

Regulation der Nektarzusammensetzung bei Bromeliaceen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften der

Bergischen Universität Wuppertal

angefertigt in der

Arbeitsgruppe für Molekulare Pflanzenforschung/Pflanzenbiochemie (Botanik)

vorgelegt von

Thomas Göttlinger

Wuppertal, im Oktober 2019

Referentin: Prof 'in Dr. Gertrud Lohaus, Bergische Universität Wuppertal

Co-Referentin: Prof 'in Dr. Gela Preisfeld, Bergische Universität Wuppertal

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20200131-113745-0

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20200131-113745-0>]

DOI: 10.25926/6g0b-mg73

[<https://doi.org/10.25926/6g0b-mg73>]

Inhaltsverzeichnis

1.	Abstract.....	1
2.	Zusammenfassung.....	2
3.	Einleitung.....	3
3.1	Die Familie Bromeliaceae.....	3
3.2	Nektarien.....	6
3.3	Nektar.....	8
3.4	Bestäuber.....	10
3.5	Auswirkungen von Umwelteinflüssen.....	13
3.6	Fragestellung.....	14
4.	Material und Methoden.....	16
4.1	Chemikalien und Geräte.....	16
4.2	Pflanzenmaterial.....	16
4.3	Sammeln von Blattmaterial.....	16
4.4	Sammeln von Nektariengewebe.....	16
4.5	Sammeln von Nektar.....	17
4.6	Untersuchung des Nektars auf mikrobiellen Befall.....	17
4.7	Biochemische Analysen der Komponenten von Blättern, Nektarien und Nektar ...	18
4.7.1	Extraktion von Metaboliten und Ionen aus Pflanzengewebe mittels Chloroform-Methanol-Extraktion.....	18
4.7.2	Bestimmung von Stärke.....	18
4.7.3	Bestimmung von Proteinen.....	20
4.7.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	21
4.7.5	Proteinauftrennung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	24
4.8	Bestimmung der Invertase-Aktivität.....	28
4.9	Paraffineinbettung von Nektariengewebe.....	29
4.9.1	Fixierung und Einbettung des Gewebes.....	29
4.9.2	Dünnschnitte am Mikrotom.....	31
4.9.3	Einfärben und permanente Einbettung.....	31

4.10	Mikroskopische Untersuchung.....	32
4.11	Einfluss von Umweltfaktoren	32
4.12	Statistik.....	33
4.12.1	Principal Component Analysis (PCA).....	33
4.12.2	Permutational analysis of variance (PERMANOVA).....	34
4.12.3	Phylogenetische Analysen.....	34
4.13	Bioinformatik	36
5.	Ergebnisse.....	38
5.1	Mikrobieller Befall im Nektar	39
5.2	Nektarzusammensetzung bei Bromeliaceen: Ist die Nektarzusammensetzung mit dem Bestäubungssyndrom korreliert?	40
5.3	Proteinanalyse des Nektars von unterschiedlichen Bromelienarten.....	106
5.4	Mikroskopische Untersuchung von Nektariengewebe.....	112
5.5	Invertase-Aktivität bei verschiedenen Bromelienarten	115
5.6	Auswirkungen von Umwelteinflüssen auf den Nektar und Nektarien der epiphytisch wachsenden Bromelie <i>A. fasciata</i>	118
5.6.1	Einfluss von Licht und Dunkelheit auf <i>Aechmea fasciata</i>	118
5.6.2	Einfluss von verschiedenen Temperaturen auf <i>Aechmea fasciata</i>	121
5.6.3	Einfluss von Trockenheit auf <i>Aechmea fasciata</i>	122
6.	Diskussion.....	125
6.1	Stabilität der Nektarkomponenten.....	125
6.2	Einfluss von Bestäubern.....	126
6.3	Einfluss von unterschiedlichen Umweltfaktoren bei Bromelien	131
6.4	Nektar wird in Nektarien gebildet.....	135
6.5	Einflussfaktoren der Nektarzusammensetzung.....	137
7.	Literaturverzeichnis	139
	Appendix.....	156
	Danksagung	164

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Herstellung von LB-, Chinablau-Laktose und Malzextrakt-Agarplatten	17
Tabelle 4.2: Reaktionsmedium für die enzymatische Aufspaltung der Stärke	19
Tabelle 4.3: Reaktionsansatz für die optisch-enzymatische Glucosebestimmung	19
Tabelle 4.4: Einstellungen für die Pulsmessungen am Amperometer.....	22
Tabelle 4.5: Lösungen für die Vorsäulenderivatisierung.....	23
Tabelle 4.6: Laufmittel für die Analyse von freien Aminosäuren	23
Tabelle 4.7: Herstellung des Trenn- und Sammelgels.....	25
Tabelle 4.8: Puffer für die SDS-PAGE	26
Tabelle 4.9: Größe und Konzentration der Markerproteine	26
Tabelle 4.10: Lösungen für die Coomassie-Färbung.....	27
Tabelle 4.11: Lösungen für die Silberfärbung.....	28
Tabelle 4.12: Puffer und Lösungen für das Invertase-Assay	29
Tabelle 4.13: Ethanol-Reihe für Dehydrierung der Gewebestücke.....	30
Tabelle 4.14: Histo-clear-Reihe als Vorbereitung des Gewebes für die Einbettung.....	31
Tabelle 4.15: Ethanol-Reihe als Vorbereitung auf die permanente Einbettung.....	32
Tabelle 4.16: Verwendete Software	37
Tabelle 5.1: Beschriftung der nach Gattungen sortierten SDS-Gele in Abbildung 5.2	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Blüten verschiedener Bromelienarten.....	5
Abbildung 3.2: Florale Nektarien bei der Familie Bromeliaceae.	7
Abbildung 4.1: Graphische Darstellung für die Pulsmessung am Amperometer.....	21
Abbildung 4.2: Acetonitril-Gradient bei der Analyse von freien Aminosäuren.....	22
Abbildung 5.1: Inkubation von Nektar bei Raumtemperatur für 48 h.	39
Abbildung 5.2: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine innerhalb verschiedener Bromelien-Gattungen.....	107
Abbildung 5.3: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine aus dem Nektar von Pflanzen mit unterschiedlichem Bestäuber (Kolibris, Fledermaus).....	110
Abbildung 5.4: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine aus dem Nektar von Pflanzen mit unterschiedlicher Blütenfarbe (gelb, blau-lila, braun, grün, weiß).	110
Abbildung 5.5: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine aus dem Nektar von Pflanzen mit unterschiedlicher Photosynthese-Typ (C3, CAM).	111
Abbildung 5.6: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine aus dem Nektar von Pflanzen mit unterschiedlicher Wachstumsformen (epiphytisch, terrestrisch).	112
Abbildung 5.7: Mikroskopische Untersuchung der Nektarien in den Blüten von <i>A. fasciata</i> und <i>A. miniata discolor</i>	114
Abbildung 5.8: Vergleich der Querschnitte und Längsschnitte von <i>A. fasciata</i> und <i>A. miniata discolor</i>	115
Abbildung 5.9: Aktivität der Zellwandinvertase, vakuolären und cytoplasmatischen Invertasen sortiert nach Bromelienarten.	116
Abbildung 5.10: Vergleich des Gesamtzuckergehalts und des Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen im Nektar und Nektariengewebe.	117
Abbildung 5.11: Gesamtzuckergehalt und Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen im Nektar von <i>A. fasciata</i> bei normalen Tag-/ Nachtbedingungen.	120
Abbildung 5.12: Gesamtzuckergehalt und Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in Nektar und Nektarien von <i>A. fasciata</i> nach 24 h Dauerlicht und 24 h Dunkelheit.....	121
Abbildung 5.13: Gesamtzuckergehalt und Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in Nektar und Nektarien von <i>A. fasciata</i> bei 20°C und 35°C.	122
Abbildung 5.14: Gesamtzuckergehalt und Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in Nektar und Nektarien von <i>A. fasciata</i> bei Trockenheit.	123

1. Abstract

Bromeliaceae is one of the species-richest families in the Neotropics with a high morphological and physiological diversity among the species. Bromeliads, like many other plants, produce floral nectar in their septal nectaries to attract pollinators. Floral nectar is an aqueous solution containing a large portion of sugar, but also free amino acids, proteins, inorganic ions, organic acids and other secondary metabolites. Previous studies have shown that the sugar composition in nectar is specific to a given plant species and that the nectar composition correlates with the pollinators.

147 bromeliad species from 18 genera, including 22 chiropterophilous species, were analyzed to investigate whether other nectar components are also related to pollinator types. Statistical analyses were carried out to examine whether the variances in the nectar composition are caused by the taxonomy or the phylogeny of the family. Special attention was paid to the pollination by bats, for which large amounts of carbohydrates, nitrogen compounds, and ions are made available by the plants. The analyses showed that there is a relationship between sugar, inorganic ions, and organic acids in nectar and the respective pollinators. Therefore, the nectar composition of bromeliads appears to be more influenced by the pollinator than by taxonomy or phylogeny. However, a considerable part of the data variance, particularly for amino acids, cannot be traced back to any of the analyzed factors.

In order to examine other factors that influence the nectar composition, the roles of various environmental factors on different types of bromeliads were also investigated. For this purpose, the effects of drought, increased temperatures, and different light conditions on the composition of nectar and nectaries were analyzed. Drought induced changes in the nectar volume and the sugar composition in the nectar, but not in the nectaries. The composition of nectar and nectaries was not so much influenced by elevated temperatures or changing light conditions. Therefore, it could be shown that the pollinator does not only determine the composition of the nectar but also by some environmental conditions. The presented variations of the nectar composition caused by drought can lead to a negative influence of the plant-pollinator interaction.

2. Zusammenfassung

Die Familie Bromeliaceae ist eine der artenreichsten Familien in den Neotropen. Ihre Arten zeichnen sich dadurch aus, dass diese eine hohe morphologische und physiologische Diversität besitzen. Die Bromelien produzieren in ihren septalen Nektarien floralen Nektar, um Bestäuber anzulocken. Anhand der Zuckerzusammensetzung im Nektar konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass diese für eine Pflanzenart spezifisch ist und dass die Nektarzusammensetzung mit dem Bestäuber korreliert.

Ob auch weitere Nektarbestandteile im Zusammenhang mit dem Bestäubertyp stehen, wurde bei 147 Bromelienarten aus 18 Gattungen inklusive 22 chiropterophilen Arten analysiert. Anhand von statistischen Analysen wurde ebenfalls überprüft, ob die Varianzen in der Nektarzusammensetzung durch die Taxonomie oder Phylogenie der Familie hervorgerufen wurden. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Bestäubung durch Fledermäuse gelegt, für die große Mengen an Kohlenhydraten, Stickstoffverbindungen und Ionen durch die Pflanzen investiert wird. Die Analysen zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen Zucker, anorganischen Ionen im Nektar und dem spezifischen Bestäuber besteht. Somit wird die Nektarzusammensetzung der Bromelien mehr durch den Bestäuber als durch die Taxonomie oder Phylogenie beeinflusst. Jedoch kann ein beachtlicher Teil der Datenvarianzen, insbesondere bei den Aminosäuren, auf keinem der analysierten Faktoren zurückgeführt werden.

Zur Überprüfung möglicher weiterer Einflussfaktoren auf die Nektarzusammensetzung wurde zusätzlich verschiedene Umweltfaktoren untersucht. Hierfür wurden die Auswirkungen von Trockenheit, Temperatur und verschiedenen Lichtverhältnissen auf die Zusammensetzung des Nektars und der Nektarien analysiert. Durch Trockenheit zeigten sich Veränderungen im Nektarvolumen und in der Zuckerzusammensetzung des Nektars, jedoch konnten solche Veränderungen nicht in den Nektarien detektiert werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Nektars nicht nur durch den Bestäuber bestimmt ist, sondern auch durch einige Umweltbedingungen verändert wird. Die aufgezeigten Veränderungen der Nektarzusammensetzung können dazu führen, dass die Interaktion der Pflanzen und Bestäuber negativ beeinflusst wird.

3. Einleitung

Die Familie Bromeliaceae zählt zu den Angiospermen. Die meisten angiospermen Blütenpflanzen nutzen Nektar, um Bestäuber anzulocken, wodurch dieser eine entscheidende Rolle in der erfolgreichen Fortpflanzung der Pflanze spielt (Schmid et al. 2011). Für Bestäuber stellt der Nektar eine wichtige Nahrungsquelle dar, mit welchen diese ihren Energiebedarf durch die enthaltenen Zucker abdecken können. Mit dem Begriff Bestäubungssyndrom wird die Anpassung der Blütenmorphologie, der Farbe, des Duftes und der Nektarzusammensetzung an die Nahrungsbedürfnisse einer spezifischen Gruppe von Bestäubern beschrieben (Fenster et al. 2004; Ashworth et al. 2015). Bei Angiospermen erfolgt ca. 90% der Bestäubung durch Tiere (Ollerton et al. 2011). Somit ist die Zusammensetzung des Nektars sowohl für die Pflanzen als auch für die tierischen Bestäuber äußerst wichtig. In diesem Zusammenhang soll aufgeklärt werden inwieweit der Bestäuber, die Blütenmorphologie, die Pflanzenphysiologie, die Phylogenie bzw. Taxonomie und verschiedene Umweltfaktoren die Nektarzusammensetzung bei Bromeliaceen beeinflusst und somit auch entsprechend reguliert werden.

3.1 Die Familie Bromeliaceae

Die Familie Bromeliaceae gehört zu der Ordnung der Poales (Süßgrasartige), die wiederum zu der Klasse der Bedecktsamer (Angiospermen) gehört. Zu der Familie zählen insgesamt mehr als 3000 Arten in ca. 58 Gattung, die mittlerweile, aufgrund genetischer Untersuchungen, in acht Unterfamilien (Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Bromelioideae, Puyoideae, Pitcairnioideae) unterteilt werden (Givnish et al. 2011). Aktuell kommt es immer wieder zu Veränderungen der Taxonomie von Bromeliaceae. Aufgrund neuer morphologischer und genetischer Studien werden neue Gattungen oder Arten gebildet und andere Arten werden anderen bzw. neuen Gattungen zugeordnet (Zizka et al. 2013; Barfuss et al. 2016; Gomes-da-Silva und Souza-Chies 2018). Dennoch sind die Untersuchungen der Phylogenie der Bromeliengewächse noch immer nicht vollständig abgeschlossen.

Als Besonderheiten der Familie Bromeliaceae fallen einige Arten auf. Bei den beiden Arten *Brocchinia reducta* und *Bro. hechtioides* handelt es sich um Karnivoren, die Insekten anlocken und diese durch die rutschige Oberfläche in den Trichter fallen, wo

sie ertrinken und anschließend durch von der Pflanze produzierten Enzyme verdaut werden (Givnish et al. 1984; Benzing 2000). *Brocchinia acuminata* lebt in einer Symbiose mit Ameisenkolonien, weshalb diese als Ameisenpflanze (Myrmecophyten) bezeichnet wird (Givnish 2007). Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist jedoch die kultivierte tropische Nutzpflanze Ananas (*Ananas comosus*). Weitere Arten werden als Zierpflanzen verwendet (z.B. *Aechmea fasciata*, Lanzenrosette).

Die Pflanzen der Familie kommen hauptsächlich in den Neotropen vor, die einzige Ausnahme stellt dabei die Art *Pitcairnia feliciana* dar, welche in Westafrika angesiedelt ist (Porembski und Barthlott 1999). Generell können die Bromelien in sehr unterschiedlichen Gebieten wachsen. Dabei kommen diese sowohl in Wüsten- als auch in Feuchtgebieten, auf Höhe des Meeresspiegels oder in Höhen von über 4000 m sowie in Gebieten mit hoher und niedriger Sonneneinstrahlung vor (Benzing 2000). Fast 60% der Bromelienarten wachsen epiphytisch, und 40% lithophytisch oder terrestrisch (Benzing 2000; Zotz 2013). Des Weiteren benutzen viele der Bromelienarten CAM-Photosynthese zur Produktion von Zucker, während andere Arten C3-Photosynthese betreiben (Crayn et al. 2015) und einige wenige Arten sind intermediäre Formen, die zwischen C3- und CAM-Metabolismus wechseln können, um sich an die Umgebungsbedingungen anzupassen, z.B. *Guzmania monostachia* (Maxwell et al. 1994). Bei Pflanzen mit CAM-Metabolismus ist die Wasseraufnahme sechs Mal effektiver als bei der C3-Photosynthese, da sich die Stomata bei Nacht öffnen (Ehleringer und Monson 1993). Zur Aufnahme von Feuchtigkeit/Niederschlag und Nährstoffen besitzen Bromelien Trichome (Saugschuppen) auf den Blättern und bilden dafür kaum Wurzeln aus, welche bei den epiphytischen Bromelien hauptsächlich zur Befestigung dienen. Beim Niederschlag ist für die Pflanzen die Dauer entscheidender als die Menge (Gradstein 2008). Zum Sammeln von Wasser bilden viele Arten Blatttrichter (Phytotelma) oder Zisternen an der Blattbasis, aufgrund der Phyllotaxis, aus (Benzing 1976; Benzing 1980). Dadurch entstehen kleine Biotope, welchen einigen Organismen als Lebensraum dienen (Alves-Silva und da Silva 2009; Torreias und Ferreira-Keppler 2011). Bromelien breiten sich einerseits über Samen und andererseits über sogenannte Kindel aus. Nach der Blüten- und Samenbildung erfolgt ein völliges Absterben der Pflanze, wobei die vegetativen Ableger (Kindel) gebildet werden. Anschließend benötigen einige Arten mehrere Jahre bis die Tochterpflanzen einen neuen Blütenstand ausbilden, z.B. braucht *Puya raimondii* zur Bildung ihres Blütenstandes ca. 40-100 Jahre (Hornung-Leoni et al. 2013).



Abbildung 3.1: Blüten verschiedener Bromelienarten.

A: *Aechmea fasciata*, **B:** *Aechmea miniata discolor*, **C:** *Aechmea cariocae*, **D:** *Aechmea angustifolia*, **E:** *Aechmea pyramidalis*, **F:** *Alcantarea imperialis*, **G:** *Billbergia nutans*, **H:** *Billbergia buchholtzii*, **I:** *Billbergia pyramidalis*, **J:** *Dyckia choristaminea*, **K:** *Guzmania monostachia*, **L:** *Guzmania cylindrica*, **M:** *Nidularium scheremetiewii*, **N:** *Puya coerulea violacea*, **O:** *Pitcairnia xanthocalyx*, **P:** *Quesnelia quesneliana*, **Q:** *Tillandsia tectorum*, **R:** *Tillandsia malzinei*, **S:** *Tillandsia ionantha*, **T:** *Tillandsia heterophylla*, **U:** *Vriesea fenestralis*, **V:** *Vriesea saundersii*, **W:** *Wallisia pretiosa*, **X:** *Werauhia werckleana*, **Y:** *Zizkaea tuerckheimii*

Generell besitzt diese Familie eine hohe morphologische und physiologische Diversität. Durch die bemerkenswerte adaptive Radiation in der Pflanzenwelt, ist bei den Bromeliaceen eine Vielzahl von Blütenmorphologien und Blütenfarben entstanden (Benzing 2000, Abbildung 3.1). Es kommen kurze oder lange, schmale, röhrenförmige oder weit geöffnete Blüten vor. Als Blütenfarbe kommen gelb, rot, rosa, lila, grün und weiß in unterschiedlichen Farbabstufungen vor.

Der Aufbau der Blüte ist entscheidend für die Erreichbarkeit des Nektars durch die spezifischen Bestäuber. Diese Faktoren spielen eine wesentliche Rolle bei der Bestäubung der Bromelien und werden anhand des Bestäubungssyndroms beschrieben (Fenster et al. 2004; Ashworth et al. 2015). Normalerweise dienen auch Duftstoffe zur Anlockung von Bestäubern, jedoch duften die Blüten von Bromelien nur sehr selten, Ausnahmen hierfür sind beispielsweise *Hohenbergia ridleyi* (Siqueira Filho 1998) und *Tillandsia macropetala* (Aguilar-Rodríguez et al. 2014). Neben den schon genannten Faktoren, ist für eine erfolgreiche Anlockung der Bestäuber ebenfalls die Zusammensetzung des Nektars ausschlaggebend (Krömer et al. 2008).

Bei Bromelien kommt eine Vielzahl von unterschiedlichen Bestäubern vor, diese umfassen, Kolibris (Trochilophilie), Fledermäuse (Chiropterophilie), Nachtfalter (Sphingophilie), Schmetterlinge (Psychophilie) und Insekten (Entomophilie), aber auch Windbestäubung (Anemophilie) ist möglich. Insgesamt werden mehr Arten durch Wirbeltiere als durch Insekten bestäubt, wobei Kolibris die am häufigsten vorkommenden Bestäuber der Bromelien sind (Kessler und Krömer 2000; Canela und Sazima 2005).

3.2 Nektarien

Blüten besitzen spezielle Drüsen, die als Nektarien bezeichnet werden, um floralen Nektar zu produzieren. Neben floralen Nektarien, welche in der Blüte sitzen, gibt es noch extraflorale Nektarien, die sich an Blattstielen oder Nebenblättern befinden. Florale Nektarien produzieren Nektar, um Bestäuber anzulocken, wohingegen extraflorale Nektarien ein Sekret abgeben, welches beispielsweise zur Anlockung von Insekten bei Karnivoren (Płachno 2012) oder zum Schutz vor Fressfeinden dient (Escalante-Pérez et al. 2012; Gish et al. 2015).

Die floralen Nektarien können in verschiedenen Bereichen der Blüte vorliegen. Bei der Familie Bromeliaceae befinden sich diese im Septum des Gynoeceums (Abbildung

3.2). Das Vorhandensein von solchen Nektarien stellt eine Anomalie in der Ordnung Poales dar und nur eine weitere Familie (Rapateaceae) in dieser Ordnung, welche Insekten- und Vogelbestäubung aufweist, besitzt solche Nektarien. Aufgrund von Windbestäubung (Sajo et al. 2004), in vielen „Kern“ Poales fehlen Nektarien völlig. Der Fruchtknoten bei den Bromelien kann sowohl oberständig als auch unterständig sein (Benzing 2000). Die Drüsen erstrecken sich von der Basis des Fruchtknotens bis hin zur Basis des Griffels und besteht aus sekretorischen Epithelzellen und Nektarienparenchym mit Stärkekörnern, welche während der Nektarsekretion hydrolysiert werden (Stahl et al. 2012). Dabei zeigt das Gewebe eine labyrinthische Oberfläche mit Gefäßbündeln, wodurch eine erhöhte Nektarproduktion für spezielle Bestäuber gewährleistet wird (Sajo et al. 2004). Das Gefäßsystem in den Nektarien besteht überwiegend aus Phloem und in seltenen Fällen kommt Phloem in Kombination mit Xylem vor (Frey-Wyssling 1955; Fahn 1979a). Im Vergleich zu anderen Arten wird in den septalen Nektarien von *Tillandsia tenuifolia* (Bernardello et al. 1991) und *Ananas ananassoides* keine Cuticula gefunden, weshalb die Sekretion über die Zellwände der Epithelzellen stattfindet (Stahl et al. 2012).



Abbildung 3.2: Florale Nektarien bei der Familie Bromeliaceae.
v. l. n. r.: *Aechmea miniata discolor*, *Aechmea racinae*, *Billbergia morelii*, *Guzmania killipiana*;
N = Nektariengewebe.

Die Metaboliten werden durch das Phloem zu den Nektarien transportiert, wo sie dann in den Nektar sekretieren. Jedoch unterscheidet sich die Zusammensetzung des Phloems und des Nektars (Lohaus und Moellers 2000; Lohaus und Schwerdtfeger 2014). Über das Phloem erfolgt der Transport von Saccharose zu den Nektarien (Lohaus und Schwerdtfeger 2014). Allerdings befindet sich im Phloem keine Hexosen (Nadwodnik und Lohaus 2008), diese sind jedoch im sekretierten Nektar zu finden. Bei Bromelien war es bisher nicht möglich reinen Phloemsaft von intakten Pflanzen zu sammeln, um die Zusammensetzung desselbigen zu verifizieren, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass innerhalb dieser Familie auch nur Saccharose im Phloem

transportiert wird. Für die Umwandlung von Phloemsaft in Nektar und die Sekretion von Nektar gibt es verschiedene Modelle. Die merokrinen und granulokrinen Sekretion beschreiben den symplastischen Transport der Metaboliten des Prä-Nektars bis zur Nektarienoberfläche, wo diese dann in Vesikel eingelagert werden. Die entstandenen Vesikel verschmelzen mit der Plasmamembran und danach entleeren diese ihren Inhalt nach außen (Fahn 1979a; Fahn 1979b; Nicolson et al. 2007). Das wahrscheinlichste Modell für viele Pflanzenarten ist die ekkrine Sekretion. Bei der Anthese wird gespeicherte Stärke aus den Nektarien abgebaut und dabei wird aus dem gebildeten Zucker, mittels Saccharose-Phosphat Synthase (SPS) und weiteren Enzymen, Saccharose produziert. Durch den Uniporter SWEET9 wird dann die synthetisierte Saccharose in den Apoplasten exportiert (Lin et al. 2014), wo dann im extrazellulären Raum die Zellwandinvertase die Saccharose in die Hexosen spaltet. Trotz dieser Modelle ist eine vollständige Aufklärung der Prozesse bisher noch nicht erfolgt (Roy et al. 2017).

Da im Gegensatz zum Phloem, im Nektar auch die Hexosen, Glucose und Fructose vorkommen (Percival 1961; Lohaus und Schwerdtfeger 2014), muss zwischen dem Transport zu den Nektarien und dem fertig sekretierten Nektar die Saccharose aus dem Phloem durch entsprechende Enzyme gespalten werden. Für die irreversible Spaltung der Saccharose in ihre Hexosen, sind Enzyme, wie Invertasen (β -Fructofuranosidasen; EC 3.2.1.26), und andere Stoffwechselprozesse während der Sekretion des Nektars zuständig (Ruhlmann et al. 2010; Tiedge und Lohaus 2018). Die Einteilung der Invertasen erfolgt in drei Gruppen anhand ihres pH-Optimums und ihrer subzellulären Lokalisation. Bei den vakuolären (V-INV) und Zellwand-Invertasen (CW-INV) handelt es sich um saure Invertasen, welche ein pH-Optimum im Bereich von pH 4,5 bis 5,0 besitzen, wohingegen neutrale Invertasen (N-INV) im Cytosol lokalisiert sind (Sturm 1999; Roitsch und González 2004).

3.3 Nektar

Nektar ist eine wässrige, stark zuckerhaltige Lösung. Neben Zucker enthält Nektar auch freie Aminosäuren, anorganische Ionen, organische Säuren, Proteine, Lipide, Phenole und weitere sekundäre Komponenten (Baker und Baker 1973; Calder und Hiebert 1983; Adler et al. 2006; Seo et al. 2013). Nektar kann über einen kurzen Zeitraum oder über mehrere Tage produziert werden, hierbei ist die Menge des produzierten Nektars von verschiedenen Einflüssen abhängig, wie den Samenanlagen

im Fruchtknoten, dem Blütezeitraum und dem Bestäuber (Pacini et al. 2003). Nektar hat mehrere Funktionen, zum einen das Anlocken von Bestäubern und zum anderen das Abschrecken von bestimmten anderen Blütenbesuchern oder Nektarräubern (Adler 2000; Heil 2011).

Zucker

Zuckerformen, die hauptsächlich im Nektar enthalten sind, sind Glucose, Fructose und Saccharose (Percival 1961). Die Gesamtkonzentration der drei Zucker reicht von 7 bis 70% w/w (Nicolson et al. 2007). Neben diesen werden in einigen Arten in deutlich geringeren Konzentrationen, andere Zucker, wie beispielsweise Raffinose (Lohaus und Schwerdtfeger 2014), Trehalose (Gonzalez et al. 2016) und Xylose (Jackson und Nicolson 2002), gefunden. Für die Arten der Familie Bromeliaceae wurden nur die drei genannten Hauptzucker im Nektar und den Nektarien gefunden (Krömer et al. 2008; Göttlinger et al. 2019). Anhand des Verhältnisses von Saccharose zu den Hexosen in Nektar, kann der Nektar in zwei Gruppen eingeteilt werden, zum einen hexosereicher ($<1,0$) und zum anderen saccharosereicher ($>1,0$) Nektar (Baker und Baker 1983a; Perret 2001; Nicolson et al. 2007). Aufgrund der relativ konstanten Zuckerzusammensetzung bei einer Art, wurde diese häufig mit dem primären Bestäuber der Pflanze in Verbindung gebracht (Nicolson et al. 2007; Krömer et al. 2008; Tiedge und Lohaus 2017).

Aminosäuren und Proteine

Im Nektar sind ebenfalls freie Aminosäuren enthalten, jedoch liegen diese im Vergleich zu den Zuckern in viel geringeren Konzentrationen vor (Baker und Baker 1973). Es wurden fast alle essentiellen und nicht essentiellen, sowie einige nicht proteinkodierende Aminosäuren gefunden (Petanidou et al. 2006). Neben den Aminosäuren sind auch Proteine im Nektar enthalten. Der Ursprung der Aminosäuren und Proteine im Nektar ist noch nicht vollständig geklärt. In einer Untersuchung von *Helleborus* konnte festgestellt werden, dass die epidermalen Zellen, welche Nektar produzieren, absterben (Vesprini et al. 1999). Dabei gelangen Proteine aus dem degenerierenden Cytoplasma in den Nektar (Pacini et al. 2003). Eine andere Möglichkeit wäre, dass diese stickstoffhaltigen Komponenten aus dem Phloemsaft oder von Proteinkörpern in Nektarienzellen stammen (Stpiczyńska et al. 2005; Nicolson et al. 2007). Durch die Aminosäuren wird die Attraktivität des Nektars erhöht. Kolibris können beispielsweise auch andere Stickstoffquellen nutzen (Baker 1977),

jedoch stellt der Nektar für einige Insekten die einzige Stickstoffquelle dar, weshalb viele Insekten einen hohen Aminosäuregehalt bevorzugen (Blüthgen und Fiedler 2004). Die im Nektar befindlichen Proteine können zum einen auch die Funktion als organische Stickstoffquelle haben, aber wahrscheinlicher ist, dass diese den Nektar vor Fressfeinden oder mikrobiellem Befall schützen. Als Beleg hierfür lassen sich die Nektarin-Proteine aufführen, welche im Blütennektar von Ziertabak gefunden wurden und diesen durch den Nektar-Redox-Zyklus vor mikrobiellem Befall schützen soll (Carter und Thornburg 2004; Park und Thornburg 2009).

Anorganische Ionen und organische Säuren

Weitere Bestandteile des Nektars sind anorganische Ionen und organische Säure. Das häufigste vorkommende Kation ist K^+ und das vorherrschende Anion ist Cl^- (Hiebert und Calder 1983; Nicolson und Worswick 1990). Bisher wurde als mögliche Funktion der anorganischen Ionen nur der Einfluss auf die elektrolytische Balance der Besucher beschrieben (Hiebert und Calder 1983). Wohingegen für die organischen Säuren bisher nur das Vorhandensein der selbigen im Nektar dokumentiert wurde (Baker 1977). Insgesamt ist über die Funktion dieser Ionen im Nektar noch wenig bekannt (Tiedge und Lohaus 2017).

Weitere Inhaltsstoffe

Nektar enthält noch weitere Substanzen, wie Lipide, Terpene, Phenole und andere sekundäre Komponenten (Nicolson 2011; Wiese et al. 2018). Lipide sind nur in sehr geringen Mengen im Nektar vorhanden und dienen als energiereiche Nahrungsquelle für Blütenbestäuber (Nicolson et al. 2007). Für den Duft von Blüten sind meist flüchtige Terpene verantwortlich (Raguso 2004). Des Weiteren befinden sich Phenole und andere sekundäre Inhaltsstoffe im Nektar, mit der Funktion Blütenbesucher entweder anzulocken oder fernzuhalten (Adler 2000; Kessler und Baldwin 2007).

3.4 Bestäuber

Mit dem Bestäubungssyndrom wird die Anpassung der Blütenmorphologie, der Blütenfarbe, des Blütenduftes und ebenso der Nektarzusammensetzung an die Vorlieben von spezifischen Bestäubern beschrieben (Fenster et al. 2004; Ashworth et al. 2015). In einigen Studien wird dieser Zusammenhang eher kritisch betrachtet, da die Blüten meist ein breiteres Spektrum von Blütenbesuchern anlocken (Ollerton et al.

2009; Schmid et al. 2011). Jedoch ist nicht jeder Blütenbesuch mit einer erfolgreichen Bestäubung gleichzusetzen (Waser et al. 1996; Souza et al. 2016).

In der Pflanzenwelt gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Bestäuber. Bei den Bromelienarten können die schon genannten typischen Bestäuber (3.1) jeweils in Tag- (Kolibri, Insekten, Schmetterlinge) und Nachtbestäuber (Fledermaus, Nachtfalter) gruppiert werden.

Trochilophilie beschreibt die Bestäubung durch Kolibris und ist der häufigste vorkommende Bestäubungstyp in den Neotropen (Bawa 1990), sowie bei den Bromelien (Kessler und Krömer 2000) und Nektar stellt eine wichtige Nahrungsquelle für diese Vögel dar. Dabei bevorzugen sie einen dünnflüssigen, saccharosereichen Nektar (Krömer et al. 2008). Generell besuchen diese tierischen Bestäuber rot- oder gelb-pigmentierte Blüten (Grant und Grant 1968). Die Blüten, welche durch Kolibris bestäubt werden, können in ihrer Form variieren (Blütenbecher, Kronröhren), allerdings besitzen die meisten Blüten eine röhrenförmige Form, wodurch diese für die Kolibris leicht zugänglich sind, jedoch andere Besucher ausschließen (Faegri und van der Pijl 1979; Rocca und Sazima 2010).

Die Bestäubung durch Insekten wird als Entomophilie bezeichnet und umfasst die Bestäubung durch Käfer, Fliegen, Bienen und Ameisen. Arthropoden fressen Blätter, Stängel, Blüten, Pollen und Wurzeln von Bromelien. Darüber hinaus konsumieren sie auch Nektar und sorgen damit für eine Bestäubung, sowie eine Ausbreitung der Samen (Frank und Lounibos 2009). In der Literatur werden Bienen als regelmäßige Besucher von normalerweise Kolibri-bestäubten Bromelienarten mit kurzen Blüten beschrieben (Kamke et al. 2011). Auch wenn Bienen oft als Zweitbestäuber bei Bromelien vorkommen, ist die Effektivität bei diesem Bestäuber eher gering (Vázquez et al. 2005).

Unter dem Begriff Psychophilie wird die Bestäubung durch tagaktive Schmetterlinge zusammengefasst. Dieser Bestäubertyp bevorzugt große rosa-, blau- und lila-pigmentierte Blüten, mit einer Möglichkeit, dass diese während der Nahrungsaufnahme landen können (Woodson et al. 1973; Yurtsever et al. 2010). Dabei besitzen die von Schmetterlingen bestäubten Pflanzen, meist lange, enge, röhrenförmige Blüten, die nur durch den Rüssel der Schmetterlinge erreicht wird (Bauder et al. 2011).

Bei Sphingophilie handelt es sich um die Bestäubung durch Nachtfalter. Diese Gruppe von Faltern hat sich auf die Ernährung von Nektar spezialisiert, da ihr Rüssel länger ist als der gesamte Körper des Nachtfalters, wodurch dieser erfolgreich den Blütenboden von äußerst langgezogenen Blüten zur Nektaraufnahme erreichen kann (Bauder et al. 2011). Durch diese nachtaktiven Falter werden meist sich nachts öffnende Blüten mit typischerweise hellen Farben (weiß oder grünlich) und einem starken Duft bei Nacht besucht (van der Pijl 1961). Im Gegensatz zu den Schmetterlingen, welche auf der Blüte landen, schweben die Nachtfalter vor der Blüte bei der Nahrungsaufnahme (van der Pijl 1961).

Zu den Nachtbestäubern zählen auch die Fledermäuse. Dieser Bestäubungstyp wird als Chiropterophilie bezeichnet. Die Bestäubung durch Fledermäuse findet sich sehr häufig in den Gattungen *Vriesea* (Sazima et al. 1985) und *Werauhia* (Cascante-Marín et al. 2005). Aber es gibt auch chiropterophile Arten in anderen Gattungen, wie beispielsweise *Alcantarea*, *Billbergia*, *Encholorium*, *Guzmania*, *Pitcairnia*, *Pseudalcantarea*, *Puya* und *Tillandsia* (Fleming et al. 2009; Aguilar-Rodríguez et al. 2014; Marques et al. 2015; Santos et al. 2017). Bromelien, bestäubt durch Fledermäuse werden regelmäßig von Tieren der Unterfamilie Glossophaginae (Phyllostomidae), besonders von Gattung *Anoura* bestäubt (Aguilar-Rodríguez et al. 2019). Um zu gewährleisten, dass der Nektar für Fledermäuse erreichbar ist, ist es notwendig, dass sich die Blüten bei Nacht öffnen und eine angepasste Blütenmorphologie vorliegt. Die Blüten besitzen, damit sie in der Dunkelheit erkennbar sind, eine bräunlich oder grünlich weiße Färbung (Tschapka und Dressler 2002; von Helversen und Winter 2003). Die Morphologie reicht von großen, weit geöffneten und schalenförmigen bis hin zu kleinen, elliptischen und röhrenförmigen Blüten, wobei die Länge der Blüte von 18 bis 80 mm variieren kann. Bei der Nahrungsaufnahme schweben Fledermäuse genauso wie Kolibris und Nachtfalter vor der Blüte, wodurch mehr Energie von den Tieren verbraucht wird (Voigt und Winter 1999). In einer Nacht nimmt eine 10 g schwere nektarfressende Fledermaus bis zu 150% ihres eigenen Körpergewichts an Nektar zu sich (Voigt et al. 2006). Als Nektarzusammensetzung bevorzugen die Fledermäuse im Gegensatz zu den anderen Bestäubern einen hexosereichen Nektar (Aguilar-Rodríguez et al. 2019). Ebenfalls konnte schon festgestellt werden, dass die Aminosäuren im Nektar einen Einfluss auf die Nahrungsauswahl der Fledermäuse hat (Rodríguez-Peña et al. 2013), jedoch decken

diese ihren täglichen Bedarf an Proteinen eher mit Pollen, anderen Pflanzenteile oder Insekten ab (Law 1992; Herrera M. et al. 2001).

Neben den genannten Bestäubungsarten kommt auch Windbestäubung (Anemophilie) bei der Familie der Bromelien vor. Diese Form der Bestäubung findet sich nur in der Gattung *Navia*, welche 93 Arten beinhaltet (Benzing 2000).

3.5 Auswirkungen von Umwelteinflüssen

Zu den Epiphyten zählen nur Arten weniger Familien, zu diesen Familien zählen Orchidaceae, Araceae, und Bromeliaceae (Gentry und Dodson 1987 b). Dabei stellen Epiphyten ein Großteil der Flora im tropischen Regenwald dar und sind somit für die ökologische Komplexität verantwortlich (Gentry und Dodson 1987 a). Ein Großteil der Familie Bromeliaceae weist ein epiphytisches Wachstum auf und reagiert dadurch besonders sensitiv auf klimatische Veränderungen, wie Wassermangel, da diese keine dauerhafte Wasser- und Nährstoffversorgung besitzen (Benzing 1998; Nadkarni und Solano 2002). Um dem entgegenzuwirken besitzen viele Bromelien eine komplexe Phyllotaxis wodurch Wasser eingelagert wird (Benzing 1980). Durch CAM-Photosynthese haben epiphytisch wachsende Pflanzen ebenfalls eine Möglichkeit geschaffen sich physiologisch an Trockenheit anzupassen (Pierce et al. 2002a; Silvera et al. 2009). Daneben sind die Epiphyten ebenfalls verschiedenen Licht- oder Temperaturbedingungen exponiert; zum einen sind sie auf den Zweigen fast der vollen Sonne ausgesetzt, zum anderen leben sie im tiefen Schatten auf dem Waldboden (Hietz und Briones 2001).

Durch klimatische Veränderungen wird es immer häufiger zu starken Trockenperioden in vielen Regionen der Erde kommen (IPCC 2014). Trockenperioden treten dabei meist in Kombination mit weiteren veränderten Umweltbedingungen auf, wie z.B. erhöhte Temperaturen (Takkis et al. 2018; Descamps et al. 2018), veränderte Lichtverhältnisse (Demmig-Adams und Adams 1992; Stancato et al. 2002) und ein erhöhter CO₂-Gehalt in der Luft (Cassia et al. 2018; Dusenge et al. 2019).

In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Pflanzen durch Trockenheit auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden, u.a. wird die Produktion von Nektar negativ beeinflusst (Carroll et al. 2001; Phillips et al. 2018). Bei Wassermangel wird weniger Nektar produziert (Carroll et al. 2001) und zum Teil verändert sich die Zuckerkonzentration (Wyatt et al. 1992). Ebenso wurde bei einigen epiphytischen

Bromelien gezeigt, wie diese generell auf den Einfluss von Trockenheit reagieren (Bader et al. 2009; Freschi et al. 2010). Eine leichte Erhöhung der durchschnittlichen Temperatur kann zunächst einen positiven Effekt auf die Nektarproduktion bei Pflanzen haben (Nocentini et al. 2013), stark erhöhte Temperaturen führen jedoch zu einer verringerten Nektarproduktion (Takkis et al. 2018). Neben Trockenheit und Temperatur sind die Lichtverhältnisse ein weiterer Faktor, der die Nektarproduktion beeinflussen kann (Kenoyer 1917; Cawoy et al. 2008). Der CO₂-Gehalt in der Atmosphäre nimmt immer weiter zu und wird sich bis zum Ende des Jahrhunderts vermutlich verdoppeln. Ein erhöhter CO₂-Gehalt steht im Zusammenhang mit einem Anstieg der Temperatur, wodurch wiederum negative Effekte entstehen (Ainsworth 2008).

Es gibt einige Studien hinsichtlich des Einflusses von Umweltfaktoren auf die Verfügbarkeit und Zusammensetzung von Nektar, allerdings wurden für die Untersuchungen, keine Bromelien verwendet (Gardener und Gillman 2001 a; Waser und Price 2016; Clearwater et al. 2018; Phillips et al. 2018; Takkis et al. 2018). Es gibt bis jetzt keine Untersuchungen bezüglich des Einflusses von verschiedenen Lichtverhältnissen, erhöhten Temperaturen oder Trockenheit auf die Nektarzusammensetzung von Bromelien als Vertreter von Epiphyten.

3.6 Fragestellung

Es gibt mittlerweile einige Studien die sich mit den Faktoren und der Regulation der Nektarzusammensetzung in verschiedenen Pflanzen beschäftigen. Jedoch kommt es hierbei meist zu unterschiedlichen Ergebnissen in unterschiedlichen Pflanzenarten. Aufgrund dessen wurden die Bromeliaceen als Modellfamilie ausgewählt. Sie wurden bereits in Studien bezüglich der Nektarzusammensetzung verwendet (Krömer et al. 2008). Die Bromeliengewächse eignen sich gut als Modellfamilie, da sie eine Vielzahl von Pflanzen mit einer außergewöhnlichen morphologischen und physiologischen Diversität besitzen. Des Weiteren werden Bromelien von einer Vielzahl von Tag- als auch Nachtbestäubern bestäubt. Durch die gute vegetative Vermehrbarkeit, durch die Bildung von täglichen Blüten, sowie durch die unterschiedliche Blütezeit der einzelnen Arten ist eine einfache Beprobung der Pflanzen gewährleistet.

Die Zusammensetzung des Nektars wurde hinsichtlich folgender Komponenten untersucht: Zucker, Aminosäuren, anorganische Kationen und Anionen, organische Säure und Proteine. Zu Beginn wurde verifiziert, ob durch einen mikrobiellen Befall die

Zuckerzusammensetzung des Nektars verändert wird. Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die Nektarzusammensetzung bei Bromeliaceen mit dem Bestäubungssyndrom zusammenhängt. Deshalb wurde der Einfluss des spezifischen Bestäubers, der taxonomischen Gruppen und der phylogenetischen Beziehungen analysiert.

Da Nektar durch das Nektariengewebe in den Blüten produziert wird, wurde dieses mikroskopisch identifiziert und analysiert. Des Weiteren findet man in diesem Gewebe die Invertasen, welche im extrazellulären Raum die Saccharose in die Hexosen aufspaltet. Deshalb wurde die Aktivität der drei verschiedenen Invertasen im Nektariengewebe, sowie der Zuckergehalt in den Nektarien bei verschiedenen Arten untersucht, damit weitere Erkenntnisse über die Sekretion des Nektars gewonnen werden.

Aufgrund der vorangegangenen Analysen wurden als nächstes weitere Umwelteinflüsse auf die Nektar- und Nektarienzusammensetzung von Bromelien untersucht. Darüber hinaus wurde auch die Aktivität der Invertasen, sowie der Stärkegehalt in den Nektarien bestimmt. Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich Umweltfaktoren auf die Nektar- und Nektarienzusammensetzung von Bromelien auswirken. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von Trockenheit, erhöhter Temperatur und verschiedenen Lichtverhältnissen (Dauerlicht und Dauerdunkel) untersucht.

4. Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Geräte

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Bezugsquellen und Laborgeräte mit Herstellerangaben befindet sich im Anhang. Die in den Versuchen verwendeten Chemikalien wurden immer im höchstmöglichen Reinheitsgrad bezogen.

4.2 Pflanzenmaterial

Die genutzten Bromelien wurden vom Botanischen Garten der Universität Göttingen, sowie vom Botanischen Garten der Universität Wien, zur Verfügung gestellt und in einem Gewächshaus der Bergischen Universität Wuppertal kultiviert. Im Gewächshaus unterliegen die Pflanzen einem automatischen Beleuchtungsrhythmus von 14 h Licht und 10 h Dunkelheit, sowie einer automatischen Bewässerung alle 48h. Die Lichtstärke betrug ca. $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei einer ganzjährigen Temperatur von ca. 25°C am Tag und 18°C bei Nacht.

Neben dem Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus der Bergischen Universität Wuppertal wurde ebenfalls Pflanzenmaterial im Botanischen Garten und Botanischen Museum Berlin, im Botanischen Garten der Universität Bochum, im Botanischen Garten der Universität Göttingen, im Botanischen Garten der Universität Heidelberg und im Botanischen Garten der Universität Wien gesammelt.

4.3 Sammeln von Blattmaterial

Beim Sammeln von Blattmaterial von Bromelien wurde jeweils ein 2×2 cm großes Stück aus der Mitte eines intakten Blattes herausgeschnitten und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zu Weiterverarbeitung der Blätter wurden diese bei -80°C gelagert.

4.4 Sammeln von Nektariengewebe

Zur Gewinnung von reinen Nektariengewebe wurden die Blüten der Bromelien jeweils entfernt. Unter der Berücksichtigung von Sajo et al. (2004) wurde mittels Skalpell unter einem Binokular das septale Nektariengewebe herausgeschnitten. Anschließend wurde das extrahierte Gewebe mit Reinstwasser gespült, um externe Zucker zu

entfernen. Anschließend wurde das Nektariengewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um bis zu den weiteren Verwendungen bei -80°C gelagert zu werden.

4.5 Sammeln von Nektar

Am ersten Tag der Anthese der jeweiligen Blüte wurde mittels Mikropipette Nektar aus der Blüte entnommen und das Nektarvolumen notiert. Dabei wurden Nachtbestäubte Arten nachts und am Tag bestäubte Arten tagsüber beprobt. Anschließend wurde der Nektar bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Liste der beprobten Pflanzen im Anhang).

4.6 Untersuchung des Nektars auf mikrobiellen Befall

Um eine Beeinflussung der Nektarzusammensetzung auszuschließen, wurde untersucht, ob der Nektar durch Hefen oder Bakterien befallen ist. Hierfür wurde stichprobenartig Nektar von unterschiedlichen Pflanzenarten untersucht. 10-50 μl des Nektars wurden auf unterschiedliche Medien ausplattiert.

Tabelle 4.1: Herstellung von LB-, Chinablau-Laktose und Malzextrakt-Agarplatten

Substanzen	Menge
LB-Agarplatten (pH 7,2-7,7 mit NaOH)	
Natriumchlorid	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Trypton	10 g/L
Agar	15 g/L
Chinablau-Laktose-Agarplatten	
Fleischextrakt	3 g/L
Pepton aus Casein	5 g/L
Natriumchlorid	5 g/L
Chinablau	0,375 g/L
Agar	12 g/L
Malzextrakt-Agarplatten (pH 5,5 mit HCl)	
Malzextrakt	20 g/L
Pepton aus Casein	3 g/L
Agar	22 g/L

Für die generelle Untersuchung von bakteriellem Befall wurde LB-Agar, für Untersuchung von Milchsäurebakterien wurde Chinablau-Lactose-Agar und für den Befall von Hefen wurde Malzextrakt-Agar verwendet (Tabelle 4.1). Für die Bakterien erfolgte die Inkubation über einen Zeitraum von 5 Tagen bei 37°C und für die Hefen bei 25°C mit täglicher Überprüfung der Platten.

4.7 Biochemische Analysen der Komponenten von Blättern, Nektarien und Nektar

4.7.1 Extraktion von Metaboliten und Ionen aus Pflanzengewebe mittels Chloroform-Methanol-Extraktion

Für die Analyse der Metaboliten und Ionen aus Pflanzengewebe wurde eine Chloroform-Methanol-Extraktion durchgeführt. Hierbei wurden 25 mg fein gemörstertes Nektariengewebe (4.4) oder 50 mg fein gemörstertes Blattmaterial (4.3) in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt und hierbei wurde die genaue Einwaage notiert, um später die mittels HPLC ermittelten Konzentrationen in pro Gramm Frischgewicht (FG/FW) umrechnen zu können. Anschließend wurde 5 ml Chloroform/Methanol (1,5:3,5; v/v) hinzugegeben und diese für 30 min aus Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 3 ml Wasser, wurde das Gemisch gevortext und zentrifugiert (4500 UpM, 1 min). Danach wird die wässrige Oberphase in einen Rundkolben überführt und der Extraktionsschritt wird mit 2 ml Wasser wiederholt. Die in den Zentrifugen-Röhrchen zurückbleibende Unterphase wird bis zur Bestimmung der Stärke (4.7.2) und des Proteingehalts (4.7.3) bei -20°C gelagert. Nach der Vereinigung der beiden wässrigen Phasen aus den Extraktionsschritten, folgte die Trocknung in einem Rotationsverdampfer. Die Metaboliten und Ionen wurden anschließend in 1 ml Wasser bei Blättern und in 0,5 ml Wasser bei Nektarien zurückgelöst. Mittels 1 ml Spritze wurde die gelösten Metaboliten und Ionen aufgenommen und durch einen Spritzenfilter (Nylonmembran mit 0,2 µm Porengröße) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung (4.7.4) erfolgte die Lagerung bei -20°C.

4.7.2 Bestimmung von Stärke

Für die Bestimmung der Stärke wurde das Zentrifugen-Röhrchen aus der Chloroform-Methanol-Extraktion (4.7.1) verwendet. Um Chloroform und Chlorophyll möglich vollständig zu entfernen, wurde zum Waschen 5 ml 96% Ethanol hinzugegeben. Danach wurde für 5 min bei 4500 UpM zentrifugiert und anschließend der Überstand

abgeschüttet. Das entstandene Pellet wird mit 2 ml 0,2 N KOH resuspendiert und im Schüttelwasserbad bei 80°C für 3 h inkubiert. Dann wurde ein pH-Wert von 4,5-5,0 mit 1 N Essigsäure eingestellt und für 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Für die enzymatische Aufspaltung der Stärke wurde in einer Doppelbestimmung zu 100 µl entnommener Probe 400 µl Reaktionsmedium (Tabelle 4.2) hinzugegeben und bei 55°C für 4 h inkubiert.

Tabelle 4.2: Reaktionsmedium für die enzymatische Aufspaltung der Stärke

Substanzen	Konzentration (pro 400 µl Ansatz)
Natriumacetat pH 4,8	50 mM
α-Amylase	1,98 U
Amyloglukosidase	1,38 U

Danach wurden die Ansätze zentrifugiert (2 min, 13000 UpM) und der klare Überstand für die optisch-enzymatische Glucosebestimmung verwendet. Hierbei wurde in einer Doppelbestimmung 10 µl des klaren Überstands in einer 1 ml Messküvette mit 690 µl Reaktionsansatz (Tabelle 4.3) versetzt und mittels Plastikspatel durchmischt.

Tabelle 4.3: Reaktionsansatz für die optisch-enzymatische Glucosebestimmung

Substanzen	Konzentration (pro 660 µl Ansatz)
Tris-HCl pH 8,0	100 mM
MgCl ₂	3 mM
ATP	1,5 mM
NADP ⁺	0,5 mM

Zunächst wurde die Anfangsextinktion bei 334 nm photometrisch gemessen (Blindwert gegen Luft). Durch die Zugabe von 5 µl Hexokinase/Glucose-6P-Dehydrogenase (1:10 verdünnt) wurde die Reaktion gestartet und für mindestens 10 min inkubiert. Dabei erfolgte die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-P unter ATP-Verbrauch. Danach wurde durch die Dehydrogenase Glucose-6-P mit NADP⁺ zu Gluconat-6-P oxidiert, wodurch NADPH+H⁺ entstand, das photometrisch gemessen werden kann. Abschließend konnte der Endextinktionswert bei 334 nm gemessen werden. Anhand der Differenz der Anfangs- und Endextinktion konnte, mittels Lambert-Beerschen Gesetz, der Stärkegehalt berechnet werden.

4.7.3 Bestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt aus der Unterphase der Chloroform-Methanol-Extraktion wurde, nach der Aufarbeitung und Stärkebestimmung, nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Die Bestimmung der Proteine beruht auf einer Farbreaktion der Peptidbindung, die mittels Photometrie gemessen werden kann. Im ersten Schritt findet eine Biuretreaktion statt, bei der sich ein blau-violetter Komplex der Peptidbindungen mit dem Kupfer (II)-Ionen im Alkalischen bildet. Anschließend wird durch diesen Komplex das gelbe Folin-Ciocalteu Phenolreagenz zu Molybdänblau reduziert, das photometrisch gemessen werden kann.

Durch das Mischen der Stammlösungen A (2% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH (w/v)), B (2% Na-K-Tartrat (w/v)) und C (1% CuSO₄ (w/v)) im Verhältnis 99:0,5:0,5 wurde zunächst eine Arbeitslösung mit Kupfer (II) und Puffer frisch hergestellt. Die Messung der Proben erfolgte mittels einer Dreifachbestimmung. Hierfür wurden zu 750 µl der frisch hergestellten Arbeitslösung 135 µl Wasser und 15 µl (1:10 Verdünnung) hinzu pipettiert, invertiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl Folin-Ciocalteu Phenolreagenz hinzugegeben, invertiert und nochmals 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur gleichen Zeit wird ein Ansatz „Stopp vor Start“ angesetzt, um den Hintergrund zu messen. Hierbei wurde zuerst 100 µl Folin-Ciocalteu Phenolreagenz mit den 750 µl Arbeitslösung 15 min inkubiert. Anschließend wurde die 1:10 verdünnte Probe hinzugegeben und ebenfalls für 15 min inkubiert. Abschließend wurde photometrisch die Extinktion des Hintergrunds und der Probe bei 578 nm gemessen.

Über eine externe Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA) konnte der Proteingehalt der photometrisch gemessenen Proben durchgeführt werden. Die Berechnung des Proteingehalts erfolgte unter Verwendung der Steigung der Kalibriergeraden anhand folgender Formel:

$$\text{Proteingehalt} \left[\frac{\text{mg}}{\text{g FG/FW}} \right] = \frac{E(\text{Probe}) - E(\text{Stopp vor Start})}{\text{Steigung } m \left[\frac{\text{ml}}{\text{mg}} \right]} \times \frac{0,5 \text{ ml}}{\text{Einwaage [g]}} \times \frac{150 \text{ } \mu\text{l}}{15 \text{ } \mu\text{l}}$$

4.7.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

4.7.4.1 Analyse der Zucker

Zur Bestimmung des Zuckers im Nektar (4.5) und extrahierten Pflanzengewebe (4.7.1) wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach Lohaus und Schwerdtfeger (2014) verwendet. Die Pflanzenextrakte wurden mit einem Spritzenfilter (0,2 μM Porengröße) nochmals gereinigt. Der Nektar und die gereinigten Extrakte wurden mit Reinstwasser soweit verdünnt, dass die Konzentrationen der Zucker im linearen Detektionsbereich des Puls-Amperometrischen Detektors lag. Bei dem verwendeten HPLC-System handelt es sich um ein Thermo Fisher Scientific Dionex ICS-5000+ HPIC System. Für die Trennung der Zucker wurde eine Anionenaustauscher-Säule (Vorsäule: CarboPac PA10 Guard; Hauptsäule: CarboPac PA10, Fa. Dionex) verwendet. Dabei erfolgte die Auftrennung über die Anionen-Bindekapazität der stationären Phase und der Anzahl der negativen Ladungen an den Zuckermolekülen in der mobilen Phase. Die Proben wurden mittels Autosampler über ein Ventil in die Eluenten-Zufuhr (80 mM NaOH) der Säule eingespritzt. Mit Hilfe der Pumpe wurde eine Flussgeschwindigkeit von 0,8 ml/min eingestellt, wodurch ein Druck von ca. 1850 psi erreicht wurde. Die Detektion der Zucker erfolgte über einen Puls-Amperometrischen Detektor mit Gold-Elektrode (ED Zelle, Fa. Dionex). Die für die Detektion notwendigen Pulseinstellungen sind in Abbildung 4.1 und Tabelle 4.4 aufgeführt. Für die externe Kalibration wurden Zucker Standards parallel gemessen. Die gesammelten chromatographischen Daten wurden mit dem Integrationsprogramm Chromeleon (Version 7.2, Fa. Dionex) ausgewertet.

