

**Molekulare Studien zur Evolution der Myrmekophytie  
in der Gattung *Macaranga* (Euphorbiaceae)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

im Fachbereich Naturwissenschaften  
der Universität Kassel

vorgelegt von:

Gudrun Bänfer

aus:

Kassel

Kassel, im Februar 2008

---

**Betreuer: Prof. Dr. Kurt Weising**

**Prüfungskommission: Prof. Dr. Kurt Weising (1. Gutachter)  
Prof. Dr. Ewald Langer (2. Gutachter)  
Dr. Maria Maier-Stolte (Beisitzerin)  
Prof. Dr. Wolfgang Nellen (Beisitzer)**

**Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2008**

---

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>A.1</b>	<b>Ameisenpflanzen als Beispiel organischer Interaktionen.....</b>	<b>4</b>
<b>A.2</b>	<b><i>Macaranga</i> THOUARS (Euphorbiaceae).....</b>	<b>6</b>
A.2.1	Allgemeine Merkmale der Gattung.....	6
A.2.2	Systematik von <i>Macaranga</i> .....	10
A.2.2.1	Stellung der Gattung innerhalb der Euphorbiaceae.....	10
A.2.2.2	Taxonomische Gliederung der Gattung <i>Macaranga</i> .....	10
A.2.3	Entstehung und Alter der Gattung <i>Macaranga</i> .....	11
A.2.4	Die myrmekophytischen Arten.....	12
<b>A.3</b>	<b>Methoden der Molekularsystematik.....</b>	<b>13</b>
A.3.1	Vergleichende DNA-Sequenzierung.....	13
A.3.2	Fingerprinting anonymer DNA-Bereiche: AFLPs.....	14
<b>A.4</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>17</b>
<b>B</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
<b>B.1</b>	<b>Pflanzenmaterial.....</b>	<b>19</b>
<b>B.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>25</b>
B.2.1	Aufbewahrung der Pflanzenproben.....	25
B.2.2	DNA-Isolation und DNA-Aufreinigung.....	25
B.2.3	Agarose-Elektrophorese.....	26
B.2.4	Elektrophorese und Detektion von DNA-Fragmenten auf einem automatischen DNA-Sequenzierer (LI-COR 4200).....	27
B.2.5	AFLP-Analyse.....	29
B.2.5.1	Restriktion und Ligation.....	29
B.2.5.2	Präamplifikation.....	30
B.2.5.3	Selektive Amplifikation und Auftrennung der AFLP-Fragmente.....	31
B.2.6	Chloroplasten-DNA-Sequenzierung.....	32
B.2.6.1	Amplifikation nichtkodierender Chloroplastensequenzen.....	32
B.2.6.2	Sequenzierung.....	33
B.2.7	Datenauswertung.....	35
B.2.7.1	Auswertung der AFLP-Daten.....	35
B.2.7.1.1	Erstellung der binären Matrix.....	35
B.2.7.1.2	Phänetische Analysen.....	36
B.2.7.1.3	Hauptkoordinaten-Analyse („principal coordinate analysis“, PCO).....	37
B.2.7.2	Analyse der Chloroplasten-DNA-Daten.....	38
B.2.7.2.1	Alignment.....	38
B.2.7.2.2	Phylogenetisch-kladistische Analyse von Chloroplastendatensätzen....	38
B.2.7.2.3	Phylogeographische Auswertung von Chloroplasten-Datensätzen.....	39
B.2.8	Statistische Überprüfung.....	41
B.2.8.1	Bootstrap (BS)-Analyse.....	41
B.2.8.2	Kladistische Statistik.....	41

---

---

<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>C.1</b>	<b>Methodischer Teil</b>	<b>42</b>
C.1.1	DNA-Isolation	42
C.1.2	Etablierung und Optimierung der AFLP-Analyse bei <i>Macaranga</i>	44
C.1.2.1	Restriktion und Ligation	44
C.1.2.2	Präamplifikation	46
C.1.2.2.1	Einfluss von PCR-Additiven auf die Präamplifikation	46
C.1.2.2.2	Einfluss von Thermocycler und Heizrate auf die Präamplifikation	47
C.1.2.3	Selektive Amplifikation	47
C.1.2.3.1	Einfluss von PCR-Additiven und Hot Start-PCR auf die selektive Amplifikation	48
C.1.2.3.2	Einfluss der Thermocycler und Heizrate auf die selektive Amplifikation	49
C.1.2.3.3	Selektive Amplifikation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Präamplifikationsprodukte	50
C.1.2.4	Reproduzierbarkeit	50
C.1.2.5	Auswahl der Primer für die phylogenetische Studie	51
C.1.2.6	Auswahl der DNA-Proben für die phylogenetische Studie	52
C.1.3	Pilotstudien zur Charakterisierung informativer Chloroplasten-Regionen	53
C.1.3.1	Der <i>psbB-psbH</i> -Spacer	53
C.1.3.2	Das <i>rps16</i> -Intron	53
C.1.3.3	Die <i>trnT-trnL</i> - und <i>trnL-trnF</i> -Spacer sowie das <i>trnL</i> -Intron	53
C.1.3.4	Der <i>psbA-trnH</i> -Spacer	54
C.1.3.5	Der intergenische Bereich zwischen <i>trnQ</i> und <i>trnS</i> und der <i>ccmp2</i> -Locus	55
C.1.3.6	Der <i>ccmp6</i> -Locus: Mikrosatelliten-Hotspot im ersten <i>ycf3</i> -Intron	56
C.1.3.7	Der <i>atpB-rbcL</i> -Spacer	56
<b>C.2</b>	<b>Phylogenie myrmekophytischer <i>Macaranga</i>-Arten und ihrer Verwandten</b>	<b>57</b>
C.2.1	AFLP-Phylogenie	57
C.2.1.1	Phänetische Analyse der AFLP-Daten	58
C.2.1.2	Kladistische Analyse der AFLP-Daten	61
C.2.1.3	Haupt-Koordinaten-Analyse der AFLP-Daten	63
C.2.2	Chloroplasten-Phylogenie	64
C.2.2.1	Phylogenie auf der Basis des <i>atpB-rbcL</i> -Spacers	64
C.2.2.2	Phylogenie auf der Basis des <i>psbI-trnS</i> -Spacers ( <i>ccmp2</i> )	66
C.2.2.3	Kombinierte Analyse beider Chloroplasten-Regionen	69
<b>C.3</b>	<b>Analyse der Chloroplasten-Daten mit Hilfe eines statistischen Parsimonie-Netzwerkes</b>	<b>71</b>
C.3.1	Haplotypendiversität am <i>atpB-rbcL</i> , <i>psbI-trnS</i> und <i>ycf3</i> -Locus	71
C.3.2	Zweistufen-Rekonstruktion eines statistischen Parsimonie-Netzwerkes	72
C.3.3	Unterteilung der Gruppen und geographische Verbreitung der Haplotypen	75
<b>D</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
<b>D.1</b>	<b>Methodischer Teil</b>	<b>78</b>
D.1.1	DNA-Isolation	78

---

---

D.1.2	AFLP-Analyse.....	79
D.1.2.1	Etablierung und Optimierung der AFLP-Analyse bei <i>Macaranga</i> .....	79
D.1.2.1.1	Restriktion und Ligation.....	79
D.1.2.1.2	Präamplifikation.....	80
D.1.2.1.3	Amplifikation.....	80
D.1.2.2	Auswahl der selektiven Primer.....	81
D.1.2.3	Auswahl der DNA-Proben.....	81
D.1.2.4	Auswertung der AFLP-Daten.....	82
D.1.3	Eignung verschiedener Chloroplasten-Regionen für die phylogenetische Analyse von <i>Macaranga</i> -Arten.....	83
D.1.3.1	Die Loci <i>trnS-trnG</i> , <i>ndhD-ndhE</i> und <i>psbB-psbH</i> .....	83
D.1.3.2	Die Region zwischen <i>psbA</i> und <i>trnH</i> .....	83
D.1.3.3	Der <i>atpB-rbcL</i> -Bereich.....	83
D.1.3.4	Der Bereich zwischen <i>psbI</i> und <i>trnS</i> („ <i>ccmp2</i> -Locus“).....	84
D.1.3.5	Verwendung des „ <i>ccmp6</i> “-Locus für die phylogeographische Analyse: ein Mikrosatelliten-Hotspot.....	85
D.1.4	Kritische Betrachtung der gewählten Methoden.....	85
D.1.4.1	AFLP-Analyse.....	85
D.1.4.2	Kritische Betrachtung zur DNA-Sequenzierung und zu den verwendeten Auswertemethoden.....	86
D.1.4.2.1	Alignment von Nukleotid-Daten.....	86
D.1.4.2.2	Insertionen/Deletionen.....	87
D.1.4.2.3	Schwierigkeiten mit der Erstellung und Interpretierung von Phylogrammen.....	88
D.1.4.3	Statistische Absicherung als Beweis einer speziellen Topologie?.....	89
D.1.4.4	Kritische Betrachtungen zu genetischen Netzwerken.....	90
<b>D.2</b>	<b>Phylogenie der myrmekophytischen <i>Macaranga</i>-Arten und ihre Stellung innerhalb der Gattung.....</b>	<b>91</b>
D.2.1	Charakterisierung der Sektionen und Artengruppen mit myrmekophytischen <i>Macaranga</i> -Arten.....	92
D.2.1.1	Die <i>puncticulata</i> -Gruppe.....	92
D.2.1.2	Sektion <i>Pachystemon</i> (BLUME) MÜLL. ARG.....	92
D.2.1.3	Sektion <i>Pruinosae</i> PAX & K. HOFFM. ....	96
D.2.1.4	Sektion <i>Winklerianae</i> PAX & K. HOFFM. ....	97
D.2.2	Spezifität der Besiedlung durch Ameisen.....	97
D.2.3	Interpretation der AFLP-Daten.....	100
D.2.4	Chloroplasten-Phylogenie der südostasiatischen <i>Macaranga</i> -Arten.....	102
D.2.4.1	Interpretation der „Maximum parsimony“-Kladogramme.....	102
D.2.4.2	Interpretation mit Hilfe eines statistischen Parsimonie-Netzwerkes.....	103
D.2.5	Fazit: Phylogenie der myrmekophytischen <i>Macaranga</i> -Sektionen Südostasiens.....	104
D.2.6	Phylogeographische Auswertung ausgewählter Sektionen mit Hilfe der Chloroplasten-Sequenzen.....	106
D.2.7	Konstruktion des Netzwerkes.....	106

---

---

D.2.8	Auslese bestimmter Chloroplasten-Typen; Hybridisierung und Introgression oder Beibehaltung ursprünglicher Haplotypen?.....	107
D.2.9	Gedanken zur Biogeographie myrmekophytischer <i>Macaranga</i> -Arten mit Hilfe der Chloroplasten-Haplotypen.....	108
<b>D.3</b>	<b>Koevolution von Pflanze und Ameise innerhalb der Gattung <i>Macaranga</i> ? .....</b>	<b>112</b>
D.3.1	Anmerkungen zu der Ameisenevolution.....	112
D.3.2	Evolution der Myrmekophytie innerhalb von <i>Macaranga</i> .....	114
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>117</b>
<b>F</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>120</b>
<b>G</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>133</b>
<b>H</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>133</b>
<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
<b>J</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>136</b>

---

## A Einleitung

Die Aufklärung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Organismen ist eine ganz wesentliche Voraussetzung für die Untersuchung der Evolution ihrer Merkmale, ihrer historischen Verbreitung (z.B. Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997; Ferris *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001), ihrer ökologischen Anpassungen (z.B. Quek *et al.*, 2004) oder auch ihrer Interaktionen mit anderen Organismen (Brouat *et al.*, 2004; Feldhaar *et al.*, 2003aa; z.B. Gargas *et al.*, 1995). Als Ergänzung zu der traditionellen morphologisch-taxonomischen Herangehensweise haben sich in den vergangenen zwei Jahrzehnten vor allem molekulare Analysen auf DNA-Basis als hilfreich erwiesen phylogenetische Zusammenhänge zu rekonstruieren (Hillis, 1996). Molekulare Daten haben inzwischen zur Aufklärung von Verwandtschaftsbeziehungen auf allen taxonomischen Ebenen beigetragen, auch unterhalb der Artebene (Avisé, 2000).

*Macaranga* THOUAR. (Euphorbiaceae) ist weltweit eine der größten tropischen Pionierbaumgattungen. Viele Arten dieser Gattung sind an das Leben mit Ameisen adaptiert, wobei Grad und Ausprägung der Interaktion sehr unterschiedlich gestaltet sein können (siehe A.2.4). Das Verbreitungsgebiet von *Macaranga* reicht von Westafrika über Süd- und Südostasien bis zu den pazifischen Inseln, allerdings haben sich nur im südostasiatischen Raum sogenannte Myrmekophyten (echte Ameisenpflanzen, siehe A.1) herausgebildet, die meist mit Arten der Ameisengattung *Crematogaster* vergesellschaftet leben.

Da auf beiden Seiten des Systems zahlreiche potentielle Partnerarten an der Interaktion beteiligt sein können, stellen *Macaranga* und *Crematogaster* ein gut geeignetes Modellsystem für das Studium der Evolution der Myrmekophytie dar (siehe A.1). Dafür ist jedoch die Kenntnis der Phylogenie der beiden Partnerorganismen eine wichtige Voraussetzung. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit standen bereits erste molekulare Stammbäume von *Macaranga* zur Verfügung, die auf Sequenzierungen der ITS-Region der ribosomalen DNA, sowie RAPD-Fingerprinting und Mikrosatelliten-PCR (MP-PCR) beruhten (Bänfer, 1999; Blattner *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2001). Diese Stammbäume unterstützten die These, dass die Myrmekophytie innerhalb von *Macaranga* mehrfach unabhängig entstanden ist. Allerdings erwiesen sich die Arten der morphologisch und ökologisch besonders vielfältigen Sektion *Pachystemon* als genetisch äußerst homogen und wiesen z.T. identische ITS-Sequenzen auf. Die Arten dieser Sektion waren infolgedessen insbesondere in den ITS- Stammbäumen nicht gut aufgelöst. Es konnten zwar einzelne Artengruppen mit beiden Methoden identifiziert werden, die aber nur eine geringe statistische Stützung erfuhren.

Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten molekularsystematischen Untersuchungen setzen an dieser Stelle an. Zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den myrmekophytischen *Macaranga*-Arten und zur Rekonstruktion einer Phylogenie der myrmekophytischen Sektionen wurden dabei zwei neue Wege eingeschlagen. Zum einen wurden AFLPs ("amplified fragment length polymorphisms"; Vos *et al.*, 1995) als hochauflösende molekulare Markermethode für *Macaranga* etabliert und AFLP-Stammbäume berechnet (siehe A.3.2), zum anderen wurden Phylogenien und genetische Netzwerke auf der Basis von DNA-Sequenzdaten ausgewählter, variabler Chloroplasten-Loci berechnet (siehe A.3.1).

Die durchgeführten Analysen sollten insgesamt zu einem besseren Verständnis von Spezifität und Diversität der Myrmekophytie in dem untersuchten *Macaranga-Crematogaster*-System im speziellen, und der Rolle von myrmekophytischen Systemen für die Erhaltung der Artenvielfalt in tropischen Regenwäldern im Allgemeinen beitragen.

## A.1 Ameisenpflanzen als Beispiel organischer Interaktionen

Eines der interessantesten Forschungsgebiete in der Natur ist die Untersuchung des Zusammenspiels verschiedener Organismen. In allen Ökosystemen koexistieren Arten aus häufig ganz unterschiedlichen taxonomischen Gruppen, die in zahlreichen Wechselbeziehungen zueinander stehen. Um die Vorgänge in einem Ökosystem nachvollziehen zu können, ist es wichtig, nicht nur einzelne Organismen zu betrachten, sondern die Interaktion von verschiedenen Organismen zu verstehen. Diese kann dabei nur einem der Partner von Nutzen sein (z.B. im Falle von Parasitismus und Räuber-Beute-Beziehung) oder auch beiden (bzw. mehreren) Beteiligten zum gegenseitigen Vorteil gereichen. Im letzteren Falle spricht man von einem Mutualismus. Eine spezielle Form des Mutualismus stellt die Symbiose dar. Bei einer Symbiose leben zwei oder mehr Organismen sehr eng zusammen, meist zum Vorteil für alle Partner. Es kann sich dabei um Lebens- oder auch Ernährungsgemeinschaften handeln. Die hier dargelegten Definitionen sind nicht allgemeingültig, da insbesondere in der amerikanischen Literatur die Begriffe „Mutualismus“ und „Symbiose“ häufig synonym verwendet werden.

Mutualistische und symbiotische Beziehungen findet man in allen Organismengruppen. Zu den bekannteren Beispielen gehören die Wechselwirkungen von Bakterien und vielen Schmetterlingsblütlern (Fabaceae). In deren Wurzeln sitzen Luftstickstoff fixierende Knöllchenbakterien, die es den Pflanzen ermöglichen, auch auf stickstoffarmen Habitaten zu existieren. Ein weiteres Beispiel ist die Mykorrhiza, eine Symbiose zwischen Landpflanzen und Pilzen. Mehr als 90 % aller Landpflanzen bilden eine von mehrerer bekannten Mykorrhiza-Varianten aus, zu den beteiligten Pilzpartnern zählen viele unserer Speise- und Giftpilze. Bei Flechten wiederum handelt es sich um eine Symbiose zwischen einem Mykobionten (Pilzpartner) und einem, manchmal auch zwei Photobionten (Grünalgen oder Cyanobakterien). Besonders häufig sind mutualistische Beziehungen zwischen Pflanzen und Tieren. Das wohl bekannteste Beispiel in dieser Hinsicht sind die Blüten und ihre Bestäuber.

Mutualistische Wechselbeziehungen, die mit mehr oder weniger auffälligen morphologischen Anpassungen einher gehen, kommen schließlich auch zwischen Ameisen und Pflanzen vor (Keeler, 1989). Die Vergesellschaftung der beiden Partner kann dabei sehr unterschiedlicher Natur sein. Bei manchen Pflanzen werden die Samen durch Ameisen ausgebreitet (Myrmekochorie, z.B. beim Lerchensporn, *Corydalis*). Hier dient Nahrung in Form von fetthaltigen Samenanhängseln (Elaiosomen) als Lockmittel für die Ameisen. Eine eher untergeordnete Rolle spielen Ameisen bei der Bestäubung, u.a. aufgrund ihrer geringen Behaarung (Myrmekophilie). Manche Pflanzen locken Ameisen durch das Präsentieren von Nahrung an (z.B. extrafloralen Nektar), was einen gewissen Fraßschutz darstellen kann (Myrmekophyllaxis). So werden Fraßfeinde der Pflanzen (Raupen, Schnecken) häufig von Ameisen attackiert, die auf der Suche nach Nahrung auf Pflanzen patrouillieren (Fiala *et al.*, 1994). Ein aus unseren Breiten bekanntes Beispiel für solche Pflanzen stellt die Pfingstrose (*Paeonia officinalis*, Paeoniaceae) dar, deren Blütenknospen stark von Ameisen frequentiert werden, um den dort angebotenen Nektar aufzunehmen.

In den Tropen haben sich neben den o.g., meist fakultativen Vergesellschaftungen zwischen Ameisen und Pflanzen im Laufe der Evolution auch hoch spezialisierte Symbiosen entwickelt. Bei diesen sogenannten Ameisenpflanzen oder Myrmekophyten (Keeler, 1989) stellen die Pflanzen den Ameisen Wohnraum (sog. Domatien) in hohlen Spross-, Blatt- oder Wurzelteilen zur Verfügung (Fiala und Maschwitz, 1992; Weissflog *et al.*, 1999). Viele Ameisenpflanzen bieten ihren Ameisenpartnern darüber hinaus auch

Nahrung an, in der Regel in Form von extrafloralen Nektar oder von speziellen Nährkörperchen (Fiala und Maschwitz, 1992; Heil *et al.*, 1998). Im Gegenzug schützen die Ameisen ihre Wirtspflanzen vor Herbivoren, und verbeißen sogar die Ranken von konkurrierenden Kletterpflanzen (Federle *et al.*, 1997; Fiala *et al.*, 1989; Gaume und McKey, 1998). Bei Ameisenpflanzen der Gattung *Macaranga* wurde nachgewiesen, dass sie das „Mehr“ an verbrauchten Ressourcen durch eine Reduktion des chemischen Fraßschutzes zumindest teilweise wieder einsparen (Eck *et al.*, 2001).

Eine spezielle Form von Myrmekophytie findet man bei Ameisenpflanzen, die unter sehr nährstoffarmen Bedingungen wachsen müssen, wie es zum Beispiel für einige Epiphyten der Fall ist. Bei dieser als Myrmekotrophie bezeichneten Art von Interaktion spielt Schutz keine Rolle, und der Fluss der Nährstoffe geht in die entgegengesetzte Richtung: die Myrmekophyten erhalten Stickstoff und Elektrolyte in Form von eingetragenen Pflanzenresten und tierischen Abfällen durch die assoziierten Ameisen. Myrmekotrophie kommt z.B. bei dem südostasiatischen Epiphyten *Myrmecodia tuberosa* (Rubiaceae) vor (siehe Keeler, 1989).

Bei der Mehrzahl der hochentwickelten Myrmekophyten-Gemeinschaften handelt es sich um Symbiosen, deren Partner alleine nicht auf die Dauer existieren können, oder zumindest nicht zur Fortpflanzungsreife gelangen. Die Bereitstellung von Wohnraum geht dabei meist, aber nicht immer mit einer *spezifischen* Ameisen-Pflanzen-Beziehung einher. Es gibt nur wenige Beispiele dafür, dass die Domatien von Ameisenpflanzen auch durch opportunistische Ameisen unspezifisch besiedelt werden (z.B. *Macaranga caladiifolia*; Fiala *et al.*, 1996; und *Leonardoxa africana* ssp. *gracilicaulis*; McKey, 2001).

Erhalten die Ameisen Nahrung von den Pflanzen, so kann das auf verschiedene Art geschehen. Erstens gibt es Pflanzen, die den Ameisen wässrige Zuckerlösungen in Form von extrafloralen Nektar anbieten. Die Nektarien sitzen meist auf der Fläche oder am Rand von Laubblättern, manchmal auch am Blattstiel (Blüthgen *et al.*, 2000; Fiala und Maschwitz, 1991; Keeler, 1989). Eine zweite Möglichkeit besteht in der Produktion von zucker-, fett- oder proteinhaltigen Nährkörperchen, die z.B. auf den Stipeln oder jungen Blättern angeboten werden (Fiala und Maschwitz, 1992; Fiala *et al.*, 1994; Heil *et al.*, 1998; Keeler, 1989). Eine dritte Möglichkeit zur – allerdings indirekten- Nahrungsversorgung symbiotischer Ameisen besteht schließlich in der Einbeziehung von Schildläusen (Cocciden) als dritten Symbiosepartner (Blüthgen *et al.*, 2000; Heckroth *et al.*, 1998). Hierbei leben die Cocciden ebenfalls innerhalb der Domatien der Wirtspflanzen, und die Ameisen sammeln den von den Schildläusen abgegebenen Honigtau. Bei der Mehrzahl der obligat symbiotischen Myrmekophyten findet die Ernährung fast ausschließlich durch Nährkörperchen (Federle und Rheindt, 2005; Fiala und Maschwitz, 1992; Heil *et al.*, 1998) und/oder durch Cocciden statt (Heckroth *et al.*, 1998), während extraflorale Nektarien nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Zur Ausbildung obligat symbiotischer Interaktionen im Rahmen der Myrmekophytie sind spezielle Rahmenbedingungen nötig. Nur im tropischen Klima, das keine ausgeprägte Saisonalität aufweist und damit eine Nährstoffproduktion während des gesamten Jahres erlaubt, kann eine dauerhafte Nahrungsversorgung für die Ameisen garantiert werden. Bekannte Beispiele für myrmekophytische Beziehungen in den immergrünen Tropen verschiedener Kontinente sind *Cecropia*-Bäume (Moraceae), assoziiert mit *Azteca*-Ameisen in Süd- und Mittelamerika, *Acacia*-Arten, assoziiert mit *Iridomyrmex* in Afrika und dem tropischen Amerika, oder *Leonardoxa africana* (Fabaceae), assoziiert mit *Aphomomyrmex afer* bzw. *Petalomyrmex phylax* ebenfalls in Afrika. In Südostasien stellt die Vergesellschaftung zwischen *Macaranga* (Euphorbiaceae) und Ameisen der Gattungen *Crematogaster* bzw. *Camponotus* die am stärksten diversifizierte Form der Myrmekophytie dar.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde der Frage nach der ökologischen und evolutiven Bedeutung myrmekophytischer Interaktionen intensiv nachgegangen. Untersuchungen auf der Pflanzenseite wurden u.a. durchgeführt an *Macaranga* (Federle *et al.*, 1998; Fiala *et al.*, 1989; Fiala, 1996; Heil *et al.*, 1999), *Cecropia* (Agrawal, 1998; Folgarait und Davidson, 1995), *Leonardoxa* (Brouat *et al.*, 2004; Chenuil und McKey, 1996; Gaume und McKey, 1998) und *Acacia* (Heil und McKey, 2003; Heil *et al.*, 2004). Studien auf der Ameisenseite beschäftigten sich mit den entsprechenden Partnerorganismen aus den Gattungen *Crematogaster* (Feldhaar *et al.*, 2000; Feldhaar *et al.*, 2003aa; 2003bb; Quek *et al.*, 2004), *Azteca* (Ayala *et al.*, 1996) und *Aphomyrmex* (Gaume *et al.*, 2000).

Im Hintergrund solcher Untersuchungen steht oft die Frage, inwieweit zwischen den an der Symbiose beteiligten Arten eine Koadaption/Koevolution stattgefunden hat oder gar eine Kospeziation erfolgt ist. Eine wichtige Voraussetzung, um dieser Frage nachzugehen, ist eine klare taxonomische Zuordnung sowie die Aufklärung der Verwandtschaftsbeziehungen der beteiligten Taxa. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen in dieser Richtung. Überdies wurde meist nicht das ganze System betrachtet, sondern nur die Phylogenie jeweils eines Partners untersucht, so z.B. Ayala *et al.* (1996) für *Azteca* spp. Phylogenetische Analysen auf beiden Seiten der myrmekophytischen Beziehungen wurden bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit nur an zwei Systemen durchgeführt. Dabei handelt es sich zum einen um die afrikanische Art *Leonardoxa africana* und ihre Symbionten (Brouat *et al.*, 2001; Brouat *et al.*, 2004; Chenuil und McKey, 1996; McKey, 2001), zum anderen um *Macaranga* und ihre Ameisenpartner (Blattner *et al.*, 2001; Davies, 2001; Davies *et al.*, 2001; Feldhaar *et al.*, 2003aa; Quek *et al.*, 2004). *Macaranga* ist mit der relativ großen Zahl von ca. 30 myrmekophytischen Arten für Grundsatzfragen zur Klärung von obligaten Ameisen-Pflanzen-Beziehungen besonders gut geeignet.

Das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den myrmekophytischen Arten der Gattung *Macaranga*. Im Folgenden wird näher vorgestellt, was über die Biologie und Systematik dieser Gattung bisher bekannt ist.

## A.2 *Macaranga* THOUARS (Euphorbiaceae)

Zur Gattung *Macaranga* THOUARS (Euphorbiaceae) werden derzeit etwa 300 Arten und Unterarten gerechnet. Etwa 50 Arten kommen in Afrika/Madagaskar vor, der Rest ist im tropischen Asien von Indien bis Neuguinea/Australien und einigen pazifischen Inseln verbreitet. Es gibt zwei Diversitätszentren der Gattung, eines davon ist Borneo, das andere Neuguinea. Myrmekophyten kommen in den drei Sektionen *Pachystemon*, *Pruinosae* und *Winklerianae* vor (Tabelle 1). Diese Sektionen haben ihre höchste Artenvielfalt auf Borneo entwickelt (Davies, 2001). Die systematische Gliederung der Gattung ist revisionsbedürftig, da die letzte Gesamtbearbeitung auf Pax und Hoffmann (1914) zurückgeht und damit vor vor nahezu 100 Jahren erfolgte.

### A.2.1 Allgemeine Merkmale der Gattung

Alle *Macaranga*-Arten sind diözische Bäume oder Sträucher. Viele der Arten sind charakteristisch für gestörte Habitats und stellen sogenannte Pionierbäume dar. Die Ansprüche an ihre Umwelt sind sehr weitgefächert (Davies, 2001; Pax und Hoffmann, 1914; Whitmore, 1975). So findet man *Macaranga*-Arten in Primär- sowie in Sekundärwäldern, auf trockenen ebenso wie feuchten und selten auch auf angeschwemmten Böden (z.B. *M. hypoleuca*). Einige Arten sind weit verbreitet (z.B.

*M. tanarius*, *M. triloba*, *M. hypoleuca*, *M. hosei*), andere kommen nur in sehr begrenzten Gebieten vor und/oder weisen sehr spezielle Habitatansprüche auf (z.B. wächst *M. calcicola* nur auf Kalkböden).

Trotz ihrer beträchtlichen morphologischen Diversität weisen die Arten der Gattung einige gemeinsame Merkmale auf. Die Blätter sind ungeteilt oder handförmig geteilt und schraubig angeordnet. Viele Arten besitzen gelbliche, auf der Blattunterseite sitzende Drüsen, über deren Funktion bis jetzt nur wenig bekannt ist. Auf der Blattoberseite sitzen häufig extraflorale Nektarien, die in Form und Anordnung typisch für bestimmte Arten sein können. Manche Arten besitzen Nährkörperchen, die hier auch Beccari'sche Körperchen genannt werden und als Belohnung für Ameisen dienen (Keeler, 1989). Die Nebenblätter sind meist groß und unterschiedlich geformt. Die Infloreszenzen sind axillär angeordnet, rispenförmig oder traubig und variieren im Grad der Verzweigung. Die eingeschlechtlichen Blüten sind klein und unauffällig. Die männlichen Blütenstände bestehen aus Gruppen von 6 bis etwa 30 Blüten und sind von unterschiedlich gestalteten Brakteolen mehr oder weniger stark eingeschlossen. Die Einzelblüten besitzen meist 1 bis 6, selten auch mehr Staubgefäße. Die weiblichen Blüten stehen einzeln und bilden nach erfolgter Befruchtung Kapsel Früchte aus, die drüsige Anhänge haben können. Die Samen sind von einem meist auffällig gefärbten Arillus umgeben, was auf eine mögliche Ausbreitung durch Vögel hinweist.

**Tabelle 1: Vorkommen und Verbreitung von *Macaranga*-Arten im südostasiatischen Raum.** Die Arten sind nach Sektionen bzw. Artengruppen gegliedert. Die Sektionszuordnungen folgen überwiegend den Angaben von Davies (2001) und Whitmore (1975). Taxa, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht in die Untersuchungen einbezogen wurden bzw. werden konnten, sind mit einem \* markiert. Bei den Taxa *M. spec.* A, B, C und D handelt es sich um noch nicht beschriebene Taxa, bzw. potentielle Hybriden. Das Habitat und Vorkommen konnte nicht bei allen Taxa angegeben werden, weil entsprechende Untersuchungen fehlen. Abkürzungen: (a) Verbreitungsangaben: AU=Australien, B=Borneo, Ba=Bangka, Br=Brunei, I=Indien, IC=Indochina, J=Java, M=Westmalaysia, OK=Ostkalimantan S=Sumatra, Sb=Sabah, Sr=Sarawak, Si=Singapur, Su=Sulawesi T=Thailand, WK=Westkalimantan, ZK=Zentralkalimantan. (b) Habitatpräferenz: P=Primärwald, S=Sekundärwald, D=stark gestörter Standort; (c) Höhenlage: L=Tiefland, SM=submontan, M=montan

Art	Verbreitung	Habitat	Vorkommen
<b>Sektion <i>Adenoceras</i> RCHB.F. &amp; ZOLL. EX BAILL.</b>			
<i>M. endertii</i> WHITMORE *	B (OK)	P	L, SM; oft kalkig
<b><i>denticulata</i>-Gruppe</b>			
<i>M. denticulata</i> (BLUME) MÜLL. ARG.	M, S, T, J		
<i>M. indica</i> WIGHT	M, T, I, IC		
<b>Sektion <i>Javanicae</i> PAX &amp; HOFFM.</b>			
<i>M. costulata</i> PAX & HOFFM.	B (SK)	P, S	M
<i>M. heynei</i> I.M. JOHNSTON	M, S		
<i>M. javanica</i> (BLUME) MÜLL. ARG.	S, J, Ba	P	
<i>M. kinabaluensis</i> AIRY SHAW	B	P	SM, M
<i>M. spathicalyx</i> WHITMORE & S.J.DAVIES	B		
<b>Sektion <i>Pachystemon</i> (BLUME) MÜLL. ARG.</b>			
<i>M. aëtheadenia</i> AIRY SHAW	B (Br, Sr, OK)	P, S, D	L
<i>M. angulata</i> S. J. Davies	B (Br, Sb, Sr)	P, D	SM, M
<i>M. ashtonii</i> S. J. DAVIES	B (Sb, Sr)		SM
<i>M. bancana</i> (MIQ.) MUELL. ARG.	T, PM, Ba, Li, Si, Su, B (Br, western Sb, Sr, OK)	P, S, D	L, trocken
<i>M. beccariana</i> MERRILL	B (Br, Sb, Sr, Z-., O- and WK)	P, S, D	L, SM
<i>M. caladiifolia</i> BECC.	B (Sr, WK)	P	L, Kerangas
<i>M. calcicola</i> AIRY SHAW	B (Bau in Sr)		L, Kalk
<i>M. constricta</i> T. C. WHITMORE & AIRY SHAW *	PM (Pahang, Terengganu)		L, trocken
<i>M. curtisii</i> HOOK. F.	PM (Penang), Su, T, J	P	SM
var. <i>glabra</i> T. C. WHITMORE	PM	P	SM, M
<i>M. depressa</i> (MUELL. ARG.) MUELL. ARG.	B (ZK, SK, Sr), Su, Ba	P, S	SM, M
f. <i>glabra</i> T. C. WHITMORE	B (Ost-Sb, Sr)	P, S	L, SM
f. <i>strigosa</i> T. C. WHITMORE	B (Z-., O- and WK, Sr)	P, S	L, SM, Sumpf
<i>M. glandibracteolata</i> S. J. DAVIES	B (östlich der Crocker Range Sb, OK)	P, S, D	L
<i>M. griffithiana</i> MUELL. ARG.	La, PM, S, PT, südliches V	P, D	L, Sumpfwald
<i>M. havilandii</i> AIRY SHAW	B (Br, Sr)	P	L, Nährstoffarm
<i>M. hullettii</i> KING, EX HOOK. F.	PM, Si, PT, B (not Sb)	P, S	L, SM, M
<i>M. hypoleuca</i> (REICHB. F. & ZOLL.) MÜLL. ARG.	PM, B (Br, O-, Z-, WK, Sb, Sr), Su, Si, PT	S	SM, M
<i>M. indistincta</i> T. C. WHITMORE	B (Sb östlich der Crocker Range, OK in Kutai)	P, S	L, SM
<i>M. kingii</i> HOOK. F. *	PM (Johor), B (Sr), Su	P ?	L, feucht
<i>M. lamellata</i> T. C. WHITMORE	B (Br, Z-., O- und WK, Sb, Sr)	P	L, oft auf Sandstein
<i>M. motleyana</i> (MUELL. ARG.) MUELL. ARG.	B (Z-, O-, SK, östliches Sb, westliches Sr)	P	L
<i>M. petanostyla</i> AIRY SHAW	B (Sb)	S	SM
<i>M. puncticulata</i> GAGE	B (OK) PM	P	L, Sumpf
<i>M. rostrata</i> HEINE	B (Sb; Sr Kelabit Highlands)	P, S	SM
<i>M. sarcocarpa</i> AIRY SHAW	B (Kuching Sr)		
<i>M. spec.</i> A	B (Sb)		

Art	Verbreitung	Habitat	Vorkommen
<i>M. spec. B</i>	B (Sb)		
<i>M. spec. C</i>	B (Br)	S	L ?
<i>M. spec. D</i>	B (Penrissen Sr)	S	
<i>M. trachyphylla</i> AIRY SHAW	B (Sb, Sr, Br)	P, S	L, eher trocken
<i>M. triloba</i> (BL.) MUELL. ARG.	S-, of T, PT PM, Su, J, Ba, Ph	P, S	L
<i>M. umbrosa</i> S. J. DAVIES	B (Sr, Br)	P	L, nährstoffreich
<i>M. velutina</i> (REICHB. F. & ZOLL.) MÜLL. ARG.	B (Südwest- Sr, K), Ba, Su	S, D	SM ?
<i>M. velutiniflora</i> S.J.DAVIES *	B ( Sr, WK)	P, S, D	L, SM
<b>Sektion <i>Pruinosae</i> PAX UND HOFFM.</b>			
<i>M. gigantea</i> (REICHB. F. & ZOLL.) MÜLL. ARG.	B (Br, Sb, Sr, Z-., O-, W- und SK), PT, PM, Ba, Su, JP, D		SM, M, oft sandig
<i>M. hosei</i> KING EX HOOK. F.	B (Br, Sr, Z-., O-, S- und WK), PT and Malayisa, Su P, S, D		L
<i>M. pearsonii</i> MERR.	B (Sb, O- und SK)	P, S, D	L, trocken
<i>M. pentaloba</i> S.J.DAVIES *	B (Sr)		SM
<i>M. pruinosa</i> (MIQ.) MUELL. ARG.	B (Sr, Z-., O- und WK), PM, PT, Riau, Su, Ba	P, S	L, Sumpfwald
<i>M. puberula</i> HEINE	B (Br, Sb, Sr)	P, D	SM, Sumpfwald
<i>M. rufescens</i> S. J. DAVIES	B (Br, Sr)		L
<i>M. siamensis</i> S. J. DAVIES	T (ohne Halbinsel) C	S	
<b>Sektion <i>Pseudo-Rottlera</i> (REICHB. F. &amp; ZOLL.) PAX &amp; HOFFM.</b>			
<i>M. anceps</i> AIRY SHAW *	Simalur Island		
<i>subsp. puncticulata</i> WHITMORE *	B (Sr)	S	L
<i>M. baccaureifolia</i> AIRY SHAW *	B (SB)	P (S)	L
<i>M. brevipetiolata</i> AIRY SHAW *	B (OK, SB, SR)	P, S	L
<i>M. lowii</i> King ex Hook.f.	B, M, T, S, PH	P, (S)	SM, M
<i>var. kostermansii</i> AIRY SHAW	B (OK)	P, (S)	L; trocken
<i>M. praestans</i> AIRY SHAW	B ( )	P	L
<i>M. rarispina</i> WHITMORE	B	P	
<i>M. repando-dentata</i> AIRY SHAW	B	P	L
<i>M. strigosissima</i> AIRY SHAW *	B (Sr)	P	L
<b>Semiglobosae PAX &amp; HOFFM.</b>			
<i>M. semiglobosa</i> J.J.SMITH *	S, J		
<b>Sektion <i>Stachyella</i> (MIQ.) PAX &amp; HOFFM.</b>			
<i>M. conifera</i> (ZOLL.) MÜLL. ARG.	B, M, S, Su	P, S, D	SM, M
<i>M. diepenhorstii</i> (MIQ.) MÜLL. ARG.	M, S		
<i>M. recurvata</i> GAGE	B, M	P, S	L; Sumpf
<b>Sektion <i>Tanarius</i> AIRY SHAW</b>			
<i>M. tanarius</i> (L.) MÜLL. ARG.	I - Au	D	SM, M,
<b>Sektion <i>Trichocarpae</i> AIRY SHAW</b>			
<i>M. trichocarpa</i> (REICHB.F. & ZOLL.) MÜLL. ARG	B, M, S, Mya, IC	S (P), D	
<b>Sektion <i>Winklerianae</i> PAX &amp; HOFFM.</b>			
<i>M. winkleri</i> PAX & HOFFM.	B (Sb, OK)	P, S, D	M, Lehm
<i>M. winkleriella</i> T. C. WHITMORE	B (Sr)	P	Kalk

## A.2.2 Systematik von *Macaranga*

### A.2.2.1 Stellung der Gattung innerhalb der Euphorbiaceae

Es ist heute unstrittig, dass die Gattung *Macaranga* innerhalb der Familie der Euphorbiaceae der Tribus Acalypheae innerhalb der Unterfamilie Acalyphoideae zuzuordnen ist (Webster, 1994; Wurdack *et al.*, 2005). Bezüglich der Stellung innerhalb der Acalypheae wurden bisher allerdings unterschiedliche Hypothesen entwickelt. Pax und Hoffmann (1914) ordneten *Macaranga* und die morphologisch ähnliche Gattung *Mallotus* LOUREIRO der Tribus Acalypheae, Subtribus Mercurialinae zu. Hutchinson (1969) stellte das System von Pax und Hoffmann um und machte *Macaranga* zum Typus für die Tribus Macarangeae (zu der er 6 weitere Gattungen zählte), und *Mallotus* zum Typus von Malloteae mit 13 weiteren Gattungen. Webster (1994) wiederum ordnete in seiner Revision der Euphorbiaceae *Macaranga* innerhalb der Acalypheae der monotypischen Subtribus Macaranginae zu und fasste *Mallotus* mit sieben anderen Gattungen zu der Subtribus Rottlerinae zusammen.

Aufgrund der habituellen Ähnlichkeit ihrer Arten kam es in der Vergangenheit häufig zu Verwechslungen zwischen *Mallotus* und *Macaranga*. Nach Pax und Hoffmann (1914), Primack und Lee (1991) und Slik *et al.* (2001) gibt es jedoch folgende Unterscheidungsmerkmale: (1) Die Blätter von *Macaranga* sitzen im Gegensatz zu *Mallotus* niemals gegenständig. (2) Die Nebenblätter sind bei *Macaranga* meist groß bis sehr groß, bei *Mallotus* immer klein und schmal. (3) Die Infloreszenzen sind bei *Macaranga* immer axillär angeordnet, bei *Mallotus* dagegen meist terminal. (4) Auffällige blütenmorphologische Merkmalsunterschiede schließlich betreffen die Staubblattanzahl (1-6, selten 15-21 bei *Macaranga* und 15-250 bei *Mallotus*), die Anzahl der Früchte pro Infloreszenz (2-257 bei *Macaranga* und 2-35 bei *Mallotus*), die Zahl der Fächer im Fruchtknoten (ein bis zwei bei *Macaranga*, meist drei bei *Mallotus*) und die Ausprägung des Griffels (kurz, nur selten bis 1 cm oder länger bei *Macaranga*, meist deutlich länger bei *Mallotus*). Nach der morphologisch-kladistischen Studie von Slik und van Welzen (2001) und der auf ITS-Sequenzen basierenden Arbeit von Blattner *et al.* (2001) sind *Macaranga* und *Mallotus* nicht eindeutig getrennt. Nach Slik *et al.* (2001) steht *Macaranga* sogar innerhalb der Gattung *Mallotus*, die dadurch paraphyletisch würde. Schließlich unterstützen auch neuere molekulare Analysen der Chloroplasten-DNA eine nahe Verwandtschaft der beiden Gattungen (Kulju *et al.*, 2007; Wurdack *et al.*, 2005).

### A.2.2.2 Taxonomische Gliederung der Gattung *Macaranga*

Eine ähnlich wechselvolle Geschichte durchlief auch die taxonomische Gliederung der Gattung *Macaranga* selbst. Die erste umfassende Arbeit über *Macaranga* geht auf Müller Argoviensis (1866) zurück, der die zu diesem Zeitpunkt beschriebenen 79 Arten in vier Sektionen aufteilte: *Pachystemon* (sechs Arten), *Dimorphantera* (zwei Arten), *Mappa* (50 Arten) und *Eumacaranga* (21 Arten). Von den sechs Arten der Sektion *Pachystemon* sind nach heutiger Auffassung drei Arten weiterhin dieser Sektion zugeordnet (*M. bancana*, *M. depressa* und *M. triloba*; vgl. Tab. 1), die drei anderen Arten wurden entweder inzwischen umbenannt oder mit anderen Arten vereinigt. Die heutigen *Pachystemon*-Arten *M. hypoleuca*, *M. griffithiana*, *M. motleyana* und die beiden heutigen *Pruinosae*-Arten *M. pruinosa* und *M. gigantea* wurden von Müller Argoviensis (1866) noch zur Sektion *Mappa* gezählt.

Die zweite und bis zum heutigen Tage letzte umfassende Revision der gesamten Gattung wurde von Pax und Hoffmann (1914) durchgeführt. Sie teilten die zu diesem Zeitpunkt beschriebenen ca. 170 Arten in insgesamt 32 Sektionen ein. Während Müller Argoviensis sein System vorrangig auf Merkmalen des Gynoeceums und des Androeceums aufgebaut hatte, sahen Pax und Hoffmann (1914) die Ausprägung gewisser Fruchtmerkmale als entscheidend für die taxonomische Bewertung an. Primär unterteilten sie die Gattung nach der Oberfläche der Kapseln in drei Gruppen. Die erste Gruppe (*Laeves*) mit 16 Sektionen ist danach gekennzeichnet durch glatte Kapseln, die zweite Gruppe (*Tuberculatae*; fünf Sektionen) durch Kapseln mit kurzen dicken Höckern und die dritte Gruppe (*Echinatae*; neun Sektionen) durch Kapseln mit dichtgestellten, oft langen Weichstacheln. Zur weiteren Unterteilung wurden die Anzahl der Fruchtblätter eines Fruchtknotens und die Anzahl der Antherenfächer verwendet. Zu den *Laeves* zählten u.a. die Sektionen *Giganteae* und *Pruinosae*, die wiederum vor allem anhand der Form der Stipeln unterschieden wurden. Die Sektionen *Pachystemon* und *Caladiifolia* wurden den *Tuberculatae* zugeordnet.

Vor allem in den 1970er Jahren wurden etliche neue *Macaranga*-Arten beschrieben und Sektionszuordnungen teilweise neu definiert (Airy Shaw, 1971, 1972; Whitmore, 1967, 1969; Whitmore und Airy Shaw, 1971; Whitmore, 1974, 1975, 1980, 1981). Eine Revision der beiden myrmekophytischen Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* wurde schließlich von Davies (2001) vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Revision werden in Kapitel A.2.4 und in der Diskussion näher ausgeführt, ebenso die Ergebnisse molekularsystematischer Studien, die als Ausgangspunkt der hier vorgestellten Arbeit dienen.

### A.2.3 Entstehung und Alter der Gattung *Macaranga*

Aufgrund der vermutlich nahen Verwandtschaft von *Macaranga* und *Mallotus* ist es bei fossilem Material meist unmöglich, die beiden Gattungen voneinander abzugrenzen (Martin, 1974; Morley, 2000). Beide besitzen einen tricolporaten Pollentyp, der meist als *Mallotus/Macaranga*-Pollentyp (*Tricolporopollenites endobalteus*) angesprochen wird (Gruas-Cavagnetto und Köhler, 1992). Fossile Pollen dieser Grundgestalt wurden im Tertiär von Neuseeland (McIntyre, 1965; Mildenhall, 1980, Oligozän), Australien (Martin, 1974, 1978, Frühes Eozän, bis Pliozän) und Europa (Gruas-Cavagnetto und Köhler, 1992, Eozän) gefunden. Neben Pollen gibt es auch blattanatomische Funde, die entweder *Mallotus* (UCMP Specimen Search, 2004) oder *Macaranga* (Sikhote-Alin, Nordost-Russland, Oligozän (Akhmetiev und Vikulin, 1995) zugeordnet wurden. Der letztere Blattfund weist Ähnlichkeit mit rezenten Arten der Sektion *Pachystemon* auf. Bei der Zuordnung fossiler Blattfunde ist jedoch Vorsicht geboten, da morphologisch ähnliche Blätter tatsächlich ganz unterschiedlichen Familien angehören können. Die Funde in Nordost-Russland und Nord-Amerika unterstützen die Annahmen einiger Wissenschaftler, dass tropische Pflanzen wie *Macaranga* oder *Mallotus* während der warmen Perioden des Tertiärs nordwärts über die Bering-Strasse bis nach Nordamerika gelangt sind (Whitmore, 1998).

Eine Kartierung von Habitatpräferenzen auf einen morphologisch-kladistischen Stammbaum brachte (Slik und van Welzen, 2001) zu der Hypothese, dass die ersten *Macaranga*-Arten als Pionierpflanzen in offenen Habitaten im späten Oligozän bzw. frühen Miozän entstanden sein könnten (d.h. vor 38-15 Mio. Jahren), als das Klima saisonal und deutlich trockener war als heute. Folgt man dieser Argumentation, dann hätten sich myrmekophytische Arten vermutlich erst im Mittleren Miozän, vor etwa 15 Mio. Jahren, entwickelt, als das Klima perhumider wurde und Regenwälder zu dominieren begannen (Morley, 2000). Da gerade im mittleren Miozän in der südostasiatischen Region extreme geologische Veränderungen stattgefunden haben, deren Zeitpunkt und

Ausprägung nicht genau bekannt sind und außerdem Fossilien von dort nur spärlich erhalten sind (Morley, 2000), sind zu dieser Frage bisher keine gesicherten Aussagen möglich.

#### A.2.4 Die myrmekophytischen Arten

Die meisten *Macaranga*-Arten locken Ameisen durch ein Nahrungsangebot an, ohne sich dauerhaft mit diesen zu vergesellschaften. Obligate Myrmekophyten haben sich nur in drei Sektionen entwickelt. Die artenreichste Sektion ist *Pachystemon* (25 Arten, davon 20 myrmekophytisch; Davies 2001), gefolgt von *Pruinosae* (acht Arten, davon sechs myrmekophytisch; Davies 2001) und *Winklerianae* (nur zwei Arten, beide myrmekophytisch; Whitmore 1974). Auf die Frage, inwieweit *Pachystemon* in Artengruppen unterteilt werden kann und ob *M. puncticulata* und deren nähere Verwandte auch zur Sektion *Pachystemon* gezählt werden können, wird im Rahmen der Diskussion näher eingegangen.

Die Verbreitung der myrmekophytischen Arten ist auf die tropische Region Südostasiens, speziell auf das Malaiische Archipel, beschränkt. *Macaranga griffithiana* ist der einzige Myrmekophyt, der auch noch weiter im Norden außerhalb der Regenwaldgebiete in Chantaburi, Thailand vorkommt, was auf die besonders feuchten Umweltbedingungen in dieser Region zurückgeführt wird (Maschwitz *et al.*, 2004). Eine gewisse Grenze bei der Besiedlung scheint auch die Höhenzonierung zu sein. Während nicht-myrmekophytische Arten auch noch oberhalb von 2000 m über N.N. vorkommen (Davies, 2001), steigen die myrmekophytischen Arten maximal auf 1800 m (z.B. *M. puberula*, *M. winkleri*).

Wie in Kapitel A.1 erläutert, wird alleine durch ein Nahrungsangebot keine echte Symbiose erzeugt. Erst die Bereitstellung von Wohnraum macht eine feste Partnerschaft möglich, wie sie in den drei Sektionen *Pachystemon*, *Pruinosae* und *Winklerianae* anzutreffen sind. Als Präadaptionen für die Evolution von Myrmekophytie sind von daher vorrangig zwei Merkmale zu werten: (1) die Bereitstellung von Nahrung in Form von extrafloralem Nektar und/oder Nährkörperchen, und (2) die Ausbildung von Domatien, im Fall von *Macaranga* in Form einer hohlen oder leicht aushöhlbaren Sprossachse. Darüber hinaus können auch die Art der Wachsbereifung, die Form der Stipeln und das Vorhandensein von Prostomata relevante Merkmale darstellen (Federle *et al.*, 2001). In den Arten der Sektionen *Pachystemon* und *Winklerianae* degeneriert das Mark von alleine, in den *Pruinosae*-Arten muss es durch die Ameisen entfernt werden. Für die obligate Bindung von spezifischen Ameisenpartnern scheint dabei nicht die Bereitstellung von Domatien, sondern die Fähigkeit der Ameisen zum aktiven Öffnen der Domatien ein entscheidendes Kriterium zu sein. So werden die selbstöffnenden Domatien von *Macaranga caladiifolia* opportunistisch von unterschiedlichsten Ameisenarten besiedelt (Fiala *et al.*, 1996).

Generell können bei den myrmekophytischen *Macaranga*-Arten zwei unterschiedliche Formen der Besiedlung angetroffen werden. So werden Arten der Sektion *Pachystemon* typischerweise bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt als Keimlinge besiedelt, während alle myrmekophytischen Arten der Sektion *Pruinosae* erst als 70-80 cm große Jungpflanzen kolonisiert werden.

Die obligaten Ameisenpartner stammen aus zwei verschiedenen Gattungen, die unterschiedlichen Unterfamilien angehören. In *Macaranga puncticulata*, *M. lamellata* und *M. griffithiana* treten generell oder zeitweise Ameisen der Gattung *Camponotus* (Formicinae) als Partner auf, alle anderen *Macaranga*-Myrmekophyten werden von bisher nicht näher beschriebenen Morphospecies der Gattung *Crematogaster* (Myrmecinae)

besiedelt (Feldhaar *et al.*, 2003aa; Fiala *et al.*, 1999). Die Spezifität der Besiedlung und ihre möglichen Ursachen werden im Rahmen der Diskussion näher behandelt (siehe Kap. D.2.2).

## A.3 Methoden der Molekularsystematik

In der vorliegenden Arbeit wird eine Verwandtschaftsanalyse der Gattung *Macaranga* mit molekularsystematischen Methoden vorgenommen. Die diesen Methoden zugrunde liegenden Prinzipien sollen daher im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Im Laufe der letzten beiden Jahrzehnte konnten mit Hilfe molekularer Methoden viele neue Erkenntnisse über Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Organismen gewonnen werden. Am oberen Ende des taxonomischen Spektrums dienen hochkonservierte DNA-Sequenzen dazu, die Beziehungen zwischen den Großgruppen der Pilze, Tiere und Pflanzen oder gar zwischen Eukaryonten, Eubakterien und Archaea zu entschlüsseln. Am unteren Ende wurden hochvariable Marker erfolgreich für Untersuchungen auf Populationsebene verwendet. Während in den 1970er und 1980er Jahren noch vorwiegend Untersuchungen von Isoenzymmustern (z.B. Sonnante *et al.*, 1997) und Protein-Sequenzen eingesetzt wurden, dominierten seither eindeutig die DNA-basierten Methoden. Auf unterer taxonomischer Ebene wurden daher vor allem sogenannte molekulare Markertechniken verwendet, die einen genetischen Fingerabdruck in Form eines Bandenmusters erzeugen. Dazu gehören zum Beispiel die RAPD-Methode (random amplified polymorphic DNA; z.B. Williams *et al.*, 1990) und die AFLPs (Vos *et al.*, 1995). Auf mittlerer und höherer Ebene hat sich jedoch, insbesondere dank immer modernerer Sequenzierautomaten, vor allem die vergleichende Sequenzierung von Kern-, Chloroplasten- oder auch Mitochondriengenomen und intergenischen Bereichen durchgesetzt.

### A.3.1 Vergleichende DNA-Sequenzierung

Die Strategie der vergleichenden DNA-Sequenzierung weist die folgenden typischen Schritte auf. Zunächst wird eine DNA-Region ausgewählt, deren Mutationsrate dem taxonomischen Niveau angepasst ist, auf dem die Untersuchung erfolgen soll. Diese Region wird mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) *in vitro* amplifiziert und anschließend sequenziert. Die orthologen Sequenzen aus den untersuchten Taxa werden passgenau übereinander gelegt (Alignment), und aus den Gemeinsamkeiten und Unterschieden in der Basenabfolge mit Hilfe einschlägiger Computerprogramme eine Phylogenie rekonstruiert.

Als wichtigste nukleäre Region für Phylogenierekonstruktionen auf Gattungsebene hat sich der ITS (interne transkribierte Spacer)-Bereich der ribosomalen DNA (rDNA) erwiesen (z.B. Baldwin und Marcos, 1998; Schmidt-Lebhuhn *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu anderen Loci liegt die ITS-Sequenz in tausendfachen Kopien im Kerngenom vor. Da üblicherweise durch „concerted evolution“ eine schnelle Vereinheitlichung der verschiedenen Kopien eintritt (Linder *et al.*, 2000; Marhold *et al.*, 2004), treten nur selten Schwierigkeiten durch das Vorhandensein unterschiedlicher Allele im gleichen Individuum auf. Einziger Nachteil des ITS-Abschnittes ist seine oft nicht ausreichende Variabilität zwischen nah verwandten Arten, wie es zum Beispiel innerhalb der Gattung *Trollius* L. (Ranunculaceae, Després *et al.*, 2003), bei *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae, Hodkinson *et al.*, 2000) oder auch bei nahe verwandten *Macaranga*-Arten (Blattner *et al.*, 2001) beobachtet wurde.

Zusätzlich zum nukleären Bereich wurden und werden in Tieren vor allem Sequenzabschnitte des Mitochondrien-Genoms (z.B. Feldhaar *et al.*, 2003aa; Gadau *et al.*, 1999; Heulin *et al.*, 1999), in Pflanzen vor allem Sequenzen des Plastoms (z.B. Clegg und Zurawski, 1992; Després *et al.*, 2003; Manen *et al.*, 2002; Renner *et al.*, 2004) für phylogenetische Untersuchungen eingesetzt. Ursprünglich überwiegend bei Gymnospermen (Gugerli *et al.*, 2001; Senjo *et al.*, 1999) und dort zur Klärung verbreitungsbiologischer Fragestellungen (Jaramillo-Correa *et al.*, 2004; Soranzo *et al.*, 1999), werden in jüngerer Zeit auch bei Angiospermen phylogenetische Untersuchungen auf der Basis von Mitochondrien-DNA-Sequenzen durchgeführt (Desplanque *et al.*, 2000; Dumolin-Lapègue *et al.*, 1998; Engelke *et al.*, 2004; Olson und McCauley, 2002; Renner und Zhang, 2004). Der Vergleich der mit Organellen-DNA und nukleärer DNA erhaltenen Phylogenien kann wichtige Rückschlüsse über Ausbreitungsmodalitäten und/oder eventuelle Hybridisierungsereignisse bei der Artbildung geben. Mitochondrien- und/oder Chloroplasten-Sequenzen sind als zusätzliche Informationsquelle schon von daher wichtig, da verschiedene Genome ebenso wie verschiedene Gene oder intergenische Bereiche unterschiedlichen evolutiven Zwängen unterliegen.

Die Sequenzierung von Chloroplasten-DNA wird bei Pflanzen auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen angewandt. Auf Artebene und darunter werden vor allem hochvariable Bereiche eingesetzt (Chloroplasten-Mikrosatelliten, intergenische Spacer und Introns; vgl. (Chloroplasten-Mikrosatelliten, intergenische Spacer und Introns; vgl. Hahn, 2002; Chloroplasten-Mikrosatelliten, intergenische Spacer und Introns; vgl. Manen und Natali, 1995; Oxelman *et al.*, 1997), auf höheren Ebenen vor allem kodierende Sequenzen (z.B. Cuenoud *et al.*, 2000; Patterson und Givinish, 2002; Savolainen *et al.*, 2000). Durch die zumeist uniparentale Vererbung des Chloroplastengenoms lassen sich mit Hilfe von Chloroplasten-Daten außerdem Ausbreitungswege einzelner Gattungen oder Arten nachvollziehen (*Ilex*, Cuenoud *et al.*, 2000; *Fraxinus excelsior*, Heuertz *et al.*, 2004; Weißtanne, *Picea abies*, Vendramin *et al.*, 2000).

Oft reicht die Variabilität der cpDNA nicht aus, um aussagefähige Phylogramme zu erstellen. In solchen Fällen bieten molekulare Marker-Methoden, die Informationen des ganzen Genoms in einer Art genetischen Fingerabdruck zusammenfassen, eine geeignete Alternative (Després *et al.*, 2003; Hodkinson *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002; Xu und Sun, 2001).

### A.3.2 Fingerprinting anonymer DNA-Bereiche: AFLPs

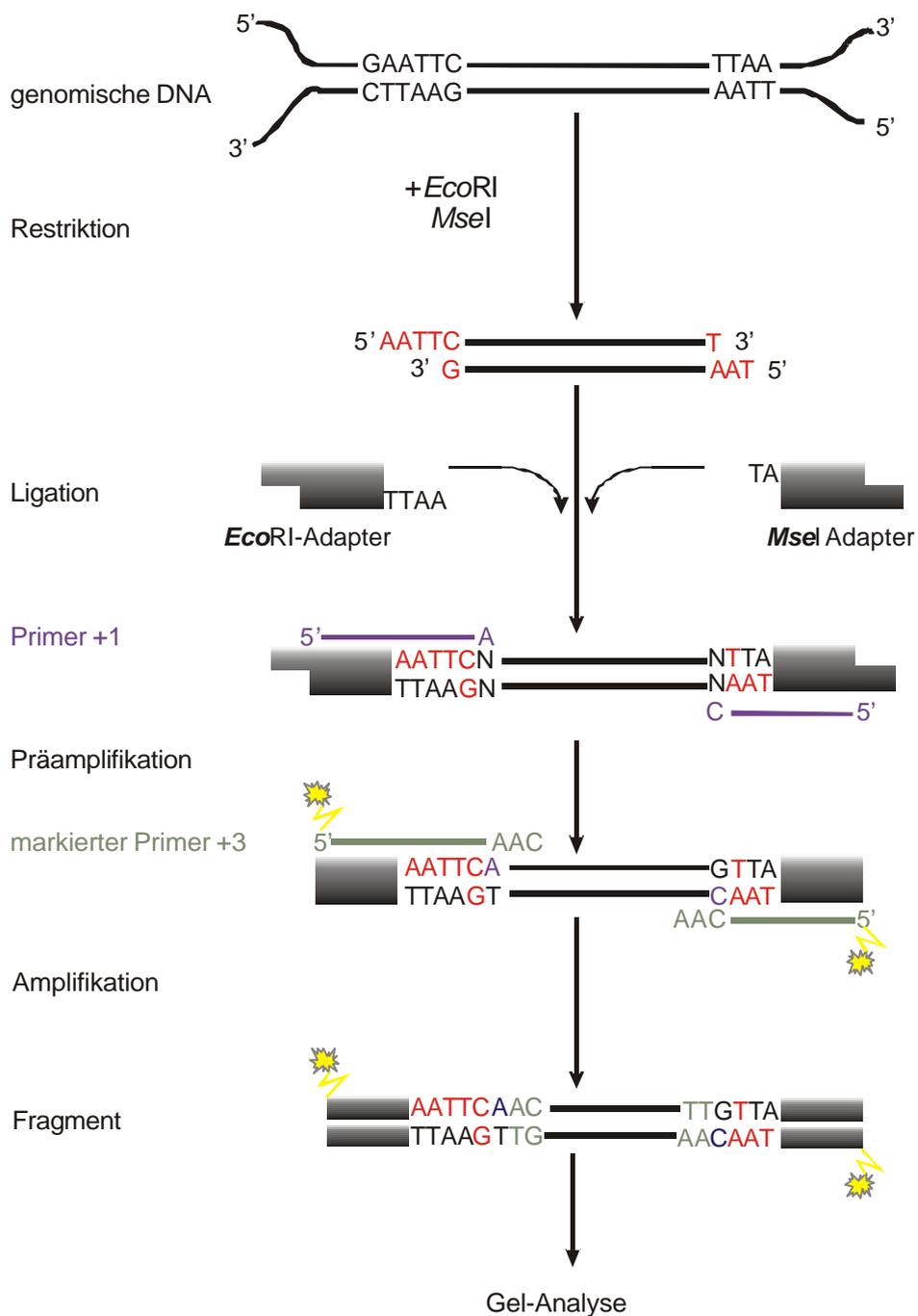
Eine heutzutage für phylogenetische Fragestellungen auf Artebene sehr häufig genutzte „Fingerprint“-Technik stellt die AFLP („Amplified Fragment Length Polymorphisms“)-Analyse dar (Vos *et al.*, 1995), welche aufgrund ihrer höheren Reproduzierbarkeit (Gaiotto *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997) die von Williams *et al.* (1990) eingeführte RAPD- („random amplified polymorphic DNA“) Technik mehr oder weniger abgelöst hat. Bei der AFLP-Analyse wird eine Restriktionsverdauung des Gesamtgenoms mit einer anschließenden selektiven PCR gekoppelt. Dadurch hat man die Spezifität der klassischen RFLP-Analyse (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, Botstein *et al.*, 1980) mit der Effektivität einer PCR gepaart. Zur Durchführung (siehe Abbildung 1) wird die Gesamt-DNA zunächst mit Hilfe von zumeist zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten. Hierzu wird üblicherweise ein häufig schneidender „4-Cutter“ (meist *MseI*) und ein weniger häufig schneidender „6-Cutter“ (meist *EcoRI* oder *HindIII*) eingesetzt, die beide überhängende Enden erzeugen. Nachdem die DNA vollständig verdaut ist, werden spezielle Adapter-Sequenzen an die beiden Enden ligiert. Diese fungieren in der späteren PCR als Primer-Bindestellen. Die Primer reichen jedoch am 3'-Ende um eine, zwei oder

drei sog. selektive Basen in das Restriktionsfragment hinein. Eine erfolgreiche Amplifikation findet nur statt, wenn diese Base dort einen passenden Partner findet. Diese Chance ist für jede einzelne Base 1:4.

