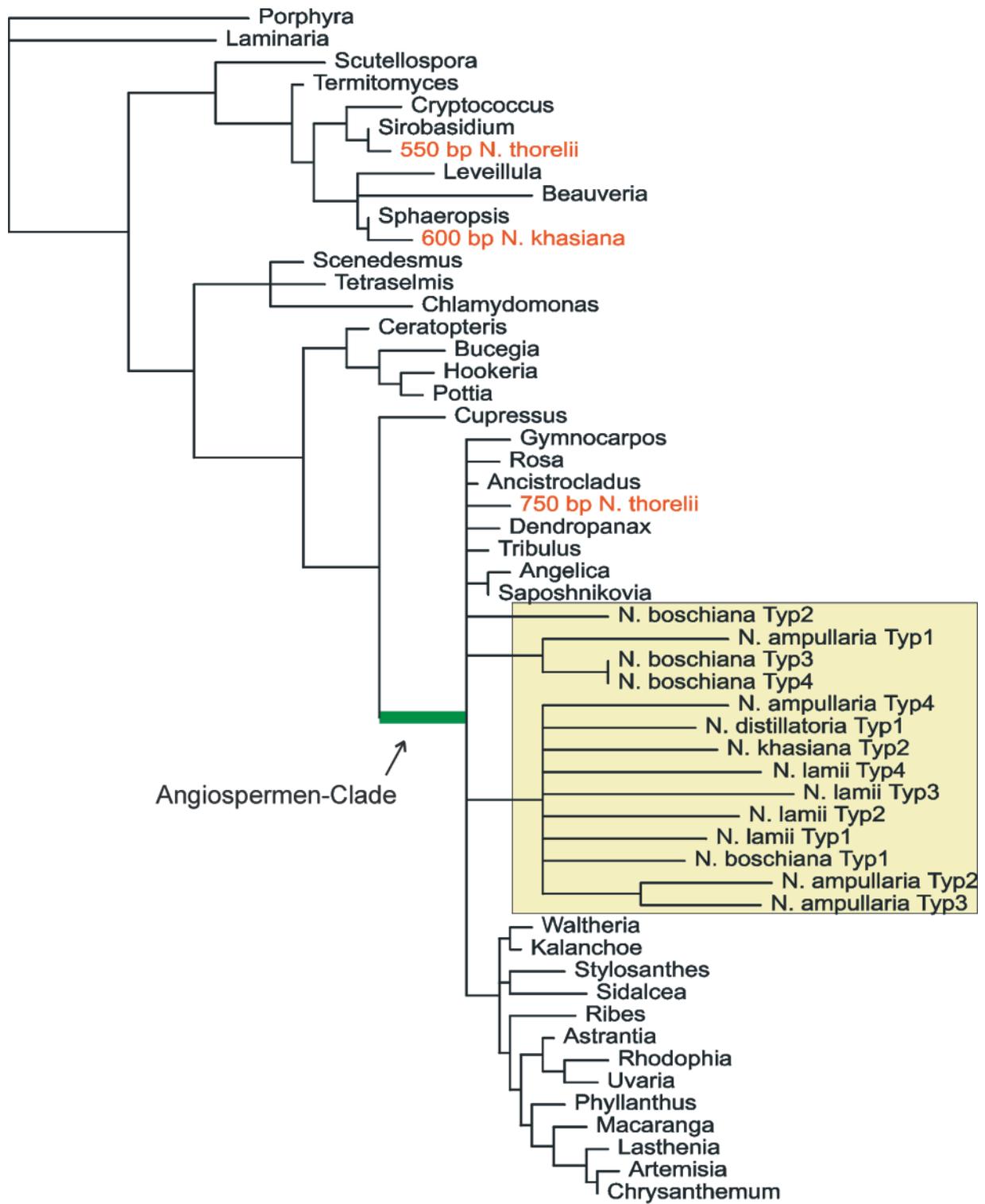
Die heuristische Suche mit PAUP ergab für diese Alinierung 98 kürzeste Bäume aus 477 Schritten, mit einem CI von 0,463 und einem RI von 0,660. Die Konsensus-Topologie ist in Abb. 36 als Phylogramm gezeigt. Wegen der langen Berechnungsdauer wurde auf eine Bootstrap-Analyse verzichtet. Die Struktur des Baums spiegelt die großsystematische Gliederung im Großen und Ganzen wider, bei Verwendung von Braun- und Rotalgen als Außengruppen. Die durch Klonierung gewonnenen Sequenzen von *Nepenthes* bilden zusammen mit allen anderen Angiospermen-Sequenzen eine Monophylie. Bei ihnen handelt es sich also nicht um Kontaminationen mit Pilzen oder Algen. Wie im Phylogramm erkennbar, werden die *Nepenthes*-Sequenzen mit einer höheren Anzahl von Mutationsschritten von den Angiospermen getrennt als diese untereinander. So liegt die paarweise Distanz, mit denen sich die einzelnen *Nepenthes*-Sequenzen von denen der Angiospermen unterscheiden, zwischen 8,3 % und 23 % (Mittelwert (MW) = 14,8 Standardabweichung (Stabw) = 3,11). Dies ist durchschnittlich etwa 3 mal mehr als die Distanz zwischen den Angiospermen untereinander von 0,6 bis 9 % (MW = 4,8 %, Stabw = 1,7). Die Höhe der paarweisen Distanzen zwischen den Sequenzen von *Nepenthes* und den übrigen Angiospermen entspricht damit in etwa der Distanz zwischen den Sequenzen der in der Alinierung berücksichtigten Farne und Moose und den Angiospermen und ist höher als die Distanz zwischen *Cupressus* und den Angio-

spermen (vgl. Abb. 37). Diese Beobachtung weist auf eine erhöhte Mutationsrate der 5,8S rDNA der verschiedenen für die Nepenthaceae ermittelten Sequenzen gegenüber den als Vergleichsproben einbezogenen Taxa hin.

Tab. 10. Die für die phylogenetische Analyse der 5,8S rDNA verwendeten Taxa, die als Vergleich für die durch Klonierung ermittelten Sequenzen herangezogen wurden. Außer den hier genannten Taxa wurden die in Kapitel 3.2.1 angeführten Sequenzen in die Analyse einbezogen. Die Bezeichnung der taxonomischen Kategorie richtet sich nach der Nomenklatur unter der die jeweiligen Sequenzen bei NCBI abgelegt sind.

	Taxon	Quelle
Angiospermae	<i>Waltheria. indica</i>	Eigene Daten
	<i>Artemisia scoparia</i>	Eigene Daten
	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	Eigene Daten
	<i>Tribulus terrestris</i>	Eigene Daten
	<i>Astrantia major</i>	Eigene Daten
	<i>Phyllanthus amarus</i>	Eigene Daten
	<i>Angelica dahurica</i>	Eigene Daten
	<i>Ancistrocladus spec. KS1</i>	Eigene Daten
	<i>Dendropanax proteus</i>	gi10179690; Wen et al., 2001
	<i>Rhodophiala bifida</i>	gi12024971; Meerow et al., 2000
	<i>Macaranga lamellata</i>	gi12311774; Blattner et al., 2001
	<i>Gymnocarpus decandrus</i>	gi13624671; Oxelman et al., 2001*
	<i>Sidalcea malviflora</i>	gi14348935; Andreassen und Baldwin, 2001
	<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	gi14575644; Yang et al., 2001*
	<i>Lasthenia leptalea</i>	gi15636727; Desrochers und Dodge, 2001*
	<i>Stylosanthes sympodialis</i>	gi15722444; Van der Stappen et al., 2001*
	<i>Rosa sempervirens</i>	gi15823574; Wu et al., 2000*
<i>Uvaria pierreii</i>	gi16755762; Meade, 2001*	
<i>Kalanchoe rhombopilosa</i>	gi8250372; Gehrig et al., 2001	
<i>Ribes spicatum</i>	gi9844750; Fenton et al., 2000	
Gymnospermae	<i>Cupressus montana</i>	gi1421760; Klein und Li, 1996*
Filicophyta	<i>Ceratopteris thalictroides</i>	gi12802160; Liu und Lin, 1999*
Bryophyta	<i>Hookeria lucens</i>	gi12053748; Capesius und Bloecher, 2000*
	<i>Pottia truncata</i>	gi3688522; Capesius, 1998
Marchantiophyta	<i>Bucegia romanica</i>	gi8670753; Capesius und Bloecher, 1999*
Chlorophyta	<i>Chlamydomonas spec.</i>	gi14140034; Pawlowski et al., 2001
	<i>Tetraselmis striata</i>	gi21967; Walter und Melkonian, 1993
	<i>Scenedesmus acutus</i>	gi6625507; van Hannen und Lurling, 1999*
Ascomycota	<i>Leveillula lanuginosa</i>	gi16904574; Khodaparast und Tajamatsu, 2000*
	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	gi5762455; Adams et al., 1999*
	<i>Beauveria bassiana</i>	gi619637; Shih et al., 1995
Basidiomycota	<i>Termitomyces spec.</i>	gi16519391; Taprab und Ohkuma, 2001*
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	gi6467893; Frases et al., 1999*
	<i>Sirobasidium magnum</i>	gi4106104; Chen, 1998*
Zygomycota	<i>Scutellospora persica</i>	gi16945531; Lanfranco, 2001*
Phaeophyceae	<i>Laminaria spec.</i>	gi15485674; Antoine, 2001*
Rhodophyta	<i>Porphyra umbilicalis</i>	gi15425557; Antoine, 2001*

*Nur in der Datenbank des NCBI veröffentlicht



_1

Abb. 36. Konsensus-Topologie der kürzesten Bäume der Maximum-Parsimony-Analyse der 5,8S rDNA ausgewählter Taxa und der für die Nepenthaceae ermittelten Sequenzen, einschließlich, der mit den Primern nach White *et al.* (1990) gewonnenen Produkte und Nebenprodukte von *N. thorelii* und *N. khasiana* (rot hervorgehoben; vgl. Kapitel 3.2.1). Die vermutlich Pseudogen darstellenden Sequenzen sind mit hohen Schrittlängen innerhalb der Monophylie der Angiospermen positioniert (gelb hervorgehoben).

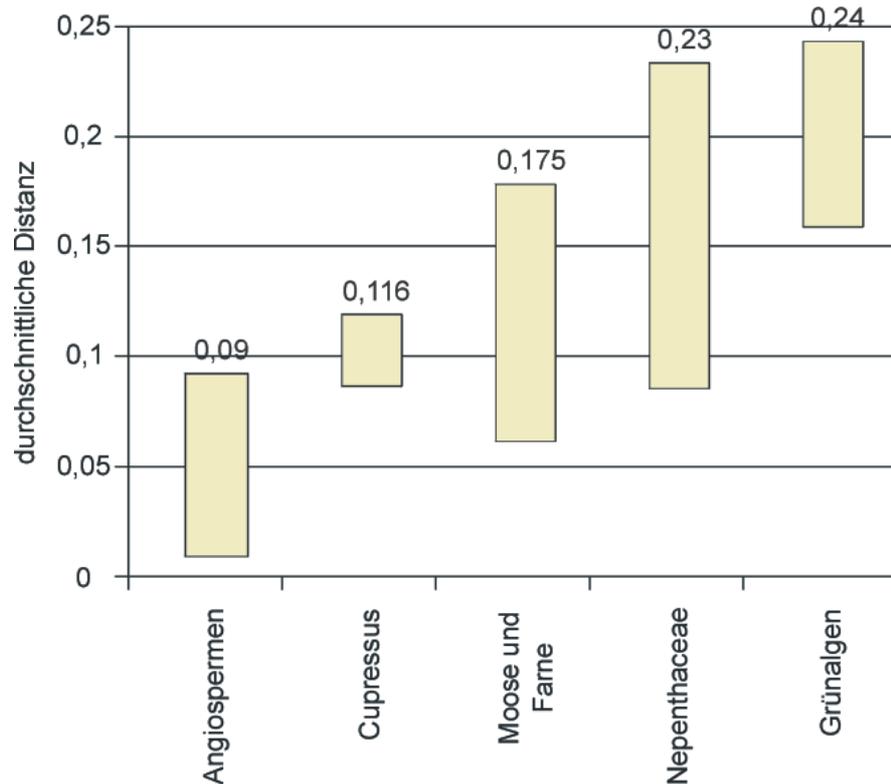


Abb. 37. Paarweise durchschnittliche Distanz der 5,8S rDNA verschiedener Gruppen zur 5,8S rDNA der untersuchten Angiospermen, ohne *Nepenthes*. Im Diagramm ist der Bereich zwischen minimalem und maximalem Wert in der entsprechenden Distanzmatrix angegeben. Distanzen zwischen den für *Nepenthes* ermittelten Sequenzen zu denen der übrigen Angiospermen sind höher als die zwischen den Angiospermen und den Moosen und Farnen.

3.2.3.2 Sekundärstruktur von ITS2

Die rDNA kodiert für RNA die zum Aufbau der Ribosomen verwendet wird. Daher ist die Sekundärstruktur dieser Moleküle in einem hohen Maße konserviert. Dies gilt eingeschränkt auch für die transkribierten Spacer, die eine bestimmte Struktur aufweisen müssen, um erfolgreich prozessiert werden zu können (van der Sande *et al.*, 1992; Van Nues *et al.*, 1995). In der Vorläufer-rRNA (pre-rRNA) bilden in einem für Hefe aufgestellten Modell das 3'-Ende der 5,8S rRNA und das 5'-Ende der 26S rRNA den sogenannten *proximal stem* (Yeh und Lee, 1990). Es handelt sich dabei um eine, an zwei Stellen durch jeweils ein ungepaartes Nukleotid unterbrochene Helix, die dadurch in einen distalen, medialen und proximalen Abschnitt getrennt wird. Diese Struktur ist essentiell zur Prozessierung der 29SB pre-rRNA (bestehend aus 5,8S rRNA, ITS2 und 26S rRNA) in dessen Verlauf ITS2 von der 5,8S und 26S rDNA abgespalten wird (Peculis und Greer, 1998). Dabei spielt die Basenabfolge der an der Helix beteiligten Sequenzen eine untergeordnete Rolle. Die Effizienz der Prozessierung der 29SB pre-rRNA wird beeinflusst durch Einführung weiterer ungepaarter Basen, durch Entfernung derselben oder durch eine Änderung der Länge der einzelnen Abschnitte des *proximal stem*.

Dementsprechend sind bei Eukaryonten die Positionen, an denen diese ungepaarten Basen auftreten, und die Länge des *proximal stem* hochkonserviert (Côté und Peculis, 2001).

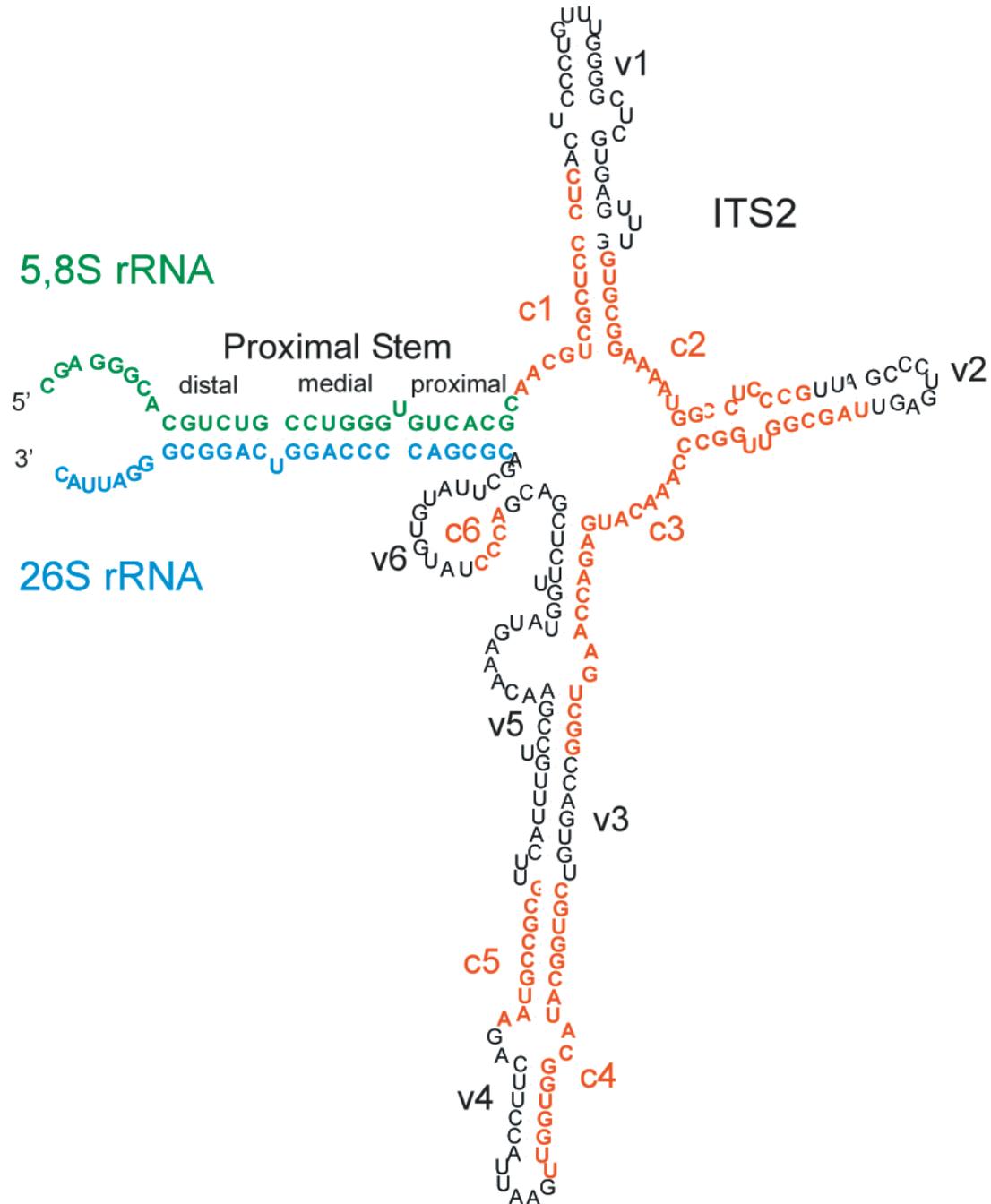


Abb. 38. Mutmaßliche Sekundärstruktur von ITS2 von *Phyllanthus amarus* (eigene Daten), berechnet mit dem Zuker-Algorithmus (Programm RNA-Structure) (optimale Struktur, freie Energie = -94,2 kcal/mol). Das 3'-Ende der 5,8S RNA bildet zusammen mit dem 5'-Ende der 26S RNA eine von zwei Fehlpaarungen unterbrochene Helix (*proximal stem*, Einteilung nach Côté und Peculis, 2001). Die konservierten Regionen, c1 bis c6 (rot), paaren in für Angiospermen charakteristischer Weise. Zwischen den konservierten Regionen liegen die variablen Regionen, v1 bis v6 (nach Hershkovitz und Zimmer, 1996).

In ITS2 von Angiospermen wurden 6 Regionen mit einer höheren Konservierung der Basenabfolge identifiziert (c1 bis c6), deren Lage im gefalteten Molekül bei allen Angiospermen ähnlich ist (Hershkovitz und Zimmer, 1996). Die Lage dieser konservierten Bereiche im Molekül ist in Angiospermen zwar nicht immer gleich, es lässt sich aber eine Konsensus-Struktur ableiten, von der ITS2 Moleküle von Angiospermen nur geringfügig abweichen. Diese beinhaltet die Paarung des 3'-Endes der Region c1 mit dem 5'-Ende von c2, des 3'-Endes von c2 mit dem 5'-Ende von c3, c4 subterminal auf der 5'-Flanke einer langen Helix und c5 gepaart mit dem 5'-Ende von c4. Der Aufbau des ITS2 enthaltenden Abschnitts der 29SB pre-rRNA nach Côté und Peculis (2001) und Hershkovitz und Zimmer (1996) ist in Abb. 38 anhand einer Sequenz von *Phyllanthus amarus* (eigene Daten) gezeigt.

Zur Überprüfung des Status der vorliegenden ITS Sequenzen von *Nepenthes* als Pseudogen wurden mit Hilfe des Programms RNA-Structure (Mathews *et al.*, 1999; Mathews *et al.*, 2001) und zur Darstellung und Konvertierung der gefalteten Sequenzen des Programms RNA-viz eine Faltung bei 37°C mit Hilfe des Zuker-Algorithmus simuliert (Mathews *et al.*, 1999). Dabei wurden je 30 Basen der ITS2 flankierenden Bereiche einbezogen, um eine Überprüfung der Struktur des *proximal stem* zu ermöglichen. Anschließend wurde versucht, die Lage der konservierten Bereiche im gefalteten Molekül zu bestimmen (anhand der von Hershkovitz und Zimmer (1996) gezeigten Alinierung), um sie mit der Konsensus-Struktur für Angiospermen nach Hershkovitz und Zimmer (1996) zu vergleichen.

Keine der aus den Klonierungen gewonnenen Sequenzen der Nepenthaceae entsprach der Struktur nach Hershkovitz und Zimmer (1996), auch in nicht optimalen Faltungen. Im Gegensatz zu den meisten anderen in der vorliegenden Arbeit untersuchten ITS2 Sequenzen von Angiospermen gelang die Zuordnung der konservierten Bereiche bei *Nepenthes* nur unzureichend. Durch die Faltung wird der *proximal stem* nicht angezeigt. In die Analyse der Sekundärstruktur von ITS2 wurden die Sequenzen von *N. boschiana* Typ 2, 3 und 4 und *N. ampullaria* Typ 1 nicht einbezogen, da für diese für ITS2 keine vollständigen Sequenzen vorlagen. Bei *N. boschiana* Typ 3 und 4 ist der Teil, der die konservierte Region c1 enthält und bei *N. boschiana* Typ2 sind 5 Basen der 5,8S rDNA deletiert. Es handelt sich bei den durch Klonierung gewonnenen Sequenzen der ITS-Region von *Nepenthes* daher mit großer Wahrscheinlichkeit ausnahmslos um Pseudogene. So sind bei *N. lamii* Typ 1 13 Basen des 3'-Endes der 5,8S rDNA deletiert und bei *N. ampullaria* Typ 4 die ersten 100 Basen des 5'-Endes der 26S rDNA, was es unwahrscheinlich macht, dass hier der essentielle *proximal stem* aufgebaut werden kann. Nach Versuchen von Van der Sande *et al.* (1992) blockieren kleine Deletionen in den an der Bildung des *proximal stem* beteiligten Bereichen vollständig die Prozessierung der 29SB-pre-rRNA. Dafür, dass es sich bei den Sequenzen um Pseudogene handelt, spricht auch ihre hohe Variabilität in der 5,8S rDNA im Vergleich zu anderen Angiospermen. Außerdem entspricht das in ITS1 konservierte Motiv nur bei *N. lamii* Typ 1 der von Liu und Schardl (1994) für Angiospermen vorgeschlagenen Basenfolge.

ITS-Sequenzen von *Ancistrocladus*, die aus direkter Sequenzierung von PCR-Produkt mit dem Primerpaar AITS1 / AITS4 gewonnen wurden, entsprachen der Struktur nach von Hershkovitz und Zimmer (1996), ebenso wie die Sequenzen aus jungem Pflanzenmaterial von *N. pervillei* und *Triphyophyllum peltatum*. Die aus jungem Pflanzenmaterial ermittelte Sequenz von *N. tobaica* entsprach dieser Struktur auch in suboptimalen Faltungen nicht, nur die Lage von c1 und c2 war so wie von Hershkovitz und Zimmer (1996) angenommen. Allerdings ließen sich im Gegensatz zu den Pseudogen-Sequenzen die konservierten Bereiche c1 – c6 identifizieren, und der *proximal stem* entspricht in seiner Struktur dem von *N. pervillei* und bildet eine 2-fach unterbrochene Helix. Die jeweils optimale Struktur der ITS2 Sequenzen und flankierender Bereiche der oben besprochenen Sequenzen ist in Abb. 39 gezeigt.

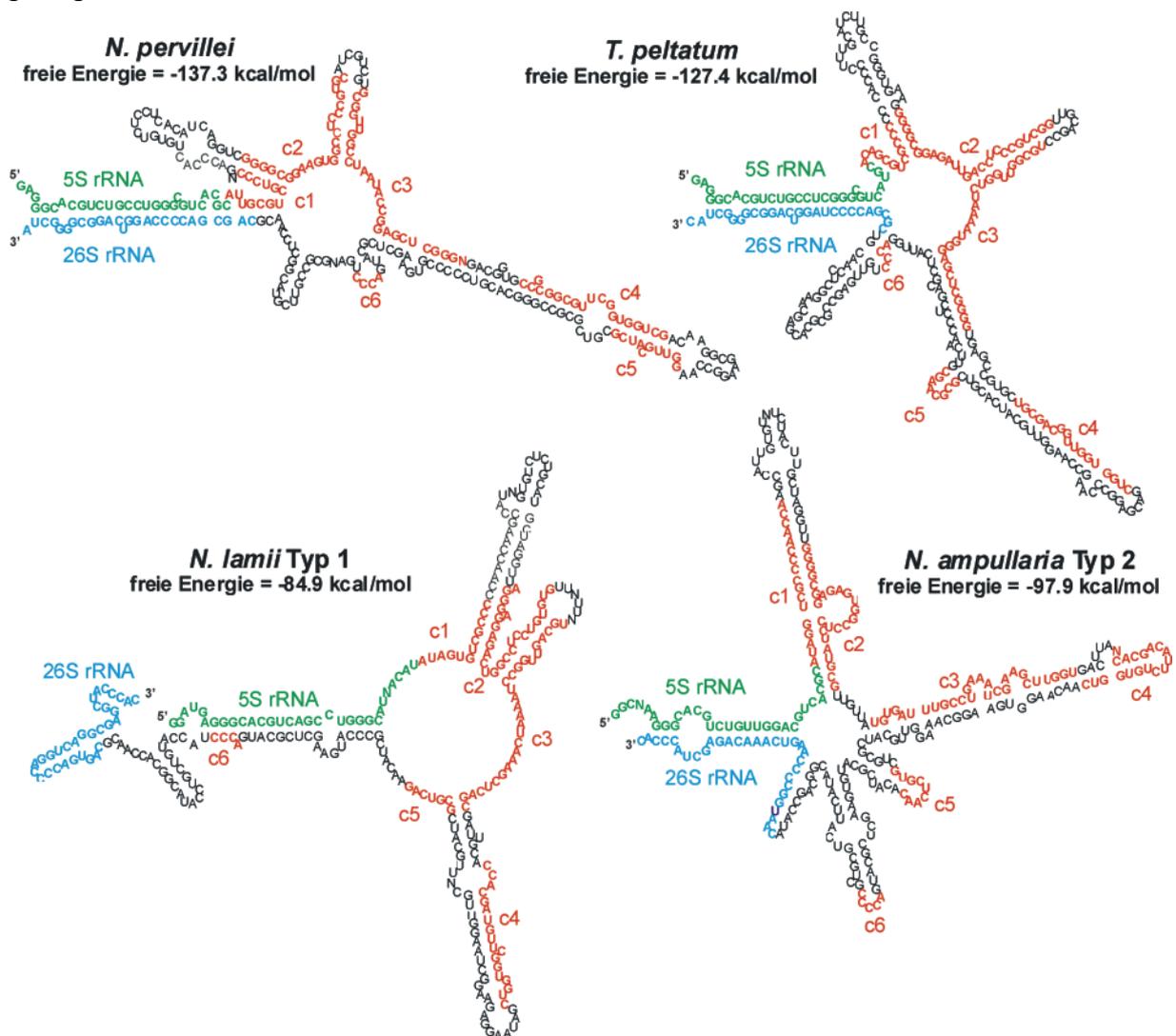


Abb. 39. Beispiele für optimale Faltungen von ITS2 nach dem Zuker-Algorithmus (Programm RNA-Structure). Die Struktur von *N. pervillei* aus jungen Pflanzenmaterial entspricht der Struktur nach Hershkovitz und Zimmer (1996). Die Faltungen der aus Klonierung gewonnenen ITS-Sequenzen (gezeigt sind *N. lamii* Typ1 und *N. ampullaria* Typ2) sowie *Triphyophyllum peltatum* entsprechen dieser Struktur nicht (vgl. auch Abb. 38)

Wegen des Auftretens verschiedener Pseudogene für ITS bei den Nepenthaceae konnte die ITS-Region nicht als phylogenetischer Marker für die Nepenthaceae eingesetzt werden. Eine Identifizierung spezifischer Sequenzen war möglich, nachdem aus jungem Pflanzenmaterial von *N. pervillei* Sequenzen gewonnen werden konnten, die den Kriterien für funktionsfähiger rDNA entsprachen. Allerdings gelang dies bei *N. tobaica* nicht. Es erschien unwahrscheinlich, dass durch eine Primerausschluss- oder eine Klonierungsstrategie für alle Arten homologe ITS-Sequenzen gewonnen werden konnten. Ein Einbau nicht homologer Sequenzen in eine molekulare Phylogenie hätte aber zu falschen Phylogenie-Hypothesen geführt.

3.3 TrnK-Polymorphismus bei Nepenthaceae

Zur Erstellung einer molekularen Phylogenie der Nepenthaceae wurden vergleichende Sequenzanalysen des trnK-Introns an 85 Arten dieser Familie durchgeführt (vgl. Kapitel 2.1 und 2.7.2.4). Die Sequenzen vieler Taxa waren bei direkter Sequenzierung des PCR-Produkts überlagert, was auf eine Koamplifikation von zwei PCR-Produkten hinwies. Die meisten Sequenzen des trnK-Introns waren lesbar, allerdings konnten von einigen Arten keine auswertbaren Sequenzen gewonnen werden. Die PCR-Produkte von *N. hamata* und einigen anderen Taxa mit dem Primerpaar Nep2-1060F / 16-trnK-2R wurden in der Agarose-Gel-Elektrophorese in zwei unterscheidbare Banden aufgeteilt. Von diesen wies die kürzere ca. 900 bp und die längere, mit ca. 1200 bp, die Länge des spezifischen Produkts auf. Die Sequenzierung der kürzeren Bande ergab eine Sequenz, die der spezifischen Sequenz des trnK-Introns ähnlich war. Es handelte sich bei den Koamplifikaten also nicht um unspezifische Produkte, sondern um zwei in *Nepenthes* vorkommende Kopien des trnK-Introns. Die Überlagerung der Sequenzen kam auch in den beiden getrennt amplifizierten Abschnitten des trnK-Introns vor. Die Bindungsstellen der für diese Amplifikationen eingesetzten Primerpaare 2-trnK-3914F / Nep16-1270R und 16-trnK-2R / Nep2-1060F waren also in beiden Kopien intakt.

Den PCR-Resultaten zufolge bestand die Gefahr, in die Datenmatrix ähnliche aber nicht homologe Sequenzen aufzunehmen und dadurch falsche Rückschlüsse auf die Phylogenie zu ziehen. Es wurden daher Versuche durchgeführt, die Sequenz beider Kopien des trnK-Introns und deren Lokalisation zu verifizieren. Denkbar war, dass beide Kopien im Chloroplasten lokalisiert sind oder dass eine Kopie im Mitochondrium und die andere im Chloroplasten vorliegt. Eine Kopie des trnK-Introns im Kern war unwahrscheinlich, da beide Kopien ungefähr die gleiche Menge an PCR-Produkt ergaben, bei einer Kern-Kopie aber von einer sehr viel geringeren Konzentration der Zielsequenz in der Amplifikation ausgegangen werden muss.

Zunächst wurde versucht beide Kopien des trnK-Introns durch Klonierung zu vereinzeln. Nach herkömmlicher Klonierung konnten nur Inserts gefunden werden, die höchstens Teile

des *trnK*-Introns enthielten. Es bestand die Möglichkeit, dass das Insert, welches mit *matK* ein funktionsfähiges Gen enthielt das Wachstum der Bakterien hemmt. Nach Einsatz von *E. coli*-Safe-Zellen der Fa. Stratagene konnte zwar vollständige Insert erhalten werden, allerdings nur in geringen Ausbeuten. Diese Zellen bilden eine geringere Menge an Kopien von Plasmiden und eignen sich daher zur Klonierung von potentiell für die Zellen unverträglichen Inserts.

Wegen der schlechten Klonierbarkeit des *trnK*-Introns wurde das *trnK*-Intron mit DNA eines einzelnen Chloroplasten als Template amplifiziert. Dadurch konnte die Sequenz beider Kopien ermittelt und die Lokalisation beider Kopien im Chloroplasten ausgeschlossen werden. Die flankierenden Bereiche beider Kopien wurden durch Inverse-PCR bestimmt. Die nicht plastidäre Kopie wurde anschließend für alle *Nepenthes*-Arten vergleichend sequenziert, um sie als zusätzlichen Marker zur Rekonstruktion der Phylogenie der Nepenthaceae einzusetzen.

3.3.1 Entwicklung einer Single-Chloroplasten-PCR

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten aus vereinzelt Chloroplasten wurde zunächst für die *trnT-trnF*-Region von *Nicotiana tabacum* und *Taraxacum officinale* entwickelt. Damit sollte die Spezifität der Methode sichergestellt werden, ohne zwei Kopien einer Zielsequenz erwarten zu müssen. Anschließend wurde das *trnK*-Intron von einzelnen Chloroplasten von *Nepenthes bicalcarata* amplifiziert. Ein vereinzelter Chloroplast wurde aus einer Gesamt-Chloroplasten-Isolierung durch Laser-Microbeam-Microdissection (LMM) und Laser-Pressure-Catapulting (LPC) in ein PCR-Reaktionsgefäß verbracht, darin einem Proteinase K-Verdau unterworfen und als Template für eine Amplifikation verwendet. Die Probenvorbereitung und die Amplifikation wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt, LMM und LPC von Herrn Stefan Thalhammer (Institut für Kristallographie LMU, München) vorgenommen. Die detaillierte Beschreibung der LMM- und LPC-Prozedur ist in Thalhammer (2001) aufgeführt, ein Überblick zur Methode findet sich in Kapitel 2.4.

3.3.1.1 Isolierung von Chloroplasten

Die Chloroplasten wurden durch Zentrifugation in einem Percoll-Gradienten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gewonnen (Eichacker *et al.*, 1996; vgl. Kapitel 2.4.1). Die Chloroplasten wurden für alle verwendeten Taxa in gleicher Weise isoliert, mit der Ausnahme, dass für *Nicotiana tabacum* und *Taraxacum officinale* eine Zugabe von Seesand nötig war. Bei *Nepenthes bicalcarata* verhinderte anscheinend der große Anteil von sklerenchymatischem Gewebe in den ledrigen und stabilen Blättern, dass die Chloroplasten beim Mörsern in 1,5 ml Reaktionsgefäßen geschert wurden. Die Chloroplasten-Emulsion wurde auf eine PEN-Membran (Polyethylen-Naphthalat) gegeben, die auf einem sehr dünnen Objektträger montierte, mit einer Pipettenspitze verteilt und getrocknet. Dabei musste die Schicht der Emulsion sehr dünn ge-

halten werden, da sonst das im Homogenisations-Puffer enthaltene Sorbit wegen seines hygroskopischen Charakters den LMM-Prozess störte. Aus dem gleichen Grund wurde auf die Zugabe von EDTA zur Inhibierung von DNAsen verzichtet. Auch EDTA verhinderte das vollständige Trocknen der Membran und behinderte dadurch den LMM-Prozess. Die Chloroplasten-Emulsion wurde vor dem Auftrag auf die PEN-Membran mit Homogenisations-Puffer verdünnt. Die Behandlung der PEN-Membran mit Polylysin, das die Anheftung der Organellen an die Membran erleichtert, verhinderte allerdings die gleichmäßige Verteilung der Emulsion und erbrachte schlechte Ergebnisse in der LMM.

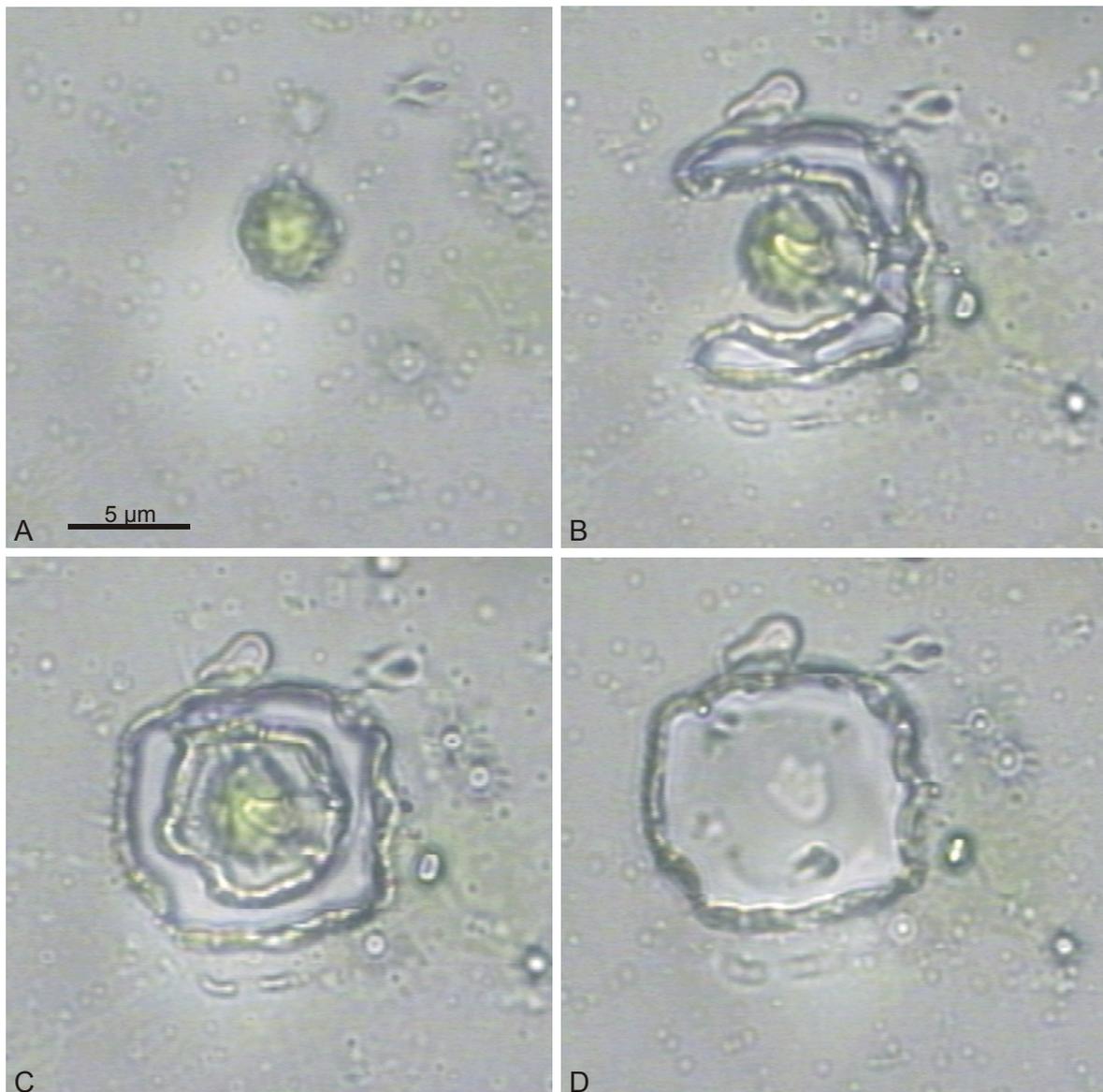


Abb. 40. Laser-Microbeam-Microdissection (LMM) eines auf eine PEN-Membran aufgebrachten Chloroplasten von *N. tabacum*. Vor (A) und während der Dissektion (B und C). Nach der Dissektion wurde die den Chloroplast enthaltende Membraninsel durch Laser-Pressure-Catapulting (LPC) in den Deckel eines PCR-Reaktionsgefäßes transferiert (D).

Der Einsatz von LPC erwies sich als sehr effiziente Methode einzelne Chloroplasten aus den vorbereiteten Präparaten in PCR-Reaktionsgefäße zu verbringen. Durch LMM isolierte Membraninseln wurden durch den Laserimpuls in den Deckel eines PCR-Reaktionsgefäßes katapultiert, wo sie haften blieben und sofort mit 10 µl Proteinase K-Lösung in 1x PCR-Reaktionspuffer bedeckt wurden. Um das Anheften der Proben in den Deckeln zu gewährleisten, erwies sich der Auftrag von 1 µl Mineralöl auf dem Deckel als unerlässlich. Mit dieser Methode, die in Kapitel 2.4.2 genauer beschrieben ist, konnten mehrere Proben pro Minute selektiert werden (vgl. Abb. 40).

3.3.1.2 Amplifikation der *trnT*-*trnF*-Region aus einzelnen Chloroplasten von *Nicotiana tabacum*

Die mit LMM und LPC separierten Membranregionen mit einem erkennbaren Chloroplast wurden als Template für eine PCR verwendet. Die Amplifikation von DNA aus einem einzigen Chloroplast wurde mit einer Re-PCR Strategie durchgeführt. Die plastidäre *trnT*-*trnF*-Region wurde in einer ersten PCR mit dem Primerpaar A2 / F2 amplifiziert (vgl. Kapitel 2.4.3). Diese erste PCR führte in keinem Fall zu einem in der Agarose-Gel-Elektrophorese sichtbaren PCR-Produkt. Auch eine erste Amplifikation mit dem Primerpaar E2 / F2 ergab kein nachweisbares Produkt, auch wenn das erwartete Produkt hier nur 300 bp anstatt 1800 bp betragen hätte. Eine Re-PCR war daher in jedem Fall notwendig. In der Re-PCR wurde mit den Primerpaaren A / B und C / F3 aus dem in der ersten PCR amplifizierten 1800 bp langen Abschnitt jeweils ein 800 bp und 1000 bp langes Stück amplifiziert. Die Re-PCR verlief in der Regel bei 90% der Proben positiv. Die Sequenzierung ergab eine 100%-ige Übereinstimmung der Re-PCR-Produkte mit der Sequenz der *trnT*-*trnF*-Region des Chloroplasten-Genoms von *N. tabacum* (gi2924257).

Zum Nachweis, ob das Template für die Chloroplasten-PCR aus DNA der sichtbaren isolierten Chloroplasten oder aus unspezifischer DNA gebildet wurde, wurden Membranregionen ohne sichtbaren Chloroplast ausgeschnitten und als Kontrolle verwendet. Die Amplifikation führte zunächst bei ca. 60% dieser Negativkontrollen zu PCR-Produkten. Es wurde vermutet, dass die PCR-Produkte von DNA aus lysierten Chloroplasten in der Emulsion oder von, wegen der Schichtdicke des Präparats, nicht im Mikroskop sichtbaren Chloroplasten stammten. Die Chloroplasten-Emulsion wurde daher vor dem Auftrag auf die PEN-Membran verdünnt. Eine 1:10 Verdünnung des in ca. 10 µl Homogenisations-Puffer resuspendierten Pellets aus der Chloroplasten-Isolierung führte in nur noch 30% der Kontrollen zu einem PCR-Produkt, während alle Proben mit sichtbarem Chloroplasten positiv waren. Bei einer weiteren Verdünnung um den Faktor zwei waren 85% der Proben mit Chloroplasten und keine der Kontrollen positiv (Abb. 41). Das Ausbleiben von Amplifikat in den Kontrollen unter den veränderten Bedingungen zeigt, dass die *trnT*-*trnF*-Region tatsächlich von einem einzelnen Chloroplast von *N. tabacum* amplifiziert wurde.

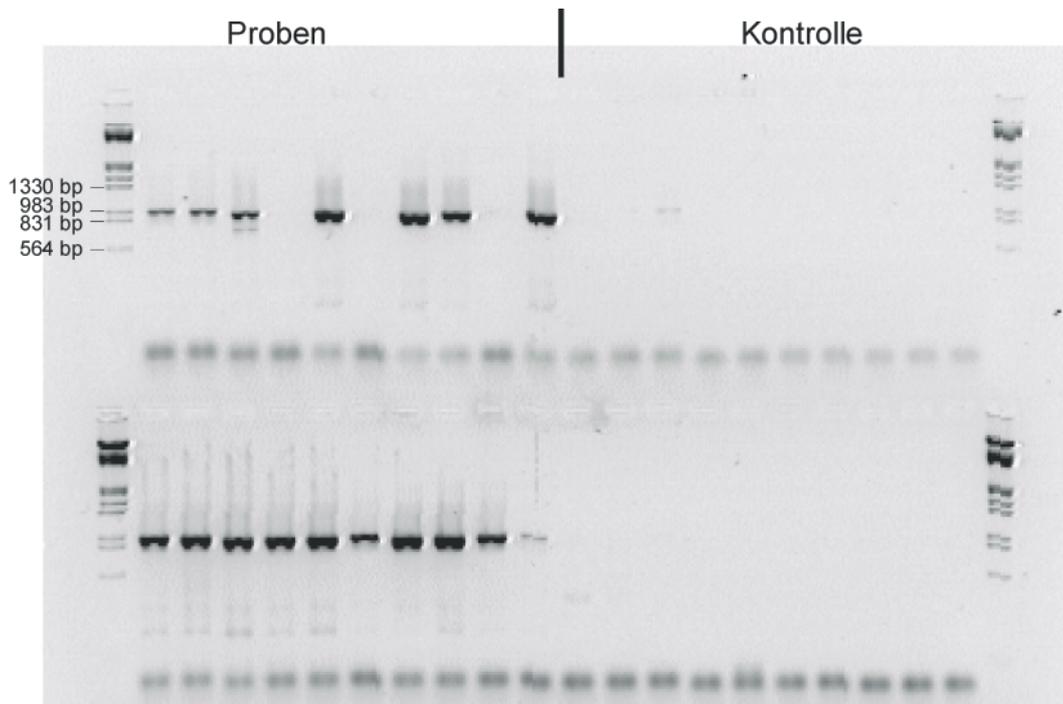


Abb. 41. Agarose-Gel-Elektrophorese einer Amplifikation von jeweils 20 durch LMM und LPC ausgeschnittenen Membranregionen mit sichtbarem Chloroplast (Proben) und ohne sichtbarem Chloroplast (Kontrolle) von *Nicotiana tabacum*. Die PCR wurde mit dem Primerpaar C / F3 durchgeführt. Als Größenstandard wurde EcoR I / Hind III geschnittene λ -Phagen-DNA aufgetragen.

3.3.2 Amplifikation des trnK-Introns aus einzelnen Chloroplasten von *Nepenthes bicalcarata*

3.3.2.1 Trennung der Koamplifikate des trnK-Introns durch Single-Chloroplasten-PCR

Zur Trennung der Koamplifikate, die bei einigen *Nepenthes*-Arten nach Amplifikation des trnK-Introns aus Gesamt-DNA beobachtet wurden, wurden aus *N. bicalcarata* über einen Percoll-Gradienten Chloroplasten isoliert und jeweils einzelne davon durch Laser-Microbeam-Microdissection (LMM) und Laser-Pressure-Catapulting (LPC) in PCR-Reaktionsgefäße verbracht. Für die Amplifikation des trnK-Introns dieses einzelnen Chloroplasten wurde die erste PCR mit dem Primerpaar 2_{kurz} / 16_{kurz} durchgeführt. Beide Primer wurden von den Primern 2-trnK-3914F und 16-trnK-2R nach Johnson und Soltis (1994) abgeleitet, die am 3'-Ende um drei Basen verkürzt wurden. Die erste PCR wurde als Touch-Down-PCR durchgeführt, in der Regel mit je 2 Zyklen bei 60 und 55°C Annealing-Temperatur, mit 10 Zyklen bei 50°C und mit anschließend 20 Zyklen bei 47,1°C. Aus dieser PCR wurde 1 μ l aus einer 1/100 Verdünnung in eine Re-PCR eingesetzt. Bei der Re-PCR wurden mit den Primerpaaren 2-trnK-3914F / Nep16-1270R oder Nep2-1060F / 16-trnK-2R aus dem ca. 2500 bp großen Produkt der ersten PCR ca. 1200 bp amplifiziert. Die Anzahl

positiver Proben bei der Amplifikation des trnK-Introns von *N. bicalcarata* war niedriger als diejenige bei der Amplifikation der trnT-trnF-Region von *Nicotiana tabacum* (Abb. 42). Die Ausbeute der Amplifikationen ließ sich durch Variation der Primer-Konzentrationen oder des pH-Werts des Reaktionspuffers sowie des Einsatzes von Polymerasen verschiedener Hersteller nicht wesentlich erhöhen. Aus den positiven Proben dieser Versuchsreihen wurden die Produkte in ausreichender Menge amplifiziert und für eine nachfolgende Sequenzierung eingesetzt.

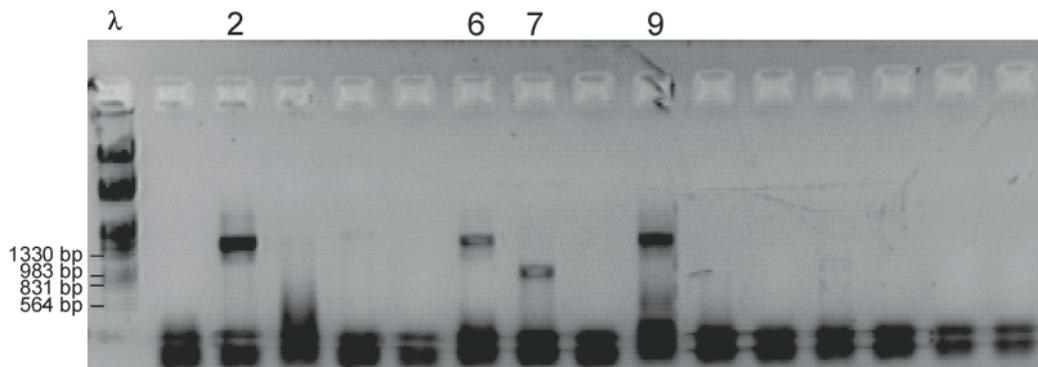
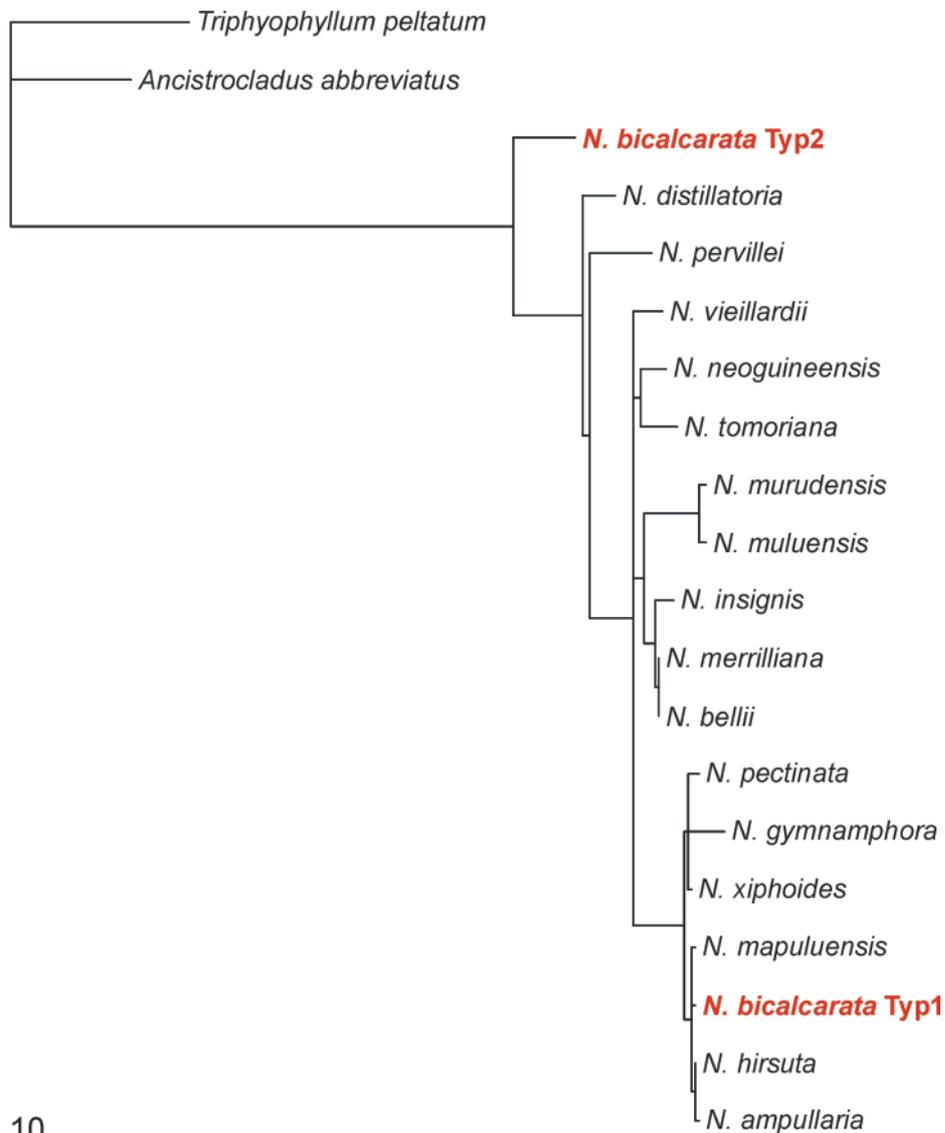


Abb. 42. Agarose-Gel-Elektrophorese von PCR-Produkten einzelner Chloroplasten unter Einsatz des Primerpaars 2-trnK-3914F / Nep16-1270R in der Re-PCR. Gezeigt ist die Amplifikation mit Standard-Taq-Polymerase aus einer Versuchsreihe zum Testen von Polymerasen verschiedener Hersteller. Aus der gezeigten Amplifikation wurden die Proben, Nr. 2, 6 und 9 sequenziert. Als Größenstandard wurde EcoR I / Hind III geschnittene λ -Phagen-DNA aufgetragen.

Aus den Versuchen zur Optimierung der Amplifikation des trnK-Introns einzelner Chloroplasten wurden ca. 30 Proben von *N. bicalcarata* mit dem Primerpaar 2-trnK-3914F (bzw. 2poly60F als interner Primer) / Nep16-1270R sequenziert, einige davon auch mit dem Primerpaar Nep2-1060F / 16-trnK-2R. Für das gesamte trnK-Intron wurden zwei Gruppen von jeweils gleichen Sequenzen erhalten. Die Sequenzen der einen Gruppe hatten eine Länge des trnK-Introns von 2328 bp und die der anderen Gruppe eine Länge von 2320 bp. Die durch die beiden Gruppen repräsentierten Sequenzen unterschieden sich durch die Basenfolge an 56 Positionen und durch 8 Längenmutationen von 1 bis 16 Basen.

Die beiden für das trnK-Intron von *N. bicalcarata* ermittelten Sequenzen wurden verglichen mit den Sequenzen des trnK-Introns verschiedener *Nepenthes*-Arten, *Triphyophyllum peltatum* und *Ancistrocladus abbreviatus*, die als Außengruppen für die Rekonstruktion der trnK-Phylogenie der Nepenthaceae vorgesehen waren. Der Vergleich ergab, dass eine der beiden Sequenzen (Typ1) von *N. bicalcarata* eine nahe Verwandtschaft mit dem trnK-Intron anderer *Nepenthes*-Arten hat und dass die andere Sequenz (Typ2) als Nachbargruppe zu den Sequenzen aller untersuchten *Nepenthes*-Taxa positioniert ist (vgl. Abb. 43). Durch Maximum-Parsimony-Analyse wurde die Sequenz des Typ 2 von den übrigen Sequenzen der

Nepenthaceae mit einer ähnlichen Schrittlänge abgetrennt, wie die trnK-Intron Sequenzen der übrigen *Nepenthes*-Taxa untereinander. Demnach handelt es sich bei den Sequenzen von Typ1 und Typ2 um für *Nepenthes* spezifische Sequenzen, deren Ursprung vermutlich nach der Abspaltung der Nepenthaceae von den nächstverwandten rezenten Taxa und vor der Radiation der rezenten Nepenthaceae zu suchen wäre. Damit wurde die Existenz zweier Kopien des trnK-Introns in den Nepenthaceae bestätigt.



10

Abb. 43. Phylogramm der Maximum-Parsimony-Analyse des trnK-Introns von 16 verschiedenen *Nepenthes*-Arten und des Typ1 und Typ2 der trnK-Intron-Sequenz von *N. bicalcarata*. Die Analyse ergab eine polyphyletische Verteilung der beiden Typen des trnK-Introns von *N. bicalcarata*. Typ 2 bildet die Schwestergruppe zu den übrigen *Nepenthes*-Taxa einschließlich des Typ1.

3.3.2.2 Nachweis des trnK-Intron Typ 2 als mitochondriales Pseudogen

3.3.2.2.1 Bestimmung der Lokalisation des trnK-Intron Typ 2 durch Single-Chloroplasten-PCR

Zur Überprüfung der Lokalisation der beiden Kopien des trnK-Introns von *N. bicalcarata* wurde das trnK-Intron aus einzelnen Chloroplasten amplifiziert. Dabei wurden 50 ausgeschnittene Membranregionen mit im Mikroskop sichtbarem Chloroplast mit 50 Membranregionen ohne sichtbarem Chloroplast aus jeweils der gleichen Chloroplasten-Präparation verglichen (10 bis 20 Proben je Amplifikation). Die Chloroplasten-Emulsion wurde vor dem Auftrag auf dem Objektträger verdünnt. Um Kontaminationen auszuschließen, die nicht von der Präparation herrührten, wurden in der Re-PCR mehrere Nullproben ohne Template in der ersten PCR eingesetzt (vgl. Abb. 44)

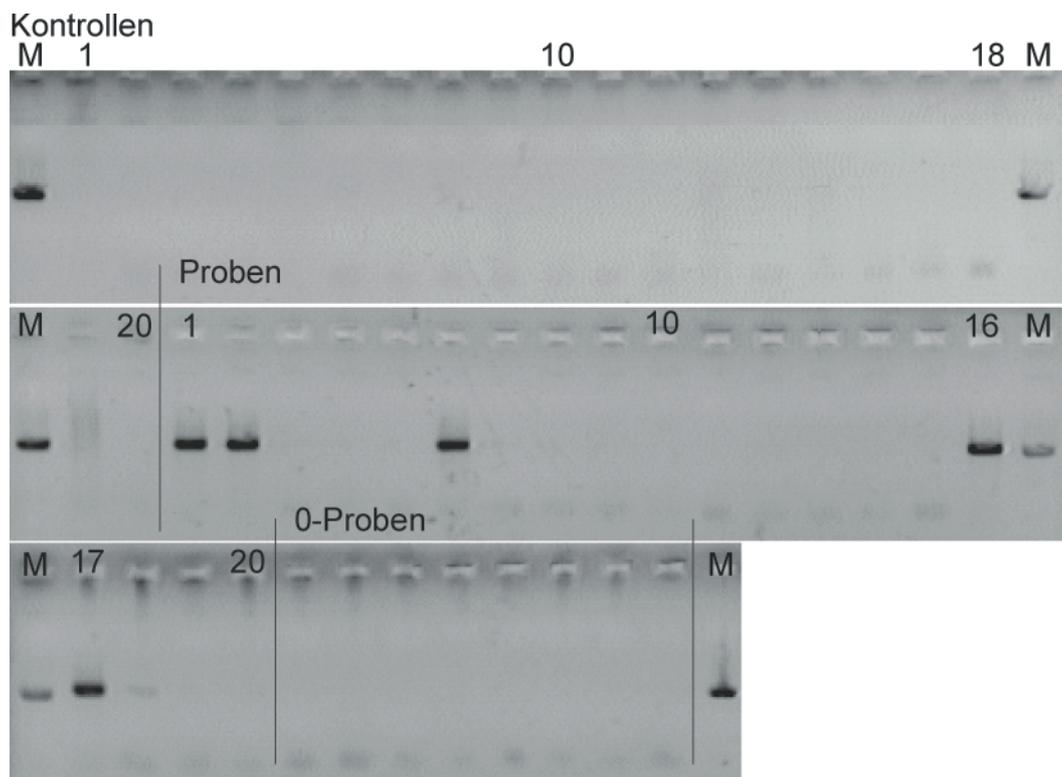


Abb. 44. Agarose-Gel-Elektrophorese der Re-PCR einzelner Chloroplasten von *N. bicalcarata* mit dem Primerpaar 2-trnK-3914F / Nep16-1270R von 20 Membranregionen ohne Chloroplast (Kontrollen), 20 Proben mit Chloroplast (Proben) und 8 Amplifikationen aus Leerproben der ersten PCR (Nullproben). Als Größenmarker (M) wurde in jeder Reihe der ersten und letzten Spur spezifisches Produkt aus anderen Amplifikationen aufgetragen. Von den 20 Proben mit Chloroplast waren 6 PCR-Reaktionen positiv (Probe 18 nur schwach).

Von den insgesamt 50 Proben mit sichtbarem Chloroplast ergaben 15 ein sequenzierbares Produkt. Das sind ca. 30 % der Proben und damit bei *N. bicalcarata* erheblich weniger als bei den vergleichbaren Versuchen mit *N. tabacum*, in denen 80 % der Proben in der Re-PCR Produkt ergaben. Von den 50 Kontrollen war nur eine Probe positiv. Die Sequenzierung der Re-PCR-Produkte des trnK-Introns wurde von einer Seite mit dem Primer 2-trnK-3914F durchgeführt. Von den 15 Proben wurden insgesamt 13 Sequenzen erhalten. Diese entsprachen alle dem trnK-Intron Typ 1. Die eine Sequenz der Kontrolle, bei der ein Produkt amplifiziert wurde, entsprach dem trnK-Intron Typ 2.

Die Sequenzen des Typ 2 ließen sich nach Verdünnung der Chloroplasten-Emulsion vor dem Auftrag auf den Objektträger nicht aus den einen sichtbaren Chloroplast enthaltenden Membranregionen amplifizieren. Die Lokalisierung beider Sequenztypen im Chloroplasten erschien daher unwahrscheinlich. Es ist davon auszugehen, dass bei Vorliegen von zwei Kopien des trnK-Introns im Chloroplasten wenigstens einige Proben überlagerte Sequenzen oder vom Typ 1 abweichende Sequenzen ergeben würden. Dies würde vor allem gelten, wenn das Plastom von *Nepenthes* zwei Kopien des trnK-Introns enthielte. Aufgrund der geringen Anzahl positiver Proben war allerdings nicht gänzlich auszuschließen, dass die unterschiedlichen Kopien unterschiedlichen Populationen von Chloroplasten zuzuordnen sind. Dies ist allerdings extrem unwahrscheinlich. In einem solchen Fall müssten zwei Populationen von Chloroplasten mit unterschiedlichem Genom über viele Generationen konserviert und gemeinsam vererbt worden sein, ein Fall der in der Literatur bisher nicht belegt ist.

3.3.2.2.2 Identifizierung der flankierenden Sequenzen des trnK-Intron Typ2

Die das trnK-Intron flankierenden Sequenzen beider Sequenztypen des trnK-Introns von *N. bicalcarata* wurden mit für die beiden Sequenztypen spezifischen Primern amplifiziert und miteinander verglichen. Dadurch wurden weitere Hinweise auf die Lokalisation der beiden Kopien gewonnen.

Die flankierenden Sequenzen des Typ 2 der trnK-Intron-Sequenz von *N. bicalcarata* wurden durch inverse PCR ermittelt (vgl. Kapitel 2.3.1). Der Restriktionsverdau der Gesamt-DNA wurde mit den 5 Enzymen AclI, BclI, Bsh1365I, BstYI und DraI durchgeführt. Diese Enzyme schneiden alle zwischen den Positionen 783 und 923 des Typ 2 des trnK-Introns, so dass in der PCR mit den gleichen Primerpaaren gearbeitet werden konnte. Das trnK-Intron Typ1 wurde von den Enzymen nicht geschnitten. Die Fragmente aus dem Restriktionsverdau wurden ligiert, gefällt und dann als Template für eine PCR verwendet. Die erste Amplifikation wurde für den 5'-flankierenden Bereich mit dem Primerpaar BicTyp2-630F / BicTyp2-1900R und für den 3'-flankierenden Bereich mit dem Primerpaar BicTyp2-1840F / BicTyp2-1560R durchgeführt. Das Amplifikat wurde in eine Re-PCR eingesetzt mit dem Primerpaar BicTyp2-670F / BicTyp2-220R für den 5'-Bereich und mit dem Primerpaar BicTyp2-2080F /

BicTyp2-970R für den 3'-flankierenden Bereich (vgl. Abb. 45). Nach der Re-PCR entfielen auf den bekannten Bereich des trnK-Introns für den 5'-flankierenden Bereich je nach Restriktionsenzym zwischen 320 und 470 bp und für den 3'-flankierenden Bereich 580 bis 730 bp.

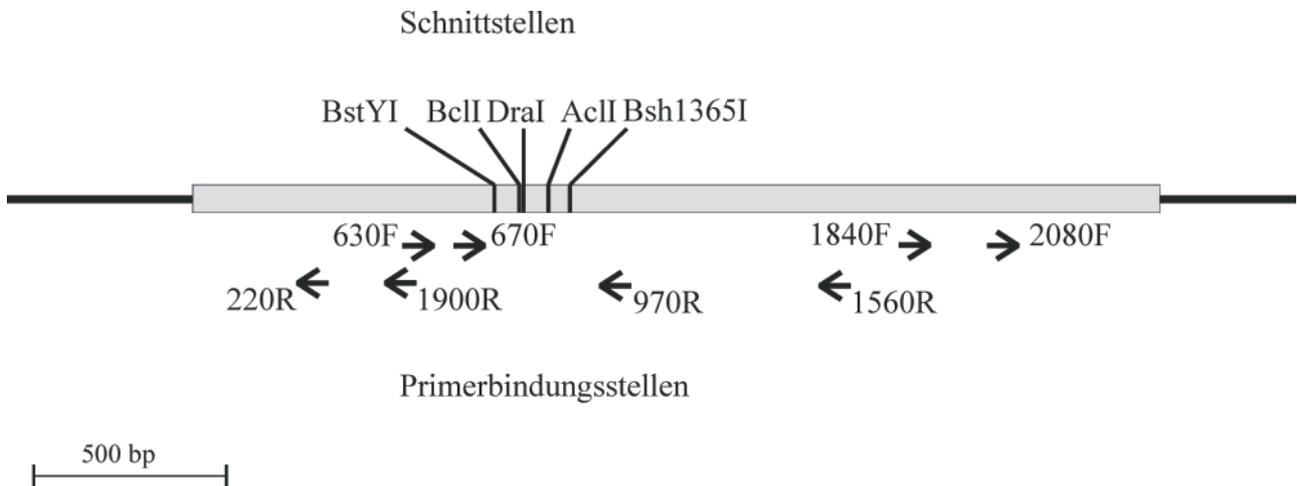


Abb. 45. Schematische Darstellung der bekannten Sequenz des trnK-Introns des Typ2, die Lage der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme und die Lage der Bindungsstellen der für die inverse PCR eingesetzten Primer.

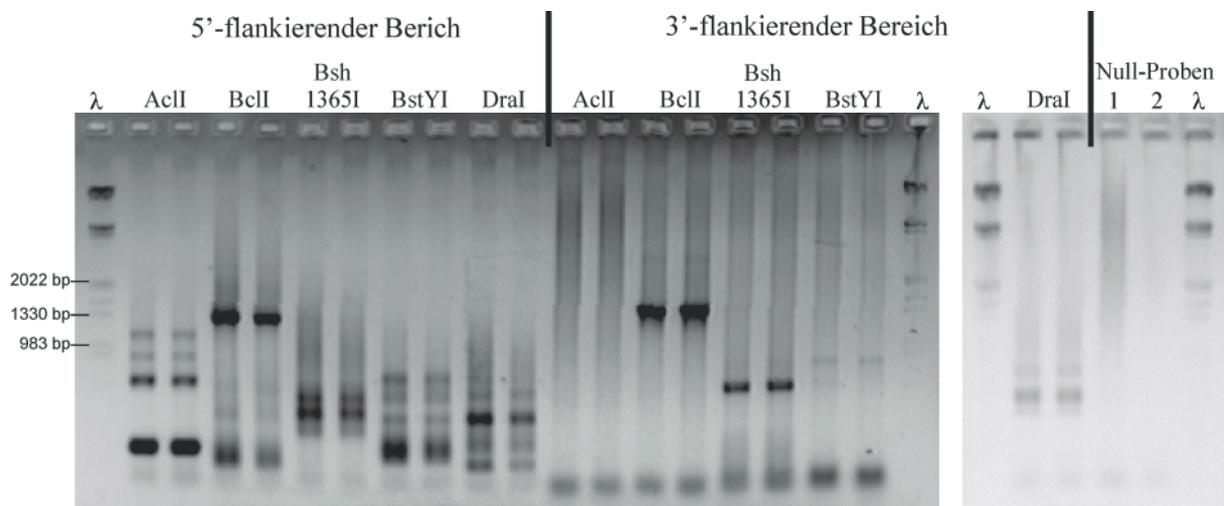


Abb. 46. Agarose-Gel-Elektrophorese von Amplifikaten der Re-PCR der Ligation des Gesamt-DNA-Verdaus von *N. bicalcarata*. Der 5'-flankierende Bereich wurde mit dem Primerpaar BicTyp2-670F/220R, der 3'-flankierende Bereich mit BicTyp2-2080F/970R amplifiziert (jede PCR zweimal in 100 µl Ansatz). Für eine Sequenzierung wurden die mit Ligation des BclII-Verdaus als Template gewonnenen Banden beider Bereiche und die mit Ligation des Bsh1365I-Verdaus für den 3'-flankierenden Bereich gewonnenen Banden verarbeitet. Als Nullproben wurden Ansätze der ersten PCR ohne Template verarbeitet, Nullprobe 1 für den 5'- und Nullprobe 2 für den 3'-flankierenden Bereich.

Die Re-PCR führte zu reproduzierbaren Ergebnissen. Für eine Sequenzierung am besten geeignet erschienen für beide flankierenden Bereiche die mit dem BclI-Verdau erhaltenen Produkte mit je ca. 2000 bp. Außerdem war für den 3'-Bereich das mit dem Bsh1365I-Verdau erhaltene Produkt mit ca. 1000 bp geeignet. Die diesen Produkten entsprechenden Banden wurden daher ausgeschnitten und von beiden Seiten sequenziert (vgl. Abb. 46).

Die mit dem Bsh1365I-Verdau gewonnene Bande ergab nur schlecht lesbare Sequenzen. Die Sequenzen aus PCR-Produkt der Ligation des BclI-Verdau waren dagegen jeweils über eine Länge von ca. 550 bp auswertbar. Die auswertbaren Sequenzen konnten nur teilweise mit den Sequenzen des Chloroplasten-Genoms von *N. tabacum* und denen von *Spinacia oleracea* ali-niert werden. Bei der mit dem Primer BicTyp2-220R erhaltenen Sequenz aus dem BclI-Verdau entsprachen die ersten 229 Basen den Sequenzen des Chloroplasten-Genoms. Die Sequenz mit dem Primer BicTyp2-670F enthielt nach ca. 60 Basen die Schnittstelle TGATCA des BclI. Hinter der Schnittstelle konnte die Sequenz nicht mit dem trnK-Intron ali-niert werden. Um die flankierende Sequenz zu verifizieren, wurde von diesem nicht ali-nierten Abschnitt ein Primer (Flank2000ohF) abgeleitet. Mit diesem Primer und mit dem Primer BicTyp2-220R wurde der 5'-flankierende Bereich des trnK-Intron-Typ2 aus Gesamt-DNA verschiedener *Nepenthes*-Arten amplifiziert und sequenziert. Bei allen hierbei untersuchten *Nepenthes*-Taxa konnte der nicht ali-nierbare Abschnitt der Sequenz zusammen mit den 229 Basen des 5'-Endes des trnK-Introns des Typ2 amplifiziert werden. Damit war die Spezifität der durch Inverse-PCR ermittelten Sequenzen nachgewiesen. Letztlich waren 1007 bp in 5'-Richtung ausgehend von der Primerbindungsstelle des Primers 2-trnK-3914F im trnK-Exon bekannt.