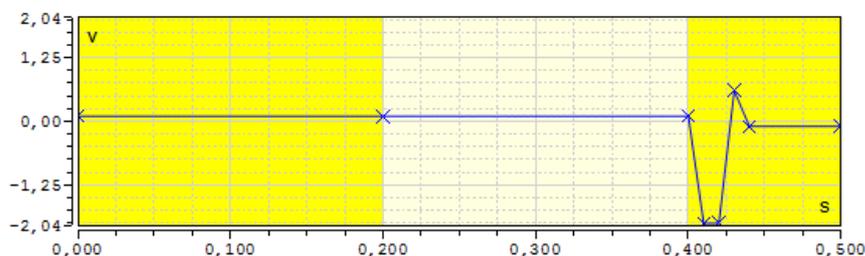


Abbildung 4.1: Graphische Darstellung für die Pulsmessung am Amperometer

Tabelle 4.4: Einstellungen für die Pulsmessungen am Amperometer

Zeit [s]	Spannung	Modus
0,000	0,1	
0,200	0,1	Messungsstart
0,400	0,1	Messungsende
0,410	-2,0	Reinigung
0,420	-2,0	Reinigung
0,430	0,6	Regeneration
0,440	-0,1	
0,500	-0,1	

4.7.4.2 Analyse der freien Aminosäuren

Die Analyse der freien Aminosäuren im Nektar (4.5) und extrahierten Pflanzengewebe (4.7.1) erfolgte mittels HPLC nach Lohaus und Schwerdtfeger (2014). Bei dem verwendeten HPLC-System handelt es sich um ein Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 System. Bei Aminosäuren mit einer primären Aminogruppe wurde eine Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) verwendet (Tabelle 4.5). Mit dieser Methode konnte keine Aminosäure mit einer sekundären Aminogruppe (z.B. Prolin) nachgewiesen werden. Deshalb wurde für die Detektion von Prolin eine Vorsäulenderivatisierung mit Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (FMOC-CL) anstelle von OPA angewendet (Tabelle 4.5). Die Auftrennung der Derivate wurde mittels einer Umkehrphasenchromatographie-Säule (Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 endcapped 5 μm LichroCART 4-4; Hauptsäule: Superspher 100 RP-18 endcapped LichroCART 125-4, Fa. Merck) mit einem Acetonitril-Gradienten (Abbildung 4.2, Tabelle 4.6) bei einer Flussrate von 0,9 ml/min durchgeführt.

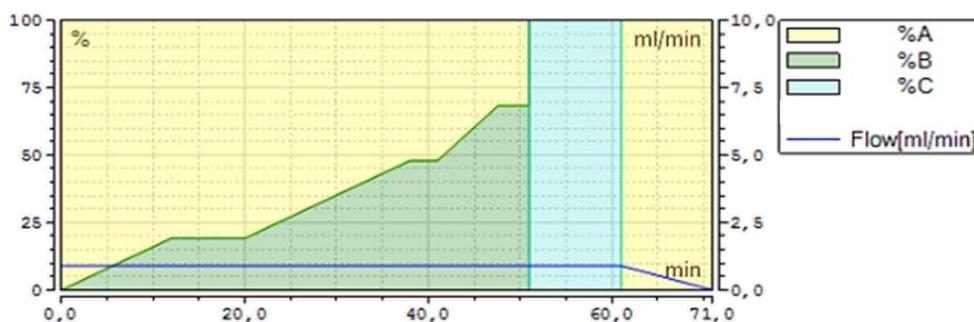
**Abbildung 4.2:** Acetonitril-Gradient bei der Analyse von freien Aminosäuren

Tabelle 4.5: Lösungen für die Vorsäulenderivatisierung

Lösung	Substanz	Menge
OPA-Stocklösung	OPA	5–8 mg
	Methanol	1 ml
	Kaliumborat (1 M, pH 10,4)	125 µl
	β-Mercaptoethanol	12,5 µl
OPA-Arbeitslösung	Kaliumborat (1 M, pH 10,4)	1 ml
	OPA-Stocklösung	0,5 ml
FMOC-Arbeitslösung	FMOC-Cl	3,8 mg
	Aceton	5 ml

Tabelle 4.6: Laufmittel für die Analyse von freien Aminosäuren

Lösung	Substanz	Menge
HPLC-Puffer	Reinstwasser	2,5 L
	Phosphorsäure	3 ml
	EDTA	1,25 g
	pH 7,06–7,1 einstellen (25% NaOH)	
Laufmittel A	HPLC-Puffer	95%
	Acetonitril	5%
Laufmittel B	HPLC-Puffer	50%
	Acetonitril	50%
Laufmittel C	Acetonitril	70%
	Reinstwasser	30%

Nach der Trennung wurden die Derivate mittels Fluoreszenz (FLD-3100, Fa. Dionex) detektiert. Bei der Derivatisierung erfolgte die Detektion bei einer Anregung von 330 nm und einer Emission von 408 nm, wohingegen bei der Derivatisierung mit FMOC-Cl eine Anregung von 265 nm und eine Emission von 305 nm verwendet wurde. Die externe Kalibrierung erfolgte mit parallel gemessenen Aminosäure-Standards. Die gesammelten chromatographischen Daten wurden mit dem Integrationsprogramm Chromeleon (Version 7.2, Fa. Dionex) ausgewertet.

4.7.4.3 Analyse von anorganischen Ionen und organischen Säuren

Die Analyse von anorganischen Anionen und Kationen erfolgte separat mittels HPLC nach Lohaus et al. (2001). Hierbei wurde sowohl Nektar (4.5) als auch extrahiertes Pflanzengewebe (4.7.1) untersucht. Zur Trennung von anorganischen Anionen und organischen Säuren wurde eine Anionenaustauschersäule (IonPac™ AS11 4 x 250 mm, Fa. Dionex) mit einem NaOH-Gradienten (4–77 mM für 30 min) verwendet. Anorganische Kationen konnten mit einer Kationenaustauschersäule (CS 12A, 4 x 250mm, Fa. Dionex) mittels einer isokratischen Elution (20 mM H₂SO₄) getrennt werden. Durch die Verwendung eines Suppressors (ASRS Ultra II 4mm, Fa. Dionex), der die Spitzenintensität erhöht und das Rauschen der Basislinie durch Vermindern der Grundleitfähigkeit des Eluenten, wurde die Empfindlichkeit erhöht. Mit einem elektronischen Leitfähigkeitsdetektor konnten die anorganischen Ionen und organischen Säuren quantifiziert werden. Standards der zu bestimmenden Ionen und organischen Säuren wurden parallel für die externe Kalibrierung bestimmt. Die gesammelten chromatographischen Daten wurden mit dem Integrationsprogramm Peaknet (Version 5.1, Fa. Dionex) ausgewertet.

4.7.5 Proteinauftrennung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4.7.5.1 Proteinfällung

Vor der Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde eine Proteinfällung durchgeführt, hierzu wurde eine modifizierte Fällung mit einer Chloroform-Methanol-Wasser-Mischung nach Wessel und Flügge (1984) durchgeführt. Zunächst wurden 200 µl Methanol zu 50 µl purem Nektar (4.5) hinzu pipettiert, gevortext und anschließend für 10 s bei 9000 x g zentrifugiert. Danach wurden 50 µl Chloroform hinzugegeben, erneut gevortext und zentrifugiert (1 min, 9000 x g). Die entstandene Oberphase wurde abgenommen und verworfen. Zur Unterphase wurden 150 µl Methanol hinzugefügt, gevortext und zentrifugiert (2 min, 9000 x g). Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wird das Pellet in 10 µl Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung (4.7.5.2) bei -20°C gelagert.

4.7.5.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Neben dem gefällten Nektar (4.54.7.5.1) wurde auch purer Nektar (4.5) in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Hierbei werden die Proteine anhand ihrer jeweiligen Molekülmasse durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Durch die Acrylamidkonzentration T (Konzentration von Acrylamid- und Bisacrylamid-Monomeren) und den Vernetzungsgrad C (Anteil von Bisacrylamid an der Gesamtacrylamidkonzentration) wird die Porengröße des SDS-Gels bestimmt, woran die Trennleistung des Gels abhängig ist. Die SDS-PAGE für die Auftrennung von Proteinen wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um ein diskontinuierliches Gelsystem, das bedeutet, dass das Gel (Tabelle 4.7) aus einem feinporigen Trenngel und einem großporigen Sammelgel mit einer jeweiligen Schichtdicke von 0,75 mm besteht. Sobald das Trenngel gegossen wurde, wird dieses mit Isopropanol überschichtet, um eine plane Oberfläche zu schaffen. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das verbliebende Isopropanol restlos entfernt, um anschließend das Sammelgel zu gießen.

Tabelle 4.7: Herstellung des Trenn- und Sammelgels

2 SDS-Gele	Trenngel	Sammelgel
T [% w/v]	14	5
C [%]	3,3	3,3
Acrylamid/Bisacrylamid (30%, A/B 29:1)	6,5 ml	1,6 ml
SDS-Gelpuffer (4x)	3,5 ml	2,5 ml
H ₂ O _{dest}	5,4 ml	6,1 ml
SDS (20% w/v)	70,0 µl	50,0 µl
TEMED	10,0 µl	12,8 µl
APS (10% w/v)	100,0 µl	84,0 µl

Bei den auf das Gel aufgetragene Proben handelt es sich um puren Nektar und proteingefällten Nektar. Beide Varianten wurden jeweils zusammen mit SDS Probenpuffer (Tabelle 4.8) im Verhältnis 1:3 gemischt und für 10 min bei 70°C erhitzt. Anschließend wurde jeweils das komplette Volumen zusammen mit einem Proteinmarker (Roti-Mark Proteinstandard, Roth) auf das Gel aufgetragen und im SDS-Elektrophoresepuffer (Tabelle 4.8) bei einer konstanten Spannung von 130 V

aufgetrennt. Um die Proteine nach der Trennung anzufärben wurde zwei verschiedene Färbetechniken verwendet, zum einen die Coomassie-Färbung (4.7.5.3) und zum anderen die Silberfärbung (4.7.5.4).

Tabelle 4.8: Puffer für die SDS-PAGE

Puffer	Substanz	Konzentration
SDS Probenpuffer	SDS	2,5% (w/v)
	Na ₂ CO ₃	23,6 mM
	Bromphenolblau	0,04% (w/v)
	DTT	25,0 mM
	Saccharose	15,0% (w/v)
SDS-Trenngelpuffer (4x)	Tris	1,5 M
	pH 8,8 (HCl), filtrieren	
SDS-Sammelgelpuffer (4x)	Tris	1 M
	pH 6,8 (HCl), filtrieren	
SDS-Elektrophoresepuffer	Glycin	383,6 mM
	Tris	50,0 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	pH 8,5 (stellt sich ein)	

Tabelle 4.9: Größe und Konzentration der Markerproteine

Protein	Molekulargewicht [kDA]	Konzentration [mg/ml]
Myosin	212	0,2
β-Galactosidase	118	0,2
Serumalbumin	66	0,2
Ovalbumin	43	0,25
Carboanhydrase	29	0,15
Trypsin Inhibitor	20	0,2
Lysozym	14	0,2

4.7.5.3 Coomassie-Färbung

Nach dem Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE (4.7.5.2) können diese nach Görg et al. (1978) modifiziert nach Rexroth et al. (2003) mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt werden. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei

0,3–1 µg Protein (Wilson 1983). Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel zunächst 15 min in der Färbelösung inkubiert, anschließend erfolgte für 30 min die Überführung in die Entfärbelösung A und abschließend zur endgültigen Entfärbung des Hintergrunds die Inkubation in Entfärbelösung B für erneut 30 min (Tabelle 4.10). Über Nacht wurde das Gel in Wasser gelagert, um eine bessere Entfärbung zu erhalten.

Tabelle 4.10: Lösungen für die Coomassie-Färbung

Lösung	Substanz	Konzentration
Färbelösung	Essigsäure	10% (v/v)
	Isopropanol	45% (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue R-250	0,1% (w/v)
Entfärber A	Essigsäure	10% (v/v)
	Isopropanol	45% (v/v)
Entfärber B	Essigsäure	10% (v/v)
	Isopropanol	10% (v/v)

4.7.5.4 Silberfärbung

Im Gegensatz zur Coomassie-Färbung besitzt die Silberfärbung nach Blum et al. (1987) eine Nachweisgrenze von 5–30 ng pro Proteinbande, wodurch diese Methode wesentlich sensitiver ist. Nach der SDS-Gelelektrophorese (4.7.5.2) wurde das Gel zweimal für 30 min in Fixierlösung I und darauffolgend dreimal für 20 min in Fixierlösung II inkubiert (Tabelle 4.11).

Aufgrund des Wasserentzugs schrumpft das Gel und färbt sich milchig-weiß. Danach wurde das Gel für 1 min in eine Thiosulfat-Lösung (Tabelle 4.11) überführt mit zwei anschließenden Waschschrritten mit H₂O_{dest}. Die Färbung des SDS-Gels erfolgt für 20 min in einer Silberlösung (Tabelle 4.11), wonach das Gel mit H₂O_{dest} gewaschen wurde und anschließend in eine neue Schale mit Entwickler (Tabelle 4.11) übertragen wurde. Die Inkubation im Entwickler wurde solange durchgeführt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Zum Stoppen der Färbung wurde eine 10% Essigsäure (v/v) für 10 min verwendet. Abschließend wurde das fertige Gel in einer Lagerlösung (Tabelle 4.11) inkubiert.

Tabelle 4.11: Lösungen für die Silberfärbung

Lösung	Substanz	Konzentration
Fixierer I	Essigsäure	12% (v/v)
	Methanol	50% (v/v)
Fixierer II	Ethanol	50% (v/v)
Thiosulfat-Lösung	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O	0,80 mM
Silberlösung	AgNO ₃	12 mM
	Formaldehyd 35% (v/v)	8,8 mM
Entwickler	Na ₂ CO ₃	566 mM
	Thiosulfat-Lösung	0,02 mM
	Formaldehyd 35% (v/v)	4,8 mM
Stopplösung	Essigsäure	10% (v/v)
Lagerlösung	Essigsäure	1% (v/v)

4.8 Bestimmung der Invertase-Aktivität

Von den gesammelten Nektarien (4.4) wurden als erstes die Proteine nach Ruhlmann et al. (2010) extrahiert. 25 mg Nektariengewebe wurden mit flüssigem Stickstoff in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mittel Plastikpistill fein gemörsert. Zu den gemörserten Proben wurde 400 µl Extraktionspuffer (Tabelle 4.12) hinzugegeben, 10 min auf Eis inkubiert und bei 4°C für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein separates Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Diese lösliche Proteinfraction beinhaltet die löslichen sauren Invertasen (cytoplasmatische und vakuoläre Invertasen). Das zurückgebliebene Pellet (beinhaltet Zellwandinvertasen) wurde mit 400 µl 80 mM Natriumacetat pH 4,8 resuspendiert und anschließend auf vier Aliquotes aufgeteilt. Die Überstände wurden ebenfalls auf 4 Aliquotes aufgeteilt. Für den Nullwert wurden jeweils zwei Aliquotes durch 5-minütiges Erhitzen auf 100°C gestoppt.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach dem Assay von Heineke et al. (1992). Zu allen aufgeteilten Proben der Proteinextraktion wurde jeweils 500 µl Saccharoselösung (abhängig von Invertase, Tabelle 4.12) hinzugegeben. Für die Invertasereaktion wurden die Proben für 10 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 3-minütiges Erhitzen bei 100°C gestoppt. Abschließend wurden alle Proben zentrifugiert (2 min, 5000 x g).

Tabelle 4.12: Puffer und Lösungen für das Invertase-Assay

Lösung	Substanz	Konzentration
Extraktionspuffer	HEPES-NaOH pH 8,0	50 mM
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5 mM
	EDTA	2 mM
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1 mM
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1 mM
	DTT	1 mM
Natriumacetatpuffer	Natriumacetat pH 4,8	80 mM
Saccharose-Lösung (Zellwandinvertase)	Natriumacetat pH 5,0	125 mM
	Saccharose	600 mM
Saccharose-Lösung (vakuoläre Invertase)	Natriumacetat pH 5,0	125 mM
	Saccharose	600 mM
Saccharose-Lösung (cytoplasmatische Invertase)	Natriumacetat pH 7,5	125 mM
	Saccharose	600 mM

Bei der Invertasereaktion wurde die hinzugefügte Saccharose zu Glucose gespalten, diese kann optisch-enzymatisch bestimmt werden. Der hierfür verwendete Glucosenachweis erfolgte analog zu dem, der bei der Bestimmung von Stärke verwendet wird (4.7.2). Anhand der Glucosekonzentrationen ließ sich die Aktivität der jeweiligen Invertase in U g⁻¹ FG (FW) berechnen.

4.9 Paraffineinbettung von Nektariengewebe

4.9.1 Fixierung und Einbettung des Gewebes

Um die morphologische Anatomie der Nektarien zu untersuchen wurde das zu untersuchende Gewebe fixiert und in Wachs eingebettet, um es anschließend sehr dünn aufschneiden zu können, damit eine mikroskopische Untersuchung des Gewebes ermöglicht wird. Aus frisch geernteten Blüten wurde mit Hilfe eines Skalpell der Fruchtknoten abgetrennt und entsprechend aufgeschnitten. Sofort wurde das aufgetrennte Gewebe in eine 4-prozentige Paraformaldehyd-Fixierlösung gegeben. Durch das Anlegen eines Vakuums mittels Spritze sollte gewährleistet werden, dass die Gewebestücke vollständig mit Fixierlösung durchzogen sind. Das Vakuum wurde

mehrmals für ungefähr 30 s angelegt. Sobald das Nektariengewebe auf den Boden sinkt, war das vollständige Eindringen der Fixierlösung erfolgreich.

Tabelle 4.13: Ethanol-Reihe für Dehydrierung der Gewebestücke

Zeit	Bedingung	Lösung
30 min	auf Eis	1x PBS-Puffer
30 min	auf Eis	1x PBS-Puffer
1 h	auf Eis	30% Ethanol
1 h	auf Eis	40% Ethanol
1 h	auf Eis	50% Ethanol
1 h	auf Eis	60% Ethanol
1 h	auf Eis	70% Ethanol
1 h	auf Eis	80% Ethanol
ü. N.	4°C	95% Ethanol mit 0,1% Eosin

Danach wurden diese über Nacht (ü. N.) bei 4°C in frischer Lösung inkubiert. Am folgenden Tag wurde dem Nektariengewebe durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe das Wasser aus dem Gewebe entfernt (Tabelle 4.13). Die Färbung erfolgte ü. N. in 95% Ethanol mit 0,1% Eosin. Das überschüssige Eosin wurde mit mehreren Ethanol-Waschschritten abgewaschen. Für die Vorbereitung auf die folgende Wachseinbettung wurden die Gewebestücke in einer ansteigenden Histo-clear-Reihe (Tabelle 4.14) inkubiert. In 100% Histo-clear mit 25% Paraffinwachs wurde die Nektarienstücke bei Raumtemperatur ü. N. gelagert. Danach wurde bei 42°C das Wachs vollständig gelöst und anschließend weitere 25% Paraffinwachs hinzugegeben. Nachdem dieses erneut vollständig gelöst war, wurde die Temperatur auf 60°C erhöht. Am Abend wurde die Histo-clear-Wachs-Mischung gegen reines Paraffinwachs ausgetauscht und weiterhin bei 60°C inkubiert. An den folgenden zwei Tagen wurde jeweils morgens und abends das Wachs durch frisches Wachs ersetzt. Abschließend wurden Wachsblöcke in auf 60°C vorgewärmte Schalen gegossen, in denen die Gewebestücke separat positioniert wurden. Dabei ist darauf zu achten, dass diese möglich senkrecht in der Schale stehen und nicht auf den Boden absinken, damit diese vollständig von Wachs umschlossen sind. Das Wachs härtet in einem Zeitraum von ca. 3 h bei Raumtemperatur aus. Die Lagerung der Wachsblöcke erfolgt bei 4°C und ist so bis zu einem Jahr möglich.

Tabelle 4.14: Histo-clear-Reihe als Vorbereitung des Gewebes für die Einbettung

Zeit	Lösung
1 h	25% Histo-clear
1 h	50% Histo-clear
1 h	75% Histo-clear
1 h	100% Histo-clear
1 h	100% Histo-clear
ü. N.	100% Histo-clear mit 25% Paraffinwachs

4.9.2 Dünnschnitte am Mikrotom

Für das Schneiden der Nektarienstücke im Wachs wurde ein Mikrotom (RM2121 RTS, Fa. Leica) verwendet. Hierfür wurden die Wachsblöcke (4.9.1) in kleine Trapezoeder geschnitzt und mit geschmolzenem Wachs auf einer Plastikhalterung fixiert. Beim Einspannen der hergestellten Trapezoeder-Wachsblöcke muss darauf geachtet werden, dass die Schnittkante und die Klinge parallel zueinander sind, um zu gewährleisten, dass sich ein gleichmäßiges Wachsband beim Schneiden bildet. Die Dicke der Schnitte lag bei 5 μm und es wurden Dünnschnitte auf der Länge des Objektträgers (Superfrost Plus, Fa. Roth) hergestellt und auf diesem mit DEPC-Wasser benetzt. Um die Falten und Knicke aus den Schnitten zu entfernen wurde die Objektträger auf einer 35°C Wärmeplatte platziert, damit sich das Wachs ausdehnen kann. Nach 15 min wird das überschüssige Wasser vorsichtig entfernt und die Objektträger wurden ü. N. zum Trocknen auf der Wärmeplatte bei 35°C belassen.

4.9.3 Einfärben und permanente Einbettung

Die Gewebeschnitte auf den Objektträger wurden in einer absteigenden Ethanol-Reihe (Tabelle 4.15) rehydriert und abschließend getrocknet. Danach wurden die Schnitte mit 0,05% Toluidinblau (O'Brien und McCully 1981) eingefärbt. Abschließend wurden diese in 2–3 Tropfen Entellan dauerhaft eingebettet.

Tabelle 4.15: Ethanol-Reihe als Vorbereitung auf die permanente Einbettung

Zeit	Lösung
10 min	100% HistoClear
10 min	100% HistoClear
30 s	100% Ethanol
30 s	95% Ethanol
30 s	85% Ethanol
30 s	70% Ethanol
30 s	50% Ethanol
30 s	30% Ethanol
30 s	10% Ethanol
1 min	Reinstwasser

4.10 Mikroskopische Untersuchung

Die dauerhaft eingebetteten Gewebeschnitte (4.9.3) wurden unter einem Lichtmikroskop (Primo Star, Zeiss) betrachtet. Abschließend wurden die Untersuchungen fotografisch dokumentiert.

4.11 Einfluss von Umweltfaktoren

Zuerst wurde der Einfluss des Blütenalters bei normalen Lichtverhältnissen untersucht, hierfür wurden zu sechs Zeitpunkten (8 Uhr, 12 Uhr, 16 Uhr, 20 Uhr, 0 Uhr und 4 Uhr) Nektarproben von derselben Blüte (je 5 µl) von *A. fasciata* gesammelt (4.5).

Um den Einfluss von Dauerlicht und Dauerdunkel zu untersuchen, wurden zu Beginn um 13 Uhr sowohl Nektar- (4.5) als auch Nektarienproben (4.4) bei *A. fasciata* gesammelt (Kontrolle). Anschließend wurden die Pflanzen jeweils 24 h Dauerlicht und Dauerdunkel ausgesetzt und am darauffolgenden Tag um 13 Uhr erneut Proben von frischen Blüten zu sammeln.

Des Weiteren wurde *A. fasciata* verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. 6 Tage bevor die erste Blüte öffnet wurden die Pflanzen zwei verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, zum einen 20°C (18°C über Nacht) und zum anderen 35°C (22°C über Nacht). Von den ersten Blüten wurden um 13 Uhr jeweils Nektar- (4.5) und Nektarienproben (4.4) gesammelt.

Der Einfluss von Trockenheit wurde bei der epiphytisch wachsenden Bromelie *A. fasciata* über einen Zeitraum von 14 Tagen überprüft. Hierfür wurde zu Beginn das

Restwasser vollständig aus dem von der Pflanze gebildeten Blatttrichter entfernt. Das Experiment wurde mit der Anthese der ersten Blüten gestartet und über den gesamten Blütezeitraum wurden täglich Nektar- (4.5) und Nektarienproben (4.4) gesammelt.

4.12 Statistik

Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Q-Q-Diagramm und die Homogenität mit dem Brown & Forsythe Test überprüft. Sofern diese Voraussetzung gegeben war, wurde eine Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) oder alternativ ein t-test durchgeführt. Bei der ANOVA wurde überprüft, ob der Mittelwert einer oder mehrerer Gruppen signifikant vom Gesamtmittelwert abweicht, jedoch zeigt dieses Verfahren nicht wo die Signifikanz vorliegt. Um zu ermitteln zwischen welchen Gruppen die festgestellte Signifikanz festgestellt wurde, erfolgte die Anwendung des Tukey post-hoc Tests (p -Wert < 0,05).

4.12.1 Principal Component Analysis (PCA)

Mit der Hauptkomponentenanalyse (PCA) wird die Anzahl der Dimension eines Datensatzes auf Daten in einem zwei- oder dreidimensionalen Raum reduziert, dabei soll der Verlust der Informationen minimal und die Varianz der Daten maximal sein. Eine wichtige Voraussetzung ist, dass die Daten die gleiche Form haben, z.B. nur Konzentrationen chemischer Komponenten oder nur Prozentangaben. Die PCA wurde mit dem Statistikwerkzeug R, einer Sprache und Umgebung für statistische Berechnung und Grafiken, durchgeführt. Zu Beginn wird eine z-Transformation des Datensatz durchgeführt, damit Variablen mit höheren Werten keinen viel größeren Einfluss auf das Ergebnis haben. Hierbei wird der Erwartungswert einer Variablen 0 und die Varianz 1, wobei die Berechnung nachfolgender Formel erfolgt:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

x = Messwert; μ = arithmetischer Mittelwert; σ = Standardabweichung

Nach der Transformation ist es möglich die PCA mittels R (Version 3.5.1, www.r-project.org) zu berechnen. Anhand der Principal Components (PCs), also der neu berechneten Hauptkomponenten, war erkennbar wieviel Prozent der Varianz durch diese PC erklärt wird. Der Eigenwert der PCs sollte unter 1 liegen, da sonst weniger

Varianz durch die PC erklärt werden, als von einer der Ursprungsvariablen. Desto mehr Varianz durch die PCs abgedeckt wird, wurde entschieden, wie viele PCs extrahiert und geplottet werden. Für die PCA wurde ein Datensatz mit 7 Gattungen (*Alcantarea*, *Guzmania*, *Pitcairnia*, *Puya*, *Tillandsia*, *Vriesea*, *Werauhia*), die die gleiche Anzahl von Fledermaus-bestäubten und Kolibri-bestäubten Bromelienarten beinhaltet, verwendet. Um die Ergebnisse und graphische Evaluation abschließend zu bestätigen wurde eine permutative multivariate Varianzanalyse (PERMANOVA, 4.12.2) durchgeführt.

4.12.2 Permutational analysis of variance (PERMANOVA)

Zur Verifizierung der Ergebnisse der PCA (4.12.1) wurde eine PERMANOVA durchgeführt. Dabei wurde der relative Einfluss der einzelnen Variablen auf den Datensatz untersucht. Die Analyse wurde mit dem "vegan" Paket mit der Adonis-Routine des Programms R durchgeführt, so dass Distanzmatrizen basierend auf Permutationstests verwendet werden konnten (Anderson 2001; Oksanen et al. 2007). Für die PERMANOVA wurden das euklidische Abstandsmaß und 999 Permutationen verwendet. Dabei erfolgt die Signifikanzprüfung durch den Vergleich der tatsächlichen F-Testergebnisse mit den zufälligen Permutationen der Objekte zwischen Gruppen. Anhand der Ergebnisse kann festgehalten werden, wie viel Prozent der Datenvarianz durch die Gruppeneinteilung erklärt werden kann. Um den relativen Einfluss auf die Nektarzusammensetzung der Bromelienarten zu untersuchen wurde als Gruppeneinteilung der Bestäuber, die Gattung und der Ort der Probenahme (Botanische Gärten) verwendet.

4.12.3 Phylogenetische Analysen

Für vergleichende Studien sollte die phylogenetische Unabhängigkeit der Daten untersucht werden. Eine Ignorierung der gemeinsamen Abstammung der Arten führt dazu, dass der Typ-I-Fehler stark erhöht ist. Deshalb ist es unbedingt notwendig die Phylogenie in der Statistik zu berücksichtigen (Felsenstein 1985).

Um die Phylogenie der Arten in der Statistik zu berücksichtigen wurden zwei Verfahren verwendet, zum einen BayesTraits (4.12.3.1) und zum anderen die Phylogenetic Generalized Least Squares (PGLS) Regressionsanalyse (4.12.3.2). Hierfür wird ein Stammbaum der zu untersuchenden Arten benötigt. Im Idealfall sollte dieser vollständig auf genetische Untersuchungen beruhen. Sofern dies nicht möglich ist,

kann auch ein schematischer und vereinfachter Stammbaum, der molekulare und morphologische Ergebnisse kombiniert, erstellt werden. Dieser kann anhand von verschiedenen phylogenetischen Untersuchungen mittels der Software Mesquite (Version 3.51; www.mesquiteproject.org) erstellt werden. Im Stammbaum wurde für die BayesTraits-Methode eine Abzweiglänge von 0,1 und für die PGLS-Regressionsanalyse eine Länge von 1 eingestellt. Für die untersuchten Bromelienarten wurde ein schematischer Stammbaum aus 23 unterschiedlichen phylogenetischen Untersuchungen verschiedener molekularer Erkenntnisse erstellt (Faria et al. 2004; Barfuss et al. 2005; Barfuss et al. 2016; Givnish 2007; Horres et al. 2007; Hornung-Leoni und Sosa 2008; Almeida et al. 2009; Rex et al. 2009; Schulte et al. 2009; Chew et al. 2010; Jabaily und Sytsma 2010; Sass und Specht 2010; Givnish et al. 2011; Givnish et al. 2014; Gomes-da-Silva et al. 2012; Versieux et al. 2012; Escobedo-Sarti et al. 2013; Costa et al. 2015; Evans et al. 2015; Pinzón et al. 2016; Schütz et al. 2016; Gomes-da-Silva und Souza-Chies 2018; Moura et al. 2018).

4.12.3.1 BayesTraits

Mit Hilfe des Programms BayesTraits (Version 3.0.1, www.evolution.rdg.ac.uk) wurde auf korrelierte Entwicklung von diskreten Charakteren mit maximaler Wahrscheinlichkeit getestet. Das bedeutet es liegen zwei diskrete (binäre) Merkmale vor und es wird getestet, ob das Vorhandensein oder Fehlen eines Merkmals mit dem Vorhandensein oder Fehlen des anderen korreliert (Pagel 1994). BayesTraits implementiert sowohl die maximale Wahrscheinlichkeit als auch Bayes'sche Methoden, um eine solche Hypothese zu überprüfen. Mit dem Programm wurde ein diskretes, abhängiges und unabhängiges Modell durchgeführt, um die Methoden gegeneinander zu analysieren und ein Wahrscheinlichkeitsverhältnis zu bestimmen. Dazu wurden die Differenz der $-\log$ Likelihood (Lh) der beiden Modelle mit 2 multipliziert und, um die Signifikanz zu bestimmen, dieses Verhältnis mit einer Chi-Quadrat-Verteilung verglichen. Bei einem Wert von 1 gibt es keinen Beweis für eine Korrelation der beiden Merkmale. Umso größer der Wert ist, um stärker ist die Korrelation zwischen den untersuchten Merkmalen (1 bis >100 möglich). Bei Werten zwischen 0 und 1 spricht man von keiner Korrelation, desto kleiner die Werte umso stärker die Unabhängigkeit der Merkmale. Für die Methode wurde der schematische Stammbaum der untersuchten Bromelienarten verwendet (4.12.3) und dabei wurde

das Saccharose-zu-Hexose Verhältnis mit dem Bestäuber der jeweiligen Art verglichen, um beide Merkmale auf ihre Korrelation zu überprüfen.

4.12.3.2 Phylogenetic Generalized Least Squares (PGLS) Regressionsanalyse

Die Phylogenetic Generalized Least Squares (PGLS) Regressionsanalyse wird mittels R (Version 3.0.1, www.evolution.rdg.ac.uk) durchgeführt, hierbei wird aus der Phylogenie ebenfalls die Höhe der erwarteten Korrelation zwischen den Arten basierend auf ihrer gemeinsamen Evolutionsgeschichte identifiziert und diese in der verallgemeinerten Regressionsrechnung der kleinsten Quadrate gewichtet. Das bedeutet, dass untersucht wird, ob die phylogenetische Beziehung die Ähnlichkeit der Artmerkmale beeinflusst (phylogenetisches Signal). Für die Regressionsanalyse wurden für die Nektarkomponenten, der Gesamtzucker pro Blüte, Aminosäuren pro Blüte, anorganische Ionen pro Blüte und das Saccharose-zu-Hexose Verhältnis in Bezug auf den Bestäuber verwendet. Durch die Zusammenfassung der PGLS erhält man für jede Komponente in Bezug auf den Bestäuber einen Lambda-Wert (λ). Lambda λ kann einen Wert von 0 bis 1 erreichen. Bei Lambda $\lambda = 0$ sind die Merkmale unabhängig von der Phylogenie, was zu einer Stern-Phylogenie führt. Werte zwischen 0 und 1 zeigen unterschiedliche Pegel des phylogenetischen Signals an. Erreicht das Lambda λ den Wert 1, kann davon ausgegangen werden, dass die Phylogenie die Verteilung des Merkmals vorhersagt und eine Brownsche Bewegung vorliegt. Eine genaue Abgrenzung zwischen 0 und 1 ist dabei nicht definiert, deshalb sollten die Ergebnisse schon eindeutig entweder Richtung 0 oder 1 zeigen.

4.13 Bioinformatik

Für die computergestützten Arbeiten kamen verschiedene Programme und Softwarepakete zum Einsatz, die in Tabelle 4.16 aufgeführt sind.

Tabelle 4.16: Verwendete Software

Name	Version	Funktion	Quelle
Programme			
BayesTraits	3.0.1	Phylogenie	http://www.evolution.rdg.ac.uk
Chromeleon	7.2	Chromatographie Daten Software	Dionex
Mesquite	3.51	Stammbaum	www.mesquiteproject.org
Peaknet	5.1	Chromatographie Daten Software	Dionex
R	3.52	Statistik	www.r-project.org
R-Pakete			
caper		PGLS	Orme et al. 2013
vegan		PERMANOVA	Oksanen et al. 2007

5. Ergebnisse

Im Rahmen der Arbeit wurden unterschiedliche Einflussfaktoren untersucht, die die Nektarzusammensetzung bei der neotropischen Familie Bromeliaceae beeinflussen und regulieren. Bei Nektar handelt es sich um eine wässrige und stark zuckerhaltige Lösung, die von Mikroorganismen als Nährboden genutzt werden kann (Nicolson et al. 2007). Aufgrund dessen wurden die gesammelten Nektarproben stichprobenartig auf mikrobiellen Befall überprüft (5.1).

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Nektarzusammensetzung der Pflanze und ihren jeweiligen Bestäuber gibt (Krömer et al. 2008; Schmid et al. 2011). Auch bei den Bromeliengewächsen wurde dies schon für einige Arten untersucht, jedoch lag dabei das Hauptaugenmerk nur auf dem Zuckergehalt und nicht auf weiteren Komponenten des Nektars. Dementsprechend erfolgte eine umfangreiche Analyse des Nektars von verschiedenen Bromelienarten. Mittels HPLC wurde die Zusammensetzung der Zucker, der Aminosäuren, der anorganischen Ionen (Anionen und Kationen), sowie der organischen Säuren untersucht (5.2). Darüber hinaus wurden die Proteine im Nektar analysiert (5.3).

Um zu verstehen, was die unterschiedlichen Zuckerzusammensetzungen im Nektar verursacht, wurde im nächsten Schritt das Nektariengewebe (5.4) und gleichzeitig auch die Aktivität der unlöslichen und löslichen Invertasen untersucht (5.5).

Neben Bestäubern können auch Umwelteinflüsse, wie beispielsweise Trockenheit, erhöhte Temperatur oder auch verschiedene Lichtbedingungen, die Zusammensetzung des Nektars beeinflussen. Die Auswirkungen dieser äußeren Einflüsse wurden sowohl für die Bestandteile des Nektars, sowie für die Nektarien analysiert (5.6.1, 5.6.2, 5.6.3).

Anhand der untersuchten Zusammensetzung des Nektars und der Nektarien, sowie deren Einflussfaktoren, sollen Rückschlüsse auf die Regulation der Zusammensetzung des Nektars bei dieser Pflanzenfamilie getroffen werden.

5.1 Mikrobieller Befall im Nektar

In der Natur können Bestäuber eine Vielzahl von Mikroorganismen in den Nektar übertragen. Diese können Einfluss auf die Zusammensetzung des Nektars, im Speziellen auf den Zucker, haben (Fridman et al. 2012; Aizenberg-Gershtein et al. 2017). Um den mikrobiellen Befall von Nektar zu verifizieren, wurden stichprobenartig Nektarproben auf LB-, Malzextrakt- und Chinablau-Laktose-Agarplatten gescreent (4.6). Bei der Überprüfung der Nektarproben kam es in zwei Fällen zur Ausbildung von Schimmelpilzen (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Identifizierung fand nicht statt, da es sich hierbei um eine einmalige Kontamination handelt.

Trotz der geringen Kontaminationen wurde der Nektar über mehrere Tage bei Raumtemperatur inkubiert und analysiert (Abbildung 5.1). Geprüft wurde, ob die Zuckerzusammensetzung durch mikrobiellen Befall verändert wird.

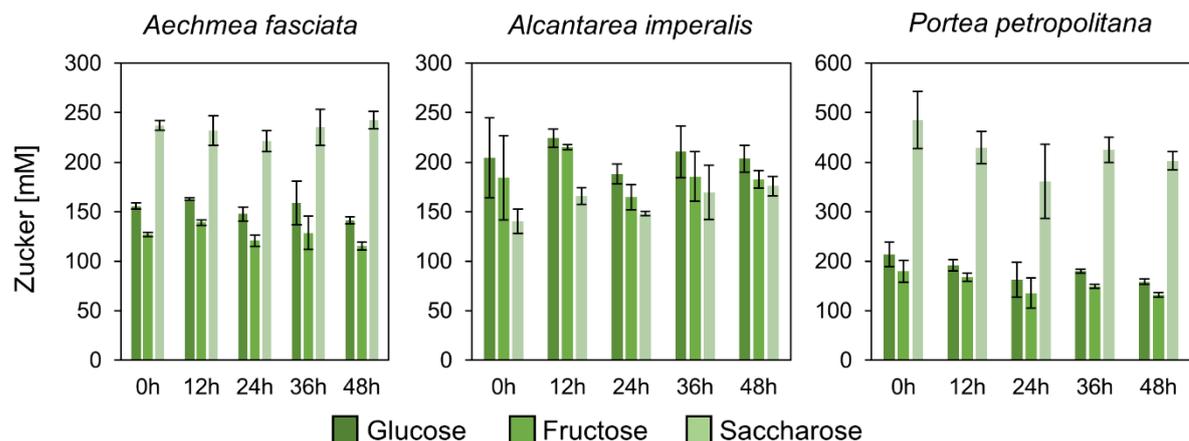


Abbildung 5.1: Inkubation von Nektar bei Raumtemperatur für 48 h.

Die drei unterschiedlichen Bromelienarten (*Aechmea fasciata*, *Alcantarea imperialis*, *Portea petropolitana*) wurden für 48 h bei Raumtemperatur inkubiert und dabei wurden alle 12 h Proben vom Nektar entnommen und mittels HPLC der Zuckergehalt des Nektars bestimmt. n = 3.

Für die Untersuchungen wurden drei unterschiedliche Bromelienarten (*Aechmea fasciata*, *Alcantarea imperialis*, *Portea petropolitana*) ausgewählt. Zwei der Arten produzieren einen saccharosereichen Nektar (*Aechmea fasciata*, *Portea petropolitana*) und eine Art produziert einen hexosereichen Nektar (*Alcantarea imperialis*). Bei der Inkubation über 48 h bei Raumtemperatur zeigte sich bis auf ein paar wenige Schwankungen keine Veränderungen in den Konzentrationen der Zucker im Nektar.

5.2 Nektarzusammensetzung bei Bromeliaceen: Ist die Nektarzusammensetzung mit dem Bestäubungssyndrom korreliert?

Um zu untersuchen, ob die Nektarzusammensetzung bei der Familie Bromeliaceae mit dem Bestäubertyp zusammenhängt und das Bestäubungssyndrom bei dieser Familie zutrifft, wurden die Nektarinhaltsstoffe in Bezug auf ihren jeweiligen Bestäuber analysiert und statistisch verifiziert. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Fledermaus als nächtlicher Bestäubertyp gelegt. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden in dem Artikel „What do nectarivorous bats like? Nectar composition in Bromeliaceae with special emphasis on bat-pollinated species” (Frontiers in Plant Science, 2019, 10:205; doi: 10.3389/fpls.2019.00205) veröffentlicht.

In der Veröffentlichung wurden hinsichtlich Ihrer Nektarzusammensetzung insgesamt 147 Bromelienarten aus 18 Gattungen mit insgesamt 22 Fledermaus-bestäubten Arten untersucht. Die Voraussetzung für die gesammelten Proben waren, dass wenigstens drei Proben von verschiedenen Blüten von mindestens zwei verschiedenen Pflanzen am ersten Tag der Blüte gesammelt wurden. Die Gesamtheit der untersuchten Proben zeigte für alle Nektarmessungen einen hohen Zuckergehalt mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der drei gefundenen Zucker: Glucose, Fructose und Saccharose. Dabei unterschieden sich grundlegend das Saccharose-zu-Hexosen Verhältnis im Nektar, produziert von chiropterophilen Bromelienarten, im Vergleich zu den anderen Tagbestäubern (Kolibri, Kolibri/Insekten, Schmetterlinge) und ebenso zu dem anderen Nachtbestäuber (Nachtfalter). Im Gegensatz dazu waren die Konzentrationen der anderen Bestandteile (Aminosäuren, anorganische Anionen und Kationen, organische Säuren) um einiges geringer. Bei den Analysen konnte festgestellt werden, dass im Nektar, produziert von Fledermaus-bestäubten Bromelienarten, eine signifikant andere Zuckerzusammensetzung, eine signifikant höhere Konzentration von anorganischen Ionen (Anionen und Kationen) und Malat im Vergleich zu dem Nektar von Arten mit anderem Bestäubertyp vorliegt. Darüber hinaus produzieren Fledermaus-bestäubte Bromelienarten ein vielfach größeres Nektarvolumen (200 µl und mehr), wodurch, bezogen auf die jeweilige Blüte, ein signifikant höherer Gehalt bei allen Bestandteilen des Nektars festgestellt werden kann. Somit investiert die Pflanze große Mengen an Kohlenhydraten, Stickstoffverbindungen und anorganischen Ionen in diesem speziellen Bestäubungstyp. Durch die Verwendung statistischer Analysen, wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA) und permutativer multivariater Varianzanalyse

(PERMANOVA), wurde verifiziert, dass die Varianzen in den Daten stark vom Bestäuber und nicht von taxonomischen Gruppen abhängt. Ebenso implizieren phylogenetische Analysen (BayesTraits und PGLS), dass die Varianzen nicht von der Phylogenie abhängig sind. Jedoch kann ein beachtlicher Teil der Varianz auf keinem der genannten Faktoren zurückgeführt werden, weshalb weitere Faktoren für die unterschiedlichen Zusammensetzungen des Nektars verantwortlich sein müssen. Allgemein ist noch nicht geklärt, wie es zu diesen Unterschieden in der Zusammensetzung des Nektars kommt. Des Weiteren ist auch noch nicht geklärt, welche Aminosäuren oder Ionen von Fledermäusen im Nektar generell bevorzugt werden. Auch die Evolution der Fledermaus-bestäubung benötigt weitere molekulare phylogenetische Untersuchungen, um ein besseres Verständnis dieser Entwicklung zu gewährleisten.



What do nectarivorous bats like? Nectar composition in Bromeliaceae with special emphasis on bat-pollinated species

Author: Thomas Göttlinger¹, Michael Schwerdtfeger², Kira Tiedge¹, Gertrud Lohaus^{1*}

¹Molecular Plant Science and Plant Biochemistry, University of Wuppertal, Wuppertal, Germany

²Albrecht-von-Haller-Institute, Plant Science, Georg-August-University Göttingen, Göttingen, Germany

***Correspondence:**

Gertrud Lohaus

lohaus@uni-wuppertal.de

Keywords: Bromeliaceae, floral nectar, flower ecology, nectar composition, bat-pollination, pollination syndrome

Abstract

Floral nectar is the most important reward for pollinators and an integral component of the pollination syndrome. Nectar research has mainly focused on sugars or amino acids, whereas more comprehensive studies on the nectar composition of closely related plant species with different pollination types are rather limited.

Nectar composition as well as concentrations of sugars, amino acids, inorganic ions, and organic acids were analyzed for 147 species of Bromeliaceae. This plant family shows a high diversity in terms of floral morphology, flowering time, and predominant pollination types (trochilophilous, trochilophilous/entomophilous, psychophilous, sphingophilous, chiropterophilous). Based on the analyses, we examined the relationship between nectar traits and pollination type in this family. Nectar of all analyzed species contained high amounts of sugars with different proportions of glucose, fructose, and sucrose. The total concentrations of amino acids, inorganic cations and anions, or organic acids were much lower.

The analyses revealed that the sugar composition, the concentrations of inorganic cations and anions as well as the concentration of malate in nectar of bat-pollinated species differed significantly from nectar of species with other pollination types. Flowers of bat-pollinated species contained a higher volume of nectar, which results in a total of about 25-fold higher amounts of sugar in bat-pollinated species than in insect-pollinated species. This difference was even higher for amino acids, inorganic anions and cations, and organic acids (between 50 and 100-fold). In general, bat-pollinated plant species invest large amounts of organic and inorganic compounds for their pollinators. Furthermore, statistical analyses reveal that the characteristics of nectar in Bromeliaceae are more strongly determined by the pollinator type rather than by taxonomic groups or phylogenetic relations. However, a considerable part of the variance cannot be explained by either of the variables, which means that additional factors must be responsible for the differences in the nectar composition.

Introduction

The family of the Bromeliaceae is one of the species-richest non-woody plant families in the Neotropics. Additionally, it has experienced a remarkable adaptive radiation in the flora and, therefore, a wide variety of flower morphology has emerged (Benzing 2000). The family is divided into eight subfamilies (Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Bromelioideae, Puyoideae, Pitcairnioideae) which subsume approximately 58 genera and more than 3000 species (Givnish et al. 2011). The current taxonomy of Bromeliaceae is in strong flux due to newer morphological and genetic studies, so that new subfamilies or genera are created and species are frequently being assigned to other taxa (Zizka et al. 2013; Barfuss et al. 2016; Gomes-da-Silva und Souza-Chies 2018). Bromeliads are adapted to various climates or other environmental conditions. Therefore, the plant family is also diverse in morphological, ecological or physiological aspects; for example, about 60 % of Bromeliaceae are epiphytic (Zotz 2013) and several species use CAM photosynthesis to produce sugars (Crayn et al. 2015).

In bromeliads, as well as in other plant groups, floral nectar is the main reward for pollinators (Proctor et al. 1996), it is produced by septal nectaries (Sajo et al. 2004). Floral nectar is an aqueous solution rich in sugars as the major energy source for visitors. The main sugars in the nectar are the hexoses glucose and fructose and the disaccharide sucrose (Percival 1961; Baker und Baker 1983a). The proportions of the three sugars can differ among the plant species so that there can be differentiated between hexose-rich and sucrose-rich nectars (Percival 1961; Baker und Baker 1983a; Freeman et al. 1991; Perret 2001; Nicolson und Fleming 2003; W. Nicolson und Thornburg 2007). Smaller amounts of other sugars, such as raffinose, are also present in some species (Witt et al. 2013; Lohaus und Schwerdtfeger 2014).

Nectar also contains a wide range of amino acids, but, in general, their concentration is much lower than the sugar concentration (Baker und Baker 1973). The biological significance of the amino acids is still being discussed. Amino acids in nectar are a potential nitrogen source for the floral visitors, therefore their concentration can affect the attractiveness of nectar (Baker und Baker 1973). Phenylalanine, for example, has been shown to have a phagostimulatory effect on bees (Inouye und Waller 1984). Furthermore, even low amino acid concentrations improve reproductive success of butterflies at suboptimal larval conditions (Mevi-Schutz und Erhardt 2005). For avid

insect-catchers, like most hummingbirds, however, amino acids in nectar are not essential, because they do not need an alternative nitrogen source (Baker 1977).

Inorganic ions were also found in the nectar, with K^+ being the most abundant cation and Cl^- the dominant anion (Hiebert und Calder 1983; Nicolson und Worswick 1990). A possible function of ions in nectar is to influence the electrolytic balance of the visitors (Hiebert und Calder 1983). Organic acids as a component of floral nectars have only been, aside from initial studies showing their presence (Baker 1977), considered in a few research studies (Noutsos et al. 2015; Tiedge und Lohaus 2017).

In addition, other components like lipids, proteins, phenolic and other secondary compounds were identified in the nectar of some species (Baker 1977; Seo et al. 2013; Zhang et al. 2016; Stevenson et al. 2017). The function of such compounds is to defend the nectar against robbers or microorganisms, as well as to attract pollinators (Adler 2000; Sasu et al. 2010; Heil 2011; Gosselin et al. 2013). Moreover, secondary metabolites such as nicotine and benzyl acetone lead to a reduction of withdrawn nectar, but also to an increase of pollinators visits (Kessler und Baldwin 2007).

The pollination syndrome is the adaptation of the floral morphology, color, scent, and even nectar composition to the preference of a specific group of pollinators (Fenster et al. 2004; Ashworth et al. 2015). In some cases, such as rare or absent visits of the primary pollinators, secondary pollinator groups may play an important role in plant reproduction (Rosas-Guerrero et al. 2014). Recently, the pollination syndrome concept has been criticized, as it is a fact that several flowers attract a broader spectrum of visitors (Ollerton et al. 2009; Schmid et al. 2011). However, flower visitation does not necessarily mean pollination (Waser et al. 1996; Souza et al. 2016). Different floral traits, like flower morphology, floral scent, duration of anthesis, time of pollen release, breeding system, and nectar compounds in relation to morphology and behavior of the floral visitors are considered to characterize the reproductive biology and the pollination type of plant species (Fumero-Cabán und Meléndez-Ackerman 2007; Amorim et al. 2013). To determine the effectiveness of pollination, the frequency of visits and the quantity of the transferred pollen are analyzed, along with the quantity of fruits and seeds produced by the plant (Aguilar-Rodríguez et al. 2014). Such analyses were performed for some bat-pollinated bromeliad species, for example *Billbergia horrida*. Results show that although bats and hummingbirds visited the species, bats as nocturnal pollinators were much more related to the reproductive success of the

bromeliad (Marques et al. 2015). Another species, *Tillandsia macropetala*, only produces nectar at night and bat-pollination resulted in the development of fruits (Aguilar-Rodríguez et al. 2014). Thus, the role of bats as effective pollinators has been elevated for different plant species.

At present, there are several research studies which indicate that bat- or sunbird-pollinated species produce nectar with high proportions of hexoses, whereas species which are pollinated by hummingbirds, butterflies, hawk moths, or long-tongued bees tend to produce sucrose-rich nectars (Baker und Baker 1983a; Baker et al. 1998; Galetto und Bernardello 2003; Chalcoff et al. 2006; Schmidt-Lebuhn et al. 2007; Krömer et al. 2008; Aguilar-Rodríguez et al. 2016; Abrahamczyk et al. 2017). A number of studies also deal with the variability of amino acids in nectar relative to the pollination types (Baker und Baker 1973; Petanidou et al. 2006; Bertazzini und Forlani 2016), whereas studies which include different organic as well as inorganic nectar compounds are rather scarce (Tiedge und Lohaus 2017).

More species within the Bromeliaceae are pollinated by vertebrates than insects, and most of them are pollinated by hummingbirds (Kessler und Krömer 2000). Beside the trochilophilous (hummingbird-pollinated) species, bromeliads include chiropterophilous (bat-pollinated), entomophilous (insect-pollinated), and autogamous (self-pollinated) species (Kessler und Krömer 2000; Krömer et al. 2006). Some studies indicate the existence of combined or generalist pollination systems (Aguilar-Rodríguez et al. 2016). Chiropterophilous species have been reported for different bromeliad genera, e.g. *Alcantarea*, *Billbergia*, *Encholorium*, *Guzmania*, *Pseudalcantarea*, *Pitcairnia*, *Puya*, *Tillandsia*, *Vriesea* and *Werauhia* (Sazima et al. 1985; Cascante-Marín et al. 2005; Fleming et al. 2009; Aguilar-Rodríguez et al. 2014; Marques et al. 2015; Santos et al. 2017). Only 7 % of 188 species in the Bolivian Andes and the adjacent lowland are bat-pollinated bromeliad species (Kessler und Krömer 2000). The New World nectarivorous bats are members of the Glossophaginae (Fleming et al. 2009); they are relatively small (7.5-30 g body weight) with relatively long tongues compared to their overall size. All glossophagine bats can echolocate and, typically, hover when visiting flowers (Fleming et al. 2009). The greatest species richness of nectarivorous bats occurs in the wet tropical lowland forest.

To ensure nectar accessibility for the bats, nocturnal anthesis and an adapted morphology of the flowers are necessary. In order to attract these animals, the flower

needs a contrasting color against the dark background at night (Tschapka und Dressler 2002). In general, the color of the flowers is a brownish or greenish white (von Helversen und Winter 2003). As known so far, bat-pollinated bromeliad species produce hexose-rich nectar (Krömer et al. 2008), and the nectar volume is in the upper range compared to species with other pollinators (Tschapka und Dressler 2002). Amino acids in the floral nectar could also have an influence on the nectarivorous bats' food selection (Rodríguez-Peña et al. 2013). However, bats generally supply their protein requirements with pollen and other plant parts and/or insects (Law 1992; Herrera M. et al. 2001).

Nectar sugar compositions have often been related to the pollination syndrome of the plant species, including species of Bromeliaceae (Krömer et al. 2008; Schmid et al. 2011), whereas amino acids or other nectar compounds have not yet been investigated thoroughly. In the present study, nectars of 147 species from 18 genera of the Bromeliaceae were analyzed with regard to sugars, amino acids, inorganic ions (anions and cations), and organic acids. The analyzed species vary widely in the time of anthesis (day versus night), floral morphology, and pollination type. The investigation included 22 bat-pollinated species, which makes up 15 % of the analyzed bromeliads. The main question of the study is whether the nectar composition is influenced by specific pollinator types, taxonomic groups, and/or phylogenetic relations. Furthermore, particular attention is paid to bat-pollinated species in pursuit of the question whether the nectar composition of bat-pollinated species differs fundamentally from the nectar of plants with other pollinators.

Materials and Methods

Plant material and collection of nectar

The nectar samples were obtained from bromeliad plants grown in tropical glasshouses in the Botanical Garden and Botanical Museum Berlin (Germany), the Botanical Garden of the University of Bochum (Germany), the Botanical Garden of the University of Göttingen (Germany), the Botanical Garden of the University of Heidelberg (Germany), and the Botanical Garden of the University of Wien (Austria) between 2016 to 2018. All nectar samples were collected with the help of a micropipette on the first day of anthesis to minimize the effects of flower aging. A minimum of three nectar samples of different flowers from at least two different plants

were collected from each of the 147 bromeliad species (Supplementary Table S1). The samples were stored at -80°C until analysis.

Bromeliad species, flower morphology and pollinator type

The 147 bromeliad species are members of 4 subfamilies and 18 genera: Bromelioideae (*Aechmea*, *Billbergia*, *Hohenbergia*, *Neoregelia*, *Nidularium*, *Quesnelia*), Puyoideae (*Puya*), Pitcairnioideae (*Deuterocochonia*, *Dyckia*, *Pitcairnia*), and Tillandsioideae (*Alcantarea*, *Guzmania*, *Lemeltonia*, *Pseudalcantarea*, *Tillandsia*, *Vriesea*, *Wallisia*, and *Werauhia*). As it was possible to ascertain the pollination mode for only about half of the analyzed species from the literature, the other half of the analyzed species had to be classified via flower morphology and pollination syndrome (Supplementary Table S1). The analyzed bromeliads contain 107 trochilophilous, 8 trochilophilous/entomophilous, 8 psychophilous (butterfly-pollinated during the day), 2 sphingophilous (hawk moth-pollinated), and 22 chiropterophilous species.

The 22 chiropterophilous species are members of 8 genera (*Alcantarea*, *Guzmania*, *Pitcairnia*, *Pseudalcantarea*, *Puya*, *Tillandsia*, *Vriesea*, and *Werauhia*). As bat pollination was published for 15 of the 22 species, the other 7 species had to be classified via flower morphology and pollination syndrome (Supplementary Table S1). The flowers visited by bats generally have a matt-white color, which can have a slight discoloration into green, brown, or yellow. The exception to this is the purple flower of *Tillandsia rauhii*, which may function more as a camouflage for other floral visitors and less as a visual attraction for bats (Fleming et al., 2009). The floral morphology can vary from large, wide open and cup-shaped to elliptical, small and tubular flowers. The corolla tube length differs between 15 and 80 mm, with the small flowers appearing in the genera *Guzmania* only, for example in *G. calothyrsus*, *G. farciminiformis* and *G. killipiana*. Bromeliads with large cup-shaped or elliptical flowers open only one or two flowers at a time, whereas other species may open 3 or 4 in the same period.

Influence of the growth site on the nectar composition

In order to test for a possible influence of the growth site on the nectar composition, the sugar concentrations in the nectar of *Pseudalcantarea grandis* from the botanical gardens Berlin and Heidelberg and that of *Aechmea racinae*, collected in the botanical gardens Berlin and Göttingen, were analyzed.