Bei höheren Pflanzen wird für die selektive Amplifikation bestimmter Restriktionsfragmente normalerweise ein 2-Schritt-Verfahren gewählt (Vos *et al.*, 1995). Zunächst wird eine sogenannte Präamplifikation mit nur einer selektiven Base (A, C, G oder T) durchgeführt. Bei der anschließenden Hauptamplifikation werden dann meist Primer mit jeweils drei selektiven Basen eingesetzt, wobei die erste mit der in der Präamplifikation verwendeten selektiven Base identisch ist. Auf diese Weise wird statistisch nur jedes 4096te Fragment (1: 4<sup>6</sup>) erfolgreich amplifiziert. Um diese Fragmente sichtbar zu machen, wird einer der beiden Primer radioaktiv oder fluoreszenz-markiert. Die Fragmente werden auf hochauflösenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Banden, die in unterschiedlichen Proben gleich schnell wandern, werden, wie auch bei RAPDs und anderen verwandten Marker Methoden, als vom gleichen Locus stammend interpretiert. Die Bandenmuster werden in eine binäre Merkmalsmatrix umgeschrieben, in der für jede Probe und jeden Locus die Anwesenheit einer Bande an einer bestimmten Position durch eine „1“, ihre Abwesenheit durch eine „0“ kodiert wird.

Die phylogenetische Auswertung der AFLPs kann mit phänetischen und kladistischen Methoden erfolgen (Després *et al.*, 2003; z.B. Kardolus *et al.*, 1998; Koopman *et al.*, 2001; Loh *et al.*, 2000). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Daten mit Hilfe einer Haupt-Koordinaten-Analyse auszuwerten (z.B. Aggarwal *et al.*, 1999; z.B. Schutt *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001).

Nachdem AFLPs ursprünglich in erster Linie für die Erstellung von Genkarten, zur Sortenidentifikation und für populationsgenetische Studien eingesetzt wurden (Aggarwal *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002; Schutt *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1996), verwendet man sie heute regelmäßig auch für phylogenetische Fragestellungen (Aggarwal *et al.*, 1999; Kardolus *et al.*, 1998; Koopman *et al.*, 2001; Spooner *et al.*, 2005).



**Abbildung 1: Prinzip der AFLP-Methode.** In der zweiten Amplifikationsrunde werden im gezeigten Beispiel jeweils drei selektive Basen eingesetzt. Die Markierung der Primer wird durch ein Blitzsymbol illustriert.

## A.4 Fragestellung

Bis zum Beginn der hier vorliegenden Arbeit waren die phylogenetischen Zusammenhänge der myrmekophytischen Sektionen von *Macaranga* nicht ausreichend aufgeklärt. Erste Versuche einer molekularen Systematik auf der Basis der ribosomaln ITS1- und ITS2-Sequenzen ergaben zwar Hinweise auf die Monophylie einzelner Gruppen (z.B. *bancana*- und *motleyana*-Gruppe), blieben jedoch aufgrund unzureichender Variabilität innerhalb der myrmekophytischen Sektionen weitgehend unaufgelöst (Blattner *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2001). Eine Untersuchung der Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* und ihrer vermutlich nahen verwandten Arten mit Hilfe der RAPD-Methode gab zwar eine bessere Auflösung innerhalb der Sektionen, die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Sektionen blieben aber aufgrund zu großer Distanzen ungeklärt (Bänfer, 1999; Blattner *et al.*, 2001). Erschwerend kommt hinzu, dass RAPDs für phylogenetische Fragestellungen kritisch betrachtet werden, da die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse oft mangelhaft ist (Jones *et al.*, 1997; Lamboy, 1994a).

Eine Voraussetzung für die Aufklärung der Koevolution von Pflanzen und Ameisen ist aber die Kenntnis der phylogenetischen Zusammenhänge beider Symbiose-Partner. Die hier vorliegende Arbeit dient der Erstellung einer Phylogenie der beteiligten Pflanzen. Dazu wurden zwei Methoden erstmals zur Aufklärung der phylogenetischen Zusammenhänge in *Macaranga* angewandt.

1. Die AFLP-Analyse sollte zunächst für *Macaranga* etabliert und informative Primerkombinationen identifiziert werden. Anschließend sollte von möglichst allen Arten der drei Myrmekophyten enthaltenden Sektionen inklusive der *puncticulata*-Gruppe ein Stammbaum auf Basis der AFLP-Daten erstellt werden. Bei diesem Ansatz sollte auch mögliche intraspezifische Variation untersucht werden, weshalb von möglichst jeder Art mehrere Individuen aus verschiedenen geographischen Regionen einbezogen wurden.
2. Erfahrungsgemäß stammen AFLP-Marker überwiegend aus dem Kerngenom, weswegen als zweiter Ansatz eine Chloroplasten-Analyse durchgeführt werden sollte, die die Evolution eines vermutlich maternal vererbten Genoms widerspiegeln soll. AFLP- und Chloroplasten-DNA-Analysen sollten ursprünglich mit einem überwiegend identischen Probensatz durchgeführt werden. Da sich allerdings während der Pilotphase der Arbeit herauskristallisierte, dass eng verwandte Taxa der Sektion *Pachystemon* weniger artspezifisch als vielmehr nach geographischen Kriterien gruppierten, wurden die Arbeiten am Chloroplasten-Genom in zwei Schritte unterteilt.
  - a. Zunächst wurden im Rahmen einer klassischen phylogenetischen Studie die myrmekophytischen Sektionen auf ihre Stellung innerhalb der Gattung untersucht. Dazu wurden neben Arten der Sektionen *Pachystemon*, *Winkleriana* und *Pruinosae* auch andere aus dem südostasiatischen Raum stammende Taxa anderer Sektionszugehörigkeit sowie Arten der nahe verwandten Gattung *Mallotus* mit einbezogen.
  - b. In einem zweiten Ansatz wurde mit einem erweiterten Taxa-Set der Myrmekophyten enthaltenden Sektionen eine phylogeographische Netzwerkanalyse der Arten vorgenommen, mit deren Hilfe der Bezug zwischen genetischen und geographischen Distanzen besser analysiert werden konnte.

Auf der Basis der so gewonnenen Information sollten molekulare Stammbäume der an der Symbiose beteiligten Pflanzenarten erstellt und mit der *Crematogaster*-Phylogenie verglichen werden, die in einer parallelen Studie von Kooperationspartnern an der Universität Würzburg erstellt werden sollte. Insbesondere sollte versucht werden, die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Wie stellen sich die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb und zwischen den myrmekophytischen *Macaranga*-Sektionen *Pachystemon*, *Winklerianae* und *Pruinosae* dar?
2. Sind myrmekophytische Arten untereinander näher verwandt als nicht-myrmekophytische Arten?
3. Bisherige Ergebnisse legen nahe (siehe A.2.4), dass die Lebensweise "Myrmekophytie" innerhalb der Gattung mehrfach unabhängig voneinander entstanden ist. Wie oft ist das geschehen? Gibt es Hinweise auf Reversionen?
4. Wo liegt genealogisch und auch geographisch der Ursprung des Symbiosekomplexes?
5. Welche Bedeutung spielen koevolutive Entwicklungen für das *Macaranga-Crematogaster*-Symbiosesystem? Ist Myrmekophytie im Sinne einer Schlüsselinnovation (Givnish, 1997) als Stimulus für eine adaptive Radiation zu betrachten?

## B Material und Methoden

### B.1 Pflanzenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial der verschiedenen *Macaranga*- und *Mallotus*-Arten und die Herkunft der einzelnen Proben sind in der Tabelle 2 zusammengestellt. Die Proben wurden zum großen Teil durch Dr. Brigitte Fiala (Univ. Würzburg), Dr. Ute Moog (ehemals Univ. Frankfurt/Univ. Kassel) und Dr. Ferry Slik (Rijks Herbarium Leiden, Niederlande) gesammelt. Einzelne Proben wurden von Prof. Dr. Ulrich Maschwitz AD (Univ. Frankfurt) und Dr. Heike Feldhaar (Univ. Würzburg) zur Verfügung gestellt. Für die phylogenetische Studie auf der Basis von Chloroplasten-Daten wurden außerdem einige DNA-Proben eingesetzt, die aus Herbarmaterial des Rijks Herbariums Leiden isoliert wurden.

Alle Taxa wurden von Dr. Brigitte Fiala und Dr. Ute Moog mit Hilfe der Artbeschreibungen in Davies (2001), des Bestimmungsschlüssels von Slik *et al.* (2000) sowie durch den Vergleich mit vorhandenen Herbarproben in Leiden identifiziert (siehe Tabelle 2). Soweit möglich, wurde nur solches Material für die molekularen Studien eingesetzt, von dem ein Herbarbeleg vorhanden war. Die entsprechenden Herbarbelege wurden in den Herbarien der Universität Kassel (KAS), der Rijks Universiteit Leiden (L) oder in der Herbarsammlung von Dr. Brigitte Fiala (WÜ) hinterlegt (siehe Tabelle 2).

In die Studien wurden alle verfügbaren Arten der *Macaranga*-Sektionen *Pachystemon*, *Pruinosae* und *Winklerianae* einbezogen. Zusätzlich wurden vier Taxa berücksichtigt, die aufgrund ihres Habitus der Sektion *Pachystemon* angehören, aber keiner der bisher beschriebenen Arten zuzuordnen sind. Eventuell handelt es sich bei diesen provisorisch als *Macaranga spec.* A, B, C und D bezeichneten Taxa um neue Arten oder auch um Hybriden (persönliche Mitteilung Dr. Ute Moog). In den phylogenetischen Teil der Chloroplasten-Studien wurden außerdem möglichst viele Arten weiterer Sektionen der Gattung einbezogen. Als Außengruppen für die Rekonstruktion von Stammbäumen wurden Arten der nahe verwandten Gattung *Mallotus* eingesetzt (Blattner *et al.*, 2001; Slik und van Welzen, 2001).

**Tabelle 2: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetztes Pflanzenmaterial.** Neben der Herkunft ist auch angegeben, welche Proben für welche Art von Untersuchungen benutzt wurden. Längen- und Breitenangaben wurden, soweit möglich, mit einem GPS-Gerät bestimmt. Alternativ wurden sie im Nachhinein unter Zuhilfenahme des „Encarta Weltatlas“ abgeschätzt. Die Sektionszuordnungen der zu den Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* gerechneten Arten wurden nach Davies (2001)<sup>1</sup> vorgenommen, alle übrigen Arten wurden Sektionen bzw. Artengruppen nach Whitmore (1975; 1980)<sup>2</sup>, Airy Shaw (1972)<sup>3</sup> und Pax und Hoffmann (1914)<sup>4</sup> zugeordnet. Die Auflistung der Arten erfolgt nach ihrer Sektionszugehörigkeit, innerhalb der Sektionen nach dem Alphabet. **Abkürzungen:** ID Pflanzen-Identifikationsnummer, Untersuchungen: A, AFLP-Analyse; G, phylogeographische Chloroplasten-Studie; Py, phylogenetische Chloroplasten-Studie; V, Vorversuche; **Herbarien (H):** KAS, Herbarium Kassel, L, Rijks Herbarium Leiden, Niederlande, WÜ Herbarbeleg in Würzburg, **Sektionen (Sekt.):** AD *Adenoceras*; C, *Cuspidatae*; I, *Indicae*, IN; *Inermes*, J, *Javanicae*; M, *Mauritianae*; O, *Oblongifoliae*; P, *Pachystemon*; PR, *Pseudo-Rottlera*; PU, *Pruinosae*; S, *Stachyella*; T, *Tanarius*; W, *Winklerianae*; **Herkunft:** FR, Forest Reserve; KK, Kota Kinabalu; NP, Nationalpark; OK Ostkalimantan; PHS, Poring Hot Springs. Bei der Chloroplasten-Phylogenie wurden die mit x<sup>1</sup> bezeichneten Proben nur am *ccmp2*-Locus, die mit x<sup>2</sup> nur mit *atpB-rbcL* untersucht.

Art	ID	A	PyG	V	H	Sekt	Land	Herkunft		
<i>Macaranga. aëtheadenia</i> AIRY SHAW	8	x		x	x	KAS	Borneo, Brunei	Belalong; 04°37'N 115°03'O		
	255	x		x <sub>b</sub>		WÜ	Borneo, Brunei	Belalong; 04°37'N 115°03'O		
	257	x		x <sub>b</sub>	x	WÜ	Borneo, Sarawak, Malaysia	Kubah NP; 01°34'N 110°10'O		
	262			x <sub>b</sub>	x	L	Borneo, Sarawak, Malaysia	Penrissen Area; Strasse von Tapah nach Padawan		
<i>M. angulata</i> S. J. DAVIES	285	x		x <sub>a</sub>		L	Borneo, Sabah, Malaysia	Crocker Range; 05°51.622'N 116°16.746'O		
	489	x				WÜ	Borneo, Sabah, Malaysia	Crocker Range		
	492	x		x <sub>b</sub>	x	WÜ	Borneo, Sabah, Malaysia	Crocker Range		
	497	x		x	x <sub>a</sub>		Borneo, Sabah, Malaysia	Crocker Range		
	179	x		x <sub>b</sub>			Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP; 06°03'N 116°41'O		
	308	x		x	x <sub>b</sub>	x	KAS	Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP; 06°02'N 116°42'O	
	311	x		x	x <sub>b</sub>		L	Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP; 06°02'N 116°42'O	
	513	x		x <sub>b</sub>		WÜ	Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP; 06°03'N 116°41'O		
<i>M. ashtonii</i> S. J. DAVIES	328	x		x	x <sub>b</sub>	L	P	Borneo, Sabah, Malaysia	Crocker Range, Rafflesia Forest Resort; 05°46.702'N 116°20.613'O	
<i>M. bancana</i> (MIQ.) MUELL. ARG.	27	x		x <sub>a</sub>	x	KAS	Borneo, Brunei	Labi Road		
	283	x		x <sub>a</sub>		L	Borneo, Sabah, Malaysia	Crocker Range, Strasse von KK. nach Tambunan, 06°00'N 116°08'O		
	276	x		x <sub>a</sub>		WÜ	Borneo, Sarawak, Malaysia	Lambir Hills; 04°20'N 113°50'O		
	339	x		x <sub>b</sub>		WÜ	Borneo, Sarawak, Malaysia	Mulu; 04°02'N 114°55'O		
	357			x <sub>b</sub>		L	Borneo, Sarawak, Malaysia	Mulu Flughafen; 04°02'N 114°55'O		
	359	x		x <sub>b</sub>			Borneo, Sarawak, Malaysia	Mulu; 04°02'N 114°55'O		
	437	x		x <sub>c</sub>	x <sub>b</sub>		KAS	Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Bukit Tingii; 03°30'N 101°55'O	
	455	x		x	x <sub>a</sub>	x <sub>a</sub>		Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak, Gombak	
	63	x		x	x <sub>a</sub>		KAS	Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak; 03°19'N 101°45'O	
348			x					Gewächshaus Uni Frankfurt		
<i>M. beccariana</i> MERRILL	15	x		x		KAS	Borneo, Brunei	Belalong; 04°37'N 115°03'O		
	242	x		x <sub>b</sub>		L	p	Borneo, Brunei	Labi Road; 04°19.022'N 114°25.810'O	
	696			x <sub>b</sub>		L		Borneo, OK, Indonesien	PT-Inhutani I Berau Concession; 01°56'N 117°14'O	
<i>M. caladiifolia</i> BECC.	108	x		x	x <sub>b</sub>	x		Borneo, Brunei	Labi Road	
	123	x					p	Borneo, Brunei	Labi Road	
<i>M. calcicola</i> AIRY SHAW	266	x		x	x <sub>b</sub>	WÜ	P	Borneo, Sarawak, Malaysia	Bau, Fairy Caves; 01°25'N 110°09'O	
<i>M. curtisii</i> HOOK. F.	433	x		x	x <sub>b</sub>	L	p <sup>2</sup>	Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Fraser's Hill; Jalan. Air Terjun; 03°42'N 101°45'O	
	451	x		x	x	WÜ		Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Fraser's Hill; 03°42'N 101°45'O	
<i>M. curtisii</i> var. <i>glabra</i> T. C. WHITMORE	440	x		x	x	x	WÜ	p	Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Cameron Highlands, Tanah Rata; 04°27'N 101°22'O
	449	x		x	x <sub>b</sub>		WÜ		Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Cameron Highlands, Tanah Rata; 04°27'N 101°22'O
<i>M. depressa</i> f. <i>glabra</i> T. C. WHITMORE	177			x <sub>a</sub>				Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS, Langanan Weg; 06°03'N 116°41'O	
	291	x		x	x <sub>a</sub>	x	WÜ	p	Borneo, Sabah, Malaysia	Sepilok; 05°51'N 117°57'O
	117			x				Borneo, Sabah, Malaysia	Sepilok; 05°51'N 117°57'O	
	100	x						Borneo, Sabah, Malaysia	Telupid; 05°38'N 117°07'O	
	297	x		x	x <sub>b</sub>	x	L		Borneo, Sabah, Malaysia	Telupid; 05°38'30"N 117°12'30"O
<i>M. depressa</i> f. <i>strigosa</i> T. C. WHITMORE	778			x <sub>b</sub>		L		Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'S 116°52'O	
	141	x		x <sub>a</sub>	x	WÜ	p	Borneo, OK, Indonesien	Samarinda; 00°36'S 117°05'O	
	268	x		x <sub>a</sub>	x	L		Borneo, Sarawak, Malaysia	Bau; Angin Caves; 01°25'N 110°09'O	
<i>M. glandibracteolata</i> S. J. DAVIES	964	x		x <sub>b</sub>		L		Borneo, OK, Indonesien	PT-Inhutani I Berau Concession; 01°54'N 117°13'O	
	130	x		x	x <sub>b</sub>	L	p	Borneo, Sabah, Malaysia	Bukit Taviu	
	302	x		x <sub>b</sub>		L		Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS; 06°02'N 116°42'O	
	499	x		x <sub>a</sub>	x			Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS; 06°02'N 116°42'O	

Art	ID	A	PyG	V	H	Sekt	Land	Herkunft
<i>M. glandibracteolata</i> S. J. DAVIES	2039	x	x				Borneo, Sabah, Malaysia	Luasong; 04°38'N 117°23'O
	471	x	x <sub>c</sub>	x <sub>b</sub>	WÜ		Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
	477	x	x	x			Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
<i>M. griffithiana</i> MUELL. ARG	372	x	x	x <sub>b</sub>			Halbinsel Malaysia, Johore, Malaysia	Lingii, NS
	74	x	x	x <sub>a</sub>	x		Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Kg. Sg. Bakau; 10 km westl. Rawang
	438	x	x	x <sub>b</sub>	L	P	Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Rawang; 03°18'N 101°34'O
	1988		x <sub>b</sub>				Süd-Thailand	Pattani; 06°51'N 101°14'O
	1987	x	x <sub>b</sub>				Thailand	Chantaburi; 12°36'N 102°06'O
<i>M. havilandii</i> AIRY SHAW	278	x		x <sub>b</sub>	WÜ	P	Borneo, Sarawak, Malaysia	Lambir Hills; 04°20'N 113°50'O
<i>M. hullettii</i> KING, EX HOOK. F.	481	x	x		WÜ		Borneo, Sabah, Malaysia	Crocker Range
	232			x			Deutschland, Frankfurt	Botanischer Garten; ursprünglich Westmalaysia
	381	x	x	x			Halbinsel Malaysia, Negeri Sembilan, Malaysia	Tampin; 02°28'0N 102°13'60O
	66	x	x <sub>b</sub>		KAS	P	Halbinsel Malaysia, Selangor/Pahang, Malaysia	Genting Highlands
	68	x		x	KAS		Halbinsel Malaysia, Selangor/Pahang, Malaysia	Genting Highlands
	248	x	x <sub>b</sub>		WÜ		Borneo, Brunei	Labi Road; 04°20'01"N 114°24.12"O
	152		x				Borneo, OK, Indonesien	Lemponah; 00°28'372'S 117°07'75'O
	981		x <sub>b</sub>		L		Borneo, OK, Indonesien	Samboja; 00°59'S 116°56'O
	377		x				Borneo, Sarawak, Malaysia	Mulu; 04°02'N 114°55'O
<i>M. hypoleuca</i> (REICHB. F. & ZOLL.) MÜLL. ARG.	147	x	x	x <sub>b</sub>			Borneo, OK, Indonesien	Lemponah; 00°28,372'S 117°07,75'O
	148	x	x	x <sub>b</sub>	x		Borneo, OK, Indonesien	Lemponah; 00°28,372'S 117°07,75'O
	290	x	x	x <sub>b</sub>	L		Borneo, Sabah, Malaysia	Bukit Taviu; km 74; 05°38'N 117°04'O
	2040	x	x			P	Borneo, Sabah, Malaysia	Luasong; 04°38'N 117°23'O
	470	x	x <sub>b</sub>				Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
	382	x	x				Borneo, Sarawak, Malaysia	Lambir Hills; 04°20'N 113°50'O
	80	x	x	x <sub>b</sub>			Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak; 03°19'N 101°45'O
<i>M. indistincta</i> T. C. WHITMORE	288	x	x	x <sub>a</sub>	L		Borneo, Sabah, Malaysia	Bukit Taviu; 05°40.496'N 116°54.301'O
	289	x			WÜ		Borneo, Sabah, Malaysia	Bukit Taviu; 05°38'N 117°04'O
	114	x	x <sub>a</sub>				Borneo, Sabah, Malaysia	Deramakot FR; 05°16'N 117°32'O
	180	x	x <sub>a</sub>	x	KAS	P	Borneo, Sabah, Malaysia	Deramakot FR; 05°16'N 117°32'O
	284	x	x	x <sub>b</sub>			Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS; 06°02'N 116°42'O
	506		x <sub>a</sub>				Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS; 06°02'N 116°42'O
	2043	x	x				Borneo, Sabah, Malaysia	Luasong; 04°38'N 117°23'O
	280	x	x	x <sub>b</sub>			Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
468	x	x <sub>c</sub>	x <sub>b</sub>			Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O	
<i>M. lamellata</i> T. C. WHITMORE	126	x	x	x	x		Borneo, Brunei	Andulau
	1163	x	x		L	P	Borneo, OK, Indonesien	PT-Inhutani I Berau Concession; 01°56'N 117°14'O
	459	x	x	x	WÜ		Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
	473	x	x				Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
	207	x	x				Borneo, Sarawak, Malaysia	Lambir Hills; 04°12'N 114°01'O
<i>M. motleyana</i> (MUELL. ARG.) MUELL. ARG.	164						Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'S 116°52'O
	168	x	x	x <sub>a</sub>	WÜ		Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'533"S 116°51'887"O
	142	x	x	x	WÜ		Borneo, OK, Indonesien	Bukit Soeharto; 00°51'S 117°01'O
	145	x		x	WÜ	P	Borneo, OK, Indonesien	Bukit Soeharto; 00°51'S 117°01'O
	150	x		x			Borneo, OK, Indonesien	Lemponah; 0°28'372"S 117°07'75"O
	1367	x	x		L		Borneo, OK, Indonesien	Samboja; 00°59'S 116°56'O
	127	x	x	x <sub>a</sub>	KAS		Borneo, Sabah, Malaysia	Deramakot FR; 05°16'N 117°32'O
2093	x	x				Borneo, Sabah, Malaysia	Luasong; 04°38'N 117°23'O	

Art	ID	A	PyG	V	H	Sekt	Land	Herkunft
<i>M. motleyana</i> (MUELL. ARG.) MUELL. ARG.	293	x	x	x <sub>a</sub>	WÜ		Borneo, Sabah, Malaysia	Sepilok, mangrove Weg, near creak; 05°51'N 117°57'O
	1892		x	x			Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
	265	x		x	WÜ		Borneo, Sarawak, Malaysia	Kubah NP; Matang Wild Life Center; 01°34'N 110°10'O
<i>M. petanostyla</i> AIRY SHAW	307	x	x	x		P	Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS; 06°02'N 116°42'O
<i>M. puncticulata</i> GAGE	251	x	x	x <sub>b</sub>	WÜ		Borneo, Brunei	Labi Road; 04°34.460'N 114°30.160'O
	243			x	WÜ		Borneo, Brunei	Labi Road; 04°19.022'N 114°25.810'O
	59	x	x		L		Borneo, Sarawak, Malaysia	Sibu; 02°17'N 111°50'O
	96			x		P	Borneo, Sarawak, Malaysia	Sibu; 02°17'N 111°50'O
	32	x	x	x <sub>b</sub> x			Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Sekinchan; 03°30'00"N 101°05'60"O
351		x	x			Halbinsel Malaysia	Westküste	
<i>M. rostrata</i> HEINE	395	x	x	x	KAS	P	Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, Mt. Kinabalu; Kinabalu Strasse zum Elektrizitätswerk
<i>M. sarcocarpa</i> AIRY SHAW	29	x			KAS	p	Borneo, Brunei	Labi Road; 2 km bis Bundan, in der Nähe von Sarawe
	247		x	x <sub>b</sub>	L		Borneo, Brunei	Labi Road
<i>M. spec. A</i>	298			x <sub>b</sub> x	WÜ	p	Borneo, Sabah, Malaysia	Telupid, Jalan Microwave; 05°38'N 117°10'O
	97	x		x <sub>b</sub> x			Borneo, Sabah, Malaysia	Telupid, Tawai Forest Research
<i>M. spec. B</i>	183	x		x	L	P	Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS, Langanan Weg; 06°03'N 116°41'O
<i>M. spec. C</i>	14	x		x <sub>a</sub>	KAS		Borneo, Brunei	Belalong; 04°37'N 115°03'O
	21	x		x	KAS	P	Borneo, Brunei	Belalong; 04°37'N 115°03'O
	254	x		x	WÜ		Borneo, Brunei	Belalong; Gratweg; 04°37'N 115°03'O
<i>M. spec. D</i>	261			x	L	P	Borneo, Sarawak, Malaysia	Penrissen Area, Kampong Gayu; 01°12'N 110°19'O
<i>M. trachyphylla</i> AIRY SHAW	253	x		x <sub>b</sub>	L	p	Borneo, Brunei	Andulau, 36 km nach Labi
	16	x			KAS		Borneo, Brunei	Belalong; 04°37'N 115°03'O
<i>M. triloba</i> (BL.) MUELL. ARG.	445	x	x	x <sub>b</sub>			Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Cameron Highlands, Tanah Rata; 04°27'N 101°22'O
	431		x	x <sub>b</sub>		P	Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Fraser's Hill; 3°42'N 101°45'O
	522	x	x	x <sub>b</sub>			Halbinsel Malaysia, Selangor/Pahang, Malaysia	Genting Highlands
	303	x	x	x <sub>b</sub> x			Java, Indonesien	unbekannt
	193	x	x	x			Sumatra, Indonesien	Barisangebirge; Barak; 00°56'09S 100°45'O
<i>M. umbrosa</i> S. J. DAVIES	3	x		x	KAS		Borneo, Brunei	Belalong; 04°37'N 115°03'O
	19	x		x <sub>b</sub>	KAS		Borneo, Brunei	Belalong; 04°37'N 115°03'O
	385		x	x <sub>b</sub>		P	Borneo, Sarawak, Malaysia	Lambir Hills; 04°20'N 113°50'O
	386	x		x <sub>b</sub>			Borneo, Sarawak, Malaysia	Mulu; 04°02'N 114°55'O
	387	x		x <sub>b</sub>			Borneo, Sarawak, Malaysia	Mulu; 04°02'N 114°55'O
<i>M. velutina</i> (REICHB. F. & ZOLL.) MÜLL. ARG.	167			x <sub>b</sub>	L		Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'S 116°52'O
	172	x					Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'533"S 116°51'887'O
	151	x					Borneo, OK, Indonesien	Lemponah; 0°28'372"S 117°07'75"O
	571			x <sub>b</sub>	L		Borneo, OK, Indonesien	Sungai Wain Protected Forest; 1°05'S 116°48'O
	646			x <sub>b</sub>	L	p	Borneo, OK, Indonesien	Samboja; 00°59'S 116°56'O
	269	x			WÜ		Borneo, Sarawak, Malaysia	Bau, Angin Caves; 01°25'N 110°09'O
	270	x		x	L		Borneo, Sarawak, Malaysia	Bau, Strasse nach Angin Caves; 01°23'568"N 110°0'274"O
	271				x	WÜ	Borneo, Sarawak, Malaysia	Bau, Strasse nach Angin Caves; 01°23'568"N 110°0'274"O
	259	x		x <sub>b</sub>	L		Borneo, Sarawak, Malaysia	Penrissen Area; Giam Wasserfall, Jl. Borneo Heights

Art	ID	A	PyG	V	H	Sekt	Land	Herkunft
<i>M. gigantea</i> (REICHB. F. & ZOLL.) MÜLL.ARG.	162	x	x				Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'S 116°52'O
	828	x	x <sub>b</sub>		L		Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'S 116°52'O
	1880	x	x				Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills, air Panas; 04°25'N 117°54'O
	450	x	x	x <sub>b</sub>	L	PU	Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Cameron Highlands, Tanah Rata; 04°27'N 101°22'O
	40	x	x	x			Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Fraser's Hill; 03°42'N 101°45'O
	9035	x	x		F		Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Rawang; Weg nach Lang Suan; 03°17'N 101°34'O
<i>M. gigantea x pruinosa</i>	256	x	x <sub>b</sub>		L	PU	Borneo, Sarawak, Malaysia	Strasse nach Kubah Park, Rote Brücke
<i>M. hosei</i> KING EX HOOK. F.	252	x	x	x <sub>b</sub>	WÜ		Borneo, Brunei	Labi Road; 04°34.460'N 114°30.160'O
	435	x	x				Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Kampung Janda Baik; 03°19'N 101°52'O
	62	x		x	KAS	PU	Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak
	454	x	x	x			Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak
	529		x				Gewächshaus Uni Frankfurt	
<i>M. pearsonii</i> MERR.	166	x	x	x <sub>a</sub>	x		Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'533"S 116°51'887'O
	347	x	x	x <sub>a</sub>		WÜ	Borneo, OK, Indonesien	Bukit Soeharto; 00°51'S 117°01'O
	509	x	x	x <sub>a</sub>			Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS; 06°02'N 116°42'O
	2091	x	x			PU	Borneo, Sabah, Malaysia	Luasong; 04°38'N 117°23'O
	465	x <sub>c</sub>	x	x		WÜ	Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
	472	x					Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
<i>M. pruinosa</i> (MIQ.) MUELL. ARG.	144	x	x				Borneo, OK, Indonesien	Bukit Soeharto; 00°51'S 117°01'O
	1504	x	x <sub>b</sub>		L	PU	Borneo, OK, Indonesien	Samboja; 00°59'S 116°56'O
	92	x	x				Borneo, Sarawak, Malaysia	Sibu; 02°17'N 111°50'O
	536	x	x	x <sub>b</sub>			Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Sekinchan; 03°30'00"N 101°05'60"O
<i>M. puberula</i> HEINE	485	x	x	x <sub>b</sub>	WÜ	PU	Borneo, Sabah, Malaysia	Crocker Range
	286	x	x	x <sub>b</sub>	WÜ		Borneo, Sabah, Malaysia	Tambunan Patau, Strasse zum Mahua Wasserfall; 05°47.451'N 116°25.232'O
<i>M. rufescens</i> S. J. DAVIES	9		x		KAS	PU	Borneo, Brunei	Belalong; 4°37'N 115°03'O
	249	x	x	x <sub>b</sub>	WÜ		Borneo, Brunei	Labi Road; 04°20.012'N 114°24.206'O
<i>M. siamensis</i> S. J. DAVIES	9010	x				PU	Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Rawang
<i>M. winkleri</i> PAX & HOFFM.	12	x	x		KAS		Borneo, Brunei	Belalong; 04°37'N 115°03'O
	1593	x	x		L		Borneo, OK, Indonesien	Samboja; 00°59'S 116°56'O
	118	x	x <sub>c</sub>	x	x		Borneo, Sabah, Malaysia	Deramakot FR; 05°16'N 117°32'O
	2051	x				W	Borneo, Sabah, Malaysia	Luasong; 04°38.00'N 117°23.00'O
	1986	x	x				Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
<i>M. winkleriella</i> T. C. WHITMORE	396	x	x	x	WÜ	W	Borneo, Sarawak, Malaysia	Mulu; Clearwater Cave; 04°02'N 114°55'O
	399	x		x			Borneo, Sarawak, Malaysia	Mulu; Clearwater Cave; 04°02'N 114°55'O
<i>M. denticulata</i> (BLUME) MÜLL. ARG.	223	x				AD <sup>4</sup>	Halbinsel Malaysia, Selangor/Pahang, Malaysia	Genting Highlands; Old Genting Road; 03°25'N 101°47'O
<i>M. diepenhorstii</i> (MIQ.) MÜLL. ARG.	456	x		x	WÜ	AD <sup>4</sup>	Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak; Gombak
	205	x	x <sub>b</sub>				Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak; 03°19'N 101°45'O
<i>M. beillei</i> PRAIN	222	x <sup>1</sup>			WÜ	B	Afrika, Elfenbeinküste	unbekannt
<i>M. ferruginea</i> BAKER	231	x <sup>1</sup>			WÜ	C <sup>4</sup>	Afrika, Elfenbeinküste	unbekannt
<i>M. inermis</i> PAX & K. HOFFM.	547	x			L	IN <sup>4</sup>	Neu Guinea, Irian Jaya, Indonesien	Umgebung von Ayawasi; 01°14'S 132°12'O
<i>M. indica</i> WIGHT	442	x				I <sup>3</sup>	Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Cameron Highlands, Ringlet; 04°24'N 101°23'O
<i>M. capensis</i> (BAILL.) SIM <sup>var.</sup> <i>kilimandscharica</i> (PAX) FRIIS & GILBERT	525	x				J <sup>4</sup>	Afrika, Kenya	Mt. Kenya

Art	ID	A	PyG	V	H	Sekt	Land	Herkunft
<i>M. costulata</i> PAX & HOFFM.	362	x			WÜ	J <sup>3</sup>	Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS; 06°02'N 116°42'O
<i>M. heynei</i> I.M. JOHNSTON	446	x	x <sub>c</sub>	x		J <sup>3</sup>	Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Cameron Highlands, Tanah Rata; 04°27'N 101°22'O
<i>M. kinabaluensis</i> AIRY SHAW	384	x				J <sup>3</sup>	Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, Head Quarter
<i>M. mauritiana</i> BOJER EX BAILL.	9006	x			KAS	M <sup>4</sup>	Mauritius	unbekannt
<i>M. oblongifolia</i> BAILL.	234	x				O <sup>4</sup>	Afrika, Elfenbeinküste	unbekannt
<i>M. lowii</i> KING EX HOOK.F.	463	x				PR <sup>3</sup>	Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
	225	x <sub>c</sub>					Halbinsel Malaysia, Negeri Sembilan, Malaysia	Pasoh FR; 02°59'N 102°19'O
<i>M. lowii</i> var. <i>kostermansii</i> AIRY SHAW	1149	x			L	PR <sup>4</sup>	Borneo, OK, Indonesien	Sungai Wain Protected Forest; 01°05'S 116°49'O
<i>M. praestans</i> AIRY SHAW	224	x <sup>1</sup>				PR <sup>3</sup>	Borneo, Sabah, Malaysia	Kinabalu NP, PHS; 6°03'N 116°41'O
<i>M. rarispina</i> WHITMORE	1510	x			L	PR <sup>3</sup>	Borneo, OK, Indonesien	PT-Inhutani I Berau Concession; 01°56'N 117°14'O
<i>M. repando-dentata</i> AIRY SHAW	1511	x			L	PR <sup>3</sup>	Borneo, OK, Indonesien	PT-ITCI Concession; 00°57'S 116°19'O
<i>M. conifera</i> (ZOLL.) MÜLL. ARG.	719	x			L		Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'S 116°52'O
	461	x	x <sub>c</sub>	x		S	Borneo, Sabah, Malaysia	Tawau Hills; 04°25'N 117°54'O
	211	x	x				Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak, 30 km NO von Kuala Lumpur
<i>M. recurvata</i> GAGE	26	x			KAS		Borneo, Brunei	Labi Road; 01°01'S 117°01'O
	136	x	x <sub>b</sub>			S	Borneo, Sabah, Malaysia	Telupid, Tawai Forest Research; 05°36'N 117°05'O
<i>M. tanarius</i> (L.) MÜLL. ARG.	28	x <sub>a</sub>			KAS		Borneo, Brunei	Bandar Seri Begawan; 04°56'N 114°56'O
	1532	x			L	TA <sup>3</sup>	Borneo, OK, Indonesien	Samboja; 00°59'S 116°56'O
	448	x	x <sub>c</sub>				Halbinsel Malaysia, Pahang, Malaysia	Cameron Highlands, Tanah Rata; 04°27'N 101°22'O
<i>M. trichocarpa</i> (REICHB.F. & ZOLL.) MÜLL. ARG.	1540	x			L	TA <sup>3</sup>	Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'S 116°52'O
<i>M. coriaceae</i> (BAILL.) MÜLL. ARG.	9017	x <sup>1</sup>			L		Neukaledonien	N. Dumbeae Valley
<i>M. suwo</i> WHITMORE	539	x <sup>1</sup>			L		Neu Guinea, Irian Jaya, Indonesien	Nördlich von Ayawasi; 01°14'S 132°12'O
<i>Mallotus eucaustus</i> AIRY SHAW	1604	x			L		Borneo, OK, Indonesien	PT-Inhutani I Berau Concession; 01°56'N 117°14'O
<i>Mallotus floribundus</i> * (BLUME) MÜLL. ARG.	333	x					Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak; 03°19'N 101°45'O
<i>Mallotus griffithanus</i> (MÜLL. ARG.) HOOK F.	1610	x			L		Borneo, OK, Indonesien	PT-Inhutani I Berau Concession; 02°02'N 117°08'O
<i>Mallotus lackeyi</i> ELMER	1613	x <sup>2</sup>			L		Borneo, OK, Indonesien	PT-ITCI Concession; 00°57'S 116°19'O
	1634	x <sup>2</sup>			L		Borneo, OK, Indonesien	PT-ITCI Concession; 00°48'S 116°23'O
<i>Mallotus macrostachys</i> MIQ.	1641	x			L		Borneo, OK, Indonesien	Bukit Bangkirai; 01°01'S 116°52'O
<i>Mallotus miquelianus</i> (SCHEFF.) BOERL.	1656		x		L		Borneo, OK, Indonesien	PT-ITCI Concession; 00°51'S 116°19'O
<i>Mallotus paniculatus</i> (LAM.) MÜLL. ARG.	412	x					Halbinsel Malaysia, Negeri Sembilan, Malaysia	Johol; 02°35'N 102°16'O
	334	x					Halbinsel Malaysia, Selangor, Malaysia	Ulu Gombak; 03°19'N 101°45'O
<i>Mallotus peltatus</i> (GEISELER) MÜLL. ARG.	1692	x			L		Borneo, OK, Indonesien	PT-ITCI Concession; 00°48'S 116°23'O
<i>Mallotus penangensis</i> MÜLL. ARG.	1722	x			L		Borneo, OK, Indonesien	PT-ITCI Concession; 00°57'S 116°19'O
<i>Mallotus wrayi</i> KING EX HOOK.	1824	x <sup>2</sup>			L		Borneo, OK, Indonesien	PT-Inhutani I Berau Concession

## B.2 Methoden

### B.2.1 Aufbewahrung der Pflanzenproben

Zur Konservierung der DNA wurde ein Teil eines Blattes oder, wenn es sich um junge Blätter handelte, ein ganzes Blatt möglichst unmittelbar nach dem Abernten im Gelände mit Hilfe von Silica-Gel getrocknet (Chase und Hills, 1991). Nach der Ankunft des Blattmaterials im Labor wurde die DNA entweder sofort isoliert, oder die Blätter wurden zur weiteren Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die schnelle Trocknung im Feld ist notwendig, da eine langsame Trocknung des Blattgewebes, kombiniert mit eventuell eingetretenen Verletzungen zur Ansammlung phenolischer Verbindungen führen kann. Diese haben häufig negative Auswirkungen auf die Ausbeute und Qualität einer DNA-Präparation (Jobes *et al.*, 1995; Loomis, 1974).

### B.2.2 DNA-Isolation und DNA-Aufreinigung

Die DNA wurde nach einer Standardmethode unter Verwendung des Detergens Cetyltrimethylammoniumbormid (CTAB) isoliert (Weising *et al.*, 1995). Um den negativen Auswirkungen von Phenolen und Phenoloxidasen zu begegnen, wurden dem CTAB-Extraktionspuffer  $\beta$ -Mercaptoethanol und Polyvinylpyrrolidon (PVP-40) zugesetzt.

#### Lösungen:

- CTAB-Extraktionspuffer:
  - 2,0 % (w/v) CTAB
  - 1,4 M NaCl
  - 0,1 M Tris-HCl pH 8.0
  - 20 mM EDTA
  - 0,2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (MET)
  - 1,0 % Polyvinylpyrrolidon (PVP; MG = 40.000)
 MET erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben.
- 24:1 Chloroform/Isoamylalkohol
- 100 % Isopropanol
- 70 % Ethanol
- 100 % Ethanol
- 1 x TE-Puffer:
  - 10 mM Tris-HCl
  - 1 mM EDTA; pH 8.0
- RNase-Stammlösung (10 mg/ml)
- 5 M NaCl

Jeweils 20-30 mg getrocknetes Blattmaterial wurden entweder mit Mörser und Pistill oder mit einer Kugelmühle (Retsch-MM300®) zerkleinert. Das resultierende Pulver wurde in 400  $\mu\text{l}$  (bzw. 500  $\mu\text{l}$  bei Verwendung der Kugelmühle) CTAB-Puffer aufgenommen und bei  $60^{\circ}\text{C}$  für 30 min inkubiert. Nach der Zell-Lyse wurde das Gemisch mit derselben Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und für 10 min geschwenkt. Die dabei entstandene Emulsion wurde anschließend für 15 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Alle hydrophoben Stoffe bleiben bei diesem Vorgang in der unteren, organischen Phase. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, zur Fällung der DNA in ein anderes Reaktionsgefäß überführt, mit 0,6 Vol. Isopropanol versetzt, vorsichtig gemischt und die gefällte DNA für 15 min bei 15.000 rpm abzentrifugiert. Wenn bei der DNA-Fällung keine fädigen Strukturen sichtbar waren, wurde das Gemisch zunächst für 30 min bis zu mehreren Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und erst anschließend zentrifugiert. Das Pellet

wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut für 15 min bei 15.000 rpm zentrifugiert, getrocknet und in 500  $\mu$ l TE-Puffer (meist über Nacht) resuspendiert.

Am nächsten Tag wurde die DNA-Präparation mit 0,5  $\mu$ l RNase-Stammlösung (10 mg/ml) versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Fällung und Entfernung von Polysacchariden wurde die DNA-Lösung anschließend mit 0,35 Vol. 100 %igen Ethanol unter niedriger Salzkonzentration (0,25 M NaCl) gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert (Michaels *et al.* 1994). Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 9000 rpm (Entfernung der ausgefallenen Polysaccharide) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol. 100 % Isopropanol versetzt, vorsichtig gemischt und die DNA für 15 min bei 15.000 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen (s.o.), zur dauerhaften Aufbewahrung in 50-100  $\mu$ l TE Puffer gelöst und bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ein Aliquot der DNA-Lösung mit Elektrophorese-Auftragspuffer versetzt und auf einem 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die DNA-Konzentrationen wurden durch Vergleich mit  $\lambda$ -DNA unterschiedlicher Konzentrationen abgeschätzt.

Einige Proben, die im weiteren Verlauf der Untersuchungen Probleme bei der PCR-Amplifizierung zeigten, wurden zusätzlich mit unlöslichem Polyvinylpyrrolidon (PolyclarAT ©) behandelt. Hierzu wurden 15  $\mu$ l DNA mit 1  $\mu$ l PolyclarAT (100 mg/ml) versetzt, für mindestens eine Stunde inkubiert, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und für die weiteren Versuche eingesetzt.

Für Herbarproben wurde alternativ auch die Natrium Dodecyl-Sulfat (SDS)-Methode nach Jobs *et al.* (1995) verwendet. Das gemörserte Pflanzenmaterial wird dabei zunächst in einem Puffer suspendiert, der 2 % PVP enthält, jedoch keine Detergentien. Die Zellkerne bleiben in diesem Puffer intakt, werden abzentrifugiert, und der cytoplasmatische Überstand wird verworfen. Im nächsten Schritt wird dem Pellet ein SDS-haltiger Puffer hinzugefügt, wodurch die zellulären Membranen einschließlich der Zellkernmembran lysiert und die DNA freigesetzt werden. Einige DNA-Proben wurden mit Hilfe des DNeasy Plant DNA-Isolation Kits (QIAGEN) isoliert, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde.

Da die aus Herbarproben isolierten DNAs in fast allen Fällen stark degradiert waren, konnten sie nicht ohne weiteres für die phylogenetischen Analysen eingesetzt werden. Aus diesem Grunde wurde eine Reparaturmethode angewandt, wie sie von Pusch *et al.* (1998) für prähistorische DNA empfohlen wird. Die Methode wurde gemäß den dortigen Angaben durchgeführt. Hierbei werden zunächst bei der degradierten DNA (ca. 20 ng) die eventuell vorhandenen Lücken mit Hilfe der DNA-Polymerase I aus *E. coli* neu synthetisiert und anschließend die Einzelstrangbruchstellen mittels der Ligase T4 geschlossen.

### B.2.3 Agarose-Elektrophorese

Genomische DNA-Proben wurden auf 0,8 % Agarosegelen, PCR-Fragmente auf 1,5 % Agarosegelen nach Standardmethoden elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (Sambrook und Russell, 2001). Dazu wurden die folgenden Lösungen verwendet:

- Tris-Borat-EDTA-(TBE-)Puffer

	0,5 x	1 x	“Long Run” 1x
Tris	45 mM	90 mM	134 mM
Borat	45 mM	90 mM	45 mM
EDTA-Na+ (pH 8,0)	1 mM	2 mM	2,5 mM

- DNA-Auftragspuffer für Agarose-Gele

Glycerin	40 %
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Xylencyanol	0,1 % (w/v)

## B.2.4 Elektrophorese und Detektion von DNA-Fragmenten auf einem automatischen DNA-Sequenzierer (LI-COR 4200)

Für die hochauflösende Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einem automatischen Sequenzierer (LI-COR 4200 IR<sup>2</sup>, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska) wurden 0,2 mM dünne Polyacrylamid-Gele (PAA-Gele) eingesetzt, die je nach Anwendung unterschiedlich konzentriert bzw. zusammengesetzt waren. Für die AFLP-Analysen (wurde die Gel-Matrix aus Sequagel XR (National Diagnostics, Atlanta) angefertigt (Lösungen s.u.). Hierbei wurden sowohl 25 cm- als auch 41 cm-Gele verwendet. Die Sequenzierprodukte des *atpB-rbcL*-Locus (siehe B.2.6.2) wurden auf 66 cm langen Gelen mit einer 3,75 %igen Long Ranger-Gelmatrix (Cambrex Bio Science) aufgetrennt; die Sequenzierreaktionen der wesentlich kürzeren *ccmp*-Loci dagegen auch auf 41 cm-Platten mit Sequagel XR. Die 25- und 41-cm Gele wurden dabei bis zu dreimal neu beladen.

Bei dem LI-COR-Sequenzierer handelt es sich um einen sogenannten Platten-Sequenzierer. Die Lösung für das PAA-Gel wird zwischen zwei Platten gegossen und ein Haifischzahn-Kamm eingesetzt. Nach ca. 2h ist das Gel polymerisiert, und die Elektrophorese kann begonnen werden. Die aufzutrennenden DNA-Fragmente tragen eine Fluoreszenzmarkierung. Der LI-COR-Sequenzierer besitzt die Möglichkeit, Fluoreszenzen in zwei verschiedenen Wellenlängen zu messen. Die beiden verwendeten Fluorochrome emittieren Licht dieser Wellenlängen: IRDye700 mit einer Emission bei 710 nm und IRDye800 mit einer Emission bei 819 nm. Dadurch können in einem einzigen Gellauf zwei Versuche parallel durchgeführt werden.

Für die Qualität der Auftrennung der Fragmente sind drei Faktoren von besonderer Bedeutung: (1) die Dicke des Gels (je dünner, desto schneller der Lauf und desto schärfer die Banden), (2) die angelegte Spannung (je höher, desto schneller der Lauf) und (3) die Länge des Gels (je länger, desto höher die Trennleistung). Die Schärfe der Banden auf Höhe der Laserabtastung ist auch abhängig von der Geschwindigkeit, mit der die Fluoreszenz durch das Gerät detektiert wird. Die Lesegeschwindigkeit muss umso langsamer sein, je länger das Gel ist. Die Spannungen und Stromstärken bei den einzelnen Gelgrößen wurden so angelegt, wie es vom Hersteller angegeben und im Gerät programmiert war.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit einem Ladepuffer im Verhältnis 1:2 gemischt. Der im Ladepuffer enthaltene Farbstoff ist positiv geladen und läuft somit in einem elektrischen Feld in die entgegengesetzte Richtung zur DNA. Dies hat den Vorteil, dass bei der Detektion der Signale keine vom Ladefarbstoff stammenden „Phantomsignale“ die Auswertung stören. Die kurzen Gele wurden üblicherweise mit 0,5 x TBE und die langen Gele mit einem 1 x Long Run-Puffer (siehe B.2.3) aufgetrennt.

## Lösungen:

- Sequagel XR (National Diagnostics, Atlanta)

Lösung	Stammkonzentration	Menge
Sequagel XR	6 %	28 ml
Sequagel XR-Puffer		7 ml
Ammonium-Persulfat (APS)	1 mg/ml	400 µl

- Long Ranger (Cambrex Bio Science)

Der Long-Ranger stellt eine 50 % Fertiglösung dar, die nur noch mit Harnstoff und dem Puffer gemischt werden muß.

Long Ranger	3,75 %	4,5 ml
Harnstoff	7M	25,2 g
„Long Run“-Puffer	1 x	

- Tris-Borat-EDTA-(TBE-)Puffer für PAA-Gele

	1 x	“Long Run” 1x
Tris	90 mM	134 mM
Borat	90 mM	45 mM
EDTA-Na+ (pH 8,0)	2 mM	2,5 mM

- DNA-Auftragspuffer für PAA-Gele

Formamid	98 %
EDTA	10 mM
Pararosanilin bzw. basisches Fuchsin	0,025 %

## B.2.5 AFLP-Analyse

Die AFLP-Analyse wurde gemäß der von Debener und Mattiesch (1990) beschriebenen Variante durchgeführt. Zum Prinzip der AFLP-Methode vgl. Kapitel A.3.2. Im Gegensatz zu der Originalbeschreibung von Vos *et al.* (1995) wurden nur 250 ng DNA pro Restriktionsverdauung eingesetzt. Bei einzelnen Proben, die nur in begrenzter Menge vorhanden waren, reduzierte sich dies auf 100 bzw. 50 ng DNA. Um die Methode für *Macaranga*-Arten zu optimieren, wurden gegenüber dem Protokoll von Debener und Mattiesch (1990) einige Änderungen vorgenommen. Auf Details wird in den folgenden Kapiteln hingewiesen.

### B.2.5.1 Restriktion und Ligation

Im ersten Schritt wurde die genomische DNA mit den beiden Restriktionsenzymen *HindIII* und *MseI* geschnitten. Gleichzeitig wurde an beide Enden der entstehenden Restriktionsfragmente ein Adapter anligiert, der als Primer-Zielsequenz für die nachfolgenden PCRs diente.

Zur Herstellung der Adapter wurden zunächst die jeweils zwei Oligonukleotide (oligo1 = oberer Strang, oligo2 = unterer Strang) gemeinsam in A. bidest gelöst, mit Hilfe eines Heizblocks auf 85 °C erhitzt und dort verbleibend langsam abgekühlt. Sobald die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte, wurden die fertigen Adapter bei -20 °C dauerhaft gelagert.

Pipettierschema für den *MseI* Adapter:

	Menge	Volumen
MseI oligo1	10 nM (=49,3 µg)	16,0 µl
MseI oligo2	10 nM (=42,1 µg)	14,0 µl
H2O		ad 200 µl

Der fertige *MseI*-Adapter hat eine Endkonzentration von 50 pmol/µl (= 50 µM) und die folgende Konformation;



Pipettierschema für den *HindIII* Adapter:

	Menge	Volumen
HindIII oligo1	1 nM (=5,1 µg)	4,3 µl
HindIII oligo2	1 nM (=5,5 µg)	4,5 µl
H2O		ad 200 µl

Der fertige *HindIII*-Adapter hat eine Endkonzentration von 5 pmol/µl (= 5 µM) und die folgende Konformation;



Als Puffer für den Restriktions/Ligationsansatz wurde der sog. RL-Puffer nach Williams *et al.* (1990) verwendet und in 10fach konzentrierter Stammlösung angesetzt:

- 10 x RL-(Restriktions- und Ligations-) Puffer, pH 7,5

	<b>Endkonzentration</b>
Tris-HCl	100 mM
Magnesium-Acetat (MgAc)	100 mM
Kalium-Acetat (KAc)	500 mM
Dithiothreitol (DTT)	50 mM

Der Puffer wird auf pH 7.5 eingestellt, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Der Restriktions/Ligations-Ansatz wurde nach folgendem Schema angesetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert:

	<b>Stammlösung</b>	<b>Menge</b>	<b>Endmenge bzw. -konzentration</b>
RL-Puffer	10 x	3 µl	1x
HindIII-Restriktionsenzym	10 U/µl	2,5 µl	2,5 U
MseI-Restriktionsenzym	10 U/µl	2,5 µl	2,5 U
HindIII-Adapter	5 pmol/µl	0,5 µl	2,5 pmol
MseI-Adapter	50 pmol/µl	0,5 µl	25 pmol
ATP (Adenosintriphosphat)	10 mM	0,6 µl	0,2 mM
T4 DNA-Ligase	2 U/ µl	0,05 µl	0,1 U
250 ng DNA			
Aqua bidest		Ad 30	

Anschließend wurden die Enzyme für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Zur Überprüfung des Erfolgs der Restriktion wurde ein Aliquot von 5 µl abgenommen und auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

### B.2.5.2 Präamplifikation

Für die Präamplifikation wurden folgende PCR-Komponenten zusammengegeben und gut gemischt:

	<b>Stammlösung</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tris-HCl (pH 8.4)	200 mM	5 µl	20 mM
KCl	500 mM	5 µl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 µl	1,5 mM
HindIII-Primer	50 ng/µl	1,5 µl	1,5 ng/µl
MseI-Primer	50 ng/µl	2,5 µl	2,5 ng/µl
dNTPs	2,5 mM	4 µl	200 µM
Taq-Polymerase rekombinant (Invitrogen)	5 U/µl	0,2 µl	1 U
Verdaute und ligierte DNA		5 µl	
Aqua bidest		Ad 50	

Die Präamplifikation wurde generell mit nur einer selektiven Base durchgeführt, wie es sich für komplexe Genome als vorteilhaft herausgestellt hat (Vos *et al.*, 1995). Als selektive Base wurde bei den *HindIII*-Primern immer Adenin (A) verwendet, bei den *MseI*-Primern entweder Adenin oder Cytosin (C). Der Präamplifikations-Ansatz wurde auf einem Biometra T6- oder einem Biorad-Thermocycler mit einer Heizrate von 0,8 °C/s mit

folgendem Programm durchgeführt. Zur Überprüfung der Präamplifikation wurden jeweils 10 µl Amplifikat auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

**Schritt 1-3 für 20 Zyklen**

1. Denaturierung	30 s	94 °C
2. Anlagerung	30 s	60 °C
3. Kettenverlängerung	60 s	72 °C

### B.2.5.3 Selektive Amplifikation und Auftrennung der AFLP-Fragmente

Für die selektive Amplifikation wurden in der gleichen Reaktion zwei unterschiedlich markierte *Hind*III-Primer eingesetzt. Dadurch konnten zwei Ansätze auf dem gleichen Gel analysiert werden (Myburg *et al.*, 2001). Für die PCR wurden folgende Ingredienzien zusammenpipetiert:

	Stammlösung	Menge	Endkonzentration
TritonX-100®	100 %	0,03 µl	0,3 %
Tris-HCl (pH 8.4)	200 mM	1 µl	20 mM
KCl	500 mM	1 µl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,4 µl	2,0 mM
MseI-Primer	50 ng/µl	0,6 µl	3,0 ng/l
dNTPs	2,5 mM	0,8 µl	200 µM
Taq-Polymerase rekombinant (Invitrogen)	5,0 U/µl	0,05 µl	0,25 U
HindIII-IRD700-Primer	2,0 ng/µl	1,5 µl	0,30 ng/µl
HindIII-IRD800-Primer	2,0 ng/µl	1,9 µl	0,38 ng/µl
1:10 verdünntes Präamplifikationsprodukt		2,5 µl	

die Reaktion wurde mit A. bidest auf 10 µl aufgefüllt

Für die Amplifikation wurde ein „touch down“-Programm verwendet, wobei in den ersten 12 Zyklen die Temperatur der Kettenanlagerung pro Zyklus um 0,7 °C abgesenkt wurde. Die Ergebnisse der Optimierungsversuche sind im Ergebnisteil genauer dargestellt (C.1.2.3).

**Schritt 1. bis 3. für 12 Zyklen**

1. Denaturierung	30 s	94 °C
2. Anlagerung *	30 s	*65 bis 57 °C
3. Kettenverlängerung	60 s	72 °C

**Schritt 4. bis 6. für 35 Zyklen**

4. Denaturierung	30 s	94 °C
5. Anlagerung	30 s	56 °C
6. Kettenverlängerung	60 s	72 °C

\* touchdown um -0,7°C pro Zyklus

Die Produkte aus der selektiven PCR wurden mit DNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:3 gemischt, denaturiert und auf dem LI-COR elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte wie im Kapitel B.2.7.1 beschrieben

## B.2.6 Chloroplasten-DNA-Sequenzierung

### B.2.6.1 Amplifikation nichtkodierender Chloroplastensequenzen

In der Testphase der Chloroplasten-Sequenzierungsexperimente wurden verschiedene „universelle“ Primerpaare aus der Literatur herausgesucht. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf nichtkodierenden Regionen mit einer PCR-Fragmentgröße zwischen 500 und 1000 bp. Die 12 Loci, die im Rahmen von Pilotstudien überprüft wurden, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primer-Kombinationen für die PCR-Amplifizierung nichtkodierender Chloroplasten-Regionen.** Zur näheren Erläuterung der Reaktionsansätze A bis E siehe Tabelle 4.

Locus	Primer-Sequenz	Größe	Gattung	Ansatz	Literatur
<i>atpB-rbcL</i>	f : 5' -GAAGTAGTAGGATTGATTCTC-3' r : 5' -CAACACTTGCTTTAGTCTCTG-3'	538 bp	<i>Glycine</i>	D	Xu <i>et al.</i> , 2000
<i>ndhD-ndhE</i>	f : 5' -GAAAATTAAGGAACCCGCAA-3' r : 5' -TCAACTCGTATCAACCAATC	576 bp	<i>Glycine</i>	C	Xu <i>et al.</i> , 2000
<i>psbA-trnH</i>	f : 5' -GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' r : 5' -CGCGCATGGTGGATTCCACAAATC-3'	240-560 bp	<i>Paeonia</i>	D	Sang <i>et al.</i> , 1997
<i>psbB-psbH</i>	f : 5' -AGATGTTTTTGCTGGTATTGA-3' r : 5' -TTCAACAGTTTGTGTAGCCA-3'	576 bp	<i>Glycine</i>	C	Xu <i>et al.</i> , 2000
<i>psbI-trnS</i> (ccmp2)	f : 5' -GATCCCGGACGTAATCCTG-3' r : 5' -ATCGTACCGAGGGTTCGAAT-3'	150-234 bp	<i>Nicotiana</i> <i>Lycopersicon</i> <i>Actinidia</i> u.a.	E	Weising & Gardner, 1998
<i>rps16</i> -Intron	f : 5' -GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT-3' r : 5' -TGCGGATCGAACATCAATTGCAAC-3'	800-900 bp	Caryophyllaceae, Tribus Sileneae Oleaceae	B	Oxelmann <i>et al.</i> , 1997 Wallander & Albert, 2000
<i>trnL</i> (UAA) Intron	f : 5' -CATTACAAATGCGATGCTCT-3' r : 5' -TCTACCGATTTGCGCATATC-3'	483 bp	<i>Echium</i> , <i>Lobostemon</i>	A	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
<i>trnL</i> (UAA)- <i>trnF</i> (GAA)	f : 5' -CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' r : 5' -GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3'	360 bp	<i>Echium</i> , <i>Lobostemon</i>	A	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
<i>trnQ-trnS</i>	f : 5' -ACCAAACCCGTTGCCTTAC-3' r : 5' -ATCGTACCGAGGGTTCGAAT-3'	1200 bp	<i>Macaranga</i>	D	Heidsieck, 2002
<i>trnS-trnG</i>	f : 5' -GATTAGCAATCCGCGCTTT-3' r : 5' -TTACCACTAAACTATACCCGC-3'	477 bp	<i>Glycine</i>	C	Xu <i>et al.</i> , 2000
<i>trnT</i> (UAA)- <i>trnL</i> (UAA)	f : 5' -GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3' r : 5' -ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'	660 bp	<i>Echium</i> , <i>Lobostemon</i>	A	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
<i>ycf3</i> -Intron (ccmp6)	f : 5' -CGATGCATATGTAGAAAGCC-3' r : 5' -CATTACGTGCGACTATCTCC-3'	93-106 bp	<i>Nicotiana</i> , <i>Lycopersicon</i> , <i>Actinidia</i> u.a.	E	Weising & Gardner, 1998

Bei allen angegebenen Amplifikationsprotokollen wurde eine Hot-Start-PCR ausgeführt, indem die Proben auf Eis vorbereitet und bei 85 °C in den Thermocycler gestellt wurden. Als Thermocycler wurden entweder der Biorad iCycler oder der Biometra T6-Cycler verwendet. Die Reaktionen wurden bei maximaler Heiz- und Kühlrate durchgeführt (5 bzw. 3 °C/s). Wenn nicht anders angegeben, wurde die Amplifikation nach dem für den jeweiligen Locus in der Literatur angegebenen Protokoll durchgeführt. Die Reaktionsansätze für die einzelnen Protokolle (A bis E) sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Übersicht der für die Amplifikation nichtkodierender cpDNA-Bereiche verwendeten PCR-Ansätze A (nach Taberlet *et al.*, 1991), B (nach Wallander und Albert, 2000), C und D (nach Xu *et al.*, 2000; D als Variation) und E (nach Weising und Gardner, 1999). BSA und DMSO wurde nur bei *atpB-rbcL* zugesetzt (\*). Die Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, in 25 µl-Ansätzen durchgeführt.**

	Stammlösung	A	B	C	D	E
		<i>trnT-trnL</i> <i>trnL</i> -Intron <i>trnL-trnF</i>	<i>rps16</i> -Intron	<i>psbB-psbH</i> <i>trnS-trnG</i> <i>ndhD-ndhE</i>	<i>atpB-rbcL</i> <i>psbA-trnH</i> <i>trnQ-trnS</i>	<i>psbI-trnS</i> <i>ycf3</i> -Intron
Endkonzentration						
Tris-HCl (pH 8.4)	200 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
KCl	500 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3 mM	2 µM	1,5 mM	1,5 mM	2,5 mM
dNTPs	2,5 mM	200 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM
Primer	5 µM	1 µM	0,2 µM	0,25 µM	0,25 µM	0,5 µM
Primer	5 µM	1 µM	0,2 µM	0,25 µM	0,25 µM	0,5 µM
DMSO	100 %	-	-	-	*5 %	-
BSA	20 µg/µl	-	-	-	*0,4 µg/µl	-
<i>Taq</i> -Polymerase rekombinant (Invitrogen)	5,0 U/µl	0,5 U	0,5 U	0,5 U	1,5 U auf 50 µl	1 U

Die Analyse des intergenischen Bereichs zwischen *atpB* und *rbcL* wurde mit einigen Modifikationen nach den Vorgaben von Xu *et al.* (2000) durchgeführt (PCR-Ansatz D). Zum einen wurde die Spezifität der PCR durch ein „touch down“-Programm während der ersten 13 Zyklen erhöht (s.o.), zum anderen wurden Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Stabilisierung der Primerbindung und BSA (Rinderserumalbumin) hinzugefügt. Als Primer wurden sogenannte „tailed-Primer“ verwendet. Diese enthalten am 5'-Ende der eigentlichen Primer-Sequenz eine spezielle Nukleotid-Abfolge der M13-DNA. Diese M13-Sequenz dient bei der anschließenden Sequenzierung als Bindemotiv für die Sequenzierprimer. Wenn die PCR-Reaktion als Vorbereitung für die Sequenzierung diente, wurde sie in einem Volumen von 50 µl (anstelle von 25 µl) durchgeführt

1. Eingangsdenaturierung	5,0 min	94 °C
2. Eingangs-Anlagerung	5,0 min	60 °C
<b>Schritt 3. - 5. für 13 Zyklen</b>		
3. Denaturierung	1,0 min	94 °C
4. Anlagerung	1,5 min	59-49 °C
5. Kettenverlängerung	3,0 min	67 °C
<b>Schritt 6. - 8. für 17 Zyklen</b>		
6. Denaturierung	1,0 min	94 °C
7. Anlagerung	1,5 min	51,1 °C
8. Kettenverlängerung	3,0 min	67 °C
9. Finale Kettenverlängerung	5,0 min	67 °C

### B.2.6.2 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Durch den Einsatz von zwei mit unterschiedlichen Fluorochromen (IRDye700 und IRDye800) markierten Primern für die Hin- und Rückreaktion konnten beide im gleichen Reaktionsansatz kombiniert werden (Multiplexing). Bei einem solchen bidirektionalen „Cycle Sequencing“ mit einer thermostabilen Sequenase wird wesentlich

weniger DNA benötigt als bei der Verwendung nur eines Primers. Für die Sequenzierung der beiden *ccmp*-Loci wurden dieselben Primer wie bei der vorausgegangenen PCR verwendet. Die PCR des *atpB-rbcL*-Locus wurde mit einem Primer durchgeführt, der eine M13-Sequenz am 5'-Ende trug („tail“). Für die Sequenzierung konnte daher ein M13-Primer verwendet werden. Um gut lesbare Sequenzen zu erhalten, mussten die *atpB-rbcL*-PCR-Produkte vor der Sequenzierung aufgereinigt werden. Dies erfolgte mit Hilfe des „Mini-PCR-Purification-Kits“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Sofern es nicht anders gekennzeichnet ist, wurden sämtliche Sequenzierungen der Chloroplasten-Regionen mit einer Zwei-Schritt-PCR (s.u.) und dem „Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing“-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu dem Ansatz wurden etwa 100 ng DNA aus der vorhergehenden PCR und jeweils 3 pmol der beiden Primer hinzugefügt.