Die mit dem Primer BicTyp2-2020R und dem Ligationsansatz des BclI-Verdau erhaltene Sequenz, reichte nicht über die bekannte Sequenz des 3'-Endes des trnK-Introns des Typ2 hinaus. Mit dem Primer BicTyp2-970F konnte über die Schnittstelle des BclI im trnK-Intron hinaus sequenziert werden. Die die Schnittstelle flankierende Sequenz konnte mit psbA von *S. oleracea* ali-niert werden und zeigte zu diesem eine hohe Übereinstimmung. Der 3'-flankierende Bereich des trnK-Introns des Typ2 besteht damit aus Sequenzen, die wie das trnK-Intron plastidären Ursprungs sind. Die benachbarte Lage des psbA zum trnK-Intron entspricht der Lage des psbA im Plastom von *N. tabacum* und *S. oleracea*.

Der 5'-flankierende Bereich des trnK-Intron-Typ1 wurde direkt durch Amplifikation aus Gesamt-DNA mit dem Primerpaar BicTyp1-220R und dem Primer rps16-10F (abgeleitet nach Chloroplasten Genom Sequenz von *N. tabacum* und *S. oleracea*) ermittelt. Die Amplifikation verlief für alle eingesetzten Arten von *Nepenthes* positiv. Von beiden Seiten des ca. 2000 bp langen Produkts konnten ca. 1000 bp ermittelt werden. Die mit beiden Primern gewonnenen Sequenzen waren mit den plastidären Sequenzen von *N. tabacum* und *S. oleracea* ali-nierbar. Nicht ali-nieren ließen sie sich mit dem 5'-flankierenden Bereich des trnK-Introns Typ2. Eine

weitere Amplifikationsrunde mit dem Primer rps16-F und psbK-R ergab zusätzliche 500 bp bei verschiedenen *Nepenthes*-Taxa, die ebenfalls plastidären Sequenzen entsprachen. Die Zuordnung der einzelnen Sequenzabschnitte sind in Abb. 47 schematisch dargestellt.

Die BLAST-Suche des unbekannt Sequenzabschnitts der 5'-flankierenden Region des trnK-Intron Typ2 ergab keine signifikanten Übereinstimmungen längerer Abschnitte gegenüber bekannten Sequenzen aus der Datenbank des NCBI. Der größte Abschnitt betrug 37 bp und war homologisierbar mit einem Bereich des mitochondrialen Genoms von *Beta vulgaris* (gi9087297). Bei einer Alinierung mit BLAST (2-Sequences-BLAST), unter Herabsetzung der Stringenz für die automatische Alinierung, der unbekannt Sequenz mit der Sequenz des mitochondrialen Genoms von *Beta vulgaris* wurden dem größten übereinstimmenden Abschnitt benachbarte Basen ebenfalls aliniert (ca. 110 bp). Die Signifikanz dieser Alinierung war allerdings gering. Der alinierbare Abschnitt entspricht keinem für *Beta vulgaris* annotiertem Gen, sondern einem Abschnitt des nicht kodierenden Bereichs zwischen nad4 und dem orf246. Die unbekannt Sequenz enthielt keine ORFs (Open Reading Frames) mit mehr als 250 bp Länge. Eine translatierte BLAST-Suche gegen die Protein-Datenbank und gegen die translatierte Nukleotid-Datenbank des NCBI ergab für alle drei potentiellen Leseraster keine signifikanten Übereinstimmungen.

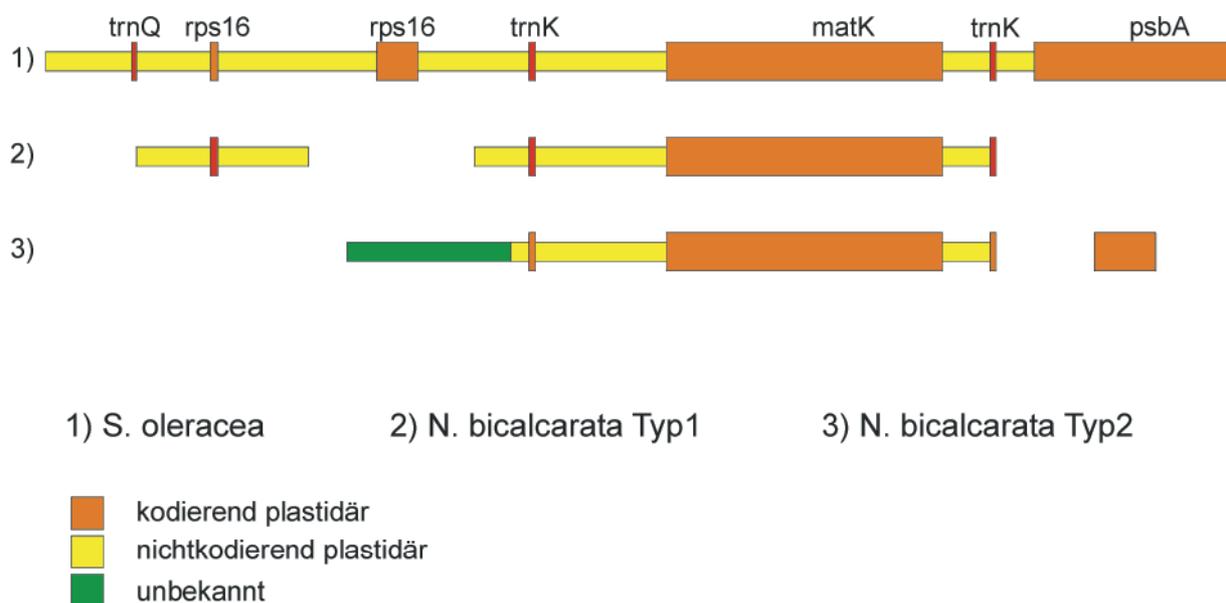


Abb. 47. Schematische Darstellung der Sequenzen für das trnK-Intron Typ 1 und Typ 2 im Vergleich zu dem entsprechenden Abschnitt der Chloroplasten-Genom-Sequenz von *S. oleracea* (gi7636084). Die nicht kodierenden Sequenzen waren gegenüber *S. oleracea* nur teilweise zu alinieren. Während Typ 2 an eine unbekannt Sequenz grenzt, kann die Typ 1 flankierende Sequenz durch Vergleich mit *S. oleracea* identifiziert werden. Der Abschnitt zwischen rps16 und trnQ des Typ 1 wurde für *N. madagascariensis* ermittelt. Die Darstellung ist nach 5'-3'-Richtung des Leserasters des matK-Gens orientiert.

Die Nepenthaceae besitzen demnach im mitochondrialen Genom sehr wahrscheinlich einen Abschnitt des plastidären Genoms, der das gesamte trnK-Intron und zumindest Teile des psbA umfasst. Die Möglichkeit des Vorkommens beider Kopien im Chloroplasten-Genom konnte, wie oben ausgeführt, ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass in der Amplifikation beider Typen des trnK-Introns vergleichbare Mengen an PCR-Produkt gebildet wurden, wies auf eine vergleichbare Häufigkeit der Zielsequenz in der Gesamt-DNA hin. Daher ist die Lokalisation einer Kopie im Kerngenom bei gleichzeitigem Vorkommen einer Kopie im Chloroplasten sehr unwahrscheinlich. Für eine Lokalisation des trnK-Intron Typ2 im Mitochondrium spricht auch die Übereinstimmung von 37 bp der das trnK-Intron Typ2 auf der 5'-flankierenden Sequenz mit einem Abschnitt des mitochondrialen Genoms von *Beta vulgaris*. Diese Art gehört zur Familie der Chenopodiaceae und wird wie *Nepenthes* in die Unterklasse der Caryophyllidae eingeordnet.

Der ORF des matK-Gens ist in der mitochondrialen Kopie nicht erhalten. Bei *N. bicalcarata* ist der größte ORF 1122 bp lang und beginnt 257 bp hinter der dem Startcodon des Typ 1 homologen Position und endet 27 bp hinter dem Stoppcodon. Es könnte sich daher bei diesem Abschnitt um ein mitochondriales Pseudogen handeln, was jedoch aufgrund der Länge des ORFs nicht allein anhand der Sequenz von *N. bicalcarata* entschieden werden konnte. Die mitochondriale Kopie des trnK-Introns wurde zusammen mit ca. 500 bp der 5'-flankierenden Sequenz für alle Nepenthaceae, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, vergleichend sequenziert und zusammen mit dem trnK-Intron des Chloroplasten als phylogenetischer Marker verwendet. In diesem Zusammenhang wurden weitere Eigenschaften der mitochondrialen Kopie als Pseudogen ermittelt (vgl. Kapitel 3.5).

3.4 TrnK-Intron Phylogenie der Nepenthaceae

Zur Aufklärung der Phylogenie der Nepenthaceae wurden vergleichende Sequenzanalysen des trnK-Introns von 85 Arten der Gattung *Nepenthes* und als Außengruppe *Triphyophyllum peltatum* und *Ancistrocladus abbreviatus* durchgeführt. Die Herkunft aller Proben und ihre Artbezeichnung einschließlich der Parallelproben sind in Tab. 1 gezeigt.

3.4.1 Alinierung des trnK-Introns der Nepenthaceae

Das trnK-Intron wurde bei allen 87 Arten wie in Kapitel 2.7.2.4 beschrieben, in zwei Abschnitten amplifiziert. Das trnK-Intron enthält zwei nichtkodierende Bereiche, einen von ca. 700 bp Länge (5'-nichtkodierender Bereich) und einen von ca. 250 bp Länge (3'-nichtkodierender Bereich). Dazwischen befindet sich der für die Maturase K (matK) kodierende Bereich von ca. 1500 bp Länge. Das Vorkommen des kodierenden Bereiches wurde bei allen Sequenzen durch Bestimmung des größten Open Reading Frame (ORF) überprüft. Der ORF ist bei allen Sequenzen, mit dem Startcodon ATG und dem Stoppcodon TGA erhalten, das

Stoppcodon bei *T. peltatum* ist TAA. Die sich daraus ergebende Einteilung in die kodierenden und nichtkodierenden Bereiche wurde durch Alinierung des trnK-Introns mit der Chloroplasten-Genom-Sequenz von *Nicotiana tabacum* (gi2924257) überprüft. Durch die Lokalisation der Primer 2-trnK-3914F und 16-trnK-2R im 5'- bzw. 3'-Exon des trnK sind die Sequenzabschnitte der nichtkodierenden Bereiche nicht vollständig. Gegenüber *N. tabacum* fehlen bei der 3'-nichtkodierenden Region bei *N. bicalcarata* 66 bp und bei *Ancistrocladus abbreviatus* 44 bp. Bei der 5'-nichtkodierenden Region fehlen bei beiden Arten 9 bp gegenüber *N. tabacum*.

Die Sequenzen der 85 untersuchten *Nepenthes*-Taxa sind 2425 bis 2465 bp lang, die von *A. abbreviatus* 2458 bp und die von *T. peltatum* 2471 bp. Bei *Nepenthes* entfallen auf den 5'-nichtkodierenden Bereich 687 bis 709 bp, auf den 3'-nichtkodierenden Bereich 225 bis 257 bp und auf den kodierenden Bereich 1512 bp bei fast allen *Nepenthes*-Arten. Bei *N. danseri* und *N. lavicola* beträgt die Länge des ORFs für matK 1503 bp bei *N. anamensis* 1518 bp. Bei *A. abbreviatus* beginnt der ORF 6 bp in 5'-3' Richtung vor der zum Startcodon von *Nepenthes* homologen Position, bei *T. peltatum* ist gegenüber *Nepenthes* und *Ancistrocladus* eine Base (Position 827 der *Triphyphyllum*-Sequenz) inseriert. Der größte ORF beginnt daher 139 bp hinter der zum Startcodon von *Nepenthes* homologen Position. Der ORF von *T. peltatum* und *A. abbreviatus* endet 24 Positionen hinter der zum Stoppcodon von *Nepenthes* homologen Position. Damit war der erfasste Bereich der 5'-nichtkodierenden Region bei *A. abbreviatus* 714 bp, bei *T. peltatum* 922 bp lang, der der kodierenden Region jeweils 1541 und 1346 bp lang und der erfasste Bereich der 3'-nichtkodierenden Region ist jeweils 202 bp lang.

Die Alinierung des trnK-Introns der 85 untersuchten *Nepenthes*-Arten und *A. abbreviatus* sowie *T. peltatum* umfasst insgesamt 2591 Positionen. Der kodierende Bereich bei *Nepenthes* liegt dabei zwischen den Positionen 784 und 2302. An 218 Positionen wurden Gaps eingefügt, um die Alinierung zu erhalten. Diese kennzeichnen insgesamt 44 Insertionen oder Deletionen (Indels) von 1 bis 32 bp Länge. In 32 Fällen sind Basen gegenüber der Mehrzahl der Taxa inseriert, in 12 Fällen deletiert. Auf die 5'-nichtkodierende Region entfallen 28 unterschiedliche Indels, auf die 3'-nichtkodierende Region 13. Nur drei Indels finden sich im für matK kodierenden Abschnitt, darunter eine Deletion von 9 bp Länge und eine Insertion von 6 bp Länge. Durch eine Insertion einer Base an Position 918 der Alinierung verschiebt sich, wie oben ausgeführt, der Anfang des ORF bei *T. peltatum*. Betrachtet man alle Gaps so zeigt sich, dass 29,4% der Positionen in der Alinierung der 3'-nichtkodierenden Region und 14,9% der der 5'-nichtkodierenden Region solche enthalten, aber nur 0,1% der Alinierung der kodierenden Region. 13 Indels betreffen Längenmutationen der Außengruppe gegenüber der Innengruppe. Besonders längenvariabel ist ein AT-reicher Abschnitt in der 5'-nichtkodierenden Region zwischen den Positionen 636 und 692. Innerhalb der Innengruppe lassen sich in dem AT-reichen Abschnitt 8 unterschiedlich ausgeprägte Insertionen und Deletionen unterschei-

den. Außerdem bestehen in diesem Abschnitt zwei gleichwertige Möglichkeiten zur Alinierung der Innengruppe gegen die Außengruppe, was allerdings für die Auflösung der Innengruppe unerheblich ist. Daher wurde die Alinierung gewählt, bei der weniger Gaps in die Sequenzen der Innengruppe eingefügt werden mussten.

Alle Indels wurden kodiert. Dabei wurden Indels gleicher Länge und ähnlicher Basenabfolge als gleich behandelt (vgl. Tab. 11). Eine Ausnahme wurde bei Indel Nummer 28, Position 778 bis 783 gemacht, in dessen Bereich bei der Außengruppe das Startcodon für *matK* liegt. An diesen Positionen sind bei allen *Nepenthes* gegenüber der Außengruppe 6 Basen deletiert, bei *N. pervillei* allerdings nur eine Base, die das potentielle Startcodon unterbricht (vgl. Abb. 48). Eine autapomorphe Insertion der Basenfolge ATAAA an dieser Stelle durch, Verdoppelung und / oder Inversion, erscheint aufgrund der Basenfolgen in den benachbarten Bereichen unwahrscheinlich. Bis auf Indel Nr. 15, Position 624 bis 630 (autapomorphe Insertion bei *N. tomoriana*), lassen sich alle anderen Indels des *trnK*-Introns, bei denen in der Innengruppe Basen gegenüber der Mehrzahl der Taxa inseriert sind, auf eine Verdoppelung direkt benachbarter Basen zurückführen. Der Zustand von *N. pervillei* läßt sich auch als Übergangszustand mit einer Verlagerung des Startcodons bei *Nepenthes* erklären. Die Folge ATAAA würde dann den plesiomorphen Zustand für *Nepenthes* darstellen, in dem das ursprüngliche Startcodon unterbrochen ist, und die in der weiteren Phylogenie der Nepentha-ceae vollständig deletiert wurde.

	770	780	790
T. peltatum	GATCGAATTTAAAA	ATGAAAATGGAAAAAT	TCCA
A. abbreviatus	GGTCTAATTTCAA	ATGAAAATGGGAAGAAT	TCCA
N. pervillei	GGTCCAATTTAAAAAT	-AAAATGGAAGAATTACG	
Übrige <i>Nepenthes</i>	GGTCCAATTTAAA	- - - - -	ATGGAAGAATTACG

Abb. 48. Ausschnitt aus der Alinierung des *trnK*-Introns von *Nepenthes*, *Triphyophyllum peltatum* und *Ancistrocladus abbreviatus*. Der Startcodon von *matK* (rot hervorgehoben) der Außengruppen ist bei *N. pervillei* durch die Deletion eines G unterbrochen und durch ein 3 bp in 3'-Richtung liegendes Codon ersetzt. Bei den übrigen *Nepenthes*-Arten ist der gesamte, dem Startcodon der Außengruppe homologe Bereich einschließlich drei flankierender Basen deletiert. Die Ausprägung bei *N. pervillei* könnte als Übergangszustand hin zu einem Deletionsereignis von 6 Basen bei den übrigen *Nepenthes* interpretiert und als Synapomorphie zur Außengruppe gewertet werden.

In der mitochondrialen Kopie des *trnK*-Introns fehlt dieser Abschnitt ATAAA ebenfalls, was die Deutung des Abschnitts als autapomorphe Insertion bei *N. pervillei* unterstützt. Das Indel wurde dennoch als identisch mit dem Indel der Außengruppe kodiert und damit als Synapomorphie von *N. pervillei* zur Außengruppe gewertet. Dieses Merkmal (kodiert als Position

2619 der Matrix) wurde aber als zweifelhaft behandelt und sein Einfluss im Einzelfall untersucht.

Tab. 11. Aufstellung der durch die Alinierung des trnK-Introns der Nepenthaceae mit der Außengruppe *Triphyophyllum peltatum* und *Ancistrocladus abbreviatus* angenommenen Längenmutationen.

	Position in der Alinierung	Länge in bp	Status gegenüber Mehrzahl der Taxa	Phylogenetischer Informationsgehalt	Vorkommen	kodiert als Charakter Nr.
5'-nichtkodierende Region						
1	143-150	7	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2952
2	157-166	9	inseriert	informativ	Außengruppe	2593
3	170-171	1	inseriert	informativ	Innengruppe	2594
4	201-206	5	inseriert	informativ	Innengruppe	2595
5	293-300	7	inseriert	nicht informativ	Außengruppe	2596
6	331-332	1	deletiert	nicht informativ	Innengruppe	2599
7	345-350	5	inseriert	nicht informativ	Außengruppe	2597
8	388-394	6	deletiert	informativ	Außengruppe	2598
9	513-514	1	inseriert	nicht informativ	Außengruppe	2600
10	545-553	8	inseriert	informativ	Innengruppe	2601
11	560-564	4	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2602
12	568-569	1	deletiert	informativ	Innengruppe	2603
13	585-586	1	inseriert	informativ	Außengruppe	2604
14	592-593	1	deletiert	nicht informativ	Außengruppe	2605
15	624-630	6	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2606
16	636-648	12	inseriert	informativ	Außengruppe	2607
17	648-655	7	deletiert	informativ	Innengruppe	2611
18	656-657	1	deletiert	nicht informativ	Außengruppe	2608
19	662-663	1	deletiert	nicht informativ	Innengruppe	2610
20	663-669	6	inseriert	informativ	Innengruppe	2609
21	660-663	3	deletiert	nicht informativ	Innengruppe	2614
22	663-666	3	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2613
23	663-676	13	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2615
24	681-690	9	inseriert	informativ	Innengruppe	2612
25	681-686	5	inseriert	informativ	Innengruppe	2616
26	681-692	11	inseriert	informativ	Außengruppe	2618
27	740-741	1	deletiert	nicht informativ	Innengruppe	2617
28	778-784	5-6	inseriert	informativ	Innengruppe	2619
Kodierende Region						
29	888-897	9	deletiert	informativ	Innengruppe	2620
30	918-919	1	inseriert	nicht informativ	Außengruppe	2621
31	1163-1169	6	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2622
3'-nichtkodierende Region						
32	2315-2347	32	inseriert	informativ	Innengruppe	2623
33	2315-2331	16	inseriert	informativ	Innengruppe	2624
34	2368-2369	1	inseriert	informativ	Außengruppe	2625
35	2370-2388	18	deletiert	nicht informativ	Innengruppe	2626
36	2376-2382	6	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2627
37	2395-2402	7	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2628
38	2417-2418	1	inseriert	informativ	Außengruppe	2629
39	2428-2433	5	inseriert	informativ	Innengruppe	2630
40	2447-2450	3	deletiert	informativ	Innengruppe	2631
41	2462-2463	1	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2632
42	2502-2507	5	inseriert	nicht informativ	Innengruppe	2633
43	2528-2533	5	inseriert	informativ	Innengruppe	2634
44	2522-2533	11	inseriert	informativ	Innengruppe	2635

3.4.2 Phylogenetische Analyse des trnK-Introns der Nepenthaceae

Die oben vorgestellte Alinierung des trnK-Introns von 85 Vertretern der Nepenthaceae sowie von *Triphyophyllum peltatum* und *Ancistrocladus abbreviatus* als Außengruppe wurde als Grundlage für eine Maximum-Parsimony-Analyse verwendet. Die Datenmatrix bestand aus den 2591 Positionen der Alinierung und den 44 Charakteren, die sich aus der Kodierung der Indels ergaben.

Die Datenmatrix enthielt somit 87 Taxa und 2635 Positionen, von denen 2137 konstant und 498 variabel waren, davon 129 (16,5%) in der 5'-nichtkodierenden Region, 59 (20,2%) in der 3'-nichtkodierenden Region und 267 (17,64%) in der für matK kodierenden Region. Von den variablen Positionen waren 223 nicht informativ und 275 potentiell phylogenetisch informativ. Auf die Innengruppe entfielen 132 potentiell phylogenetisch informative Positionen. Innerhalb der Innengruppe waren 77 Positionen (9,8%) in der 5'-nichtkodierenden Region, 42 (14,4%) in der 3'-nichtkodierenden Region und 169 (10,5%) in der kodierenden Region variabel. Alle drei Regionen wiesen damit vergleichbare Variabilität auf.

Die heuristische Suche mit den Standardeinstellungen von PAUP führte zu einer sehr hohen Anzahl kürzester Bäume mit 639 Schritten. Die Berechnung wurde daher mit der Option *collapse=min* durchgeführt, bei der Äste bei einer möglichen (minimalen) Astlänge von 0 zu Polytomien zusammengefasst werden. Die heuristische Suche mit diesen Einstellungen, sowie *simple sequence addition* gegen *T. peltatum* oder 10 Replikaten *random sequence addition* führte zu 12 kürzesten Bäumen mit 639 Schritten, einem CI von 0,867 und einem RI von 0,927. Die Konsensus-Topologie ist in Abb. 49 als Kladogramm und in Abb. 50 als Phylogramm gezeigt. Sie stimmt mit der unter Standardeinstellungen von PAUP, bei Begrenzung der Anzahl zu speichernder Bäume auf 1000, überein.

Der Ausschluss des Merkmals 2619, das wie oben dargestellt, eine zweifelhafte Synapomorphie von *N. pervillei* zur Außengruppe darstellt, ändert die Topologie nur geringfügig. *N. pervillei* von den Seychellen wird dann als Polytomie zusammen mit *N. distillatoria* aus Sri Lanka als das der Außengruppe benachbarte Taxon dargestellt, auch in der Bootstrap-Analyse. Die basale Position von *N. pervillei* bei Einschluss des Merkmals 2619, gestützt durch einen Bootstrap-Wert von 68 und einem Decay-Wert von 1, ist damit zweifelhaft. Die Schwestergruppe zu *N. pervillei* und *N. distillatoria* wird von den madagassischen Arten *N. madagascariensis* und *N. masoalensis* gebildet (Bootstrap-Wert 86, Decay-Wert >3). *N. khasiana* vermittelt zwischen diesen und allen anderen *Nepenthes* (Bootstrap-Wert 100, Decay-Wert >3). Die übrigen *Nepenthes*-Taxa bilden eine monophyletische Gruppe (Bootstrap-Wert 90, Decay-Wert 3). Diese Monophylie ist in drei gut gestützte Clades aufgeteilt (Clade 1 bis 3, vgl. Abb. 49).

Abb. 49. Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse des trnK-Introns der Nepenthaceae aus 12 kürzesten Bäumen mit 639 Schritten, als Kladogramm. Über den Ästen sind Bootstrap-Werte (10000 Replikate) angegeben, wenn die Äste durch Bootstrap-Analyse unterstützt sind. Unter den jeweiligen Ästen sind die Decay-Werte gezeigt.

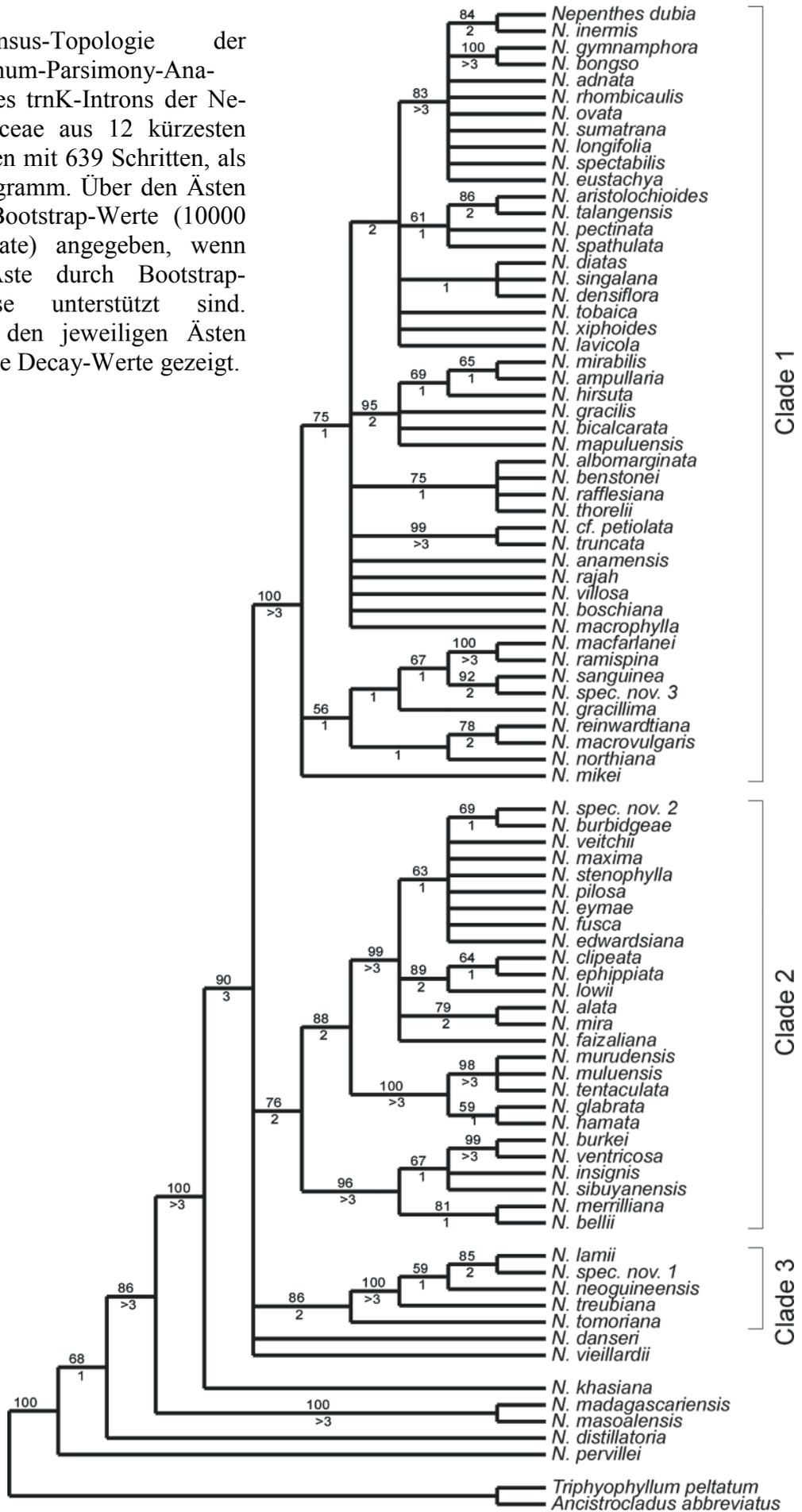
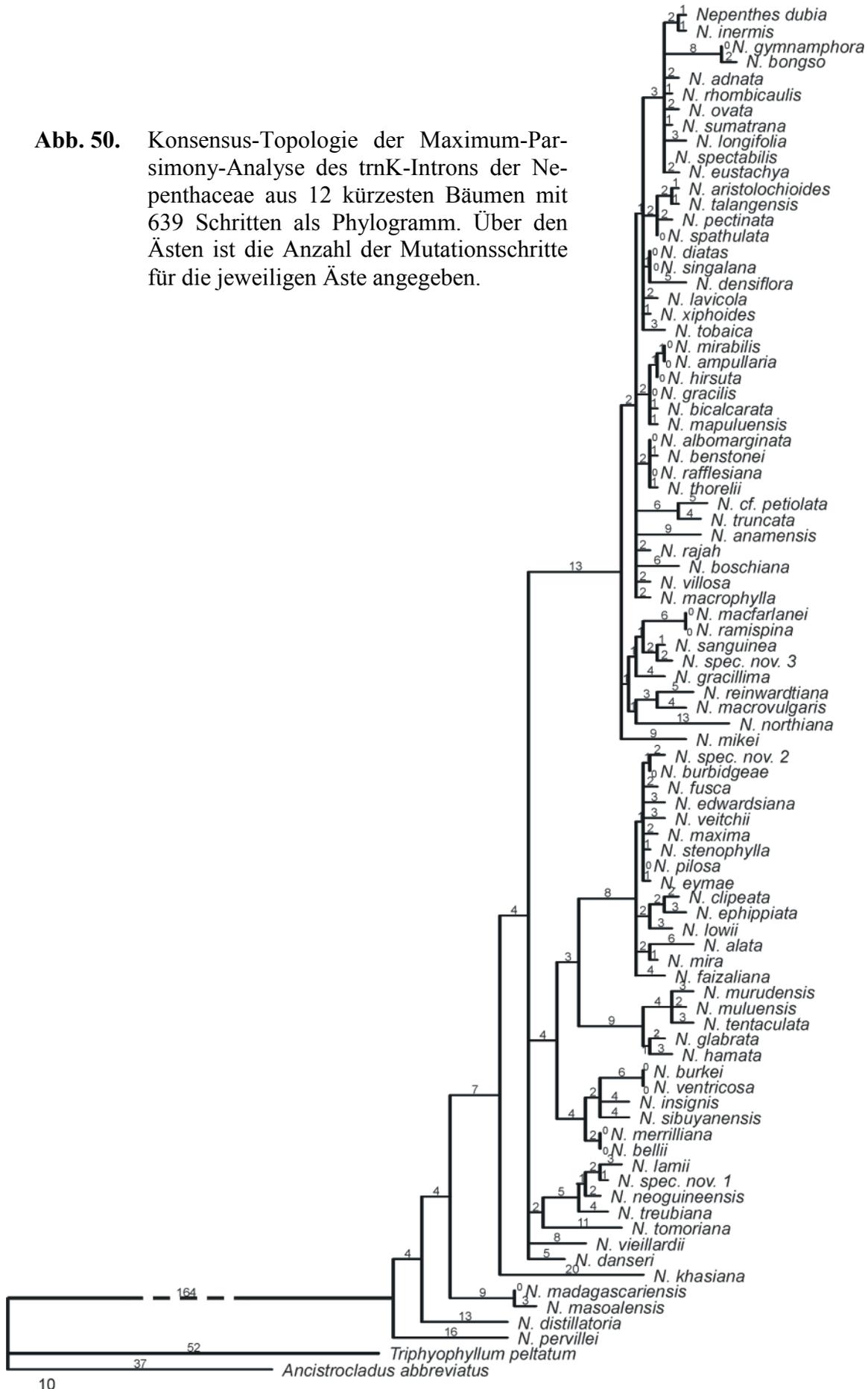


Abb. 50. Konsensus-Topologie der Maximum-Parimony-Analyse des trnK-Introns der Nepenthaceae aus 12 kürzesten Bäumen mit 639 Schritten als Phylogramm. Über den Ästen ist die Anzahl der Mutationsschritte für die jeweiligen Äste angegeben.



Clade 1 enthält 46 Arten und wird mit einem Bootstrap-Wert von 100 gestützt. Es bleibt auch in der Konsensus-Topologie aller Bäume, die bis einschließlich 3 Schritte länger als die kürzeste Topologie sind (Decay-Wert >3), erhalten. Innerhalb Clade 1 bilden alle in Sumatra endemischen Taxa, außer *N. mikei* eine Monophylie, die sich allerdings nicht durch eine Bootstrap-Analyse stützen lässt und die in der Konsensus-Topologie der um einen Schritt längeren Bäume kollabiert (Decay Wert 1). Die 3 Arten mit weitem Verbreitungsgebiet, *N. mirabilis*, *N. ampullaria* und *N. gracilis*, bilden zusammen mit 3 auf Borneo heimischen Arten, *N. hirsuta*, *N. bicalcarata* und *N. mapuluensis*, eine monophyletische Gruppe (Bootstrap-Wert 95, Decay-Wert 2). Außerdem bilden die Arten mit einer das gesamte Sundaschelf umfassenden Verbreitung (malaiische Halbinsel, Sumatra, Borneo), nämlich *N. albomarginata* und *N. rafflesiana*, zusammen mit *N. benstonei* und der Probe, die als *N. thorelii* in die Analyse aufgenommen wurde, eine Monophylie (Bootstrap-Wert 75, Decay-Wert 1).

Als Polytomie innerhalb Clade 1 wird eine Monophylie aus *N. cf. petiolata* und *N. truncata* (Bootstrap- 99, Decay-Wert >3), beide auf die Philippinen beschränkt, sowie aus *N. anamensis* aus Thailand-Vietnam und aus den endemisch auf Borneo beschränkten Arten *N. rajah*, *N. villosa*, *N. boschiana* und *N. macrophylla* gestellt. Die Schwestergruppe zu allen anderen Taxa des Clade 1 bildet eine schwach gestützte Monophylie (Bootstrap- 56, Decay-Wert 1) bestehend aus *N. reinwardtiana* (von Borneo und Sumatra) und *N. macrovulgaris* und *N. northiana* (von Borneo), und auf der malaiischen Halbinsel endemischen Arten *N. macfarlanei*, *N. ramispina*, *N. sanguinea*, *N. gracillima* und *N. spec. nov 3*. Die Verbreitung von *N. spec. nov 3* ist noch nicht bekannt ist, die Probe wurde aber auf der malaiischen Halbinsel gesammelt. Als Polytomie zu allen Arten von Clade 1 wird *N. mikei* aus Sumatra gestellt.

Clade 2 entspricht einer Monophylie aus 26 Arten (Bootstrap-Wert 76, Decay-Wert 2), die sich in drei Subclades gliedert. Einer dieser Subclades besteht unter anderem aus einer Monophylie aus *N. burbidgeae*, *N. veitchii*, *N. stenophylla*, *N. pilosa*, *N. fusca* und *N. edwardsiana* (endemisch auf Borneo) und *N. eymae* (aus Sulawesi) und *N. maxima*, (aus Sulawesi und Neu Guinea). Als Polytomie zu der Gruppe um *N. maxima* wird *N. faizaliana*, eine Monophylie aus *N. clipeata*, *N. ephippiata* und *N. lowii* (Borneo) (Bootstrap-Wert 89, Decay-Wert 2) sowie eine Monophylie aus *N. alata* (Philippinen) und *N. mira* (Palawan) (Bootstrap-Wert 79, Decay-Wert 2) gestellt. Die Schwestergruppe zu diesen Arten wird von *N. muluensis*, *N. murudensis* (Borneo), *N. tentaculata* (Borneo und Sulawesi) und *N. hamata* und *N. glabrata* (Sulawesi) (Bootstrap-Wert 100, Decay-Wert >3) gebildet. *N. burkei*, *N. ventricosa*, *N. sibuyanensis*, *N. merrilliana* und *N. bellii* von den Philippinen zusammen mit *N. insignis* aus Neu Guinea bilden die Schwestergruppe zu den übrigen Arten von Clade 2 (Bootstrap-Wert 96, Decay-Wert 3).

Clade 3 besteht aus den 4 in Neu Guinea verbreiteten Arten *N. lamii*, *N. neoguineensis*, *N. treubiana* und *N. spec nov. 1* und *N. tomoriana* aus Sulawesi. *N. tomoriana* bildet das Schwe-

stertaxon zu den übrigen Taxa von Clade 3. *N. danseri* aus Waigeo und *N. vieillardii* aus Neu Kaledonien erscheinen in der Konsensus-Topologie als Polytomie zu allen Arten von Clade 1 bis 3.

Die Topologie der trnK-Intron Phylogenie zeigt keine auffallenden Widersprüche zu biogeographischen Daten sowie zu der Gattungseinteilung nach Danser (1928), wenn man Dansers Einschätzung über die Bedeutung seiner Gruppen als evolutive Einheiten berücksichtigt (vgl. Kapitel 4.4.3). Für eine bessere Auflösung der Phylogenie der Nepenthaceae wurde die trnK-Intron-Phylogenie mit einem Datensatz aus Sequenzen der mitochondrialen Kopie des trnK-Introns verschiedener *Nepenthes*-Taxa ergänzt.

3.5 Phylogenetische Analyse der mitochondrialen trnK-Pseudogen-Sequenzen

Zur Absicherung der trnK-Intron-Phylogenie der Nepenthaceae wurde eine vergleichende Sequenzanalyse der mitochondrialen Kopie des trnK-Introns durchgeführt. In dieser Analyse wurde ein Abschnitt untersucht, der sich zusammensetzt aus einem dem trnK-Intron homologen Bereich, einem dem 5'-Exon des trnK homologen Bereich und ca. 500 bp der das 5'-Exon flankierenden Sequenz, die wahrscheinlich eine mitochondriale Sequenz darstellt (vgl. 3.3.2.2). Dieser Abschnitt wurde wie in Kapitel 2.7.2.4 beschrieben amplifiziert und sequenziert. Der die mitochondriale Kopie des trnK-Introns enthaltende Abschnitt konnte bei insgesamt 68 Arten der Nepenthaceae amplifiziert werden (*N. bongso*, *N. masoalensis*, *N. spec. nov2* und *N. spec. nov3* wurden nicht untersucht).

Bei 15 Arten gelang die Amplifikation nicht, auch wenn verschiedene Primerpaare eingesetzt wurden. Von diesen Arten bilden *N. burkei*, *N. ventricosa*, *N. insignis*, *N. sibuyanensis*, *N. merrilliana* und *N. bellii* in der Phylogenie des plastidären trnK-Introns eine monophyletische Gruppe. Außerdem gelang die Amplifikation des mitochondrialen Pseudogens nicht bei *N. distillatoria*, *N. khasiana*, *N. tomoriana*, *N. treubiana*, *N. alata*, *N. edwardsiana* und *N. ovata*. Es erscheint wahrscheinlich, dass bei den genannten Arten große Deletionen im Bereich der Primerbindungsstellen vorliegen. Derartige Deletionen konnten bei einigen Taxa festgestellt werden, z. B. bei *N. faizaliana*, deren Sequenz ca. 1400 bp kürzer war als die der anderen Taxa. Weil der Informationsgehalt solcher Sequenzen vermindert ist, war die Anwendung einer anderen Primerstrategie für diese Arten nicht lohnend.

Der Beginn des Open Reading Frame (ORF), der dem plastidären matK entspricht, ist durch eine Punktmutation im matK Startcodon (ATT statt ATG) auf die Position verschoben, die der Position 974 bis 977 der Alinierung des trnK-Introns homolog ist. Durch eine Insertion von 5 bp an Position 1953 entsteht bei den meisten Nepenthaceae an Position 2070 bis 2073 ein neues Stoppcodon. Im Gegensatz zu der plastidären kodierenden Region von matK ist der

ORF der mitochondrialen Kopie häufig durch Indels unterbrochen, so dass der größte bestimmbare ORF bei den meisten untersuchten Taxa zwischen 333 und 1122 bp lang war. Bei 5 Proben ließ sich kein ORF länger als 100 bp bestimmen. Dies bestätigt, dass es sich bei den mitochondrialen Sequenzen aller Wahrscheinlichkeit nach um Pseudogene handelt.

Die untersuchten Sequenzen waren zwischen 1620 und 3023 bp lang, die meisten zwischen 2800 und 3000 bp. Bei Sequenzen aus den PCR-Produkten, die mit dem Primer 16Typ2 (vgl. Kapitel 2.7.2.4) gewonnen wurden, wurden am 3'-Ende 86 bp weniger als bei Verwendung des Primers 16-*trnK*-2R erfasst. Die Alinierung der mitochondrialen Pseudogen-Sequenzen mit *trnK*-Intron-Sequenzen von *Triphyophyllum peltatum* und *Ancistrocladus abbreviatus* als Außengruppe umfasste 3133 Positionen. Davon entfielen die Positionen 1 bis einschließlich 542 auf den keiner bekannten Sequenz zuordenbaren Abschnitt, Position 543 bis 581 auf den dem 5'-Exon des *trnK* homologen Bereich, 582 bis 1354 auf den der 5'-nichtkodierenden Region homologen Bereich, 1355 bis 2902 auf den *matK* homologen Bereich und 2903 bis 3133 auf den der 3'-nichtkodierenden Region homologen Bereich.

In der Alinierung der mitochondrialen Kopie des *trnK*-Introns waren 62 Längenmutationen erkennbar, davon 44 zwischen Arten der Innengruppe. Die Länge der Indels in der Alinierung des mitochondrialen Pseudogens variiert stärker als die Länge der Indels in der Alinierung des plastidären *trnK*-Introns. 5 Indels sind länger als 100 bp, das längste Indel stellt eine Deletion von 1459 bp bei *N. faizaliana* dar. Das Auftreten dieser markanten Längenmutationen sowie die hohe Anzahl von Längenmutationen in den homologen Regionen des kodierenden Bereiches des *trnK*-Introns bestätigt den Status der mitochondrialen Sequenzen als Pseudogen. So ist beispielsweise bei *N. glabrata* der Bereich des 5'-Exons des *trnK* vollständig deletiert. In dem *matK* homologen Bereich finden sich insgesamt 18 Indels von denen 12 das potentielle Leseraster des *matK* unterbrechen. 78% der dem Leseraster des *matK*-Gens homologen Positionen in der Alinierung enthielten Gaps, bei Berücksichtigung von Indels unter 100 bp Länge immer noch 7%. Dies ähnelt in etwa dem Anteil der Positionen mit Gaps der 3'-nichtkodierenden Region (7%) und der 5'-nichtkodierenden (22%). In der Alinierung des plastidären *trnK*-Introns ist der Anteil der Positionen mit Gaps im *matK* mit 0,1% sehr viel niedriger als in den nicht kodierenden Regionen mit 15 % bzw. 29 %.

Die Indels wurden kodiert und in die phylogenetische Analyse einbezogen (vgl. Tab. 12). Bei Indel Nr. 8 der Pseudogen-Sequenz, bei dem 5 Zustände als unterschiedliche Anzahl von T bestehen, wurde jeder Zustand als ein Merkmal gewertet. Wegen der niedrigen Homologiewahrscheinlichkeit dieser Poly-T-Abschitte wurde der Einfluss dieser 5 Merkmale auf die Topologie untersucht. Da sich diese Positionen in der Maximum-Parsimony-Analyse als Analogien mit niedrigem CI erwiesen, wurden in den folgenden Analysen die der Kodierung des Poly-T-Abschnitts entsprechenden Positionen der Datenmatrix ausgeschlossen.

Tab. 12. Aufstellung der durch die Alinierung des mitochondrialen Pseudogens des *trnK* der Nepenthaceae mit dem plastidären *trnK*-Intron von *Triphyophyllum peltatum* und *Ancistrocladus abbreviatus* angenommenen Längenmutationen.

Nr.	Position in der Alinierung	Länge in bp	Status gegenüber Mehrzahl der Taxa	Vorkommen	Phylogenetischer Informationsgehalt	kodiert als Merkmal Nr.
Flankierende Sequenz						
1	24-26	2	inseriert	Innengruppe	informativ	3134
2	43-44	1	inseriert	Innengruppe	informativ	3135
3	54-57	3	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3136
4	140-141	1	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3137
5	204-242	38	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3138
6	282-283	1	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3139
7	277-507	230	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3140
8	508-513	5	inseriert	Innengruppe	informativ	3141 bis 3145
9	521-1980	1459	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3182
10	563-565	2	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3146
5'-nichtkodierende Region						
11	635-644	9	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3147
12	660-664	4	deletiert	Innengruppe	informativ	3148
13	667-673	6	deletiert	Innengruppe	informativ	3149
14	667-672	5	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3150
15	700-701	1	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3151
16	742-751	9	inseriert	Außengruppe	informativ	3152
17	729-755	26	deletiert	Innengruppe	informativ	3153
18	755-763	8	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3154
19	762-768	6	inseriert	Außengruppe	nicht informativ	3155
20	778-885	7	inseriert	Außengruppe	nicht informativ	3156
21	888-893	5	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3157
22	925-927	2	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3158
23	935-940	5	inseriert	Außengruppe	nicht informativ	3159
24	976-980	4	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3160
25	978-984	6	deletiert	Außengruppe	informativ	3161
26	1036-1037	1	deletiert	Innengruppe	informativ	3162
27	1077-1078	1	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3163
28	1083-1087	4	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3164
29	1087-1095	8	deletiert	Innengruppe	informativ	3165
30	1099-1108	9	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3166
31	1099-1104	5	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3167
32	1171-1172	1	inseriert	Außengruppe	nicht informativ	3168
33	1111-1128	17	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3169
34	1125-1127	2	inseriert	Innengruppe	informativ	3170
35	1169-1170	1	inseriert	Außengruppe	nicht informativ	3171
36	1173-1175	2	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3172
37	1176-1177	1	deletiert	Außengruppe	informativ	3174
38	1212-1234	22	inseriert	Außengruppe	informativ	3175
39	1245-1246	1	inseriert	Außengruppe	informativ	3173
40	1311-1317	6	deletiert	Außengruppe	informativ	3176
41	1349-1355	6	inseriert	Außengruppe	informativ	3178
Kodierende Region						
42	1478-1480	2	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3177
43	1491-1492	1	inseriert	Außengruppe	nicht informativ	3179
44	1610-1618	8	deletiert	Innengruppe	informativ	3180
45	1676-1679	3	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3187
46	1728-2072	344	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3181
47	1708-1819	111	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3183
48	1856-1857	1	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3184

Fortsetzung Tab. 12

Nr.	Position in der Alinierung	Länge in bp	Status gegenüber Mehrzahl der Taxa	Vorkommen	Phylogenetischer Informationsgehalt	kodiert als Merkmal Nr.
Kodierende Region						
49	1936-1957	21	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3185
50	1970-1972	2	inseriert	Innengruppe	informativ	3186
51	2059-2066	7	deletiert	Innengruppe	informativ	3188
52	2312-2313	1	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3189
53	2293-2766	473	deletiert	Innengruppe	informativ	3190
54	2426-2427	1	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3191
55	2544-2549	5	deletiert	Außengruppe	informativ	3192
56	2647-2648	1	inseriert	Innengruppe	nicht informativ	3193
57	2735-2741	6	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3194
58	2774-2781	7	deletiert	Außengruppe	informativ	3195
59	2790-2798	8	deletiert	Innengruppe	nicht informativ	3196
3'-nichtkodierende Region						
60	2937-2938	1	inseriert	Außengruppe	informativ	3197
61	2976-2980	4	inseriert	Außengruppe	informativ	3198
62	2986-2987	1	inseriert	Außengruppe	informativ	3199
63	3125-3126	1	deletiert	Innengruppe	informativ	3200

Bei *N. pervillei* entstanden bei der Amplifikation mit dem Primerpaar Flank1500F /16-trnK-2R mehrere Koamplifikate für das mitochondriale trnK-Pseudogen. Diese ergaben in der direkten Sequenzierung aus dem PCR-Produkt überlagerte Sequenzen. Bei der Verwendung des Primerpaares Flank1900F / 16-trnK-2R entstanden 2 Produkte unterschiedlicher Länge, die nach der Auftrennung auf einem Agarose-Gel einzeln ausgeschnitten und sequenziert werden konnten. Auch dann waren verschiedene Abschnitte aufgrund von Überlagerung nicht auswertbar. Durch die Verwendung verschiedener Primer konnten aber von dem längeren Produkt (Paralogen 1) 2109 bp und von dem kürzeren Produkt (Paralogen 2) 1282 bp der ca. 3100 bp der Alinierung ermittelt werden. Diese beiden Sequenzen unterschieden sich von der plastidären Sequenz, was ihren Status als Paraloge des mitochondrialen Pseudogens bestätigt. Die teilweise Überlagerung der von beiden Paralogen gewonnen Sequenzen ließ sich auf die gleichzeitige Sequenzierung von Kopien mit verschiedenen Längenmutationen zurückführen.

Die Lage dieser Längenmutationen konnten durch Allelsubtraktion ermittelt werden (vgl. Kapitel 2.8.4). Das PCR-Produkt des Paralogen 1 enthielt Kopien, in denen ein Poly-A-Abschnitt 9 bp und einer 7 bp lang war. Der Zustand des Poly-A-Abschnitts aus 7 bp entsprach dem Zustand des Paralogen 2. Bei Paralogen 2 war ein Abbruch der Sequenz ab Position 78 festzustellen. Dieser Abbruch konnte auf die gemeinsame Sequenzierung von zwei Kopien, von denen eine eine Deletion von 10 bp ab Position 78 aufwies, zurückgeführt werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den durch die unterschiedliche Größe trennbaren Amplifikate auch jeweils um Gemische verschiedener Sequenzen handelte. Die von Paralogen 1 und 2 auswertbaren Abschnitte konnten jeweils zu Sequenzen zusammengesetzt werden, die, obwohl es sich offensichtlich um Gemische verschiedener Kopien handelte, einheitliche Eigenschaften im Vergleich zu Sequenzen der übrigen Nepenthaceae aufwiesen. Auch bei einigen

Sequenzen des mitochondrialen Pseudogens der anderen *Nepenthes*-Taxa wurden Überlagerungen beobachtet, vor allem ab dem Poly-T-Abschnitt von Position 508 bis 518 der Alinierung. Es könnten also auch bei anderen Taxa verschiedene paraloge Sequenzen für den untersuchten Abschnitt vorliegen.

Paralogen 1 von *N. pervillei* hat zu den übrigen Sequenzen eine geringere Distanz als Paralogon 2. Die UPGMA und die PCoA (mit durchschnittlicher Distanz und mit p-Distanz) zeigte, dass das Paralogon 2 ebenso wie die Sequenzen von *N. longifolia*, *N. lamii*, *N. faizaliana* und die Sequenzen der Taxa um *N. hamata* (siehe oben), sich von den Sequenzen der übrigen Taxa der Nepenthaceae stärker unterscheiden als diese sich untereinander (vgl. Abb. 51). Bei *N. faizaliana* ließ sich dies auf die große Deletion zurückführen. Lange Deletionen verringern die für ein Sequenzpaar vorliegende Alinierungslänge und damit die Stichprobe für die Distanzbestimmung im Vergleich zu Sequenzpaaren ohne Deletionen. Dies kann zu größeren zufälligen Abweichungen bei der Distanzbestimmung führen. Von den in der Distanz abweichenden Sequenzen enthielten *N. faizaliana* und die Taxa um *N. hamatus* lange Deletionen, die von *N. longifolia* enthielt einen langen, nicht sequenzierten Abschnitt. Nach Ausschluss der die Deletion von *N. faizaliana* betreffenden Positionen in der Alinierung wies *N. faizaliana* keine höhere Distanz zu den anderen Taxa auf. Im Gegensatz dazu bestätigte der Ausschluss der entsprechenden Deletionen die hohe Distanz zwischen *N. longifolia* und der Taxa um *N. hamata* sowie dem Paralogon 2 von *N. pervillei* zu den übrigen untersuchten Taxa.

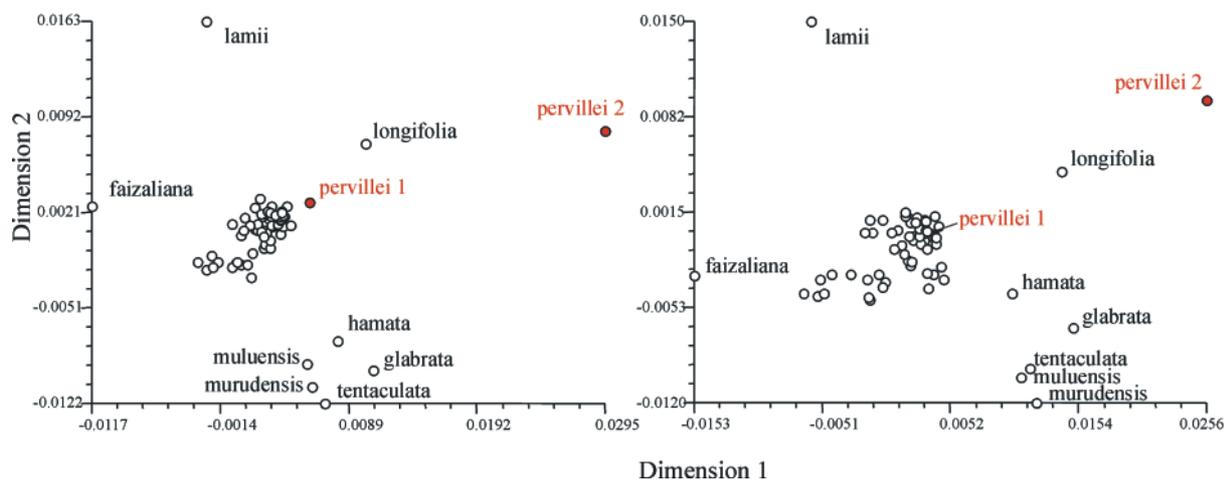


Abb. 51. Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) durchschnittlicher Distanzen der Alinierung des mitochondrialen Pseudogens der Nepenthaceae zur Darstellung der Position der paralogen Sequenzen aus *N. pervillei*. Oben für Positionen, die für eine der Sequenzen, rechts für Positionen, die für beide Sequenzen vorliegen. Beide paraloge Sequenzen werden unterschiedlich positioniert.

Dieser Unterschied in den paarweisen Distanzen beider Paralogons zu den anderen Sequenzen läßt sich entweder mit einer unterschiedlichen Evolutionsgeschwindigkeit beider Paralogons

nach einer monophyletischen Abstammung oder mit einer nicht homologen Herkunft beider Sequenzen erklären. Im letzteren Fall müsste eine Sequenz seit einer frühen Artaufspaltung in einer Mitochondrien-Population persistieren, während die andere nach einem Hybridisierungsereignis koexistiert und eine geringere Distanz zu der Sequenz einer Ausgangsart aufweist. Auf mögliche Erklärungen dieses Phänomens und auf Konsequenzen für die Interpretation einer phylogenetischen Analyse wird im Folgenden näher eingegangen.

3.5.1 Basenzusammensetzung der mitochondrialen Sequenzen

Der GC-Gehalt im plastidären trnK-Intron der Nepenthaceae betrug 30,6 bis 33,1% (MW = 32,74%, Stabw = 0,47). Es bestand kein wesentlicher Unterschied im GC-Gehalt zwischen den nichtkodierenden Bereichen (5'-nichtkodierender Bereich: MW = 32,96%; Stabw = 1,24; 3'-nichtkodierender Bereich: MW = 34,92%; Stabw = 1,45) und dem kodierenden Bereich (MW = 32,39%; Stabw = 0,37). Der untersuchte Sequenzabschnitt der mitochondrialen Kopie des trnK-Introns hatte einen GC-Gehalt von durchschnittlich 33,91% (Stabw = 1,25). Es bestand ein wesentlicher Unterschied im GC-Gehalt zwischen der unbekannt, 5'-flankierenden Sequenz (MW = 40,52%; Stabw = 0,94) und dem 5'-Exon des trnK homologen Bereichs (MW = 45,36%; Stabw = 3,45) einerseits und den dem trnK-Intron homologen Bereichen, mit der 5' nichtkodierenden (MW = 33,63%; Stabw = 0,75), der kodierenden (MW = 31,74; Stabw = 1,64) und der 3'-nichtkodierenden Region (MW = 32,76% Stabw = 3,16), andererseits. Das trnK-Intron und die mitochondriale Pseudogen-Sequenz des trnK-Introns unterscheiden sich demnach im GC-Gehalt nicht voneinander, das trnK-Exon und die flankierende Sequenz des Pseudogens haben einen erhöhten GC-Gehalt (vgl. Abb. 52).

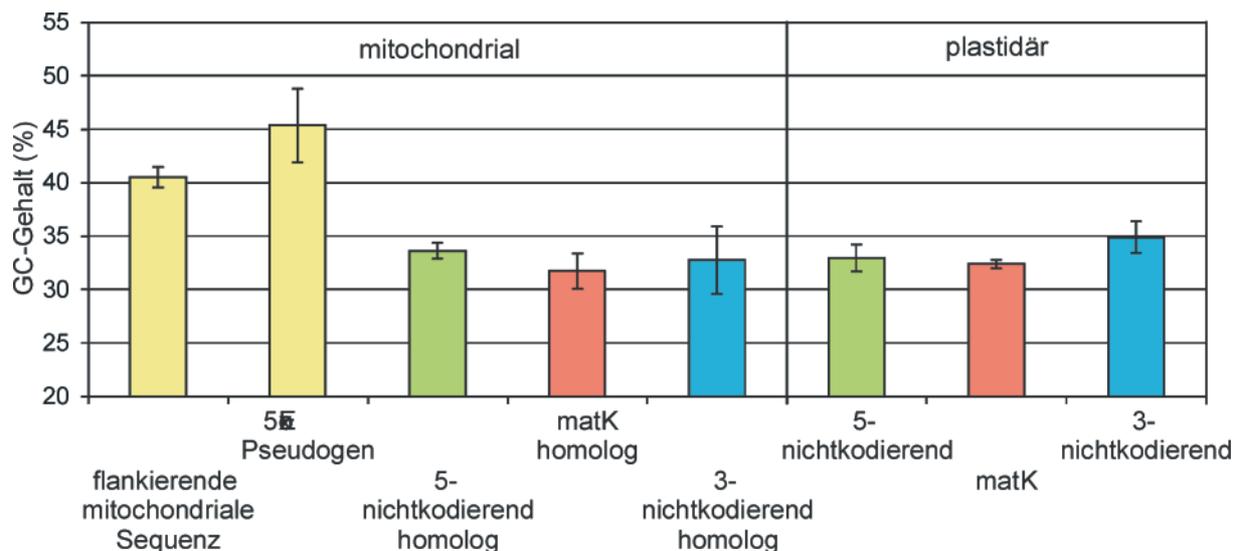


Abb. 52. GC-Gehalt der unterscheidbaren Sequenzabschnitte des plastidären trnK-Introns und seiner mitochondrialen Kopie.

3.5.2 Phylogenetische Analyse der mitochondrialen Kopie des trnK-Introns der Nepenthaceae

Die Phylogenie der Sequenzen des mitochondrialen Pseudogens des trnK-Introns der Nepenthaceae wurde durch eine Maximum-Parsimony-Analyse rekonstruiert. Dazu wurde eine Alinierung aller Sequenzen des mitochondrialen Pseudogens, die für 68 Taxa der Nepenthaceae erhalten werden konnten, mit den plastidären trnK-Intron Sequenzen von *Triphyophyllum peltatum* und *Ancistrocladus abbreviatus* als Außengruppe aliniert und zur Maximum-Parsimony-Analyse eingesetzt. Die Datenmatrix enthielt somit 71 Taxa (zweimal für *N. pervillei*) und 3195 Positionen, davon 3133 aus der Alinierung und 62 aus der Kodierung der Indels. Die das Indel Nr. 8 betreffenden 5 Merkmale wurden nach ersten Analysen ausgeschlossen. Von den Positionen der Datenmatrix waren 2638 Positionen konstant, 282 variabel und nicht informativ und 275 variabel und potentiell phylogenetisch informativ.

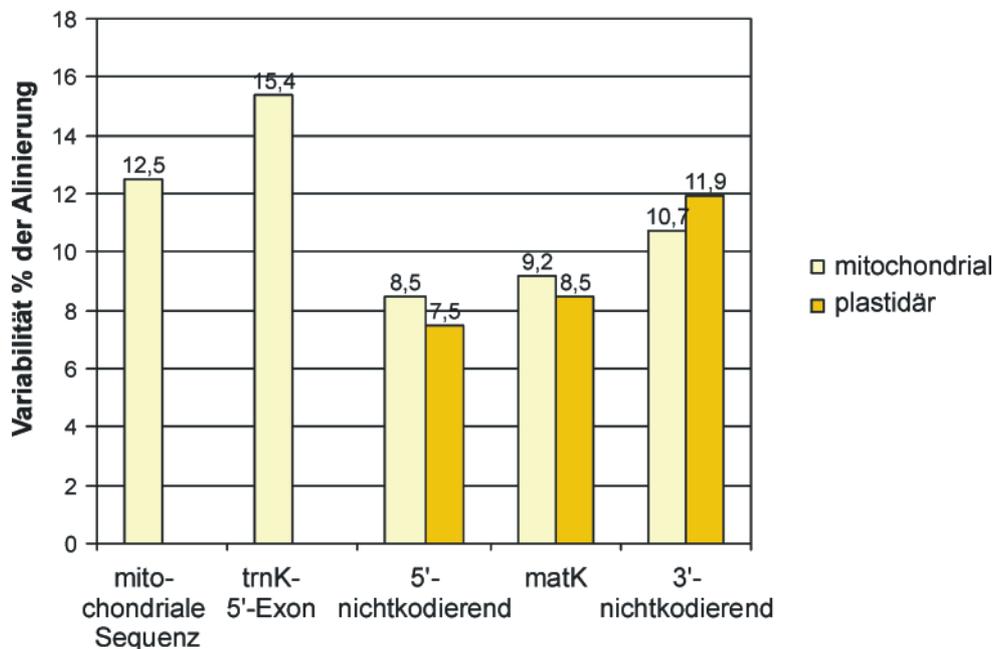


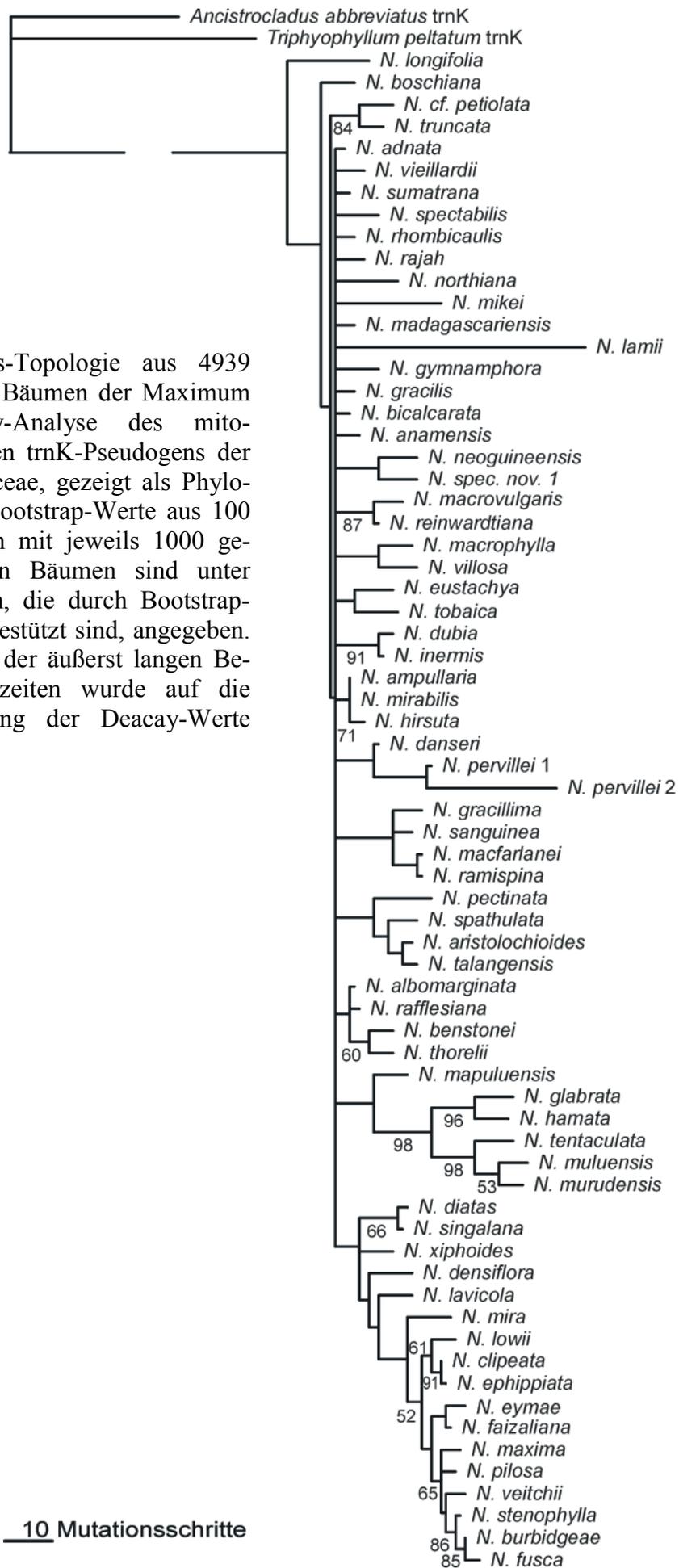
Abb. 53. Vergleich der Anzahl der variablen Positionen der einzelnen unterscheidbaren Sequenzabschnitte des mitochondrialen Pseudogens des trnK und des plastidären trnK-Introns. Zugrundegelegt wurde eine Alinierung der Nepenthaceae, die nur Taxa enthielt für die Daten für beide Genorte vorlagen.

In dem bekannten Sequenzen nicht zuordenbaren Sequenzabschnitt, der das trnK-Pseudogen flankiert, waren 12,5 % der Positionen der auf die Innengruppe reduzierten Alinierung variabel. In dem homologen Abschnitt des 5'-Exons waren dies 15,4 %, in dem der 5'-nichtkodierenden Region 8,5 %, in dem der kodierenden Region 9,2 % und in dem homologen Abschnitt der 3'-nichtkodierenden Region 10,7 % der Positionen. Die Variabilität dieser einzelnen Abschnitte war somit mit der Variabilität der Abschnitte des plastidären trnK-Introns ver-

gleichbar. Der Anteil variabler Positionen in der Alinierung des plastidären trnK-Introns der Taxa, für die Daten für das mitochondriale Pseudogen vorlagen, betrug 7,5 % in der 5'-nichtkodierenden Region des trnK-Introns, 8,5 % in der kodierenden Region und 11,9 % in der 3'-nichtkodierenden Region (vgl. Abb. 53). Die Maximum-Parsimony-Analyse führte, unter Verwendung der oben genannten Außengruppe, zu 4939 kürzesten Bäumen mit 824 bis 831 Schritten, einem CI von 0,739 bis 0,745 und einem RI von 0,728 bis 0,737, unter Verwendung der Option *collapse=min* und *simple sequence addition* mit *T. peltatum* als Referenztaxon (vgl. Kapitel 2.9.3). In der Konsensus-Topologie wird das der Außengruppe benachbarte Taxon von *N. longifolia* gebildet, gefolgt von *N. boschiana* und einer Monophylie von *N. cf. petiolata* und *N. truncata*. Alle anderen Taxa bilden eine schlecht aufgelöste Monophylie, in der 14 Taxa als Polytomie gezeigt werden. Monophyletisch erscheinen neben einigen kleineren Gruppen, die auch in der trnK-Intron-Phylogenie angezeigt sind, die Taxa um *N. hamata* und die um *N. maxima*. Die meisten der inneren Knoten der Topologie sind nicht durch Bootstrap-Analyse stützbar. Insgesamt 15 der 34 inneren Knoten sind in der Konsensus-Topologie der um einen Schritt längeren Bäume (Decay-Index = 1, berechnet aus 100000 Bäumen der Länge 824 und 825) nicht mehr angezeigt. Das betrifft auch alle der Außengruppe benachbarten Knoten. Nur zwei Gruppen enthalten mehr als vier Taxa, das sind zum einen die Monophylie um *N. hamata* mit 5 Taxa und zum anderen die Monophylie um *N. maxima* mit 11 Taxa. Die Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse des mitochondrialen Pseudogens des trnK ist in Abb. 54 gezeigt.

Im Gegensatz zu allen anderen Maximum-Parsimony Analysen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, änderte sich die Konsensus-Topologie des Datensatzes des mitochondrialen Pseudogens des trnK-Introns mit Änderung verschiedener Parameter. So führte *random sequence addition* mit 10 Replikaten zu einer erheblich höheren Anzahl kürzester Bäume. Außerdem wurde der kürzeste Baum mit 824 Schritten nicht in jedem Replikat gefunden. Nach dem Einbau eines aus den Sequenzen abgeleiteten Grundmusters (Wägele, 2000) als Referenztaxon in die Maximum-Parsimony-Analyse bildet *N. madagascariensis*, wie in der trnK-Intron-Phylogenie, die Nachbargruppe der Außengruppe. Als Grundmuster wurde der ursprüngliche Zustand der Sequenzen durch Vergleich der Sequenzen des plastidären trnK-Introns und der mitochondrialen Sequenzen mit den Außengruppen angenommen. Dazu wurde der Zustand einer variablen Position als ursprünglich gewertet, wenn er in der Innengruppe einer der beiden Datensätze mit der Außengruppe übereinstimmte oder in der Innengruppe beider Datensätze übereinstimmte. Das Grundmuster wurde als „ancestor“ in die Maximum-Parsimony-Analyse einbezogen. Dadurch werden gewurzelte Bäume erstellt, wobei der „ancestor“ als Referenztaxon für den Branch-Swapping Algorithmus dient. Der Einbau des Grundmusters in die Phylogenie des plastidären trnK-Intron änderte die entsprechende Topologie nicht.

Abb. 54. Konsensus-Topologie aus 4939 kürzesten Bäumen der Maximum Parsimony-Analyse des mitochondrialen trnK-Pseudogens der Nepenthaceae, gezeigt als Phylogramm. Bootstrap-Werte aus 100 Replikaten mit jeweils 1000 gespeicherten Bäumen sind unter den Ästen, die durch Bootstrap-Analyse gestützt sind, angegeben. Aufgrund der äußerst langen Berechnungszeiten wurde auf die Bestimmung der Decay-Werte verzichtet.



10 Mutationsschritte

Die Konsensus-Topologie der kürzesten Bäume der mitochondrialen Sequenzen ist damit erheblich schlechter aufgelöst als die der plastidären trnK-Intron Sequenzen. Der Datensatz aus den Sequenzen des mitochondrialen Pseudogens scheint ein geringeres phylogenetisches Signal als der Datensatz der plastidären Sequenzen zu enthalten. Dementsprechend beträgt der CI der kürzesten Bäume der Phylogenie der mitochondrialen Pseudogen-Sequenzen 0,600, im Vergleich zu 0,830 der kürzesten Bäume der trnK-Intron Phylogenie eines vergleichbaren Datensatzes (unter Ausschluß nicht informativer Positionen). Für die Rekonstruktion der Phylogenie des Pseudogens werden also mehr Analogien angenommen, als dies für die Phylogenie des trnK-Introns der Fall ist. Auch der Ausschluss der die Kodierung der Indels betreffenden Positionen änderte an diesem Bild nichts. Bei Längenmutationen können, aufgrund der von den Basensubstitutionen abweichenden Mutationsmechanismen, eine höhere Anzahl von Analogien auftreten. In Abb. 55 sind die Änderungen pro informativer Position, wie sie für den Baum Nummer 1 der gespeicherten kürzesten Bäume aus der Maximum-Parsimony-Analyse angenommen wurden, jeweils für die Pseudogen- (links) und trnK-Intron-Phylogenie (rechts) gezeigt. Zur Konstruktion des kürzesten Baums der Pseudogen-Phylogenie müssen also mehr analoge Änderungen angenommen werden als bei der Konstruktion des kürzesten Baums der trnK-Intron Phylogenie.