Assay for microbial contamination

Microbial contamination was assayed according to the method of Tiedge und Lohaus (2017). Nectar samples were plated on malt extract as well as on lysogeny broth medium and they were incubated for one week at 28°C or 37°C.

Analyses of sugars in nectar

The nectar sugars were analyzed via HPLC (Thermo Scientific Dionex ICS-5000+ HPIC System) according to Lohaus und Schwerdtfeger (2014). An anion exchange column (Dionex™ CarboPac™ PA10 4x250 mm; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA) was eluted isocratically with 80 mM NaOH (Honeywell, USA). The sugars were detected by a pulse amperometric detector with gold electrode (ED cell, Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA). Sugar standards (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) were measured in parallel for external calibration. The measured chromatograms were evaluated with an integration program (Chromeleon 7.2, Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA). The sugar concentrations in the nectars were determined with the help of calibration curves for the different sugars. All sugar concentrations in the nectars are given in millimolar concentrations (mM). The millimolar sugar concentration can be multiplied by the molar mass of a given sugar to obtain mass concentrations (g L^{-1}).

Nectar of the bromeliad species contained glucose, fructose, and sucrose. Based on the measurement results, the nectar samples of the species were defined and referred to as sucrose-rich or hexose-rich, with sucrose-rich meaning a proportion of sucrose higher than 50% and hexose-rich a proportion of glucose and fructose higher than 50%.

Analyses of free amino acids

The analysis of free amino acids was performed via HPLC according to Lohaus und Schwerdtfeger (2014). Amino acids with a primary amino group were processed by precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde, amino acids with a secondary amino group (e.g. proline) were processed by precolumn derivatization with fluorenylmethyloxycarbonyl. Thereafter, the derivates were separated on the reversed-phase column (Merck, Darmstadt, Germany) with an acetonitrile gradient. The derivates were detected by fluorescence (derivatization with o-phthaldialdehyde: excitation 330 nm and emission 405 nm; derivatization with

fluorenylmethyloxycarbonyl chloride: excitation 265 nm and emission 305 nm). Amino acid standards (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) were measured in parallel for external calibration. The evaluation of the chromatograms was performed with an integration program (Chromeleon 7.2, Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA). The concentration of the amino acids in the nectar was determined with the help of calibration curves for the different amino acids. All amino acid concentrations in nectars are given in millimolar concentrations (mM).

Analyses of inorganic ions and organic acids

Anions and cations were analyzed separately via HPLC according to Lohaus et al. (2001). For the analysis of anions (inorganic anions and organic acids), an anion exchange column (IonPac™ AS11 4x250mm; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA) and a sodium hydroxide gradient (4 to 77 mM in 30 min) was used. For the analysis of cations, a cation exchange column (CS 12A, 4x250mm; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA) with isocratic elution (20 mM H₂SO₄) was used. The ions were detected by their electronic conductivity (CP20 Conductivity Detector; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA). Sugar standards were measured in parallel for external calibration. The measured chromatograms were evaluated with an integration program (Peaknet 5.1, Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA). The concentration of the inorganic ions in the nectar was determined with the help of calibration curves for the different inorganic ions. All concentrations of inorganic ions in nectars are given in millimolar concentrations (mM).

Statistical analysis of the nectar composition of all analyzed bromeliad species

To analyze and compare the nectar compositions in different pollinator groups, an ANOVA followed by a post-hoc test (Tukey) was carried out for all 147 bromeliad species (18 genera) (p value < 0.05).

Statistical analysis of the nectar composition of 7 genera with bat-pollinated species

To analyze and compare the nectar compositions in bat-pollinated species and species with other pollination types the 7 genera (*Alcantarea*, *Guzmania*, *Pitcairnia*, *Puya*, *Tillandsia*, *Vriesea*, *Werauhia*), which contain bat-pollinated species as well as species with other pollinators, were selected. To analyze and compare the nectar compositions

and the different components in different pollinator groups (bat-pollinator, residual-pollinator: hummingbirds, insects or butterflies), an ANOVA followed by a post-hoc test (Tukey) was carried out (p value < 0.05).

Statistical analysis of the influence of pollinator type, taxonomic group, and growth site

A Principal Component Analysis (PCA) was conducted to examine the influence of the pollinator type and the taxonomic group (genera) on the nectar composition. 38 bromeliad species were included in this analysis: 19 bat pollinated species from 7 genera and the same number of hummingbird-pollinated species from the same 7 genera. The bat- and hummingbird-pollinated species per genus were from the same botanical garden. Prior to analysis, all data were normalized by z transformation to set their means to zero and the variance to one. Five amino acids, which were not detectable in all the species, were removed from the data set. In the following PCA, two principal components were extracted from 25 initial variables. These variables were determined beforehand through measurements of sugars, amino acids, inorganic anions, inorganic cations, and organic acids. Varimax with Kaiser normalization was chosen as the rotation method in this procedure.

Furthermore, a Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) was performed to identify the relative importance of the variables pollinator type ('Pollinator') and taxonomic groups ('Genus') on the nectar composition. In addition, the possible influence of the growth site on nectar composition ('Bot. garden') has also been taken into account during the statistical analysis of the nectar composition. The analysis was performed using the 'vegan' package with the adonis routine of the program "R", so that distance matrices based on permutation tests could be used (Anderson 2001; Oksanen et al. 2007). For the PERMANOVA, euclidean distance measure and 999 permutations were applied. All statistical analyses were performed using R (version 3.5.1, www.r-project.org).

Phylogenetic analysis

A schematic and simplified phylogenetic tree of all analyzed Bromeliaceae species combining molecular and morphological findings was established. The schematic tree was created using Mesquite 3.51; it is based on 23 different phylogenetic investigations of different molecular findings (Faria et al. 2004; Barfuss et al. 2005; Givnish 2007;

Horres et al. 2007; Hornung-Leoni und Sosa 2008, 2008, 2008; Almeida et al. 2009; Rex et al. 2009; Schulte et al. 2009; Chew et al. 2010; Jabaily und Sytsma 2010; Sass und Specht 2010; Givnish et al. 2011; Gomes-da-Silva et al. 2012; Versieux et al. 2012; Escobedo-Sarti et al. 2013; Givnish et al. 2014; Costa et al. 2015; Evans et al. 2015; Barfuss et al. 2016; Pinzón et al. 2016; Schütz et al. 2016; Gomes-da-Silva und Souza-Chies 2018; Moura et al. 2018). The pollinator type and the nectar composition (sugar ratio, amino acid concentration, concentration of inorganic ions) were mapped on the species level in order to visualize the phylogenetic distribution of bat-pollination.

Statistical analysis of the influence of pollinator type and phylogenetic relation

In order to evaluate the non-independence of the data due to shared ancestry the phylogenetic relation was verified by comparative analyses. First, two discrete (binary) traits were analyzed to obtain an evolutionary correlation. This implies investigating whether the absence or presence of one characteristic correlates with the absence or presence of another characteristic (Pagel 1994). Therefore, to validate the correlation BayesTraits (version 3.0.1, www.evolution.rdg.ac.uk) was used since maximum likelihood and Bayesian methods are included. By this a discrete, dependent and independent model were performed to analyze the methods against each other to determine a likelihood ratio. For this the differences of the $-\log$ likelihood (Lh) of the two models was multiplied by 2 and this ratio was compared to a chi-square distribution. Further, a Phylogenetic Generalized Least Squares (PGLS) regression analysis was implemented to study, if phylogenetic relationship influences the similarity in species traits (phylogenetic signal). For the analyses, the branch lengths were generated by Grafen transformation (Grafen 1989), in order to fit the assumptions of independent contrasts. In order to estimate the phylogenetic correlation between two characters, the factor lambda λ was estimated at the same time (κ and $\delta = 1$). Lambda λ can reach a value from 0 to 1. At lambda λ zero traits are independent of phylogeny resulting in a star phylogeny. Values between 0 and 1 indicate different levels of the phylogenetic signal. If the lambda λ reaches value 1, it can be assumed that the phylogeny predicts the distribution of the trait and a Brownian movement is present. PGLS analysis was calculated using the 'caper' package (Orme et al. 2013) in R (Version 3.5.2, www.r-project.org).

Results

Nectar samples

A minimum volume of about 4-5 μL per nectar sample was required to analyze the different components, including sugars, amino acids, inorganic ions (anions and cations), and organic acids. Furthermore, a minimum of three independent samples per species was required for the analysis. Nectar samples of 147 species of a total number of 300 sampled species of Bromeliaceae fulfilled these criteria (Supplementary Table S1).

Influence of the growth site on the nectar composition

In the present study, nectar samples of plants from different botanical gardens were used and it is conceivable that the growth site has an influence on the nectar composition. Therefore, the sugar concentrations of the same bromeliad species from different botanical gardens were analyzed (Figure 1). The sugar concentrations in the nectar of *Pseudalcantarea grandis* from the botanical gardens Berlin and Heidelberg showed no significant difference ($p > 0.05$, $df = 5$, $n = 6$). The same applies to the sugar concentrations in nectar of *Aechmea racinae*, collected in the botanical gardens Berlin and Göttingen.

Microbial contamination

In order to test for the possibility of the differences in sugar composition being a result of microbial activity, the samples were tested for the presence of yeast or bacteria. The test revealed no microbial contaminations in the nectar samples from bromeliad species with different pollinators.

Sugar, amino acid, and ion concentrations in nectar of all species

The nectar of all 147 analyzed bromeliad species contained the three sugars glucose, fructose, and sucrose; no other sugars were detected in appreciable amounts (Figure 2 A, Supplementary Table S2). Glucose and fructose were present in equal amounts in the nectar of every given species. The total sugar concentration (sum of glucose, fructose and sucrose) was between 232 mM (*Tillandsia propagulifera*) and 2553 mM (*Nidularium scheremetiewii*).

The concentration of sugars differentiated by pollination type are shown in Figure 2 A. The concentrations of hexoses and sucrose in the nectar of bat-pollinated species differed significantly from those of species with other pollination types (Figure 2 A; $p < 0.001$, $df = 876$, $n = 441$). Nectar of bat-pollinated plant species contained more hexoses than sucrose, whereas the nectar of species with other pollination types was sucrose-rich throughout all samples, independent of the pollinator (hawk moths, hummingbirds, hummingbirds/insects, or butterflies). Therefore, the sucrose-to-hexoses ratio was significantly lower in bat-pollinated species than in the nectar of the other species ($p < 0.001$, $df = 436$, $n = 441$). In bat-pollinated species, the ratio was 0.5 ± 0.1 , whereas in the other groups it ranged from 2.0 ± 0.0 (hawk moths) to 3.2 ± 1.5 (hummingbirds/insects).

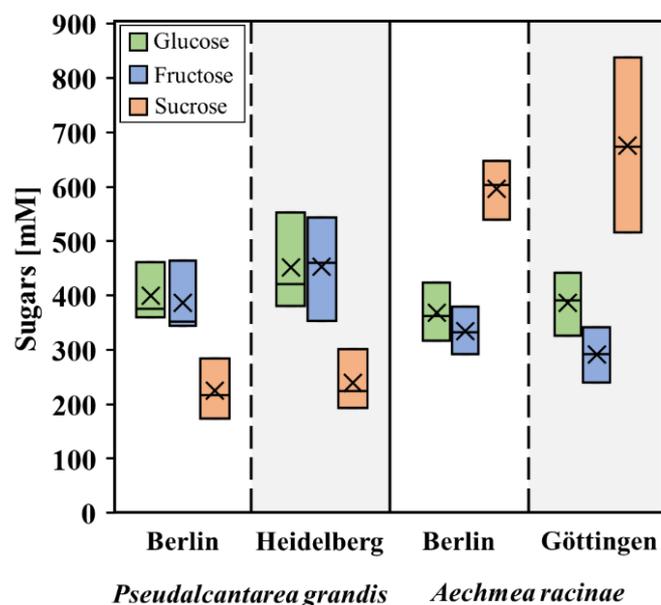


Figure 1 | Boxplots of sugar composition in nectar from different botanical gardens. Comparison of one bat-pollinated (*Pseudalcantarea grandis*) and one hummingbird-pollinated (*Aechmea racinae*) species from two different botanical gardens. The sample number for each species was $n = 3$. The box plots show medians (horizontal line in box) and means (x in box).

In contrast to the high concentrations of sugar in the nectars of all samples, the concentrations of the 20 detected amino acids were at a rather low level (sum of amino acids 0.1 to 16.2 mM; Supplementary Table S3). The amino acid concentrations showed a much wider variability than was found for the sugar concentrations. The most abundant amino acids were glutamine and asparagine, followed by serine, alanine, and proline. Nevertheless, the proportions of these amino acids varied greatly depending on the plant species.

No significant differences between the total amino acid concentrations in the nectars of species with different pollinators could be shown (Figure 2 B), whereas the concentration of amides (asparagine and glutamine) and proline differed between species with different pollination types.

The concentration of inorganic anions in nectar ranged from 0.1 to 16.9 mM, and chloride was the most abundant anion (Supplementary Table S4). The concentration of inorganic cations was in a similar range (0.1 to 22.5 mM) with potassium being the most abundant cation. Magnesium and calcium were detected in similar and low concentrations; therefore, the two cations were grouped together. The nectar of the bromeliad species also contained organic acids. In contrast to citrate, which was not detectable in most samples, malate could be detected more frequently and the concentration ranged from 0 up to 11 mM (Supplementary Table S4).

The inorganic cation and anion concentrations differentiated by pollination type are shown in Figure 2 C and D. The nectar of bat-pollinated species showed significantly higher chloride and phosphate concentrations than the nectar of the other pollinators. In addition, significantly higher amounts of potassium and sodium were detectable.

Nectar composition in species of genera with bat-pollination

The results of the nectar composition of all 147 species imply that the composition of bat pollinated species differs from all other pollination types. In a next step, only genera which include both chiropterophilous as well as other types of pollinators were considered. For this purpose, the seven genera *Alcantarea*, *Guzmania*, *Pitcairnia*, *Puya*, *Tillandsia*, *Vriesea*, and *Werauhia* were investigated more closely. The genus *Tillandsia* was recently divided in several genera (Barfuss et al. 2016). One of the resulting new genera, *Pseudalcantarea*, contains also bat-pollinated species; but in this case, no species with other types of pollinators are known.

than in species with other pollination types, whereas the sucrose concentration was significantly lower (Figure 3 A). In the case of the amino acids, a significantly higher concentration in the nectar of bat-pollinated species was found for proline only (Figure 3 B). The differences for the other amino acids were not on a significant level.

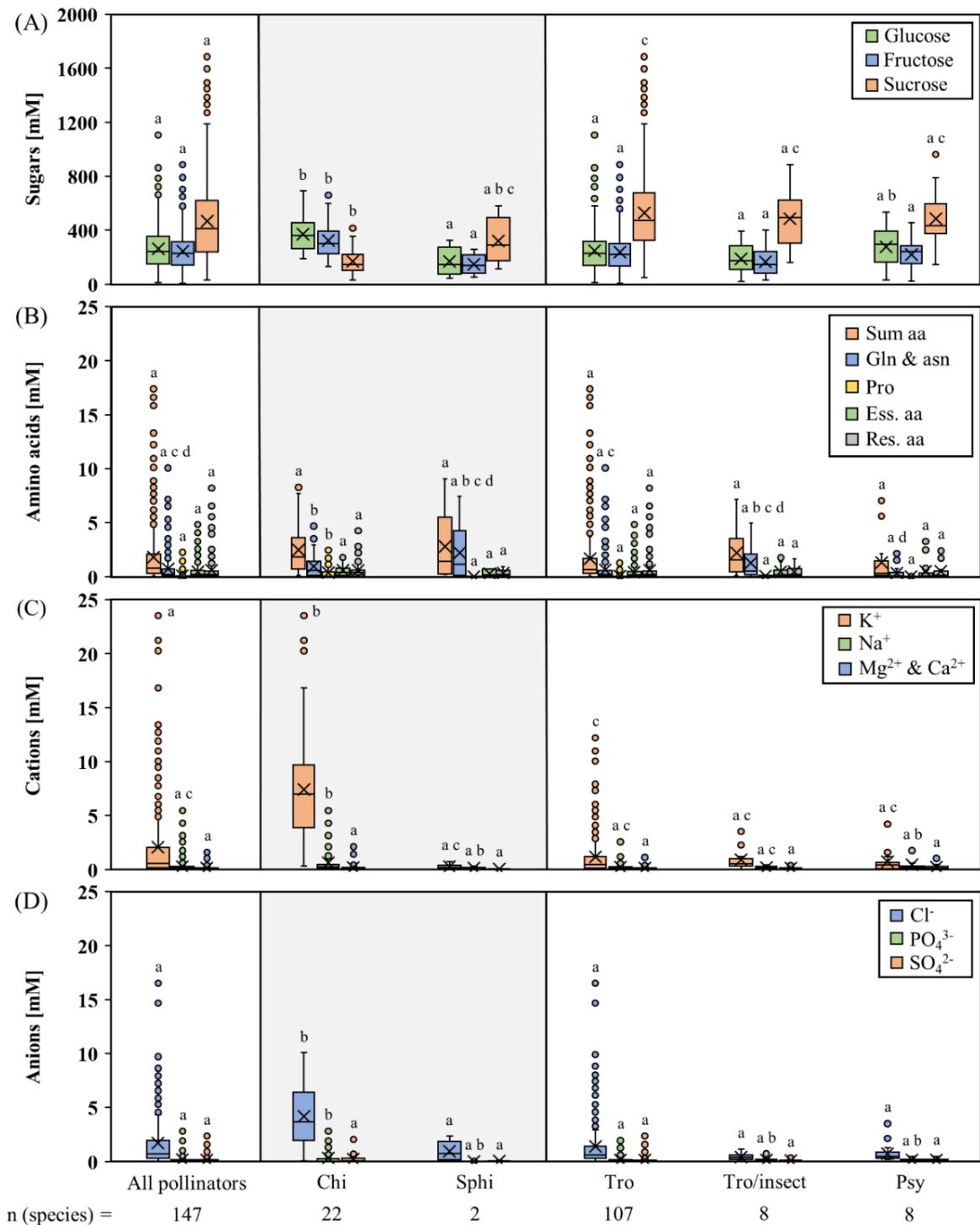


Figure 2 | Concentrations of different compounds in nectar of all analyzed bromeliad species. The data are arranged by the nocturnal and diurnal pollinators of the species. The nocturnal bromeliads include 22 chiropterophilous and 2 sphingophilous species. The diurnal bromeliads include 107 trochilophilous, 8 trochilophilous/ entomophilous, and 8 psychophilous species. Boxplot diagrams illustrating the following components: sugars (A), amino acids (B), inorganic cations (C), and inorganic anions (D). The boxplots show medians (horizontal line in box) and means (x in box). Different letters represent significant differences in each sugars (glucose, fructose, sucrose), amino acids (sum amino acids, glutamine and asparagine, proline, essential amino acids, residual amino acids), cations (potassium, sodium, magnesium, calcium), and anions (chloride, phosphate, sulfate) between the different pollination groups (Tukey's HSD; $p < 0.05$).

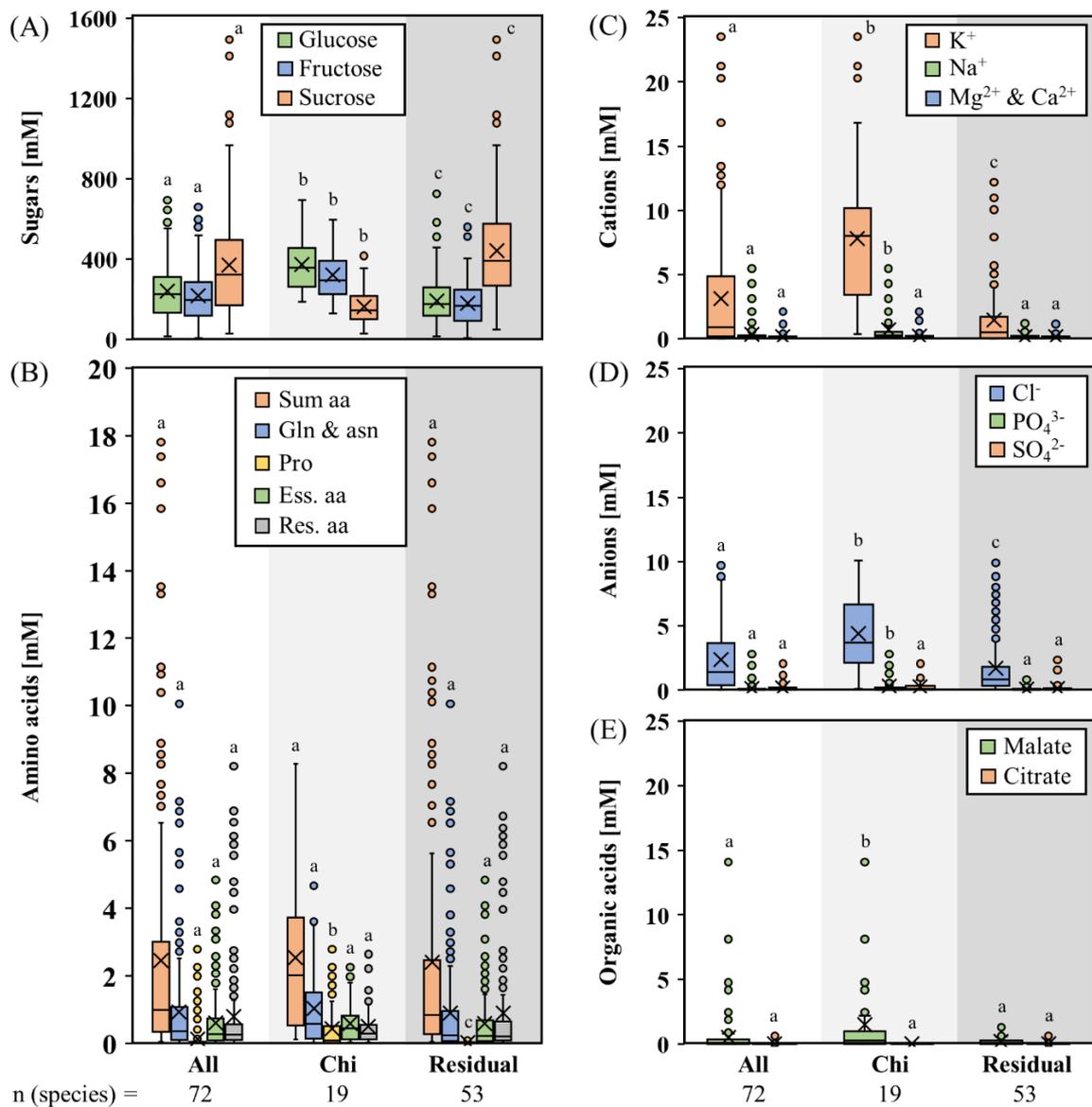


Figure 3 | Concentrations of different compounds in nectar of seven genera with bat-pollinated species. Comparison of the nectar constituents of seven bromeliad genera (*Alcantarea*, *Guzmania*, *Pitcairnia*, *Puya*, *Tillandsia*, *Vriesea*, and *Werauhia*), which include bat-pollinated species as well as species with other pollination types. Boxplot diagrams illustrate the following components: sugars (A), amino acids (B), cations (C), anions (D), and organic acids (E). All concentrations are given in mM. The boxplots show medians (horizontal line in box) and means (x in box). Different letters represent significant differences in each sugars (glucose, fructose, sucrose), amino acids (sum amino acids, glutamine and asparagine, proline, essential amino acids, residual amino acids), cations (potassium, sodium, magnesium, calcium), anions (chloride, phosphate, sulfate), and organic acids (malate, citrate) between the different pollination groups (Tukey's HSD; $p < 0.05$).

A comparison of bat-pollinated species and the other species also showed that the concentrations of potassium, sodium, chloride, phosphate, and malate were significantly higher in the nectar of bat-pollinated species than those of species with other pollination types (Figure 3 C E). Figure 3 A-E show the mean concentration of sugars, amino acids, inorganic cations and anions as well as organic acids in nectar

of bat-pollinated species and species with other pollination types from the seven genera mentioned above. The results for the single genera are shown in the Supplementary Figures S1-S5. The concentrations of glucose and fructose in nectar of bat-pollinated bromeliads were significantly higher

Amounts of sugars, amino acids, and ions in nectar per flower

The flowers of the different bromeliad species contained different volumes of nectar. Very small nectar volumes were found in hawk moth-pollinated species (1-3 μL), small volumes in hummingbird/insect- and butterfly-pollinated species (3-10 μL), high nectar volumes in species pollinated by hummingbirds only (10-50 μL), and large nectar volumes in species pollinated by bats (up to 200 μL and more). Therefore, the total amounts of sugars, amino acids, inorganic ions, and organic acids per flower were also diverse in different bromeliad species (Figure 4 A-E). The total amounts per flower were calculated using the nectar concentrations and the nectar volumes.

When considering the total amount of compounds per flower, the differences between bat-pollinated bromeliads and those with other pollinators are more pronounced, with bat-pollinated species providing about 47 μmol each glucose or fructose, 22 μmol sucrose, 0.3 μmol amino acids, 1.1 μmol inorganic cations, 0.6 μmol inorganic anions, and 0.2 μmol malate. These amounts all are significantly higher than the corresponding amounts in flowers of species with other pollination types (sugars 7-fold, amino acids 6-fold, cations 40-fold, anions 22-fold, malate 71-fold).

Nectar composition in relation to pollination type, taxonomy, and growth site

In order to reduce the amount and complexity of the data, a PCA was performed to capture the complete diversity at once. Again, the focus was on the seven aforementioned genera, with all species visited by bats being included in the analyses. The same number of hummingbird-pollinated bromeliads from these genera was selected as well, as this pollination type is the most common in bromeliads; they are also from the same growth site. Figure 5 A shows the loading plot of the analyzed nectar, the loading on the extracted principal components is illustrated. Most of the amino acids load negatively on the first component; hexoses, proline, and inorganic ions load negatively on the first and second component. Sucrose is the only constituent which loads positively on both main components. The two principal components explained 46.2 % of the total variance.

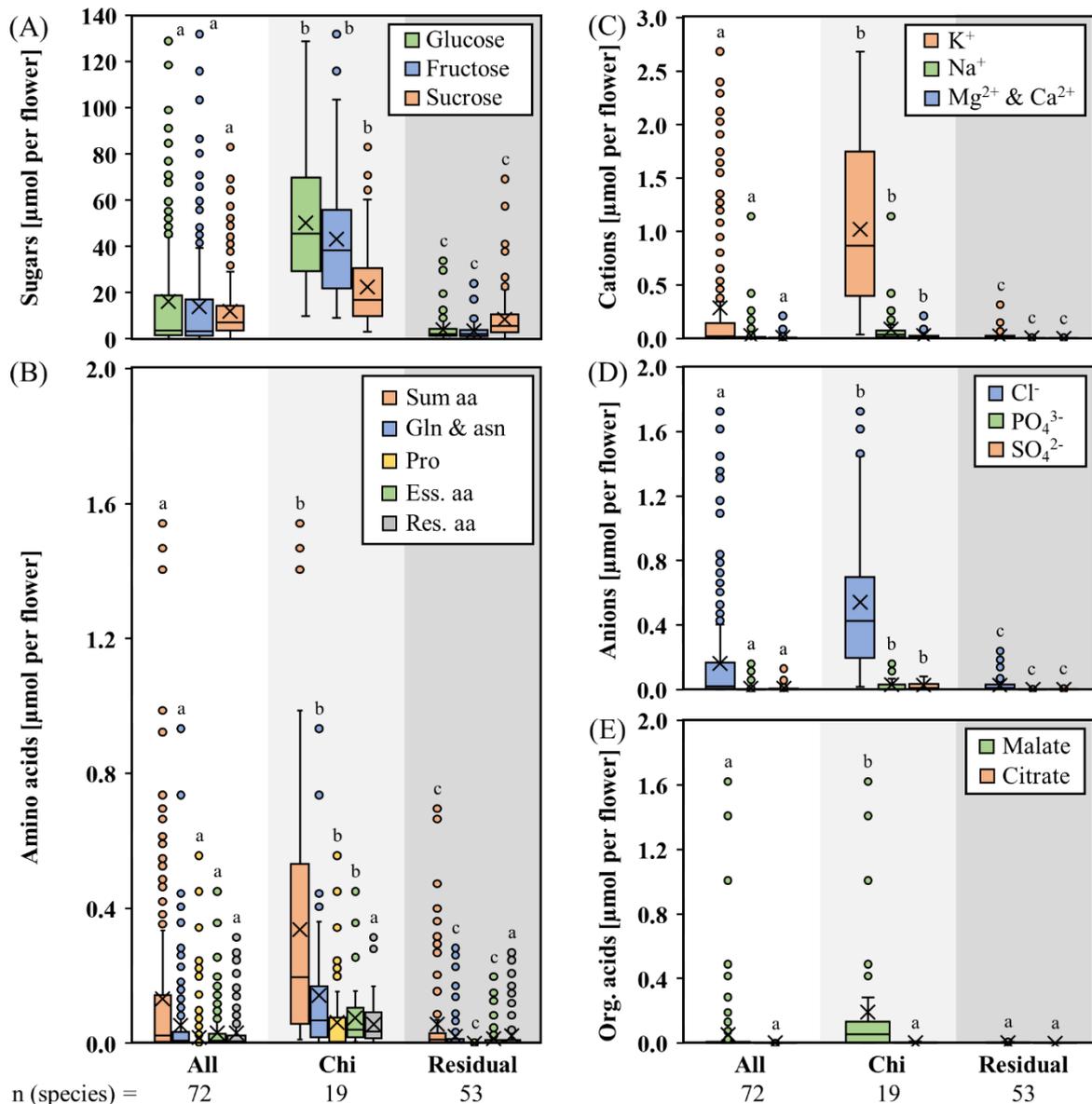


Figure 4 | Amount of different nectar compounds per flower in seven genera with bat-pollinated species. Comparison of the nectar constituents of seven bromeliad genera (*Alcantarea*, *Guzmania*, *Pitcairnia*, *Puya*, *Tillandsia*, *Vriesea*, and *Werauhia*), which include bat-pollinated species as well as species with other pollination types. Boxplot diagrams illustrate the following components: sugar (A), amino acids (B), cations (C), anions (D), and organic acids (E). All amounts are given in $\mu\text{mol per flower}$. The box plots show medians (horizontal line in box) and means (x in box). Different letters represent significant differences in each sugars (glucose, fructose, sucrose), amino acids (sum amino acids, glutamine and asparagine, proline, essential amino acids, residual amino acids), cations (potassium, sodium, magnesium, calcium), anions (chloride, phosphate, sulfate), and organic acids (malate, citrate) between the different pollination groups (Tukey's HSD; $p < 0.05$).

The scatterplot of this PCA is shown in Figure 5 B, the scores focus on the distribution by pollinator groups and genera at the same time. There is a visual separation of the different pollinator types: When a diagonal from top left to right separates the individual points of the pollinators, the bat-pollinated species (filled circles) are clustered below this line and the hummingbird-pollinated species (crosses) are nearly completely

located above. The only exceptions are some trochilophilous species of the genus *Guzmania*, which appeared in the lower quadrants due to increased concentrations of inorganic ions.

To support the graphical evaluation, a PERMANOVA was performed with the same nectar data using pollination type (bat, hummingbird), taxonomic group (genus), and growth site (botanical garden) as categorical variables (Table 1).

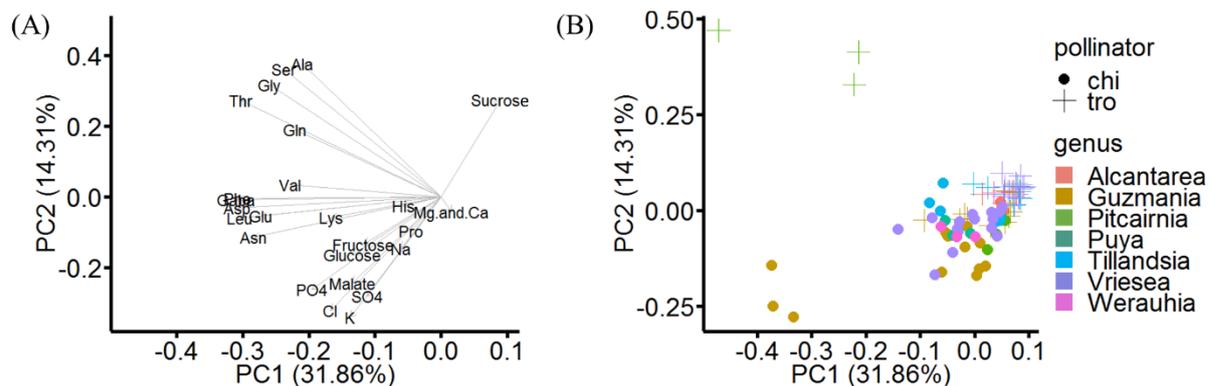


Figure 5 | Loadings and scatterplot of PCA in rotated space (pollinator and taxonomic groups). In the PCA, the statistically analyzed samples were selected according to their pollinator and their taxonomic groups (genera). (A) Loading plot, which illustrates the original variables loaded as vectors in PCA space. The first principal component (PC 1) describes 31.9 % and the second principal component (PC 2) describes 14.3 % of the dataset variation. (B) Scatterplot of PCA, in which the data are grouped by pollinator (markings) and genus (colors).

When considering all components (sugars, amino acids, inorganic cations and anions, organic acids), there is a high significance for the categories of pollinators ($p < 0.01$) with 41 % of the data variation being explained by the pollinator, only 6 % by the genus, and 2 % by the growth site (botanical garden). When considering the components individually (Supplementary Figure S6, Table S5), it turns out that the impact on the sugars (41 %, $p < 0.001$) is much higher by the pollinators than it is by the genus (6 %; $p < 0.05$). For amino acids, however, the opposite effect becomes apparent: 37 % is explained by the genus and only 3 % by the pollinator ($p < 0.001$). When only considering the inorganic ions and organic acids in the PERMANOVA, 34 % of the data variance is influenced by the pollinators and 18 % by the genus ($p < 0.001$).

Table 1: Results of the PERMANOVA: Degrees of freedom (df), pseudo-F (F), R², and p-values. PERMANOVA describes the percentage of the influence of the pollinator, the genus and the botanical garden on the nectar composition.

	Degrees of freedom (df)	Pseudo-F (F)	R ²	p-value
<i>All components [mM]</i>				
Pollinator	1	85.89	0.41	0.001 ***
Genus	6	2.13	0.06	0.024 *
Bot. garden	3	1.68	0.02	0.126
Pollinator x Genus	6	2.53	0.07	0.012 *
Pollinator x Bot. garden	3	1.92	0.03	0.077
Genus x Bot. garden	1	2.85	0.01	0.066
Pollinator x Genus x Bot. garden	1	14.37	0.07	0.001 ***
Residuals	68		0.32	
Total	89		1.00	

Phylogenetic distribution of bat-pollinated species

In order to visualize the phylogenetic relationships between the different taxa investigated in this study, a schematic and simplified tree was established (Supplementary Figure S7). About two thirds of the 147 bromeliad species could be phylogenetically classified on the basis of molecular findings. The analyzed bat-pollinated species were found in three subfamilies (*Puyoideae*, *Pitcairnioideae* and *Tillandsioideae*). Bat-pollinated species are assigned a separate clade, like *Pseudalcantarea*, or a clade together with species with other pollinators (e.g. *Puya ferruginea* and *Puya densiflora*).

Nectar composition in relation to pollination type and phylogeny

The phylogeny could strongly impact the composition of nectar; therefore, comparative analyses were used to affirm the non-independence of the data due to shared ancestry of the plants. To analyze correlated evolution of discrete characters BayesTraits was used. Therefore, the pollination type was compared with the sucrose to hexose ratio. The -log likelihood of the dependent model was -40.31 and of the independent model was -68.16. Based on these values a likelihood ratio of 55.7 ($p < 0.001$) can be calculated. This ratio rejects the hypothesis that both traits evolve independently in

favor that there is a strong correlation between the compared traits. Further evolutionary correlation studies by PGLS by determining the factor lambda λ were performed in order to verify the phylogenetic influence of the traits. For this purpose, respectively a component of the nectar was investigated with the pollinator types. The characters which are researched by PGLS are sucrose to hexoses ratio ($\lambda = 0.094$; $r^2 = 0.29$, $p < 0.001$), sugar per flower ($\lambda = 0.141$; $r^2 = 0.72$, $p < 0.001$), amino acid per flower ($\lambda = 0.000$; $r^2 = 0.40$, $p < 0.001$) and inorganic ions per flower ($\lambda = 0.000$; $r^2 = 0.78$, $p < 0.001$). In all cases the estimated lambda values are approximately 0 or exactly 0, whereby the observed variations were independent of phylogeny.

All in all, the PCA with all nectar constituents indicates an increased influence of the pollination type rather than the growth site and the taxonomic group on the data variation. The corresponding PERMANOVA confirmed these results. Sugars, inorganic ions, and organic acids are the components that show the highest variation depending on the pollination type. Furthermore, the phylogenetic comparative analyses by PGLS indicate roughly no influence of the phylogenetic signal on nectar characters.

Discussion

Stability of nectar compounds

The nectar composition of a given species is relatively constant and independent of the locations of the greenhouses and the growth site of the plants (Figure 1). This is in line with a former study that showed that greenhouse and field nectar samples are similar in sugar composition (Krömer et al. 2008); Supplementary Table S6). Whereas nectar, which is collected from species in the field, can contain pollinator carried microbes (Herrera et al. 2009; Fridman et al. 2012; Aizenberg-Gershtein et al. 2017), no contamination with yeast or bacteria was found in the greenhouse grown bromeliad species. In order to track any possible changes of the nectar sugar composition after sampling, nectar of at least one hummingbird- and one bat-pollinated species (*Aechmea fasciata*, *Alcantarea imperialis*) were measured immediately after sampling and 12 and 24 h later. The sugar concentrations did not change significantly during this period (data not shown). However, it could not be excluded that other nectar compounds are influenced by different environmental conditions or growth sites. Therefore, the potential influence of the growth site was included in the analyses of the data.

Origin of nectar compounds

Nectar of all analyzed bromeliad species contained high concentrations of sugars (about 600 - 1000 mM), with the most predominant sugars being glucose, fructose, and sucrose. The sum of amino acids, inorganic anions or cations, and organic acids, in contrast, are detected at rather low millimolar concentrations (Figure 2).

Nectar with all its compounds is produced by and secreted from nectaries in a multi-stage process (Roy et al. 2017). The nectaries are supplied by the phloem and the discrepancy of solute composition and concentration between phloem sap and nectar has already been shown for different plant species (Lohaus und Schwerdtfeger 2014; Tiedge und Lohaus 2018). Although the total sugar concentrations of the phloem sap and the nectar are similar, hexoses only occur in the nectar and typically not in the phloem sap (Lohaus und Moellers 2000; Lohaus und Schwerdtfeger 2014). Therefore, the proportion of hexoses in nectar depends on the presence and activity of sucrose-cleaving enzymes, such as cell wall invertases (Ruhlmann et al. 2010; Tiedge und Lohaus 2018). So far, it has not been possible to collect pure phloem sap from intact plants of Bromeliaceae like it was performed for other plant species. Therefore, the phloem compounds in the different bromeliad species have not yet been determined. Nevertheless, it is very likely that these species also translocate only sucrose in the phloem.

The nectar sugar concentration in day-flowering species was about 20 % higher than in night-flowering species; however, this difference was not on a significant level ($p = 0.087$, $df = 145$, $n = 147$; Figure 2 A; Supplementary Table S2). Similar results were shown for day- and night-flowering *Nicotiana* species (Tiedge und Lohaus 2017). It could be a lower assimilation rate of carbon and a lower phloem translocation rate at night that cause these lower sugar concentrations in the nectar of night-flowering species (Riens et al. 1994). In addition, the higher humidity during the night could lead to slower evaporation (Witt et al. 2013).

The sugar-to-amino-acid-ratio as well as the sugar-to-cation or sugar-to-anion-ratio were lower in the phloem sap than in the nectar (Table 2; (Lohaus und Moellers 2000; Lohaus und Schwerdtfeger 2014). This may be an indication for an active regulation mechanism in the nectaries and for a reduced secretion of amino acids or inorganic ions into the nectar (Lohaus und Schwerdtfeger 2014). In general, the low concentrations of amino acids and inorganic ions in the nectar are more similar to the

corresponding concentrations in other extracellular fluids, like the leaf apoplast or the xylem; in the symplast, the concentrations are usually higher (Lohaus et al. 2001).

Furthermore, the amino acid composition can be affected by the growth conditions. It was shown, for example, that fertilization leads to higher proportions of glutamine, asparagine and proline in the nectar (Gardener und Gillman 2001 b). In addition, higher amino acid concentrations in the phloem sap of plants correlated with higher concentrations in the nectar (Lohaus und Schwerdtfeger 2014). Many species of the Bromeliaceae are epiphytic, but there are also terrestrial species to be found; so it can be assumed that the different growing forms are influenced by the availability of nitrogen, which in turn influences the nitrogen content in the nectar. However, the concentration of amino acids in the nectar was not significantly different in the epiphytic and terrestrial plant groups (data not shown).

Variation of the water content in the nectar (concentrated versus diluted nectar) or of the nectar volume per flower (low versus high nectar volumes) can also be caused by biochemical variations in the nectaries (Nicolson und Thornburg 2007). Furthermore, ambient humidity and the associated equilibrium has an influence on the nectar water content (Corbet 2003). Hydrolysis of sucrose to glucose and fructose increases the osmolality of the nectar and subsequently the water flow from the nectaries to the nectar (Nicolson und Thornburg 2007). With regard to the carbon equivalent per water equivalent in the nectar, it seems more effective to produce hexose-rich (monosaccharide with 6 carbon atoms) nectar instead of sucrose-rich (disaccharide with 12 carbon atoms) nectar. Bat-pollinated species produce high volumes of nectar (up to several hundred microliter nectar per flower) and the nectar is hexose-rich (Figure 2 A and 3 A). Similar results were shown for sunbird-pollinated *Nicotiana* species (Tiedge und Lohaus 2017). However, results from *Brassica napus* are in contradiction to these findings, as its nectar was also dominated by hexoses but the nectar volume per flower was very low (Lohaus und Schwerdtfeger 2014). Therefore, it is very probable that the nectar volume also depends on other ecological or physiological factors (Cresswell und Galen 1991; Nicolson und Thornburg 2007).

Table 2: Ratios of different compounds in nectar of bromeliad species with different pollinators. Data are calculated from the concentrations of sugars, amino acids, inorganic cations and anions in nectar of 147 bromeliad species (Supplementary Table S2-S4). Pollinator: Chi = chiropterophilous, Sphi = sphingophilous, Tro = trochilophilous, Ent = entomophilous, Psy = psychophilous. Different letters represent significant differences between the different pollination type (Tukey's HSD; $p < 0.05$).

Pollination type	Sucrose/hexose	Sugars/amino acids	Sugars/cations	Sugars/anions
Chi	0.5 ± 0.1^a	919 ± 1028^a	143 ± 100^a	276 ± 225^a
Sphi	$2.0 \pm 0.0^{a,b}$	$1795 \pm 2438^{a,b}$	$1583 \pm 1110^{a,b}$	$1875 \pm 2342^{a,b}$
Tro	2.5 ± 1.4^b	2649 ± 3669^b	1952 ± 2323^b	1829 ± 2261^b
Tro/Ent	3.2 ± 1.5^b	$1238 \pm 1298^{a,b}$	$1034 \pm 716^{a,b}$	$1488 \pm 680^{a,b}$
Psy	2.3 ± 1.3^b	3838 ± 4296^b	$1446 \pm 1218^{a,b}$	$1369 \pm 906^{a,b}$

Nectar composition and requirements of pollinators

Nectar sugars represent the major energy source for pollinators (Percival 1961) and the sugar composition in bromeliad species corresponded with their pollination type. Most of the hummingbird-pollinated species secreted sucrose-rich nectar, whereas the nectars of all analyzed bat-pollinated species were hexose-rich (Figure 2 A, 3 A, Supplementary Table S2). In an experimental study, Martínez del Rio 1990) demonstrated the preference for sucrose over hexoses for some hummingbird species. Generally, the nectar sugar preference of hummingbirds seems to be variable and it depends on the concentration of the offered sugar solution (Nicolson und Fleming 2003). Similar to the nectar of bat-pollinated species, the nectar of sunbird-pollinated species is also often hexose-rich (Nicolson und Fleming 2003; Tiedge und Lohaus 2017). Moreover, it was shown that for passerine birds the sucrase activity was at a very low level and much lower than for example for hummingbirds (Martínez del Rio et al. 1992). For bat species, however, considerable sucrase activity has been detected (Schondube et al. 2001) and sucrose hydrolysis does not limit food intake in bats (Herrera M. und Mancina 2008). Therefore, the reason for bat-pollinated species to produce hexose-rich nectar may not primarily be to serve the physiological needs of the bats.

Nectar is often a poor source of nitrogen (Baker und Baker 1982) and for most pollinators it is not possible to rely solely on nectar for their nitrogen supply (Nicolson und Fleming 2003). Pollen, fruits, or insects seem to serve as an additional nitrogen source for bats (Herrera M. et al. 2001; Mancina und Herrera M. 2010). Hummingbirds also feed on insects, whereas nectarivorous butterflies lack an alternative

nitrogen/protein source (Gilbert und Singer 1975; Baker und Baker 1982; Lopez-Calleja 2003). Despite that, all ten essential amino acids for most pollinators were present in the nectar of all our examined bromeliad species, albeit in varying proportions between 5-70% (Figure 2 B, Supplementary Table S3). In most species, the predominant amino acid was glutamine, followed by asparagine, serine, alanine, and, in bat-pollinated species, also proline (Figure 2 B, Supplementary Table S3). Similar amino acid compositions were shown for other plant species (Gardener und Gillman 2001 a; Tiedge und Lohaus 2017). In contrast to the floral nectar of 73 Mediterranean plant species, where the proportion of phenylalanine was highly variable (Petanidou et al. 2006), the phenylalanine proportion was less variable and rather low in the nectar of all bromeliad species (about 2 ± 2 %).

There are at least two possible reasons for the species-specific differences in the nectar composition of amino acids: (1) they are leaching from the nectaries and the nectar composition reflects the corresponding composition in the nectaries, or (2) the composition of amino acids in the nectar is adjusted to the preferences of different pollinators. Honey bees (*Apis mellifera*) and hummingbirds are attracted by proline in nectar (Waller 1972; Quintana-Rodríguez et al. 2018). Proline-rich nectar seems to have a particular importance for insects such as Hymenoptera, because they use proline in the initial phase of flight (Carter et al. 2006; Nepi et al. 2012). Amino acids can also influence the food selection of bats (Rodríguez-Peña et al. 2013), but so far there is no knowledge about a preference for special amino acids.

The concentration of malate in the nectar was less than 0.3 mM in most non-bat-pollinated bromeliad species, whereas in the nectar of bat-pollinated species, the concentration was higher (1.6 ± 2.7 mM) but very variable (Figure 4 E). An elevated concentration of malate was also found in *Nicotiana otophora*, a bat-pollinated species (Tiedge und Lohaus 2017). It is likely that organic acids play a role in the attraction of pollinators by adding flavors to the nectar rather than constitute a carbon source for pollinators (Noutsos et al. 2015).

The nectar of bat-pollinated species is generally more dominated by inorganic ions than the nectar of species with other pollinators (inorganic anions are 2- to 6-fold higher and inorganic cations are 3-fold higher, Figure 2 C and D). The processes leading to this difference in nectar composition are still poorly explored, but in general, the ion concentration in nectar influences the electrolyte balance of pollinators (Calder 1979;

Hiebert und Calder 1983). The broad-tailed hummingbird (*Selasphorus platycercus*), for example, needs to replace 14 % of its body electrolytes every day (Calder und Hiebert 1983).

Nectar composition is influenced by pollination type rather than by taxonomic groups

The pollination modes vary between closely related species within the Bromeliaceae (Supplementary Figure S7; (Kessler und Krömer 2000; Krömer et al. 2008), and bat-pollinated species were found in several genera (Supplementary Table S1). The differing concentrations of sugars, amino acids, and inorganic ions in the nectars of species with different pollination types indicate that nectars of bat-pollinated species are different from the other, non-bat-pollinated species.

The analysis of the data shows that the pollination type (hummingbirds versus bats) has a much higher influence on the nectar composition than the plant genera or the growth site (Table 1). This applies when considering all measured nectar components (sugars, amino acids, inorganic ions, and organic acids), and also when only sugars or inorganic ions and organic acids were considered. However, if only amino acids are considered, the importance of pollinators over genera vanishes (Supplementary Table S5). Furthermore, there is an influence of the growth site on the inorganic ions and organic acids, but it is not very extensive at 7 % (Supplementary Table S5). Similar analyses of *Nicotiana* species also revealed a strong influence of pollinator types on nectar composition, but here the pollinator type influenced the sugar and amino acid concentrations in the nectar more than the concentration of inorganic ions (Tiedge und Lohaus 2017). However, the study included only one bat-pollinated species, which might explain the difference (Tiedge und Lohaus 2017). Nevertheless, there is a considerable part of the variance that cannot be elucidated by either of the grouping options, which raises the question whether there are models or selective agents beyond this to predict the nectar composition (Parachnowitsch et al. 2018).

Phylogenetic distribution of bat pollination and nectar composition

Currently, there is no complete phylogeny of the family Bromeliaceae available due to neglecting or under-sampling of several species and genera. However, there are several models of the phylogeny based on the analyses of DNA and RNA sequences and sequence homologies. In 2013, a supertree for Bromeliaceae was established, but

the authors noticed that at that time only about 20 % of the bromeliad species have been included in phylogenetic analyses (Escobedo-Sarti et al. 2013). Since then, further studies have been published, but phylogeny still does not cover all species of this large family and particularly the larger genera (*Pitcairnia*, *Vriesea*, *Tillandsia*) are still under-sampled (Palma-Silva et al. 2016). Therefore, a schematic phylogenetic tree of the analyzed bromeliad species was created based on published molecular studies (Supplementary Figure S7). The analyzed bat-pollinated species were found in the three subfamilies Puyoideae, Pitcairnioideae, and Tillandsioideae. In the subfamily Bromelioideae, however, bat-pollination was not found for the analyzed species in this study (Supplementary Figure S7), although bat-pollination does exist in this subfamily as well (Marques et al. 2015).

Most of the bat-pollinated species evolved in addition to species with other pollination types (e.g. *Puya ferruginea* and *Puya densiflora*). Therefore, it is likely that in the family of Bromeliaceae, bat-pollinated species evolved several times alongside and from hummingbird-pollinated species (Benzing 2000; Fleming et al. 2009; Aguilar-Rodríguez et al. 2014). Within the subfamily Tillandsioideae, however, there is a single clade including bat-pollinated species only, which may have arisen as a single evolutionary transition. The genus *Tillandsia* has recently been split into at least four new genera (Barfuss et al. 2016), among them the genus *Pseudalcantarea* (the former subgenus *Pseudalcantarea*), of which all known species are bat-pollinated. This might be an indication for an ongoing evolution from bird or moth pollination to bat pollination (Benzing 2000; Aguilar-Rodríguez et al. 2014). Furthermore, Hoballah et al. (2007) demonstrated in their study that a major shift is caused by a single gene only, and thus the plants adapt to a new pollinator type. It can be assumed that the adaptation to bat-pollination is also reflected on the genetic level and with that on the taxonomic affiliation of a plant species and on the phylogenetic relations. However, further molecular phylogenetic analyses are necessary to understand the evolution of bat-pollination in this family.

The phylogenetic comparative analyses show that the trends in the nectar composition are not related to a phylogenetic signal. The maximum likelihood ratio by BayesTraits implicate a correlation between pollination type and sucrose to hexoses ration. Further, the PGLS affirmed that there is roughly no phylogenetic signal in the analyzed data. These results corroborate the findings of Petanidou et al. (2006), or studies of Schmidt-Lebuhn et al. (2007) on Acanthaceae, but stand in contrast to, for example, findings of

Nicolson und van Wyk 1998) for Proteaceae. This may be due to the fact that a putative phylogenetic constraint on nectar composition is more or less pronounced in different taxonomic groups (Krömer et al. 2008). In addition, it should be noted that the influence of the pollination type differs for the various nectar compounds. The sugar composition is clearly influenced by the pollination type, whereas, in the case of amino acids and inorganic ions, there is also an influence by the taxonomic group or by environmental conditions.

Nectar characteristics of bat-pollinated species

Despite the fact that the total sugar concentrations in the nectar of species with different pollination types were roughly similar, the sugar composition was different and the nectar of bat-pollinated species showed lower sucrose-to-hexoses ratios (Table 2). It also contained more amino acids, inorganic ions, and organic acids than the nectar of species with other pollination types (Figure 3 and 4) and the sugar-to-amino acids or sugar-to-ions ratios in the nectar of bat pollinated species were lower than in the nectar of the other bromeliad species (Table 2). In addition, bat-pollinated species produce higher volumes of nectar than non-bat-pollinated species. Therefore, the amount of sugars per flower was up to 25-fold higher in bat-pollinated species than in species with other pollination types (Figure 4 A), the amount of amino acids per flower was up to 35-fold higher (Figure 4 B), and the amount of inorganic ions per flower was up to several hundred-fold higher (Figure 4 C and 4D). The difference was more pronounced between the nectar of bat- and that of insect-pollinated species than between the nectar of the two vertebrate pollinators, bats and hummingbirds. That means that bat-pollinated species invest large amounts of their carbohydrates, nitrogen compounds, and inorganic ions in this special pollination type. The benefit for the plant is that bats transfer large quantities of pollen and are long-distance pollen dispersers (Fleming et al. 2009).

A lot of the bat-pollinated bromeliad species belong to the C3 type of photosynthesis and not to the CAM type (Supplementary Table S1). In general, the CO₂-assimilation rate per gram photosynthetic active tissue is higher in C3 plants than in CAM plants. One could assume that bromeliad species with CAM photosynthesis would not be able to afford losing high amounts of sugars through the nectar and, therefore, bat-pollination must be associated with C3 photosynthesis. In addition, C3 plants are

common in more humid areas such as wet lowland regions, where chiropterophily is also most common (Kessler und Krömer 2000).

Summarizing all data, it is obvious that significant differences exist between nectar traits of bat-pollinated species and species with other pollination types. However, all analyzed bat-pollinated bromeliad species in the Neotropics were pollinated by bat species of the Phyllostomidae (American leaf-nose bats), and the described nectar composition applies to this type of bat-pollination. Pollination by species of the Pteropodidae (Old World flying foxes) is also shown for plant species in Africa, Asia, and Australia (Fleming et al. 2009). Thus, more detailed studies of nectar traits are necessary to understand the adaptation of plants to pollination by New or Old World bats.

Funding

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (LO 734/10-1; SCHW 679/3-1).

Acknowledgments

We would like to thank the Botanical Garden and Botanical Museum Berlin (Germany), the Botanical Garden of the University of Bochum (Germany), the Botanical Garden of the University of Göttingen (Germany), the Botanical Garden of the University of Heidelberg (Germany), and the Botanical Garden of the University of Wien (Austria) for the possibility of nectar sampling and the provision of plants. In addition, we would like to thank Rosi Ritter for critical reading of the manuscript and the reviewers for the helpful comments.