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Eingangsdenaturierung	5 min	95 °C
<b>Schritt 2. – 3. für 20 Zyklen</b>		
2. Denaturierung	45 sec	95 °C
3. Anlagerung und Kettenverlängerung	3 min	58 °C

Im Anschluss an die Sequenzierungsreaktion wurden je Reaktion 6 µl denaturierender Auftragspuffer zugefügt (vgl. Kapitel B.2.4), die Ansätze für 5 min bei 85 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Je ein Aliquot von 0,5 µl wurde auf das PAA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit dem mitgelieferten Programm eSeq v2.0 (LI-COR) gesteuert und gestartet. Mit Hilfe dieses Programms erfolgte auch die Sequenzierung der Hin- und Rückreaktionen. Das Alignment des Vorwärts- und Rückwärtsstranges wurde mit dem Programm AlignIR v1.2 (LI-COR) erstellt und abschließend die komplette Sequenz des Locus manuell editiert, um eventuell aufgetretene Fehler zu korrigieren.

Während der Pilotstudien wurden auch einige Sequenzierungen zur Analyse an ein Servicelabor vergeben. Die Auftrennung erfolgte dort auf einem automatischen Sequenzierer vom Typ ABI 3700, für die Sequenzierungsreaktion wurde der „BigDye Terminator Kit“ (PE Biosystems) verwendet. Es wurde nur jeweils ein Primer pro Reaktion eingesetzt und der entsprechende Locus nur in einer Richtung sequenziert. Für die Reaktion wurden gemäß Herstellerangaben je 4 µl „Terminator Reaction Mix“ in einem 10 µl-Ansatz gegeben, wobei auch hier etwa 100 ng PCR-Produkt zugefügt wurden.

Die Sequenzierungsreaktion wurde bei einer Heizrate von 1 °C/sek. auf einem Biometra T6 - Thermocycler durchgeführt. Dazu wurde folgendes Programm verwendet:

1. Eingangs-Denaturierung	1 min	95 °C
<b>Schritt 2. - 4. für 25 Zyklen</b>		
2. Denaturierung	10 sek	95 °C
3. Anlagerung	10 sek	58 °C
4. Kettenverlängerung	4 min	60 °C
5. Finale Kettenverlängerung	10 min	60 °C

Bei der Verwendung eines ABI-Sequenzierers mussten die Sequenzierungsprodukte vor der Auftrennung generell gereinigt werden, um Kontaminationen mit verbliebenen, fluoreszenzmarkierten ddNTPs zu vermeiden. Dazu wurden den fertigen Reaktionsprodukten 30 µl A. bidest und 60 µl 100 % Isopropanol zugesetzt, kurz gemischt, für 15 min bei Raumtemperatur (RT) die DNA gefällt und anschließend für 20 min bei RT

und 15.000 rpm (Eppendorf 8404R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA mit 250 µl 75 % Isopropanol gewaschen, für 10-15 min in der SpeedVac getrocknet und anschließend in 20 µl-HPLC-Wasser (Roth) resuspendiert. Die Proben wurden in dieser Form an das Sequenzierlabor verschickt, wo sie vor dem Auftrag auf den ABI-Sequenzierer für 10 min bei 95 °C denaturiert wurden. Die Sequenzdaten wurden von dem Servicelabor in elektronischer Form zur Verfügung gestellt.

## B.2.7 Datenauswertung

Bei der phylogenetischen Auswertung von binären AFLP-Matrizen oder Sequenzdatensätzen gibt es vom Prinzip her zwei unterschiedliche Vorhergehensweisen, um die durch molekulare Daten nahegelegten Verwandtschaftsverhältnisse in Form so genannter Dendrogramme darzustellen. Die eine Methode bedient sich unmittelbar der Originaldaten bzw. -merkmale, um mit Hilfe spezieller Algorithmen einen Stammbaum zu erzeugen. Werden dabei nur gemeinschaftlich abgeleitete Merkmale (Synapomorphien) der Berechnung zugrundegelegt (Kladistik), dann entstehen sog. Kladogramme, die auch als Phylogramme bezeichnet werden. Bei der zweiten, als numerische Taxonomie oder auch Phänetik bezeichneten Herangehensweise werden auf Grundlage der (molekularen) Merkmale zunächst paarweise Ähnlichkeiten zwischen den Taxa berechnet. Die resultierenden Ähnlichkeits- bzw. Distanzmatrizen kann man ebenfalls in Baumform graphisch darstellen, in diesem Fall entstehen sog. Phänogramme. Phänogramme sind keine Stammbäume im eigentlichen Sinne und spiegeln somit keine Abfolge evolutiver Schritte wider. Zur Absicherung der einzelnen Verzweigungen in den Dendrogrammen oder zur Beurteilung des Homoplasie-Grades des Dendrogrammes können schließlich verschiedene statistische Methoden wie z.B. „Bootstrapping“ eingesetzt werden (s.u.).

Die Analysen wurden mit folgenden Programmpaketen durchgeführt: NTSYSpc © Version 2.10p (Rohlf, 1997), TREECON for Windows © Version 1.3b (van de Peer und De Wachter, 1994), PAUP 4.0b10 © (Swofford, 2002) sowie TCS Version 1.13 (Clement *et al.*, 2000). In den folgenden Kapiteln werden diese Methoden im Einzelnen erläutert.

### B.2.7.1 Auswertung der AFLP-Daten

Die AFLP-Daten wurden sowohl phänetisch als auch kladistisch (siehe hierzu B.2.7.2.2) analysiert. In beiden Fällen wurde als erster Schritt eine binäre Datenmatrix erzeugt.

#### B.2.7.1.1 Erstellung der binären Matrix

Die Rohdaten der AFLP-Analyse wurden halbautomatisch ausgewertet. Zunächst wurden die Bandenmuster mit Hilfe des Computerprogramms GeneImageIR © v4.02 (Scanalytics, Inc., Fairfax) in eine binäre Datenmatrix überführt, wobei die Anwesenheit einer AFLP-Bande an einer bestimmten Gelposition mit einer „1“, ihre Abwesenheit mit einer „0“ kodiert wurde. Die so gewonnenen Rohdaten wurden per Hand editiert. Unklare und schwache Banden, sowie Banden mit starken Intensitätsschwankungen über die verschiedenen Taxa hinweg wurden nicht für die Auswertung berücksichtigt. Aufgrund der Erfahrung, dass im niedrigen Molekulargewichtsbereich häufig artifizielle Banden auftreten (eigene Beobachtungen und Potokina *et al.*, 2002), wurden nur Banden > 50 bp ausgewertet. Bei vereinzelt Proben/Primer-Kombinationen waren auf dem Gel überhaupt keine Banden zu sehen. In diesem Fall wurden alle mit dieser Primerkombination erzeugten Merkmale als „fehlend“ gewertet und mit einer „4“ kodiert (siehe Anhang).

Vortests hatten gezeigt, dass das Hinzufügen vereinzelter als „4“ gekennzeichnete Merkmale bei dem Datensatz keine entscheidenden Veränderungen der Dendrogramm-Topologie bewirkten.

### B.2.7.1.2 Phänetische Analysen

Die binäre 0/1-Matrix wurde anschließend in eine Distanz- bzw. Ähnlichkeitsmatrix überführt. Paarweise Ähnlichkeiten ( $A$ ) wurden mit Hilfe zweier unterschiedlicher Indizes berechnet. Der erste Index berechnet sich nach der von Dice (1945) entwickelten und von Nei und Li (1979) auf Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen angewandten Formel

$$A_D = \frac{2n_{ab}}{n_a + n_b}$$

Hierbei werden jeweils zwei Taxa  $a$  und  $b$  (auch als OTUs, operational taxonomical units bezeichnet) miteinander verglichen. Die gemeinsam bei  $a$  und  $b$  vorhandenen Banden werden addiert ( $n_{ab}$ ) und die Summe mit zwei multipliziert. Das Produkt wird durch die Summe aller in  $a$  ( $n_a$ ) und  $b$  ( $n_b$ ) vorhandenen Merkmale dividiert. Die relative Ähnlichkeit der beiden Taxa bzw. ihrer Bandenmuster bewegt sich zwischen 0 (keine gemeinsamen Banden) und 1 (alle Banden identisch).

Der zweite Index zur Berechnung der Ähnlichkeit beruht auf dem Modell von Jaccard (1908). Dieser sogenannte Jaccard-Index ( $A_J$ ) errechnet sich wie folgt:

$$A_J = \frac{n_{ab}}{n_a + n_b - n_{ab}}$$

Im Gegensatz zum Dice-Index ( $A_D$ ) wird bei der Berechnung von  $A_J$  die Anzahl aller gemeinsam vorhandenen Merkmale ( $n_{ab}$ ) nur einfach gewertet und durch die Summe der Merkmale dividiert, die jeweils nur bei einer, nicht aber in beiden OTUs vorkommen. Häufig wird statt mit den Ähnlichkeiten ( $A$ ) mit den Distanzen ( $D$ ) gerechnet. Diese lassen sich aus der vorher berechneten Ähnlichkeit durch die einfache Formel  $D = 1 - A$  bestimmen.

Die Ähnlichkeits- bzw. Distanzmatrizen wurden anschließend graphisch ausgewertet und in Form von Dendrogrammen dargestellt. Die AFLP-Daten wurden hierbei sowohl kladistisch (siehe S. 38 „Maximum Parsimony“-Analyse) als auch phänetisch ausgewertet. Bei der Erstellung der Phänogramme wurde sowohl das „Neighbor Joining“-Verfahren als auch die UPGMA-Analyse eingesetzt.

Bei der Verwendung des „Neighbor Joining“-Verfahrens [NJ, (Saitou und Nei, 1987)] werden die Taxa auf der Basis ihrer paarweisen Ähnlichkeiten mit Hilfe eines hierarchischen Clusterverfahrens in Gruppen zusammengefasst. Ausgangspunkt ist ein sternförmiges Gebilde, an dessen Ästen die einzelnen OTUs sitzen. In mehreren aufeinanderfolgenden Schritten werden jeweils zwei OTUs mit der geringsten Distanz zueinander gesucht. Diese werden miteinander verbunden und zu einem neuen OTU zusammengefasst. Im nächsten Schritt werden wieder die jeweils nächstähnlichen OTUs („nearest neighbors“) gesucht und hinzugefügt. NJ-Bäume sind sog. additive Bäume, d.h. die Astlängen geben die tatsächlichen (genetischen) Distanzen der einzelnen OTUs zueinander an. Meist wird ein NJ-Baum als bewurzelter Baum dargestellt. Zur Erstellung der Wurzel wird in der Regel die Außengruppen-Methode verwendet. Dazu werden ein oder mehrere Taxa dem Datensatz hinzugefügt, die nicht zur „Innengruppe“ der untersuchten Taxa gehören, jedoch möglichst nahe mit dieser verwandt sind. Diese sog.

Außengruppe wird basal zu allen anderen Arten gesetzt. Die Außengruppe verleiht dem Baum eine evolutive Richtung. Die NJ-Analyse der AFLP-Daten wurde sowohl mit dem Programm TREECON als auch mit dem Programmpaket PAUP durchgeführt (s.o.). Als Ähnlichkeits-Indices wurden entweder der Dice-Index  $A_D$  oder der Jaccard-Index  $A_J$  zur Berechnung herangezogen.

Eine alternative Vorgehensweise zur Erzeugung eines Phänogramms ist die UPGMA-Cluster-Analyse [„unweighted pair group method with arithmetic means“ (Sneath und Sokal, 1973)]. UPGMA-Bäume sind ultrametrisch, d.h. im Gegensatz zu NJ-Methode werden konstante Evolutionsraten für alle Merkmale und Taxa vorausgesetzt. Wiederum werden zunächst die beiden OTUs mit der geringsten Distanz zueinander gesucht und zu einer neuen taxonomischen Einheit zusammengefasst. Die Distanzen des neuen Paares zu den verbliebenen OTUs werden arithmetisch gemittelt. Nun wird wiederum ein Paar von OTUs mit der größten Ähnlichkeit ausgewählt und zu einer neuen Einheit miteinander verschmolzen. Auf diese Weise werden die OTUs solange zu kontinuierlichen „Clustern“ zusammengeschlossen, bis kein OTU mehr übrig ist. Zur Bewurzelung des Phänogramms kann man sowohl die Außengruppenmethode (s.o.) als auch das sog. „midpoint rooting“ verwenden. Im letzteren Fall wird die Wurzel einfach an den Mittelpunkt des Dendrogramms angeschlossen. Die Berechnung der UPGMA-Bäume erfolgte mit den oben beschriebenen Indices und den Computerprogrammen NTSYSpC und TREECON.

#### B.2.7.1.3 Hauptkoordinaten-Analyse („principal coordinate analysis“, PCO)

Ähnlichkeiten zwischen Taxa kann man auch mit Hilfe von Ordinations-Methoden graphisch darstellen. Die Hauptkoordinaten-Analyse („principal coordinate analysis“, PCO) stellt eine Verwandte der Hauptkomponenten-Analyse („principal component analysis“, PCA) dar. Während bei letzterer quantitative Daten in Form z.B. von Allelfrequenzen in die Berechnung eingehen, werden bei der PCO-Analyse symmetrische Matrizen (z.B. paarweise Distanzen) als Daten für die Berechnungen verwendet (Gower, 1966). Die PCO folgt Gowers Annahmen, ein Set an Punkten für  $n$  Einheiten (Akzessionen) in einem multidimensionalen Raum zu finden, bei der ähnliche Einheiten nahe zusammen, verschiedene Einheiten weiter voneinander weg gruppieren. Die erste Achse (Dimension) soll dabei für alle Punkte die größtmögliche Auflösung zeigen. Bei  $n$  Proben gibt es theoretisch  $(n-1)$  Dimensionen. Die Robustheit eine Gruppe (Cluster) wird durch den Vergleich zwischen der minimalen Ähnlichkeit zwischen Individuen innerhalb einer Gruppe zu der durchschnittlichen Ähnlichkeit zwischen allen Individuen bestimmt.

Zur Durchführung der Hauptkoordinaten-Analyse wurde das Programmpaket NTSYpC eingesetzt. Zunächst wurden die vorher berechneten paarweisen Distanzen ( $D_D$ ) mit Hilfe des Programms DCENTER in skalare Produkte überführt und anschließend mit dem Programm EIGEN die Eigenvektoren und Eigenwerte berechnet. Zur graphischen Darstellung der Eigenvektoren wurde die dreidimensionale Darstellung gewählt (MOD 3d Plot). Auf die so gewonnenen Daten wurde ein sogenannter „minimum spanning tree“ (MST) aufkartiert, der die tatsächliche Zugehörigkeit einzelner Akzessionen widerspiegelt, die aber erst unter Hinzunahme einer weiteren Dimension erkennbar sind.

## B.2.7.2 Analyse der Chloroplasten-DNA-Daten

### B.2.7.2.1 Alignment

Um Sequenzdaten miteinander vergleichen und Dendrogramme berechnen zu können, müssen die für die verschiedenen Taxa bestimmten Nukleotidabfolgen zunächst passgenau übereinander geschrieben werden. Für die Erstellung eines solchen sog. „Alignments“ stehen verschiedene Programme zur Verfügung, u.a. das hier verwendete AlignIR© v1.2. Schwierigkeiten bei der Erstellung von Alignments treten insbesondere in Sequenzbereichen auf, bei denen die Variation vor allem auf Insertionen oder Deletionen (sogenannten Indels) beruht. Solche Stellen wurden in der vorliegenden Arbeit daher manuell überarbeitet. Generell wurde nach dem Parsimonie-Prinzip vorgegangen, d.h., es wurde versucht, das Alignment so zu gestalten, dass es durch eine minimale Anzahl von Mutationsereignissen erklärt wurde.

### B.2.7.2.2 Phylogenetisch-kladistische Analyse von Chloroplastendatensätzen

Kladistische Methoden verwenden zur Berechnung der Dendrogramme die Merkmale an sich. Zur kladistischen Auswertung von Sequenzdaten können neben Punktmutationen (= Basensubstitutionen) auch Indel-Ereignisse als Merkmale gewertet werden. Die im Rahmen des Alignment-Vorgangs definierte An- bzw. Abwesenheit eines Indels wurde in Form einer (1/0)-Matrix kodiert und diese an das Ende des Datensatzes angehängt. In einigen Fällen wurde aufgrund der verschachtelten Strukturen ein sogenanntes „multistate character coding“ angewendet. Hierbei wurde der gesamte hochvariable Bereich zwischen zwei konservierten Enden als ein einziges Indel aufgefasst, welches unterschiedliche Merkmalszustände aufweisen kann (Scotland, 1992). Diese wurden dann in Form von Zahlen kodiert (0, 1, 2, 3,...). Auf diese Art und Weise ist es möglich, gemeinsame Merkmale in die Auswertung mit einzubeziehen, unklare Alignment-Positionen jedoch auszuschließen. Zur Erzeugung von Kladogrammen wurde ausschließlich die Methode der maximalen Sparsamkeit („maximum parsimony“) angewandt.

#### „Maximum parsimony“

Der „maximum parsimony“ (MP)-Methode liegt das Sparsamkeitsprinzip zu Grunde. Danach wird angenommen, dass der direkte Weg einer Merkmalsänderung von A nach B wahrscheinlicher ist als ein indirekter Weg, z.B. von A über C nach B. Der kürzestmögliche evolutionäre Weg wird als der wahrscheinlichste Weg angesehen. Das MP-Verfahren besteht daher in der Suche nach derjenigen Baumtopologie, die den vorhandenen Datensatz mit der geringsten Anzahl von Merkmalsänderungen erklärt. Jede Merkmalsänderung wird als ein Schritt bewertet, die Zahl aller Schritte für die gesamte Topologie ergibt die Baumlänge. Der Computer berücksichtigt bei einer MP-Analyse nur die Bäume mit der geringsten Anzahl evolutiver Schritte. Meist wird dabei nicht nur ein einzelner Baum gefunden, sondern eine Vielzahl von gleich langen Bäumen, die alle dieses Kriterium erfüllen. Um eine neutrale Interpretationsmöglichkeit zu erhalten, können aus diesen vielen Einzelbäumen Konsensus-Bäume erzeugt (s. u.).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden alle MP-Bäume inklusive der AFLP-Daten mit dem Programmpaket PAUP 4.0b 10© (Swofford 2002), berechnet. Lücken im Alignment (Indels) wurden als fehlende Merkmale gewertet, die Indels jedoch kodiert und für manche

Analysen an den Sequenzdatensatz angehängt. Da das MP-Verfahren empfindlich auf Variationen der Zahl und Gewichtung potentieller Apomorphien reagiert, wurden in zwei Fällen Indels mit einer niedrigeren Gewichtung für die Berechnung (0,5) versehen, da nicht erkennbar war, ob es sich um zwei unabhängig voneinander entwickelte Merkmale handelt. Aufgrund der bekanntermaßen hohen Homoplasiewahrscheinlichkeit von Mikrosatelliten-Mutationen wurden Indels, die auf Längenvariationen von Mikrosatelliten beruhen (insb. Poly-A-Abschnitte) nicht in die Berechnung mit einbezogen. Die Bäume wurden nach heuristischen Kriterien unter Verwendung der Standard-Algorithmen des Programmpaketes gesucht (Fitch parsimony; stepwise addition, addition sequence: simple; branch swapping algorithm: tree-bisection-reconnection „TBR“; MULPARS; ACCTRAN). Die allgemeine Merkmals-Kongruenz, sowie der Grad der Homoplasie wurde mit dem „Consistency“ Index (CI) und dem „Retention“ Index (RI) abgeschätzt. Zur Polarisierung der Bäume wurden die *Mallotus*-Arten als Außengruppe definiert und mit ihrer Hilfe das entstandene Dendrogramm bewurzelt.

### Konsensus-Bäume

Wie oben erläutert, resultiert bei einer MP-Analyse in der Regel eine Vielzahl an „kürzesten“ Bäumen. Da meist keine wirklich objektive Möglichkeit besteht, aus diesen Bäumen einen auszuwählen, der die Realität am besten widerspiegelt, werden üblicherweise alle Bäume zu einem Konsensus-Baum zusammengefasst. Die am häufigsten angewandte Methode stellt das sogenannte strikte Konsensusverfahren dar (engl. „strict consensus tree“). Dabei werden nur solche Gruppen (bzw. Knoten, Zweige) beibehalten, die in allen Einzelbäumen vorkommen und damit eindeutig von dem Datensatz unterstützt werden. Ein Nachteil dieser Methode liegt darin, dass das resultierende Kladogramm häufig nicht ausreichend aufgelöst ist und damit wichtige Informationen aus den Einzelbäumen verloren gehen kann. Eine Alternative stellt der „Majority rule consensus“ (MR)- Baum dar. Hierbei bleiben alle Gruppen im Konsensusbaum erhalten, die mit einer vorgegebenen Mindesthäufigkeit (meist 50 %) in den alternativen Topologien zu finden sind. Bei einem 50 %-MR-Baum geht weniger Information verloren und der Baum ist meist besser aufgelöst. Der Prozentsatz aller Bäume, bei dem eine bestimmte Verzweigung vorhanden ist, wird als Zahl an den jeweiligen Ast geschrieben. Bei den hier durchgeführten kladistischen Berechnungen wurden beide Methoden angewandt. In den Abbildungen wurden generell die 50 %-MR-Bäume dargestellt. Die Gruppen, die im „strict consensus tree“ kollabieren, sind in den Abbildungen durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

#### B.2.7.2.3 Phylogeographische Auswertung von Chloroplasten-Datensätzen

Bei der phylogeographischen Analyse geht man nicht zwingend davon aus, dass ein Taxon, aus dem sich zwei neue bilden, als ausgestorben gelten muss. Es wird vielmehr angenommen, dass ursprüngliche Taxa noch existieren und interne Knoten in einem Baum besetzen können. Die Ergebnisse einer phylogeographischen Analyse werden nicht als Phylogramm mit dichotomen Verzweigungen dargestellt, sondern als genetische Netzwerke, in denen auch alternative Wege in Form von Ringverbindungen zugelassen sind. Mit Hilfe solcher Netzwerke lassen sich inner- und zwischenartliche Verwandtschaftsbeziehungen, Speziationsereignisse oder auch historisch-geographische Ausbreitungswege auf komplexe Art und Weise darstellen. Die Methode kann bei Sequenz-Datensätzen mit relativ geringer Anzahl an Merkmalen genutzt werden.

Aufgrund der geringen bis nicht vorhandenen Rekombination eignet sich bei pflanzlichen Organismen vor allem die Chloroplasten-DNA für eine phylogeographische Analyse. Zur phylogeographischen Auswertung wurden aus den gewonnenen Sequenzdaten zunächst Chloroplasten-Haplotypen (s. u.) ermittelt, die mit Hilfe des Computer-Programms TCS (Clement *et al.*, 2000) zu einem Netzwerk zusammengefügt wurden.

## Chloroplasten-Haplotypen

Zur Ermittlung der Chloroplasten-Haplotypen wurde ebenso wie bei der kladistischen Auswertung zunächst ein DNA-Sequenzalignment der entsprechenden Loci erstellt. Im Gegensatz zur phylogenetischen Analyse wurden bei der Erstellung der Haplotypen neben Punktmutationen und Indelereignissen auch Längenvariationen von Mikrosatelliten in die Bewertung mit einbezogen. Da das Programm TCS nicht mit längeren Indels und Zahlenkodierungen rechnen kann, wurde jedes Indel als einzelne Basensubstitution kodiert. An Stellen mit Mononukleotid-Mikrosatelliten wurde jede Nukleotid-Verlängerung oder Verkürzung als separate Merkmalsänderung gewertet.

## Netzwerk-Erstellung

Die Haplotypen wurden nach den Algorithmen von Templeton *et al.* (1992) mit dem Programm TCS v1.18 (Clement *et al.*, 2000) zu einem statistischen Parsimonie-Netzwerk verrechnet. Zur Konstruktion des Netzwerks verwendet das Programm die Sparsamkeit (Parsimonie) als Bewertungskriterium. Als Schwellenwert bei der durchgeführten Berechnung wurde der vorgegebene Standardwert von 0,95 benutzt.

Im Gegensatz zu bifurkalen Konsensus-Bäumen können mit Hilfe des Netzwerkes mehrere gleich wahrscheinliche Entwicklungslinien parallel dargestellt werden. Um solche netzartigen Strukturen (sogenannte „loops“) aufzulösen, kann man sich zweier Annahmen bedienen. Zum einen wird davon ausgegangen, dass ursprünglichere Haplotypen häufiger sind als abgeleitete Haplotypen. Zweitens kann bei mehreren Verbindungslinien eine Priorisierung aufgrund geographischer Informationen durchgeführt werden (Crandall und Templeton, 1993).

Da der für diese Arbeit vorliegende Datensatz sehr groß und sehr variabel war, wurde das Haplotypen-Netzwerk in einem Zweischritt-Verfahren erstellt. Zunächst wurden nur robuste Substitutions- und Indelaten berücksichtigt und daraus mit Hilfe von TCS ein Ausgangsnetzwerk berechnet. Der Abgleich mit der Sequenz von Außengruppentaxa wurde hierbei unterstützend zur Beurteilung eingesetzt. Die in den homoplastischen Mikrosatelliten und Indels enthaltenen Informationen wurde anschließend mit Hilfe von TCS sowie manuell hinzugefügt. Die Mehrzahl der Schleifen („loops“) im Netzwerk konnte nach den o.g. Gesichtspunkten aufgelöst werden.

Auf eine „Nested Clade“-Analyse (Crandall, 1996) zur besseren Interpretation möglicher geographischer oder historischer Strukturen wurde verzichtet, da der Datensatz hierfür zu viele Arten umfasste.

## Methoden zur Bewurzelung eines Netzwerkes.

Um auch bei einem Netzwerk eine phylogenetische Richtung anzugeben, kann eine Wurzel definiert werden. Hierbei spielen zwei Grundannahmen eine Rolle. Erstens sind interne Haplotypen, die Verbindungen zu vielen anderen Haplotypen haben, wahrscheinlich älter als terminale Haplotypen. Zweitens sind häufige Haplotypen vermutlich älter als seltene

Haplotypen (Koaleszenz-Theorie, Crandall und Templeton, 1993; Koaleszenz-Theorie, Kingmann, 1982). Unter diesen Voraussetzungen können die sogenannten Außengruppengewichte nach den Vorgaben von Castelleo und Templeton (1994) berechnet werden (implementiert im Programm TCS). Eine alternative Methode zur Bewurzelung des Netzwerkes, die auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit zur Verwendung kam, liegt in der Interpretation der Polarität des Netzwerks mit Hilfe der Phylogrammen, die zum Beispiel mit der „maximum parsimony“-Methode gewonnen wurden.

## B.2.8 Statistische Überprüfung

### B.2.8.1 Bootstrap (BS)-Analyse

Das „Bootstrapping“ stellt eine Standardmethode zur Überprüfung der Robustheit eines Datensatzes dar (Felsenstein, 1985; 1988; Salamin *et al.*, 2003). Bei der BS-Analyse werden aus einem Datensatz mit  $n$  Merkmalen insgesamt  $n$  Merkmale zufällig gezogen. Im resultierenden Datensatz können einige Merkmale einfach, andere zwei- oder mehrfach, wiederum andere dagegen gar nicht vertreten. Aus jedem so erzeugten Datensatz wird ein Dendrogramm konstruiert. Dieses Vorgehen wird vielfach wiederholt, wobei jede BS-Replikation unabhängig von den vorangegangenen Replikationen geschieht und in jeder Runde wieder alle Merkmale zur Verfügung stehen. Aus allen ermittelten BS-Bäumen wird anschließend ein Konsensusbaum erstellt. Die angegebenen Werte an den Verzweigungspunkten dieses Dendrogrammes geben an, bei wieviel Prozent der Replikationen die von diesem Punkt abgehende monophyletische Gruppe gefunden wurde. Gruppen, die beim MP-Baum „Bootstrap“-Werte von  $> 90\%$  erhalten, gelten als sehr gut unterstützt.

Die „Bootstrap“-Analyse wurde entweder mit TREECON (van de Peer und De Wachter, 1994) oder mit PAUP 4.0b10© (Swofford 2002) durchgeführt.

### B.2.8.2 Kladistische Statistik

Zur Absicherung der Daten-Interpretation sind im Programmpaket PAUP mehrere statistische Verfahren implementiert, die automatisch berechnet werden können:

Der Konsistenzindex [engl. „Consistency Index“ (CI)] gibt das Ausmaß von Homoplasie innerhalb eines Datensatzes an. Ist keinerlei Homoplasie vorhanden (was in der Praxis eine unrealistische Annahme ist), dann ist  $CI = 1$ . Der CI-Wert ist bei gleicher Anzahl von Homoplasien von der Anzahl der Taxa, der Merkmale sowie den vorhandenen Autapomorphien abhängig und daher aus rein methodischer Sicht kein gutes Maß (Wägele, 2000). Der Konservierungsindex [engl. „Retention Index“ (RI)] ist, bezogen auf einen gegebenen Datensatz, ein Maß für die Menge an potentiellen Synapomorphien, die in einer konstruierten Topologie erhalten bleiben; je mehr Analogien und desto weniger Homoplasien vorkommen, desto geringer wird auch der RI-Wert.

## C Ergebnisse

### C.1 Methodischer Teil

#### C.1.1 DNA-Isolation

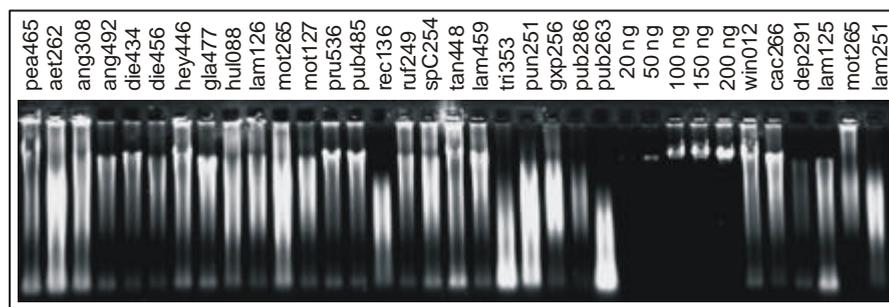
Die überwiegende Anzahl der DNA-Proben wurde aus mit Silicagel getrocknetem Material isoliert. Dabei wurde standardmäßig die in Abschnitt B.2.2 beschriebene CTAB-Methode verwendet. Die besten Ergebnisse in Form von hochmolekularer DNA in ausreichender Menge wurden mit relativ frisch getrocknetem Material erzielt (ca. vier bis acht Wochen alt). Trotz gleicher Behandlung der verschiedenen Blattproben waren die erzielten Ergebnisse recht unterschiedlich (siehe Abbildung 1 und Tabelle 5).

**Tabelle 5: Auswertung der DNA-Isolation.** Die Zahlen geben die Anzahl der durchgeführten Isolation für die einzelnen Arten an. Als positiv (pos) wurde DNA eingestuft, die sowohl hochmolekular als auch in ausreichender Menge (bezogen auf das eingesetzte Blattgewicht) isoliert wurde. Alle Proben, für die entweder das eine oder das andere Kriterium nicht zutrifft, wurden als negativ (neg) eingestuft. Dan *M. bancana* und *M. velutina* teilweise synonym verwendet werden, wurde in einer Zeile die Ergebnisse beider Arten zusammengefasst (*M. ban/vel*)

Art	S	pos	%	neg	%	S	pos	%	neg	%	
<i>M. aetheadenia</i>	10	9	90%	1	10%	<i>M. motleyana</i>	40	40	100%	0	0%
<i>M. angulata</i>	10	9	90%	1	10%	<i>M. pearsonii</i>	7	6	86%	1	14%
<i>M. ashtonii</i>	1	0	0%	1	100%	<i>M. petanostyla</i>	3	3	100%	0	0%
<i>M. bancana</i>	41	33	80%	8	20%	<i>M. pruinosa</i>	6	3	50%	3	50%
<i>M. ban/vel</i>	60	45	75%	15	25%	<i>M. puberula</i>	4	3	75%	1	25%
<i>M. beccariana</i>	7	4	57%	3	43%	<i>M. puncticulata</i>	13	11	85%	2	15%
<i>M. caladiifolia</i>	3	2	67%	1	33%	<i>M. recurvata</i>	10	0	0%	10	100%
<i>M. calcicola</i>	2	1	50%	1	50%	<i>M. rostrata</i>	3	2	67%	1	33%
<i>M. conifera</i>	5	5	100%	0	0%	<i>M. rufescens</i>	2	2	100%	0	0%
<i>M. curtisii</i>	4	4	100%	0	0%	<i>M. sarcocarpa</i>	3	3	100%	0	0%
<i>M. depressa</i>	19	8	42%	11	58%	<i>M. spec. A</i>	4	3	75%	1	25%
<i>M. diepenhorstii</i>	2	2	100%	0	0%	<i>M. spec. B</i>	4	2	50%	2	50%
<i>M. gigantea</i>	16	13	81%	3	19%	<i>M. spec. C</i>	3	3	100%	0	0%
<i>M. glandibracteolata</i>	7	7	100%	0	0%	<i>M. spec. D</i>	1	0	0%	1	100%
<i>M. griffithiana</i>	16	16	100%	0	0%	<i>M. tanarius</i>	7	5	71%	2	29%
<i>M. havilandii</i>	2	2	100%	0	0%	<i>M. trachyphylla</i>	3	3	100%	0	0%
<i>M. heynei</i>	2	2	100%	0	0%	<i>M. triloba</i>	9	6	67%	3	33%
<i>M. hosei</i>	9	9	100%	0	0%	<i>M. umbrosa</i>	8	8	100%	0	0%
<i>M. hullettii</i>	25	19	76%	6	24%	<i>M. velutina</i>	19	12	63%	7	37%
<i>M. hypoleuca</i>	23	11	48%	12	52%	<i>M. winkleri</i>	11	11	100%	0	0%
<i>M. indistincta</i>	11	10	91%	1	9%	<i>M. winkleriella</i>	3	2	67%	1	33%
<i>M. lamellata</i>	17	13	76%	4	24%	Total	333	256	76%	77	24%

Von einigen Arten lieferten alle Individuen intakte DNA, auch bei nicht optimaler Lagerung des Blattmaterials (z.B. *M. motleyana*, *M. griffithiana*). Bei anderen Arten hingegen waren DNA-Qualität oder -Ausbeute trotz Verwendung frischen Blattmaterials

überwiegend unbefriedigend (z.B. *M. depressa* und *M. recurvata*). Aus Probenmaterial von *M. recurvata* konnte in keinem Fall hochmolekulare DNA isoliert werden. Besonders unbefriedigend fielen auch die Ergebnisse mit Herbarproben aus, aus denen meist schon nach zwei bis drei Jahren keine sichtbare DNA mehr isoliert werden konnte. Auch Versuche mit anderen DNA-Isolationsmethoden [z.B. mit der SDS-Methode von (Jobes *et al.*, 1995)] oder einer Variation der CTAB-Methode, bei der die Blätter zunächst in 100% Ethanol aufgenommen werden, um schädigende Enzyme zu hemmen (Adams *et al.*, 1999), erbrachten keine Verbesserung (Ergebnisse nicht dargestellt). Von den Herbarproben konnten letztlich für die Chloroplasten-Phylogenie nur *M. coriaceae* und *M. suwo* eingesetzt werden, deren DNAs mit Hilfe der CTAB-Methode und einem anschließenden Reparaturschritt (siehe Kapitel B.2.2) isoliert wurden. Für die *atpB-rbcL*-Analyse wurden die Proben aber nicht eingesetzt, da eine Amplifikation des vollständigen Fragmentes nicht möglich war.



**Abbildung 2:** Typisches Ergebnis einer CTAB-DNA-Isolation verschiedener *Macaranga* –Arten nach Auftrennung auf 0,8 %igem Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Die Proben sind mit ihren ID-Nummern gekennzeichnet. Siehe hierzu Tabelle 2. Als Mengen-Standard wurde  $\lambda$ -DNA in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (Angaben in ng).

## C.1.2 Etablierung und Optimierung der AFLP-Analyse bei *Macaranga*

Bevor mit der eigentlichen AFLP-Analyse der myrmekophytischen *Macaranga* -Arten begonnen werden konnte, musste die Methode im Labor etabliert und ihre Reproduzierbarkeit innerhalb der Gattung *Macaranga* bestimmt werden. Nach der Optimierung der Versuchsbedingungen wurde die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf verschiedenen Ebenen untersucht.

### C.1.2.1 Restriktion und Ligation

Der erste Schritt der AFLP-Analyse ist die Restriktion der Gesamt-DNA, von deren Gelingen im hohen Maße die spätere Interpretierbarkeit der gewonnenen Daten abhängig ist (Vos *et al.*, 1995). Zur Erzeugung reproduzierbarer AFLP-Bandenmuster muss die Ausgangs-DNA sowohl sauber als auch halbwegs hochmolekular sein. Um unspezifische oder falsche Ergebnisse zu vermeiden, wurden daher grundsätzlich nur Proben verwendet, aus denen hochmolekulare DNA gewonnen werden konnte. *Macaranga recurvata* war auf Grund der durchweg negativen Isolationsergebnisse die einzige Art, die daher nicht in die AFLP-Analyse mit einbezogen werden konnte, obwohl die ursprüngliche Zuordnung dieser Art zur Sektion *Pachystemon* (Whitmore, 1974) das wünschenswert gemacht hätte.

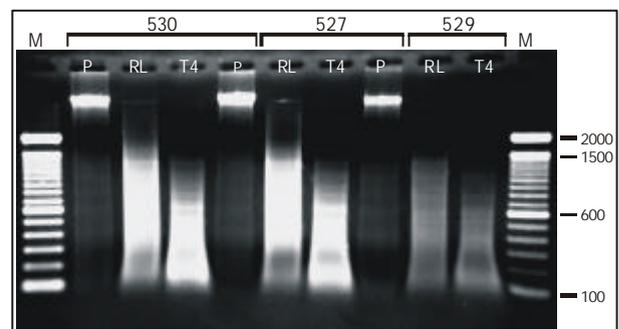
Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, dass auch hochmolekulare DNA-Proben nicht immer gut von den verwendeten Restriktionsenzymen verdaut wurden (Tabelle 6). Zwei Proben ließen sich im ersten Versuch gar nicht verdauen und 27 Proben nur unvollständig. Als unvollständig verdaut wurden solche Proben angesehen, bei denen das durchschnittliche Molekulargewicht des auf dem Agarosegel erkennbaren DNA-„Schmiers“ deutlich höher war als bei den restlichen Arten, und/oder noch DNA im hochmolekularen Bereich enthielt. Besonders häufig traten solche Probleme bei DNA-Proben von *M. sarcocarpa*, *M. umbrosa*, *M. bancana*, *M. velutina* und *M. winkleriella* auf. Bei allen unvollständig verdauten Proben wurden erneut Restriktionsenzyme hinzugefügt und für weitere 2-4 Stunden inkubiert. Im Fall von *M. sarcocarpa*, *M. triloba* und *M. winkleriella* wurde nach einer weiteren Aufreinigung eine zweite Restriktion durchgeführt, die dann letztlich zu einem positiven Ergebnis führte.

**Tabelle 6: Ergebnisse der Restriktion verschiedener *Macaranga*-DNAs.** Die Zahlen geben die Anzahl der mit der jeweiligen Art durchgeführten Restriktionen an. Als negativ (neg) wurden Proben eingestuft, deren DNA unvollständig oder gar nicht verdaut wurde.

Art	S	neg	%		S	neg	%
<i>M. aetheadenia</i>	10	1	10%	<i>M. lamellata</i>	8	1	13%
<i>M. angulata</i>	14	0	0%	<i>M. motleyana</i>	18	1	6%
<i>M. ashtonii</i>	1	0	0%	<i>M. pearsonii</i>	9	0	0%
<i>M. bancana</i>	24	7	29%	<i>M. petanostyla</i>	4	0	0%
<i>M. beccariana</i>	3	0	0%	<i>M. pruinosa</i>	2	0	0%
<i>M. caladiifolia</i>	4	0	0%	<i>M. puberula</i>	5	0	0%
<i>M. calcicola</i>	4	0	0%	<i>M. puncticulata</i>	10	1	10%
<i>M. conifera</i>	2	0	0%	<i>M. rostrata</i>	3	0	0%
<i>M. costulata</i>	1	0	0%	<i>M. rufescens</i>	2	0	0%
<i>M. curtisii</i>	4	1	25%	<i>M. sarcocarpa</i>	7	4	57%
<i>M. depressa</i>	11	0	0%	<i>M. spec. A</i>	2	0	0%
<i>M. diepenhorstii</i>	2	0	0%	<i>M. spec. B</i>	3	0	0%
<i>M. gigantea</i>	4	0	0%	<i>M. spec. C</i>	1	0	0%
<i>M. gigantea/pruinosa</i>	1	0	0%	<i>M. spec. D</i>	2	0	0%
<i>M. glandibracteolata</i>	9	1	11%	<i>M. tanarius</i>	2	0	0%
<i>M. griffithiana</i>	7	0	0%	<i>M. trachyphylla</i>	3	0	0%
<i>M. havilandii</i>	3	0	0%	<i>M. triloba</i>	12	1	8%
<i>M. heynei</i>	1	0	0%	<i>M. umbrosa</i>	11	3	27%
<i>M. hosei</i>	8	1	13%	<i>M. velutina</i>	10	2	20%
<i>M. hullettii</i>	22	2	9%	<i>M. winkleri</i>	2	0	0%
<i>M. hypoleuca</i>	7	0	0%	<i>M. winkleriella</i>	5	2	40%
<i>M. indistincta</i>	12	1	8%	Total	275	29	11%

Restriktion und Ligation sollten aus ökonomischen Gründen im gleichen Reaktionsschritt durchgeführt werden. Daher war es wichtig, dass der eingesetzte Puffer sowohl für das Restriktionsenzym als auch für die Ligase geeignet ist. In einem ersten Versuch wurde der mitgelieferte Puffer der T4-Ligase im Vergleich zu dem von (Debener und Mattiesch, 1999) empfohlenen Restriktions-Ligations-Puffer (RL-Puffer) überprüft. Die Restriktion wurde für 4 Stunden mit den beiden Enzymen *MseI* und *HindIII* durchgeführt. Im Gegensatz zu *EcoRI* weist *HindIII* unter suboptimalen Bedingungen keine unspezifische Aktivität („star activity“) auf und wurde deshalb generell als 6-Cutter für den Restriktionsschnitt verwendet.

**Abbildung 3: Effizienz des Restriktions-Ligationsschritts: Vergleich des T4-Puffers mit dem RL-Puffer.** Es wurden drei verschiedene *Macaranga*-Proben zu Vergleichszwecken herangezogen (v.l.n.r. *M. bancana* 530, *M. motleyana* 527, *M. hosei* 529). Bei allen drei Proben handelt es sich um Frischmaterial aus dem Gewächshaus. P ist die unverdaute DNA-Probe. Als Größenstandard M wurde die 100 bp-Leiter von GibcoBRL aufgetragen.



Es sind deutliche Unterschiede im Grad der Verdauung zu erkennen (Abbildung 3). Bei Verwendung des T4-Puffers erfolgt die Verdauung nach einer Inkubationszeit von 4 h

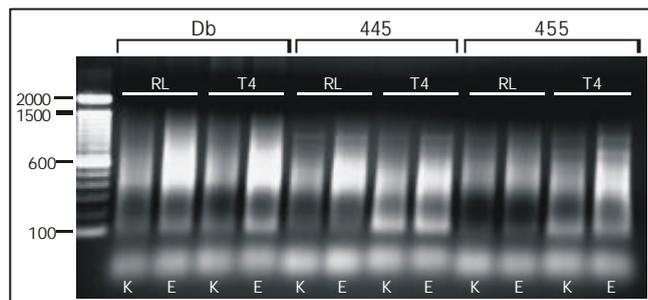
offenbar effektiver. Die Größe der sichtbaren Restriktionsfragmente beträgt nur noch zwischen 100 und 600 bp, im Gegensatz zu 300 bis 1300 bp beim Verdau mit dem RL-Puffer. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 17 h führte anscheinend zu einer vollständigen Verdauung in beiden Puffern. Auch in der anschließenden Amplifikation konnten keine Unterschiede festgestellt werden. In allen weiteren Versuchen wurde daher, sofern nicht anders angegeben, der Restriktions-Ligationsansatz für 17 h mit dem RL-Puffer inkubiert.

Neben den *Macaranga*-Proben wurde in die weiteren Optimierungsversuche auch eine Probe der Yamswurz (*Dioscorea bulbifera*; Dioscoreaceae) als Positivkontrolle einbezogen.

### C.1.2.2 Präamplifikation

Zur Beurteilung des Erfolgs der Restriktion/Ligation reicht es nicht aus, sich die entsprechenden Produkte auf einem Agarosegel anzuschauen. Es ist auch nötig, die verdaute DNA einer Präamplifikation und einer selektiven Amplifikation zu unterziehen. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Präamplifikationen so durchgeführt wie im Kapitel B.2.5.2 beschrieben.

**Abbildung 4: Ergebnis der Präamplifikation mit unterschiedlichen Restriktionsansätzen.** Bei den Proben handelt es sich um *Dioscorea bulbifera* (Db), *M. triloba* 445 und *M. bancana* 455 (v.l.n.r.). Die Amplifikation wurde DNA durchgeführt, wo bei der Vorbehandlung RL- bzw. T4-Ligase-Puffer verwendet wurde, wobei Restriktion und Ligation entweder nacheinander (E) oder kombiniert (K) durchgeführt wurden. Größenstandard ist die 100 bp-Leiter von Gibco-BRL.



Zunächst wurde der Einfluss der beiden Restriktions- und Ligationspuffer auf die Ergebnisse der Präamplifikation überprüft. Dazu wurde eine Präamplifikation mit DNA-Proben durchgeführt, die entweder nacheinander verdaut und ligiert wurden oder aber kombiniert im gleichen Ansatz (siehe oben). Auf der Abbildung 4 ist zu erkennen, dass die Ausbeute an Präamplifikationsprodukten bei der getrennten Durchführung von Restriktion und Ligation etwas höher ist. Ein Einfluss der Puffer ist auf dieser Ebene kaum zu erkennen. Bei einer testweise durchgeführten selektiven Amplifikation traten zwischen den hier verglichenen Varianten keine Unterschiede auf (Ergebnisse nicht gezeigt). Für alle weiteren Versuche wurden daher Restriktion und Ligation standardmäßig im gleichen Ansatz durchgeführt.

#### C.1.2.2.1 Einfluss von PCR-Additiven auf die Präamplifikation

Da einige Proben bei den ersten Versuchen nicht verlässlich amplifizierten, wurde mit Hilfe von diversen Additiven versucht, die Störfaktoren auszuschalten bzw. die Signale zu verstärken. Der Präamplifikation wurde zu diesem Zweck DMSO in einer Konzentration von 1 % oder TMAC in einer Konzentration von 25mM hinzugefügt. Der Versuch wurde wahlweise mit 2,5 bzw. 5 µl verdauter DNA ausgeführt. Bei der Auswertung der Präamplifikation konnten keine gravierenden Unterschiede zwischen der Standard-PCR und der PCR mit TMAC bzw. DMSO festgestellt werden. Auch zwischen der Zugabe von

2,5 oder 5  $\mu$ l DNA war kein Unterschied erkennbar. Da der Einfluss der beiden Additive auf die selektive Amplifikation eher negativ war (s.u. und Abbildung 5), wurde bei den weiteren Versuchen auf ihren Einsatz verzichtet.

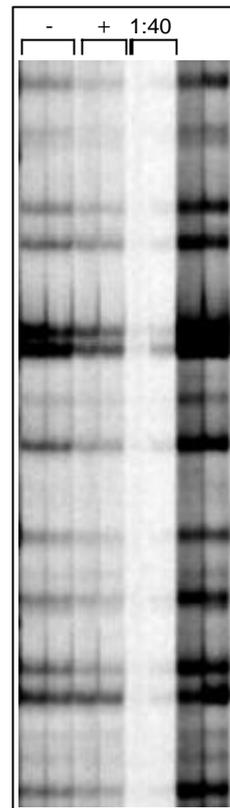
#### C.1.2.2.2 Einfluss von Thermocycler und Heizrate auf die Präamplifikation

Als nächstes wurde der Einfluss des Heizverhaltens der Thermocycler auf die Ergebnisse der Amplifikation überprüft, da das Originalprotokoll von Vos *et al.* (1995) zu einem Zeitpunkt entwickelt wurde, als es noch keine Thermocycler mit schnellen Heizraten gab. Ein gegebener Präamplifikationsansatz wurde dazu in zwei Hälften geteilt. Mit der einen Hälfte wurde die PCR in dem iCycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt, die andere Hälfte wurde in dem PE 2400 (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, USA) amplifiziert. Bei dem iCycler handelt es sich um ein sehr schnell heizendes (bis 5  $^{\circ}$ C/s) und abkühlendes (3  $^{\circ}$ C/s) Gerät. Das ältere Gerät von Perkin Elmer heizt und kühlt hingegen lediglich mit einer Rate von 0,8  $^{\circ}$ C/s. Bei diesen Versuchen konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den mit beiden Thermocyclern erhaltenen Ergebnissen festgestellt werden.

#### C.1.2.3 Selektive Amplifikation

Bevor die selektive Amplifikation nach dem im Kapitel B.2.5.3 aufgeführten Schema ausgeführt werden konnte, waren verschiedene Pilotversuche erforderlich. Ausgangspunkt war das Protokoll von Debener und Mattiesch (1999), bei dem (1) die eingesetzte Menge an DNA gegenüber dem Originalprotokoll von Vos *et al.* (1995) auf 250 ng reduziert wird, und (2) *EcoRI* anstelle von *HindIII* als 6-Cutter eingesetzt wird. Da die Fragmente auf dem LI-COR-Sequenzierer Global IR<sup>2</sup> aufgetrennt wurden, konnten in den meisten Fällen zwei verschiedene *HindIII*-Primer im gleichen Reaktionsansatz verwendet

**Abbildung 5: Ergebnis der selektiven Amplifikation nach Zusatz von 1% DMSO und 25 mM TMAC in der Präamplifikation.** Der Versuch wurde mit *M. hosei* 529 sowie den Primern *HindACA* und *MseACG* durchgeführt. Die Fragmente wurden auf einem 25 cm-Gel aufgetrennt. Die ersten sechs Bahnen zeigen das Ergebnis einer Amplifikation mit Hot Start-PCR. Die Versuche mit TMAC und DMSO sind mit „+“, die ohne Zusatz mit „-“ gekennzeichnet. Jeweils bei der ersten von zwei benachbarten Bahnen wurden 5  $\mu$ l verdaute DNA für die Präamplifikation eingesetzt, bei der zweiten Bahn nur 2,5  $\mu$ l. Bei den Bahnen 5 und 6 wurde dieselbe Präamplifikationsreaktion verwendet, aber statt einer 20-fachen eine 40-fache Verdünnung für die selektive Amplifikation verwendet. Bei den letzten beiden Bahnen handelt es sich um eine Amplifikationsreaktion, die ohne Hot Start durchgeführt wurde. Bahn 7 zeigt das Ergebnis mit getrennter Restriktion und Ligation, Bahn 8 das mit einer Kombination der beiden Reaktionen erhaltene Ergebnis.

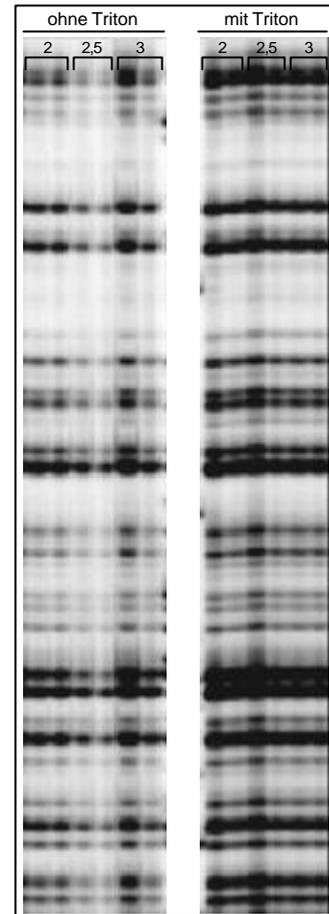


werden. Einer der beiden Primer wurde mit IRDye700, der andere mit IRDye800 markiert. Nur in einem Fall wurde durch die Kombination zweier Vorwärtsprimer die Amplifikation mit einem der beiden Primer vollständig verhindert. Hier wurde die selektive Amplifikation in Einzelreaktionen durchgeführt, die Proben wieder zusammengeführt und gemeinsam auf das Gel aufgetragen.

### C.1.2.3.1 Einfluss von PCR-Additiven und Hot Start-PCR auf die selektive Amplifikation

Wie schon weiter oben angeführt, wurde ausgewählten Präamplifikationsreaktionen 1 % DMSO und 25 mM TMAC zugegeben. Um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, wurde die selektive Amplifikation außerdem in Form einer „Hot Start-PCR“ durchgeführt. Die Produkte der Präamplifikation wurden außerdem sowohl in einer 20- als auch einer 40-fachen Verdünnung für die Amplifikation eingesetzt. Während in der Präamplifikation keine Unterschiede zu erkennen waren (s. o.), zeigten die Additive bei der selektiven Amplifikation eine gravierende Wirkung. In der Abbildung 5 wird deutlich, dass der Zusatz von TMAC und DMSO einen eher negativen Einfluss auf die Bandenintensität hat, das gleiche gilt für den Einsatz einer „Hot Start“-PCR. Die besten Ergebnisse wurden ohne TMAC und DMSO in der Präamplifikationsreaktion und ohne Hot Start während der selektiven Amplifikation erzielt. Ob dabei Restriktion und Ligation getrennt (Bahn 7) oder kombiniert (Bahn 8) durchgeführt wurden, hat keinen sichtbaren Einfluss. Schwächere Banden ergaben sich auch, wenn die Präamplifikationsprodukte in 40facher Verdünnung eingesetzt wurden.

**Abbildung 6: Ergebnisse der selektiven Amplifikation unter Zugabe von TritonX-100® in Abhängigkeit von verschiedenen Magnesiumchlorid-Konzentrationen.** Auf der linken Seite des Bildes sind die Ergebnisse der PCR ohne, auf der rechten Seite mit Triton X100® zu sehen. Als  $MgCl_2$ -Konzentrationen wurden 2mM , 2,5 mM oder 3mM eingesetzt



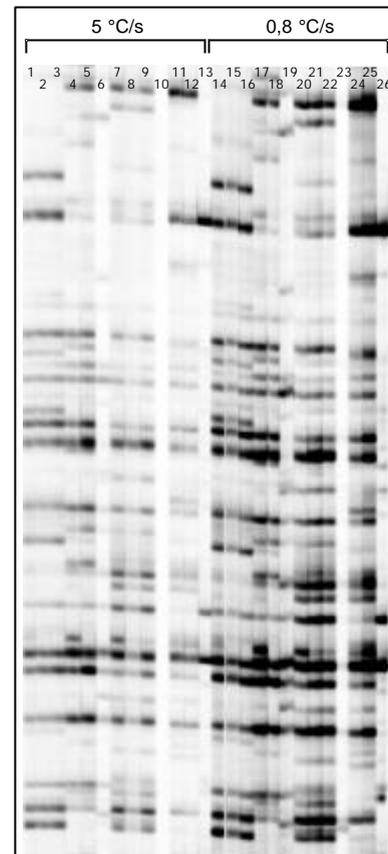
In einem weiteren Versuch wurde der Amplifikation das Detergens Triton X-100® (0,3 %) in Abhängigkeit von verschiedenen  $MgCl_2$ -Konzentrationen hinzugefügt. Auf Abbildung 6 wird deutlich, dass sich der Zusatz von Triton X-100® positiv auf die Bandenintensität auswirkt. Ein Einfluss von  $MgCl_2$  hingegen ist bei der gewählten geringen Konzentrationsspanne nicht zu erkennen. Für alle weiteren Versuche wurde 0,3 % Triton X-100® der selektiven Amplifikation zugesetzt.

### C.1.2.3.2 Einfluss der Thermocycler und Heizrate auf die selektive Amplifikation

Da im Labor unterschiedliche Thermocycler zur Verfügung standen, wurde nicht nur auf der Präamplifikationsebene, sondern auch für die selektive Amplifikation der Einfluss der Heiz- und Kühlrate untersucht. Ebenso wie der iCycler hat auch der Biometra T6-Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) ein schnelles Heizverhalten.

Zusätzlich wurde die Reproduzierbarkeit der Amplifikation mit verschiedenen DNA-Isolaten der gleichen Pflanzenprobe untersucht. Die Proben wurden nach einer gemeinsam durchgeführten Präamplifikation sowohl auf dem iCycler als auch auf dem PE 2400 amplifiziert. Für diese Experimente wurden jeweils drei verschiedene DNA-Proben aus vier unterschiedlichen Arten (*M. bancana* 348, *M. hullettii* 232, *M. motleyana* 155 und *M. spec. C* 014) verwendet (siehe Legende zur Abbildung 7).

**Abbildung 7: Selektive Amplifikation: Vergleich unterschiedlicher Thermocycler und Heizraten, sowie Reproduzierbarkeit der Bandenmuster aus unabhängigen DNA-Isolationen.** Der linke Teil des Bildes zeigt das Ergebnis der selektiven Amplifikation im Biorad iCycler mit einer Heizrate von 5°C/s, der rechte Teil das Ergebnis mit dem PE 2400 und einer Heizrate von 0,8°C/s. Amplifiziert wurden *M. bancana* 348 (Bahn 1, 2, 3, und 13, 14, 15) *M. hullettii* 232 (Bahn 4, 5, 6, und 16, 17, 18), *M. spec. C* 014 (7, 8, 9, und 19, 20, 21) und *M. motleyana* 155 (10, 11, 12, und 22, 23, 24). Die mit drei unabhängigen DNA-Isolationen aus der gleichen Pflanzenprobe erzielten Ergebnisse sind jeweils nebeneinander aufgetragen. Als Primer-Kombination wurde *Hind*III-ACA und *Mse*I-ACG verwendet. Auf Bahn 25 ist eine Probe aus einer vorangegangenen Amplifikation und Bahn 26 dient als Größenstandard.



Auf der Abbildung 7 sieht man einen deutlichen Unterschied der Banden-Intensitäten in Abhängigkeit von den Heizraten während der Amplifikation. Die Banden auf der linken Seite des Bildes, welche mit dem iCycler erzeugt wurden, sind insgesamt blasser als die Banden auf der rechten Seite (PE 2400). Weiterhin zeigt sich, dass auch die DNA-Isolation einen Einfluss auf die Amplifikation haben kann. Jeweils ein Parallelansatz bei *M. hullettii* 232 (Bahnen 6 und 18) und bei *M. motleyana* 155 (Bahnen 10 und 23) haben nicht einwandfrei funktioniert (siehe auch Kapitel C.1.2.4).

In einem weiteren Versuch wurde nun der Einfluss der Heizrate während der Präamplifikation auf das Ergebnis der selektiven Amplifikation und zugleich der Einfluss verschiedener Thermocycler mit ungefähr gleicher Heiz- bzw. Kühlrate auf die selektive Amplifikation untersucht. Hierzu wurden die gleichen Präamplifikate vergleichsweise entweder in dem PE 2400 oder in dem iCycler selektiv amplifiziert. Der iCycler wurde diesmal bei der selektiven Amplifikation auf eine Heizrate von 1 °C/s gestellt. Da die Kühlrate nicht verändert werden kann, blieb sie bei 3 °C/s.

Der Versuch ergab, dass die unterschiedlichen Heizraten während der Präamplifikation bei beiden Geräten keinen erkennbaren Einfluss auf das Endergebnis der selektiven Amplifikation hatten, ebenso wenig der Einsatz verschiedener Geräte. Alle weiteren

selektiven Amplifikationen wurden mit reduzierter Heizrate durchgeführt, während die Präamplifikation mit schneller Heizrate durchgeführt wurde.

### C.1.2.3.3 Selektive Amplifikation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Präamplifikationsprodukte

Einige DNA-Proben machten trotz aller vorangegangenen Optimierungen regelmäßig Schwierigkeiten bei der selektiven Amplifikation, wenn eine 20-fache Verdünnung der Präamplifikation verwendet wurde. Als mögliche Ursache wurde eine zu geringe Konzentration der Präamplifikationsprodukte vermutet. Es wurden daher selektive Amplifikationen mit unterschiedlichen Verdünnungen des Präamplifikationsansatzes durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass eine 10-fache Verdünnung mit TE-Puffer in den meisten Fällen zu einem besseren Ergebnis bei der selektiven Amplifikation führte als eine 20- oder 40-fache Verdünnung (Daten nicht dargestellt). In allen weiteren Versuchen wurde daher eine 10-fache Verdünnung der Präamplifikationsprodukte für die selektive Amplifikation eingesetzt. Nur einzelne Proben, in denen zu viele PCR-hemmende sekundäre Inhaltsstoffe enthalten waren, wurden in einer stärkeren Verdünnung verwendet.

### C.1.2.4 Reproduzierbarkeit

Jones *et al.* (1997) hatten in einer groß angelegten Studie zur Reproduzierbarkeit verschiedener molekularer Markertechniken gezeigt, dass AFLPs generell sehr gut reproduzierbar sind. Trotzdem wurde zu Beginn der vorliegenden Studie an *Macaranga* der Grad der Reproduzierbarkeit auf verschiedenen Ebenen untersucht. Erstens wurden die aus verschiedenen, unabhängigen DNA-Isolationen aus der gleichen Pflanze erhaltenen Ergebnisse verglichen (siehe auch Abbildung 6). Zweitens wurde dieselbe DNA-Probe mehrfach unabhängig voneinander verdaut, ligiert und anschließend präamplifiziert. Drittens wurden dieselbe verdaute DNA-Probe mehrfach unabhängig präamplifiziert. Viertens schließlich wurde auch die Reproduzierbarkeit der selektiven Amplifikation bei gleichen Vorbedingungen überprüft.

**Abbildung 8: Reproduzierbarkeit der AFLP-Muster.** Dargestellt sind die Ergebnisse der selektiven Amplifikation aus verschiedenen DNA-Präparationen derselben Blattprobe (A), unterschiedlichen Restriktionsansätzen der selben DNA (B), unterschiedlicher Präamplifikation (C) und schließlich verschiedener selektiver Amplifikation sonst gleich behandelter Proben (D). Als Taxa wurde *M. bancana* 455, *M. motleyana* 155, *M. bancana* 348 und *M. hullettii* 232 und *M. spec.* C 014 verwendet. Als Primer-Kombination wurde *HindIII*-ACA und *MseI*-ACG verwendet.



Wie auf der Abbildung 8 zu erkennen ist, erwiesen sich die Bandenmuster auf allen getesteten Ebenen qualitativ als fast zu 100 % reproduzierbar. Die Banden sind allerdings z.T. unterschiedlich intensiv, was durch leichte Schwankungen bei der Amplifikation, durch unterschiedliche Mengen an eingesetzter DNA oder durch Ungenauigkeiten beim Auftragen auf das Gel bedingt sein kann. Wie im Kapitel C.1.2.3.2 schon angemerkt, können jedoch unterschiedliche DNA-Isolate zu unterschiedlich guten Ergebnissen führen, teilweise sogar zu einem totalen Ausfall. Alle für die eigentliche Studie zu verwendenden DNA-Proben sollten daher vorher sorgfältigst geprüft werden. Da Intensitätsschwankungen im Regelfall nur bei schwächeren Banden auftraten, wurden bei der Überführung der Bandenmuster in eine binäre Merkmalsmatrix nur Banden gewertet, die sowohl distinkt als auch stark waren (s.u.).

### C.1.2.5 Auswahl der Primer für die phylogenetische Studie

Nach der Etablierung und Optimierung der AFLP-Methode wurden acht *HindIII*-Primer und acht *MseI*-Primer in allen Kombination getestet (siehe Tabelle 7) und die vielversprechendsten Primer-Kombinationen für die AFLP-Analyse der myrmekophytischen Sektionen von *Macaranga* ausgewählt. Wichtigstes Auswahlkriterium war die Erzeugung einer hinreichenden Anzahl distinkter, im richtigen Grade polymorpher Banden. Alle *HindIII*-Primer besaßen ein Adenin als erste selektive Base, bei den *MseI*-Primern wurden vier Primer mit Adenin und vier Primer mit Cytosin als erste selektive Base getestet. Generell wies jeder Primer drei selektive Basen am 3'-Ende auf. Banden wurden als distinkt angesehen, wenn sie eine gewisse Mindestintensität aufwiesen und die Zuordnung zu einer bestimmten Gelposition (= Laufweite) klar erkennbar war. Der Polymorphiegrad wurde dann als geeignet angesehen, wenn die Unterschiede innerhalb einer Art nicht zu zahlreich waren, zwischen den Arten jedoch genügend Variation auftrat. Die  $8 \times 8 = 64$  Primerkombinationen wurden an verschiedenen *Macaranga*-Arten der Sektion *Pachystemon* getestet. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Arten als auch unterschiedliche Akzessionen der gleichen Art untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Anzahl der Banden und ihr Größespektrum variierte dabei erheblich, ebenso wie die Möglichkeit der Abgrenzung distinkter Banden.