Die Evolution mitochondrialer Sequenzen kann von der Evolution plastidärer Sequenzen abweichen. Ein maternaler Erbgang für Mitochondrien wird für die meisten Angiospermen angenommen. Allerdings scheint es, dass Mitochondrien, im Gegensatz zu Plastiden, in Arten mit biparentaler Vererbung und nach Mutationen des Chondroms eher koexistieren anstatt zu segregieren (Bonnet and Glimelius, 1983). Damit können Individuen verschiedene Genotypen des Chondroms aufweisen. Das Auftreten mehrerer Sequenzen für die mitochondriale Kopie des trnK-Introns konnte für *N. pervillei* gezeigt werden. Die Tatsache, dass einige der Sequenzen zu den anderen eine erheblich höhere paarweise Distanz aufweisen (vgl. Abb. 51) ist ein weiterer Hinweis darauf, dass aus verschiedenen *Nepenthes*-Taxa Pseudogen-Sequenzen gewonnen wurden, die untereinander nicht homolog sind.

Die Konsensus-Topologie der mitochondrialen Pseudogen-Sequenzen entsprach in einigen Verzweigung der Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Phylogenie. Die der trnK-Intron-Phylogenie widersprechenden Verzweigungen sind alle nicht gesichert, mit einem Decay-Wert von 1. Dies deutet daraufhin, dass zumindest einige Monophylien innerhalb der Nepenthaceae homologe Sequenzen für das mitochondriale Pseudogen aufweisen. So wird auch die in der trnK-Intron-Phylogenie angezeigte Monophylie um *N. hamata* auch in der Pseudogen-Phylogenie gestützt. Die Sequenzen der dieser Monophylie zugehörigen Taxa sind durch eine hohe Distanz von den übrigen Pseudogen-Sequenzen getrennt. Wertet man dies als Hinweis, dass die Pseudogen-Sequenzen dieser Taxa zu den anderen nicht homolog sind, sollte der Zeitpunkt der Konservierung dieser Sequenzen in der Evolution dieser Monophylie vor der Artaufspaltung der zugehörigen Taxa liegen. Die Sequenzdaten des mitochondrialen

Pseudogens könnten dann zu einer besseren Auflösung der nah verwandten Taxa dienen. Die Sequenzdaten des mitochondrialen Pseudogens wurden mit den Daten des plastidären trnK-Intron kombiniert. Die einzelne Gruppen stützenden Synapomorphien wurden für jeden Datensatz getrennt betrachtet und die Verzweigungen auf dieser Grundlage bewertet.

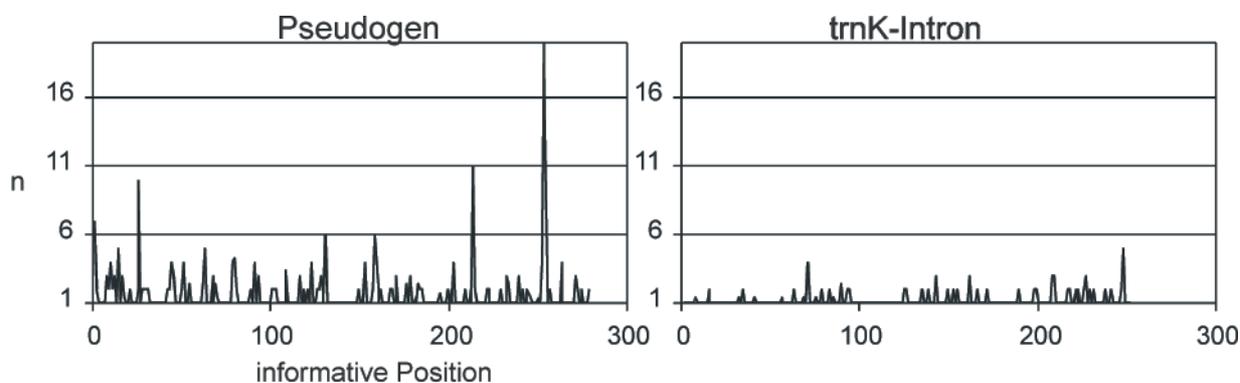


Abb. 55. Anzahl der für die Rekonstruktion eines zufällig ausgewählten kürzesten Baumes aus der Maximum-Parsimony-Analyse angenommenen Mutationsschritte in Abhängigkeit der Position in der Alinierung (nur potentiell informative Positionen berücksichtigt), jeweils für das trnK-Pseudogen (links) und das trnK-Intron (rechts). Der Berechnung zugrunde lagen jeweils Alinierungen der *Nepenthes*-Taxa für die für beide Genorte Daten vorlagen.

3.6 Kombinierte Analyse der trnK und Pseudogendaten

Die Datenmatrizen der Sequenzen des trnK-Introns und des mitochondrialen Pseudogens wurden zu einer kombinierten Datenmatrix als Grundlage für eine Maximum-Parsimony-Analyse zusammengefasst und diese mit den Analysen der einzelnen Datensätze in Bezug gesetzt. *N. pervillei* wurde hierbei nicht aufgenommen, da für dieses Taxon zwei paraloge Sequenzen für das mitochondriale Pseudogen gefunden wurden, die darüber hinaus nur unvollständig vorlagen. Die kombinierte Datenmatrix enthielt demnach 69 Taxa, 67 der Nepenthaceae sowie *Triphyophyllum peltatum* und *Ancistrocladus abbreviatus* als Außengruppe (in jeder der zur Kombination verwendeten Datenmatrizen als plastidäre trnK-Intron-Sequenzen) und 5830 Charaktere (bei Ausschluss der das Indel Nr. 8 der Pseudogen-Alinierung betreffenden Positionen 5776 bis einschließlich 5780). Von diesen waren 439 variabel und phylogenetisch nicht informativ sowie 528 variabel und potentiell phylogenetisch informativ.

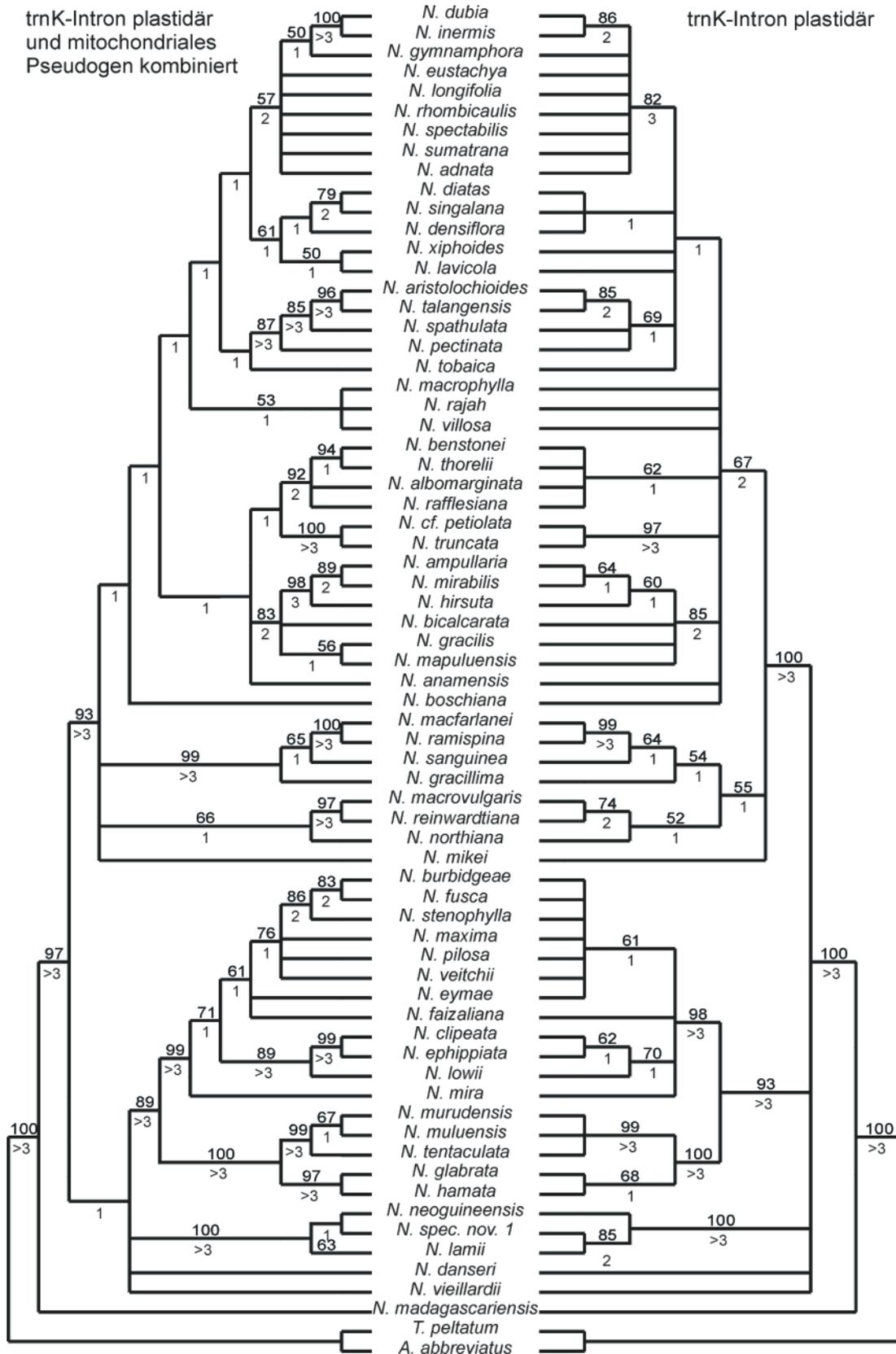


Abb. 56. Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse der aus dem mitochondrialen Pseudogen des *trnK* und dem plastidären *trnK*-Intron kombinierten Datenmatrix (links) im Vergleich zur Konsensus-Topologie der Analyse des plastidären *trnK*-Introns (rechts).

Die Maximum-Parsimony-Analyse der kombinierten Datenmatrix (Option *collapse=min*) ergab 120 kürzeste Bäume mit 1333 bis 1337 Schritten, einem CI von 0,79 und einem RI von 0,83 (Abb. 56). Die kürzesten Bäume der kombinierten Analyse sind damit 21 bis 25 Schritte länger als die Summe der kürzesten Baumängen der Maximum-Parsimony-Analysen der einzelnen Datensätze. Für die kürzesten Bäume der kombinierten Analyse wurden für die Positionen 2636 bis 5380 (der Pseudogen-Sequenzen) 798 bis 804 Schritte angenommen und damit 15 bis 21 Änderungen mehr als für den kürzesten Baum des Pseudogen-Datensatzes mit 783 Schritten. Für die Positionen 1 bis 2635 (der trnK-Intron-Sequenzen) wurden für die kürzesten Bäume der kombinierten Analyse mit 531 bis 534 Schritten 2 bis 5 Änderungen mehr als für den kürzesten Baum des trnK-Intron-Datensatzes mit 529 Schritten angenommen. Die Konsensus-Topologie aus der kombinierten Analyse entsprach im Wesentlichen der Topologie der trnK-Intron-Phylogenie. Allerdings waren einige zusätzliche Verzweigungen angezeigt. Ein Unterschied zwischen den beiden Topologien ergab sich innerhalb Clade 3, indem in der trnK-Intron-Phylogenie *N. lamii* und *N. spec. nov 1* und in der kombinierten Analyse *N. neoguineensis* und *N. spec. nov 1* als Monophylie gezeigt werden. Die in der trnK-Intron-Phylogenie angezeigte Schwestergruppen-Beziehung zwischen der Monophylie von *N. northiana*, *N. macrovulgaris* und der auf der malaiischen Halbinsel endemischen Taxa um *N. macfarlanei* war in der Topologie der kombinierten Matrix nicht angezeigt.

In der kombinierten und in der trnK-Intron-Analyse auftretende Gruppen haben bis auf zwei in der Analyse der kombinierten Matrix eine höhere Bootstrap-Unterstützung als in der Analyse des trnK-Intron.

Die Anzahl der inneren Knoten in der Konsensus-Topologie der kombinierten Analyse ist höher als die der inneren Knoten der Analyse des trnK-Introns. Der CI der kürzesten Topologien der kombinierten Analyse war für die beiden Datensätze etwas niedriger als der CI der kürzesten Topologien der einzelnen Datensätze. Für die Sequenzen des mitochondrialen Pseudogens betrug der CI der kombinierten Analyse 0,58 und für die des trnK-Introns ca. 0,83, für die einzelnen Datensätze betrug die CI-Werte 0,60 und 0,84 bei Ausschluss nicht informativer Positionen. Für die Konstruktion der Topologie wird also nach der Kombination der Datensätze ein etwas höherer Anteil an Analogien angenommen als dies für die Konstruktion der Topologien der einzelnen Datensätze allein der Fall ist. Der CI war aber bei beiden Datensätzen der kombinierten Analyse nicht so weit erniedrigt, dass dies auf ein widersprüchliches phylogenetisches Signal in den beiden Datensätzen hinweist.

Zur Bewertung der einzelnen Verzweigungen der Konsensus-Topologie aus der kombinierten Analyse wurde untersucht, wieviele Apomorphien aus den jeweiligen Datensätzen einzelne innere Knoten stützen und welcher CI-Wert diesen zugeordnet wurde, also wieviele Zustandsänderungen für die einzelnen Apomorphien in der Rekonstruktion der Phylogenie angenom-

men wurden. Einzelne innere Knoten könnten zwar in der Topologie angezeigt, aber nur durch Homoplasien aus beiden Datensätze gestützt sein. Einzelne Knoten könnten aber auch durch Synapomorphien aus beiden Datensätze gestützt sein, deren Anzahl nicht ausreicht, um in den Konsensus-Topologien der einzelnen Datensätze berücksichtigt zu werden. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden die CI-Werte in vier Klassen eingeteilt: $CI = 1$ für einen Mutationsschritt; $CI = 1$ bis $0,5$ für zwei Mutationsschritte und wenn bei mehr als zwei Zuständen einer Position ein Mutationsschritt zur Erklärung des einen Zustands und mehr als ein Schritt zur Erklärung des anderen Zustands angenommen wird; $CI = 0,25$ bis $0,5$ für zwischen 2 und 4 Mutationsschritte; $CI < 0,25$ für mehr als 4 Mutationsschritte. Die Taxa der Außengruppen wurden für diese Analyse ausgeschlossen, da bei diesen durch die relativ höhere Distanz zu Taxa der Innengruppe der Anteil an zufälligen Analogien zu einzelnen Taxa der Innengruppe höher ist.

Für die Konstruktion der 50 inneren Knoten der Konsensus-Topologie wurden im kombinierten Datensatz insgesamt 256 Änderungen angenommen, dabei entfielen auf das trnK-Intron 93 und auf das Pseudogen 163 Änderungen. Für das trnK-Intron bestanden 70 und für das Pseudogen 43 Änderungen aus Synapomorphien, für die keine analoge Änderung angenommen wird ($CI=1$). Im Vergleich dazu wurden für die Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Phylogenie für 31 innere Knoten 91 Änderungen, für die Pseudogen Phylogenie (exemplarisch Baum 1) für 53 innere Knoten 176 Änderungen angenommen. Die Anzahl der Synapomorphien mit $CI=1$ war bei beiden Datensätzen in der Einzelanalyse mit 73 für das trnK-Intron und 48 für das Pseudogen etwas höher als die für die Rekonstruktion der gemeinsamen Phylogenie (vgl. Tab. 13). Der CI einzelner Positionen war in der Konsensus-Topologie des kombinierten Datensatzes niedriger als in denen der Einzelanalysen. Es lassen sich aber keine auffallenden Unterschiede feststellen, die auf ein unterschiedliches phylogenetisches Signal in beiden Datensätzen hinweisen würden. Positionen, für die mehr als 2 Änderungen angenommen werden müssen, entstammen fast alle aus dem Datensatz des Pseudogens. Im Gegensatz zum trnK-Intron scheint dieses einen erhöhten Anteil an Analogien aufzuweisen.

Um unabhängig von einer Bootstrap-Analyse abschätzen zu können, welche der inneren Knoten berechtigt sind, wurde die Verteilung der die einzelnen Knoten stützenden Synapomorphien in Bezug auf deren Zugehörigkeit zu dem jeweiligen Datensatz betrachtet und nach ihrem CI eingereiht (vgl. Abb. 57). Dabei wurden diejenigen Knoten identifiziert, die nur durch Homoplasien gestützt werden.

Tab. 13. Anzahl der für die Konsensus-Topologie der kombinierten Analyse angenommenen Mutationsschritte eingeteilt nach dem CI der zugehörigen Positionen. Verglichen wurden die Mutationsschritte die für die einzelnen Datensätze in der Analyse des kombinierten Datensatzes angenommen wurden, sowie eines zufällig ausgewählten Baumes der Analysen der einzelnen Datensätze. Berücksichtigt wurden die Mutationen die für die Konstruktion der inneren Knoten angenommen wurden. Für die Berechnung des CI wurden alle Positionen einbezogen.

Schritte	Einzel-Analysen		Kombinierte Analyse		
	plastidär	mitochondrial	plastidär	mitochondrial	kombiniert
CI					
1	93	176	93	163	256
0,5-1	73	48	70	43	113
0,25-0,5	15	36	15	29	44
<0,25	4	49	8	49	57
	0	43	0	42	42

Von den 50 inneren Knoten waren 35 durch mindestens eine synapomorphe Position in einem der beiden Datensätze gestützt. Für diese Positionen wurden zur Rekonstruktion der Phylogenie keine weitere analoge Änderung angenommen. 11 der inneren Knoten wurden durch Synapomorphien aus beiden Datensätzen, 16 aus dem trnK-Intron-Datensatz und 8 aus dem Pseudogen-Datensatz gestützt, von denen 6 Knoten in der Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Analyse nicht angezeigt waren. 9 innere Knoten wurden nur aufgrund von Homoplasien angezeigt, bei 6 Knoten mit einem CI-Wert bis zu 0,5, bei 3 Knoten mit einem CI-Wert von unter 0,25. Diese Homoplasien wurden ausschließlich von Positionen der Pseudogen-Matrix gebildet. Obwohl die Knoten teilweise durch Bootstrap-Werte unterstützt sind, werden sie als zweifelhaft bewertet.

Die trnK-Intron-Phylogenie der Nepenthaceae wurde mit der durch die kombinierte Analyse ermittelte Topologie ergänzt. Dabei wurden bei den Arten, für die keine Daten für das mitochondriale Pseudogen vorlagen, die in der trnK-Intron-Phylogenie angezeigten Schwestergruppen-Beziehungen beibehalten (Abb. 58). Da es sich dabei um ein künstliches Kladogramm handelt, wurde auf die Angabe von Astlängen und unterstützende Werte verzichtet. Dieses Kladogramm spiegelt die Betrachtungen über die Phylogenie der Nepenthaceae und für eine vorläufige Einteilung der Gattung *Nepenthes* aufgrund molekularer Daten wider. Wegen der schlechten Auflösung der Topologie des Datensatzes des mitochondrialen Pseudogens wird die Evolution der Nepenthaceae mit Hilfe der trnK-Intron-Phylogenie beurteilt und gegebenenfalls auf Ergebnisse die sich aus der Topologie des Pseudogens oder der kombinierten Analyse ergeben hingewiesen (vgl. Kapitel 4.4).

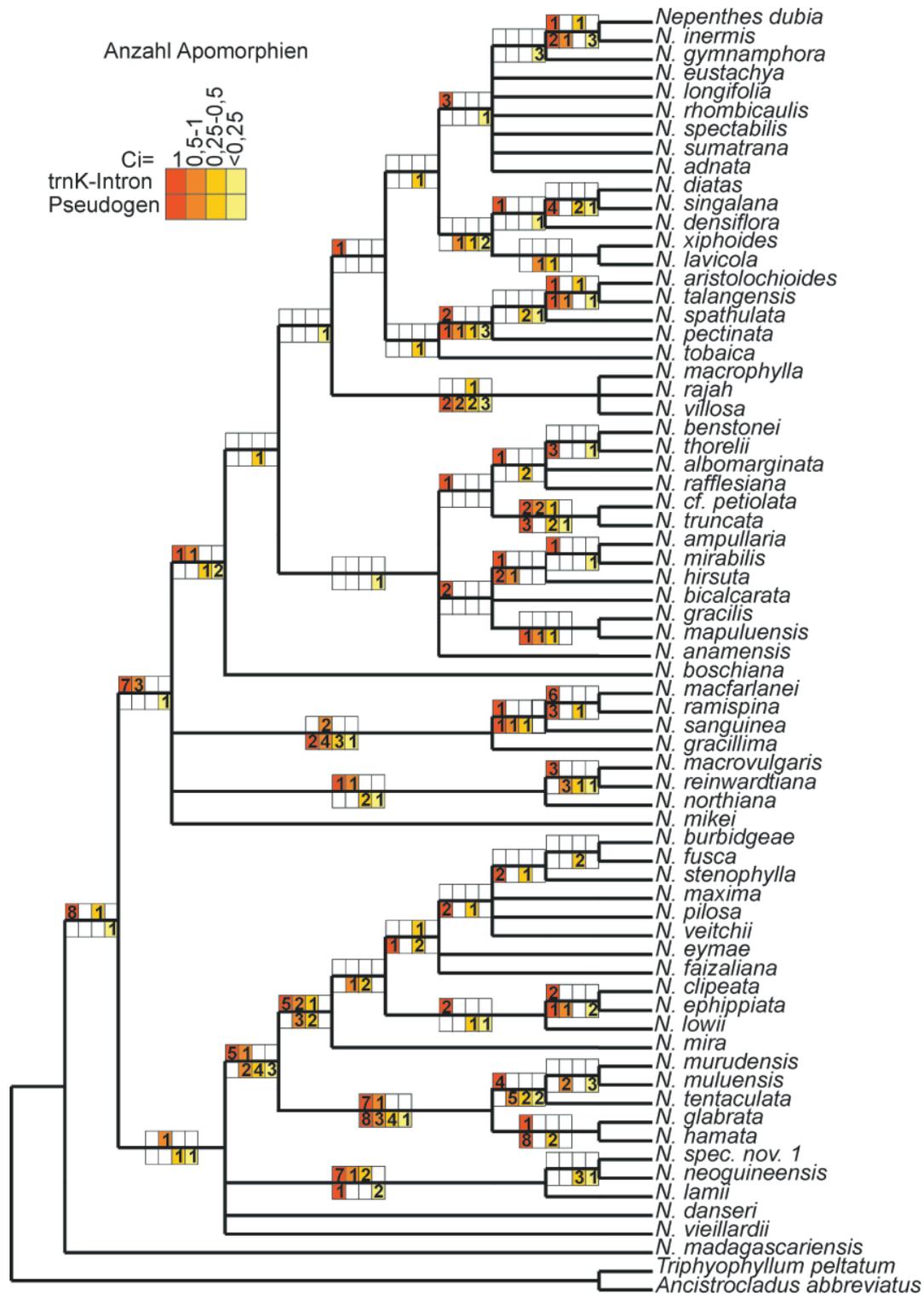
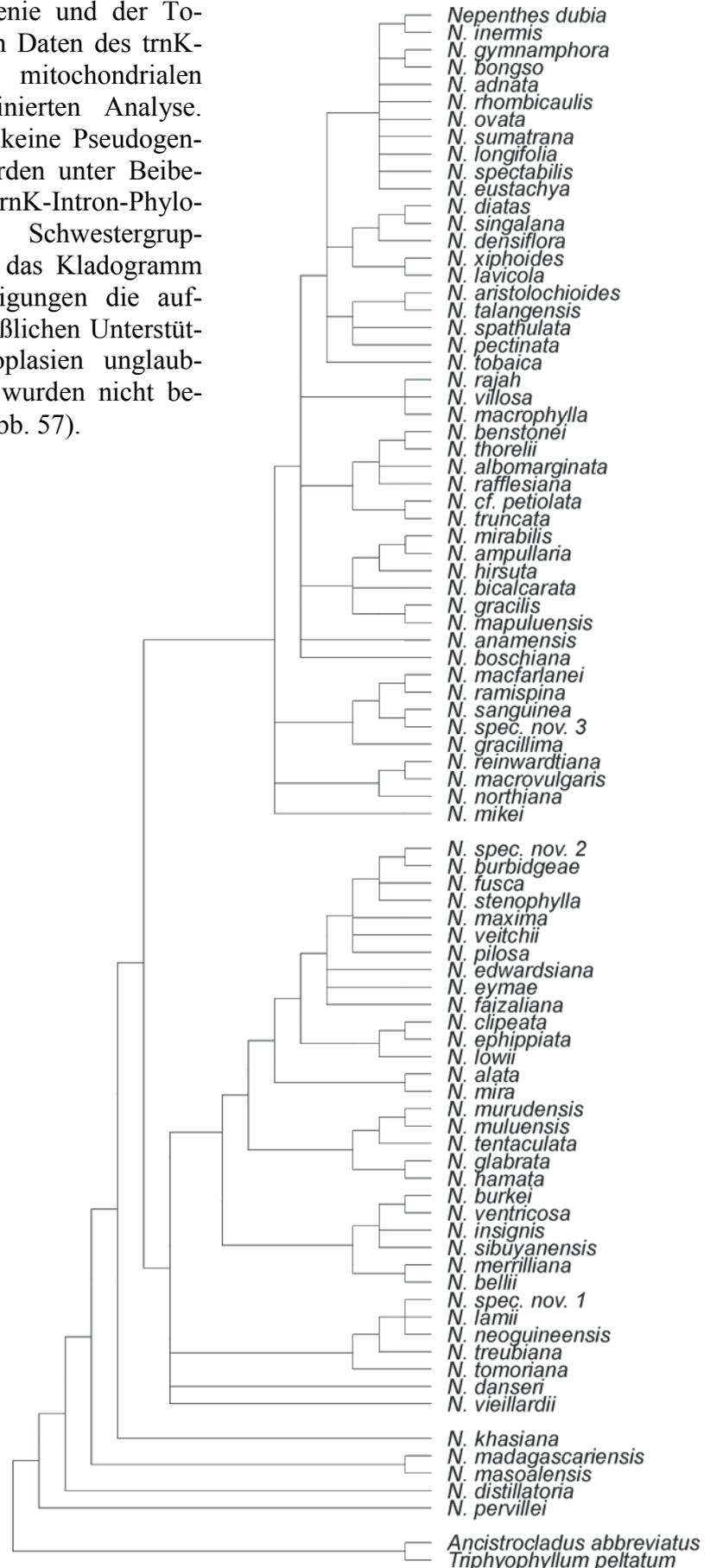


Abb. 57. Konsensus-Topologie der Analyse des kombinierten Datensatzes mit Angabe des CI der die Äste stützenden Merkmale. Oberhalb der Äste sind die Merkmale des plastidären trnK-Introns aufgetragen, unterhalb die Merkmale des mitochondrialen Pseudogens des trnK. Die Position 1 bezeichnet die Anzahl an Charakteren mit einem CI von 1, Position 2 die mit einem CI von 1-0,5, Position 3 die mit einem CI von 0,5-0,25 und Position 4 die mit einem CI <0,25. Äste die nur durch Charaktere mit einem CI von weniger als 0,5 gestützt sind, wurden als zweifelhaft behandelt.

Abb. 58. Konstruiertes Kladogramm aus der trnK-Intron-Phylogenie und der Topologie der aus den Daten des trnK-Introns und des mitochondrialen Pseudogens kombinierten Analyse. Die Arten, für die keine Pseudogen-daten vorlagen wurden unter Beibehaltung der in der trnK-Intron-Phylogenie angezeigten Schwestergruppenbeziehungen in das Kladogramm eingebaut. Verzweigungen die aufgrund der ausschließlichen Unterstützung durch Homoplasien unglaublich erschienen wurden nicht berücksichtigt (vgl. Abb. 57).



3.7 Molekulare Phylogenie der *Ancistrocladaceae*

In der vorliegenden Arbeit konnte eine nahe Verwandtschaft der *Ancistrocladaceae* mit den *Dioncophyllaceae* und den *Nepenthaceae* nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.1.1). Die Familie der *Ancistrocladaceae* besteht aus der Gattung *Ancistrocladus*, deren Arten eine Reihe pharmakologisch bedeutsamer Inhaltsstoffe aus der Gruppe der Naphtylisochinolin-Alkaloide aufweisen. Von verschiedenen Vertretern dieser Familie wurden vergleichende Sequenzanalysen der Internal Transcribed Spacer (ITS-Region) der nukleären rDNA und des plastidären trnK-Introns durchgeführt. Es sollte damit zum einen eine Hypothese über die Phylogenie der *Ancistrocladaceae* entwickelt und zum anderen eine Grundlage für die taxonomische Einteilung der *Ancistrocladaceae* in Südostasien erarbeitet werden. Für Vertreter dieser Familie in dieser Region fehlt bisher ein schlüssiges Artkonzept (vgl. Kapitel 1.4).

Im Rahmen von fünf Sammelreisen (zwei von H. Rischer, AG Bringmann, zwei vom Autor der vorliegenden Arbeit, eine von C. Bräuchler, AG Heubl) wurden 65 Proben von *Ancistrocladus* aus Südostasien gesammelt. Von V. Chamchumroon und R. Pooma (Royal Forest Department Thailand) wurden freundlicherweise zusätzlich 8 Proben zur Verfügung gestellt und davon Belegexemplare herbarisiert. Außerdem wurden zwei herbarisierte Specimen, die der AG Bringmann für chemische Analysen zur Verfügung standen, einbezogen. So konnten insgesamt 75 Individuen der *Ancistrocladaceae* von 24 Fundorten aus Südostasien in die Untersuchung aufgenommen werden (vgl. Abb. 11, Tab. 2 und Tab. 3). Das mit den Proben abgedeckte Untersuchungsgebiet erstreckte sich zum einen von Hainan (Südchina) über Südlaos nach Ost- und Südostthailand (im folgenden als Norden des Untersuchungsgebietes bezeichnet) und zum anderen von der malaiischen Halbinsel mit Südthailand und Malaysia bis nach Borneo (im folgenden als Süden des Untersuchungsgebietes bezeichnet). Außer den Proben aus Südostasien wurden 17 Proben von 13 Taxa aus Afrika und 3 Proben von 2 Taxa aus Indien / Sri Lanka analysiert.

Von 91 Belegen wurden vergleichende Sequenzanalysen der ITS-Region und von 77 Belegen vergleichende Sequenzanalysen des trnK-Introns durchgeführt. Als Referenzmaterial wurde die ITS-Sequenz von Isotypen der Arten *A. cochinchinensis*, *A. attenuatus*, *A. pinangianus* und *A. stelligerus* ermittelt (vgl. Tab. 2). Ergänzend zu den Sequenzanalysen wurden im Rahmen einer vom Autor angeleiteten Diplomarbeit (Sommaro, 2002) ISSR-Fingerprints verschiedener in CTAB-Puffer konservierter Proben hergestellt (vgl. Kapitel 2.3.2). Die Ergebnisse der ISSR-Analysen wurden mit den Sequenzanalysen verglichen.

3.7.1 ITS-Alinierung und phylogenetische Analyse

Die ITS-Region der nukleären rDNA wurde für 91 Proben der *Ancistrocladaceae* sequenziert. Die Sequenzierung der Proben 1051, und 1151 aus dem Khao Yai NP und 1234, 1244, 2244

2214 aus Ubon Ratchathani ergab Abschnitte, die durch additive Signale überlagert waren. Diese Überlagerung trat nach Positionen auf, die zwei in der Alinierung Indels enthaltenden Positionen homolog waren. Dies war Indel Nr. 3 (Deletion eines T gegenüber der Mehrzahl der Taxa an Position 266) und Indel Nr. 9 (PolyG, 4 oder 5 G an Position 570). Die PCR-Produkte der 6 Proben enthielten also Kopien, die sich im Auftreten der Indels voneinander unterschieden. Durch Allelsubtraktion (vgl. Kapitel 2.8.4) konnten die Sequenzen der Kopien ermittelt werden. Dies geschah durch einen manuellen Vergleich von Sequenzen der anderen Proben, die den jeweiligen Zustand für die Indels aufwiesen. Für die Probe 1124 (Khao Sok NP) konnte eine koamplifizierte Kopie der ITS-Region identifiziert werden, die an Position 145 eine Insertion von 2 Basen aufwies, die allen anderen Sequenzen fehlt. Es waren in jedem Fall nur zwei verschiedene Kopien an der Überlagerung beteiligt, deren Sequenzen mit Sequenz 1 und Sequenz 2 bezeichnet und in die Alinierung aufgenommen wurden. Die zwei Sequenzen einer Probe variierten an 1 bis 4 erkennbaren Positionen, einschließlich der Indels.

Der Sequenzabschnitt der ITS-Region aller untersuchten Proben hatte eine Länge von 844 bis 847 bp. Davon entfielen auf die 18S rDNA 21 bp, auf ITS1 276 bis 279 bp, auf die 5,8S rDNA 154 bis 155 bp, auf ITS2 228 bis 230 bp und auf die 26S rDNA 164 bp. In der 26S rDNA waren alle Positionen in der Alinierung konstant. Bei Proben bei denen der Abschnitt der 26S rDNA nicht vollständig vorlag wurde er deshalb nicht durch weitere Sequenzierungen komplettiert. An 13 Positionen mussten bei der Alinierung Gaps eingefügt werden, die insgesamt 10 Indels von 1 bis 2 bp Länge kennzeichneten. Davon entfielen fünf Indels auf ITS1, ein Indel auf die 5,8S rDNA und vier Indels auf ITS 2. Indels der Innengruppe wurden kodiert und in die Datenmatrix aufgenommen (vgl. Tab. 14).

Tab. 14. Aufstellung der in der Alinierung der ITS-Region der Ancistrocladaceae eingefügten Indels (Insertionen und Deletionen), ihre Position in der Alinierung, ihr phylogenetischer Informationsgehalt und ihre Position in der Datenmatrix zur phylogenetischen Analyse.

Nr.	Position in der Alinierung	Länge in bp	Status gegenüber Mehrzahl der Taxa	Phylogenetischer Informationsgehalt	Kodiert als Charakter Nr.
1	66	1	inseriert	informativ	861
2	128	2	deletiert	informativ	862
3	145	2	inseriert	nicht informativ	863
4	184	2	inseriert	nicht informativ	864
5	270	1	deletiert	informativ	865
6	437	1	inseriert	nicht informativ	866
7	491	1	inseriert	nicht informativ	867
8	556	1	deletiert	nicht informativ	868
9	570	1	inseriert	informativ	869
10	681	1	inseriert	informativ	870

Die DNA der Proben der als Referenzmaterial dienenden Isotypus-Belege von *A. attenuatus*, *A. pinangianus*, *A. stelligerus* und *A. cochinchinensis* war stark degradiert. Daher wurde ITS1 und ITS2 getrennt in einer ersten PCR amplifiziert, die anschließend als Template für eine

Re-PCR verwendet wurde (vgl. Kapitel 2.7.2.2). Die Sequenzen der Proben der Isotypus-Belege sind dadurch kürzer und die kodierenden Bereiche fehlen fast vollständig. Von *A. stelligerus* konnte nur ITS1 amplifiziert werden (217 bp). Die Sequenz von ITS1 war bei *A. stelligerus*, dem Isotypus von *A. attenuatus* und den Proben KC1 bis KC6, 36 und 34 gleich.

Gleiche Sequenzen wurden zu einer Einheit zusammengefasst. Aus den 103 Proben einschließlich der vier Sequenzen des Isotypus-Materials standen 48 verschiedene Sequenzen zur Verrechnung zur Verfügung. Die Sequenzen der *Ancistrocladaceae* wurden für die phylogenetische Analyse mit der ITS-Sequenz, die aus jungem Blattmaterial von *Triphyophyllum peltatum* ermittelt wurde (vgl. Kapitel 3.2), als Außengruppe aliniert. Die Datenmatrix enthielt 49 Taxa mit 870 Positionen, einschließlich der 10 Indels der Innengruppe. Von den Positionen der Alinierung waren 661 konstant, 139 variabel und phylogenetisch nicht informativ und 70 potentiell phylogenetisch informativ. Die Maximum-Parsimony-Analyse mit der Option *collapse=min* führte zu 1228 kürzesten Bäumen mit einer Länge von 278 bis 282 Schritten, einem CI von 0,801 bis 0,813 und einem RI von 0,850 bis 0,861. Bei der Verwendung der Option *collapse=max* (Standardeinstellung PAUP) wurden 44895 kürzeste Bäume der Länge 278 gefunden. Beide Analysen ergaben die gleiche Konsensus-Topologie mit einer Länge von 290 Schritten mit einem CI von 0,779 und RI von 0,829. Sie ist in Abb. 59 und Abb. 60 gezeigt.

Die ITS-Sequenzen der westafrikanischen und die der meisten asiatischen Taxa bildeten in der Konsensus-Topologie jeweils eine monophyletische Gruppe. Dazu bildeten jeweils eine Polytomie die beiden ostafrikanischen Taxa *A. robertsoniorum* und *A. tanzaniensis* sowie *A. hamatus* aus Sri Lanka und eine Gruppe aus Proben, die aufgrund der Blattmorphologie als *A. griffithii* bestimmt wurden. Innerhalb der westafrikanischen Taxa bestand eine große Ähnlichkeit der Sequenzen der ITS-Region von *A. congolensis* (5 Proben) und *A. ealaensis*, *A. likoko* und *A. cf. letestui* und *A. spec.* Gabun. Diese Sequenzen unterschieden sich ausschließlich durch ein Indel von 1 bp an Position 681 (Indel Nr. 10). Die beiden durch das Indel Nr. 10 unterscheidbaren Sequenztypen kamen bei einer Population von *A. congolensis* vor. Damit reicht die Variabilität der ITS-Region nicht aus, um die 5 Arten voneinander zu trennen. Daher kann über den Status der als *A. spec.* Gabun geführten Probe als eigene Art keine Aussage getroffen werden. *A. korupensis* und *A. spec.* Zaire bildeten mit den Proben um *A. congolensis* eine Monophylie. Der Status von *A. spec.* Zaire ist noch ungeklärt. Die Möglichkeit der Beschreibung als neue Art wird zur Zeit durch Herrn Mudogo geprüft (mündliche Mitteilung Bringmann). Die Astlänge die *A. spec.* Zaire von *A. korupensis* und *A. congolensis* trennt, deutet auf eine Eigenständigkeit von *A. spec.* Zaire im Bezug auf die in die Untersuchung einbezogenen Taxa hin. *A. guineensis* und *A. barteri* wurden als Monophylie zusammengefasst und zusammen mit *A. abbreviatus* und *A. pachyrrhachis* als Polytomie in der Monophylie der westafrikanischen Taxa eingeordnet.

Die Monophylie der asiatischen Taxa bestand aus 2 Gruppen mit jeweils Proben aus dem Norden und aus dem Süden des Untersuchungsgebietes. Die Gruppe 1 wurde aus der Probe aus Trat (Südostthailand), den 3 Proben des Gunung Benom (Zentral Malaysia) sowie einer Monophylie aus 11 Proben (Südthailand, Malaysia, Borneo) und dem Isotypus von *A. pinangianus* gebildet. Sie war mit einem Bootstrap-Wert von 87 gestützt und hatte einen Decay-Wert von 2 („pinangianus“ in Abb. 59).

Die Gruppe 2 bestand aus einer Monophylie von Proben aus Südthailand zusammen mit dem Isotypus von *A. attenuatus* und mit *A. heyneanus* aus Indien und einer Monophylie aus den Proben aus Ostthailand, Laos und Hainan und dem Isotypus von *A. cochinchinensis*. Die beiden Monophylien wurden allerdings nur mit einem Bootstrap-Wert von 52 zusammengefaßt. In der Konsensus-Topologie der um einen Schritt längeren Bäume ist von der Gruppe 2 nur die Monophylie von Proben aus Ostthailand und dem Isotypus von *A. cochinchinensis* und der Probe aus Hainan angezeigt. Auffallend ist die hohe Anzahl von Mutationsschritten mit der die in Südostasien gesammelten Proben voneinander getrennt werden. Zur Rekonstruktion wurden für die Gliederung der asiatischen Proben ähnlich viele Mutationsschritte angenommen wie für die Gliederung der westafrikanischen Arten (vgl. Abb. 60). Auch sind gemäß der Konsensus-Topologie der ITS-Phylogenie die südostasiatischen Proben nicht monophyletisch. Zum einen wurden die Sequenzen von *A. heyneanus* aus Indien innerhalb der südostasiatischen Proben positioniert, zum anderen sind die Proben von *A. griffithii* zu den anderen Proben, einschließlich der afrikanischen, als Polytomie angeordnet.

Im Falle einer Probe, die als *A. tectorius* aus dem Botanischen Garten Bogor/Indonesien beschafft wurde, wurden in mehreren Versuchen aus den mit den Primern AITS4, AITS3 und AITS1 gewonnenen Amplifikaten überlagerte Sequenzen gewonnen, die nicht durch Allelsubtraktion voneinander getrennt werden konnten. Mit Hilfe einer besonderen Primerstrategie wurde versucht das spezifische Produkt der Amplifikation der ITS-Region zu isolieren. Dazu wurden für Gruppen der asiatischen Proben spezifische Primer mit 1 bis 2 selektiven Basen an ihrem 3'-Ende abgeleitet. Durch die selektiven Basen sollte die Anzahl potentieller Bindungsstellen der Primer in den koamplifizierten Loci soweit verringert werden, dass das Produkt einer Amplifikation lesbare Sequenzen ergab. Dies gelang mit dem Primerpaar ITS41pinan-Typ / ITS14pinan-Typ (selektiv für die Monophylie der Gruppe „Pinangianus“). Die aus dieser Amplifikation gewonnene Sequenz war 379 bp lang und umfasste den größten Teil von ITS1 und der 5,8S rDNA. Sie ließ sich gegen die ITS-Sequenzen der übrigen Proben von *Ancistrocladus* alinieren, wies aber dabei mit 45 autapomorphen Änderungen eine erhöhte Variabilität auf. Von den variablen Positionen entfielen 11 auf die erfassten 66 bp des Bereichs der bei den anderen Sequenzen konstanten 5,8S rDNA.

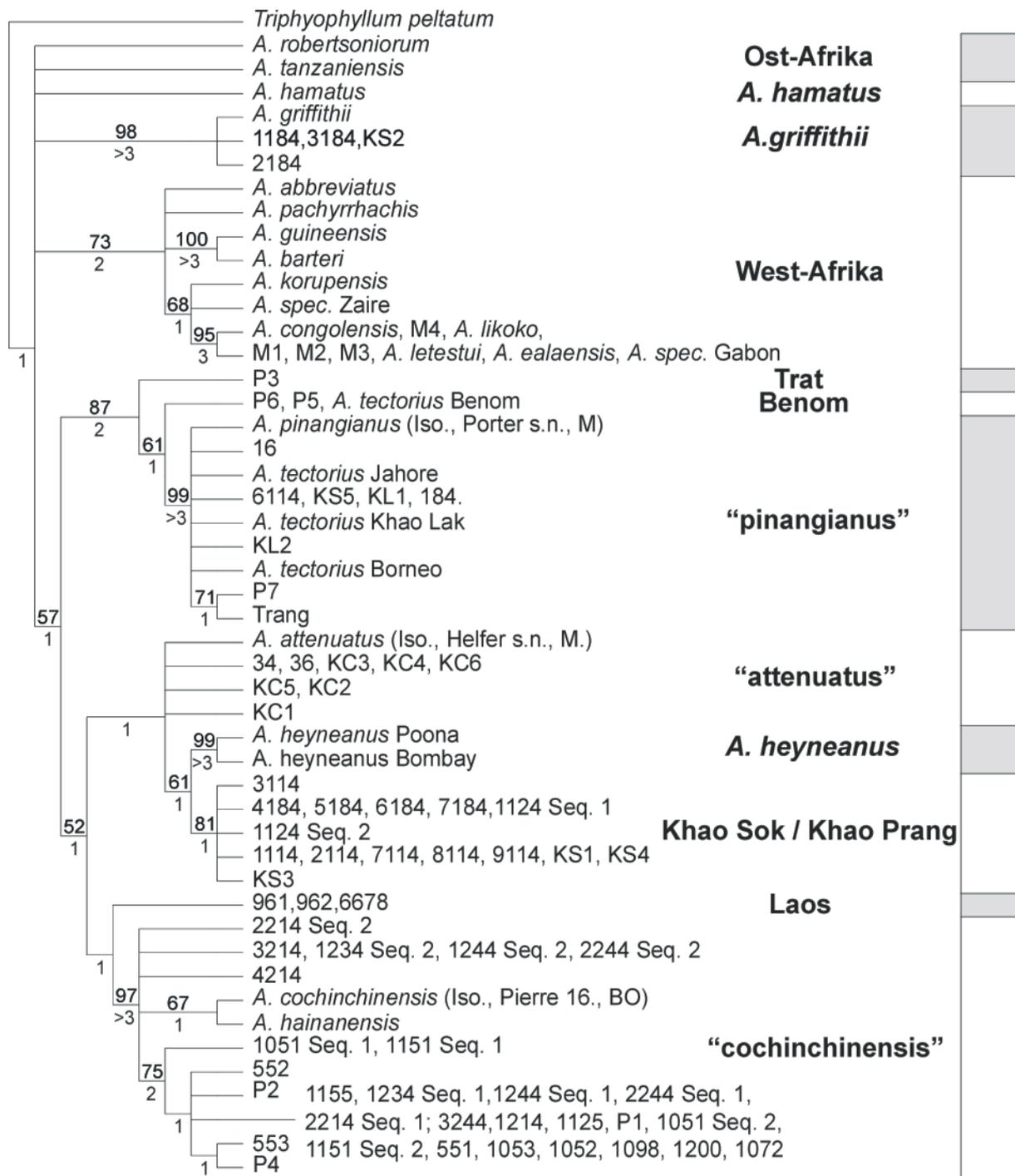


Abb. 59. Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse von ITS-Sequenzen der Ancistrocladaceae, gezeigt als Kladogramm. Bootstrap-Werte sind oberhalb der durch Bootstrap-Analyse stützbaeren Äste angegeben. Decay-Werte unter den Ästen. Die Benennung einer Monophylie erfolgte gegebenenfalls nach der Isotypus-Sequenz, die der Monophylie angehörte. Die Sequenzen der Gruppe „attenuatus“ sind in der Maximum-Parsimony-Analyse als Polytomie angeordnet, bilden aber in der UPGMA-Analyse ein Cluster.

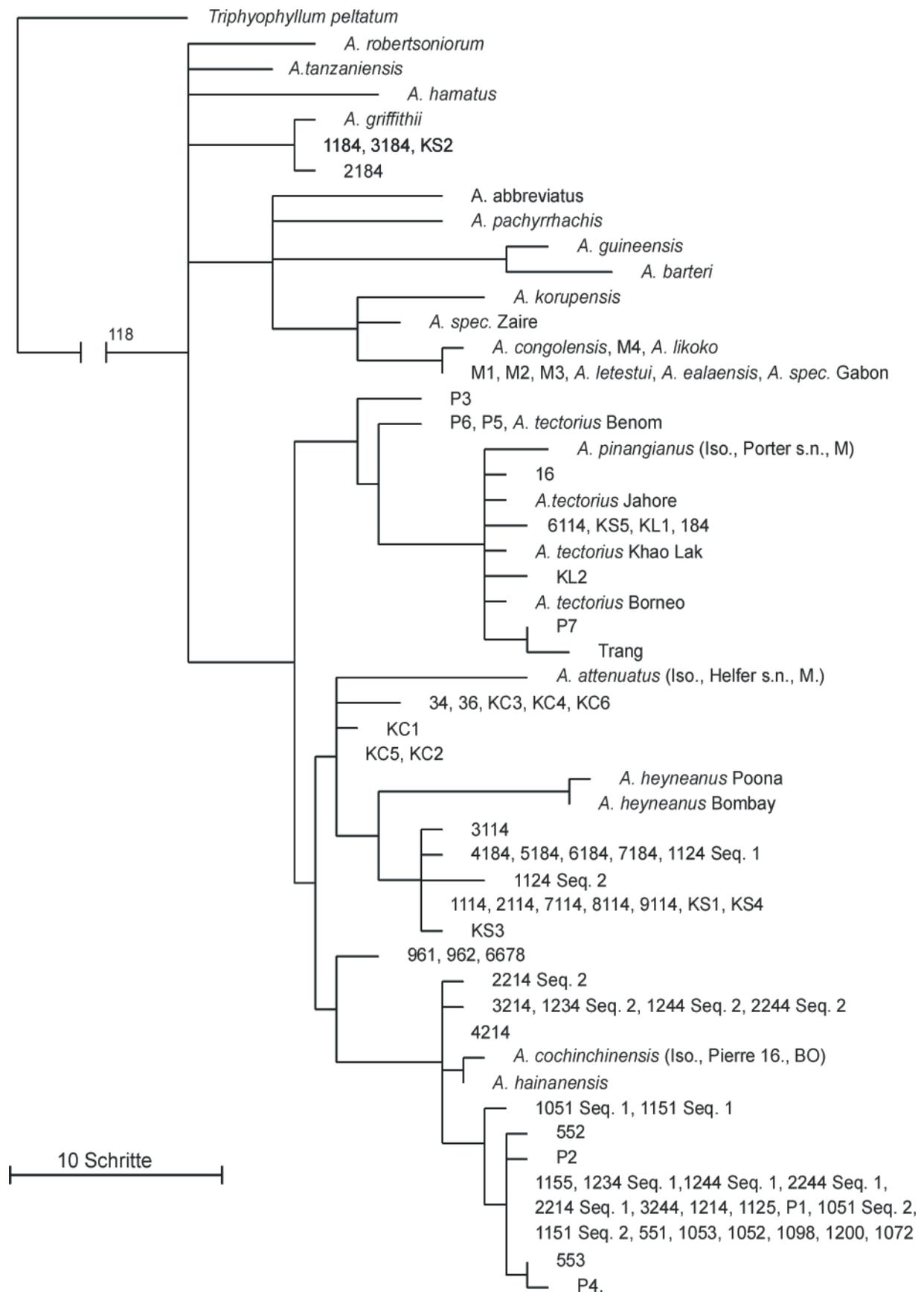


Abb. 60. Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse von ITS-Sequenzen der untersuchten Proben der Ancistrocladaceae, gezeigt als Phylogramm.

Bei der Sequenz des Kulturmaterials von *A. tectorius* aus Bogor handelt es sich wegen der erhöhten Variabilität gegenüber den übrigen ITS-Sequenzen von *Ancistrocladus* wahrscheinlich um ein Pseudogen. So findet sich bei dieser Sequenz ein Basentausch (T statt C) an Position 3 der konservierten Region der ITS1-Region nach Liu und Schardl (1994; vgl. Kapitel 3.2.3). Bei der Probe aus dem Botanischen Garten Bogor könnte es sich um eine Kulturhybride handeln, da ihre *trnK*-Intron-Sequenz der von *A. hamatus* entspricht. Sie wurde daher nicht in die weiteren Untersuchungen aufgenommen. Bei allen anderen Proben von *Ancistrocladus* ließen sich durch Amplifikation mit den oben genannten spezifischen Primern keine von den Sequenzen der einzelnen Proben abweichende Sequenzen isolieren. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Probe *A. tectorius* aus Bogor, dass Pseudogene für die ITS-Region bei den *Ancistrocladaceae* vorkommen können.

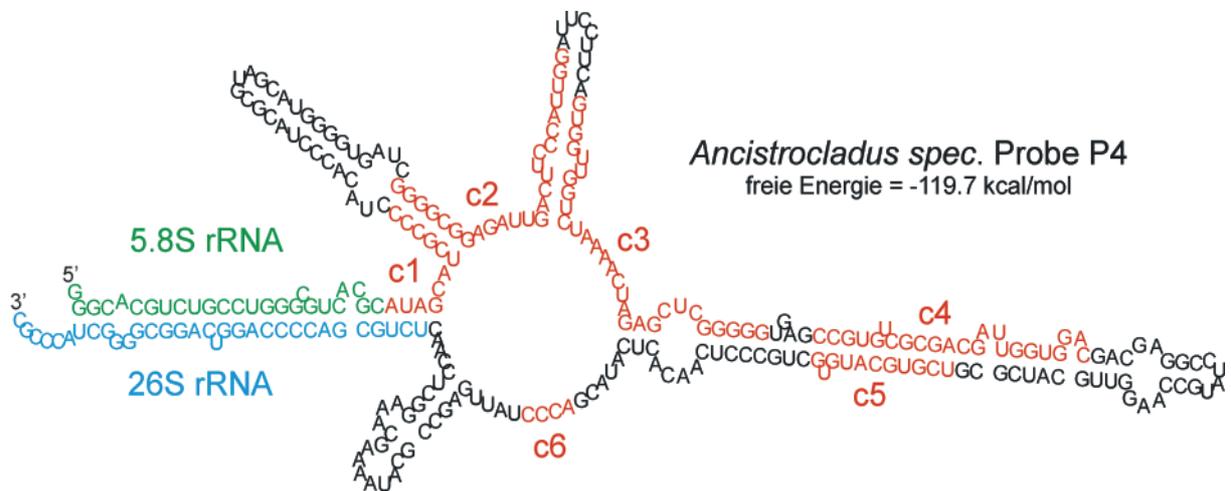


Abb. 61. Mutmaßliche Sekundärstruktur von ITS2 von *Ancistrocladus spec.* am Beispiel der Probe P4, berechnet mit dem Zuker-Algorithmus (Programm RNA-Structure; optimale Struktur, freie Energie = -119,7 kcal/mol). Die konservierten Regionen (c1 bis c6; rot) paaren in für Angiospermen charakteristischer Weise (nach Hershkovitz und Zimmer, 1996). Die zwischen den konservierten Bereichen liegenden variablen Bereiche (v1 bis v6) sind nicht bezeichnet. Dieser optimalen Struktur entsprechen die meisten der für die Sequenzen von *Ancistrocladus* ermittelten Sekundärstrukturen. In einigen Fällen wurden zusätzliche helikale Abschnitte angenommen, ohne dass sich die relative Lage der konservierten Bereiche dadurch änderte.

Wegen der Möglichkeit des Auftretens von Pseudogenen wurde die Sekundärstruktur von ITS2 der in die Phylogenie aufgenommenen Sequenzen auf die Lage der konservierten Bereiche nach Hershkovitz und Zimmer (1996) überprüft (vgl. Kapitel 3.2.3.2). Alle Sequenzen des ITS2 der *Ancistrocladaceae* entsprachen in den optimalen Faltungen der von Hershkovitz und Zimmer (1996) vorgeschlagenen Struktur. Die häufigste, nach dem Zuker-Algorithmus (für 37°C mit dem Programm RNA-Structure) rekonstruierte, optimale Struktur von ITS2 ist in Abb. 61 gezeigt. Für einige Sequenzen wurden zusätzlich helikale Bereiche zwischen

Abschnitten angenommen, die in der häufigsten Struktur ungepaart vorliegen. Dadurch änderte sich die relative Position der konservierten Bereiche C1 bis C6 nicht oder nur unwesentlich. Die konservierte Region in ITS1 entsprach bei allen Sequenzen dem Motiv nach Liu und Schardl (1994).

Die Sekundärstruktur von ITS2, die freie Energie, die für die optimalen Sekundärstrukturen angenommen wurde (-121 bis -108 kcal/mol) und der GC-Gehalt der Sequenzen (55 bis 59% für ITS2 und 51,5 bis 54,8% für ITS1) ergaben keine Hinweise, dass in die ITS-Phylogenie Pseudogen-Sequenzen eingebaut wurden. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit boten die analysierten Sequenzen keine Anhaltspunkte, dass in der Evolution der Ancistrocladaceae unterschiedliche paraloge Sequenzen für die ITS-Region konserviert wurden. Dieser Zusammenhang wird später noch eingehender betrachtet.

3.7.2 Phylogenetische Analyse der *trnK*-Intron-Sequenzen

Die Sequenzen des plastidären *trnK*-Introns wurden von 77 Proben der Ancistrocladaceae vergleichend analysiert (vgl. Kapitel 2.7.2.4). Der sequenzierte Abschnitt des *trnK*-Introns war bei den untersuchten Proben zwischen 2406 und 2476 bp lang. Die Einteilung in kodierende und nichtkodierende Bereiche des *trnK*-Introns entsprach bei allen Sequenzen der Einteilung von *A. abbreviatus*, wie sie im Rahmen der *trnK*-Intron-Phylogenie der Nepenthaceae im Vergleich zur Chloroplasten-Genom-Sequenz von *Nicotiana tabacum* ermittelt wurde. Der ORF des *matK* war in jedem Fall erhalten, mit einem Startcodon (ATG) an Position 747 bis 749 der Alinierung (einschließlich der Außengruppe *Triphyophyllum peltatum*) und einem Stoppcodon (TGA) an Position 2296 bis 2298 mit zwei Abweichungen. Bei der Sequenz der Probe 552 war der ORF 35 Basen vor dem Stoppcodon durch eine Insertion von 7 Basen unterbrochen wodurch ein Stoppcodon an Position 2267 bis 2269 entstand und der ORF damit um 20 Basen verkürzt war. Bei der Sequenz der Probe P7 war der ORF 12 Basen vor dem Stoppcodon durch eine Deletion von 7 Basen unterbrochen. Dadurch entstand ein Stoppcodon (TGG) an Position 2273 bis 2275, womit der ORF um 27 bp verkürzt war.

Bei den Sequenzen der Proben von *Ancistrocladus* schwankte die Länge des erfassten Abschnitts bei der 5'-nichtkodierenden Region zwischen 711 und 728 bp, bei der 3'-nichtkodierenden Region zwischen 178 und 231 bp und bei der kodierenden Region zwischen 1509 und 1519 bp, unter der Annahme des Stoppcodons an Position 2296 bis 2298 für alle Sequenzen.

Auf zwei Besonderheiten sei hingewiesen. Bei der Probe KC2 war das Leseraster des *matK* durch die Deletion einer Base an Position 1844 verschoben. Ansonsten wies die Sequenz dieser Probe zu denen der Proben KC3 und KC5 keinen Unterschied auf. Es gab daher außer dieser Deletion keinen Hinweis darauf, dass es sich bei der Sequenz der Probe KC2 um ein Pseudogen des *matK*-Gens handeln könnte. Die Sequenz wurde daher als mit denen der Proben KC3 und KC5 übereinstimmend angesehen, ohne diese Deletion in der Auswertung zu

berücksichtigen. Das trnK-Intron der Probe von Hainan wurde wegen des Alters des Materials in 5 Abschnitten von je 500 bis 700 bp Länge amplifiziert. Insgesamt konnten von dieser Probe 1800 bp der trnK-Intron-Sequenz ermittelt und in die Alinierung eingebaut werden.

Zur Maximum-Parsimony-Analyse wurden gleiche Sequenzen einem Taxon zugeordnet. Die Alinierung des trnK-Introns bestand aus 40 Sequenzen, die sich in mindestens einer Position unterschieden, einschließlich *Triphyophyllum peltatum* als Außengruppe. Insgesamt 116 Positionen der Alinierung enthielten Gaps, die 15 Indels bezeichneten. Die Indels wurden kodiert und in die Analyse einbezogen (vgl. Tab. 15). Die Datenmatrix einhielt 2517 Positionen, einschließlich der Indels. 2350 Positionen waren konstant, 128 variabel und nicht informativ und 39 Positionen (35 innerhalb der Innengruppe) variabel und potentiell phylogenetisch informativ.

Tab. 15. Aufstellung der in der Alinierung des trnK-Introns der untersuchten *Ancistrocladaceae* und *Triphyophyllum peltatum* auftretenden Indels, ihre Position in der Alinierung, ihre Länge, ihr phylogenetischer Informationsgehalt und die Anzahl unterschiedlicher Sequenzen bei denen das Indel auftrat. Für die phylogenetische Analyse wurden die Indels als Merkmal Nr. 2503-2517 in der Datenmatrix kodiert. Die Deletion einer Base bei der Probe KC2 an Position 1844 wurde nicht in die Auswertung aufgenommen.

Nummer	Länge in bp	Position in der Alinierung	Anzahl Sequenzen	Status gegenüber Mehrzahl der Taxa	Außen / Innengruppe
5'-nichtkodierende Region					
1	15	245-260	1	Insertion	Innengruppe
2	6	292-298	1	Insertion	Außengruppe
3	5	348-353	1	Insertion	Außengruppe
4	1	506	1	Insertion	Innengruppe
5	1	550	1	Deletion	Innengruppe
6	1	558	2	Deletion	Innengruppe
7	1	574	2	Deletion	Innengruppe
8	1	628	1	Deletion	Außengruppe
9	6	648-654	5	Insertion	Innengruppe
kodierende Region					
10	1	886	1	Insertion	Außengruppe
11	3	1492-1495	1	Deletion	Innengruppe
12	7	2254-2261	1	Insertion	Innengruppe
13	7	2276-2283	1	Deletion	Innengruppe
3'-nichtkodierende Region					
14	8	2323	4	Insertion	Innengruppe
15	53	2306-2359	1	Deletion	Innengruppe

Die Maximum-Parsimony-Analyse (Standardeinstellungen: *collapse=max*) ergab 3082 kürzeste Bäume mit einer Länge von 181 Schritten, einem CI von 0,945 und einem RI von 0,936. Die daraus resultierende Konsensus-Topologie ist in Abb. 62 als Kladogramm und Phylogramm gezeigt.

A. robertsoniorum bildet in der trnK-Intron-Phylogenie das der Außengruppe am nächsten verwandte Taxon durch eine Synapomorphie mit *T. peltatum*. *A. tanzaniensis* wurde als Polytomie zu einer Monophylie der restlichen afrikanischen Taxa, die nicht weiter aufgelöst sind, sowie zu einer Monophylie aller asiatischen Proben, gestellt. Die Monophylie der asiatischen Taxa wurde in 2 Gruppen geteilt. Eine Gruppe bestand aus Proben aus Nordostthailand und aus Laos, einschließlich der Probe P3, die in der ITS-Phylogenie enge Beziehungen zu Proben aus Malaysia und Südthailand zeigte. Als Schwestergruppe zu diesen Sequenzen wurde eine Monophylie aus *A. hamatus* und *A. heyneanus* gestellt. Die zweite Gruppe bestand hauptsächlich aus Sequenzen von Proben aus dem Süden des Untersuchungsgebietes, einschließlich der Proben von *A. griffithii*. Die Proben aus dem Gene Conservation Center Ubon Ratchathani in Nordostthailand und die Probe aus Hainan in Südchina wurden ebenfalls in diese Monophylie gestellt. Die trnK-Intron-Phylogenie widerspricht damit in einigen Verzweigungen der ITS-Phylogenie. Ein Vergleich der beiden Phylogenien ist in Abb. 63 gezeigt. Trotz der geringen Anzahl an potentiell phylogenetisch informativen Positionen des trnK-Intron-Datensatzes waren manche der von der ITS-Phylogenie abweichenden Verzweigungen durch hohe Bootstrap-Werte gestützt. So hatte z. B. die Monophylie in der trnK-Intron-Phylogenie von *A. hamatus* und *A. heyneanus* einen Bootstrap-Wert von 100. Ausgehend von Baum Nr. 1 der 3082 kürzesten Bäume der ITS-Phylogenie ergab die Annahme einer Monophylie zwischen den ITS-Sequenzen dieser beiden Arten eine um 7 Schritte längere Topologie als die kürzeste von 278 Schritten, ausgehend von der Konsensus-Topologie ergab sich eine um drei Schritte längere Topologie. Eine Monophylie der ITS-Sequenzen von *A. heyneanus* und *A. hamatus* ist daher unwahrscheinlich. Die Unterschiede zwischen den Phylogenien könnten auf Introgressionsereignissen beruhen, die sowohl bei plastidären Sequenzen (z. B. Roelofs und Bachmann, 1997) als auch bei ITS-Sequenzen nachgewiesen sind (z. B. Suh *et al.*, 1993). Begleitend zu dieser Arbeit wurden ISSR-Fingerprint-Analysen von *Ancistrocladus* im Rahmen einer vom Autor angeleiteten Diplomarbeit zur Absicherung der Ergebnisse der ITS- und trnK-Intron-Phylogenie erstellt (Sommaro, 2002). Teile der dort erarbeiteten Daten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu Vergleichszwecken ausgewertet.

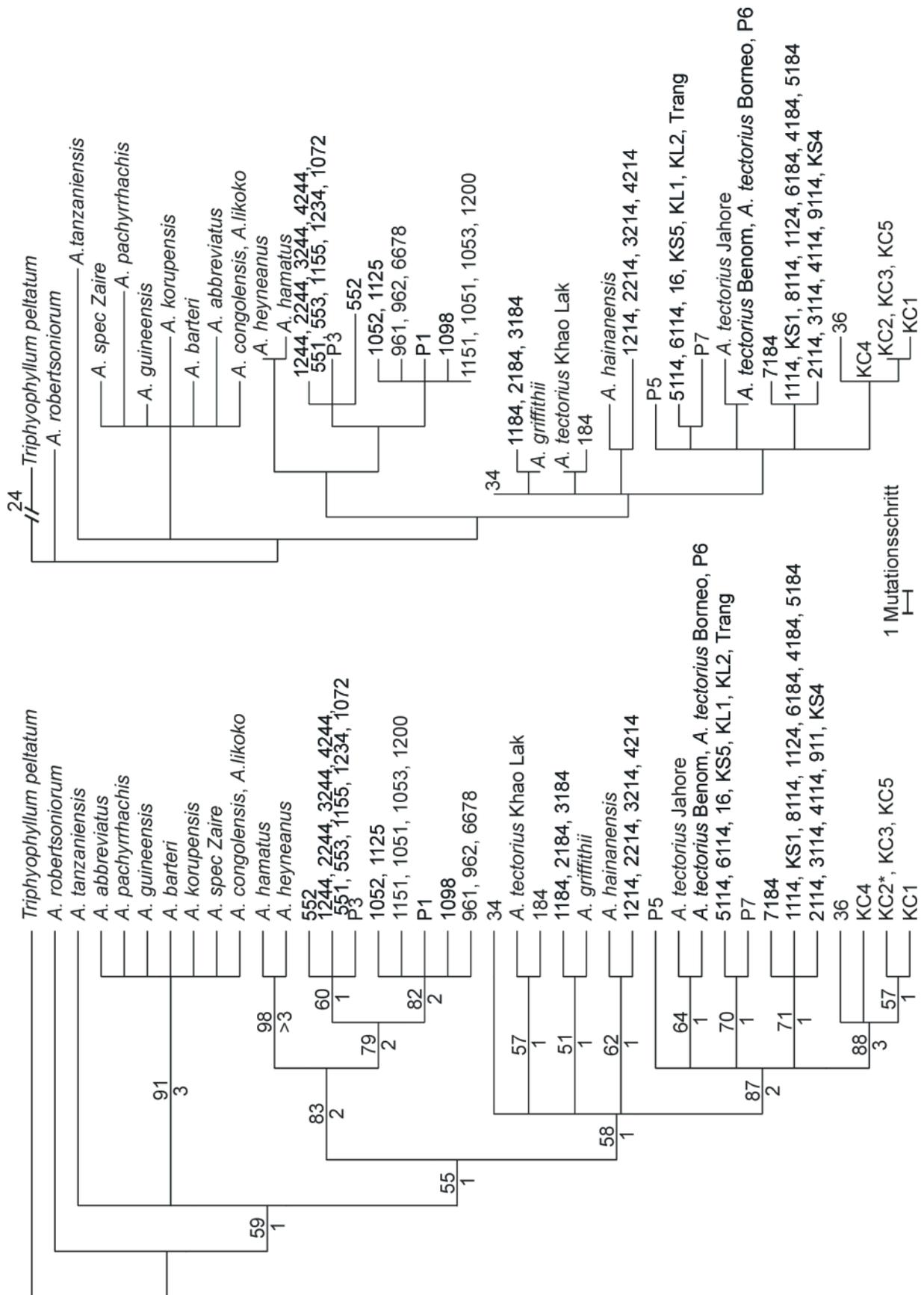


Abb. 62. Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Phylogenie der Ancistrocladaceae als Phylogramm und Kladogramm. Im Kladogramm sind Bootstrap-Werte über den Ästen, Decay-Werte unter den Ästen angegeben.

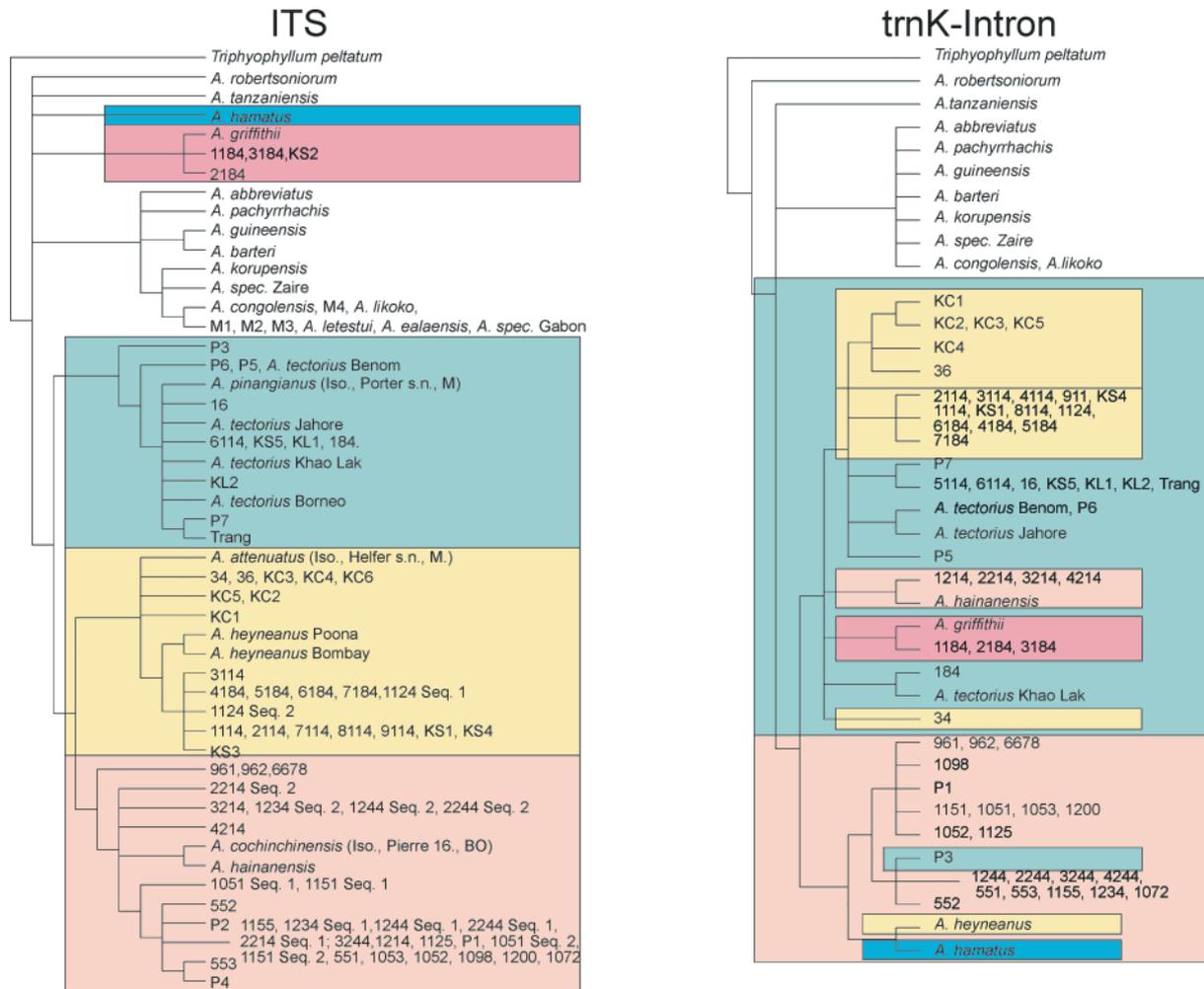


Abb. 63. Vergleich der Konsensus-Topologien der Maximum-Parsimony-Analyse der ITS-Region (links) und des trnK-Introns (rechts) der Ancistrocladaceae. Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen beiden Topologien, sind die sich aufgrund der ITS-Topologie ergebenden Gruppierungen farblich hervorgehoben.