References

- Abrahamczyk, S., Kessler, M., Hanley, D., Karger, D.N., Müller, M.P.J., Knauer, A.C., et al.** (2017). Pollinator adaptation and the evolution of floral nectar sugar composition. *J Evol Biol* 30, 112–127. doi: 10.1111/jeb.12991
- Adler, L.S.** (2000). The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91, 409–420. doi: 10.1034/j.1600-0706.2000.910301.x
- Aguilar-Rodríguez, P.A., MacSwiney G, M.C., Krömer, T., García-Franco, J.G., Knauer, A., and Kessler, M.** (2014). First record of bat-pollination in the species-rich genus *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 113, 1047–1055. doi: 10.1093/aob/mcu031
- Aguilar-Rodríguez, P.A., Krömer, T., García-Franco, J.G., and MacSwiney G, M.C.** (2016). From dusk till dawn: nocturnal and diurnal pollination in the epiphyte *Tillandsia heterophylla* (Bromeliaceae). *Plant Biol (Stuttg)* 18, 37–45. doi: 10.1111/plb.12319
- Aizenberg-Gershtein, Y., Izhaki, I., and Halpern, M.** (2017). From microhabitat of floral nectar up to biogeographic scale: Novel insights on neutral and niche bacterial assemblies. *Microb Ecol* 74, 128–139. doi: 10.1007/s00248-017-0935-9
- Almeida, V.R., Ferreira da Costa, A., Mantovani, A., Gonçalves-Esteves, V., Oliveira, R., and Forzza, R.C.** (2009). Morphological phylogenetics of *Quesnelia* (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Systematic Botany* 34, 660–672. doi: 10.1600/036364409790139619
- Amorim, F.W., Galetto, L., and Sazima, M.** (2013). Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biol (Stuttg)* 15, 317–327. doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00643.x
- Anderson, M.J.** (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26, 32–46. doi: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
- Ashworth, L., Aguilar, R., Martén-Rodríguez, S., Lopezaraiza-Mikel, M., Avila-Sakar, G., Rosas-Guerrero, V., et al.** (2015). Pollination syndromes: A global pattern of convergent evolution driven by the most effective pollinator. *Evolutionary Biology: Biodiversification from Genotype to Phenotype*, 203–224. doi: 10.1007/978-3-319-19932-0_11
- Baker, H.G.** (1977). Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie* 8, 349–356. Doi: 10.1051/apido:19770405
- Baker, H.G., and Baker, I.** (1973). Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature* 241, 543–545. doi: 10.1038/241543b0
- Baker, H.G., and Baker, I.** (1982). Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. In: M. H. Nitecki (ed.), *Biochemical aspects of evolutionary biology*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 131–171.
- Baker, H.G., and Baker, I.** (1983). Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. *Handbook of experimental pollination biology*, 117–141. doi: 10.2307/2443763
- Baker, H.G., Baker, I., and Hodges, S.A.** (1998). Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics. *Biotropica* 30, 559–586. doi: 10.1111/j.1744-7429.1998.tb00097.x

- Barfuss, M.H.J., Samuel, R., Till, W., and Stuessy, T.F.** (2005). Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *Am J Bot* 92, 337–351. doi: 10.3732/ajb.92.2.337
- Barfuss, M.H.J., Till, W., Leme, E., Pinzón, J.P., Manzanares, J.M., Halbritter, H., et al.** (2016). Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. *Phytotaxa* 279, 1. doi: 10.11646/phytotaxa.279.1.1
- Benzing, D.H.** (2000). *Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation*. Cambridge: Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511565175
- Bertazzini, M., and Forlani, G.** (2016). Intraspecific variability of floral nectar volume and composition in rapeseed (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). *Front Plant Sci* 7, 288. doi: 10.3389/fpls.2016.00288
- Calder, W.A.** (1979). On the temperature-dependency of optimal nectar concentrations for birds. *Journal of Theoretical Biology* 78, 185–196. doi: 10.1016/0022-5193(79)90263-7
- Calder, W.A., and Hiebert, S.M.** (1983). Nectar feeding, diuresis, and electrolyte replacement of hummingbirds. *Physiological Zoology* 56, 325–334. doi: 10.1086/physzool.56.3.30152597
- Carter, C., Shafir, S., Yehonatan, L., Palmer, R.G., and Thornburg, R.** (2006). A novel role for proline in plant floral nectars. *Naturwissenschaften* 93, 72–79. doi: 10.1007/s00114-005-0062-1
- Cascante-Marín, A., Oostermeijer, J.G.B., Wolf, J.H.D., and den Nijs, J C M** (2005). Reproductive biology of the epiphytic bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a premontane tropical forest. *Plant Biol (Stuttg)* 7, 203–209. doi: 10.1055/s-2005-837584
- Chalcoff, V.R., Aizen, M.A., and Galetto, L.** (2006). Nectar concentration and composition of 26 species from the temperate forest of South America. *Annals of Botany* 97, 413–421. doi: 10.1093/aob/mcj043
- Chew, T., Luna, E. de, and González, D.** (2010). Phylogenetic relationships of the Pseudobulbous *Tillandsia* species (Bromeliaceae) inferred from cladistic analyses of ITS 2, 5.8S ribosomal RNA gene, and ETS sequences. *Systematic Botany* 35, 86–95. doi: 10.1600/036364410790862632
- Corbet, S.A.** (2003). Nectar sugar content: Estimating standing crop and secretion rate in the field. *Apidologie* 34, 1–10. doi: 10.1051/apido:2002049
- Costa, A.F., Gomes-da-Silva, J., and Wanderley, M.D.** (2015). *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): A cladistic analysis of eastern Brazilian species based on morphological characters. *Rodriguésia* 66, 429–440. doi: 10.1590/2175-7860201566211
- Crayn, D.M., Winter, K., Schulte, K., and Smith, J.A.C.** (2015). Photosynthetic pathways in Bromeliaceae: Phylogenetic and ecological significance of CAM and C 3 based on carbon isotope ratios for 1893 species. *Bot J Linn Soc* 178, 169–221. doi: 10.1111/boj.12275
- Cresswell, J.E., and Galen, C.** (1991). Frequency-dependent selection and adaptive surfaces for floral character combinations: The pollination of *Polemonium viscosum*. *Am Nat* 138, 1342–1353. doi: 10.1086/285290

- Escobedo-Sarti, J., Ramírez, I., Leopardi, C., Carnevali, G., Magallón, S., Duno, R., et al.** (2013). A phylogeny of Bromeliaceae (Poales, Monocotyledoneae) derived from an evaluation of nine supertree methods. *Journal of Systematics Evolution* 51, 743–757. doi: 10.1111/jse.12044
- Evans, T.M., Jabaily, R.S., Faria, A.P., Sousa, L.O., Wendt, T., and Brown, G.K.** (2015). Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany* 40, 116–128. doi: 10.1600/036364415X686413
- Faria, A.P., Brown, G.K., and Wendt, T.** (2004). Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 91, 303–319.
- Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R., and Thomson, J.D.** (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35, 375–403. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132347
- Fleming, T.H., Geiselman, C., and Kress, W.J.** (2009). The evolution of bat pollination: A phylogenetic perspective. *Annals of Botany* 104, 1017–1043. doi: 10.1093/aob/mcp197
- Freeman, C.E., Worthington, R.D., and Jackson, M.S.** (1991). Floral nectar sugar compositions of some South and Southeast Asian species. *Biotropica* 23, 568. doi: 10.2307/2388394
- Fridman, S., Izhaki, I., Gerchman, Y., and Halpern, M.** (2012). Bacterial communities in floral nectar. *Environ Microbiol Rep* 4, 97–104. doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00309.x
- Fumero-Cabán, J.J., and Meléndez-Ackerman, E.J.** (2007). Relative pollination effectiveness of floral visitors of *Pitcairnia angustifolia* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 94, 419–424. doi: 10.3732/ajb.94.3.419
- Galetto, L., and Bernardello, G.** (2003). Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): An animal visitor's matter? *Plant Syst Evol* 238, 69–86. doi: 10.1007/s00606-002-0269-y
- Gardener, M.C., and Gillman, M.P.** (2001a). Analyzing variability in nectar amino acids: Composition is less variable than concentration. *J Chem Ecol* 27, 2545–2558. doi: 10.1023/A:1013687701120
- Gardener, M.C., and Gillman, M.P.** (2001b). The effects of soil fertilizer on amino acids in the floral nectar of corncockle, *Agrostemma githago* (Caryophyllaceae). *Oikos* 92, 101–106. doi: 10.1034/j.1600-0706.2001.920112.x
- Gilbert, L.E., and Singer, M.C.** (1975). Butterfly Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 6, 365–395. doi: 10.1146/annurev.es.06.110175.002053
- Givnish, T.J.** (2007). Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany: Vol. 23: Iss. 1, Article 4.*
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., et al.** (2011). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 98, 872–895. doi: 10.3732/ajb.1000059
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., et al.** (2014). Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Mol Phylogenet Evol* 71, 55–78. doi: 10.1016/j.ympev.2013.10.010

- Gomes-da-Silva, J., and Souza-Chies, T.T.** (2018). What actually is *Vriesea*? A total evidence approach in a polyphyletic genus of Tillandsioideae (Bromeliaceae, Poales). *Cladistics* 34, 181–199. doi: 10.1111/cla.12200
- Gomes-da-Silva, J., Alves da Costa Vargens, F., do Carmo de Oliveira Arruda, R., and Ferreira da Costa, A.** (2012). A morphological cladistic analysis of the *Vriesea corcovadensis* group (Bromeliaceae: Tillandsioideae), with anatomical descriptions: New evidence of the non-monophyly of the genus. *Systematic Botany* 37, 641–654. doi: 10.1600/036364412X648599
- Gosselin, M., Michez, D., Vanderplanck, M., Roelants, D., Glauser, G., and Rasmont, P.** (2013). Does *Aconitum septentrionale* chemically protect floral rewards to the advantage of specialist bumblebees? *Ecol Entomol* 38, 400–407. doi: 10.1111/een.12032
- Grafen, A.** (1989). The phylogenetic regression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 326:119-157. doi: 10.1098/rstb.1989.0106
- Heil, M.** (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends Plant Sci* 16, 191–200. doi: 10.1016/j.tplants.2011.01.003
- Herrera, C.M., Vega, C. de, Canto, A., and Pozo, M.I.** (2009). Yeasts in floral nectar: A quantitative survey. *Annals of Botany* 103, 1415–1423. doi: 10.1093/aob/mcp026
- Herrera M., L.G., and Mancina, C.A.** (2008). Sucrose hydrolysis does not limit food intake by Pallas's long-tongued bats. *Physiol Biochem Zool* 81, 119–124. doi: 10.1086/522904
- Herrera M., L.G., Hobson, K.A., Mirón, L.M., Ramírez P., N., Méndez C., G., and Sánchez-Cordero, V.** (2001b). Sources of protein in two species of phytophagous bats in a seasonal dry forest: Evidence from stable-isotope analysis. *Journal of Mammalogy* 82, 352–361. doi: 10.1644/1545-1542(2001)082<0352:SOPITS>2.0.CO;2
- Hiebert, S.M., and Calder, W.A.** (1983). Sodium, potassium, and chloride in floral nectars: Energy-free contributions to refractive index and salt balance. *Ecology* 64, 399–402. doi: 10.2307/1937086
- Hoballah, M.E., Gübitz, T., Stuurman, J., Broger, L., Barone, M., Mandel, T., et al.** (2007). Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *Plant Cell* 19, 779–790. doi: 10.1105/tpc.106.048694
- Hornung-Leoni, C.T., Sosa, V., and Hornung-Leoni, C.T.** (2008). Morphological phylogenetics of *Puya* subgenus *Puya* (Bromeliaceae). *Bot J Linn Soc* 156, 93–110. doi: 10.1111/j.1095-8339.2007.00740.x
- Horres, R., Schulte, K., Weising, K., and Zizka, G.** (2007). Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - Evidence from molecular and anatomical studies. *Aliso* 23, 27–43. doi: 10.5642/aliso.20072301.05
- Inouye, D., and Waller, G.D.** (1984). Responses of honey bees (*Apis mellifera*) to amino acid Solutions mimicking floral nectars. *Ecology* 65, 618–625. doi: 10.2307/1941424
- Jabaily, R.S., and Sytsma, K.J.** (2010). Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): Placement, major lineages, and evolution of Chilean species. *Am J Bot* 97, 337–356. doi: 10.3732/ajb.0900107
- Kessler, D., and Baldwin, I.T.** (2007). Making sense of nectar scents: The effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *Plant J* 49, 840–854. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02995.x

- Kessler, M., and Krömer, T.** (2000). Patterns and ecological correlates of pollination modes among bromeliad communities of Andean Forests in Bolivia. *Plant Biol* 2, 659–669. doi: 10.1055/s-2000-16642
- Krömer, T., Kessler, M., and Herzog, S.K.** (2006). Distribution and flowering ecology of bromeliads along two climatically contrasting elevational transects in the Bolivian Andes. *Biotropica* 38, 183–195. doi: 10.1111/j.1744-7429.2006.00124.x
- Krömer, T., Kessler, M., Lohaus, G., and Schmidt-Lebuhn, A.N.** (2008). Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biol (Stuttg)* 10, 502–511. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00058.x
- Law, B.S.** (1992). The maintenance nitrogen requirements of the Queensland blossom bat (*Syconycteris australis*) on a sugar/pollen diet: Is nitrogen a limiting resource? *Physiological Zoology* 65, 634–648. doi: 10.1086/physzool.65.3.30157974
- Lohaus, G., and Moellers, C.** (2000). Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* 211, 833–840. doi: 10.1007/s004250000349
- Lohaus, G., and Schwerdtfeger, M.** (2014). Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*. *PLoS ONE* 9, e87689. doi: 10.1371/journal.pone.0087689
- Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M., and Hermann Muehling, K.** (2001). Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol Plant* 111, 457–465. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110405.x
- López-Calleja, M.V., Fernández, M.J., Bozinoric, F.** (2003). The integration of energy and nitrogen balance in the hummingbird *Sephaniodes sephaniodes*. *Journal of Experimental Biology* 206, 3349–3359. doi: 10.1242/jeb.00572
- Mancina, C.A., and Herrera M., L.G.** (2010). Disparate feeding strategies used by syntopic Antillean nectarivorous bats to obtain dietary protein. *Journal of Mammalogy* 91, 960–966. doi: 10.1644/09-MAMM-A-323.1
- Marques, J.S., Tagliati, M.C., and Faria, A.P.** (2015). Diurnal versus nocturnal pollination success in *Billbergia horrida* Regel (Bromeliaceae) and the first record of chiropterophily for the genus. *An Acad Bras Cienc* 87, 835–842. doi: 10.590/0001-3765201520140340
- Martínez del Rio, C.** (1990). Dietary, phylogenetic, and ecological correlates of intestinal sucrase and maltase activity in birds. *Physiological Zoology* 63, 987–1011. doi: 10.1086/physzool.63.5.30152625
- Martínez del Rio, C., Baker, H.G., and Baker, I.** (1992). Ecological and evolutionary implications of digestive processes: Bird preferences and the sugar constituents of floral nectar and fruit pulp. *Experientia* 48, 544–551. doi: 10.1007/BF01920237
- Mevi-Schutz, J., and Erhardt, A.** (2005). Amino acids in nectar enhance butterfly fecundity: A long-awaited link. *Am Nat* 165, 411–419. doi: 10.1086/429150
- Moura, M.N., Forzza, R.C., and Cristiano, M.P.** (2018). Reconstruction of ancestral genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae): What can genome size tell us about the evolutionary history of its five genera? *Bot J Linn Soc* 186, 321–333. doi: 10.1093/botlinnean/box101
- Nepi, M.** (2014). Beyond nectar sweetness: The hidden ecological role of non-protein amino acids in nectar. *J Ecol* 102, 108–115. doi: 10.1111/1365-2745.12170

- Nepi, M., Soligo, C., Nocentini, D., Abate, M., Guarnieri, M., Cai, G., et al.** (2012). Amino acids and protein profile in floral nectar: Much more than a simple reward. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207, 475–481. doi: 10.1016/j.flora.2012.06.002
- Nicolson, S.W., and Worswick, P.V.** (1990). Sodium and potassium concentrations in floral nectars in relation to foraging by honey bees. *South African Journal of Zoology* 25, 93–96. doi: 10.1080/02541858.1990.11448196
- Nicolson, S.W., and van Wyk, B.E.** (1998). Nectar sugars in Proteaceae: Pattern and processes. *Australian Journal of Botany* 46, 489–504.
- Nicolson, S.W., and Fleming, P.A.** (2003). Nectar as food for birds: The physiological consequences of drinking dilute sugar solutions. *Plant Syst Evol* 238, 139–153. doi: 10.1007/s00606-003-0276-7
- Nicolson, S.W., and Thornburg, R.W.** (2007). Nectar chemistry. Nectaries and Nectar eds Nicolson S.W., Nepi M., Pacini E., editors. (Dordrecht: Springer), 215–264. doi: 10.1007/978-1-4020-5937-7_5
- Noutsos, C., Perera, A.M., Nikolau, B.J., Seaver, S.M.D., and Ware, D.H.** (2015). Metabolomic profiling of the nectars of *Aquilegia pubescens* and *A. canadensis*. *PLoS ONE* 10, e0124501. doi: 10.1371/journal.pone.0124501
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Henry, M., and Stevens, H.** (2007). The vegan package. Community ecology package. R package version 2.5-3. Available online at: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Ollerton, J., Alarcón, R., Waser, N.M., Price, M.V., Watts, S., Cranmer, L., et al.** (2009). A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* 103, 1471–1480. doi: 10.1093/aob/mcp031
- Orme D, Freckleton R, Thomas G, Petzoldt T, Fritz S, Isaac N, Pearse W.** (2013). caper: Comparative analyses of phylogenetics and evolution in R. R package version 1.0.1. Available online at: <https://CRAN.R-project.org/package=caper>
- Pagel, M.** (1994). Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proc. R. Soc. Long. B. Biological Sciences*. 255:37-45. doi: 10.1098/rspb.1994.0006
- Palma-Silva, C., Leal, B.S.S., Chaves, C.J.N., and Fay, M.F.** (2016). Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. *Bot J Linn Soc* 181, 305–322. doi: 10.1111/boj.12431
- Parachnowitsch, A.L., Manson, J.S., and Sletvold, N.** (2018). Evolutionary ecology of nectar. *Annals of Botany*. doi: 10.1093/aob/mcy132
- Percival, M.S.** (1961). Types in nectar in angiosperms. *New Phytol* 60, 235–281. doi: 10.1111/j.1469-8137.1961.tb06255.x
- Perret, M., Chautems, A., Spichiger, R., Peixoto, M., Savolainen, V.** (2001). Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). *Annals of Botany* 87, 267–273. doi: 10.1006/anbo.2000.1331
- Petanidou, T., van Laere, A., Ellis, W.N., and Smets, E.** (2006). What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos* 115, 155–169. doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.14487.x
- Pinzón, J.P., Ramírez-Morillo, I.M., Carnevali, G., Barfuss, M.H.J., Till, W., Tun, J., et al.** (2016). Phylogenetics and evolution of the *Tillandsia utriculata* complex (Bromeliaceae, Tillandsioideae) inferred from three plastid DNA markers and the ETS of the nuclear ribosomal DNA. *Bot J Linn Soc* 181, 362–390. doi: 10.1111/boj.12425

- Proctor, M., Yeo, P., and Lack, A.** (1996). The natural history of pollination. London: Harper Collins.
- Quintana-Rodríguez, E., Ramírez-Rodríguez, A.G., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Camacho-Coronel, X., Esparza-Claudio, J., et al.** (2018). Biochemical traits in the flower lifetime of a Mexican mistletoe parasitizing mesquite biomass. *Front Plant Sci* 9, 1031. doi: 10.3389/fpls.2018.01031
- Rex, M., Schulte, K., Zizka, G., Peters, J., Vásquez, R., Ibisch, P.L., et al.** (2009). Phylogenetic analysis of *Fosterella* L.B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. *Mol Phylogenet Evol* 51, 472–485. doi: 10.1016/j.ympev.2009.01.001
- Riens, B., Lohaus, G., Winter, H., and Heldt, H.** (1994). Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 192. doi: 10.1007/BF00203587
- Rodríguez-Peña, N., Stoner, K.E., Ayala-Berdon, J., Flores-Ortiz, C.M., Duran, A., and Schondube, J.E.** (2013). Nitrogen and amino acids in nectar modify food selection of nectarivorous bats. *J Anim Ecol* 82, 1106–1115. doi: 10.1111/1365-2656.12069
- Rosas-Guerrero, V., Aguilar, R., Martén-Rodríguez, S., Ashworth, L., Lopezaraiza-Mikel, M., Bastida, J.M., et al.** (2014). A quantitative review of pollination syndromes: Do floral traits predict effective pollinators? *Ecol Lett* 17, 388–400. doi: 10.1111/ele.12224
- Roy, R., Schmitt, A.J., Thomas, J.B., and Carter, C.J.** (2017). Review: Nectar biology: From molecules to ecosystems. *Plant Sci* 262, 148–164. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.04.012
- Ruhmann, J.M., Kram, B.W., and Carter, C.J.** (2010). *CELL WALL INVERTASE 4* is required for nectar production in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 61, 395–404. doi: 10.1093/jxb/erp309
- Sajo, M.G., Rudall, P.J., and Prychid, C.J.** (2004). Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. *Plant Syst. Evol.* 247. doi: 10.1007/s00606-002-0143-0
- Santos, V.L., Versieux, L.M., Wanderley, M.D.G.L., and Da Luz, C.F.P.** (2017). Pollen morphology of *Alcantarea* giant bromeliads (Bromeliaceae, Tillandsioideae). *Grana* 57, 117–136. doi: 10.1080/00173134.2017.1310920
- Sass, C., and Specht, C.D.** (2010). Phylogenetic estimation of the core Bromeliads with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Mol Phylogenet Evol* 55, 559–571. doi: 10.1016/j.ympev.2010.01.005
- Sasu, M.A., Wall, K.L., and Stephenson, A.G.** (2010). Antimicrobial nectar inhibits a florally transmitted pathogen of a wild *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Am J Bot* 97, 1025–1030. doi: 10.3732/ajb.0900381
- Sazima, M., Buzato, S., and Sazima, I.** (1985). Bat pollination of *Vriesea* in southeastern Brazil. *Bromélia* 2, 29–37.
- Schmid, S., Schmid, V.S., Zillikens, A., Harter-Marques, B., and Steiner, J.** (2011). Bimodal pollination system of the bromeliad *Aechmea nudicaulis* involving hummingbirds and bees. *Plant Biol (Stuttg)* 13 Suppl 1, 41–50. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00348.x

- Schmidt-Lebuhn, A.N., Schwerdtfeger, M., Kessler, M., and Lohaus, G.** (2007). Phylogenetic constraints vs. ecology in the nectar composition of Acanthaceae. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 202, 62–69. doi: 10.1016/j.flora.2006.02.005
- Schondube, J.E., Herrera M, L.G., and Martínez del Rio, C.** (2001). Diet and the evolution of digestion and renal function in phyllostomid bats. *Zoology (Jena)* 104, 59–73. doi: 10.1078/0944-2006-00007
- Schulte, K., Barfuss, M.H.J., and Zizka, G.** (2009). Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Mol Phylogenet Evol* 51, 327–339. doi: 10.1016/j.ympev.2009.02.003
- Schütz, N., Krapp, F., Wagner, N., and Weising, K.** (2016). Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae): Evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. *Bot J Linn Soc* 181, 323–342. doi: 10.1111/boj.12403
- Seo, P.J., Wielsch, N., Kessler, D., Svatos, A., Park, C.-M., Baldwin, I.T., et al.** (2013). Natural variation in floral nectar proteins of two *Nicotiana attenuata* accessions. *BMC Plant Biol* 13, 101. doi: 10.1186/1471-2229-13-101
- Souza, C.S.d., Aoki, C., Ribas, A., Pott, A., and Sigrist, M.R.** (2016). Floral traits as potential indicators of pollination vs. theft. *Rodriguésia* 67, 309–320. doi: 10.1590/2175-7860201667203
- Stevenson, P.C., Nicolson, S.W., and Wright, G.A.** (2017). Plant secondary metabolites in nectar: Impacts on pollinators and ecological functions. *Funct Ecol* 31, 65–75. doi: 10.1111/1365-2435.12761
- Tiedge, K., and Lohaus, G.** (2017). Nectar sugars and amino acids in day- and night-flowering *Nicotiana* species are more strongly shaped by pollinators' preferences than organic acids and inorganic ions. *PLoS ONE* 12, e0176865. doi: 10.1371/journal.pone.0176865
- Tiedge, K., and Lohaus, G.** (2018). Nectar sugar modulation and cell wall invertases in the nectaries of day- and night-flowering *Nicotiana*. *Front Plant Sci* 9. doi: 10.3389/fpls.2018.00622
- Tschapka, M., and Dressler, S.** (2002). Chiropterophily: On bat-flowers and flower-bats. *Curtis's Botanical Magazine* 19, 114–125. doi: 10.1111/1467-8748.00340
- Versieux, L.M., Barbará, T., Wanderley, M.D., Calvente, A., Fay, M.F., and Lexer, C.** (2012). Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (Alcantarea, Bromeliaceae): Implications for morphological evolution and biogeography. *Mol Phylogenet Evol* 64, 177–189. doi: 10.1016/j.ympev.2012.03.015
- von Helversen, O.v., and Winter, Y.** (2003). *Glossophagine bats and their flowers: cost and benefit for plant and pollinator.* University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Waller, G.D.** (1972). Evaluating responses of honey bees to sugar solutions using an artificial-flower feeder. *Annals of the Entomological Society of America* 65, 857–862. doi: 10.1093/aesa/65.4.857
- Witt, T., Jürgens, A., and Gottsberger, G.** (2013). Nectar sugar composition of european Caryophylloideae (Caryophyllaceae) in relation to flower length, pollination biology and phylogeny. *J Evol Biol* 26, 2244–2259. doi: 10.1111/jeb.12224
- Zhang, F.-P., Yang, Q.-Y., and Zhang, S.-B.** (2016). Dual effect of phenolic nectar on three floral visitors of *Elsholtzia rugulosa* (Lamiaceae) in SW China. *PLoS ONE* 11, e0154381. doi: 10.1371/journal.pone.0154381

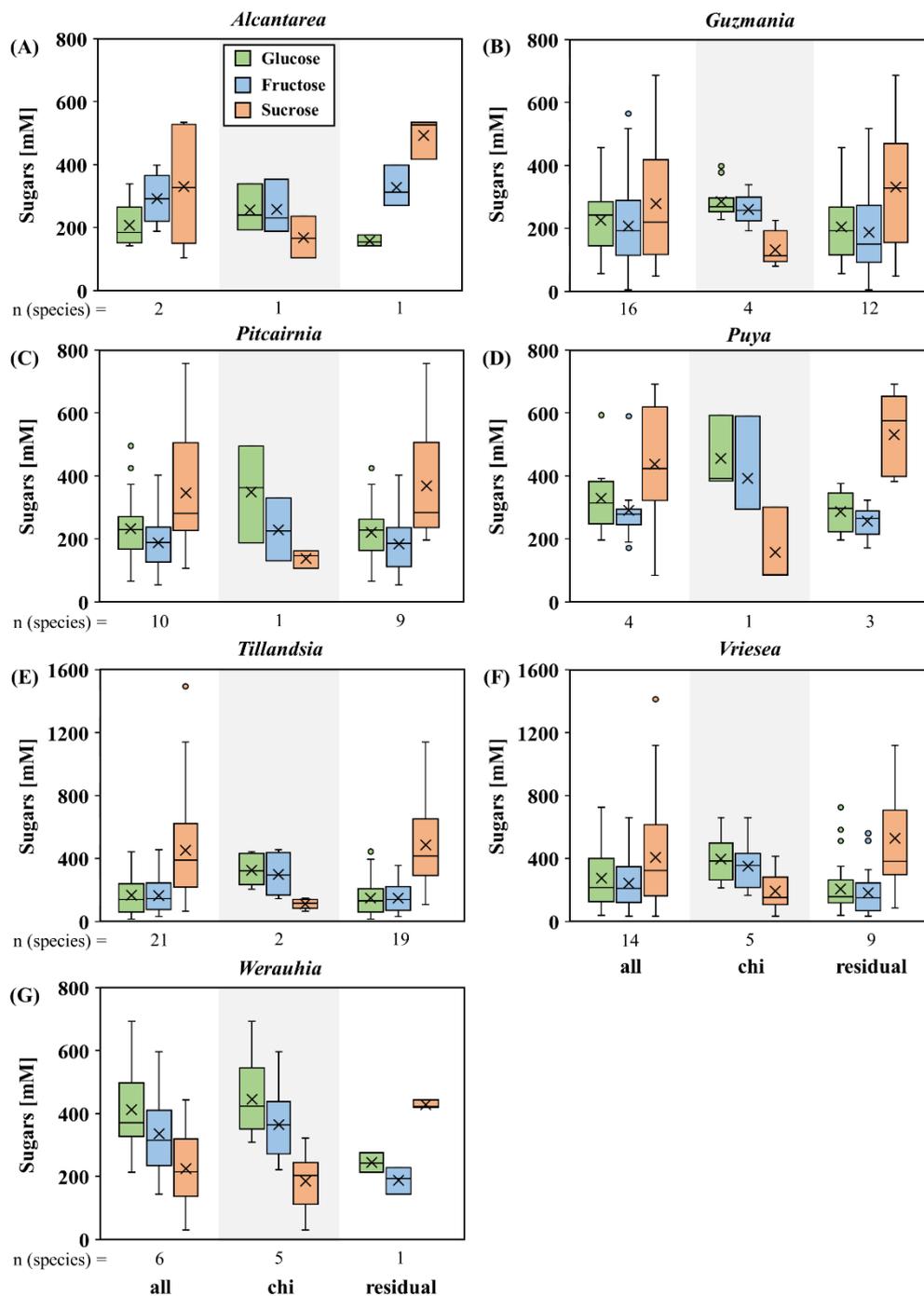
- Zizka, G., Schneider, J.V., Schulte, K., and Novoa, P.** (2013). Taxonomic revision of the Chilean *Puya* species (Puyoideae, Bromeliaceae), with special notes on the *Puya alpestris*-*Puya berteroniana* species complex. *Brittonia* 65, 387–407. doi: 10.1007/s12228-012-9290-9
- Zotz, G.** (2013). The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update. *Bot J Linn Soc* 171, 453–481. doi: 10.1111/boj.12010

Supplementary Material

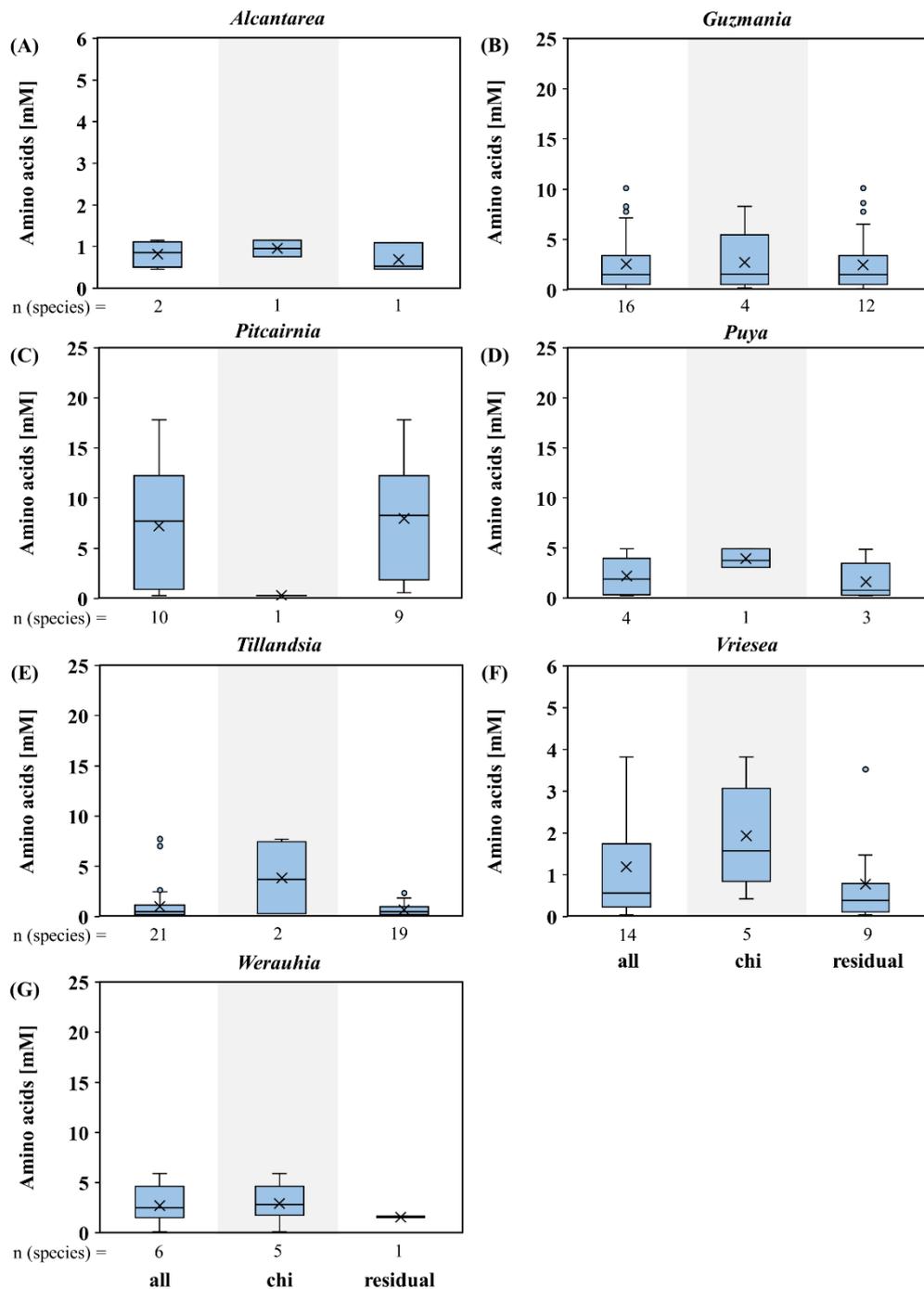
What do nectarivorous bats like? Nectar composition in Bromeliaceae with special emphasis on bat-pollinated species

Author: Thomas Göttlinger, Michael Schwerdtfeger, Kira Tiedge, Gertrud Lohaus*

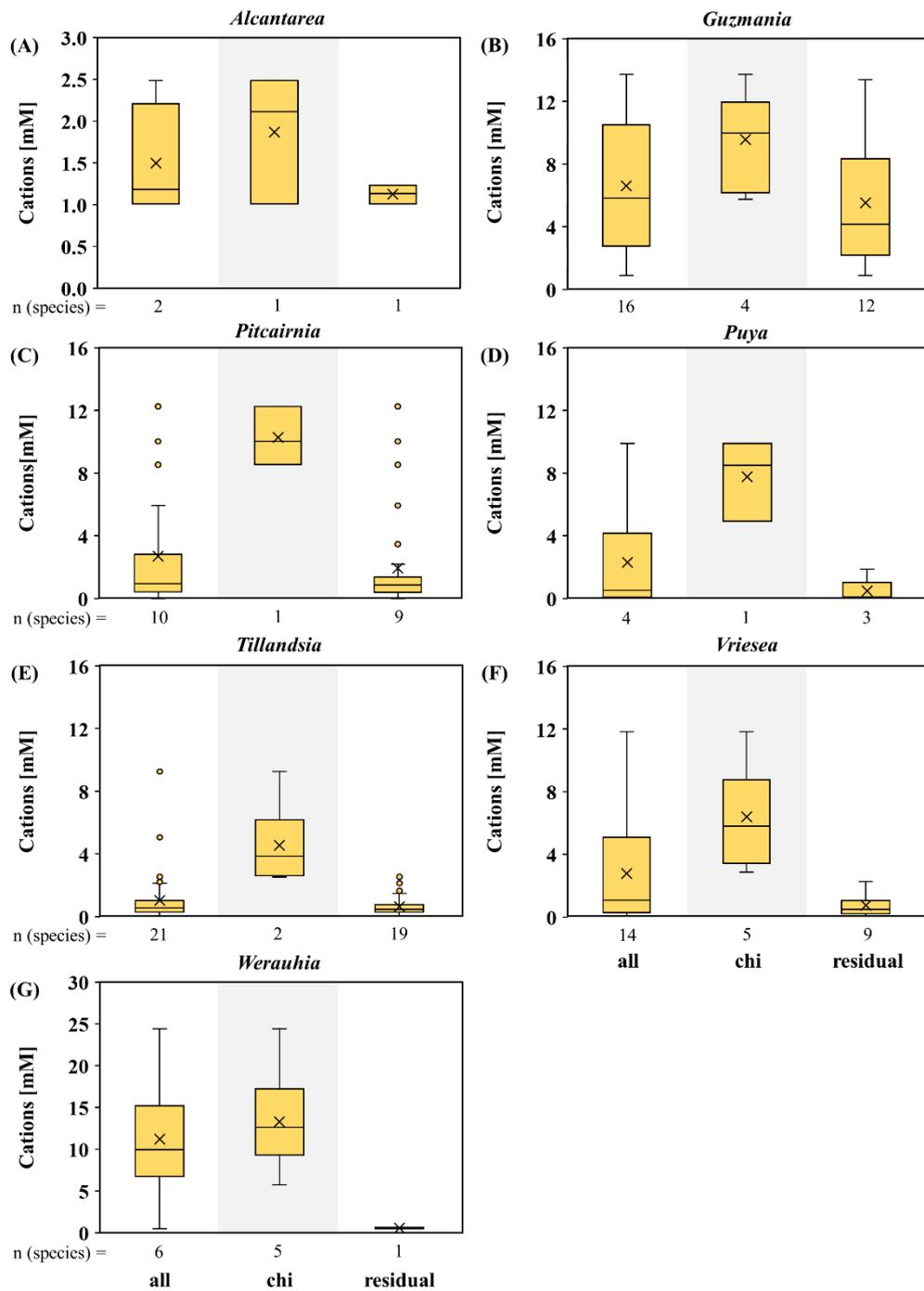
*Correspondence: Gertrud Lohaus (lohaus@uni-wuppertal.de)



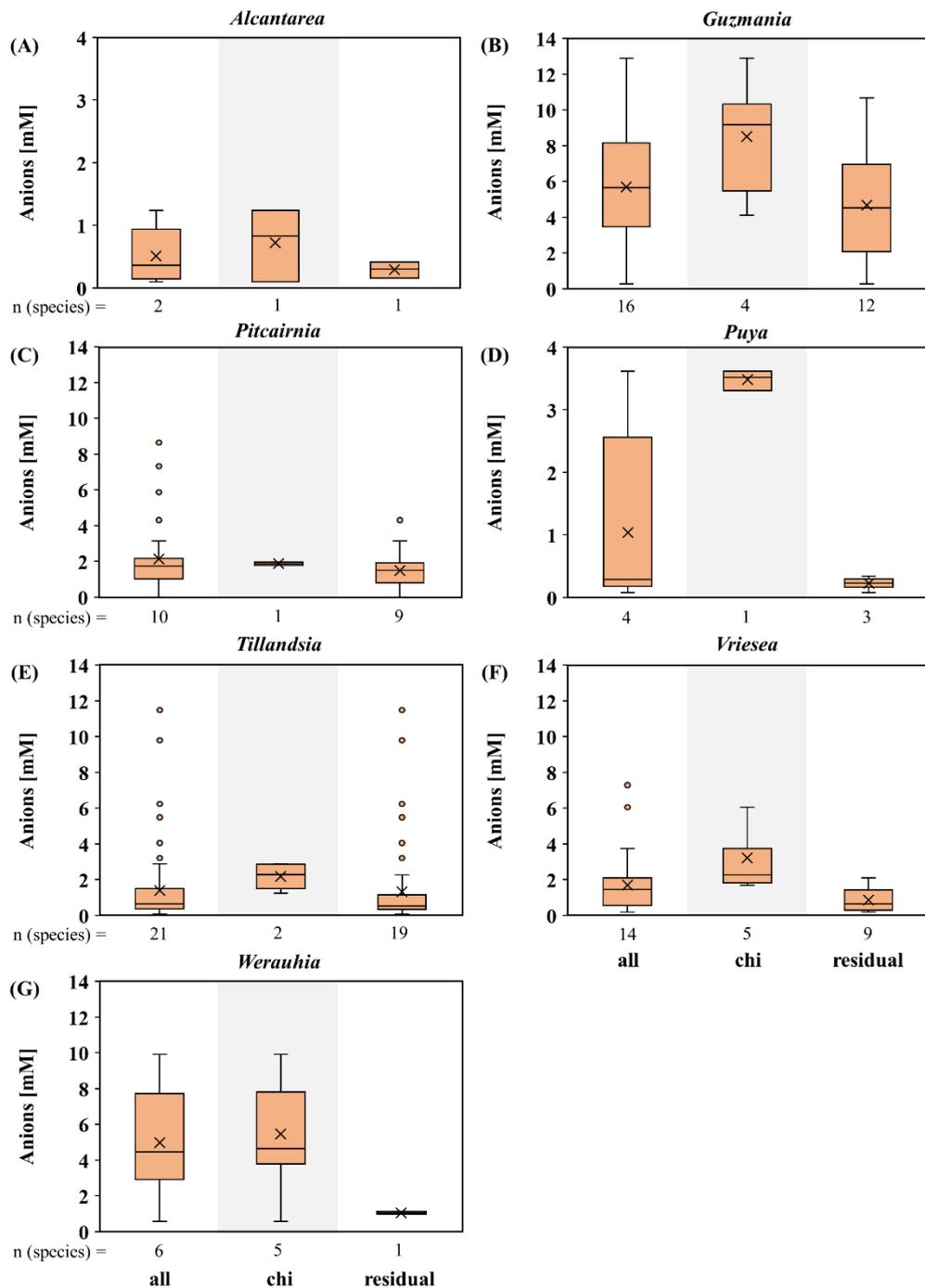
Supplementary Figure S1: Concentration of sugars (glucose, fructose, sucrose) in nectar of seven genera of Bromeliaceae, which include bat-pollinated species. The box plots show medians (horizontal line in box) and means (x in box).



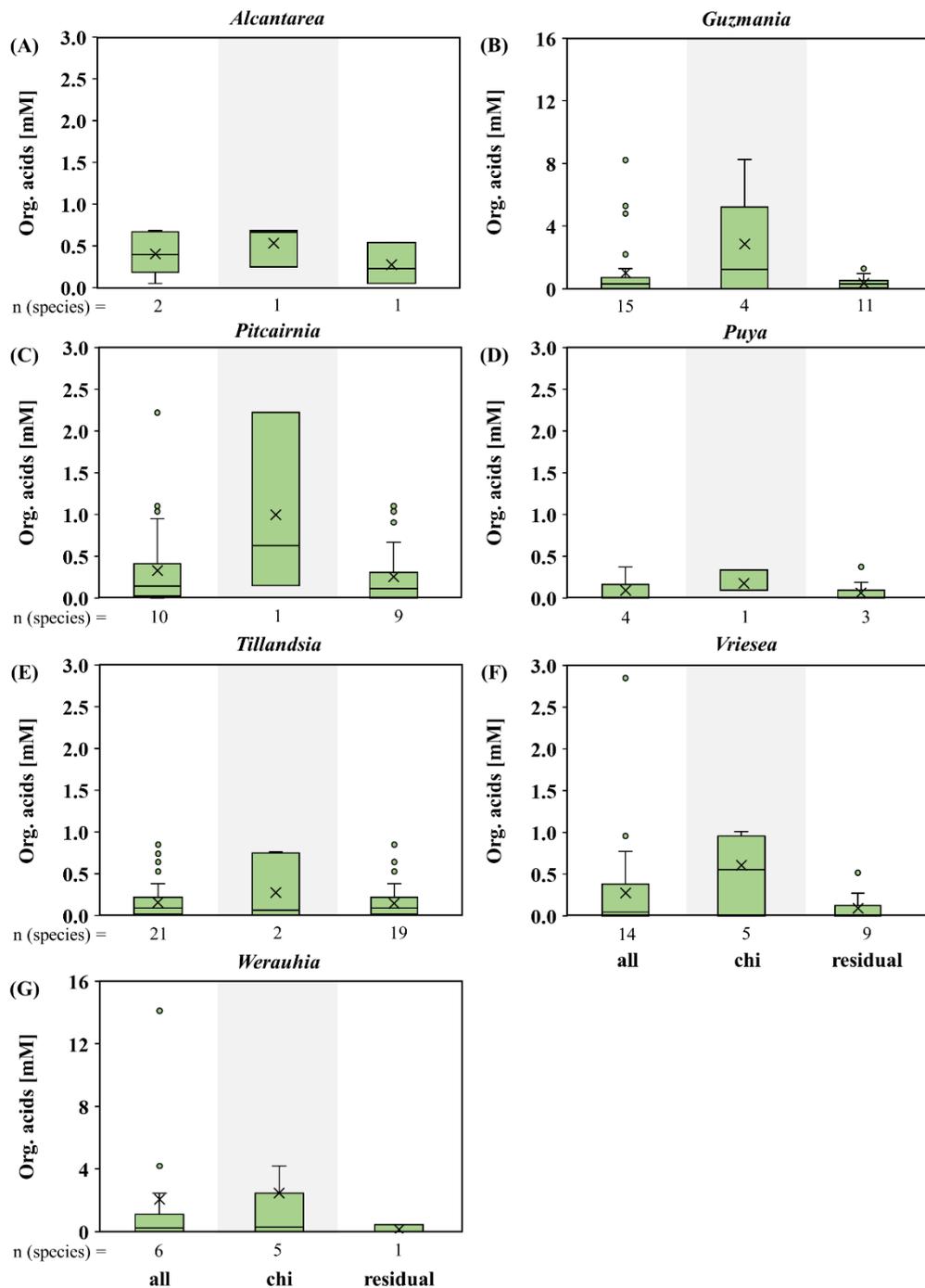
Supplementary Figure S2: Concentration of amino acids (ala, arg, asn, asp, gaba, gln, glu, gly, his, iso, leu, lys, met, phe, pro, ser, thr, trp, tyr, val) in nectar of seven genera of Bromeliaceae, which include bat-pollinated species. The box plots show medians (horizontal line in box) and means (x in box).



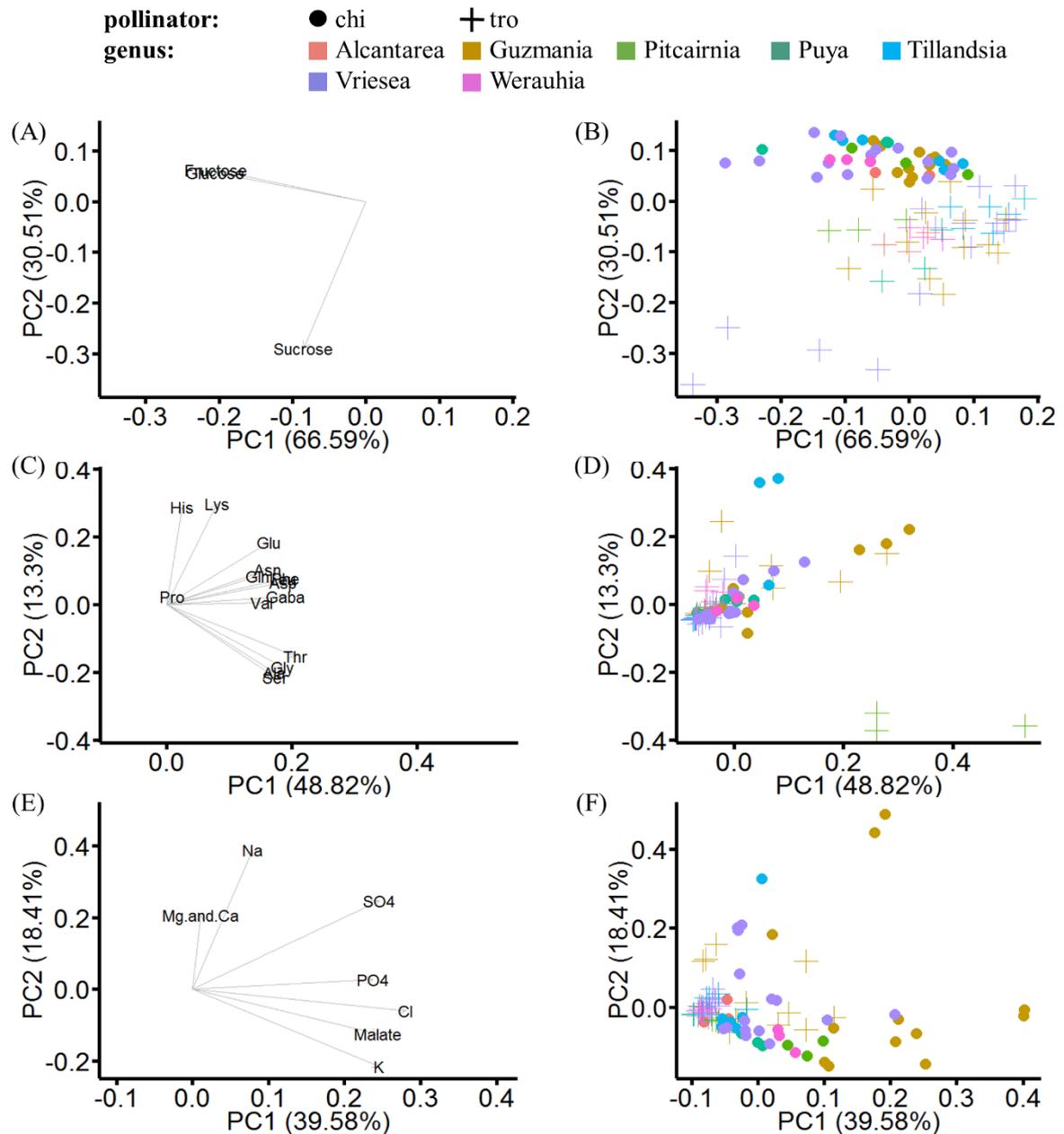
Supplementary Figure S3: Cation concentrations (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+}) in nectar of seven genera of Bromeliaceae, which include bat-pollinated species. The box plots show medians (horizontal line in box) and means (x in box).



Supplementary Figure S4: Anion concentrations (Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) in nectar of seven genera of Bromeliaceae, which include bat-pollinated species. The box plots show medians (horizontal line in box) and means (x in box).



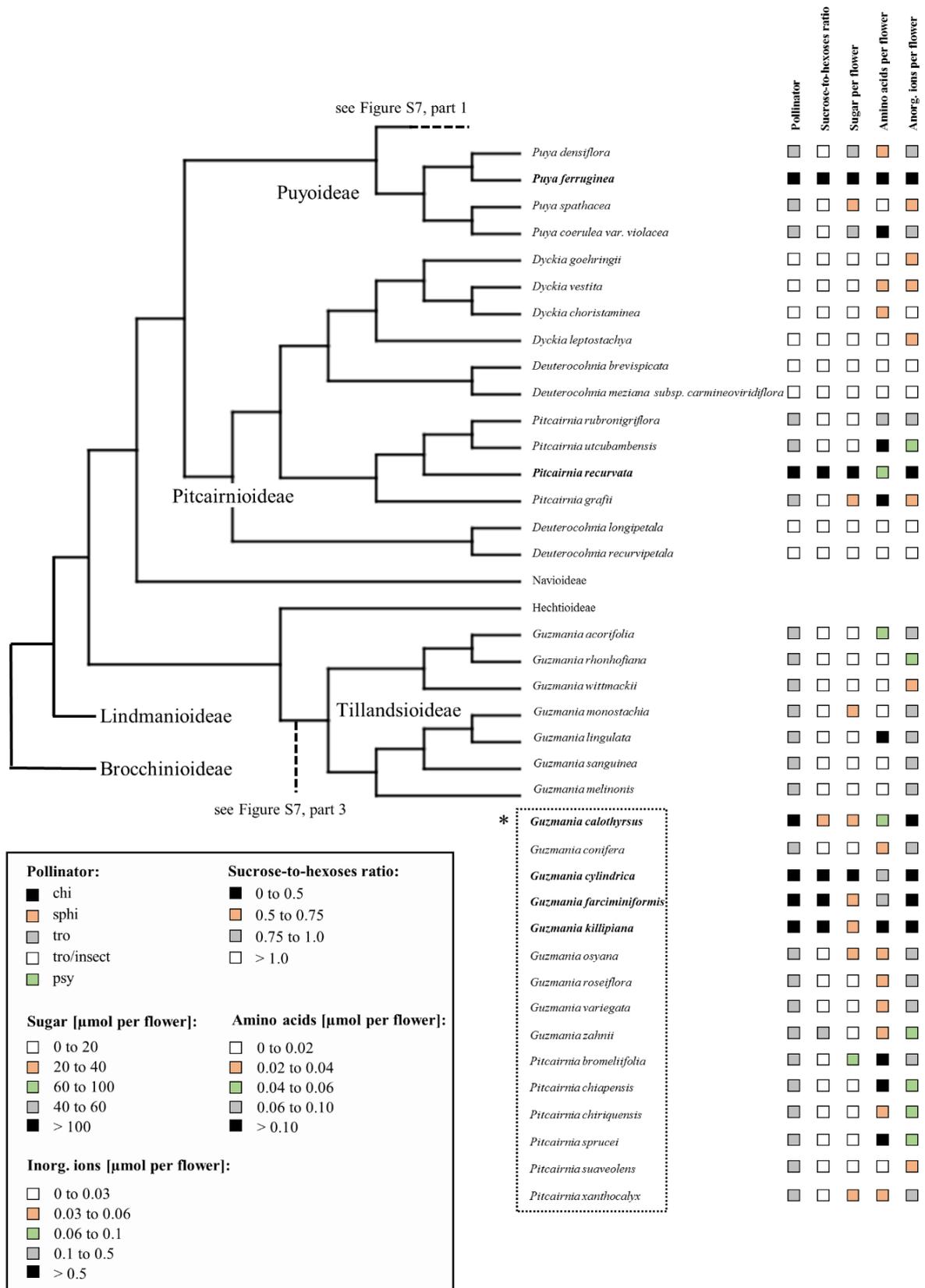
Supplementary Figure S5: Concentration of organic acids (malate, citrate) in nectar of seven Bromeliaceae genera, which include bat-pollinated species. The box plots show medians (horizontal line in box) and means (x in box).

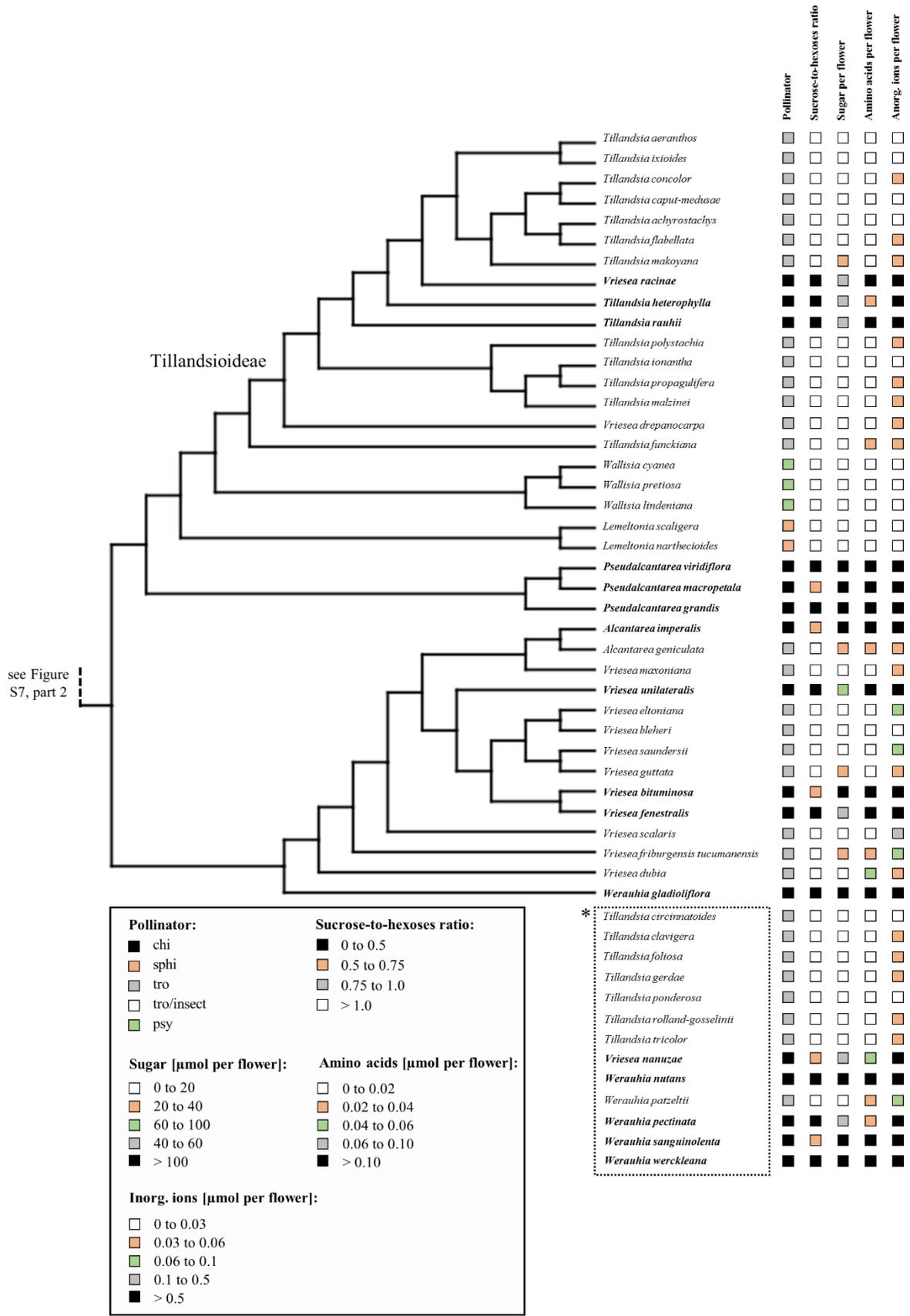


Supplementary Figure S6: Loadings and scatterplot of PCA in rotated space (pollinator and taxonomic groups, growth site). In the PCA, the statistically analyzed samples were selected according to their pollinator and to their taxonomic groups (genera). A, C, E: Loading plot, which illustrate the original variables (A: sugars, C: amino acids, E: inorganic ions and organic acids) loaded as vectors in PCA space. B, D, F: Scatterplot of PCA, in which the data (B: sugars, D: amino acids, F: inorganic ions and organic acids) are grouped by pollinator (markings) and genus (colors).



Supplementary Figure S7: Simplified phylogram of all analyzed Bromeliaceae species combining molecular and morphological findings. The schematic phylogenetic tree is based on 23 different phylogenetic investigations (Faria et al., 2004; Barfuss et al., 2005; Givnish, 2007; Horres et al., 2007; Hornung-Leoni et al., 2008; Almeida et al., 2009; Rex et al., 2009; Schulte et al., 2009; Chew et al., 2010; Jabaily and Sytsma, 2010; Sass and Specht, 2010; Givnish et al., 2011; Gomes-da-Silva et al., 2012; Versieux et al., 2012; Escobedo-Sarti et al., 2013; Givnish et al., 2014; Costa et al., 2015; Evans et al., 2015; Barfuss et al., 2016; Pinzón et al., 2016; Schütz et al., 2016; Gomes-da-Silva and Souza-Chies, 2018; Moura et al., 2018). The phylogenetic tree was created using Mesquite 3.51. * No molecular phylogenetic data available. Bold type = bat-pollinated bromeliads.