HindIII/MseI	AAC	AAG	ACG	AGC	CAA	CAC	CGA	CTA
AAC	mäßig	mangelhaft	mangelhaft	mäßig	mäßig	<b>gut</b>	mäßig	mangelhaft
AAG	<b>gut</b>	mäßig	mangelhaft	mäßig	mangelhaft	mangelhaft	mäßig	<b>gut</b>
ACA	mangelhaft	mangelhaft	mäßig	mangelhaft	mäßig	<b>gut</b>	mäßig	<b>gut</b>
ACC	mangelhaft	mäßig	mangelhaft	mäßig	mangelhaft	<b>gut</b>	mangelhaft	mangelhaft
ACG	mangelhaft	mangelhaft	mangelhaft	mäßig	mangelhaft	gut	mangelhaft	mangelhaft
ACT	mangelhaft	mangelhaft	mäßig	mangelhaft	mangelhaft	mangelhaft	mangelhaft	<b>gut</b>
AGC	mangelhaft	mäßig	mangelhaft	mangelhaft	mäßig	<b>gut</b>	mäßig	mäßig
AGG	mangelhaft	mangelhaft	mangelhaft	mangelhaft	mäßig	mäßig	mangelhaft	mäßig

**Tabelle 7: Evaluation der 64 AFLP-Primer-Kombinationen mit Hilfe von 12 *Macaranga* Taxa.** Die fett markierten Primerkombinationen wurden für die Hauptuntersuchungen eingesetzt.

Die maximale Größe der selektiven PCR-Amplifikate schwankte je nach Primerkombination zwischen ca. 230 bp (*HindIII*-ACG/*MseI*-ACA) und 750 bp (*HindIII*-ACC/*MseI*-CTA, *HindIII*-AAG/*MseI*-CAC). Die Anzahl der auswertbaren Banden variierte von 31 (*HindIII*-ACG/*MseI*-ACA) bis 90 (*HindIII*-ACC/*MseI*-CAC). Von den 64

Primerkombinationen erzeugte etwa die Hälfte hinreichend aufgelöste Bandenmuster. Die Qualität der Muster wurde in Kategorien eingeteilt, die von „gut“ bis „mangelhaft“ reichten. Während bei den *MseI*-Primern mit Adenin als erster selektiver Base nur eine Primer-Kombination als gut eingestuft wurde (3 %), 21 Kombinationen hingegen als mangelhaft (66 %), wurden mit dem *MseI*-Primer mit Cytosin als erster selektiver Base acht Kombinationen als gut (25 %) und nur 13 als mangelhaft eingestuft (40 %). Als bester Kombinationspartner ist der Primer *MseI*-CAC zu erkennen, fünf von acht Kombinationen, an denen dieser Primer beteiligt war, lieferten ein gutes Ergebnis (63 %). Für die eigentliche phylogenetische Studie wurden acht Primerkombinationen ausgewählt (s. Tabelle 7), die allesamt als gut eingestuft wurden.

#### C.1.2.6 Auswahl der DNA-Proben für die phylogenetische Studie

Insgesamt wurden im Laufe der Vorversuche 275 DNA-Proben von 231 verschiedenen *Macaranga*-Proben verdaut, präamplifiziert und selektiv amplifiziert. Davon wurden letztlich 120 Proben aus 43 *Macaranga*-Arten und 5 unbeschriebenen Morphospezies für die AFLP-Analyse der myrmekophytischen Sektionen ausgewählt (siehe Tabelle 2). Das wichtigste Auswahlkriterium war, möglichst alle Arten dieser Sektionen in die Studie einzubeziehen. Darüber hinaus sollten von weit verbreiteten Arten möglichst Aufsammlungen aus verschiedenen geographischen Regionen untersucht werden.

Mit einigen Arten wurden fast immer gute Ergebnisse erzielt, bei anderen ergaben sich überdurchschnittlich oft schlechte Bandenmuster. Die Arten der Sektion *Pruinosae* ließen sich meist besser amplifizieren als die der Sektion *Pachystemon*. Innerhalb von *Pachystemon* fielen besonders positiv die Mitglieder der *umbrosa*- und *hypoleuca*-Gruppe auf, ebenso wie *M. motleyana* und *M. trachyphylla* aus der *bancana*-Gruppe. Innerhalb der *bancana*-Gruppe traten aber auch die meisten Proben mit überwiegend schlechten Bandenmustern auf; hierzu zählen *M. depressa f. strigosa* (70 % aller Amplifikationen negativ), *M. depressa f. glabra* (40% negativ), *M. glandibracteolata* (40 % negativ) und *M. puncticulata* (50 % negativ). Dieses Ergebnis ließ sich nicht verbessern, trotz diverser Versuche die DNA-Reinigung und die PCR-Bedingungen zu optimieren.

Alle 120 letztlich ausgewählten Proben hatten im Rahmen der Etablierung der AFLP-Methode klare und distinkte Banden erzeugt. Im Laufe der eigentlichen Studie stellte sich jedoch heraus, dass dies nicht für alle Proben und alle Primerkombinationen der Fall war. Aus diesem Grund mussten 12 weitere Proben im Nachhinein aus der Wertung ausgeschlossen werden. Demnach konnten nur 108 Proben in die endgültige AFLP-Analyse einbezogen werden. Bei einigen Proben gelegentlich auftretende, undeutliche Bandenpositionen wurden bei der Auswertung der entsprechenden Primerkombination mit einer „4“ codiert („missing data“; s. a. Kapitel B.2.7.1.1). Der Einfluss auf die Topologie der Bäume war vernachlässigbar.

### C.1.3 Pilotstudien zur Charakterisierung informativer Chloroplasten-Regionen

Zu Beginn der Untersuchung wurden 12 nichtkodierende Chloroplasten-Regionen ausgewählt (siehe Tabelle 3) und in der Literatur beschriebene universelle Primerpaare auf ihre Funktionstüchtigkeit innerhalb von *Macaranga* überprüft. Neben intergenischen Regionen („spacer“) wurden auch drei Introns mit in diese Voruntersuchungen einbezogen. Für die Tests wurde zunächst ein kleines Set aus jeweils mindestens fünf DNA-Proben aus unterschiedlichen Sektionen zusammengestellt. In einige Voruntersuchungen wurde auch eine *Mallotus*-Probe einbezogen. Mit den Primern für die Loci *trnS-trnG* und *ndhD-ndhE* (Xu *et al.*, 2000) konnten innerhalb der Gattung *Macaranga* im ersten Anlauf keine Amplifikate erzeugt werden; die betreffenden Loci wurden daraufhin nicht weiter untersucht.

#### C.1.3.1 Der *psbB-psbH*-Spacer

Für die Pilotstudie zur Amplifikation des *psbB-psbH*-Spacers wurden die DNA-Proben *M. aëtheadenia* 228, *M. spec. C* 21, *M. gigantea* 828, *M. pruinosa* 092, *M. winkleri* 012, *M. lowii* 225, *Mallotus floribundus* 333 und *Mallotus paniculatus* 334 ausgewählt. Die Amplifikation funktionierte mit allen Proben gut und ohne nennenswerte Nebenprodukte (ohne Abbildung). Die Fragmentgröße betrug ca. 690 bp, auch bei *Mallotus*. Auf dem ABI-Sequenzierer konnten Sequenzen mit einer Leseweite von 280 bis 420 bp erhalten werden. Die Variabilität zwischen den sechs untersuchten Taxa (*M. aëtheadenia* 228, *M. spec. C* 21, *M. winkleri* 12, *M. lowii* 225, *Mallotus floribundus* 333 und *Mallotus paniculatus* 334) war jedoch äußerst gering - lediglich zur Abgrenzung *Mallotus/Macaranga* konnten fünf mehr oder weniger gesicherte Punktmutationen identifiziert werden. Des Weiteren wurde ein Indel in Form einer „AATA“-Duplikation gefunden. Der AT-Gehalt des sequenzierten Abschnitts betrug etwa 60 %. Ein Versuch, weitere *Macaranga*-Arten im Rahmen einer Diplomarbeit auf ihre Variation im *psbB-psbH*-Spacers hin zu untersuchen, musste aus technischen Gründen abgebrochen werden (Heidsieck, 2002). Für die phylogenetische und phylogeographische Untersuchung wurde dieser Locus daher nicht in Betracht gezogen.

#### C.1.3.2 Das *rps16*-Intron

Die Amplifikation des *rps16*-Introns erzeugte bei *M. aëtheadenia* 228, *M. spec. C* 21, *M. pruinosa* 92 und *M. gigantea* 828 klare Banden von etwa 1000 bp, bei *M. winkleri* von etwa 900 bp Größe. Erfolgreich sequenziert werden konnten im Rahmen der Vorversuche aber nur *M. aëtheadenia* 228, *M. spec. C* 21 und *M. winkleri* 12, die Leseweite betrug nur 280 bis 425 bp. Der „AT“-Gehalt lag ebenfalls bei etwa 60 %. Es wurden keine gesicherten Mutationen für den Locus in den lesbaren Bereichen entdeckt, weshalb er von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde.

#### C.1.3.3 Die *trnT-trnL*- und *trnL-trnF*-Spacer sowie das *trnL*-Intron

Die von den sogenannten „Taberlet“-Primern eingerahmte *trnT-trnL-trnF*-Region (Taberlet *et al.*, 1991) wurde in mehreren *Macaranga*-Arten aus den drei myrmekophytischen Sektionen sowie zwei *Mallotus*-Arten auf ihre Amplifizierbarkeit und eventuelle Variabilität untersucht. Nach Auftrennung der PCR-Produkte auf Agarose-Gelen zeigte der Bereich zwischen *trnT* und *trnL* bei allen Proben eine Größe von etwa

550 bp, und bei *trnL-trnF* von etwa 500 bp. Die Größe des *trnL*-Introns variierte von etwa 600 bp (*M. winkleriella* 396), über 610 bp (*Pachystemon* und *Pruinosae*-Proben), 640 bp (*M. winkleri*, *M. lowii* 225, *Mallotus floribundus* 333 und *Mallotus paniculatus* 334) bis zu 670 bp (*M. winkleri* 12)

Der *trnL-trnF*-Spacer wurde in insgesamt sechs Taxa ansequenziert, wobei die Leseweite zwischen 170 bp (*M. lowii* 225) und 400 bp (*M. griffithiana* 74) schwankte. Zur Abgrenzung *Macaranga/Mallotus* wurden fünf Punktmutationen detektiert. Innerhalb von *Macaranga* wurde ein großes Indel (21 bp) bei *M. aëtheadenia* 228 entdeckt. Es handelt sich hierbei um eine kurze Duplikation des angrenzenden Bereichs. Zwei Punktmutationen grenzten *M. lowii* 225 von den restlichen Proben ab.

Für das *trnL*-Intron wurden vier Sequenzen während der Pilotstudie untersucht. Die Variation, die in einem ca. 350 bp Sequenzabschnitt gefunden wurde, war äußerst gering. Lediglich zwei Punktmutationen wurden für die Abgrenzung *Macaranga/Mallotus* gefunden, eine Punktmutation trennte *M. hullettii* und *M. winkleri*. Der AT-Gehalt lag bei etwa 65 %.

Der Spacer zwischen *trnL* und *trnT* ließ sich in den Pilotstudien schwer sequenzieren, so dass nur max. ca. 300 bp gut lesbar waren. Die Variabilität dieses kurzen Sequenzbereichs war aber mit insgesamt fünf Punktmutationen und einem Indel wesentlich höher als die der anderen beiden „Taberlet“-Abschnitte, zumindest was die Abgrenzung von *Mallotus* und *Macaranga* betrifft. Hinzu kamen weitere vier Punktmutationen und ein Indel für Variationen innerhalb von *Mallotus*. Innerhalb von *Macaranga* war der Sequenzabschnitt hingegen mit Ausnahme eines variablen Mikrosatelliten-Locus monomorph.

Aufgrund der mangelnden Variabilität innerhalb der Gattung *Macaranga* wurden alle drei „Taberlet“-Loci von den weitergehenden Untersuchungen ausgeschlossen.

#### C.1.3.4 Der *psbA-trnH*-Spacer

Bei einer ersten Untersuchung der intergenischen Region zwischen *psbA* und *trnH* wurden mit allen untersuchten Templaten Amplifikate erhalten, deren Größe von 850 bp (Sektion *Winklerianae*) über 900 bp (Sektion *Pruinosae*) bis zu 950 bp reichte (Sektion *Pachystemon*). Auffallend hierbei sind vor allem die ausgedehnten AT-Bereiche und ein Gesamt-AT-Gehalt von wenigstens 70 % (GC-Gehalt nur ca. 15 %, der Rest unklar). Es wurden außerdem auf dem kurzen Stück vier Indels detektiert, die auch innerhalb der Sektion *Pachystemon* variabel sind. Neben den Indels befand sich ein Mikrosatellit mit einer Länge von sieben (*Pachystemon*) bzw. zehn (*M. winkleri*) Wiederholungseinheiten innerhalb des Spacers. Dieser Bereich wurde für die Chloroplasten-Analyse zunächst näher in Betracht gezogen; es wurden daher weitere Proben überwiegend aus der Sektion *Pachystemon* sequenziert. In den meisten Fällen traten hierbei Schwierigkeiten auf; nur einige Sequenzen konnten ausgewertet werden.

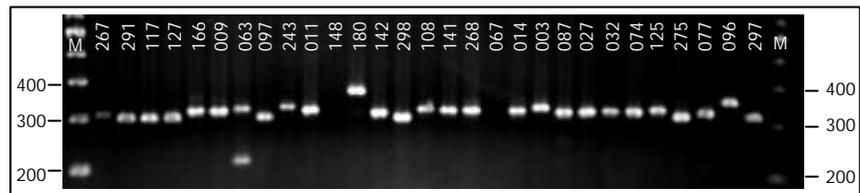
Für die phylogenetischen und phylogeographischen Untersuchungen konnte dieser Locus letztlich nicht verwendet werden, da er sich (1) nur schlecht amplifizieren und sequenzieren ließ und (2) aufgrund des hohen AT-Gehalts und der unüberschaubaren Fülle an Insertions- und Deletionsereignissen über große Bereiche hinweg kein eindeutiges Alignment möglich war.

### C.1.3.5 Der intergenische Bereich zwischen *trnQ* und *trnS* und der *ccmp2*-Locus

Der Bereich zwischen den Genen *trnQ* und *trnS* enthält neben nichtkodierenden Abschnitten auch zwei Gene, *psbK* und *psbI*. Ersteres ist ca. 300 bp von *trnQ* entfernt ist und etwa 160 bp lang. Das *psbI*-Gen ist ca. 300 bp von *psbK* entfernt, aber nur etwa 100 bp lang. Der Abstand zwischen *psbI* und *trnS* variiert bei verschiedenen Arten erheblich und beträgt durchschnittlich ca 200 bp (Quelle: www. ncbi.gov).

Im Rahmen einer Diplomarbeit (Heidsieck, 2002) wurde der Bereich zwischen *trnQ* und *trnS* für *Macaranga*-Arten aus unterschiedlichen Sektionen sequenziert und auf den Grad der Variabilität untersucht. Der Spacer zwischen *trnQ* und *psbK* wies 23 Punktmutationen auf, davon drei innerhalb der myrmekophytischen Arten und die Region zwischen *psbI* und *trnS* überwiegend Indels. Innerhalb der myrmekophytischen Arten wurden im Rahmen von Pilotstudien insgesamt acht variable Indels identifiziert. Bei der Region zwischen *psbI* und *trnS* handelt es sich auch den sogenannten *ccmp2*-Bereich, der häufig Mikrosatelliten enthält und für den universelle Primerpaare entwickelt wurde (Weising und Gardner, 1998). Der *ccmp2*-Vorwärtsprimer sitzt im Endbereich des *psbI*-Gens, der *ccmp2*-Rückwärtsprimer innerhalb des *trnS*-Gens. Die PCR mit diesen beiden Primern funktionierte meist problemlos und lieferte bei fast allen *Macaranga*-Proben distinkte Fragmente.

**Abbildung 9:** PCR-Produkte, die mit *ccmp2*-Primern aus verschiedenen *Macaranga*-Arten erhalten wurde. Zur Übersicht der eingesetzten Proben siehe Tabelle 2



Die Fragmentgrößen lagen mit einer Ausnahme in einer Größenordnung von ca. 300 bis 400 bp (Abbildung 9).

Da der gesamte Bereich zwischen *trnQ* und *trnS* zu groß war, um in einem Ansatz sequenziert zu werden und außerdem die Variabilität innerhalb der myrmekophytischen Arten im Großteil dieses Bereichs nur gering war, wurde für die weitergehenden Studien lediglich der kurze, AT-reiche Spacer (AT-gehalt 85 %) zwischen *psbI* und *trnS* verwendet („*ccmp2*“). Innerhalb dieses Bereichs konnten 14 Indels mit jeweils weniger als 10 bp identifiziert werden. Mit dem Hinzufügen weiter entfernter Arten war es nicht mehr in allen Fällen möglich, eine Homologisierung bestimmter Bereiche vorzunehmen, weswegen für die phylogenetische Analyse große variable Bereiche als ein Locus mit vielen Allelen angesehen und ausgewertet wurden (siehe Kapitel B.2.7.2.2). Punktmutation kommen mit einer Ausnahme ausschließlich beim Vergleich der *Pachystemon*-Arten mit den Außengruppen-Taxa oder der Sektion *Winklerianae* vor.

#### C.1.3.6 Der *ccmp6*-Locus: Mikrosatelliten-Hotspot im ersten *ycf3*-Intron

Auch der *ccmp6*-Locus enthält nach Studien von Weising und Gardner (1998) häufig Mikrosatelliten. Sowohl die Amplifikation des Bereichs mit dem universellen *ccmp6*-Primerpaar als auch die Sequenzierung funktionierten mit allen Arten problemlos. Das Alignment war 120 Basenpaare lang, und der AT-Gehalt lag bei etwa 75%, also niedriger als bei den zuvor besprochenen Loci. Aufgrund der geringen Länge und Variation ist der *ccmp6*-Bereich zwar nicht für eine phylogenetische Analyse, wohl aber für eine phylogeographische Auswertung nah verwandter Arten gut geeignet. Neben zwei Mikrosatelliten (beide Poly-T) enthält der Bereich auch ein Indel (siehe Tabelle im Anhang und elektronische Datei), mit dessen Hilfe die *bancana*-Gruppe aus Sabah in zwei separate Clades unterteilt wird und eine Punktmutation innerhalb der Sektion *Pruinosae*. Der erste Mikrosatellit variiert in der Anzahl der Wiederholungseinheiten zwischen T<sub>11</sub> und T<sub>15</sub>, der zweite zwischen T<sub>7</sub> und T<sub>12</sub>.

#### C.1.3.7 Der *atpB-rbcL*-Spacer

Die Region zwischen den Genen *atpB* und *rbcL* wurde nach den Vorversuchen als einer der interessanteren Loci ausgewählt und ebenfalls im Rahmen der Diplomarbeit von Michael Heidsieck (2002) auf Variabilität innerhalb der Gattung genauer untersucht. Die PCR funktionierte bis auf wenige Ausnahmen problemlos, und es wurden immer starke und distinkte Banden detektiert. Um auch schwierige Proben zu amplifizieren, wurde eine touchdown-PCR unter Zusatz von DMSO (und z.T. BSA) durchgeführt. Der AT-Gehalt des *atpB-rbcL*-Spacers lag im Durchschnitt bei 72%. Der intergenische Bereich ist durch variable und konservative Abschnitte gekennzeichnet, die einander abwechseln. Einige der konservativen Abschnitte entsprechen den Promotoren für die beiden Gene. Trotz vieler Indel-Ereignisse konnte das Alignment problemlos erstellt werden. Bei den vorhandenen Indels handelt es sich meist um größere Duplikationen (> 10 bp) oder Deletionen. Außer Indels und Punktmutationen befinden sich noch vier unterschiedlich variable Mikrosatelliten innerhalb des Spacers. Es handelt sich dabei um ein Poly-A- und drei Poly-T-Bereiche. Aufgrund der zahlreichen Polymorphismen innerhalb der zu untersuchenden Sektionen wurde die *atpB-rbcL*-Region als einer von drei Loci für die weitergehenden Studien ausgewählt.

## C.2 Phylogenie myrmekophytischer *Macaranga*-Arten und ihrer Verwandten

### C.2.1 AFLP-Phylogenie

Die AFLP-Ansätze der 120 DNA-Proben wurden auf zwei Gelen verteilt durchgeführt (64 Probenaschen je Gel). Als Größenstandard wurde auf den Außenbahnen sowie in der Mitte aller Gele eine Probe aufgetragen, die zu Beginn der Untersuchungen mit Hilfe der M13-DNA-Sequenz geeicht wurde. Für die phylogenetische Analyse wurden insgesamt 426 Bandenmerkmale gewertet, wobei die eindeutig wertbaren Bandenpositionen je nach Primer zwischen 34 und 75 variierten (siehe Tabelle 8). Die Größe der Fragmente überschritt selten 500 bp. Nur zwei Banden waren in allen Akzessionen identisch. Fünf Banden waren monomorph für die Sektion *Pachystemon* und 12 für die Sektion *Pruinosae*. Dies ist ein Hinweis auf ein hohes Maß an Variabilität der AFLP-Muster, auch auf intraspezifischer Ebene. 154 (36 %) Banden waren spezifisch für Arten der Sekt. *Pachystemon* und 26 (6 %) für Sekt. *Pruinosae*.

**Tabelle 8: Bandenanzahl und Polymorphismen der für die Untersuchung eingesetzten AFLP-Primer-Kombinationen**

	Primer Kombination	Bandenanzahl	Banden spezifisch für		Banden monomorph in	
			<i>Pachystemon</i>	<i>Pruinosae</i>	<i>Pachystemon</i>	<i>Pruinosae</i>
A	HindACA-MseCAC	75	26	5	1	2
B	HindACC-MseCAC	44	15	3	1	3
C	HindAGC-MseCAC	62	23	2	0	1
D	HindACA-MseCTA	34	13	0	1	2
E	HindAAG-MseCTA	68	23	6	1	0
F	HindAAG-MseAAC	31	5	3	1	2
G	HindAAC-MseCAC	69	33	5	0	1
H	HindACT-MseCTA	43	16	2	0	1
	Total	426	154	26	5	12

Die Analyse der Bandenmuster erfolgte mit Hilfe des Programms GeneImageIR (B.2.7.1.1). Die zunächst generierte binäre 0/1-Matrix wurde in eine Ähnlichkeits- bzw. Distanzmatrix umgerechnet. Die Werte für die paarweisen Ähnlichkeiten bewegten sich für alle Taxa zwischen 0,260 und 0,951, innerhalb der Sektion *Pachystemon* zwischen 0,303 und 0,951, und innerhalb der Sektion *Pruinosae* zwischen 0,420 und 0,874 (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Bandbreite der paarweisen Ähnlichkeiten innerhalb einzelner Arten (A) und zwischen Arten, Gruppen und Sektionen (B).** Die Berechnung wurde mit dem Nei und Li-Koeffizienten durchgeführt

interspezifische Variation		intraspezifische Variation	
<b>Sektion <i>Pachystemon</i></b>		zwischen allen Taxa	0.260-0.951
<i>M. aetheadenia</i>	0.689-0.837	innerhalb der Innengruppe	0.303-0.951
<i>M. angulata</i>	0.656-0.804	innerhalb <i>Pachystemon</i>	0.303-0.951
<i>M. depressa</i>	0.693-0.830	innerhalb <i>Pruinosae</i>	0.420-0.874
<i>M. indistincta</i>	0.642-0.854	innerhalb <i>Winklerianae</i>	0.439-0.741
<i>M. glandibracteolata</i>	0.812-0.878		
<i>M. griffithiana</i>	0.699-0.755	innerhalb der <i>bancana</i> Gruppe	0.421-0.879
<i>M. hypoleuca</i>	0.775-0.951	innerhalb der <i>hypoleuca</i> Gruppe	0.571-0.951
<i>M. motleyana</i>	0.632-0.811	innerhalb der <i>kingii</i> Gruppe	0.545-0.817
<i>M. umbrosa</i>	0.671-0.802	innerhalb der <i>puncticulata</i> Gruppe	0.550-0.913
<i>M. spec. C</i>	0.735-0.835		
<i>M. triloba</i>	0.732-0.767		
<i>M. velutina/M. bancana</i>	0.569-0.832		
<b>Sektion <i>Pruinosae</i></b>			
<i>M. hosei</i>	0.692-0.819		
<i>M. pearsonii</i>	0.737-0.834		

Die so erhaltenen Datensätze wurden zum einen phänetisch mit Hilfe von Baumrekonstruktionsmethoden ausgewertet (NJ-Methode und UPGMA-Analyse). Dazu wurden die Computerprogrammpakete PAUP und TREECON verwendet. Zum anderen erfolgte eine kladistische Auswertung nach dem „Maximum parsimony“-Kriterium (MP) mit PAUP. Schließlich wurden die Daten auch mit Hilfe einer Haupt-Koordinaten-Analyse (PCO) untersucht, welche keine phylogenetischen Interpretationen zulässt, dafür aber Gruppenzugehörigkeiten besser zum Ausdruck bringen kann. Die PCO wurde mit dem Programmpaket NTSYS-pc durchgeführt.

### C.2.1.1 Phänetische Analyse der AFLP-Daten

Bei der Durchführung der NJ-Analyse und der UPGMA-Analyse wurde *M. tanarius* als Außengruppe gewählt. Es handelt sich hier um eine weit verbreitete, im ITS-Baum von (Blattner *et al.*, 2001) von den myrmekophytischen Sektionen entfernt stehende *Macaranga*-Art. Die Topologie der Dendrogramme (s.u.) änderte sich auch nicht, wenn stattdessen *M. heynei* als Außengruppe eingesetzt wurde.

Die Abbildung 10 zeigt einen NJ-Baum der in die AFLP-Studie einbezogenen 108 *Macaranga*-Akzessionen auf der Basis von 426 Merkmalen, die mit acht Primerkombinationen erzeugt wurden. *Macaranga heynei*, *M. conifera* und *M. diepenhorstii* stehen basal zu allen myrmekophytischen Sektionen. Die Monophylie der Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* wird jeweils gut unterstützt durch „Bootstrap“-Werte von 81 % bzw. 87 %. Die beiden Arten der Sektion *Winklerianae* (*M. winkleri* und *M. winkleriella*) gruppieren ebenfalls zusammen, erhalten aber nur geringe statistische Unterstützung. Die Beziehungen zwischen den drei Sektionen bleibt ungelöst. Wurden jedoch *M. winkleri* und *M. winkleriella* aus dem Datensatz entfernt, dann bildeten die

Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* gut gestützte Schwesterngruppen (BS 83 %, Abbildung nicht dargestellt).

Innerhalb der Sektion *Pruinosae* gibt es eine klare Trennung zwischen myrmekophytischen und nicht myrmekophytischen Arten, wobei die weit verbreitete, nicht myrmekophytische *M. gigantea* eine Schwesterposition zu allen anderen Arten der Sektion einnimmt (BS 81 %). Die Akzessionen der einzelnen Arten bilden jeweils monophyletische Gruppen, welche aber nur bei *M. pruinosa*, *M. puberula* und *M. gigantea* BS-Werte > 50 % erhalten.

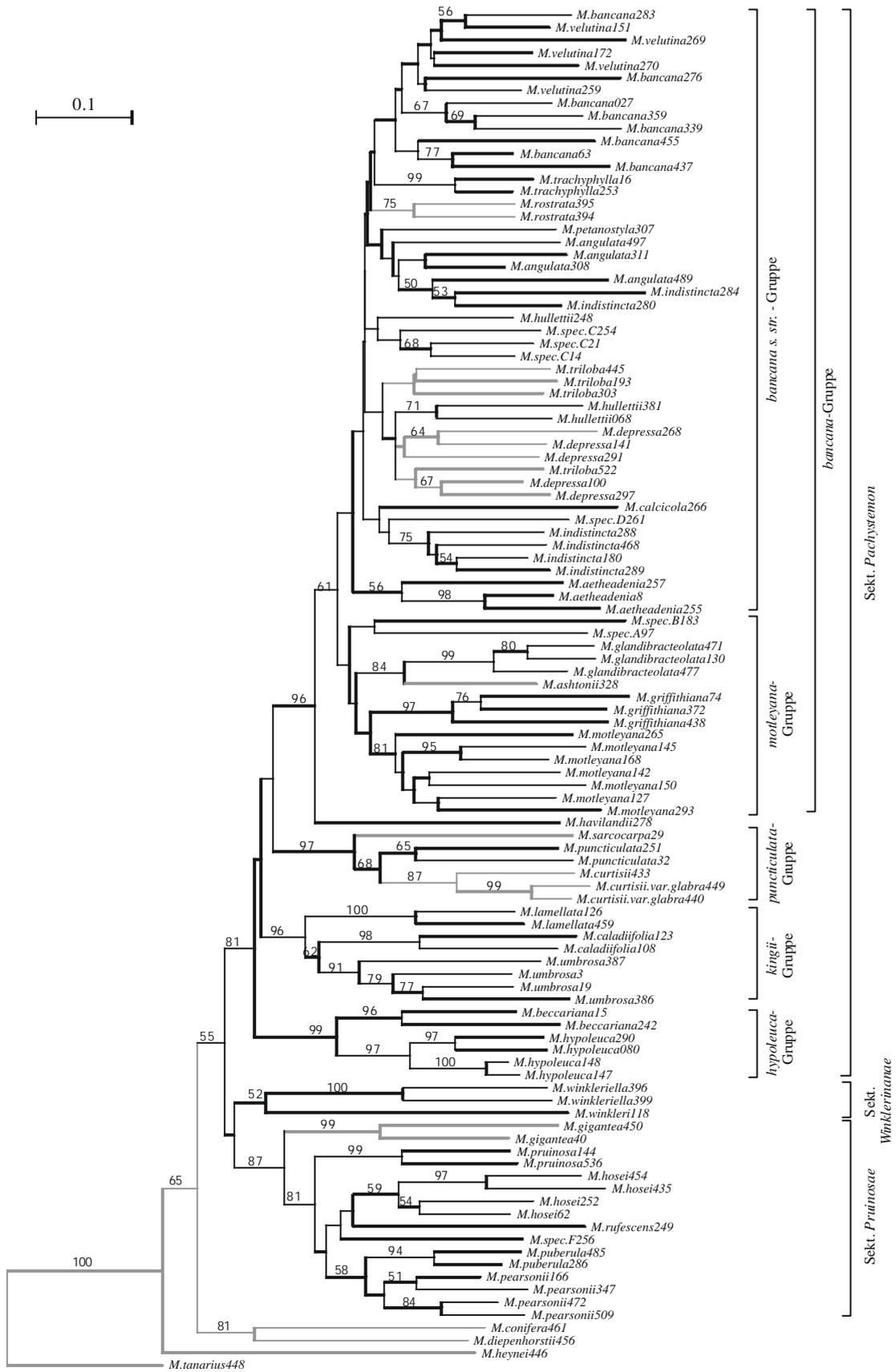
Die Sektion *Pachystemon* wird in vier statistisch sehr gut gestützte Gruppen unterteilt. Drei der vier Gruppen (*bancana*-Gruppe, *hypoleuca*-Gruppe, *kingii*-Gruppe) stimmen im Wesentlichen mit den Gruppen überein, die in früheren Studien mittels ITS-Sequenzen, RAPD-Fingerprints oder morphologischen Studien identifiziert wurden (Blattner *et al.*, 2001; Davies, 1996, 2001; Davies *et al.*, 2001). In Anlehnung an Blattner *et al.* (2001) werden die Gruppen im folgenden als *hypoleuca*-Gruppe (BS 99 %), *kingii*-Gruppe (BS 96 %), *puncticulata*-Gruppe (BS 97 %) und *bancana*-Gruppe (BS 96 %) bezeichnet, wobei letztere auch die Arten der *motleyana*-Gruppe enthält, wie sie von Davies (2001) beschrieben wurde. Da sie sich in verschiedener Hinsicht von den anderen Mitgliedern der *bancana*-Gruppe unterscheidet, (siehe Tabelle 10) wird sie auch separat behandelt.

Die langen terminalen Äste weisen auf hohe innerartliche Variation hin. Akzessionen der gleichen Art gruppieren in der Regel zusammen (*M. rostrata*, *M. trachyphylla*, *M. griffithiana*, *M. motleyana*, *M. glandibracteolata*, *M. hypoleuca*, *M. beccariana*, *M. umbrosa*, *M. lamellata*, *M. curtisii*, *M. gigantea*, *M. pruinosa*), meist mit signifikanten „Bootstrap“-Werten. Ausnahmen finden sich vor allem innerhalb der *bancana*-Gruppe, wo z.B. die Akzessionen von *M. bancana* und *M. velutina* eine gemischte Gruppe bilden.

Die *hypoleuca*-Gruppe vereinigt die auch morphologisch ähnlichen Arten *M. hypoleuca* und *M. beccariana*. Die *kingii*-Gruppe enthält alle Akzessionen von *M. caladiifolia*, *M. lamellata* und *M. umbrosa* (früher *M. kingii* ssp. *lamellata*; vgl. Davies 2001). Die eigentliche *M. kingii* ist sehr selten und konnte in die Untersuchung nicht einbezogen werden. In der *puncticulata*-Gruppe sind alle Akzessionen von *M. puncticulata*, *M. sarcocarpa* und *M. curtisii* vereinigt; in der großen *bancana*-Gruppe alle anderen Arten der Sektion. An der Basis der *bancana*-Gruppe steht *M. havilandii*. Alle anderen Arten der Gruppe teilen sich (allerdings ohne „Bootstrap“-Unterstützung) in zwei Untergruppen, die hier als *motleyana*- und *bancana*- s.str.-Gruppe bezeichnet werden.

Die Arten der beiden Gruppen unterscheiden sich morphologisch deutlich. Die Arten der *motleyana*-Gruppe (*M. havilandii*, *M. motleyana*, *M. griffithiana*, *M. ashtonii*, *M. glandibracteolata*, *M. spec. A* und *M. spec. B*) sind auffällig bewachst, die der *bancana* s.str.-Gruppe im Allgemeinen nicht. Die einzelnen Arten der *motleyana*-Gruppe sind durch hohe BS-Werte voneinander abgegrenzt. Werden *M. spec. A* und *M. spec. B* aus der Analyse ausgeschlossen steigt der „Bootstrap“-Wert der *motleyana*-Gruppe als solche auf über 50 %.

Die Berechnung von Phänogrammen wurde nicht nur mit alternativen Methoden durchgeführt (NJ und UPGMA), sondern auch mit der gleichen Methode und unterschiedlichen Computerprogrammen (TREECON, PAUP). Alle so generierten Phänogramme weisen im Großen und Ganzen die selben Topologien auf und Gruppierungen wie oben besprochen. Unterschiede bestehen lediglich bezüglich der Stellung statistisch nicht gestützter Gruppen und der Höhe der „Bootstrap“-Werte. Alle Gruppen mit hohen „Bootstrap“-Werten erwiesen sich über alle Analysen hinweg identisch.



**Abbildung 10: Neighbor Joining-Baum von 108 *Macaranga*-Akzessionen, erzeugt auf der Basis von 426 AFLP-Bandenpositionen aus acht Primerkombinationen.** Die unterliegende Distanzmatrix wurde mit Hilfe des Nei und Li-Indexes (1979) berechnet. Die Zahlen oberhalb der Zweige geben die „Bootstrap“-Werte an, erzeugt aus 1000 Wiederholungen. Nicht myrmekophytische Taxa sind im Dendrogramm mit grauen Ästen dargestellt, myrmekophytische mit schwarzen.

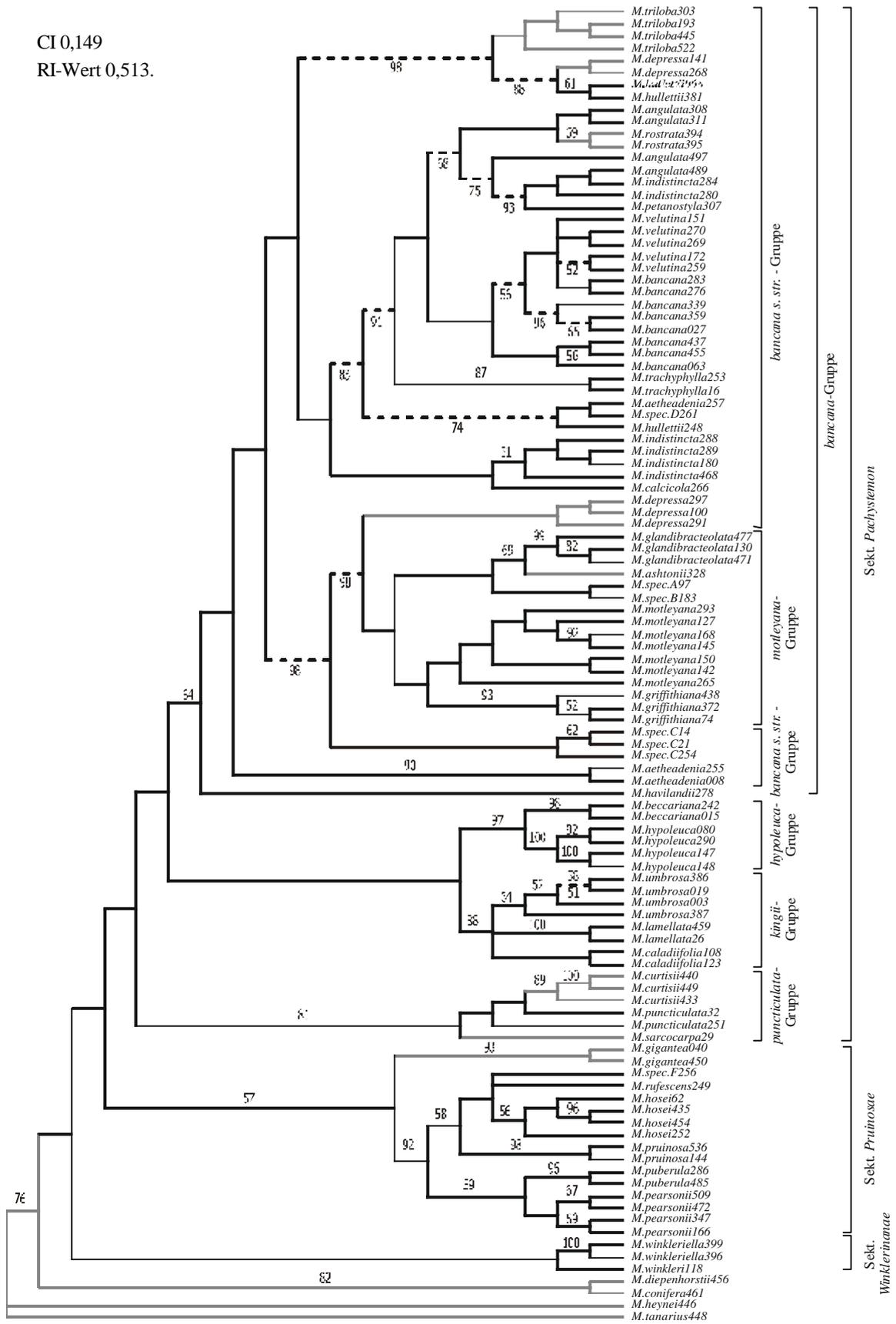
### C.2.1.2 Kladistische Analyse der AFLP-Daten

Die kladistische Analyse der 0/1-Matrix wurde mit Hilfe des Programmpaketes PAUP mit dem „maximum parsimony“-Kriterium durchgeführt. Auch hier wurden wieder wahlweise *M. tanarius* oder *M. heynei* als Außengruppe eingesetzt. Es wurden 12 kürzeste Bäume mit jeweils 2843 Schritten gefunden. Die Bäume wiesen einen CI von 0,149 und einem RI von 0,513 auf, was auf ein relativ hohes Maß an Homoplasie hinweist. Die „Bootstrap“-Werte wurden mit 100 Replikationen und dem „TBR branch swapping“ gerechnet. In Abbildung 11 ist der „majority rule“-Konsensus-Baum aus den 12 Bäumen zu sehen. Wie schon bei der phänetischen Analyse stehen *M. conifera* und *M. diepenhorstii* basal zu allen myrmekophytischen Sektionen. *M. winkleri* und *M. winkleriella* sind Schwestertaxa, jedoch auch hier ohne statistische Unterstützung (BS <50 %). Generell weist der MP-Baum erheblich niedrigere „Bootstrap“-Werte auf als die phänetischen Bäume. Die Sektion *Pachystemon* (BS <50 %) und *Pruinosae* (BS 57 %) sind jeweils monophyletisch, aber auch sie mit nur geringer „Bootstrap“-Unterstützung.

Innerhalb der Sektion *Pruinosae* steht auch im MP-Baum die nicht myrmekophytische *M. gigantea* basal zu allen übrigen *Pruinosae*-Arten. Lässt man diese Art weg, so erhöht sich der „Bootstrap“-Wert der Sektion von 57 % auf 92 %. Auch alle übrigen Arten der Sektion gruppieren gemäß ihrer taxonomischen Zuordnung (*M. pruinosa*, *M. puberula*, *M. pearsonii*) Die Sektion *Pachystemon* teilt sich in die vier oben definierten, mäßig bis immer noch sehr gut gestützten Gruppen [*bancana*- (BS 64 %), *kingii*- (BS 88 %), *hypoleuca*- (BS 97 %) und *puncticulata*-Gruppe (BS 81 %)]. Die Anordnung der Gruppen zueinander unterscheidet sich aber. In der Position identisch zum Phänogramm in Abbildung 10 ist lediglich die *bancana s. str.*-Gruppe als abgeleiteter Zweig. Die *bancana s. str.*-Gruppe ist im MP-Baum aber paraphyletisch, da einige Proben außerhalb der Gruppe sitzen (*M. depressa* 100, 291 und 297, die unbewachsenen *M. aëtheadenia* und *M. spec. C*). Auch *M. motleyana*, *M. griffithiana*, *M. glandibracteolata* und *M. ashtonii* gruppieren zusammen, alle vier Mitglieder der *motleyana*-Gruppe mit ausgeprägter Wachsbereifung auf den Zweigen. *M. havilandii* steht wie im NJ-Phänogramm an der Basis der gesamten Gruppe. Bewachste und unbewachste *M. aëtheadenia*-Akzessionen bilden zwei weit getrennte Gruppen, während sie im NJ-Baum vereinigt sind. Eine Aufspaltung von westmalaysischen und borneensischen Akzessionen in getrennte Gruppen findet sich sowohl in *M. hullettii* und *M. bancana* aus der *bancana*-Gruppe als auch bei *M. hosei* aus der Sektion *Pruinosae*. Innerhalb von Borneo lassen sich geographisch definierte Gruppen in *M. hypoleuca*, *M. pearsonii* und *M. depressa* beobachten. Im Falle von *M. depressa* ist jedoch nicht klar ob es sich primär um eine geographische oder taxonomische Unterteilung handelt, da in den verschiedenen geographischen Standorten unterschiedliche Formen der Art vorkommen (*f. glabra* in Sabah und *f. strigosa* in Sarawak und Ostkalimantan).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Topologien der phänetischen und kladistischen Bäume leichte Unterschiede aufweisen, alle gut gestützten Gruppen finden sich jedoch bei beiden Berechnungsmethoden wieder.

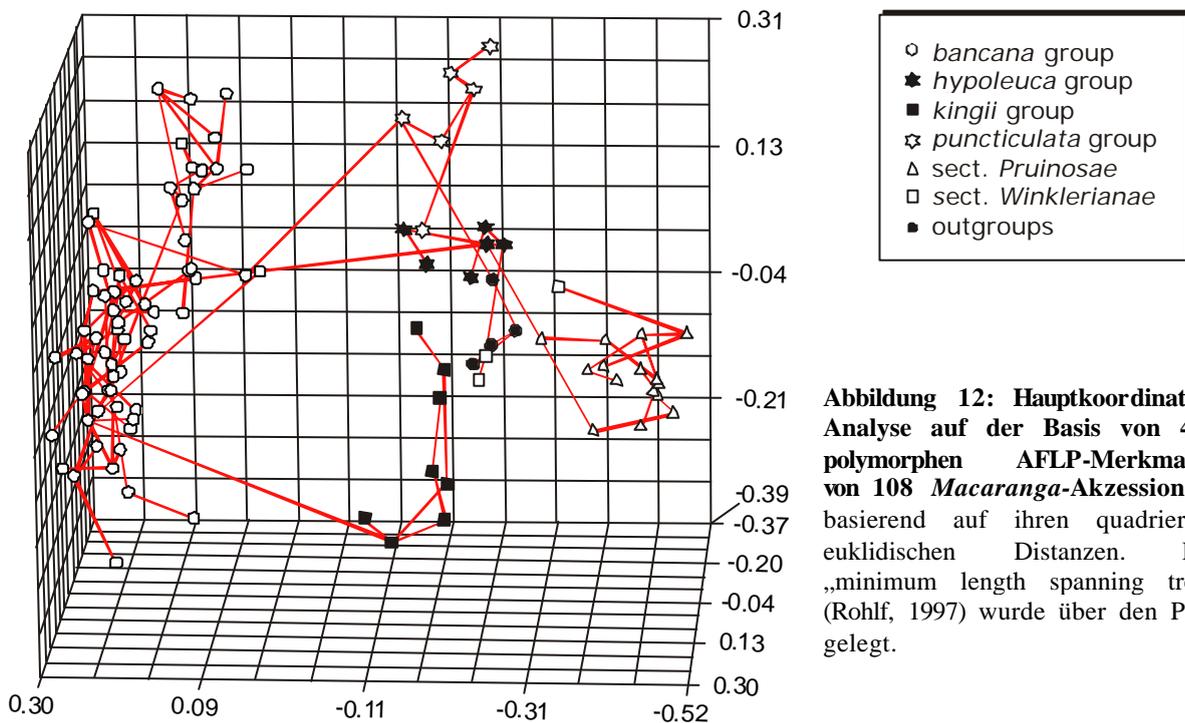
CI 0,149  
RI-Wert 0,513.



**Abbildung 11: Majority rule-Konsensus-Baum von 12 AFLP-MP-Bäumen mit jeweils 2843 Schritten,** erzeugt auf der Basis von 426 AFLP-Bandenpositionen aus 8 Primerkombinationen. Clades, die in einem strikten Konsensus-Baum kollabieren, sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die Zahlen unterhalb der Äste geben an, in wieviel Prozent der 12 einzelnen Bäume die jeweilige Verzweigung vorkommt. Die Zahlen oberhalb der Linie repräsentieren die „Bootstrap“-Werte, welche mit 100 Replikationen und „TBR-branch swapping“ berechnet wurden. Nicht myrmekophytische Taxa sind im Dendrogramm mit grauen Ästen dargestellt, myrmekophytische mit schwarzen.

### C.2.1.3 Haupt-Koordinaten-Analyse der AFLP-Daten

Eine ganz andere Methode, verwandtschaftliche Verhältnisse und Zusammenhänge darzustellen, stellt die Haupt-Koordinaten-Analyse („principal coordinate analysis“, PCO) dar. In Abbildung 12 repräsentieren die ersten drei Koordinaten 13,5 %, 5,4 % und 4,2 % aller Varianzen und ermöglichen es, die fünf auch im NJ- und MP-Baum erkennbaren Artengruppen voneinander zu trennen, d.h. die Sektion *Pruinosae*, und die *bancana*-, *kingii*-, *hypoleuca*- und *puncticulata*-Gruppe der Sektion *Pachystemon*. Auf der ersten Achse trennt sich die Sekt. *Pruinosae* und die *bancana*-Gruppe der Sekt. *Pachystemon* gegenüber den restlichen Arten ab. In der zweiten und dritten Dimension trennen sich die *kingii*-, die *hypoleuca*- und die *puncticulata*-Gruppe voneinander ab. Die Außengruppen-Taxa stehen von den Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* isoliert. Die Sektion *Winklerianae* bildet keine deutliche Gruppe. Die wesentlichen Ergebnisse der NJ- und MP-Analyse werden demnach auch durch die PCO bestätigt.



**Abbildung 12: Hauptkoordinaten-Analyse auf der Basis von 426 polymorphen AFLP-Merkmalen von 108 *Macaranga*-Akzessionen,** basierend auf ihren quadrierten euklidischen Distanzen. Ein „minimum length spanning tree“ (Rohlf, 1997) wurde über den Plot gelegt.

## C.2.2 Chloroplasten-Phylogenie

Für die phylogenetische Analyse der Chloroplasten-Daten wurden die intergenischen Bereiche zwischen *atpB* und *rbcL* und zwischen *psbI* und *trnS* („ccmp2“) verwendet (vergleiche Kapitel C.1.3.5 und C.1.3.7). Aufgrund der geringen Variabilität innerhalb der myrmekophytischen *Macaranga*-Sektionen waren keine fundierten Rückschlüsse auf Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb dieser Sektionen zu erwarten. Es wurden daher exemplarisch nur einige Arten der einzelnen Sektionen für diesen Teil der Analyse eingesetzt. Welche Sequenzen identisch sind können der Tabelle mit den Chloroplasten-Merkmalen entnommen werden. Ziel der Analyse war es, die Position der myrmekophytischen Sektionen innerhalb der Gattung *Macaranga* insgesamt zu bestimmen. Neben möglichst vielen *Macaranga*-Arten aus unterschiedlichen Regionen (z.B. Sunda-Provinz, Neuguinea, Afrika) und Verwandtschaftskreisen wurden als Außengruppe einige *Mallotus*-Arten von Borneo und der Halbinsel Malaysia verwendet. Bei Herbarproben war es trotz spezieller Reinigung und Reparaturmethoden nur aus zwei Arten möglich Sequenzen des *ccmp2*-Locus zu erzeugen. Der *atpB-rbcL*-Bereich konnte aufgrund seiner Größe nicht amplifiziert werden. In Tabelle 2 ist aufgeführt, für welche Arten an welchem der beiden cpDNA-Loci Sequenzdaten erzeugt werden konnten.

### C.2.2.1 Phylogenie auf der Basis des *atpB-rbcL*-Spacers

Das Alignment für die phylogenetische Analyse des *atpB-rbcL*-Spacers hatte eine Länge von 963 bp, die Länge der Einzelsequenzen variierte zwischen 747 und 819 bp innerhalb von *Macaranga* und zwischen 565 und 830 bp innerhalb von *Mallotus*. Das Alignment erstreckt sich vom ersten Codon des *atpB*-Gens am 5'-Ende bis zu den ersten 10 Nukleotiden des *rbcL*-Gens am 3'-Ende.

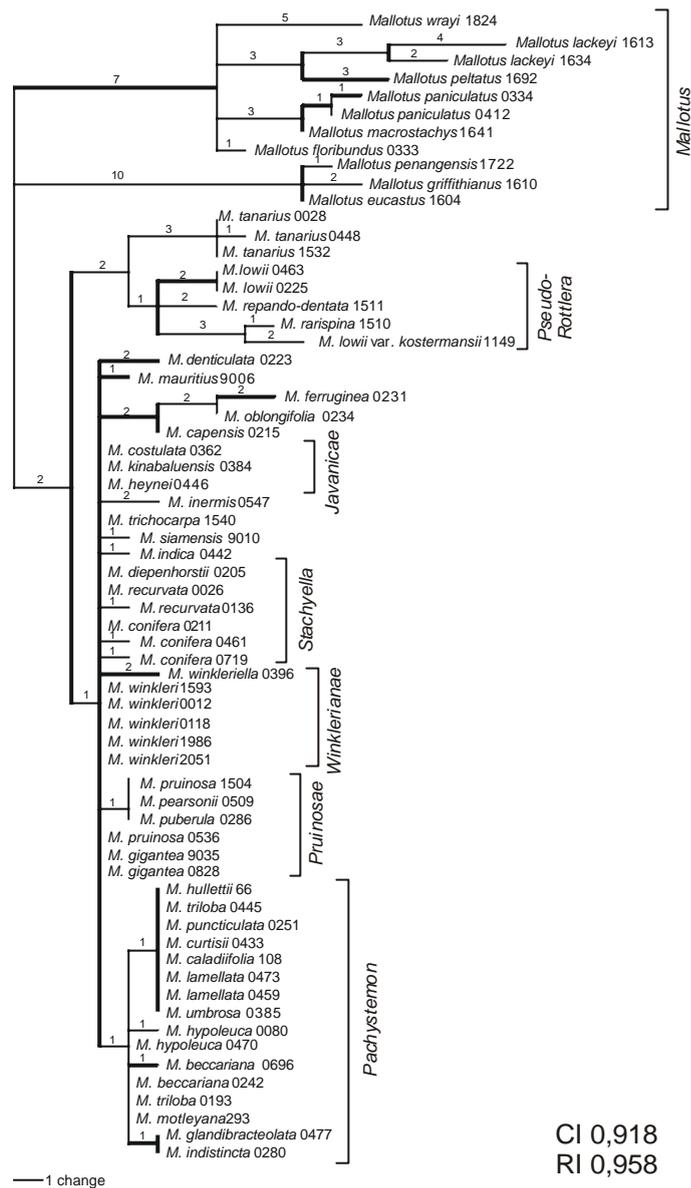
Der intergenische Bereich zwischen dem *atpB*- und *rbcL*-Gen zeichnet sich durch eine Vielzahl von Indels aus, die die beiden Gattung *Macaranga* und *Mallotus* als auch die Arten innerhalb der myrmekophytischen Sektionen voneinander differenzieren. Punktmutationen dagegen sind vergleichsweise selten, stellen innerhalb der Sektion *Pachystemon* vor allem Autapomorphien dar und spielen deshalb bei der Berechnung von Verwandtschaftsbeziehungen keine entscheidende Rolle. Die Gesamtvariabilität an dem Locus beträgt 3,4 % innerhalb von *Macaranga* und 7,5 % im gesamten Datensatz. Die Sektion *Pachystemon* weist eine markante 21 bp-Deletion als unikale Synapomorphie auf. Für die Sektionen *Winklerianae* gibt es keine entsprechende Synapomorphie, während eine *Pruinosae*-spezifische Insertion in einigen, aber nicht in allen *Pruinosae*-Proben vorkommt. Die Variation innerhalb der Sekt. *Pachystemon* beruht vor allem auf Mikrosatelliten, welche aber für die phylogenetischen Analysen nicht verwendet wurden (siehe hierzu Erläuterungen im Kapitel A.1.).

Bei der „maximum parsimony“-Berechnung (Berechnungsmodi siehe Abbildung 13) auf der Basis des *atpB-rbcL*-Alignments wurden 270 kürzeste Bäume mit einer Länge von 91 Schritten gefunden; 44 der 76 variablen Positionen waren parsimonieinformativ. Drei *Mallotus*-Arten (*Mallotus penangensis*, *Mallotus griffithianus*, *Mallotus eucastus*) weisen im Alignment eine 275 bp große Deletion auf. Innerhalb dieses Bereiches liegen bei den übrigen *Mallotus*-Arten einige aussagekräftige Mutationen. Vermutlich durch die fehlenden Merkmale in diesem Bereich bedingt, gruppiert diese *Mallotus*-Gruppe in ca. der Hälfte aller 270 gefundenen Bäume innerhalb von *Macaranga*, wodurch *Mallotus* paraphyletisch würde. In die Berechnung der Konsensus-Bäume wurden daher nur Einzelbäume einbezogen, bei denen diese *Mallotus*-Gruppe basal zu allen *Macaranga*-

Sippen steht. Der Ausschluss der Bäume beeinflusste nicht die Gruppierungen innerhalb von *Macaranga*.

Bei der Betrachtung eines „maximum parsimony“-Baumes (Abbildung 13) lässt sich der Mangel an Variabilität innerhalb der Gattung *Macaranga* besonders gut erkennen. Einige Arten unterscheiden sich in nur einem einzigen Merkmal voneinander. Ganz anders verhält es sich innerhalb von *Mallotus*, wo die einzelnen Gruppen durch mehrere, teilweise einmalige Mutationsereignisse definiert werden. Die *Mallotus*-Akzessionen bilden jedoch keine monophyletische Gruppe.

Insgesamt betrachtet erbringt der MP-Baum auf der Basis des *atpB-rbcL*-Alignments nur wenig Information. Die meisten Äste kollabieren bei der Berechnung eines Konsensusbaumes (nicht dargestellt). Eine deutliche Gruppe bilden hierbei die verschiedenen *Macaranga tanarius*-Akzessionen mit einem „Bootstrap“-Wert (BS) von 98 %. Eine weitere eindeutige Gruppe bilden die afrikanischen-Arten (BS 79 %; *M. ferruginea*, *M. oblongifolia*, *M. capensis*). Die drei Myrmekophyten enthaltenden Sektionen (*Pachystemon*, *Pruinosae*, *Winklerianae*) bilden jeweils keine eindeutig definierte Gruppe. Von den myrmekophytischen Sektionen wird nur *Pachystemon* durch eine nur hier vorkommende Synapomorphie im *atpB-rbcL*-Bereich unterstützt (siehe Tabelle 11 im Anhang).



**Abbildung 13: Maximum parsimony- Analyse auf der Basis der Sequenz des *atpB-rbcL*-Spacers. Einer von 270 kürzesten Bäumen.** Indels wurden separat codiert, es wurden keine Mikrosatelliten mit in die Bewertung einbezogen. Die 270 kürzesten Bäume haben je einer Gesamtlänge von 91 Schritten aus 915 konstante Merkmale, aus 44 von 76 parsimonieinformative Merkmale. Die Ziffern oberhalb geben die Schritte an. Einstellungen: „Addition sequence: simple“ (ref. Taxon *Mallotus paniculatus* 0334). „TBR branch swapping“. *Mallotus* wurde als Außengruppe definiert.

#### C.2.2.2 Phylogenie auf der Basis des *psbI-trnS*-Spacers (ccmp2)

Das Alignment des intergenischen Bereichs zwischen *psbI* und *trnS* besitzt eine Länge von 579 bp. Hinzu kommen am 5'-Ende 33 Positionen des *psbI*-Gens (inkl. Primer-Bindestelle) und am 3'-Ende ebenfalls 33 Nukleotide des *trnS*-Gens. Aufgrund zahlreicher komplexer Indels war für große Bereiche (231 bp) kein eindeutiges Alignment möglich. Diese Abschnitte wurden bei der MP-Analyse aus der Berechnung ausgeschlossen, die darin enthaltene Information codiert und an das Ende des Datensatzes angehängt (siehe Alignment im Anhang: „ccmpMP.txt“). Die größten Längenvariationen und Verschachtelungen kamen in den Arten der Gattung *Mallotus* vor. Die Sequenzen von drei *Mallotus*-

Arten mussten aufgrund von Homologisierungsproblemen aus dem Alignment und somit aus der Wertung ausgeschlossen werden (*Mallotus lackeyi*, *Mallotus miquelianus*, *Mallotus wrayi*). Bei zwei weiteren Merkmalen konnte nicht entschieden werden, ob es sich um zwei unabhängig voneinander entstandene Insertionen handelt. Die beiden Merkmalen wurden daher bei der Analyse nur gewichtet mit dem Faktor 0,5 in die Berechnung einbezogen.

Legt man das Gesamtalignment zu Grunde, so existieren 6 % Mutationsunterschiede auf Basis von Punktmutationen (35 Merkmale). Bei *Macaranga* sind es ebenfalls 6 % Differenz (26 Merkmale), in einem um 157 bp verkürzten Alignment.

Bei der „maximum parsimony“-Berechnung (Berechnungsmodi siehe Abbildung 14) auf der Basis des *atpB-rbcL*-Alignments wurden 35.501 kürzeste Bäume mit einer Länge von 90,5 Schritten gefunden; 32 der 61 variablen Positionen waren parsimonieinformativ. *Mallotus* steht basal zu allen *Macaranga*-Arten und bildet auch mit diesem Locus keine monophyletische Gruppe (siehe Abbildung 14). Innerhalb von *Macaranga* stehen die Arten der Sektionen *Pseudo-Rottlera* und *M. tanarius* an der Basis; hinzu kommt die bei diesem Locus mit in die Analyse einbezogene *M. coriaceae* aus Neukaledonien. Die übrigen südostasiatischen Arten und die afrikanischen Arten bilden eine, auch im Konsensusbaum (nicht dargestellt) gestützte Gruppe.

Gut gestützte Gruppen innerhalb von *Macaranga* gibt es nur wenige. Die *M. tanarius*-Akzessionen bilden mit der durch *atpB-rbcL* nicht untersuchten *M. suwo* eine Gruppe (BS 85 %). Die Arten der Sektion *Pseudo-Rottlera*-Gruppe bilden im *psbI-trnS*-Baum keinen monophyletischen Clade. Alle Proben aus Afrika (inkl. *M. mauritiana*) gruppieren zusammen, unter Einschluss der nun zusätzlich untersuchten *M. beillei*. Statistisch gestützt sind aber nur der Schwesterstatus von *M. ferruginea* und *M. oblongifolia* (BS 85 %). Für die myrmekophytischen Arten existiert kein einheitliches Bild.

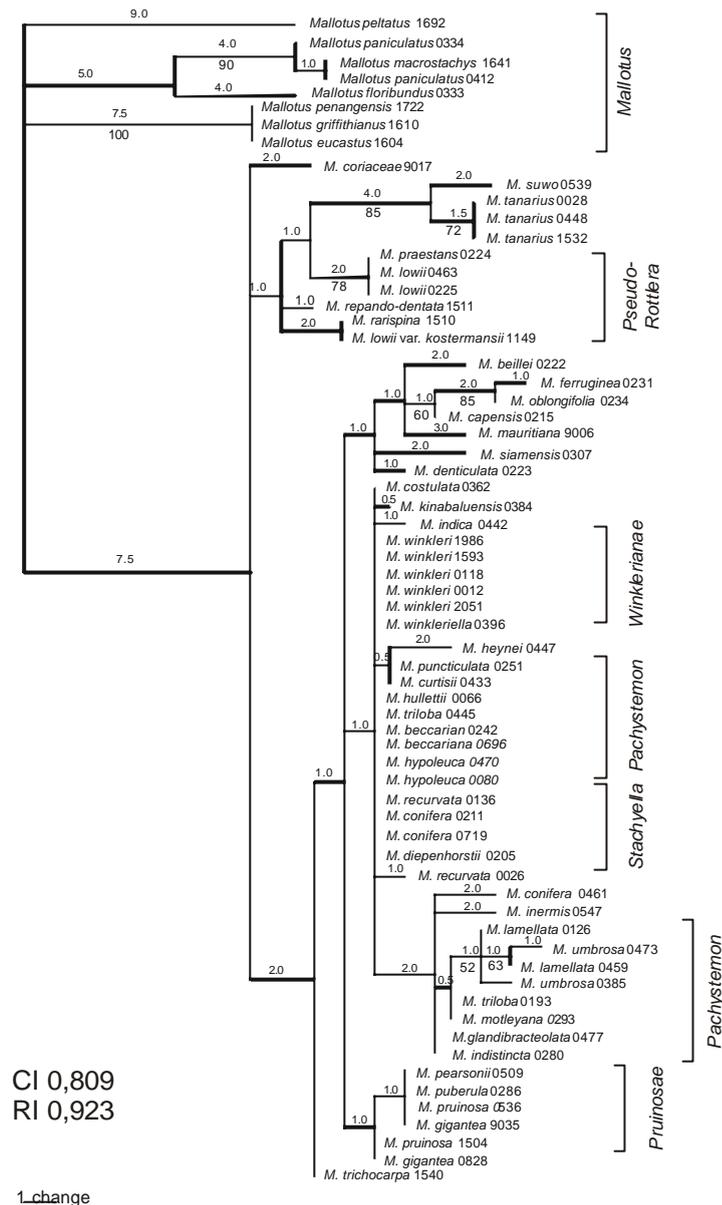


Abbildung 14: „Maximum parsimony“-Analyse auf der Basis des des intergenischen Bereichs zwischen *psbI* und *trnS* (*ccmp2*). Einer von 35.501 kürzesten Bäumen („most parsimonious trees“). Indels wurden separat codiert. Die kürzesten Bäume haben je einer Gesamtlänge von 90,5 Schritten; von 61 von 607 Merkmalen sind variable und 32 davon parsimonieinformativ. Die Ziffern oberhalb geben die Schritte an, die Ziffern unterhalb den Bootstrap-Wert (100 Wiederholungen). Einstellungen: „Addition sequence: simple“ (ref. Taxon *Mallotus paniculatus* 0334). „TBR branch swapping“. *Mallotus* wurde als Außengruppe definiert.

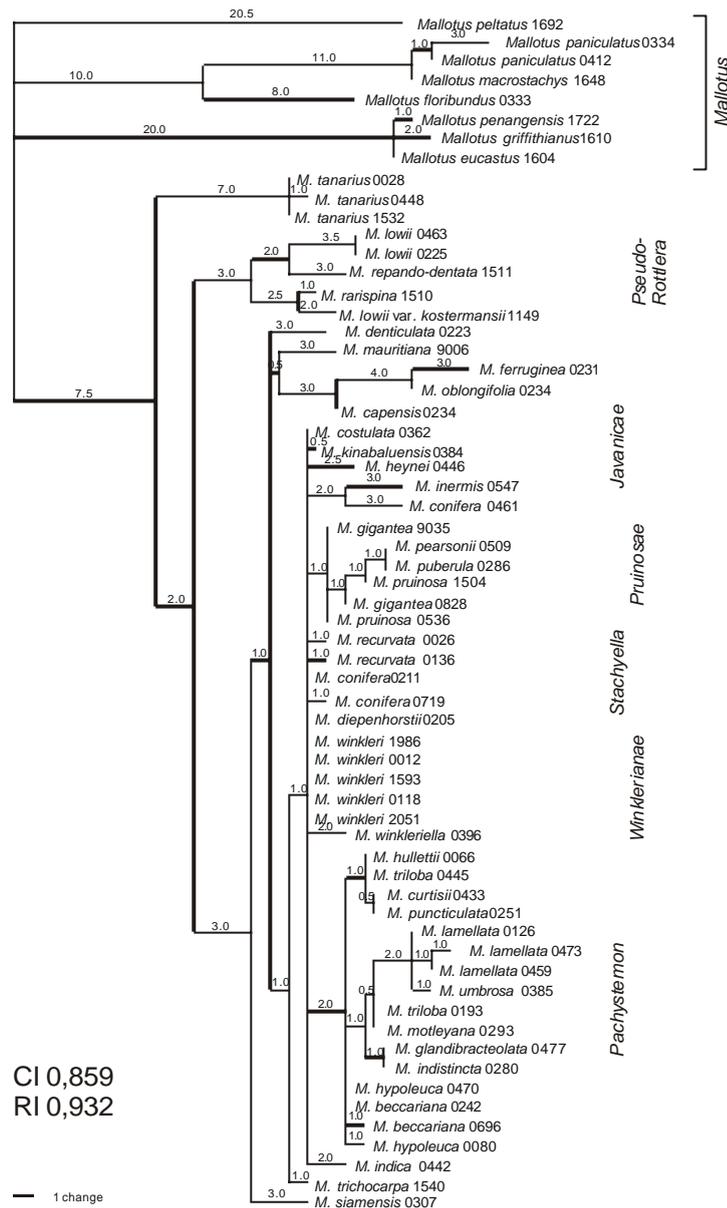
### C.2.2.3 Kombinierte Analyse beider Chloroplasten-Regionen

Bei der kombinierten Analyse beider Chloroplasten-Loci entsteht ein MP-Baum mit 159,5 Schritten. Deutlich wird der große Abstand zwischen *Mallotus* und *Macaranga* und die langen Äste zu den einzelnen *Mallotus*-Gruppen (siehe Abbildung 15).