3.7.3 ISSR-Fingerprint-Analysen

ISSR-Fingerprints wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Sommaro (2002) von 88 Proben mit 13 Primern angefertigt (vgl. Kapitel 2.3.2). Da für diese Untersuchungen herbarisiertes Material ungeeignet ist, wurden neben in CTAB-Puffer eingelegtem Material aus Südostasien, Frischmaterial aus dem Botanischen Garten Würzburg einbezogen. Einige dieser Proben stammten von Pflanzen, die aus Samen von Belegen, deren Mutterpflanzen zur Sequenzanalyse verwendet wurden, gezogen waren, andere wurden als Sämlinge in naher Umgebung der Mutterpflanze gesammelt. In die Untersuchung einbezogen wurden jeweils 9 Proben von *A. congolensis* (gezogen aus Samen der Proben M1 bis M4), 9 Proben aus dem Gunung Benom, Malaysia (Sämlinge der Probe P6), 9 Proben aus dem Khao Yai NP in Zentralthailand (Sämlinge der Probe P1) und 5 Proben aus Trat in Südostthailand (Samen der Probe P3). Darüber hinaus wurden 5 Proben aus Sämlingen von *A. korupensis* einbezogen.

Diese Proben dienten als Vergleichsmaterial zur Abschätzung der Diversität innerhalb der Populationen. Als Probe „Trang“ wurde ein im Botanischen Garten München aus Samen dieser Probe gezogenes Exemplar verwendet.

Die Bandenmuster der ISSR-PCR wurden in einer 0/1-Datenmatrix kodiert. Die Matrix enthielt 88 Taxa und 768 Positionen. Die phylogenetische Analyse der Datenmatrix wurde mit Hilfe von Neighbor-Joining-Analyse und UPGMA unter Verwendung des Distanzmodells nach Nei und Li (1979) in PAUP durchgeführt. Die Distanzen wurden auch mit Hilfe einer PCoA mit dem Programm NTSYSpc, Version 2.10w, zweidimensional dargestellt. Details dieser Untersuchungen sind in (Sommaro, 2002) nachzulesen.

Das mit der Neighbor-Joining-Analyse erstellte Kladogramm der ISSR-Fingerprints entsprach in einigen Punkten der ITS- in anderen der trnK-Intron-Phylogenie (Abb. 64). Die Proben afrikanischer Taxa bildeten eine Gruppe, deren Mitglieder untereinander eine geringere Distanz aufwiesen als zu den Proben asiatischer Taxa. Erwartungsgemäß wurden im Kladogramm die als Vergleichsmaterial einbezogenen Populationen von *A. congolensis* und *A. korupensis* jeweils als Monophylie dargestellt. Die Position im Kladogramm von *A. barteri* und *A. robertsoniorum* aus Ostafrika ist der im ITS-Kladogramm vergleichbar. *A. spec. Zaire* wird als Nachbargruppe zu *A. korupensis* gezeigt. Die Proben von *A. congolensis* bilden die Nachbargruppe zu den übrigen westafrikanischen Taxa. *A. hamatus* und *A. heyneanus* bilden die Nachbargruppen zu allen südostasiatischen Proben. Die südostasiatischen Proben wurden in 2 Gruppen geteilt, von denen eine der Gruppe 1 der ITS-Phylogenie entspricht, die andere der Gruppe 2, mit der Ausnahme, dass die Proben des Khao Sok NP und Khao Prang NP, die in der ITS-Phylogenie der Gruppe 2 zugeordnet sind, hier in die Gruppe 1 einbezogen werden. *A. griffithii* bildet in der ISSR-Analyse die Nachbargruppe zu Gruppe 1.

Das Kladogramm der UPGMA-Analyse der ISSR-Fingerprints entsprach im Wesentlichen dem der Neighbor-Joining-Analyse. Allerdings bildeten in der UPGMA-Analyse *A. hamatus* und *A. heyneanus* die Nachbargruppe zu Gruppe 2 und *A. griffithii* die Nachbargruppe zu allen übrigen asiatischen Taxa. Diese Anordnung entspricht derjenigen aus der Neighbor-Joining-Analyse, wenn die afrikanischen Proben ausgeschlossen werden.



Abb. 64. Neighbor-Joining-Analyse basierend auf genetischen Distanzen nach Nei und Li (1979) der ISSR-Bandenmuster von verschiedenen Proben der Ancistrocladaceae.

3.7.4 Hinweise auf retikuläre Evolution der *Ancistrocladaceae* in Asien

Die Phylogenien der ITS-Region und des trnK-Introns sowie die Cluster-Analyse der ISSR-Distanzen der *Ancistrocladaceae* sind in einigen Punkten widersprüchlich. Für die afrikanischen Taxa sind die drei Datensätze nur eingeschränkt zu vergleichen. In der trnK-Intron-Phylogenie konnte keine Auflösung für die westafrikanischen Taxa erreicht werden. In der ISSR-Phylogenie konnten nur wenige Arten einbezogen werden. Im Gegensatz dazu lag für die asiatischen Proben für alle drei Datensätze eine vergleichbare Anzahl an Proben vor.

Die in der Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse zur Rekonstruktion der Phylogenie angenommenen Schrittlängen sind sowohl bei ITS wie auch beim trnK-Intron für die Monophylien der afrikanischen und asiatischen Proben vergleichbar. Auch die nicht durch Analogieannahmen beeinflussten paarweisen Distanzen der ITS- und der trnK-Intron-Sequenzen waren jeweils für die afrikanischen und asiatischen Proben vergleichbar hoch. Für ITS betragen die paarweisen Distanzen aller afrikanischen Taxa maximal 26 Positionen, die der westafrikanischen Taxa 23. Die ITS-Sequenzen von Proben aus Südostasien wiesen maximal 24 unterschiedliche Positionen im paarweisen Vergleich auf. Für Sequenzen des trnK-Introns betrug dieser Wert für alle afrikanischen Arten 21 Positionen. Die morphologisch verhältnismäßig gut charakterisierten westafrikanischen Taxa zeigten allerdings nur höchstens 8 unterschiedliche Positionen im paarweisen Vergleich. Das ist erheblich weniger als die 14 Positionen der südostasiatischen Proben. Ein Vergleich der Häufigkeiten, mit der einzelne paarweise Distanzen in einer Distanzmatrix auftreten, zeigt, dass die meisten Werte bei Betrachtung aller Proben mehr als die Hälfte des Maximalwertes in der Distanzmatrix betragen. Diese Verteilung bleibt auch bestehen in einer Datenmatrix aus den südostasiatischen Proben sowie in einer Datenmatrix aus den afrikanischen zusammen mit den indischen Proben (*A. heyneanus* und *A. hamatus*; vgl. Abb. 65). Die Höhe der maximalen paarweisen Distanz lässt sich also nicht nur auf wenige, von einer Gruppe ähnlicher Sequenzen stark abweichende Sequenzen zurückführen. In einem solchen Fall müsste die Anzahl niedriger paarweiser Distanzen innerhalb einer Distanzmatrix höher sein als die Anzahl hoher Distanzen. Innerhalb der südostasiatischen Proben wurden allem Anschein nach mehrere Gruppen von Sequenzen mit hohen Distanzen voneinander getrennt. Dies bestätigt, dass die Höhe der in der Maximum-Parsimony-Analyse angenommenen Schrittlängen für die Auflösung der südostasiatischen Proben eher auf Sequenzunterschieden als auf Analogieannahmen aufgrund der phylogenetischen Rekonstruktion beruhen. Die Annahme, es handle sich bei den *Ancistrocladaceae* aus Südostasien um eine Art, nämlich *A. tectorius* s. l. (vgl. Kapitel 1.4), kann daher nicht bestätigt werden.

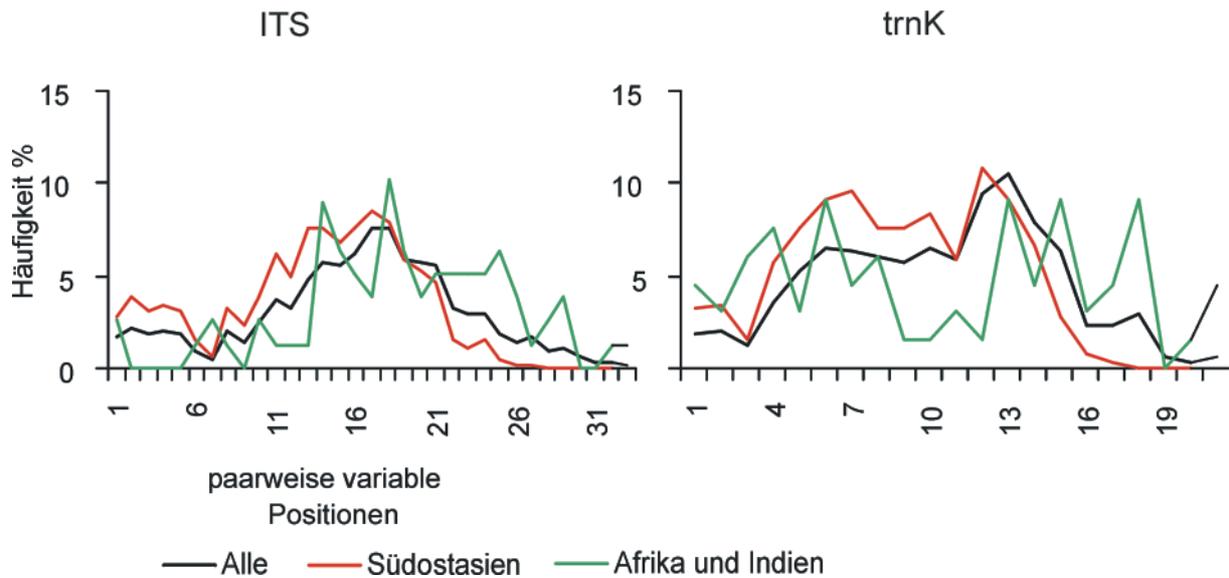


Abb. 65. Häufigkeitsverteilung der paarweisen Distanzen in den Distanzmatrizen aller untersuchten Proben der Ancistrocladaceae, der südostasiatischen Proben und der afrikanischen Proben zusammen mit *A. hamatus* und *A. heyneanus*. Die Verteilung der Häufigkeiten ist in allen Distanzmatrizen ähnlich, d. h. die ähnlich hohe Anzahl an Mutationsschritten, mit denen die südostasiatischen Taxa im Vergleich zu den afrikanischen Taxa in der Maximum-Parsimony-Analyse getrennt werden, ist nicht nur auf Analogieannahmen in der phylogenetischen Rekonstruktion zurückzuführen.

Die Variabilität der ISSR-Bandenmuster war zwischen den asiatischen Proben etwas höher als die zwischen den afrikanischen Proben. Allerdings ist bei ISSR-Analysen die Variabilität wegen der hohen Anzahl von autapomorphen Banden abhängig von der Anzahl der untersuchten Proben. Die beiden Gruppen waren nur eingeschränkt zu vergleichen, da die Anzahl der Proben sehr unterschiedlich war. Die Unterschiede in den drei Phylogenien des trnK-Introns, der ITS-Region und der ISSR-Analyse lassen sich als Hinweise auf Introgressionsereignisse in der Evolution der Ancistrocladaceae deuten. In Abb. 67 ist eine Hauptkoordinaten-Analyse (Principle Coordinate Analysis, PCoA) der Distanzen der asiatischen Taxa untereinander für die Datensätze der ITS-Region, des trnK-Introns und der ISSR-Fingerprints gezeigt. Die Proben sind farblich den einzelnen Gruppen der Maximum-Parsimony-Analyse der ITS-Alinierung (Abb. 59) zugeordnet. Die Verteilung der Proben zeigte, dass die Distanzen der ISSR-Fingerprints größere Ähnlichkeit zu den ITS-Daten als zu den des trnK-Introns hatten. Abweichend davon zeigten die ISSR-Daten und die trnK-Intron-Daten der Proben des Khao Sok / Khao Prang NP eine geringe Distanz zu den Proben um *A. pinangianus* und des Gunung Benom. Auch zwischen *A. hamatus* und *A. heyneanus* entsprachen die Distanzen der ISSR-Analyse denen der trnK-Intron-Analyse. Die Verfälschung einer Phylogenie durch Introgressionsereignisse von einzelnen Sequenzabschnitten kann bei einer ISSR-Fingerprint-Analyse ausgeschlossen werden, da hier jedes Merkmal ein Locus des Kerngenoms darstellt. Im Falle von Hybridisierungsereignissen stellen diese Merkmale

dadurch nicht den Zustand einer der Ausgangsarten sondern mehr oder weniger ein Gemisch der Ausgangsarten dar (Wolfe *et al.*, 1998). Also unterscheiden sich die Bandenmuster von Hybriden in jedem Fall von denen der potentiellen Ausgangsarten. Die Proben, denen aufgrund von Unterschieden zwischen trnK-Intron- und ITS-Phylogenie ein potentieller hybridogener Ursprung zugesprochen werden kann, unterschieden sich in ihrem Bandenmuster nicht von den Proben, die aufgrund ihrer ITS- und trnK-Intron-Sequenzen als zu den potentiellen Ausgangsarten zugehörig angesehen werden können. Es muß daher im Fall der Evolution der *Ancistrocladaceae* in Asien von möglichen Introgressionseignissen ausgegangen werden, die sowohl das trnK-Intron als auch die ITS-Region betreffen. Ein deutlicher Hinweis auf Introgressionseignisse ist die Tatsache, dass zwischen einigen Proben, deren ITS-Sequenzen nur wenige Unterschiede aufwiesen, für das trnK-Intron sehr hohe paarweise Distanzen beobachtet wurden. So ist die maximale Distanz zwischen den trnK-Intron-Sequenzen der Proben der *Ancistrocladaceae* aus dem Norden des Untersuchungsgebietes nur geringfügig niedriger als die maximale Distanz zwischen den trnK-Intron-Sequenzen der in die vorliegende Arbeit einbezogenen westafrikanischen Taxa (0,28 gegenüber 0,32 % variabler Positionen). Deren Variabilität der ITS-Region ist allerdings sehr viel höher. Bei den afrikanischen Arten ist die maximale durchschnittliche Distanz zwischen zwei Sequenzen der ITS Region 14 mal höher als die zwischen zwei Sequenzen des trnK-Introns. Die maximale paarweise Distanz der ITS-Sequenzen der südostasiatischen Proben ist 4,6 mal höher als die der Sequenzen des trnK-Introns. Bei den Proben der nach der ITS-Phylogenie mit *A. cochinchinensis* verwandten Proben sind die maximalen durchschnittlichen Distanzen zwischen den ITS-Sequenzen und den trnK-Intron-Sequenzen ungefähr gleich hoch. Ein extremes Beispiel dafür ist die Probe 3214, die u. a. gegenüber der Probe 2244 in der ITS-Region keine variable Position aufwies, im trnK-Intron jedoch 14 variable Positionen. Dies sind immerhin 67% des innerhalb der *Ancistrocladaceae* festgestellten größten paarweisen Unterschieds von 21 variablen Positionen. Werden die Sequenzen der, die dieses stark abweichende trnK-Intron aufweisen (die Proben 1 bis 4214 und der Probe von Hainan) ausgeschlossen, sind die maximalen Distanzen der ITS-Region dennoch nur etwa doppelt so hoch wie die des trnK-Introns. Die Variabilität des trnK-Introns ist demnach bei den Belegen aus dem Norden des Untersuchungsgebietes im Vergleich zu den übrigen *Ancistrocladaceae* scheinbar erhöht (vgl. Abb. 66). Eine höhere Mutationsrate des trnK-Introns dieser Aufsammlungen kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Allerdings muss sie zur Erklärung der beobachteten Variabilität die Mutationsrate des trnK-Intron der afrikanischen Arten um das 8-fache übersteigen. Die scheinbar erhöhte Variabilität des trnK-Introns zwischen den Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass die taxonomischen Einheiten, zu denen die einzelnen Aufsammlungen zu zählen sind, aus mehreren Ursprungsarten entstanden sind, d.h. dass das trnK-Intron dieser Taxa polyphyletisch ist.

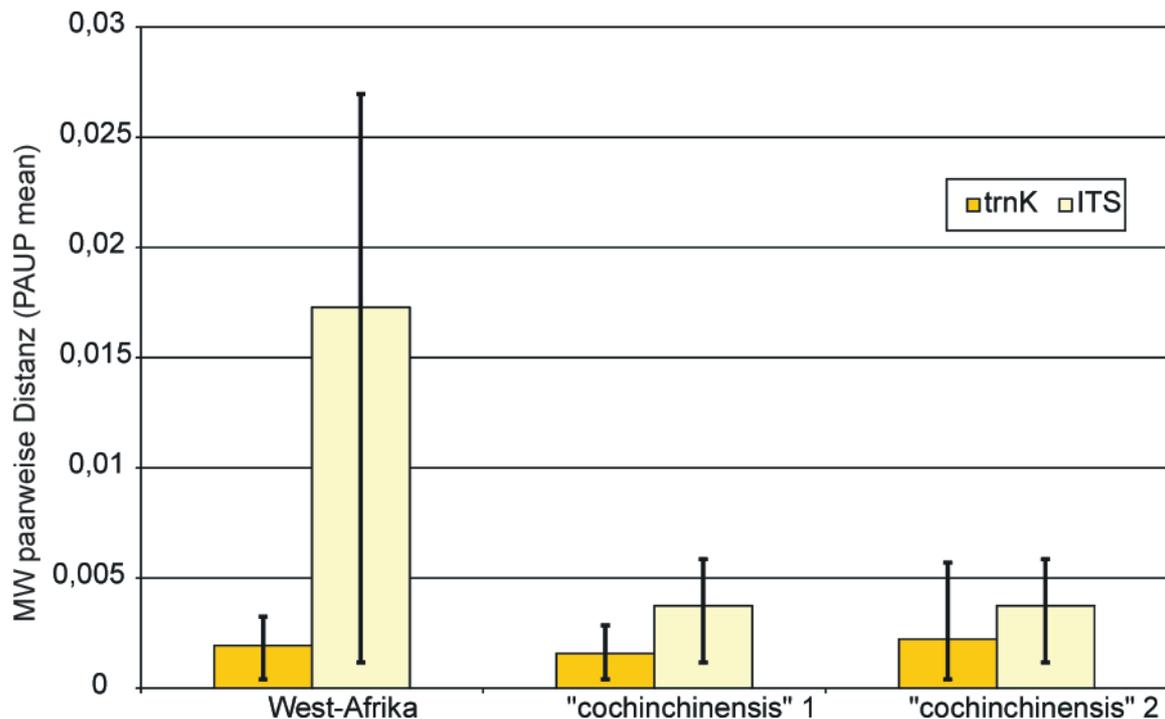


Abb. 66. Mittelwerte der durchschnittlichen Distanzen der ITS-Region und des trnK-Introns innerhalb der afrikanischen Proben und der Proben, die in der ITS-Phylogenie die Gruppe „cochinchinensis“ bilden, 1 ohne die Proben aus Hainan und dem Gene Conservation Center Ubon Ratchathani, 2 mit ihnen. Diese Proben weichen in ihrer trnK-Intron-Sequenz stark von den anderen Proben der Gruppe „cochinchinensis“ ab (trnK-Intron-Typ 4 und 5, vgl. Kapitel 3.8.1). Als Fehlerbalken ist der minimale und maximale Wert der Distanz angegeben.

Wolfe und Randle (2001) berichten von einer häufig beobachteten größeren Übereinstimmung von Phylogenien aus ISSR-Daten und ITS-Sequenzen als von Phylogenien aus ISSR-Daten und plastidären Markern. Dies kann auf eine schnellere Homogenisierung von Kernmarkern nach Hybridisierungsereignissen zurückzuführen sein. Demnach persistieren plastidäre Sequenzen von Ursprungsarten länger in einem Hybridkomplex oder in einer durch retikuläre Evolution entstandenen Artgruppe als unterschiedliche Sequenzen der nukleären rDNA. Allerdings sind auch Fälle bekannt, in denen nach einem Hybridisierungsereignis verschiedene ITS-Paraloge durch die *concerted evolution* bevorzugt wurden, so dass nach der Homogenisierung der Sequenzen verschiedene Individuen einer Art verschiedene ITS-Sequenzen aufweisen können. Mögliche Introgressionen von ITS-Sequenzen liegen für diejenigen Proben vor, deren Einordnung in der ISSR-Fingerprint-Analyse der in der trnK-Intron-Phylogenie entspricht. Das sind *A. hamatus*, *A. griffithii* und die Proben des Khao Sok und des Khao Prang NP. Wegen der offensichtlichen Widersprüche in der ITS- und trnK-Intron-Phylogenie wurde auf Auswertung eines kombinierten Datensatzes aus ITS- und trnK-Intron-Sequenzen verzichtet.

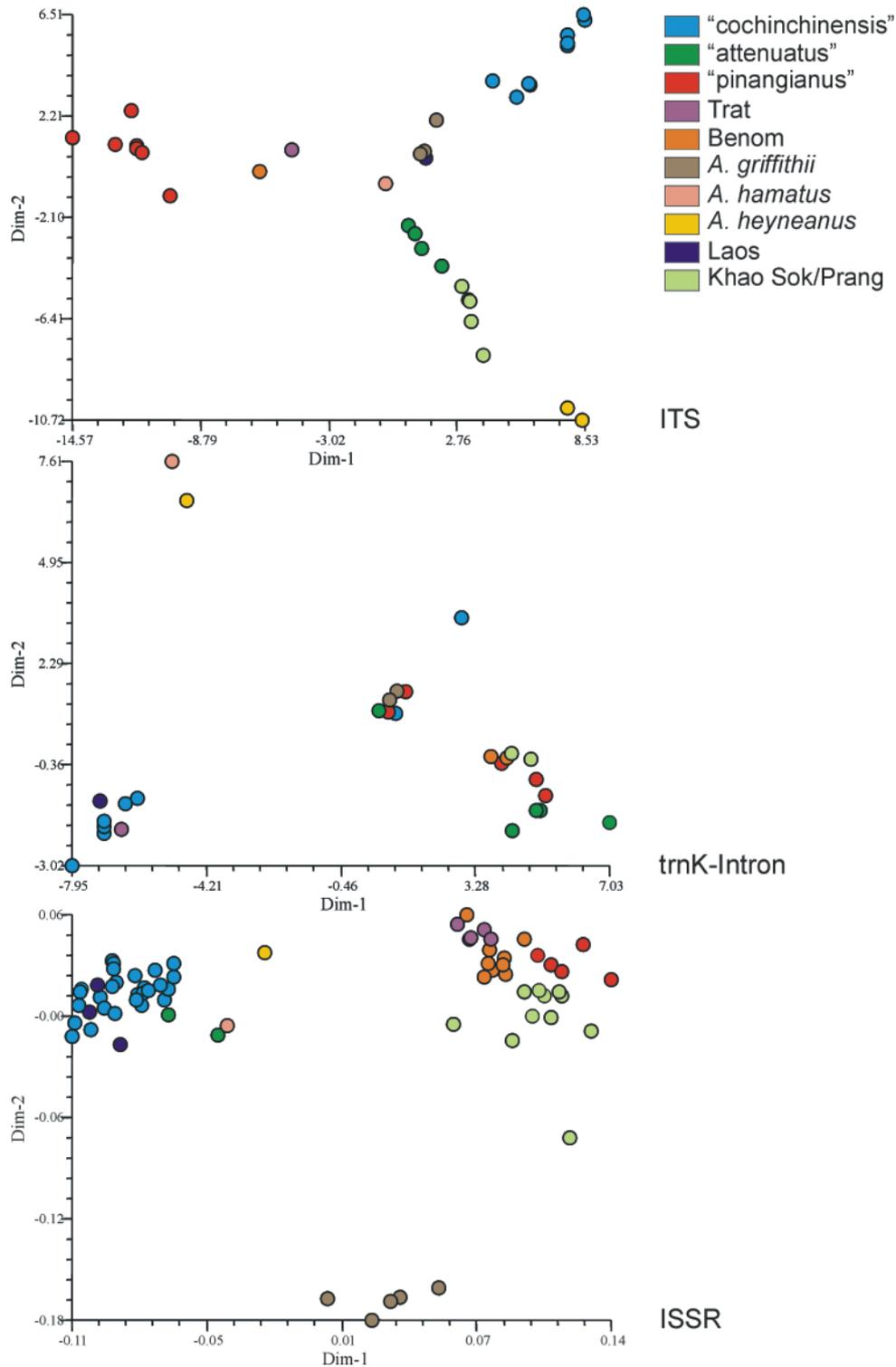


Abb. 67. Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) der ITS (oben) und trnK-Intron-Sequenzen (Mitte) und ISSR-Fingerprints (unten) der Ancistrocladaceae Südostasiens. Im Falle der Sequenzdaten wurden für die PCoA absolute Distanzen verwendet, im Falle der ISSRs Distanzen nach Nei und Li. Die einzelnen Proben sind farblich den Gruppen zugeordnet, die sich aufgrund der ITS-Phylogenie ergeben. Auf die Einbeziehung der ITS-Sequenzen der Isotypen wurde verzichtet, da deren Distanzen überdurchschnittlich stark von denen der anderen Proben abweichen.

3.8 Erstellung eines Artkonzepts der Ancistrocladaceae Asiens

Im Folgenden werden die sich aus den Phylogenien der drei Marker, ITS-Region, trnK-Intron, und ISSR-Fingerprints, ergebenden Beziehungen der untersuchten Proben aus Asien in Bezug auf ihre geographische Herkunft betrachtet. Es soll damit versucht werden ein Artkonzept für die Ancistrocladaceae Südostasiens zu entwickeln und die Wege einer möglichen retikulaten Evolution aufzuzeigen.

3.8.1 Einteilung der Sequenzen in Verwandtschaftsgruppen

Sequenzen eines Locus können auch innerhalb einer Art eine gewisse Variabilität aufweisen. Die Variabilität zwischen den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben der Ancistrocladaceae kann daher auch auf infraspezifische Variabilität von ITS sowie des trnK-Introns zurückzuführen sein. So zeigten die als *A. griffithii* bestimmten Proben im paarweisen Vergleich ihrer ITS-Sequenzen bis zu zwei Unterschiede auch wenn die Proben einem Fundort entstammten. Auch das trnK-Intron dieser Proben war an einer Position variabel. Ein weiteres Indiz für eine gewisse infraspezifische Variabilität stellt der Befund dar, dass an Fundorten der am häufigsten (bei 17 Proben) nachgewiesenen ITS-Sequenz auch Sequenzen auftraten, die von ersterer in ein bis zwei Positionen abwichen. Die abweichenden Sequenzen traten nur bei einzelnen Individuen auf und könnten lokale Abweichungen von einem von der häufigsten Sequenz repräsentierten Grundmuster darstellen.

Die Sequenzen der Proben aus Südostasien wurden durch Vergleich ihrer paarweisen Sequenzen zu Verwandtschaftsgruppen, die durch einen Sequenztyp repräsentiert sind, zusammengefasst. Der Übersichtlichkeit wegen werden sie in den folgenden Betrachtungen als einem möglichen Taxon zugehörig behandelt. Sequenzen wurden als ein Sequenztyp betrachtet wenn sie in UPGMA und Maximum-Parsimony-Analyse ein Cluster bildeten und untereinander eine geringere Distanz aufwiesen als gegenüber den anderen Sequenzen. Als zusätzliches Kriterium wurde die Existenz einer Sequenz angesehen von der sich die übrigen Sequenzen der Gruppe nur in einer oder in Ausnahmen in zwei Positionen unterschieden und die damit ein mögliches Grundmuster eines Taxons darstellte. Mit dieser Vorgehensweise wurden die 35 verschiedenen Sequenzen für ITS in 9 Sequenztypen und die 27 verschiedenen trnK-Intron-Sequenzen in 12 Sequenztypen eingeteilt. Die einzelnen Sequenzen wurden mit der Bezeichnung des Sequenztyps, dem sie zugeordnet wurden und mit Kleinbuchstaben benannt (z.B. ITS-Sequenztyp 1 bestehend aus den Sequenzen 1a bis 1f).

In die Einteilung der ITS-Sequenzen wurden auch die Sequenzen der Isotypen einbezogen. Diese Sequenzen, vor allem die von *A. attenuatus*, zeigten einen höheren Anteil abweichender Positionen. Die ITS-Sequenz des Isotypus von *A. attenuatus* hatte die größte Ähnlichkeit zu den ITS-Sequenzen der Gruppe 8. Der erfasste Bereich von ITS 1 war mit dem der Gruppe 8

sequenzgleich, der von ITS2 unterschied sich aber in 8 bis 9 Positionen von dem der Gruppe 8. Von diesen Positionen waren 6 zu allen untersuchten Ancistrocladaceae autapomorph. Wegen der aufgrund des Alters des Isotypus-Materials geringen Template-Menge in der Amplifikation und der deshalb notwendigen Re-PCR-Strategie zur Amplifikation der ITS-Region, bestand die Möglichkeit, dass bei der Sequenzierung abweichende ITS-Sequenzen und Amplifikationsfehler nachgewiesen wurden. Darauf kann die hohe Anzahl autapomorpher Unterschiede im ITS2 des Isotypus-Material zurückzuführen sein. Die Sequenz von *A. attenuatus* wurde wegen der Übereinstimmung von ITS1 und zweier potentieller Synapomorphien in ITS2 der Gruppe 8 zugeordnet. Tab. 16 zeigt für ITS eine Aufstellung der einzelnen Sequenzen, der maximalen und minimalen Positionsunterschiede mit der sie von den Sequenzen der jeweiligen Gruppe und von den übrigen Sequenzen getrennt wurden, Tab. 17 für das trnK-Intron. In Abb. 68 ist die Einteilung der Sequenzen anhand eines UPGMA-Phylogramms durchschnittlicher Distanzen gezeigt. Auf weitere Eigenschaften der gebildeten Gruppen wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

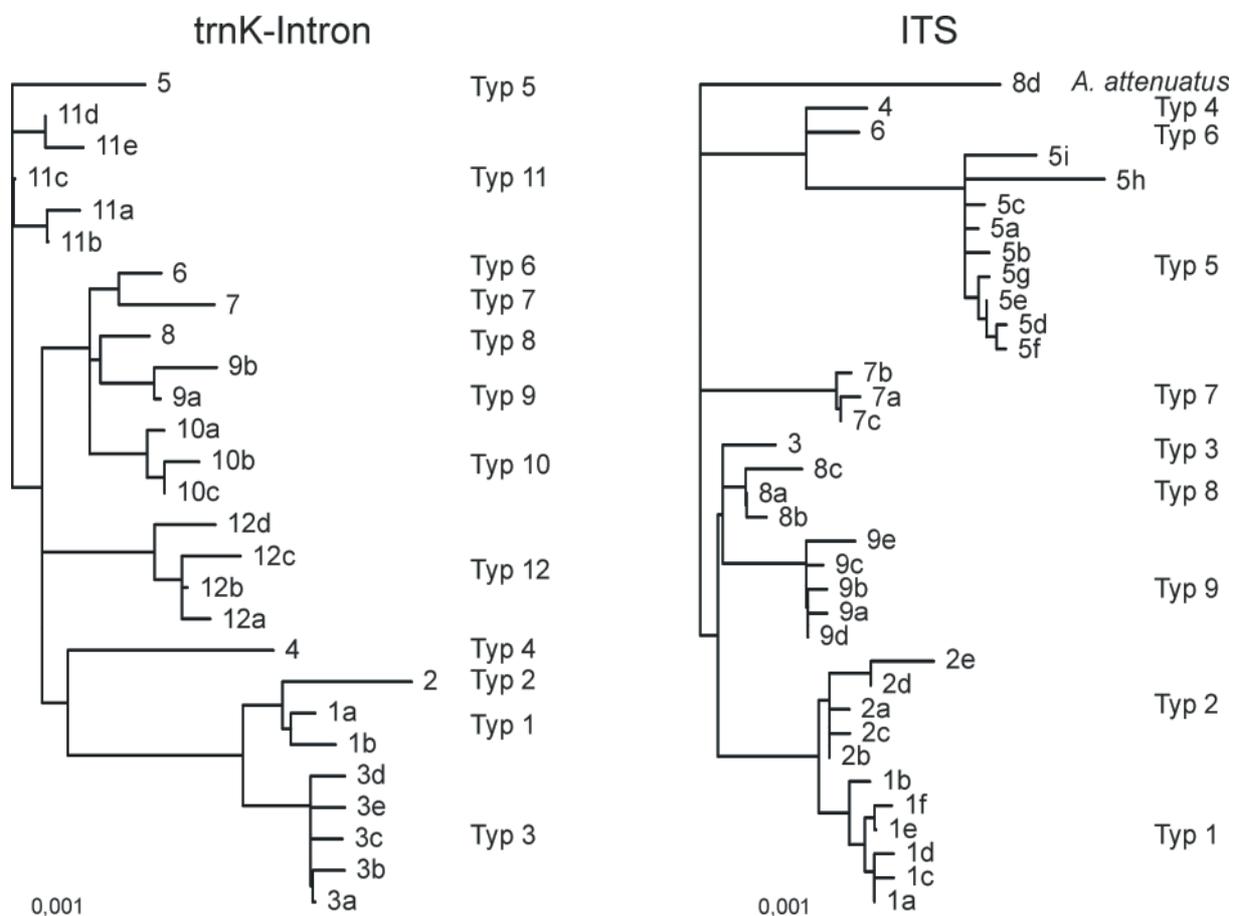


Abb. 68. Einteilung der Sequenzen der Ancistrocladaceae aus Südostasien in verschiedene Sequenztypen, gezeigt anhand von UPGMA-Phylogrammen durchschnittlicher paarweiser Distanzen.

Tab. 16. Zuordnung der einzelnen unterschiedlichen ITS-Sequenzen zu den sich aus der phylogenetischen Analyse ergebenden Gruppen. Gezeigt ist die Anzahl der paarweisen Unterschiede mit der die Sequenzen von den anderen Sequenzen ihrer Gruppe und von den nicht zu ihrer Gruppe gerechneten Sequenzen getrennt sind, die Anzahl der Proben bei denen die Sequenzen gefunden wurden und die Anzahl der Fundorte. Die Sequenzen wurden mit der Nummer der Gruppe bzw. Sequenztyp dem sie angehören und gegebenenfalls mit Kleinbuchstaben benannt.

Gruppe		Distanz zu Sequenzen der Gruppe		Distanz zu Sequenzen anderer Gruppen		Anzahl Proben	Anzahl Fundorte	Proben
		Min	Max	Min	Max			
1	1a	1	2	4	20	17	8	1155, 1234 Seq. 1, 1244 Seq. 1, 2244 Seq. 1, 2214 Seq. 1, 3244, 1214, 1125, P1, 1051 Seq. 2, 1151 Seq. 2, 551, 1053, 1052, 1098, 1200, 1072
	1b	2	4	4	23	2	1	1051 Seq. 1, 1151 Seq. 1
	1c	1	3	4	24	1	1	552
	1d	1	3	5	24	1	1	P2
	1e	1	4	3	23	1	1	P4
	1f	1	3	4	24	1	1	553
2	2a	1	3	4	21	4	2	3214, 1234 Seq. 2, 1244 Seq. 2, 2244 Seq. 2
	2b	1	2	4	20	1	1	4214
	2c	1	3	4	21	1	1	2214 Seq. 2
	2d	1	2	4	21	1	1	<i>A. hainanensis</i>
	2e	1	3	5	19	1	1	<i>A. cochinchinensis</i> (Isotypus)
3	3	-	-	4	17	3	1	961, 962, 6678
4	4	-	-	6	16	1	1	P3
5	5a	2	5	8	20	1	1	<i>A. tectorius</i> Borneo
	5b	2	4	8	21	1	1	P7
	5c	2	5	8	21	1	1	16
	5d	1	6	9	22	1	1	KL2
	5e	1	4	8	21	1	1	<i>A. tectorius</i> Jahore
	5f	1	6	9	22	4	3	6114, KS5, KL1, 184
	5g	1	5	8	21	1	1	<i>A. tectorius</i> Khao Lak
	5h	3	5	8	21	1	1	<i>A. pinangianus</i> (Isotypus)
	5i	2	6	11	24	1	1	Trang
6	6	-	-	8	17	3	1	P6, P5, <i>A. tectorius</i> Benom
7	7a	1	2	11	22	1	1	<i>A. griffithii</i>
	7b	1	2	11	22	1	1	2184
	7c	1	1	10	21	3	2	1184, 3184, KS2
8	8a	1	3	4	15	2	1	KC5, KC2
	8b	1	4	5	16	1	1	KC1
	8c	3	4	7	18	5	3	34, 36, KC3, KC4, KC6
	8d	9*	10	12	21	1	1	<i>A. attenuatus</i> (Isotypus)
9	9a	1	4	5	20	1	1	3114
	9b	1	3	5	20	1	1	KS3
	9c	1	2	5	20	5	2	4184, 5184, 6184, 7184, 1124 Seq. 1
	9d	1	3	4	19	7	1	1114, 2114, 7114, 8114, 9114, KS1, KS4
	9e	2	4	7	22	1	1	1124 Seq. 2

* Bei der ITS-Sequenz 8d handelt es sich um die Sequenz des Isotypus von *A. attenuatus* die in ITS 2 eine hohe Anzahl an Autapomorphien aufweist. Die Bestimmung der paarweisen Unterschiede innerhalb Gruppe 8 wurde unter Ausschluss der Sequenz 8d durchgeführt. Zur Begründung der Zuordnung dieser Sequenz zu Gruppe 9 siehe Text.

Tab. 17. Zuordnung der einzelnen unterschiedlichen trnK-Intron-Sequenzen zu den sich aus der phylogenetischen Analyse ergebenden Gruppen. Gezeigt ist die Anzahl der paarweisen Unterschiede mit der die Sequenzen von den anderen Sequenzen ihrer Gruppe und von den nicht zu ihrer Gruppe gerechneten Sequenzen getrennt sind, die Anzahl der Proben bei denen die Sequenzen gefunden wurden und die Anzahl der Fundorte. Die Sequenzen wurden mit der Nummer der Gruppe bzw. Sequenztyp dem sie zugehören und gegebenenfalls mit Kleinbuchstaben benannt.

Gruppe	Distanz zu Sequenzen der Gruppe		Distanz zu Sequenzen anderer Gruppen		Anzahl Proben	Anzahl Fundorte	Proben	
	Min	Max	Min	Max				
1	1a	2	2	4	14	9	4	1244, 2244, 3244, 4244, 551, 553, 1155, 1234, 1072
	1b	2	2	5	15	1	1	P3
2	2	-	-	5	17	1	1	552
3	3a	1	1	4	14	4	2	1151, 1051, 1053, 1200
	3b	1	2	5	15	2	2	1052, 1125
	3c	1	2	5	15	1	1	1098
	3d	1	2	6	15	1	1	P1
	3e	1	2	6	15	3	1	961, 962, 6678
4	4	-	-	6	16	4	1	1214, 2214, 3214, 4214
5	5	-	-	(3)*	(11)	1	1	A. hainanensis
6	6	-	-	4	14	7	4	5114, 6114, 16, KS5, KL1, KL2, Trang
7	7	-	-	4	14	1	1	P7
8	8	-	-	4	14	1	1	P5
9	9a	2	2	4	14	3	1	A. tectorius Benom, A. tectorius Borneo, P6
	9b	2	2	4	16	1	1	A. tectorius Jahore
10	10a	1	2	4	14	5	1	2114, 3114, 4114, 9114, KS4
	10b	1	2	5	15	1	1	7184
	10c	1	1	4	14	7	2	1114, KS1, 8114, 1124, 6184, 4184, 5184
11	11a	1	3	5	11	3	1	1184, 2184, 3184
	11b	1	4	6	12	1	1	A. griffithii
	11c	1	2	4	10	1	1	34
	11d	1	3	4	11	1	1	A. tectorius Khao Lak
	11e	1	4	6	12	1	1	184
12	12a	1	3	5	14	4	1	KC3, KC5
	12b	1	2	4	14	1	1	KC4
	12c	1	4	7	17	1	1	KC2
	12d	2	4	7	15	1	1	KC1

* Die trnK-Intron-Sequenz 4 entspricht der der Probe von Hainan, die aufgrund des hohen Alters der DNA nicht vollständig erhalten werden konnte. Die Werte fallen daher zu niedrig aus.

3.8.2 Geographische Verteilung der ITS- und trnK-Intron-Sequenztypen in Südostasien

Vergleicht man die oben definierte Einteilung der Sequenzen mit der Herkunft der Aufsammlungen, so zeigen sich verschiedene Korrelationen, die für eine taxonomische Klassifizierung herangezogen werden können. Zum einen waren einige Typen der ITS-Region gehäuft mit bestimmten Typen des trnK-Introns korreliert, zum anderen traten Individuen mit bestimmten Kombinationen von ITS und trnK-Intron an mehreren Fundorten auf, zum Teil sympatrisch mit Vertretern anderer Kombinationen. Im folgenden werden diese Zusammenhänge näher betrachtet und mit den Ergebnissen der ISSR-Analysen verglichen. Dies wird jeweils getrennt für den Norden und den Süden des Untersuchungsgebietes durchgeführt um eine bessere Übersichtlichkeit der Darstellung zu erreichen.

3.8.2.1 Geographische Verteilung der Sequenztypen im Norden des Untersuchungsgebietes

Als Norden des Untersuchungsgebietes (nachfolgend als Norden bezeichnet) werden in der vorliegenden Arbeit die Fundorte von *Ancistrocladus* in Ost- und Zentralthailand, in Südlaos, auf der Insel Hainan in Südchina und der Locus classicus für *A. cochinchinensis* in Nordvietnam zusammengefasst (Abb. 69). Für dieses Gebiet lagen insgesamt 30 Proben von 12 Fundorte (einschließlich des Locus classicus) zur Sequenzanalyse vor.

Die phylogenetische Analyse der ITS-Sequenzen ergab eine Monophylie aller Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes mit Ausnahme der Probe aus Trat (P3), die mit Proben aus Süd Thailand zusammengefasst wurde. Die Proben aus Laos bildeten die Nachbargruppe zu dieser Monophylie. Die dem Isotypus von *A. cochinchinensis* ähnlichste Sequenz hatte die Probe aus Hainan, die wahrscheinlich der beschriebenen *A. hainanensis* entspricht. Aus insgesamt 6 Proben der Populationen des Khao Yai NP, des Gene Conservation Centers Ubon Ratchathani und von dem Gelände des Botanischen Gartens Ubon Ratchathani wurden jeweils 2 paraloge Sequenzen ermittelt, mit einer Distanz von 1 bis 4 Positionen zwischen den Paralogs. Insgesamt wiesen die 30 Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes einschließlich des Isotypus von *A. cochinchinensis* 13 verschiedene Sequenzen für ITS auf, mit einer paarweisen Distanz von 1 bis 16 Positionen. Von diesen Sequenzen wurden 8 nur bei jeweils einer Probe gefunden, 5 jeweils bei mehr als einer (vgl. Tab. 16). In der UPGMA und der Maximum-Parsimony-Analyse bildeten diese 13 ITS-Sequenzen 4 Gruppen (vgl. Abb. 68). Für das trnK-Intron wurden 10 verschiedene Sequenzen gefunden, die in 5 Gruppen eingeteilt wurden. 3 dieser Gruppen bildeten in der Maximum-Parsimony-Analyse eine Monophylie, 2 wurden innerhalb der Sequenzen der Proben aus dem Süden des Untersuchungsgebietes positioniert.

Die ITS-Sequenzen des Typ 1 und 2 bildeten in der Maximum-Parsimony-Analyse eine monophyletische Gruppe. Proben mit diesen ITS-Sequenzen kamen an 10 der 12 Fundorte im Norden vor. Die Sequenzen des Typ 1 finden sich in Populationen von 8 Fundorten und finden sich nicht am Locus classicus in Nordvietnam und auf Hainan. Die Sequenzen des Typs 2 finden sich in den beiden Populationen in der Region Ubon Ratchathani in Hainan und im Isotypus von *A. cochinchinensis* in Nord Vietnam.

ITS-Sequenzen der Gruppe 1 hatten mit Ausnahme von 1b (siehe unten) einen paarweisen Unterschied von 1 bis 3 Positionen, wobei aber alle Sequenzen, zu einer der anderen Sequenzen nicht mehr als einen Unterschied aufwiesen. Die Sequenz 1a wurde für 17 Proben ermittelt, die von 8 der 12 untersuchten Lokalitäten stammten. Die anderen Sequenzen der Gruppe 1 waren jeweils auf eine Probe beschränkt, die mit Proben mit der Sequenz 1a vergesellschaftet waren. Sie wurden daher als lokale Abweichungen von einem durch 1a repräsentierten Grundmuster interpretiert.

Die Sequenzen der Gruppe 2 wurden aus Proben von den zwei Fundorten in der Region Ubon Ratchathani Nordostthailand, dem Isotypus von *A. cochinchinensis* und der Probe aus Hainan isoliert. Davon kam eine Sequenz (2a) bei 4 Proben aus 2 Populationen, die restlichen jeweils bei einer Probe vor. Sequenzen des Typ 2 hatten untereinander eine paarweise Distanz von 1 bis 3 Basen. Die Sequenz 2b wies zu den anderen Sequenzen jeweils nur einen Unterschied auf, zu der Sequenz des Isotypus zwei Unterschiede. Die Sequenz 2b könnte damit analog zu dem Vorgehen in der Gruppe 1 als Grundmuster eines durch Sequenzen des Typ 2 repräsentierten Taxons gewertet werden.

Aus den Proben 1051 und 1151 aus dem Khao Yai NP wurden neben dem Typ 1a auch eine paraloge Sequenz ermittelt, die gegenüber der Sequenz 1a zwei und gegenüber der Sequenz 2b drei Unterschiede aufwies. Diese Sequenz hatte eine vermittelnde Stellung zwischen den Gruppen 1 und 2, die sich auch in der Maximum-Parsimony-Analyse bestätigte. Da ihre Distanz zu Sequenz 1a geringer war als zu Sequenz 2b, wurde sie als Sequenz 1b zu Sequenztyp 1 gezählt. Die vermittelnde Stellung der Sequenz 1b zwischen diesen beiden Typen kann auch mit einem Rekombinationsereignis zwischen einer Sequenz des Typ 1 und einer des Typ 2 erklärt werden (Coleman, 2002; Muir *et al.*, 2001).

In Populationen, in denen einzelne Individuen nur den ITS-Sequenztyp 2 aufweisen, haben alle Vertreter den trnK-Intron-Typ 4 oder 5. Dies sind zum einen die Aufsammlungen aus dem Gene Conservation Centers in Ubon Ratchathani zum anderen die Probe aus Hainan. Die trnK-Intron-Sequenzen des Typ 4 und 5 werden in der Maximum-Parsimony-Analyse mit Sequenzen von Proben aus dem Süden des Untersuchungsgebietes zusammengefasst. Diejenigen Populationen in denen kein Individuum gefunden werden konnte, das nur ITS-Typ 2 aufwies, hatten den trnK-Intron-Typ 1, 2 oder 3. TrnK-Intron-Typ 2 kam nur in einer Probe (552) aus Kho Chang vor, zusammen mit ITS-Typ 1a (Abb. 69).

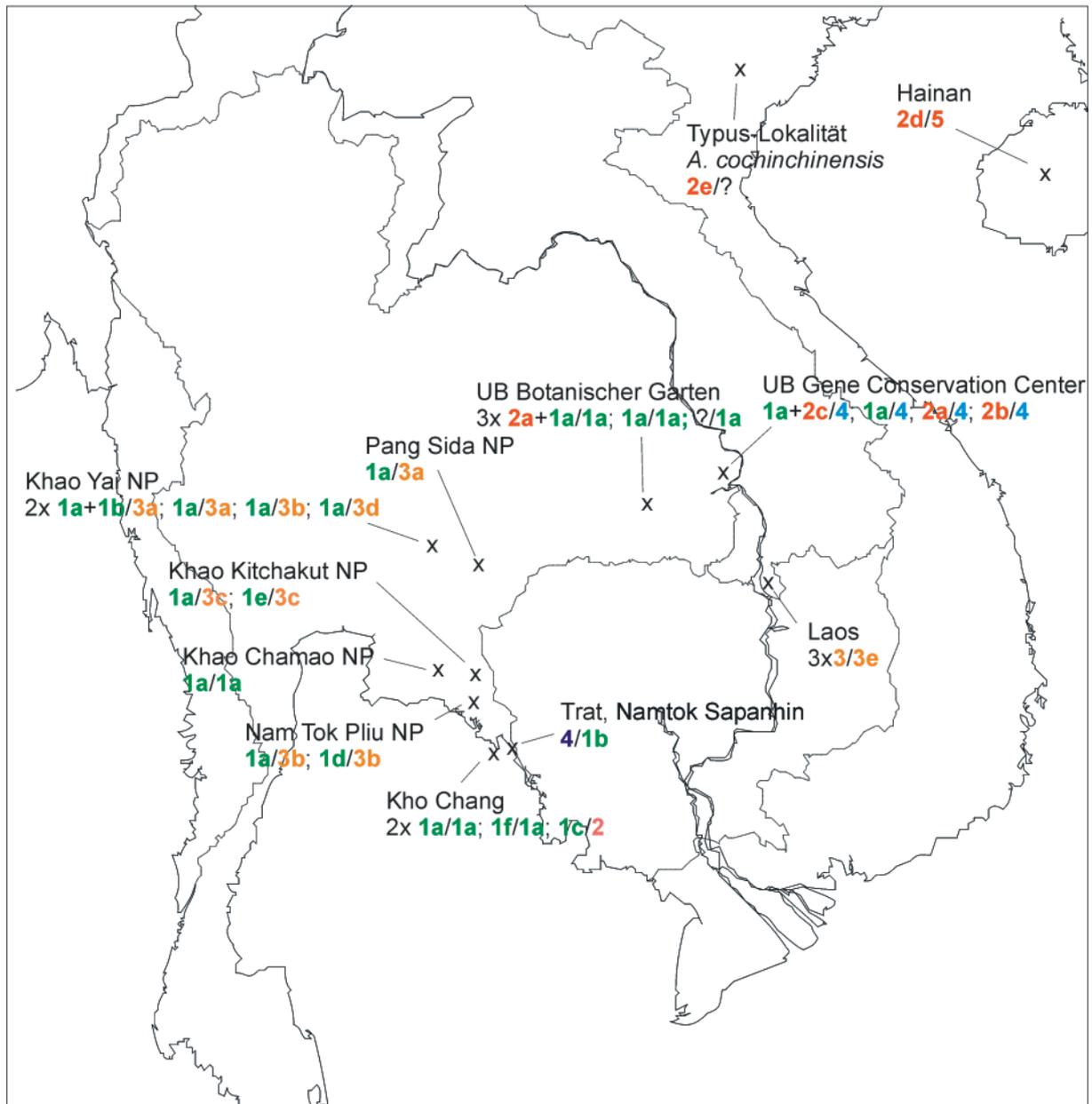


Abb. 69. Karte des Nordens des Untersuchungsgebietes (Nord- und Ostthailand, Laos, Nordvietnam und Hainan) mit den Fundorten für *Ancistrocladus*. Für die Proben der Fundorte ist die Kombination der ITS- und trnK-Intron-Sequenzen angegeben (ITS/trnK). Die Benennung der Sequenzen entspricht ihrer Einteilung aufgrund der paarweisen Distanzen. Sequenzen des gleichen Typs sind in gleicher Farbe gezeigt, den trnK-Intron-Sequenzen wurde die Farbe eines ITS-Typs, mit dem sie häufig zusammen auftraten, zugeordnet.

Es besteht eine geographische Korrelation in der Verbreitung der verschiedenen Sequenztypen. Individuen mit Sequenztyp 2 der ITS-Region und Sequenztyp 4 und 5 des trnK-Introns haben einen nordöstlichen Verbreitungsschwerpunkt, Individuen mit Typ 1 der ITS-Region und Typ 1, 2, oder 3 des trnK-Introns einen südwestlichen davon, in Zentralthailand. Die beiden Populationen aus Ubon Ratchathani können als Vertreter einer Hybridisierungszone

zwischen Gruppen, die durch Typ 1 und Typ 2 der ITS-Region charakterisiert sind, interpretiert werden. Die Proben aus der 70 km westlich des Gene Conservation Centers besammelten Population des Geländes des Botanischen Gartens Ubon Ratchathani setzten sich aus Proben nur mit ITS-Typ1 sowie Proben mit ITS-Typ1 und Typ 2 zusammen. Hier kommt der trnK-Intron-Typ 1 vor, der ansonsten nur in Individuen weiter westlich und weiter südlich gefunden wurde. Die Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes könnten folglich aus einem nördlich verbreiteten Taxon bestehen, das durch den ITS-Typ 2 und einem trnK-Intron-Typ 4 bzw. 5 charakterisiert ist, und einem südlich verbreiteten Taxon, das durch ITS-Typ 1 und trnK-Intron-Typ 1 oder 3 ausgezeichnet ist. Weil der Isotypus von *A. cochinchinensis* eine ITS-Sequenz des Typ 2 aufwies, kann das nördlich verbreitete Taxon zur Art *A. cochinchinensis* gezählt werden. Zwei Proben des Khao Yai NP weisen neben ITS-Typ 1a auch den ITS-Typ 1b auf, der in Distanz- und Maximum-Parsimony-Analyse zwischen den anderen Sequenzen des Typ1 und denen des Typ 2 vermittelt und eventuell ein rekombinantes Molekül zwischen beiden ITS-Typen darstellt. Es besteht daher die Möglichkeit, dass ITS-Sequenzen, die dem Typ 2 ähnlich sind, auch in Populationen weiter westlich der hier postulierten Hybridisierungszone auftreten können. Innerhalb der Hybridisierungszone zeigt sich eine zunehmende Ähnlichkeit von Westen nach Osten bzw. Norden der *Ancistrocladus*-Proben mit dem „Genotyp“ von *A. cochinchinensis*.

Allerdings wurden mit dem Isotypus von *A. cochinchinensis* und der Probe von Hainan nur 2 Proben aus dem nördlichen Bereich der Verbreitung von *Ancistrocladus* in Südostasien untersucht. Aufgrund des Alters des Materials dieser Proben bestand die Möglichkeit, dass bei einem Auftreten zweier paraloger Sequenzen eine davon zufällig in der Amplifikation unterdrückt war. Ein Vorkommen von ITS-Sequenzen des Typ 1 in diesem Gebiet kann demnach nicht ausgeschlossen werden.

In Populationen, die nur Proben mit ITS-Sequenzen vom Typ1 aufwiesen, kamen entweder trnK-Intron-Sequenzen des Typ 1 oder des Typ 3 (in einem Fall 1 und 2) vor. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Vorkommen der beiden trnK-Intron-Typen und der geographischen Entfernung der Populationen festgestellt werden. Die durchschnittliche Distanz ist für die trnK-Intron-Sequenzen der entsprechenden Proben mit maximal 0,32% nur wenig niedriger als die für die ITS-Region mit 0,46 %, so dass beide Moleküle scheinbar eine ähnliche Mutationsrate haben. Davon kann jedoch nicht ausgegangen werden. Die Werte deuten darauf hin, dass in verschiedenen Populationen von Individuen mit ITS-Typ 1, trnK-Intron-Sequenzen mit polyphyletischem Ursprung vorkommen.

Die Probe P3 aus dem Süden der Provinz Trat im Grenzgebiet von Thailand und Kambodscha weicht in ihrer ITS Sequenz stark von den übrigen Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes ab (1,4 bis 1,8% durchschnittliche Distanz). In der Maximum-Parsimony-Analyse bildet sie die Schwestergruppe zu in Südthailand und Malaysia gesammelten Proben

um *A. pinangianus*. Sie hat zu den Proben P5 und P6 aus dem Gunung Benom in Malaysia die niedrigste Distanz von 0,7%. Die Proben 6678, 961 und 962 aus Laos werden in der ITS-Phylogenie als Nachbargruppe zur Monophylie um *A. cochinchinensis* gestellt. Dabei waren ihre Sequenzen denjenigen Sequenzen der Trang-Gruppe (siehe unten) mit einer minimalen Distanz von 0,35 % ähnlicher als denjenigen von *A. cochinchinensis* mit mindestens 0,58%. Die Proben stammen von einem Fundort und waren untereinander sequenzgleich. Anzeichen für die Existenz paraloger Sequenzen waren nicht zu erkennen.

Das trnK-Intron der drei Proben aus Laos (Typ 3e) unterscheidet sich von den übrigen trnK-Intron-Sequenzen des Typ 3 in bis zu 2 Positionen, am ähnlichsten ist die Sequenz 3a mit nur einer Base Unterschied. Das trnK-Intron der Probe aus Trat (Typ 1b) unterscheidet sich von der der trnK-Intron-Sequenz des Typ 1a um zwei Basen. Das trnK-Intron der Proben aus Laos und der Probe P3 aus Trat unterscheidet sich damit nicht wesentlich von dem der Proben aus Populationen mit ITS-Typ 1. Die phylogenetische Einordnung des trnK-Introns der Probe aus Laos entspricht dann der der ITS-Phylogenie, wenn man bei den Proben mit dem ITS-Typ 1 von einer Introgression des trnK-Intron-Typ 3 ausgeht. Bei P3, der Probe aus Trat, stimmt die phylogenetische Position des trnK-Introns nicht mit der der ITS-Sequenz überein.

Die im Wesentlichen nach ihrer ITS-Sequenz vorgenommene Einteilung der hier besprochenen Aufsammlungen lässt sich durch die ISSR-Fingerprint-Analysen weitgehend bestätigen. Aufgrund der höheren Frequenz von Mikrosatelliten in der Kern-DNA stellen die ISSR-Bandenmuster ein Maß für die genetische Distanz unter Berücksichtigung von Rekombinations- und Hybridisierungsereignissen dar. Die auf Distanzen nach Nei und Li (1979) basierende Neighbor-Joining-Analyse zeigt die untersuchten Populationen jeweils als Monophylie (wenn die Individuen eines Fundortes jeweils als Population angesehen werden). Die Populationen aus dem Khao Yai, aus Kho Chang und die aus Ubon Ratchathani wurden zu einer Gruppe zusammengefasst (vgl. Abb. 64). Darüber hinaus besitzen die Aufsammlungen einer Populationen zueinander eine niedrigere Distanz als zu den Proben anderer Fundorte. Die durch die ISSR-Fingerprints angezeigte genetische Distanz innerhalb der einzelnen Populationen ist damit niedriger als die zwischen Proben verschiedener Populationen mit gleicher ITS- oder trnK-Intron-Sequenz. Die Proben aus Ubon Ratchathani werden somit nicht nach der Distanz ihrer ITS-Sequenzen sondern nach ihrer geographischen Herkunft eingeordnet. Eine Ausnahme bildet die Probe 1234 aus dem Bot. Garten Ubon Ratchathani, die als Polytomie gezeigt wird und in der PCoA zwischen den Proben aus Ubon Ratchathani und den übrigen vermittelt. Bei dieser Probe handelt es sich um eine von drei Proben die die ITS-Sequenzen 1a und 2a aufweisen. In der zweidimensionalen Darstellung der Distanzen nach Nei und Li (1979) sind die Populationen nach dem Auftreten des Sequenztyps für ITS gegliedert. Einzelne Cluster sind für die Proben mit ITS-Typ 3 (Laos) und ITS-Typ 4 (Trat) angezeigt. Weitere Cluster bestehen zum einen für die Populationen aus Ubon Ratchathani, in denen der ITS-Typ 2 auftritt und zum anderen für die Populationen, die nur den ITS-Typ 1

aufweisen. In letzterem Cluster werden Proben aus dem Khao Yai NP und aus dem ca. 275 km vom Khao Yai entfernten Kho Chang zusammengefasst (vgl. Abb. 70).

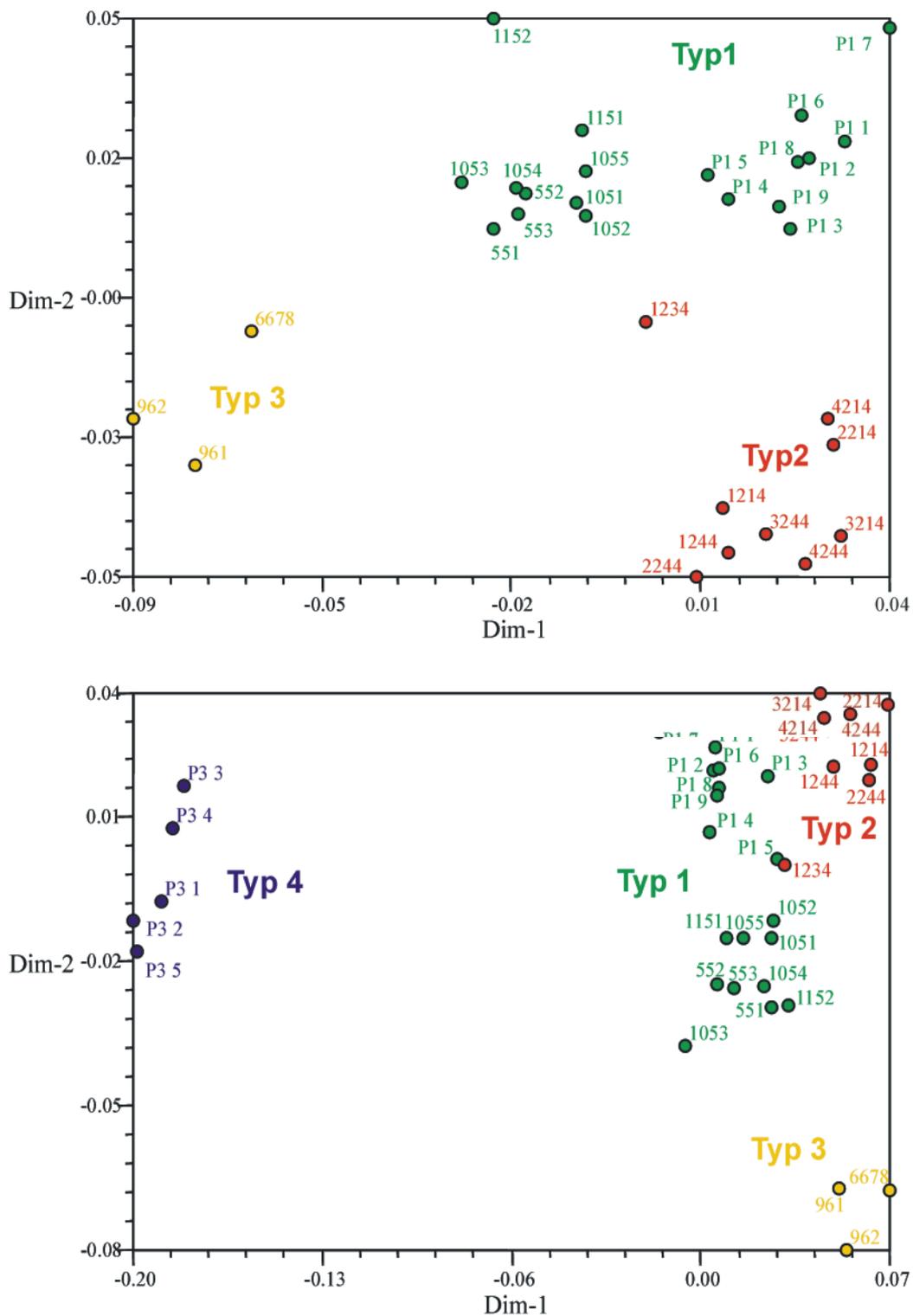


Abb. 70. Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) von Nei-Li-Distanzen der ISSR-Fingerprints der Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes. Oben wurden die 5 Proben der aus Sämlingen der Probe P3 aus Trat gezogenen Individuen (ITS-Typ 4) ausgeschlossen. Die Proben sind farblich ihrem ITS-Typ zugeordnet, Proben aus Populationen in denen ITS-Typ 2 vorkam, wurden farblich ITS-Typ 2 zugeordnet.

Neben dem Auftreten von Paralogen von verschiedenen Sequenztypen von ITS in einer Probe und der teilweise unterschiedlichen phylogenetischen Einordnung von ITS und trnK-Intron-Sequenz einer Probe, kann dies als Unterstützung für die Hypothese gewertet werden, dass die hier besprochenen Ancistrocladaceae Teil eines durch Hybridisierung entstandenen Artkomplexes darstellen. Beide Populationen aus Ubon Ratchathani bilden ein gemeinsames Cluster, obwohl sie in ihrer trnK-Intron-Sequenz stark voneinander abweichen. Die Proben 3244 und 1214 sind für ITS sequenzgleich (Typ 1a) mit den Proben 551,1053,1052, wurden aber in der ISSR-Analysen nicht mit diesen zusammengefasst. Die genetische Distanz der nukleären DNA entspricht demnach nicht den Distanzen zwischen den ITS- und trnK-Intron-Sequenzen. Die Populationen, in denen mehr als ein Sequenztyp für ITS und das trnK-Intron auftreten, sind nach den ISSR-Fingerprints genetisch homogener als die Distanzen der Sequenzen erwarten lassen. Die Ergebnisse der ISSR-Analyse weisen daher darauf hin, dass verschiedene paraloge ITS- und trnK-Intron-Sequenzen nach Hybridisierungsereignissen in den Populationen persistieren. Die geringere Distanz zwischen den Proben von Khao Chong und des Khao Yai NP als zwischen denen des Khao Yai NP und denen aus Ubon Ratchathani ist als Unterstützung für die oben aufgeführte Einschätzung zu werten der für *A. cochinchinensis* nachgewiesene ITS-Typ 2 repräsentiere ein von den Individuen mit ITS-Typ 1 abtrennbares Taxon. Das Auftreten von ITS-Sequenzen des Typ 2 in Populationen mit ITS-Typ 1 ist in diesem Fall mit einer Erhöhung der genetischen Distanz dieser Populationen zu denen, die nur ITS-Typ 1 aufweisen, korreliert. Diese Verhältnisse sollten bei Vertretern einer Hybridisierungszone oder bei Introgressionen von ITS-Sequenzen des Typ 1 in Populationen mit ITS-Typ 2 vorkommen. Da keine Proben aus der Umgebung des Locus classicus für Fingerprint-Untersuchungen zur Verfügung standen kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zwischen diesen beiden Möglichkeiten differenziert werden.

Bei der Probe P3 aus Trat ist das trnK-Intron dem der Proben aus benachbarten Populationen ähnlich. Die Marker der nukleären DNA unterscheiden sich stark von den anderen Populationen, so dass eine hybridogene Entstehung dieses Individuums aus Vertretern geographisch benachbarter Gruppen unwahrscheinlich ist. In die ISSR-Analyse konnten 5 aus Samen von Probe P3 gezogene Proben einbezogen werden. Alle 5 Proben gruppieren mit hoher Signifikanz als Nachbargruppe zu den Proben des Gunung Benom (9 aus Samen gezogene Individuen) innerhalb eines Clades mit *A. pinangianus* zuordenbaren Proben. Die Probe P3 erscheint damit eindeutig von den übrigen Proben der näheren und weiteren Umgebung ihres Fundortes getrennt.

3.8.2.2 Taxonomische Einteilung der Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes

Geht man von den aufgrund der ISSR-Fingerprints angezeigten Verwandtschaftsverhältnissen aus, ergeben sich mindestens ein Introgressionereignis für ITS und mindestens 4 für das

trnK-Intron (vgl. zu diesem Zusammenhang Kapitel 4.3.3 und Abb. 80). Aufgrund der Befunde lassen sich die Proben des Nordens des Untersuchungsgebietes vorläufig in potentielle Arten einordnen. Eine nördliche Art (*A. cochinchinensis*) wird repräsentiert durch den Isotypus *A. cochinchinensis* und die Probe aus Hainan und ist charakterisiert durch eine ITS-Sequenz des Typ 2 und eine trnK-Intron-Sequenz des Typ 4 oder 5. Eine südliche Art (*A. spec.* Khao Yai) wird repräsentiert durch ITS-Sequenzen des Typs 1. Die Proben aus Ubon Ratchathani werden aufgrund des Auftretens verschiedener Sequenztypen für ITS und trnK und der ISSR-Distanzen als Vertreter einer Hybridisierungszone zwischen den nördlichen und südlichen Arten angesehen. Abgesetzt von diesen beiden potentiellen Taxa sind die Proben aus Südlaos (*A. spec.* Laos) aufgrund der ITS-Sequenz des Typ 3 und ihres ISSR-Bandenmusters. Die ITS-Sequenz und die ISSR-Bandenmuster der Proben aus Trat haben mit Proben aus Malaysia eine hohe Ähnlichkeit. Die Probe P3 (*A. spec.* Trat) erscheint von den übrigen potentiellen Arten getrennt als Angehöriger einer Verwandtschaftsgruppe aus dem Süden des Untersuchungsgebietes.

3.8.2.3 Geographische Verteilung der Sequenztypen im Süden des Untersuchungsgebietes

Als Süden des Untersuchungsgebietes (nachfolgend als der Süden bezeichnet) werden in der vorliegenden Arbeit die Fundorte von *Ancistrocladus* auf der malaiischen Halbinsel (Südthailand und Malaysia), auf Borneo, der Locus classicus für *A. pinangianus* in Nordostmalaysia und für *A. attenuatus* in Südburma zusammengefasst (Abb. 71). Für dieses Gebiet lagen 15 Fundorte (einschließlich der beiden Loci classici) mit insgesamt 41 Proben zur Sequenzanalyse vor.

Die Proben aus dem Süden zeigten im Vergleich zu den Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes eine höhere Diversität ihrer ITS-Region. In der Maximum-Parsimony-Analyse bildeten die Sequenzen dieser Proben drei Linien, von denen eine als Nachbargruppe zu einer Monophylie aus Proben aus dem Norden angeordnet wurde und eine andere Linie (*A. griffithii*) als Polytomie zu allen *Ancistrocladus*-Taxa (vgl. Abb. 59). Aus der Probe 1124 aus dem Khao Sok NP in Thailand wurden 2 paraloge Sequenzen für ITS ermittelt. Ein Paralogon entsprach einer ITS-Sequenz aus anderen Proben, das andere hatte gegenüber den untersuchten Proben zwei Autapomorphien in ITS1, eine Insertion von 2 bp Länge und eine Basensubstitution. Insgesamt wiesen die 41 Proben aus dem Süden einschließlich der Isotypen von *A. pinangianus* und *A. attenuatus* 20 verschiedene Sequenzen für ITS auf, mit einer paarweisen Distanz von 1 bis 22 Positionen. Von diesen Sequenzen wurden 13 jeweils nur bei einer Probe gefunden (vgl. Tab. 16). In der UPGMA und der Maximum-Parsimony-Analyse bildeten die 20 verschiedenen ITS-Sequenzen 5 Gruppen.