Pollinator:

- chi
- sphi
- tro
- tro/insect
- psy

Sucrose-to-hexoses ratio:

- 0 to 0.5
- 0.5 to 0.75
- 0.75 to 1.0
- > 1.0

Sugar [μmol per flower]:

- 0 to 20
- 20 to 40
- 60 to 100
- 40 to 60
- > 100

Amino acids [μmol per flower]:

- 0 to 0.02
- 0.02 to 0.04
- 0.04 to 0.06
- 0.06 to 0.10
- > 0.10

Inorg. ions [μmol per flower]:

- 0 to 0.03
- 0.03 to 0.06
- 0.06 to 0.1
- 0.1 to 0.5
- > 0.5

- Tillandsia circinnatoides*
- Tillandsia clavigera*
- Tillandsia foliosa*
- Tillandsia gerdae*
- Tillandsia ponderosa*
- Tillandsia rolland-gosselintii*
- Tillandsia tricolor*
- Vriesea nanuzae*
- Werauhia nutans*
- Werauhia patzeltii*
- Werauhia pectinata*
- Werauhia sanguinolenta*
- Werauhia werckleana*

References

- Almeida, V.R., Ferreira da Costa, A., Mantovani, A., Gonçalves-Esteves, V., Oliveira, R., and Forzza, R.C.** (2009). Morphological phylogenetics of *Quesnelia* (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Systematic Botany* 34, 660–672. doi: 10.1600/036364409790139619
- Barfuss, M.H.J., Samuel, R., Till, W., and Stuessy, T.F.** (2005). Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *Am J Bot* 92, 337–351. doi: 10.3732/ajb.92.2.337
- Barfuss, M.H.J., Till, W., Leme, E., Pinzón, J. P., Manzanare, J. M., Halbritter, H., et al.** (2016). Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. *Phytotaxa* 279, 1. doi: 10.11646/phytotaxa.279.1.1
- Chew, T., Luna, E. de, and González, D.** (2010). Phylogenetic relationships of the Pseudobulbous *Tillandsia* species (Bromeliaceae) inferred from cladistic analyses of ITS 2, 5.8S ribosomal RNA gene, and ETS sequences. *Systematic Botany* 35, 86–95. doi: 10.1600/036364410790862632
- Costa, A.F., Gomes-da-Silva, J., and Wanderley, M.D.** (2015). *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): A cladistic analysis of eastern Brazilian species based on morphological characters. *Rodriguésia* 66, 429–440. doi: 10.1590/2175-7860201566211
- Escobedo-Sarti, J., Ramírez, I., Leopardi, C., Carnevali, G., Magallón, S., Duno, R., et al.** (2013). A phylogeny of Bromeliaceae (Poales, Monocotyledoneae) derived from an evaluation of nine supertree methods. *Journal of Systematics Evolution* 51, 743–757. doi: 10.1111/jse.12044
- Evans, T.M., Jabaily, R.S., Faria, A.P., Sousa, L.O., Wendt, T., and Brown, G.K.** (2015). Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany* 40, 116–128. doi: 10.1600/036364415X686413
- Faria, A.P., Brown, G.K., and Wendt, T.** (2004). Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 91, 303–319.
- Givnish, T.J.** (2007). Phylogeny, adaptive radiation and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*: Vol. 23: Iss. 1, Article 4.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Ee, B. V., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., et al.** (2011). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 98, 872–895. doi: 10.3732/ajb.1000059
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., et al.** (2014). Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Mol Phylogenet Evol* 71, 55–78. doi: 10.1016/j.ympev.2013.10.010
- Gomes-da-Silva, J., Alves da Costa Vargens, F., do Carmo de Oliveira Arruda, R., and Ferreira da Costa, A.** (2012). A morphological cladistic analysis of the *Vriesea corcovadensis* group (Bromeliaceae: Tillandsioideae), with anatomical descriptions: New evidence of the non-monophyly of the genus. *Systematic Botany* 37, 641–654. doi: 10.1600/036364412X648599

- Gomes-da-Silva, J., and Souza-Chies, T.T.** (2018). What actually is *Vriesea*? A total evidence approach in a polyphyletic genus of Tillandsioideae (Bromeliaceae, Poales). *Cladistics* 34, 181–199. doi: 10.1111/cla.12200
- Hornung-Leoni, C.T., Sosa, V., and Hornung-Leoni, C.T.** (2008). Morphological phylogenetics of *Puya* subgenus *Puya* (Bromeliaceae). *Bot J Linn Soc* 156, 93–110. doi: 10.1111/j.1095-8339.2007.00740.x
- Horres, R., Schulte, K., Weising, K., and Zizka, G.** (2007). Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - Evidence from molecular and anatomical studies. *Aliso* 23, 27–43. doi: 10.5642/aliso.20072301.05
- Jabaily, R.S., and Sytsma, K.J.** (2010). Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): Placement, major lineages, and evolution of Chilean species. *Am J Bot* 97, 337–356. doi: 10.3732/ajb.0900107
- Moura, M.N., Forzza, R.C., and Cristiano, M.P.** (2018). Reconstruction of ancestral genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae): What can genome size tell us about the evolutionary history of its five genera? *Bot J Linn Soc* 186, 321–333. doi: 10.1093/botlinnean/box101
- Pinzón, J.P., Ramírez-Morillo, I.M., Carnevali, G., Barfuss, M.H.J., Till, W., Tun, J., et al.** (2016). Phylogenetics and evolution of the *Tillandsia utriculata* complex (Bromeliaceae, Tillandsioideae) inferred from three plastid DNA markers and the ETS of the nuclear ribosomal DNA. *Bot J Linn Soc* 181, 362–390. doi: 10.1111/boj.12425
- Rex, M., Schulte, K., Zizka, G., Peters, J., Vásquez, R., Ibisch, P.L., et al.** (2009). Phylogenetic analysis of *Fosterella* L.B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. *Mol Phylogenet Evol* 51, 472–485. doi: 10.1016/j.ympev.2009.01.001
- Sass, C., and Specht, C.D.** (2010). Phylogenetic estimation of the core Bromeliads with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Mol Phylogenet Evol* 55, 559–571. doi: 10.1016/j.ympev.2010.01.005
- Schulte, K., Barfuss, M.H.J., and Zizka, G.** (2009). Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Mol Phylogenet Evol* 51, 327–339. doi: 10.1016/j.ympev.2009.02.003
- Schütz, N., Krapp, F., Wagner, N., and Weising, K.** (2016). Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae): Evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. *Bot J Linn Soc* 181, 323–342. doi: 10.1111/boj.12403
- Versieux, L.M., Barbará, T., Wanderley, M.D., Calvente, A., Fay, M.F., and Lexer, C.** (2012). Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae): Implications for morphological evolution and biogeography. *Mol Phylogenet Evol* 64, 177–189. doi: 10.1016/j.ympev.2012.03.015

Supplementary Table S1: Overview of some main features of all examined Bromeliaceae species.

Species	Subfamily	Locality	Pollination type	Flower Color	Length of corolla tube [mm]	CAM or C3 (1)
<i>Aechmea abbreviata</i> L.B.Sm.	Brom.	Gö	Tro (2)	yellow	15	CAM
<i>Aechmea aquilega</i> (Salisb.) Griseb.	Brom.	Gö	Tro (3)	yellow	20	CAM
<i>Aechmea bruggeri</i> Leme	Brom.	Heid	Tro (4)	purple	10	CAM
<i>Aechmea cylindrata</i> Lindm.	Brom.	Boc	Tro (5)	yellow	15	CAM
<i>Aechmea distichantha</i> Lem.	Brom.	Ber	Tro (6)	purple	10	CAM
<i>Aechmea eurycorymbus</i> Harms	Brom.	Ber	Tro (2)	orange	25	CAM
<i>Aechmea fasciata</i> (Lindl.) Baker	Brom.	Wup	Tro (7)	purple	35	CAM
<i>Aechmea gamosepala</i> Wittm.	Brom.	Wup	Tro (5)	blue	25	CAM
<i>Aechmea gracilis</i> Lindm.	Brom.	Gö	Tro (2)	purple	30	CAM
<i>Aechmea leptantha</i> (Harms) Leme & J.A.Siqueira	Brom.	Heid	Tro (8)	yellow	35	CAM
<i>Aechmea marauensis</i> Leme	Brom.	Heid	Tro (2)	purple	25	CAM
<i>Aechmea miniata discolor</i> (Beer) Beer ex Baker	Brom.	Wup	Tro (9)	blue	20	CAM
<i>Aechmea nudicaulis</i> (L.) Griseb.	Brom.	Boc	Tro (5)	yellow	15	CAM
<i>Aechmea penduliflora</i> Andre	Brom.	Heid	Tro (2)	orange	20	CAM
<i>Aechmea pyramidalis</i> Benth.	Brom.	Boc	Tro (2)	white	5	CAM
<i>Aechmea racinae</i> L.B.Sm.	Brom.	Wup	Tro (9)	yellow	15	CAM
<i>Aechmea recurvata</i> (Klotzsch) L.B.Sm.	Brom.	Gö	Tro (5)	purple	35	CAM
<i>Aechmea weilbachii</i> Didr.	Brom.	Gö	Tro (9)	purple	20	CAM
<i>Alcantarea geniculata</i> (Vell.) Harms	Till.	Heid	Tro (2)	yellow	40	C3
<i>Alcantarea imperialis</i> (Carriere) Harms	Till.	Heid	Chi (10)	matt-white	80	C3-CAM
<i>Billbergia amoena</i> (G.Lodd.) Lindl.	Brom.	Gö	Tro (5)	green	45	CAM
<i>Billbergia brasiliensis</i> L.B.Sm.	Brom.	Gö	Tro (2)	blue	25	CAM
<i>Billbergia buchholtzii</i> Mez	Brom.	Heid	Tro (2)	purple	35	CAM
<i>Billbergia distachia</i> (Vell.) Mez	Brom.	Gö	Tro 3	green	50	CAM
<i>Billbergia euphemiae</i> E.Morren	Brom.	Heid	Tro (11)	blue	40	C3
<i>Billbergia fosteriana</i> L.B.Sm.	Brom.	Gö	Tro (2)	blue	60	CAM
<i>Billbergia morelii</i> Brongn.	Brom.	Wup	Tro (8)	blue	50	CAM
<i>Billbergia nutans</i> H.Wendl. ex Regel	Brom.	Wup	Tro (2)	green	40	CAM
<i>Billbergia pyramidalis</i> (Sims) Lindl.	Brom.	Gö	Tro (8)	red	40	CAM
<i>Billbergia reichardtii</i> Wawra	Brom.	Heid	Tro (2)	purple	35	CAM
<i>Billbergia viridiflora</i> H.Wendl.	Brom.	Ber	Tro (3)	green	50	CAM
<i>Billbergia vittata</i> Brongn. ex C.Morel	Brom.	Gö	Tro (12)	blue	50	CAM
<i>Deuterocohnia brevispicata</i> Rauh & L.Hrom.	Pitc.	Ber	Tro /Ent (13)	pink	25	CAM
<i>Deuterocohnia longipetala</i> (Baker) Mez	Pitc.	Ber	Tro /Ent (2)	pink	40	CAM
<i>Deuterocohnia meiziana</i> subsp. <i>carmineoviridiflora</i> (Rauh) N.Schutz	Pitc.	Heid	Tro /Ent (2)	green	50	CAM
<i>Deuterocohnia recurvipetala</i> E.Gross	Pitc.	Heid	Tro /Ent (2)	yellow	10	CAM
<i>Dyckia choristaminea</i> Mez	Pitc.	Heid	Tro /Ent (14)	yellow	10	CAM
<i>Dyckia goehringii</i> E.Gross & Rauh	Pitc.	Heid	Tro /Ent (14)	orange	10	CAM
<i>Dyckia leptostachya</i> Baker	Pitc.	Heid	Tro /Ent (14)	yellow	10	CAM
<i>Dyckia vestita</i> Hassl.	Pitc.	Heid	Tro /Ent (14)	yellow	10	CAM
<i>Guzmania acorifolia</i> (Griseb.) Mez	Till.	Ber	Tro (2)	white	15	C3
<i>Guzmania calothyrsus</i> Mez	Till.	Wup	Chi (15)	matt-white	15	C3
<i>Guzmania conifera</i> (André) André ex Mez	Till.	Gö	Tro (2)	yellow	30	C3
<i>Guzmania cylindrica</i> L.B.Sm.	Till.	Gö	Chi (2)	matt-white	50	C3
<i>Guzmania farcimiformis</i> H.Luther	Till.	Gö	Chi (2)	matt-white	15	C3
<i>Guzmania killipiana</i> L.B.Sm.	Till.	Wup	Chi (9)	matt-white	30	C3
<i>Guzmania lingulata</i> (L.) Mez	Till.	Heid	Tro (16)	yellow	50	C3
<i>Guzmania melinonis</i> Regel	Till.	Gö	Tro (15)	yellow	30	C3
<i>Guzmania monostachia</i> (L.) Rusby ex Mez	Till.	Wup	Tro (3)	white	25	C3-CAM
<i>Guzmania osyana</i> (E.Morren) Mez	Till.	Gö	Tro (2)	yellow	35	C3
<i>Guzmania rhonhofiana</i> Harms	Till.	Wien	Tro (2)	white	25	C3
<i>Guzmania roseiflora</i> Rauh	Till.	Boc	Tro (2)	yellow	15	C3
<i>Guzmania sanguinea</i> (Andre) Andre ex Mez	Till.	Gö	Tro (2)	yellow	75	C3
<i>Guzmania variegata</i> L.B.Sm.	Till.	Ber	Tro (2)	red	30	C3
<i>Guzmania wittmackii</i> (Andre) Andre ex Mez	Till.	Gö	Tro (2)	white	90	C3
<i>Guzmania zahni</i> (Hook.f.) Mez	Till.	Wup	Tro (9)	yellow	30	C3-CAM
<i>Hohenbergia correia-araujoi</i> E.Pereira & Moutinho	Brom.	Ber	Tro (2)	yellow	10	CAM
<i>Hohenbergia leopoldo-horstii</i> E.Gross. Rauh & Leme	Brom.	Gö	Tro (2)	purple	10	CAM
<i>Hohenbergia rosea</i> L.B.Sm. & Read	Brom.	Heid	Tro (2)	purple	10	CAM

<i>Hohenbergia stellata</i> Schult. & Schult.f.	Brom.	Ber	Tro (2)	purple	10	CAM
<i>Hohenbergia utriculosa</i> Ule	Brom.	Ber	Tro (2)	purple	10	CAM
<i>Lemeltonia narthecioides</i> (C.Presl)	Till.	Gö	Sphi (2)	white	10	C3-CAM
Barfuss & W.Till						
<i>Lemeltonia scaligera</i> (Mez & Sodiro)	Till.	Gö	Sphi (2)	white	20	C3
Barfuss & W.Till						
<i>Neoregelia ampullacea</i> (E.Morren)	Brom.	Boc	Tro (11)	purple	15	CAM
L.B.Sm.						
<i>Neoregelia carolinae</i> (Beer) L.B.Sm.	Brom.	Wup	Psy (2)	purple	35	CAM
<i>Neoregelia compacta</i> (Mez) L.B.Sm.	Brom.	Gö	Tro (11)	pink	15	CAM
<i>Neoregelia farinosa</i> (Ule) L.B.Sm.	Brom.	Gö	Psy (2)	purple	50	CAM
<i>Neoregelia fosteriana</i> L.B.Sm.	Brom.	Gö	Tro (2)	purple	20	CAM
<i>Neoregelia johannis</i> (Carrière) L.B.Sm.	Brom.	Ber	Tro (8)	white	25	CAM
<i>Neoregelia kautskyi</i> E.Pereira	Brom.	Gö	Tro (2)	white	20	CAM
<i>Neoregelia laevis</i> (Mez) L.B.Sm.	Brom.	Heid	Tro (2)	white	20	CAM
<i>Neoregelia martinellii</i> W.Weber	Brom.	Ber	Tro (2)	white	20	CAM
<i>Neoregelia olens</i> (Hook.f.) L.B.Sm.	Brom.	Gö	Psy (2)	purple	40	CAM
<i>Neoregelia pineliana</i> (Lem.) L.B.Sm.	Brom.	Ber	Psy (2)	purple	40	CAM
<i>Neoregelia seideliana</i> L.B.Sm. & Reitz	Brom.	Gö	Psy (2)	purple	40	CAM
<i>Neoregelia wilsoniana</i> M.B.Foster	Brom.	Gö	Tro (2)	white	30	CAM
<i>Nidularium amazonicum</i> (Baker) Linden & É.Morren ex Lindm.	Brom.	Wup	Tro (2)	white	20	C3-CAM
<i>Nidularium innocentii</i> Lem.	Brom.	Gö	Tro (5)	white	50	C3
<i>Nidularium procerum</i> Lindm.	Brom.	Wup	Tro (7)	blue	20	CAM
<i>Nidularium purpureum</i> Beer	Brom.	Wup	Tro (2)	pink	20	CAM
<i>Nidularium rutilans</i> É.Morren	Brom.	Gö	Tro (5)	pink	10	CAM
<i>Nidularium scheremetiewii</i> Regel	Brom.	Gö	Tro (11)	blue	55	CAM
<i>Nidularium utriculosum</i> Ule	Brom.	Wup	Tro (2)	blue	30	CAM
<i>Pitcairnia bromeliifolia</i> L'Heritier	Pitc.	Gö	Tro (2)	yellow	40	C3
<i>Pitcairnia chiapensis</i> Miranda	Pitc.	Gö	Tro (2)	yellow	40	C3-CAM
<i>Pitcairnia chiriquensis</i> L.B.Sm.	Pitc.	Ber	Tro (2)	orange	45	C3
<i>Pitcairnia grafii</i> Rauh	Pitc.	Ber	Tro (2)	orange	50	C3
<i>Pitcairnia recurvata</i> (Scheidw.) K.Koch	Pitc.	Ber	Chi (2)	matt-white	80	C3
<i>Pitcairnia rubronigriflora</i> Rauh	Pitc.	Ber	Tro (2)	red	50	C3
<i>Pitcairnia sprucei</i> Baker	Pitc.	Ber	Tro (5)	red	60	C3
<i>Pitcairnia suaveolens</i> Lindl.	Pitc.	Ber	Tro (2)	yellow	50	C3
<i>Pitcairnia utcubambensis</i> Rauh	Pitc.	Wien	Tro (2)	red	60	C3
<i>Pitcairnia xanthocalyx</i> Mart.	Pitc.	Ber	Tro (2)	yellow	45	C3
<i>Pseudalcantarea grandis</i> (Schltdl.) Pinzón & Barfuss	Pitc.	Ber	Chi (17)	matt-white	90	C3
<i>Pseudalcantarea macropetala</i> (Wawra) Pinzón & Barfuss	Pitc.	Gö	Chi (18)	matt-white	30	C3-CAM
<i>Pseudalcantarea viridiflora</i> (Beer) Pinzón & Barfuss	Pitc.	Gö	Chi (7)	matt-white	50	C3
<i>Puya coerulea</i> var. <i>violacea</i> (Brongn.) L.B.Sm. & Looser	Pitc.	Heid	Tro (11)	blue	45	C3-CAM
<i>Puya densiflora</i> Harms	Pitc.	Heid	Tro (2)	purple	80	CAM
<i>Puya ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) L.B.Sm.	Pitc.	Heid	Chi (15)	matt-white	80	C3-CAM
<i>Puya spathacea</i> (Griseb.) Mez	Pitc.	Heid	Tro (11)	blue	30	C3
<i>Quesnelia edmundoi</i> L.B.Sm.	Brom.	Gö	Tro (2)	white	20	CAM
<i>Quesnelia lateralis</i> Wawra	Brom.	Gö	Tro (2)	blue	35	CAM
<i>Quesnelia quesneliana</i> (Brongn.) L.B.Sm.	Brom.	Gö	Tro (19)	purple	30	CAM
<i>Tillandsia achyrostachys</i> E.Morren	Till.	Gö	Tro (20)	green	55	CAM
<i>Tillandsia aeranthes</i> (Loisel.) Desf.	Till.	Gö	Tro (21)	purple	20	CAM
<i>Tillandsia caput-medusae</i> E.Morren	Till.	Gö	Tro (2)	purple	40	CAM
<i>Tillandsia circinnatoides</i> Matuda	Till.	Gö	Tro (2)	purple	40	CAM
<i>Tillandsia clavigera</i> Mez	Till.	Heid	Tro (2)	purple	20	C3
<i>Tillandsia concolor</i> L.B.Sm.	Till.	Gö	Tro (2)	pink	60	CAM
<i>Tillandsia flabellata</i> Baker	Till.	Gö	Tro (9)	purple	50	CAM
<i>Tillandsia foliosa</i> M.Martens & Galeotti	Till.	Gö	Tro (2)	purple	40	CAM
<i>Tillandsia funckiana</i> Baker	Till.	Wien	Tro (2)	red	45	CAM
<i>Tillandsia gerdiae</i> Ehlers	Till.	Gö	Tro (2)	purple	45	CAM
<i>Tillandsia heterophylla</i> E.Morren	Till.	Gö	Chi (22)	matt-white	70	C3
<i>Tillandsia ionantha</i> Planch.	Till.	Gö	Tro (2)	purple	50	CAM
<i>Tillandsia ixioides</i> Griseb.	Till.	Gö	Tro (2)	yellow	25	CAM
<i>Tillandsia makoyana</i> Baker	Till.	Heid	Tro (2)	purple	35	CAM
<i>Tillandsia malzinei</i> (E.Morren) Baker	Till.	Gö	Tro (2)	white	50	C3
<i>Tillandsia polystachia</i> (L.) L.	Till.	Gö	Tro (2)	purple	40	CAM
<i>Tillandsia ponderosa</i> L.B.Sm.	Till.	Heid	Tro (9)	purple	65	C3-CAM
<i>Tillandsia propagulifera</i> Rauh	Till.	Heid	Tro (2)	purple	30	CAM
<i>Tillandsia rauhii</i> L.B.Sm.	Till.	Ber	Chi (2)	purple	90	C3-CAM
<i>Tillandsia roland-gosselinii</i> Mez	Till.	Boc	Tro (2)	purple	30	CAM
<i>Tillandsia tricolor</i> Schltdl. & Cham.	Till.	Ber	Tro (2)	purple	40	CAM
<i>Vriesea bituminosa</i> Wawra	Till.	Ber	Chi (9)	matt-white	55	C3
<i>Vriesea bleheri</i> Roeth & W. Weber	Till.	Gö	Tro (2)	yellow	55	C3

<i>Vriesea drepanocarpa</i> (Baker) Mez	Till.	Gö	Tro (8)	yellow	40	C3
<i>Vriesea dubia</i> (L.B.Sm.) L.B.Sm.	Till.	Gö	Tro (2)	white	20	C3
<i>Vriesea eltoniana</i> E.Pereira & Ivo	Till.	Gö	Tro (2)	yellow	30	C3
<i>Vriesea fenestralis</i> Linden & Andre	Till.	Gö	Chi (5)	matt-white	40	C3-CAM
<i>Vriesea friburgensis tucumanensis</i> (Mez) L.B.Sm.	Till.	Gö	Tro (5)	yellow	35	C3
<i>Vriesea guttata</i> Linden & Andre	Till.	Wup	Tro (2)	yellow	25	C3
<i>Vriesea maxoniana</i> (L.B.Sm.) L.B.Sm.	Till.	Ber	Tro (15)	yellow	50	C3
<i>Vriesea nanuzae</i> Leme	Till.	Heid	Chi (23)	matt-white	30	C3
<i>Vriesea racinae</i> L.B.Sm.	Till.	Ber	Chi (2)	matt-white	40	C3
<i>Vriesea saundersii</i> (Carriere) E.Morren	Till.	Heid	Tro (2)	yellow	50	C3
<i>Vriesea scalaris</i> E.Morren	Till.	Ber	Tro (9)	yellow	55	C3-CAM
<i>Vriesea unilateralis</i> (Baker) Mez	Till.	Gö	Chi (9)	matt-white	30	C3
<i>Wallisia cyanea</i> Barfuss & W.Till	Till.	Gö	Psy (2)	purple	55	C3
<i>Wallisia lindeniana</i> (Regel) E.Morren	Till.	Gö	Psy (2)	blue	45	C3
<i>Wallisia pretiosa</i> (Mez) Barfuss & W.Till	Till.	Gö	Psy (2)	purple	52	C3
<i>Werauhia gladioliflora</i> (H.Wendland) J.R.Grant	Till.	Gö	Chi (15)	matt-white	40	C3
<i>Werauhia nutans</i> (L.B.Sm.) J.R.Grant	Till.	Gö	Chi (9)	matt-white	35	C3
<i>Werauhia patzeltii</i> (Rauh) J.R.Grant	Till.	Gö	Tro (2)	white	15	C3
<i>Werauhia pectinata</i> (L.B.Sm.) J.R.Grant	Till.	Gö	Chi (2)	matt-white	35	C3
<i>Werauhia sanguinolenta</i> (Linden ex Cogniaux & Marchal) J.R.Grant	Till.	Gö	Chi (9)	matt-white	30	C3
<i>Werauhia werckleana</i> (Mez) J.R.Grant	Till.	Gö	Chi (2)	matt-white	40	C3

Subfamily: Brom. = Bromelioideae, Till. = Tillandsioideae, Pitc. = Pitcairnioideae. Botanical garden/University: Ber = Berlin (Germany), Boc = Bochum (Germany), Gö = Göttingen (Germany), Heid = Heidelberg (Germany), Wien (Austria), Wup = Wuppertal (Germany). Pollination type: Chi = chiropterophilous, Sphi = sphingophilous, Tro = trochilophilous, Ent = entomophilous, Psy = psychophilous. Bold type = bat-pollinated bromeliads.

References

1. **Crayn, D.M., Winter, K., Schulte, K., Smith, J.A.** (2015). Photosynthetic pathways in Bromeliaceae: Phylogenetic and ecological significance of CAM and C 3 based on carbon isotope ratios for 1893 species. *Bot J Linn Soc* 178(2):169–221. doi:10.1111/boj.12275
2. classified via flower morphology and pollination syndrome.
3. **Zanata, T.B.** (2014). Macroecologia das interações entre plantas e aves nectarívoras. PhD thesis.
4. **Dias, L.C.D.** (2014). Biologia reprodutiva de *Aechmea bruggeri* Leme (Bromeliaceae): uma espécie endêmica da Floresta Atlântica ameaçada de extinção. PhD thesis.
5. **Martín González, A.M., Dalsgaard, B., Nogués-Bravo, D., Graham, C.H., Schleuning, M., Maruyama, P.K., et al.** (2015). The macroecology of phylogenetically structured hummingbird-plant networks. *Global Ecology and Biogeography* 24(11):1212–24. doi:10.1111/geb.12355
6. **Pierce, S., Gottsberger, R.** (2001). Observations of hummingbird visits to bromeliads at the Cerro Jefe cloud forest, Panama. *Journal of the Bromeliad Society*: 25–34.
7. **Benzing, D.H., Bennett, B.C.** (2000). Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. doi:10.1017/CBO9780511565175
8. **Tavares, D.C., Freitas, L., Gaglianone, M.C.** (2016). Data compilation of hummingbird-pollinated plant species in the Brazilian Atlantic rain forest. *Journal of Tropical Ecology*. 32(04):335-339. doi:10.1594/PANGAEA.859056

9. **Krömer, T., Kessler, M., Lohaus, G., Schmidt-Lebuhn, A.N.** (2008). Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biol (Stuttg)* 10(4):502–11. doi:10.1111/j.1438-8677.2008.00058.x
10. **Santos, V.L., Versieux, L.M., Wanderley, M.D., Da Luz, C.F.** (2017). Pollen morphology of *Alcantarea* giant bromeliads (Bromeliaceae, Tillandsioideae). *Grana* 57(1-2):117–36. doi:10.1080/00173134.2017.1310920
11. **Martinelli, G.** (1995). Reproductive biology of Bromeliaceae in the atlantic rainforest of southeastern Brazil. PhD thesis.
12. **Rodrigues, L.C., Rodrigues, M.** (2014). Flowers visited by hummingbirds in the open habitats of the southeastern Brazilian mountaintops: Species composition and seasonality. *Braz J Biol* 74(3):659–76. doi:10.1590/bjb.2014.0097
13. **Schütz, N.** (2012). Systematics and evolution of the genus *Deuterocohnia* Mez (Bromeliaceae). PhD thesis.
14. **Krapp, F., Barros Pinangé, D.S. de, Benko-Iseppon, A.M., Leme, E.M., Weising, K.** (2014). Phylogeny and evolution of *Dyckia* (Bromeliaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences. *Plant Syst Evol* 100(17):597. doi:10.1007/s00606-014-0985-0
15. **Krömer, T., Kessler, M., Herzog, S.K.** (2006). Distribution and flowering ecology of bromeliads along two climatically contrasting elevational transects in the Bolivian Andes. *Biotropica* 38(2):183–95. doi:10.1111/j.1744-7429.2006.00124.x
16. **Pierce, S., Winter, K., Griffiths, H.** (2002). The role of CAM in high rainfall cloud forests: An in situ comparison of photosynthetic pathways in Bromeliaceae. *Plant Cell Environ* 25(9):1181–9. doi:10.1046/j.1365-3040.2002.00900.x
17. **Mosti, S., Ross Friedman, C., Pacini, E., Brighigna, L., Papini, A.** (2013). Nectary ultrastructure and secretory modes in three species of *Tillandsia* (Bromeliaceae) that have different pollinators. *Botany* 91(11):786–98. doi:10.1139/cjb-2013-0126
18. **Aguilar-Rodríguez, P.A., MacSwiney G, M.C., Krömer, T., García-Franco, J.G., Knauer, A., Kessler, M.** (2014). First record of bat-pollination in the species-rich genus *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 113(6):1047–55. doi:10.1093/aob/mcu031
19. **Fonseca, L.C., Vizentin-Bugoni, J., Rech, A.R., Alves, M.A.** (2015). Plant-hummingbird interactions and temporal nectar availability in a restinga from Brazil. *An Acad Bras Cienc* 87(4):2163–75. doi:10.1590/0001-3765201520140349
20. **González-Astorga, J., Cruz-Angón, A., Flores-Palacios, A., Vovides, A.P.** (2004). Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 94(4):545–51. doi:10.1093/aob/mch171
21. **Maruyama, P.K.** (2015). Plant-hummingbird interactions = natural history and ecological networks = Interação entre plantas e beija-flores: História natural e redes ecológicas. PhD thesis.
22. **Aguilar-Rodríguez, P.A., Krömer, T., García-Franco, J.G., MacSwiney G, M.C.** (2016). From dusk till dawn: nocturnal and diurnal pollination in the epiphyte *Tillandsia heterophylla* (Bromeliaceae). *Plant Biol (Stuttg)* 18(1):37–45. doi:10.1111/plb.12319
23. **Elton, M.C.** (1997). Revision of the lithophytic *Vriesea* species from Minas Gerais State, Brazil: Part II. *Journal of the Bromeliad Society* (47):168–77.

Supplementary Table S2: Concentrations of the main three sugars in nectar of different Bromeliaceae species.

Species	Sum sugar [mM]	Percentages of sugars [%]			Sucrose-to-hexoses ratio
		Glucose	Fructose	Sucrose	
<i>Aechmea abbreviata</i>	1025 ± 312	24	22	54	1.3 ± 0.5
<i>A. aquilega</i>	1312 ± 108	19	20	61	1.6 ± 0.2
<i>A. bruggeri</i>	1290 ± 54	14	15	71	2.5 ± 0.1
<i>A. cylindrata</i>	1122 ± 209	19	13	68	2.4 ± 1.1
<i>A. distichantha</i>	1170 ± 90	17	14	69	2.3 ± 0.4
<i>A. eurycorymbus</i>	1803 ± 782	10	8	82	5.2 ± 2.5
<i>A. fasciata</i>	518 ± 13	21	21	58	1.4 ± 0.2
<i>A. gamosepala</i>	1127 ± 96	11	11	78	3.4 ± 0.1
<i>A. gracilis</i>	641 ± 57	12	18	70	2.3 ± 0.1
<i>A. leptantha</i>	1131 ± 27	21	22	57	1.3 ± 0.0
<i>A. marauensis</i>	1013 ± 277	23	26	51	1.1 ± 0.3
<i>A. miniata discolor</i>	1016 ± 23	15	17	68	2.1 ± 0.3
<i>A. nudicaulis</i>	620 ± 147	24	20	56	1.3 ± 0.1
<i>A. penduliflora</i>	1001 ± 58	15	19	66	2.0 ± 0.3
<i>A. pyramidalis</i>	1559 ± 142	11	7	82	4.6 ± 0.8
<i>A. racinae</i>	1177 ± 127	20	18	62	1.6 ± 0.3
<i>A. recurvata</i>	746 ± 73	21	13	66	2.0 ± 0.5
<i>A. weilbachii</i>	859 ± 75	19	20	61	1.6 ± 0.0
<i>Alcantarea geniculata</i>	978 ± 141	11	23	66	1.9 ± 0.2
<i>Alc. imperialis</i>	683 ± 226	31	31	38	0.6 ± 0.1
<i>Billbergia amoena</i>	430 ± 113	13	9	78	3.5 ± 0.3
<i>B. brasiliensis</i>	1011 ± 497	19	16	65	1.9 ± 0.7
<i>B. buchholtzii</i>	2289 ± 119	10	15	75	3.0 ± 0.7
<i>B. distachia</i>	1692 ± 598	12	18	70	2.3 ± 0.3
<i>B. euphemiae</i>	2022 ± 904	10	18	72	2.6 ± 0.3
<i>B. fosteriana</i>	1180 ± 189	16	16	68	2.2 ± 0.6
<i>B. morelii</i>	641 ± 55	15	15	70	2.4 ± 0.2
<i>B. nutans</i>	862 ± 39	8	9	83	4.8 ± 0.3
<i>B. pyramidalis</i>	1621 ± 168	17	18	65	1.9 ± 0.0
<i>B. reichardtii</i>	1396 ± 472	9	15	76	3.2 ± 0.2
<i>B. viridiflora</i>	1563 ± 393	21	20	59	1.5 ± 0.2
<i>B. vittata</i>	839 ± 181	8	9	83	4.8 ± 0.1
<i>Deuterocohnia brevispicata</i>	1444 ± 241	15	14	71	2.5 ± 0.4
<i>Deu. longipetala</i>	406 ± 235	9	9	82	5.5 ± 3.4
<i>Deu. meziana</i> subsp. <i>carmineoviridiflora</i>	504 ± 155	14	14	72	2.6 ± 0.1
<i>Deu. recurvipetala</i>	1020 ± 107	12	13	75	3.0 ± 0.1
<i>Dyckia choristaminea</i>	725 ± 286	20	14	66	2.0 ± 0.9
<i>D. goehringii</i>	736 ± 62	9	7	84	5.5 ± 0.5
<i>D. leptostachya</i>	1200 ± 38	21	17	62	1.7 ± 0.6
<i>D. vestita</i>	676 ± 272	14	11	75	2.9 ± 0.3
<i>Guzmania acorifolia</i>	296 ± 230	40	11	49	1.0 ± 0.2
<i>G. calothyrsus</i>	771 ± 33	29	30	41	0.7 ± 0.1
<i>G. conifera</i>	611 ± 25	15	18	67	2.1 ± 0.2
<i>G. cylindrica</i>	571 ± 52	41	33	26	0.4 ± 0.1
<i>G. farcimiformis</i>	583 ± 31	37	34	29	0.4 ± 0.1
<i>G. killipiana</i>	794 ± 56	39	35	26	0.4 ± 0.2
<i>G. lingulata</i>	667 ± 247	8	9	83	5.1 ± 1.3
<i>G. melinonis</i>	1048 ± 24	19	21	60	1.5 ± 0.2
<i>G. monostachia</i>	903 ± 61	17	18	65	1.8 ± 0.1
<i>G. osyana</i>	1409 ± 110	23	27	50	1.1 ± 0.4
<i>G. rhonhofiana</i>	248 ± 16	24	19	57	1.4 ± 0.4
<i>G. roseiflora</i>	772 ± 220	26	18	56	1.3 ± 0.5
<i>G. sanguinea</i>	996 ± 405	22	19	59	1.6 ± 0.6
<i>G. variegata</i>	513 ± 106	21	19	60	1.6 ± 0.4
<i>G. wittmackii</i>	673 ± 311	12	11	77	3.4 ± 0.5
<i>G. zahnii</i>	439 ± 39	31	22	47	0.9 ± 0.2
<i>Hohenbergia correia-araujoi</i>	1343 ± 147	21	17	62	1.7 ± 0.4
<i>H. leopoldo-horstii</i>	1598 ± 626	22	15	63	1.8 ± 0.6
<i>H. rosea</i>	1680 ± 200	27	25	48	0.9 ± 0.0
<i>H. stellata</i>	694 ± 183	27	19	54	1.2 ± 0.4
<i>H. utriculosa</i>	2147 ± 847	29	21	50	1.0 ± 0.2

<i>Lemeltonia narthecioides</i>	378 ± 174	16	18	66	2.0 ± 0.3
<i>L. scaligera</i>	894 ± 288	18	15	67	2.0 ± 0.2
<i>Neoregelia ampullacea</i>	1431 ± 161	26	21	53	1.1 ± 0.1
<i>N. carolinae</i>	1176 ± 194	24	20	56	1.3 ± 0.1
<i>N. compacta</i>	1153 ± 245	12	13	75	3.0 ± 0.4
<i>N. farinosa</i>	1203 ± 426	18	14	68	2.1 ± 0.2
<i>N. fosteriana</i>	2064 ± 342	18	18	64	1.8 ± 0.1
<i>N. johannis</i>	1197 ± 78	15	14	71	2.4 ± 0.1
<i>N. kautskyi</i>	928 ± 172	21	21	58	1.4 ± 0.2
<i>N. laevis</i>	1669 ± 166	19	16	65	1.9 ± 0.0
<i>N. martinellii</i>	1034 ± 86	23	19	58	1.4 ± 0.2
<i>N. olens</i>	999 ± 60	27	19	54	1.2 ± 0.2
<i>N. pineliana</i>	1327 ± 566	17	15	68	2.2 ± 0.2
<i>N. seideliana</i>	1285 ± 85	24	16	60	1.5 ± 0.0
<i>N. wilsoniana</i>	2005 ± 660	25	25	50	1.0 ± 0.2
<i>Nidularium amazonicum</i>	1581 ± 86	14	15	71	2.5 ± 0.1
<i>Nid. innocentii</i>	917 ± 247	24	19	57	1.4 ± 0.3
<i>Nid. procerum</i>	1125 ± 104	11	13	76	3.2 ± 0.4
<i>Nid. purpureum</i>	1112 ± 168	13	14	73	2.7 ± 0.2
<i>Nid. rutilans</i>	768 ± 40	19	19	62	1.6 ± 0.2
<i>Nid. scheremetiewii</i>	2553 ± 629	15	17	68	2.1 ± 0.1
<i>Nid. utriculosum</i>	899 ± 13	20	20	60	1.5 ± 0.2
<i>Pitcairnia bromeliifolia</i>	981 ± 294	16	9	75	3.1 ± 0.6
<i>Pit. chiapensis</i>	397 ± 6	13	10	77	3.5 ± 0.9
<i>Pit. chiriquensis</i>	923 ± 204	19	12	69	2.4 ± 1.2
<i>Pit. grafii</i>	1170 ± 235	22	21	57	1.3 ± 0.1
<i>Pit. recurvata</i>	715 ± 282	40	27	33	0.5 ± 0.1
<i>Pit. rubronigriflora</i>	751 ± 81	25	23	52	1.1 ± 0.1
<i>Pit. sprucei</i>	832 ± 146	13	14	73	2.7 ± 0.5
<i>Pit. suaveolens</i>	693 ± 73	28	23	49	1.0 ± 0.1
<i>Pit. utcubambensis</i>	484 ± 62	22	18	60	1.5 ± 0.1
<i>Pit. xanthocalyx</i>	731 ± 43	25	23	52	1.1 ± 0.1
<i>Pseudalcantarea grandis</i>	844 ± 304	34	35	31	0.5 ± 0.1
<i>Pse. macropetala</i>	1081 ± 59	32	31	37	0.6 ± 0.1
<i>Pse. viridiflora</i>	732 ± 284	39	26	35	0.5 ± 0.1
<i>Puya coerulea</i> var. <i>violacea</i>	1027 ± 67	25	19	56	1.3 ± 0.0
<i>P. densiflora</i>	991 ± 252	16	14	70	2.3 ± 0.4
<i>P. ferruginea</i>	1007 ± 413	42	34	24	0.3 ± 0.1
<i>P. spathacea</i>	1204 ± 95	15	17	68	2.1 ± 0.0
<i>Quesnelia edmundoi</i>	1121 ± 797	30	24	46	0.9 ± 0.2
<i>Q. lateralis</i>	1125 ± 322	15	13	72	2.6 ± 0.6
<i>Q. quesneliana</i>	1096 ± 137	20	20	60	1.5 ± 0.0
<i>Tillandsia achyrostachys</i>	1148 ± 215	18	12	70	2.4 ± 0.4
<i>T. aeranthos</i>	1150 ± 286	22	18	60	1.5 ± 0.0
<i>T. caput-medusae</i>	816 ± 68	10	12	78	3.6 ± 0.2
<i>T. circinnatoides</i>	329 ± 145	8	12	80	4.0 ± 0.1
<i>T. clavigera</i>	455 ± 63	33	16	51	1.1 ± 0.2
<i>T. concolor</i>	551 ± 272	9	18	73	2.8 ± 0.4
<i>T. flabellata</i>	950 ± 24	22	20	58	1.4 ± 0.2
<i>T. foliosa</i>	1217 ± 261	10	13	77	3.5 ± 0.6
<i>T. funckiana</i>	389 ± 136	6	9	85	6.1 ± 1.8
<i>T. gerdae</i>	486 ± 87	7	5	88	8.1 ± 2.6
<i>T. heterophylla</i>	978 ± 75	38	39	23	0.3 ± 0.0
<i>T. ionantha</i>	483 ± 91	6	9	75	6.4 ± 2.3
<i>T. ixioides</i>	1271 ± 42	12	13	75	3.0 ± 0.3
<i>T. makoyana</i>	1658 ± 312	5	9	86	6.0 ± 0.6
<i>T. malzinei</i>	652 ± 61	10	16	74	2.9 ± 0.4
<i>T. polystachia</i>	554 ± 128	20	15	65	1.9 ± 0.4
<i>T. ponderosa</i>	736 ± 20	16	15	69	2.2 ± 0.1
<i>T. propagulifera</i>	232 ± 51	13	15	72	2.6 ± 0.2
<i>T. rauhii</i>	496 ± 72	41	30	29	0.4 ± 0.1
<i>T. roland-gosselinii</i>	1042 ± 53	8	7	85	5.6 ± 0.4
<i>T. tricolor</i>	824 ± 211	7	7	86	6.1 ± 0.5
<i>Vriesea bituminosa</i>	1477 ± 291	33	31	36	0.6 ± 0.0
<i>V. bleheri</i>	703 ± 117	16	17	67	2.0 ± 0.4
<i>V. drepanocarpa</i>	1082 ± 479	11	14	75	3.3 ± 1.0
<i>V. dubia</i>	337 ± 124	18	19	63	2.0 ± 1.3
<i>V. eltoniana</i>	738 ± 82	19	15	66	2.2 ± 1.1

<i>V. fenestralis</i>	961 ± 155	37	37	26	0.4 ± 0.1
<i>V. friburgensis tucumanensis</i>	1300 ± 80	17	17	66	2.0 ± 0.1
<i>V. guttata</i>	2249 ± 408	18	13	69	2.2 ± 0.4
<i>V. maxoniana</i>	353 ± 53	9	7	84	5.2 ± 0.6
<i>V. nanuzae</i>	819 ± 402	33	26	41	0.7 ± 0.0
<i>V. racinae</i>	942 ± 192	40	32	28	0.4 ± 0.2
<i>V. saundersii</i>	530 ± 75	18	8	74	3.1 ± 1.0
<i>V. scalaris</i>	966 ± 108	7	8	85	5.4 ± 0.1
<i>V. unilateralis</i>	509 ± 84	41	33	26	0.4 ± 0.2
<i>Wallisia cyanea</i>	606 ± 266	18	16	66	2.0 ± 0.8
<i>W. lindeniana</i>	944 ± 384	14	13	73	2.9 ± 1.2
<i>W. pretiosa</i>	321 ± 99	10	9	81	5.0 ± 2.7
<i>Werauhia gladioliflora</i>	1035 ± 109	34	32	34	0.5 ± 0.0
<i>Wer. nutans</i>	1024 ± 402	37	30	33	0.5 ± 0.2
<i>Wer. patzeltii</i>	861 ± 74	20	15	65	1.9 ± 0.3
<i>Wer. pectinata</i>	632 ± 36	50	35	15	0.2 ± 0.1
<i>Wer. sanguinolenta</i>	1057 ± 205	36	26	38	0.6 ± 0.1
<i>Wer. werckleana</i>	1232 ± 256	41	35	24	0.3 ± 0.0

Bold type = bat-pollinated bromeliads.

Supplementary Table S3: Amino acid concentration, proportions of the most abundant amino acids and the ratio of sugars to amino acids in nectar of different Bromeliaceae species.

Species	Sum amino acids [mM]	Percentages of amino acids [%]				Sum sugars [mM]/Sum amino acids [mM]
		Asn & Gln	Pro	Essentia I	Residual	
<i>Aechmea abbreviata</i>	3.6 ± 2.4	65	1	14	20	281
<i>A. aquilega</i>	2.0 ± 0.2	6	31	38	25	666
<i>A. bruggeri</i>	0.2 ± 0.0	16	14	23	47	6589
<i>A. cylindrata</i>	0.3 ± 0.1	38	16	22	24	4063
<i>A. distichantha</i>	0.7 ± 0.3	44	8	21	27	1690
<i>A. eurycorymbus</i>	1.7 ± 1.2	41	1	30	28	1036
<i>A. fasciata</i>	0.5 ± 0.0	28	4	39	29	963
<i>A. gamosepala</i>	1.1 ± 0.1	64	15	8	13	1073
<i>A. gracilis</i>	2.1 ± 0.1	18	1	39	42	299
<i>A. leptantha</i>	0.9 ± 0.3	21	55	7	17	1198
<i>A. marauensis</i>	0.4 ± 0.2	12	4	31	53	2754
<i>A. miniata discolor</i>	1.7 ± 0.6	16	31	27	26	596
<i>A. nudicaulis</i>	0.4 ± 0.0	17	23	26	34	1617
<i>A. penduliflora</i>	0.2 ± 0.1	22	14	28	36	4660
<i>A. pyramidalis</i>	1.3 ± 0.4	30	4	25	41	1221
<i>A. racinae</i>	0.4 ± 0.1	62	2	16	20	3108
<i>A. recurvata</i>	0.9 ± 0.0	47	1	26	26	859
<i>A. weilbachii</i>	0.8 ± 0.1	45	0	28	27	1107
<i>Alcantarea geniculata</i>	0.7 ± 0.3	73	1	5	21	1413
Alc. imperialis	1.0 ± 0.2	34	12	30	24	715
<i>Billbergia amoena</i>	0.1 ± 0.1	66	1	18	15	2975
<i>B. brasiliensis</i>	0.1 ± 0.0	15	53	11	21	8544
<i>B. buchholtzii</i>	0.2 ± 0.0	40	0	17	43	9658
<i>B. distachia</i>	0,7 ± 0,2	46	13	20	21	534
<i>B. euphemiae</i>	0.2 ± 0.1	54	17	12	17	10044
<i>B. fosteriana</i>	0.6 ± 0.3	46	0	19	35	1608
<i>B. morelii</i>	0.6 ± 0.1	37	17	16	30	1112
<i>B. nutans</i>	0.4 ± 0.1	26	51	10	13	2392
<i>B. pyramidalis</i>	0.1 ± 0.1	32	3	16	49	14629
<i>B. reichardtii</i>	0.1 ± 0.0	35	7	21	37	24579
<i>B. viridiflora</i>	0.8 ± 0.6	27	3	36	34	2010
<i>B. vittata</i>	0.1 ± 0.0	29	27	18	26	11551
<i>Deuterocohnia brevispicata</i>	1.6 ± 0.2	55	1	24	20	885
<i>Deu. longipetala</i>	3.8 ± 0.2	70	0	12	18	108
<i>Deu. meziana subsp. carmineoviridiflora</i>	0.2 ± 0.1	21	0	24	55	2978
<i>Deu. recurvipetala</i>	0.7 ± 0.3	83	2	7	8	1559
<i>Dyckia choristaminea</i>	7.1 ± 0.1	57	1	25	17	102
<i>D. goehringii</i>	1.2 ± 0.4	24	11	30	35	634
<i>D. leptostachya</i>	0.3 ± 0.2	34	26	11	29	3391
<i>D. vestita</i>	2.7 ± 1.0	53	4	20	23	217
<i>Guzmania acorifolia</i>	6.6 ± 1.1	34	0	40	26	45
G. calothyrsus	1.2 ± 0.2	41	2	36	21	665
<i>G. conifera</i>	1.6 ± 0.0	17	36	27	20	371
G. cylindrica	0.3 ± 0.1	28	2	46	24	1601
G. farcimiformis	2.1 ± 0.3	34	3	29	34	279
G. killipiana	7.3 ± 0.9	43	1	21	35	109
<i>G. lingulata</i>	7.8 ± 2.9	59	0	21	20	79
<i>G. melinonis</i>	3.1 ± 0.6	41	1	38	20	342
<i>G. monostachia</i>	0.1 ± 0.0	27	14	31	28	6512
<i>G. osyana</i>	2.3 ± 1.1	34	3	31	32	616
<i>G. rhonhofiana</i>	0.4 ± 0.5	26	28	25	21	563
<i>G. roseiflora</i>	1.9 ± 0.9	53	0	37	10	411
<i>G. sanguinea</i>	1.5 ± 1.6	44	1	24	31	674
<i>G. variegata</i>	1.0 ± 0.2	44	1	29	26	504
<i>G. wittmackii</i>	0.5 ± 0.1	13	6	35	46	1476
<i>G. zahnii</i>	2.1 ± 0.1	57	0	25	18	206
<i>Hohenbergia correia-araujoii</i>	0.2 ± 0.2	7	2	33	58	6148
<i>H. leopoldo-horstii</i>	0.6 ± 0.3	24	2	30	44	2815
<i>H. rosea</i>	0.2 ± 0.1	33	0	26	41	6945

<i>H. stellata</i>	1.4 ± 1.3	17	0	40	43	513
<i>H. utriculosa</i>	0.9 ± 0.5	40	0	27	33	2470
<i>Lemeltonia narthecioides</i>	5.3 ± 3.4	79	0	11	10	71
<i>L. scaligera</i>	0.3 ± 0.0	49	1	18	32	3519
<i>Neoregelia ampullacea</i>	3.7 ± 1.6	28	2	35	35	386
<i>N. carolinae</i>	1.9 ± 0.3	24	1	29	46	637
<i>N. compacta</i>	2.2 ± 0.3	23	0	35	42	537
<i>N. farinosa</i>	0.2 ± 0.1	40	6	35	19	7176
<i>N. fosteriana</i>	0.7 ± 0.1	19	3	32	46	3190
<i>N. johannis</i>	0.4 ± 0.1	15	0	44	41	2786
<i>N. kautskyi</i>	0.2 ± 0.1	33	8	25	34	4010
<i>N. laevis</i>	1.6 ± 1.1	15	2	39	44	880
<i>N. martinellii</i>	0.8 ± 0.4	21	3	22	54	1360
<i>N. olens</i>	6.7 ± 0.9	21	0	44	35	150
<i>N. pineliana</i>	0.5 ± 0.3	2	19	12	67	2465
<i>N. seideliana</i>	0.1 ± 0.0	23	1	44	32	12880
<i>N. wilsoniana</i>	0.3 ± 0.0	43	0	29	28	5891
<i>Nidularium amazonicum</i>	1.8 ± 0.2	58	0	15	27	893
<i>Nid. innocentii</i>	1.5 ± 0.4	23	0	31	46	614
<i>Nid. procerum</i>	2.6 ± 0.9	59	0	15	26	441
<i>Nid. purpureum</i>	2.4 ± 0.9	13	0	30	57	466
<i>Nid. rutilans</i>	0.3 ± 0.0	30	0	42	28	2632
<i>Nid. scheremetiewii</i>	2.4 ± 0.7	39	0	28	33	1063
<i>Nid. utriculosum</i>	0.4 ± 0.0	36	2	32	30	2024
<i>Pitcairnia bromeliifolia</i>	16.2 ± 2.5	40	1	21	38	47
<i>Pit. chiapensis</i>	8.2 ± 0.5	11	0	32	57	49
<i>Pit. chiriquensis</i>	2.5 ± 0.6	24	1	24	51	371
<i>Pit. grafii</i>	12.6 ± 2.8	30	0	12	58	64
<i>Pit. recurvata</i>	0.3 ± 0.0	38	5	29	28	2533
<i>Pit. rubronigriflora</i>	6.6 ± 1.5	47	1	9	43	114
<i>Pit. sprucei</i>	13.0 ± 3.9	46	1	14	39	47
<i>Pit. suaveolens</i>	0.8 ± 0.2	32	5	31	32	909
<i>Pit. utcubambensis</i>	11.3 ± 1.7	20	0	35	45	39
<i>Pit. xanthocalyx</i>	0.9 ± 0.0	33	1	24	42	819
<i>Pseudalcantarea grandis</i>	3.9 ± 1.4	32	0	18	50	219
<i>Pse. macropetala</i>	1.6 ± 0.3	22	1	34	43	678
<i>Pse. viridiflora</i>	0.7 ± 0.1	20	2	17	61	1002
<i>Puya coerulea</i> var. <i>violacea</i>	3.9 ± 1.0	24	0	35	41	261
<i>P. densiflora</i>	0.3 ± 0.0	24	1	44	31	3883
<i>P. ferruginea</i>	3.9 ± 0.9	15	57	15	13	256
<i>P. spathacea</i>	0.7 ± 0.2	26	0	48	26	1734
<i>Quesnelia edmundoi</i>	1.4 ± 0.3	41	1	29	29	776
<i>Q. lateralis</i>	0.4 ± 0.2	82	3	8	7	2647
<i>Q. quesneliana</i>	1.4 ± 0.3	24	2	26	48	799
<i>Tillandsia achyrostachys</i>	0.2 ± 0.0	56	2	18	24	7314
<i>T. aeranthos</i>	1.4 ± 0.1	30	1	29	40	814
<i>T. caput-medusae</i>	0.4 ± 0.1	43	0	26	31	2038
<i>T. circinnatoides</i>	0.3 ± 0.1	36	3	41	20	949
<i>T. clavigera</i>	0.7 ± 0.5	22	6	38	34	643
<i>T. concolor</i>	0.2 ± 0.1	47	3	7	43	2827
<i>T. flabellata</i>	1.3 ± 0.4	61	5	18	16	749
<i>T. foliosa</i>	0.5 ± 0.1	31	12	18	39	2670
<i>T. funckiana</i>	2.0 ± 1.0	40	1	37	22	197
<i>T. gerdae</i>	1.4 ± 0.5	61	1	13	25	341
<i>T. heterophylla</i>	0.3 ± 0.0	41	2	25	32	3048
<i>T. ionantha</i>	0.6 ± 0.0	29	7	11	53	800
<i>T. ixioides</i>	1.4 ± 0.8	48	1	33	18	928
<i>T. makoyana</i>	0.2 ± 0.0	20	5	34	41	7260
<i>T. malzinei</i>	0.5 ± 0.1	5	0	56	39	1251
<i>T. polystachia</i>	0.1 ± 0.1	4	61	10	25	4390
<i>T. ponderosa</i>	0.1 ± 0.0	30	12	4	54	7907
<i>T. propagulifera</i>	0.2 ± 0.1	27	26	21	26	1083
<i>T. rauhii</i>	7.4 ± 0.3	59	0	24	17	68
<i>T. roland-gosselinii</i>	0.2 ± 0.0	25	4	39	32	5909
<i>T. tricolor</i>	1.3 ± 0.5	36	0	26	38	620
<i>Vriesea bituminosa</i>	2.8 ± 0.2	46	14	20	20	525
<i>V. bleheri</i>	0.1 ± 0.0	32	20	12	36	13338
<i>V. drepanocarpa</i>	0.2 ± 0.1	30	7	7	56	5516

<i>V. dubia</i>	3.6 ± 0.1	60	0	24	16	94
<i>V. eltoniana</i>	0.1 ± 0.0	43	1	20	36	7994
<i>V. fenestralis</i>	1.2 ± 0.4	22	8	47	23	863
<i>V. friburgensis</i>	1.4 ± 0.1	40	0	31	29	919
<i>tucumanensis</i>						
<i>V. guttata</i>	0.6 ± 0.1	36	1	20	43	4126
<i>V. maxoniana</i>	0.6 ± 0.3	16	0	39	45	574
<i>V. nanuzae</i>	0.5 ± 0.1	1	2	62	35	1666
<i>V. racinae</i>	1.6 ± 0.6	23	51	13	13	587
<i>V. saundersii</i>	0.3 ± 0.1	51	10	10	29	1941
<i>V. scalaris</i>	0.2 ± 0.2	19	9	20	52	3888
<i>V. unilateralis</i>	3.5 ± 0.3	15	27	33	25	144
<i>Wallisia cyanea</i>	0.1 ± 0.0	38	3	22	37	4264
<i>W. lindeniana</i>	0.7 ± 0.3	51	1	28	20	1439
<i>W. pretiosa</i>	0.2 ± 0.1	46	3	19	32	1696
<i>Werauhia gladioliflora</i>	2.9 ± 0.8	36	37	10	17	362
<i>Wer. nutans</i>	3.6 ± 1.0	50	5	33	12	283
<i>Wer. patzeltii</i>	1.6 ± 0.1	53	1	34	12	552
<i>Wer. pectinata</i>	0.2 ± 0.1	5	3	70	22	2402
<i>Wer. sanguinolenta</i>	2.9 ± 1.6	69	9	13	9	362
<i>Wer. werckleana</i>	5.1 ± 0.7	36	39	17	8	242

Bold type = bat-pollinated bromeliads. Essential amino acids = arg, his, ile, leu, lys, met, phe, thr, trp, val. Residual amino acids = ala, asp, gaba, glu, gly, ser, tyr.

Supplementary Table S4: Concentrations of inorganic cations, anions, malate, and the ion composition in nectar of different Bromeliaceae species.