*Mallotus* bildet wie schon bei den Einzelbäumen eine paraphyletische Gruppe und steht basal zu *Macaranga*. Die Gattung *Macaranga* wird charakterisiert durch 7,5 Evolutionsschritte was sich auch im strikten Konsensusbaum (siehe Abbildung 26 in der Diskussion) durch eine sehr gute statistische Absicherung widerspiegelt (BS 97 %). Basal steht die weit verbreitete *M. tanarius* (BS 100 %), gefolgt von den Arten der Sektion *Pseudo-Rottlera*. Die übrigen Arten werden durch lediglich drei Evolutionsschritte zusammengehalten und bilden insgesamt eine nicht gestützte (BS <50 %) Gruppe, in der sich auch die afrikanischen Arten (BS 96 %) als Schwestergruppe zu *M. mauritiana* (BS 59 %) wiederfinden. Die Mitglieder der Sektionen *Stachyella*, *Javanicae* und *Winklerianae* bilden keine sektionsspezifischen Gruppen. Auch zeigt sich, dass *M. siamensis* weit weg von der Sektion *Pruinosae* gruppiert. Die von Davies (2001) vorgenommene Zuordnung von *M. siamensis* zu dieser Sektion ist daher in Frage zu stellen.

Die beiden großen myrmekophytischen Sektionen *Pruinosae* und *Pachystemon* sind beide monophyletisch, jedoch ohne statistische Absicherung (BS <50 %). Innerhalb der beiden Sektionen ist die Auflösung gering; um die Verwandtschaftsverhältnisse der Gruppen näher zu untersuchen wurde daher ein Netzwerkanalyse durchgeführt (siehe nächstes Kapitel)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es allein mit Hilfe der vorliegenden Chloroplasten-Sequenzen nicht möglich ist, eine zuverlässige systematische Zuordnung der myrmekophytischen Arten innerhalb der Gattung *Macaranga* vorzunehmen. Deutlich erkennbar wird aber die basale Position der *Pseudo-Rottlera*-Gruppe und von *M. tanarius*, sowie die Zusammengehörigkeit der afrikanischen *Macaranga*-Arten. Insgesamt erscheinen die Arten der malaiischen Region wenig differenziert voneinander, so dass auch die Sektionszugehörigkeiten nicht immer eindeutig belegt werden konnte.



**Abbildung 15:** Einer von 40.101 kürzesten „maximum parsimony“-Bäumen auf der Basis der beiden untersuchten Chloroplasten-Bereiche *atpB-rbcL* und *psbI-trnS* (Gesamtlänge von 159,5 Schritten). Indels wurden separat codiert. Die zugrunde liegenden Daten enthalten 52 variable, aber parsimonieuninformative und 71 parsimonieinformative Merkmale. Die Ziffern oberhalb geben die Schritte an. Einstellungen: „Addition sequence: simple“ (ref. Taxon *Mallotus paniculatus* 0334). „TBR branch swapping“. *Mallotus* wurde als Außengruppe definiert.

In einem abschließenden, im nächsten Kapitel beschriebenen Set von Versuchen wurden die myrmekophytischen *Macaranga*-Arten mit Hilfe einer Netzwerkanalyse näher untersucht. In diese Experimente wurden neben Punktmutationen und Indel-Ereignissen auch variable Mikrosatelliten mit einbezogen.

## C.3 Analyse der Chloroplasten-Daten mit Hilfe eines statistischen Parsimonie-Netzwerkes

### C.3.1 Haplotypendiversität am *atpB-rbcL*, *psbI-trnS* und *ycf3*-Locus

Für die Netzwerkanalyse der Chloroplasten-Daten wurde neben den beiden für die Phylogenie verwendeten Loci *atpB-rbcL* und *psbI-trnS* (=ccmp2) ein Abschnitt des *ycf3*-Introns sequenziert, dessen Länge im Gesamtalignment 119 bp betrug. Es handelt sich bei diesem Locus um einen Hot-Spot für Chloroplasten-Mikrosatelliten (Locus ccmp6, Weising und Gardner, 1998), der für eine „maximum parsimony“-Analyse kaum auswertbare Merkmale enthält (C.1.3.6), für Netzwerkanalysen jedoch brauchbar ist.

Das Alignment des *atpB-rbcL*-Locus hat eine Länge von 929 bp und enthält neben den für die phylogenetische Untersuchung verwendeten acht Indels und zehn Punktmutationen vier Mononukleotid-Mikrosatelliten vom Typ Poly A/T. Die vier Mikrosatelliten sind unterschiedlich variabel. Während einer der PolyT-Bereiche innerhalb der Sektion *Pachystemon* nur in der *bancana*-Gruppe in Westmalaysia und in der *hypoleuca*-Gruppe variiert, ist ein weiterer PolyT-Mikrosatellit in allen Arten und Regionen hochvariabel und wurde dem Netzwerk manuell als letztes Merkmal zugefügt. Innerhalb von *Pruinosae* war die Mikrosatellitenvariation generell geringer. Nähere Angaben über die Zuordnung der Merkmale und Haplotypen zu den einzelnen untersuchten Akzessionen können in der Tabelle im Anhang eingesehen werden. Das Alignment des ccmp2-Locus ist 432 bp lang und enthält insgesamt 14 Indels, acht Punktmutationen und keine Mikrosatelliten.

Nachdem sich schon während der Pilotstudie herauskristallisierte, dass Chloroplasten-Haplotypen zwischen und innerhalb von Arten variierten und z.T. nach geographischen Kriterien verteilt vorkamen, war es erforderlich, von möglichst allen Arten der Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* mehrere Proben aus verschiedenen Regionen zu untersuchen. *Macaranga siamensis* wurde nicht berücksichtigt, da sich schon bei der phylogenetischen Untersuchung herausstellte, dass diese Art offensichtlich nicht zur Sektion *Pruinosae* gehört. Zusätzlich zu den myrmekophytischen Sektionen wurden weitere südostasiatische Arten als Außengruppen mit in die Untersuchung einbezogen. Auf der Abbildung 18 ist zu erkennen, dass der Fokus der Untersuchung auf dem Norden und Nordwesten Borneos lag. Dies ist zum einen damit zu begründen, dass hier die Diversität der Gattung mit 17 untersuchten Arten sehr hoch ist. Zum anderen ist das malaysische Bundesland Sabah eines der Untersuchungsgebiete einer Forschergruppe aus Würzburg, mit der eine enge Kooperation besteht. In Ostkalimantan kommen ebenfalls viele Arten vor (14), aus dieser Region mussten jedoch überwiegend Proben aus dem Herbarium Leiden, Niederlande eingesetzt werden. Eine große Lücke bezüglich der Aufsammlungen besteht in Süd-, West- und Zentralkalimantan. Hier kommen zwar viele *Macaranga*-Arten vor, es bestand aber keine Möglichkeit, an geeignete Blattproben heranzukommen. Auf der Halbinsel Malaysia und in Thailand gibt es die wenigsten Arten der myrmekophytischen Sektionen (12 Arten). Nur *M. constricta*, *M. curtisii*, *M. griffithiana* und *M. triloba* kommen ausschließlich außerhalb Borneos vor.

### C.3.2 Zweistufen-Rekonstruktion eines statistischen Parsimonie-Netzwerkes

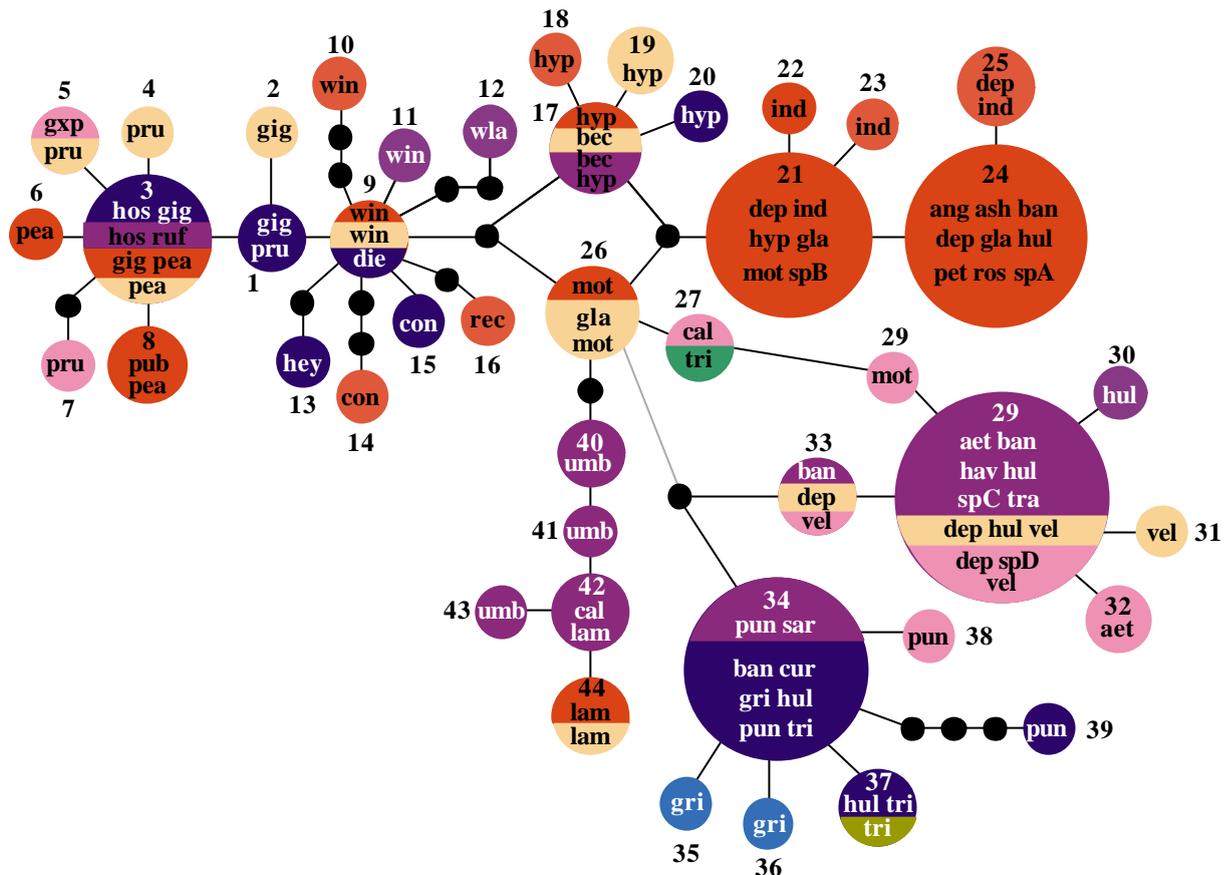


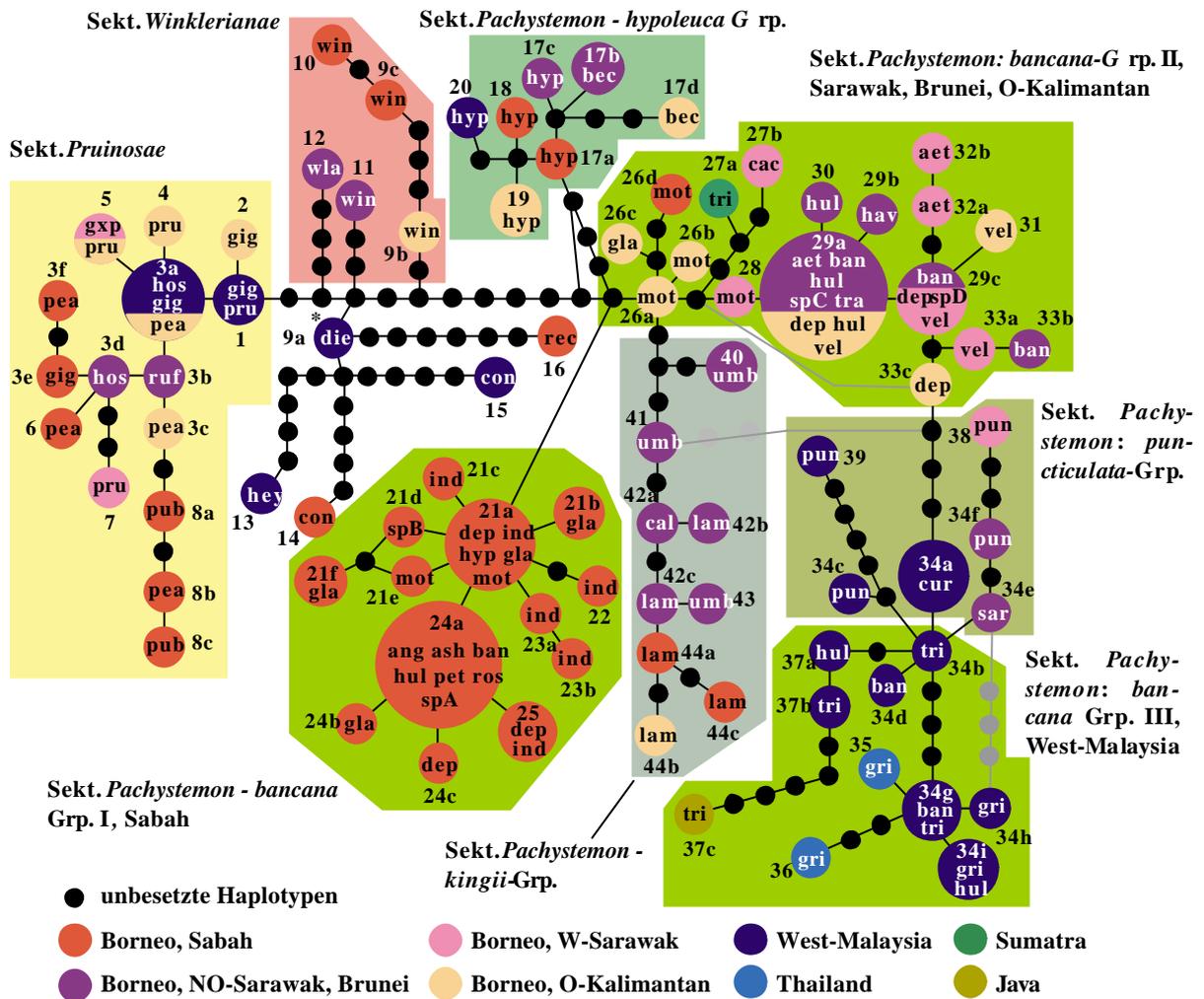
Abbildung 16: Erste Stufe des statistischen Parsimonie-Netzwerkes der Sektionen *Pachystemon*, *Pruinosae* und *Winklerianae* sowie weiterer südostasiatischer Arten, ohne homoplastische Merkmale.

Wie schon unter Material und Methode (B.2.7.2.3) näher erläutert, wurde die Erstellung des Netzwerkes in mehreren Schritten durchgeführt. Zunächst wurden bei der Bestimmung der Haplotypen alle Mikrosatellitenvarianten sowie alle homoplastischen Indels außen vor gelassen. Daraus resultierten 44 Haplotypen, die mit Hilfe des Computerprogramms TCS (Clement *et al.*, 2000) zu einem Parsimonie-Netzwerk kombiniert wurden (No. 1-44, Abbildung 16). Diesem Gerüst-Netzwerk wurden anschließend die übrigen Polymorphismen manuell oder unter zu Hilfenahme des TCS-Programms hinzugefügt. Das voll aufgelöste Netzwerk mit 88 Haplotypen ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Mikrosatelliten- und Indel-Variationen wurden in Abbildung 17 als Erweiterungen (z.B. 3a, 3b) an die ursprüngliche Haplotypen-Bezeichnung angehängen. Nur wenige unaufgelöste Verbindungen zwischen den Haplotypen sind in dem Netzwerk verblieben, die auf keine der im Methodenteil angegebene Art und Weise aufgelöst werden konnten und daher verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zulassen. Insgesamt 10 Haplotypen kommen bei bis zu 7 verschiedenen Arten vor. Pro Gruppe und Standort wurden bis zu 4 verschiedene Haplotypen gefunden. Meist haben unterschiedliche Arten am gleichen Standort auch unterschiedliche Haplotypen (z. B. in Bau, Sabah, mit drei Arten und drei Haplotypen), es kommt aber auch vor, dass alle untersuchten Taxa eines Standorts den gleichen Haplotypen besitzen (z. B. *M. glandibracteolata*, *M. indistincta*, *M. motleyana* und *M. hypoleuca* aus Luasong, Sabah). Das Netzwerk ist komplex, aber relativ gut aufgelöst. Es zeigt ein Ausmaß an Strukturierung, wie es mit der „maximum parsimony“-Analyse nicht erreicht wurde. Während die Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* (*sensu* Davies, 2001) gut voneinander

und den Außengruppen abgegrenzte monophyletische Gruppen darstellen und durch wenigstens drei nicht homoplastische Mutationen voneinander getrennt sind, bildet die Sektion *Winklerianae* (sensu Whitmore, 1975) kein Monophylum. *M. diepenhorstii* Den größten Unterschied zu allen anderen Arten weist *M. recurvata* mit sieben Schritten zu *M. diepenhorstii* als nächstem Nachbar auf (siehe Anhang).

Während die Haplotypen (HTs) der Sektion *Pruinosae* in Borneo nach der vorhandenen Datenlage nur in jeweils einer Art vorkommen (siehe Anhang), sind die beiden in Westmalaysia vertretenen Haplotypen 1 (*M. gigantea* und *M. pruinosa*) und 3 (*M. gigantea*, *M. hosei* und *M. pearsonii*) in mehreren Arten präsent. HT 3 kommt außerdem in Ostkalimantan vor, wo er an einem Standort bei zwei unterschiedlichen Arten auftritt (*M. gigantea* #162 und *M. pearsonii* #166).

Die Sektion *Pachystemon* weist insgesamt die größere Anzahl an Haplotypen auf; in beiden Sektionen (*Pachystemon* und *Pruinosae*) kommen jedoch ca. 2,5 Haplotypen auf eine Art. Dies ist allerdings eine Vereinfachung, da keine Unterscheidung zwischen weit verbreiteten und begrenzt vorkommenden Arten gemacht wird.



**Abbildung 17: Statistisches Parsimonie-Netzwerk aus Haplotypen von *Macaranga*-Arten myrmekophytischer Sektionen.** Zur Erstellung wurden drei verschiedene Chloroplasten-Loci verwendet (*atpB-rbcL* intergenischer Spacer, ein Teil des *ycf3*-Introns (*ccmp6*) und *psbI-trnS* (*ccmp2*). Mit Ausnahme von *M. calcicola* (*cac*), *M. gigantea* x *pruinosa* (*gxp*), *M. winkleriella* (*wla*) und *M. spec.* (*spA*, *spB*, *spC*, *spD*), wurden die Arten durch die ersten drei Buchstaben ihres Epithetons abgekürzt. Die Größe der Kreise repräsentiert die Anzahl von Akzessionen, die diesen Haplotypen aufweisen. Die Nummern neben oder innerhalb der Kreise geben die Haplotypen-Bezeichnungen an. Graue Verbindungen zwischen zwei Haplotypen stellen alternative Verbindungen dar (Homoplasie), die weniger wahrscheinlich sind als die schwarzen Verbindungen. Der als mögliche Wurzel des Netzwerkes definierte Haplotyp (vgl. Text) ist durch einen Stern gekennzeichnet.

### C.3.3 Unterteilung der Gruppen und geographische Verbreitung der Haplotypen

Innerhalb der Sektion *Pachystemon* finden wir mit gewissen Einschränkungen die selben Großgruppen wieder, die auch mit der AFLP-Analyse identifiziert und benannt wurden. Deutlich abgrenzbar sind allerdings nur die *hypoleuca*- und die *kingii*-Gruppe, während sich die übrigen Arten in einer sehr diversen *bancana*-Gruppe wiederfinden. Die Arten der *puncticulata*-Gruppe werden erst unter Hinzunahme der Mikrosatelliten in der zweiten Stufe der Netzwerkrekonstruktion von der *bancana s. lt.*-Gruppe abgetrennt. Weniger ausgeprägt ist die Abgrenzung der *motleyana*-Gruppe. Innerhalb der großen *bancana s. str.*-Gruppe wurden insgesamt 58 Akzessionen von 15 Arten untersucht (inklusive *M. spec. C* und *M. spec. D*), die zusammen 25 Haplotypen aufwiesen. Nimmt man *motleyana*- und *bancana s. str.*-Gruppe zusammen, so wurden in den 79 Akzessionen aus 20 Arten (inkl. *M. spec. A, B, C* und *D*) insgesamt 40 Haplotypen gefunden.

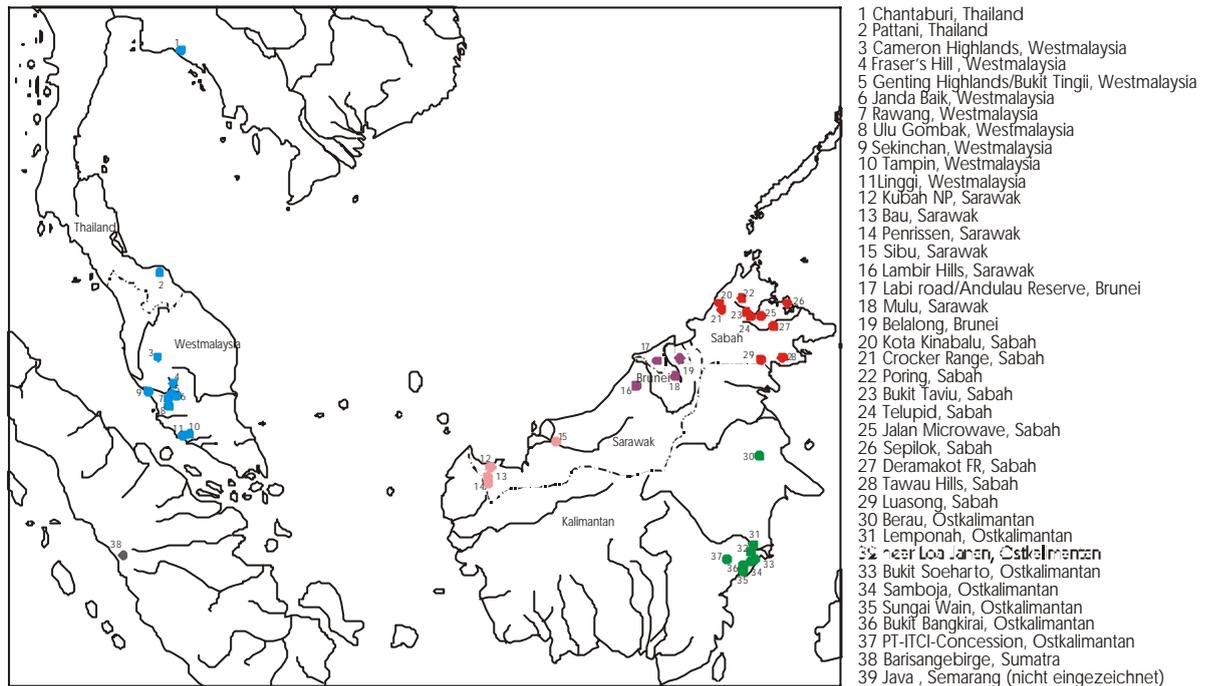
Die Arten der *puncticulata*-Gruppe separieren sich zwar von den Taxa der *bancana s. str.*-Gruppe, bilden aber keine monophyletische Einheit. Die borneensischen Akzessionen *M. puncticulata* und *M. sarcocarpa* (HT 34f, 38 und 34e) gruppieren zusammen, die westmalaysischen *M. puncticulata*-Proben (HT 34c und 39) ebenso, wobei es zwischen den beiden Gruppen fünf unbesetzte Positionen im Netzwerk gibt. Demgegenüber stehen *M. curtisii* (HT 34a). Alle Haplotypen der *puncticulata*-Gruppe zweigen im Netzwerk von *M. triloba* 0431 (HT 34b) ab.

Die *hypoleuca*-Gruppe umfasst acht Haplotypen aus zwei Arten und neun untersuchten Proben, wobei eine Akzession aus Luasong, Sabah ihren HT mit ebenfalls dort vorkommenden Arten der *bancana*-Gruppe teilt. Es gibt zwei weit voneinander weg liegende Ostkalimantan-Proben (HT 17c und 19), zwei nahe beieinander liegende HTs aus Nordostsarawak bzw. Brunei (HT 17b,c) und zwei näher beieinander liegende HTs aus Sabah (HT 17 und 18).

Die *kingii*-Gruppe stellt genau wie die *hypoleuca*-Gruppe eine klar abgegrenzte monophyletische Gruppe dar, mit insgesamt neun Haplotypen bei drei Arten und 10 untersuchten Proben. Nach Maßgabe der Netzwerk-Topologie könnte der Ursprung in Nordostsarawak/Brunei liegen, woraus sich sowohl die Sabah-HTs als auch die Ostkalimantan-HTs entwickelt hätten. An den beiden letztgenannten Standorten kommt ausschließlich *M. lamellata* vor, wohingegen in Nordostsarawak/Brunei alle Arten vorkommen.

Die *bancana*-Gruppe wird deutlich in drei geographisch definierte Gruppen untergliedert (Gruppe I, II und III). Die genaue Herkunft der einzelnen Proben kann sowohl aus Tabelle 2 als auch aus der unten abgebildeten Graphik entnommen werden. Die Gruppe I beinhaltet alle Proben aus Sabah (und zusätzlich eine *M. hypoleuca* aus Luasong, s.o.), Gruppe II setzt sich aus Akzessionen aus Ostkalimantan, Sarawak und Brunei zusammen und die Gruppe III schließlich beinhaltet alle Proben aus Westmalaysia und Thailand sowie eine *M. triloba* aus Java. Die Arten der *bancana*-Gruppe geographisch naher Regionen sitzen generell nah beieinander, unabhängig von ihrer Artzugehörigkeit. Eine Ausnahme hiervon stellt *M. motleyana* dar, deren Haplotypen sich mit Ausnahme der Probe aus Luasong alle nah beieinander befinden, trotz geographisch großer Distanzen (HT 26a, b und 28). Dass es sich tatsächlich um eine geographische Aufteilung einzelner Arten handelt, wird am besten an den weit verbreiteten Arten *M. bancana* und *M. hullettii* deutlich. Die Haplotypen der beiden Arten gruppieren immer gemäß ihrer geographischen Herkunft, wo sie mit ähnlichen oder gar identischen Haplotypen anderer Arten assoziiert vorkommen. Größere Unterschiede findet man innerhalb Westmalaysias und Thailand, und auch die Abtrennung zwischen den festländischen und den borneensischen Akzessionen ist durch vier Schritte deutlich

vollzogen, wobei der tatsächliche evolutive Weg im Unklaren liegt (siehe alternativer grauer Entwicklungspfad in Abbildung 17).



**Abbildung 18: Herkunft der Proben für die phylogeographische Netzwerk-Analyse.** Auf dem Plan nicht dargestellt die *Macaranga triloba*-Probe aus Java.

Bei der Betrachtung der Sabah-Gruppe kann man eine Tendenz zur weiteren Untergliederung erkennen. Die Haplotypen 24a, b, c und 25 kommen mehrheitlich im Osten Sabahs (Crocker Range und Kinabalu) vor und nur vereinzelt im mittleren Teil (Region um Telupid). Die andere Gruppe ist überwiegend auf den westlichen (Luasong, Tawau Hills, Deramakot) und mittleren Teil Sabahs (Region um Telupid, Sepilok) beschränkt. Zwei Haplotypen (HT 45 *M. spec. B*, HT 48 *M. glandibracteolata*) dieser Gruppen stammen aber ebenfalls aus Poring. Auf der Sequenzebene ist diese geographische Auftrennung durch ein Deletionsereignis im *ycf3*-Locus markiert, welches ein exklusives Merkmal für die Haplotypen im Osten Sabahs darstellt.

Außerhalb der Hauptverbreitungsgebiete der myrmekophytischen Sektionen (Halbinsel Malaysia und Borneo) konnten nur wenige Proben anderer Regionen mit in die Untersuchung einbezogen werden. Die beiden *M. griffithiana*-Proben aus Thailand integrieren sich im Netzwerk in den westmalaysischen Teil, wobei *M. griffithiana* 1987 (der am weitesten nördlich vorkommende Myrmekophyt) durch vier Mutationsschritte von dem nächsten Haplotypen weiter im Süden abgegrenzt ist. *Macaranga triloba* aus Java (303, HT 37c) steht nach der vorhandenen Datenlage den westmalaysischen Haplotypen nahe, *M. triloba* aus Sumatra (193, HT 27a) eher den Arten aus Borneo.

Innerhalb der Sektion *Pruinosae* ist keine so eindeutige geographische Aufteilung zu erkennen. In den westmalaysischen Proben kommen lediglich zwei Haplotypen vor (HT 1 und 3), diese sind jedoch nicht exklusiv auf Westmalaysia beschränkt. Zwei Akzessionen von *M. gigantea* und *M. pearsonii* aus Bukit Bangkirai, Ostkalimantan, besitzen ebenfalls Haplotyp 3. Die Akzessionen bzw. Arten aus Sabah nehmen offenbar abgeleitete Positionen ein. Hier sieht es nach einer geographischen Unterteilung aus, ähnlich der Situation innerhalb der Sekt. *Pachystemon*. Während die Haplotypen 8a, b und c (*M. pearsonii*,

*M. puberula*) aus dem Westen Sabahs stammen, kommen HT 6, 3e und f ausschließlich im Osten von Sabah vor (*M. gigantea*, *M. pearsonii*).

Wie schon bei der phylogenetischen Analyse stellt Sekt. *Winklerianae* eine paraphyletische Gruppe dar, deren Akzessionen zwar nach geographischen Standorten unterteilt sind, aber auch durch viele unbesetzte Haplotypen voneinander getrennt sind.

Bewurzelt wurde das Netzwerk unter Zuhilfenahme der phylogenetischen Untersuchungen. Geht man von den Phylogrammen der „maximum parsimony“-Analyse aus, so befindet sich die Wurzel irgendwo zwischen *Pachystemon* und den Außengruppen-Taxa. In dem Netzwerk wurde die Wurzel *M. diepenhorstii* zugeordnet (HT9a), da es sich bei den hier vorliegenden Daten um den basalsten Haplotypen der Außengruppe handelt.

## D Diskussion

### D.1 Methodischer Teil

#### D.1.1 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation wurde regulär nach der sog. CTAB-Methode mit anschließender Polysaccharid-Fällung nach Michaels *et al.* (1994) durchgeführt, für einige Proben auch mit einem kommerziellen Kit der Firma Qiagen (DNeasy Plant DNA Isolation Kit). Für Herbarproben war die CTAB-Methode nur in einzelnen Fällen erfolgreich (z.B. *M. inermis*, *M. suwo*, *M. coriaceae*). Es wurden daher weitere alternative DNA-Isolationsmethoden getestet, was aber in der Regel nicht zu verbesserten Ergebnissen führte (s.u.).

Wie in Abbildung 2 dargestellt, sahen die Ergebnisse der DNA-Isolation, trotz gleichen Alters der Proben und gleicher Isolationsmethode recht unterschiedlich aus. *Macaranga*-Arten besitzen wie alle Pflanzenarten ein weites Spektrum von unterschiedlichen sekundären Inhaltsstoffen, deren Funktionen für die Pflanze nur teilweise bekannt sind (Jang *et al.*, 2004; z.B. Linsenmair *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2003). Es ist denkbar, dass sich solche z.T. artspezifischen Inhaltsstoffe auf die Ausbeute und Qualität der DNA-Präparation bei manchen Arten negativ auswirken, bei anderen hingegen nicht. Aus Tabelle 5 geht hervor, dass z.B. aus *M. motleyana* und *M. griffithiana* bei allen Versuchen hochmolekulare DNA erhalten wurde. Aus Blattmaterial von *M. recurvata* hingegen gelang es mit keiner der angewendeten Methoden, hochmolekulare DNA zu gewinnen. Dies ist möglicherweise auf einen erhöhten Gehalt von Polyphenolen in *M. recurvata* zurückzuführen, da sowohl die Blätter (bei nicht optimaler Lagerung) als auch die DNA-Präparationen regelmäßig braune bis schwarze Verfärbungen aufwiesen. Eine solche Verfärbung ist typisch für oxidierte Polyphenole (z.B. Loomis, 1974). Polyphenole können durch Polyvinylpyrrolidon (PVP) gebunden werden; PVP-40 in einer Konzentration von 1 % war daher ein Routinebestandteil des CTAB-DNA-Isolationspuffers. In einigen Fällen wurde die DNA zusätzlich mit einem wasserunlöslichen PVP-Derivat (Polyclar AT©, Serva, Heidelberg) gereinigt, was eine deutliche Besserung der anschließenden PCR zur Folge hatte.

Auch bei *M. depressa* verlief die DNA-Isolation bei etwas über der Hälfte der Proben unbefriedigend. Hier lagen die Gründe vermutlich anders, denn die DNA-Präparationen waren sehr viskos. Dies könnte auf die Anwesenheit von Polysacchariden hindeuten, die sich nicht nach der Methode von Michaels *et al.* (1994) ausfällen ließen. Von Polysacchariden ist bekannt, dass sie die PCR-Amplifikationen erschweren können (Weising *et al.*, 2005).

Auch die Dauer der Lagerung des Blattmaterials hatte einen Einfluss auf den Erfolg der DNA-Isolation. So wurden ca. 80 % der als positiv gewerteten Isolationen mit Blattproben durchgeführt, die maximal 3 Monate bei -80 °C gelagert worden waren. Längere Lagerungszeiten wirkten sich bei vielen *Macaranga*-Arten negativ auf die Qualität der DNA aus. Bei den gut zu isolierenden Proben sticht insbesondere *M. motleyana* heraus. Bei dieser Art scheint die Lagerung keinen bzw. kaum einen Einfluss auf die Qualität der DNA zu haben. Während der Isolation wurden keine Verfärbungen beobachtet. Hochmolekulare DNA wurde sowohl aus sehr frischem Material erhalten als auch aus Blättern, die mehr als ein Jahr im getrockneten Zustand bei Raumtemperatur aufbewahrt worden waren.

Erfolglos verliefen sowohl Versuche, die Blätter mit 100% Ethanol vorzubehandeln (Adams *et al.*, 1999) als auch die Anwendung einer von Jobs *et al.* (1995) beschriebenen Variante der sog. SDS-Methode. Bei letzterer wurde das Blattmaterial zunächst in einem Puffer

homogenisiert, der die Zellkerne intakt ließ, durch seinen hohen Gehalt an PVP (2 %) jedoch cytoplasmatische Polyphenole effektiv entfernte.

Insgesamt zeigen die verschiedenen Experimente zur Verbesserung der DNA-Isolationsroutine nur geringe Erfolge auf. Die Hauptursache dafür liegt wahrscheinlich in der Art der Behandlung und Aufbewahrung des entsprechenden Pflanzenmaterials von der Aufsammlung bis zur DNA-Isolation. Es war schon früher beobachtet worden, dass frisches Blattmaterial von *Macaranga* oder frisch eingefrorenes Material die besten Resultate bei der DNA-Isolation erbrachte (Bänfer, 1999). Die Schnelltrocknung mit Silicagel nach Chase und Hills (1991) stellt zwar in vielen Fällen eine gute Alternative dar, scheint aber für einige Arten nicht geeignet zu sein. Die unbefriedigend verlaufenen Isolationsversuche aus Herbarproben sowie aus länger gelagerten, mit Silicagel getrockneten Proben legen nahe, dass unter diesen Aufbewahrungsbedingungen ein schneller Abbau der DNA erfolgt, der für die geringen Ausbeuten verantwortlich ist. Die Braunfärbung vieler Proben weist darüber hinaus darauf hin, dass auch eine Oxidation von Polyphenolen stattfindet, mit negativem Einfluss sowohl auf die DNA-Ausbeute als auch auf die Amplifizierbarkeit via PCR. Das Alter von Herbarproben schien kein prinzipielles Problem zu sein, denn in einem Fall war es möglich, auch aus relativ altem Herbarmaterial hochmolekulare DNA zu gewinnen. Schließlich konnten in einigen Fällen DNA-Proben mit Hilfe eines Reparatur-Protokolls (Pusch *et al.*, 1998) wieder soweit hergestellt werden, dass nach einer PCR Chloroplasten-Fragmente bis ca. 450 bp lesbar wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die große Mehrzahl der *Macaranga*-Arten die im Methodenkapitel ausführlich beschriebene Variante des CTAB-Protokolls mit anschließender Polysaccharidreinigung nach Michaels *et al.* (1994) die besten Ergebnisse lieferte. Dies galt für Frischmaterial, tiefgefrorenes Material, mit Silicagel getrocknete Proben und Herbarmaterial.

## D.1.2 AFLP-Analyse

### D.1.2.1 Etablierung und Optimierung der AFLP-Analyse bei *Macaranga*

#### D.1.2.1.1 Restriktion und Ligation

Von dem Gelingen und der Vollständigkeit der Restriktionsverdauung hängt in hohem Maße die Reproduzierbarkeit von AFLP-Ergebnissen ab (Suazo und Hall, 1999; Vos *et al.*, 1995). Wie Pilotversuche zeigten, ist zur vollständigen Restriktion von *Macaranga*-DNA-Proben in dem verwendeten RL-Puffer eine relativ lange Inkubationszeit erforderlich, weswegen alle Ansätze routinemäßig über Nacht verdaut wurden. Trotzdem war bei einigen Proben nach der Agarose-Elektrophorese ein Schmier im hochmolekularen Bereich zu sehen, was auf eine unvollständige Verdauung hinweist. Dieser Umstand könnte ebenso wie die z.T. unbefriedigenden DNA-Isolationsergebnisse (s.o.) auf die Hemmwirkung von sekundären Inhaltsstoffen (vor allem Polyphenole) und von Polysacchariden zurückzuführen sein (Vos *et al.*, 1995; Weising *et al.*, 2005), möglicherweise auch auf den suboptimalen Puffer für die beiden Restriktionsenzyme (Weising *et al.*, 2005). Proben, bei denen Zweifel an der vollständigen Restriktion bestanden, wurden nicht in die weitergehenden Untersuchungen einbezogen.

### D.1.2.1.2 Präamplifikation

Die Präamplifikation zeigte bei allen durchgeführten Optimierungsversuchen ein ähnliches Ergebnis, unabhängig von der Änderung einzelner Parameter. So hatten weder der gewählte Restriktionspuffer, noch die Magnesium-Konzentration im PCR-Ansatz, noch der Zusatz von Additiven (DMSO, TMAC, Triton X-100®) einen erkennbaren Einfluss auf das Ergebnis. Ein Unterschied ergab sich lediglich bezüglich der Heizrate des Thermocyclers. Bei Benutzung eines Thermocyclers mit schneller Heizrate (5 °C/sek.) wurden (lt. Testelektrophorese) mehr Präamplifikationsprodukte erzeugt als bei langsamer Heizrate (0,8 °C/sek.). Dies ist plausibel, da auch das AFLP-Originalprotokoll von Vos *et al.* (1995) auf Geräten mit langsamen Heizraten etabliert wurde und dementsprechend angepasst ist.

### D.1.2.1.3 Amplifikation

Um die selektive Amplifikation zu optimieren und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Untersucht wurde dabei der Einfluss von (1) Änderungen der Restriktion- und Ligationsparameter (Puffer, einzeln oder gemeinsam durchgeführte Restriktion/Ligation), (2) veränderten Bedingungen der Präamplifikation (veränderte Heizrate, Zusatz von Additiven), sowie (3) der selektiven Amplifikation (veränderte Heizrate, Zusatz von Additiven, Verdünnung der Präamplifikation, „Hot Start“-PCR).

Ohne sichtbare Auswirkung auf die selektive Amplifikation blieb die Verwendung der beiden unterschiedlichen Puffer während der Restriktion. Ebenso wenig konnte ein Unterschied zwischen einer getrennt durchgeführten Restriktion/Ligation und einer kombinierten Reaktion erkannt werden (D.1.2.1.1).

Einen deutlichen Einfluss dagegen hatte die Erniedrigung der Heizrate auf 0,8 °C/sec bei der selektiven Amplifikation. Dieser positive Effekt ist vermutlich ebenso wie bei der Präamplifikation darauf zurückzuführen, dass das eingesetzte Protokoll ursprünglich für langsame Thermocycler konzipiert wurde (Vos *et al.*, 1995). Warum eine Abschwächung der Signale bei der Durchführung einer „Hot Start“-PCR aufgetreten ist, kann nicht erklärt werden.

Von den verwendeten PCR-Additiven erbrachten TMAC und DMSO nicht die erhoffte Wirkung, sondern hatten im Gegenteil einen negativen Einfluss auf die Amplifikation. Das in der selektiven Amplifikation zugesetzte TritonX-100® führte hingegen zu intensiveren Banden und hatte damit als einziges eingesetztes Additiv eine positive Wirkung.

Trotz aller Optimierungsversuche ließen sich einige Template gar nicht oder nur schlecht amplifizieren. Oft half eine Wiederholung des Versuchs, oder es wurde – im Falle von einigen mit dem Qiagen-Kit isolierten DNA-Proben – ein zusätzlicher Polysaccharid-Reinigungsschritt vorgeschaltet. Im Falle von *M. depressa* und *M. triloba* half es, die PCR-Produkte aus der Präamplifikation nicht in der standardmäßigen 1:10-Verdünnung, sondern in einer 1:20-Verdünnung für die selektive Amplifikation zu verwenden. Zurückzuführen ist dieser Effekt vermutlich darauf, dass nicht nur die DNA-Menge verdünnt wird, sondern auch die gegebenenfalls im PCR-Produkt vorhandenen Inhibitoren (Weising *et al.*, 2005). Eine 40-fache Verdünnung, wie sie bei Vos *et al.* (1995) beschrieben wurde, erwies sich hingegen als nicht geeignet, vermutlich aufgrund der dann zu geringen DNA-Ausgangsmenge.

Nach erfolgter Etablierung und Optimierung erwies sich die AFLP-Methode für die Gattung *Macaranga* als gut reproduzierbar (siehe Kapitel C.1.2.4), > 95% der AFLP-Banden waren in den Replikaten identisch. Ähnlich hohe Werte wurden zum Beispiel von Myburg *et al.*

(2001) bei *Eucalyptus*, von McGregor *et al.* (2000) bei *Solanum tuberosum* und von Hansen *et al.* (1999) bei der Gattung *Beta* gefunden.

Bezüglich der phylogenetischen Auswertung von AFLP-Daten ist es wichtig, dass eine ausreichend große Anzahl an Merkmalen (d.h. An- bzw. Abwesenheit von Banden an einer bestimmten Position) einbezogen wird. Mit zunehmender Anzahl an Merkmalen fallen zufällige, ungerichtete Fehler weniger ins Gewicht (Skroch und Nienhuis, 1995). Wichtig dabei ist jedoch, dass keine systematischen Fehler auftreten, die sich eventuell potenzieren.

Die Versuche mit den getrennt durchgeführten DNA-Isolationen haben deutlich gezeigt, dass die Auswahl von Proben und Merkmalen entscheidend für den weiteren Verlauf der Versuche sein kann. Bevor daher ausgewählt wurde, welche Templat-DNAs für die phylogenetische Untersuchung letztlich in Betracht kamen, wurden mit allen DNA-Proben Testamplifikationen durchgeführt. Bei Templat-DNAs, die sich schlecht amplifizieren ließen, die aber wichtig für die Probenauswahl waren, wurde versucht durch erneute Reinigung der DNA oder Verdünnung/Erhöhung des eingesetzten Präamplifikats bessere Ergebnisse zu erzielen. Proben, die trotz aller Optimierungsversuche mit mehr als einer Primerkombination letztlich keine Ergebnisse lieferten, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt (siehe hierzu auch D.1.4.1)

#### D.1.2.2 Auswahl der selektiven Primer

Bei den Pilotstudien mit unterschiedlichen Kombinationen von selektiven Primern stellte sich heraus, dass Cytosin (C) als selektive Base auf der ersten (innersten) Position generell bessere Ergebnisse lieferte als Adenosin (A). Die Gründe hierfür sind nicht klar, dieser Effekt wurde jedoch auch bei anderen Pflanzengattungen beobachtet (z.B. bei Arten der Gattung *Fosterella*, Bromeliaceae; M. Rex, pers. Mitt.). In den meisten Fällen zeigten die mit A als selektierende Base generierten Muster schwächere und schlechter interpretierbare Bandenmuster bei ungefähr gleicher Gesamtzahl von Banden. Nur zwei der acht für die phylogenetische Studie ausgewählten Primer-Kombinationen besitzen ein A als erste selektive Base. Möglicherweise funktionieren Primer mit A am 3'-Ende generell schlechter. Aufgrund der drei Wasserstoffbrücken in einem GC-Paar (gegenüber zwei in einem AT-Paar) wird ja beim Primer-Design im allgemeinen empfohlen, ein C oder G an das 3'-Ende zu setzen.

#### D.1.2.3 Auswahl der DNA-Proben

Hochmolekulare und saubere DNA lieferte generell auch gute Ergebnisse bei der AFLP-Analyse (z. B. *M. motleyana*). Arten wie *M. depressa*, die reich an Polysacchariden sind, ließen sich dagegen häufig nur schlecht oder gar nicht amplifizieren. Wenn die selektive Amplifikation nicht optimal funktioniert, kann man davon ausgehen, dass schon bei den vorherigen Schritten (Restriktion, Ligation, Präamplifikation) Schwierigkeiten aufgetreten sind. Interessant sind gruppenspezifische Unterschiede, die in diesem Zusammenhang beobachtet wurden. Zum Beispiel lieferten die Arten der *kingii*- und der *hypoleuca*-Gruppe durchweg klare, gut interpretierbare Bandenmuster. Diese Übereinstimmungen sind möglicherweise auf den unterschiedlichen Gehalt von PCR-Inhibitoren (Zusammensetzung von sekundären Inhaltsstoffen) in den verschiedenen taxonomischen Gruppen zurückzuführen. Myrmekophyten und Nichtmyrmekophyten hingegen unterschieden sich in dieser Hinsicht nicht. So wies die nicht myrmekophytische *M. depressa* aus der Sektion *Pachystemon* durchweg weniger gute Ergebnisse auf als die nicht myrmekophytische *M. gigantea* aus der Sektion *Pruinosae*. Von einigen nicht myrmekophytischen *Macaranga*-

Arten ist bekannt, dass sie einen im Vergleich zu Myrmekophyten erhöhten Gehalt an sekundären Inhaltsstoffen aufweisen (Eck *et al.*, 2001; Heil *et al.*, 1999; Heil *et al.*, 2002). Diese scheinen jedoch die Arbeit der bei der AFLP-Analyse verwendeten Enzyme (Restriktionsendonukleasen, *Taq*-Polymerase) nicht generell zu behindern. Da von den meisten *Macaranga*-Arten nur wenig über ihre sekundären Inhaltsstoffe bekannt ist, kann auch keine Optimierungsstrategie für bestimmte Arten empfohlen werden.

Anzahl und Qualität von AFLP-Banden sind u.a. von der Anzahl der selektiven Basen am 3'-Ende der verwendeten Primerpaare, von der Größe des Genoms und vom Ploidiegrad abhängig (Fay *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde standardmäßig mit jeweils 3 selektiven Basen an beiden Primern gearbeitet (+3/+3). Da bei *Macaranga* keine Polyloidie bekannt, noch ein auffallend großes Genom vorhanden ist (Whitmore *et al.*, 1970 und Dr. F. Blattner pers. Komm.) Diese Kombination führte bei *Macaranga* zu Bandenmustern mit gut auswertbarer Komplexität. Bei Arten mit kleinen Genomen ist es ratsam, die Anzahl selektiver Basen zu verringern (z.B. +2/+3), wohingegen für größere Genome ggf. eine Erhöhung der Anzahl zu einer Verbesserung der Ergebnisse führt (z.B. +3/+4).

#### D.1.2.4 Auswertung der AFLP-Daten

Bei der Konvertierung der AFLP-Bandenmuster in eine binäre Merkmalsmatrix wurden nur Banden, die eindeutig bestimmt werden konnten, in die phylogenetische Analyse miteinbezogen. Bei kräftigen Banden konnten noch Fragmente mit Längen-Unterschieden von nur 1 bp differenziert werden. Unklare, verwaschene und aus anderen Gründen nicht deutlich erkennbare Banden wurden nicht in die Datenmatrix aufgenommen, wie es bereits Yang und Quiros (1993) für RAPDs und Hodkinson *et al.* (2000) für AFLPs empfohlen haben. Vereinzelt ist es nach mehrmaligen Versuchen nicht gelungen, AFLPs einer bestimmten Templat-DNA mit einer bestimmten Primer-Kombination zu erzeugen. Wenn dies für mehr als eine der acht eingesetzten Kombinationen der Fall war, wurde die entsprechende Probe aus dem Datensatz herausgenommen. Kam es nur einmal vor, so wurde der fehlende Datensatz mit einer „4“ für „unklares Ergebnis“ kodiert (Schutt *et al.*, 1997). Eine vergleichende Auswertung zeigte, dass unklare Daten bei der vorhandenen Datenlage keinen nennenswerten Einfluss auf das Gesamtergebnis hatten, wenn sie vereinzelt im Datensatz auftauchten. Um ein möglichst breites Artenspektrum in die Analyse einzubeziehen, wurden solche Proben daher mitberücksichtigt.

Für die graphische Auswertung der AFLP-Daten wurden sowohl phänetische (UPGMA und NJ-Analyse) als auch kladistische Methoden (MP) eingesetzt. Die NJ-Analyse wurde alternativ mit TREECON und PAUP gerechnet, wobei übereinstimmende Ergebnisse erzielt wurden. Gut gestützte Artengruppen konnten in der Regel sowohl durch phänetische als auch kladistische Methoden identifiziert werden, wobei die Phänogramme generell besser aufgelöst waren als die Kladogramme. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen Pflanzenarten gemacht (Després *et al.*, 2003; z.B. Kardolus *et al.*, 1998; Koopman *et al.*, 2001). Unterschiede in der Topologie von Phäno- vs. Kladogrammen ergaben sich vor allem bei Gruppen, die in keinem der beiden Bäume eine gute statistische Abstützung über „Bootstrap“-Werte erhielten. Verschiedenartige Auswertungen können also als zusätzliche Absicherung für die gefundenen Gruppen gesehen werden.

### D.1.3 Eignung verschiedener Chloroplasten-Regionen für die phylogenetische Analyse von *Macaranga*-Arten

#### D.1.3.1 Die Loci *trnS-trnG*, *ndhD-ndhE* und *psbB-psbH*

Die zwei Loci *trnS-trnG*, *ndhD-ndhE* ließen sich für *Macaranga*-Arten generell schlecht amplifizieren. Der Locus *psbB-psbH* ließ sich zwar überwiegend amplifizieren, eine vergleichende Sequenzierung zeigte aber eine für phylogenetische und phylogeographische Untersuchungen der myrmekophytischen *Macaranga*-Arten zu große Übereinstimmung (Heidsieck, 2002). Die schlechte Amplifizierbarkeit kann möglicherweise auf Variationen innerhalb der Bindestellen der Primerpaare zurückzuführen sein, die ja nicht für *Macaranga* entwickelt worden waren. Die drei Loci wurden aus den weitergehenden Analysen ausgeschlossen.

#### D.1.3.2 Die Region zwischen *psbA* und *trnH*

Die intergenische Region zwischen *psbA* und *trnH* wurde bisher bei vielen Taxa erfolgreich für phylogenetische Fragestellungen eingesetzt (Azuma *et al.*, 1999; Chandler *et al.*, 2001; Sang *et al.*, 1997). Bei *Macaranga* erwies sich die Region jedoch als ungeeignet. Probleme bereiteten vor allem lange, AT-reiche Sequenzabschnitte, die kein eindeutiges Alignment zuließen. Punktmutationen hingegen traten innerhalb der Sektion *Pachystemon* nur vereinzelt auf. Die große Variabilität in diesem Bereich kann direkt mit dem hohen AT-Gehalt zusammen hängen, da AT-reiche Sequenzen die Mutationshäufigkeit fördern (Morton, 1995) und bei direkter Nachbarschaft zu einer Base auch Einfluss auf das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen nehmen.

Der Bereich zwischen *psbA* und *trnH* gilt allgemein als Hotspot für strukturelle Mutationen wie Insertionen, Deletionen und Inversionen (Mes *et al.*, 2000; Sang *et al.*, 1997). Die in solchen Bereichen häufig (und auch bei *Macaranga*) auftretenden kurzen Indels sind phylogenetisch meist nicht einsetzbar, u.a. wegen erhöhter Homoplasiegefahr durch die Bildung von Haarnadelstrukturen (Mes *et al.*, 2000). Vermeintliche Punktmutationen in solchen Bereichen können in Wirklichkeit durch Inversionen bedingt sein. Die wenigen Punktmutationen innerhalb dieses Locus bei *Macaranga* sind daher mit Vorbehalt zu betrachten, was auch auf die Entscheidung mitwirkte, diesen Bereich nicht für die phylogenetischen Untersuchungen zu verwenden.

#### D.1.3.3 Der *atpB-rbcL*-Bereich

Der *atpB-rbcL*-Locus erwies sich als gut geeignet für die Abtrennung von *Mallotus* und *Macaranga* sowie für die Auftrennung der *Mallotus*-Arten in einzelne Gruppen. Innerhalb von *Macaranga* war die Anzahl von polymorphen Merkmalen sehr gering. Trotzdem wurden einige Artengruppen recht gut durch „Bootstrap“-Werte unterstützt; und der *atpB-rbcL*-Baum weist insgesamt einen hohen CI-Wert auf. Eine vergleichsweise geringe Variation des *atpB-rbcL*-Locus wurde auch bei anderen Pflanzenarten beobachtet (z.B. Cuenoud *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000).

Es gibt auch kritische Stimmen diesem Locus gegenüber, da er häufig genauso viele Insertions- und Deletionsereignissen wie Punktmutationen und außerdem häufig (Clegg und Zurawski, 1992) poly-A/T-Sequenzen aufweist (Golenberg *et al.* 1993). Savolainen *et al.* (1997) konnten allerdings zeigen, dass innerhalb der Ordnung *Celastrales* mehr als 60 % der gefundenen Indels Autapomorphien darstellen, die nicht mehr und nicht weniger

homoplastisch als Nukleotid-Substitutionen sind. Nach den Beobachtungen innerhalb des vorliegenden Datensatzes trifft das auch auf *Macaranga* und *Mallotus* zu, in denen fast ebenso viele Indels wie Punktmutationen als spezifische also nicht homoplastische Merkmale für einzelne Gruppen auftreten. In *Macaranga* ist der *atpB-rbcL*-Locus außerdem nicht durch kurze Basenwiederholungen, sondern durch längere Insertionen und Deletionen gekennzeichnet (näheres zum Umgang mit Indels im Kapitel D.1.4.2.2).

#### D.1.3.4 Der Bereich zwischen *psbI* und *trnS* („ccmp2-Locus“)

Aufgrund der relativ geringen Anzahl von Mutationen wurde der größte Teil des *trnQ-trnS*-Spacers von der Analyse der myrmekophytischen *Macaranga*-Arten ausgeschlossen. An dieser Stelle sollen nur einige Anmerkungen zu dem kurzen Abschnitt zwischen den Genen *psbI* und *trnS* gemacht werden.

Das Alignment des Abschnitts zwischen dem *psbI*- und dem *trnS*-Gen wies bei *Macaranga* große und verschachtelte Insertions/Deletionsereignisse auf. Diese hatten zur Folge, dass bei der phylogenetischen Analyse erhebliche Schwierigkeiten auftraten, die nach Beendigung der Pilotstudie noch nicht abzusehen waren, da die Pilotstudien vorwiegend mit Arten der Sektion *Pachystemon* durchgeführt worden waren. Beim Hinzufügen weiter entfernter Arten wurde es jedoch immer schwieriger, entsprechende Positionen zu homologisieren, so dass es letztlich nicht möglich war, ein eindeutiges Alignment über alle Arten hinweg zu erstellen.

Der *psbI-trnS*-Locus ist bekanntermaßen ein sehr variabler Bereich des Chloroplastengenoms, der bei vielen Pflanzenfamilien Mikrosatelliten vom poly A/T enthält. Das von Weising und Gardner (1998) beschriebene Primerpaar *ccmp2* rahmt diesen Locus ein; er wird daher im folgenden auch als „*ccmp2*“-Locus bezeichnet. Ausgedehnte hypervariable Bereiche, wie sie bei diesem Locus auftauchen, können ein Hinweis auf interne Rekombinationsereignisse sein, die sich durch kurze Inversionen oder „inverted repeats“ bemerkbar machen (Kelchner und Wendel, 1996; Mes *et al.*, 2000). Sekundärstrukturen mit sehr großen Schleifenbildungen sind häufig assoziiert mit Regionen chaotischer oder labiler Längenvariationen die teilweise mehrfach unabhängig (homoplastisch) entstehen können.

Auch der hohe AT-Gehalt des *ccmp2*-Locus von ca. 85 % ist ein Hinweis auf hohe Variabilität, wie es schon für den *psbA-trnH*-Spacer diskutiert wurde (D.1.3.2) Bei der phylogenetischen Auswertung der gewonnenen Sequenzen wurden dem hohem Homoplasierisiko insofern Aufmerksamkeit geschenkt, als dass Längenvariationen im Sequenzabschnitt zwischen 42 und 130 bp (siehe elektronischer Anhang; *ccmp2MP.txt*) nur mit dem Faktor 0,5 in die Berechnungen einbezogen wurden (siehe auch Kapitel B.2.7.2.2), wie es im PAUP-Handbuch für ähnlich gelagerte Fälle empfohlen wird. Bei diesen beiden Loci konnte nicht genau geklärt werden, ob es sich tatsächlich um zwei unabhängige Merkmale handelte oder um eins. Auch bei der Interpretation der Daten für die phylogeographische Auswertung im Rahmen der Netzwerkrekonstruktion wurde eine Gewichtung der verschiedenen Indels vorgenommen (vgl. Kapitel B.2.7.2.3).

Die größten Unterschiede am *ccmp2*-Locus traten erwartungsgemäß beim Vergleich der *Macaranga*-Sequenzen mit den *Mallotus*-Sequenzen auf. Neben konservierten Bereichen im letzten Viertel der Sequenz, zeigten die Arten der Gattung *Mallotus* auch untereinander große Differenzen. Für drei Arten (*Mallotus lackeyi*, *Mallotus miquelianus* und *Mallotus wrayi*) war es nicht möglich, ein Alignment der Sequenzen mit den restlichen Arten zu erzeugen. Die großen *ccmp2*-Sequenzunterschiede innerhalb von *Mallotus* stehen im Einklang mit dem vermutlich hohen Alter der Gattung von 50 Mio. Jahren (Gruas-

Cavagnetto und Köhler, 1992; Martin, 1978) und auch mit der großen morphologischen Divergenz der untersuchten Arten (Slik und van Welzen, 2001).

#### D.1.3.5 Verwendung des „ccmp6“-Locus für die phylogeographische Analyse: ein Mikrosatelliten-Hotspot

Aufgrund der geringen Länge des Sequenzabschnitts lieferte der gleichfalls von Weising und Gardner (1999) beschriebene „ccmp6“-Bereich im ersten *ycf3*-Intron nicht genügend Information für eine phylogenetische Analyse der *Macaranga*-Arten. Für die Erstellung genetischer Netzwerke im Rahmen der phylogeographischen Studie war dieser Locus jedoch ebenso wie der *ccmp2*-Locus hervorragend geeignet. Die beiden in diesem Bereich enthaltenen Mikrosatelliten waren in unterschiedlichem Maße variabel: Es traten keine Schwierigkeiten bei Sequenzierung und Alignment auf.

### D.1.4 Kritische Betrachtung der gewählten Methoden

#### D.1.4.1 AFLP-Analyse

Alle molekularen Markermethoden, zu denen auch die AFLP-Analyse gehört, müssen sich der Frage nach der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stellen. Aus diesem Grund gibt es zu diesem Thema zahlreiche Studien, die entweder nur die AFLPs (z.B. Hongtrakul *et al.*, 1997; Myburg *et al.*, 2001; z.B. Vos *et al.*, 1995) oder auch verschiedene Markermethoden im Vergleich hinsichtlich der Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersuchten (z.B. Jones *et al.*, 1997; McGregor *et al.*, 2000). Mit einer Reproduktionswahrscheinlichkeit von meist über 99 % schneidet die AFLP-Methode unter den diversen anonymen Markermethoden (z. B. RAPDs, Williams *et al.*, 1990); hervorragend ab. Dennoch ist es generell empfehlenswert, Duplikations- und Reproduktionsstudien für die zu untersuchenden Taxa durchzuführen. Auch bei *Macaranga* konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit exemplarisch nachgewiesen werden, dass eine gute Reproduzierbarkeit der AFLP-Daten gegeben ist. Es wurde daher darauf verzichtet, alle Versuche doppelt durchzuführen (Potokina *et al.*, 2002).

Auch bei einer groß angelegten Studie ist weiterhin darauf zu achten, dass möglichst mehrere Proben einer Art in die Studie einbezogen werden. Nur so kann überprüft werden, ob eine Art ein Monophylum darstellt bzw. Artabgrenzungen durch AFLPs unterstützt werden. Durch Heterozygotie könnten sonst Verfälschungen im Dendrogramm auftreten (z.B. Kardolus *et al.*, 1998). Ein großer Teil der Variation von AFLP-Banden tritt gewöhnlich innerhalb einer Art auf, dieser Umstand ist verantwortlich für die meist großen terminalen Astlängen in den Dendrogrammen. Besonders deutlich zeigt sich dies innerhalb der *bancana*-Gruppe.

Ein spezifisches Problem von AFLPs können auch nicht vollständig verdaute DNA-Isolate sein. Für die AFLP-Analyse sollte daher möglichst hochmolekulare und reine DNA verwendet werden (Vos *et al.*, 1995). Die Reinheit ist auch für die Amplifikation wichtig, da die *Taq*-Polymerase auf Verunreinigungen häufig empfindlich reagiert und gehemmt werden kann. Schwächere Banden werden dann eventuell in einzelnen Proben gar nicht amplifiziert bzw. detektiert, was zu Auswertefehlern führt.

Fehler in der Auswertung können aber auch aus anderen Gründen auftreten. Eine Hauptursache für Fehlinterpretationen ist die irrtümliche Wertung nicht homologer, bei der Elektrophorese zufällig auf gleicher Höhe laufender („komigrierender“) Banden als

gemeinsames Merkmal. Bei einer Untersuchung an der Kartoffel (Roupe van der Voort *et al.*, 1997) wurde gezeigt, dass dieses Problem bei nahen Verwandten nur eine geringe Rolle spielt. Mit zunehmendem taxonomischen Abstand zwischen den untersuchten Taxa nimmt die Gefahr der Falschinterpretation jedoch erheblich zu. Schutt *et al.* (1997) empfahlen daher, in unsicheren Fällen ein Merkmal als unklar zu kennzeichnen (Merkmalszustand „4“). Stimmen zwei komplexe Fragmentmuster in zahlreichen Banden überein, ist auch die Homologiewahrscheinlichkeit für das einzelne Fragment höher. Der bei AFLPs generell geringe CI-Wert beruht auf der oft geringen Homologiewahrscheinlichkeit einiger Merkmale (Després *et al.*, 2003). Die Fragmente als Merkmale sind außerdem nicht notwendigerweise voneinander unabhängig, was eigentlich eine Grundannahme bei der Auswertung ist.

Eine weitere Art von Auswertefehler hängt mit der Größe der Fragmente zusammen. So sind Banden > 450 bp häufig in einzelnen Bahnen so schwach, dass falsche Polymorphismen produziert werden. Niedermolekulare Banden wiederum können Primer-Peaks darstellen und laufen überdies oft zufällig auf gleicher Höhe, ohne homolog zueinander zu sein (s.o.). Um solche Fehler zu vermeiden, haben Potokina *et al.* (2002) empfohlen, nur Banden zwischen 100 und 400 bp zu werten. Bei *Macaranga* wurden nur Merkmale in die Auswertung einbezogen, die größer als 50 bp und < 500 bp waren.

Bei der phylogenetischen Arbeit mit molekularen Markern, wie es die AFLPs darstellen, ist es außerdem besonders wichtig, eine ausreichend große Anzahl von Merkmalen zu analysieren. Die Zuverlässigkeit der gewonnenen Daten pendelt sich mit zunehmender Anzahl von Merkmalen auf einem Plateau ein. Eine weitere Hinzunahme von Merkmalen führt dann nicht mehr zu einer signifikanten Veränderung der resultierenden Baumtopologie. Schon Skroch und Nienhuis (1995) konnten bei RAPDs zeigen, dass Zählfehler von 2% bei einer Reproduzierbarkeit der Merkmale von nur 76% keinen Einfluss auf die Baumtopologie hatten. Bei der Interpretation der phänetisch und kladistisch gewonnenen Dendrogramme muss man davon ausgehen, dass sich Fehler bei der Erstellung der Matrix in beiden Methoden gleich auswirken. Stabile Gruppen mit einer guten statistischen Absicherung kann man mit beiden Methoden eindeutig bestimmen. Nur diesen Gruppen sollte man auch ein phylogenetisches Gewicht beimessen (Koopman *et al.*, 2001).