Für das trnK-Intron der 38 Proben, für die das trnK-Intron sequenziert wurde, wurden 17 unterschiedliche Sequenzen mit einer maximalen paarweisen Distanz von 9 Positionen identifiziert. Die Distanz war geringer als die der Sequenzen des trnK-Introns der Proben aus dem Norden. Dementsprechend waren die trnK-Intron-Sequenzen der Proben aus dem Süden in der Maximum-Parsimony-Analyse in einer Monophylie angeordnet, allerdings nur mit geringer Auflösung. Die Sequenzen wurden in 7 Gruppen eingeteilt, innerhalb derer die einzelnen Sequenzen von mindestens einer Sequenz durch nicht mehr als 2 Positionen unterschieden waren und die gegenüber Sequenzen anderer Gruppen an mindestens 4 Positionen Unterschiede aufwiesen. Die Sequenzen, die dieses Kriterium erfüllen, wurden als ein Sequenztyp behandelt (vgl. Tab. 17). Die Korrelation von ITS- und trnK-Intron-Typen (siehe unten) bestätigte diese Vorgehensweise. Allerdings stellen die Sequenztypen nur in wenigen Fällen Gruppen dar in denen eine in mehreren Proben vorkommende Sequenz ein Grundmuster repräsentiert von dem die anderen Sequenzen geringfügig abweichen. Im Süden des Untersuchungsgebietes war im Gegensatz zum Norden, eine Korrelation zwischen ITS-Sequenztypen und Typen des trnK-Introns der Proben zu erkennen (Abb. 71).

Die Proben mit dem ITS-Typ 5, zeigten in ihrem trnK-Intron eine hohe Diversität. Neben dem trnK-Intron-Typ 6 kamen hier Sequenzen vom Typ 7, 9 und 11 vor. In ITS-Gruppe 5 wurden 8 ITS-Sequenzen zusammen mit der Sequenz des Isotypus von *A. pinangianus* angeordnet. Die ITS-Sequenz 5i der Probe vom Gelände des Botanischen Garten in Trang hatte zu den anderen eine paarweise Distanz von 2 bis 6 Positionen. Alle anderen Sequenzen hatten untereinander eine paarweise Distanz von 1 bis 4 Positionen (ohne die Isotypus-Sequenz 1 bis 3 Positionen). Die ITS-Sequenzen der Gruppe 5 zeigten damit eine höhere Diversität als diejenigen einer Gruppe der Proben des Nordens. Es konnte keine Sequenz identifiziert werden, zu der die übrigen Sequenzen der Gruppe 5 eine niedrigere Distanz hatten als diese untereinander. Alle ITS-Sequenzen der Gruppe 5 unterschieden sich aber von denen der anderen Proben aus dem Süden in 13 bis 22 Positionen. Sie wurden daher als ITS-Sequenzen von Mitgliedern einer von den übrigen Ancistrocladaceae abgesetzten Verwandtschaftsgruppe angesehen, entweder dem Taxon *A. pinangianus* zugehörig oder *A. pinangianus* sehr nah verwandter Taxa.

Der ITS-Typ 6 kam nur bei den drei Proben des Gunung Benom vor, zusammen mit dem trnK-Intron-Typ 8 und dem trnK-Intron 9 mit gleicher Sequenz wie die Probe aus Borneo (ITS-Typ 5a, trnK-Intron-Typ 9a).

Die ITS-Sequenzen der Gruppe 7 wurden aus insgesamt 5 Proben von drei verschiedenen Fundorten ermittelt. Die Pflanzen, von denen diese Proben stammten, waren ausnahmslos durch auffallend schmale Blätter gekennzeichnet. Sie waren damit die einzigen Ancistrocladaceae aus Südostasien, die sich von anderen Aufsammlungen derart unterschieden, dass sie sich im Feld sofort ansprechen ließen. Sie wurden von H. Rischer durch Vergleich mit

Typusmaterial als *A. griffithii* bestimmt und wurden in Südthailand gesammelt, geographisch nahe der Typuslokalität von *A. griffithii* in Südburma. Die drei als Gruppe 7 zusammengefassten ITS-Sequenzen unterschieden sich voneinander in 1-2 Positionen und von denen der anderen Gruppen in 10 bis 22 Positionen. Zwei Sequenzen kamen bei jeweils einer Probe vor und unterschieden sich von der Sequenz 7c in nur einer Position. Sie wurden daher als lokale Abweichungen eines durch die ITS-Sequenz 7c repräsentierten Grundmusters angesehen. Alle Proben mit einer ITS-Sequenz des Typ 7 hatten eine trnK-Intron Sequenz des Typ 11. TrnK-Intron Sequenzen des Typ 11 wurden auch in zwei Proben mit ITS-Typ 5 und in einer Proben mit ITS-Typ 8 nachgewiesen, in keinem Fall aber den gemeinsam mit ITS-Typ 7 auftretenden sequenzgleich.

Die ITS-Sequenzen der Gruppen 8 waren von denen der Gruppe 9 durch eine paarweise Distanz von 4 bis 10 Positionen getrennt. Die paarweise Distanz der Sequenzen innerhalb beider Gruppen betrug 1 bis 4 Positionen, die Sequenzen hatten aber zu denen ihrer Gruppe in jedem Fall eine niedrigere Distanz als zu den Sequenzen der anderen Gruppe. Die ITS-Sequenzen der Gruppe 8 wurden in der UPGMA und in der Maximum-Parsimony-Analyse als Polytomien zur Gruppe 9 gestellt, bildeten also keine Monophylie. Die ITS-Sequenz des Isotypus von *A. attenuatus* hatte die größte Ähnlichkeit zu den ITS-Sequenzen der Gruppe 8. Der Vergleich mit den trnK-Intron-Daten und mit der Herkunft der Proben unterstützt die Annahme die ITS-Sequenzen der Gruppe 8 als Einheit zu betrachten. So wiesen alle Proben mit ITS Sequenzen des Typ 8, bis auf eine Ausnahme, immer eine trnK-Intron Sequenz des Typ 8 auf. Die Probe 34 aus dem nördlichen Khao Chang NP hatte eine ITS-Sequenz des Typ 8 und eine trnK-Intron Sequenz des Typ 11.

Innerhalb der ITS-Gruppe 9 unterschieden sich alle Sequenzen, außer der Sequenz 9e, nur durch eine Position von der Sequenz 9d. Die Sequenz 9e wurde als eines von zwei Paralogs der Probe 1124 ermittelt und wich in 2 bis 4 Positionen von den übrigen Sequenzen der Gruppe 9 ab, war aber der ebenfalls für die Probe 1124 nachgewiesenen Sequenz 9c am ähnlichsten. Sie kann daher als Abkömmling der Sequenz 9c interpretiert werden. Die ITS-Sequenzen der Gruppe 9 wurden als Abweichungen eines durch die Sequenz 5d repräsentierten Grundmusters interpretiert und als ITS-Sequenztyp 5 bezeichnet. Proben mit ITS-Sequenzen des Typ 9 waren immer mit einer trnK-Intron-Sequenz des Typ 10 gekoppelt.

Die Verknüpfung von ITS-Typen mit bestimmten trnK-Intron-Typen im Süden deutet auf das sympatrische Vorkommen mehrerer Arten hin. So hatten beispielsweise von 12 untersuchten Proben des Khao Sok NP 9 Proben den ITS-Typ 9 und trnK-Intron-Typ 10, 2 Proben ITS-Typ 5 und trnK-Intron-Typ 6 und eine den ITS-Typ 7, der immer mit trnK-Intron-Typ 11 gekoppelt war. Das trnK-Intron wurde bei letzterer Probe nicht sequenziert, das ISSR-Bandenmuster entsprach aber denjenigen Proben mit ITS-Typ 7 und trnK-Intron-Typ 11. Im

Khao Prang NP hatten 4 Proben ITS-Typ 9 und trnK-Intron-Typ 10 und 3 Proben ITS-Typ 7 und trnK-Intron-Typ 11 (vgl. Abb. 71).

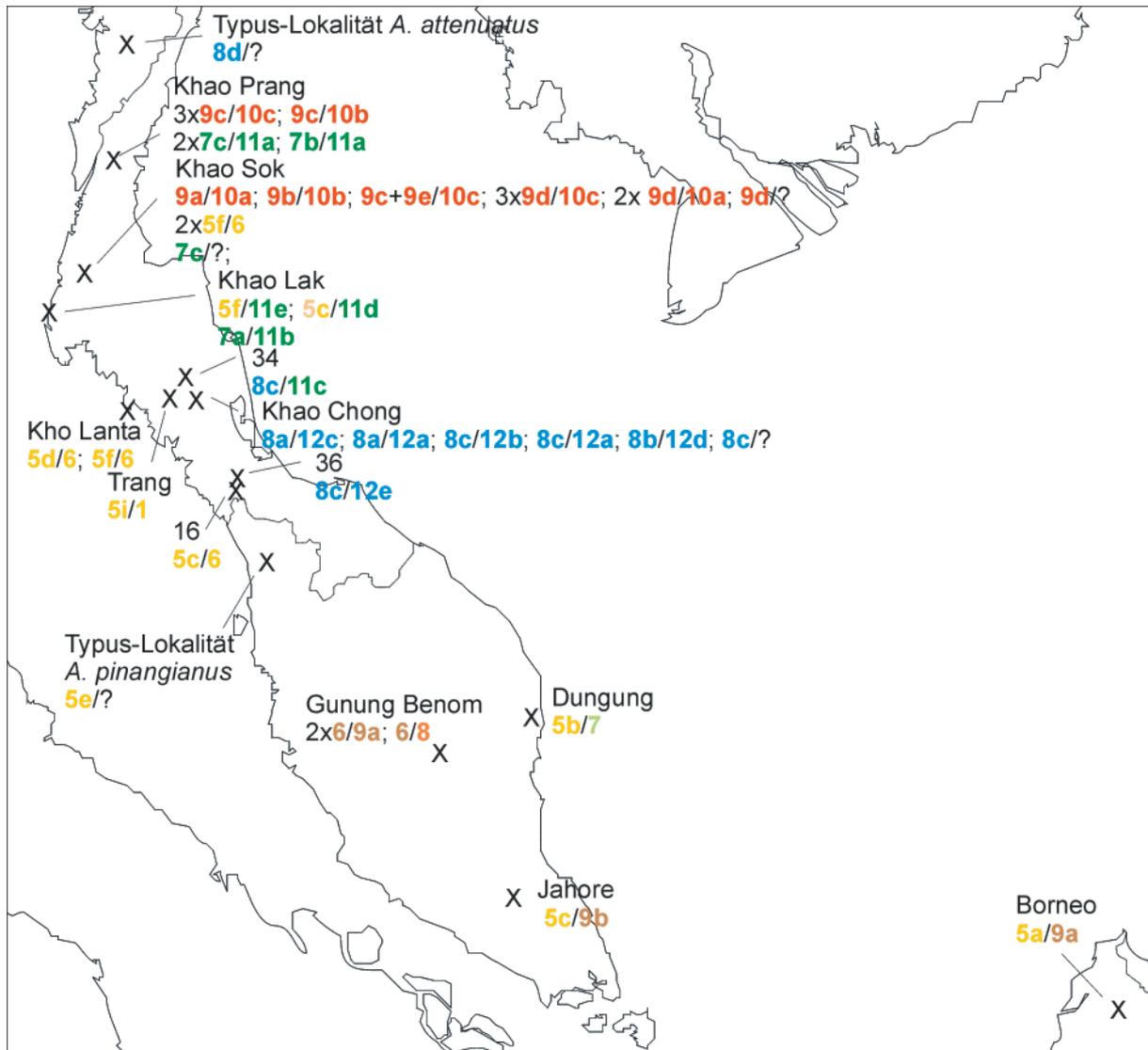


Abb. 71. Karte des Südens des Untersuchungsgebietes (Südthailand, Malaysia, Borneo) mit den Fundorten für *Ancistrocladus*. Für die Proben der Fundorte ist die Kombination der ITS- und trnK-Intron-Sequenzen angegeben (ITS/trnK). Die Benennung der Sequenzen entspricht ihrer Einteilung aufgrund der paarweisen Distanzen. Sequenzen des gleichen Typs sind in gleicher Farbe gezeigt, den trnK-Intron-Sequenzen wurde die Farbe des ITS-Typs, mit dem sie am häufigsten zusammen auftraten, zugeordnet.

Die ISSR-Fingerprints spiegeln im Wesentlichen eine Aufteilung wider, wie sie aufgrund der ITS-Sequenzen nahe gelegt wird. Bei den Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes hatten die ISSR-Fingerprints von Proben einer Aufsammlung untereinander die geringste Distanz, auch wenn die ITS-Sequenzen nicht dem gleichen Sequenztyp entsprachen. Bei den Proben aus dem Süden korrespondierten die Distanzen der ISSR-Fingerprints in hohem Maße

mit den Distanzen der ITS-Sequenzen. Deutlich von anderen getrennte Cluster wurden zum einen von den Proben mit ITS-Typ 7 und zum anderen von den Proben mit ITS-Typ 8 gebildet. Cluster mit geringem Abstand zueinander wurden für Proben mit ITS-Typ 5, 6 und 9 angezeigt (vgl. Abb. 72). Die Proben mit ITS-Typ 5 sind nicht deutlich von denen mit Typ 6 und 9 getrennt. Die ISSR-Bandenmuster der Proben des Khao Sok NP mit ITS-Typ 5 unterscheiden sich aber von denen der Proben des Khao Sok NP mit ITS-Typ 9 (Abb. 72 unten). Ein Cluster mit Proben mit ITS-Typ 5 ist damit angezeigt. Auch die Proben des Gunung Benom unterscheiden sich nur wenig in ihren ISSR-Fingerprints von den Proben mit ITS-Typ 5. Hier wurden 9 aus Samen angezogene Pflanzen des Fundortes der Probe P6, die einen mit der Probe aus Borneo übereinstimmenden trnK-Intron-Typ (4a) aufwies, in die Untersuchung aufgenommen. Von den Proben aus Malaysia, die für chemische Untersuchungen gesammelt wurden, konnten außer den Proben des Gunung Benom, keine ISSR-Fingerprints angefertigt werden. Die Trennung dieser Individuen von Vertretern der näheren Umgebung konnte deshalb nicht mit ISSR-Fingerprints überprüft werden. Die ISSR-Bandenmuster der Proben des Gunung Benom waren aber denen aus Trat in Ostthailand ähnlicher als denen mit ITS-Typ 5. Wird von einer Zugehörigkeit der Proben des Gunung Benom und der Proben mit ITS-Typ 5 zu einer Art ausgegangen, müsste in diese Art auch die Probe aus Trat einbezogen werden. Dies erscheint aufgrund der geographischen Entfernung und der unterschiedlichen ITS-Sequenzen als unwahrscheinlich. Es lassen sich aufgrund unterschiedlicher ITS, trnK und den vorliegenden ISSR-Distanzen 5 mögliche Arten oder Artgruppen charakterisieren, deren teilweise sympatrisches Vorkommen auf einen höheren Grad an genetischer Trennung der *Ancistrocladus* aus dem Süden als der *Ancistrocladus* aus dem Norden schließen lässt.

3.8.2.4 Taxonomische Einteilung der Proben aus dem Süden des Untersuchungsgebietes

Der ITS-Sequenz des Isotypus von *A. pinangianus* ist den ITS-Sequenzen des Typ 5 ähnlich. Proben mit diesem Sequenztyp wurden in 8 (von 13) Fundorten im Khao Sok NP, im Zentrum der malaiischen Halbinsel bis nach Südmalaysia und in Kalimantan gesammelt. Das trnK-Intron dieser Proben war hochvariabel. Dies weist auf eine hybridogene Entstehung von *A. pinangianus* aus mehreren, bis zu 4 Ursprungsarten oder auf Introgressionsereignisse hin. *A. pinangianus* kann zwar ein Aggregat mehrerer Arten darstellen, was aber wegen der unzureichenden Anzahl von Proben aus Malaysia nicht überprüft werden konnte. Von Proben mit einem *A. pinangianus* entsprechendem ITS-Typ aus Malaysia konnten keine ISSR-Fingerprints angefertigt werden, außerdem lag von den einzelnen Aufsammlungen jeweils nur ein Beleg vor. Die Proben mit ITS-Typ 1 wurden daher zu *A. pinangianus* zusammengefasst, ohne dass Aufsammlungen aus Malaysia und Borneo genauer überprüft wurden.

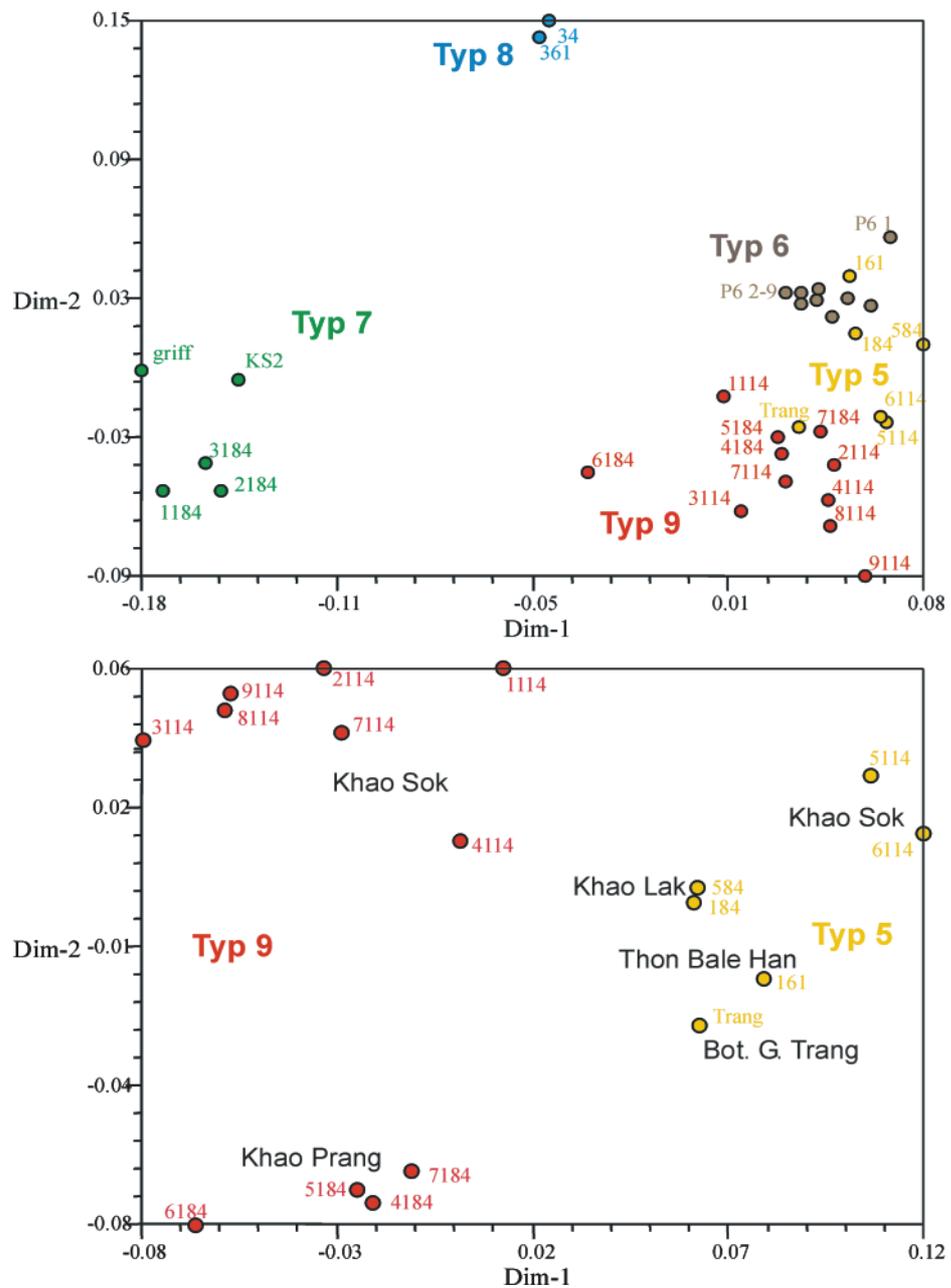


Abb. 72. Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) der Nei-Li-Distanzen der ISSR-Fingerprints der Proben des Südens des Untersuchungsgebietes, aller Proben (oben) und der Proben mit ITS-Typ 9 und ITS-Typ 5 (unten). Die Datenpunkte wurden farblich nach dem ITS-Typ der zugehörigen Proben hervorgehoben.

In Zentralmalaysia (Gunung Benom) wurden von H. Rischer 3 Proben gesammelt, die in ihrer ITS-Sequenz nicht mit *A. pinangianus* übereinstimmten. ITS-Sequenz und ISSR-Bandenmuster waren denen der Probe P3 aus Ostthailand ähnlicher als allen aus Südthailand gesammelten Proben. Das trnK-Intron der Proben des Gunung Benom war unterschiedlich. P5 hatte eine trnK-Intron-Sequenz (Typ 8), die sich von allen anderen trnK-Intron-Sequenzen

unterschied, während die anderen beiden Proben die trnK-Intron-Sequenz 9a aufwiesen, sequenzgleich mit *A. pinangianus* aus Borneo und ähnlich (2 Basen Unterschied) zu *A. pinangianus* aus der Umgebung von Jahore, Süd Malaysia. Demnach muss auch hier von Introgressionsereignissen ausgegangen werden. Die Belege wurden als *A. spec.* Benom zusammengefaßt.

Der ITS-Sequenz des Isotypus von *A. attenuatus* war der des Typ 8 am ähnlichsten. So unterschied sich ITS1 von *A. attenuatus* in keiner Position von den ITS-Sequenzen des Typ 8. Die große Anzahl von Autapomorphien im ITS2 von *A. attenuatus* wurde eventuell durch die Re-PCR-Strategie verursacht. ITS1 des Isotypus-Materials von *A. stelligerus* enthielt ebenfalls in keiner Position Unterschiede zu den ITS-Sequenzen des Typ 8, ITS2 konnte hier nicht amplifiziert werden. Die Proben mit dem ITS-Typ 8 wurden der Art *A. attenuatus* zugeordnet. *A. attenuatus* wurde zwar später als *A. stelligerus* beschrieben, für *A. attenuatus* lag aber ITS1 und ITS2 vor und auch in ITS2 bestanden Synapomorphien mit den Sequenzen des Typ 8. Die Art ist durch das Vorkommen des ITS-Typ 8, des trnK-Intron-Typ 12 und der von den anderen Proben aus dem Süden des Untersuchungsgebietes abweichenden ISSR-Bandenmuster der Proben 34 und 36 charakterisiert. Die ISSR-Analyse dieser Proben ergab eine geringere Distanz zu den Proben aus dem Norden des Untersuchungsgebietes als zu denen des Südens. Gefunden wurden Proben von *A. attenuatus* an zwei Lokalitäten des Khao Chong NP Süd Thailand in der Nähe von Trang und im Thale Ban NP an der Grenze zu Malaysia, ca. 120 km südlich von Trang entfernt. In einer Probe wurde eine trnK-Intron-Sequenz des Typ 11 nachgewiesen, so dass von Introgressionsereignissen plastidärer Sequenzen in einzelnen Individuen ausgegangen werden muss.

Im Khao Sok NP und Khao Prang NP in der Provinz Surathani, Südthailand, wurden insgesamt 13 Proben gesammelt, die sich durch den ITS-Typ 9 und trnK-Intron-Typ 10 von allen anderen Proben unterschieden. Diese Proben bildeten auch in der ISSR-Fingerprint-Analyse ein eigenes Cluster und kamen an beiden Fundorten zusammen mit Proben von *A. griffithii* (siehe unten) und im Khao Sok NP zusammen mit *A. pinangianus* vor. Wegen des sympatrischen Auftretens, der durch die drei Marker unterschiedlich eingeordneten Proben erschienen diese Aufsammlungen als eigene Art abtrennbar und wurden als *A. spec.* Khao Sok zusammengefasst.

A. griffithii wurde an drei Fundorten gesammelt. Sie ist gegenüber anderen Taxa durch sehr schmale Blätter gekennzeichnet, die am Ende in eine deutliche Spitze auslaufen. Aufsammlungen von *A. griffithii* waren durch ihre ISSR-Bandenmuster, ITS-Typ 7 und trnK-Intron-Typ 10 charakterisiert.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Rekonstruktion molekularer Phylogenien, die verschiedene Familien aus dem Verwandtschaftskreis der carnivoren Taxa innerhalb der Caryophyllidae s. l. einbeziehen. Dadurch sollten Grundlagen für die infrafamiliäre Gliederung, Hypothesen zur Evolution dieser Familien und ihrer phylogenetischen Beziehungen erarbeitet werden. Die Phylogenie ausgewählter Taxa der Caryophyllidae s. l. wurde mit Hilfe partieller Sequenzen des im trnK-Intron lokalisierten matK-Gens erarbeitet. Molekulare Phylogenien der Nepenthaceae, Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae wurden mit Hilfe vergleichender Sequenzanalysen des plastidären trnK-Introns und der ITS-Region erstellt. Die ITS-Region erwies sich für die Nepenthaceae und Dioncophyllaceae als Marker ungeeignet. Hier konnten spezifische Sequenzen nicht von Pseudogen-Sequenzen für ITS getrennt werden. Bei den Nepenthaceae konnte ein mitochondriales Pseudogen des trnK-Intron nachgewiesen werden, welches anstelle der ITS-Region als ein ergänzender phylogenetischer Marker für die Nepenthaceae eingesetzt wurde. Bei den Ancistrocladaceae zeigten die Daten des trnK-Introns und der ITS-Region, dass zumindest in Asien die Entstehung rezenter Taxa auf retikulate Evolution zurückgeführt werden kann. Es wurden daher Inter-Simple-Sequence-Repeat (ISSR)-Fingerprintanalysen durchgeführt, die für einen Vergleich mit den Sequenzdaten eingesetzt wurden.

Mit dieser Vorgehensweise konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Evolution der Nepenthaceae, Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae nachgezeichnet werden. Die infrafamiliäre Gliederung der Nepenthaceae, wie sie von Danser (1928) aufgestellt wurde, wurde nach Vergleich mit den molekularen Daten modifiziert und die von verschiedenen Autoren erwähnten Verwandtschaftsverhältnisse einzelner *Nepenthes*-Taxa bewertet. Für die Ancistrocladaceae wurde mit Hilfe molekularer Daten ein taxonomisches Konzept für die bisher im *A. tectorius*-Aggregat zusammengefassten Taxa erstellt. Die Beziehungen der carnivoren Taxa innerhalb der Caryophyllidae konnten besser als in bisher veröffentlichten Arbeiten aufgelöst werden, außerdem konnte gezeigt werden, dass die Carnivorie mit hoher Wahrscheinlichkeit monophyletisch entstanden ist.

4.1 Eignung der verwendeten Marker

4.1.1 Das trnK-Intron

Die phylogenetische Analyse von DNA-Sequenzen beruht auf der Detektion von Punkt- und Längenmutationen, die als Unterschiede zwischen zwei Sequenzen festgestellt werden. Die

Anzahl der Unterschiede zwischen den Sequenzen zweier Taxa ist abhängig von der Mutationsrate der Sequenz und von der Zeit, die seit der Isolierung beider Taxa vergangen ist. Moleküle mit hoher Mutationsrate zeigen bei lange Zeit getrennten Taxa wegen der häufiger auftretenden Rückmutationen einen im Vergleich zu Molekülen niedriger Mutationsrate höheren Anteil an Homoplasien, der bei der Rekonstruktion der Phylogenie zu falschen Phylogenie-Annahmen oder zur schlechteren Auflösung eines Stammbaumes führen kann. Für die Erstellung von Phylogenien von Taxa höherer Kategorie werden daher Moleküle als phylogenetischer Marker eingesetzt, die aufgrund ihres kodierenden Charakters in der Evolution konserviert sind. Allerdings können auch bei Verwendung konservierter DNA-Abschnitte als phylogenetischer Marker Homoplasien zu falschen Phylogenie-Annahmen führen. Dies ist begünstigt durch die relativ niedrige Anzahl an potentiell informativen Positionen in Datensätzen, die mit solchen Markern gewonnen wurden. Ein Taxon kann in der kürzesten Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse aufgrund von Analogien mit entfernt stehenden Taxa zusammengefasst werden, wenn die Anzahl der Analogien die der Synapomorphien übersteigt (*long branch attraction*; Wägele, 2000). Solche Effekte lassen sich durch die Erhöhung der Anzahl einbezogener Taxa und Positionen auflösen (Graybeal, 1998). Der Bestand an veröffentlichten Sequenzdaten konservierter Marker (z.B. *atpB* und *rbcL*) ist mittlerweile derart angewachsen, dass Phylogenien zur Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse der Angiospermen aufgestellt wurden, die mehrere 100 Taxa umfassen (Savolainen *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden Sequenzen des *trnK*-Introns als Marker für Phylogenien auf Familienniveau und für eine Phylogenie ausgewählter Familien der Unterklasse der Caryophyllidae eingesetzt.

Das *trnK*-Intron besteht aus zwei nicht kodierenden Bereichen, von zusammen ca. 1000 bp Länge, welche einen codierenden Abschnitt, das *matK*-Gen, von ca. 1500 bp Länge flankieren. Die Verwendung des *matK*-Gens als phylogenetischen Marker wurde von Johnson und Soltis (1994) eingeführt. Sequenzen des *matK*-Gens und der flankierenden nicht kodierenden Bereiche wurden für Phylogenien auf Familienniveau verwendet (z. B. Kron, 1997; Kores *et al.*, 2001). Das *trnK*-Intron stellt damit eine Alternative zu der *trnT*-*trnF* Region dar, ein Abschnitt des Plastoms, der am häufigsten als plastidärer phylogenetischer Marker für nah verwandte Taxa eingesetzt wird. In diesem Abschnitt wechseln variable nicht kodierende Bereiche mit kurzen hochkonservierten Abschnitten, die als Bindungsstellen für universelle Primer dienen können, ab (Taberlet *et al.*, 1991). Die Variabilität des *trnK*-Introns der Nepenthaceae ist der Variabilität der *trnT*-*trnF*-Region ähnlich. In Abb. 73 ist ein Vergleich der Anzahl der variablen Positionen der in der vorliegenden Arbeit erstellten Daten für das *trnK*-Intron mit von Schad (1995) erstellten Daten des intergenischen Spacers zwischen *trnL* und *trnF* der *trnT*-*trnF*-Region gezeigt. Die Anzahl an Längenmutationen ist in den nicht kodierenden Abschnitten des *trnK*-Introns mit der des intergenischen Spacers zwischen *trnL* und *trnF* vergleichbar, im für *matK* kodierenden Abschnitt aber sehr viel niedriger.

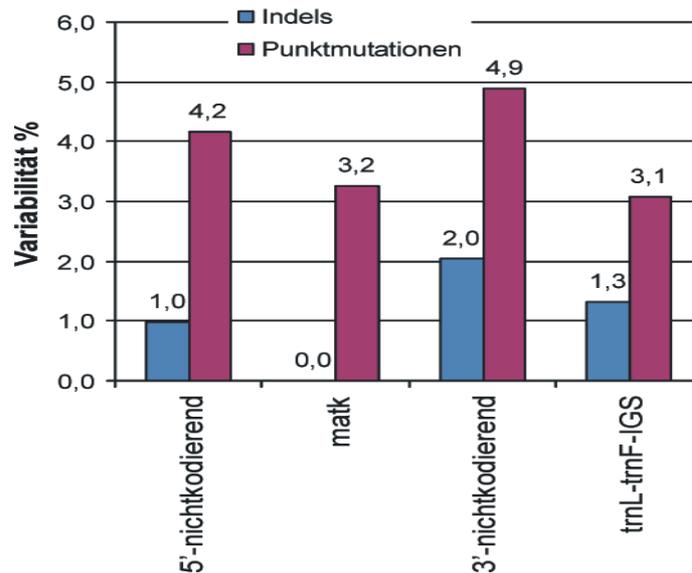


Abb. 73. Vergleich der Variabilität (Anzahl variabler Positionen / Länge der Alinierung) der einzelnen Abschnitte des trnK-Introns mit dem intergenischen Spacer der trnL-trnF-Region für zwölf Arten der Nepenthaceae. Zur Berechnung der Variabilität der Indels wurde die Anzahl der Indels unabhängig ihrer Länge auf die Länge der Alinierung bezogen.

MatK kann im Gegensatz zur trnT-trnF-Region auch zwischen entfernt verwandten Taxa leicht aliniert und so als Marker mit hoher Variabilität für Analysen über dem Familienniveau eingesetzt werden. Auffallend ist, dass die Anzahl an Punktmutationen im matK-Gen ähnlich hoch ist wie in den nicht kodierenden Abschnitten des trnK-Introns und des intergenischen Spacers zwischen dem trnL- und trnF-Gen. Die Mutationsrate des matK scheint daher der der nicht kodierenden DNA im Plastom vergleichbar zu sein. Das matK-Gen kodiert für eine Maturase, die einen essentiellen Splice-Faktor für die Prozessierung des trnK-Introns darstellt und die von allen im Chloroplasten kodierten Proteinen die höchste Sequenzvariabilität zwischen verschiedenen Pflanzenarten aufweist (Vogel *et al.*, 1997). Die Aminosäurezusammensetzung dieser Maturase scheint für ihre Funktion eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Mutationsrate der Basen auf Codonposition 1 und 2 des Leserasters von matK ist im Vergleich zu den für die Aminosäurezusammensetzung neutralen Mutationen auf Position 3 höher als bei rbcL und atpB (vgl. Abb. 75). Während bei letzteren 70 % bzw. 78 % der paarweisen Unterschiede zwischen *Ancistrocladus korupensis* und *Nepenthes alata* auf die dritte Codonposition entfallen, sind dies bei matK nur 47%. Dieser Befund entspricht den

Ergebnissen von Manos und Steele (1997), die für Taxa verschiedener Familien einen Anteil der 3. Codonposition von 42 % der variablen Positionen für *matK* und 77 % für *rbcL* angeben. Die Anzahl an Änderungen in der Aminosäuresequenz des Proteins von *matK* ist höher als bei *rbcL* (vgl. Abb. 75). Dennoch handelt es sich bei *matK* um einen für ein Protein kodierenden Abschnitt. Im Plastom des Vollparasiten *Epifagus* ist das Leseraster des *matK*-Gens erhalten, während dort alle Gene, die für an der Photosynthese beteiligten Proteine kodieren, nur als Pseudogene vorliegen (Wolfe *et al.*, 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem im *trnK*-Intron lokalisierten *matK* ein variabler Abschnitt des Plastoms als Marker für Taxa verschiedener Familien einer Unterklasse der Angiospermen eingesetzt. Damit konnte eine große Anzahl informativer Positionen analysiert und eine hohe Bootstrap-Unterstützung von Monophylien von Taxa nachgewiesen werden, die mit bisher vorliegenden Studien nur unzureichend gesichert waren. Der Anteil potentiell informativer Positionen ist im *matK*-Gen höher als im *rbcL*-Gen (vgl. Abb. 27 und Abb. 74). In den Datensätzen der Caryophyllidae aus Taxa, von denen Daten für beide Gene vorliegen, sind im *matK* 25 % und im *rbcL* 12 % der Positionen potentiell informativ. Nimmt man die Hamamelididae zum Vergleich, so betragen diese Werte 24 % bzw. 9 % (Manos und Steele, 1997). Es lassen sich bei Verwendung des *matK*-Gens also in diesen beiden Unterklassen mehr als doppelt so viele potentiell informative Positionen pro Sequenzposition ermitteln als bei Verwendung des *rbcL*-Gens. Die Eignung von *matK* als Marker für Phylogenien oberhalb des Familienniveaus wurde von Hilu und Liang (1997) vorgeschlagen, aber bisher nur selten dafür eingesetzt.

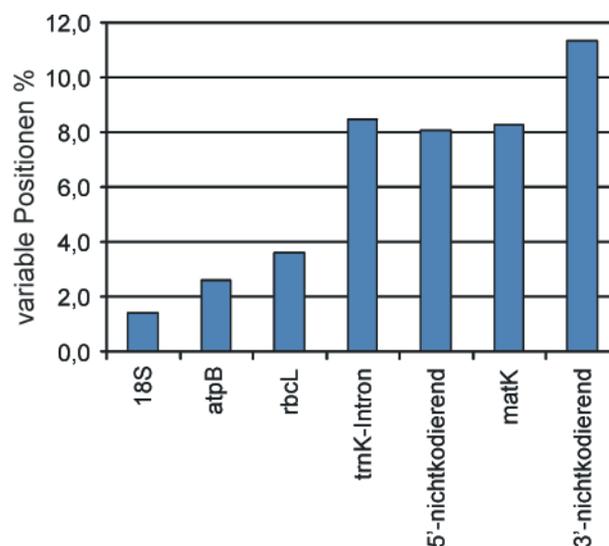


Abb. 74. Anteil variabler Positionen in Alinierungen verschiedener Marker, die für phylogenetische Rekonstruktionen eingesetzt wurden. Aliniert wurden jeweils Sequenzen von *Nepenthes alata* und *Ancistrocladus korupensis*.

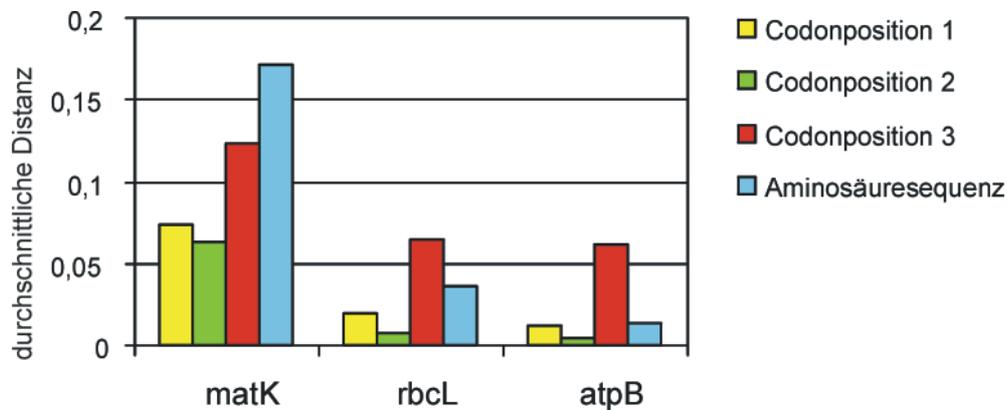


Abb. 75. Variabilität als durchschnittliche Distanz der einzelnen Codonpositionen des Leserasters, und der von matK, rbcL und atpB von *N. alata* und *A. korupensis* (berechnet nach Ausschluß der nicht der jeweiligen Codonposition zuzurechnenden Positionen). Zusätzlich ist die Distanz der jeweiligen Aminosäuresequenz gezeigt.

4.1.2 Das Auftreten mehrerer Paraloger und Pseudogene des ITS

Die Internal Transcribed Spacer (ITS1 und ITS2) der Wiederholungseinheit der ribosomalen DNA (rDNA) wird sehr häufig verwendet, um eine infragenerische Gliederung von Pflanzengruppen mittels molekularer Marker durchzuführen (z.B. Baldwin 1992; Baldwin *et al.* 1995; Downie und Katz-Downie, 1996; Manos, 1997; Panero *et al.*, 1999; Aceto *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2000; Francisco-Ortega *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002). Die Variabilität dieses Markers ist in manchen Pflanzengruppen so hoch, dass er auch für Analysen verschiedener Populationen einer Art eingesetzt werden kann (z.B. Hess *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001). Die ITS-Region liegt als Teil der rDNA-Wiederholungseinheit in vielen Kopien im Genom vor. Die Kopien werden durch *concerted evolution* aneinander angeglichen (Baldwin *et al.* 1995). Dies führt nach Hybridisierungen zu einer Homogenisation aller ITS-Kopien (Fuertes-Aguilar *et al.*, 1999b), die innerhalb eines Locus schneller als zwischen verschiedenen Loci abläuft. So können bei allopolyploiden Hybriden und bei einer Lokalisation von ITS-Loci auf nicht homologen Chromosomen zwei verschiedene paraloge Sequenzen für ITS innerhalb einer Art persistieren (Campbell *et al.*, 1997). Hybridisierungsereignisse können, bei noch nicht abgeschlossener Homogenisierung, direkt anhand der ITS-Sequenz nachgewiesen werden (Hughes *et al.*, 2002; vgl. Kapitel 4.3.3). Die Existenz mehrerer ITS-Typen innerhalb eines Individuums scheint eher die Regel zu sein als die Ausnahme. Während in frühen Arbeiten über die ITS-Region nur selten verschiedene Kopien detektiert wurden, häufen sich mittlerweile

Untersuchungen über die ITS-Diversität innerhalb eines Genoms (Hughes *et al.*, 2002). Allerdings kann die *concerted evolution* auch in vor kurzer Zeit entstandenen Allopolyploiden wirksam sein. So wurden bei vielen Allopolyploiden keine verschiedenen Paraloge detektiert (z. B. Yang *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit kam es bei allen untersuchten Gruppen zur Koamplifikation von paralogen ITS-Sequenzen und Pseudogenen der ITS-Region, bei den Nepenthaceae auch zur Koamplifikation von Sequenzen epi- oder endophytischer Organismen. Über die Koamplifikation von Pilz-DNA berichtet Zhang *et al.* (1997). In den Amplifikationen kann zufällig Fremd-DNA bevorzugt vermehrt werden, so dass im Extremfall stark voneinander abweichende Sequenzen in eine Phylogenie eingebaut werden. Dies ist im Fall einer Untersuchung der Gattung *Picea* belegt. Dort wurden in eine ITS-Phylogenie Pilz-Sequenzen eingebaut (Smith und Klein, 1994; 1996). Dies wurde später von anderen Autoren gezeigt (Liston und Alvarez-Buylla, 1995; Liston *et al.*, 1996). Die DNA der wahrscheinlich epiphytisch auf den Blättern mancher Arten wachsenden Pilze wurde bevorzugt amplifiziert, entweder aufgrund der Primer-Sequenzen oder weil die spezifische Zielsequenz unter den gewählten Bedingungen die Amplifikation mehr behindernde Sekundärstrukturen ausbildete als die unspezifische Zielsequenz. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit für Angiospermen spezifische Primer für die ITS-Region abgeleitet. Mit diesen Primern wurden bei *Nepenthes* in allen untersuchten Arten Pseudogene amplifiziert die eine Auswertung von Sequenzen aus dem PCR-Produkt verhinderten.

Die Identifikation der Sequenzen als Pseudogen erfolgte aufgrund der Variabilität der 5,8S rDNA in einer gemeinsamen Alinierung von Sequenzen von Taxa verschiedener Großgruppen des Pflanzenreichs und durch Vergleich der Sekundärstruktur von ITS2 nach Hershkowitz und Zimmer (1996). Der Vergleich der Variabilitäten sollte nach Hughes *et al.* (2002) zum Nachweis des Pseudogenstatus von Sequenzen ausreichen. Allerdings ergibt ein solcher Ansatz keinen Beleg für den Verlust der Funktion des Sequenzabschnitts. Bei für Proteine kodierende Sequenzabschnitten können Pseudogene aufgrund einer Unterbrechung des Leserasters identifiziert werden. Bei rDNA-Sequenzen muß dabei auf die für die Funktion notwendigen Abschnitte zurückgegriffen werden. So konnten einige Sequenzen der Nepenthaceae identifiziert werden, die aufgrund von Deletionen essentieller Bereiche die zur Prozessierung der rDNA nötige Sekundärstruktur (Côté und Peculis, 2001) nicht aufbauen können. Ein Pseudogenstatus dieser Sequenzen ist daher unzweifelhaft. Auch der Vergleich mit der Sekundärstruktur nach Hershkowitz und Zimmer (1996) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Instrument zur Identifizierung von Pseudogenen der rDNA eingesetzt werden. Allerdings war das Konservierungsmuster hier undeutlicher als bei der für die Ausbildung des *proximal stem* der 29SB pre-rRNA nötigen Bereiche der 5,8S rDNA und 26S rDNA (Côté und Peculis, 2001).

Pseudogene der rDNA können aufgrund ihrer weniger stabilen Sekundärstrukturen in einer Amplifikation bevorzugt werden (Buckler *et al.*, 1997). In diesem Fall können vollständige Phylogenien auf Pseudogenen beruhen, die nicht monophyletischen Ursprungs sind, und daraus abgeleiteten Phylogenie-Hypothesen fehlerhaft sein. So wurde von Samuel *et al.* (1998) eine Phylogenie der Gattung *Quercus* präsentiert, die auf nicht erkannten Pseudogenen für ITS beruhte. Dies wurde später von Mayol und Rosselló (2001) gezeigt. Unabhängig davon ob Paraloge von ITS-Sequenzen funktional sind oder nicht kann es zu Rekombinationen zwischen Paralogen kommen (z.B. Wendel *et al.*, 1995; Mummenhoff *et al.* 1997). In phylogenetischen Analysen interkalieren solche rekombinanten ITS-Sequenzen zwischen den Clades ihrer Ausgangssequenzen (Coleman, 2002; Muir *et al.*, 2001). Im Falle der Nepenthaceae können die ITS-Pseudogene verschiedener Arten untereinander ähnlicher sein als die Pseudogene innerhalb einer Art. Daraus läßt sich folgern, dass die ITS-Pseudogene verschiedene Entwicklungslinien repräsentieren. Die rezenten Arten könnten sich von einem Taxon ableiten, welches bereits mehrere unterschiedliche ITS-Sequenzen aufwies. Auf der anderen Seite könnten aus zwei ursprünglichen ITS-Pseudogenen auch mehrere rekombinante Moleküle entstanden sein, auch parallel in verschiedenen Arten. Bei der Gattung *Quercus* konnte anhand von ITS-Sequenzen die Entwicklung zweier Arten aus einem Hybrid gezeigt werden. Beide Arten wiesen jeweils drei ITS-Sequenztypen auf. Zwei stammten von den Elternarten des Hybriden, eine stellte eine Kombination aus diesen Sequenzen dar. Von den drei ITS-Sequenzen waren mindestens zwei älter als das Speziationsereignis (Muir *et al.*, 2001). In interspezifischen Hybriden ist die Nucleolus-Organizer-Region (NOR) einer Ausgangsart über die NOR der anderen Ausgangsart funktionell dominant (Volkov *et al.*, 1999). Diese *nukleolar dominance* wird als Mechanismus angesehen rDNA-Gene stillzulegen, damit in einer Zelle nur ein rDNA-Typ transkribiert wird (Chen *et al.*, 1998). Dieses *gene silencing* genannte Phänomen betrifft nur die rDNA des NOR, dem NOR direkt benachbarte für Proteine kodierende Gene werden an den Loci beider Ausgangsarten transkribiert (Lewis und Pikaard, 2001). Das *gene silencing* ist reversibel, so dass für den ITS-Bereich keine Erhöhung der Mutationsrate wegen fehlender Selektion angenommen werden kann (Chen und Pikaard, 1997). Allerdings scheint das Auftreten von rDNA-Pseudogenen und Polymorphismen mit den Mechanismen der Polyploidie gekoppelt zu sein (Hughes *et al.*, 2002). Es könnte also sein, dass die Bildung von Pseudogenen an den Genorten, die dem *gene silencing* unterliegen, begünstigt ist.

Die hohe Zahl der Pseudogene, die für die Gattung *Nepenthes* identifiziert werden konnten, und deren große Unterschiede lassen auf einen ITS-Polymorphismus innerhalb des Vorläufers der rezenten Nepenthaceae schließen. Dies und die hohen Chromosomenzahlen der Nepenthaceae (Heubl und Wistuba, 1995) deuten darauf hin, dass die rezenten Nepenthaceae aus einem allopolyploiden Vorfahren entstanden sind.

4.1.3 Verwendung des mitochondrialen *trnK*-Pseudogens als phylogenetischer Marker

Mitochondriale Sequenzen wurden bisher nur selten als Marker für die Phylogenie von Pflanzengruppen verwendet. Nach Palmer (1992) wird davon ausgegangen, dass das Mitochondrien-Genom eine langsame Mutationsrate der Basenabfolge aufweist. Allerdings ist die strukturelle Variabilität so hoch, dass das Mitochondrien-Genom häufig für RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) -Studien nah verwandter Taxa eingesetzt wird (z.B. Tomaru *et al.*, 1998; Szalanski *et al.*, 2001; Caha *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu plastidären Sequenzen erschwert die hohe strukturelle Variabilität die Verwendung nichtkodierender Sequenzen des Mitochondrien-Genoms für eine phylogenetische Analyse. Diese sind häufig deletiert (Bakker *et al.*, 2000) oder die flankierenden Primerbindungsstellen sind aufgrund eines Umbaus des Genoms nicht vergleichbar. Es sind daher bei Pflanzen nur wenige, universell verwendbare schnell evolvierende phylogenetische Marker des Mitochondrien-Genoms bekannt, im Gegensatz zu solchen des Plastiden-Genoms. Für phylogenetische Analysen mitochondrialer Sequenzen wurden bisher vornehmlich kodierende Abschnitte eingesetzt, so das *nadI*-Gen für infragenerische Untersuchung in der Gattung *Pelargonium* (Geraniaceae; Bakker *et al.*, 2000), *atp1* und *matR* für die Ericales (Anderberg *et al.*, 2002) und *nad5* für die Pinaceae (Wang *et al.*, 2000). Daneben wurden mitochondriale Sequenzen für großsystematische Fragestellungen eingesetzt (Nickrent *et al.*, 2000; Duff und Nickrent, 1999, Chaw *et al.*, 2000), hier vor allem die 16S rRNA.

In der vorliegenden Arbeit wurde das mitochondriale Pseudogen für *trnK* nach einer Koamplifikation bei der PCR für das plastidäre *trnK*-Intron identifiziert. Diese Koamplifikation kam regelmäßig und in ähnlicher Menge wie das spezifische Produkt vor. Nukleäre Pseudogene als Koamplifikate sollten wegen der geringeren Menge an Zielsequenz geringere Mengen an Produkt ergeben als ein plastidäres spezifisches Produkt und die Sequenzierung aus PCR-Produkt nicht beeinträchtigen. Erst bei sehr geringen Template-Mengen wird daher der Effekt der Koamplifikation störend (Parfait *et al.*, 1998). Die Dislokation von DNA-Abschnitten der Organellen in den Kern ist relativ häufig (Brosius und Gould, 1992; Moreira *et al.*, 2002). So ist ein kontinuierlicher Verlust an Genen im Mitochondrium der Angiospermen zu beobachten (Adams *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2002). Das Mitochondrium-Genom von Pflanzen enthält in den untersuchten Fällen einen großen Anteil an Fremd-DNA nukleären oder plastidären Ursprungs. Bei *Arabidopsis thaliana* werden ca. 1% des mitochondrialen Genoms als plastidären Ursprungs angesehen (Unsel *et al.*, 1997), bei *Beta vulgaris* 2,1% (Kubo *et al.*, 2000). Das mitochondriale Genom von *Beta vulgaris* enthält plastidäre Elemente von 25-3366 bp Länge, deren Einwanderung zu verschiedenen Zeitpunkten der Evolution stattfand.

Von dem Abschnitt plastidärer DNA im mitochondrialen Genom der Nepenthaceae insgesamt 2998 bp identifiziert. Der Abschnitt enthält das trnK-Intron und zumindest einen Teil des psbA-Gens, wobei die Sequenz zwischen trnK und psbA nicht ermittelt wurde. Die Sequenzen lassen sich über 3525 bp mit der Chloroplastensequenz von *Spinacia oleracea* homologisieren. Die bekannte Insertionsstelle etwas oberhalb des 5'-Exons des trnK liegt. Die andere Insertionsstelle ist nicht bekannt, so dass der Abschnitt erheblich größer sein kann. Als mitochondrial wurde die Sequenz aufgrund folgender Befunde gewertet: erstens entstand das Koamplifikat in vergleichbarer Menge wie das spezifische Produkt, zweitens konnte das Koamplifikat in der Single-Chloroplasten-PCR nicht im Chloroplasten nachgewiesen werden und drittens ließ sich die den 5'-Exon des trnK homologen Bereich flankierende Sequenz über 37 bp mit hoher Signifikanz mit der mitochondrialen Sequenz von *Beta vulgaris* homologisieren. Außerdem konnten nur in Ausnahmefällen heterozygote Signale in der Sequenzierung festgestellt werden, was bei der Sequenzierung nukleärer Pseudogene aus PCR-Produkt zu erwarten gewesen wäre. Diese Befunde ergeben eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das Template des Koamplikats im Mitochondrium lokalisiert ist. Aufgrund der Unterbrechung des matK-Leserasters bei allen untersuchten Arten wurde der Pseudogenstatus dieser Sequenz angenommen. Außerdem zeigte die mitochondriale Sequenz in der Alinierung der untersuchten Taxa einen sehr viel höheren Anteil an Längenmutationen in dem zum matK-Gen homologen Abschnitt.

Die Variabilität in der Alinierung des mitochondrialen Pseudogens und in der Alinierung des trnK-Intron ist vergleichbar hoch, so dass die Annahme von Palmer *et al.* (1992) nicht bestätigt werden kann, mitochondriale Sequenzen hätten allgemein einen niedrigeren Anteil an Punktmutationen als die Sequenzen der anderen Kompartimente. Zumindest die nichtkodierenden Sequenzen scheinen eine den plastidären Sequenzen vergleichbare Mutationsrate zu haben. Bei den Pinaceae zeigt das mitochondriale Gen nad5 nur 50 % der Variabilität von matK (Wang *et al.*, 2000), allerdings auch das Intron des nad5. Auch bei *Pelargonium* ist die Variabilität der mitochondrialen Sequenzen (203 bp des nad1 mit Intron) mit ca. 17 % niedriger als die der trnL-trnF Region mit ca. 23% (Bakker *et al.*, 2000).

Eine scheinbar hohe Variabilität in den mitochondrialen Sequenzen könnte auch an einem von den Plastiden abweichendem *lineage sorting* (vgl. Hardig *et al.*, 2000) der Mitochondrien liegen. Nach Bonnet und Glimelius (1983) können im Gegensatz zum Plastom verschiedene Haplotypen des Chondroms koexistieren. Als Gründe dieser Heteroplasmie werden entweder die kontinuierliche Divergenz zweier Linien oder biparentale Vererbung bzw. seltene Weitergabe paternaler Mitochondrien bei sonst maternalem Erbgang, sogenannte *paternal leakage*, angesehen (Städler und Delph, 2002). Heteroplasmie konnte für *Silene acaulis* gezeigt werden, wo mehrere Linien des Chondroms seit ca. 15 Mio. Jahren koexistieren (Städler und Delph, 2002). Hier wurden auch Hinweise auf Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen Haplotypen des Chondroms gefunden. Solche Rekombinationen wurden im Labor und

in natürlichen Populationen für verschiedene Organismen gezeigt (z.B. Saville *et al.*, 1998; Ladoukakis und Zouros, 2001). Bei höheren Pflanzen wird davon ausgegangen, dass Rekombinationen innerhalb des Genoms eines Mitochondriums und zwischen verschiedenen Mitochondrien für die Größenvariabilität des Chondroms und für seine hohe strukturelle Variabilität verantwortlich sind (Albert *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 2000).

Nimmt man Heteroplasmie des Chondroms auch bei den Nepenthaceae an, könnten dort innerhalb der Vorläufer-Populationen und auch in Individuen rezenter Taxa verschiedene Haplotypen des Chondroms koexistieren. Diese könnten besonders variabel sein, wenn *Nepenthes* aus allopolyploiden Vorfahren entstanden ist, worauf die Verteilung der ITS-Pseudogene hinweist (vgl. Kapitel 4.1.2). Nach Rekombinationen und *lineage sorting* könnten zwei Entwicklungslinien in so einem Fall mitochondriale Sequenzen aufweisen, die jeweils ein Gemisch der Chondrome darstellen und die untereinander nur teilweise homolog sind. In der phylogenetischen Analyse haben diese Entwicklungslinien dann gute Synapomorphien neben zu den Synapomorphien inkongruenten Apomorphien.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich einige Hinweise darauf, dass die oben beschriebenen Merkmale der Genomevolution der Mitochondrien die phylogenetische Analyse beeinflusst haben. In *N. pervillei* wurden zwei verschiedene Kopien des Abschnitts nachgewiesen und amplifiziert. Darüber hinaus waren bei einigen Proben in den mitochondrialen Sequenzen Doppelsignale an einzelnen Positionen häufiger als bei der Sequenzierung des plastidären trnK-Introns. Das Auftreten von Doppelsignalen kommt bei ITS häufig vor, vor allem bei Anwesenheit verschiedener paraloger Sequenzen (Campbell *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass Heteroplasmie bei Mitochondrien der Nepenthaceae vorkommen könnte. Die phylogenetische Rekonstruktion des Datensatzes der mitochondrialen Sequenz führte zu einer sehr schlecht aufgelösten Konsensus-Topologie und zu einer sehr hohen Anzahl gleich kurzer Bäume. In diesen ist der Anteil an homoplasischen Positionen erheblich höher als in den kürzesten Bäumen des trnK-Intron-Datensatzes, so dass der CI mit 0,60 niedriger ist als der des trnK-Intron-Datensatzes mit 0,84. Im Gegensatz zu dem trnK-Intron kommen in der mitochondrialen Sequenz Homoplasien vor, für die sehr viele Änderungen angenommen werden müssen. Außerdem bilden die mitochondrialen Sequenzen im Gegensatz zu den Sequenzen des trnK-Introns keine Cluster in einer Ähnlichkeitsanalyse. Abb. 76 zeigt eine Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) der paarweisen Distanzen der mitochondrialen Sequenzen und der trnK-Intron-Sequenzen.

N. madagascariensis stellt das Taxon dar, für das Daten für das mitochondriale Pseudogen vorliegen, welches nach der trnK-Intron-Phylogenie am längsten von den übrigen Arten getrennt ist. Während die paarweisen Distanzen des trnK-Introns dieses Taxons zu den anderen Taxa zwischen 1,03% und 1,64% liegen, betragen die paarweisen Distanzen des mitochondrialen Pseudogens minimal nur 0,16% und maximal 1,66%. Wenn in verschiedenen

Taxa verschiedene Haplotypen des mitochondrialen Genoms vorliegen, könnte die Sequenzvariabilität eines Haplotyps sehr viel niedriger sein als durch den Datensatz anzunehmen ist. Auch bei *N. pervillei* ist die minimale paarweise Distanz der mitochondrialen Sequenzen zu den anderen Taxa sehr viel niedriger als die des trnK-Introns. Letztere beträgt zwischen 1,2% und 2,2%, während die mitochondrialen Sequenzen einer der beiden Kopien über dem erfassten Abschnitt nur zwischen 0,2% bis 1,6% liegt.

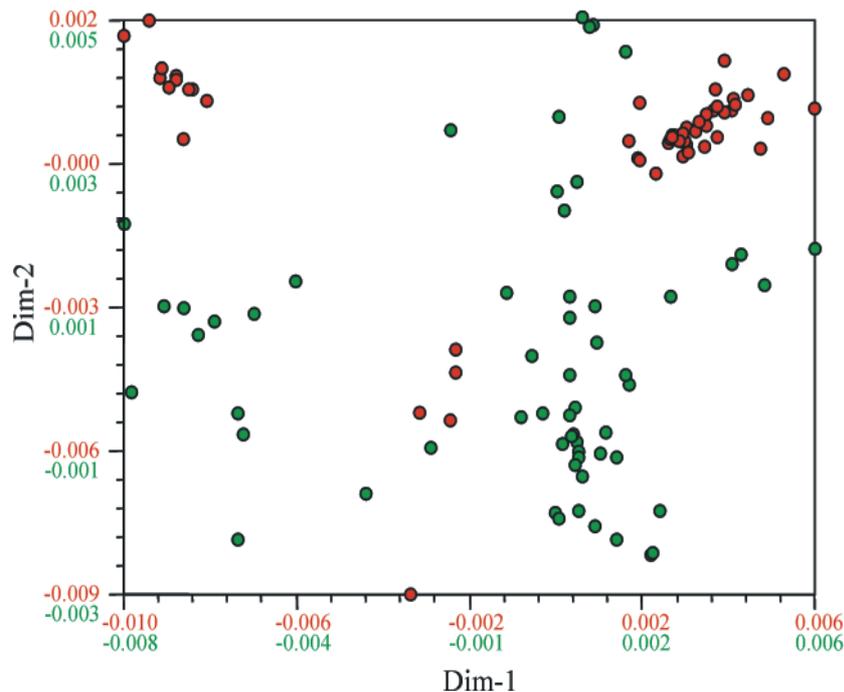


Abb. 76. PCoA von Jukes-Cantor Distanzen des trnK-Introns (rot) und der mitochondrialen Sequenzen (grün.). Während die trnK-Intron-Sequenzen verschiedene Cluster bilden, die denen der Maximum-Parsimony-Analyse entspricht, erscheinen die mitochondrialen Sequenzen mehr oder weniger gleichmäßig verteilt. Für diese Analyse wurden die im mitochondrialen Pseudogen stark von den anderen abweichende Sequenzen ausgeschlossen (vgl. Kapitel 3.5.2).

Diese Befunde deuten darauf hin, dass das phylogenetische Signal der mitochondrialen Sequenzen niedriger ist als das der trnK-Intron-Sequenzen. Im vorliegenden Fall könnte das phylogenetische Signal aufgrund von Rekombinationen verschiedener Haplotypen verwaschen sein oder die Anzahl von Analogien durch Heteroplasmie erhöht sein. Die mitochondrialen Sequenzen sind daher nur sehr eingeschränkt als phylogenetischer Marker geeignet. Allerdings werden viele der in der trnK-Intron-Phylogenie angezeigten Gruppen näherer Verwandtschaft auch durch die Analyse der mitochondrialen Sequenzen gestützt. Diese könnten gemeinsame Mitochondrienlinien aufweisen, so dass das phylogenetische Signal erhalten ist. Dementsprechend ergab die kombinierte Analyse einen besser aufgelösten Baum, der auch in fast allen Verzweigungen durch höhere Bootstrap-Werte gestützt war (vgl. Abb. 56). Für die Beurteilung der Phylogenie der Nepenthaceae wurde im Wesentlichen die Phylogenie des

trnK-Introns herangezogen. Auf Befunde, die sich aufgrund der Phylogenie des mitochondrialen Pseudogens ergeben, wird gegebenenfalls hingewiesen.

4.2 MatK-Phylogenie der Caryophyllidae

Die derzeit verfügbaren molekularen Arbeiten, in denen carnivore Taxa der Unterklasse Caryophyllidae einbezogen wurden, hatten die Zielsetzung, die phylogenetischen Beziehungen zwischen unterschiedlichen Pflanzenfamilien der Angiospermen aufzuklären. Für diesen Zweck wurden sehr große Datensätze analysiert. Die Beziehungen innerhalb der Caryophyllidae war daher in den meisten Fällen nicht signifikant. Eine Zusammenfassung der bisher veröffentlichten Topologien zeigt Abb. 1. Analysen morphologischer und molekularer Daten (rbcL) carnivorer Taxa und der Droseraceae (Sonnentaugewächse) im speziellen (Albert *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1994) ergab *Drosophyllum* (Taublatt) als basales Taxon einer monophyletischen Gruppierung der Droseraceae. *Aldrovanda* (Wasserfalle) wurde in diesen Arbeiten nicht molekular untersucht und die Position als nächster Verwandter zu *Dionaea* (Venusfliegenfalle) konnte nur morphologisch gestützt werden. Die Beziehung zwischen *Dionaea* und *Aldrovanda* lässt sich durch die matK-Phylogenie bestätigen.

Die Verrechnung morphologischer und phytochemischer Daten durch Williams *et al.* (1994) lieferte Hinweise auf eine engere Beziehung von *Drosophyllum lusitanicum* zu den Dioncophyllaceae. Diese stützte sich vor allem auf die Art des Blattwachstums bei *Drosophyllum* und *Triphyphyllum* (rückwärts eingerollt) aber auch auf die Verholzung der Sprossachsen, Phloem in den Drüsen und einzelne getrennte Griffeläste. Alle Merkmale dieser Analyse, die *Drosophyllum lusitanicum* mit den Droseraceae teilt, kommen ebenfalls in den Dioncophyllaceae, Nepenthaceae und Plumbaginaceae vor, so dass Williams *et al.* (1994) die Zugehörigkeit von *Drosophyllum lusitanicum* zu den Droseraceae bezweifelt. *Drosophyllum lusitanicum* kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht zu den Droseraceae gezählt werden. Es bildet, wiederum gestützt durch trnK-Intron- und rbcL-Daten, die Schwestergruppe zu den Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae. Die Abtrennung von *Drosophyllum* von den Droseraceae als eigene Familie wie mittlerweile von einigen Autoren vorgeschlagen (Cuénoud *et al.*, 2002) läßt sich anhand der matK-Daten bestätigen. Zu den Droseraceae gehören demnach die Gattungen *Aldrovanda*, *Dionaea* und *Drosera*. Die Nepenthaceae erscheinen in der Analyse von Williams *et al.* (1994) als Schwestergruppe zu den Plumbaginaceae und Polygonaceae und wären damit das älteste carnivore Taxon der Caryophyllidae. Die carnivoren Taxa sind in dieser Analyse durch die Positionierung der Plumbaginaceae und Polygonaceae paraphyletisch, weshalb es in diesem Punkt unwahrscheinlich ist, dass die bei Williams *et al.* (1994) vorgestellte rbcL-Phylogenie der Entwicklungsgeschichte der Caryophyllidae s. l. entspricht.

Die Dioncophyllaceae die von Williams *et al.* (1994) als nächste nicht carnivore Verwandte zu den Droseraceae bezeichnet werden, sind mit *Triphyphyllum peltatum* zumindest in den

Jugendstadien mit Klebfallen ausgestattet und daher carnivor. Die Dioncophyllaceae mit den monotypischen Gattungen *Habropetalum*, *Dioncophyllum* und *Triphyophyllum* werden durch die matK-Daten als monophyletisch bestätigt. Die vorliegende Arbeit stellt die erste Arbeit dar, in der alle drei Vertreter dieser Familie einbezogen wurden. Es kann davon ausgegangen werden, dass *Dioncophyllum* und *Habropetalum* die Carnivorie sekundär verloren haben. Das gleiche gilt für die Ancistrocladaceae die keinen carnivoren Vertreter haben. Die nahe Verwandtschaft der Ancistrocladaceae zu den Dioncophyllaceae auf der einen Seite und die basale Position der nur relikitär verbreiteten (Nordafrika, Portugal) und morphologisch klar separierten Gattung *Drosophyllum* lässt sich auch hier am besten durch den Verlust der Carnivorie deuten. Andernfalls ließe sich diese Beziehung nur durch den polyphyletischen Erwerb der Carnivorie bei *Triphyophyllum* und *Drosophyllum* erklären.

In einer Analyse des rbcL Gens durch Fay *et al.* (1997) wurde die Position der Gattung *Rhabdodendron* innerhalb der Caryophyllidae und auch einiger der in der vorliegenden Arbeit einbezogenen Taxa untersucht. Die Topologie des Kladogramms von Fay *et al.* (1997) entspricht in einigen Punkten der matK-Phylogenie, in der Konsensus-Topologie stehen die Nepenthaceae als Nachbargruppe zu den Plumbaginaceae und Polygonaceae, basal dazu als Polytomie die Droseraceae und Ancistrocladaceae / Dioncophyllaceae. Bei Lledó *et al.* (1998) wurde ebenfalls nach einer rbcL-Analyse nach Wichtung von Charakteren erstmals die Nepenthaceae mit Droseraceae und Dioncophyllaceae /Ancistrocladaceae als monophyletische Gruppe zusammengefasst, die Nepenthaceae allerdings als Schwestergruppe zu den anderen Taxa. Diese Monophylie war aber nicht durch eine Bootstrap-Analyse gestützt. In der vorliegenden Arbeit konnte die Monophylie der carnivoren Taxa der Caryophyllidae erstmals mit molekularen Daten gezeigt werden.

Das plastidäre trnK-Intron stützt also eine Monophylie der carnivoren Taxa der Caryophyllidae, zu der die Droseraceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae und Nepenthaceae gehören. Die Droseraceae stellen die Nachbargruppe der übrigen carnivoren Taxa dar. Die Nachbargruppe dieser Monophylie bilden in der matK-Phylogenie die Caryophyllales. Diese Beziehung lässt sich aber nicht durch rbcL- und 18S rDNA-Daten stützen.

4.3 Molekulare Phylogenie der Ancistrocladaceae

4.3.1 Artkonzept der Ancistrocladaceae in Südostasien

In der Flora Malesiana (van Steenis, 1948) wurden die bis dahin beschriebenen Arten als *Ancistrocladus tectorius* synonymisiert, aufgrund des Mangels an augenscheinlichen Merkmalen, die diese Arten voneinander trennen. Dies führte dazu, dass die meisten Belege in den Herbarien der Region als *A. tectorius* s. l. bestimmt sind. Nach Auskünften von Herrn T. Joganurak (Royal Forest Department, Thailand), der die Ancistrocladaceae für die Flora von

Thailand bearbeitet, entspricht die Annahme von nur einer polymorphen *Ancistrocladus*-Art in Südostasien auszugehen, nicht den Gegebenheiten. Seiner Erfahrung zufolge dürfte es aber schwierig sein, aufgrund morphologischer Merkmale eine sichere Einteilung in mehrere Taxa durchzuführen. Hinzu kommt die Schwierigkeit, dass viele der Belege keine Blüten und Früchte aufweisen. Damit stehen für eine morphologische Untersuchung meist nur vegetative Merkmale zur Verfügung, die bei den *Ancistrocladaceae* in hohem Maße variabel sind. Diese Verhältnisse erschweren eine morphologische Bearbeitung der Gruppe. Allerdings konnte durch Vergleich mit dem Isotypus-Beleg von *A. griffithii* festgestellt werden, dass dieses Taxon durchaus von anderen potentiellen Taxa abtrennbar ist (bestimmt durch H. Rischer und J. Schlauer). Pflanzen der Art *A. griffithii* hatten in jedem Fall auffallend schmale Blätter. Ihre Farbe ist heller als die der anderen Taxa und die Mittelrippe der Blätter ist deutlich erkennbar. Die für die *Ancistrocladaceae* typische Hakenbildung ist bei *A. griffithii* filigraner ausgebildet und am Ansatz deutlicher als bei den anderen Taxa von der Sprossachse abgesetzt. Durch diese Merkmalskombination ließ sich *A. griffithii* immer sicher ansprechen (Abb. 77). Trotzdem wurde auch *A. griffithii* von van Steenis (1948) in die Synonymie von *A. tectorius* verwiesen. Seiner Einschätzung zufolge sind die erkennbaren Unterschiede zwischen einzelnen Individuen zu gering, um eine Zuordnung zu verschiedenen Spezies zu rechtfertigen. Diese Annahme erscheint aufgrund der Möglichkeit *A. griffithii* morphologisch zu charakterisieren jedoch zweifelhaft. Beobachtungen am Naturstandort ließen auch Unterschiede hinsichtlich der ökologischen Präferenzen erkennen (Abb. 78). So wuchsen *A. griffithii*-Pflanzen an allen drei Fundorten an denen die Art gesammelt wurde, oberhalb des in den Bachtälern stehenden bambusreichen Sekundärwaldes. Im Sekundärwald wurden nur Individuen von *A. spec.* Khao Sok gefunden, oft mitten in dichten Bambusbeständen. Vertreter der Art *A. spec.* Trat wuchsen bevorzugt in vom Monsun geprägtem Bambus- bzw. Schilfwald auf stark erodierten Böden, während *A. spec.* Benom in kühl-temperierten Regenwald noch in Höhen bis 1180 m vorkommt (Rischer, 2002). Die Aufsammlungen die in der vorliegenden Arbeit als Mitglieder einer Hybridisierungszone von *A. spec.* Khao Yai und *A. cochinchinensis* angesehen werden, kamen im hochstämmigen Monsunwald, der von in der Trockenzeit blattwerfenden Dipterocarpaceen dominiert wird, vor. Die Pflanzen finden sich dort am häufigsten in feuchten Senken trockenfallender Fließgewässer (Gene Conservation Center Ubon Ratchathani; Auskunft der Mitarbeiter des Gene Conservation Centers). Auf dem Gelände des Botanischen Gartens Ubon Ratchathani wuchs *Ancistrocladus* inmitten von niederwüchsigem Sekundärgebüsch. Letztere Standorte unterscheiden sich sehr von den Regenwäldern mit ihren kurzen oder fehlenden Trockenzeiten, in denen *Ancistrocladus* sonst gefunden wurde.