Species	Sum cations [mM]	Percentages of cations [%]			Sum anions [mM]	Percentages of anions [%]			Malate [mM]
		K ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺ & Ca ²⁺		Cl ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	
Species	0.4 ± 0.0	28	52	20	1.4 ± 0.0	88	9	3	0.13
<i>Aechmea abbreviata</i>	1.0 ± 0.2	79	17	4	1.2 ± 0.0	75	19	6	0.05
<i>A. aquilega</i>	0.5 ± 0.0	73	11	16	0.4 ± 0.1	100	0	0	0.00
<i>A. bruggeri</i>	1.0 ± 0.8	46	36	18	0.7 ± 0.1	75	15	10	0.01
<i>A. cylindrata</i>	1.0 ± 0.2	58	23	19	0.5 ± 0.2	69	10	21	0.01
<i>A. distichantha</i>	1.0 ± 0.5	76	8	16	1.1 ± 0.3	87	2	11	0.01
<i>A. distichantha</i>	0.8 ± 0.1	76	11	13	1.3 ± 0.1	81	18	1	0.00
<i>A. eurycorymbus</i>	0.8 ± 0.1	76	11	13	1.3 ± 0.1	81	18	1	0.00
<i>A. fasciata</i>	0.5 ± 0.1	64	22	14	0.9 ± 0.1	81	6	13	0.00
<i>A. fasciata</i>	0.6 ± 0.3	50	22	28	0.8 ± 0.3	54	32	14	0.07
<i>A. gamosepala</i>	1.2 ± 0.4	82	10	8	0.2 ± 0.0	49	42	9	0.05
<i>A. gracilis</i>	1.4 ± 0.0	87	5	8	0.3 ± 0.1	65	15	20	0.23
<i>A. leptantha</i>	2.9 ± 0.5	71	15	14	4.1 ± 0.6	96	3	1	0.37
<i>A. marauensis</i>	2.1 ± 1.3	61	24	15	0.9 ± 0.1	75	16	9	0.08
<i>A. miniata discolor</i>	0.6 ± 0.4	60	20	20	0.3 ± 0.1	72	0	28	0.00
<i>A. nudicaulis</i>	1.5 ± 0.4	59	20	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.00
<i>A. penduliflora</i>	1.7 ± 0.6	66	27	7	0.9 ± 0.1	81	4	15	0.03
<i>A. pyramidalis</i>	0.5 ± 0.2	18	70	12	0.4 ± 0.3	82	0	18	0.00
<i>A. racinae</i>	0.6 ± 0.4	40	38	22	0.7 ± 0.1	73	22	5	0.07
<i>A. recurvata</i>	1.1 ± 0.1	75	20	5	0.3 ± 0.1	66	33	1	0.27
<i>A. weilbachii</i>	1.9 ± 0.8	85	8	7	0.7 ± 0.6	74	13	13	0.53
<i>Alcantarea geniculata</i>	0.3 ± 0.1	26	64	10	0.7 ± 0.2	98	0	2	0.01
Alc. imperialis	1.1 ± 0.2	65	28	7	0.7 ± 0.2	52	29	19	0.00
<i>Billbergia amoena</i>	0.7 ± 0.3	84	8	8	0.8 ± 0.1	43	40	17	0.03
<i>B. brasiliensis</i>	0.3 ± 0.2	12	55	33	0.7 ± 0.1	73	25	2	0.20
<i>B. buchholtzii</i>	0.7 ± 0.2	56	31	13	0.4 ± 0.0	89	1	10	0.01
<i>B. distachia</i>	1.2 ± 0.7	70	26	4	1.0 ± 0.5	79	9	12	0.17
<i>B. euphemiae</i>	1.2 ± 0.0	93	3	4	1.0 ± 0.2	97	1	2	0.23
<i>B. fosteriana</i>	0.1 ± 0.0	78	22	0	0.7 ± 0.1	85	13	2	0.02
<i>B. morelii</i>	0.1 ± 0.0	23	44	33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.00
<i>B. nutans</i>	0.3 ± 0.2	45	51	4	0.1 ± 0.0	60	19	21	0.06
<i>B. pyramidalis</i>	0.1 ± 0.1	70	30	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.00
<i>B. reichardtii</i>	0.3 ± 0.3	53	28	19	0.2 ± 0.0	90	5	5	0.04
<i>B. viridiflora</i>	0.8 ± 0.1	62	30	8	0.8 ± 0.1	68	20	12	0.09
<i>B. vittata</i>	1.4 ± 0.3	42	28	30	0.8 ± 0.2	78	0	22	0.02
<i>Deuterocohnia brevispicata</i>	0.2 ± 0.0	51	18	31	0.3 ± 0.0	100	0	0	0.00
<i>Deu. longipetala</i>	0.6 ± 0.1	71	26	3	0.9 ± 0.4	83	0	17	0.04
<i>Deu. meziana subsp. carmineoviridiflora</i>	1.0 ± 0.7	32	35	33	0.7 ± 0.4	81	8	11	0.04
<i>Deu. recurvipetala</i>	3.1 ± 0.7	89	7	4	0.9 ± 0.3	21	70	9	0.19
<i>Dyckia choristaminea</i>	2.1 ± 1.5	83	14	3	0.5 ± 0.3	40	46	14	0.01
<i>D. goehringii</i>	0.8 ± 0.5	59	29	12	0.3 ± 0.1	43	42	15	0.03
<i>D. leptostachya</i>	12.4 ± 0.8	85	2	13	6.1 ± 1.2	83	12	5	0.14
<i>D. vestita</i>	9.9 ± 3.5	98	1	1	9.8 ± 0.5	94	5	1	0.09
<i>Guzmania acorifolia</i>	7.0 ± 1.8	76	22	2	16.9 ± 0.9	91	5	4	0.32
G. calothyrsus	12.2 ± 1.9	95	4	1	5.5 ± 1.8	85	1	14	7.09
<i>G. conifera</i>	6.3 ± 0.8	30	68	2	6.8 ± 2.5	80	4	16	0.08
G. cylindrica	10.0 ± 1.1	95	2	3	11.9 ± 1.4	75	18	7	3.91
G. farcimiformis	3.5 ± 0.9	91	9	0	1.9 ± 0.5	84	11	5	0.39
G. killipiana	6.8 ± 1.4	94	2	4	7.7 ± 1.2	96	3	1	0.42
<i>G. lingulata</i>	2.0 ± 0.1	98	1	1	7.7 ± 0.9	96	1	3	0.18
<i>G. melinonis</i>	7.6 ± 1.4	94	2	4	8.1 ± 2.5	86	8	6	0.52
<i>G. monostachia</i>	3.8 ± 0.1	94	2	4	1.0 ± 0.5	100	0	0	0.17
<i>G. osyana</i>	12.3 ± 1.1	93	3	4	5.5 ± 2.2	96	0	4	0.49
<i>G. rhonhofiana</i>	4.9 ± 0.8	86	4	10	4.7 ± 1.0	82	12	6	0.33
<i>G. roseiflora</i>	4.1 ± 2.2	92	5	3	3.9 ± 0.6	93	2	6	0.65
<i>G. sanguinea</i>	2.1 ± 0.2	11	24	65	0.5 ± 0.2	60	28	12	0.06
<i>G. variegata</i>	2.9 ± 0.6	91	3	6	4.2 ± 0.7	96	2	2	0.32
<i>G. wittmackii</i>	0.7 ± 0.7	52	32	16	0.2 ± 0.0	82	12	6	0.01
<i>G. zahnii</i>	2.7 ± 1.4	60	14	26	0.7 ± 0.2	83	14	3	0.26
<i>Hohenbergia correia-arauji</i>	0.5 ± 0.4	55	24	21	0.6 ± 0.2	70	15	15	0.19

<i>H. leopoldo-horstii</i>	0.6 ± 0.3	39	43	18	1.5 ± 1.3	87	5	8	0.08
<i>H. rosea</i>	0.5 ± 0.2	55	34	11	1.4 ± 0.2	83	9	8	0.02
<i>H. stellata</i>	0.5 ± 0.04	79	13	8	1.7 ± 0.8	98	0	2	0.02
<i>H. utriculosa</i>	0.4 ± 0.2	23	66	11	0.3 ± 0.2	91	1	8	0.00
<i>Lemeltonia narthecioides</i>	6.1 ± 1.5	77	17	6	3.0 ± 1.2	68	21	11	0.26
<i>L. scaligera</i>	3.7 ± 2.5	74	10	16	2.8 ± 1.3	80	12	8	0.09
<i>Neoregelia ampullacea</i>	1.5 ± 0.3	32	51	17	1.1 ± 0.3	43	13	44	0.38
<i>N. carolinae</i>	0.4 ± 0.1	2	68	30	3.9 ± 1.6	64	18	18	0.04
<i>N. compacta</i>	1.0 ± 0.2	85	9	6	0.6 ± 0.1	78	17	5	0.10
<i>N. farinosa</i>	0.3 ± 0.1	47	31	22	0.3 ± 0.2	85	0	15	0.38
<i>N. fosteriana</i>	1.9 ± 0.7	67	19	14	0.3 ± 0.0	51	27	22	0.03
<i>N. johannis</i>	0.7 ± 0.2	74	11	15	0.6 ± 0.2	54	34	12	0.55
<i>N. kautskyi</i>	0.8 ± 0.4	68	16	16	0.8 ± 0.1	68	19	13	0.71
<i>N. laevis</i>	0.7 ± 0.3	45	29	26	0.7 ± 0.1	54	41	5	0.23
<i>N. martinellii</i>	0.9 ± 0.0	63	31	6	0.6 ± 0.2	75	0	25	0.27
<i>N. olens</i>	4.1 ± 0.5	28	48	24	0.4 ± 0.1	51	22	27	0.14
<i>N. pineliana</i>	0.3 ± 0.2	21	50	29	0.4 ± 0.1	76	14	10	0.07
<i>N. seideliana</i>	2.3 ± 0.4	75	15	10	2.7 ± 0.8	61	18	21	0.43
<i>N. wilsoniana</i>	4.1 ± 1.3	89	7	4	4.6 ± 0.8	57	10	33	0.29
<i>Nidularium amazonicum</i>	4.8 ± 1.1	91	4	5	4.3 ± 1.2	58	31	11	0.22
<i>Nid. innocentii</i>	2.0 ± 0.2	90	4	6	1.1 ± 0.1	64	18	16	0.85
<i>Nid. procerum</i>	0.5 ± 0.4	57	22	21	1.1 ± 0.0	61	30	9	0.18
<i>Nid. purpureum</i>	2.4 ± 1.0	72	4	24	5.0 ± 0.3	78	19	3	1.80
<i>Nid. rutilans</i>	0.6 ± 0.2	75	25	0	0.5 ± 0.1	86	10	4	0.00
<i>Nid. scheremetiewii</i>	0.5 ± 0.3	58	42	0	2.0 ± 0.1	86	0	14	0.02
<i>Nid. utriculosum</i>	0.4 ± 0.0	80	14	6	1.7 ± 0.3	86	7	7	0.10
<i>Pitcairnia bromeliifolia</i>	0.9 ± 0.2	59	22	19	1.6 ± 0.2	91	0	9	0.03
<i>Pit. chiapensis</i>	0.2 ± 0.2	43	39	18	1.4 ± 0.3	97	3	0	0.96
<i>Pit. chiriquensis</i>	10.3 ± 1.9	95	3	2	7.3 ± 1.4	100	0	0	0.94
<i>Pit. grafii</i>	4.7 ± 1.2	92	5	3	3.1 ± 1.1	91	5	4	0.15
Pit. recurvata	0.3 ± 0.2	54	31	15	1.4 ± 0.7	97	1	2	0.08
<i>Pit. rubronigriflora</i>	1.1 ± 0.2	83	10	7	1.1 ± 0.4	94	2	4	0.10
<i>Pit. sprucei</i>	0.6 ± 0.4	74	19	7	1.7 ± 1.5	77	4	19	0.34
<i>Pit. suaveolens</i>	1.3 ± 0.1	80	16	4	1.7 ± 0.1	96	0	4	0.00
<i>Pit. utcubambensis</i>	6.2 ± 1.2	98	2	0	5.8 ± 1.1	99	1	0	1.16
<i>Pit. xanthocalyx</i>	6.7 ± 2.9	91	7	2	2.8 ± 0.8	74	18	8	0.73
Pseudalcantarea grandis	2.8 ± 1.3	93	5	2	4.6 ± 1.4	98	1	1	2.23
Pse. macropetala	1.3 ± 0.5	91	6	3	0.1 ± 0.0	79	0	21	0.00
Pse. viridiflora	0.1 ± 0.0	24	51	25	0.3 ± 0.1	100	0	0	0.00
<i>Puya coerulea</i> var. <i>violacea</i>	7.8 ± 2.6	97	2	1	3.5 ± 0.2	100	0	0	0.11
<i>P. densiflora</i>	0.1 ± 0.0	29	54	17	0.3 ± 0.0	97	0	3	0.00
P. ferruginea	0.5 ± 0.1	46	51	3	2.8 ± 0.7	84	13	4	0.35
<i>P. spathacea</i>	0.2 ± 0.2	54	26	20	0.1 ± 0.0	66	5	29	0.00
<i>Quesnelia edmundoi</i>	0.2 ± 0.1	51	32	17	0.9 ± 0.2	67	25	8	0.32
<i>Q. lateralis</i>	0.2 ± 0.0	13	66	21	0.5 ± 0.1	89	4	7	0.04
<i>Q. quesneliana</i>	0.2 ± 0.1	0	94	6	9.2 ± 2.7	81	3	16	0.00
<i>Tillandsia achyrostachys</i>	0.1 ± 0.1	46	46	8	0.6 ± 0.3	83	8	9	0.09
<i>T. aeranthos</i>	0.6 ± 0.4	59	10	31	2.0 ± 1.1	83	5	12	0.29
<i>T. caput-medusae</i>	0.5 ± 0.1	17	55	28	0.3 ± 0.1	87	0	13	0.00
<i>T. circinnatoides</i>	0.5 ± 0.2	31	43	26	1.5 ± 0.4	83	4	13	0.28
<i>T. clavigera</i>	0.3 ± 0.2	30	44	26	1.7 ± 0.6	96	1	3	0.10
<i>T. concolor</i>	0.6 ± 0.2	46	44	10	0.3 ± 0.1	80	8	12	0.03
<i>T. flabellata</i>	1.5 ± 0.7	79	15	6	0.3 ± 0.1	66	18	16	0.19
<i>T. foliosa</i>	0.4 ± 0.3	35	43	22	3.9 ± 1.7	90	3	7	0.28
<i>T. funckiana</i>	2.6 ± 0.1	96	3	1	1.6 ± 0.3	95	2	3	0.50
<i>T. gerdae</i>	0.2 ± 0.1	65	24	11	0.5 ± 0.1	80	7	13	0.22
T. heterophylla	0.4 ± 0.1	2	77	21	0.7 ± 0.2	87	0	13	0.06
<i>T. ionantha</i>	1.4 ± 0.3	75	10	15	0.7 ± 0.2	70	24	6	0.41
<i>T. ixioides</i>	0.3 ± 0.2	51	38	11	0.5 ± 0.1	84	4	12	0.10
<i>T. makoyana</i>	0.4 ± 0.2	13	65	22	0.6 ± 0.3	63	4	33	0.04
<i>T. malzinei</i>	0.6 ± 0.1	88	9	3	0.2 ± 0.1	87	0	13	0.09
<i>T. polystachia</i>	1.1 ± 0.6	39	32	29	0.2 ± 0.0	100	0	0	0.14
<i>T. ponderosa</i>	6.5 ± 2.4	75	23	2	2.8 ± 0.1	98	0	2	0.00
<i>T. propagulifera</i>	0.5 ± 0.1	43	41	16	0.4 ± 0.1	97	0	3	0.02
<i>T. rauhii</i>	2.1 ± 0.6	50	42	8	0.9 ± 0.2	92	4	4	0.08
<i>T. roland-gosselinii</i>	9.6 ± 3.3	74	25	1	2.4 ± 0.4	100	0	0	0.65
<i>T. tricolor</i>	0.1 ± 0.0	23	54	23	0.5 ± 0.2	78	1	21	0.00
Vriesea bituminosa	0.5 ± 0.5	37	43	20	1.4 ± 0.2	93	0	7	0.00

<i>V. bleheri</i>	1.0 ± 0.3	89	9	2	0.2 ± 0.1	65	3	32	0.09
<i>V. drepanocarpa</i>	1.3 ± 0.8	52	42	6	0.6 ± 0.1	66	6	28	0.08
<i>V. dubia</i>	7.4 ± 1.8	95	3	2	6.9 ± 0.7	86	9	5	1.39
<i>V. eltoniana</i>	2.1 ± 0.1	94	6	0	1.4 ± 0.1	55	14	31	0.13
<i>V. fenestralis</i>	0.3 ± 0.2	11	48	41	1.2 ± 0.3	90	4	6	0.44
<i>V. friburgensis</i>	0.1 ± 0.1	18	54	28	0.5 ± 0.1	80	4	16	0.00
<i>tucumanensis</i>									
<i>V. guttata</i>	4.6 ± 1.1	97	2	1	1.9 ± 0.3	96	0	4	0.09
<i>V. maxoniana</i>	3.0 ± 0.1	13	30	57	3.1 ± 0.6	90	1	9	0.00
<i>V. nanuzae</i>	0.3 ± 0.1	5	64	31	0.2 ± 0.1	93	4	3	0.00
<i>V. racinae</i>	1.0 ± 0.0	50	22	28	1.7 ± 0.4	90	1	9	0.04
<i>V. saundersii</i>	7.4 ± 1.4	93	5	2	1.7 ± 0.1	96	4	0	0.88
<i>V. scalaris</i>	0.4 ± 0.2	26	35	39	0.6 ± 0.3	87	11	2	0.00
<i>V. unilateralis</i>	0.2 ± 0.0	17	43	40	0.7 ± 0.4	76	14	10	0.03
<i>Wallisia cyanea</i>	0.7 ± 0.2	68	32	0	1.2 ± 0.2	87	0	13	0.07
<i>W. lindeniana</i>	8.7 ± 1.5	94	5	1	4.6 ± 0.7	95	4	1	0.95
<i>W. pretiosa</i>	8.1 ± 2.0	94	5	1	8.2 ± 0.8	89	7	4	0.00
<i>Werauhia gladioliflora</i>	0.6 ± 0.1	46	43	11	0.9 ± 0.3	86	14	0	0.15
<i>Wer. nutans</i>	14.0 ± 3.5	97	2	1	8.5 ± 1.3	82	16	2	10.78
<i>Wer. patzeltii</i>	13.2 ± 0.6	95	3	2	4.2 ± 1.0	88	2	10	0.30
<i>Wer. pectinata</i>	22.5 ± 1.8	97	2	1	3.4 ± 1.4	100	0	0	0.25

Bold type = bat-pollinated bromeliads. n.d. = not detectable.

Supplementary Table S5: Results of the PERMANOVA taking into account the individual components of nectar (corresponding Table 1). R^2 describes the influence of the pollinator, the genus and the botanical garden on the nectar composition.

	Degrees of freedom (df)	Pseudo-F (F)	R^2	p -value
<i>Sugar [mM]</i>				
Pollinator	1	85.90	0.41	0.001 ***
Genus	6	2.13	0.06	0.019 *
Bot. garden	3	1.68	0.02	0.125
Pollinator x Genus	6	2.52	0.07	0.007 **
Pollinator x Bot. garden	3	1.92	0.03	0.079
Genus x Bot. garden	1	2.85	0.01	0.064
Pollinator x Genus x Bot. garden	1	14.38	0.07	0.001 ***
Residuals	68		0.32	
Total	89		1.00	
<i>Amino acids [mM]</i>				
Pollinator	1	26.35	0.03	0.001 ***
Genus	6	54.20	0.37	0.001 ***
Bot. garden	3	8.62	0.03	0.001 ***
Pollinator x Genus	6	61.05	0.42	0.001 ***
Pollinator x Bot. garden	3	6.65	0.02	0.001 ***
Genus x Bot. garden	1	21.11	0.02	0.001 ***
Pollinator x Genus x Bot. garden	1	19.24	0.02	0.001 ***
Residuals	68		0.08	
Total	89		1.00	
<i>Inorganic ions and organic acids [mM]</i>				
Pollinator	1	73.03	0.34	0.001 ***
Genus	6	6.28	0.18	0.001 ***
Bot. garden	3	5.06	0.07	0.002 **
Pollinator x Genus	6	2.21	0.06	0.011 *
Pollinator x Bot. garden	3	1.49	0.02	0.198
Genus x Bot. garden	1	1.97	0.01	0.144
Pollinator x Genus x Bot. garden	1	1.20	0.01	0.266
Residuals	68		0.32	
Total	89		1.00	

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Supplementary Table S6: Sugar-ratios in nectar of bromeliad species collected during fieldwork in Bolivia and Mexico or in botanical gardens in Germany. Data from field plants were derived from (Krömer et al., 2008) and data from greenhouse plants were derived from Supplementary Table S2 (this work).

	Field plants		Greenhouse plants	
Species	<i>n</i>	Sucrose-to-hexoses ratio	<i>n</i>	Sucrose-to-hexoses ratio
chiropterophilous				
<i>Guzmania killipiana</i>	1	0.6	3	0.4 ± 0.2
<i>Tillandsia heterophylla</i>	2	0.3 ± 0.0	3	0.3 ± 0.0
<i>Tillandsia viridiflora</i> (<i>Pseudalcantarea viridiflora</i>)	7	0.3 ± 0.1	3	0.5 ± 0.1
<i>Werauhia nutans</i>	5	0.6 ± 0.1	3	0.5 ± 0.2
trochilophilous				
<i>Guzmania melinonis</i>	1	2.6	3	1.5 ± 0.2

References

Krömer, T., Kessler, M., Lohaus, G., and Schmidt-Lebuhn, A.N. (2008). Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biol (Stuttg)* 10, 502–511. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00058.x

5.3 Proteinanalyse des Nektars von unterschiedlichen Bromelienarten

Neben den bisher untersuchten Bestandteilen des Nektars (5.2) findet man im floralen Nektar auch kleinere Mengen an Proteinen. Aufgrund dieser geringen Mengen wurde zunächst eine Proteinfällung durchgeführt, um die Proteine zu isolieren und auf zu konzentrieren (4.7.5.1). Anschließend wurde die SDS-PAGE für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht durchgeführt (4.7.5.2). Zuletzt wurden aufgrund der unterschiedlichen Nachweisgrenzen, bei den fertigen Gelen sowohl die Coomassie- (4.7.5.3) als auch die Silberfärbung (4.7.5.4) verwendet.

Die Auftragung des proteingefällten Nektars zeigte im Vergleich zu purem Nektar keine Aufkonzentrierung, eher fanden sich bei der Methode weniger Proteine im Nektar (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen wurde für die weiteren Untersuchungen nur purer Nektar bei der SDS-Gelelektrophorese verwendet. Obwohl die Coomassie-Färbung eine Nachweisgrenze von 0,3–1 µg Protein (Wilson 1983) besitzt, war diese nicht sensitiv genug um die geringen Mengen der Proteine im Nektar der Bromelien zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Somit wurde für die Untersuchung der Nektarproben die Silberfärbung als sensitivere Methode verwendet (5-30 ng pro Proteinbande).

Zur Analyse des Proteinprofils des Nektars wurden Proben der gleichen Bromelien-Gattung miteinander verglichen, um festzustellen, ob es innerhalb einer Gattung oder Gattungsübergreifend ein einheitliches Proteinmuster existiert (Abbildung 5.2, Tabelle 5.1). Für die untersuchten Bromelienarten der jeweiligen Gattungen konnte kein einheitliches Proteinmuster festgestellt werden. Bei der Gattung *Aechmea* kommen Arten vor, die keine Proteine im Nektar aufweisen (*A. callichroma*, *A. bruggeri*), sowie Arten mit einer Vielzahl von Proteinen (*A. aquilega*, *A. fasciata*). Bei vier der acht analysierten Arten von *Aechmea* konnte ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa detektiert werden (Abbildung 5.2, A1-A4). Bei drei Arten dieser Gattung (A1, A2, A3) konnte auch eine zusätzliche Proteinbande bei ca. 66 kDa festgestellt werden. Für die Gattung *Alcantarea* konnte nur bei *Alc. imperialis* ein Protein mit einer Größe von ca. 60 kDa im Nektar gefunden werden. Die Hälfte der analysierten Arten der Gattung *Billbergia* weisen keine Proteine auf, wohingegen bei den anderen beiden Arten im Bereich von 40 kDa bis 212 kDa mehrere Proteinbanden zu finden sind, die im Bereich von 50 bis 80 kDa identisch sind (Abbildung 5.2, C1 und C4). Auch bei der einen untersuchten Art der Gattung *Dyckia* konnten Banden in diesem 30 kDa-Bereich gesichtet werden.

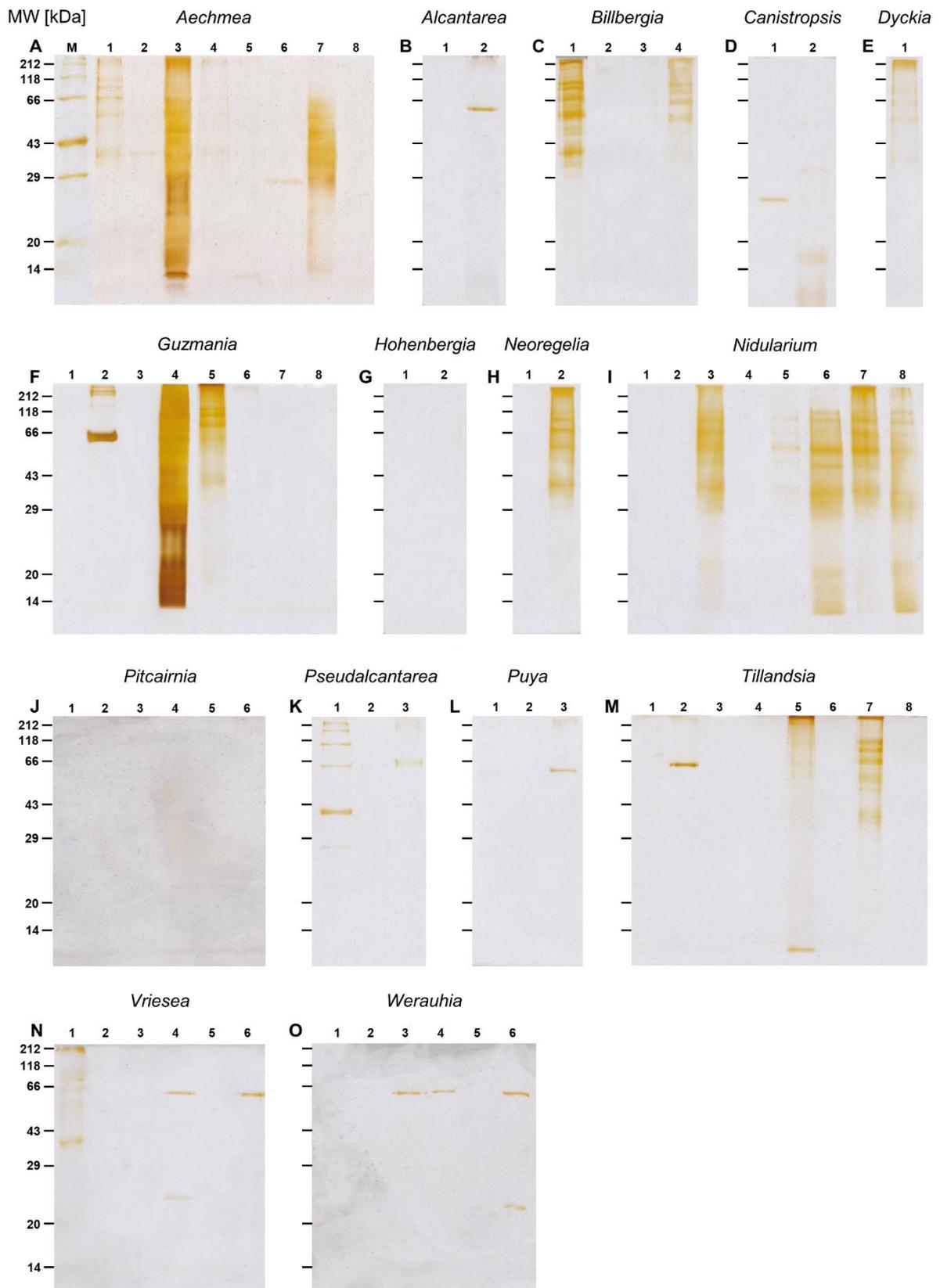


Abbildung 5.2: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine innerhalb verschiedener Bromelien-Gattungen.

Die Beschriftung der einzelnen SDS-Gele befindet sich in Tabelle 5.1. Als Protein-Molekulargewichtsmarker (M) wurde der Roti®-Mark Standard (14-212 kDa, Roth) verwendet.

Tabelle 5.1: Beschriftung der nach Gattungen sortierten SDS-Gele in Abbildung 5.2

Nr.	Artname	Nr.	Artname	Nr.	Artname
Aechmea [A]		6.	<i>G. melinonis</i>	3.	<i>Pse. grandis</i>
1.	<i>A. aquilega</i>	7.	<i>G. zahnii</i>	Puya [L]	
2.	<i>A. miniata discolor</i>	8.	<i>G. calothyrsus</i>	1.	<i>P. vasquezii</i>
3.	<i>A. fasciata</i>	Hohenbergia [G]		2.	<i>P. densiflora</i>
4.	<i>A. racinae</i>	1.	<i>H. correia-araujo</i>	3.	<i>P. coerulea violacea</i>
5.	<i>A. callichroma</i>	2.	<i>H. stellata</i>	Tillandsia [M]	
6.	<i>A. gamosepala</i>	Neoregelia [H]		1.	<i>T. caput-medusae</i>
7.	<i>A. macrochlamys</i>	1.	<i>N. olens</i>	2.	<i>T. heterophylla</i>
8.	<i>A. bruggeri</i>	2.	<i>N. fosteriana</i>	3.	<i>T. funckiana</i>
Alcantarea [B]		Nidularium [I]		4.	<i>T. flabellata</i>
1.	<i>Alc. geniculata</i>	1.	<i>Nid. rutilans</i>	5.	<i>T. concolor</i>
2.	<i>Alc. imperialis</i>	2.	<i>Nid. innocentii</i>	6.	<i>T. makoyana</i>
Billbergia [C]		3.	<i>Nid. scheremetiewii</i>	7.	<i>T. ponderosa</i>
1.	<i>B. nutans</i>	4.	<i>Nid. utriculosum</i>	8.	<i>T. samaipetensis</i>
2.	<i>B. morelii</i>	5.	<i>Nid. purpureum</i>	Vriesea [N]	
3.	<i>B. viridiflora</i>	6.	<i>Nid. amazonicum</i>	1.	<i>V. fenestralis</i>
4.	<i>B. euphemiae</i>	7.	<i>Nid. procerum</i>	2.	<i>V. maxoniana</i>
Canistropsis [D]		8.	<i>Nid. innocentii lineatum</i>	3.	<i>V. friburgensis tucumanensis</i>
1.	<i>C. seidelii</i>	Pitcairnia [J]		4.	<i>V. unilateralis</i>
2.	<i>C. billbergioides</i>	1.	<i>Pit. bromeliifolia</i>	5.	<i>V. saundersii</i>
Dyckia [E]		2.	<i>Pit. chiapensis</i>	6.	<i>V. racinae</i>
1.	<i>D. vestita</i>	3.	<i>Pit. xanthocalyx</i>	Werauhia [O]	
Guzmania [F]		4.	<i>Pit. grafii</i>	1.	<i>Wer. gladioliflora</i>
1.	<i>G. wittmackii</i>	5.	<i>Pit. recurvate</i>	2.	<i>Wer. patzeltii</i>
2.	<i>G. cylindrica</i>	6.	<i>Pit. sprucei</i>	3.	<i>Wer. pectinata</i>
3.	<i>G. acorifolia</i>	Pseudalcantarea [K]		4.	<i>Wer. sanguinolenta</i>
4.	<i>G. monostachia</i>	1.	<i>Pse. macropetala</i>	5.	<i>Wer. nutans</i>
5.	<i>G. killipiana</i>	2.	<i>Pse. viridiflora</i>	6.	<i>Werauhia werckleana</i>

Die beiden Arten von *Canistropsis* zeigen jeweils unterschiedliche Proteinprofile im Nektar, zum einen eine Proteinbande bei ca. 25 kDa und zum anderen eine Bande bei 35 kDa. Innerhalb der Bromelien-Gattung *Guzmania* (Abbildung 5.2, F) konnte nur bei

drei Arten (*G. cylindrica*, *G. monostachia*, *G. killipiana*) Proteine im Nektar nachgewiesen werden. Hierbei lagen schon relativ hohe Proteinkonzentrationen in den Nektarproben vor.

Im Nektar der drei Arten konnte jeweils ein Protein mit einer molekularen Größe von ca. 60 kDa detektiert werden. In den Gattungen *Hohenbergia* und *Pitcairnia* wurden keine Proteine im floralen Nektar der analysierten Arten erkannt (Abbildung 5.2, G und J). In einer Art von *Neoregelia* konnte ein ähnliches Proteinmuster festgestellt werden, wie in den Arten von *Billbergia* und *Dyckia*. Bei *Nidularium* konnten nur in fünf der acht untersuchten Arten Proteine im Nektar gefunden werden. Diese weisen insgesamt fünf identische Proteine mit einer Molekülgröße von ca. 35 kDa, 45 kDa, 50 kDa, 60 kDa und 80 kDa auf (Abbildung 5.2, I3, I5-I8). Bei den analysierten Nektarproben der Gattung *Pseudalcantarea* konnten einheitlich eine Bande bei ca. 60 kDa und bei zwei Arten auch noch weitere unterschiedliche Proteine festgestellt werden. Der Nektar von *Puya coerulea violacea* zeigte im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten *Puya*-Arten eine Bande bei ca. 60 kDa. Wie schon bei anderen Gattungen konnten auch bei der Gattung *Tillandsia* nicht im Nektar aller Arten Proteine gefunden werden (Abbildung 5.2, M, *T. heterophylla*, *T. flabellata*, *T. ponderosa*). Sowohl bei *Vriesea* als auch bei *Werauhia* wurden nur bei jeweils der Hälfte der Arten Proteine gefunden (Abbildung 5.2, N1, N4, N6, O3, O4, O6). Dabei wurde im Nektar aller Arten der genannten Gattungen ein Protein mit einer Größe von ca. 60 kDa detektiert.

Ferner wurden Nektarproben von Pflanzen mit unterschiedlichem Bestäuber (Abbildung 5.3), unterschiedlicher Blütenfarbe (Abbildung 5.4), unterschiedlichem Photosynthesetyp (Abbildung 5.5) und unterschiedlicher Wachstumsform (Abbildung 5.6) anhand der Proteinauftrennung nach der Silberfärbung gegenübergestellt.

Für den Vergleich des Nektars von Pflanzen mit unterschiedlichem Bestäuber wurden jeweils vier Arten bestäubt durch Kolibris, und vier Arten bestäubt durch Fledermäuse, aus unterschiedlichen Gattungen ausgewählt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, sowie durch Silberfärbung detektiert (Abbildung 5.3). Damit sollte untersucht werden, ob der Nektar hinsichtlich der Proteinzusammensetzung an einen bestimmten Bestäuber angepasst ist. Im Nektar von Kolibri-bestäubten Arten finden sich nur in zwei der vier Arten Proteine im Nektar. Dabei weist das Proteinprofil im Bereich von 50-118 kDa ähnliche Proteinbanden auf (Abbildung 5.3).

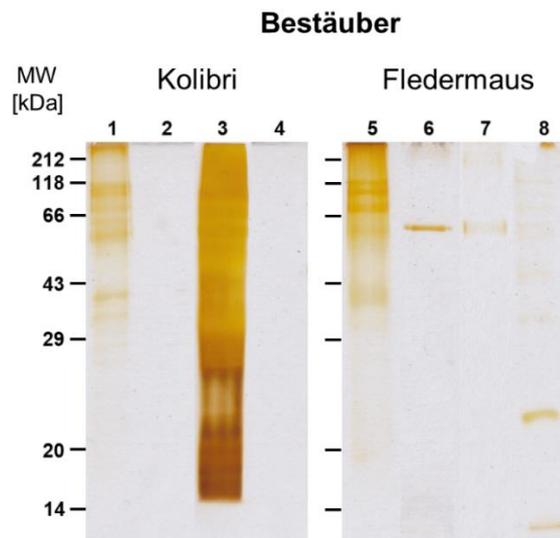


Abbildung 5.3: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine aus dem Nektar von Pflanzen mit unterschiedlichem Bestäuber (Kolibris, Fledermaus).

1. *A. fasciata*, 2. *B. morelii*, 3. *G. monostachia*, 4. *P. densiflora*, 5. *G. killipiana*, 6. *Alc. imperialis*, 7. *Pse. grandis*, 8. *Z. tuerckheimii*. Als Protein-Molekulargewichtsmarker wurde der Roti®-Mark Standard (14-212 kDa, Roth) verwendet.

Jedoch findet man diese Bandenstruktur auch bei einer der Fledermaus-bestäubten Bromelien (*G. killipiana*). Allerdings detektiert man im Nektar von Fledermaus-bestäubten Arten häufig eine Bande bei ca. 60 kDa. Diese ist in zwei Arten (*Alc. imperialis*, *Pse. grandis*) die einzige Bande, welche man feststellen kann.

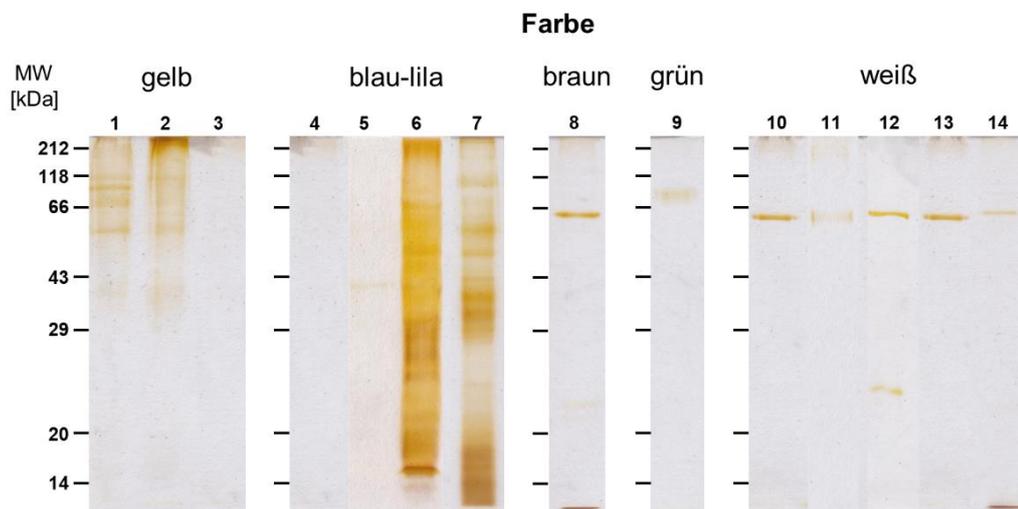


Abbildung 5.4: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine aus dem Nektar von Pflanzen mit unterschiedlicher Blütenfarbe (gelb, blau-lila, braun, grün, weiß).

1. *A. aquilega*, 2. *V. friburgensis tucumenensis*, 3. *G. melinonis*, 4. *Po. petropolitana*, 5. *A. miniata discolor*, 6. *A. fasciata*, 7. *N. procerum*, 8. *V. bituminosa*, 9. *P. spathacea*, 10. *T. heterophylla*, 11. *Pse. grandis*, 12. *Wer. nutans*, 13. *Alc. imperialis*, 14. *P. ferruginea*. Als Protein-Molekulargewichtsmarker wurde der Roti®-Mark Standard (14-212 kDa, Roth) verwendet.

Da Bromelien viele verschiedene Blütenfarben aufweisen und diese meist mit einer erfolgreichen Bestäubung zusammenhängen, wurde ebenfalls untersucht ob der Nektar von unterschiedlich gefärbten Blüten andere Proteinmuster aufweist (Abbildung 5.4). Bei den gelben Blüten wurde im Bereich von ca. 50-118 kDa bei zwei der drei Arten ein ähnliches Bandenmuster der Proteine gefunden. Eine Detektion der Proteine im Nektar der dritten Art war nicht möglich. Für die Blütenfarbe Blau-lila konnte nur in zwei von vier Nektarproben Proteinbanden mit divergierendem Muster festgestellt werden. Wohingegen bei der Blütenfarbe braun und weiß jeweils ein Protein mit einer molekularen Größe von ca. 60 kDa gefunden wurde. Im Nektar der grün gefärbten Blüte findet sich nur ein Protein bei ca. 75 kDa.

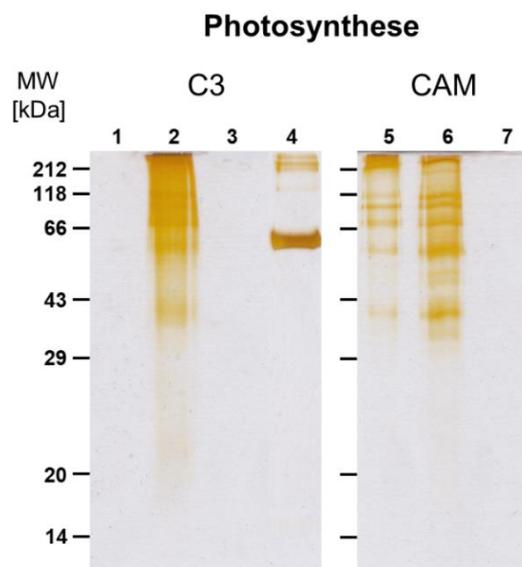


Abbildung 5.5: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine aus dem Nektar von Pflanzen mit unterschiedlicher Photosynthese-Typ (C3, CAM).

1. *G. cylindrica*, 2. *G. killipiana*, 3. *Alc. geniculata*, 4. *P. spathacea*, 5. *A. aquilega*, 6. *Q. quesnelia*, 7. *B. nutans*. Als Protein-Molekulargewichtsmarker wurde der Roti®-Mark Standard (14-212 kDa, Roth) verwendet.

Der Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine aus dem Nektar von Pflanzen mit unterschiedlichem Photosynthese-Typ (C3, CAM), zeigt erneut, dass nicht in allen Nektarproben von verschiedenen Bromelienarten Proteine gefunden werden können (Abbildung 5.5). Bei zwei Nektarproben der C3-Pflanzen findet man eine Proteinbande bei ca. 60 kDa. Dem vergleichend gegenübergestellt wurde der Nektar von CAM-Pflanzen, hierbei wurde bei zwei von drei Arten ein ähnliches Proteinmuster gefunden. Bei Bromelien sind die beiden Wachstumsformen epiphytisch und terrestrisch sehr häufig vertreten. Deshalb wurden die Proteine im Nektar hinsichtlich dieser Variablen bei den Pflanzen verglichen (Abbildung 5.6). Dabei zeigt sich, dass bei beiden

Wachstumsformen in jeweils zwei Arten eine Bande bei ca. 60 kDa detektiert werden kann. Weitere Proteinmuster sind bei diesem Vergleich nicht erkennbar.

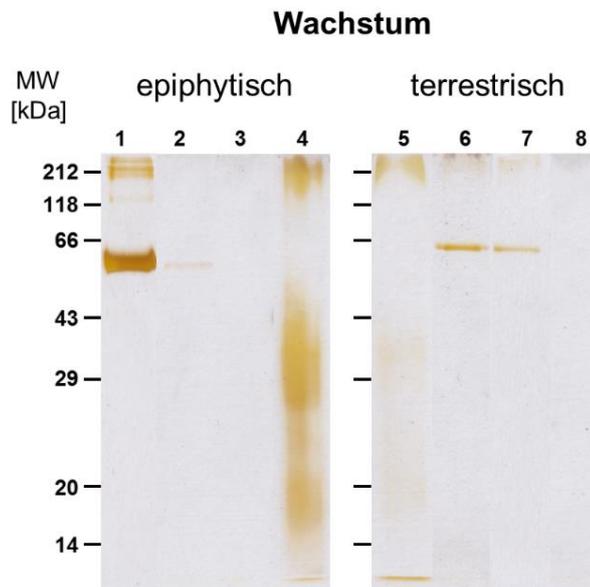


Abbildung 5.6: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine aus dem Nektar von Pflanzen mit unterschiedlicher Wachstumsformen (epiphytisch, terrestrisch).

1. *G. cylindrica*, 2. *T. heterophylla*, 3. *B. morelii*, 4. *C. billbergioides*, 5. *G. killipiana*, 6. *Alc. imperalis*, 7. *P. coerulea violacea*, 8. *P. spathacea*. Als Protein-Molekulargewichtsmarker wurde der Roti®-Mark Standard (14-212 kDa, Roth) verwendet.

Ebenfalls wurde der Gesamtproteingehalt der Blätter und der Nektarien der Bromelien bestimmt (4.7.3). In den Blättern der verschiedenen Bromelienarten lag der Proteingehalt durchschnittlich bei ca. 7 mg g⁻¹ FG, wohingegen der Proteingehalt in den Nektarien in einem Bereich von ca. 4 mg g⁻¹ FG bis hin zu 26 mg g⁻¹ FG je nach Art schwankte (Ackermann 2018).

5.4 Mikroskopische Untersuchung von Nektariengewebe

Die Familie Bromeliaceae besitzt septale Nektarien, das bedeutet, dass sich das Nektariengewebe in den Scheidewänden des Fruchtknotens befindet. Zum besseren Verständnis des Aufbaus der Nektarien und der Sekretion des Nektars bei Bromelien wurde dies durch mikroskopische Untersuchungen des Gewebes analysiert. Aufgrund der hohen Blütenzahl und der Größe der Blüte, somit auch des Fruchtknotens, wurden *Aechmea fasciata* (Abbildung 5.7, A) und *Aechmea miniata discolor* (Abbildung 5.7, J) hierfür ausgewählt. Der Blütenstand der zweiten untersuchten Art *A. miniata discolor* unterscheidet sich von der Farbe und Aufbau grundlegend von der ersten Art. Allerdings ist die Blütenfarbe mit blau-lila bei beiden Arten identisch. Neben dem

Versuch das Gewebe mit einer Rasierklinge zu schneiden und anschließend zu mikroskopieren (4.10), wurde das Nektariengewebe auch in Paraffin eingebettet (4.9.1). Für entsprechend dünne Schnitte wurde das eingebettete Material darauffolgend mittels Mikrotom geschnitten (4.9.2), wonach das Gewebe für die Mikroskopie angefärbt wurde (4.9.3).

Die Unterfamilie Bromelioideae zu denen auch die untersuchten Arten gehören, besitzen jeweils einen unterständigen Fruchtknoten (Sajo et al. 2004). Das Nektariengewebe in *A. fasciata* erkennt man in Abbildung 5.7 B, C als gelb-braun adriges Gewebe. Bei *A. miniata discolor* erscheinen die Nektarien in den Scheidewänden des Fruchtknotens ebenfalls als gelb-braunes Gewebe (Abbildung 5.7 K, L). Schon bei den Schnitten mit den Rasierklingen (Abbildung 5.7 D) erkennt man im Nektariengewebe die Nektarkanäle, die vom Boden des Fruchtknotens bis zum Boden des Griffels führen und sich an der Basis der Kronröhre öffnen (Stahl et al. 2012). Bei *A. miniata discolor* ist der grundsätzliche Aufbau des Nektariengewebes identisch (Abbildung 5.7 O). Weiterhin sind Nektarkanäle erkennbar, die von der Außenwand zur Mitte des Fruchtknotens führen (Abbildung 5.7 E). Dies ist auch bei der zweiten Art erkennbar (Abbildung 5.7 M). Bei näherer Betrachtung des Nektariengewebes erkennt man hier schon, dass dies aus verschiedenen Zellstrukturen besteht. Die Nektarkanäle, durch welche der Nektar sezerniert wird, sind durch die Schnitte des in Paraffin eingebetteten Gewebes bei beiden Arten noch deutlicher zu erkennen (Abbildung 5.7 F-I, O-R).

Dabei wird deutlich, dass die Nektarkanäle nicht linear verlaufen, sondern einen gewellten und gewundenen Strukturverlauf aufweisen. Ebenso sind innerhalb des Nektariengewebes unterschiedliche Zellstrukturen ersichtlich. Im Vergleich zu *A. miniata discolor* sind die Blüten von *A. fasciata* fast dreimal so groß, wodurch diese ebenso ein entsprechend größeres Nektariengewebe besitzen. Im direkten Vergleich der Quer- und Längsschnitte der beiden untersuchten Arten lässt sich feststellen, dass bei beiden Arten drei Kammern im Fruchtknoten mit Samenanlagen befinden und diese durch die Scheidewände, in denen sich das Nektariengewebe befindet, abgetrennt sind (Abbildung 5.8 A,C).

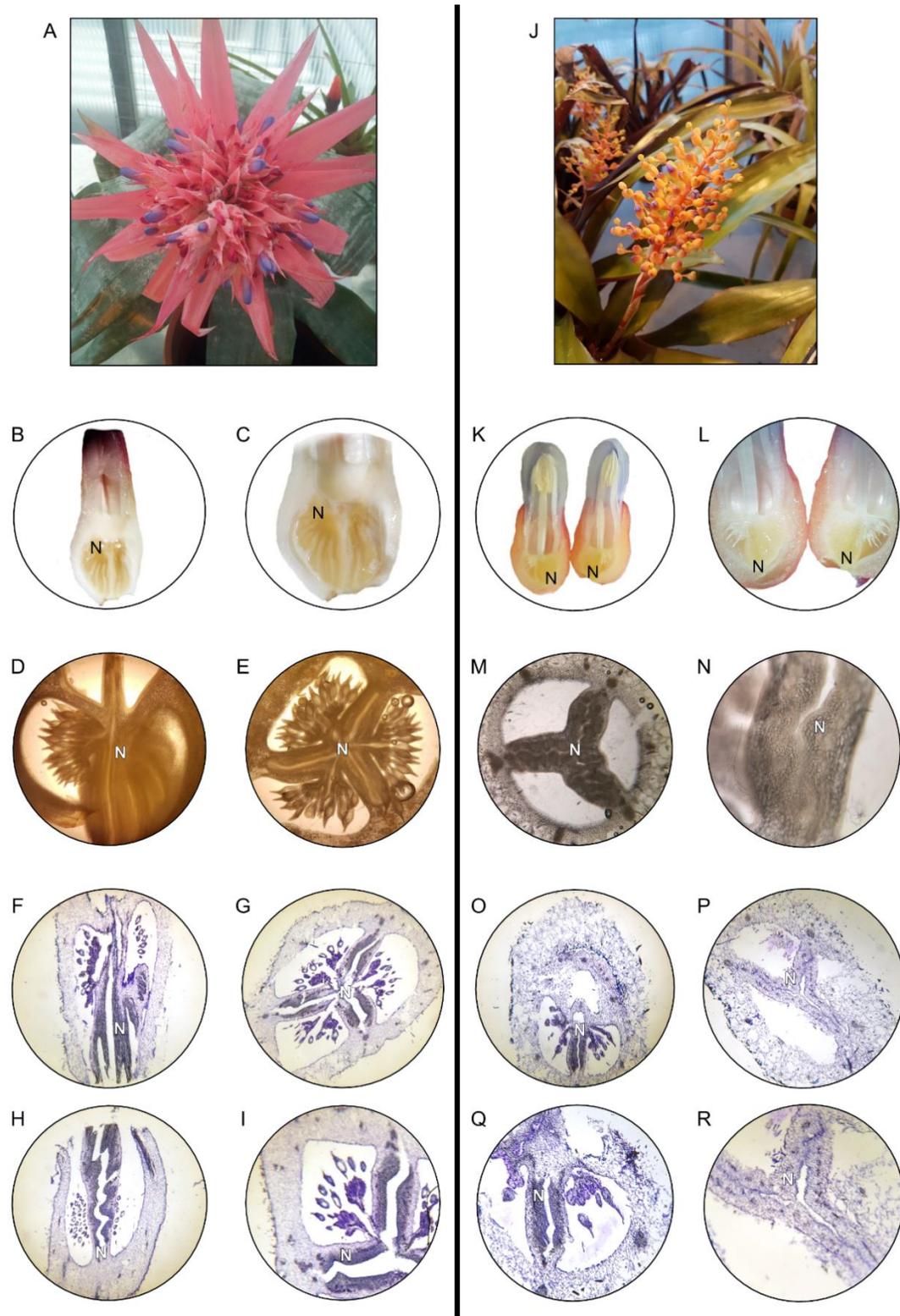


Abbildung 5.7: Mikroskopische Untersuchung der Nektarien in den Blüten von *A. fasciata* und *A. miniata discolor*.

A: Blütenstand von *A. fasciata*; **B:** Längsschnitt einer Blüte; **C:** Nahaufnahme der Nektarien im Längsschnitt; **D:** Längsschnitt des Fruchtknotens (Rasierklinge); **E:** Querschnitt des Fruchtknotens (Rasierklinge); **F, H:** Längsschnitt des Fruchtknotens (Mikrotom); **G, I:** Querschnitt des Fruchtknotens (Mikrotom); **J:** Blütenstand von *A. miniata discolor*; **K:** Längsschnitt einer Blüte mit beiden Hälften der Blüte; **L:** Nahaufnahme der Nektarien im Längsschnitt; **M:** Querschnitt des Fruchtknotens (Rasierklinge); **N:** Nahaufnahme des Nektariengewebes im Querschnitt des Fruchtknotens (Rasierklinge); **O, Q:** Längsschnitt des Fruchtknotens (Mikrotom); **P, R:** Querschnitt des Fruchtknotens (Mikrotom). N = Nektariengewebe.

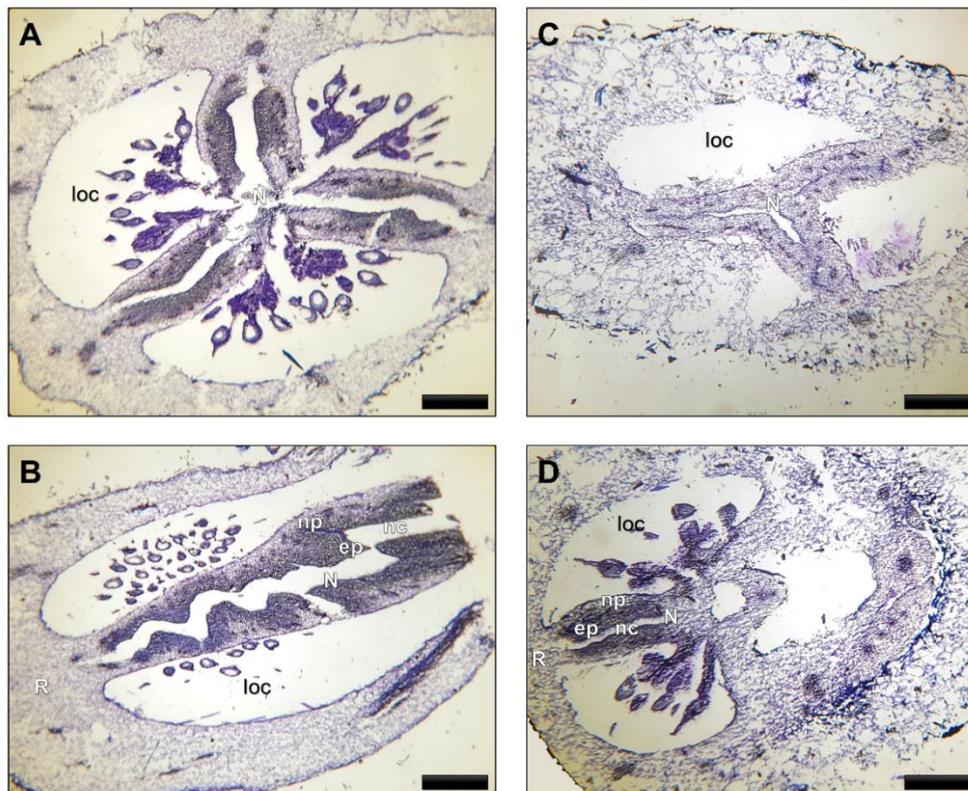


Abbildung 5.8: Vergleich der Querschnitte und Längsschnitte von *A. fasciata* und *A. miniata discolor*. **A:** Querschnitt vom Fruchtknoten von *A. fasciata* (Mikrotom); **B:** Längsschnitt des Fruchtknotens von *A. fasciata* (Mikrotom); **C:** Querschnitt vom Fruchtknoten von *A. miniata discolor*; **D:** Längsschnitt des Fruchtknotens von *A. miniata discolor*. N = Nektariengewebe, loc = Fruchtknoten mit Samenanlage, ep = multiseriales Epithel, np = Nektarienparenchym, nc = Nektarienkanal, R = Blütenboden. Balken = 500 μm .

Im Querschnitt von *A. miniata discolor* lässt sich kaum ein struktureller Unterschied im Gewebe der Nektarien feststellen (Abbildung 5.8 C), wohingegen bei *A. fasciata* durch unterschiedlich starke Anfärbung die Zellstrukturen des Gewebes sichtbar sind (Abbildung 5.8 A). In den Längsschnitten sind diese Strukturmerkmale in beiden Arten erkennbar (Abbildung 5.8 B, D). Das Nektariengewebe kann nach Stahl et al. (2012) in zwei Zelltypen eingeteilt werden (Abbildung 5.8 B, D). Am Rand zum Nektarkanal befinden sich ein multiseriales Epithel (ep) und danach folgt in Richtung der Samenanlagen eine Schicht aus Nektarienparenchym (np).

5.5 Invertase-Aktivität bei verschiedenen Bromelienarten

Nach der Identifizierung des Nektariengewebes (5.4) erfolgte die Analyse der Invertase-Aktivität in verschiedenen Bromelienarten (4.8). Die Funktion der Invertasen in den Nektarien ist die Spaltung der durch das Phloem transportierten Saccharose, wodurch die Hexosen Glucose und Fructose im Nektar zur Verfügung gestellt werden.

Bei der Untersuchung wurde sowohl die Zellwandinvertase als auch die vakuoläre und cytoplasmatische Invertase bestimmt.