#### D.1.4.2 Kritische Betrachtung zur DNA-Sequenzierung und zu den verwendeten Auswertemethoden

Während klassisch-morphologisch arbeitende Systematiker lange Zeit an der Aussagekraft molekularer Daten zweifelten, hat sich die Sequenzierung von Kern- oder Organellen-DNA mittlerweile bei allen Organismen etabliert (z.B. Clegg und Zurawski, 1992; z.B. Felsenstein, 1988; Savolainen und Chase, 2003). Viele Systematiker gehen davon aus, dass die Aussagekraft der direkten DNA-Sequenzierung über diejenige von molekularen Markermethoden, wie es z. B. AFLPs darstellen, hinausgeht. Eine solche Auffassung lässt sich aber durchaus kontrovers diskutieren. Obwohl man bei der DNA-Sequenzierung direkt die Nukleotidabfolge eines bestimmten Bereichs sieht, können sowohl die evolutiv richtige Homologisierung der einzelnen Basen im Alignment als auch die Gewichtung der Merkmale erhebliche Probleme im Rahmen einer phylogenetischen Analyse bereiten.

##### D.1.4.2.1 Alignment von Nukleotid-Daten

Die Erstellung eines Alignments ist einer der entscheidenden Schritte in der DNA-basierten Verwandtschaftsanalyse und kann mehr Einfluss auf die Baumtopologie haben als die Anwendung alternativer Methoden zur Berechnung der Bäume. Das grundlegende Problem

aller Alignment-Methoden ist, dass ein Optimierungsverfahren nicht unbedingt den tatsächlichen Verlauf der Phylogenese rekonstruieren muss. Meist wird ein multiples Alignment-Verfahren eingesetzt (Beispiele siehe Wheeler, 1996). Bei einigen Alignment-Programmen ist es auch möglich, die unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten von Transversionen vs. Transitionen mit einfließen zu lassen.

Am Computer generierte Alignments sollten aufgrund der Probleme bei der Handhabung längerer Indels und Mikrosatelliten immer visuell kontrolliert und editiert werden. Oberste Priorität bei der manuellen Editierung ist eine möglichst objektive Beurteilung der vorhandenen Sequenzen. Insbesondere bei nichtkodierenden Bereichen muss dabei verstärkt auf mögliche strukturelle Zwänge geachtet werden (siehe folgendes Kapitel). Es besteht sonst die Gefahr, dass eine einzige Punktmutation in einer Haarnadelstruktur, die mehrere Mutationen nach sich zieht, fälschlicherweise als mehrere Merkmale gewertet wird. Weiterhin sollte man darauf achten, ob Sequenzen in der Umgebung von Indels gewisse Anomalien in Form von direkten Wiederholungseinheiten aufweisen (Mes *et al.*, 2000).

#### D.1.4.2.2 Insertionen/Deletionen

Das Einbeziehen von Indels, wie es bei der Chloroplasten-Sequenzierung von *Macaranga* vorgenommen wurde, kann zwar wichtige Informationen liefern, aber auch aufgrund der teilweise höheren Homoplasiewahrscheinlichkeit zu Fehlinterpretationen führen. Kurze Indels in der Größenordnung von wenigen Basenpaaren treten häufig durch Fehler bei der Replikation der DNA auf, während längere Indels überwiegend durch ungleiches „crossing-over“ entstehen (Li, 1997). Indels in nicht kodierenden Bereichen können auch aufgrund von Haarnadelstrukturen entstehen (Sang *et al.*, 1997). Häufig werden Indelbereiche, die im Alignment nicht eindeutig zu interpretieren sind, bei der phylogenetischen Interpretation ausgeschlossen (Yang, 1997; Yang und Rannala, 1997). Werden Indels in die Bewertung mit einbezogen, so können sie bei den meisten Programmen wahlweise als fehlende Merkmale, als fünftes Merkmal oder in Form einer separaten meist binären Datenmatrix (Anwesenheit vs. Abwesenheit) dem übrigen Alignment hinzugefügt werden (Simmons und Ochoterena, 2000). Viele Wissenschaftler sind sich einig darüber, dass ein Großteil der Insertions/Deletionsereignisse, auch die sehr variablen, phylogenetisch relevant sind (z.B. Giribet und Wheeler, 1999; Mes *et al.*, 2000; Simmons *et al.*, 2001; z.B. Wheeler, 1996), und ihr Ausschluss zu einer Fehlinterpretation der tatsächlichen Evolution einer Gruppe führen kann. Bis heute ist die Evolution von Indels allerdings unzureichend aufgeklärt; es existieren lediglich Modelle, wie und unter welchen Bedingungen Indels in die Bewertung einbezogen werden können (z.B. Giribet und Wheeler, 1999; Kelchner, 2000; Lee, 2001; Phillips *et al.*, 2000; Simmons und Ochoterena, 2000; Wägele, 2000).

Grundsätzlich ist bei Indelereignissen eine genaue Analyse der sie einschließenden Sequenzstrukturen notwendig, um eventuell existierende Haarnadelstrukturen identifizieren zu können. (Mes *et al.*, 2000). Darüber hinaus kommen Indelereignisse in nicht kodierenden, AT-reichen Regionen häufiger vor als in anders strukturierten Regionen der Chloroplasten-DNA (Gielly *et al.* 1996) und kurze Indels sind mit einer höheren Wahrscheinlichkeit homoplastisch (van Ham *et al.*, 1994).

Für die phylogenetische Auswertung der Chloroplasten-Daten dieser Arbeit wurden die Indels separat kodiert und an das Alignment angehängt. Hochvariable Bereiche, wie sie im *ccmp2*-Locus gegeben sind, wurden als ein Indel mit unterschiedlichen Merkmalszuständen gewertet (siehe Datei im elektronischen Anhang; „*ccmp2MP.txt*“). Auf diese Art und Weise können zwar theoretisch phylogenetische Aussagen verloren gehen; der Vorteil liegt jedoch darin, dass 100 % identische synapomorphe Allele in die Wertung einbezogen werden

können, ohne durch homoplastische Signale Verfälschungen in die Berechnung einfließen zu lassen.

Probleme bei der Bewertung auf höherer taxonomischer Ebene, wie sie zum Beispiel von Golenberg *et al.* (1993) beschrieben wurden, machten sich bei einigen *Mallotus*-Arten bemerkbar. Aufgrund einer Vielzahl an Indelereignissen war es bei diesen Arten nicht möglich, eine Homologisierung mit dem übrigen Alignment durchzuführen; sie mussten daher aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Insbesondere innerhalb des *atpB-rbcL*-Spacers gab es aber auch einige Indels, die, obwohl es sich um einfache Duplikationen handelte, von hoher phylogenetischer Relevanz sind und singuläre Ereignisse darstellen.

#### D.1.4.2.3 Schwierigkeiten mit der Erstellung und Interpretierung von Phylogrammen

Die nächste Hürde stellt die Erstellung eines Phylogramms auf der Basis eines Sequenzalignments dar (Pol und Siddall, 2001). Zum einen gibt es mehrere, prinzipiell unterschiedliche Vorhergehensweisen zur Baumkonstruktion (z.B. „Maximum Parsimony“ = Maximale Sparsamkeit, Maximum Likelihood, Bayes'sche Methode). Zum anderen bietet jede dieser Methoden unterschiedliche Algorithmen an, um eine Berechnung zu optimieren (z.B. ACCTRAN und DELTRAN bei der MP-Analyse mit dem Programmpaket PAUP). Am Anfang steht daher immer die Frage nach der oder den geeigneten Methode(n) (bei entsprechender Rechnerkapazität ist der Einsatz mehrerer, verschiedener Methoden anzuraten). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Erstellung der Phylogramme anhand der Chloroplasten-Daten die Maximum Parsimony (MP)-Methode herangezogen. Ein wesentlicher Grund hierbei war die Möglichkeit der Einbeziehung der Vielzahl an Indels, die einen hohen Informationsgehalt aufwiesen.

MP-Bäume können durch multiple Substitutionen und Variationen in der Evolutionsrate zwischen individuellen Merkmalen verschoben werden (Clegg, 1993; Korall und Kenrick, 2004; Vrana und Wheeler, 1996). Beachtet man das nicht und wertet alle Merkmale gleich, so können die wenigen markanten Merkmale unter einer Vielzahl homoplastischer Merkmale verloren gehen, und der daraus resultierende Baum würde ebenfalls nur eine geringe Auflösung zeigen. Will man stattdessen eine Wertung für bestimmte Merkmale herauf- oder herabsetzen, besteht das Risiko einer Fehlinterpretation aufgrund eines „subjektiven“ Bildes der Gruppenzugehörigkeit. Während phänomenologisch arbeitende Systematiker eine Abschätzung der Homologie-Wahrscheinlichkeit in die Analyse einbringen, indem sie ein „wertvolles“ Merkmal höher wichten, schließen Verfechter der phänetischen Kladistik explizit eine phänomenologische Merkmalsanalyse aus (Wägele, 2000). Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurde dem phänomenologischen Ansatz gefolgt und eine Reduzierung der Wichtigkeit zweier offensichtlich homoplastischer Merkmale vorgenommen.

Auch Transitionen und Transversionen können nicht pauschal unterschiedlich gewichtet werden, wie es bei einigen Berechnungsmodi vorgesehen ist. Wie schon erwähnt wurde, finden Punktmutationen an bestimmten Stellen häufiger statt als an anderen und werden zudem beeinflusst durch die umliegenden Nukleotide (z.B. Morton, 1995; Morton *et al.*, 1997; Savolainen *et al.*, 1997). Bei der MP-Analyse besteht schließlich die Fehlermöglichkeit, dass nicht notwendigerweise der kürzeste Baum oder die kürzesten Bäume gefunden werden, da bei mehr als acht Taxa eine heuristische Suche durchgeführt wird und nicht alle möglichen Wege überprüft werden können.

Eine alternative Methode, die auf dem tatsächlichen Datensatz beruht, stellt das „Maximum likelihood“ (ML)-Verfahren dar. Bei dieser Methode wird aus einer Vielzahl von Bäumen

derjenige Baum berechnet, der unter Annahme eines wählbaren Evolutionsmodells den tatsächlichen Datensatz mit der höchsten *a priori*-Wahrscheinlichkeit widerspiegelt. Die mit der ML-Methode verbundenen Berechnungen sind sehr rechenintensiv, weshalb die Computerkapazitäten bzw. die Zeit einen limitierenden Faktor darstellen. In letzter Zeit wird vermehrt auch die Berechnung von Kladogrammen mit Hilfe einer auf den Bayes'schen Theoremen basierenden Methode angewandt (Brouat *et al.*, 2004; Renner, 2004; Renner und Zhang, 2004; Renner *et al.*, 2004). Dabei wird ein Baum gesucht, der einer maximale *a posteriori*-Wahrscheinlichkeit aufweist (Huelsenbeck und Ronquist, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Methoden aber nicht eingesetzt.

Bei nahe verwandten Arten die vermutlich eine schnelle Radiation durchgemacht haben scheitern klassische Methoden, die ein Dendrogramm zur Interpretation heranziehen häufig (Després *et al.*, 2003; Pelsler *et al.*, 2003). Hier liegt das Kernproblem dieser Methoden, die davon ausgeht, dass aus einer Ausgangsart immer nur zwei neue Arten entstehen, während die ursprüngliche Art aufhört zu existieren. Gerade bei schneller Einnischung und zeitgleichen Speziationsereignissen kann es aber möglich sein, dass mehrere Arten zur gleichen Zeit entstehen. Ein Hinweis darauf können polytome Verzweigungen innerhalb eines Dendrogrammes sein, trotz eigentlich großer Sequenzunterschiede. Polytomien können aber auch Homoplasien in der verwendeten Datenmatrix widerspiegeln. Ursachen für Homoplasien können (a) evolutive Konvergenz (Ähnlichkeit durch Anpassung an die selben Umweltfaktoren), (b) Analogie (zufällige Übereinstimmung), (c) horizontaler Gentransfer und (d) Fehlbestimmung von nur oberflächlich ähnlich aussehende Strukturen als Homologie (Givnish und Sysmsma, 1997) sein.

Um bei Chloroplasten-Sequenzierungen trotz schneller Radiation und einer nur geringen Anzahl an informativen Polymorphismen Aussagen über die Evolution der Organismen zu treffen, kann neben der Erstellung eines Dendrogramms auch eine Netzwerk-Analyse der Daten sinnvoll sein, wie sie im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen wurde (siehe Kapitel C.3).

#### D.1.4.3 Statistische Absicherung als Beweis einer speziellen Topologie?

In der Regel wird einem Phylogramm nur dann vertraut, wenn (1) ein gut aufgelöster strikter Konsensus-Baum vorliegt und (2) die einzelnen Gruppen durch unterschiedliche statistische Methoden unterstützt werden. Dies bedeutet jedoch keinesfalls, dass ein Baum die tatsächliche Phylogenie auch wirklich widerspiegelt. Ein guter „Bootstrap“-Wert belegt bestenfalls, dass die mit einer bestimmten Methode berechneten Topologie die Information im Datensatz gut wiedergibt (Wägele, 2000). Sowohl die Auflösung des strikten Konsensus-Baums, als auch die Höhe der „Bootstrap“-Werte sind abhängig von der Anzahl der Taxa, der Gesamtzahl der Merkmale und dem Anteil der Synapomorphien. Wenn zu wenig wertbare Merkmale vorliegen, muss der „Bootstrap“-Wert aufgrund seines zufälligen Charakters (siehe Kap. B.2.8.1) notwendigerweise niedrig ausfallen. Bei dem strikten Konsensus-Baum kommt hinzu, dass schon bei einer nicht identischen Verknüpfung bestimmter Taxa die Gruppe in sich zusammenbricht („kollabiert“). Bei einer Analyse mit über 40.000 Einzelbäumen, wie in dem vorliegenden Fall, führt das zwangsweise zu einer Unterbewertung bestimmter Gruppen. Von daher wurde für das Chloroplasten-Phylogramm ein 50 % „Majority rule“ Konsensus-Baum gewählt. Im Gegensatz zum „Strict consensus“-Baum (100 %) werden hier alle Gruppen dargestellt, die in >50 % der Einzelbäume vorliegen. Die Berechnung der „Bootstrap“-Werte konnte mit 100 Wiederholungen nur niedrig angesetzt werden, da aufgrund der hohen Anzahl möglicher Bäume die Rechnerkapazität nicht ausreichte.

#### D.1.4.4 Kritische Betrachtungen zu genetischen Netzwerken

Netzwerke bieten im Gegensatz zu Dendrogrammen die Möglichkeit, mehrere alternative Evolutionswege darzustellen und interne Knoten zu besetzen (hier mit Chloroplasten-Haplotypen). Netzwerke machen es möglich, auch solche Zweige zu identifizieren, die mit den üblichen phylogenetischen Analysemöglichkeiten unaufgelöst bleiben. Auch bei der Erstellung eines Netzwerkes gilt es natürlich, die unter D.1.4.2.1 und D.1.4.2.2 Anmerkungen zu beachten.

Probleme können auch bei der Bewurzelung auftreten, vor allem, wenn man die ursprüngliche Methode nach Castelleo und Templeton (1994) anwendet, die bei der Berechnung des Außengruppengewichts nur direkt angrenzende Nachbarn einbezieht. Die Grundannahme hierbei ist, dass interne Haplotypen, die in Verbindung zu vielen anderen Haplotypen stehen, wahrscheinlich älter sind als terminale Haplotypen, die nur mit einem weiteren Haplotyp verbunden sind. Haplotypen, die im Datensatz häufig auftreten, sind vermutlich ebenfalls älter als seltene (Crandall und Templeton, 1993).

Das in der vorliegenden Arbeit erstellte Netzwerk schließt zahlreiche *Macaranga*-Arten aus drei Sektionen ein und sprengt damit die Grenzen einer Populationsstudie. Daher spielen hier auch noch andere Faktoren eine Rolle: Erstens wurden nicht alle Arten und Gruppen in gleicher Intensität besammelt. Zweitens wurden offensichtliche Außengruppentaxa in die Analyse mit einbezogen. Damit ist auch zu begründen, warum das Computerprogramm TCS die Wurzel des Netzwerks im Haplotyp 1 sieht, während mit Hilfe anderer Analysemethoden (ITS, RAPD, AFLP) sich die Wurzel irgendwo zwischen den Sektionen *Winklerianae*, *Pruinosae*, *Javanica* und *Stachyella* befindet. Die im Netzwerk in Abbildung 17 angegebene Position der Wurzel bezieht sich daher auf die Vorinformation aus phylogenetischen Studien.

## D.2 Phylogenie der myrmekophytischen *Macaranga*-Arten und ihre Stellung innerhalb der Gattung

Da es innerhalb der *Macaranga*-Sektionen mit myrmekophytischen Arten morphologisch nur schwer möglich ist, Aussagen über die Verwandtschaftsverhältnisse zu treffen, ist es notwendig, molekulare Methoden hierfür einzusetzen. Nachdem in früheren Studien auf der Basis von ITS-Sequenzen (Blattner *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2001) und RAPD-Fingerprints (Bänfer, 1999; Blattner *et al.*, 2001) keine befriedigende phylogenetische Auflösung erzielt werden konnte, wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit AFLP-Analysen, und Chloroplasten-Sequenzen eingesetzt. Ursprünglich nur für die phylogenetische Auswertung gedacht, konnte mit Hilfe der Chloroplasten-Sequenzen auch eine phylogeographische Netzwerkanalyse durchgeführt werden.

Die AFLP-Daten unterstützten die Einordnung der myrmekophytischen *Macaranga*-Arten in die drei Sektionen *Pachystemon*, *Pruinosae* und *Winklerianae*. Eine gute Unterstützung gab es auch für die Monophylie von *Pachystemon* und *Pruinosae*, nicht jedoch für *Winklerianae*. Innerhalb von *Pachystemon* ergab sich eine klare Unterteilung in vier jeweils monophyletische Artengruppen: die *bancana*-Gruppe, die *hypoleuca*-Gruppe, die *kingii*-Gruppe und die *puncticulata*-Gruppe. Die Arten der *motleyana*-Gruppe, wie von Davies beschrieben, standen zwar bei den Analysen überwiegend separat, es fehlt hier aber eine statistische Unterstützung dieser Gruppe. Die Biologie und Vergesellschaftung der Arten der genannten Sektionen und Gruppen soll im Folgenden vergleichend diskutiert werden (siehe auch Tabelle 10).

## D.2.1 Charakterisierung der Sektionen und Artengruppen mit myrmekophytischen *Macaranga*-Arten

### D.2.1.1 Die *puncticulata*-Gruppe

Bis zur letzten Revision durch Davies (2001) wurden die Mitglieder der *puncticulata*-Gruppe zur Sektion *Pachystemon* gerechnet. Nach Whitmore (1975) gehören zu der *puncticulata*-Gruppe die namensgebende Art *M. puncticulata*, sowie *M. curtisii* und *M. sarcocarpa*. Alle drei Arten besitzen ungeteilte Blätter, ihre Stipeln stehen aufrecht (Abbildung 19). Die männlichen Blüten haben 2-3 Staubgefäße und stehen in Büscheln von mehr als 5 Einzelblüten. Während es sich bei *M. puncticulata* um einen obligaten Myrmekophyten handelt, sind die beiden anderen Arten nicht mit Ameisenpartnern assoziiert. Der Ameisenpartner von *M. puncticulata* gehört zur Gattung *Camponotus* (Federle *et al.*, 1998). Die Besiedlung beginnt, wenn die Stammhöhe ca. 30 cm misst, wobei sich zunächst der Durchmesser der Zweige von ca. 4 auf 10 mM erweitert (Abbildung 19). Ebenso wie bei den Arten der Sektion *Pachystemon* werden die Zweige durch Degeneration des Marks von alleine hohl. Potentielle Bestäuber sind neben anderen Insekten Thripse der Gattung *Neoheegeria* (Ordnung Thysanoptera, Thripse, Moog, 2002).



Abbildung 19: Junge *M. puncticulata*-Pflanze mit angeschwollenen Zweigen zur Bereitstellung von Domatien (Pfeil).

### D.2.1.2 Sektion *Pachystemon* (BLUME) MÜLL. ARG.

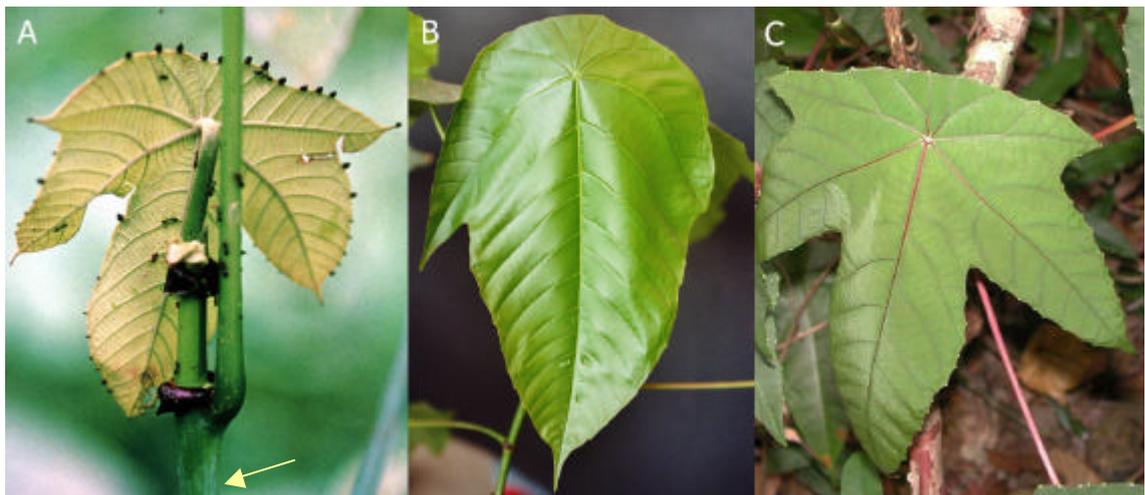
Die Sektion *Pachystemon* umfasste in der ursprünglichen Beschreibung von Pax und Hoffmann (1914) nur 6 Arten. Vor allem in den 1960er und 70er Jahren wurden zahlreiche neue Arten beschrieben, so dass Whitmore (1975) letztendlich 16 Arten mit sieben Unterarten bzw. Formen benannte, wobei er eine Unterteilung in *Pachystemon s. stricto* und *Pachystemon s. lato* (inkl. 4 weiterer Arten) vornahm. Weitere Neubeschreibungen wurden in der letzten Revision von Davies (2001) durchgeführt. Danach besteht die Sektion *Pachystemon* aus 25 Arten, wobei eine Art in drei Formen vorliegt (*M. depressa*). Die Mitglieder der *puncticulata*-Gruppe wurden von Davies (2001) aus der Sektion herausgenommen.

Die Arten der Sektion *Pachystemon* sind gekennzeichnet durch meist hohle und ameisenbewohnte Zweige, welche teilweise wachsbereift, meist aber nur glatt und manchmal mit einfachen Haaren bedeckt sind. Die Blätter sind peltat und im überwiegenden Fall dreibis fünfflappig. Extraflorale Nektarien kommen mit Ausnahme von *M. rostrata* nicht auf der Blattoberfläche vor, in manchen Arten jedoch am Rande der Blätter. Der Ort der Nährkörperproduktion kann an unterschiedlichen Stellen lokalisiert sein (näheres siehe in den Kapiteln zu den verschiedenen *Pachystemon*-Gruppen). Die Blüten- und Fruchtmerkmale können sehr vielgestaltig sein. Männliche Blüten haben entweder 1, 2-3 oder 4-7 Staubblätter mit 3- oder 4-porigen Antheren (siehe auch Tabelle 10). Die Sepalen können frei oder verwachsen sein. Der Fruchtknoten besteht aus drei bis sechs Karpellen.

Die Früchte haben oft drüsige Auswüchse in Form von Rippen, Scheiben oder hornähnlichen Anhängen. Die Samen sind rundlich und von einem fleischigen roten Arillus umgeben. Die besiedelnden Ameisen gehören meist der Gattung *Crematogaster* an (näheres zu den Arten in Kapitel D.2.2). Davies (2001) unterscheidet in seiner Revision vier Gruppen, die *bancana*-, *motleyana*, *hypoleuca*- und *kingii*-Gruppe. Nach den Ergebnissen der AFLP-Analyse sind die beiden erstgenannten Gruppe nicht eindeutig voneinander getrennt und werden unter dem Begriff *bancana*-Gruppe zusammengefasst. Die einzelnen Gruppen werden im folgenden kurz beschrieben.

### Die *bancana*-Gruppe

Die *bancana*-Gruppe ist die artenreichste Gruppe innerhalb ihrer Sektion. Ihre Mitglieder sind im ganzen Malaiischen Archipel verbreitet. Von den 14 von Davies (2001) benannten Arten stellen 11 obligate Myrmekophyten dar. Charakteristisch für die myrmekophytischen Arten sind hohle Stängel, deren Mark im Laufe der Jungpflanzenentwicklung degeneriert (Fiala und Maschwitz, 1992). Weiterhin kennzeichnend sind die zurückgeschlagenen fleischigen Stipeln (siehe Abbildung 20) als Ort der Nährkörperchen-Synthese. Die Zweigoberflächen sind bei den meisten Arten nicht bewachst.



**Abbildung 20: Blätter von drei Arten der *bancana*-Gruppe.** (A) *M. aetheadenia* (B) *M. hullettii*, (C) *M. angulata*. Alle drei Arten sind Myrmekophyten und haben die für viele *Pachystemon*-Arten typischen 3- oder 5-lobigen Blätter. Auf der Abbildung (A) gut zu erkennen ist der mit Wachs überzogene Spross (Pfeil) und die nach unten gebogenen fleischigen Stipeln, unter denen die Nährkörperchen produziert werden. Für *M. aetheadenia* typisch sind die großen vulkanähnlichen extrafloralen Nektardrüsen an der Blattbasis. Ein besonderes Merkmal für *M. hullettii* ist die glänzende Blattoberseite. Fotos A und C B. Fiala.

Die männlichen Infloreszenzen tragen bis zu 10 Blüten mit jeweils einem Staubblatt pro Blüte (Davies, 2001; Moog, 2002). Die männlichen Blüten sind meist von Brakteen eng umschlossen (11 von 14 Arten), wobei die Brakteen mit einer Ausnahme (*M. angulata*) sukkulent sind. Die Brakteen tragen Trichomnektarien an der Innenseite (Moog, 2002). Nur *M. calcicola*, *M. petanostyla* und *M. rostrata* haben keine von Brakteen eingeschlossenen Blüten. (Weitere Angaben siehe Tabelle 10). Besiedelt werden die Arten dieser Gruppe überwiegend von Ameisen der Gattung *Crematogaster* (*Decacrema*), msp. 3 und 4; bei größeren Pflanzen kann auch msp. 1 vorkommen (Fiala *et al.* 1999).

## Die *motleyana*-Gruppe

Die *motleyana*-Gruppe steht der *bancana*-Gruppe sehr nahe. Sie wird von Davies (2001) anhand morphologischer Merkmale als separate Gruppe behandelt, kann jedoch mit molekularen Methoden wie ITS-Sequenzierung und RAPDs, (Bänfer, 1999; Blattner *et al.*, 2001) sowie den AFLPs und Chloroplasten-Sequenzierung (siehe auch Kapitel C.2.1 und C.2.2 sowie D.2.4) nicht klar von der *bancana*-Gruppe abgetrennt werden. Nach Davies (2001) enthält die Gruppe fünf Arten (*M. ashtonii*, *M. constricta*, *M. glandibracteolata*, *M. griffithiana* und *M. motleyana*), welche sich durch Bewachsung der Zweige (siehe Abbildung 21), die Anzahl der Staubblätter pro Blüte (meist 2-3) und durch die Anzahl der männlichen Blüten pro Glomerus (20-28) von der *bancana*-Gruppe unterscheidet. Nur bei *M. glandibracteolata* und *M. ashtonii* kann auch ein einzelnes Staubblatt vorkommen, wie es für die *bancana*-Gruppe typisch ist. Wie auch die Arten der vorher genannten Gruppe haben die Arten der *motleyana*-Gruppe trilobe Blätter; die myrmekophytischen Arten haben hohle Zweige, da das Mark degeneriert. Die Blüten sind von sukkulenten Brakteen bedeckt und enthalten Trichomnektarien (Moog, 2002). Während die Blüten von *M. motleyana* überwiegend von Thripsen der Gattung *Neoheegeria* (Phlaeotribidae) besucht werden, wurden an *M. griffithiana* auf der malaysischen Halbinsel ausschließlich Thripse aus der Gruppe der Thripidae beobachtet (Moog, 2002). Über die übrigen Arten liegen bisher keine bestäubungsbiologischen Daten vor. Die besiedelnden Ameisen gehören alle zur Gattung *Crematogaster Decacrema*. Neben den häufig beobachteten msp. 4, 7 und 10 kommen auch die msp. 2, 5 und 9 vor (Details siehe Tabelle 10).



**Abbildung 21:** *M. griffithiana* aus Thailand mit auffälliger Wachsbereifung (Pfeil).

## *hypoleuca*-gruppe

Die *hypoleuca*-Gruppe besteht aus zwei sehr distinkten myrmekophytischen Arten. Dabei handelt es sich um *M. beccariana*, die auf Borneo endemisch ist, und *M. hypoleuca*, die im südostasiatischen Raum weit verbreitet vorkommt. Beide Arten haben dreilappige Blätter mit langen, zugespitzten Loben und hohle Zweige durch selbst degenerierendes Mark (Davies, 2001). Die männlichen Infloreszenzen setzen sich aus Gruppen mit ungefähr 15 Einzelblüten zusammen und besitzen jeweils nur ein Staubblatt pro Blüte. Die Blüten sind von sukkulenten Brakteen bedeckt, enthalten Trichomnektarien und werden überwiegend von Thripsen der Gattung *Neoheegeria* (66%), aber auch der Gattung *Terebrantia* (29%) besucht (Moog, 2002). Die Nährkörperchen werden auf den jungen Blättern produziert; die Stipeln sind klein und stehen aufrecht. Beide Arten haben eine extreme Wachsbereifung, aufgrund derer die Blattunterseite kalkig weiß erscheint. Charakteristisch für diese Gruppe ist auch die Besiedlung mit einer Ameisenart, die auf bewachsenen Oberflächen laufen kann (Federle *et al.* 1997), nämlich *Crematogaster (Decacrema)* msp. 6 (Feldhaar *et al.*, 2003a). In ausgewachsenen Bäumen kann msp. 6 durch die weniger spezialisierte msp. 1 ersetzt sein.

## Die *kingii*-Gruppe

Die vierte Gruppe der Sekt. *Pachystemon* ist die *kingii*-Gruppe. Sie enthält vier Arten (*M. caladiifolia*, *M. lamellata*, *M. kingii* und *M. umbrosa*), die auf den ersten Blick morphologisch sehr unterschiedlich sind. Die Blätter können gelappt (*M. kingii* siehe Abbildung 22) oder ungeteilt sein (alle übrigen Arten). Die Stipeln sind entweder hornähnlich nach unten gebogen (*M. kingii*, *M. lamellata*, *M. umbrosa*) oder abstehend (*M. caladiifolia*). Charakteristisch für diese Gruppe sind die blütenmorphologischen Merkmale. Im Gegensatz zu den übrigen *Pachystemon*-Arten haben sie vier bis sieben Staubblätter je Blüte (Davies, 2001). Bei allen vier Arten handelt es sich um Myrmekophyten, wobei *M. caladiifolia* im Gegensatz zu allen anderen *Pachystemon*-Arten eine unspezifische Form der Interaktion mit Ameisen aufweist. Die Domatien entstehen durch selbst degenerierendes Mark, sind aber selbstöffnend (Fiala *et al.*, 1996). Da eine besiedelnde Königin keine speziellen Fähigkeiten benötigt, um die Kolonie im Stängel zu gründen, kann man eine Vielzahl unterschiedlicher, unspezifischer Partnerameisen in den Domatien von *M. caladiifolia* finden. Während *M. umbrosa* durch *Crematogaster* (*Decacrema*) msp. 3 und msp. 4 besiedelt wird (Feldhaar *et al.*, 2003a; Fiala *et al.*, 1999), kommen bei *M. lamellata* je nach Habitat Partner aus zwei unterschiedlichen Ameisengattungen vor. Im Sekundärwald von Brunei sind die Pflanzen vor allem von *Crematogaster* (*Decacrema*) msp. 5 besiedelt, im Primärwald von Sabah, Sarawak und Brunei hingegen durch *Camponotus macarangae* (Maschwitz *et al.*, 1996).

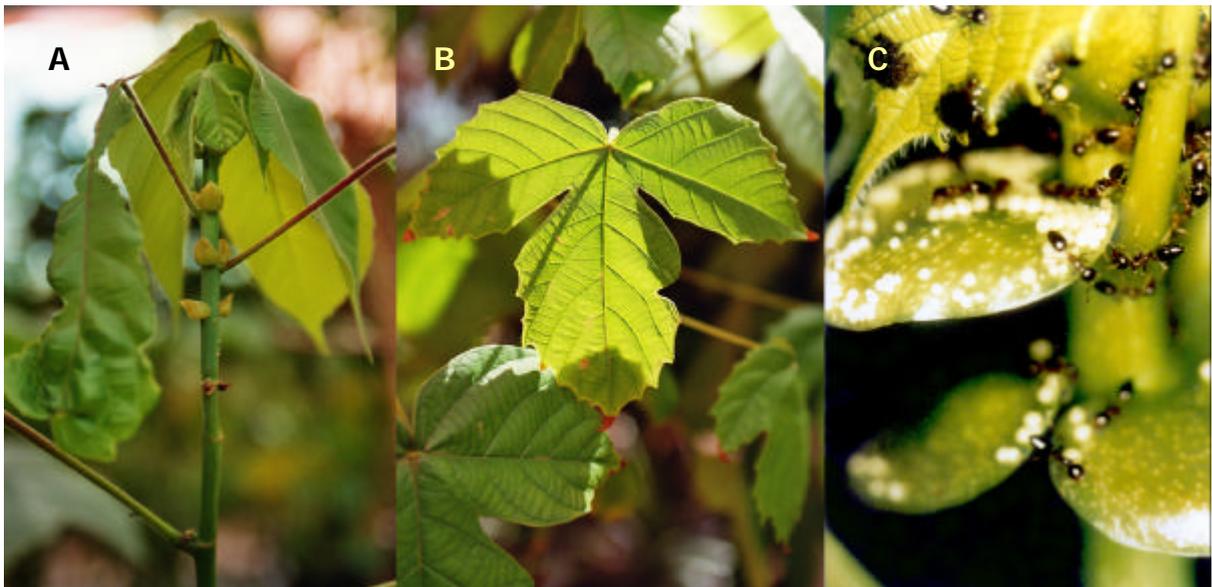


**Abbildung 22:** *M. kingii* aus Westmalaysia mit auffallend glänzender Blattoberfläche und tief eingeschnittenen Blättern. Foto B. Fiala

### D.2.1.3 Sektion *Pruinosae* PAX & K. HOFFM.

Die Sektion *Pruinosae* PAX & K. HOFFM. besteht nach der Revision von Davies (2001) aus acht Arten. Dabei handelt es sich um fünf Myrmekophyten (*M. hosei*, *M. pearsonii*, *M. pruinosa*, *M. puberula*, *M. rufescens*) und drei Nichtmyrmekophyten (*M. gigantea*, *M. pentaloba* und *M. siamensis*). Erstmals beschrieben wurde die Sektion von Pax und Hoffmann im Jahre 1914, wobei sie damals noch zehn Arten enthielt. Die Arten sind gekennzeichnet durch Zweige mit lockerem Mark, das in den Myrmekophyten von den Ameisen ausgehöhlt wird. Die Zweige sind teilweise wachsbereift und können glatt oder mit Haaren bedeckt sein (Davies, 2001). Die Stipeln können abstehend, aufrecht oder auch ausgesackt sein. Bei den myrmekophytischen Arten werden die Nährkörperchen auf der Oberseite der Stipeln produziert. Die Blätter sind tief gelappt und weisen eine handförmige Nervatur auf. Männliche Blüten haben 2-3 Staubblätter mit 4-porigen Antheren. Die Sepalen sind frei. Der Fruchtknoten besteht aus zwei Karpellen. Die Früchte sind im Gegensatz zur Sektion *Pachystemon* gleichmäßig von einem drüsigen Exudat umgeben und bilden keine Anhängsel aus. Die Samen sind linsenförmig und komplett von einem fleischigen, meist violetten Arillus eingehüllt. Als potentielle Bestäuber findet man überwiegend Thripse der Gattung *Mesothrips*, wesentlich seltener Thripidae, *Neoheegeria* und Wanzen (Moog, 2002).

**Abbildung 23: Beispiel von Arten der Sektion *Pruinosae*.** Auf Bild (A) ein Spross von *M. pruinosa* mit aufrechten ausgesackten Stipeln und peltaten Blättern. Bild (B) und (C): *M. hosei* mit (B) typischer apeltater Blattform und (C) runden abstehenden Stipeln, auf deren Oberfläche *Crematogaster*-Ameisen Nährkörperchen einsammeln. Foto (C) B. Fiala.



#### D.2.1.4 Sektion *Winklerianae* PAX & K. HOFFM.

Die Sektion *Winklerianae* besteht aus den beiden endemisch auf Borneo vorkommenden Arten *M. winkleri* und *M. winkleriella*. Bei beiden handelt es sich um echte Myrmekophyten, die ausschließlich durch *Crematogaster* msp. 8 besiedelt werden (Fiala *et al.*, 1999 B. Fiala pers. Komm.; Jakob, 1995). Diese Ameisenart gehört nicht der Untergattung *Decacrema* an und wurde bisher nur auf Pflanzen der Sektion *Winklerianae* gefunden. Während es sich bei *M. winkleri* um eine auf Borneo weit verbreitete Art handelt (Whitmore, 1975), beschränkt sich das Vorkommen von *M. winkleriella* auf eine kleine Region im Osten Sarawaks (Whitmore, 1974). Die Blätter sind ungeteilt, die Zweige hohl und die Stipeln abstehend, teilweise nach unten gebogen. Bei *M. winkleri* stehen die männlichen Blüten in Gruppen von ca. 15 zusammen, wobei eine Blüte 2-3 Staubblätter besitzt. Die Brakteen sind sackförmig aufgewölbt; an ihrem oberen Rand befinden sich 4 verlängerte Brakteenzipfel, die jeweils in einem Nektarium enden. Als Blütenbesucher kommen hier sowohl *Neoheegeria* als auch Thripidae vor (Moog, 2002).



**Abbildung 24:** Zweig einer *M. winkleri*-Pflanze. Deutlich zu erkennen die glatten, aber unbewachsenen Zweige und die abstehenden Stipeln. Foto B. Fiala.

#### D.2.2 Spezifität der Besiedlung durch Ameisen

Zum Verständnis der Evolution der Ameisenpflanzen innerhalb von *Macaranga* muss man auch die vergesellschafteten Ameisen näher betrachten. Die 29 bisher beschriebenen myrmekophytischen *Macaranga*-Arten leben in obligater Assoziation mit wenigstens 10 Morphospecies (msp.) der Gattung *Crematogaster* (Myrmicinae) (Feldhaar *et al.*, 2003a, Fiala pers. Kommentar; Fiala *et al.*, 1999; Jakob, 1995). Des Weiteren konnten bisher vier Ameisen-Pflanzen-Assoziationen mit unterschiedlichen Arten der Gattung *Camponotus* (Formicinae) identifiziert werden (Federle *et al.*, 1998; Maschwitz *et al.*, 1996; Maschwitz *et al.*, 2004).

Durch Vergleiche mit vorhandenem Museumsmaterial konnten neun der zehn *Crematogaster*-Arten der Untergattung *Decacrema* FOREL zugeordnet werden (msp. 1-7 und msp. 9 und 10). Die einzelnen Arten besiedeln mit sehr unterschiedlicher Spezifität eine oder mehrere *Macaranga*-Arten (Fiala *et al.*, 1999). Nur die Partnerameise der Arten der Sektion *Winklerianae* ist eine Nicht-*Decacrema* und wird als msp. 8 bezeichnet (Fiala *et al.*, 1999) (siehe auch Tabelle 10).

Feldhaar *et al.* (2003a) ist es gelungen, drei der Morphospezies anhand der Holotypen bekannter Ameisen-Arten zu synonymisieren und mit Hilfe molekularer Methoden (Sequenzierung von Abschnitten des mitochondrialen Cytochrom C Oxidasegens, *coxI*) zwei Artengruppen innerhalb des Subgenus *Decacrema* zu charakterisieren. Die erste Artengruppe enthält msp. 1, msp. 2, msp. 4 und msp. 5 und wird "captiosa-Gruppe" genannt, da sie *Crematogaster captiosa* FOREL (msp. 4) enthält. Die zweite Artengruppe umfasst msp. 3, msp. 6, msp. 7 und msp. 9 und wird nach *Crematogaster decamera* FOREL (msp. 6) als "decamera-Gruppe" bezeichnet.

Während die Königinnen der *captiosa*-Gruppe Kolonien sowohl in Keimlingen als auch in der Kronenregion großer, ausgewachsener Bäume gründen können, beschränken sich die

verhältnismäßig kleinen Königinnen der *decamera*-Gruppe auf die Besiedlung sehr junger Bäume und Keimlinge (Feldhaar *et al.*, 2003aa; 2003bb).

Vier *Macaranga*-Arten wurden bisher gefunden, die mit Ameisen der Gattung *Camponotus* vergesellschaftet sind. Im Falle von *M. puncticulata* ist eine *Camponotus* aus der Untergattung *Colobopsis* die einzige besiedelnde Ameisenart (Federle *et al.*, 1998; Fiala *et al.*, 1999). Bei den übrigen Arten ist die Besiedlung mit *Camponotus*-Arten entweder abhängig von der geographischen Lage (*M. griffithiana* in Thailand; Maschwitz *et al.*, 2004) oder dem Habitat (*M. lamellata*, Maschwitz *et al.*, 1996). Bei *M. caladiifolia* stellt *Camponotus* dagegen eine von vielen möglichen unspezifischen Ameisenpartnern dar (Fiala *et al.*, 1996). Es handelt sich in allen Fällen um nicht näher verwandte *Camponotus*-Arten.

**Tabelle 10: Übersicht morphologischer und verbreitungsbiologischer Merkmale myrmekophytischer *Macaranga*-Arten. Abkürzungen: Blütenbesucher:** A, M, N=Neohegeria, R, T=Thripse, W, ?=nicht bekannt, **Frucht:** d=mit einem Drüsenfeld je Karpell, 2d=mit zwei Drüsenfeldern je Karpell, g=glatt, gd=mit drüsigem Exudat überzogen, HA=mit hornähnlichen Anhängseln, oA=ohne Anhängsel, F=fleischig, **Ort der Nährkörperproduktion (NK):** jB= junge Blätter, gP= ganze Pflanze, SO=Stipeloberseite, SU=Stipelunterseite, Zweige: h=selbst degenerierendes Mark, hohl, hh=lockeres Mark, hohl, s=solide, **Stipeln:** AB=abstehend, A=aufrecht, A<sub>A</sub>=aufrecht frühzeitig abfallend, A<sub>D</sub>=Stipeln aufrecht, reduziert, A<sub>S</sub>=aufrecht und ausgesackt, Z= zurückgebogen, Z<sub>F</sub> = zurückgebogen, fleischig, Z<sub>H</sub>=zurückgebogen, hornähnlich, **Myrmekophyt:** M=ja, N=nein. Die Angaben zur Morphologie und Blütenbiologie entstammen folgender Literatur: (Davies, 2001; Moog, 2002; Slik *et al.*, 2000), die der Ameisen-Pflanzen-Interaktion außerdem: (Federle *et al.*, 1998; Feldhaar *et al.*, 2003bb; Fiala *et al.*, 1999; Maschwitz *et al.*, 1996; Maschwitz *et al.*, 2004)

		Blütenbesucher	Brakteen sukulent	s. Blüten/Glomerus	Stamina/Blüte	Frucht	episodisch blühend	NK	Zweige	Zweige wachsbereift	Zweige behaart	Stipel	Besteckung	Ameisen
Sektion <i>Pachystemon</i>	<i>bancana</i> -Gruppe	<i>M. aetheadenia</i>	? ja	bis 10	1-3	d	?	SU h	ja/nein	nein	Z <sub>F</sub>	M	2, 3	
		<i>M. angulata</i>	R? nein	bis 10	1	d	ja	SU h	nein	nein	Z <sub>F</sub>	M	4, 10	
		<i>M. bancana</i>	N ja	bis 10	1	d	ja	SU h	nein	ja	Z <sub>F</sub>	M	4	
		<i>M. calcicola</i>	? -	bis 10	1	d	?	SU h	nein	ja	Z <sub>F</sub>	M	4	
		<i>M. depressa</i>	N ja	bis 10	1	dh	ja	s	nein	ja	A	N	-	
		<i>M. havilandii</i>	? ja	bis 10	1	d	ja/nein	SU h	ja	nein	Z <sub>F</sub>	M	6, 7	
		<i>M. hullettii</i>	N ja	bis 10	1	dh	ja	SU h	nein	ja		M	3(H), 4(L), 2(SUM)	
		<i>M. indistincta</i>	N ja	bis 10	1	dh	ja	SU h	ja	ja	Z <sub>F</sub>	M	10, 4, 1	
		<i>M. petanostyla</i>	N -	bis 10	1	dh	ja	SU h	nein	nein	Z <sub>F</sub>	N	3	
		<i>M. rostrata</i>	? -	bis 10	1	dh	?	s	nein	ja	A	N	-	
		<i>M. trachyphylla</i>	N ja	bis 10	1	dh	ja	SU h	nein	ja	Z <sub>F</sub>	M	4, 3	
		<i>M. triloba</i>	N ja	bis 10	1	dh	ja		nein	nein	A	N	-	
		<i>M. velutina</i>	? ja	bis 10	1	d	ja	SU h	nein/ja*	ja	Z <sub>F</sub>	M	4	
		<i>M. velutiniflora</i>	? ja	bis 10	1	dh	?	SU h	nein	nein	Z <sub>F</sub>	M	?	
Sektion <i>Pachystemon</i>	<i>motleyana</i> -Gruppe	<i>M. ashtonii</i>	? ja	20-28	3	d	?	s	ja	nein	A	N	-	
		<i>M. constricta</i>	? ja	20-28	1-3	d	?	SU h	ja	nein	Z <sub>F</sub>	M	5, 9	
		<i>M. glandibractolata</i>	? ja	20-28	1-3	d	ja	SU h	ja	nein	Z <sub>F</sub>	M	10, 4	
		<i>M. motleyana</i>	N ja	20-28	4 (3)	d	ja	SU h	ja	nein	Z <sub>F</sub>	M	4, 7, 2(SUM)	
		<i>M. griffithiana</i>	T ja	20-28	1-3	ja	ja	SU h	ja	nein	Z <sub>F</sub>	M	1, C (T)	
Sektion <i>Pachystemon</i>	<i>kingii</i> -Gruppe	<i>M. caladiifolia</i>	? nein	bis 6	4-7	2d	ja	h	nein	nein	AB	M*	-	
		<i>M. kingii</i>	? nein	bis 6	4-7	2d	?	h	ja	nein	Z <sub>H</sub>	M	4, 3	
		<i>M. lamellata</i>	? nein	bis 6	4-7	2d	ja	h	ja	nein	Z <sub>H</sub>	M	5, Cm	
		<i>M. umbrosa</i>	? nein	bis 6	4-7	2d	ja	h	nein	nein	Z <sub>H</sub>	M	3	
Sektion <i>Pachystemon</i>	<i>hypoleuca</i> -Gruppe	<i>M. beccariana</i>	N ja	15	1	2d	ja	jB h	ja	nein	A <sub>D</sub>	M	6	
		<i>M. hypoleuca</i>	N, T ja	15	1	2d	ja	jB h	ja	nein	A <sub>D</sub>	M	6, 9	
		<i>M. curtisii</i> ssp. <i>curtisii</i>	N ja	mehr als 5	2-3	g	ja	s	ja	ja	A	N	-	
		<i>M. curtisii</i> ssp. <i>glabra</i>	A nein	mehr als 5	2-3	g	ja	s	nein	nein	A	N	-	
Sektion <i>Pachystemon</i>	<i>puncticulata</i> -Gruppe	<i>M. puncticulata</i>	? ja	mehr als 5	2-3	g	ja	s/h	ja	nein	A	M	Csp1	
		<i>M. sarcocarpa</i>	? ?	mehr als 5	2-3	F	?	s	nein		N	-		
		<i>M. winkleri</i>	N, T ja	15	2-3	g	nein	h	nein	nein	AB	M	8	
Sektion <i>Pruinosae</i>	<i>Winklerianae</i>	<i>M. winkleriella</i>	? ?	?	?	?	?	h	ja	nein	Z	M	8	
		<i>M. gigantea</i>	M, T ja	6-15	2-3	gd	ja	s	nein	ja	A	N	-	
		<i>M. hosei</i>	M ja	6-15	2-3	gd	ja	SO hh	ja	nein	AB	M	2, 1	
		<i>M. pearsonii</i>	M ja	10	2-3	GD	ja	SO hh	ja	nein	A <sub>S</sub>	M	2, 1	
		<i>M. pentaloba</i>	? ?	?	?	?	?	s	ja	nein	A	M	-	
		<i>M. pruinosa</i> (B)	M, T ja	6-15	2-3	gd	ja	SO hh	nein	ja	A <sub>S</sub>	M	-	
		<i>M. pruinosa</i> (W)	? ja	6-15	2-3	gd	ja	SO hh	ja*	nein	A <sub>S</sub>	M	2, 1	
		<i>M. puberula</i>	? ja	10-15	2-3	gd	ja?	SO hh	nein	ja	A <sub>S</sub>	M	2, 1	
		<i>M. rufescens</i>	? ja	6-15	2-3	gd	?	SO hh	ja	nein	AB	M	?	
		<i>M. siamensis</i>	? ja	15-25	2-3	gd	?	s	ja	ja	A	N	-	

### D.2.3 Interpretation der AFLP-Daten

Mit Hilfe der auf den AFLP-Daten beruhenden Phylogenien (Abbildung 10 und Abbildung 11) konnte eindeutig die Monophylie sowohl der Sektion *Pachystemon* als auch der Sektion *Pruinosae* nachgewiesen werden. Unklar bleibt die Monophylie der Sektion *Winklerianae*, die allerdings auch nur mit drei Akzessionen in der Analyse vertreten war. Beide erstgenannten Gruppen werden durch einen relativ hohen „Bootstrap“-Wert im NJ-Baum gestützt (81 und 87 %). Sie bilden auch im strikten Konsensus-Baum der „Maximum parsimony“-Analyse jeweils eine monophyletische Gruppe, hier jedoch - wohl aufgrund der generell niedrigeren Werte - ohne „Bootstrap“-Unterstützung. Die Topologie der erhaltenen AFLP-Bäume legt nahe, dass auch die *puncticulata*-Gruppe zur Sektion *Pachystemon* gehört. Auch die PCO-Analyse zeigte eine klare Auftrennung der Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* sowie die Unterteilung von *Pachystemon* in die *puncticulata*-, *bancana*-, *hypoleuca*- und *kingii*-Gruppe. Insgesamt ist die Auftrennung mit Hilfe der PCO eher schwach, da mit den ersten drei Ordinaten lediglich knapp 25 % der beobachteten Varianz aufgetrennt werden konnten.

Die Zuordnung der *puncticulata*-Gruppe wird kontrovers diskutiert. Whitmore (1975) ordnete *M. puncticula* und einige andere Arten der Sektion *Pachystemon* zu, die dadurch zu *Pachystemon sensu lato* wurde (Whitmore, 1975). Während Davies (Davies *et al.*, 2001) die Gruppe anhand morphologischer Merkmale aus der Sektion ausschloss und die ITS- und RAPD-Daten keine klare Aussage ermöglichten (Blattner *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2001), sprechen die hier gewonnenen AFLP-Daten dafür, dass die *puncticulata*-Gruppe Teil der Sektion *Pachystemon* ist.

Unklar bleibt weiterhin die Stellung der Sektion *Winklerianae*, sowohl bezüglich der Monophylie der Sektion an sich, als auch in Bezug auf die Stellung zu den beiden anderen myrmekophytischen Sektionen. Morphologisch sind sich die beiden Arten ähnlich, und die enge Verwandtschaft wird insbesondere unterstützt durch die Besiedelung mit *Crematogaster* (Nicht-*Decacrema*) msp. 8, die exklusiv auf Pflanzen dieser Sektion vorkommt. Nach den ITS-Daten steht *M. winkleri* näher an *M. diepenhorstii* und *M. winkleriella* bildet die Schwesterart zur *kingii*-Gruppe (Blattner *et al.*, 2001). In beiden Fällen lagen die „Bootstrap“-Werte der betreffenden Äste jedoch unter 50 %.

Die Sektion *Pruinosae* scheint von allen untersuchten Sektionen die am deutlichsten strukturierte zu sein. *M. gigantea* als Nichtmyrmekophyt steht basal (BS 99 %) und ist die Schwestergruppe zu den restlichen Arten, die als abgeleitet zu interpretieren sind. Auch die Monophylie der einzelnen Arten erfährt mit teilweise signifikanten „Bootstrap“-Werten (*M. pruinosa*, *M. puberula*) eine gute Unterstützung. Wie auch schon bei den vorhergegangenen ITS-Analysen (Blattner *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2001) stellt diese Sektion eine Schwestergruppe zu der Sekt. *Pachystemon* dar.

Innerhalb der Sektion *Pachystemon* lassen sich je nach gewählter Methode vier oder fünf Gruppen differenzieren. Vier Gruppen (*hypoleuca*-, *kingii*-, *bancana*- und *puncticulata*-Gruppe) sind mit Hilfe von molekularen (AFLPs) und morphologischen Methoden sehr gut untertstützt. Innerhalb der *bancana*-Gruppe ist eine weitere Aufteilung in zwei schwach differenzierte Untergruppe möglich, die man als *motleyana*-Gruppe und als *bancana*- *s. str.* Gruppe bezeichnen könnte (siehe Tabelle 10).

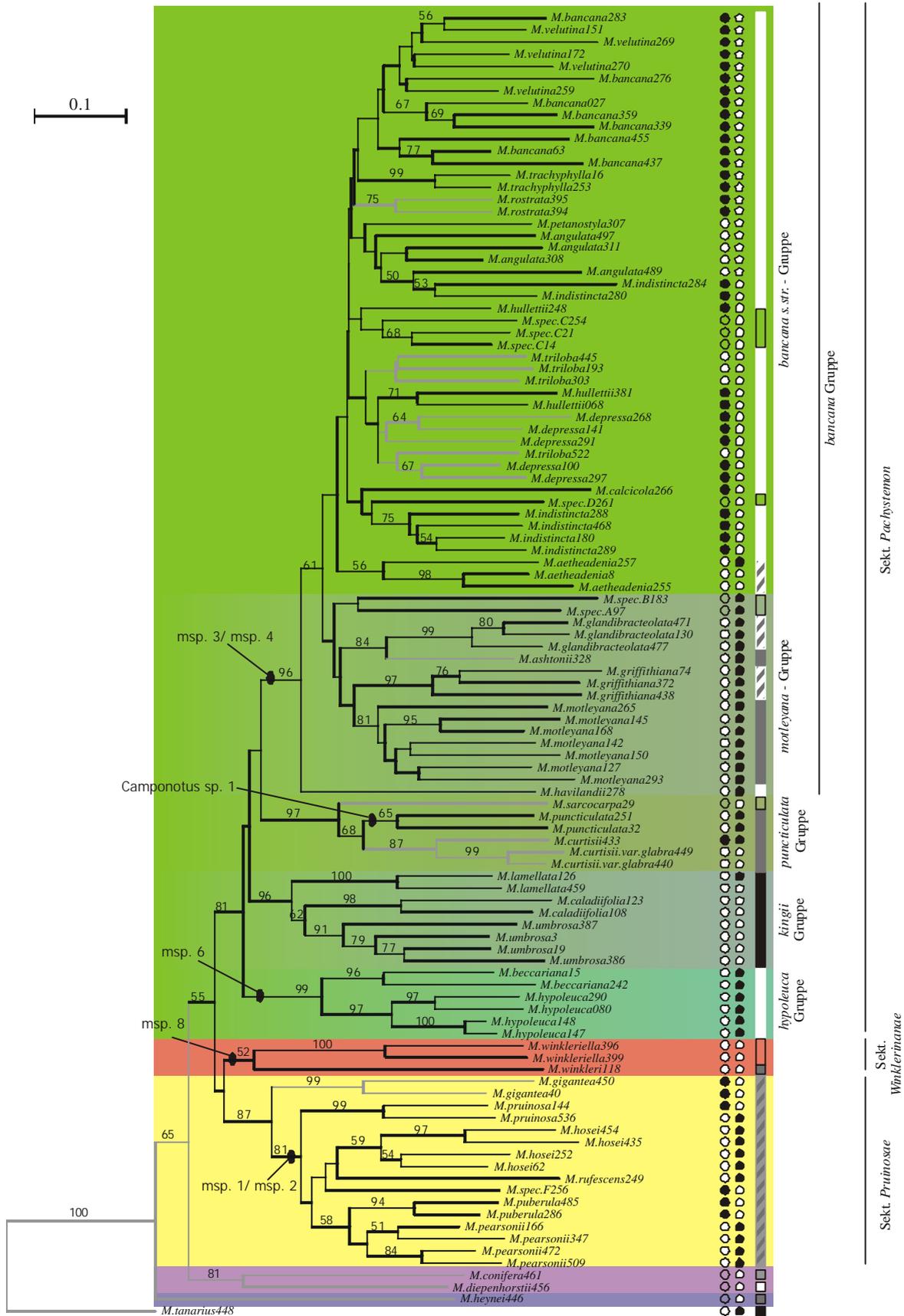


Abbildung 25: Kartierung verschiedener morphologischer Merkmale auf den AFLP-NJ-Baum. Legende: **nicht myrmekophytische Taxa sind im Dendrogramm mit grauen Ästen dargestellt, myrmekophytische mit schwarzen. Zweige unbewacht ○, Zweige bewacht ●, Zweige behaart ◆, Zweige unbehaart ◇; Anzahl der Stamen: 1 □, 1-3 ◻, 2-3 ◼, 3 ◽, 5 ◾, 6 ◿**

## D.2.4 Chloroplasten-Phylogenie der südostasiatischen *Macaranga* - Arten

Aufgrund der geringen Variabilität der Chloroplasten-Loci wurden die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb und zwischen den drei *Macaranga*-Sektionen, in denen Myrmekophyten enthalten sind, mit zwei unterschiedlichen Ansätzen analysiert. Mit den intergenischen Bereichen *atpB-rbcL* und dem *ccmp2*-Locus (*psbI-trnS*) wurde zunächst sowohl getrennt als auch in Kombination eine „Maximum parsimony“-Analyse mit Vertretern aus allen verfügbaren *Macaranga*- und *Mallotus*-Arten aus allen Sektionen durchgeführt. Zusätzlich wurde mit jeweils mehreren Vertretern der Arten aus den drei myrmekophytischen Sektionen *Pachystemon*, *Pruinosae* und *Winkleriana* eine Netzwerkanalyse durchgeführt, wobei zusätzlich der *ccmp6*-Locus eingesetzt wurde.

### D.2.4.1 Interpretation der „Maximum parsimony“-Kladogramme

Die besten Ergebnisse wurden bei der Kombination der beiden intergenischen Chloroplasten-Regionen *atpB-rbcL* und *psbI-trnS* erhalten (vgl. Abbildung 13, 15 und Abbildung 15). Im Konsensusbaum (Abbildung 26) stehen die weit verbreitete *M. tanarius* und die Arten der Sektion *Pseudo-Rottlera* basal zu allen übrigen *Macaranga*-Arten. *M. tanarius* ist ein typischer Pionierbaum savannenähnlicher Vegetationen, so dass auch in Übereinstimmung mit der These von Slik und van Welzen (2001) anzunehmen ist, dass sich die Gattung *Macaranga* aus kleinen Pionierbäumen offener Savannen- oder Buschlandschaften entwickelt hat. Alternativ bildet die Sektion *Pseudo-Rottlera* die „Wurzel“ aller anderen Arten, was auch durch eine erst vor kurzem veröffentlichte detaillierte Analyse durch Kulju *et al.* (2007) auf der Basis von drei Kerngenen und einem Chloroplastengen nahegelegt wurde.

Die Anzahl der Mutationsschritte (gleiche Mutationsrate innerhalb der Gattung vorausgesetzt) legt die Vermutung nahe, dass sich afrikanische *Macaranga*-Arten relativ früh von den südostasiatischen Arten abgespalten haben. Obwohl *M. capensis* von Pax und Hoffman (1914) der Sektion *Javanicae* zugeordnet wurde, wird eher eine nähere Verwandtschaft mit den anderen *Macaranga*-Arten des afrikanischen Kontinents angenommen als mit den anderen Mitgliedern der Sektion *Javanicae*. Über die Evolution, Phylogenie und Diversifizierung der Gattung *Macaranga* als solche kann im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit aufgrund des begrenzten Samplings und der geringen Variation der untersuchten Marker keine weitergehende Aussage getroffen werden.

Wie in den verschiedenen Vorversuchen gezeigt wurde, ist die Variabilität der Chloroplastenloci sehr unterschiedlich, sowohl in der Art der Mutationen (Punktmutationen, Mikrosatelliten, Indels) als auch in deren Häufigkeit. Deutlich wird auch das geringe Maß an „guten“ Mutationen zwischen oder innerhalb der myrmekophytischen Sektionen in Form von nicht synapomorpher Punktmutationen oder auch nicht homoplastischen Indels. Es besteht daher durchaus die Möglichkeit, dass die Differenzierung der myrmekophytischen Arten jungen Datum ist und eine schnelle Radiation stattgefunden hat, auf was auch die Daten der ITS-Sequenzierung hinweisen (Blattner *et al.*, 2001). Die Auswertung von eng miteinander verwandten Artengruppen kann daher besser mit einer Netzwerkanalyse durchgeführt werden, wie sie zur Klärung der Phylogeographie von Pflanzenarten bereits vielfach verwendet wurde (Cannon und Manos, 2003) und auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde (C.3 und D.2.6)

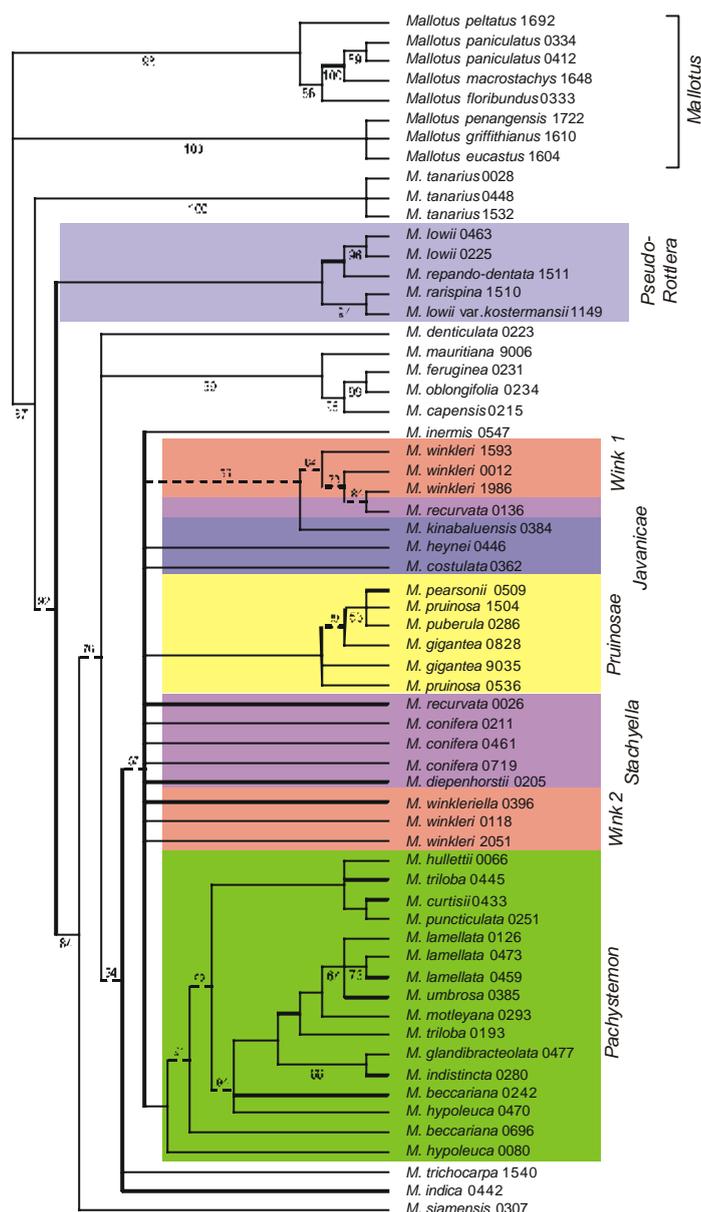


Abbildung 26: „Majority Rule“-Konsensus-Baum der 40.101 gleich langen Bäume aus der kombinierten Analyse der untersuchten Chloroplasten-Loci *atpB-rbcL* und dem *cmp2*-Locus.