Abb. 77. Verschiedene Vertreter von *Ancistrocladus* aus Südostasien. A und B) *A. griffithii* im Khao Lak NP Südthailand, C) *A. spec.* Khao Sok, Khao Sok. NP und D) *A. spec.* Khao Yai x *cochinensis* auf dem Gelände des Botanischen Gartens Ubon Ratchathani, Ostthailand. *A. griffithii* unterscheidet sich deutlich von den anderen in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Arten durch seine schmalen Blätter.



Abb. 78. Verschiedene Standorte von *Ancistrocladus* in Südostasien. A) hochstämmiger Regenwald in Südthailand (Khao Chang NP, Trang), B) niederwüchsiger stark monsungeprägter Sekundärwald auf dem Gelände des Botanischen Gartens Ubon Ratchathani (Ostthailand), C) Bambusreicher Sekundärwald im Khao Sok NP (Südthailand) im Überschwemmungsbereich.

4.3.2 Artkonzept der Ancistrocladaceae Südostasiens aufgrund molekularer Daten

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht mit Hilfe vergleichender Analyse nukleärer ITS- und plastidärer trnK-Intron-Sequenzen sowie mit ISSR-Fingerprintanalysen die Grundlagen für ein Artkonzept der Ancistrocladaceae in Südostasien zu erstellen. Die Ancistrocladaceae Südostasiens zeigen eine hohe Diversität, sowohl in ihren ITS- als auch in ihren trnK-Intron-Sequenzen. Die Annahme, bei allen untersuchten Aufsammlungen handele es sich um Mitglieder einer Art (*A. tectorius*), ist aufgrund der Anzahl der Unterschiede zwischen den einzelnen Sequenzen und den ISSR-Fingerprints unwahrscheinlich (vgl. Kapitel 3.7.4). Das Ausmaß der Unterschiede ist mit den der afrikanischen *Ancistrocladus*-Taxa vergleichbar, deren Status aufgrund der morphologischen Charakterisierung besser geklärt ist. In 18 von 19 Lokalitäten in Südostasien, in denen mehr als ein Individuum gefunden wurde, fanden sich mehr als eine ITS-Sequenz, an 7 Lokalitäten mehr als eine trnK-Intron-Sequenz.

Verschiedene ITS- und trnK-Intron-Sequenzen einer Art können entweder monophyletisch nach der Isolierung einer Art entstanden oder polyphyletischen Ursprungs sein und sind demzufolge aufgrund eines hybridogenen Ursprungs einer Art oder durch Introgressionen von Allelen in den Genpool einer Art eingebracht worden. Hybridisierung und Introgressionen sind häufig Ursache von polymorphen Art-Komplexen, deren taxonomische Gliederung Probleme bereitet. Es wird davon ausgegangen, dass 70% der Pflanzenarten durch Hybridisierungsereignisse entstanden sind (Orians, 2000). Beispiele, bei denen Artbildung durch allopolyploide oder homoploide Hybridisierung durch molekulare Marker nachgewiesen ist, sind zahlreich (z. B. Keim *et al.*, 1989; Ungerer *et al.*, 1998; Ferguson und Sang, 2001). Für die Gattung *Armeria* (Plumbaginaceae) wurde festgestellt, dass das Auftreten verschiedener ITS-Sequenzen eher mit der geographischen Herkunft korreliert als mit der morphologischen Charakterisierung der einzelnen Spezies. In einer Art kommen hier verschiedene ITS-Sequenzen vor. Dies wird auf Introgressionereignisse und damit auf horizontalen Gentransfer zurückgeführt (Fuertes Aguilar *et al.*, 1999a; Nieto Feliner *et al.*, 2001). Ähnliche Verhältnisse wurden für die Gattung *Limonium* (Plumbaginaceae) festgestellt (Palacios *et al.*, 2000).

Zur Dokumentation retikulater Evolution und Bestimmung von Hybridisierungsereignissen wurde in verschiedenen Arbeiten das Auftreten verschiedener ITS-Sequenzen innerhalb einer Art, die mit ITS-Sequenzen von potentiellen Ausgangsarten homologisiert wurden, verwendet. Detektiert wurden dazu additive Signale verschiedener Sequenzen aus einem PCR-Produkt in der Sequenzierung (Sang *et al.*, 1995 und 1997). Additive Signale wurden auch bei 7 Proben der Ancistrocladaceae bei der Sequenzierung von ITS festgestellt. In diesen Fällen konnte durch Vergleich mit Sequenzen anderer Proben der Zustand beider Paraloger rekonstruiert werden. Für diese Proben ließe sich demnach eine hybridogene Entstehung annehmen.

Allerdings stellen die additiven Signale bei ITS-Sequenzen bzw. der Nachweis verschiedener paraloger ITS-Sequenzen nur einen Hinweis auf ein stattgefundenes Hybridisierungsereignis dar. ITS liegt in einer hohen Zahl an Kopien im Genom vor und unterliegt als rDNA der *concerted evolution*, in deren Verlauf verschiedene ITS-Sequenzen eines Locus homogenisiert werden (Buckler *et al.*, 1997). Sie stellen damit keine Allele im eigentlichen Sinne dar, die gemäß einem mendelschen Erbgang heterozygot vorliegen können. Additive Signale werden nur detektiert, wenn ein großer Anteil der Kopien der rDNA von einer abweichenden Sequenz gebildet wird. Es sind zwar Fälle bekannt in denen ein ITS-Polymorphismus innerhalb von Individuen nach einem alten Hybridisierungsereignis persistiert (Campbell *et al.*, 1997), in der Regel wird aber die rDNA durch die *concerted evolution* im Laufe der Zeit homogenisiert. Ist die Homogenisierung zu weit fortgeschritten, ist nur der häufigere ITS-Typ nachweisbar (Wendel *et al.*, 1995). Es ist auch vorstellbar, dass einzelne paraloge ITS-Sequenzen durch Segregation verloren gehen, durch ungleiche Verteilung von Paralogen während der Meiose (Sang *et al.* 1997).

Für beide Fällen bietet ein Vergleich mit Phylogenien plastidärer Sequenzen die Möglichkeit zur Überprüfung der Fixierung einer ITS-Sequenz in einem Hybrid. Stammt die plastidäre Sequenz von einem der parental Genome (in der Regel vom maternalen) und die ITS-Sequenz von dem anderen, stimmt die Position des Hybrid in den Phylogenien beider Genorte nicht überein (Soltis und Kuzoff, 1995). Durch Introgressionen können allerdings auch genetisch unterschiedliche Plastiden innerhalb einer Art vorkommen (Roelofs und Bachmann, 1997). Dies ist bei uniparentalem Erbgang der Plastiden möglich, wenn die Nachkommen eines Hybrid durch Rückkreuzung der Ausgangsart, von der der Plastid nicht stammt, genetisch angeglichen werden. Dieses auch als *chloroplast capture* bezeichnete Phänomen ist weit verbreitet und wird als einer der Hauptgründe für eine Inkongruenz zwischen Phylogenien nukleärer und plastidärer Marker angesehen (Wolfe und Elisens, 1995; Padgett *et al.*, 2002). Es wird davon ausgegangen, dass horizontaler Gentransfer von Plastiden-Genomen häufiger ist als horizontaler Gentransfer von rDNA-Sequenzen (Hardig *et al.*, 2000).

Neben Introgressionen wird als mögliche Ursache für das Auftreten verschiedener plastidärer Sequenzen oder nukleärer ITS-Sequenzen die Entstehung von zwei Arten aus einem für die jeweiligen Sequenzen polymorphen Vorläufertaxon angesehen (Hardig *et al.*, 2000). Durch zufälliges Aussterben verschiedener Entwicklungslinien innerhalb beider Arten kann es dazu kommen, dass in beiden Arten jeweils Individuen mit verschiedenen Anteilen des polymorphen Markers vorkommen und so eine Introgression vorgetäuscht wird. Zwischen diesem als *lineage sorting* bezeichneten Vorgang und Introgressionen kann alleine durch phylogenetische Analysen nicht zweifelsfrei unterschieden werden. Hardig *et al.* (2000) führen als Beispiel hierfür das Auftreten einer gleichen Chloroplasten-Sequenz in zwei allopatrischen Arten der Gattung *Ceanothus* (Rhamnaceae) an, bei denen eine rezente Hybridisierung ausgeschlossen ist. Ein solches Bild ist entweder durch Introgression in einer in jüngerer Zeit erloschenen

Kontaktzone beider Arten oder durch die Entstehung beider Arten aus einem Vorläufer, der bereits für die plastidären Sequenzen polymorph war, zu erklären.

In Kapitel 3.8 wurde gezeigt, dass für die südostasiatischen *Ancistrocladaceae* Introgressionen plastidärer oder nukleärer ITS-Sequenzen angenommen werden muß. Die durchschnittlichen paarweisen Distanzen, also die Anzahl von Punktmutationen bezogen auf die Länge des sequenzierten Abschnitts, mit denen die ITS-Sequenzen zweier Aufsammlungen voneinander getrennt werden, können niedriger sein als die durchschnittlichen paarweisen Distanzen der *trnK*-Intron-Sequenzen dieser Vertreter. Außer mit Introgressionen ließe sich das nur erklären, wenn für das *trnK*-Intron einzelner Taxa eine höhere Mutationsrate als für ITS angenommen wird. Davon kann aber nicht ausgegangen werden. Die maximale durchschnittliche Distanz zweier Proben ist für ITS 5,6 mal höher als für *trnK*, die der Südostasiatischen Proben 4,6 mal höher.

Eine infraspezifischen Variabilität von Genorten kann auch monophyletisch entstehen, d. h. durch Anhäufung unterschiedlicher Punktmutationen in einer oder in verschiedenen Populationen einer Art. Solche Sequenzen müssen als zu dem Genpool eines Taxon angehörig betrachtet werden. Die Höhe dieser Variabilität ist nur schwer abzuschätzen. Arbeiten die eine große Anzahl Individuen einer Spezies in Sequenzanalysen einbeziehen sind selten. Bei einer Untersuchung der Sequenzvariabilität von ITS verschiedener *Phyllanthus*-Arten (Euphorbiaceae) konnte für *Phyllanthus amarus* (82 Proben) eine Variabilität von 0-6 Positionen festgestellt werden für *P. urinaria* 0-7 Positionen (10 Proben; eigene Daten).

Entsprechend der Annahme einer gewissen infraspezifischen Variabilität der Sequenzen eines Taxons wurden die Sequenzen wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben in Verwandtschaftsgruppen eingeteilt. Sequenzen der einzelnen Gruppen bildeten jeweils in der Maximum-Parsimony-Analyse und UPGMA durchschnittlicher Distanzen Monophylien und hatten zueinander eine geringere Distanz als zu den Sequenzen, die anderen Gruppen zugeordnet wurden (zu den Ausnahmen vgl. Kapitel 3.8.1). Diese Gruppen wurden anschließend als einheitlicher Sequenztyp behandelt. UPGMA und PCoA der ISSR-Bandenmuster ergaben für die meisten der Sequenztypen von ITS einheitliche Cluster ungeachtet des Fundortes der Proben, wodurch die Vorgehensweise bestätigt wurde. Die *trnK*-Intron-Sequenzen korrelierten nicht in dem Ausmaß mit den ISSR-Bandenmustern wie die ITS-Sequenzen. Dies deutet auf einen höheren Anteil an Introgressionen plastidärer Sequenzen als von rDNA-Sequenzen und entspricht den von Hardig *et al.* (2000) angenommenen Verhältnissen für horizontalen Gentransfer. Als potentielle Taxa wurden dementsprechend Proben angesehen, die in der Analyse der ISSR-Fingerprints eigene Cluster bildeten und gleichzeitig bei der Mehrzahl der Proben eine von den anderen Clustern abweichende ITS- und *trnK*-Intron Sequenz aufwiesen.

Eine Ausnahme bestand in den beiden Aufsammlungen in Ubon Ratchathani (Ostthailand). Hier kamen Proben, die nur den ITS-Typ 1, Proben, die nur den ITS-Typ 2 und Proben, die

sowohl ITS-Typ 1 als auch ITS-Typ 2 aufwiesen, vor. Die ISSR-Bandenmuster dieser Arten waren sich untereinander ähnlicher als zu den Bandenmustern der anderen Proben. Es wurden hier Individuen gefunden, die mit Proben anderer potentieller Taxa in trnK-Intron und ITS Sequenzgleich waren (je Typ 1), mit ISSR-Fingerprints aber näher zu Proben mit ITS-Typ 2 und trnK-Intron-Typ 4 eingeordnet wurden. Diese Beobachtung lässt sich als Resultat von Hybridisierungsereignissen in jüngerer Zeit zwischen zwei trennbaren Taxa interpretieren. Die beiden Aufsammlungen in Ubon Ratchathani könnten in der Kontaktzone zweier Taxa liegen, in der durch wiederholte Hybridisierungen und Rückkreuzungen das nukleäre Genom der einzelnen Individuen bereits homogenisiert ist, ITS und plastidäre Sequenzen aber noch nicht. Mit Hilfe des ISSR-Bandenmusters kann eine Hybridisierung nachvollzogen werden, da der Hybrid oder die durch Hybridisierung entstandene Art spezifische Banden beider Ausgangsarten enthält (Wolfe *et al.*, 1998). Es war aber nicht möglich Frischmaterial oder in CTAB-Isolierungspuffer fixiertes Material von Individuen zu bekommen, die einem durch ITS-Typ 2 charakterisierten Taxon angehören könnten. Proben, die nur ITS-Typ 2 aufwiesen, waren der Isotypus von *A. cochinchinensis* aus Nordvietnam und die Probe von *A. hainanensis* aus Südchina. Aus diesem Grund war es auch nicht möglich zu entscheiden, ob die Aufsammlungen aus Ubon Ratchathani ein durch Hybridisierung entstandenes Taxon darstellen könnten.

Tab. 18. Aufstellung der durch molekulare Methoden charakterisierten Taxa der *Ancistrocladaceae* in Südostasien und der aus den Fundorten abgeleiteten Verbreitung.

Artname, bzw. vorläufiger Artname	Verbreitung
<i>Ancistrocladus griffithii</i>	S-Thailand: Khao Lak; Khao Sok; Khao Prang
<i>Ancistrocladus pinangianus</i>	S-Thailand: Khao Sok; Khao Lak; Trang Bot. Garten*; Kho Lanta; Ton Puei, Malaysia: Dungun; Jahore Borneo
<i>Ancistrocladus spec. Benom</i>	Malaysia: Gunung Benom
<i>Ancistrocladus attenuatus</i>	S-Thailand: Khao Chong; Thale Ban
<i>Ancistrocladus spec. Khao Sok</i>	S-Thailand: Khao Sok; Khao Prang
<i>Ancistrocladus spec. Khao Yai</i>	E-Thailand: Khao Yai, Khao Kitchakut; Khao Chamao; Nam Tok Philu; Kho Chang; Pang Sida
<i>Ancistrocladus spec. Trat</i>	E-Thailand: Trat, Namtok Sapanhin
<i>Ancistrocladus spec. Laos</i>	S-Laos: Muang Khong
<i>Ancistrocladus spec. Khao Yai x cochinchinensis</i>	E-Thailand: Gene Conservation Center Ubon Ratchathani; Ubon Ratchathani Bot. Garten*
<i>Ancistrocladus cochinchinensis</i>	S-China: Hainan

*wildwachsend auf dem Gelände des Botanischen Gartens

Um Anhaltspunkte für die Artzugehörigkeit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben zu bekommen wurden ITS-Sequenzen von Herbarmaterial der Isotypen von *A. cochinchinensis*, *A. attenuatus* und *A. pinangianus* gewonnen. Die ITS-Sequenz wurde damit als diagnostisches Merkmal für ein Taxon verwendet. Bei Angiospermen ist die Verwendung von

Punkt- und Längenmutationen in Sequenzabschnitten von ITS oder plastidärer Sequenzen als diagnostisches Merkmal für verschiedene Spezies untersucht (z. B. Germano und Klein 1999; Linder *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). In diesen Arbeiten konnte aber in jedem Fall die Sequenz für mehrere Angehörige der betreffenden Taxa verifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit war dies nicht möglich, da keine von den Sequenzen unabhängige Anhaltspunkte zur Artzugehörigkeit der untersuchten Proben vorlagen. Der hohe Grad an Übereinstimmung zwischen der phylogenetischen Rekonstruktion der ISSR-Bandenmuster und der ITS-Sequenzen bei den *Ancistrocladaceae* Südostasiens deutet aber daraufhin, dass die ITS-Sequenzen sich als diagnostisches Merkmal für einzelne Taxa eignen.

Ein Vorkommen zweier paraloger Sequenzen bei den Isotypus-Belegen, wie bei einzelnen Proben nachgewiesen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund des Alters des zur DNA-Isolierung eingesetzten Materials war die in der Amplifikation eingesetzte Template-Menge sehr gering. Dadurch kann es zur zufälligen Unterdrückung eines Paralogs in der Amplifikation kommen, auch wenn dieses Paralogon unter Standardbedingungen nachweisbar gewesen wäre (Allel-Dropout oder Allel-Suppression; Vigilant *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2001; vgl. auch Buckler *et al.*, 1997)). Relevant ist dieser Zusammenhang für die Abtrennung von *A. cochinchinensis*. Kommt in der Population des Locus Classicus neben ITS-Typ 2 auch ITS-Typ 1 vor, können die Populationen aus Ubon Ratchathani nicht als Angehörige einer Hybridisierungszone zwischen *A. cochinchinensis* und einem bisher nicht benannten Taxon angesehen werden. Aufgrund der molekularen Daten wurden 8 potentielle *Ancistrocladus*-Arten in Südostasien definiert. In Tab. 18 und Abb. 79 ist das für die *Ancistrocladaceae* in Südostasien aufgestellte Artkonzept zusammengefasst.

Aufgrund von paarweisen Distanzen und phylogenetischer Analyse molekularer Daten allein ist ein taxonomisches Artkonzept kaum ableitbar. Zum einen ist die Mutationsrate bei verschiedenen Organismen unterschiedlich, zum anderen korreliert die Mutationsrate nicht gleichmäßig mit der morphologischen Differenzierung zweier Taxa. Eine Untersuchung an *Apiaceae* zeigte, dass die Variabilität der ITS-Region zwischen allen Arten der Gattung *Astrantia* mit 4 % erheblich niedriger als die von 4 untersuchten Arten der Gattung *Eryngium* (beide *Apiaceae*) mit 18,1 % (Günther, 2000) ist. Das für eine Artabtrennung nach dem biologischen Artbegriff verwendete Kriterium ist die reproduktive Isolation zweier Arten. In der botanischen Taxonomie ist die alleinige Verwendung der reproduktiven Isolation wegen des häufigen Auftretens von Hybriden praktisch schwer anwendbar, so dass hier die morphologische Abtrennbarkeit zweier Arten als Kriterium eine größere Bedeutung hat (Briggs und Walters, 1997, S. 361-367). Beide Kriterien sind allerdings nicht abhängig von der Distanz, die sich aufgrund molekularer Marker ergibt. Die genetischen Distanzen können nur Indizien für eine Erfüllung der Kriterien darstellen (Wägele, 2000).

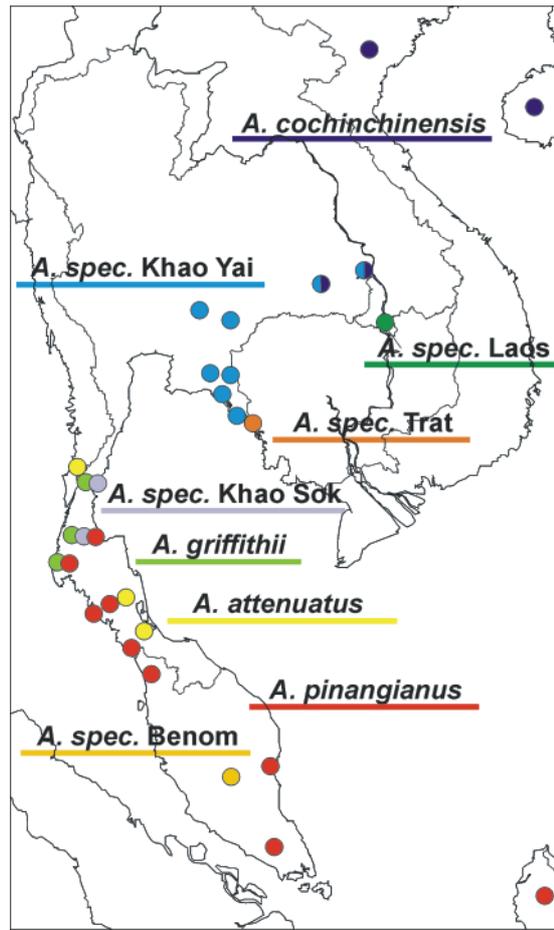


Abb. 79. Verbreitung der aufgrund von Sequenzanalysen und DNA-Fingerprints charakterisierten Taxa der Ancistrocladaceae Südostasiens.

Allerdings sollte die Kombination aller drei in der vorliegenden Arbeit vorgestellten molekularen Marker geeignet sein genetisch getrennte Gruppen der Ancistrocladaceae voneinander abzutrennen. Die Variabilität der drei Marker zwischen den in Tab. 18 definierten südostasiatischen Taxa ist ähnlich hoch wie die zwischen den untersuchten afrikanischen und indischen Taxa. Die sehr hohe Variabilität der Sequenzen des trnK-Introns und der ITS-Region zeigt, dass entweder mehrere Arten der Ancistrocladaceae im Untersuchungsgebiet vorkommen, oder dass in der Vergangenheit getrennte Taxa in jüngerer Zeit einen hybridogenen Formenschwamm bildeten, der taxonomisch als *A. tectorius* s. l. bezeichnet wurde. Das sympatrische Vorkommen von Individuen der Taxa *A. griffithii*, *A. pinangianus* und *A. spec. Khao Sok*, die in allen drei Markern unterscheidbar waren, lässt die Interpretation zu, es handle sich hierbei um genetisch getrennte Arten. Allerdings weist *A. pinangianus* in seinem trnK-Intron eine erheblich höhere Variabilität auf als in seiner ITS-Sequenz. Die Homogenisierung der ITS-Sequenz ist also scheinbar weiter vorangeschritten als die Homogenisierung des trnK-Introns. Für die Proben von *A. pinangianus* aus Malaysia und aus Borneo konnten allerdings keine ISSR-Fingerprints angefertigt werden. Die Möglichkeit die hier zu *A. pinangianus* zusam-

mengefassten Aufsammlungen in weitere Taxa aufzutrennen, muß durch weitere Untersuchungen überprüft werden. Auch die Distanz zwischen dem trnK-Intron der Proben des Gene Conservation Centers Ubon Ratchathani und der Probe von Hainan (Typ 4 und 5) ist relativ hoch, so dass die Existenz einer weiteren taxonomischen Einheit möglich ist, die als Quelle des trnK-Intron-Typ 4 in Frage kommt. Insgesamt ergibt sich aber das Bild, dass die historische Diversität der Ancistrocladaceae in Südostasien größer war als die rezente Diversität und verschiedene trnK-Intron-Sequenzen als Relikte in den rezenten Taxa persistieren.

4.3.3 Evolution der Ancistrocladaceae

Aufgrund der vorliegenden Datensätze von ITS, trnK-Intron und ISSR-Fingerprints kann nicht entschieden werden, ob die ostafrikanischen Taxa die Schwestergruppe zu den anderen Ancistrocladaceae, und damit Relikte einer frühen Evolution der Gruppe in Afrika, oder Vertreter einer monophyletischen afrikanischen Linie darstellen. *Ancistrocladus robertsoniorum* und *A. tanzaniensis* bilden eigene Entwicklungslinien in der ITS- und trnK-Intron-Phylogenie, wobei in letzterer *A. robertsoniorum* die Nachbargruppe zu allen anderen Ancistrocladaceae bildet. Diese Position ist allerdings nur durch eine mit der Außengruppe, *Triphyophyllum peltatum*, gemeinsame Synapomorphie angezeigt, die *A. tanzaniensis* fehlt. Maximum-Likelihood-Analyse der ITS-Daten ergab bei Annahme eines Transitions-Transversions-Verhältnisses von 1:1 und von 2:1, dass *A. tanzaniensis* das der Außengruppe ähnlichste Taxon darstellt. Das ISSR-Bandenmuster von *A. robertsoniorum* ist den westafrikanischen Taxa ähnlicher (0,096-0,18, Distanzen nach Nei und Li, 1979) als allen asiatischen Taxa (0,21-0,35). Dies spricht im Gegensatz zu den Sequenzdaten von ITS und trnK-Intron für eine Einordnung der ostafrikanischen Taxa als Teile einer afrikanischen Entwicklungslinie. In allen Analysen erscheinen die westafrikanischen Taxa monophyletisch, so dass für die ostafrikanischen Taxa zumindest eine lange eigenständige Evolution angenommen werden kann. Sie erscheinen damit als Relikte einer frühen Diversifizierung der Ancistrocladaceae in Afrika, von der sich ein Taxon zu den rezenten westafrikanischen Taxa entwickelt hat.

Für die asiatischen Ancistrocladaceae wird in der phylogenetischen Rekonstruktion von trnK-Intron und ISSRs eine gemeinsame Entwicklungslinie angenommen. In der Konsensus-Topologie der Maximum-Parsimony-Analyse der ITS-Sequenzen werden *A. griffithii* und *A. hamatus* als Polytomie zu den übrigen Ancistrocladaceae gestellt. In 59 % der kürzesten Bäume sind die asiatischen Ancistrocladaceae aber monophyletisch, der ITS-Datensatz widerspricht in diesem Punkt also nicht den Datensätzen von trnK-Intron und ISSR-Fingerprints. Ein monophyletischer Ursprung der südostasiatischen Taxa wird nur durch die Neighbor-Joining-Analyse der ISSR-Fingerprints angenommen, bei der *A. hamatus* (Sri Lanka) und *A. heyneanus* (Indien) jeweils als Nachbargruppe zu allen südostasiatischen Taxa gezeigt werden. Die auf Sequenzen beruhenden Datensätze lassen sowohl in Maximum-Parsimony-Analyse als auch Maximum-Likelihood-Analyse die südostasiatischen Taxa paraphyletisch

erscheinen. Die ITS-Daten stützen *A. heyneanus* und die trnK-Intron-Daten *A. heyneanus* und *A. hamatus* als Nachbargruppe zu den Taxa *A. cochinchinensis*, *A. spec.* KhaoYai und *A. spec.* Laos.

Die nächsten Verwandten der *Ancistrocladaceae*, die *Dioncophyllaceae*, besitzen eine reliktdäre, kleinräumige Verbreitung in Westafrika. Geht man daher von einem afrikanischen Ursprung der *Ancistrocladaceae* aus, lässt sich aus der ISSR-Fingerprint-Analyse ableiten, dass die *Ancistrocladaceae* schrittweise Südostasien über den indischen Subkontinent besiedelt haben. Introgressionen von plastidären Sequenzen kommen häufiger vor als von ITS-Sequenzen. ITS-Phylogenien entsprechen daher eher der Phylogenie der Spezies, die Phylogenien plastidärer Marker spiegeln eher Introgressionen wider (Ferguson und Jansen, 2002; Hardig *et al.*, 2000). Dennoch kommen Introgressionen auch bei ITS vor (z.B. Hughes *et al.*, 2002). ISSR-Fingerprints werden als Multilocus-Analyse des nukleären Genoms nur wenig durch Introgressionen beeinflusst. Die Bandenmuster von Hybriden stellen immer ein Gemisch der Bandenmuster beider Elternarten dar und sind damit immer von den anderen Arten und deren Hybriden unterschieden (Wolfe *et al.*, 1998). In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass ISSR-Fingerprints geeignet sind die Phylogenie nah verwandter Arten aufzulösen und dass diese Phylogenien eher mit Phylogenien von ITS als von plastidären Markern übereinstimmen (Wolfe und Randle, 2001).

Im Fall der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Phylogenie der *Ancistrocladaceae* korreliert die Neighbor-Joining-Analyse der Nei-Li-Distanzen bzw. Dice-Koeffizienten in höherem Maße mit der Herkunft der untersuchten Aufsammlungen als die auf Sequenzdaten beruhenden Phylogenien. Die Herkunft der Pflanzen stellt im Falle der vorliegenden Arbeit das einzige Kriterium dar, anhand dessen die Plausibilität der die *Ancistrocladaceae* betreffenden Phylogramme überprüft werden kann. Die Neighbor-Joining-Analyse zeigt die indischen Arten interkalierend zwischen den afrikanischen und südostasiatischen Taxa. Letztere bilden zwei Entwicklungslinien, von denen eine hauptsächlich im Süden verbreiteten Taxa enthält mit *A. griffithii* als Nachbargruppe zu den übrigen Taxa. Eine andere Entwicklungslinie enthält hauptsächlich im Norden verbreitete Taxa. Allerdings werden die Proben von *A. spec.* Trat aus Ostthailand zusammen mit den südlich verbreiteten Taxa angeordnet und *A. spec.* Trang aus Südthailand zusammen mit den nördlich verbreiteten Taxa. Die beiden Entwicklungslinien könnten sich damit teilweise durch geographische Isolation von Populationen ehemals sympatrischer Taxa ableiten.

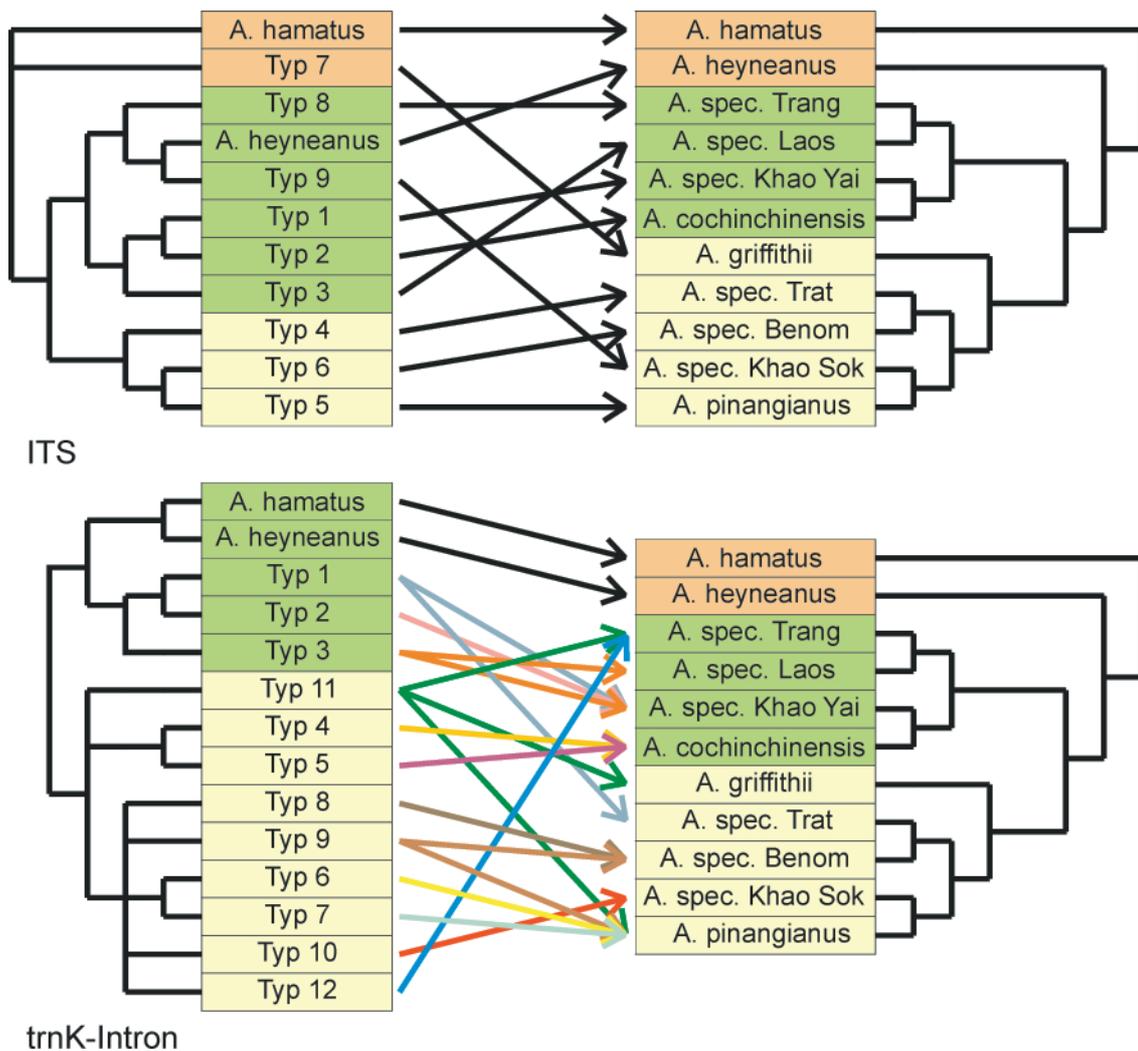


Abb. 80. Vergleich der Phylogenien von ITS und trnK-Intron mit der durch ISSR-Fingerprints angezeigten Verwandtschaftsbeziehungen der Taxa der Ancistrocladaceae in Asien (jeweils rechts). Die Unterschiede der auf Sequenzen beruhenden Phylogenien zu der Clusteranalyse der ISSR-Fingerprints deuten auf das häufige Auftreten von Introgressionen und *chloroplast capture* hin.

Auch die phylogenetische Rekonstruktion der ITS- und trnK-Intron-Daten läßt auf die Existenz von mehreren Entwicklungslinien der Ancistrocladaceae in Asien schließen. Die von diesen Markern angezeigten Verwandtschaftsverhältnisse sind aber nicht mit den von den ISSR-Fingerprints angezeigten kongruent (vgl. Abb. 80). Insgesamt deutet dies auf eine Besiedelung Südostasiens durch zwei bis drei Entwicklungslinien hin, deren Kompartimente durch Introgression vermischt wurden.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Diversität der Ancistrocladaceae in Südostasien größer als bisher angenommen. Die als potentielle Taxa angesehenen Populationen weisen eine große Variabilität in ihrem trnK-Intron und in ihrer ITS-Sequenz auf, obwohl sie nach ihren ISSR-Fingerprints genetisch homogen erscheinen. Diese große Diversität der beiden Genorte kann mit dem vorliegenden ISSR-Datensatz nicht auf rezente,

isolierte Taxa zurückgeführt werden. Die Clusteranalysen lassen nicht auf die Existenz von einer derart hohen Anzahl sympatrisch vorkommender Arten schließen. Es erscheint daher wahrscheinlicher, dass die historische Diversität der *Ancistrocladaceae* höher war als die rezente. Ehemals isolierte Taxa könnten nach Hybridisierung heute einen gemeinsamen Genpool bilden. Denkbar ist auch, dass solch ein Vorgang mehrmals auftrat und dass ein durch Hybridisierung entstandenes Taxon sich wieder in mehrere Arten aufgespalten hat und durch *lineage sorting* nah verwandte Taxa entfernt verwandte ITS- und trnK-Intron-Sequenzen aufweisen. Die in der Topologie der ITS- und trnK-Intron-Phylogenie von der phylogenetischen Rekonstruktion der ISSR-Fingerprints abweichend positionierten Sequenzen könnten Relikte vormals existenter Taxa darstellen und in anderen Taxa aufgegangene ursprüngliche Taxa repräsentieren. Die ITS-Sequenzen von *A. griffithii*, *A. hamatus*, *A. robertsoniorum* und *A. tanzaniensis* sind Sequenzen mit längerer eigenständiger Evolution als die anderen untersuchten Sequenzen von *Ancistrocladus*. Dies ist aufgrund ihrer Position in der ITS-Topologie und ihrer relativ niedrigen paarweisen Distanzen untereinander angezeigt.

Die Existenz basaler Linien in Ostafrika, Sri Lanka und Südthailand widerspricht der aus den ISSR-Fingerprints abgeleiteten Annahme einer über den indischen Subkontinent erfolgten schrittweisen Einwanderung nach Asien ausgehend von Afrika. Diese Besiedlung erfolgte entweder sehr schnell oder bereits durch mehrere differenzierte Taxa. Denkbar ist daher auch ein laurasischer Ursprung der *Ancistrocladaceae* und eine Besiedlung Asiens von Norden aus. Die afrikanischen Linien könnten sich von westlaurasischen Vorläufern ableiten, die nach Verschlechterung der Klimabedingungen nach Süden abgedrängt wurden und so das tropische Afrika erreichten. Diese Zusammenhänge werden in Kapitel 4.5.2 im Vergleich mit der Evolution der Nepenthaceae näher betrachtet. Ungeachtet des Ursprungs der *Ancistrocladaceae* müssen für die asiatischen Vertreter mehrere alte Entwicklungslinien angenommen werden, die untereinander hybridisierten und so die inkongruenten Phylogenien von plastidären und nukleären Markern ergaben. Dabei können auch nur sporadisch auftretende Introgressionen oder Hybridisierungsereignisse im Laufe der Zeit zu solchen Verteilungen einzelner Marker führen (Ferguson und Jansen, 2002). Es ist zwar nicht bekannt, welchen Ploidiegrad die *Ancistrocladaceae* besitzen, da Chromosomenzahlen der *Ancistrocladaceae* bisher nicht untersucht wurden. Homoploide Hybridisierung kommen aber bei polyploiden Artgruppen häufiger vor als bei diploiden. Eine Erklärung der Inkongruenzen zwischen den einzelnen Markern durch allopolyploide Hybridisierung erscheint bei den *Ancistrocladaceae* eher unwahrscheinlich. Es scheint eher so, dass regelmäßige Introgressionen zu einer allmählichen Angleichung der ISSR-Bandenmuster verschiedener rezenter Taxa oder in erdgeschichtlich jüngerer Zeit geographisch benachbart vorkommender Taxa geführt haben.

Ob auch für die afrikanischen Taxa eine durch Hybridisierungen und Introgressionen geprägte Artbildung vorausgesetzt werden muß, kann mit dem vorliegenden Datensatz nicht beantwortet werden, da hierzu zu wenige afrikanische Proben verarbeitet wurden. Nach Ferguson

und Jansen (2002) sind komplexe Verwandtschaftsverhältnisse, wie in der vorliegenden Arbeit für die Ancistrocladaceae gezeigt, häufiger als bisher im allgemeinen angenommen. Diese werden erst bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von Proben auf Populations-ebene auffällig, was bei der Erstellung von molekularen Phylogenien häufig außer acht gelassen wird.

4.4 Molekulare Phylogenie der Nepenthaceae

4.4.1 Bewertung der trnK-Intron-Phylogenie im Hinblick auf introgressive Hybridisierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine molekulare Phylogenie des trnK-Introns der Nepenthaceae erstellt. Die ITS-Region konnte bei den Nepenthaceae nicht als molekularer Marker verwendet werden. Hier kam es zur Amplifikation einer großen Anzahl von Pseudogen-Sequenzen, die nicht von möglicherweise zwischen verschiedenen Arten homologisierbaren Sequenzen abgetrennt werden konnten (vgl. Kapitel 4.1.2). Im Gegensatz zu den Ancistrocladaceae, wo die vergleichende Sequenzierung der ITS-Region problemlos gelang, lagen damit für die Nepenthaceae nur Datensätze cytoplasmatischer Marker vor. Die Daten des plastidären trnK-Introns wurden mit einem Datensatz einer mitochondrialen Kopie des trnK-Introns ergänzt, letzterer ergab allerdings nur eine sehr schlecht aufgelöste Phylogenie, die sich für einen Vergleich mit den trnK-Intron-Daten nur begrenzt eignete (vgl. Kapitel 4.1.3).

Wie für die Ancistrocladaceae gezeigt werden konnte, kann die ausschließliche Verwendung eines plastidären Markers zu falschen Phylogenie-Annahmen führen, wenn in der Evolution einer Gruppe Hybridisierungen und Introgressionen eine Rolle gespielt haben. Für die Nepenthaceae sind Hybridisierungen häufig belegt. In Kultur lassen sich zwischen fast allen Spezies fertile Hybride herstellen (Danser, 1928). Die bisher dahingehend untersuchten Nepenthaceae haben Chromosomenzahlen von $2n = 80$ (Heubl und Wistuba, 1995) und stellen damit wahrscheinlich eine Artgruppe hochpolyploider Taxa dar, unter denen homoploide Hybridisierung erleichtert ablaufen kann. Es erscheint unwahrscheinlich, dass die Evolution dieser Gruppe ohne Hybridisierungsereignisse ablief. Dennoch erscheint die Topologie aufgrund der Korrelation mit der Biogeographie und mit der Gruppeneinteilung nach Danser (1928) plausibel. Die Verwandtschaftsverhältnisse des trnK-Introns sollten also im Großen und Ganzen die Verwandtschaftsverhältnisse widerspiegeln, die aufgrund von morphologischen Merkmalen angenommen worden sind. Es ist aber denkbar, dass durch *chloroplast capture* (Wolfe und Elisens, 1995; vgl. Kapitel 4.3.3) dem Genotyp nach ältere Taxa eine plastidäre Sequenz abgeleiteter Taxa aufweisen und dadurch auch als abgeleitete Taxa angesehen werden. Mit den für die Nepenthaceae vorliegenden Datensätzen können solche Phä-

nomene nicht ausgeschlossen werden. Da bei Introgressionsereignissen Stammbäume nukleärer Sequenzen als der Phylogenie der Arten ähnlicher angesehen werden als Stammbäume plastidärer Daten, können aufgrund der molekularen Daten die Verwandtschaftsverhältnisse einzelner Taxa nur mit Einschränkungen beurteilt werden. Die Untersuchung der Nepenthaceae mit einem weiteren Marker, der von den plastidären Sequenzen unabhängig evolviert, oder mit einer Fingerprinttechnik könnte helfen die sich aufgrund der trnK-Intron-Phylogenie ergebenden Verhältnisse abzusichern. Die Sequenzdaten des mitochondrialen Pseudogens, die zu diesem Zweck erstellt wurden enthalten ein zu geringes phylogenetisches Signal um eine Überprüfung der trnK-Intron-Phylogenie im Hinblick auf *chloroplast capture* verlässlich zu gewährleisten. Im Folgenden werden die in der Literatur angenommenen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Taxa der Nepenthaceae mit den in der vorliegenden Arbeit erstellten molekularen Daten verglichen.

4.4.2 Vergleich der trnK-Intron-Phylogenie mit der Biogeographie

Die Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Phylogenie der Nepenthaceae läßt eine auffällige Korrelation hinsichtlich der Biogeographie erkennen. Alle in Sumatra vorkommenden Arten sowie alle auf dem Festland von Südostasien vorkommenden Arten entstammen einer gemeinsamen Entwicklungslinie. Zusätzlich bilden die Arten, deren Areal den größten Teil der malesischen Region umfasst, eine Monophylie. Die meisten der auf Borneo endemischen Arten sind zusammen mit Arten von Sulawesi und den Philippinen monophyletisch, ebenso wie die meisten der auf Neuguinea endemischen Arten. Damit zeigt die Topologie der trnK-Intron Phylogenie der Nepenthaceae drei Entwicklungslinien mit unterschiedlichen Verbreitungsschwerpunkten (vgl. Abb. 81, Clade 1 bis 3).

Die im Westen des Verbreitungsgebietes auf Madagaskar, den Seychellen und auf Sri Lanka isoliert vorkommenden Taxa sind der Außengruppe am nächsten verwandt und bilden die Basis der trnK-Intron-Phylogenie der rezenten Nepenthaceae. Diese Taxa, *N. pervillei*, *N. distillatoria*, *N. madagascariensis* und *N. masoalensis* könnten also Relikte eines ursprünglichen Verbreitungsgebietes der Nepenthaceae darstellen. Nach Schmid-Hollinger (1979) haben diese Arten eine Reihe plesiomorpher Charaktere, die in dieser Kombination nicht in den anderen Arten vorkommen. Schmid-Hollinger (1979) betrachtet *N. madagascariensis* und *N. distillatoria* in diesem Sinne als die ursprünglichsten Taxa vor. Die Annahme von Schmid Hollinger (1979), dass *N. pervillei* das am stärksten abgeleitete Taxon innerhalb der westlich isolierten Taxa darstellt, wird durch die molekularen Daten nicht unterstützt. *N. pervillei* hat einige ungewöhnliche Charaktere, die dazu führten dass dieses Taxon von Hooker (1873) in die monotypische Sektion *Anourosperma* gestellt wurde, für die von Hallier (1921) Gattungsrang angenommen wurde. Ein charakterisches Merkmal für die westlichen Arten sind traubige Infloreszenzen, welche sonst nur bei *N. danseri*, *N. neoguineensis*, *N. tomoriana* und *N. paniculata* vorkommen. *N. neoguineensis* und *N. tomoriana* sind Teil von Clade 3 der trnK-

Intron-Phylogenie, *N. danseri* bildet eine eigene Entwicklungslinie. *N. khasiana* besiedelt ein begrenztes Areal in Assam, Nordindien (Jyntea- und Khasigebirge). In der trnK-Phylogenie vermittelt *N. khasiana* zwischen den westlichen Arten und allen anderen *Nepenthes*-Taxa. *N. khasiana* fehlen die von Schmid-Hollinger (1979) als ursprünglich angesehenen Merkmale, so dass *N. khasiana* den Indo-malaiischen Taxa nahe verwandt zu sein scheint.

Die restlichen Taxa der Nepenthaceae bilden drei Entwicklungslinien. Clade 1 enthält alle auf Sumatra, der malaiischen Halbinsel und dem übrigen südostasiatischen Festland vorkommenden Taxa. Eine eigene Entwicklungslinie innerhalb Clade 1 wird von allen, bis auf *N. mikei*, auf Sumatra endemischen Taxa und *N. gymnamphora* aus Westjava gebildet. Diese Linie ist zwar nicht durch Bootstrap-Analyse stützbar, die Taxa besitzen aber eine Synapomorphie mit einem CI von 1. Die hohe Anzahl von auf Sumatra endemischen Arten lässt sich also nach der trnK-Intron-Phylogenie auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückführen. Eine andere Linie wird überwiegend durch Taxa mit einer über den Sundaschelf hinausgehenden Verbreitung gebildet. Hierzu gehören *N. mirabilis*, *N. ampullaria* und *N. gracilis* und die auf Borneo vorkommenden Arten *N. bicalcarata*, *N. hirsuta* und *N. mapuluensis*. Eine weitere Linie wird durch die beiden Arten deren Verbreitung den gesamten Sundaschelf (malaiische Halbinsel, Sumatra, Borneo) umfasst, *N. albomarginata* und *N. rafflesiana* zusammen mit *N. thorelii* und *N. benstonei*. *N. benstonei* wurde 1999 beschrieben und wurde bisher in Südthailand und auf der malaiischen Halbinsel gefunden (Cheek und Jebb, 2001). *N. thorelii* ist von Ostthailand bis Nordvietnam verbreitet. In die Analyse wurde Material von *N. thorelii* aus dem Botanischen Garten München einbezogen. Die Sequenz von *N. thorelii* unterscheidet sich nur in 1-2 Positionen von den anderen Taxa dieser Monophylie, so dass eine Fehlbestimmung dieser Probe nicht ausgeschlossen werden kann. Die Nachbargruppe zu diesen Arten wird in der kombinierten Analyse des trnK-Introns und des mitochondrialen trnK-Pseudogens von zwei Arten der Philippinen gebildet, *N. truncata* und *N. cf. petiolata*. Diese Gruppierung ist in der Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Analyse nicht angezeigt, besitzt aber eine Synapomorphie mit einem CI von 1 im trnK-Intron. Die Arten *N. rajah*, *N. macrophylla* und *N. villosa* werden als Polytomie zu den oben genannten Arten innerhalb Clade 1 gestellt. In der kombinierten Analyse bilden die drei Arten gestützt durch die mitochondrialen Sequenzen eine Monophylie. Nicht auflösen lässt sich durch den vorliegenden Datensatz die Position von *N. boschiana* (Borneo) und *N. anamensis* (Vietnam). Die Nachbargruppe zu den restlichen Arten von Clade 1 wird durch eine Monophylie aller in der malaiischen Halbinsel endemischen Arten, einer Monophylie aus *N. reinwardtiana* aus Borneo und Sumatra und den Endemiten aus Borneo, *N. macrovulgaris* und *N. northiana*, sowie *N. mikei* gebildet.

Clade 1 könnte die älteste Entwicklungslinie der Kolonisation des Hauptverbreitungsgebietes der Nepenthaceae darstellen. Clade 1 enthält als einziger Taxa der malaiischen Halbinsel, sowie aus Thailand, Vietnam und Kambodscha und weist damit das größte Verbreitungsgebiet der drei Entwicklungslinien auf. Die kombinierte Analyse unterstützt diese Annahme.

Hier werden Clade 2 und Clade 3 zusammengefasst, Clade 1 stellt also die Nachbargruppe der übrigen *Nepenthes* des Indomalaiischen Archipels dar. Diese Beziehung ist allerdings nicht gestützt und wird aufgrund einer Homoplasie mit einem CI von 0,5 im trnK-Intron und zwei Homoplasien mit einem CI von weniger als 0,5 der mitochondrialen Sequenzen gebildet.

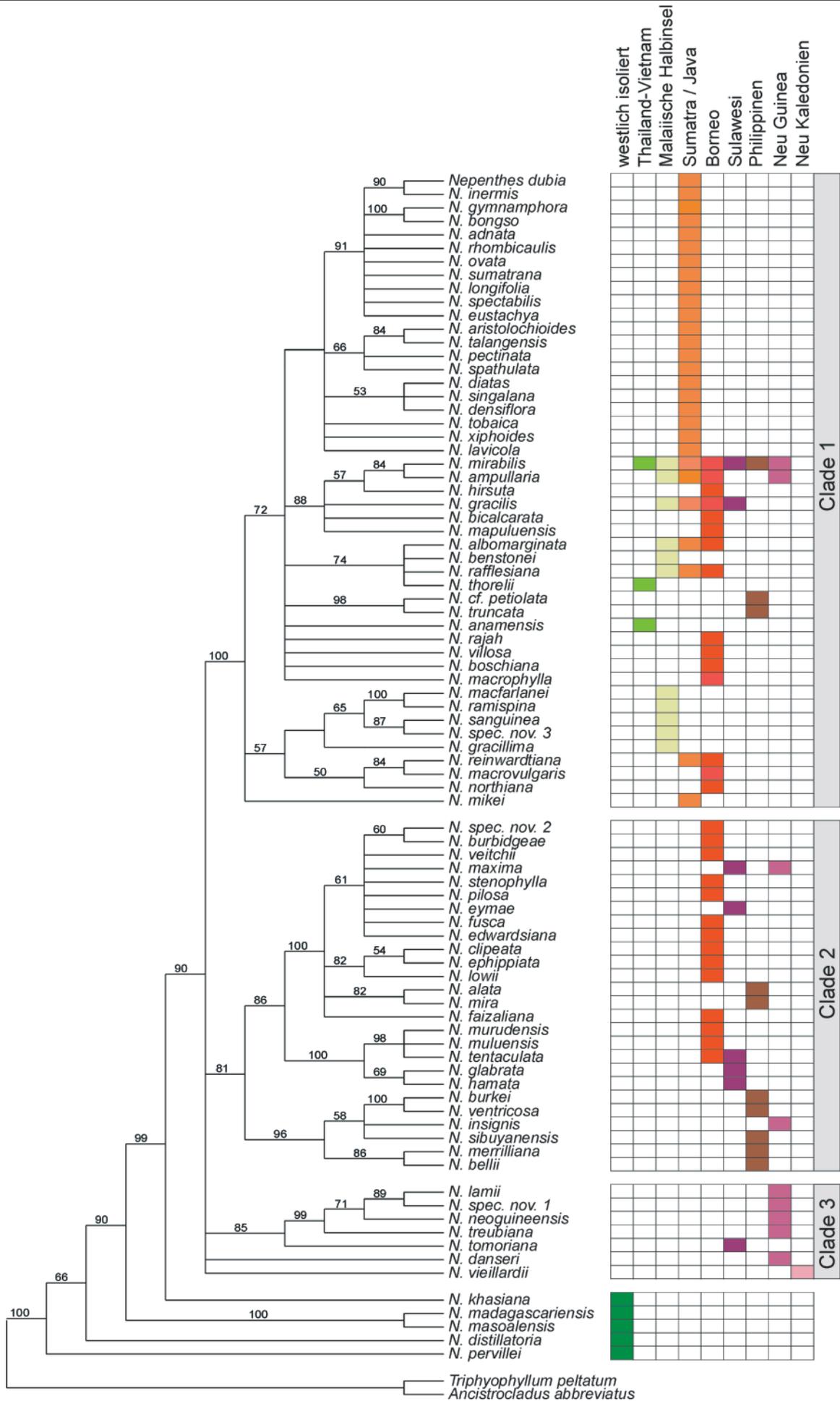
Clade 2 enthält ausschließlich Arten aus Borneo, den Philippinen und Sulawesi mit Ausnahme von *N. maxima* und *N. insignis*, die auch auf Neu Guinea vorkommen. Alle Taxa von Clade 2 wurden von Danser (1928) als Mitglieder seiner Regiae und Insignes angesehen. Nachbargruppe zu allen anderen Taxa von Clade 2 wird durch die endemischen Taxa der Philippinen, *N. burkei*, *N. ventricosa*, *N. sibuyanensis*, *N. merrilliana* und *N. bellii* und *N. insignis* aus Neu Guinea gebildet. Die anderen Taxa von Clade 2 bilden 2 Linien. Eine Linie aus Arten von Borneo und Sulawesi (*N. muluensis* und *N. murudensis*, beide Borneo, *N. glabrata* und *N. hamatus*, beide Sulawesi, und *N. tentaculata*, Borneo und Sulawesi) und eine Linie gebildet aus Arten, die von Danser (1928) der Gruppe der Regiae zugeordnet wurden. Die Nachbargruppe zu letzteren besteht in der kombinierten Analyse aus *N. mira* aus Palawan. *N. mira* ist nach der trnK-Intron-Phylogenie der nächste Verwandte zu *N. alata*, von der keine mitochondrialen Sequenzen gewonnen werden konnten. In der kombinierten Analyse sind damit die Taxa der Regiae monophyletisch, während sie in der trnK-Intron-Phylogenie auch *N. alata* und *N. mira* enthalten.

Clade 2 hat einen östlichen Verbreitungsschwerpunkt. Nach Morely und Flenley (1987) existierten wahrscheinlich zwei Landbrücken zwischen Borneo und den Philippinen, eine nördliche über Palawan und eine östliche über Mindanao. *N. mira* (Palawan) und *N. alata* (Luzon) könnten als Verwandte der Regiae Beispiele einer Einwanderung über die nördliche Route von Borneo nach Luzon darstellen. Das Vorkommen der anderen philippinischen Arten von Clade 2 ist als primär anzusehen, da sie die Nachbargruppe zu den übrigen Taxa von Clade 2 bilden. Die Vorläufer der Taxa von Clade 2 besiedelten also die Philippinen und Borneo und breiteten sich von dort aus nach Osten bis nach Neu Guinea (*N. maxima* und *N. insignis*) aus. Die rezente hohe Diversität der *Nepenthaceae* auf Borneo erscheint damit als Ergebnis einer Radiation von Taxa mit einem östlichen Verbreitungsschwerpunkt und der Einwanderung einzelner Taxa ausgehend von der malaiischen Halbinsel (Clade 1).

Clade 3 enthält eine Monophylie von Arten aus Neu Guinea mit *N. tomoriana* aus Sulawesi als Nachbargruppe dazu. Diese Entwicklungslinie hat als einzige ihre höchste Diversität östlich der *Wallace Line* und kann daher als Beispiel einer frühen Ausbreitung nach Osten gewertet werden. *N. danseri* (Waigeo) und *N. vieillardii* (Neu Kaledonien) werden in der trnK-Intron-Phylogenie als Polytomie zu Clade 1, 2 und 3 gestellt, in der kombinierten Analyse zu Clade 2 und 3. Für diese Taxa muß daher eine lange eigenständige Entwicklung angenommen werden. Beide können als Relikt einer schnellen Besiedelung des Archipels gewertet werden, von denen *N. vieillardii* die östliche Grenze des Verbreitungsgebietes markiert.

Aus dem Vergleich der Biogeographie mit der hier vorgestellten Phylogenie der Nepenthaceae lässt sich folgendes Szenario der Evolution der Nepenthaceae ableiten: Ausgehend vom Indischen Subkontinent wurde der malaiische Archipel bis hin nach Neu Kaledonien wahrscheinlich in relativ kurzer Zeit besiedelt. Ein Indiz hierfür ist die mangelnde Auflösung zwischen Clade 1 bis 3 sowie *N. danseri* und *N. vieillardii* in der trnK-Intron-Phylogenie. Nach dieser Besiedlung wurden drei Linien voneinander getrennt, die jeweils einen intensiven Artbildungsprozess durchmachten, eine westliche Linie in Sumatra und der malaiischen Halbinsel, eine östliche auf den Philippinen, auf Borneo und Sulawesi und eine weitere östlich der *Wallace Line* auf Neu Guinea. Nach Diversifizierung der einzelnen Linien breitete sich die westliche Linie nach Borneo aus und brachte einige miteinander verwandte Arten hervor, die große Teile des Areals der Nepenthaceae im malaiischen Archipel besiedeln konnten. Die dritte Linie breitete sich weiter nach Osten aus und erreichte mit einigen Vertretern Neu Guinea.

Abb. 81. (nächste Seite): Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Phylogenie der Nepenthaceae im Vergleich zum Verbreitungsgebiet der untersuchten Taxa. Die Nepenthaceae weisen 3 Entwicklungslinien auf, die unterschiedliche Verbreitungsschwerpunkte haben.



4.4.3 Vergleich der molekularen Phylogenie mit bestehenden taxonomischen Konzepten der Nepenthaceae

Die hier vorgestellte Konsensus-Topologie der trnK-Intron-Phylogenie der Nepenthaceae korreliert teilweise mit dem taxonomischen Konzept der Gattungsgliederung nach Danser (1928; Abb. 82). Polyphyletisch erscheint die Gruppe der Vulgatae mit Vertretern in allen Entwicklungslinien. Hier hat Danser in Ermangelung eindeutiger Merkmale Arten mit einfach strukturierten Kannen in einer wahrscheinlich nicht natürlichen Gruppe zusammengefasst. Die Urceolatae mit *N. bicalcarata* und *N. ampullaria* erscheinen zusammen mit Vertretern der Vulgatae und Nobiles monophyletisch, die Nobiles sind mit *N. hirsuta* und *N. spectabilis* innerhalb Clade 1 polyphyletisch. Zwei Linien innerhalb Clade 1 werden hauptsächlich von Arten der Montanae besetzt. Eine Linie besteht aus den endemisch auf der malaiischen Halbinsel vorkommenden Arten, die anderen aus einer Monophylie innerhalb der endemisch auf Sumatra vorkommenden Arten. Zur zweiten Linie wird auch *N. tobaica* der Vulgatae und *N. spectabilis* gestellt, die von Danser den Nobiles zugeordnet wird und als zwischen den Vulgatae und Montanae vermittelnd angesehen wird.

Dansers Insignes sind mit Vertretern in allen 3 Entwicklungslinien polyphyletisch, allerdings gehören alle Vertreter einer Monophylie um *N. insignis* innerhalb Clade 2 zu dieser Gruppe. Innerhalb Clade 2 lässt sich eine Entwicklungslinie den Regiae zuordnen. Hierzu gehört außerdem *N. alata* der Vulgatae, die nach Danser allerdings einige Merkmale der Regiae aufweist. Ansonsten müssen den Regiae auch 3 Arten von Clade 1 zugerechnet werden.

Als durch die trnK-Phylogenie im Wesentlichen gestützte Gruppe erscheinen die Regiae, in geringerem Maße auch die Montanae, die allerdings zwei getrennte Linien bilden. Die übrigen Gruppen lassen sich durch die trnK-Intron-Topologie nicht stützen. Die Einteilung nach Danser (1928) muss nach seiner eigenen Einschätzung als vorläufig angesehen werden. Ein Vergleich mit der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Phylogenie zeigt, dass diese Einteilung in einigen Ansätzen berechtigt ist, insbesondere im Fall der Regiae, der Montanae, der Urceolatae und in geringem Maße auch der Insignes. Die Nobiles und die Vulgatae erfahren keinerlei Unterstützung durch die trnK-Intron-Phylogenie und der Phylogenie der mitochondrialen Sequenzen.

In neueren Arbeiten über die Nepenthaceae wurde auf umfassende Gattungseinteilungen verzichtet (Jebb und Cheek, 1997; Cheek und Jebb, 2001; Clark, 1997). Allerdings werden in diesen Arbeiten innerhalb der Artbeschreibungen Gruppenbeziehungen begründet, die sich teilweise mit der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Phylogenie decken.

Clade 3 besteht aus einer gut gestützten Entwicklungslinie die durch *N. lamii*, *N. neoguineensis*, *N. spec. nov. 1*, *N. treubiana* und *N. tomoriana* gebildet wird. Augenscheinliche Verwandtschaftsbeziehungen von *N. treubiana* zu Arten aus Sumatra (Danser 1928; Cheek und

Jebb, 2001) oder von *N. tomoriana* zu *N. bellii* oder *N. danseri* (Jebb und Cheek, 1997) können durch die molekulare Analyse nicht bestätigt werden.

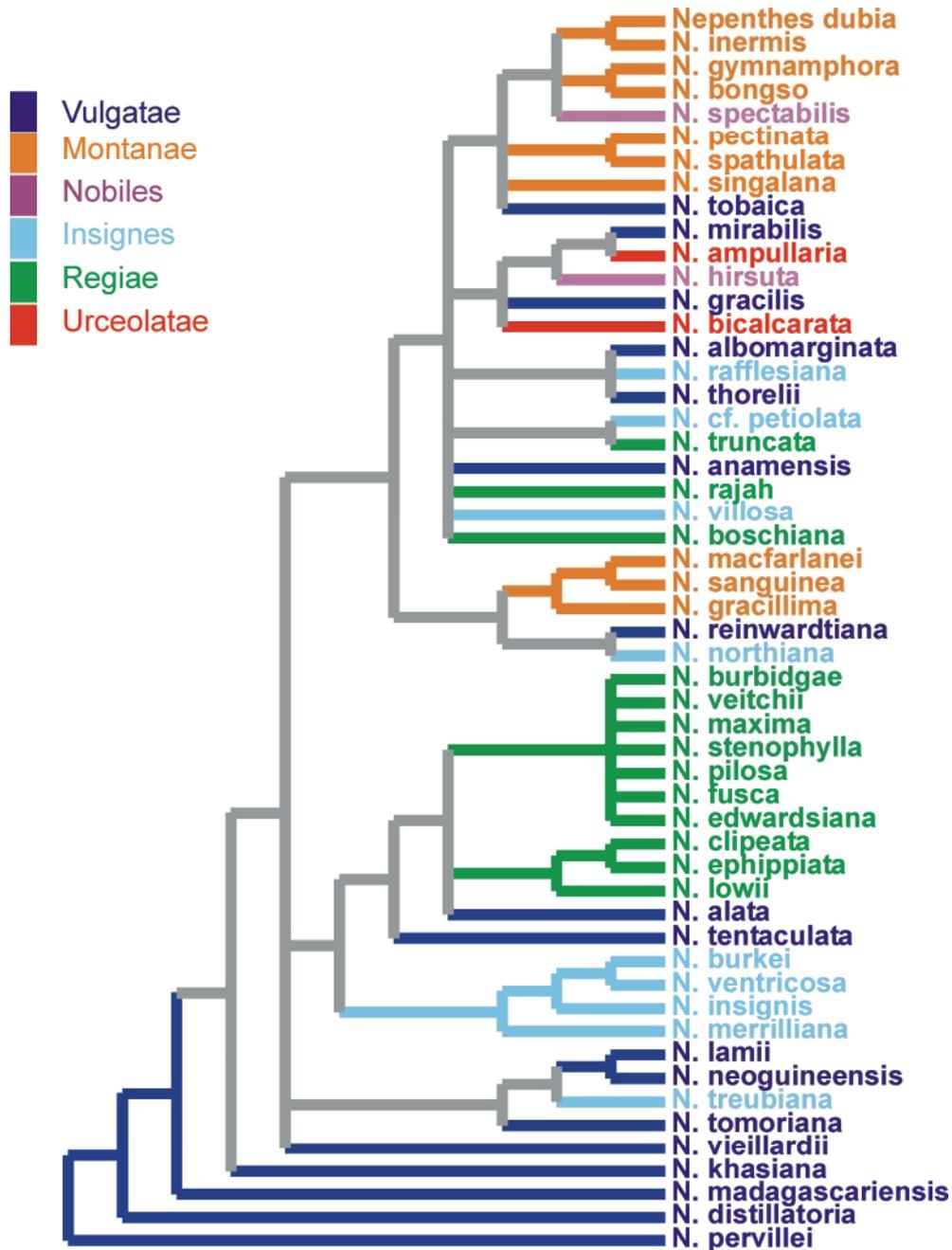


Abb. 82. Die trnK-Intron-Phylogenie reduziert auf die von Danser (1928) anerkannten Arten und Vergleich mit seinem taxonomischen Konzept der Nepenthaceae.

Innerhalb Clade 2 besteht eine Monophylie von Arten *N. bellii*, *N. merrilliana*, *N. sibuyanensis*, *N. ventricosa*, *N. burkei* und *N. insignis*. Die Arten dieser Monophylie werden von Cheek und Jebb (2001) als Insignis-Gruppe bezeichnet, angelehnt an Dansers Insignes, aber

ohne Berücksichtigung der Arten der Insignes von Sumatra. Von keiner der Arten der Insignis-Gruppe konnte die mitochondriale Sequenz amplifiziert werden. *N. merrilliana* und *N. bellii* sind Endemiten des Nordostens von Mindanao und stellen eine Schwestergruppe zu den nördlich davon verbreiteten Taxa, *N. ventricosa* (Luzon), *N. burkei* (Mindoro und Palay), *N. sibuyanensis* (Sibuyan) und *N. insignis* (Neu Guinea) dar. Dabei sind *N. ventricosa* und *N. burkei* auf der einen Seite und *N. merrilliana* und *N. bellii* auf der anderen Seite jeweils sequenzgleich. Vor allem im Falle von *N. merrilliana* und *N. bellii* kann wegen der sympatrischen Verbreitung eine Verwechslung oder eine Introgression des trnK-Introns nicht ausgeschlossen werden. Die Monophylie bestätigt aber die von Cheek und Jebb (2001) angenommene Insignis-Gruppe.

Eine Monophylie innerhalb Clade 2 wird durch die Arten *N. tentaculata*, *N. hamata*, *N. glabrata*, *N. muluensis* und *N. murudensis* gebildet. Diese Monophylie ist sehr hoch gestützt durch beide untersuchten Genorte. Im Pseudogen ist diesen Arten eine Deletion von ca. 600 Basen gemeinsam. *N. tentaculata* stellt die am weitesten verbreitete Art dieser Monophylie dar mit Vorkommen in den meisten montanen Regionen auf Borneo sowie auf Sulawesi. Sie erscheint in der kombinierten Analyse als Schwesterntaxon zu *N. muluensis* (montane Regionen in Sarawak, Nord Borneo) und *N. murudensis*, ein Endemit mit eingeschränktem Areal in Sarawak, Nord Borneo (Mt. Murud). Die Arten dieser Monophylie mit auf Sulawesi beschränktem Areal, *N. hamata* und *N. glabrata*, werden von den übrigen abgesetzt. Aufgrund einer Reihe gemeinsamer Merkmale werden *N. tentaculata*, *N. muluensis*, *N. hamata* und *N. glabrata* von Cheek und Jebb (2001) zur Tentaculata-Gruppe zusammengefasst. *N. murudensis* wird von Cheek und Jebb (2001) als möglicher Hybrid zwischen *N. rafflesiana* und *N. tentaculata* angesehen. Aufgrund der vorliegenden Arbeit erscheint *N. murudensis* aber näher verwandt mit *N. muluensis* als mit *N. tentaculata*. Sie weist im trnK-Intron 5 und in der mitochondrialen Sequenz 12 Unterschiede zu *N. muluensis* auf, zu *N. tentaculata* 6 bzw. 17. Für *N. adnata* (Sumatra) nehmen Cheek und Jebb (2001) ebenfalls eine nahe Verwandtschaft zu den Arten der Tentaculata-Gruppe an, schließen aber auch eine konvergente Entwicklung nicht aus, da *N. adnata* sich in einer Reihe von Charakteren von den anderen Arten unterscheidet. Einer Zugehörigkeit von *N. adnata* zur Tentaculata-Gruppe wird durch beide vorliegenden molekularen Datensätze widersprochen. Eine wie in Cheek und Jebb (2001) erwähnte Tentaculata Gruppe wird mit den vorliegenden Datensätzen unterstützt, mit den Arten *N. hamata*, *N. glabrata*, *N. muluensis* und *N. tentaculata* unter Einbeziehung von *N. murudensis* und Ausschluss von *N. adnata*.

Cheek und Jebb (2001) erwähnen in den Artbeschreibungen die Maxima-Gruppe, die im Wesentlichen Dansers Regiae entspricht. Genannt werden hier *N. burbidgeae*, *N. clipeata*, *N. eymae*, *N. faizaliana*, *N. fusca*, *N. maxima*, *N. pilosa* und *N. stenophylla* und *N. veitchii* und *N. klossii* (in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht). Gewisse Ähnlichkeiten zu dieser Gruppe werden *N. truncata* und *N. alata* zugeschrieben, ebenso wie zwischen *N. boschiana* und *N.*

stenophylla. *N. alata* teilt mit den Taxa der Maxima-Gruppe einen auffälligen Anhang des Kannendeckels. Nach Danser gehören zu den Regiae außerdem *N. lowii* und *N. ehippiata*, sowie *N. rajah* und *N. boschiana*. In der Rekonstruktion des kombinierten Datensatzes, sowie der beiden einzelnen Datensätze bilden *N. clipeata*, *N. ehippiata* und *N. lowii* eine Monophylie, wobei *N. lowii* das Schwestertaxon zu den beiden anderen Taxa darstellt. Von *N. clipeata* und *N. lowii* wurde zur Überprüfung dieser Beziehung das trnK-Intron von jeweils 2 Individuen unterschiedlicher Herkunft analysiert. Cheek und Jebb (2001) sehen in *N. lowii* und *N. ehippiata* Schwesterarten, wobei *N. ehippiata* *N. lowii* in Zentral-Kalimantan ersetzt. Dies wird durch beide Datensätze gestützt, allerdings ist aufgrund der molekularen Analysen davon auszugehen, dass *N. clipeata* zu diesen Arten nah verwandt ist. Die Zugehörigkeit von *N. rajah* und *N. boschiana* zur Maxima-Gruppe wird nicht gestützt. Von *N. rajah* wurden zur Kontrolle ebenfalls 2 Individuen untersucht. Die von Cheek und Jebb (2001) erwähnte Maxima-Gruppe erscheint in der molekularen Analyse monophyletisch, wenn entweder Cheek und Jebb (2001) ausgeschlossen oder *N. lowii* und *N. ehippiata* in die Gruppe eingeschlossen wird. Allerdings wird auch *N. edwardsiana* in der trnK-Analyse in diese Gruppe gestellt. Cheek und Jebb (2001) sehen *N. edwardsiana* in der Nähe von *N. villosa*, was durch auffällige Bildungen des Peristoms angezeigt ist. Die mitochondrialen Sequenzen ließen sich im Gegensatz zu den anderen Arten der Maxima-Gruppe von *N. edwardsiana* nicht amplifizieren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass hier eine Introgression einer der Taxa der Maxima-Gruppe ähnlichen plastidären Sequenz vorliegt.