Die Aktivität der Zellwandinvertasen ist nicht gattungsspezifisch, ein Großteil der Arten weist eine Aktivität im Bereich von 80–125 U g⁻¹ FG Nektariengewebe auf (Abbildung 5.9). Bei der Bromelienart *N. kautskyi* konnte eine erhöhte Aktivität von mehr als 150 U g⁻¹ FG detektiert werden.

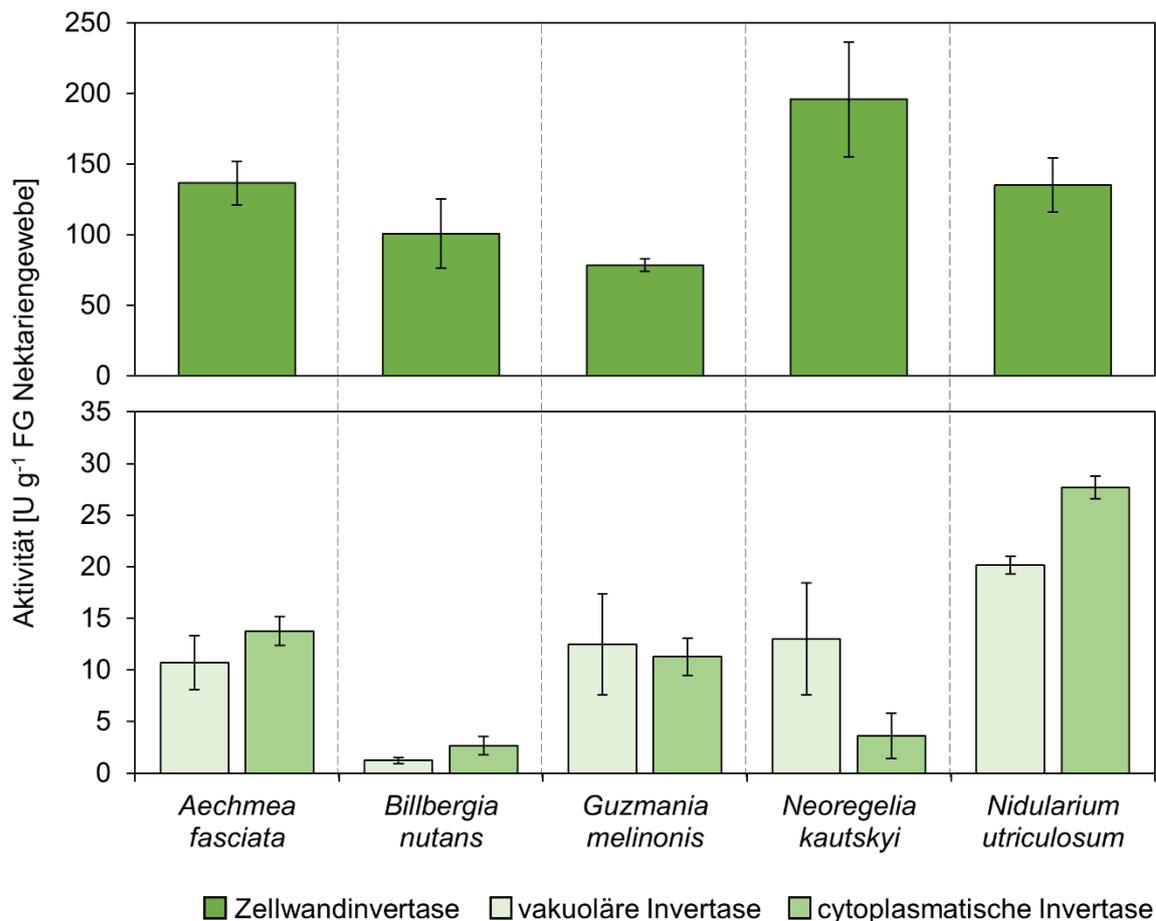


Abbildung 5.9: Aktivität der Zellwandinvertase, vakuolären und cytoplasmatischen Invertasen sortiert nach Bromelienarten.

Im oberen Diagramm ist die Aktivität der Zellwandinvertase in U g⁻¹ FG Nektariengewebe dargestellt. Das untere Diagramm zeigt die um ein vielfaches niedrigere Aktivitäten der vakuolären und cytoplasmatischen Invertasen. Als Fehlerindikator wird die Standardabweichung verwendet. n = 3.

Im Vergleich dazu sind die Aktivitäten der vakuolären und cytoplasmatischen Invertasen um den Faktor 8-10 niedriger als die Aktivitäten der Zellwandinvertasen. Dabei fallen die erhöhten Aktivitäten der beiden Invertasen von mehr als 20 U g⁻¹ FG bei der Bromelienart *Nid. utriculosum* auf. Auch sind die Aktivitäten der sauren und neutralen Invertase nicht bei allen Arten identisch, bei *A. fasciata*, *B. nutans* und

Nid. utriculosum ist die Aktivität der neutrale Invertasen erhöht, wohingegen bei *N. kautskyi* die Aktivität der sauren Invertase in der Vakuole erhöht ist (Abbildung 5.9).

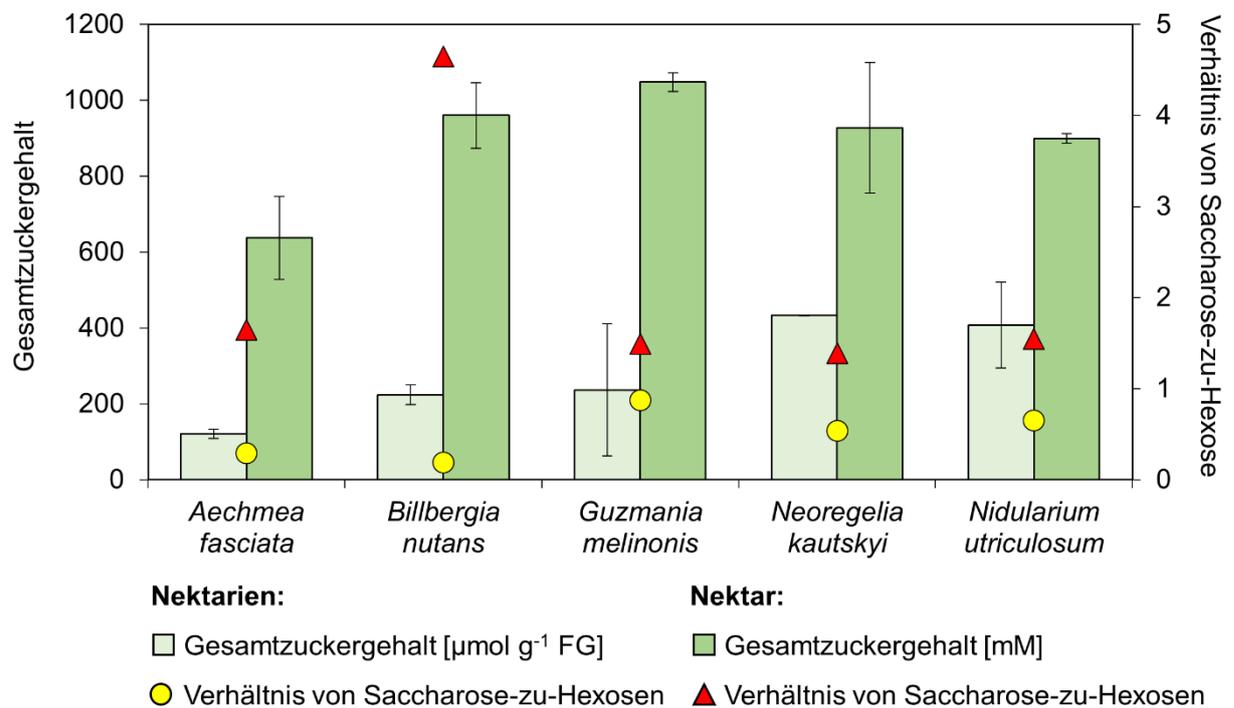


Abbildung 5.10: Vergleich des Gesamtzuckergehalts und des Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen im Nektar und Nektariengewebe.

Dabei ist anhand der Balken im Diagramm der jeweilige Gesamtzuckergehalt in $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG (Glucose, Fructose und Saccharose) in den Nektarien und in mM im Nektar dargestellt. Das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen wird durch die gelben Kreise (Nektarien) und roten Dreiecke (Nektar) dargestellt. Als Fehlerindikator wird die Standardabweichung verwendet. $n = 3$.

Im Zusammenhang mit der Aktivität der drei untersuchten Invertasen wurde auch der Gesamtzuckergehalt in den Nektarien und im Nektar betrachtet, wobei ebenfalls das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in den Vergleich mit einbezogen wurde (Abbildung 5.10). Generell fällt auf, dass der Gesamtzuckergehalt im Nektar im Bereich von 600 bis 1200 mM liegt, wohingegen in den Nektarien nur ein Gehalt im Bereich von 100 bis maximal 400 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG detektiert werden kann. Des Weiteren findet sich im Nektar ein Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen im Bereich von 1,4 (*N. kautskyi*) bis 4,6 (*B. nutans*). In den Nektarien liegt das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen generell unter 1 (Abbildung 5.10). Dabei ist der Unterschied des Verhältnisses zwischen Nektar und Nektarien relativ konstant (*A. fasciata*, *G. melinonis*, *N. kautskyi*, *Nid. utriculosum*). Ein größerer Unterschied ist bei *B. nutans* festzustellen, hierbei ist das Verhältnis der Zucker um den Faktor 23 höher im Nektar als in den Nektarien (Abbildung 5.10).

5.6 Auswirkungen von Umwelteinflüssen auf den Nektar und Nektarien der epiphytisch wachsenden Bromelie *A. fasciata*

Neben dem Zusammenhang zwischen Bestäuber und Nektarzusammensetzung bei der Familie Bromeliaceae, wurde ebenfalls die Auswirkungen von unterschiedlichen Umwelteinflüssen auf die Zusammensetzung von Nektar und Nektariengewebe bei *A. fasciata*, als Vertreter von epiphytisch wachsenden Pflanzen, untersucht.

Die Erforschung von verschiedenen Umwelteinflüssen, wie beispielsweise Trockenheit, erhöhten Temperaturen und unterschiedlichen Lichtbedingungen auf die Pflanzenwelt gewinnt zunehmend an Bedeutung. Bromelien sind als Epiphyten besonders davon betroffen. Die Auswirkungen dieser Einflüsse auf die Metaboliten- und Ionenzusammensetzung von Nektar und Nektarien ist bisher kaum erforscht. Allerdings spielt Nektar eine wesentliche Rolle in der Interaktion zwischen Pflanzen und Bestäuber. Veränderungen im Nektar, aufgrund äußerer Einflüsse, verringern vermutlich die Anzahl der Besuche durch Bestäuber, da dadurch der Nektar seine spezifischen Bestäuber nicht mehr anlockt. Dies führt zu einem sinkenden Reproduktionserfolg der Pflanzen und die tierischen Bestäuber eine Nahrungsquelle bzw. unter Umständen ihre einzige Nahrungsquelle verlieren. Somit bleibt fraglich, inwieweit die Anpassungen der Bromelien an Trockenheit und unterschiedliche Licht- oder Temperaturbedingungen hierfür ausreichend sind.

Um dies zu untersuchen wurde die epiphytisch wachsende Bromelienart *A. fasciata* diesen drei Umweltfaktoren (Lichtverhältnisse, Temperatur und Trockenheit) ausgesetzt, wobei die Zusammensetzung des Nektariengewebes und Nektars analysiert wurden. Bei Epiphyten spielt Trockenheit eine besondere Rolle, denn diese besitzen durch ihre Wurzeln, die nur zur Verankerung dienen, keinen dauerhaften Zugang zu Wasservorkommen und können stattdessen Regenwasser nur über ihre Blätter aufnehmen.

5.6.1 Einfluss von Licht und Dunkelheit auf *Aechmea fasciata*

Die Bromelie *A. fasciata* produziert eine Vielzahl von Blüten von denen täglich drei bis sechs innerhalb der Blütezeit geöffnet sind. Hierbei öffnen sich die Blüten in den Morgenstunden und gegen Abend fangen diese an sich wieder zu verschließen, so dass sie am folgenden Tag nicht mehr für den entsprechenden Bestäuber zu Verfügung stehen. Somit öffnen sich täglich neue Blüten. Bevor sich die Blüten öffnen, weisen die Blütenblätter eine dunkelblaue Färbung auf. Bei der Anthese und auch in

den folgenden Stunden sind diese lila. Nach ca. 12 h verschließen sich die Blüten wieder und besitzen im geschlossenen Zustand eine rosa Blütenfarbe. Aufgrund dessen wurde zu Beginn untersucht inwieweit sich das Blütenalter auf die Zusammensetzung des Nektars auswirkt (4.11). Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass das Blütenalter die Auswirkungen der zu untersuchenden Umwelteinflüsse beeinträchtigt.

Im Tagesverlauf verändert sich das Volumen des Nektars. Während nach der Anthese bis zum frühen Nachmittag ca. 30 µl Nektar pro Blüte entnommen werden kann, nimmt das Volumen im Verlauf weiter ab. Bei älteren bzw. verblühten Blüten liegt nur noch ein geringes Nektarvolumen vor. Die Analyse des Nektars von *A. fasciata* bei normalen Tag-/ Nachtbedingungen zu sechs verschiedenen Uhrzeiten innerhalb von 24 h haben gezeigt, dass sich die Konzentrationen und Zusammensetzungen der Metaboliten und Ionen im Nektar verändern. Im Zeitraum von 8 Uhr bis 16 Uhr kann von frischen Blüten gesprochen werden, wohingegen die Blüten zwischen 20 Uhr und 4 Uhr als alt bezeichnet werden. Bei den frischen Blüten kann eine um den Faktor 3 erhöhte Gesamtzuckerkonzentration im Vergleich zu den Nektarproben von alten Blüten festgestellt werden (Abbildung 5.11). Bei diesem Vergleich kann ebenfalls festgestellt werden, dass sich das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen von ca. 1,8 auf 0,7 verringert.

Der Aminnosäuregehalt im Nektar nimmt von frischen zu alten Blüten um den Faktor 5 zu und ebenfalls kann eine Zunahme der anorganischen Ionen (Kationen und Anionen) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Nektarproben von frischen und alten Blüten wurde ebenso daraufhin untersucht, ob sich nach 24 h und 48 h bei Raumtemperatur der Nektar weiter verändert. Das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen und der Gesamtzuckergehalt im Nektar von frischen Blüten zeigt hierbei keine signifikante Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Wohingegen der Nektar von älteren Blüten zwar einen relativ konstanten Gesamtzuckergehalt besitzt, jedoch das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen signifikant weiter abnimmt (Daten nicht gezeigt).

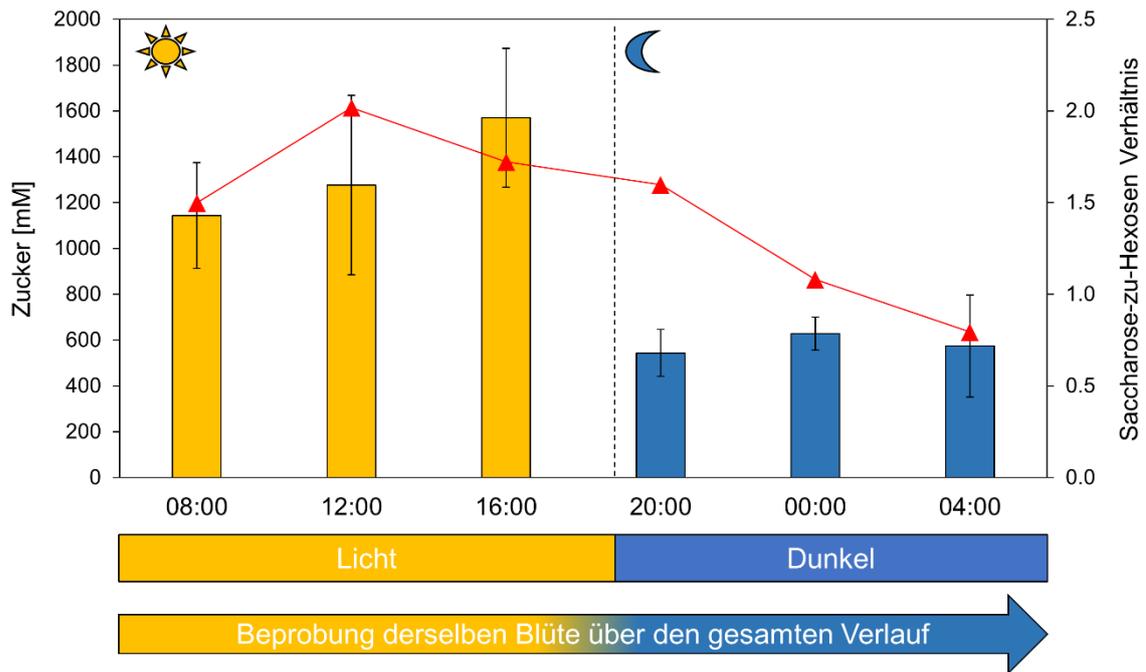


Abbildung 5.11: Gesamtzuckergehalt und Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen im Nektar von *A. fasciata* bei normalen Tag-/ Nachtbedingungen.

Über einen Zeitraum von 24 h wurde zu sechs Zeitpunkten Nektarproben aus derselben Blüte entnommen (Tagbedingungen: 8 Uhr, 12 Uhr, 16 Uhr; Nachtbedingungen: 20 Uhr, 0 Uhr, 4 Uhr). Die Balkendiagramme stellen den Gesamtzuckergehalt (Glukose, Fruktose und Saccharose) und die Linie den Verlauf des Verhältnisses von Saccharose-zu-Hexosen dar (n = 6).

Um den Einfluss unterschiedlicher Lichtverhältnisse auf die Zusammensetzung des Nektars und der Nektarien bei Blüten des gleichen Alters zu analysieren, wurden *A. fasciata* Pflanzen 24 h Dauerlicht und 24 h Dauerdunkel ausgesetzt (4.11). Durch die 24 h Dauerlicht werden sowohl im Nektar als auch in den Nektarien keine signifikanten Veränderungen der Zusammensetzung festgestellt (Abbildung 5.12). Ebenso konnte auch in der Zusammensetzung der genannten Komponenten bei den Nektarien keine Veränderungen nach der 24 stündigen Beleuchtung detektiert werden (Abbildung 5.12). Allerdings war eine geringfügige Zunahme des Stärkegehalts im Nektariengewebe zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Die Bestimmung der Invertase-Aktivität von CW-INV, V-INV und N-INV zeigte ebenso keine Veränderungen (Daten nicht gezeigt).

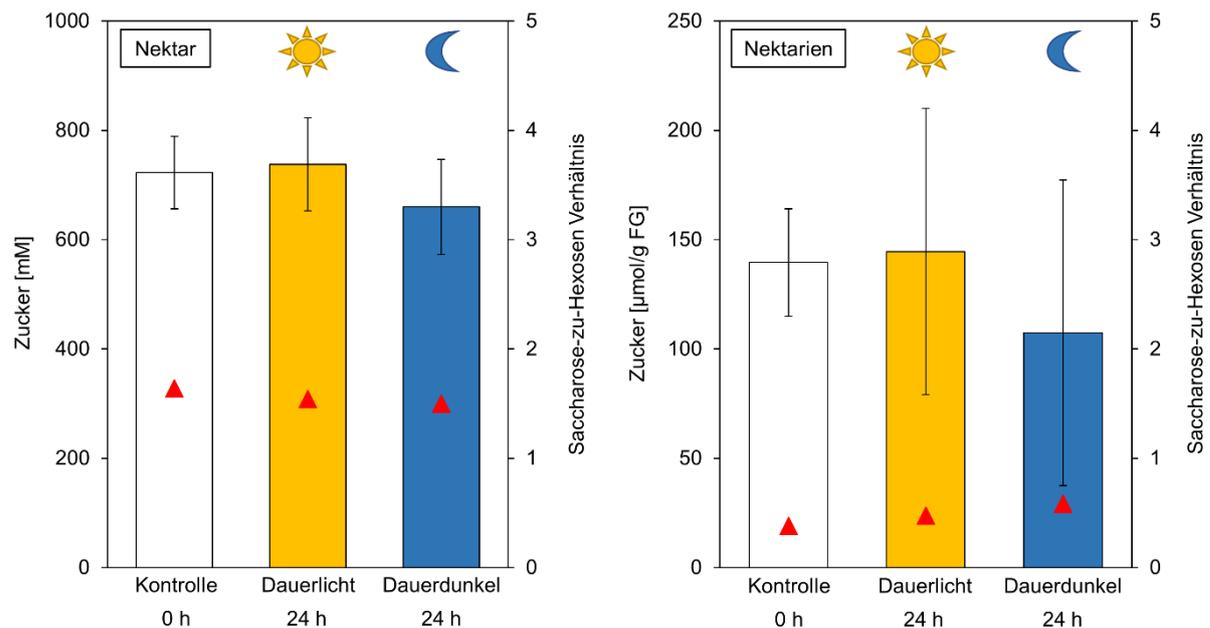


Abbildung 5.12: Gesamtzuckergehalt und Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in Nektar und Nektarien von *A. fasciata* nach 24 h Dauerlicht und 24 h Dunkelheit.

Bromelien der Art *A. fasciata* wurden 24 h Dauerlicht und Dauerdunkelheit ausgesetzt. Ebenso wurden Pflanzen normalen Tag/Nacht-Lichtverhältnissen ausgesetzt und dienten als Kontrollen. Balkendiagramme stellen den Gesamtzuckergehalt und Dreiecke das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in Nektar ($n = 6$) und Nektarien ($n = 3$) dar.

Die Bromelien, welche 24 h Dunkelheit ausgesetzt waren, zeigen eine geringe Abnahme des Zuckergehalts (Abbildung 5.12), sowie eine Zunahme der Gesamt-Aminosäuren und -Ionen, allerdings sind diese Veränderungen nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Die Zusammensetzung der Nektarien zeigt ähnliche Veränderungen, denn auch hierbei wird eine geringe Abnahme des Zuckergehalts festgestellt (Abbildung 5.12). Jedoch zeigen weder der Gehalt an Aminosäuren, Stärke und anorganischen Ionen signifikante Variationen (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu Kontrollpflanzen, die normalen Lichtverhältnissen ausgesetzt waren, nahm hierbei die Aktivität der Zellwandinvertase um 40% ab (Daten nicht gezeigt). Sowohl die Blütenmorphologie als auch das Nektarvolumen bleibt bei 24 h Dauerlicht und 24 h Dunkelheit bei *A. fasciata* unverändert.

Zur Überprüfung, ob nach der Sekretion der Nektar sich weiter verändert, wurde dieser für bis zu 48 h bei RT gelagert und alle 24 h gemessen. Es konnten keine weiteren Veränderungen nach der Nektarsekretion detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

5.6.2 Einfluss von verschiedenen Temperaturen auf *Aechmea fasciata*

Als weiterer Umwelteinfluss wurden verschiedene Temperaturen untersucht. *A. fasciata* wurde schon vor dem Beginn der Blütezeit, zum einen 20°C und zum anderen

35°C ausgesetzt (4.11). Bei beiden Temperaturen konnten keine sichtbaren Veränderungen der Blütenmorphologie und des Nektarvolumens festgestellt werden. Die Untersuchungen des Nektars zeigte, dass sowohl die niedrigen als auch erhöhten Temperaturen nicht den Zuckergehalt und die Zusammensetzung beeinflussen (Abbildung 5.13). Das gleiche konnte auch für die anorganischen Ionen festgestellt werden, allerdings konnte ein signifikanter Anstieg der Gesamt-Aminosäuren zwischen den beiden Temperaturen bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

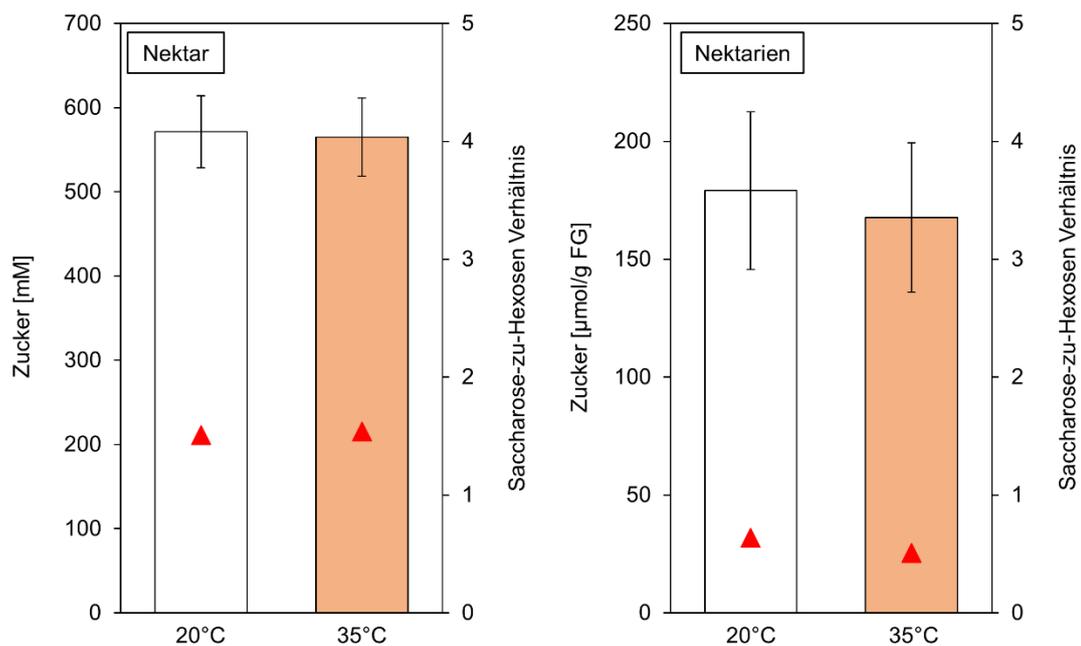


Abbildung 5.13: Gesamtzuckergehalt und Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in Nektar und Nektarien von *A. fasciata* bei 20°C und 35°C. Balkendiagramme stellen den Gesamtzuckergehalt und Dreiecke das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in Nektar (n = 6) und Nektarien (n = 3) dar.

Auf die Zusammensetzung der Nektarien hat die Erhöhung der Temperatur keinen Einfluss (Abbildung 5.13; Daten nicht gezeigt), ebenso auch nicht auf die Aktivität der Invertasen (Daten nicht gezeigt).

Der Nektar wurde ebenfalls bis zu 48 h bei Raumtemperatur inkubiert und täglich gemessen, wodurch festgestellt werden konnte, dass der Nektar sich nach der Sekretion nicht weiter verändert (Daten nicht gezeigt).

5.6.3 Einfluss von Trockenheit auf *Aechmea fasciata*

Die Auswirkungen von Trockenheit wurde ebenfalls bei *A. fasciata* als epiphytischen Vertreter der Bromelien untersucht (4.11). Die Kontrollpflanzen zeigten keine

Veränderungen in Ihrer Metabolit- und Ionenzusammensetzung im Nektar und in den Nektarien, weshalb diese als „Kontrolle Tag 0“ für jeden Parameter zusammengefasst wurden. Die Bromelienart produziert täglich drei bis sechs sich öffnende Blüten, jedoch bei Trockenheit nimmt diese kontinuierlich ab, bis nach 14 Tagen sich keine weiteren Blüten öffnen. Daneben nimmt im gleichen Zeitraum auch das Nektarvolumen ab, so dass die letzten Tage noch ca. 50% des anfänglichen Nektarvolumens in den Blüten zur Verfügung steht.

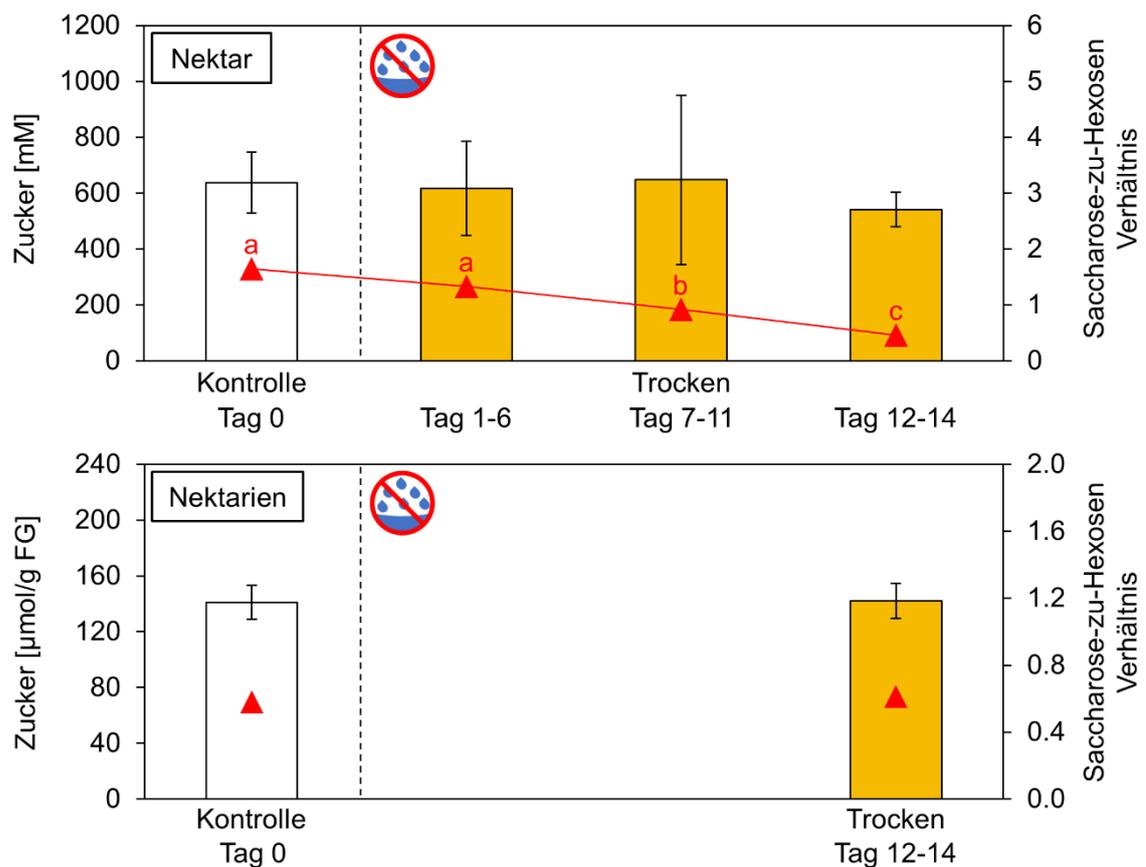


Abbildung 5.14: Gesamtzuckergehalt und Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in Nektar und Nektarien von *A. fasciata* bei Trockenheit.

Balkendiagramme stellen den Gesamtzuckergehalt und Dreiecke das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in Nektar ($n = 6$) und Nektarien ($n = 3$) dar. Unterschiedliche Buchstaben stellen signifikante Unterschiede des Verhältnisses von Saccharose-zu-Hexosen im Nektar dar (Tukey's HSD; $p < 0.05$).

Im Nektar blieb die Zuckerkonzentration bis auf ein paar Schwankungen konstant bei ca. 600 mM (Abbildung 5.14). Hingegen verringerte sich signifikant das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen von 1,6 auf 0,5 ($F(41) = 19,94$; $p < 0,001$) bei 14 Tagen Trockenheit. Die anderen Metaboliten (Aminosäuren und anorganische Ionen) verzeichnen eine geringfügige Zunahme. Um den Einfluss von Trockenheit in den Nektarien zu bestimmen, wurde Nektarien im Zeitraum von Tag 7 bis 14 gesammelt

und gepoolt. Die Konzentration und Zusammensetzungen der Metaboliten und anorganische Ionen in den Nektarien weisen keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen auf (Daten nicht gezeigt). Auch bei der Aktivität der Invertasen (CW-INV, V-INV und N-INV) konnte keine Reaktion auf die trocknen Bedingungen bestimmt werden.

Um zu analysieren, ob sich die Zuckerzusammensetzung nach der Nektarsekretion verändert, wurde der Nektar direkt nach der Probenahme und nach 24 h sowie 48 h gemessen. Dabei konnte detektiert werden, dass sich weder der Zuckergehalt noch die Zusammensetzung signifikant verändert (Daten nicht gezeigt).

Der Vergleich der Metaboliten- und Ionenkonzentrationen im Nektar und Nektarien zeigt, dass sich diese unterscheiden. Die Komponenten in den Nektarien werden in $\mu\text{mol pro g}$ Frischgewicht bestimmt und anschließend werden durch Abschätzung des Wassergehalts die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile extrapoliert. Sowohl bei den Kontrollpflanzen als auch bei den Bromelien unter Trockenheitsbedingungen konnte eine viermal höhere Zuckerkonzentration im Nektar im Vergleich zu den Nektarien festgestellt werden. Die Aminosäurekonzentration in den Nektarien war 20mal höher und die Konzentration an anorganischen Ionen in den Nektarien war 100mal höher als im Nektar (Daten nicht gezeigt).

6. Diskussion

Die Familie Bromeliaceae wurde im Rahmen dieser Arbeit als Modellfamilie verwendet, da sie aufgrund ihrer Artenvielfalt und morphologischen, sowie physiologischen Diversität, besonders geeignet ist die Einflussfaktoren der Nektarzusammensetzung zu untersuchen. Es wurden eine Vielzahl von Nektarkomponenten, sowie das Nektariengewebe von unterschiedlichen Bromelienarten analysiert. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf Faktoren gelegt, die die Inhaltsstoffe des Blütensekrets und der septalen Nektarien beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Studien werden nun in Bezug auf die anfänglichen Fragestellungen zusammengefasst und diskutiert.

6.1 Stabilität der Nektarkomponenten

Einfluss von Standort und mikrobiellem Befall

Die gesammelten Nektarproben (4.5) stammen von verschiedenen Botanischen Gärten aus Deutschland und Österreich. Aufgrund dessen wurde zunächst überprüft, ob diese sich durch die unterschiedlichen Bedingungen in den Gewächshäusern und im Vergleich zu Feldproben unterscheiden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Standort keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung des Zuckers im Nektar hat (5.2, Figure 1). Des Weiteren gibt es bei der Zuckerzusammensetzung keinen Unterschied bei Bromelien aus dem Gewächshaus oder in ihren natürlichen Standorten (5.2, Supplementary Table S6, Krömer et al. 2008).

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Nektar bei einigen Pflanzenarten von mikrobiellem Befall betroffen sein kann (Herrera et al. 2009; Fridman et al. 2012; Aizenberg-Gershtein et al. 2017), da dieser durch seinen Zuckergehalt einen optimalen Lebensraum für Hefen und Bakterien darstellt. Diese Organismen können den Zuckergehalt reduzieren, die Zusammensetzung verändern, sowie den pH-Wert des Nektars erhöhen (Herrera et al. 2008; Vannette et al. 2013). Allerdings besitzen einige Pflanzen Mechanismen um sich gegenüber dem mikrobiellen Befall zu schützen, beispielsweise produzieren diese antimikrobielle Komponenten im Nektar (Martini et al. 1990; Adler 2000; Carter et al. 2007). Diese Komponenten wurden bisher nur in speziellen Arten oder Gattungen untersucht. Es ist fraglich inwieweit diese Erkenntnisse auf andere Pflanzen übertragen werden können.

Bei den oben aufgeführten Studien zum mikrobiellen Befall wurden Feldproben verwendet. Solche Nektarproben können durch von Bestäubern oder Blütenbesuchern transportierte Mikroben kontaminiert werden. Bis auf zwei Ausnahmen, konnten beim mikrobiellen Screening des Nektars, der hier verwendeten Bromelien, keine Kontamination festgestellt werden (5.1, Abbildung 5.1). Die gesammelten Nektarproben stammten ausnahmslos von Bromelien aus Gewächshäusern. Vermutlich wurde der Nektar dieser Pflanzen nicht durch Bestäuber oder andere Besucher kontaminiert. Dennoch ist es nicht vollständig ausgeschlossen, dass auch in den Gewächshäusern eine Kontamination auf anderen Wegen stattfinden kann.

6.2 Einfluss von Bestäubern

Um der Frage nachzugehen, ob die Nektarzusammensetzung bei Bromelien mit dem Bestäubungstyp korreliert und somit die Pflanzen an den Bestäuber angepasst sind, wurden insgesamt 147 Bromelienarten aus 18 Gattungen mit insgesamt 22 Fledermaus-bestäubten Arten analysiert (5.2, Supplementary Table S1). Die Bestäuber der jeweiligen Art wurden entweder anhand der Literatur oder der Blütenmorphologie klassifiziert. Die Bestäuber können in Tag- und Nachtbestäuber eingeordnet werden (3.4). Dabei wurde ein spezielles Augenmerk auf die nächtlichen Bestäuber gelegt, besonders auf die Bestäubung durch Fledermäuse.

In vorangegangenen Arbeiten konnte schon die Zuckerzusammensetzung im Nektar von Bromelien mit dem Bestäubungssyndrom in Zusammenhang gebracht werden (Krömer et al. 2008; Schmid et al. 2011). In diesen Studien konnte festgestellt werden, dass Kolibri- und Schmetterling-bestäubte Pflanzen einen saccharosereichen, wohingegen Fledermaus-bestäubte Arten einen hexosereichen Nektar besitzen. Krömer et al. (2008) vermuteten, dass die Präferenz von Fledermäusen für hexosereichen Nektar als mögliches Ergebnis einer Anpassung an hexosereiche Früchte entstanden ist, da viele nektarfressende Fledermäuse auch fleischige oder saftige Früchte bevorzugen (Baker und Baker 1983b). Über den Zusammenhang anderer Nektarbestandteile und Bestäubertyp war bisher kaum etwas bekannt.

Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Nektarzusammensetzung bei der Familie Bromeliaceae und dem Bestäubertyp?

Die Bromelienarten, welche durch die nachtaktiven Fledermäuse bestäubt werden, besitzen im Nektar den gleichen molaren Gesamtzuckergehalt, wie auch die restlichen

Arten mit anderen Bestäubertypen. Allerdings unterscheidet sich der Nektar dieser 22 Bromelienarten signifikant in der Zuckerzusammensetzung von den anderen Arten und dadurch kann die bereits erwähnte Präferenz für einen hexosereichen Nektar bestätigt werden. Für Fledermausarten der Familie Phyllostomidae wurde eine Sucrase-Aktivität nachgewiesen, weshalb diese auch theoretisch saccharosereichen Nektar aufnehmen und verstoffwechseln könnten (Schondube et al. 2001). Deshalb ist es fraglich, ob diese Bromelienarten einen hexosereichen Nektar wegen der physiologischen Bedürfnisse der Fledermäuse darbieten. Hinsichtlich des hohen Nektarvolumens bei chiropterophilen Arten und bezogen auf das Kohlenstoffäquivalent pro Wasseräquivalent, ist es unter Umständen effektiver einen Nektar mit mehr Hexosen als Saccharose zu produzieren. Interessanterweise unterscheidet sich dieser hexosereiche Nektar nicht nur vom Nektar tagbestäubter Arten, sondern auch vom Nektar nachtbestäubter Arten, z.B. von den Nachtfalterbestäubten Arten (5.2, Figure 2). In der Literatur wird z.B. angegeben, dass der Nachtfalter *Macroglossum stellatarum* eher Saccharose im Nektar bevorzugt (Kelber 2003).

Generell finden sich Aminosäuren in allen untersuchten Proben, jedoch ist Nektar keine ausreichende Stickstoffquelle für die meisten Bestäuber, da sie damit nicht ihren täglichen Bedarf decken können (Baker und Baker 1982; Nicolson und Fleming 2003). Die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung im Nektar lässt sich entweder dadurch erklären, dass diese von stickstoffhaltigen Komponenten im Phloem stammen und über die Nektarien in den Nektar gelangen (Nicolson et al. 2007) oder dass diese Zusammensetzungen an die Präferenzen des Bestäubers angepasst sind. Letzteres wird von den vorliegenden Ergebnissen jedoch nur teilweise bestätigt. Für die Aminosäuren konnte festgestellt werden, dass Prolin die einzige Komponente im Nektar ist, bei der sich Fledermaus-bestäubte Bromelien signifikant von den anderen Arten unterscheiden. (5.2, Figure 2, Figure 3). Es wird vermutet, dass Prolin von Fledermäusen für das Bindegewebe in den Flügelmembranen verwendet wird (Kricher 1997). Für Fledermäuse ist bisher nur bekannt, dass Aminosäuren die Wahl der Nahrungsquelle beeinflussen (Rodríguez-Peña et al. 2013). Genaue Präferenzen für spezielle Aminosäuren sind hingegen nicht bekannt.

Der Nektar von chiropterophilen Bromelien haben signifikant höhere Konzentrationen an anorganischen Ionen als Nektar von anderen Pflanzen (5.2, Figure 2, Figure 3), jedoch ist über die biochemischen Prozesse die zu diesen Unterschieden führen nur

sehr wenig bekannt. Wie schon bei den Aminosäuren, ist keine Präferenz von Ionen bei Fledermäusen bekannt. Allgemein nutzen Kolibris die Ionen im Nektar, um ihre Elektrolytbalance zu beeinflussen (Calder 1979; Hiebert und Calder 1983). Neben den Ionen weist der Nektar von Fledermaus-bestäubten Arten eine signifikant erhöhte Malat-Konzentration auf (5.2, Figure 2, Figure 3). Dies konnte auch schon bei *Nicotiana otophora* festgestellt werden (Tiedge und Lohaus 2017). Es ist wahrscheinlich, dass Malat in diesem Fall nicht als Kohlenstoffquelle dient, sondern den Geschmack des Nektars verändert (Noutsos et al. 2015).

Erst durch die Einbeziehung des Nektarvolumens und Berechnung der Nektarbestandteile pro Blüte zeigt sich, dass sich der Gesamtgehalt von Zucker, Aminosäuren und Ionen signifikant bei Fledermaus-bestäubten Arten von den Bromelien mit anderen Bestäubern unterscheidet (5.2, Figure 4). Das bedeutet, dass chiropterophile Bromelienarten hohe Mengen von Kohlenhydraten, Stickstoffkomponenten und anorganischen Ionen in den Nektar für diesen speziellen Bestäubertyp investieren. Dafür erhält die Pflanze den Vorteil, dass Fledermäuse große Mengen an Pollen über eine weite Entfernung verteilen (Fleming et al. 2009).

Unter Berücksichtigung der Blütenmorphologie, der Blütenfarbe und der Nektarzusammensetzung lässt sich feststellen, dass für viele Arten der Bromeliaceae das Bestäubungssyndrom zutreffend ist.

Um zu überprüfen, ob die festgestellten Variationen in der Nektarzusammensetzung vom Bestäubertyp oder von den taxonomischen Gruppen abhängen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Hierbei wurden die Daten der Nektaranalysen von 19 chiropterophilen (Fledermaus) und 19 trochilophilen (Kolibri) Bromelienarten aus 7 Gattungen miteinander verglichen (5.2). Kolibri-bestäubte Arten wurden zum Vergleich ausgewählt, da es sich um den häufigsten Bestäuber in dieser Familie handelt (Kessler und Krömer 2000). Die graphischen Ergebnisse der PCA implizieren, trotz einiger Überschneidungen, dass der Nektar der unterschiedlich bestäubten Arten voneinander getrennt und gruppiert werden kann (5.2, Figure 5). Zur Validierung der graphischen Resultate wurde zusätzlich eine PERMANOVA durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass die Varianzen zu 41% durch den Bestäuber und nur zu 6% durch die Gattungen erklärt werden können (5.2, Table 1). Damit wurde bestätigt, dass ein deutlich höherer Einfluss durch den Bestäuber als durch die Taxonomie vorliegt. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch eine Studie mit verschiedenen

Nicotiana Arten (Tiedge und Lohaus 2017). Jedoch lag hierbei der Haupteinfluss bei Zuckern und Aminosäuren, wohingegen bei den analysierten Bromelienarten der Einfluss auf die Varianz durch Zucker, Ionen und organischen Säuren hervorgerufen wurde. Bei der Einzelbetrachtung der Aminosäuren ist der Einfluss auf die Datenvarianz eher gering (5.2, Supplementary Table S5). Jedoch können insgesamt 32% der Datenvarianz weder durch den Bestäuber, noch durch die Gattung belegt werden (5.2, Table 1).

Die Phylogenie könnte die Zusammensetzung des Nektars ebenfalls stark beeinflussen. Durch phylogenetische Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Veränderungen nicht mit dem phylogenetischen Signal zusammenhängen (5.2). Diese Ergebnisse bestätigen die Studien von Petanidou et al. (2006) und Schmidt-Lebuhn et al. (2007) bei Acanthaceae, stehen jedoch im Kontrast zu den Ergebnissen von Nicolson and van Wyk (1998) bei Proteaceae. Es ist daher zu vermuten, dass die Nektarzusammensetzung bei verschiedenen Pflanzenfamilien durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst sind bzw. dass die unterschiedlichen Faktoren, wie Bestäubertyp, Phylogenie, einen unterschiedlich starken Einfluss haben.

Können Proteine im Nektar Auskunft über den Bestäuber geben?

Neben den Konzentrationen löslicher Metaboliten und Ionen wurde auch das Proteinprofil (5.3), im Nektar verschiedener Gattungen (Abbildung 5.2), verschiedener Bestäuber (Abbildung 5.3) und verschiedener Pflanzenmerkmale erfasst (Abbildung 5.4, Abbildung 5.5, Abbildung 5.6).

Der Beitrag von Proteinen zur Ernährung von Bestäubern ist vermutlich sehr gering da Proteine nur in sehr geringen Konzentrationen im Nektar vorliegen, wie z.B. bei *Oenothera* Arten, bei denen eine Konzentration von $0,31 \mu\text{g ml}^{-1}$ festgestellt werden konnte (Antoń et al. 2017). Hingegen wurde bei verschiedenen Tabakarten ein Proteingehalt von $44 \mu\text{g ml}^{-1}$ bis $788 \mu\text{g ml}^{-1}$ im Nektar detektiert (Silva et al. 2018). Allgemein scheint der Proteingehalt sich in den verschiedenen Arten stark zu unterscheiden. Beim Vergleich der Proteine im Nektar konnte beim Nektar der untersuchten Arten kein gattungsspezifisches Proteinmuster festgestellt werden (Abbildung 5.2). Der Nektar von Fledermaus-bestäubten Arten zeigt einheitlich eine Proteinbande bei ca. 60 kDa, jedoch kann das Protein vereinzelt ebenfalls beim Nektar von Arten mit trochilophiler Bestäubung bestimmt werden (Abbildung 5.3). Bei der Aufteilung nach Farbe konnte im Nektar von Arten mit weißen und grünen Blüten das

Protein bei ca. 60 kDa detektiert werden. Bei den Arten mit diesen Farben handelt es sich ausschließlich um Fledermaus-bestäubte Bromelien, d.h. es handelt sich um das gleiche Protein. Auch die weiteren Auftrennungen nach Photosynthesetyp und Wachstumsform zeigte kein spezifisches Proteinprofil im Nektar (Abbildung 5.5, Abbildung 5.6). Auch schon bei anderen Studien konnte festgestellt werden, dass das Proteinprofil des Nektars bei Tabakpflanzen auch von Art zu Art unterschiedlich ist (Tiedge 2018; Kerchner et al. 2015).

Bei dem im Nektar gefundenen Protein mit einer molekularen Größe von 60 kDa könnte es sich um eine Zellwandinvertase handeln, deren Größe mit 63 kDa beschrieben wird (Sturm 1999). Da Invertasen bisher nicht im Nektar gefunden wurden, wäre es wahrscheinlicher, dass es sich um Nectarin IV und Nectarin V (61-65 kDa) handelt (Carter und Thornburg 2004; Park und Thornburg 2009). Diese wurden bisher nur im Nektar von *Nicotiana* Arten eindeutig identifiziert und sollen eine Funktion in der Abwehr von mikrobiellem Befall haben (Carter und Thornburg 2004; Schmitt et al. 2018). Die Nectarin-Proteine sind am Nektar-Redox-Zyklus beteiligt, bei dem es sich um einen oxidativen Prozess handelt, der sehr hohe Mengen an Wasserstoffperoxid als Verteidigungsverbindung gegen Mikroben produziert, wodurch die bakterielle Zellwand zerstört wird (Carter und Thornburg 2004). Um die Identität der Proteine im Nektar von Bromelien zu bestimmen müssen weitere massenspektrometrische Analysen und Sequenzvergleiche durchgeführt werden.

Korreliert die Invertase-Aktivität in den Nektarien mit den Gattungen?

Im Nektariengewebe der Blüten, welches durch das Phloem mit Saccharose versorgt wird, wird der Blütennektar produziert und sekretiert (Lohaus und Schwerdtfeger 2014). Allerdings beinhaltet der Phloemsaft keine Hexosen (Nadwodnik und Lohaus 2008), wohingegen der Nektar von Bromelien neben dem Disaccharid auch größere Mengen von Glucose und Fructose aufweist (Krömer et al. 2008). Daher wird vermutlich ein Teil der Saccharose durch spaltende Enzyme, wie z.B. Invertasen gespalten (3.2; Ruhlmann et al. 2010; Tiedge und Lohaus 2018).

Die Aktivität der Zellwandinvertase und der cytoplasmatischen, sowie vakuolären Invertase wurde bei fünf trochilophilen Bromelienarten (*A. fasciata*, *B. nutans*, *G. melinonis*, *N. kautskyi*, *Nid. utriculosum*) untersucht (5.5, Abbildung 5.9). Bei allen untersuchten Arten ist die Zellwandinvertase-Aktivität deutlich höher als die Aktivität der beiden anderen löslichen Invertasen. Des Weiteren liegt keine gattungsspezifische

Aktivität bei den Invertasen vor. Da Fledermaus-bestäubte Bromelienarten nur wenig Blüten pro Tag produzieren, war es bisher noch nicht möglich die Invertase-Aktivitäten bei diesen zu detektieren. Aufgrund des Hexose-reichen Nektars bei diesen Arten, wäre eine Analyse sinnvoll, um Unterschiede zu Kolibri-bestäubten Arten festzustellen. Zusätzlich wurde auch der Gesamtzucker Gehalt und das Saccharose-zu-Hexosen Verhältnis von Nektar und Nektarien miteinander verglichen (Abbildung 5.10). Der Zuckergehalt in den Nektarien ist deutlich niedriger als im Nektar (Tiedge und Lohaus 2018). Anhand dessen können keine spezifischen Einteilungen bezüglich Gattung vorgenommen werden. Bei dem Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen konnte für die Kolibri-bestäubten Arten festgestellt werden (Abbildung 5.10), dass das Verhältnis im Nektar generell höher ist (>1) als in den Nektarien (<1). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Mechanismen der Nektarsekretion bei Tabak und Bromelien unterscheiden. Bei Tabakpflanzen war das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen in den Nektarien höher als im sekretierten Blütennektar. Jedoch war bei diesen die Differenz zwischen den beiden Verhältnissen bei tagaktiven Arten deutlich ausgeprägt (Tiedge und Lohaus 2018). Somit wäre auch die Analyse der Nektarienzusammensetzung bei Fledermaus-bestäubten Bromelienarten notwendig. Dies ist aber relativ schwierig, da viele chiropterophile Bromelien nur eine Blüte pro Tag öffnen und pro Blüte nur relativ wenig Nektariengewebe gewonnen werden kann, da sich dieses nur im Septum des Fruchtknotens befindet.

6.3 Einfluss von unterschiedlichen Umweltfaktoren bei Bromelien

In den ersten Analysen konnte gezeigt werden, dass mehr als 30% der Datenvarianz der unterschiedlichen Bromelienarten nicht durch den Bestäuber, Gattung oder Standort erklärt werden können. Deswegen wurde im zweiten Teil der Arbeit der Einfluss von Umweltbedingungen auf die Nektarzusammensetzung (Zucker, Aminosäuren, anorganische Ionen) und auf die Nektarien (Zucker, Stärke, Aminosäuren, anorganische Ionen, Invertase-Aktivität) analysiert. Ein wichtiger Faktor für Pflanzen ist die Wasserverfügbarkeit. Trockenheit beeinflusst die Pflanzen auf biochemischer, zellulärer und organischer Ebene, wodurch auch die Produktion von Nektar negativ beeinflusst werden kann (Fathi und Tari 2016; Mundim und Pringle 2018). Mehr als die Hälfte der Bromelienarten lebt epiphytisch (Zotz 2013), die besonders von Wassermangel betroffen sind, auch wenn sie Mechanismen entwickelt haben, um dem entgegenzuwirken (Benzing 1980; Silvera et al. 2009). Trockenheit

taucht meist in Verbindung mit erhöhten Temperaturen auf und dieser Umweltfaktor wurde bisher noch nicht hinsichtlich seines Einflusses auf die Nektarzusammensetzung bei Bromelien untersucht. Neben Wasserknappheit und erhöhten Temperaturen, ist Licht ein weiterer Einflussfaktor für Pflanzen (Sarvikas et al. 2006). Epiphyten sind unterschiedlichen Lichtverhältnissen ausgesetzt (Hietz und Briones 2001), deshalb wurde der Einfluss von jeweils 24 h Dauerlicht und Dauerdunkel auf Bromelien untersucht. Die epiphytisch wachsende Bromelienart *A. fasciata* wurde aufgrund ihrer Eigenschaften ausgewählt und hinsichtlich der Auswirkungen unterschiedlicher Lichtverhältnisse (5.6.1), Temperaturen (5.6.2) und Trockenheit (5.6.3) untersucht.

Es konnte schon in einer vorangegangenen Studie gezeigt werden, dass das Blütenalter einen Einfluss auf das Volumen und die Zusammensetzung des Nektars haben (Petanidou et al. 1996), dies konnte ebenso für *A. fasciata* festgestellt werden (Abbildung 5.11). Mögliche Ursachen für das verringerte Volumen können die Nektarresorption von Nektarien oder anderen Blütenzellen sein (Nepi und Stpiczyńska 2007). Durch Saccharose spaltende Enzyme (z.B. Zellwandinvertasen) lässt sich das veränderte Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen erklären (Heil et al. 2005). Damit werden nach der Nektarsekretion stattfindende Veränderungen in alten Blüten unterstützt, welche nicht bei frischen Blüten festgestellt werden können (Abbildung 5.11). Proteolytische Mechanismen führen vermutlich zu den erhöhten Konzentrationen von Aminosäuren und anorganischen Ionen in älteren Blüten. Für die Untersuchung der Umweltfaktoren muss dies berücksichtigt werden, damit das Blütenalter die Auswirkungen der Umweltfaktoren nicht überlagert, deswegen soll bei den Analysen nur Nektar und Nektarien von entsprechend frischen Blüten gesammelt werden.

Dies ist eine der ersten Studien, die verschiedene Umweltfaktoren auf Bromelien untersucht, mit besonderem Schwerpunkt auf der Zusammensetzung des Nektars und der Nektarien. Um das Verständnis der Auswirkungen und Prozesse dieser Einflüsse zu verbessern, sind zusätzliche Untersuchungen an weiteren Bromelienarten notwendig.

Trockenheit beeinflusst die Zuckerzusammensetzung

Der Einfluss von Trockenheit konnte schon bei den Blüten der Pflanzen beobachtet werden, bei *A. fasciata* kam es zu einer Reduktion der täglich öffnenden Blüten, sowie

des produzierten Nektarvolumens (5.6.3). Diese Beobachtungen konnten auch schon für andere Pflanzen festgestellt werden (Phillips et al. 2018; Descamps et al. 2018; Gallagher und Campbell 2017). Generell zeigten bisherige Studien, dass keine einheitlichen Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Trockenheit auf die Nektarzusammensetzung gibt (Borghi et al. 2019). Der Gesamtzuckergehalt blieb bei *A. fasciata* über die gesamte Trockenphase konstant, jedoch verändert sich die Zusammensetzung des Nektars von saccharosereich zu hexosereich (5.6.3, Abbildung 5.14). Das veränderte Verhältnis der Zucker deutet darauf hin, dass die Pflanze den Nektar vor dem Verdunsten schützt. Denn ein hexosereicher Nektar besitzt bei gleicher Zuckermenge eine höhere Osmolalität als ein saccharosereicher Nektar, wodurch dieser langsamer verdunstet (Corbet 1978; Nicolson 1994). Durch diese Veränderungen entsteht ein Nektar, welcher nicht länger attraktiv für den spezifischen Bestäuber (Kolibris) dieser Bromelienart ist, denn diese bevorzugen einen saccharosereichen Nektar (Benzing 2000). Die Verringerung der Blütenzahl und des Nektarvolumens tragen dazu ebenso bei, wodurch es fraglich wird bis zu welchem Punkt das Anlocken der Bestäuber durch die Pflanze noch erfolgreich ist. Der Zuckergehalt und auch das Verhältnis von Saccharose-zu-Hexosen blieben in den Nektarien im Gegensatz zum Nektar konstant (5.6.3, Abbildung 5.14). Das deutet daraufhin, dass die veränderte Nektarzusammensetzung durch Veränderungen in der Zuckersekretion hervorgerufen wird (Ruhlmann et al. 2010; Lin et al. 2014).

Die analysierte Pflanze scheint über einen längeren Zeitraum Trockenheit gut zu überstehen, da sie an kurzweiliger Trockenheit angepasst sind. Durch ihre dicken und wachsigen Blätter, sowie durch die Anordnung der selbigen (3.1, Bernhardt 2003, Moore 2008) und durch die Verwendung des CAM-Metabolismus, können die Pflanzen ihren Wasserverlust verringern (Winter und Smith 1996; Dodd et al. 2002).

Die Auswirkungen von Wassermangel sollte ebenfalls bei Bromelien mit C3-Photosynthese und Fledermaus-Bestäubung untersucht werden. Dies war bisher nicht möglich, da die Anzahl der Blüten dieser Arten nicht ausreichte. Ebenso muss beachtet werden, dass in der Natur, Trockenheit nicht als einzelner Faktor auftritt, sondern mit erhöhter Temperatur und Lichtintensität einhergeht, womit die Veränderungen im Nektar vermutlich beschleunigt und verstärkt werden (Schweiger et al. 2010).