#### D.2.4.2 Interpretation mit Hilfe eines statistischen Parsimonie-Netzwerkes

Eine zweite Möglichkeit, Informationen zur Phylogenie der Myrmekophyten enthaltenden Sektionen zu erhalten, besteht in der Verwendung einer Netzwerkanalyse (Posada und Crandall, 2001). Mithilfe des hier erzeugten statistischen Parsimonie-Netzwerkes konnte in Übereinstimmung mit den ITS-Daten aus früheren Studien (Blattner *et al.* 2001, Davies *et al.* 2001) sowie den während dieser Arbeit gewonnen AFLP-Daten gezeigt werden, dass die drei myrmekophytischen Sektionen deutlich voneinander abgegrenzt sind. Ähnlich wie bei den ITS-Daten (Blattner *et al.* 2001, Davies *et al.* 2001) bilden die beiden Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* jeweils monophyletische Gruppen, Sekt. *Winklerianae* jedoch nicht. Im Netzwerk sind nicht nur die beiden Arten der Sektion (*M. winkleri* und *M. winkleriella*) getrennt, sondern auch die verschiedenen Akzessionen von *M. winkleri*. Aufgrund der zu geringen Probennahme innerhalb dieser Sektion und den vermutlich daraus resultierenden unbesetzten Haplotypenpositionen kann aber keine klare Aussage getroffen

werden. Anhand des vorliegenden Datensatzes wird eine monophyletische Sektion *Winklerianae* aufgrund mangelnder symplesiomorpher Merkmale jedenfalls nicht unterstützt.

Ähnlich verhält es sich auch mit den Arten aus anderen Sektionen. Die separate Stellung von *M. recurvata* im Vergleich zur Sektion *Pachystemon* steht im Einklang mit dem Ausschluss dieser Art aus der Sektion, wie er von Davies (2001) im Zuge seiner Revision der beiden großen myrmekophytischen Sektionen vorgenommenen wurde. Davies (2001) hatte dieses Vorgehen sowohl in Hinblick auf die ITS-Daten als auch wegen der abweichenden morphologischen Merkmale begründet. Aufgrund der großen Anzahl an trennenden Punktmutationen (siehe Tabelle im Anhang) kann man bei *M. recurvata* (und auch bei *M. conifera*) vermuten, dass beide Arten relativ weit von den Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* entfernt stehen.

Die AFLP-Daten hatten innerhalb von *Pachystemon* vier signifikante, monophyletische Gruppen identifiziert (vgl. C.2.1). Drei dieser Gruppen (die *bancana*-, *hypoleuca*- und *kingii*-Gruppe) konnten durch die Netzwerkanalyse bestätigt werden. Die vierte, mit Hilfe der AFLPs identifizierte *puncticulata*-Gruppe ist eng verzahnt mit der *bancana*-Gruppe und trennt sich von dieser erst unter Einbeziehung von Mikrosatellitendaten sowie einiger Insertionen ab (vgl. Abbildung 16 und Abbildung 17). Neben den AFLP-Bäumen sprechen damit auch die Chloroplastendaten gegen die Vorgehensweise von Davies (2001), der die Arten der *puncticulata*-Gruppe aufgrund morphologischer Merkmale (Davies *et al.* 2001) aus der Sektion *Pachystemon* ausschloss.

Die von Davies (2001) morphologisch definierte *motleyana*-Gruppe (als Teil der *bancana*-Gruppe) wird durch die Chloroplasten-Daten nur unzureichend gegenüber den restlichen Vertretern der *bancana*-Gruppe abgegrenzt. Während *M. motleyana* selbst mit einer Ausnahme (Haplotyp 21a) eine separate Stellung einnimmt, teilen sich die übrigen Arten meist einen Haplotypen mit anderen Arten der *bancana*-Gruppe, bzw. befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu ihnen. Auch bei der ITS-Analyse (Blattner *et al.*, 2001) wurde die *motleyana*-Gruppe nicht signifikant abgegrenzt. In der AFLP-Analyse bildete die *motleyana*-Gruppe zwar ein Monophylum, blieb jedoch ohne „Bootstrap“-Unterstützung und gilt damit nicht als gesichert.

## D.2.5 Fazit: Phylogenie der myrmekophytischen *Macaranga*-Sektionen Südostasiens

Anhand der durchgeführten Untersuchungen und Analysen sowohl des Kerngenoms (AFLPs) als auch des Chloroplastengenoms mit unterschiedlichen Methoden konnte ein differenziertes Bild zur Phylogenie der südostasiatischen *Macarangas* im Allgemeinen und zu den drei Myrmekophyten enthaltenden Sektionen im Speziellen erstellt werden.

Die geringe Sequenzvariation zwischen den Arten spricht dafür, dass - mit Ausnahme der Arten der Sektion *Pseudo-Rottlera* - die *Macaranga*-Arten der Sunda-Provinz erst jungen Alters sind. Es ist davon auszugehen, dass sich diese Arten erst mit der wieder langsam beginnenden Ausbreitung des Regenwaldes im mittleren Miozän (vor ca. 20 Mio. Jahren) herausgebildet haben. Unter den drei Myrmekophyten enthaltenden Sektionen nimmt *Winklerianae* eine isolierte Stellung ein. Dafür sprechen sowohl die großen Sequenzunterschiede als auch die hochspezifische Besiedlung ausschließlich mit der isoliert stehenden *Crematogaster* (Nicht-*Decacrema*) msp. 8 (Quek *et al.*, 2004). Auch zwischen den beiden Arten der Sektion (*M. winkleri* und *M. winkleriella*) treten große genetische Unterschiede bei der Chloroplasten-Analyse, der AFLP-Analyse und der ITS-Analyse auf, was ein Hinweis auf ein relativ hohes Alter dieser Arten sein kann. Die geringen Gemeinsamkeiten zwischen den untersuchten Akzessionen kann ein Indiz für ausgestorbene

Arten und Populationen sein, oder auf eine frühzeitig getrennte Entwicklung von *M. winkleri* und *M. winkleriella* hinweisen. Aufgrund des seltenen Vorkommens von *M. winkleriella* und dem damit einhergehende Mangel an blütenbiologischen Merkmalen ist die Zusammengehörigkeit der beiden Arten vor allem durch ihren gemeinsamen Ameisenpartner gestützt. Wie auch anhand der Tabelle 10 deutlich wird, sind viele charakteristische Merkmale der beiden Arten potentiell homoplastisch. So tritt z.B. Bewachung der Pflanzenoberfläche in *Macaranga* weit verbreitet auf. Nur eine Betrachtung aller zur Verfügung stehender Merkmale ermöglicht eine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe.

Die Arten der Sektion *Pruinosae* bilden mit allen bisher durchgeführten molekularen und morphologischen Studien eine gut gestützte, monophyletische Gruppe (Blattner *et al.* 2001, Davies *et al.* 2001, Davies 2001). Auch die Abgrenzung der einzelnen Arten ist morphologisch, ökologisch und molekulargenetisch weitgehend eindeutig. Häufig handelt es sich um vikariierende Arten, die sich in den verschiedenen Biotopen und/oder Regionen ablösen (z. B. feucht vs. trocken, Tiefland vs. Hochland). *Macaranga gigantea*, die einzige nicht myrmekophytische Art der Sektion, sitzt bei den meisten Analysen an der Basis und damit in einer Schwesterposition zu den übrigen Arten. Auch die Analyse des Chloroplasten-Netzwerkes unterstützt diese Annahme, da die Haplotypen aller untersuchten Akzessionen von *M. gigantea* zentrale Positionen in der Sektion einnehmen und somit vermutlich älter als die Haplotypen der abgeleiteten, weiter außen stehenden Akzessionen sind. Mit Hilfe der Chloroplastendaten wurde schließlich deutlich, dass *M. siamensis* kein Mitglied der Sektion *Pruinosae* ist, wie von Davies (2001) proklamiert. Leider stand zum Zeitpunkt der AFLP-Analyse noch kein Material dieser Art zur Verfügung, weswegen eine entsprechende Absicherung durch AFLPs noch aussteht.

Die Sektion *Pachystemon* ist die artenreichste der myrmekophytischen *Macaranga*-Sektionen. Ihre Monophylie konnte mit der AFLP-Analyse erstmals klar gestützt werden. Die hier gewonnenen AFLP- und Chloroplastendaten legen ferner nahe, dass auch die *puncticulata*-Gruppe zur Sektion *Pachystemon* zu rechnen ist und eine von vier sehr gut gestützten monophyletischen Linien der Sektion darstellt. Von den drei anderen Linien werden die *hypoleuca*-Gruppe und die *kingii*-Gruppe auf molekularer, morphologischer und ökologischer Ebene besonders deutlich voneinander und vom Rest der Sektion abgetrennt. Die *hypoleuca*-Gruppe ist morphologisch charakterisiert durch die extrem bewachste und damit weißlich erscheinenden Blattunterseiten und 15 Blüten pro Glomerulus. Die Mitglieder der *kingii*-Gruppe sind u.a. gekennzeichnet durch maximal sechs Blüten pro Glomerulus und durch ihr gemeinsames Vorkommen an Primärwaldstandorten, die für die übrigen lichtliebenden Arten eher untypische Habitate darstellen. Die besonders artenreiche *bancana*-Gruppe lässt sich nur mit AFLPs klar von den übrigen Mitgliedern der Sektion abgrenzen; eine weitere Untergliederung in eine *motleyana*- und eine *bancana s. str.*-Gruppe ist vor allem morphologisch begründet (u.a. Wachs vs. kein Wachs, 1-3 Stamen/Blüte vs. 1 Stamen/Blüte), auf molekularer Ebene jedoch nicht eindeutig charakterisiert. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Chloroplasten-Haplotypen, der ITS-Sequenzen und teilweise der AFLP-Bandenmuster und morphologischen Merkmale kann man davon ausgehen, dass es sich bei der *bancana*-Gruppe um eine junge, Artengruppe handelt, deren Mitglieder vermutlich noch (zumindest teilweise) miteinander kreuzbar sind.

Leider lässt sich mit Hilfe der bisher gewonnen Daten keine eindeutige Phylogenie innerhalb der *bancana*-Gruppe vornehmen. Die Gründe liegen zum einen in der mangelnden Variabilität sowohl der Chloroplasten- als auch der ITS-Sequenzen, zum anderen in der Beobachtung, dass die Chloroplasten-Haplotypen innerhalb dieser Gruppe nicht nach taxonomischen, sondern nach geographischen Gesichtspunkten aufgetrennt sind. Dies erhärtet die Annahme, dass es sich bei den Arten der Sektion *Pachystemon*, insbesondere der

*bancana*-Gruppe, um noch junge Arten handelt, die aufgrund einer schnellen eventuell adaptiven Radiation entstanden sind.

### D.2.6 Phylogeographische Auswertung ausgewählter Sektionen mit Hilfe der Chloroplasten-Sequenzen

Die Avise *et al.* (1987) begründete Phylogeographie erlaubt die Untersuchung geographischer Strukturen einzelner geographischer Linien oder Arten. In jüngerer Zeit wurden zahlreiche Fälle von Pflanzengruppen bekannt, bei denen Hybridisierungen oder unzureichende Auftrennung der Evolutionslinien eine korrekte Interpretation eines auf nur eine Art beschränkten Datensatzes erschweren. In diesen Fällen ist es zweckmäßig, nicht nur eine Art sondern eine ganze Artengruppe auf ihre Haplotypen-Diversität zu untersuchen. Bis jetzt gibt es jedoch nur wenige Arbeiten, die es sich zum Ziel gesetzt haben, eine solche phylogeographische Analyse für einen ganzen Artenkomplex durchzuführen (Byrne *et al.*, 1999; Cannon und Manos, 2003; Jakob und Blattner, 2006). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde ein statistisches Parsimonie-Netzwerk dazu benutzt, die Struktur chloroplastidärer Verwandtschaftsverhältnisse und phylogeographischer Verbreitungs- und Ausbreitungsmuster zwischen und innerhalb myrmekophytischer *Macaranga*-Sektionen und ihrer vermutlich nächsten Verwandten zu analysieren.

### D.2.7 Konstruktion des Netzwerkes

Die Konstruktion des Netzwerkes wurde in zwei aufeinander folgenden Schritten vorgenommen. Zunächst wurde mit Hilfe des Programms TCS (Clement *et al.*, 2000) ein Gerüst-Netzwerk auf der Basis von Punktmutationen und größeren Indels erstellt. Es enthielt 44 Haplotypen (siehe Abbildung 16). Auf diesem Gerüst aufbauend wurden dann nacheinander zusätzliche Merkmale mit absteigender Homoplasie-Wahrscheinlichkeit hinzugefügt, teils manuell, teils unter Zuhilfenahme von TCS. Dabei handelte es sich vor allem um Längenvarianten von Chloroplasten-Mikrosatelliten und kurze, AT-reiche Indels. Obwohl es bis jetzt nur wenige Daten über die tatsächlichen Mutationsraten von Chloroplasten-Mikrosatelliten gibt (z.B. Provan *et al.*, 1999), ist anzunehmen, dass sie eine höhere Mutationsrate und damit größere Homoplasie-Wahrscheinlichkeit aufweisen als Punktmutationen oder längere Indels.

Üblicherweise werden genetische Netzwerke in einem Schritt unter Verwendung aller vorhandenen Daten erstellt. Bei der Behandlung von großen Datensätzen mit Haplotypen aus unterschiedlichen Arten können dabei viele Schleifen und falsche Verknüpfungen entstehen, was als ein Zeichen für homoplastische Merkmale zu werten sind. So wurden bei der Untersuchung des endemisch in Brasilien vorkommenden Baumes *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) große Unterschiede in der Topologie eines auf dem chloroplastidären *trnT-trnF*-Spacers basierenden Netzwerkes festgestellt, je nachdem ob Mikrosatelliten für die Konstruktion verwendet wurden oder Basensubstitutionen und Indels (Clevatti *et al.*, 2003). Als Gründe hierfür wurden unter anderem homoplastische Ereignisse angesehen. Die Erstellung eines Netzwerkes in zwei Schritten ist daher die logische Konsequenz bei einem sektionsübergreifenden Netzwerk, indem zur besseren Auflösung nah verwandter Arten auch Mikrosatelliten und andere zur Homoplasie tendierende Merkmale verwendet werden sollen.

## D.2.8 Auslese bestimmter Chloroplasten-Typen; Hybridisierung und Introgression oder Beibehaltung ursprünglicher Haplotypen?

Die Gruppe unterteilt sich in drei separate Chloroplasten-Linien (Gruppe I-III in Abbildung 17), welche durch ihre geographische Verbreitung charakterisiert sind. Eine Abgrenzung von Chloroplasten-Haplotypen aufgrund geographischer und nicht taxonomischer Natur wurde auch schon in anderen Pflanzenarten aus unterschiedlichen Familien beobachtet, so z.B. bei *Quercus* (Kanno *et al.*, 2004 and Dumolin -Lapègue, 1997; Whittimore und Schaal, 1991), *Betula* (Palme *et al.*, 2004), *Eucalyptus* (McKinnon *et al.*, 2004) und *Lithocarpus* (Cannon und Manos, 2003). In kleinräumig vorkommenden *Macaranga*-Arten ist diese geographische Auftrennung weniger ausgeprägt, wohl aber bei den weit verbreiteten Arten wie *M. bancana* und *M. hullettii*. In Akzessionen dieser Arten wurden bis zu sechs verschiedene Haplotypen gefunden (*M. bancana* und *M. depressa*), zugleich teilen sich aber bis zu neun Arten den gleichen Haplotyp (HT 24a und HT 29a). Dabei handelt es sich sowohl um verbreitete als auch um endemisch vorkommende Arten, Myrmekophyten wie Nichtmyrmekophyten (näheres dazu D.3). Eine ähnliches Verteilungsmuster von Haplotypen wurde auch in anderen, schnell radiierenden Gruppen gefunden, wie zum Beispiel in einem Komplex nahe verwandter *Hordeum*-Arten (Jakob und Blattner, 2006). Dies ist ein weiteres Indiz für eine schnelle Radiation innerhalb der *bancana*-Gruppe. In den anderen *Pachystemon*-Linien (*hypoleuca*-, *kingii*- und *puncticulata*-Gruppe) ist die geographische Unterteilung nicht so stark ausgeprägt. Dies mag auch eine Folge der wegen eingeschränkter Verfügbarkeit geringeren Anzahl von untersuchten Akzessionen sein. Drei Szenarien können zur Interpretation der Ergebnisse herangezogen werden. Zunächst einmal könnte es sich bei den *Macaranga*-Arten der *bancana*-Gruppe um sogenannte Metapopulationen handeln. Die Entstehung einer Metapopulation ist nur durch permanente Kreuzung verschiedener Arten über deren gesamtes Verbreitungsgebiet hinweg möglich, wobei sich ein Chloroplasten-Typ in bestimmten Regionen durchsetzen kann. Allerdings scheint dieses Szenario für die untersuchten *Macaranga*-Arten aus mindestens zwei Gründen wenig wahrscheinlich: Zum Einen sollte bei regelmäßigem Genfluss eine phänotypische Vereinheitlichung der beteiligten Arten bemerkbar sein. Zum Anderem bestehen bei sympatrisch vorkommenden *Macaranga*-Arten aufgrund unterschiedlicher Bestäuber und/oder unterschiedlicher Blütezeiten präzygotische Barrieren, was den zwischenartlichen Genfluss erheblich einschränken dürfte, (Davies und Ashton, 1999; Moog, 2002; Moog *et al.*, 2002). Bei der näheren Betrachtung der Datenlage fällt außerdem auf, dass verschiedene Arten am gleichen Fundort meistens unterschiedliche Haplotypen besitzen. Die Akzessionen aus Luasong in Sabah stellen hierbei eine auffallende Ausnahme dar, da alle Proben sowohl der *bancana s.str.*- als auch der *motleyana*- und der *hypoleuca*-Gruppe den selben Haplotypen besitzen.

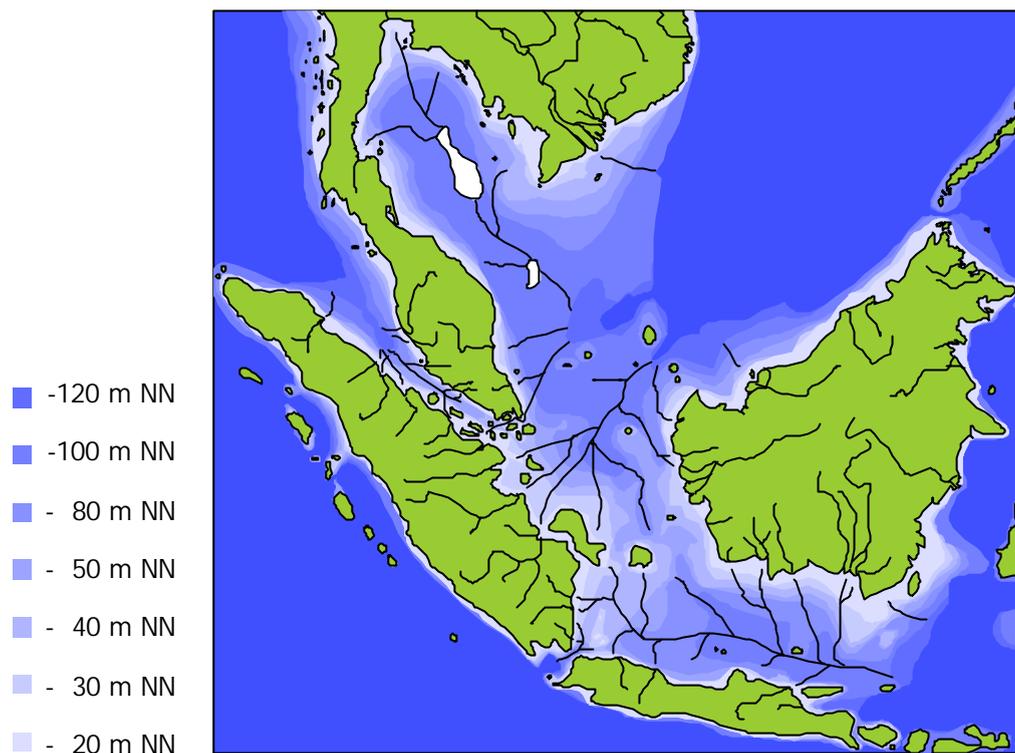
Zur Ausbildung regionenspezifischer Chloroplastenhaplotypen kann es auch durch Introgression kommen. Dafür ist vorauszusetzen, dass sich nahe verwandte Arten trotz möglicher präzygotischer Barrieren gelegentlich miteinander kreuzen könnten. Der Hybrid erhält seinen Chloroplastentyp von der Mutterpflanze. Wenn er sich nun aber mit väterlichen Populationen rückkreuzt, resultiert als Endprodukt eine Pflanze, die phänotypisch aussieht wie die väterliche Art, jedoch den Chloroplasten der mütterlichen Art besitzt („chloroplast capture“). Introgression kann auch dann passieren, wenn Pollen einer Art durch Windverdriftung in neue, bisher von dieser Art nicht besiedelte Gebiete eindringt. Durch wiederholte Bestäubung der lokalen Individuen können die ortsansässigen Arten genetische Merkmale der fremden Art übernehmen, während der maternal über die Eizelle vererbte Chloroplastenhaploypotyp derselbe bleibt. Ein solches Szenario ist nur denkbar, wenn die lokale Population nur wenige Individuen aufweist. Hiervon kann jedoch ausgegangen werden, da es sich bei *Macaranga* um Pionierbäume handelt, deren ursprüngliches Habitat z.B. entlang von Flussufern oder in Baumsturzlücken liegt. Für dieses Szenario spricht eine mögliche Sippenseparation während der Eiszeiten (siehe D.2.9). Die heutzutage teilweise

großflächige Ausbreitung ist dagegen erst ein Phänomen der letzten Jahrzehnte, in denen Waldrodung und Waldbrände stark zugenommen haben. Unterstützt wird dieses Szenario auch dadurch, dass auch *M. hypoleuca* aus Luasong, Sabah, denselben Haplotypen besitzt wie Arten der *bancana*-Gruppe I. Eine Hybridisierung ist hier wahrscheinlich, zumal *M. hypoleuca* z. B. mit *M. hullettii* sympatrisch vorkommt. und beide Arten synchron verlaufende Blühperioden mit dem selben Bestäuber haben (Moog, 2002).

Eine dritte Interpretationsmöglichkeit des Phänomens der geographischen Assoziation der Chloroplasten-Haplotypen besteht im sog. „lineage sorting“. Darunter versteht man die Beibehaltung bzw. noch nicht voll ausgeprägte Auftrennung der in den Vorfahren vorhandenen Chloroplastenhaplotypen auf die Tochterarten. Dieses Szenario würde für eine erst junge Radiation sprechen, bei der es noch nicht zu einer Fixierung unterschiedlicher Chloroplasten gekommen ist, sondern die Vielfalt der „alten Haplotypen“ („ancient haplotypes“) in den neuen Arten erhalten bleibt. Interessant hierbei ist, dass in Luasong/Sabah alle *Pachystemon*-Arten denselben Haplotypen aufweisen, und zwar unabhängig davon, aus welcher Gruppe sie stammen. Nicht nur *M. hypoleuca* besitzt diesen Haplotypen, sondern auch *M. motleyana*. Die konsequente Beibehaltung eines Haplotyps an diesem Standort könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich um einen alten, übrig gebliebenen Haplotyp aus der Vorläuferart handelt. Eine Entscheidung zwischen den genannten Szenarien kann auf der Basis des vorhandenen Datensatzes nicht getroffen werden. Das übergreifende Netzwerk bietet jedoch einen ersten Überblick und eine gute Basis für Detailuntersuchungen in den jeweiligen Gruppen.

### D.2.9 Gedanken zur Biogeographie myrmekophytischer *Macaranga*-Arten mit Hilfe der Chloroplasten-Haplotypen

Eine morphologische Analyse der Gattungen *Macaranga* und *Mallotus* (Slik und van Welzen, 2001), sowie die Analyse der nukleären ITS-Region (Blattner *et al.*, 2001) hatten nahegelegt, dass *Macaranga* der Gattung *Mallotus* entspringt und letztere dadurch paraphyletisch wird. Wurdack *et al.* (2005) setzen *Macaranga* dagegen basal zum Subtribus *Rottlerinae* (siehe A.2.2.1). Nach erst kürzlich publizierten molekularen Stammbäumen auf der Basis der chloroplastidären *trnL-F*-Region sowie drei nukleären Markern sind die Gattungen *Macaranga* und *Mallotus* hingegen eher Schwestergruppen (Kuljo, 2005), und die Arten der Sektion *Pseudo-Rottlera* sowie einige neukaledonische Arten stehen an der Basis der Gattung *Macaranga*. Die Frage nach dem Ursprung der Gattung *Macaranga* bleibt jedoch weiterhin ungelöst. Basierend auf ihrer morphologisch-kladistischen Analyse stellten Slik und van Welzen (2001) die These auf, dass die ersten Arten der Gattung *Macaranga* keine Regenwaldpflanzen, sondern Pionierbäume der offenen Buschvegetation waren. Der Ursprung der Gattung wird dabei in das Oligozän bzw. frühe Miozän (vor 38-15 Mio. Jahren) gelegt, als das Weltklima überwiegend saisonal und trocken war. Auf der anderen Seite legen Sequenzanalysen nahe, dass die Sektion *Pseudo-Rottlera* basal sitzt und somit der Ursprung der Gattung eher in den Regenwäldern liegt (Blattner *et al.* 2001; Kulju *et al.* 2007). Auch wenn *Pseudo-Rottlera* heutzutage ausschließlich auf die Sunda-Provinz beschränkt vorkommt, bedeutet es nicht, dass dort auch der Ursprung der Gattung liegen muss. Es kann dann durchaus möglich sein, dass die fossilen Pollen aus dem mittleren bis frühen Eozän Europas und Australiens nicht nur von *Mallotus*, sondern auch von *Macaranga* stammen. Die maximale Ausbreitung des Regenwaldes im südostasiatischen Raum durch ansteigende Temperaturen und perhumide Bedingungen fand aber erst im mittleren Miozän (vor ca. 13 Mio. Jahren) statt (Morley, 2000), was auch als maximales Alter der myrmekophytischen Arten angenommen wird (Quek *et al.*, 2004). Zu diesem Zeitpunkt war der tropische Regenwald bis nach Japan ausgebreitet (von 10°S - 40°N).



**Abbildung 27: Geographische Entwicklung Südasiens während der letzten 250.000 Jahre. Dargestellt ist der Einfluss der Kälteperioden auf die Höhe des Meeresspiegels und die Landverbindungen in Südostasien.** Die verschiedenen Farben geben die Lage der einzelnen Regionen des Malaiischen Archipels in Bezug auf die aktuelle Meereshöhe an (Voris, 2000). Sichtbar werden dabei sowohl mögliche Flussverbindungen und entstandene Seen.

Obwohl es einige Studien gibt, die sich mit geologischen Aktivitäten und Klimaschwankungen im südostasiatischen Raum beschäftigen (z.B. Hall, 2002; z.B. Moss und Finch, 1997; Voris, 2000; Wilson und Moss, 1999), ist lediglich eine sehr hypothetische Interpretation möglich. Hinzu kommt, dass gerade in diesem Raum nur wenige Fossilien vorhanden sind oder durch Verdriftung nicht dem richtigen Zeitalter zugeordnet werden können. Des Weiteren existieren bisher von Südostasien nur wenige bio- und phylogeographische Analysen an Pflanzen und Tieren. Diese wenigen Studien deuten aber auf einen tiefen Einschnitt hin, mit vikariierenden Arten zwischen den Inseln und dem Festland, der etwa in das Quartär zurückdatiert werden kann (Cannon und Manos, 2003). Nach dem heutigen Stand des Wissens existierten in den letzten 250.000 Jahren ungefähr zu 43 % der gesamten Zeit Landbrücken zwischen der Halbinsel Malaysia, Sumatra, Java und Borneo, bei einem Meeresspiegel von -50 m NN (siehe Abbildung 27). Interessant ist auch, dass für etwa die Hälfte des Zeitraums bei lediglich -40 m NN ein schmaler Korridor zwischen Borneo und Sumatra existierte, der einen Austausch der Populationen ermöglichen konnte. Der sinkende Meeresspiegel war mit einer Klimaveränderung verbunden, die zunehmende Trockenheit und saisonale Schwankungen mit sich brachte. Die Bedingungen für regenwaldangepasste Pflanzen und damit auch die Myrmekophyten verschlechterten sich. Aufgrund des damit einhergehenden Rückzugs der Regenwaldarten in bestimmte Refugien, wie sie teilweise von Slik *et al.* (2003) beschrieben wurden, ist auch eine Sippen-Separation denkbar. Mit Hilfe einer molekularen Uhr könnten die Artbildungs- und Kolonisierungsereignisse zeitlich besser abgeschätzt werden. Ein Fehlen von *Macaranga*-Fossilien in Südostasien und die nicht eindeutige Unterscheidung von *Mallotus*- und *Macaranga*-Pollen, machte eine solche Kalibrierung aber bisher unmöglich.

In der Sektion *Pruinosae* scheint die Entwicklung der Arten von der Halbinsel Westmalaysia auszugehen, da die basalen Haplotypen HT 1 und HT 3a die einzigen Haplotypen sind, die in Westmalaysia existieren. HT 1 kommt nur in Westmalaysia vor (bei zwei untersuchten Arten), und HT3a sowohl in Westmalaysia als auch in Ostkalimantan. Die Ausbreitung verlief demnach über zwei Pfade durch Borneo, wobei Sabah jeweils am Endpunkt der Ausbreitungswege steht. Die Haplotypen HT 8a, b und c sind im Osten von Sabah verbreitet, HT 6, 3e und 3f in den Bergketten im Westen Sabahs. Ob es sich bei der geographischen Trennung der *Pruinosae*-Arten in West- und Ost-Sabah um einen Zufall oder um eine tatsächliche geographische Aufteilung der Haplotypen handelt, kann aufgrund der geringen Probandichte nicht eindeutig festgestellt werden. Hierzu sind umfangreichere populationsgenetische Studien speziell in dieser Sektion nötig, die bereits begonnen wurden (Daniela Guicking, pers. Mitt.).

Anders verhält es sich bei den Sektionen *Winklerianae* und *Pachystemon*. Beide Arten der Sektion *Winklerianae* sind endemisch auf Borneo und vermutlich dort entstanden. Auch die zentralen Haplotypen (HT 26a und 28) von *Pachystemon* kommen ausschließlich auf Borneo vor. Haplotypen vom Festland oder anderen Inseln sitzen ausnahmslos peripher. Dies spricht für einen borneensischen Ursprung auch der Sektion *Pachystemon*. Das Netzwerk legt zwei unabhängige Ausbreitungsereignisse zum malaysischen Festland nahe, sowie eine mögliche Migration zurück nach Borneo. Eines dieser Ereignisse betrifft die *hypoleuca*-Gruppe. Während alle zentralen und älteren Haplotypen dieser Gruppe in Borneo vorkommen, sitzt der Haplotyp aus Westmalaysia peripher. Die zweite Besiedlung Westmalaysias durch *Pachystemon*-Arten fand in der ‚Gruppe III bzw. über die *puncticulata*-Gruppe statt (inkl. einer Art von Java; siehe Abbildung 17). Vermutlich ist die *puncticulata*-Gruppe gemeinsam mit der *bancana*- Gruppe III auf der Halbinsel Malaysia entstanden. Innerhalb der *puncticulata*-Gruppe kam es dann anscheinend zu einer Rekolonisation von Sarawak und Brunei auf Borneo (HT 34e, 34f, 38). Diese konnte über die zeitweise existierenden Landbrücken erfolgen.

Der Chloroplastenhaplotyp, der bei der einzigen *M. triloba*-Probe von Sumatra vorkommt, zeigt Ähnlichkeiten mit den Arten der sonst ausschließlich auf Borneo vorkommenden ‚Gruppe II. Die mögliche Ausbreitung dieses Haplotypen kann über die weiter oben geschilderte Landverbindung zwischen Borneo und Sumatra geschehen sein. Die Verwandtschaft der Haplotypen zwischen Westmalaysia und Java bleibt dagegen aufgrund der großen molekularen Unterschiede zwischen den Pflanzen aus diesen beiden Gebieten sowie die geringe Besammlungsichte weitgehend unklar.

Die Arten der *bancana*-Gruppe aus Sabah nehmen gegenüber den anderen Regionen eine separate Position ein, zudem gibt es eine deutliche Auftrennung zwischen Ost- und Westsabah. Die Abgrenzung von Sabah zu dem Rest von Borneo ist mit dem sehr alten Bergmassiv zu begründen, dass sich von Nordosten nach Südwesten quer durch Borneo zieht und im Bereich von Sabah als Crocker Range bezeichnet wird. Die besondere Stellung von Sabah konnten auch Slik *et al.* (2003) bei ihrer floristischen Studie nachweisen. Für eine Ausbreitung aus Sabah in Richtung Ostkalimantan gibt es nur innerhalb der *kingii*- und *hypoleuca*-Gruppe einen Hinweis. Innerhalb der *bancana*-Gruppe scheint Sabah dagegen eher eine Sackgasse zu sein. Die Auftrennung der Haplotypen nach Ost- und West scheint vor allem dem Vorkommen der Arten an den entsprechenden Standorten zu folgen. Während die Arten mit den Haplotypen 21 -23 überwiegend östlich bis nach Ostkalimantan verbreitet sind, kommen die Arten mit den Haplotypen 24 und 25 meist nur in der Bergkette im Westen vor.

Die *kingii*-Gruppe scheint sich aus der ‚Gruppe II entwickelt zu haben. Die Haplotypen dieser Gruppe haben sich demnach von Nordostsarawak/Brunei über Sabah bis nach Ostkalimantan ausgebreitet, was besonders gut an der auf Borneo weit verbreiteten *M. lamellata* deutlich

wird. Die endemisch in bestimmten Gebieten Borneos vorkommenden *M. caladiifolia* und *M. umbrosa* besitzen Haplotypen, die ihrer geographischen Zuordnung entsprechend mit den in Nordostsarawak/Brunei vorkommenden *M. lamellata*-Haplotypen assoziiert sind.

Die Vielfalt der Haplotypen innerhalb einer Art ist nicht ausschließlich auf weit verbreitete Arten beschränkt; so weist auch die auf Sabah beschränkte Art *M. indistincta* sechs Haplotypen bei nur fünf untersuchten Populationen und acht Akzessionen auf. Bei der Bestimmung der Wurzel der Sekt. *Pachystemon*, die durch TCS bei der Sabah-Gruppe gesetzt wurde, muss berücksichtigt werden, dass zwar nahezu alle Arten in die Studie miteinbezogen wurden, jedoch nicht in gleichem Maße auch verschiedene geographische Populationen. Insbesondere zwischen den Gruppen, in denen mehrere leere Haplotypenpositionen existieren, kann man erwarten, dass diese nicht ausgestorben sind, sondern nicht besammelt wurden.

Eine flächendeckende Probennahme ist aber nicht nur aufgrund des logistischen Schwierigkeiten fast unmöglich, sondern auch wegen der Zerstörung der primären Regenwälder auf Borneo problematisch. Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnten sich vermehrt Erstbesiedler durchsetzen, die vor allem auf Sekundärwald und gestörte Habitate spezialisiert sind. Arten, die auf einen wenigstens halbwegs intakten Primärwald angewiesen sind, wurden daher immer mehr verdrängt. Mit dem Vordringen des Sekundärwaldes kann es aber nun auch möglich sein, dass sich die Verbreitung der Haplotypen verändert hat. Solche Überlegungen werden hier aber nicht weiter fortgeführt, da die Klärung der aufgeworfenen Fragen populationsgenetische Studien erfordert, die derzeit für verschiedene Arten der myrmekophytischen Sektionen begonnen werden (Daniela Guicking, pers. Mitt.), insbesondere mit dem Focus auf die möglicherweise unterschiedliche Populationsstruktur von myrmekophytischen versus nicht myrmekophytischen Arten.

## D.3 Koevolution von Pflanze und Ameise innerhalb der Gattung *Macaranga* ?

Der kombinierte Einsatz verschiedener Genome und Genregionen zur Untersuchung phylogenetischer Zusammenhänge ermöglicht es, nicht nur Genbäume, sondern tatsächliche Stammbäume zu erstellen. Die AFLP-Analyse vermeidet die Überinterpretation eines bestimmten Locus, da sie Ausschnitte aus dem gesamten Kerngenom mit in die Untersuchung einbezieht. Diese Methode kann aber nur in einem taxonomisch eng begrenztem Rahmen eingesetzt werden, entweder zwischen nahe verwandten Arten (z.B. Després *et al.*, 2003; z.B. Kardolus *et al.*, 1998) oder innerartlich (z.B. Angiollo *et al.*, 1999; Gaiotto *et al.*, 1997; z.B. Paul *et al.*, 1997). Betrachten wir nun alle bisher vorliegenden phylogenetischen Daten für die myrmekophytischen Sektionen der Gattung *Macaranga*, ist es möglich, eine durchaus präzise Analyse zur Entstehung der Ameisenpflanzen zu erstellen.

Neben den früher schon durchgeführten ITS-Sequenzierungen (Blattner *et al.*, 2001), der RAPD-Analyse (Bänfer, 1999; Blattner *et al.*, 2001), sowie einer morphologischen Analyse (Davies *et al.*, 2001) kommen in der vorliegenden Arbeit eine Chloroplasten-Phylogenie und eine AFLP-Analyse hinzu. Pilotversuche mit verschiedenen Mitochondrien-Loci im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit blieben ohne Ergebnis, da die Variabilität der untersuchten Loci nicht ausreichend für die vorliegende Fragestellung war (Daten nicht dargestellt). Eine erst vor kurzem publizierte Studie verwendete die chloroplastidäre *trnL-F*-Region in Kombination mit nukleären Sequenzen der ITS-Region, eines Phytochrom C-Gens und eines Glutaminsynthetase-Gens zur Erstellung von Gesamtphylogenien der Gattungen *Macaranga* und *Mallotus* (Kulju *et al.*, 2007). In diese Untersuchung wurden jedoch nur wenige myrmekophytische Vertreter einbezogen, so dass sie für die hier verfolgten Fragestellungen keine wesentlichen neuen Erkenntnisse brachte.

Auch auf Seiten der Ameisen wurden im Laufe der letzten Jahre viele neue Erkenntnisse gewonnen. Obwohl die Aussagen der mitochondrialen Stammbäume nicht eindeutig mit der Zuordnung zu den Morphospezies übereinstimmen (Feldhaar *et al.*, 2003aa), konnten doch aufgrund des neuen Wissens um Besiedlungsstrukturen und Verhalten der Ameisen (z.B. Federle *et al.*, 2000; Federle *et al.*, 2002; Feldhaar *et al.*, 2003bb) und einer geographisch groß angelegten Studie von (Quek *et al.*, 2004) viele neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Um die Evolution der Myrmekophytie innerhalb der Gattung *Macaranga* zu untersuchen, können daher jetzt mehrere Aspekte in die Betrachtung mit einbezogen werden; die Phylogenie der Pflanzen, die Phylogenie der Ameisen und die wechselseitigen Anpassungen an das Zusammenleben mit den jeweiligen Partnern.

Anhand der bis jetzt vorliegenden Ergebnisse lässt sich feststellen, dass eine spezifische ein-zu-eins-Koevolution von Ameisen und Pflanzen im Sinne einer Kospeziation wohl nicht stattgefunden hat. Schon eine frühe Arbeit von Fiala *et al.* (1999) zeigte, dass eine Ameisenmorphospezies Partner mehrerer Pflanzenarten sein kann, als auch, dass eine Pflanzenspezies in der Regel von mehr als einer Ameisenmorphospezies besiedelt wird.

### D.3.1 Anmerkungen zu der Ameisenevolution

Neuere phylogeographische, auf mitochondrialen Haplotypen beruhende Studien der *Crematogaster (Decacrema)* -Gruppe weisen auf eine deutliche genetische Trennung der Morphospezies zwischen der Halbinsel Malaysia und der Insel Borneo hin, eine ähnliche Trennung besteht auch zwischen Sarawak und Sabah (Feldhaar *et al.*, 2003aa; Quek *et al.*, 2004). Die molekular charakterisierten Linien der Ameisenmorphospezies aus der *captiosa*-Gruppe kolonisieren ein breites Spektrum von Pflanzen (Feldhaar *et al.*, 2003aa). Eine

*captiosa*-Untergruppe, welche die Morphospezies 1, 2, 4 und 5 enthält, kommt fast ausschließlich auf Pflanzen der Sektion *Pachystemon* vor, während die msp. 1 und 2 der zweiten *captiosa*-Untergruppe ausschließlich in Arten der Sektion *Pruinosae* leben. Interessant hierbei ist, dass die msp. 2 der Untergruppe angehört, zu der sonst ausschließlich besiedelnde Ameisen von *Pachystemon*-Arten gehören.

Aufgrund der fehlenden Definition von Morphotypen bei der Arbeit von Quek *et al.* (2004) lässt sich leider nur schwer ein Vergleich der Stammbäume aus Feldhaar *et al.* (2003) und Quek *et al.* (2004) vornehmen. Es ist aber zu vermuten, dass es sich bei Linie G aus Quek *et al.* (2004) überwiegend um die *Pruinosae* besiedelnde Morphospezies 2 handelt, oder um eine andere Art der zweiten *captiosa*-Gruppe. Bei den Linien H und F handelt es sich vermutlich um die beiden Morphospezies 4 bzw. 3, bei C um Morphospezies 6 und bei A um die bei Feldhaar *et al.* (2003a) ebenfalls basal sitzenden msp. 7 und msp. 10 (ehemals msp. 3 aus Borneo, pers. Mitt. H. Feldhaar).

Identisch bei beiden Analysen ist die basale Position der Morphospezies 8 (*Crematogaster* sp. SKY32 bei Quek *et al.*, 2004), die ausschließlich die beiden Arten der Sektion *Winklerianae* besiedelt und zu allen übrigen *Macaranga* besiedelnden *Crematogaster*-Ameisen eine große genetische Distanz aufweisen. Innerhalb der letzteren sitzen bei beiden Analysen die *M. motleyana* besiedelnden Arten (msp. 10 und 3; Feldhaar *et al.* 2003a bzw. Linie A; Quek *et al.* 2004) basal zu allen übrigen *Crematogaster* (*Decacrema*)-Arten. Nach Quek *et al.* (2004) zeichnet sich eine klare Trennung ab zwischen den wachslaufenden Ameisenarten und denjenigen Arten, denen diese Fähigkeit fehlt.

Da es sich bei der Arbeit von Quek *et al.* (2004) ausschließlich um eine molekulare Arbeit ohne nähere Beschreibung der Morphologie der Ameisenarten handelt, ist es schwer zu sagen, ob der Stammbaum tatsächlich die Phylogenie der Art widerspiegelt oder – wie bei *Macaranga* – auch Introgression eine Rolle spielt und die Mitochondrien-Daten daher in die Irre führen können. Auch bei den Ameisen scheint der mtDNA-Haplotyp nicht immer den Artgrenzen zu folgen. Weiterführende AFLP-Analysen zur Aufstellung eines Kern-Stammbaums sind daher geplant (Feldhaar, pers. Mitt.).

Die beiden Morphospezies 3 und 4 scheinen allopatrisch vorzukommen, wobei msp. 3 die msp. 4 in den montanen Regionen ablöst (Moog, 2002). Neuere Studien haben gezeigt, dass auf den äußeren Ästen von älteren Bäumen sowohl der Sekt. *Pachystemon* als auch der Sekt. *Pruinosae* der eigentlich übliche Ameisenpartner häufig durch Morphospezies 1 abgelöst wird (Feldhaar *et al.*, 2003aa; 2003bb). Vergleichende Untersuchungen im Primär- und Sekundärwald haben außerdem gezeigt, dass in beiden Habitaten eine unterschiedliche Besiedlung stattfinden kann (Murase *et al.*, 2003). Ein solches Phänomen war bisher nur von *M. lamellata* bekannt, die je nach Standort entweder durch *Crematogaster* msp. 5 oder eine *Camponotus*-Art besiedelt wird. Bei den oben genannten Untersuchungen wurden Jungpflanzen von *M. bancana* in Sarawak untersucht; dabei wurde festgestellt, dass sämtliche Bäume des Primärwaldes durch die „übliche“ *Crematogaster*-Morphospezies besiedelt wurden. Im Sekundärwald hingegen wurde ungefähr die Hälfte aller untersuchten Pflanzen durch unspezifische Ameisen besiedelt. Auch diese Studie unterstützt die Erkenntnis, dass eine Anpassung an die spezifische Vergesellschaftung von Ameise und Pflanze stattgefunden hat, das System aber flexibel genug ist, um auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Murase *et al.* (2003) schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die Assoziation zwischen den Partnern im Sekundärwald schwächer und pflanzeeigene Abwehrmechanismen stärker ausgeprägt sind. Auch die zur Verfügung stehende Lichtmenge scheint eine Rolle zu spielen, unklar ist jedoch, ob Standort und Lichteinfall eine Bedeutung für die Pflanze oder auch für die Partnerameise eine direkte Bedeutung hat.

### D.3.2 Evolution der Myrmekophytie innerhalb von *Macaranga*

Obwohl sich echte Myrmekophyten nur innerhalb der immergrünen tropischen Regionen ausgebildet haben, stellen fast alle *Macaranga*-Arten myrmekophile Bäume (im Sinne von ameisenfreundlichen Pflanzen) dar, die Ameisen mit Hilfe von frei auf der Oberfläche verteilten Nährkörperchen (z. B. *M. tanarius*) oder extrafloralen Nektarien (z. B. *M. rostrata*, *M. conifera*) anlocken. In der nahe verwandten Gattung *Mallotus* sind solche Anpassungen nicht vorhanden. Man kann daher davon ausgehen, dass es sich bei solchen Erscheinungen um Präadaptationen für die Ausprägung echter Myrmekophytie handelt. Es stellt sich die Frage, wie und wie oft sich echte Myrmekophyten innerhalb der Gattung entwickelt haben, und ob und in welcher Form eine Koadaptation und/oder Koevolution zwischen Ameisen und Pflanzen stattgefunden hat.

Trotz zahlreicher Analysen auf der Basis morphologischer (Davies *et al.*, 2001) und molekularer Daten (Bänfer, 1999; Blattner *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2001), ist die Phylogenie der drei Myrmekophyten enthaltenden *Macaranga*-Sektionen bisher nicht eindeutig aufgeklärt; weder die Beziehungen zueinander noch die Verhältnisse im inneren einer Gruppe. Auch wenn der morphologisch generierte Baum (Davies, 1996) eine klare Auftrennung der beteiligten Gruppen zeigt, kann das sicherlich auf die Einbeziehung der Merkmale für die myrmekophytische Anpassung zurückzuführen sein. An der geringen Unterstützung der gefundenen Gruppe ist zu erkennen, dass viele morphologische Merkmale homoplastischen Ursprungs sind.

Wie in Kapitel D.3.1 dargestellt, ist die Kombination der Sektion *Winklerianae* und Morphospezies 8 in *Macaranga* das einzige Beispiel für eine hochspezifische Bindung von Ameisen und Pflanzen. Ob es sich dabei um ein koevolutives Ereignis handelt, ist trotz der sehr spezifischen Assoziation eher zweifelhaft. Bei der Morphospezies 8 handelt es sich offensichtlich um eine ältere *Crematogaster*-Art (Feldhaar *et al.*, 2003a; Quek *et al.*, 2004), deren minimales Alter auf 12 Mio. Jahre (Mittleres Miozän) geschätzt wird (Quek *et al.*, 2004) und die nicht näher mit den anderen *Macaranga*-assoziierten *Crematogaster*-Arten verwandt ist. Zu dieser Zeit herrschten hohe Temperaturen mit einer Ausbreitung des tropischen Regenwaldes bis nach Japan (10°S-40°N). *M. winkleri* und *M. winkleriella* sind daher möglicherweise älter als die Arten der Sektionen *Pruinosae* und *Pachystemon* (Blattner *et al.*, 2001), und sind genetisch scheinbar nicht näher miteinander verwandt. Möglich ist, dass die *Winklerianae*-Arten ursprünglich durch andere Ameisen besiedelt wurden und *Crematogaster* einen Partner darstellt, der im Laufe der Zeit den ursprünglichen Partner verdrängt hat. Dass eine Übernahme durch andere Ameisen nicht unwahrscheinlich, sondern durchaus üblich ist, zeigt das Besiedlungsmuster vieler *Macaranga*-Arten, die als junge Pflanzen durch ihren „normalen“ Partner und als ausgewachsene Bäume durch Morphospezies 1 besiedelt werden können (Feldhaar *et al.*, 2003bb).

Nicht nur in der Sektion *Winklerianae*, auch innerhalb der Sektion *Pruinosae* hat sich die Myrmekophytie wohl unabhängig entwickelt. Erstens ist die Art der Interaktion innerhalb dieser Sektion deutlich anders als bei den beiden anderen Sektionen (markgefüllte Stängel vs. hohle Stängel, Besiedlung erst zu einem späteren Zeitpunkt der Keimlingsentwicklung, Nährkörperchen auf der Oberseite der Stipeln). Zweitens steht die weit verbreitete, nicht myrmekophytische Art *M. gigantea* innerhalb der Sektion in einer basalen Position (siehe Abbildung 25). Drittens werden die Arten dieser Sektion fast ausschließlich durch *Crematogaster* (*Decacrema*) msp. 2 besiedelt (bei älteren Pflanzen meist auch msp. 1; beide gehören zur *captiosa*-Gruppe). Die terminale Position der *Pruinosae* besiedelnden *Crematogaster*-Arten im Phylogramm (Feldhaar *et al.*, 2003aa; Quek *et al.*, 2004) könnte ein Hinweis auf die erst junge Entfaltung dieser Gruppe sein. Wenn auch *Crematogaster* msp. 2 fast ausschließlich in der Sekt. *Pruinosae* vorkommt, erscheint eine direkte Koevolution beider Partner zweifelhaft. Es ist eher wahrscheinlich, dass die Sektion zuerst entstanden ist

und erst sekundär die Assoziation mit *Crematogaster* stattgefunden hat. Dies kann relativ schnell geschehen sein, da die präadaptiven Merkmale (Nährkörperchen, EFNs, Prostomata) weit verbreitet in *Macaranga* vorkommen. Gegen die Kospeziation mit Ameisen spricht auch die starke ökologische Anpassung der meisten Arten an bestimmte Standorte.

Eine Interpretation der Evolution der Myrmekophytie innerhalb der Sektion *Pachystemon* fällt im Gegensatz zur den bisher genannten Gruppen wesentlich schwerer. Zum einen gibt es innerhalb der Sektion fünf morphologisch wohldefinierte Gruppen (*puncticulata*-, *hypoleuca*-, *kingii*-, *motleyana*- und *bancana s.str*-Gruppe), von denen auf der molekularen Ebene jedoch nur vier differenzierbar sind (*puncticulata*- *hypoleuca*-, *kingii*- und *bancana*-Gruppe), zum anderen kommen als besiedelnde Ameisenpartner sowohl zahlreiche *Crematogaster* (*Decacrema*)- Morphospezies als auch nicht näher miteinander verwandte *Camponotus*-Arten in Frage.

Die *puncticulata*-Gruppe mit der einzigen spezifisch besiedelten myrmekophytischen Art *M. puncticulata* wird ausschließlich von *Camponotus* sp. 1 bewohnt (Federle *et al.*, 1998), über deren Alter nichts bekannt ist. Nicht nur der Ameisenpartner ist ungewöhnlich, sondern auch die Art der Besiedlung. Während *Crematogaster*-Kolonien auf jeweils einen Baum beschränkt sind, teilweise sogar ein Baum durch mehrere Kolonien auch unterschiedlicher Ameisen bewohnt wird, bildet *Camponotus* sp. 1 sehr große Kolonien, die sich über mehrere Bäume erstrecken können. Eine eigenständige Entwicklung der Myrmekophytie wird ferner durch die Tatsache unterstützt, dass – ähnlich wie in der Sektion *Pruinosae* - die Nichtmyrmekophyten dieser Gruppe basaler sitzen als *M. puncticulata* selbst (vgl. Ergebnisse der AFLP-Analyse und cp-Daten, siehe Abbildung 10 und Abbildung 17). Prostomata als Orientierungshilfen für Ameisen sind in dieser Gruppe außerdem nicht vorhanden (Federle *et al.*, 2001).

Ebenfalls einzigartig, sowohl aufgrund der morphologischen Gruppenmerkmale (15 Staubblätter pro Blüte und 1 Blüte pro Glomerus, zwei Drüsenfelder pro Karpell; Nährkörperchen auf der Unterseite junger Blättern, Stipeln aufrecht und reduziert; ganze Pflanze auffällig bewachst; keine Prostomata) als auch der molekularen Daten und der Besiedlungsstruktur (überwiegend *Crematogaster Decacrema* msp. 6) ist die *hypoleuca*-Gruppe. Nach der Position dieser Gruppe in den molekularen Stammbäumen (insbesondere bei dem Chloroplastennetzwerk) und den teilweise homoplastischen morphologischen Merkmalen scheint eine eigene Entwicklung der Myrmekophytie jedoch eher unwahrscheinlich.

Schwieriger wird es bei der *kingii*-Gruppe, die nicht nur morphologisch äußerst divers ist, sondern auch bezüglich der Besiedlungsmuster der einzelnen Arten. Während *M. umbrosa* überwiegend durch *Crematogaster* (*Decacrema*) msp. 4 besiedelt wird, kommt bei *M. lamellata* wahlweise msp. 5 oder *Camponotus macarangae* (Maschwitz *et al.*, 1996) vor. Auch die Ausprägung der Prostomata ist nicht einheitlich. Während *M. umbrosa* einen ganz eigenen Typ besitzt, der zwischen den Stipeln verläuft (Federle *et al.*, 2001), sind bei *M. lamellata* keine Prostomata ausgebildet. Neben den molekularen Daten ist die Zusammengehörigkeit der Arten vor allem durch die ausgeprägte Schattentoleranz gegeben, die Davies (1996; 1998) als gemeinsam abgeleitetes Merkmal wertet. Sowohl die AFLPs als auch die Ergebnisse der Netzwerkanalyse deuten an, dass die ursprünglichste Art innerhalb dieser Gruppe *M. lamellata* ist. Es kann daher sein, dass die Besiedlung mit *Camponotus* Reliktcharakter hat und *Camponotus* den ursprünglichen Besiedler darstellt.

Von allen *Pachystemon*-Gruppen am schwierigsten zu interpretieren ist die *bancana*-Gruppe. So ist es noch nicht einmal klar, ob man besser von einer Gruppe oder von zwei Gruppen (*bancana s. str.* und *motleyana*-Gruppe) sprechen sollte. Morphologie (siehe Tabelle 10) und molekulare Daten treffen hier unterschiedliche Aussagen (Blattner *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2001 und eigene Analysen). Die Stellung der Nichtmyrmekophyten innerhalb der Gruppe ist

aufgrund mangelnder Auflösung der molekularen Stammbäume ebenfalls unklar. Obwohl morphologisch gesehen bei Davies *et al.* (2001) alle Nicht-myrmekophyten zusammen gruppierten, muss dieser Aspekt mit Vorsicht betrachtet werden, denn Merkmale, die Anpassung an die myrmekophytische Lebensweise darstellen, wurden in die Analyse mit einbezogen (Zirkelschluss!). Weiterhin werden die Arten dieser Gruppe sowohl von wachslaufenden Arten (*motleyana*-Gruppe) als auch durch die beiden nicht wachslaufenden Arten *Crematogaster* (*Decacrema*) msp. 3 und msp. 4 besiedelt (die meisten Arten der *bancana*-Gruppe). An bestimmten Standorten kommt auch *Camponotus* als besiedelnde Art hinzu (*M. griffithiana* auf Thailand), und die auf *M. motleyana* siedelnde *Crematogaster*-Art steht basal zu allen übrigen *Pachystemon*-bewohnenden Arten. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass sich Ameisen und Pflanzen innerhalb der *bancana*-Gruppe zwar koadaptiert, nicht aber koevolviert haben. Die vielschichtige Besiedlungsstruktur innerhalb dieser Gruppe deutet auf eine gemeinsame Entwicklung der *Decacrema*- und *Pachystemon*-Gruppe hin. *Macaranga motleyana* nimmt nicht nur bezüglich der Besiedlung, sondern auch auf molekularer Ebene eine Sonderstellung ein. Bei der ITS-Sequenzierung sitzen *M. motleyana* und *M. griffithiana* separat von den übrigen Arten der *bancana*-Gruppe, bei der Chloroplasten-Sequenzierung ist dies lediglich für *M. motleyana*, der Fall, während *M. griffithiana* Bestandteil der *bancana*-Gruppe III ist (siehe Abbildung 17). Da es sich bei allen nicht myrmekophytischen Arten (*M. depressa*, *M. rostrata*, *M. triloba*) dieser Gruppe um submontane bis montane Arten handelt, liegt es nahe, dass durch die Anpassung an höhere Lagen die obligate Ameisenbeziehung mehrfach unabhängig voneinander verloren gegangen sein kann. Wenn dem so ist, dann handelt es sich bei den relevanten Merkmalen für echte Myrmekophyten (hohler Stängel, Sitz der Nährkörperchen, veränderte Zusammensetzung der chemischen Abwehr) um plastische Merkmale, die leicht entstehen und wieder verschwinden können. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse zu den Abwehrmechanismen von *M. bancana* im Primär- vs. Sekundärwald (Murase *et al.*, 2003), sowie die Variabilität der Bewachsung bei *M. aëtheadenia*.

Insgesamt legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass echte Myrmekophytie in *Macaranga* drei- bis viermal unabhängig entstanden ist, jeweils einmal in den Sektionen *Pruinosae*, *Winklerianae* und *Pachystemon*, sowie möglicherweise in der *puncticulata*-Gruppe. Innerhalb von *Pachystemon* ist es vermutlich mehrfach zu einer Rückbildung der Myrmekophytie gekommen und in verschiedenen Habitaten auch zu einem Partnerwechsel, d.h. zur Vergesellschaftung mit anderen *Crematogaster*- oder *Camponotus*-Arten. Möglicherweise haben die Arten der Sekt. *Pruinosae* bereits angepasste *Crematogaster*-Arten als Ameisenpartner übernommen und haben so selber den Schritt von unspezifisch besuchten myrmekophilen Pflanzen zu echten Myrmekophyten relativ spät gemacht. Ob dabei *Crematogaster* die selektierende Art gewesen ist oder ursprünglich ein anderer Partner bei der Ausbildung der Myrmekophytie verantwortlich war, lässt sich jedoch nicht sagen. Denkbar ist, dass Ameisen der Gattung *Camponotus* die ursprünglichen Besiedler von *Macaranga*-Arten sind und *Crematogaster* erst bei schon ausgeprägter Ameisen-Pflanzen-Assoziation *Camponotus* auskonkurriert. Für diese These würde die (reliktartige) Beschränkung von *Camponotus*-Arten auf bestimmte Habitate (Moorwälder bei *M. puncticulata* und Primärwälder bei *M. lamellata*), geographische Regionen (Ostthailand bei *M. griffithiana*) und wenige Pflanzenarten sprechen.

## E Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte phylogenetische Analyse der Ameisenpflanzen aus der Gattung *Macaranga* (Euphorbiaceae) und ihres verwandtschaftlichen Umfelds mit Hilfe von AFLP-Fingerprinting („amplified fragment length polymorphisms“) sowie vergleichender Analyse von mehreren nichtkodierenden Chloroplasten-DNA-Loci vorgenommen.

Anhand dieser Untersuchungen sollten im Wesentlichen die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Wie stellen sich die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den myrmekophytischen *Macaranga*-Sektionen *Pachystemon*, *Winklerianae* und *Pruinosae* dar?
2. Wie sind die einzelnen Arten dieser Sektionen miteinander verwandt?
3. Wie oft ist die Lebensweise „Myrmekophytie“ unabhängig voneinander entstanden? Gibt es Hinweise auf Reversionen?
4. Wo liegt genealogisch und auch geographisch der Ursprung der Symbiose zwischen den myrmekophytischen *Macaranga*-Arten und ihren Partnerameisen?
5. Welche Bedeutung spielen koevolutive Entwicklungen für das *Macaranga-Crematogaster*-Symbiosesystem? Ist Myrmekophytie im Sinne einer Schlüsselinnovation (Givnish, 1997) als Stimulus für eine adaptive Radiation zu betrachten?

In Voruntersuchungen wurde zunächst die AFLP-Analyse und die vergleichende Chloroplasten-Sequenzierung etabliert, optimiert und geeignete Primer bzw. Loci identifiziert. Dabei konnten im einzelnen folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Aus 64 vorab untersuchten Primer-Kombinationen wurden acht Primerpaare, die distinkte, polymorphe und gut reproduzierbare Bandenmuster erzeugten, für die AFLP-Analyse ausgewählt. Mit einer Ausnahme handelt es sich hierbei um Primer, die ein C als erste selektive Base besitzen. Von 231 vorab untersuchten DNA-Templaten wurden letztendlich 108 Proben aus 43 *Macaranga*-Arten und 5 unbeschriebenen Morphospezies in die phylogenetische Untersuchung einbezogen. Die relevanten Sektionen konnten damit fast vollständig abgedeckt werden. Auf der Basis von 426 Merkmalen (An- bzw. Abwesenheit von Banden auf definierten Positionen) wurden Phänogramme (über UPGMA und NJ-Analyse) sowie Kladogramme („most parsimonious trees“) rekonstruiert. Zur statistischen Absicherung wurden Bootstrap-Analysen durchgeführt und im Falle der Kladogramme darüber hinaus der „consistency“-Index bestimmt. Die AFLP-Datensätze wurden zusätzlich einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen.
2. Mit Hilfe der verschiedenen Untersuchungsmethoden konnten weitgehend übereinstimmende Gruppierungen bzw. evolutive Linien identifiziert werden. Die Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* bilden eine jeweils gut gestützte monophyletische Gruppe. Beide sind vermutlich Schwesterguppen und damit gleich alt. Für die Monophylie der nur aus zwei Arten bestehenden Sektion *Winklerianae* ergab sich keine Unterstützung.
  - a. Die Arten der Sektion *Pruinosae* sind im AFLP-Baum gut aufgelöst. Die nicht myrmekophytische *M. gigantea* sitzt dabei an der Basis und ist Schwesterguppe zu den myrmekophytischen Arten.
  - b. Innerhalb der Sektion *Pachystemon* wurden mit Hilfe der AFLP-Analyse vier gut gestützte Gruppen identifiziert. Dabei handelt es sich um (1) die *hypoleuca*-Gruppe mit ihren zwei Arten *M. hypoleuca* und *M. beccariana*, (2) die *kingii*-Gruppe mit den drei hier untersuchten Arten *M. umbrosa*, *M. lamellata* und

*M. caladiifolia*, (3) die große *bancana*-Gruppe sowie (4) die *puncticulata*-Gruppe. Innerhalb der *bancana*-Gruppe ließ sich, jedoch mit deutlich geringerer Unterstützung, eine *motleyana*-Gruppe von einer *bancana* s. str.-Gruppe abgrenzen. Für die *puncticulata*-Gruppe konnte hier erstmals auf molekularer Ebene eine Zugehörigkeit zur Sekt. *Pachystemon* nachgewiesen werden. Der von Davies (2001) vorgenommene Ausschluss von *M. recurvata* aus der Sekt. *Pachystemon* konnte bestätigt werden.

3. Die Verwandtschaftsbeziehungen einzelner Arten zueinander sind in den AFLP-Bäumen nicht aufgelöst.
4. Für die vergleichende Chloroplasten-Sequenzierung wurden geeignete Sequenzbereiche mit Hilfe ausführlicher Pilotexperimente ausgesucht. Dazu wurden 12 verschiedene Chloroplasten-Regionen getestet. Mit 10 Primerpaaren konnten distinkte PCR-Amplifikate erzeugt werden. Nach Maßgabe der Sequenzvariabilität in Testsequenzierungen wurden die Bereiche *atpB-rbcL* und *psbI-trnS* für die phylogenetische Untersuchung ausgewählt. Für die Netzwerkanalyse wurde zusätzlich der *ccmp6*-Locus herangezogen.
5. Für die Chloroplasten-Phylogenie wurden für jeden Locus mehr als 100 Sequenzen analysiert. Neben 29 *Pachystemon*-Arten inkl. vier unbekannter Morphospezies, acht *Pruinosae*-Arten inkl. eines möglichen Hybriden und den beiden Arten der Sekt. *Winklerianae* wurden 22 weitere *Macaranga*- und 10 *Mallotus*-Arten in die Untersuchung einbezogen.
6. Zwischen den südostasiatischen Arten bestanden nur geringe Sequenzunterschiede, und innerhalb der Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* waren zahlreiche Sequenzen über Artgrenzen hinweg identisch. Maximum-Parsimonie-Kladogramme wurden rekonstruiert aus (a) 65 *atpB-rbcL*-Sequenzen (inklusive 11 *Mallotus*-Sequenzen), (b) 66 *psbI-trnS*-Sequenzen (inklusive acht *Mallotus*-Sequenzen) und (c) 62 kombinierten Sequenzen. Indels wurden mit (0/1) kodiert und als separate Merkmalsmatrix an die Sequenzdaten angehängen.
7. Die Auflösung der Kladogramme war für die im Fokus der Untersuchung stehenden Arten nur unbefriedigend. Innerhalb von *Macaranga* konnten nur wenige abgesicherte Gruppen identifiziert werden. Deutlich war die Zusammengehörigkeit der afrikanischen Arten und ihr Entstehung aus den südostasiatischen Arten. Die von Davies (2001) der Sektion *Pruinosae* zugeordnete *M. siamensis* steht deutlich außerhalb dieser Sektion. Die Arten der Sektionen *Pruinosae*, *Pachystemon* und *Winklerianae* bilden keine statistisch gesicherten monophyletischen Gruppen. Aufgrund der geringen Auflösung waren keine über die AFLP-Analyse hinausgehenden Schlussfolgerungen zur Phylogenie der myrmekophytischen Sektionen möglich.

Während der Pilotstudien stellte sich heraus, dass die Chloroplastensequenzen nahe verwandter Arten der Sektion *Pachystemon* weniger nach den Artgrenzen, sondern vielmehr nach geographischen Kriterien gruppieren. Es wurde daher zusätzlich eine phylogeographische Analyse der Chloroplasten-Sequenzen auf der Basis eines Parsimonie-Netzwerks durchgeführt. Neben dem *atpB-rbcL*-Spacer und einer Teilsequenz des *psbI-trnS*-Locus (*ccmp2*) wurde dafür zusätzlich der *ccmp6*-Locus (ein Abschnitt des *ycf3*-Introns) sequenziert.