In der trnK-Intron Analyse wird *N. alata* mit *N. mira* als Schwestertaxon als Polytomie innerhalb der Maxima-Gruppe positioniert. *N. alata* hat einige Merkmale mit den Arten der Maxima-Gruppe gemeinsam, *N. mira* wird von Cheek und Jebb (2001) aber in die Nähe von *N. villosa* gestellt. In der gemeinsamen Analyse und der Analyse der mitochondrialen Sequenzen bildet *N. mira* die Nachbargruppe zu den Taxa der Maxima-Gruppe (von *N. alata* konnte das mitochondriale Pseudogen nicht amplifiziert werden). *N. alata* und *N. mira* könnten damit zur Maxima-Gruppe gezählt werden. Sie werden aufgrund der Position von *N. mira* als potentielle Nachbargruppe zur Maxima-Gruppe angesehen.

Mit dem Vorbehalt der Position von *N. alata* und *N. mira*, sowie *N. edwardsiana*, kann nach den hier vorliegenden molekulare Analysen die von Cheek und Jebb (2001) postulierte Maxima-Gruppe bestätigt werden (vgl. Tab. 19). Die Gruppe läßt sich aufgrund der vorliegenden molekularen Daten in die Untergruppen Maxima, Clipeata und Alata gliedern.

Die endemischen Arten der malaiischen Halbinsel *N. macfarlanei*, *N. ramispina*, *N. sanguinea* und *N. gracillima* bilden in der trnK-Intron- und trnK-Pseudogen-Phylogenie innerhalb Clade 1 eine Monophylie, die zusammen mit einigen anderen Arten als Schwestergruppe zu den übrigen Arten von Clade 1 positioniert wird. Danser (1928) ordnet diese Arten seinen Montanae zu. Cheek und Jebb (2001) fassen sie zwar nicht zu einer Gruppe zusammen,

erwähnen aber ihre Ähnlichkeit untereinander, vor allem zwischen *N. gracillima* und *N. ramispina*. Es handelt sich bei allen Arten um solche der montanen Regionen, die im Falle *N. sanguinea* Südthailand erreichen. Die einzige weitere Art die anscheinend in ihrer Verbreitung auf die malaiische Halbinsel beschränkt ist, ist *N. benstonei*. Sie kommt allerdings in tieferen Lagen vor und zeigt in der molekularen Phylogenie auch keine näheren Beziehungen zu den montanen Arten dieser Region. *N. macfarlanei* und *N. ramispina* zeigen keinen Unterschied in der Basenabfolge des trnK-Introns, in der mitochondrialen Sequenz zwei Unterschiede. Die anderen Arten dieser Gruppe haben einen paarweisen Unterschied in beiden Genorten von jeweils 6-8 bp. Es ist nicht ausgeschlossen, dass bei der für *N. ramispina* verarbeiteten Probe nach Introgression ein Plastom von *N. macfarlanei* vorliegt. Die sowohl von Cheek und Jebb (2001) sowie von Danser (der *N. ramispina* mit *N. gracillima* synonymisierte) angenommene nähere Verwandtschaft zwischen *N. ramispina* und *N. gracillima* als zwischen *N. ramispina* und *N. macfarlanei* kann damit nicht ausgeschlossen werden. Zu dieser Gruppe gehört auch die noch nicht beschriebene *N. spec. nov 3* (gesammelt und bestimmt von H. Rischer).

Alle Arten, deren Verbreitungsgebiet auf Sumatra beschränkt ist, außer *N. mikei*, werden zusammen mit *N. gymnamphora* aus Java in der trnK-Intron-Phylogenie zu einem Clade zusammengefasst. In der kombinierten Analyse beider untersuchter Genorte bleibt dieser Clade zwar erhalten, lässt sich durch die mitochondrialen Sequenzen aber nur durch Homoplasien stützen. Allerdings ist auffällig, dass sich hier nahezu alle auf Sumatra (bzw. mit *N. gymnamphora* auf Java) endemischen Arten finden, wobei von den 19 Arten 17 montane Arten mit teilweise sehr begrenzter Verbreitung und nur zwei, *N. sumatrana* und *N. eustachya*, Tieflandarten mit weiterer Verbreitung darstellen. Die Arten dieser Gruppe, die von Danser erkannt wurden, stellte er bis auf *N. spectabilis* und *N. tobaica* in die Montanae, zusammen mit den montanen Arten der malaiischen Halbinsel. Cheek und Jebb (2001) fassen die Arten *N. bongso*, *N. aristolochioides*, *N. diatas*, *N. densiflora*, *N. ovata*, *N. singalana* und *N. spathulata* zur Singalana- oder Sumatra-Gruppe zusammen. Durch trnK-Intron- und Pseudogen-Sequenzen werden eine engere Beziehung zwischen *N. diatas*, *N. densiflora*, *N. singalana* auf der einen Seite und *N. aristolochioides*, *N. talangensis* und *N. spathulata* auf der anderen Seite gestützt. *N. talangensis* wird von Cheek und Jebb (2001) als Synonym zu *N. bongso* behandelt, die in der molekularen Analyse das Schwestertaxon zu *N. gymnamphora* bildet. Die Sumatra-Gruppe nach Cheek und Jebb (2001) ist aufgrund der molekularen Daten paraphyletisch. Die Einbeziehung der anderen Arten der Monophylie, die die Arten der Sumatra-Gruppe enthalten, sollte geprüft werden (vgl. Tab. 19).

Tab. 19. Aufstellung der von Cheek und Jebb (2001) aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten angenommene natürliche Gruppen innerhalb der Nepenthaceae. Angegeben sind die Arten die von Cheek und Jebb (2001) für diese Gruppen angenommen wurden und die Gruppenzugehörigkeit wie sie durch die molekularen Daten nahelegen. Arten deren Gruppenzugehörigkeit zweifelhaft ist sind in Klammern gesetzt.

	trnK-Intron	Cheek & Jebb		trnK-Intron	Cheek & Jebb
Insignis-Gruppe	N. bellii N. merrilliana N. sibuyanensis N. insignis N. ventricosa N. burkei	N. bellii N. merrilliana N. sibuyanensis N. insignis N. ventricosa N. burkei	Gracillima-Gruppe	N. gracillima N. macfarlanei N. ramispina N. sanguinea N. spec. nov. 3	-
Tentaculata-Gruppe	N. hamata N. glabrata N. muluensis N. tentaculata N. murudensis	N. hamatus N. glabrata N. muluensis N. tentaculata N. adnata	Villosa-Gruppe	N. villosa N. macrophylla (N. rajah)	N. villosa N. macrophylla N. edwardsiana N. mira
Maxima-Gruppe	Untergruppe Maxima: N. burbidgeae N. faizaliana N. fusca N. maxima N. stenophylla N. veitchii N. pilosa N. eymae N. spec nov2 (N. edwardsiana) Untergruppe Clipeata: N. clipeata N. ephippiata N. lowii Untergruppe Alata: N. mira N. alata	N. burbidgeae N. clipeata N. eymae N. faizaliana N. fusca N. maxima N. pilosa N. stenophylla N. veitchii N. klossii (N. truncata) (N. alata) (N. boschiana)	(Singalana) Sumatra-Gruppe	N. lavicola N. xiphioides N. tobaica N. densiflora N. singalana N. diatas N. spathulata N. pectinata N. talangensis N. aristolochioides N. eustachya N. spectabilis N. longifolia N. sumatrana N. ovata N. rhombicaulis N. adnata N. bongso N. gymnamphora N. inermis N. dubia	N. bongso N. aristolochioides N. diatas N. densiflora N. ovata N. singalana N. spathulata

Cheek und Jebb (2001) erwähnen in den jeweiligen Artbeschreibungen eine Villosa-Gruppe, zu der sie *N. villosa*, *N. macrophylla*, *N. edwardsiana* und *N. mira* zählen. *N. villosa* bildet in der kombinierten Analyse zusammen mit *N. macrophylla* und *N. rajah* innerhalb Clade 1 eine Monophylie. Diese wird durch Daten des trnK-Introns nur durch eine Homoplasie gestützt, aber durch 2 Synapomorphien der mitochondrialen Sequenzen. *N. mira* und *N. edwardsiana* erscheinen innerhalb oder als Nachbartaxon der Maxima-Gruppe. Eine Verwandtschaft zwischen *N. macrophylla* und *N. villosa* ist damit durch die Pseudogen-Phylogenie angezeigt,

was auch die Einschätzung von Clark (1997) widerspiegelt. *N. rajah* wurde von Danser in seine Regiae einbezogen, Cheek und Jebb (2001) postulieren zu dieser Art keine Verwandtschaftsbeziehung. Da diese Gruppe, ebenso wie die Maxima-Gruppe, auf Borneo vorkommt ist horizontaler Gentransfer zwischen beiden Gruppen nicht ausgeschlossen.

4.5 Evolution der carnivoren Taxa der Caryophyllidae

4.5.1 Südostasien als sekundäres evolutives Zentrum der Nepenthaceae

Hypothesen über den Ursprung von Gruppen, die in der vorliegenden Arbeit als Teil der carnivoren Taxa der Caryophyllidae gezeigt werden konnten, wurden bisher für die Droseraceae und die Nepenthaceae formuliert. Die Droseraceae zeigen mit Diversitätszentren in Australien, Südamerika und, in geringerem Maße, Südafrika eine Verbreitung wie sie von im westlichen Gondwana entstandenen Gruppen angenommen wird (Williams *et al.*, 1994). Eine Verbindung zwischen Australien und Südamerika, um die Disjunktion ohne Annahme von Fernverbreitung zu erklären, war wahrscheinlich bis zu Beginn des Tertiärs existent (Schuster, 1976), ein Florenaustausch temperater Formen eventuell bis ins mittlere Eozän möglich (Raven und Axelrod, 1974). Die Nepenthaceae, Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae sind paläotropische Familien, deren Fehlen in der Neotropis mit dem Kappen transatlantischer Ausbreitungsmöglichkeiten vor ihrer Entstehung begründet werden kann (Takhtajan, 1973).

Danser (1928) nahm aufgrund der Biogeographie einen Ursprung der Nepenthaceae im östlichen Gondwana an, im Bereich der indischen Platte. Demnach hat sich *Nepenthes* vor der Trennung der madagassischen und indischen Platte entwickelt. Bei der Nordverlagerung der Indischen Platte blieben die *Nepenthes*-Taxa aus Madagaskar und den Seychellen als Relikte zurück, während nach dem Entstehen von Landverbindungen zwischen Indien und Laurasien *Nepenthes* den malaiischen Archipel besiedelte. Nach Krutzsch (1988) war *Nepenthes* ein Element der immergrünen Flora der Nordtethys. Von dort breitete sich *Nepenthes* nach Osten aus und bildete in der malesischen Florenregion ein zweites evolutives Zentrum von wo es sich bis nach Madagaskar ausbreitete. Die Hypothese nach Danser läßt sich in seiner ursprünglichen Form nicht durch die molekularen Daten stützen. Die Taxa *N. distillatoria* aus Sri Lanka und *N. pervillei* von den Seychellen sind den Nachbargruppen der Nepenthaceae näher verwandt als die madagassischen Arten *N. madagascariensis* und *N. masoalensis*. Die Diversifizierung in diese Arten müsste daher zum Zeitpunkt der Disjunktion abgeschlossen gewesen sein. Geht man von einem Ende der Landverbindung zwischen Indien und Madagaskar vor ca. 88 Mio. Jahren aus (Storey, 1995) müßte für das Szenario von Danser ein zu hohes Alter für die Nepenthaceae angenommen werden. Die madagassischen Arten stellen also kein Gondwana-Relikt dar.

Zur Rekonstruktion der Phylogenie der Nepenthaceae aufgrund des trnK-Intron-Datensatzes werden ca. 25 % der Anzahl der Mutationsschritte, die die Nepenthaceae vom letzten gemeinsamen Vorfahren mit der Nachbargruppe maximal trennen, für die Rekonstruktion der Phylogenie der rezenten Nepenthaceae angenommen. Die Mutationsschritte sollten bei nicht zu großen Schwankungen der Mutationsrate annähernd proportional zur Dauer der Evolution sein. Bei Annahme des Beginns der Diversifizierung zur Zeit der Abtrennung der madagassischen Platte von der indischen ergäbe sich ein Alter der Nepenthaceae von ca. 300 Mio. Jahren, ein Alter für das nach Kadereit (2002) der Ursprung der Angiospermen angenommen wird, während die ersten Fossilien der Angiospermen auf ca. 140 Mio. Jahre, der frühen Kreide datiert werden. Auch unter der Annahme, dass bis zum Zeitpunkt der Ankunft der Indischen Platte in Laurasien, nach Raven und Axelrod (1974), vor 45 Mio. Jahren ein Austausch zwischen Madagaskar und Indien möglich war, wären die Nepenthaceae mit 180 Mio. Jahren sehr alt. Die molekularen Daten unterstützen daher die Hypothese, dass *Nepenthes* sich ausgehend von der indischen Platte nach Madagaskar und auf die Seychellen verbreitet hat.

Die madagassische Flora hat eine hohe Affinität zur malesischen Flora (Aubreville, 1969), und es gibt eine Reihe von Gattungen mit einer ähnlichen Verbreitung wie *Nepenthes*, mit einem Hauptverbreitungsgebiet in Südostasien und einem disjunktem Vorkommen in Madagaskar (Schatz, 1996). Diese Disjunktion wurde auch mit der Existenz von Landbrücken zwischen Sri Lanka und Madagaskar erklärt (van Steenis, 1962). Die Existenz dieser „Lemurian-Stepping-Stones“, die zur Erklärung der Verbreitung ursprünglicher Primaten postuliert wurden, wurde zwar zwischenzeitlich verworfen, von Haq *et al.* (1988) aber wieder aufgegriffen. Schatz (1996) vermutet, dass durch das Absinken des Meeresspiegels im Oligozän vor ca. 30 Mio. Jahren weite Teile des Plateaus der heutigen Chagos- und Lakkadiven-Inseln sowie des Maskarenen-Plateaus (mit den heutigen Inseln der Seychellen und Mauritius) über dem Meeresspiegel lagen und als Stepping-Stones für eine Ausbreitung zwischen Indien und Madagaskar dienten (diese Gebiete haben heute eine Wassertiefe von ca. 75 m). Dadurch ließe sich das Areal der Nepenthaceae erklären, ohne Fernverbreitung annehmen zu müssen. In welchem Ausmaß die Samen von *Nepenthes* zur Fernverbreitung geeignet sind ist schwer abzuschätzen. Nach Clark (1997) überwinden sie als windverbreitete Samen selten mehr als ein paar Kilometer. Dazu kommt, dass *Nepenthes* als diözische Pflanzen zur Besiedelung disjunkter Areale durch Fernverbreitung eher ungeeignet sind, da zur Etablierung einer Population immer mehr als ein Verbreitungsereignis in kurzer Zeit erfolgen muß. Dies erklärt auch warum sehr viele Spezies Lokal-Endemiten montaner Regionen sind, auf benachbarten Bergen aber fehlen. Die auf Fernverbreitung beruhende Hypothese, die Nepenthaceae hätten sich im Bereich ihres heutigen Diversitätszentrum entwickelt und von dort aus bis nach Madagaskar ausgebreitet (Raven und Axelrod, 1974), ist aus diesem Grund unwahrscheinlich. Sie wird auch nicht durch die molekularen Daten gestützt. Dennoch zeigen einige Arten Möglichkeiten zur Verbreitung zumindest über kürzere Entfernungen. So besiedelt *N. mira-*

bilis den gesamten malaiischen Archipel und *Nepenthes* konnte mehrmals die *Wallace Line* zwischen Sulawesi und Neu Guinea überwinden.

Die Nepenthaceae weisen alle eine hohe Chromosomenzahl von $2n=80$ auf (Heubl und Wistuba, 1995), was auf einen hohen Ploidie-Grad (8x oder 16x) hinweist. Fast alle Arten können Hybride untereinander bilden (Phillips und Lamb, 1996) und scheinen damit eher relativ junge Derivate zu sein. Dies zusammen mit der Tatsache der morphologischen Ähnlichkeit deutet daraufhin, dass es sich bei *Nepenthes* um Paläopolyploide handelt, deren diploide Vertreter und Vertreter mit einem niedrigeren Ploidie-Niveau ausgestorben sind. Die Diversität der Vorfahren der Nepenthaceae scheint zwischenzeitlich stark abgenommen zu haben, so dass eine zweite Diversifizierung auf einem höheren Ploidie-Level stattfand. Darauf deutet auch die Anzahl der Mutationsschritte hin, mit denen die rezenten Nepenthaceae voneinander getrennt sind hin. Diese ist im Vergleich zu der Anzahl der Mutationsschritte, die für die Trennung der Nepenthaceae von ihren nächsten Verwandten angenommen wird, sehr niedrig. So ist auch die Dislokation des *trnK*-Introns in das Mitochondrium ein monophyletisches Ereignis, welches zu einem Zeitpunkt stattfand, der 35-40% hinter der Zeit der Abspaltung der Nepenthaceae zurückliegt. Die Dislokation ist als ein einmaliges Ereignis einzustufen, so dass die Nepenthaceae entweder von einem zu dieser Zeit lebenden Vorfahren abstammen, oder sich durch *lineage sorting* eine zu diesem Zeitpunkt entstandene Mitochondrienlinie in einer größeren Population durchgesetzt hat. Die Vertreter der Populationen oder Arten, die diesen Mitochondrien-Typ nicht aufwiesen, wären dann zwischenzeitlich ausgestorben. Die Existenz mehrerer polyphyletischer Linien von sehr unterschiedlichen ITS-Pseudogenen in mehreren Arten der Nepenthaceae lassen auf einen allopolyploiden Vorfahren aller rezenten Nepenthaceae schließen (vgl. Kapitel 4.1.2). Die rezenten Nepenthaceae erscheinen, ungeachtet ihres Ursprungs als Mitglieder eines zweiten evolutiven Zentrums, wobei die im Westen überdauernden Arten wahrscheinlich Paläorelikte eines vormals weiter westlich liegenden Areals darstellen. Dies entspricht der Hypothese von Krutzsch (1988), der ein zweites evolutives Zentrum der Nepenthaceae in Asien annahm.

4.5.2 Evolution der Nepenthaceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae und Drosophyllaceae

Die Frage nach der Herkunft der Nepenthaceae kann nur gemeinsam mit ihren Nachbargruppen den Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae, Drosophyllaceae und Droseraceae beantwortet werden. Die Familie der Dioncophyllaceae besteht aus drei monotypischen Gattungen, die eine reliktdäre Verbreitung in Westafrika haben. Die Drosophyllaceae haben ein reliktdäres Areal in Südspanien und Marokko. Nur die Ancistrocladaceae haben eine weitere Verbreitung mit einem Diversitätszentrum in West- und Zentralafrika und einem in Südostasien (siehe Kapitel 4.3). Sie reichen dort südlich bis Südsumatra und Borneo. Die Ancistrocladaceae sind

wie die Nepenthaceae eine abgeschlossene Gruppe, die untereinander verhältnismäßig ähnliche Sequenzen aufweisen.

4.5.2.1 Abschätzung des Alters der betreffenden Gruppen

Für eine Altersbestimmung mit Hilfe der „molekularen Uhr“ ist eine Kalibrierung der Mutationsrate in der Regel aufgrund von datierten Fossilien nötig. Die Fossilien müssen aufgrund von Merkmalen sicher einem Clade zuordenbar sein und sollten auch Synapomorphien zu einem seiner Subclades aufweisen, damit ausgeschlossen ist, dass das Fossil nicht einer ausgestorbenen Nachbargruppe zuzuordnen ist (Renner *et al.*, 2001). Nur die Droseraceae sind fossil gut belegt (Cameron *et al.*, 2002), allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit zu wenige Taxa der Droseraceae einbezogen, um eine Kalibrierung vornehmen zu können. Von den Nepenthaceae und Dioncophyllaceae liegen Fossilien aus dem Eozän Laurasiens vor. Es kann aber nicht entschieden werden, ob diese Fossilien einem ausgestorbenen Mitglied der rezenten Familien zuzuordnen sind oder einem Vorfahren oder einer Nachbargruppe, die mittlerweile ausgestorben ist. Das Zeitfenster, das für eine Kalibrierung herangezogen werden müsste, ist daher zu groß. Das Alter der Gruppen lässt sich aber an Hand der Schrittlängen, die in der phylogenetischen Rekonstruktion angenommen werden, ungefähr abschätzen.

Für die Droseraceae sind Pollenfunde aus verschiedenen Schichten weltweit häufig (Krutzsch, 1985). Die Gattung *Aldrovanda* (Droseraceae) ist bis ins untere Tertiär fossil mit Pollen und Samen belegt, *Dionaea* aus dem Miozän und Pliozän Europas (Cameron *et al.*, 2002). Beide Taxa bilden eine Monophylie und bilden die Nachbargruppe der übrigen Droseraceae, eine Beziehung, die von Cameron *et al.* (2002) bestätigt wurde. Der Ursprung der Droseraceae könnte daher bis in die Kreide zurückreichen. Cameron *et al.* (2002) sieht die Möglichkeit dieses hohen Alters als Unterstützung einer Hypothese des gondwanischen Ursprungs der Droseraceae und Nepenthaceae an. Die Fossilien der Dioncophyllaceae und Nepenthaceae stammen jedoch aus Eurasien, die Pollenfunde von *Nepenthes* aus dem Eozän Mitteleuropas (Frankreich bis Kaukasus; Krutzsch, 1989), der als *Dioncophyllites* geführte Samen stammt aus Sibirien (Amur-Region; Fedotov, 1980). Geht man von einem gondwanischen Ursprung der carnivoren Taxa der Caryophyllidae aus, muß bereits im Eozän, also vor ca. 50-35 Mio. Jahren, eine so hohe Diversität der beiden Familien geherrscht haben, dass sie sich bis in die Nordtethys ausbreiteten. In diesem Fall sollte der Split zwischen *Nepenthes* auf der einen Seite und Drosophyllaceae, Dioncophyllaceae und Ancistrocladaceae auf der anderen Seite zum Zeitpunkt der Trennung von West- und Ost-Gondwana, bzw. der Trennung der indischen Platte von der afrikanischen, erfolgt sein, der nach Raven und Axelrod (1974) in der mittleren Kreide (vor ca. 100 Mio. Jahren) stattfand. Im heutigen Afrika, das vor 90 Mio. Jahren von Südamerika getrennt wurde, entwickelten sich dann die drei afrikanischen Familien der Entwicklungslinie und breiteten sich im Eozän bis in die Nordtethys aus. Nach dem Szenario von Krutzsch (1988) könnte die frühe Evolution aller 4 Linien in West-Gondwana stattgefunden

haben. Darauf deuten Pollenfunde aus der oberen Kreide Afrikas und Südamerikas hin, die als *Droseridites senonicus* bezeichnet werden. Die Einordnung dieser Pollen ist allerdings unsicher. Sie könnten auch frühen Palmen zugerechnet werden. Für den Split zwischen Nepenthaceae und Dioncophyllaceae müsste aufgrund der Fossilien ein Alter von mindestens 40 Mio. Jahren angenommen werden, wegen der großen Unterschiede zwischen Nepenthaceae und Dioncophyllaceae, erscheint die Annahme eines höheren Alters aber angebracht.

Eine weitere Möglichkeit das Alter der Nepenthaceae abzuschätzen besteht im Vergleich ihrer Phylogenie mit den Annahmen zur Entwicklung des indomalaiischen Archipels. Nach Hall (2001) entstand der Archipel während des Miozäns durch das Zusammenspiel einer Reihe tektonischer Ereignisse. Während in der Mitte des Oligozäns der Sundaschelf eine geschlossene Landmasse darstellte, reichten nur einige Ketten vulkanischer Inseln nach Osten. Diese, aufgrund vulkanischer Aktivität am Rand der Subduktionszonen angenommenen Regionen von potentiellen Inselketten (Macpherson und Hall, 2002), umschlossen auch die Salomoninseln. Neu Guinea hatte den Archipel noch nicht erreicht. Die Ausbildung von größeren Landgebieten zwischen dem Sundaschelf und Neu Guinea fand nach Hall (2001) erst vor ca. 10 Mio. Jahren statt. Für diesen Zeitraum wird von Hall (2001) eine erleichterte Ausbreitung über die *Wallace Line* nach Osten angesehen, der Grenze zwischen eurasischen und australischen biogeographischen Regionen. Im Gegensatz dazu werden von Morely (1998) Ausbreitungsereignisse verschiedener Pflanzengruppen bereits für das frühe Miozän (20 Mio. Jahre) angenommen. Aufgrund der trnK-Intron-Phylogenie läßt sich ableiten, dass die Nepenthaceae den Archipel mit drei Entwicklungslinien besiedelten, von denen die heute östlich der *Wallace Line* beheimatete sich zu gleicher Zeit oder nur wenig später abspaltete als die beiden anderen Linien. Die *Wallace Line* wurde damit ziemlich früh in der Evolution der Nepenthaceae in Südostasien überschritten, so dass für die südostasiatischen Nepenthaceae ein Alter von 20-10 Mio. Jahren angenommen werden kann. Für alle rezenten Nepenthaceae ergibt sich damit ein Alter von ca. 34-17 Mio. Jahren. Dieses Alter erlaubt die Annahme einer Ausbreitung nach Madagaskar über Stepping-Stones wie sie von Schatz (1996) für das mittlere Oligozän angenommen wurden.

Die sich aus den oben ausgeführten verschiedenen Szenarien im Vergleich zu den Schrittlängen der phylogenetischen Rekonstruktion der trnK-Intron-Sequenzen ergebenden Altersabschätzungen der einzelnen Gruppen sind in Tab. 20 wiedergegeben. Als Anhaltspunkte wurden der Split von West- und Ost-Gondwana, die Datierung der Fossilien und die sich aus der Palaeogeographie nach Hall (2001) ergebenden Zeiträume angenommen. Die Mutationsraten der als Lianen wachsenden Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae und Nepenthaceae könnten untereinander vergleichbar sein. Die Schrittlängen, die für die Abtrennung der Droseraceae angenommen werden, sind wahrscheinlich etwas zu hoch. In Abb. 83 ist ein schematisiertes Phylogramm einer Analyse des trnK-Introns aller in der vorliegenden Arbeit

untersuchten Gruppen im Vergleich zu den Zeiträumen, die sich aus der Annahme der Isolierung der Nepenthaceae auf der indischen Platte ergeben.

Tab. 20. Aus den Schrittlängen der phylogenetischen Rekonstruktion abgeleitete Schätzung des Alters der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gruppen. Als Referenzzeitpunkte wurden verwendet: 1: Die von Hall (2001) und Morely (1998) angenommenen minimalen Ausbreitungsbarrieren an der *Wallace Line* vor ca. 20 bzw. 10 Mio. Jahren, als Zeitpunkt der Aufspaltung der Südostasiatischen Nepenthaceae in mehrere Entwicklungslinien. 2: Die Datierung der Fossilfunde von *Nepenthes* und *Dioncophyllum* (Fossilien aus dem Eozän, Annahme des Splits zwischen Nepenthaceae und Dioncophyllaceae für den Beginn des Eozäns); 3: Trennung von Afrika und Indien vor ca. 100 Mio. Jahren nach Raven und Axelrod (1974) als Zeitpunkt der Trennung zwischen den Nepenthaceae und ihren Nachbargruppen.

Split	Vor Mio. Jahren		
	1	2	3
Isolierung Droseraceae	153-75	75	140
Isolierung Nepenthaceae	110-55	53	100
Isolierung Drosophyllaceae	70-35	36	63
Split Dioncophyllaceae / Ancistrocladaceae	38-19	20	33
Alter des trnK-Pseudogens Nepenthaceae	46-23	24	42
Alter rezente <i>Ancistrocladus</i> -Taxa	14-7	7	12
Alter rezente <i>Nepenthes</i> -Taxa	34-17	17	30
Alter Nepenthaceae aus SE-Asien	20-10	10	18
Alter Clade 1	12-6	6	11
Alter Clade 2	16-8	8	14
Alter Clade 3	10-5	5	9

Die Ancistrocladaceae sind nach diesen Schätzungen mit einem Alter von 14-7 Mio. Jahren eine verhältnismäßig junge Gruppe. Die ITS-Daten der Ancistrocladaceae zeigen die asiatischen Vertreter (*A. hamatus*, *A. griffithii*) und die ostafrikanischen Vertreter (*A. robertsonianorum* und *A. tanzaniensis*) als Polytomie zu den übrigen Ancistrocladaceae. Die Anzahl möglicher Synapomorphien zwischen *A. griffithii*, *A. hamatus* und den übrigen asiatischen Taxa ist sehr niedrig und die Sequenzen von *A. griffithii* und *A. robertsonianorum* sind sich untereinander ähnlicher als zu den anderen Sequenzen. Dies deutet auf eine sehr rasche Trennung von afrikanischen und asiatischen Linien hin. Entweder erfolgte die Ausbreitung von Afrika nach Asien sehr schnell oder ein vormals zusammenhängendes Verbreitungsgebiet wurde fragmentiert und die Linien dadurch mehr oder weniger zeitgleich voneinander getrennt. Dies könnte beispielsweise durch gleichzeitige Einwanderung von laurasischen Vertretern nach Afrika und nach Asien geschehen sein. Nach Aussterben der Ausgangspopulationen verblieben geographisch getrennte Populationen, von denen einige sich in neue Arten aufspalteten.

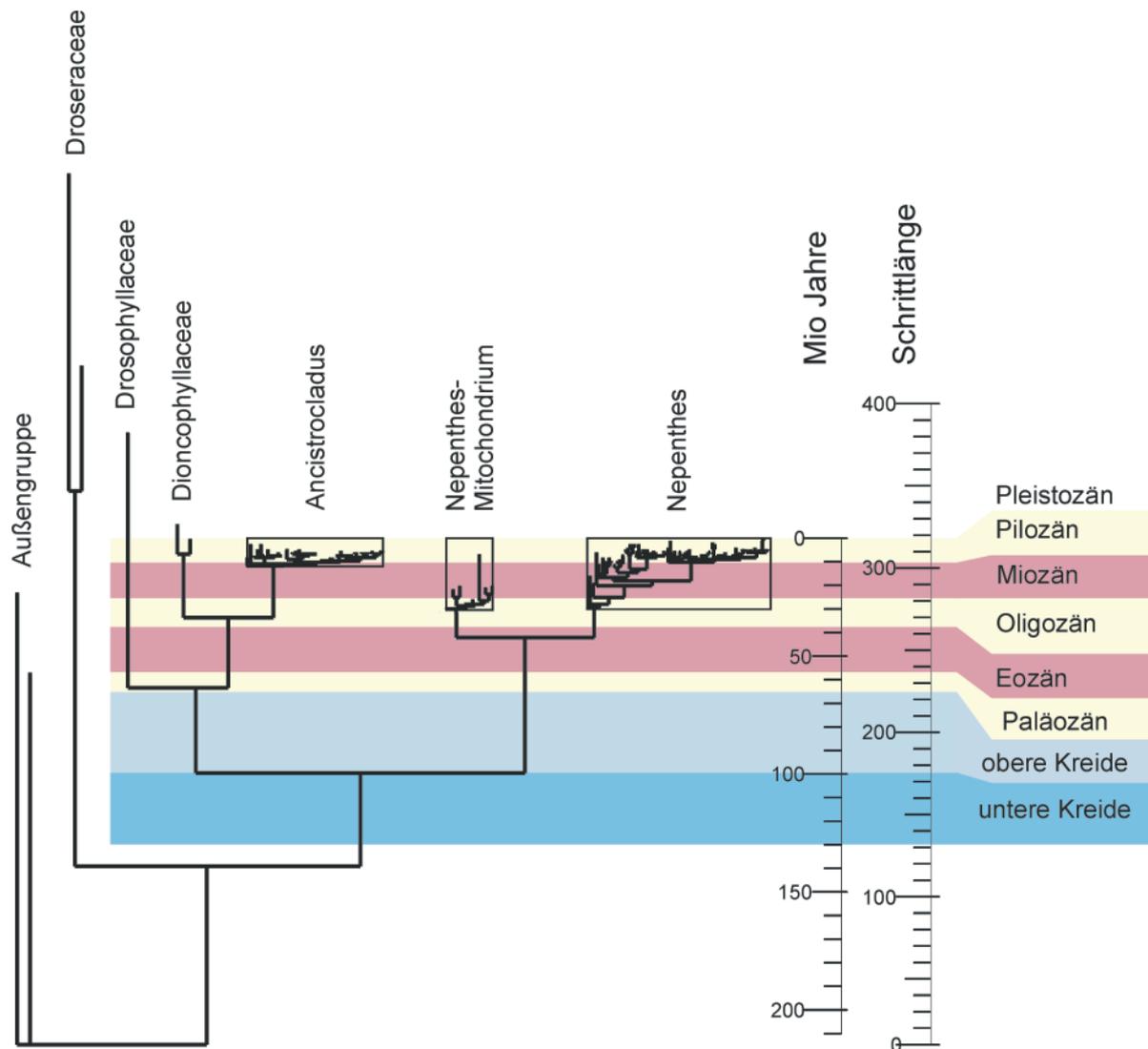


Abb. 83. Schematisiertes Phylogramm einer Analyse der in der vorliegenden Arbeit angefertigten trnK-Intron-Daten der carnivoren Taxa der Caryophyllidae im Vergleich zu den bei einem angenommenen Gondwana-Ursprung sich ergebenden Zeiträume für die Evolution der Gruppe. Gezeigt ist ein zufällig ausgewählter kürzester Baum. Vom mitochondrialen Pseudogen der Nepenthaceae wurden nur 8 Sequenzen einbezogen. Als Zeitpunkt des Splits zwischen Nepenthaceae und seinen Nachbargruppen wurde 100 Mio. Jahre angenommen, der Zeitpunkt der Abtrennung der Indischen Platte von Afrika nach Raven und Axelrod (1974). Für die Splits zu den Droseraceae und den Außengruppen ist wahrscheinlich eine zu hohe Anzahl an Schritten angenommen, aufgrund der geringen Anzahl an Taxa, die hier untersucht werden konnten.

4.5.3 Hypothesen zur Evolution der carnivoren Taxa der Caryophyllidae

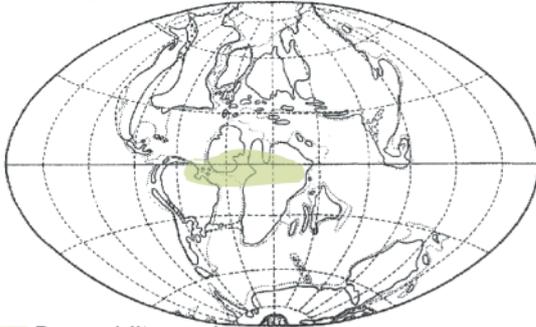
Die Abschätzung des Alters der verschiedenen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gruppen sowie der Vergleich mit relevanten geologischen Ereignissen, und mit der Hypothese der „Lemurian Stepping Stones“, lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass die Nepenthaceae vor 30 Mio. Jahren ein Areal besiedelten, welches den indischen Subkontinent, das Chagos-, Lakkadiven- und Maskarenen-Plateaus und Madagaskar einschloß. Von dort aus besiedelten die Nepenthaceae den im Entstehen begriffenen malaiischen Archipel. Dieses Areal war entweder das Entstehungszentrum der Familie von wo aus die Nordtethys besiedelt wurde, oder ein östlicher Ausläufer eines die Nordtethys einschließenden Areals. Nach Krutzsch (1988) entstanden im frühen Miozän Trockenbarrieren, die die Nordtethys vom heutigen Asien trennten. Dadurch wurden die Nepenthaceae der Nordtethys isoliert und starben später aus (vgl. Abb. 84).

Die Ancistrocladaceae waren entweder über die Nordtethys oder über die Südtethys verbreitet. Zur Zeit der Aufspaltung der rezenten Ancistrocladaceae, vor ca. 15 Mio. Jahren wurde dieses Areal durch die Abkühlung des Klimas fragmentiert und die Ancistrocladaceae nach Süden abgedrängt. Die Ancistrocladaceae spalteten sich in ihren Rückzugsgebieten in Afrika und in Südasien jeweils in mehrere Arten auf.

Aufgrund des fossilen Samens, der den Dioncophyllaceae zugeordnet wird, muß auch für die Dioncophyllaceae oder einem Vorläufer eine Verbreitung im Eozän Laurasiens angenommen werden. Von dort zogen sich die rezenten Dioncophyllaceae nach Westafrika zurück, wo sie heute als Palaeorelikte ausdauern, ohne Aufspaltung in neue Arten. Die Drosophyllaceae haben ein palaeoreliktäres Areal in Südportugal und Marokko und erscheinen damit als Relikte eines Areals, das wahrscheinlich die Nordtethys miteinschloß.

Die Wurzeln dieser Familien reichen wahrscheinlich bis in die obere Kreide zurück. Der Split zwischen ihnen und den Droseraceae liegt damit in einem Zeitraum für den Schuster (1976) annimmt, dass ein Florenaustausch zwischen Gondwana und Laurasien stattfinden konnte. Das heißt, dass nach den molekularen Daten eine frühe Evolution der Gruppe in Gondwana oder in Laurasien möglich ist. Problematisch bleibt dabei die Einschätzung von Raven und Axelrod (1974) ein Florenaustausch zwischen Afrika und Laurasien sei erst vor 17 Mio. Jahren möglich gewesen. Eine Ausbreitung der Dioncophyllaceae von Afrika nach Laurasien im Eozän, wie aufgrund der Fossilien anzunehmen, wäre daher nicht anzunehmen. Im Gegensatz dazu geht Krutzsch (1988) von der Möglichkeit eines Florenaustausches zwischen Süd- und Nordtethys über Archipelle und Inselketten im Palaeozän und Miozän aus. Es wäre auch vorstellbar, dass sich die Nachbargruppen der Nepenthaceae auf der indischen Platte sympatrisch mit den Nepenthaceae entwickelt haben und Afrika im Miozän ausgehend von einem sekundären laurasischen Areal erreicht haben.

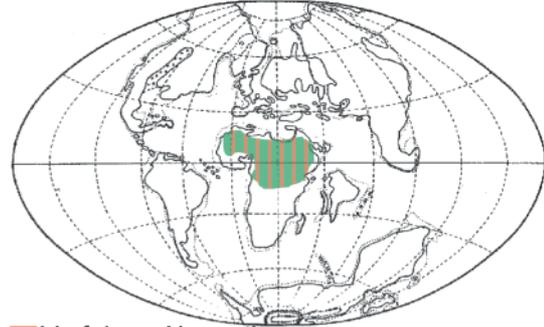
80 Ma, obere Kreide



■ *Droseridites spinosus*

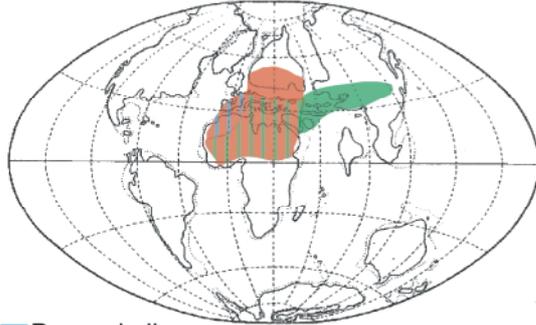
■ Vorfahren Drosophyllaceae / Dioncophyllaceae / Ancistrocladaceae

60 Ma, Paläozän



■ Vorfahren Nepenthaceae

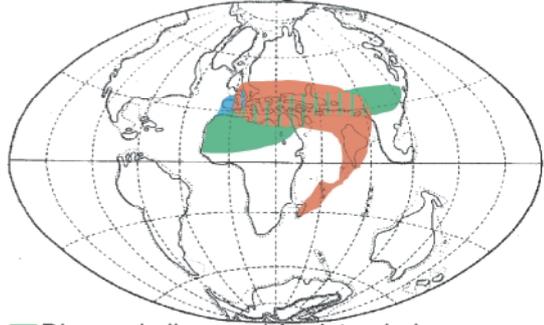
40-50 Ma, Eozän



■ Drosophyllaceae

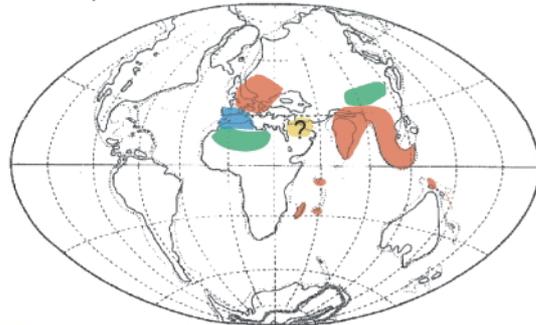
■ Nepenthaceae

30 Ma, unteres Oligozän



■ Dioncophyllaceae / Ancistrocladaceae

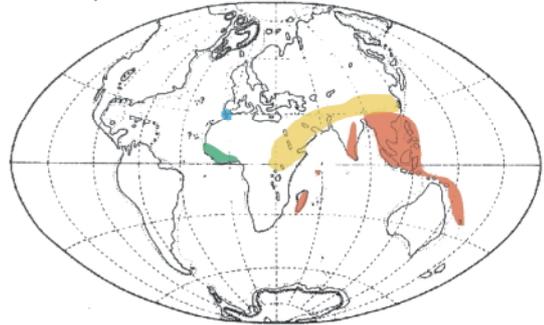
20 Ma, mittleres Miozän



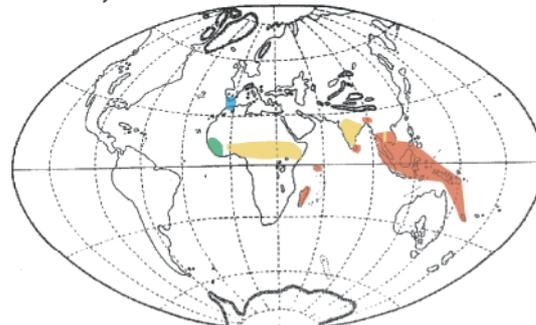
■ Ancistrocladaceae

■ Dioncophyllaceae

10 Ma, oberes Miozän



2-4 Ma, Pliozän



0 Ma, Heute

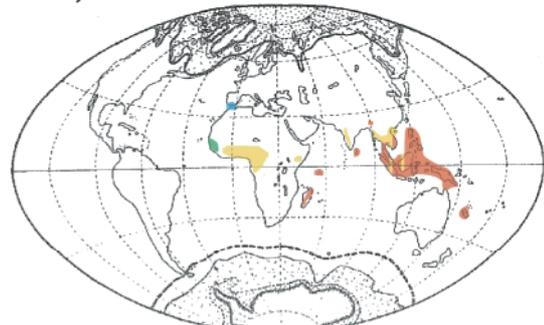


Abb. 84. Mögliche Evolution der Verwandtschaftsgruppe der Drosophyllaceae, Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae und Nepenthaceae ausgehend von *Droseridites spinosus*-Pollen, der nach Krutzsch (1988) als frühester Nachweis dieser Verwandtschaftsgruppe angesehen werden kann (Details siehe Text). Grundlage der Karten bilden die von Krutzsch (1989) veröffentlichten Karten zur Beurteilung palaeogeographischer Areale.

Hypothesen über die Evolution einer Gruppe, die aufgrund ihrer Phylogenie und ihrer Biogeographie aufgestellt werden, bleiben immer spekulativ, vor allem wenn die Gruppe nur unzureichend fossil belegt ist. In der Ausbreitungsgeschichte der Angiospermen muß von großen Arealverlagerungen ausgegangen werden auf die alleine durch die heutige Verbreitung nicht geschlossen werden kann (Schuster, 1976). So ist auch eine Evolution der Droseraceae in Laurasien vorstellbar, wenn man bedenkt, dass *Dionaea muscipula*, *Aldrovanda vesiculosa* und *Drosera regia*, die drei Spezies der Droseraceae mit der am längsten währenden eigenständigen Entwicklung, relikttä Areale besiedeln, die eher auf einen laurasischen Ursprung hindeuten. *Dionaea muscipula* besiedelt ein 300 qkm großes Gebiet im Südwesten der USA, *Aldrovanda vesiculosa* ein großes fragmentiertes Areal in Eurasien mit Ausläufern in Australien und *Drosera regia* die Kapregion. Die Evolution heutiger palaeotropischer Florenelemente in der Nordtethys wird von einigen Autoren als unwahrscheinlich angesehen. Nach (Takhtajan, 1973) hatten die Floren der Nordtethys in der oberen Kreide und dem Tertiär subtropischen Charakter mit einem je nach geologischem Zeitraum unterschiedlichen Anteil eingewanderter tropischer Elemente. Auch wenn *Nepenthes*, mit *N. khasiana* und *N. vieillardii*, subtropische Bereiche besiedelt und Bergformen, die auch Temperaturen unter dem Gefrierpunkt ertragen können, aufweist (Clark, 1997), sind die rezenten Diversitätszentren der Dioncophyllaceae, Ancistrocladaceae und Nepenthaceae tropisch. Ein Ursprung der Gruppen in den Subtropen sollte eine höhere Anzahl rezenter subtropischer Arten bedeuten. Auch dies spricht für einen Ursprung der carnivoren Taxa der Caryophyllidae in Gondwana, auch wenn sich wahrscheinlich ihre Areale zwischenzeitlich weit nach Norden ausgedehnt hatten (vgl. Abb. 84).

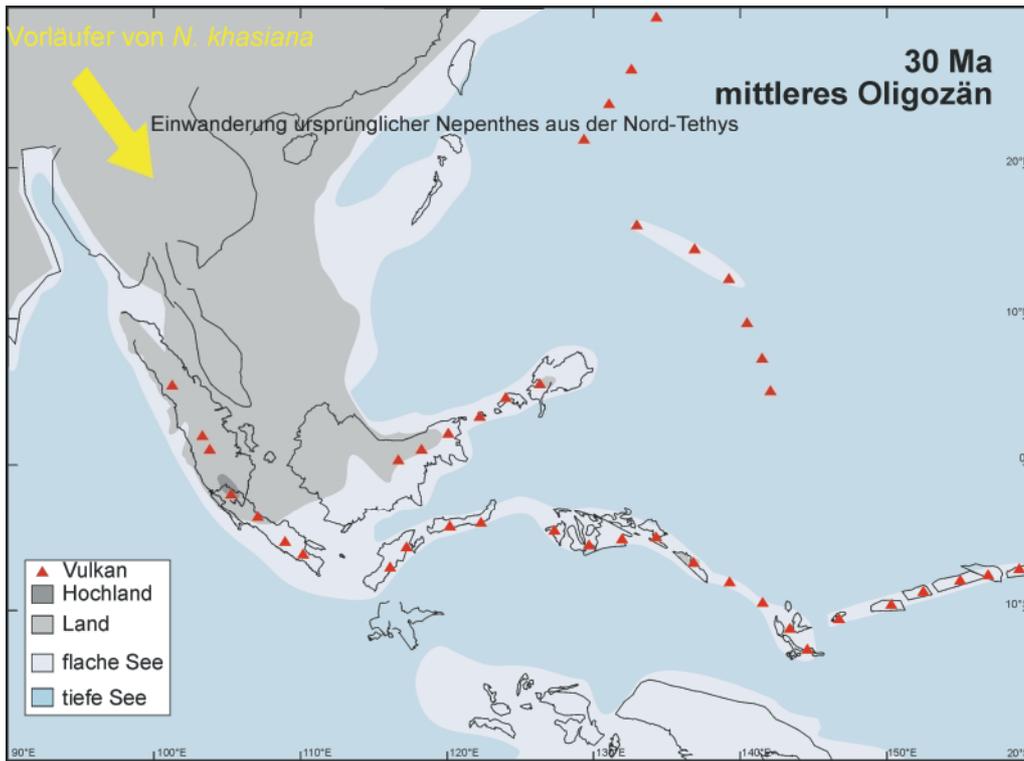
4.5.3.1 Die Evolution der Nepenthaceae in Südostasien

Die Radiation der Nepenthaceae Südostasiens begann wahrscheinlich zur Zeit der Bildung des malaiischen Archipels. Nach Hall (1998, 2001) entstand der Archipel vor ca. 20 Mio. Jahren durch das aufeinandertreffen des Nordrandes der Australischen Platte ab dem Ende des Oligozäns mit kleineren Platten und Inselbögen im Norden. Dies führte in der Folgezeit zu der Ausbildung eines unterbrochenen aber sehr langen Inselbogens zwischen Asien und Melanesien (darunter auch Neu Kaledonien). Die Nepenthaceae könnten über diesen Inselbogen ihr heutiges Areal besiedelt haben. Der Sundaschelf war nach Hall (1998) bis in jüngste Zeit eine zusammenhängende Landmasse, erst nach der letzten Eiszeit wurden Sumatra und Borneo zu Inseln. In Abb. 85 ist ein mögliches Szenario der Besiedelung des malaiischen Archipels durch die Nepenthaceae dargestellt. Gegen Ende des Oligozäns bis Anfang des Miozäns könnten die Vorläufer der Taxa von Clade 3 im zukünftigen Sulawesi, *N. danseri* in Neu Guinea und *N. vieillardii* in Neu Kaledonien von den anderen Taxa isoliert worden sein. Die Vorläufer von Clade 2 erreichten die heutigen Philippinen entweder über die nördliche Insel Luzon oder über die südlichen Inseln, die am Ende des Oligozäns einen Teil des oben

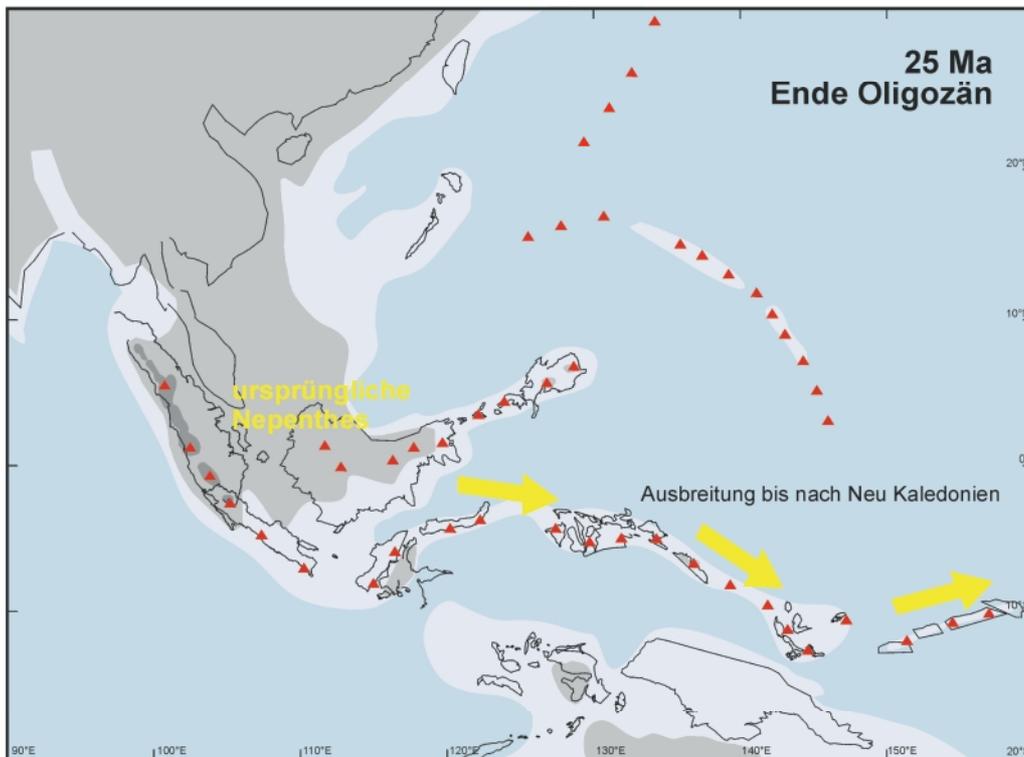
erwähnten Inselbogens bildeten. Für die letztere Variante spricht die Nachbargruppenposition von *N. alata* (Luzon) und *N. mira* (Palawan) zu den Arten der Maxima-Gruppe. *N. alata* und *N. mira* könnten zwischen den Philippinischen Arten und den Arten von Borneo vermitteln. Vor ca. 15 bis 10 Mio. Jahren wanderten Taxa von Clade 2, ausgehend von Vorläufern der Insignis-Gruppe, nach nach Sulawesi und Borneo ein und etwas später Taxa von Clade 3 ausgehend von Sulawesi nach Neu Guinea. Die Vorläufer der Taxa von Clade I spalteten sich vor ca. 10 Mio. Jahren in mehrere Linien auf von denen eine Sumatra und eine die malaiische Halbinsel besiedelte. In Sumatra und Borneo existieren heute mehrere Linien von Clade I, die den Sundaschelf besiedelten und heute noch auf Borneo und Sumatra vorkommen. Während des Pleistozäns, als die Inseln des malaiischen Archipels nur durch wenige Wasserstraßen voneinander getrennt wurden besiedelten *N. mirabilis*, *N. ampullaria* und *N. gracilis* große Teile des Archipels.

Abb. 85 (folgende Seiten): Szenario der Besiedlung des malaiischen Archipels durch die Nepenthaceae. Dargestellt sind die einzelnen Entwicklungslinien, wie sie sich durch die molekularen Daten ergeben im Vergleich zu der Entstehung des malaiischen Archipels, wie von Hall (1998) angenommen. Nach einer Einwanderung von Norden wurde das Areal bis nach Neu Kaledonien vor 25-20 Mio. Jahren über Inselketten besiedelt. Ausgehend von Relikten dieser Besiedelung entstanden die 5 Entwicklungslinien der rezenten Nepenthaceae, Clade 1 bis 3, *N. danseri* und *N. vieillardii* (Karten nach Hall (1998) leicht verändert).

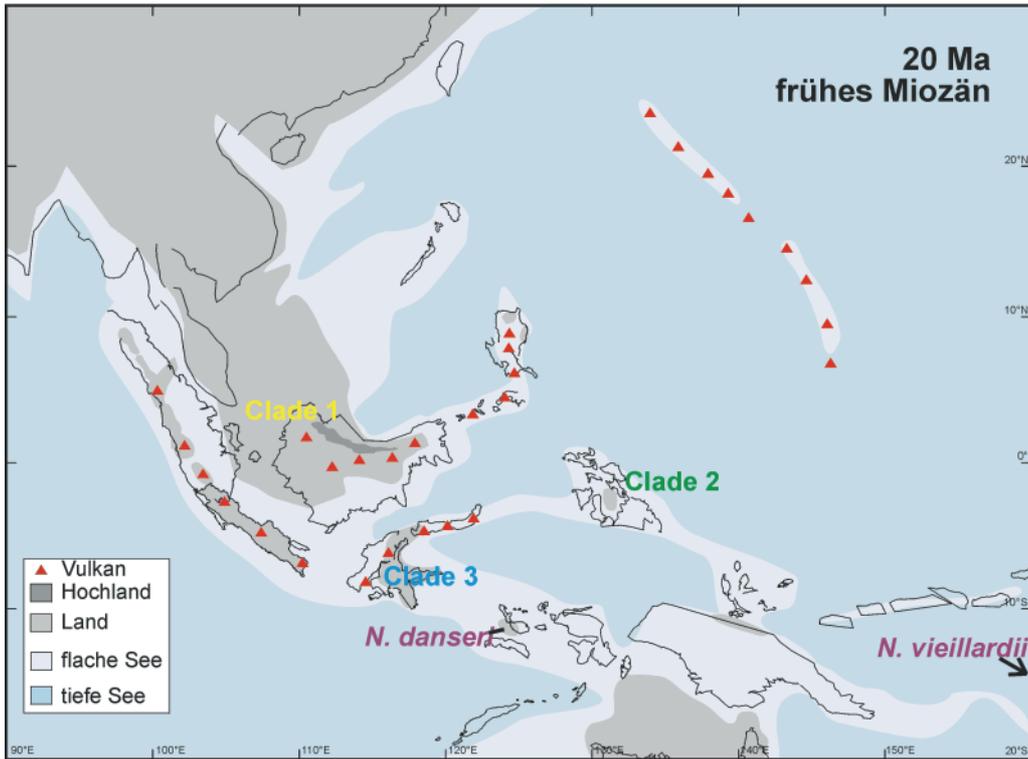
Quelle: http://www.gl.rhbc.ac.uk/seasia/Biogeography/LandSeaMaps/body_landseamaps.html



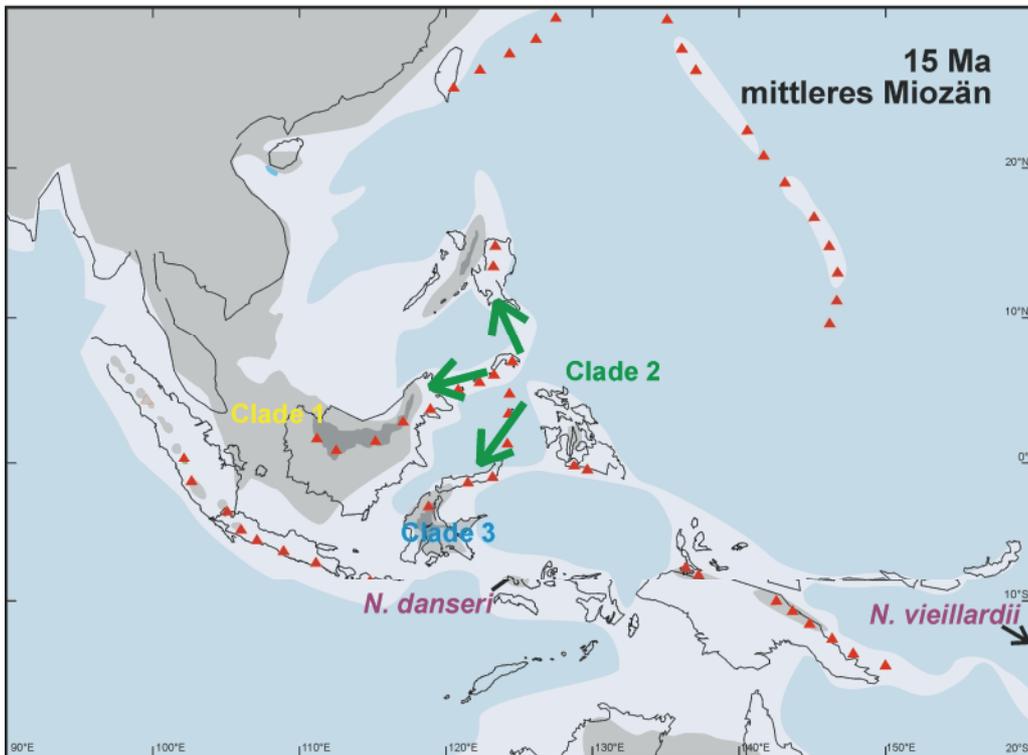
Bei einem Alter der rezenten *Nepenthes* von maximal 34 Mio. Jahren, könnte im mittleren Oligozän die Besiedelung der Malesischen Region erfolgt sein, ausgehend vom Indischen Subkontinent oder der Nord-Tethys. *N. khasiana* stellt ein Relikt dieser Ausbreitung dar.



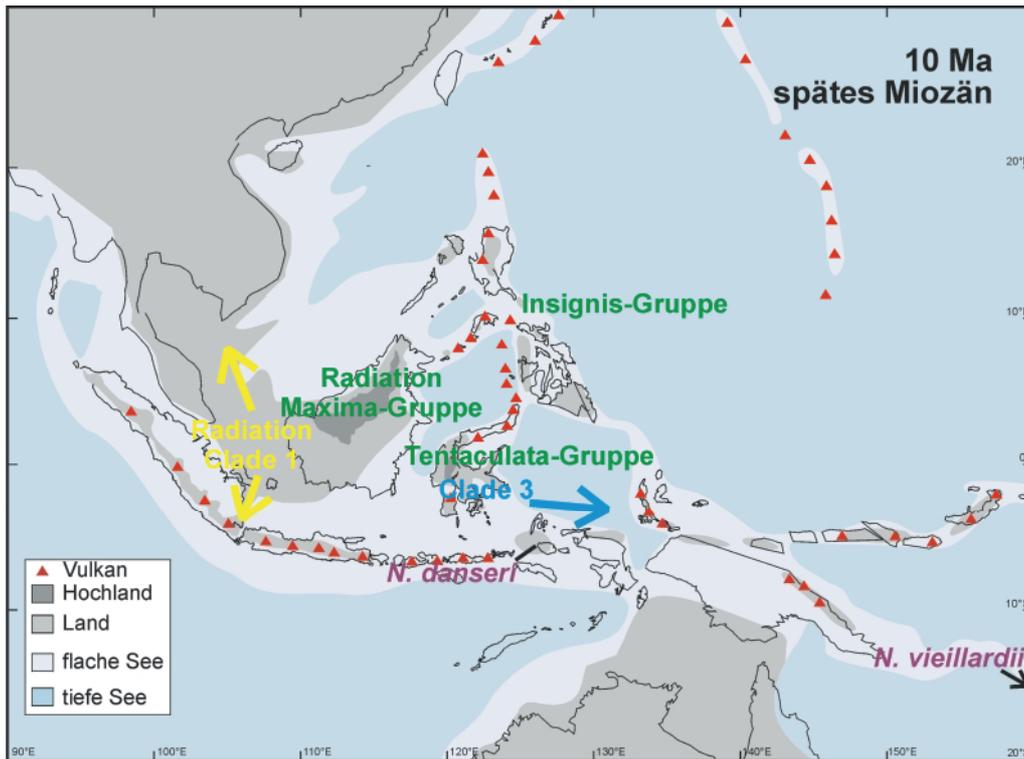
Ausgehend vom zukünftigen Sundashelf, könnten die *Nepenthaceae* über einen Inselbogen ihr heutiges Verbreitungsgebiet besiedelt habe. Nach Hall (1998, 2001) bestand dieser Inselbogen wahrscheinlich bis vor 20 Mio. Jahren. Dies entspricht dem Alter der Radiation der Südasiatischen *Nepenthaceae*, geht man von einer Isolierung der Vorläufer der *Nepenthaceae* auf der indischen Platte vor 100 Mio Jahren (nach Raven und Axelrod, 1974) aus (vgl. Tabelle 20).



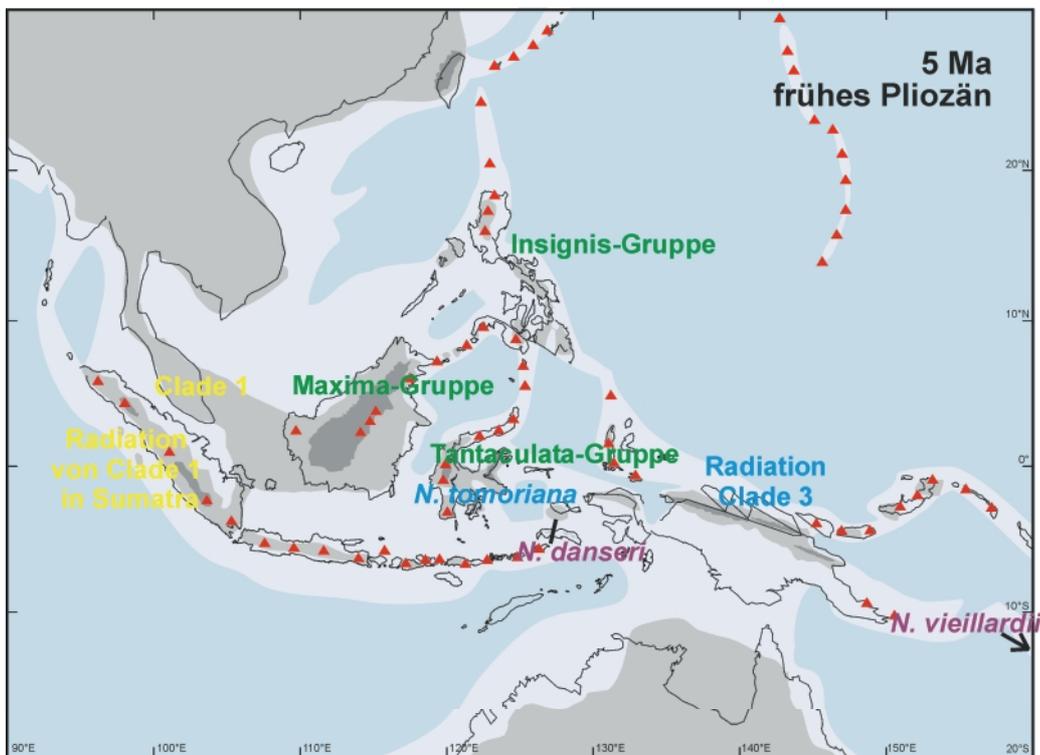
Beginn der Differenzierung der südostasiatischen Nepenthaceae in die in der phylogenetischen Rekonstruktion angezeigten fünf Entwicklungslinien, Clade 1 bis 3, *N. danseri* (Waigeo) und *N. vieillardii* (Neu Kaledonien). Frühe Vertreter von Clade 2 sind auf den zukünftigen Philippinen isoliert (angezeigt durch die isolierte Stellung der Insignes, frühe Vertreter von Clade 3 auf Celebes (angezeigt durch *N. tomoriana*).



Ausbreitung von Vertretern von Clade 2 bis nach Sulawesi, angezeigt durch die auf Sulawesi endemischen Taxa *N. hamata* und *N. glabrata* und nach Borneo (Differenzierung in Tentaculata- und Maxima-Gruppe).



Beginn der Radiation der Taxa der Maxima-Gruppe auf dem Sundashelf (Clade 2) und der Taxa von Clade 1 auf dem Sundashelf. Clade 2 behielt dabei einen östlichen, Clade 1 einen westlichen Verbreitungsschwerpunkt, woraus sich die heutige Vorherrschaft von Clade 1 auf Sumatra und malaiischer Halbinsel und von Clade 2 auf Borneo erklärt. Beginn der Ausbreitung von Clade 3 nach Osten.



Radiation von Vertretern von Clade 1 auf dem mittlerweile entstandenen Sumatra und Radiation von Vertretern von Clade 3 auf Neu Guinea. In der Folgezeit wurde Borneo vom Sundshelf getrennt. Im Pleistozän entstanden Landbrücken die eine Einwanderung von Vertretern der Maxima-Gruppe bis nach Neu Guinea (*N. maxima*) und Vertreter von Clade 1 in den gesamten malaiischen Archipel (*N. gracilis*, *N. ampullaria* und *N. mirabilis*) ermöglichten.

5 Zusammenfassung

In traditionellen Klassifikationssystemen der Angiospermen (Bedecktsamer) werden die Ordnungen der Caryophyllales, Polygonales und Plumbaginales und Polygonales in die Unterklasse Caryophyllidae eingeordnet. Obwohl der Verwandtschaftskreis mehrmals Gegenstand eingehender morphologischer, chemosystematischer und kladistischer Studien war, ist die Abgrenzung der Caryophyllidae nach wie vor unsicher und demzufolge im Fokus der molekular ausgerichteten Pflanzensystematik. Bisherige Sequenzanalysen an *rbcL*, 18S rDNA und ORF2280 zeigten, dass dem Umfeld der Caryophyllidae weitere Familien angehören die bisher anderen Verwandtschaftskreisen zugeordnet wurden. Dazu gehören neben den Frankeniaceae und Tamaricaceae auch die carnivoren Droseraceae, Drosophyllaceae, Nepenthaceae sowie die Dioncophyllaceae und die Ancistrocladaceae.

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die phylogenetischen Beziehungen der carnivoren Taxa zu rekonstruieren sowie ihre systematische Stellung innerhalb der Caryophyllidae aufzuklären. Besonderes Interesse galt den Nepenthaceae für die, durch vergleichende Sequenzanalysen verschiedener Genorte, bisherige Hypothesen zur Evolution und taxonomischen Gliederung überprüft werden sollten. Ein ähnlicher Ansatz wurde auch für die Ancistrocladaceae gewählt, wo die Phylogenie rekonstruiert und ein taxonomisches Konzept für den in SO-Asien weitverbreiteten *A. tectorius*-Komplex erstellt werden sollte. Vor allem dieser kritische Formenkreis ist aufgrund seiner antiviralen und antiplasmodialen Wirkung zur Zeit Gegenstand intensiver phytochemischer und medizinischer Studien. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde nachgewiesen, dass das Untersuchungsmaterial aus SO-Asien bemerkenswerte Heterogenität bezüglich der Inhaltsstoffe (Naphthylisochinolin-Alkaloide) bestand. Folglich lag es nahe, das Konzept verschiedener Florenwerke von nur einer Art auszugehen, einer kritischen Prüfung zu unterziehen.

Als phylogenetische Marker wurden das *trnK*-Intron der Chloroplasten-DNA und die Internal-Transcribed-Spacer (ITS-Region) der nukleären rDNA eingesetzt. Bei den Nepenthaceae kam es zur Koamplifikation von rDNA-Pseudogenen, die nicht sicher von den spezifischen Produkten getrennt werden konnten. Durch Klonierung wurden bis zu vier verschiedene Pseudogen-Sequenzen für ein Individuum identifiziert, die untereinander einen paarweisen Unterschied von mehr als 20% aufwiesen. Die kladistische Analyse der ITS-Pseudogene legt die Annahme nahe, dass sich die rezenten Nepenthaceae aus einem Vorfahren entwickelten, der bereits verschiedene ITS-Sequenzen aufwies. Auch für das *trnK*-Intron der Nepenthaceae wurden zwei paraloge Sequenzen identifiziert. Durch den Einsatz einzelner Chloroplasten als Template in der PCR wurde die Lokalisation nur eines Paralogons im Chloroplasten nachgewiesen. Es gab Hinweise darauf, dass das andere

Paralogen eine mitochondriale Kopie darstellt. Unterstützt wurde dieser Befund durch die Ermittlung der das trnK-Intron flankierenden Sequenzen mit inverser PCR. Diese Sequenzen ließen sich teilweise mit veröffentlichten mitochondrialen Sequenzen alinieren. Die mitochondriale Kopie des trnK, die aufgrund der häufigen Unterbrechung des Leserasters im für die Maturase K kodierenden Bereich des trnK-Introns (matK), ein Pseudogen darstellt, wurde als phylogenetischer Marker für die Nepenthaceae vergleichend sequenziert.

Durch kladistische Analyse des im trnK-Intron lokalisierten matK an ausgewählten Taxa konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Caryophyllidae die Droseraceae, Drosophyllaceae, Nepenthaceae, Ancistrocladaceae und Dioncophyllaceae eine Monophylie bilden. Die Carnivorie ist demnach innerhalb der Caryophyllidae monophyletisch entstanden und bei den Ancistrocladaceae sowie einigen Gattungen der Dioncophyllaceae (*Habropetalum* und *Dioncophyllum*) sekundär verloren gegangen.

Die trnK-Intron-Phylogenie der Nepenthaceae zeigt in hohem Maße eine Korrelation mit der Biogeographie. Aufgrund dieser Beziehung läßt sich ein Szenario der Besiedelung und Radiation des malaiischen Archipels durch die Nepenthaceae ableiten. Die Hypothese, die Nepenthaceae hätten aufgrund des Vorkommens von zwei relikitären Taxa auf Madagaskar einen Ursprung in Gondwana, kann durch die trnK-Intron-Phylogenie nicht gestützt werden. Die mitochondriale Kopie des trnK eignete sich nur eingeschränkt zur phylogenetischen Rekonstruktion. Es konnte gezeigt werden, dass wahrscheinlich durch Heteroplasmie und *lineage sorting* die hohe Variabilität des Genorts entstand und nicht auf homologe Substitutionen zurückgeführt werden kann. Dies steht jedoch im Widerspruch zu verfügbaren Daten in der Literatur.

Die Sequenz- und Fingerprintanalysen zeigten, dass die Variabilität der Ancistrocladaceae Südostasiens mit der afrikanischer Arten vergleichbar ist. Die Inkongruenz von trnK-Intron- und ITS-Phylogenie, sowie eine scheinbar erhöhte Mutationsrate des trnK-Introns legen den Schluß nahe, dass bei der Artbildung der Ancistrocladaceae vor allen in Südostasien Hybridisierungen und Introgressionen eine große Rolle gespielt haben. Durch Vergleich der Sequenzdaten mit ISSR- Fingerprints (Inter-Simple-Sequence-Repeat-PCR) konnten die im Rahmen mehrerer Sammelreisen aus Südostasien beschafften Proben zahlreicher Populationen in zehn unterscheidbare Taxa eingeteilt werden. Von diesen wurden drei aufgrund von ITS-Sequenzen, die aus Isotypusmaterial gewonnenen wurden, den gültig beschriebenen Arten *A. pinangianus*, *A. attenuatus* und *A. cochinchinensis* zugeordnet. Inwieweit die verbliebenen Taxa neu beschrieben werden können, müssen morphologische Untersuchungen zeigen.

6 Literatur

- Aceto, S., P. Caputo, S. Cozzolino, L. Gaudio und A. Moretti** (1999) Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: Morphological gaps and molecular continuity. *Mol Phylogenet Evol*, **13** (1): 67–76.
- Adams, K. L., M. Rosenblueth, Y.-L. Qui und J. D. Palmer** (2001) Multiple losses and transfers to the nucleus of two mitochondrial Succinate Dehydrogenase genes during Angiosperm evolution. *Genetics*, **158**: 1289-1300.
- Adams, K. L., Y.-L. Qiu, M. Stoutemyer und J. D. Palmer** (2002) Punctuated evolution of mitochondrial gene content: High and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during Angiosperm evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99** 15: 9905-9912.
- Airy Shaw, H. K.** (1951) On the Dioncophyllaceae, a remarkable new family of flowering plants. *Kew Bull*, **341**: 327-347.
- Albert, B., B. Godelle, A. Atlan, R. De Paepe und P. H. Gouyon** (1996) Dynamics of plant mitochondrial genome: Model of a three-level selection process. *Genetics*, **144**: 369-382.
- Albert, V. A., A. Backlund, K. Bremer, M. W. Chase, J. R. Manhart, B. D. Mishler und K. C. Nixon** (1994) Functional constraints and rbcL evidence for land plant phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*, **81**: 534-567.
- Albert, V. A., S. E. Williams und M. W. Chase** (1992) Carnivorous plants: Phylogeny and structural evolution. *Science*, **257**: 1491-1495.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*, **25**: 3389-3402.
- Anderberg, A. A., C. Rydin und M. Källersjö** (2002) Phylogenetic relationships in the order Ericales s.l.: Analyses of molecular data from five genes from the plastid and mitochondrial genomes. *Am J Bot*, **89** (4): 677-687.
- Andreasen, K. und B. G. Baldwin** (2001) Unequal evolutionary rates between annual and perennial lineages of Checker Mallows (*Sidalcea*, Malvaceae): Evidence from 18S-26S rDNA internal and external transcribed spacers. *Mol Biol Evol*, **18** (6): 936-944.
- Applied Biostatistics inc.** (2002) NTSYSpc Version 2.10w, 1996-2002.
- Aubreville, A.** (1969) Essais sur la distribution et l'histoire des Angiospermes tropicales dans le monde. *Adansonia* **2** (9): 189-248.
- Azuma, H., J. G. Garcia-Franco, V. Rico-Gray und L. B. Thien** (2001) Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: The biogeography of tropical and temperate disjunctions. *Amer J Bot*, **88** (12): 2275–2285.
- Bachman, K.** (1997) Nuclear DNA markers in plant biosystematic research. *Opera Bot*, **132**: 137-148.
- Bakker, F. T., A. Culham, C. E. Pankhurst und M. Gibby** (2000) Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). *Amer J Bot*, **87** (4): 727–734.
- Bakker, F. T., A. Culham, L. C. Daugherty und M. Gibby** (1999) A trnL-F based phylogeny for species of *Pelargonium* (Geraniaceae) with small chromosomes. *Plant Syst Evol*, **216**: 309-324.
- Baldwin, B. G.** (1992): Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol Phylogenet Evol*, **1** (1): 3-16.
- Baldwin, B. G., M. J., Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell und M. J. Donoghue** (1995): The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*, **82**: 247-277.
- Baldwin, B.G.** (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1** (1): 3-16.
- Bayer, R. J. und J. R Starr** (1999) Tribal phylogeny of the asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the trnL Intron and trnL/F intergenic spacer. *Ann Missouri Bot Gard*, **85**: 242-256.

- Beck, S. und F. M. Pohl** (1984) DNA sequencing with direct blotting electrophoresis. *EMBO J*, **3** (12): 2905-2909.
- Bittrich V.** (1993) Introduction to Centrospermae. In: K. Kubitzki, J. G. Rohwer, and V. Bittrich [eds.], The families and genera of vascular plants, vol. II, Magnoliid, hamamelid, and caryophyllid families, 13–19. Springer Verlag, Berlin. Germany.
- Blattner, F. R., K. Weising, G. Banfer, U. Maschwitz und B. Fiala** (2001) Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae). *Mol Phylogenet Evol*, **19** (3): 331-344.
- Bonnet, H. T. und K. Glimelius** (1983) Somatic hybridization in *Nicotiana*, behavior of organelles after fusion of protoplasts from male-fertile and male-sterile cultivars. *Theor Appl Genet*, **65**: 213-217.
- Borisjuk, N. V., V. P. Momot und Y. Gleba** (1988): Novel class of rDNA repeat units in somatic hybrids between *Nicotiana* and *Atropa*. *Theor Appl Genet*, **76**: 108-112.
- Boyd, M. R., Y. F. Hallock, J. H. Cardellina, K. P. Manfredi, J. W. Blunt, , J. B. McMahon, R. W. Buckheit, G. Bringmann, M. Schäffer, G. M. Cragg, D. W. Thomas und J. G. Jato** (1994) Anti – HIV Michellamines from *Ancistrocladus korupensis*. *J Med Chem*, **37**: 1740-1745.
- Bremer, K.** (1988) The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, **42** (4): 795-803.
- Briggs, D. und S. M. Walters** (1997) Plant variation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bringmann, G. und F. Pokorny** (1995) The Naphthylisoquinoline Alkaloids. In: G. A. Cordell, (ed.), The Alkaloids, Academic Press, New York, **46**: 127-271.
- Bringmann, G., A. Hamm, C. Günther, M. Michel, R. Brun und V. Mudogo** (2000) Ancistrocalines A and B, two new bioactive Naphthylisoquinolines, and related Naphthoic Acids from *Ancistrocladus ealaensis*, *J Nat Prod*, **63**: 1465-1470.
- Bringmann, G., G. François, L. Aké Assi und J. Schlauer** (1998) the alkaloids of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae). *Chimia*, **52**: 18-28.
- Bringmann, G., R. Zagst, M. Schäffer, Y. F. Hallock, J. H. Cardellina II, und M. R. Boyd** (1993) The absolute configuration of Michellamine B, a „dimeric“, anti-HIV-active naphthylisoquinoline alkaloid. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **31**: 1190-1191.
- Brosius, J. und S. J. Gould** (1992) On "genomenclature": A comprehensive (and respectful) taxonomy for pseudogenes and other "junk DNA". *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 10706-10710.
- Buckler, E.S., A. Ippolito und T. P. Holtsford** (1997) The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics*, **145**: 821-832.
- Caha, C. A., D. J. Lee und J. Stubbendieck** (1998) Organellar genetic diversity in *Penstemon haydenii* (Scrophulariaceae): An endangered plant species. *Amer J Bot*, **85** (12): 1704–1709.
- Cameron, K. M., K. J. Wurdack, und R. W. J. Obson** (2002) Molecular evidence for the common origin of snap-traps among carnivorous plants. *Amer J Bot*, **89** (9): 1503–1509.
- Cameron, K. M., M. W. Chase, W. R. Anderson und H. G. Hills** (2001) Molecular systematics of Malpighiaceae: evidence from plastid rbcL and matK sequences. *Amer J Bot*, **88** (10): 1847–1862.
- Campbell, C. S., M. F. Wojciechowski, B. G. Baldwin, L. A. Alice und M. J. Donoghue** (1997) Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Mol Biol Evol*, **14**: 81-90.
- Capesius, I.** (1998) Sequence Announcements. *Plant Mol. Biol*, **38**, 677-677.
- Chase, M. W., D. E. Soltis, R. G. Olmstead und 40 andere** (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbcL. *Ann Missouri Bot Gard*, **80** (3): 528-580.
- Chaw, S. M., A. Zharkikh, H. M. Sung, T. C. Lau und W. H. Li** (1997) Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: Analysis of nuclear 18S rRNA sequences. *Mol Biol Evol*, **14** (1): 56-68.
- Chaw, S-M., C. L. Parkinson , Y. Cheng, T. M. Vincent und J. D. Palmer** (2000) Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant Gymnosperms and origin of Gnetales from Conifers. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97** (8): 4086–4091.

- Cheek, M.** (2000) A synoptic revision of *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae) in Africa, with a new species from western Cameroon, *Kew Bull*, **55**: 871-882.
- Cheek, M. und M. Jebb** (2001) Flora Malesiana, series I-seed plants, Vol. 15, Nepenthaceae, National Herbarium Nederland.
- Cheek, M., C. Frimodt-Møller und V. Hoerlyck** (2000) A new submontane species of *Ancistrocladus* from Tanzania, *Kew Bull*, **55**: 207-212.
- Chen Z. J. und C. S. Pikaard** (1997) Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 3442-3447.
- Chen, Z. J., L. Comai und C. S. Pikaard** (1998) Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in *Arabidopsis* allopolyploids. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 14891-14896.
- Cheng, Y., R. G. Nicolson, K. Tripp, und S. M. Chaw** (2000) Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae genera inferred from chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA ITS region. *Mol Phylogenet Evol*, **14** (3): 353-365.
- Clark, C.** (1997) *Nepenthes* of Borneo, Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.
- Clement J.-S., T. J. Mabry, H. Wyler und A. S. Dreiding** (1994) Chemical review and evolutionary significance of betalains. In: H.-D. Behnke and T. J. Mabry [eds.], *Caryophyllales: Evolution and systematics*, 247-261. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Coleman, A. W.** (2002) Comparison of *Eudorina/Pleodorina* ITS sequences of isolates from nature with those from experimental hybrids. *Amer J Bot*, **89** (9): 1523-1530.
- Compton, J. A., A. Culham und S. Jury** (1998) Reclassification of *Actaea* to include *Cimicifuga* and *Souliea* (Ranunculaceae): Phylogeny inferred from morphology, nrDNA ITS and cpDNA trnL-F sequence variation. *Taxon*, **47**: 593-634.
- Côté, C. A. und B. A. Peculis** (2001) Role of the ITS2-proximal stem and evidence for indirect recognition of processing sites in pre-rRNA processing in yeast. *Nucleic Acids Res*, **29** (10): 2106-2116.
- Cronquist, A.** (1988) An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York.
- Cuénoud, P., V. Savolainen, L. W. Chatrou, M. Powell, R. J. Grayer und M. W. Chase** (2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB* and *matK* DNA sequences. *Amer J Bot*, **89**: 132-144.
- Dahlgren, G.** (1989) The last Dahlgrenogram. System of classification of the dicotyledons. Pp. 249-260. In: K. Tan (ed.), *Plant Taxonomy, Phytogeography and related subjects* (The Davis and Hedge Festschrift). Edinburgh University Press.
- Danser, B. H.** (1928) The Nepenthaceae of the Netherlands Indies. *Bull Jard Bot Buitenzorg*, **3** (9): 249-438.
- Dice, L. R.** (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, **26**: 297-302.
- Dolphin, K., R. Belshaw, C. D. L. Orme und D. L. J. Quicke** (2000) Noise and incongruence: Interpreting results of the incongruence length difference test. *Mol Phylogenet Evol*, **17** (3): 401-406.
- Downie, S. R. et al.** (1991) Six independent losses of the chloroplast DNA *rpl2* intron in dicotyledons: Molecular and phylogenetic implications. *Evolution* **45**: 1245-1259.
- Downie, S. R. und D. S. Katz-Downie** (1996) A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer J Bot*, **83** (2): 234-251.
- Downie, S. R. und J. D. Palmer** (1994) A chloroplast DNA phylogeny of Caryophyllales based on structural and inverted repeat restriction site variation. *Syst Bot*, **19** (2): 236-252.
- Downie, S. R., D. S. Katz-Downie und C. Kyung-Jin** (1997) Relationships in the Caryophyllales as suggested by phylogenetic analyses of partial chloroplast DNA *ORF2280* homolog sequences. *Amer J Bot*, **84** (2): 253-273.
- Doyle, J. J. und J. L. Doyle** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, **19**: 11-15.

- Duff, R. J. und D. L. Nickrent** (1999) Phylogenetic relationships of land plants using mitochondrial small-subunit rDNA sequences. *Amer J Bot*, **86** (3): 372–386.
- Ehrendorfer, F.** (1991) Strasburger, Lehrbuch der Botanik, Teil 3: Evolution und Systematik, Samenpflanzen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Eichacker, L. A., M. Helfrich, W. Rüdiger und B. Müller** (1996) Stabilization of Chlorophyll *a*-binding Apoproteins P700, CP47, CP43, D2 and D1 by Chlorophyll *a* or Zn-Pheophytin *a*. *J Biol Chem*, **271**(50): 32174–32179.
- Farris, J. S.** (1970) Methods for computing Wagner trees. *Syst Zool*, **19**: 83–92.
- Farris, J. S.** (1989) The retention index and homoplasy excess. *Syst Zool*, **38** (4): 406–407.
- Fay, M. F., K. M. Cameron, G. T. Prance, M. D. Lledo und M. W. Chase** (1997) Familial relationships of *Rhabdodendron* (Rhabdodendraceae). Plastid *rbcL* sequences indicate a Caryophyllid placement. *Kew Bull*, **52**(4): 923–932.
- Fedotov, V. V.** (1980) The genus *Dioncophyllites* in the Eocene flora of Raitschika from the Amur District. *UDK*, **56**: 985–987.
- Fenton, B., A. N. Birch, G. Malloch, P.G. Lanham und R. M. Brennan** (2000) Gall mite molecular phylogeny and its relationship to the evolution of plant host specificity. *Exp Appl Acarol*, **24** (10–11): 831–861.
- Ferguson, C. J. und R. K. Jansen** (2002) A chloroplast DNA phylogeny of eastern *Phlox* (Polemoniaceae): Implications of congruence and incongruence with the ITS phylogeny. *Amer J Bot*, **89** 8: 1324–1335.
- Ferguson, D. und T. Sang** (2001) Speciation through homoploid hybridization between allotetraploids in peonies (*Paeonia*). *Proc Natl Acad Sci USA*, **98** 7: 3915–3919.
- Fofana, B., L. Harvengt, J. P. Baudoin und P. du Jardin** (1997) New primers for the polymerase chain amplification of cpDNA intergenic spacers in *Paspalum* phylogeny. *Belg J Bot*, **129**(2): 118–122.
- Forster, P.F. und V. L. Sork** (1997) Population and genetic structure of the West African rain forest liana *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae). *Amer J Bot*, **84** (8): 1078–1091.
- Francisco-Ortega, J., S. J. Park, A. Santos Guerra, A. Benabid und R. K. Jansen** (2001) Origin and evolution of the endemic macaronesian Inuleae (Asteraceae): Evidence from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Biol J Linn Soc*, **72**: 77–97.
- Fuertes Aguilar, J., J. A. Roselló und G. Nieto Feliner** (1999b) Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). *Mol Ecol*, **8**: 1341–1346.
- Fuertes Aguilar, J., J. A. Roselló und G. Nieto Feliner** (1999a) Molecular evidence for the compilospecies model of reticulate evolution in *Armeria* (Plumbaginaceae). *Syst Bio*, **48** (4): 735–754.
- Gehrig, H., O. Gaussmann, H. Marx, D. Schwarzott und M. Kluge** (2001) Molecular phylogeny of the genus *Kalanchoe* (Crassulaceae) inferred from nucleotide sequences of the ITS-1 and ITS-2 regions. *Plant Sci*, **160** (5): 827–835.
- Gereau, R. E.** (1997), Typification of Names in *Ancistrocladus* Wallich (Ancistrocladaceae). *Novon*, **7**: 242–245.
- Germano J. und A. S. Klein** (1999) Species-specific nuclear and chloroplast single nucleotide polymorphisms to distinguish *Picea glauca*, *P. mariana* and *P. rubens*. *Theor Appl Genet*, **99**: 37–49.
- Giannasi, D. E., G. Zurawski, G. Learn und M. T. Clegg** (1992) Evolutionary relationships of the Caryophyllidae Based On Comparative *rbcL* sequences. *Syst. Bot*, **17** (1): 1–15.
- Goloboff, P. A.**, (1993) NONA Version 2.0,.
- Graybeal, A.** (1998) Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Syst Bio*, **47** (1): 9–17.
- Günther, U.** (2000) Molekulare Phylogenie der Gattung *Astrantia* (Apiaceae) abgeleitet aus Sequenzen des nukleären ITS-Bereichs. Zulassungsarbeit, LMU München.
- Guo, Z. H., Y. Y. Chen und D. Z. Li** (2002) Phylogenetic studies on the *Thamnocalamus* group and its allies (Gramineae: Bambusoideae) based on its sequence data. *Mol Phylogenet Evol*, **22** 1: 20–30.
- Hall, R.** (1998) The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea. In: Hall, R. and Holloway, J.D. (eds.), Biogeography and Geological Evolution of SE Asia Backhuys Publishers, Leiden, 99–131.

- Hall, R.** (2001) Cenozoic reconstructions of SE Asia and SW Pazific: changing patterns of land and sea, in: L. Matcalfe, J. M. B. Smith, M. Morwood und I. D. Davidson (eds.): Faunal and floral migrations and evolution in SE Asia-Australasia. A. A. Balkema (Swets & Zeitlinger Publishers) Lisse: 35-56.
- Hall, T. A.** (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Sym. Ser.*, **41**:95-98.
- Hallier, H.** (1921) Beiträge zur Kenntnis der Linaceae. *Beih Bot Centralblatt*, **39**(2): 162.
- Hamada H., M. G. Petrino und T. Kakunaga** (1982) A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**: 6465-6469.
- Haq, B. U., J. Hardenbol und P. R. Vail**, (1988) Mesozoic and Cenozoic chronostratigraphy and eustatic cycles. In: Wilgus, C. K. et al., Sea-level changes: an integrated approach. Special Publ. 42, Soc. Econ. Paleont. Mineral., Tulsa, Oklahoma.
- Hardig T. M., P. S. Soltis und D. E. Soltis** (2000) Diversification of the North American shrub genus *Ceanothus* (Rhamnaceae): Conflicting phylogenies from nuclear ribosomal DNA and chloroplast DNA. *Amer J Bot*, **87** 1: 108–123.
- Harms, H.** (1936) Nepenthaceae. In: Die Natürlichen Pflanzenfamilien (Engler, A. und K. Prantl, eds), Band 17b. Leipzig.
- HersHKovitz, M. A. und E. A. Zimmer** (1996) Conservation patterns in angiosperm rDNA-ITS2 sequences. *Nucleic Acids Res*, **24** (15): 2857-2867.
- Hess, J., J. W. Kadereit. und P. Vargas** (2000) The colonization history of *Olea europaea* L. in Macaronesia based on internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences, randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD), and intersimple sequence repeats (ISSR). *Mol Ecol*, **9**: 857-868.
- Heubl, G. und A. Wistuba** (1995) A cytological study of the genus *Nepenthes* L. (Nepenthaceae). *Sendtnera* **4**: 169-174.
- Hilu, K. W. und H. Liang** (1997) The *matk* Gene: Sequence variation and application in plant systematics. *Amer J Bot*, **84** (6): 830–839.
- Hilu, K.-W., L.-A. Alice und H. Liang** (1999) Phylogeny of Poaceae inferred from matK sequences. *Ann Missouri Bot Gard*, **86** (4): 835-851.
- Hooker, J. D.** (1873) Nepenthaceae. In: Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetalis (Candolle, A. P. de, ed.) **17**: 90-105.
- Hoot, S. B., S. Magallon und P. R. Crane** (1999) Phylogeny of basal Eudicots based on three molecular data sets: atpB, rbcL and 18S nuclear ribosomal DNA sequences. *Ann Missouri Bot Gard*, **86**: 1-32.
- Hughes, C. E., C. D. Bailey und S. A. Harris** (2002) Divergent and reticulate species relationships in *Leucaena* (Fabaceae) inferred from multiple data sources: Insights into polyploid origins and nrDNA polymorphism. *Amer J Bot*, **89** (7): 1057–1073.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. und White, T. J. (eds.)** (1990) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, USA.
- Jebb, M.** (1991) A review of *Nepenthes* in New Guinea. *Science in New Guinea*, **17** (2): 7-54.
- Jebb, M. und M. Cheek** (1997) A skeletal revision of *Nepenthes* (Nepenthaceae). *Blumea*, **42**: 1-106.
- Jobst, J., K. King und V. Hemleben** (1998) Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae. *Mol Phylogenet Evol*, **9**(2): 204–219.
- Johnson, L. A und D. E. Soltis** (1994) Matk DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Syst Bot*, **19** (1): 143-156.
- Kadereit, J. W.** (2002) Strasburger, Lehrbuch der Botanik, Teil 3: Evolution und Systematik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Kajita, T., K. Kamiya, K. Nakamura, H. Tachida, R. Wickneswari, Y. Tsumura, H. Yoshimaru und T. Yamazaki** (1998) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia based on nucleotide sequences of matK, trnL Intron and trnL-trnF intergenic spacer region in chloroplast DNA. *Mol Phylogenet Evol*, **10** (2): 202–209.

- Keim, P., K. N. Paige, T. G. Whitham und K. G. Lark** (1989) Genetic analysis of an interspecific hybrid swarm of *Populus*: Occurrence of unidirectional introgression. *Genetics*, **123**: 557-565.
- Kluge, A. G. und J. S. Farris** (1969) Quantitative phyletics and the evolution of Anurans. *Syst Zool*, **18**: 1-32.
- Kores, P. J., M. Molvray, P. H. Weston, S. D. Hopper, A. P. B Rown, K. M. Cameron und M. W. Chase** (2001) A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. *Amer J Bot*, **88** (10): 1903–1914.
- Kron, K. A.** (1997) Phylogenetic relationships of Rhododendroideae (Ericaceae). *Amer J Bot*, **84** (8): 973–980.
- Kron, K. A., W. S. Judd und D. M. Crayn** (1999) Phylogenetic analyses of Andromedeae (Ericaceae subfam. Vaccinioideae). *Amer J Bot*, **86** (9): 1290.
- Krutzsch, W.** (1985) Über *Nepenthes*-Pollen im europäischen Tertiär. *Gleditschia*, **13**: 89-93.
- Krutzsch, W.** (1988) Palaeogeography and historical phytogeography (palaeochorology) in the Neophyticum, *Plant Syst Evol*, **162**: 5-61.
- Kubo, T., S. Nishizawa, A. Sugawara, N. Itchoda, A. Estiati und T. Mikami** (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA^{cys}(GCA). *Nucleic Acids Res*, **28** 13: 2571-2576.
- Kurata, S.** (1973) *Nepenthes* from Borneo, Singapore and Sumatra. *Gard Bull Sing*, **26**: 227-232.
- Kurata, S.** (1976) *Nepenthes* of Mt. Kinabalu. Sabah National Park Trustees, Kota Kinabalu, Sabah.
- Kuzoff, R. K., J. A. Sweere, D. E. Soltis, P. S. Soltis und E. A. Zimmer** (1998): The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Mol Biol Evol*, **15** (3): 251-263.
- Ladoukakis, E. D. und E. Zouros** (2001) Direct evidence for homologous recombination in Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol*, **18** (7): 1168–1175.
- Lewis, M. S. und C. S. Pikaard** (2001) Restricted chromosomal silencing in nucleolar dominance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98** (25): 14536–14540.
- Linder, C. R., L. A. Moore und R. B. Jackson** (2000) A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *Mol Ecol*, **9**: 1549–1559.
- Liston, A. und E. Alvarez-Buylla**, (1995) Internal transcribed spacer sequences of conifers: “There is a fungus among us.” *Inoculum* **46**: 26 [Abstract].
- Liston, A., W. A. Robinson, J. M. Oliphant und E. R. Alvarez-Buylla** (1996) Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of non-flowering seed plants. *Syst Bot*, **21**: 109–120.
- Liu, J.-S. und C. L. Schardl** (1994) A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant Mol Biol*, **26**: 775-778.
- Lledo, M. D., M. B. Crespo, K. M. Cameron, M. F. Fay und M. W. Chase** (1998) Systematics of Plumbaginaceae based upon cladistic analysis of rbcL sequence data. *Syst Bot*, **23** (1): 21-29.
- Lowrey, T. K. und K. Timothy** (1991) Chromosome and isozyme number in the Nepenthaceae. *Amer J Bot*, **78** (6) Suppl.: 200-201.
- Macfarlane, J. M.** (1908) Nepenthaceae In Das Pflanzenreich (A. Engler, ed.) **4** (3): 1-92.
- Macpherson, C. G. und R. Hall** (2002) Timing and tectonic controls in the evolving orogen of SE Asia and the western Pacific and some implications for ore generation. In: Blundell, D.J., Neubauer, F. & von Quadt, A. (eds.) The timing and location of major ore deposits in an evolving orogen. Geological Society, London, Special Publications, in press. Quelle: <http://www.gl.rhbc.ac.uk/seasia/Publications/papers/papers.html>.
- Mai, J. C. und A. W. Coleman** (1997) The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green Algae and flowering plants. *J Mol Evol*, **44**: 258-271.
- Manfredi, K. P, J. W. Blunt, J. H. Cardellina, J. B. McMahon, L. L. Panell, G. M. Cragg und M. R. Boyd** (1991) Novel alkaloids from the tropical plant *Ancistrocladus abbreviatus* inhibit cell killing by HIV-1 and HIV-2. *J Med Chem*, **34**: 3402-3405.
- Manos, P. S.** (1997) Systematics of *Nothofagus* (Nothofagaceae) Based on rDNA spacer sequences (ITS): taxonomic congruence with morphology and plastid sequences. *Amer J Bot*, **84** (9): 1137–1155.
- Manos, P. S. und K. P Steele** (1997) Phylogenetic analyses of higher Hamamelididae based on plastid sequence data. *Amer J Bot*, **84** (10): 1407–1419.

- Mathews, D. H., J. Sabina, M. Zuker, und D. H. Turner** (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol*, **288**: 911-940.
- Mathews, D. H., M. Zuker, und D. H. Turner** (2001) RNAstructure Version 3.6 (1996-2001).
- Mayol, M. und J. A. Rosselló** (2001): Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*. *Mol Phylogenet Evol*, **2**: 167-176.
- Meerow, A. W., C. L. Guy, Q.-B. Li und S.-L. Yang** (2000) Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. *Syst. Bot*, **25** (4): 708-726.
- Michalowski, C. B., H. J. Bohnert, D. F. Klessig und J. O. Berry** (1990) Nucleotide sequence of *rbcL* from *Amaranthus hypochondriacus* chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, **18** (8): 2187.
- Miyashita, N. T., A. Kawabe, H. Innan und R. Terauchi** (1998) Intra- and interspecific DNA variation and codon bias of the Alcohol Dehydrogenase (*Adh*) locus in *Arabis* and *Arabidopsis* species. *Mol Biol Evol*, **15**(11): 1420-1429.
- Moreira, C. D., F. G. Gmitter Jr., J. W. Grosser, S. Huang, V. M. Ortega, und C. D. Chase** (2002) Inheritance of organelle DNA sequences in a *Citrus-Poncirus* intergeneric cross. *J Hered*, **93** (3):174-178.
- Morgan, D. R. und D. E. Soltis** (1993) Phylogenetic relationships among members of Saxifragaceae sensu lato based on *rbcL* Sequence Data. *Ann Missouri Bot Gard*, **80** (3): 631-660.
- Morin, P. A., K.E. Chambers, C. Boesch und L. Vigilant** (2001) Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Mol Ecol*, **10**(7): 1835-44.
- Morley, R. J.** (1998) Palynological evidence for Tertiary plant dispersals in the SE Asian region in relation to plate tectonics and climate. In: Hall, R. and Holloway, J.D. (eds.), *Biogeography and Geological Evolution of SE Asia* Backhuys Publishers, Leiden, 211-231.
- Morley, R. J. und J. R. Flenley** (1987) Late Cainozoic vegetational and environmental changes in the Malay Archipelago. In *Biogeographical evolution of the Malay Archipelago* (Whitmore, T. C. ed.). Oxford.
- Muir, L. G., C. C. Fleming, und C. Schlotterer** (2001) Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Mol Biol Evol*, **18** (2):112-119.
- Mummenhoff, K., A. Franzke und M. Koch** (1997) Molecular phylogenetics of *Thlaspi* s.l. (Brassicaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation and sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Canad J Bot*, **75**: 469-482.
- Murray, V.** (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, **17**: 8889.
- Nagaoka, T. und Y. Ogihara** (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet*, **94**: 597-602.
- Nandi, O., M.W. Chase und P. K. Endress** (1998) A combined cladistic analysis of angiosperms using *rbcL* and non-molecular data sets. *Ann Missouri Bot Gard*, **79**: 249-265.
- Nei, M. und W. H. Li** (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**: 5269-5273.
- Nicholas, K. B. und H. B. Nicholas** (1997) GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Nickrent, D. L. und D. E. Soltis** (1995) A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rDNA and *rbcL* sequences. *Ann Missouri Bot Gard*, **82**: 208-234.
- Nickrent, D. L., C. L. Parkinson, J. D. Palmer und R. J. Duff** (2000) Multigene phylogeny of land plants with special reference to Bryophytes and the earliest land plants. *Mol. Biol. Evol*, **17** (12):1885-1895.
- Nieto Feliner, G., J. Fuertes Aguilar und J. A. Rosselló** (2001) A new species of *Armeria* (Plumbaginaceae) from southern Spain with molecular and morphometric evidence on its origin *Bot J Linn Soc*, **135**: 71-84.
- Nixon, K. C.** (1999) Winclada Ver. 0.9.9+ (Beta), <http://www.cladistics.com>.
- Olsen, K. M. und B. A. Schaal** (1999) Evidence on the origin of *Cassava*: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 5586-5591.

- Orians, C. M.** (2000) The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: Implications for the ecology and evolution of plant–herbivore interactions. *Amer J Bot*, **87** (12): 1749–1756.
- Owen, T. P., K. A. Lennon., M. J. Santo., und A. N. Anderson** (1999) Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Ann Bot*, **84**: 459–466.
- Padgett, D. J., D. H. Les und G. E. Crow** (1999) Phylogenetic relationships in *Nuphar* (Nymphaeaceae): evidence from morphology, chloroplast DNA, and nuclear ribosomal DNA. *Amer J Bot*, **86**: 1316–1324.
- Palacios, C., J. A. Rosselló und F. González Candelas** (2000) Study of the evolutionary relationships among *Limonium* species (Plumbaginaceae) using nuclear and cytoplasmic molecular markers. *Mol Phylogenet Evol*, **14**, 2: 232–249.
- Palmer, J. D.** (1992) Mitochondrial DNA in plant systematics. In: P. S. Soltis, D. E. Soltis, und J. J. Doyle [Eds.], *Molecular systematics of plants*, 36–49. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- Palmer, J. D., K. L. Adams, Y. Cho, C. L. Parkinson, Y.-L. Qiu und K. Song** (2000) Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: Mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97** (13): 6960–6966.
- Panero, J. L., J. Francisco-Ortega, R. K. Jansen und A. Santos Guerra** (1999) Molecular evidence for multiple origins of woodiness and a new world biogeographic connection of the macaronesian island endemic *Pericallis* (Asteraceae: Senecioneae). *Proc Natl Acad Sci USA*, **96** (24): 13886–13891.
- Parfait, B., P. Rustin, A. Munnich und A. Rotig** (1998) Coamplification of nuclear pseudogenes and assessment of heteroplasmy of mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**: 57–59.
- Pawlowski, J., M. Holzmann, J. F. Fahrni und P. Hallock** (2001) Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid Foraminifera: 1. Chlorophytes. *J Eukaryot Microbiol*, **48** (3): 362–367.
- Peculis, B. A. und C. L. Greer** (1998) The structure of the ITS2-proximal stem is required for pre-rRNA processing in yeast. *RNA*, **4** (12): 1610–1622.
- Phillips, A. und A. L. Lamb** (1996) Pitcher plants of Borneo. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu.
- Qui, Y.-L., M. W. Chase, D. H. Les und C. R. Parks** (1993) Molecular phylogenetics of the Magnoliidae: Cladistic analyses of nucleotide sequences of the plastid gene *rbcL*. *Ann Missouri Bot Gard*, **80**: 587–606.
- Raven, P. H. und D. J. Axelrod** (1974) Angiosperm biogeography and past continental movements. *Ann Missouri Bot Gard*, **61**: 539–673.
- Renner, S. S., G. Clausing und K. Meyer** (2001) Historical biogeography of Melastomataceae: the roles of tertiary migration and long-distance dispersal. *Amer J Bot*, **88** (7): 1290–1300.
- Rettig, J. H., H. D. Wilson und J. Manhart** (1992) Phylogeny of the Caryophyllales - gene sequences data. *Taxon* **41**: 201–209.
- Rischer, H.** (2002) Acetogenine Sekundärmetabolite und ihre Produzenten: Physiologie und Botanik ausgewählter Vertreter der Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae und Nepenthaceae sowie *Antidesma* (Euphorbiaceae), Dissertation, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Roelofs, D. und K. Bachmann** (1997) Genetic analysis of a *Microseris douglasii* (Asteraceae) population polymorphic for an alien chloroplast type. *Plant Syst Evol*, **206** (1–4): 273–284.
- Samuel, R., A. Bachmair, J. Jobst und F. Ehrendorfer** (1998) ITS sequences from nuclear rDNA suggest phylogenetic relationships between Euro-Mediterranean, East Asiatic and North American taxa of *Quercus* (Fagaceae). *Plant Syst Evol*, **211**: 129–139.
- Sang, T., D. J. Crawford und T. F. S. Tuessy** (1995) Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using sequences of internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 6813–6817.
- Sang, T., D. J. Crawford und T. F. S. Tuessy** (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Amer J Bot*, **84** (9): 1120–1136.
- Sanger F., S. Nicklen und A. R. Coulson** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74** (12): 5463–5467.
- Saville, B. J., Y. Kohli und J. B. Anderson** (1998) MtDNA recombination in a natural population (*Armillaria gallica*). *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 1331–1335.

- Savolainen, V., W. C. Chase, S. B. Hoot, C. M. Morton, D. E. Soltis, C. Bayer, M. F. Fay, A. Y. De Bruijn, S. Sullivan und Y.-L. Qiu** (2000) Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid atpB and rbcL gene sequences. *Syst Biol*, **49** (2): 306-362.
- Schad, A.** (1995) Vergleichende Analyse der Sequenz eines tRNA-IGS der Chloroplasten-DNA von 15 *Nepenthes*-Arten. Diplomarbeit, LMU München.
- Schatz, G. E.** (1996) Malagasy/Indo-Australo-Malesian phytogeographic connections. In Biogeography of Madagascar (Lourenço W. R., ed.). Editions ORSTOM, Paris.
- Schmid-Hollinger, R.** (1979) Die Kannenformen der westlichen *Nepenthes*-Arten. *Bot Jahrb Syst*, **100**: 379-405.
- Schulze, W., W. B. Frommer und J. M Ward** (1999) Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Plant J*, **17** (6): 101-110.
- Schuster, R. M.** (1976) Plate tectonics and its bearing on the geographical origin and dispersal of Angiosperms. In Beck, C. B. (eds.) Origin and evolution of early Angiosperms, Columbia University Press, New York
- Schütze K., und A. Clement-Sengewald** (1994) Catch and move - cut or fuse. *Nature*, **368**: 667-669.
- Schütze, K., I. Becker, K. F. Becker, S. Thalhammer, R. Stark, W. M. Heckl, M. Bohm und H. Posl** (1997) Cut out or poke in - the key to the world of single genes: Laser micromanipulation as a valuable tool on the look-out for the origin of disease. *Genet Anal*, **14**:1-8.
- Shih, H. L., C. P. Lin, R. F. Liou und S. S. Tzean** (1995) Complete nucleotide sequence of *Beauveria bassiana* 5.8s rRNA coding gene and flanking internal transcribed spacers. *DNA Seq*, **5** (6): 381-383.
- Shivas, R. G.** (1984) Pitcher plants of Peninsular Malaysia and Singapore. Maruzen Asia. Singapore.
- Smith, D. E. und A. S. Klein** (1994) Phylogenetic inferences on the relationship of North American and European *Picea* species based on nuclear ribosomal 18S sequences and the internal transcribed spacer 1 region. *Mol Phylogenet Evol* **3**: 17-26.
- Smith, D. E. und A. S. Klein** (1996) Erratum. *Mol Phylogenet Evol*, **5**: 286-287.
- Soltis, D. E. et. al.** (1997) Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Ann Missouri Bot Gard*, **84**: 1-49.
- Soltis, D. E. und R. Kuzoff** (1995) Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the *Heuchera*-Group (Saxifragaceae). *Evolution*, **49**(4): 727-742.
- Sommario, M.** (2002) ISSR-Fingerprint-Analysen in der Gattung *Ancistrocladus* (Ancistrocladaceae). Diplomarbeit, LMU München.
- Städler, T. und L. F. Delph** (2002) Ancient mitochondrial haplotypes and evidence for intragenic recombination in a gynodioecious plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (18): 11730-11735.
- Storey, M. J. J. et al.** (1995) Timing of hot spot-related volcanism and the breakup of Madagascar and India. *Science*, **267**: 852-855.
- Suh, Y., L. B. Thien, H .A. Reeve und E. A. Zimmer** (1993): Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Amer J Bot*, **80** (9): 1042-1055.
- Swofford, D. L.** (1993) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 3.1. Computer programm distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Swofford, D. L.** (1998) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Szalanski, A. L., G. Steinauer, R. Bischof und J. Petersen** (2001) Origin and conservation genetics of the threatened Ute Ladies-Tresses, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *Amer J Bot*, **88** (1): 177-180.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou und J. Bouvet** (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol*, **17**: 1105-1109.
- Takhtajan, A.** (1973) Evolution und Ausbreitung der Blütenpflanzen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Tamin, R. und M. Hotta** (1986) *Nepenthes* di Sumatera: The genus *Nepenthes* of the Sumatra island. In Hotta, M. (ed.) Diversity and dynamics of plant life in Sumatra. Kyoto University, Kyoto.

- Thalhammer, S.** (2001) Rasterkraftmikroskopie und Laser-gestützte Mikromanipulation: Einsatzmöglichkeiten in der molekularen Cytogenetic. Dissertation, LMU München.
- Tomaru, N., M. Takahashi, Y. Tsumura, M. Takahashi und K. Ohba** (1998) Intraspecific variation and phylogeographic patterns of *Fagus crenata* (Fagaceae) mitochondrial DNA. *Amer J Bot*, **85** (5): 629–636.
- Ungerer, M. C., J. E. Stuart, J. P. Baird, und L. H. Rieseberg** (1998) Rapid hybrid speciation in wild sunflowers evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 11757–11762.
- Unsold, M., J. R. Marienfeld, P. Brandt, und A. Brennicke** (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366924 nucleotides. *Nature Genet*, **15**: 57–61.
- Van De Peer, Y.** (1998) Treecon, Version 1.3b.
- Van De Peer, Y. und R. De Wachter** (1993) Treecon: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput Applic Biosci*, **9**: 177-182.
- Van der Sande, C. A., M. Kwa, R. W. van Nues, H. van Heerikhuizen, H. A. Raue und R. J. Planta** (1992) Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *J Mol Biol*, **223** (4): 899-910.
- Van Houten, W. H. J., N. Scarlett, und K. Bachmann** (1993) Nuclear DNA markers of the Australian tetraploid *Microseris scarpigera* and its North American diploid relatives. *Theor Appl Genet*, **87**: 498-505.
- Van Nues, R. W., Rientjes J. M., Morré S. A., Mollee E., Planta R. J., Venema J. und Raucé, H. A.** (1995) Evolutionarily conserved structural elements are critical for processing of internal transcribed spacer 2 from *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA. *J Mol Biol*, **250** (1): 24-36.
- Van Steenis C.G.G.J.** (1948) Flora Malesiana, series I-seed plants, Vol. 4, Ancistrocladaceae, National Herbarium Nederland.
- Van Steenis, C.G.G.J.** (1962) The land-bridge theory in botany. *Blumea*, **11**: 235-372.
- Vargas, P., C. M. Morton und S. L. Jury** (1999) Biogeographic patterns in mediterranean and macaronesien species of *Saxifraga* (Saxifragaceae) inferred from phylogenetic analysis of ITS sequences. *Amer J Bot*, **86** (5): 724-734.
- Vigilant, L., M. Hofreiter, H. Siedel und C. Boesch** (2001) Paternity and relatedness in wild chimpanzee communities. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 12890-12895.
- Vogel, J., T. Hübschmann, T. Börner und W. R. Hess** (1997) Splicing and intron-internal RNA editing of trnK-matK transcripts in barley plastids: Support for matK as an essential splice factor. *J Mol Biol*, **270**: 179-187.
- Volkov, R. A., N. V. Borisjuk, I. I. Panchuk, D. Schweizer und V. Hemleben** (1999) Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Mol Biol Evol*, **16** (3):311–320.
- Wägele, J. W.** (2000) Grundlagen der phylogenetischen Systematik. Pfeil, München.
- Wagenitz, G.** (1997) The impact of molecular methods on the systematics of Angiosperms. *Bot Acta*, **110**: 274-281.
- Walter, B. und M. Melkonian** (1993) Gene for the nuclear-encoded 5.8S rRNA. *Plant Mol Biol*, **23**: 227-227.
- Walter, M.** (1999) Molekulare Phylogenie der Tribus Hippeastrae (Amaryllidaceae). Diplomarbeit, LMU München.
- Wang, X.-Q., D. C. Tank und T. Sang** (2000) Phylogeny and divergence times in Pinaceae: evidence from three genomes. *Mol Biol Evol*, **17** (5): 773–781.
- Wen, J, G. M. Plunkett, A. D. Mitchell und S. J. Wagstaff** (2001) The evolution of Araliaceae: A phylogenetic analysis based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Syst Bot*, **26** (1): 144-167.
- Wendel, J. F., A. Schnabel und T. Seelanan** (1995) An unusual ribosomal DNA sequence from *Gossypium gossypoides* reveals ancient, cryptic, intergenomic introgression. *Mol Phyogenet Evol*, **4** (3): 298-313.
- Wendel, J. F., A. Schnabel und T. Seelanan** (1995) Bi-directional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 280–284.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee und J. Taylor** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninski, J. J., White, T.J. (eds) PCR Protocols. A guide to methods and applications. United Kingdom edition. *Academic Press*, San Diego, California: 315-322.

- Williams, S. E., V. A. Albert und M. W. Chase** (1994) Relationships of Droseraceae: A cladistic analysis of rbcL sequence and morphological data. *Amer J Bot*, **81** (8): 1027-1037.
- Williams, W. M., H. A. Ansari, N. W. Ellison und S. W. Hussain** (2001) Evidence of three subspecies in *Trifolium bigrescens*. *Ann Bot*, **87**: 683-691.
- Wolfe, A. D. und C. P. Randle** (2001) Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Syst Bot*, **26** (1): 120-130.
- Wolfe, A. D., Q. Y. Xiang und S. R. Kephart** (1998) Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 5112-5115.
- Wolfe, A., W. Elisens** (1995) Evidence of chloroplast capture and pollen-mediated gene flow in *Penstemon* Sect. *Peltanthera* (Scrophulariaceae). *Syst Bot*, **20** (4): 395-412.
- Wolfe, K. H., C. W. Morden und J. D. Palmer** (1992) Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89** (22): 10648-10652.
- Yang, M. D. Zhang, J. Liu und J. Zheng** (2001) A molecular marker that is specific to medicinal Rhubarb based on Chloroplast trnL/trnF sequences. *Planta med*, **67**: 784-786.
- Yang, Y. W-n, K-N. Lai, P-Y. Tai, D-P. Ma und W-H. Li** (1999) Molecular phylogenetic studies of *Brassica*, *Rorippa*, *Arabidopsis* and allied genera based on the internal transcribed spacer region of 18S-25S rDNA. *Mol Phylogenet Evol*, **13** (3): 455-462.
- Yeh, L. C. und Lee J. C.** (1990) Structural analysis of the internal transcribed spacer 2 of the precursor ribosomal RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, **211** (4): 699-712.
- Zhang, W., J. F. Wendel und L. G. Clark** (1997) Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Mol Phylogenet Evol*, **8** (2): 205-217.
- Zietkiewicz E., A. Rafalski und D. Labuda** (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176-183.
- Zurawski, G. und M. T. Clegg** (1987) Evolution of higher-plant chloroplast DNA-encoded genes: Implications for structure-function and phylogenetic studies. *Ann Rev Plant Physiol*, **38**: 391-418.
- Zurawski, G., W. Bottomley und P. R. Whitfeld** (1984) Junctions of the large single copy region and the inverted repeats in *Spinacia oleracea* and *Nicotiana debneyi* chloroplast DNA: sequences of the genes for tRNA^{His} and ribosomal proteins S19 and L2. *Nucleic Acids Res*, **12**: 6547-6558.

Anhang

Anhang 1 Chemikalienverzeichnis

ABI PRISM [®] BigDye [™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Terminator Ready Reaction Mix: (A-Dye Terminator, mit dichloro[R6G] markiert; C-Dye Terminator, mit dichloro[ROX] markiert; G-Dye Terminator, mit dichloro[R110] markiert; T-Dye Terminator, mit dichloro[TAMRA] markiert; dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dUTP); AmpliTaq [®] DNA Polymerase, FS; MgCl ₂ ; Tris-HCl-Puffer, pH 9.0); pGEM [®] -3Zf(+)-double-stranded DNA Control Template, 0.2 µg/µl; 21 M13 Control Primer (forward), 0.8pmol/µl	
Acrylamid 2x	SERVA, Heidelberg, Deutschland
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	GATC, Konstanz, Deutschland
Ampicillin	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Bacto Agar	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Bacto Trypton	Amersham, Braunschweig, Deutschland
1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	SIGMA Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA
Borsäure	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Toluidinsalz (BCIP-p-Toluidinsalz)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galactosidase (X-Gal)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dextran-Blau	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
DH5α E. coli (Kompetente Zellen)	GIBCO Life Technologies, Deutschland.
N,N-Dimethylformamid (DMF)	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
DNA Größenmarker, λ-DNA: Hind III und EcoR I verdaut)	Angewandte Gentechnologie Systeme (AGS), Heidelberg, Deutschland und ABgene, Hamburg
DNA Größenmarker, 123 bp Leiter	Invitrogen [®] , Groningen, Holland
DNA Größenmarker, 50 bp Leiter	ABgene, Hamburg, Deutschland
Dneasy [™] Plant Mini Kit	Quiagen, Gmbh, Hilden, Deutschland.
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Na ⁺ -Salz) Lösungen je 100mM; pH 7,5)	Angewandte Gentechnologie Systeme (AGS), Heidelberg, Deutschland
Essigsäure 100% (Eisessig)	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Ethanol \geq 99.8% (Ethanol abs.)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidium-Bromid	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure Dinatriumsalz (Na ₂ EDTA)	SERVA Elektrophoresis, Heidelberg, Deutschland, E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
GATC-BioCycle sequencing kit	GATC, Konstanz, Deutschland
Reaktionspuffer (274 mM Tris-HCl pH 7,5, 68,6mM Na ₃ Citrat, 200mM NaCl, 27,4 mM MnCl ₂); dITP-Mix (dATP, dCTP, dTTP, dTTP); ddNTP-Lösungen, Biotin-markiert (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP); Stop-Mix (99% (v/v) deionisiertes Formamid, 5mM Na ₂ EDTA, 0,1% (w/v) Bromphenolblau)	
GATC-direct-blotting-Membran (für einzelsträngige DNA)	GATC, Konstanz, Deutschland
GATC-Gellösung (30% Acrylamid)	GATC, Konstanz, Deutschland
GATC-Stopmix	GATC, Konstanz, Deutschland
GeneAmp [®] 10x PCR Puffer; 500mM KCl, 100mM Tris/HCl pH 8,3, 15mM MgCl ₂ , 0,1% (w/v) Gelatine	PE Applied Biosystem, Foster City, Californien, USA

Gene Clean Kit	Bio 101, Carlsbad, Ca, USA
Glucose	Baker Chemicals, Deventer, Holland
Glycerin 98%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff ultra pure	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff ALF-Grade	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes/KOH	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
2-Hydroxyethylmercaptan (β -Mercaptoethanol)	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Nestlé, Frankfurt a. Main, Deutschland
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)-Hexahydrat	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Maleinsäure p. a.	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
3-Methacacryloxypropyltrimethoxysilan	GATC, Konstanz, Deutschland
3-Methyl-1-butanol (Isoamylalkohol)	J.T. Baker B. V., Deventer, Niederlande
MicroSpin TM S-400 HR Columns enthalten Sephacryl [®] S-400 HR Harz, äquilibriert in 1x TE pH 7,6	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg, Deutschland
MinElute TM Gel Extraction Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Natriumacetat	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrotetrazoliumblauschwarz P (NBT) p. a. = Nitroblaues Tetrazoliumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NucleoSpin Plant DNA-Isolierungskit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Phenol	AMRESCO, Ohio, USA
Oligonucleotide (HPSF-gereinigt), lyophilisiert	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
pGEM [®] -T Vector Systems-Kit	Promega GmbH, Mannheim
pGEM [®] -T Vector (50ng/ μ l); T4 DNA Ligase; T4 DNA Ligase 10x Puffer	
PEN-Membran (Poly-Ethylen-Naphthalat)	P.A.L.M. GmbH Bernried, Germany)
Percoll	SIGMA Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA
Polvinylpyrrolidon	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K (PCR grade)	Roche, Mannheim, Deutschland
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt. Deutschland
Ribonuklease A (RNase A)	SIGMA Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA
QuantumPrep TM (QP) Gel Slice Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californien, USA
QP Gel Slice Matrix: 5,7M Guanidin-Thiocyanat; 25mM Acetat (pH 5,2); QP Midi-Columns; QP wash buffer: 40mM Tris, 4mM EDTA, 800mM NaCl pH 7,5	
Salzsäure (HCl) konz. (36-38%)	J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande
Seesand, inert	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Sephadex	SIGMA Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA
Sorbit	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
Stickstoff (N_2), flüssig	Linde, Deutschland
Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugat (SA-AP Konjugat)	Promega, Mannheim Deutschland
1:7500; gelöst in 1x PBS, 1mg/ml BSA, 1mM $MgCl_2$, 0,1mM $ZnCl_2$, 0,02% Natriumazid	
T4-Ligase	Promega, Mannheim Deutschland

Taq-Polymerase	Hybaid GmbH, Heidelberg, AGS, Heidelberg, Deutschland
<i>Titanium</i> -Taq-Polymerase	Clontech, BD Bioscience
Hotstart-Taq-Polymerase	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulfonphthalein (Bormphenolblau)	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) 99%	SIGMA Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA
ThermoSequenase™ DNA-Polymerase 32U/μl; mit anorganischer Pyrophosphatase (TAP) aus <i>Thermoplasma acidophilum</i> ; Verdünnungspuffer	Amersham Life Science, Cleveland, Ohio, USA
Trichlormethan (Chloroform)	Riedel-de Haen; Seelze, Deutschland
Xylencanol	E. MERCK, Darmstadt, Deutschland

Anhang 2 Verzeichnis der Lösungen

Ampicillin-Stammlösung: 25 mg/ml in H₂O_{bid}; sterilfiltriert; Lagerung bei -20° C

10%APS-Lösung (w/w): 100 mg/ ml in H₂O_{bid}; Lagerung der Aliquotis bei -20°C.

BCIP-Lösung: 50 mg/ ml in 100%DMF; Lagerung bei -20°C

2% Blocking-puffer (w/w): 1 g Magermilchpulver in 49 g Maleinsäure-Puffer pH 7,5; frisch angesetzt.

Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1): Lagerung in brauner Flasche bei RT

CTAB-Extraktionspuffer: 2% CTAB- Stammlösung, 1,25 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris auf 50ml mit H₂O_{bid} aufgefüllt. Vor Gebrauch 2 μl/ ml Mecaptoethanol zufügen. Lagerung bei RT.

10%CTAB-Stammlösung (w/v): 10 g CTAB, 4,1 g NaCl (700mM) aufgefüllt auf 100 mit H₂O_{bid}; Bei 65°C im Wasserbad gelöst, autoklaviert gelagert bei.RT.

EDTA-Lösung 0,5 M: 93,05 g Na₂EDTA (0,5 M), 10 g NaOH-Plätzchen (0,5 M), 400 ml H₂O_{bid}; pH-Wert auf 8,0 eingestellt, auf 500 ml mit H₂O_{bid} aufgefüllt; autoklaviert gelagert bei RT.

EGTA-Lösung (125 mM): 4,75 g EGTA (125 mM) ad. 100 ml H₂O_{bid}; autoklaviert gelagert bei RT.

Ethidiumbromid-Lösung (1 %, w/v): in H₂O_{dest}; Lagerung bei 4° C.

76%Ethanol (v/v): 76 ml Ethanol abs. und 24 ml H₂O_{bid}; Lagerung bei -20°C.

Glukose-Stammlösung (2 M): 19,8 g Glukose in 40 ml H₂O_{bid}. gelöst; mit H₂O_{bid} auf 50 ml aufgefüllt; steril filtriert gelagert bei -20° C.

Harnstoff-Diluent: 84 g Harnstoff (ultra pure) (14 M), 18,7 g 10x TBE-Puffer, 76,4 g H₂O_{bid} unter Erwärmung; Lagerung bei RT.

Homogenistions-Puffer: 50 mM Hepes/KOH, pH 8.0; 400 mM Sorbit in H₂O_{bid}; gelagert bei RT

IPTG-Lösung: 1,2 mg IPTG in 50 μl H₂O_{bid}; gelagert bei -20°C

X-Ga-Lösung: 1 mg X-Gal in 40 μl DMF; gelagert bei -20°C

LB-Medium: 2,5 g Bacto-Trypton (1%), 1,25 g Hefeextrakt (0,5%), 2,5 g NaCl (170 mM), 3,75 g Agar (1,5%) ad. 250 ml H₂O_{bid}; pH-Wert mit 5 M NaOH auf 7,5 eingestellt; autoklaviert gelagert bei 4°C; Vor Gebrauch 1 ml Ampicillin-Lösung/ 250 ml).

LPA: 0,5 g 2x Acrylamid, 66,6 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (4 mM), 400 µl 1 M Tris/ HCl pH 7,5 (8 mM), 160 µl 125 mM EGTA-Lösung (0,4 mM) ad. 10 ml H₂O_{bid}; mit 500 µl 10% (w/w) APS (0,1%) und 50 µl TEMED (0,1%) 30 min bei RT auspolymerisieren lassen, anschließend Volumen mit H₂O_{bid} ad. 50 ml; Lagerung bei 4°C.

MgCl₂-Lösung (100 mM): 203,3 mg MgCl₂ x 6 H₂O ad. 10,0 ml H₂O_{bid}, Lagerung der Aliquots bei -20°C.

Magnesium(II)Salzlösung (2 M): 12,2 g MgCl₂ x 6 H₂O, 14,8 g MgSO₄ x 7 H₂O, ad. 50 ml H₂O_{bid}; sterilfiltriert gelagert bei 4° C.

Maleinsäurepuffer pH 7,5: 23,21 g Maleinsäure (100 mM), 17,53 g NaCl (150 mM), 16 g NaOH- Plätzchen (200 mM) ad. 2 l H₂O_{bid}; pH-Wert auf 7,5 einstellen, Lagerung bei RT.

NaCl-Lösung 5 M: 29,2 g NaCl (5 M) ad. 100 ml H₂O_{bid}; autoklaviert gelagert bei RT.

Natriumacetat-Lösung 3 M: 24,6 g Natriumacetat (3 M) ad. 100 ml H₂O_{bid}; autoklaviert gelagert bei RT.

NBT-Lösung: 500 mg NBT (100 mg/ ml) in 5 ml 70% DMF; Lagerung der Aliquots bei -20°C.

10x PCR-Puffer: 5,0 ml Tris-HCl-Lösung pH 8,0 (1M), 3,78 g KCl, 0,305 g MgCl₂, ad. 100 ml H₂O_{bid}; autoklaviert gelagert bei -20° C.

Phenol/ Chloroform: 25 Teile Phenol, 24 Teile Chloroform, 1 Teil Isoamylalkohol; Lagerung bei 4°C.

Reaktionspuffer pH 9,5: 5,84 g NaCl (100 mM), 2 g MgCl₂ (34 mM), 12,21 g Tris (100 mM) ad. 1 l H₂O_{bid}; Lagerung bei RT.

Silanlösung: 50 µl 3-Metacryloxypropyltrimethoxysilan, 30 µl 100% Essigsäure, 300 µl H₂O_{bid}, 9,62 ml Ethanol abs., Lagerung bei 4°C.

SOB-Medium: 5,0 g Bacto-Trypton, 1,25 g Hefeextrakt, 0,146 g NaCl, 0,047 g KCl, ad. 250 ml H₂O_{bid}; auf pH 7 eingestellt, autoklavieren; anschließend 2,5 ml Mg²⁺-Salzlösung (2 M); Lagerung bei 4° C.

SOC-Medium: 1 ml 2 M Glucose-Lösung (20 mM) ad. 100 ml SOB-Medium; Lagerung bei 4° C

10x Stop-Ladepuffer (Auftragspuffer): 400 µl Glycerin, 350 µl 10x TAE pH 8,0, 250 µl (Bromphenolblau/ Xylencyanol; Lagerung bei 4°C.

Streptavidinlösung: Streptavidin Alkaline Phosphatase 14 µl in 40 ml Reaktionspuffer; frisch angesetzt.

50x TAE-Puffer pH 8,0: 242,0 g Tris (2 M), 57,1 ml Eisessig (50 mM), 100 ml EDTA-Lösung (5,7%), ad. 1000 ml H₂O_{bid}; Lagerung bei RT.

10x TBE-Puffer: 154,5 g Tris, 26,2 g Borsäure, 9 g Na₂EDTA, 810 ml H₂O_{bid}; pH-Wert stellt sich von selbst bei 8,3 ein; Lagerung bei RT.

10x TE-Puffer pH 8,0: 10 ml 1 M Tris/ HCl pH 8,0 (100 mM), 2 ml 0,5 M EDTA-Lösung (10 mM), ad. 100 ml H₂O_{bid}; autoklaviert bei RT lagern.

Tris/ HCl-Puffer (1 M): 12,11 g Tris (1 M) ad. 100 ml H₂O_{bid}; pH-Wert mit konz. HCl auf pH 7,5 oder pH 8,3 eingestellt; Lagerung bei RT.

Anhang 3 In der Datenbank des NCBI veröffentlichte Sequenzen

Folgende im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte Sequenzen waren bereits Bestandteil von Veröffentlichungen und wurden in diesem Rahmen in der Datenbank des NCBI abgelegt:

gesamtes trnK-Intron:

<i>Triphyophyllum peltatum</i>	gi 14193654
<i>Ancistrocladus abbreviatus</i>	gi 14193652
<i>Nepenthes spec nov 1.</i>	gi 14193650
<i>Nepenthes gracilis</i>	gi 14193648
<i>Nepenthes fusca</i>	gi 14193646
<i>Nepenthes lavicola</i>	gi 14193644
<i>Nepenthes macrovulgaris</i>	gi 14193642
<i>Nepenthes muluensis</i>	gi 14193640
<i>Nepenthes tentaculata</i>	gi 14193638
<i>Nepenthes macrophylla</i>	gi 14193636
<i>Nepenthes eymae</i>	gi 14193634
<i>Nepenthes spec. nov 2</i>	gi 14193632
<i>Nepenthes glabrata</i>	gi 14193630
<i>Nepenthes densiflora</i>	gi 14193628
<i>Nepenthes bellii</i>	gi 14193626
<i>Nepenthes villosa</i>	gi 14193624
<i>Nepenthes talangensis</i>	gi 14193622
<i>Nepenthes sanguinea</i>	gi 14193620
<i>Nepenthes stenophylla</i>	gi 14193618
<i>Nepenthes burbidgeae</i>	gi 14193616
<i>Nepenthes mirabilis</i>	gi 14193614
<i>Nepenthes pilosa</i>	gi 14193612
<i>Nepenthes mapuluensis</i>	gi 14193610
<i>Nepenthes faizaliana</i>	gi 14193608
<i>Nepenthes bellii</i>	gi 14193606
<i>Nepenthes diatas</i>	gi 14193604
<i>Nepenthes hamata</i>	gi 14193602
<i>Nepenthes maxima</i>	gi 14193600
<i>Nepenthes merrilliana</i>	gi 14193598
<i>Nepenthes mikei</i>	gi 14193596
<i>Nepenthes rafflesiana</i>	gi 14193594
<i>Nepenthes pectinata</i>	gi 14193592
<i>Nepenthes albomarginata</i>	gi 14193590
<i>Nepenthes reinwardtiana</i>	gi 14193588
<i>Nepenthes ehippiata</i>	gi 14193586
<i>Nepenthes lamii</i>	gi 14193584
<i>Nepenthes truncata</i>	gi 14193582
<i>Nepenthes boschiana</i>	gi 14193580
<i>Nepenthes cf. petiolata</i>	gi 14193578

<i>Nepenthes northiana</i>	gi 14193576
<i>Nepenthes aristolochioides</i>	gi 14193574
<i>Nepenthes tobaica</i>	gi 14193572
<i>Nepenthes tomoriana</i>	gi 14193570
<i>Nepenthes vieillardii</i>	gi 14193568
<i>Nepenthes neoguineensis</i>	gi 14193566
<i>Nepenthes veitchii</i>	gi 14193564
<i>Nepenthes macfarlanei</i>	gi 14193562
<i>Nepenthes treubiana</i>	gi 14193560
<i>Nepenthes ventricosa</i>	gi 14193558
<i>Nepenthes alata</i>	gi 14193556
<i>Nepenthes thorelii</i>	gi 14193554
<i>Nepenthes hirsuta</i>	gi 14193552
<i>Nepenthes ampullaria</i>	gi 14193550
<i>Nepenthes khasiana</i>	gi 14193548
<i>Nepenthes distillatoria</i>	gi 14193546
<i>Nepenthes pervillei</i>	gi 14193544
<i>Nepenthes masoalensis</i>	gi 14193542
<i>Nepenthes madagascariensis</i>	gi 14193540
<i>Nepenthes insignis</i>	gi 14193538
<i>Nepenthes insignis</i>	gi 14193536
<i>Nepenthes rajah 1</i>	gi 14193534
<i>Nepenthes rajah 2</i>	gi 14193532
<i>Nepenthes clipeata</i>	gi 14193530
<i>Nepenthes clipeata</i>	gi 14193528
<i>Nepenthes lowii</i>	gi 14193526
<i>Nepenthes lowii</i>	gi 14193524
<i>Nepenthes rhombicaulis</i>	gi 14193522
<i>Nepenthes ovata</i>	gi 14193520
<i>Nepenthes sumatrana</i>	gi 14193518
<i>Nepenthes longifolia</i>	gi 14193516
<i>Nepenthes inermis</i>	gi 14193514
<i>Nepenthes dubia</i>	gi 14193512
<i>Nepenthes spectabilis</i>	gi 14193510
<i>Nepenthes eustachys</i>	gi 14193508
<i>Nepenthes adnata</i>	gi 14193506
<i>Nepenthes bongso</i>	gi 14193504
<i>Nepenthes gymnamphora</i>	gi 14193502

matK-Gen partiell:

<i>Portulaca oleracea</i>	gi 8568070
<i>Amaranthus paniculatus</i>	gi 8568068
<i>Bougainvillea spec</i>	gi 8568066
<i>Chenopodium bonus-henricus</i>	gi 8568064
<i>Simmondsia chinensis</i>	gi 8568062
<i>Frankenia laevis</i>	gi 8568060
<i>Tamarix gallica</i>	gi 8568058
<i>Rheum cf. rhabarbarum</i>	gi 8568056
<i>Polygonum bistorta</i>	gi 8568054
<i>Polygonum alpinum</i>	gi 8568052
<i>Plumbago indica</i>	gi 8568050
<i>Armeria gaditana</i>	gi 8568048
<i>Goniolimon tataricum</i>	gi 8568046
<i>Limonium mouretii</i>	gi 8568044
<i>Limonium narbonense</i>	gi 8568042
<i>Limonium ob lanceolatum</i>	gi 8568040
<i>Limonium rumicifolium</i>	gi 8568038
<i>Drosera capillaris</i>	gi 8568036
<i>Drosera aliciae</i>	gi 8568034
<i>Drosera regia</i>	gi 8568032
<i>Dionaea muscipula</i>	gi 8568030

<i>Drosophyllum lusitanicum</i>	gi 8568028
<i>Habropetalum dawei</i>	gi 8568026
<i>Dioncophyllum tholloni</i>	gi 8568024
<i>Triphyophyllum peltatum</i>	gi 8568022
<i>Ancistrocladus hamatus</i>	gi 8568020
<i>Ancistrocladus heyneanus</i>	gi 8568018
<i>Ancistrocladus abbreviatus</i>	gi 8568016
<i>Ancistrocladus korupensis</i>	gi 8568014
<i>Nepenthes distillatoria</i>	gi 8568012
<i>Nepenthes pervillei</i>	gi 8568010
<i>Nepenthes khasiana</i>	gi 8568008
<i>Nepenthes madagascariensis</i>	gi 8568006
<i>Nepenthes alata</i>	gi 8568004
<i>Nepenthes ventricosa</i>	gi 8568002
<i>Nepenthes macfarlanei</i>	gi 8568000
<i>Nepenthes thorelii</i>	gi 8567998
<i>Nepenthes tomoriana</i>	gi 8567996
<i>Nepenthes tobaica</i>	gi 8567994
<i>Nepenthes veitchii</i>	gi 8567992

Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Günther Heubl für die wissenschaftliche Freiheit, die mir bei der Bearbeitung des sehr interessanten Themas gewährt wurde bedanken und für seine dauernde Bereitschaft alle auftretenden Fragen und Probleme zu lösen. Dieser Dank gilt auch für Prof. Dr. Peter Dittrich, der mir freundlicherweise einen Laborarbeitsplatz zur Verfügung stellte. Beiden sei auch für das angenehme Arbeitsklima gedankt.

Tanja Ernst gilt mein Dank für die exzellente technische Unterstützung und für die Übernahme vieler der molekularbiologischen Routinearbeiten.

Die Untersuchungen an den Ancistrocladaceae waren nur mit der Hilfe verschiedener Arbeitsgruppen und Personen bei der Beschaffung des Pflanzenmaterials möglich. Hervorzuheben ist hier die AG Bringmann der Julius-Maximilians-Universität Würzburg zu nennen, die mir bereitwillig eine Fülle von Untersuchungsmaterial zur Verfügung stellte. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank vor allem Dr. Heiko Rischer, Dr. Jan Schlauer und Prof. Dr. Gerhard Bringmann. Auch für den regen Austausch von Anregungen und Informationen, der sich aus dieser Kooperation entwickelte, sei an dieser Stelle gedankt. Für die Bereitstellung von Pflanzenmaterial von *Nepenthes* bin ich Dr. Andreas Wistuba sehr dankbar.

Dr. Thangonsak Joganurak und Voradol Chamchumroon vom Royal Forest Department Thailand sei herzlich für die Unterstützung gedankt, die sie mir auf meinen Sammelreisen in Thailand gewährten. Ihre Ratschläge führten unmittelbar dazu, dass in der relativ kurzen Zeit, die mir auf den Reisen zur Verfügung stand, derart viele Specimen von *Ancistrocladus* gefunden werden konnten. Voradol Chamchumroon möchte ich darüber hinaus für die Übersendung von CTAB-fixiertem Material danken, welches er auf meine Bitte hin auf seinen Exkursionen sammelte. Auch Christian Bräuchle sei an dieser Stelle gedankt für das von seiner Reise nach Thailand und Laos mitgebrachte Pflanzenmaterial.

Dr. Stefan Thalhammer vom Institut für Kristallographie an der Ludwig-Maximilians-Universität München LMU danke ich für die Übernahme der LMM und LPC zur Probenvorbereitung für die Ein-Chloroplasten-PCR.

Schließlich möchte ich meinem Vater Dr. Rüdiger Meimberg für das Korrekturlesen und seine Geduld dabei danken, und meiner Frau Cristina Olaverri für ihre moralische Unterstützung während der Zeit des Verfassens dieser Arbeit.

Lebenslauf

Personalien		Harald Walter Engelbert Meimberg geboren am 8.6.1967 in Giessen verheiratet
Schulbildung	1973-1977	Gebele-Grundschule, München
	1977-1979	Maria-Theresia-Gymnasium, München
	1980-1984	Heinrich-Heine-Gymnasium, München
	1984-1987	Lion-Feuchtwanger-Gymnasium, München
	6.1987	Abitur
Zivildienst	10.87 -6.89	Pflegehelfer in der Chirurgischen Klinik Dr. Rinnecker
Studium	1989-1991	Grundstudium an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
	1992-1995	Hauptstudium an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München Hauptfach: Zoologie; Nebenfächer: Biochemie, Ökologie und Systematische Botanik
	2.1995-12.1995	Diplomarbeit am Institut für ökologische Chemie der Gesellschaft für Strahlen und Umweltforschung (GSF) zum Thema „Untersuchungen über detoxifizierende Enzyme limnischer Gastropoden und ihre Induzierbarkeit“
	10.1997	Beginn der vorliegenden Arbeit
Berufsweg	1996	Angestellter der Gesellschaft für Umwelt und Computergraphik (GUC)
	1.-6.97	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Abt. Schäffner
	seit 10.1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Systematische Botanik, Abt. Heubl

Publikationsliste

Meimberg, H., C. Schrenk, C. Steinberg, A. Klarenberg und A. A. F. Kettrup (1997) The suitability of Gastropods as biomarkers: Induction of Ethoxy-, Pentoxy- and Benzoxyresorufin-O-dealkylase in limnetic Gastropods via Aroclor 1254. *Environ Sci Pollut Res*, **4** (4): 183-188

Meimberg, H., P. Dittrich, G. Bringmann, J. Schlauer und G. Heubl (2000) Molecular phylogeny of Caryophyllidae s. l. based on matK-sequences with special emphasis on carnivorous taxa. *Plant Biol*, **2**: 218-228.

Meimberg, H., A. Wistuba, P. Dittrich und G. Heubl (2001) Molecular phylogeny of Nepenthaceae based on cladistic analysis of plastid trnK intron sequence data. *Plant Biol*, **3**: 154-175.

Lindermayr, C., B. Mollers, J. Fliegmann, A. Uhlmann, E. Lottspeich, H. Meimberg und J. Ebel (2002) Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. *Eur J Biochem* **269** (4), 1304-1315.

Tagungsbeiträge:

Meimberg, H., P. Dittrich und G. Heubl (2001) Molecular phylogeny of Nepenthaceae. 15. *Symposium Biodiversität & Evolutionsbiologie, Bochum.*

Posterpräsentationen:

Meimberg, H., P. Dittrich und G. Heubl (1999) Molekulare Phylogenie der Gattung *Nepenthes* L. (Nepenthaceae) basierend auf matK-Sequenzen. 14. *Symposium Biodiversität & Evolutionsbiologie, Jena.*

Meimberg, H., P. Dittrich, G. Bringmann, J. Schlauer und G. Heubl (1999) Molekulare Phylogenie und Chemotaxonomie der Familie Ancistrocladaceae PLANCH. 14. *Symposium Biodiversität & Evolutionsbiologie, Jena.*

Meimberg, H., H. Rischer, G. Bringmann, P. Dittrich und G. Heubl (2001) Molecular Phylogeny of the Ancistrocladaceae. 15. *Symposium Biodiversität & Evolutionsbiologie, Bochum.*

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt habe
und keine anderen als die von mir angegebenen
Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

München, den