8. Das Gesamtalignment für diese Analyse hatte eine Länge von 1480 bp, davon entfielen auf den *ccmp6*-Locus 119 bp, auf den *atpB-rbcL*-Locus 929 bp und auf den *ccmp2*-Locus 432 bp. Die phylogeographische Untersuchung wurde mit 144 Proben aus 41 *Macaranga*-Arten durchgeführt. Darin enthalten waren 29 Arten (inkl. vier

- Morphospezies) mit 112 Proben der Sektion *Pachystemon*, sieben 7 Arten (inkl. eines potentiellen Hybriden) mit 22 Proben der Sekt. *Pruinosae* und zwei Arten mit 5 Proben der Sekt. *Winklerianae* .
9. Das voll aufgelöste statistische Parsimonie-Netzwerk umfasste 88 Haplotypen. Die Sektionen *Pachystemon* und *Pruinosae* bilden jeweils eine monophyletische Gruppe. Innerhalb von *Pachystemon* sind nur die *hypoleuca*- und *kingii*-Gruppe eindeutig abgegrenzt. Die Arten der *puncticulata*-Gruppe stehen zwar etwas separiert, stellen aber keine monophyletische Gruppe dar. Die *motleyana*-Gruppe ist von der *bancana*-Gruppe ebenfalls nicht getrennt.
  10. Die große *bancana* -Gruppe unterteilt sich in drei separate Chloroplasten-Linien, die offenbar geographischen Kriterien unterworfen sind. Die Gruppe I enthält mit Ausnahme einer *M. motleyana*-Probe alle Arten aus Sabah, die Gruppe II alle Proben aus Brunei, Sarawak und Ostkalimantan und die Gruppe III alle Arten aus Westmalaysia und Südthailand. Die *puncticulata*-Gruppe steht zwischen der Gruppe II und III der *bancana*-Gruppe. Das geographische Arrangement der Haplotypen unabhängig von der Artzugehörigkeit könnte durch Introgression (infolge gelegentlicher Hybridisierungsereignisse) und/oder „lineage sorting“ bedingt sein. Unter letzterem versteht man die Beibehaltung bzw. noch nicht voll ausgeprägte Auftrennung der in den Vorfahren vorhandenen Chloroplasten-Haplotypen auf die Tochterarten.
  11. Der Ursprung der Sektion *Pruinosae*, nach der – jedoch mit einer begrenzten Probenanzahl durchgeführten - phylogeographischen Untersuchung könnte auf der Halbinsel Westmalaysia liegen, von wo sich die Arten auf zwei Pfaden nach Borneo ausgebreitet haben. Im Gegensatz dazu scheint der Ausgangspunkt der Ausbreitung der *Pachystemon*-Arten Borneo zu sein. Von dort scheint es mehrere unabhängige Besiedlungsereignisse nach Westmalaysia gegeben zu haben, einmal in der *hypoleuca*-Gruppe, einmal in der *bancana*-Gruppe, und einmal in der *puncticulata*-Gruppe. Innerhalb der letzteren Gruppe kam es wahrscheinlich zu einer Rekolonisation von Sarawak und Brunei auf Borneo.
  12. Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass eine enge Ameisen-Pflanzen-Symbiose innerhalb der Gattung *Macaranga* mindestens drei-, möglicherweise viermal unabhängig voneinander entstanden ist (jeweils einmal in den Sektionen *Pruinosae* und *Winklerianae*, mindestens einmal in der Sektion *Pachystemon*). Eine Reversion hat mindestens einmal, möglicherweise häufiger in der *bancana*-Gruppe stattgefunden. Ob sich die Symbiose dabei in Westmalaysia oder in Borneo entwickelt hat, kann man nicht sicher sagen; bei einer unabhängigen Entwicklung wäre eine Entstehung aus präadaptierten Arten an beiden Orten denkbar.
  13. Ob und inwieweit die große Artenzahl in der *bancana*-Gruppe als eine Folge der Myrmekophytie anzusehen ist, bleibt zunächst offen. Die Myrmekophytie könnte in dieser Gruppe als Schlüsselinnovation gesehen werden, mit deren Hilfe neue Siedlungsräume erobert werden konnten und dabei neue Arten entstanden. In ungünstigen Habitaten konnte die Myrmekophytie wieder verloren gehen, z.B. aufgrund der Anpassung an die Höhenlage (*M. depressa*, *M. rostrata* und *M. triloba*). Innerhalb der Sektion *Pruinosae* scheint die Myrmekophytie keine Schlüsselinnovation darzustellen, da sich die einzelnen Arten in ihren ökologischen Präferenzen deutlich voneinander abtrennen.

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit liegen bereits in publizierter Form vor (AFLP-Analyse: Bänfer et al. 2004; Chloroplasten-Analyse: Vogel et al. 2003; Bänfer et al. 2006).

## F Literaturverzeichnis

UCMP Specimen Search (2004), (ed.: University of California - Museum of Paleontology).

**Adams, R. P., Zhong, M. und Fei, Y.** (1999) Preservation of DNA in plant specimens: inactivation and re-activation of DNases in field specimens. *Molecular Ecology* **8**, 681-684.

**Aggarwal, R. K., Brar, D. S., Nandi, S., Huang, N. und Khush, G. S.** (1999) Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 1320-1328.

**Agrawal, A. A.** (1998) Leaf damage and associated cues induce aggressive ant recruitment in a neotropical ant-plant. *Ecology* **79**, 2100-2112.

**Airy Shaw, H. K.** (1971) Malesian and other asiatic Euphorbiaceae. *Kew Bulletin* **25**, 473-553.

**Airy Shaw, H. K.** (1972) New or noteworthy species of *Macaranga* Thou. *Kew Bulletin* **23**, 88-105.

**Akhmetiev, M. A. und Vikulin, S. V.** (1995) Peltate leaves *Macaranga* Thouars (Euphorbiaceae) in the cenozoic of eastern Sikhote-Alin. *Paleontological Journal*, 151-156.

**Angiollo, A., Mencuccini, M. und Baldoni, L.** (1999) Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 411-421.

**Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., jr., Bermingham, T., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. und Saunders, N. C.** (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 489-522.

**Avise, J. C.** (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge, USA: Harvard University Press.

**Ayala, F. J., Weterer, J. K., Longino, J. T. und Haetl, D. L.** (1996) Molecular Phylogeny of *Azteca* Ants (Hymenoptera: Formicidae) and the Colonization of *Cecropia* Trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **5**, 423-428.

**Azuma, H., Thien, L. B. und Kawano, S.** (1999) Molecular phylogeny of *Magnolia* (Magnoliaceae) inferred from cpDNA sequences and evolutionary divergence of the floral scents. *Journal of Plant Research* **112**, 291-306.

**Baldwin, B. G. und Marcos, S.** (1998) Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10**, 449-463.

**Bänfer, G.** (1999) Molekulare Analyse von Verwandtschaftsbeziehung innerhalb der paläotropischen Myrmekophytengattung *Macaranga* THOU. Diplom, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

**Blattner, F. R., Weising, K., Bänfer, G., Maschwitz, U. und Fiala, B.** (2001) Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**, 331-344.

**Blüthgen, N., Verhaagh, M., Goitia, W., Jaffee, K., Morawetz, W. und Barthlott, W.** (2000) How plants shape the ant community in the amazonian rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. *Oecologia* **125**, 229-240.

**Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. und Davis, R. W.** (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-331.

**Brouat, C., Gielly, L. und McKey, D.** (2001) Phylogenetic relationships in the genus *Leonardoxa* (Leguminosae: Caesalpinoideae) inferred from chloroplast *trnL* intron and *trnL-trnF* intergenic spacer sequences. *American Journal of Botany* **88**, 143-149.

- Brouat, C., McKey, D. und Douzery, E. J. P.** (2004) Differentiation in a geographical mosaic of plants coevolving with ants: phylogeny of the *Leonardoxa africana* complex (Fabaceae: Caesalpinioideae) using amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* **13**, 1157-1171.
- Brouat, C., McKey, D. und Douzery, E. J. P.** (2004) Differentiation in a geographical mosaic of plants coevolving with ants: phylogeny of the *Leonardoxa africana* complex (Fabaceae: Caesalpinioideae) using amplified fragment length polymorphism markers. *Mol. Ecol.*
- Byrne, M., Macdonald, B. und Coates, D.** (1999) Divergence in the chloroplast genome and nuclear rDNA of the rare western australian plant *Lambertia orbifolia* Gardner (Proteaceae). *Molecular Ecology* **8**, 1789-1796.
- Cannon, C. H. und Manos, P. S.** (2003) Phylogeography of the southeast asian stone oaks (*Lithocarpus*). *Journal of Biogeography* **30**, 211-226.
- Castelloe, J. und Templeton, A. R.** (1994) Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **3**, 102-113.
- Chandler, G. T., Bayer, R. J. und Crisp, M. D.** (2001) A molecular phylogeny of the endemic australian genus *Gastrolobium* (Fabaceae: Mirbelieae) and allied genera using chloroplast and nuclear markers. *American Journal of Botany* **88**, 1675-1687.
- Chase, M. W. und Hills, H. H.** (1991) Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* **40**, 215-220.
- Chenuil, A. und McKey, D.** (1996) Molecular phylogenetic study of myrmecophyte symbiosis: did *Leonardoxa*/ant associations diversify via Cospeciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**, 270-286.
- Clegg, M. T. und Zurawski, G.** (1992) Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. In *Molecular Systematics of Plants*, (ed. D. E. Soltis P. S. Soltis und J. J. Doyle), S. 1-13. New York, USA: Chapman & Hall.
- Clegg, M. T.** (1993) Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 363-367.
- Clement, M., Posada, D. und Crandall, K. A.** (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1659.
- Colevatti, R. G., Grattapaglia, D. und Hay, J. D.** (2003) Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology* **12**, 105-115.
- Crandall, K. A. und Templeton, A. R.** (1993) Empirical Tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* **134**, 959-969.
- Crandall, K. A.** (1996) Multiple interspecies transmissions of human and simian T-Cell Leukemia/Lymphoma virus sype I Sequences. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 115-131.
- Cuenoud, P., Martinez, d. P. M. A., Loizeau, P.-A., Spichiger, R., Andrews, S. und Manen, J.-F.** (2000) Molecular phylogeny and biogeography of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae). *Annals of Botany* **85**, 111-122.
- Davies, S. J.** (1996) The comparative Ecology of *Macaranga* (Euphorbiaceae). PhD, Harvard University, Harvard, USA
- Davies, S. J., Palmiotto, P. A., Ashton, P. S., Lee, H. S. und Lafrankie, J. V.** (1998) Comparative ecology of 11 sympatric *Macaranga* in Borneo. *Journal of Ecology* **86**, 662-673.
- Davies, S. J. und Ashton, P. S.** (1999) Phenology and fecundity in 11 sympatric pioneer species of *Macaranga* (Euphorbiaceae) in Borneo. *American Journal of Botany* **86**, 1786-1795.
- Davies, S. J.** (2001) Systematics of *Macaranga* sects. *Pachystemon* and *Pruinosae* (Euphorbiaceae). *Harvard Papers of Botany* **6**, 371-448.

- Davies, S. J., Lum, S. K. Y., Chan, R. und Wang, L. K.** (2001) Evolution of myrmecophytism in Western Malesian *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Evolution* **55**, 1542-1559.
- Debener, T. und Mattiesch, L.** (1999) Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 891-899.
- Desplanque, B., Viard, F., Bernard, J., Forcioli, D., Saumitou-Laparde, P., Cuguen, J. und van Dijk, H.** (2000) The linkage disequilibrium between chloroplast DNA and mitochondrial DNA haplotypes in *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.): the usefulness of both genomes for population genetic studies. *Molecular Ecology* **9**, 141-154.
- Després, L., Gielly, L., Redoutet, B. und Taberlet, P.** (2003) Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**, 185-196.
- Dice, L. R.** (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**, 297-302.
- Dumolin-Lapègue, S., Demesure, B., Fineschi, S., Le Corre, V. und Petit, R. J.** (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the european continent. *Genetics* **146**, 1475-1487.
- Dumolin-Lapègue, S., Pemonge, M.-H. und Petit, R. J.** (1998) Association between chloroplast and mitochondrial lineages oaks. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 1321-1331.
- Eck, G., Fiala, B., Linsenmair, K. E., Hashim, R. B. und Proksch, P.** (2001) Trade-off between chemical and biotic antiherbivore defense in the South East asian plant genus *Macaranga*. *Journal of Chemical Ecology* **27**, 1979-1996.
- Engelke, T., Agbicodo, E. und Tatlioglu, T.** (2004) Mitochondrial genome variation in *Allium ampeloprasum* and its wild relatives. *Euphytica* **137**, 181-191.
- Fay, M. F., Cowan, R. S. und Leitch, I. J.** (2005) The Effects of Nuclear DNA Content (C-value) on the quality and utility of AFLP Fingerprints. *Annals of Botany* **95**, 237-246.
- Federle, W., Maschwitz, U., Fiala, B., Riederer, M. und Hölldobler, B.** (1997) Slippery ant-plants and skilful climbers: selection and protection of specific ant partner by epicuticular wax blooms in *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Oecologia* **112**, 217-224.
- Federle, W., Maschwitz, U. und Fiala, B.** (1998) The two-partner ant-plant system of *Camponotus* (*Colobopsis*; Formicidae: Formicinae) sp.1 and *Macaranga puncticulata* (Euphorbiaceae): Myrmecophytic traits of the partner ants. *Insectes Sociaux* **45**, 1-16.
- Federle, W., Rohrseitz, K. und Hölldobler, B.** (2000) Attachment forces of ants measured with a centrifuge: better wax-runners' have a poorer attachment to a smooth surface. *J. Exper. Biol.* **203**, 505-512.
- Federle, W., Fiala, B., Zizka, G. und Maschwitz, U.** (2001) Incident daylight as orientation cue for hole-boring ants: prostomata in *Macaranga* ant-plants. *Insectes Sociaux* **48**, 165-177.
- Federle, W., Maschwitz, U. und Hölldobler, B.** (2002) Pruning of host plant neighbours as defence against enemy ant invasions: *Crematogaster* ant partners of *Macaranga* protected by wax barriers prune less than their congeners. *Oecologia* **132**, 264-270.
- Federle, W. und Rheindt, F. E.** (2005) *Macaranga* ant-plants hide food from intruders: correlation of food presentation and presence of wax barriers analysed using phylogenetically independent contrasts. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**, 177-193.
- Feldhaar, H., Fiala, B., Hashim, b. R. und Maschwitz, U.** (2000) Maintaining an ant-plant symbiosis: secondary polygyny in the *Macaranga triloba*-*Crematogaster* sp. association. *Naturwissenschaften* **87**, 408-411.
- Feldhaar, H., Fiala, B., Gadau, J., Mohamed, M. und Maschwitz, U.** (2003a) Molecular phylogeny of *Crematogaster* subgenus *Decacrema* ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Macaranga* (Euphorbiaceae) trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**, 441-452.

- Feldhaar, H., Fiala, B., Hashim, R. und Maschwitz, U.** (2003b) Patterns of the *Crematogaster-Macaranga* association: the ant partner makes the difference. *Insectes Sociaux* **50**, 9-19.
- Felsenstein, J.** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Felsenstein, J.** (1988) Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Ann. Rev. Genet.* **22**, 521-565.
- Ferris, C., King, R. A., Väinölä, R. und Hewitt, G. M.** (1998) Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland. *Heredity* **80**, 584-593.
- Fiala, B., Maschwitz, U., Tho, Y. P. und Helbig, A. J.** (1989) Studies of a South East Asian ant-plant association: protection of *Macaranga* trees by *Crematogaster borneensis*. *Oecologia* **79**, 463-470.
- Fiala, B. und Maschwitz, U.** (1991) Extrafloral nectaries in the genus *Macaranga* (Euphorbiaceae) in Malaysia: comparative studies of their possible significance as predisposition's for myrmecophytism. *Biological Journal of the Linnean Society* **44**, 287-305.
- Fiala, B. und Maschwitz, U.** (1992) Domatia as most important adaptations in the evolution of myrmecophytes in the paleotropical tree genus of *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Plant Systematics and Evolution* **180**, 53-64.
- Fiala, B. und Maschwitz, U.** (1992) Food bodies and their significance for obligate ant-association in the tree genus *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **110**, 61-75.
- Fiala, B., Grunsky, H., Maschwitz, U. und Linsenmair, K. E.** (1994) Diversity of ant-plant interactions: protective efficacy in *Macaranga* species with different degrees of ant association. *Oecologia* **97**, 186-192.
- Fiala, B.** (1996) Ants benefit pioneer trees: the genus *Macaranga* as an example of ant-plant associations in dipterocarp forest ecosystems. In *Dipterocarp Forest Ecosystems: towards sustainable management*, (ed. A. Schulte und D. Scone), S. 102-123. Singapore, NY, London, Hongkong: World Scientific Publishing Co.
- Fiala, B., Maschwitz, U. und Linsenmair, K. E.** (1996) *Macaranga caladiifolia*, a new type of ant-plant among south-east asian myrmecophytic *Macaranga* species. *Biotropica* **28**, 408-412.
- Fiala, B., Jakob, A., Maschwitz, U. und Linsenmair, K. E.** (1999) Diversity, evolutionary specialization and geographic distribution of a mutualistic ant-plant complex: *Macaranga* and *Crematogaster* in South East Asia. *Biological Journal of the Linnean Society* **66**, 305-331.
- Folgarait, P. J. und Davidson, D. W.** (1995) Myrmecophytic *Cecropia*: antiherbivore defenses under different nutrient treatments. *Oecologia* **104**, 189-206.
- Gadau, J., Brady, S. G. und Ward, P. S.** (1999) Systematics, Distribution, and ecology of an endemic california *Camponotus quericola* (Hymenoptera: Formicidae). *Entomological soc. Am.* **92**, 514-522.
- Gaiotto, F. A., Bramucci, M. und Grattapaglia, D.** (1997) Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 842-849.
- Gargas, A., DePriest, P. T., Grube, M. und Tehler, A.** (1995) Multiple Origins of Lichen Symbioses in Fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* **268**, 1492-1495.
- Gaume, L. und McKey, D.** (1998) Protection against herbivores of the myrmecophyte *Leonardoxa africana* (Baill.) Aubrèv. T3 by its principal ant inhabitant *Aphomomyrmex afer* Emery. *C.R. Acad. Sci. Paris* **321**, 593-601.
- Gaume, L., Matile-Ferrero, D. und McKey, D.** (2000) Colony foundation and acquisition of coccoid trophobionts by *Aphomomyrmex afer* (Formicinae): co-dispersals of queens and phoretic mealybugs in an ant-plant-homopteran mutualism? *Insectes Sociaux* **47**, 84-91.

- Giribet, G. und Wheeler, W. C.** (1999) On gaps. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13**, 132-143.
- Givnish, T. J.** (1997) Adaptive Radiation and molecular systematics: Issues and approaches. In *Molecular Evolution and adaptive radiation*, (ed. T. J. Givnish und K. J. Sytsma), S. 1-54.
- Golenberg, E. M., Clegg, M. T., Durbin, M. L., Doebley, J. und Ma, D. P.** (1993) Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2**, 52-64.
- Gower, J. C.** (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**, 325-338.
- Gruas-Cavagnetto, C. und Köhler, E.** (1992) Pollens fossiles d'Euphorbiacées de l'Eocène français. *Grana* **31**, 291-304.
- Gugerli, F., Senn, J., Anzidei, M., Madaghiele, A., Büchler, U., Sperisen, C. und Vendramin, G. G.** (2001) Chloroplast microsatellites and mitochondrial *nad1* intron 2 sequences indicate congruent phylogenetic relationships among Swiss stone pine (*Pinus cembra*), Siberian stone pine (*Pinus sibirica*), and Siberian dwarf pine (*Pinus pumila*). *Molecular Ecology* **10**, 1489-1497.
- Hahn, W.** (2002) A molecular phylogenetic study of the *Palmae* (Arecaceae) based on *atpB*, *rbcL*, and 18S nrDNA sequences. *Systematic Biology* **51**, 92-112.
- Hall, R.** (2002) Cenozoic geological and plate tectonic evolution of SE Asia and the SW Pacific: computer-based reconstructions, model and animations. *Journal of Asian Earth Science* **20**, 353-431.
- Hansen, M., Kraft, T., Christiansson, M. und Nilsson, N.-O.** (1999) Evaluation in *Beta*. *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 845-852.
- Heckroth, H. P., Fiala, B., Gullan, P. J., Idris, A. H. und Maschwitz, U.** (1998) The soft scale (Coccidae) associates of Malaysian ant-plants. *Journal of the tropical ecology* **14**, 427-443.
- Heidsieck, M.** (2002) Molekularsystematische Studien in der Gattung *Macaranga* (Euphorbiaceae) auf der Basis nichtcodierender Chloroplasten-DNA. Diplom, Universität Kassel, Kassel
- Heil, M., Fiala, B., Kaiser, W. und Linsenmair, K. E.** (1998) Chemical contents of *Macaranga* food bodies: adaptations to their role in ant attraction and nutrition. *Funct. Ecol.* **12**, 117-122.
- Heil, M., Fiala, B. und Linsenmair, K. E.** (1999) Reduced Chitinase activities in ant plants of the genus *Macaranga*. *Naturwissenschaften* **86**, 146-149.
- Heil, M., Delsinne, T., Hilpert, A., Schürkens, S., Andary, C., Linsenmair, K. E., Sousa S., M. und McKey, D.** (2002) Reduced chemical defence in ant-plants? A critical re-evaluation of a widely accepted hypothesis. *Oikos* **99**, 457-468.
- Heil, M. und McKey, D.** (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **34**, 425-453.
- Heil, M., Greiner, S., Meimberg, H., Krüger, R., Noyer, J.-L., Heubl, G., Linsenmair, K. E. und Boland, W.** (2004) Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature* **430**, 205-208.
- Heuertz, M., Fineschi, S., Anzidei, M., Pastorelli, R., Salvini, D., Paule, L., Frascaria-Lacoste, N., Hardy, O. J., Vekemans, X. und Vendramin, G. G.** (2004) Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology* **13**, 3437-3452.
- Heulin, B., Surget-Groba, Y., Guillaume, C. P. und Deunff, J.** (1999) Comparisons of mitochondrial DNA (mtDNA) sequences (16S rRNA gene) between oviparous and viviparous starins of *Lacerta vivipara*: a preliminary study. *Molecular Ecology* **8**, 1627-1631.
- Hillis, D. M.** (1996) *Molecular Systematics*: Sinauer.

- Hodkinson, T. R., Renvoize, S. A., Chonghaile, G. N., Stapleton, C. M. A. und Chase, M. W.** (2000) A comparison of ITS nuclear rDNA sequence data and AFLP markers for phylogenetic studies in *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae). *Journal of Plant Research* **113**, 259-269.
- Hodkinson, T. R., Chase, M. W., Takahashi, C., Leitch, I. J., Bennett, M. D. und Renvoize, S. A.** (2002) The use of DNA sequencing (ITS and *trnL-F*), AFLP, and fluorescent in situ hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae). *American Journal of Botany* **89**, 279-286.
- Hongtrakul, V., Huestis, G. M. und Knapp, S. J.** (1997) Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 400-407.
- Huang, J., Corke, H. und Sun, M.** (2002) Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution* **49**, 541-550.
- Huelsenbeck, J. P. und Ronquist, F.** (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics applications note* **17**, 754-755.
- Hutchinson, J.** (1969) Tribalism in the family Euphorbiaceae. *American Journal of Botany* **56**, 738-758.
- Jaccard, P.** (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Vaudoise de Sciences Naturelles* **44**, 223-270.
- Jakob, A.** (1995) Das südostasiatische Myrmekophytiesystem *Macaranga-Crematogaster*: Untersuchungen zur Spezifität der Assoziationen. Diplom, J.-W.-Goethe-Universität, Frankfurt a.M.
- Jakob, S. S. und Blattner, F. R.** (2006) A chloroplast genealogy of *Hordeum* (Poaceae): long-term persisting haplotypes, incomplete lineage sorting, regional extinction, and the consequences of phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* **23**, 1602-1612.
- Jang, D. S. J., Cuendet, M., Pawlus, A. D., Kardono, L. B. S., Kawanishi, K., Farnsworth, N. R., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M. und Kinghorn, A. D.** (2004) Potential cancer chemopreventive constituents of the leaves of *Macaranga triloba*. *Phytochemistry* **65**, 345-350.
- Jaramillo-Correa, J. P., Beaulieu, J. und Bousquet, J.** (2004) Variation in mitochondrial DNA reveals multiple distant glacial refugia in black spruce (*Picea mariana*), a transcontinental North American conifer. *Molecular Ecology* **13**, 2735-2747.
- Jobs, D. V., Hurley, D. L. und Thien, L. B.** (1995) Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharids, and RNA. *Taxon* **44**, 379-386.
- Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A. et al.** (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* **3**, 381-390.
- Kanno, M., Yokoyama, J., Suyama, Y., Ohyama, M., Itoh, T. und Suzuki, M.** (2004) Geographical distribution of two haplotypes of chloroplast DNA in four oak species (*Quercus*) in Japan. *Journal of Plant Research* **117**, 311-317.
- Kardolus, J. P., van Eck, H. J. und van den Berg, R. G.** (1998) The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* **210**, 87-103.
- Keeler, K. H.** (1989) Ant-Plant Interactions. In *Plant-Animal Interactions*, (ed. W. G. Abrahamson), S. 207-242. New York: McGraw-Hill.
- Kelchner, S. A. und Wendel, J. F.** (1996) Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. *Current Genetics* **30**, 259-262.
- Kelchner, S. A.** (2000) The Evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **87**, 482-498.

- Kingmann, J. F. C.** (1982) The coalescent. *Stoch. Proc. Appl.* **13**, 235-248.
- Koopman, W., Zevenbergen, M. J. und van den Berg, R. G.** (2001) Species relationships in *Lactuca s.l.* (Lactucaceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. *American Journal of Botany* **88**, 1881-1887.
- Korall, P. und Kenrick, P.** (2004) The phylogenetic history of Selaginellaceae based on the DNA sequences from the plastid and nucleus: extreme substitution rates and rate heterogeneity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**, 852-864.
- Kuljo, K.** (2005). In *17th International Botanical Congress*, (ed. Wien, Austria).
- Kulju, K. K. M., Sierra, S. E. C., Draismann, S., G.A., Samuel, R. und van Welzen, P. C.** (2007) Molecular phylogeny of *Macaranga*, *Mallotus*, and related genera (Euphorbiaceae s.s.): insights from plastid and nuclear DNA sequence data. *American Journal of Botany* **94**, 1726-1743.
- Lambooy, W.** (1994a) Computing Genetic Similarity Coefficients from RAPD Data: The effect of PCR artifacts. *PCR Methods Appl.* **4**, 31-37.
- Lee, M. S. Y.** (2001) Unalignable sequences and molecular evolution. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 681-685.
- Li, W.-H.** (1997) *Molecular Evolution*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates.
- Linder, C. R., Goertzen, L. R., Heuvel, B. V., Francisca-Ortega, J. und Jansen, R. K.** (2000) The complete external transcribed spacer of 18S-26S rDNA: amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in Asteraceae and closely allied families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **14**, 285-303.
- Linsenmair, K. E., Heil, M., Kaiser, W. M., Fiala, B., Koch, T. und Boland, W.** (2001) Adaptations to biotic and abiotic stress: *Macaranga*-ant plants optimize investment in biotic defence. *Journal of Experimental Biology* **52**, 2057-2065.
- Loh, J. P., Kiew, R., Hay, A., Kee, A., Gan, L. H. und Gan, Y.-Y.** (2000) Intergeneric and interspecific relationships in Araceae tribe Caladieae and development of molecular markers using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Annals of Botany* **85**, 371-378.
- Loomis, W. D.** (1974) Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology* **31**, 528-44.
- Manen, J.-F. und Natali, A.** (1995) Comparison of the evolution of ribulose-1, 5 biphosphate carboxylase (*rbcL*) and *atpB-rbcL* noncoding spacer sequences in a recent plant group, the tribe Rubieae (Rubiaceae). *Journal of Molecular Evolution* **41**, 920-927.
- Manen, J.-F., Boulter, M. C. und Naciri-Graven, Y.** (2002) The complex history of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae): evidence from the comparison of plastid and nuclear DNA sequences and from fossil data. *Plant Systematics and Evolution* **235**, 79-98.
- Marhold, K., Lihova, J., Perny, M. und Bleeker, W.** (2004) Comparative ITS and AFLP analysis of diploid *Cardamine* (Brassicaceae) taxa from closely related polyploid complexes. *Annals of Botany* **93**, 507-520.
- Martín, H. A.** (1974) The identification of some Tertiary pollen belonging to the family Euphorbiaceae. *Australian Journal of Botany* **22**, 271-291.
- Martin, H. A.** (1978) Evolution of the Australian flora and vegetation through the Tertiary: evidence from Pollen. *Alcheringia* **2**, 181-202.
- Maschwitz, U., Fiala, B., Davies, S. J. und Linsenmair, K. E.** (1996) A South-East asian myrmecophyte with two alternative inhabitants: *Camponotus* or *Crematogaster* as partners of *Macaranga lamellata*. *Ecotropica* **2**.
- Maschwitz, U., Fiala, B. und Dumpert, K.** (2004) An unusual myrmecophytic *Macaranga* association, occurring in a disjunct area in the monsoon zone of South-East Asia: phenology and the description of a new ant species. *Ecotropica* **10**, 33-49.

- McGregor, C. E., Lambert, C. A., Greyling, M. M., Louw, J. H. und Warnich, L.** (2000) A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP, and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* **113**, 135-144.
- McIntyre, D. J.** (1965) Some new pollen species from New Zealand Tertiary deposits. *New Zealand Journal of Botany* **3**, 204-214.
- McKey, D.** (2001) *Leonardoxa africana* (Leguminosae: Caesalpinioideae): a complex of mostly allopatric subspecies. *Adansonia* **22**, 71-109.
- McKinnon, G. E., Jordan, G. J., Vaillancourt, R. E., Steane, D. A. und Potts, B. M.** (2004) Glacial refugia and reticulate evolution: the case of the Tasmanian eucalypts. *Philosophical transactions of the Royal Society B - Biological Science* **359**, 275-284.
- Mes, T. H. M., Kuperus, P., Kirschner, J., Stepanek, J., Oosterveld, P., Storchova, H. und Den Nijs, J. C. M.** (2000) Hairpins involving both inverted and direct repeats are associated with homoplasious indels in non-coding chloroplast DNA of *Taraxacum* (Lactucaceae: Asteraceae). *Genome* **43**, 634-641.
- Michaels, S. D., John, M. C. und Amasino, R. M.** (1994) Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *BioTechniques* **17**, 274-276.
- Mildenhall, D. C.** (1980) New Zealand late cretaceous an Cenozoic plant biogeography: a contribution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **31**, 197-233.
- Moog, U.** (2002) Die Reproduktion von *Macaranga* (Euphorbiaceae) in Südostasien: Bestäubung durch Thripse und Kastration durch Pflanzenameisen. Promotion, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
- Moog, U., Fiala, B., Federle, W. und Maschwitz, U.** (2002) Thrips pollination of the dioecious ant plant *Macaranga hullettii* (Euphorbiaceae) in Southeast Asia. *American Journal of Botany* **89**, 50-59.
- Morley, R. J.** (2000) Origin and evolution of tropical rainforest. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Morton, B. R.** (1995) Neighboring base composition and transversion/transition bias in a comparison of rice and maize chloroplast noncoding regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9717-9721.
- Morton, B. R., Oberholzer, V., M. und Clegg, M. T.** (1997) The influence of specific neighboring bases on substitutions bias in noncoding regions of the plant chloroplast genome. *Journal of Molecular Evolution* **45**, 227-231.
- Moss, S. J. und Finch, E. M.** (1997) Geological implications of new biostratigraphic data from East and West Kalimantan, Indonesia. *Journal of Southeast Asian Earth Sciences* **15**, 489-506.
- Müller Argoviensis, J.** (1866) *Macaranga*. In *Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*, vol. 15 (ed. A. P. de Candolle), S. 987-1015. Paris, Frankreich: Mason & Fils.
- Murase, K., Itioka, T., Nomura, M. und Yamane, S.** (2003) Intraspecific variation in the status of ant symbiosis on a myrmecophyte, *M. bancana*, between primary and secondary forests in Borneo. *Population Ecology* **45**, 221-226.
- Myburg, A. A., Remington, D. L., O'Malley, D. M., Sederoff, R. R. und Whetten, R. W.** (2001) High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automated DNA sequencer. *BioTechniques* **30**, 348-357.
- Nei, M. und Li, W. H.** (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 5269-5273.
- Olson, M. S. und McCauley, D. E.** (2002) Mitochondrial DNA diversity, population structure, and gender association in the gynodioecious plant *Silene vulgaris*. *Evolution* **56**, 253-262.

- Oxelman, B., Liden, M. und Berglund, D.** (1997) Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* **206**, 393-410.
- Palme, A., Su, Q., Palsson, S. und Lascoux, M.** (2004) Extensive sharing of chloroplast haplotypes among European birches indicates hybridization among *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nana*. *Molecular Ecology* **13**, 167-178.
- Patterson, T. B. und Givinish, T. J.** (2002) Phylogeny, concerted convergence, and phylogenetic niche conservatism in the core Liliales: insights from *rbcL* and *ndhF* sequence data. *Evolution* **56**, 233-252.
- Paul, S., Wachira, F. N., Powell, W. und Waugh, R.** (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* **94**, 255-263.
- Pax, F. und Hoffmann, K.** (1914) Euphorbiaceae-Acalyphaceae-Mercurialinae. In *Das Pflanzenreich*, vol. IV (ed. A. Engler), S. 298-395. Leipzig und Berlin, Deutschland: Wilhelm Engelmann.
- Pax, F. und Hoffmann, K.** (1914) Euphorbiaceae. In *Natürliche Pflanzenfamilien*, vol. 19c (ed. Engler-Prantl), S. 11-.
- Pelser, P. B., Gravendeel, B. und van der Meijden, R.** (2003) Phylogeny reconstruction in the gap between too little and too much divergence: the closest relatives of *Senecio jacobaea* (Asteraceae) according to DNA sequences and AFLPs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**, 613-628.
- Pillips, A., Janies, D. und Wheeler, W.** (2000) Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **16**, 317-330.
- Pol, D. und Siddall, E.** (2001) Biases in maximum likelihood and parsimony: a simulation approach to a 10-Taxon case. *Cladistics* **17**, 266-281.
- Posada, D. und Crandall, K. A.** (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 37-45.
- Potokina, E., Blattner, F. R., Alexandrova, T. und Bachmann, K.** (2002) AFLP diversity in the common vetch (*Vicia sativa* L.) on the world scale. *Theoretical and Applied Genetics* **105**, 58-67.
- Primack, R. B. und Lee, H. S.** (1991) Population dynamics of pioneer (*Macaranga*) trees and understorey (*Mallotus*) trees (Euphorbiaceae) in primary and selectively logged Bornean rain forests. *Journal of Tropical Ecology* **7**, 439-457.
- Provan, J., Lawrence, P., Young, G., Whright, F., Bird, R., Paglia, G., Cattonaro, F., Morgante, M. und Powell, W.** (1999) Analysis of the genus *Zea* (Poaceae) using polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Plant Systematics and Evolution* **218**, 245-256.
- Pusch, C. M., Giddings, I. und Scholz, M.** (1998) Repair of degraded duplex DNA from prehistoric samples using *Escherichia coli* DNA polymerase I and T4 ligase. *Nucleic Acids Research* **26**, 857-859.
- Quek, S. P., Davies, S. J., Itino, T. und Pierce, N. E.** (2004) Codiversification in ant-plant mutualism: stem texture and the evolution of host use in *Crematogaster* (Formicidae: Myrmicinae) inhabitants of *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Evolution* **58**, 554-570.
- Renner, S. S.** (2004) Bayesian analysis of combined chloroplast loci, using multiple calibrations, supports the recent arrival of Melastomataceae in Africa and Madagascar. *American Journal of Botany* **91**.
- Renner, S. S. und Zhang, L. B.** (2004) Biogeography of the *Pistia* clade (Araceae): Based on chloroplast and mitochondrial DNA sequences and Bayesian divergence time inference. *Systematic Biology* **53**, 422-432.
- Renner, S. S., Zhang, L. B. und Murata, J.** (2004) A chloroplast phylogeny of *Arisaema* (Araceae) illustrates tertiary floristic links between Asia, North America, and East Africa. *American Journal of Botany* **91**, 881-888.
- Rohlf, F. J.** (1997) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system 2.1.

- Roupe van der Voort, J. N. A. M., van Zandvoort, P., van Eck, H. J., Folkertsma, R. T., Hutten, R. C. B., Draaistra, J., Gommers, F. J., Jacobsen, E., Helder, J. und Bakker, J.** (1997) Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Molecular General Genetics* **255**, 438-447.
- Saitou, N. und Nei, M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Salamin, N., Chase, M. W., Hodkinson, T. R. und Savolainen, V.** (2003) Assessing internal support with large phylogenetic DNA matrices. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**, 528-539.
- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, US: CSHL Press.
- Sang, T., Crawford, D. J. und Stuessy, T. F.** (1997) Chloroplast DNA phylogeny reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* **84**, 1120-1136.
- Sang, T., Donoghue, M. J. und Zhang, D.** (1997) Evolution of alcohol dehydrogenase genes in peonies (*Paeonia*): phylogenetic relationships of putative nonhybrid species. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 994-1007.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchinson, C. A., Slocombe, P. M. und Smith, M.** (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage *phi* X174 DNA. *Nature* **265**, 687-695.
- Savolainen, V., Spichiger, R. und Manen, J.-F.** (1997) Polyphyletism of Celastrales deduced from a chloroplast noncoding DNA region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7**, 145-157.
- Savolainen, V., Chase, M. W., Hoot, S. B. und Morton, C. M.** (2000) Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. *Systematic Biology* **49**.
- Savolainen, V. und Chase, M. W.** (2003) A decade of progress in plant molecular phylogenetics. *Trends in Genetics* **19**, 717.
- Schmidt-Lebhuhn, A. N., Kessler, M. und Müller, J.** (2005) Evolution of *Suessenguthia* (Acanthaceae) inferred from morphology, AFLP data, and ITS rDNA sequences. *Organisms, Diversity & Evolution* **5**, 1-13.
- Schutt, J. W., Qi, X. und Stam, P.** (1997) Association between relationship measures based on AFLP markers pedigree data and morphological traits in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 1161-1168.
- Scotland, R. W.** (1992) Character coding. In *Cladistics: A practical course in systematics*, (ed. P. L. Forey), S. 14-21. Oxford: Clarendon Press.
- Senjo, M., Kimura, K., Watano, Y., Ueda, K. und Shimizu, T.** (1999) Extensive mitochondrial introgression from *Pinus pumila* to *P. parviflora* var. *Pentaphylla* (Pinaceae). *Journal of Plant Research* **112**, 97-105.
- Sharma, S. K., Knox, M. R. und Ellis, T. H. N.** (1996) AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPDs analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **96**, 751-758.
- Simmons, M. P. und Ochoterena, H.** (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* **49**, 369-381.
- Simmons, M. P., Ochoterena, H. und Carr, T. G.** (2001) Incorporation, relative homoplasy, and effect of gap characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* **50**, 454-462.
- Skroch, P. und Nienhuis, J.** (1995) Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data an RAPD based estimates of genetic distance. *Theoretical and Applied Genetics* **91**, 1086-1091.
- Slik, J. W. F., Priyono und van Welzen, P. C.** (2000) Key to the *Macaranga* Thou. and *Mallotus* Lour. species (Euphorbiaceae) of East Kalimantan, Indonesia. *Garden's Bulletin Singapore* **52**, 11-87.

- Slik, J. W. F. und van Welzen, P. C.** (2001) A phylogeny of *Mallotus* (Euphorbiaceae) based on morphology: indications for a pioneer origin of *Macaranga*. *Systematic Biology*.
- Slik, J. W. F., Poulsen, A. D., Ashton, P. S., Cannon, C. H., Eichhorn, K. A. O., Kartawinata, K., Lanniari, I., Nagamasu, H., Nakagawa, M., van Nieuwstadt, M. G. L. et al.** (2003) A floristic analysis of the lowland dipterocarp forests of Borneo. *Journal of Biogeography* **30**, 1517-1531.
- Sneath, P. H. A. und Sokal, R. R.** (1973) Numerical Taxonomy. San Francisco.: Freeman.
- Sonnante, G., Spinosa, A., Marangi, A. und Pignone, D.** (1997) Isozyme and RAPD Analysis of genetic diversity within and between *Vigna luteola* and *V. marina*. *Annals of Botany* **80**, 741-746.
- Soranzo, N., Provan, J. und Powell, W.** (1999) An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome Research* **42**, 158-161.
- Spooner, D. M., Peralta, I. E. und Knapp, S.** (2005) Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon* **54**, 43-61.
- Suazo, A. und Hall, H. G.** (1999) Modification of the AFLP Protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *BioTechniques* **26**, 704-709.
- Swofford, D. L.** (2002) PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. und Bouvet, J.** (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**, 1105-1109.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A. und Sing, C. F.** (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequencing data. III. Cladogram estimation. *Genetica* **132**, 619-653.
- Tseng, M. H., Kuo, Y. H., Chen, Y. M. und Chou, C. H.** (2003) Allelopathic potential of *Macaranga tanarius* (L.) Muell.-Arg. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 1269-1286.
- van de Peer, Y. und De Wachter, R.** (1994) TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **9**, 569-570.
- van Ham, R. C. H. J., 't Hart, H., Mes, T. H. M. und Sandbrink, J. M.** (1994) Molecular evolution of noncoding regions of the chloroplast genome in the Crassulaceae and related species. *Current Genetics* **25**, 558-566.
- Vendramin, G. G., Anzidei, M., Madaghiale, A., Sperisen, C. und Bucci, G.** (2000) Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies*). *Genome* **43**, 68-78.
- Voris, H. K.** (2000) Maps of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *Journal of Biogeography* **27**, 1153-1167.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. et al.** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Vrana, P. B. und Wheeler, W.** (1996) Molecular evolution and phylogenetic utility of the polyubiquitin locus in mammals and higher vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**, 259-269.
- Wägele, J.-W.** (2000) Phylogenetische Systematik. München, Deutschland: Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
- Wallander, E. und Albert, V. A.** (2000) Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* **87**, 1827-1841.

- Webster, G. L.** (1994) Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **81**, 33-144.
- Webster, G. L.** (1994) Classification of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **81**, 3-32.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. und Meyer, W.** (1995) DNA Fingerprinting in plants and fungi. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA.
- Weising, K. und Gardner, R. C.** (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* **42**, 9-19.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. und Kahl, G.** (2005) DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Weissflog, A., Moog, J., Federle, W., Werner, M., Hashim, R. und Maschwitz, U.** (1999) *Hoya mitrata* Kerr (Asclepiadaceae): a new myrmecotrophic epiphyte from Southeast Asia with a unique multileaved domatium. *Ecotropica* **5**, 221-225.
- Wheeler, W.** (1996) Optimization alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics* **12**, 1-9.
- Whitmore, T. C.** (1967) Studies in *Macaranga*, an easy Genus of Malayan wayside trees. *Malaysian Nat. J.* **20**, 89-99.
- Whitmore, T. C.** (1969) First thoughts on species evolution in malayan *Macaranga*. *Biological Journal of the Linnean Society* **1**, 223-231.
- Whitmore, T. C., Kim-Gai, S. und Jones, B. M. G.** (1970) Studies in *Macaranga* II. Chromosome counts. *Taxon*, 255-256.
- Whitmore, T. C. und Airy Shaw, H. K.** (1971) Studies in *Macaranga*: IV New and notable records for Malaya. *Kew Bulletin* **25**, 237-.
- Whitmore, T. C.** (1974) Studies in *Macaranga*: VI Novelties from Borneo and reduction in Malaya. *Kew Bulletin* **29**, 445-450.
- Whitmore, T. C.** (1975) The Euphorbiaceae of Borneo. In *Kew Bulletin Additional Series*, vol. 4 (ed. H. K. Airy Shaw), S. 140-159. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Whitmore, T. C.** (1980) *Macaranga* in New Guinea and the Birmarck Archipelago. *Kew Bulletin* **34**, 599-605.
- Whitmore, T. C.** (1981) The Euphorbiaceae of Sumatra - *Macaranga* Thou. *Kew Bulletin* **36**, 312-325.
- Whitmore, T. C.** (1998) Tropical rain forests. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Whittemore, A. T. und Schaal, B. A.** (1991) Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 2540-2544.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. und Tingey, S. V.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 7213-7218.
- Wilson, M. E. J. und Moss, S. J.** (1999) Cenozoic palaeogeographic evolution of Sulawesi and Borneo. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **145**, 303.
- Wurdack, K. J., Hoffmann, P. und Chase, M. W.** (2005) Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid *rbcL* and *trnL-trnF* DNA sequences. *American Journal of Botany* **92**, 1397-1420.

- Xu, D. H., Abe, J., Sakai, M., Kanazawa, A. und Shimamoto, Y.** (2000) Sequence variation of non-coding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes. *Theoretical and Applied Genetics* **101**, 712-732.
- Xu, F. und Sun, M.** (2001) Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives (*Amaranthus*; Amaranthaceae). Using internal transcribed spacer, amplified fragment length polymorphism, and double-primer fluorescent intersimple sequence repeat. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**, 372-387.
- Yang, X. und Quiros, C.** (1993) Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **86**, 205-212.
- Yang, Z.** (1997) Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood (PAML) ver. 1.3.
- Yang, Z. und Rannala, B.** (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* **14**, 717-724.
- Zhang, L. B., Comes, H. P. und Kadereit, J. W.** (2001) Phylogeny and quaternary history of the European montane/alpine endemic *Soldanella* (Primulaceae) based on ITS and AFLP variation. *American Journal of Botany* **88**, 2331-2345.

---

## G Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorkommen und Verbreitung von <i>Macaranga</i> -Arten im südostasiatischen Raum. ....	8
Tabelle 2: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetztes Pflanzenmaterial. ....	19
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primer-Kombinationen für die PCR-Amplifizierung nichtkodierender Chloroplasten-Regionen. ....	32
Tabelle 4: Übersicht der für die Amplifikation nichtkodierender cpDNA-Bereiche verwendeten PCR- Ansätze. ....	33
Tabelle 5: Auswertung der DNA-Isolation. ....	42
Tabelle 6: Ergebnisse der Restriktion verschiedener <i>Macaranga</i> -DNAs ....	45
Tabelle 7: Evaluation der 64 AFLP-Primer-Kombinationen mit Hilfe von 12 <i>Macaranga</i> Taxa. ....	51
Tabelle 8: Bandenanzahl und Polymorphismen der für die Untersuchung eingesetzten AFLP-Primer- Kombinationen ....	57
Tabelle 9: Bandbreite der paarweisen Ähnlichkeiten innerhalb einzelner Arten (A) und zwischen Arten, Gruppen und Sektionen (B). ....	58
Tabelle 10: Übersicht morphologischer und verbreitungsbiologischer Merkmale myrmekophytischer <i>Macaranga</i> -Arten. ....	98
Tabelle 11: NCBI-Datenbanknummern der einzelnen Sequenzen. ....	135
Tabelle 12: Übersicht über der Haplotypen und die Kodierung der Merkmale. ....	138

## H Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der AFLP-Methode.....	16
Abbildung 2: Typisches Ergebnis einer CTAB-DNA-Isolation verschiedener <i>Macaranga</i> –Arten .....	43
Abbildung 3: Effizienz des Restriktions-Ligationsschritts: Vergleich des T4-Puffers mit dem RL-Puffer. .....	45
Abbildung 4: Ergebnis der Präamplifikation mit unterschiedlichen Restriktionsansätzen. ....	46
Abbildung 5: Ergebnis der selektiven Amplifikation nach Zusatz von 1% DMSO und 25 mM TMAC in der Präamplifikation. ....	47
Abbildung 6: Ergebnisse der selektiven Amplifikation unter Zugabe von TritonX-100® in Abhängigkeit von verschiedenen Magnesiumchlorid-Konzentrationen. ....	48
Abbildung 7: Selektive Amplifikation: Vergleich unterschiedlicher Thermocycler und Heizraten, sowie Reproduzierbarkeit der Bandenmuster aus unabhängigen DNA-Isolationen. ....	49
Abbildung 8: Reproduzierbarkeit der AFLP-Muster. ....	50
Abbildung 9: PCR-Produkte, die mit ccmp2-Primern aus verschiedenen <i>Macaranga</i> -Arten erhalten wurde. ....	55
Abbildung 10: Neighbor Joining-Baum von 108 <i>Macaranga</i> -Akzessionen, erzeugt auf der Basis von 426 AFLP-Bandenpositionen aus acht Primerkombinationen. ....	61
Abbildung 11: <i>Majority rule</i> -Konsensus-Baum von 12 AFLP-MP-Bäumen.....	63
Abbildung 12: Hauptkoordinaten-Analyse auf der Basis von 426 polymorphen AFLP-Merkmalen .....	63
Abbildung 13: Maximum parsimony- Analyse auf der Basis der Sequenz des <i>atpB-rbcL</i> -Spacers. ....	66
Abbildung 14: „Maximum parsimony“-Analyse auf der Basis des des intergenischen Bereichs zwischen <i>psbI</i> und <i>trnS</i> (ccmp2). ....	68
Abbildung 15: Einer von 40.101 kürzesten „maximum parsimony“-Bäumen auf der Basis der beiden untersuchten Chloroplasten-Bereiche <i>atpB-rbcL</i> und <i>psbI-trnS</i> .....	70
Abbildung 16: Erste Stufe des statistischen Parsimonie-Netzwerkes der Sektionen <i>Pachystemon</i> , <i>Pruinosae</i> und <i>Winklerianae</i> sowie weiterer südostasiatischer Arten .....	72
Abbildung 17: Statistisches Parsimonie-Netzwerk aus Haplotypen von <i>Macaranga</i> -Arten myrmekophytischer Sektionen. ....	74
Abbildung 18: Herkunft der Proben für die phylogeographische Netzwerk-Analyse.....	76
Abbildung 19: Junge <i>M. puncticulata</i> -Pflanze mit angeschwollenen Zweigen .....	92
Abbildung 20: Blätter von drei Arten der <i>bancana</i> -Gruppe. ....	93
Abbildung 21: <i>M. griffithiana</i> aus Thailand mit auffälliger Wachsbereifung (Pfeil).....	94
Abbildung 22: <i>M. kingii</i> aus Westmalaysia mit auffallend glänzender Blattoberfläche und tief eingeschnittenen Blättern. Foto B. Fiala .....	95
Abbildung 23: Beispiel von Arten der Sektion <i>Pruinosae</i> . ....	96
Abbildung 24: Zweig einer <i>M. winkleri</i> -Pflanze. ....	97
Abbildung 25: Kartierung verschiedener morphologischer Merkmale auf den AFLP-NJ-Baum. ....	101
Abbildung 26: „Majority Rule“-Konsensus-Baum der 40.101 gleich langen Bäume aus der kombi- nierten Analyse der untersuchten Chloroplasten-Loci <i>atpB-rbcL</i> und dem ccmp2-Locus.....	103
Abbildung 27: Geographische Entwicklung Südostasiens während der letzten 250.000 Jahre.....	109

# I Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
BS	bootstrap
BSA	Rinderserumalbumin ("bovine Serum albumine")
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CI	Konsistenzindex ("consistency index")
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure-Dinatrium-Salz
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
G	Guadin
HCl	Salzsäure
Indel	Insertionen/Deletionen
IRD	infrared dye
ITS	internal transcribed spacer
KAc	Kalium-Acetat
M	molar ( Mol/Liter)
MET	$\beta$ -Mercaptoethanol
MgAc	Magnesium-Acetat
MgCl	Magnesium-Chlorid
min.	Minute
MP	maximum parsimony
msp.	Morphospecies
NaCl	Natrium-Chlorid
ng	Nanogramm
o. Abb.	ohne Abbildung
PCA	principal component analysis
PCO	principal coordinate analysis
PVP	Polyvinylpyrrolidon
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
RI	Konservierungsindex ("retention index")
RL	Restriktion und Ligation
rpm.	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Sekt.	Sektion
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfat
sog.	sogenannt
T	Thyrosin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TMAC	Tetramethylammonium-Chlorid
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	units (Einheiten)
u.a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

**Tabelle 11: NCBI-Datenbanknummern der einzelnen Sequenzen.**

Art	ID	HT	Herkunft	GenBank Nr.			
				<i>atpB-rbcL</i>	<i>ccmp2</i>	<i>ccmp6</i>	
<i>M. aetheadenia</i>	8	29a	Kuala Belalong (19)	DQ358320	DQ358466	DQ358591	
	255	29a	Kuala Belalong (19)	DQ358321	DQ358465	DQ358590	
	257	32b	Kubah National Park (12)	DQ358340	DQ358460	DQ358585	
	262	32a	Penrissen Area (14)	DQ358341	DQ358461	DQ358586	
<i>M. angulata</i>	285	24a	Crocker Range (21)	DQ358371	DQ358498	AY159420	
	492	24a	Crocker Range (21)	DQ358373	DQ358495	DQ358624	
	497	24a	Crocker Range (21)	DQ358374	AY245598	DQ358629	
	179	24a	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358370	DQ358497	DQ358626	
	308	24a	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358376	DQ358499	DQ358627	
	311	24a	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358372	DQ358500	DQ358628	
	513	24a	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358375	DQ358501	DQ358630	
	328	24a	Crocker Range (21)	DQ358377	DQ358502	DQ358631	
<i>M. ashtonii</i>	27	29c	Labi Road (17)	DQ358337	AY159394	AY159423	
<i>M. bancana</i>	283	24a	Crocker Range (21)	DQ358378	AY245599	AY159421	
	276	33b	Lambir Hills (16)	DQ358343	AY245587	AY159422	
	339	29a	Mulu (18)	DQ358322	DQ358467	DQ358592	
	357	29a	Mulu (18)	DQ358323	DQ358468	DQ358593	
	359	29a	Mulu (18)	DQ358324	DQ358469	DQ358594	
	437	34d	Road Sempah Genting to Betong (5)	DQ358317	DQ358458	DQ358583	
	455	34g	Ulu Gombak (8)	DQ358312	AY159395	AY159424	
	63	34g	Ulu Gombak (8)	DQ358311	DQ358455	DQ358580	
	<i>M. calcicola</i>	266	27b	Bau (13)	DQ358347	DQ358484	DQ358609
	<i>M. depressa f. strigosa</i>	778	29a	Bukit Bangkirai (36)	DQ358327	DQ358462	DQ358587
268		29c	Bau (13)	DQ358338	AY245586	AY159427	
141		33c	Road from Samarinda to Balikpapan (32)	DQ358344	AY245588	DQ358607	
<i>M. depressa f. glabra</i>	177	25	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358380	AY245593	AY159426	
	291	21a	Sepilok (26)	DQ358363	AY245596	DQ358615	
	297	24c	Telupid (24)	DQ358365	DQ358494	DQ358623	
<i>M. glandibracteolata</i>	130	24b	Bukit Taviu (23)	DQ358360	DQ358503	DQ358632	
	499	21b	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358356	AY245597	AY159428	
	2039	21a	Luasong (29)	DQ358387	DQ358511	DQ358640	
	302	21b	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358357	DQ358491	DQ358618	
	471	21f	Tawau Hills (28)	DQ358354	DQ358489	DQ358616	
	477	21f	Tawau Hills (28)	DQ358355	DQ358490	DQ358617	
	964	26c	Berau (30)	DQ358351	DQ358486	DQ358612	
<i>M. griffithiana</i>	372	34i	Linggi (11)	DQ358309	DQ358453	DQ358578	
	74	34i	Rawang (7)	DQ358307	AY245590	AY159429	
	438	34h	Rawang (7)	DQ358313	DQ358451	DQ358576	
	1988	35	Pattani (2)	DQ358314	DQ358454	DQ358579	
	1987	36	Chantaburi (1)	DQ358306	DQ358449	DQ358574	
	<i>M. havilandii</i>	278	29b	Lambir Hills (16)	DQ358334	DQ358470	DQ358595
<i>M. hullettii</i>	481	24a	Crocker Range (21)	DQ358369	DQ358507	DQ358636	
	381	34i	Tampin (10)	DQ358308	DQ358452	DQ358577	
	66	37a	Genting Highlands (5)	DQ358315	DQ358456	DQ358581	
	248	29a	Labi Road (17)	DQ358329	DQ358471	DQ358596	
	377	30	Mulu (18)	DQ358319	DQ358478	DQ358604	
	152	29a	Lemponah (31)	DQ358328	DQ358480	DQ358605	

<i>M. indistincta</i>	981	29a	Samboja (34)	DQ358330	DQ358472	DQ358597
	2043	22	Luasong (29)	DQ358362	DQ358512	DQ358641
	288	21a	Bukit Taviu (23)	DQ358367	AY245594	DQ358620
	506	25	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358379	AY245592	AY159432
	280	21c	Tawau Hills (28)	DQ358361	DQ358492	DQ358619
	284	25	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358381	DQ358508	DQ358637
	468	21a	Tawau Hills (28)	DQ358368	DQ358493	DQ358621
	114	23b	Deramakot Forest Reserve (27)	DQ358358	DQ358487	DQ358613
	180	23a	Deramakot Forest Reserve (27)	DQ358359	AY159392	AY159431
	<i>M. motleyana</i>	127	21a	Deramakot Forest Reserve (27)	DQ358364	AY245595
2093		21a	Luasong (29)	DQ358385	DQ358510	DQ358639
293		26d	Sepilok (26)	DQ358352	DQ358483	AY159434
1892		21e	Tawau Hills (28)	DQ358386	DQ358509	DQ358638
265		28	Kubah National Park (12)	DQ358345	DQ358464	DQ358589
142		26a	Bukit Soeharto (33)	DQ358349	AY245589	AY159433
168		26a	Bukit Bangkirai (36)	DQ358350	DQ358482	DQ358608
1367		26b	PT-ITCI Concession (37)	DQ358348	DQ358513	DQ358610
307		24a	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358382	DQ358496	DQ358625
395		24a	Kinabalu NP, Head Quarter (22)	DQ358366	DQ358506	DQ358635
<i>M. rostrata</i>	298	24a	Jalan Microwave, Telupid (25)	DQ358383	DQ358505	DQ358634
	97	24a	Tawai Forest Reserve, Telupid (24)	DQ358384	DQ358504	DQ358633
<i>M. spec. A</i>	183	21d	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358353	DQ358488	DQ358614
<i>M. spec. B</i>	14	29a	Kuala Belalong (19)	DQ358331	AY159393	AY159430
<i>M. spec. C</i>	254	29a	Kuala Belalong (19)	DQ358332	DQ358463	DQ358588
<i>M. spec. D</i>	261	29c	Penrissen Area (14)	DQ358335	DQ358473	DQ358598
<i>M. trachyphylla</i>	253	29a	Andulau Reserve (17)	DQ358333	DQ358474	DQ358600
<i>M. triloba</i>	303	37c	Semarang (39)	DQ358305	DQ358448	DQ358573
	445	37b	Cameron Highlands, Tanah Rata (3)	DQ358318	DQ358459	DQ358584
	431	34b	Fraser's Hill (4)	DQ358316	DQ358457	DQ358582
	522	34g	Genting Highlands (5)	DQ358310	DQ358450	DQ358575
	193	27a	Barak, Barisan mountains (38)	DQ358346	DQ358485	DQ358611
	167	31	Bukit Bangkirai (36)	DQ358339	DQ358475	DQ358601
	571	29a	Sungai Wain Protected Forest (35)	DQ358325	DQ358476	DQ358602
<i>M. velutina</i>	646	29a	Samboja (34)	DQ358326	DQ358477	DQ358603
	270	29c	Bau (13)	DQ358336	DQ358479	DQ358599
	259	33a	Penrissen Area (14)	DQ358342	DQ358481	DQ358606
	15	17c	Kuala Belalong (19)	DQ358281	DQ358424	DQ358549
	242	17c	Labi Road (17)	DQ358283	DQ358426	DQ358551
<i>M. beccariana</i>	696	17d	Berau (30)	DQ358282	DQ358425	DQ358550
	2040	21a	Luasong (29)	DQ358285	DQ358428	DQ358553
	290	18	Bukit Taviu (23)	DQ358279	DQ358422	DQ358547
	470	17a	Tawau Hills (28)	DQ358277	DQ358420	DQ358545
	382	17b	Lambir Hills (16)	DQ358280	DQ358423	DQ358548
	147	19	Lemponah (31)	DQ358276	DQ358419	DQ358544
	148	19	Lemponah (31)	DQ358278	DQ358421	DQ358546
	80	20	Ulu Gombak (8)	DQ358284	DQ358427	DQ358552
<i>M. caladiifolia</i>	108	42a	Labi Road (17)	DQ358286	DQ358429	DQ358554
<i>M. lamellata</i>	126	42b	Andulau Reserve (17)	DQ358287	DQ358430	DQ358555
	459	44a	Tawau Hills (28)	DQ358295	DQ358438	DQ358563
	473	44c	Tawau Hills (28)	DQ358293	DQ358436	DQ358561
	207	42c	Lambir Hills (16)	DQ358288	DQ358431	DQ358556
	1163	44b	Berau (30)	DQ358294	DQ358437	DQ358562
<i>M. umbrosa</i>	19	43	Kuala Belalong (19)	DQ358289	DQ358432	DQ358557

	385	41	Lambir Hills (16)	DQ358290	DQ358433	DQ358558
	386	40	Mulu (18)	DQ358291	DQ358434	DQ358559
	387	40	Mulu (18)	DQ358292	DQ358435	DQ358560
<i>M. curtisii</i>	433	34a	Fraser's Hill (4)	DQ358302	DQ358445	DQ358570
	451	34a	Fraser's Hill (4)	DQ358303	DQ358446	DQ358571
<i>M. curtisii</i> var. <i>glabra</i>	440	34a	Cameron Highlands, Tanah Rata (3)	DQ358301	DQ358444	DQ358569
	449	34a	Cameron Highlands, Tanah Rata (3)	DQ358300	DQ358443	DQ358568
<i>M. puncticulata</i>	251	34f	Labi Road (17)	DQ358299	DQ358442	DQ358566
	59	38	Sibu (15)	DQ358304	DQ358447	DQ358572
	32	34c	Sekinchan (9)	DQ358297	DQ358440	DQ358565
	351	39	West Coast (9)	DQ358298	DQ358441	DQ358567
<i>M. sarcocarpa</i>	247	34e	Labi Road (17)	DQ358296	DQ358439	DQ358564
<i>M. gigantea</i>	1880	3e	Tawau Hills (28)	DQ358265	DQ358410	DQ358524
	162	3a	Bukit Bangkirai (36)	DQ358262	DQ358399	DQ358535
	828	2	Bukit Bangkirai (36)	DQ358273	DQ358416	DQ358543
	450	3a	Cameron Highlands, Tanah Rata (3)	DQ358254	DQ358400	DQ358528
	40	3a	Fraser's Hill (4)	DQ358255	DQ358398	DQ358529
	9035	1	Rawang (7)	DQ358275	DQ358418	DQ358542
<i>M. gigantea</i> x <i>pruinosa</i>	256	5	Road to Kubah Park, Red Bride (12)	DQ358272	DQ358415	DQ358539
<i>M. hosei</i>	252	3d	Labi Road (17)	DQ358256	DQ358403	DQ358530
	435	3a	Janda Baik (6)	DQ358257	DQ358401	DQ358533
	454	3a	Ulu Gombak (8)	DQ358268	DQ358402	DQ358538
<i>M. pearsonii</i>	509	8b	Kinabalu NP, Poring Hot Springs (22)	DQ358270	AY245591	AY159436
	2091	3f	Luasong (29)	DQ358267	DQ358412	DQ358537
	465	6	Tawau Hills (28)	DQ358266	DQ358411	DQ358536
	166	3a	Bukit Bangkirai (36)	DQ358258	DQ358404	DQ358532
	347	3c	Bukit Soeharto (33)	DQ358260	DQ358405	AY159435
<i>M. pruinosa</i>	92	7	Sibu (15)	DQ358263	DQ358408	DQ358525
	1504	5	Samboja (34)	DQ358271	DQ358414	DQ358540
	144	4	Bukit Soeharto (33)	DQ358259	DQ358406	DQ358534
	536	1	Sekinchan (9)	DQ358274	DQ358417	DQ358541
<i>M. puberula</i>	485	8c	Crocker Range (21)	DQ358269	DQ358413	DQ358527
	286	8a	Tambunan (21)	DQ358261	DQ358407	DQ358526
<i>M. rufescens</i>	249	3b	Labi Road (17)	DQ358264	DQ358409	DQ358531
<i>M. winkleri</i>	12	11	Kuala Belalong (19)	DQ358245	DQ358390	DQ358516
	1986	10	Tawau Hills (28)	DQ358247	DQ358392	DQ358518
	118	9c	Deramakot Forest Reserve (27)	DQ358246	DQ358391	DQ358517
	1593	9b	Samboja (34)	DQ358248	DQ358393	DQ358519
<i>M. winkleriella</i>	396	12	Mulu (18)	DQ358249	DQ358394	DQ358520
<i>M. conifera</i>	461	14	Tawau Hills (28)	DQ358252	DQ358396	DQ358522
	211	15	Ulu Gombak (8)	DQ358251	DQ358395	DQ358523
<i>M. diepenhorstii</i>	205	9a	Ulu Gombak (8)	DQ358253	DQ358397	DQ358521
<i>M. recurvata</i>	136	16	Tawai Forest Reserve, Telupid (24)	DQ358244	DQ358388	DQ358515
<i>M. heynei</i>	446	13	Cameron Highlands, Tanah Rata (3)	DQ358250	DQ358389	DQ358514

ID=Identifikationsnummer, HT=Haplotyp

**Tabelle 12: Übersicht über der Haplotypen und die Kodierung der Merkmale**

## Erklärung:

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

Kassel, im Februar 2008