Die Nektarzusammensetzung wird nicht von erhöhten Temperaturen beeinflusst

Bei einer Studie mit erhöhten Temperaturen mit dem Kraut *Saussurea nigrescens* konnten keine veränderten Konzentrationen detektiert werden. Ebenfalls ist eine Abnahme des Nektarvolumens, sowie der Blütenzahl zu verzeichnen (Mu et al. 2015). Eine weitere Studie bei *Borago officinalis* über einen Zeitraum von fünf Wochen mit erhöhten Temperaturen hat gezeigt, dass das Nektarvolumen mehr beeinflusst wird als die Zuckerzusammensetzung des Nektars (Descamps et al. 2018). Ebenso wurde festgehalten, dass steigende Temperaturen die Produktion des Nektars bei mediterranen Pflanzenarten negativ beeinflussen (Takkis et al. 2018). Die Bromelienart *A. fasciata* wurde für mehrere Tage Temperaturen in Höhe von 35°C ausgesetzt, dabei konnten ebenfalls keine Veränderungen in der Nektarzuckerkonzentration detektiert werden (Abbildung 5.13). Ebenso sind keine Veränderungen bei der Blütenmorphologie und des Nektarvolumens festzustellen. Da diese Bromelienart in subtropischen Regionen wächst, ist diese Art vermutlich besser an die erhöhten Temperaturen angepasst. Aber ebenso muss festgehalten werden, dass im Vergleich zu den anderen Studien die Dauer des erhöhten Temperatureinflusses geringer war, weshalb vermutlich noch keine Auswirkungen auf die Morphologie und den Nektar beobachtet werden konnten. Bisher liegen noch keine weiteren Studien mit weiteren Bromelienarten zum Thema Temperaturstress vor, weshalb noch nicht definitiv festgehalten werden kann, ob diese Anpassung an erhöhten Temperaturen nur für *A. fasciata* oder auch andere Pflanzenarten zutrifft.

Die Nektarzusammensetzung wird nicht von Dauerlicht und Dauerdunkel beeinflusst

Durch das Aussetzen von *A. fasciata* über 24 h in Dauerlicht konnte keine Veränderung in den untersuchten Parametern in Nektar und Nektarien festgestellt werden (5.6.1, Abbildung 5.12). In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Licht das Photosystem II verändert bzw. stört (Sarvikas et al. 2006), wodurch Veränderungen der Zuckerzusammensetzung möglich gewesen wären. Ebenso zeigten Studien, dass Lichtstress zu veränderten Wachstum und Entwicklung von epiphytischen Pflanzen führt (Stancato et al. 2002; Díez et al. 2017). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die verwendeten Lichtintensitäten zu gering waren. In anderen Studien zu Lichtverhältnissen wurde eine Intensität von mehr als 1000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verwendet (Ksas et al. 2015; Nguyen et al. 2018), während bei diesen Versuchen unter Gewächshausbedingungen eher 300 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$

genutzt wurden. Deshalb könnte die verwendete Lichtintensität zu gering gewesen zu sein, um größere Auswirkungen in der Photosynthese oder anderen physiologischen Prozessen hervorzurufen.

Bei 24 h Dunkelheit konnte beobachtet werden, dass *A. fasciata* keine Veränderung der Blütenzahl oder des Nektarvolumens aufweist. Bei *Fagopyrum esculentum* konnte gezeigt werden, dass bei einem Tag in Dunkelheit die Anzahl der sich öffnenden Blüten verringert (Cawoy et al. 2008). Beim Fehlen von Licht ist das Öffnen der Blüten und die Nektarsekretion gestört, was vermutlich mit einer verringerten Photosyntheseleistung und somit der verringerten Produktion von Zucker zusammenhängt. Weiterhin ist bei Dunkelheit der Phloemtransport verringert, jedoch nicht vollständig gestoppt (Riens et al. 1994). Bei *A. fasciata* konnte bei 24 h Dunkelheit nur eine geringfügige Veränderung des Gesamtzuckers in Nektar und Nektarien festgestellt werden (Abbildung 5.12). Wohingegen in einer anderen Studie mit Kürbissen schon nach 5 h eine Verringerung des Zuckergehalts im Nektar festgestellt werden konnte (Solhaug et al. 2019 a). Nach den 24 h in Dunkelheit zeigt diese Bromelienart eine erhöhte Konzentration von Aminosäuren und anorganischen Ionen, jedoch waren diese Veränderungen nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Da die Ursprünge dieser Nektarbestandteile noch nicht vollständig geklärt sind (Nicolson und Thornburg 2007), kann nur vermutet werden, dass bei Dunkelheit weniger Zucker von den Nektarien in den Nektar transportiert wird, aber dafür mehr Aminosäuren und Ionen in den Nektar gelangen. Bromelien scheinen auf bestimmte Umweltbedingungen, wie z.B. Dauerdunkel, eher langsamer zu reagieren als einige anderen Pflanzenarten, da diese auch an schattigen Plätzen wachsen.

6.4 Nektar wird in Nektarien gebildet

Das Nektariengewebe in der Familie Bromeliaceae besteht am Rand des Nektarkanals aus Nektarienparenchym und multiserialem Epithel (5.4, Stahl et al. 2012). Im Gegensatz zu anderen Pflanzenarten findet sich bei dem Nektariengewebe im Faltungsbereich keine Cuticula (Paiva und Machado 2008). Die Parenchymzellen der Nektarien einiger Pflanzenarten enthalten große Mengen an Stärke, welche in der präsekretorischen und sekretorischen Phase genutzt werden können (Paiva und Machado 2008; Stahl et al. 2012). Die Stärke wird somit benötigt, sobald floraler Nektar innerhalb kürzester Zeit produziert werden muss (Pacini et al. 2003). Jedoch findet sich in den Nektarien von Bromelien nur sehr wenig Stärke, weshalb die Zucker im

Nektar vermutlich eher durch Saccharose aus dem Phloem und nur zu einem geringen Anteil aus der Stärke in den Nektarien produziert wird.

Aufgrund der Differenzen zwischen dem Gesamtzuckergehalt und dem Zuckerverhältnis in den Nektarien und Nektar bei den untersuchten Bromelienarten (Abbildung 5.10, 5.6.3, Abbildung 5.14) kann vermutet werden, dass dies das Ergebnis einer regulierten Zuckersekretion aus den Nektarien ist oder von Stoffwechselprozessen während der Sekretion verursacht wurde. Da die gemessenen Zuckerkonzentrationen im Nektar höher waren als in den Nektarien ist von einer aktiven Zuckerexkretion auszugehen. Für einen aktiven Transport könnten Transporter, wie Monosaccharidtransporter (MSTs) und/oder Saccharosetransporter (SUTs), die bereits in den Blüten von *Arabidopsis* (Sherson et al. 2003) und *Nicotiana* (Lemoine et al. 1999) gefunden wurden, zuständig sein. In *Nicotiana* wurden auch sogenannte SWEET gefunden (Lin et al. 2014). SWEET9 soll z.B. für die erleichterte Diffusion der Saccharose aus den Nektarienzellen verantwortlich sein. In *Ananas comosus* wurden ebenfalls SWEET-Gene gefunden, aber deren Funktion ist bisher noch nicht geklärt (Guo et al. 2018). Da diese Transporter nur die Diffusion erleichtern, müssten die Zelltypen der Nektarien erhöhte Saccharosekonzentrationen für den Transport aufweisen. Da bei den Messungen das gesamte Nektariengewebe analysiert wurde, ist nicht auszuschließen, dass bestimmte Bereiche erhöhte Konzentrationen von Saccharose aufweisen, wodurch beispielsweise, je nach Bedarf, die Diffusion von Saccharose von den Parenchymzellen zu den Epithelzellen möglich wäre. Somit zeigt sich, dass es notwendig ist, weitere Analysen bezüglich der Nektarproduktion und -sekretion durchzuführen.

Für die anderen Nektarkomponenten wird vermutet, dass diese durch den Phloemsaft (Nicolson et al. 2007) oder geringfügig auch über das Xylem in die Nektarien und dann in den sekretierenden Nektar gelangen. Im Gegensatz zu Zucker, waren die Konzentrationen von Aminosäuren und anorganischen Ionen in den Nektarien höher als im Nektar (5.6.3). Des Weiteren variierte die Aminosäurekonzentration weitaus mehr als die Zuckerkonzentration im Nektar (5.2, 5.6.3). Aufgrund dessen wäre es denkbar, dass erleichternde Diffusionstransporter oder Transportkanäle für Aminosäuren und Ionen existieren. Durch diese gelangen sie in den Nektar.

6.5 Einflussfaktoren der Nektarzusammensetzung

Für eine Pflanzenart ist die Nektarzusammensetzung relativ konstant, variiert jedoch zwischen den Arten. Bei der Familie Bromeliaceae konnte bestätigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Nektarzusammensetzung und dem Bestäubungstyp besteht (5.2), wodurch die verschiedenen Arten einen für den Bestäuber attraktiven Nektar sekretieren. Dies konnte auch schon bei anderen Pflanzenarten gezeigt werden (Nicolson und Thornburg 2007; Krömer et al. 2008; Tiedge und Lohaus 2017). Chiropterophile Bromelienarten investieren hohe Mengen von Kohlenhydraten, Stickstoffkomponenten und anorganische Ionen in diesen speziellen Bestäubertyp. Insgesamt konnten 41% der Varianzen der Nektarzusammensetzung durch den Bestäuber und 6% durch die Taxonomie erklärt werden. Einen Zusammenhang zwischen den Varianzen und der Phylogenie konnte bei den analysierten Arten nicht festgestellt werden. Jedoch konnte bei den Analysen mittels PCA und PERMANOVA 32% der vorliegenden Unterschiede im Nektar nicht durch die untersuchten Faktoren erklärt werden (5.2, Table 1). Somit gibt es noch weitere Faktoren, wie Umwelteinflüsse, die zu den gefundenen Unterschieden im Nektar beitragen (Petanidou et al. 1996; Gardener und Gillman 2001 b; Waser und Price 2016; Clearwater et al. 2018).

Zu den wichtigsten Umweltfaktoren gehören Temperatur, Lichtverhältnisse und Wasserverfügbarkeit. Für Trockenheit konnte bei Bromelien gezeigt werden, dass sich das Nektarvolumen und die Zuckerzusammensetzung im Nektar verändert (5.6.3). Diese Auswirkungen auf den Nektar konnten auch in einer anderen Studie bei Wildblumenarten (*Lathyrus pratensis*, *Onobrychis viciifolia* and *Prunella vulgaris*) festgestellt werden (Phillips et al. 2018). Für die anderen Nektarbestandteile der Bromelien konnte keine Veränderungen festgestellt werden, ebenfalls nicht für die Nektarien (5.6.3, Daten nicht gezeigt). Bei *A. fasciata* ist kein Einfluss auf die Zusammensetzung des Nektars und der Nektarien von erhöhten Temperaturen (5.6.2) und veränderten Lichtperioden (5.6.1) festzustellen. Bei Trockenheit wird hauptsächlich die Zuckerzusammensetzung des Nektars beeinflusst und führt dazu, dass der Nektar von saccharosereich zu hexosereich wechselt. Diese Veränderung konnte bisher nur bei der CAM-Pflanze *A. fasciata* festgestellt werden, weshalb weitere Analyse von anderen Arten, besonders C3-Pflanzen, notwendig sein wird. Auf die anderen Umweltbedingungen (Temperatur, Dauerlicht und Dauerdunkel) scheint die epiphytisch wachsende Bromelienart *A. fasciata* langsamer bzw. kaum zu reagieren,

weshalb vermutet werden kann, dass diese an bestimmte Bedingungen besser angepasst ist. Jedoch muss noch überprüft werden, inwieweit dies auch für andere Arten dieser Familie zutrifft.

Neben den klimatischen Veränderungen gibt es noch weitere Umweltfaktoren. In einigen Studien wurde festgehalten, dass durch die zusätzliche Stickstoffzufuhr der Aminosäuregehalt im Nektar verändert werden kann (Gardener und Gillman 2001 b; Gijbels et al. 2015). Unter natürlichen Bedingungen können Mikroorganismen den Zuckergehalt und die Zusammensetzung des Blütennektars massiv verändern (Vannette und Fukami 2016, 2018; Aizenberg-Gershtein et al. 2017). In einer anderen Studie konnte bei *Brassica nigra* sogar gezeigt werden, dass Pflanzenfresser, die während der Blütezeit die Blätter essen, den Zuckergehalt im Nektar und den Blütenduft beeinflussen (Bruinsma et al. 2014).

Die bisher nicht bei Bromelien analysierten Umweltfaktoren im Zusammenhang mit der Nektarzusammensetzung, tragen vermutlich dazu bei, die auftretenden Unterschiede im Nektar zu erklären und sollten deshalb ebenfalls untersucht werden. Die Schwierigkeit bei den genannten Parametern ist, dass diese generell nicht alleine auftreten und sich ebenso gegenseitig beeinflussen. Dadurch kann mehrfacher Stress bei den Pflanzen entstehen, der sich dann ebenso in der Nektarzusammensetzung widerspiegelt.

Durch die fortschreitenden klimatischen Veränderungen werden die Effekte bestimmter Umweltfaktoren (Wasserverfügbarkeit, Lichtverhältnisse und erhöhte Temperatur) vermutlich noch weiter steigen (IPCC 2014). Neben ihrem Einfluss auf den gesamten Pflanzenstoffwechsel könnte dies auch einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Sekretion des Nektars sowie auf die Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Bestäuber haben (Brown et al. 2016; Borghi et al. 2019). Somit werden irgendwann die Umwelteinflüsse die artspezifische Nektarzusammensetzung bei den Bromelien überdecken. Dadurch kommt es dann zu Störungen bei der Interaktion zwischen Pflanzen und Bestäuber. Das bedeutet einerseits für die Bromelien, dass diese sich vermutlich nicht mehr erfolgreich reproduzieren können, andererseits für den Bestäuber, dass diesem eine notwendige Nahrungsquelle fehlt.

7. Literaturverzeichnis

- Abrahamczyk, S.; Kessler, M.; Hanley, D.; Karger, D.N.; Müller, M.P.J.; Knauer, A.C. et al.** (2017): Pollinator adaptation and the evolution of floral nectar sugar composition. *Journal of evolutionary biology* 30 (1), 112–127. doi: 10.1111/jeb.12991.
- Ackermann, C.** (2018): Analyse des Proteingehalts und der Invertaseaktivität im Nektar und in den Nektarien ausgewählter Bromelien-Arten. Bachelor Thesis. Bergische Universität Wuppertal. Molekulare Pflanzenforschung / Pflanzenbiochemie.
- Adler, L.S.** (2000): The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91 (3), 409–420. doi: 10.1034/j.1600-0706.2000.910301.x.
- Adler, L.S.; Wink, M.; Distl, M.; Lentz, A.J.** (2006): Leaf herbivory and nutrients increase nectar alkaloids. *Ecology letters* 9 (8), 960–967. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00944.x.
- Aguilar-Rodríguez, P.A.; Krömer, T.; García-Franco, J.G.; MacSwiney G., M.C.** (2016): From dusk till dawn: nocturnal and diurnal pollination in the epiphyte *Tillandsia heterophylla* (Bromeliaceae). *Plant biology* 18 (1), 37–45. doi: 10.1111/plb.12319.
- Aguilar-Rodríguez, Pedro A.; Krömer, T.; Tschapka, M.; García-Franco, J.G.; Escobedo-Sarti, J.; MacSwiney G., M.C.** (2019): Bat pollination in Bromeliaceae. *Plant Ecology & Diversity* 12 (1), 1–19. doi: 10.1080/17550874.2019.1566409.
- Aguilar-Rodríguez, P.A.; MacSwiney G., M.C.; Krömer, T.; García-Franco, J.G.; Knauer, A.; Kessler, M.** (2014): First record of bat-pollination in the species-rich genus *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 113 (6), 1047–1055. doi: 10.1093/aob/mcu031.
- Ainsworth, E.A.** (2008): Rice production in a changing climate. A meta-analysis of responses to elevated carbon dioxide and elevated ozone concentration. *Global Change Biol* 14 (7), 1642–1650. doi: 10.1111/j.1365-2486.2008.01594.x.
- Aizenberg-Gershtein, Y.; Izhaki, I.; Halpern, M.** (2017): From microhabitat of floral nectar up to biogeographic scale: Novel insights on neutral and niche bacterial assemblies. *Microbial ecology* 74 (1), 128–139. doi: 10.1007/s00248-017-0935-9.
- Almeida, V.R.; Ferreira da Costa, A.; Mantovani, A.; Gonçalves-Esteves, V.; Oliveira, R.C.; Forzza, R.C.** (2009): Morphological phylogenetics of *Quesnelia* (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Systematic Botany* 34 (4), 660–672. doi: 10.1600/036364409790139619.
- Alves-Silva, R.; da Silva, H.R.** (2009): Life in bromeliads. Reproductive behaviour and the monophyly of the *Scinax perpusillus* species group (Anura: Hylidae). *Journal of Natural History* 43 (3-4), 205–217. doi: 10.1080/00222930802568808.
- Amorim, F.W.; Galetto, L.; Sazima, M.** (2013): Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant biology* 15 (2), 317–327. doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00643.x.
- Anderson, M.J.** (2001): A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26 (1), 32–46. doi: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.

- Antoñ, S.; Komoñ-Janczara, E.; Denisow, B.** (2017): Floral nectary, nectar production dynamics and chemical composition in five nocturnal *Oenothera* species (Onagraceae) in relation to floral visitors. *Planta* 246 (6), 1051–1067. doi: 10.1007/s00425-017-2748-y.
- Ashworth, L.; Aguilar, R.; Martén-Rodríguez, S.; Lopezaraiza-Mikel, M.; Avila-Sakar, G.; Rosas-Guerrero, V.; Quesada, M.** (2015): Pollination syndromes. A global pattern of convergent evolution driven by the most effective pollinator. *Evolutionary Biology: Biodiversification from Genotype to Phenotype*, 203–224. doi: 10.1007/978-3-319-19932-0_11.
- Bader, M.Y.; Menke, G.; Zotz, G.** (2009): Pronounced drought tolerance characterizes the early life stages of the epiphytic bromeliad *Tillandsia flexuosa*. *Funct Ecol* 23 (3), 472–479. doi: 10.1111/j.1365-2435.2009.01547.x.
- Baker, H.G.** (1977): Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie* 8 (4), 349–356. doi: 10.1051/apido:19770405.
- Baker, H.G.; Baker, I.** (1973): Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature* 241, 543–545. doi: 10.1038/241543b0.
- Baker, H.G.; Baker, I.** (1982): Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. In: M. H. Nitecki (ed.), *Biochemical aspects of evolutionary biology*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 131–171.
- Baker, H.G.; Baker, I.** (1983a): A brief historical review of the chemistry of floral nectar. Pp. 126-152. In: B. Bentley und T. Elias (Hg.): *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, New York, 259.
- Baker, H.G.; Baker, I.** (1983b): Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type, 117–141. doi: 10.2307/2443763.
- Baker, H.G.; Baker, I.; Hodges, S.A.** (1998): Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics. *Biotropica* 30 (4), 559–586. doi: 10.1111/j.1744-7429.1998.tb00097.x.
- Barfuss, M.H.J.; Samuel, R.; Till, W.; Stuessy, T.F.** (2005): Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American journal of botany* 92 (2), 337–351. doi: 10.3732/ajb.92.2.337.
- Barfuss, M.H.J.; Till, W.; Leme, E.; Pinzón, J.P.; Manzanare, J.M.; Halbritter, H. et al.** (2016): Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. *Phytotaxa* 279 (1), 1. doi: 10.11646/phytotaxa.279.1.1.
- Bauder, J.A.S.; Lieskonig, N.R.; Krenn, H.W.** (2011): The extremely long-tongued Neotropical butterfly *Eurybia lycisca* (Riodinidae). *Proboscis morphology and flower handling*. *Arthropod Structure & Development* 40 (2), 122–127. doi: 10.1016/j.asd.2010.11.002.
- Bawa, K.S.** (1990): Plant-Pollinator Interactions in Tropical Rain Forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21 (1), 399–422. doi: 10.1146/annurev.es.21.110190.002151.
- Benzing, D.H.** (1976): Bromeliad trichomes structure function and ecological significance. *Selbyana* 1 (4), 330–348. doi: 10.2307/41759602.
- Benzing, D.H.** (1980): *The biology of the Bromeliads*. Mad River Press, Eureka, California.

- Benzing, D.H.** (1998): Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. *Climatic Change* 39 (2/3), 519–540. doi: 10.1023/A:1005312307709.
- Benzing, D.H.** (2000): Bromeliaceae. Profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bernardello, M.; Galetto, L.; Juliani, H.R.** (1991): Floral nectar, nectary structure and pollinators in some Argentinean Bromeliaceae. *Annals of Botany* (67), 401–411. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a088156.
- Bernhardt, P.** (2003): Wily violets & underground orchids. Revelations of a botanist. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Bertazzini, M.; Forlani, G.** (2016): Intraspecific variability of floral nectar volume and composition in rapeseed (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). *Frontiers in plant science* 7, 288. doi: 10.3389/fpls.2016.00288.
- Blüthgen, N.; Fiedler, K.** (2004): Preferences for sugars and amino acids and their conditionality in a diverse nectar-feeding ant community. *Journal of Animal Ecology* 73 (1), 155–166. doi: 10.1111/j.1365-2656.2004.00789.x.
- Borghi, M.; Souza, L.P. de; Yoshida, T.; Fernie, A.R.** (2019): Flowers and climate change. A metabolic perspective. *New phytologist*. doi: 10.1111/nph.16031.
- Brown, M.J.F.; Dicks, L.V.; Paxton, R.J.; Baldock, K.C.R.; Barron, A.B.; Chauzat, M. et al.** (2016): A horizon scan of future threats and opportunities for pollinators and pollination. *PeerJ* 4, e2249. doi: 10.7717/peerj.2249.
- Bruinsma, M.; Lucas-Barbosa, D.; Broeke, C.J.M.; van Dam, N.M.; van Beek, T. A.; Dicke, M.; van Loon, J.J.A.** (2014): Folivory affects composition of nectar, floral odor and modifies pollinator behavior. *Journal of chemical ecology* 40 (1), 39–49. doi: 10.1007/s10886-013-0369-x.
- Calder, W.A.** (1979): On the temperature-dependency of optimal nectar concentrations for birds. *Journal of Theoretical Biology* 78 (2), 185–196. doi: 10.1016/0022-5193(79)90263-7.
- Calder, W.A.; Hiebert, S.M.** (1983): Nectar feeding, diuresis, and electrolyte replacement of hummingbirds. *Physiological Zoology* 56 (3), 325–334. doi: 10.1086/physzool.56.3.30152597.
- Canela, M.B.F.; Sazima, M.** (2005): The pollination of *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae) in southeastern Brazil. Ornithophilous versus melittophilous features. *Plant biology* 7 (4), 411–416. doi: 10.1055/s-2005-865619.
- Carroll, A.B.; Pallardy, S.G.; Galen, C.** (2001): Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *Am. J. Bot.* 88 (3), 438–446. doi: 10.2307/2657108.
- Carter, C.; Healy, R.; O'Tool, N.M.; Naqvi, S.M.S.; Ren, G.; Park, S. et al.** (2007): Tobacco nectaries express a novel NADPH oxidase implicated in the defense of floral reproductive tissues against microorganisms. *Plant physiology* 143 (1), 389–399. doi: 10.1104/pp.106.089326.
- Carter, C.; Shafir, S.; Yehonatan, L.; Palmer, R.G.; Thornburg, R.** (2006): A novel role for proline in plant floral nectars. *Die Naturwissenschaften* 93 (2), 72–79. doi: 10.1007/s00114-005-0062-1.

- Carter, C.; Thornburg, R.W.** (2004): Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends in plant science* 9 (7), 320–324. doi: 10.1016/j.tplants.2004.05.008.
- Cascante-Marín, A.; Oostermeijer, J.G.B.; Wolf, J.H.D.; den Nijs, J.C.M.** (2005): Reproductive biology of the epiphytic bromeliad *Werauhia gladioliflora* in a premontane tropical forest. *Plant biology* 7 (2), 203–209. doi: 10.1055/s-2005-837584.
- Cassia, R.; Nocioni, M.; Correa-Aragunde, N.; Lamattina, L.** (2018): Climate change and the impact of greenhouse gasses. CO₂ and NO, Friends and foes of plant oxidative stress. *Frontiers in plant science* 9, 273. doi: 10.3389/fpls.2018.00273.
- Cawoy, V.; Kinet, J.-M.; Jacquemart, A.-L.** (2008): Morphology of nectaries and biology of nectar production in the distylous species *Fagopyrum esculentum*. *Annals of Botany* 102 (5), 675–684. doi: 10.1093/aob/mcn150.
- Chalcoff, V.R.; Aizen, M.A.; Galetto, L.** (2006): Nectar concentration and composition of 26 species from the temperate forest of South America. *Annals of Botany* 97 (3), 413–421. doi: 10.1093/aob/mcj043.
- Chew, T.; Luna, E. de; González, D.** (2010): Phylogenetic relationships of the pseudobulbous *Tillandsia* species (Bromeliaceae) Inferred from cladistic analyses of ITS 2, 5.8S ribosomal RNA gene, and ETS sequences. *Systematic Botany* 35 (1), 86–95. doi: 10.1600/036364410790862632.
- Clearwater, M.J.; Revell, M.; Noe, S.; Manley-Harris, M.** (2018): Influence of genotype, floral stage, and water stress on floral nectar yield and composition of mānuka (*Leptospermum scoparium*). *Annals of Botany* 121 (3), 501–512. doi: 10.1093/aob/mcx183.
- Corbet, S.A.** (1978): Bee visits and the nectar of *Echium vulgare* L. and *Sinapis alba* L. *Ecol Entomol* 3 (1), 25–37. doi: 10.1111/j.1365-2311.1978.tb00900.x.
- Corbet, S.A.** (2003): Nectar sugar content. Estimating standing crop and secretion rate in the field. *Apidologie* 34 (1), 1–10. doi: 10.1051/apido:2002049.
- Costa, A.F. da; Gomes-da-Silva, J.; Wanderley, M.D.G.L.** (2015): *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae). A cladistic analysis of eastern Brazilian species based on morphological characters. *Rodriguésia* 66 (2), 429–440. doi: 10.1590/2175-7860201566211.
- Crayn, D.M.; Winter, K.; Schulte, K.; Smith, J.A.C.** (2015): Photosynthetic pathways in Bromeliaceae. Phylogenetic and ecological significance of CAM and C 3 based on carbon isotope ratios for 1893 species. *Bot J Linn Soc* 178 (2), 169–221. doi: 10.1111/boj.12275.
- Cresswell, J.E.; Galen, C.** (1991): Frequency-dependent selection and adaptive surfaces for floral character combinations. The pollination of *Polemonium viscosum*. *The American naturalist* 138 (6), 1342–1353. doi: 10.1086/285290.
- Demmig-Adams, B.; Adams, W.W.** (1992): Photoprotection and Other Responses of Plants to High Light Stress. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43 (1), 599–626. doi: 10.1146/annurev.pp.43.060192.003123.
- Descamps, C.; Quinet, M.; Baijot, A.; Jacquemart, A.-L.** (2018): Temperature and water stress affect plant-pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae). *Ecology and evolution* 8 (6), 3443–3456. doi: 10.1002/ece3.3914.

- Díez, M.C.; Moreno, F.; Gantiva, E.** (2017): Effects of light intensity on the morphology and CAM photosynthesis of *Vanilla planifolia* Andrews. *Rev. Fac. Nac. Agron.* 70 (1), 8023–8033. doi: 10.15446/rfna.v70n1.61736.
- Dodd, A.N.; Borland, A.M.; Haslam, R.P.; Griffiths, H.; Maxwell, K.** (2002): Crassulacean acid metabolism. Plastic, fantastic. *Journal of experimental botany* 53 (369), 569–580. doi: 10.1093/jexbot/53.369.569.
- Dusenge, M.E.; Duarte, A.G.; Way, D.A.** (2019): Plant carbon metabolism and climate change. Elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. *The New phytologist* 221 (1), 32–49. doi: 10.1111/nph.15283.
- Ehleringer, J.R.; Monson, R.K.** (1993): Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24 (1), 411–439. doi: 10.1146/annurev.es.24.110193.002211.
- Escalante-Pérez, M.; Jaborsky, M.; Lautner, S.; Fromm, J.; Müller, T.; Dittrich, M. et al.** (2012): Poplar extrafloral nectaries. Two types, two strategies of indirect defenses against herbivores. *Plant physiology* 159 (3), 1176–1191. doi: 10.1104/pp.112.196014.
- Escobedo-Sarti, J.; Ramírez, I.; Leopardi, C.; Carnevali, G.; Magallón, S.; Duno, R.; Mondragón, D.** (2013): A phylogeny of Bromeliaceae (Poales, Monocotyledoneae) derived from an evaluation of nine supertree methods. *Jnl of Sytematics Evolution* 51 (6), 743–757. doi: 10.1111/jse.12044.
- Evans, T.M.; Jabaily, R.S.; Faria, A.P.G. de; Sousa, L.O.F. de; Wendt, T.; Brown, G.K.** (2015): Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany* 40 (1), 116–128. doi: 10.1600/036364415X686413.
- Faegri, K.; van der Pijl, L.** (1979): *Principles of Pollination Ecology*. 3rd ed. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Fahn, A.** (1979b): Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *Am. J. Bot.* 66 (8), 977–985. doi: 10.1002/j.1537-2197.1979.tb06309.x.
- Fahn, A.** (1979a): *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London, UK.
- Faria, A.P.G. de; Brown, G.K.; Wendt, T.** (2004): Cladistic relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 91 (2), 303–319.
- Felsenstein, J.** (1985): Confidence limits on phylogenies. An approach using The Bootstrap. *Evolution; international journal of organic evolution* 39 (4), 783–791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.
- Fenster, C.B.; Armbruster, W.S.; Wilson, P.; Dudash, M.R.; Thomson, J.D.** (2004): Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35 (1), 375–403. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132347.
- Fleming, T.H.; Geiselman, C.; Kress, W.J.** (2009): The evolution of bat pollination: A phylogenetic perspective. *Annals of Botany* 104 (6), S. 1017–1043. doi: 10.1093/aob/mcp197.
- Frank, J.H.; Lounibos, L.P.** (2009): Insects and allies associated with bromeliads: a review. *Terrestrial arthropod reviews* 1 (2), 125–153. doi: 10.1163/187498308X414742.

- Freeman, C.E.; Worthington, R.D.; Jackson, M.S.** (1991): Floral nectar sugar compositions of some South and Southeast Asian species. *Biotropica* 23 (4), 568. doi: 10.2307/2388394.
- Freschi, L.; Takahashi, C.A.; Cambui, C.A.; Semprebom, T.R.; Cruz, A.B.; Mito, P.T. et al.** (2010): Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of plant physiology* 167 (7), 526–533. doi: 10.1016/j.jplph.2009.10.011.
- Frey-Wyssling, A.** (1955): The phloem supply to the nectaries. *Acta Botanica Neerlandica* 4 (3), 358–369. doi: 10.1111/j.1438-8677.1955.tb00337.x.
- Fridman, S.; Izhaki, I.; Gerchman, Y.; Halpern, M.** (2012): Bacterial communities in floral nectar. *Environmental microbiology reports* 4 (1), 97–104. doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00309.x.
- Fumero-Cabán, J.J.; Meléndez-Ackerman, E.J.** (2007): Relative pollination effectiveness of floral visitors of *Pitcairnia angustifolia* (Bromeliaceae). *American journal of botany* 94 (3), 419–424. doi: 10.3732/ajb.94.3.419.
- Galetto, L.; Bernardello, G.** (2003): Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina). An animal visitor's matter? *Plant Syst Evol* 238 (1-4), 69–86. doi: 10.1007/s00606-002-0269-y.
- Gallagher, M. Kate; Campbell, Diane R.** (2017): Shifts in water availability mediate plant-pollinator interactions. *The New phytologist* 215 (2), 792–802. doi: 10.1111/nph.14602.
- Gardener, M.C.; Gillman, M.P.** (2001 a): Analyzing variability in nectar amino acids: composition is less variable than concentration. *Journal of chemical ecology* 27 (12), 2545–2558. doi: 10.1023/A:1013687701120.
- Gardener, M.C.; Gillman, M.P.** (2001 b): The effects of soil fertilizer on amino acids in the floral nectar of corncockle, *Agrostemma githago* (Caryophyllaceae). *Oikos* 92 (1), 101–106. doi: 10.1034/j.1600-0706.2001.920112.x.
- Gentry, A.H.; Dodson, C.H.** (1987 b): Diversity and biogeography of Neotropical vascular epiphytes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74 (2), 205. doi: 10.2307/2399395.
- Gentry, A.H.; Dodson, C.** (1987 a): Contribution of nontrees to species richness of a tropical rain forest. *Biotropica* 19 (2), 149. doi: 10.2307/2388737.
- Gijbels, P.; Ceulemans, T.; van den Ende, W.; Honnay, O.** (2015): Experimental fertilization increases amino acid content in floral nectar, fruit set and degree of selfing in the orchid *Gymnadenia conopsea*. *Oecologia* 179 (3), 785–795. doi: 10.1007/s00442-015-3381-8.
- Gilbert, L.E.; Singer, M.C.** (1975): Butterfly Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 6 (1), 365–395. doi: 10.1146/annurev.es.06.110175.002053.
- Gish, M.; Mescher, M.C.; Moraes, C.M. de** (2015): Targeted predation of extrafloral nectaries by insects despite localized chemical defences. *Proceedings. Biological sciences* 282 (1816), 20151835. doi: 10.1098/rspb.2015.1835.
- Givnish, T.J.** (2007): Phylogeny, adaptive radiation and hystorical biogeography of bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. *Aliso* 23, 3–26. doi: 10.5642/aliso.20072301.04.

- Givnish, T.J.; Barfuss, M.H.J.; van Ee, B.; Riina, R.; Schulte, K.; Horres, R. et al.** (2011): Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae. Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American journal of botany* 98 (5), 872–895. doi: 10.3732/ajb.1000059.
- Givnish, T.J.; Burkhardt, E.L.; Happel, R.E.; Weintraub, J.D.** (1984): Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. *The American naturalist*, 124. doi: 10.1086/284289.
- Givnish, T.J.; Barfuss, M.H.J.; van Ee, B.; Riina, R.; Schulte, K.; Horres, R. et al.** (2014): Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular phylogenetics and evolution* 71, 55–78. doi: 10.1016/j.ympev.2013.10.010.
- Gomes-da-Silva, J.; Alves da Costa Vargens, F.; do Carmo de Oliveira Arruda, R.; Ferreira da Costa, A.** (2012): A morphological cladistic analysis of the *Vriesea corcovadensis* group (Bromeliaceae, Tillandsioideae), with anatomical descriptions: New evidence of the non-monophyly of the genus. *Systematic Botany* 37 (3), 641–654. doi: 10.1600/036364412X648599.
- Gomes-da-Silva, J.; Souza-Chies, T.T.** (2018): What actually is *Vriesea*? A total evidence approach in a polyphyletic genus of Tillandsioideae (Bromeliaceae, Poales). *Cladistics* 34 (2), 181–199. doi: 10.1111/cla.12200.
- Gonzalez, D.; Nave, A.; Gonçalves, F.; Nunes, F.M.; Campos, M.; Torres, L.** (2016): Higher longevity and fecundity of *Chrysoperla carnea*, a predator of olive pests, on some native flowering Mediterranean plants. *Agronomy for Sustainable Development* 36 (2), 30. doi: 10.1007/s13593-016-0369-7.
- Gosselin, M.; Michez, D.; Vanderplanck, M.; Roelants, D.; Glauser, G.; Rasmont, P.** (2013): Does *Aconitum septentrionale* chemically protect floral rewards to the advantage of specialist bumblebees? *Ecol Entomol* 38 (4), 400–407. doi: 10.1111/een.12032.
- Göttlinger, T.; Schwerdtfeger, M.; Tiedge, K.; Lohaus, G.** (2019): What do nectarivorous bats like? Nectar composition in Bromeliaceae with special emphasis on bat-pollinated species. *Frontiers in plant science* 10, 205. doi: 10.3389/fpls.2019.00205.
- Gradstein, S.** (2008): Epiphytes of tropical montane forests - Impact of deforestation and climate change. *Tropical Mountain Forest: Patterns and Processes in a Biodiversity Hotspot*, 51–65.
- Grafen, A.** (1989): The phylogenetic regression. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 326 (1233), 119–157. doi: 10.1098/rstb.1989.0106.
- Grant, K.A.; Grant, V.** (1968): *Hummingbirds and their flowers*. Columbia University Press, New York, New York.
- Guo, C.; Li, H.; Xia, X.; Liu, X.; Yang, L.** (2018): Functional and evolution characterization of SWEET sugar transporters in *Ananas comosus*. *Biochemical and biophysical research communications* 496 (2), 407–414. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.024.

- Heil, M.; Rattke, J.; Boland, W.** (2005): Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science* 308 (5721), 560–563. doi: 10.1126/science.1107536.
- Heil, M.** (2011): Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science* 16 (4), 191–200. doi: 10.1016/j.tplants.2011.01.003.
- Herrera, C.M.; García, I. M.; Pérez, R.** (2008): Invisible floral larcenies. Microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology* 89 (9), 2369–2376. doi: 10.1890/08-0241.1.
- Herrera, C.M.; Vega, C. de; Canto, A.; Pozo, M.I.** (2009): Yeasts in floral nectar: A quantitative survey. *Annals of Botany* 103 (9), 1415–1423. doi: 10.1093/aob/mcp026.
- Herrera M., L.G.; Hobson, K.A.; Leticia, M.; Ramírez, P.N.; Méndez, C.G.; Sánchez-Cordero, V.** (2001): Sources of protein in two species of phytophagous bats in a seasonal dry forest. Evidence from stable-isotope analysis. *Journal of Mammalogy* 82 (2), 352–361. doi: 10.1644/1545-1542(2001)082<0352:SOPITS>2.0.CO;2.
- Herrera M., L.G.; Mancina, C.A.** (2008): Sucrose hydrolysis does not limit food intake by Pallas's long-tongued bats. *Physiological and biochemical zoology*, PBZ 81 (1), 119–124. doi: 10.1086/522904.
- Hiebert, S.M.; Calder, W.A.** (1983): Sodium, potassium, and chloride in floral nectars. Energy-free contributions to refractive index and salt balance. *Ecology* 64 (2), 399–402. doi: 10.2307/1937086.
- Hietz, P.; Briones, O.** (2001): Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and within-canopy distribution of epiphytic ferns in a Mexican Cloud Forest. *Plant biol* 3 (3), 279–287. doi: 10.1055/s-2001-15198.
- Hoballah, M.E.; Gübitz, T.; Stuurman, J.; Broger, L.; Barone, M.; Mandel, T. et al.** (2007): Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *The Plant cell* 19 (3), 779–790. doi: 10.1105/tpc.106.048694.
- Hornung-Leoni, C.T.; Sosa, V.** (2008): Morphological phylogenetics of *Puya* subgenus *Puya* (Bromeliaceae). *Bot J Linn Soc* 156 (1), 93–110. doi: 10.1111/j.1095-8339.2007.00740.x.
- Hornung-Leoni, C.T.; Sosa, V.; Simpson, J.; Gil, K.** (2013): Genetic variation in the emblematic *Puya raimondii* (Bromeliaceae) from Huascarán National Park, Peru. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 13 (1), 67–74. doi: 10.1590/S1984-70332013000100008.
- Horres, R.; Schulte, K.; Weising, K.; Zizka, G.** (2007): Systematics of Bromelioideae (Bromeliaceae) - Evidence from Molecular and Anatomical Studies. *Aliso* 23 (1), 27–43. doi: 10.5642/aliso.20072301.05.
- Inouye, D.W.; Waller, G.D.** (1984): Responses of honey bees (*Apis mellifera*) to amino acid solutions mimicking floral nectars. *Ecology* 65 (2), 618–625. doi: 10.2307/1941424.
- IPCC** (2014): Climate change 2014: Impacts, adaptation, and vulnerability. Contribution of working groups I, II and III to the Fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change (eds Core Writing Team, Pachauri RK, Meyer LA). IPCC, Geneva, Switzerland.

- Jabaily, R.S.; Sytsma, K.J.** (2010): Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae). Placement, major lineages, and evolution of Chilean species. *American journal of botany* 97 (2), 337–356. doi: 10.3732/ajb.0900107.
- Jackson, S.; Nicolson, S.W.** (2002): Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 131 (4), 613–620.
- Kamke, R.; Schmid, S.; Zillikens, A.; Lopes, B.C.; Steiner, J.** (2011): The importance of bees as pollinators in the short corolla bromeliad *Aechmea caudata* in southern Brazil. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206 (8), 749–756. doi: 10.1016/j.flora.2010.12.004.
- Kelber, A.** (2003): Sugar preferences and feeding strategies in the hawkmoth *Macroglossum stellatarum*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 189 (9), 661–666. doi: 10.1007/s00359-003-0440-0.
- Kenoyer, L.A.** (1917): Environmental influences on nectar secretion. *Botanical Gazette* 63 (4), 249–265. doi: 10.1086/332023.
- Kerchner, A.; Darók, J.; Bacskay, I.; Felinger, A.; Jakab, G.; Farkas, Á.** (2015): Protein and alkaloid patterns of the floral nectar in some solanaceous species. *Acta biologica Hungarica* 66 (3), 304–315. doi: 10.1556/018.66.2015.3.6.
- Kessler, D.; Baldwin, I.T.** (2007): Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 49 (5), 840–854. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02995.x.
- Kessler, M.; Krömer, T.** (2000): Patterns and ecological correlates of pollination modes among bromeliad communities of Andean Forests in Bolivia. *Plant Biol* 2 (6), 659–669. doi: 10.1055/s-2000-16642.
- Kricher, J.C.** (1997): *A neotropical companion. An introduction to the animals, plants, and ecosystems of the New World tropics.* 2nd ed., rev. and expanded. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.
- Krömer, T.; Kessler, M.; Lohaus, G.; Schmidt-Lebuhn, A.N.** (2008): Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant biology* 10 (4), 502–511. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00058.x.
- Krömer, T.; Kessler, M.; Herzog, S.K.** (2006): Distribution and flowering ecology of bromeliads along two climatically contrasting elevational transects in the Bolivian Andes. *Biotropica* 38 (2), 183–195. doi: 10.1111/j.1744-7429.2006.00124.x.
- Ksas, B.; Becuwe, N.; Chevalier, A.; Havaux, M.** (2015): Plant tolerance to excess light energy and photooxidative damage relies on plastoquinone biosynthesis. *Scientific reports* 5, 10919 EP. doi: 10.1038/srep10919.
- Law, B.S.** (1992): The maintenance nitrogen requirements of the Queensland blossom bat (*Syconycteris australis*) on a sugar/pollen diet. Is nitrogen a limiting resource? *Physiological Zoology* 65 (3), 634–648. doi: 10.1086/physzool.65.3.30157974.
- Lemoine, R.; Bürkle, L.; Barker, L.; Sakr, S.; Kühn, C.; Regnacq, M. et al.** (1999): Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters* 454 (3), 325–330. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00843-1.

- Lin, I.W.; Sosso, D.; Chen, L.-Q.; Gase, K.; Kim, S.-G.; Kessler, D. et al.** (2014): Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* 508 (7497), 546–549. doi: 10.1038/nature13082.
- Lohaus, G.; Moellers, C.** (2000): Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* 211 (6), 833–840. doi: 10.1007/s004250000349.
- Lohaus, G.; Pennewiss, K.; Sattelmacher, B.; Hussmann, M.; Hermann Muehling, K.** (2001): Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia plantarum* 111 (4), 457–465. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110405.x.
- Lohaus, G.; Schwerdtfeger, M.** (2014): Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*. *PloS one* 9 (1), e87689. doi: 10.1371/journal.pone.0087689.
- Lopez-Calleja, M.V.** (2003): The integration of energy and nitrogen balance in the hummingbird *Sephanoides sephaniodes*. *Journal of Experimental Biology* 206 (19), S. 3349–3359. doi: 10.1242/jeb.00572.
- Mancina, C.A.; Herrera M., L.G.** (2010): Disparate feeding strategies used by syntopic Antillean nectarivorous bats to obtain dietary protein. *Journal of Mammalogy* 91 (4), 960–966. doi: 10.1644/09-MAMM-A-323.1.
- Marques, J.S.; Tagliati, M.C.; Faria, A.P.G.** (2015): Diurnal versus nocturnal pollination success in *Billbergia horrida* Regel (Bromeliaceae) and the first record of chiropterophily for the genus. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 87 (2), 835–842. doi: 10.590/0001-3765201520140340.
- Martínez del Rio, C.; Baker, H.G.; Baker, I.** (1992): Ecological and evolutionary implications of digestive processes. Bird preferences and the sugar constituents of floral nectar and fruit pulp. *Experientia* 48 (6), 544–551. doi: 10.1007/BF01920237.
- Martínez del Rio, C.** (1990): Dietary, phylogenetic, and ecological correlates of intestinal sucrase and maltase activity in birds. *Physiological Zoology* 63 (5), 987–1011. doi: 10.1086/physzool.63.5.30152625.
- Martini, M.; Schmid, Angela; Hess, D.** (1990): Antibiotics, sugars, and amino acids in nectar of *Rhododendron* and *Piptanthus* species from Nepal. *Botanica Acta* 103 (4), 343–348. doi: 10.1111/j.1438-8677.1990.tb00172.x.
- Maxwell, C.; Griffiths, H.; Young, A.J.** (1994): Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C₃ - CAM epiphyte *Guzmania monostachia*. Gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. *Funct Ecol* 8 (6), 746. doi: 10.2307/2390234.
- Mevi-Schutz, J.; Erhardt, A.** (2005): Amino acids in nectar enhance butterfly fecundity. A long-awaited link. *The American naturalist* 165 (4), 411–419. doi: 10.1086/429150.
- Moore, P.D.** (2008): Tropical forests. *Facts On File (Ecosystem)*, New York, New York.
- Moura, M.N.; Forzza, R.C.; Cristiano, M.P.** (2018): Reconstruction of ancestral genome size in Pitcairnioideae (Bromeliaceae). What can genome size tell us about the evolutionary history of its five genera? *Bot J Linn Soc* 186 (3), 321–333. doi: 10.1093/botlinnean/box101.

- Mu, J.; Peng, Y.; Xi, X.; Wu, X.; Li, G.; Niklas, K. J.; Sun, S.** (2015): Artificial asymmetric warming reduces nectar yield in a Tibetan alpine species of Asteraceae. *Annals of Botany* 116 (6), 899–906. doi: 10.1093/aob/mcv042.
- Nadkarni, N.M.; Solano, R.** (2002): Potential effects of climate change on canopy communities in a tropical cloud forest. An experimental approach. *Oecologia* 131 (4), 580–586. doi: 10.1007/s00442-002-0899-3.
- Nadwodnik, J.; Lohaus, G.** (2008): Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227 (5), 1079–1089. doi: 10.1007/s00425-007-0682-0.
- Nepi, M.; Stpiczyńska, M.** (2007): Nectar resorption and translocation in *Cucurbita pepo* L. and *Platanthera chlorantha* Custer (Rchb.). *Plant biology* 9 (1), 93–100. doi: 10.1055/s-2006-924287.
- Nepi, M.; Soligo, C.; Nocentini, D.; Abate, M.; Guarnieri, M.; Cai, G. et al.** (2012): Amino acids and protein profile in floral nectar. Much more than a simple reward. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207 (7), 475–481. doi: 10.1016/j.flora.2012.06.002.
- Nguyen, H.C.; Lin, K.-H.; Hsiung, T.-C.; Huang, M.-Y.; Yang, C.-M.; Weng, J.-H. et al.** (2018): Biochemical and physiological characteristics of photosynthesis in plants of two *Calathea* species. *International journal of molecular sciences* 19 (3). doi: 10.3390/ijms19030704.
- Nicolson, S.W.** (1994): Eucalyptus nectar. Production, availability, composition and osmotic consequences for the larva of the eucalypt nectar fly, *Drosophila flavohirta*. *South African Journal of Science* 90, 75–79.
- Nicolson, S.W.; Fleming, P.A.** (2003): Nectar as food for birds. The physiological consequences of drinking dilute sugar solutions. *Plant Syst Evol* 238 (1-4), 139–153. doi: 10.1007/s00606-003-0276-7.
- Nicolson, S.W.; Worswick, P.V.** (1990): Sodium and potassium concentrations in floral nectars in relation to foraging by honey bees. *South African Journal of Zoology* 25 (2), 93–96. doi: 10.1080/02541858.1990.11448196.
- Nicolson, S.W.** (2011): Bee Food. The Chemistry and Nutritional Value of Nectar, Pollen and Mixtures of the Two. In: *African Zoology* 46 (2), 197–204. doi: 10.3377/004.046.0201.
- Nicolson, S.W.; Nepi, M.; Pacini, E.** (2007): Nectaries and nectar. Springer Netherlands, Dordrecht, Netherlands.
- Nicolson, S.W.; Thornburg, R.W.** (2007): Nectar chemistry. In: Nicolson, S.W.; Pacini, E.; Nepi, M. (ed.) *Nectaries and Nectar*, S. 215–264. Springer Netherlands, Dordrecht, Netherlands.
- Nicolson, S.W.; van Wyk, B.-E.** (1998): Nectar Sugars in Proteaceae. Patterns and processes. *Aust. J. Bot.* 46 (4), 489. doi: 10.1071/BT97039.
- Nocentini, D.; Pacini, E.; Guarnieri, M.; Martelli, D.; Nepi, M.** (2013): Intrapopulation heterogeneity in floral nectar attributes and foraging insects of an ecotonal Mediterranean species. *Plant Ecol* 214 (6), 799–809. doi: 10.1007/s11258-013-0204-z.

- Noutsos, C.; Perera, A.M.; Nikolau, B.J.; Seaver, S.M.D.; Ware, D.H.** (2015): Metabolomic profiling of the nectars of *Aquilegia pubescens* and *A. canadensis*. *PLoS one* 10 (5), e0124501. doi: 10.1371/journal.pone.0124501.
- O'Brien, T.P.; McCully, M.E.** (1981): The study of plant structure. Principles and selected methods. Termarcarphi, Melbourne, Australia.
- Oksanen, J.; Kindt, R.; Legendre, P.; O'Hara, B.; Henry, M.; Stevens, H.** (2007): The vegan package.
- Ollerton, J.; Alarcón, R.; Waser, N.M.; Price, M.V.; Watts, S.; Cranmer, L. et al.** (2009): A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* 103 (9), 1471–1480. doi: 10.1093/aob/mcp031.
- Ollerton, J.; Winfree, R.; Tarrant, S.** (2011): How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120 (3), 321–326. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x.
- Orme, D.; Freckleton, R.P.; Thomas, G.H.; Petzoldt, T.; Fritz, S.A.; Isaac, N.** (2013): CAPER. Comparative analyses of phylogenetics and evolution in R. *Methods in Ecology and Evolution* 3, 145–151.
- Pacini, E.; Nepi, M.; Vesprini, J.L.** (2003): Nectar biodiversity. A short review. *Plant Syst Evol* 238 (1-4), 7–21. doi: 10.1007/s00606-002-0277-y.
- Pagel, M.** (1994): Detecting correlated evolution on phylogenies. A general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings. Biological sciences* 255 (1342), 37–45. doi: 10.1098/rspb.1994.0006.
- Paiva, E.A.S.; Machado, S.R.** (2008): The floral nectary of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae). Structural aspects during floral development. *Annals of Botany* 101 (1), 125–133. doi: 10.1093/aob/mcm268.
- Palma-Silva, C.; Leal, B.S.S.; Chaves, C.J.N.; Fay, M.F.** (2016): Advances in and perspectives on evolution in Bromeliaceae. *Bot J Linn Soc* 181 (3), 305–322. doi: 10.1111/boj.12431.
- Parachnowitsch, A.L.; Manson, J.S.; Sletvold, N.** (2018): Evolutionary ecology of nectar. *Annals of Botany*. doi: 10.1093/aob/mcy132.
- Park, S.; Thornburg, R.W.** (2009): Biochemistry of nectar proteins. *J. Plant Biol.* 52 (1), 27–34. doi: 10.1007/s12374-008-9007-5.
- Percival, M.S.** (1961): Types in nectar in angiosperms. *New Phytol* 60 (3), 235–281. doi: 10.1111/j.1469-8137.1961.tb06255.x.
- Perret, M.** (2001): Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). *Annals of Botany* 87 (2), S. 267–273. DOI: 10.1006/anbo.2000.1331.
- Petanidou, T.; van Laere, A.J.; Smets, E.** (1996): Change in floral nectar components from fresh to senescent flowers of *Capparis spinosa* (Capparidaceae), a nocturnally flowering Mediterranean shrub. *Plant Syst Evol* 199 (1-2), 79–92. doi: 10.1007/BF00985919.
- Petanidou, T.; van Laere, A.; N. Ellis, W.; Smets, E.** (2006): What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos* 115 (1), 155–169. doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.14487.x.

- Phillips, B.B.; Shaw, R.F.; Holland, M.J.; Fry, E.L.; Bardgett, R.D.; Bullock, J.M.; Osborne, J.L.** (2018): Drought reduces floral resources for pollinators. *Global change biology* 24 (7), 3226–3235. doi: 10.1111/gcb.14130.
- Pierce, S.; Winter, K.; Griffiths, H.** (2002a): Carbon isotope ratio and the extent of daily CAM use by Bromeliaceae. *New Phytol* 156 (1), 75–83. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00489.x.
- Pinzón, J.P.; Ramírez-Morillo, I.M.; Carnevali, G.; Barfuss, M.H.J.; Till, W.; Tun, J.; Ortiz-Díaz, J.J.** (2016): Phylogenetics and evolution of the *Tillandsia utriculata* complex (Bromeliaceae, Tillandsioideae) inferred from three plastid DNA markers and the ETS of the nuclear ribosomal DNA. *Bot J Linn Soc* 181 (3), 362–390. doi: 10.1111/boj.12425.
- Plachno, B.J.** (2012): “Sweet but dangerous”. Nectaries in carnivorous plants. *Acta Agrobot* 60 (2), 31–37. doi: 10.5586/aa.2007.027.
- Porembski, S.; Barthlott, W.** (1999): *Pitcairnia feliciana*. The only indigenous African bromeliad. *Harvard Papers in Botany* 4 (1), 175–184.
- Proctor, M.; Yeo, P.; Lack, A.** (1996): The natural history of pollination. London: Harper Collins (The new naturalist, 83).
- Quintana-Rodríguez, E.; Ramírez-Rodríguez, A.G.; Ramírez-Chávez, E.; Molina-Torres, J.; Camacho-Coronel, X.; Esparza-Claudio, J. et al.** (2018): Biochemical traits in the flower lifetime of a mexican mistletoe parasitizing mesquite biomass. *Frontiers in plant science* 9, 1031. doi: 10.3389/fpls.2018.01031.
- Raguso, R.A.** (2004): Why are some floral nectars scented? *Ecology* 85 (6), 1486–1494. doi: 10.1890/03-0410.
- Rex, M.; Schulte, K.; Zizka, G.; Peters, J.; Vásquez, R.; Ibsch, P.L.; Weising, K.** (2009): Phylogenetic analysis of *Fosterella* L.B. Sm. (Pitcairnioideae, Bromeliaceae) based on four chloroplast DNA regions. *Molecular phylogenetics and evolution* 51 (3), 472–485. doi: 10.1016/j.ympev.2009.01.001.
- Riens, B.; Lohaus, G.; Winter, H.; Heldt, H.W.** (1994): Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 192 (4). doi: 10.1007/BF00203587.
- Rocca, M.A.; Sazima, M.** (2010): Beyond hummingbird-flowers. The other side of ornithophily in the neotropics. *Oecol. Austr.* 14 (01), 67–99. doi: 10.4257/oeco.2010.1401.03.
- Rodríguez-Peña, N.; Stoner, K.E.; Ayala-Berdon, J.; Flores-Ortiz, C.M.; Duran, A.; Schondube, J.E.** (2013): Nitrogen and amino acids in nectar modify food selection of nectarivorous bats. *The Journal of animal ecology* 82 (5), 1106–1115. doi: 10.1111/1365-2656.12069.
- Roitsch, T.; González, M.-C.** (2004): Function and regulation of plant invertases. Sweet sensations. *Trends in plant science* 9 (12), 606–613. doi: 10.1016/j.tplants.2004.10.009.
- Rosas-Guerrero, V.; Aguilar, R.; Martén-Rodríguez, S.; Ashworth, L.; Lopezaraiza-Mikel, M.; Bastida, J.M.; Quesada, M.** (2014): A quantitative review of pollination syndromes. Do floral traits predict effective pollinators? *Ecology letters* 17 (3), 388–400. doi: 10.1111/ele.12224.

- Roy, R.; Schmitt, A.J.; Thomas, J.B.; Carter, C.J.** (2017): Review. Nectar biology: from molecules to ecosystems. *Plant science: an international journal of experimental plant biology* 262, 148–164. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.04.012.
- Ruhlmann, J. M.; Kram, B.W.; Carter, C.J.** (2010): *CELL WALL INVERTASE 4* is required for nectar production in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 61 (2), 395–404. doi: 10.1093/jxb/erp309.
- Sajo, M.G.; Rudall, P.J.; Prychid, C.J.** (2004): Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. *Plant Syst. Evol.* 247 (3-4). doi: 10.1007/s00606-002-0143-0.
- Santos, V.L.D.; Versieux, L.M.; Wanderley, M.D.G.L.; Da Luz, C.F.P.** (2017): Pollen morphology of *Alcantarea* giant bromeliads (Bromeliaceae, Tillandsioideae). *Grana* 57 (1-2), 117–136. doi: 10.1080/00173134.2017.1310920.
- Sarvikas, P.; Hakala, M.; Pätsikkä, E.; Tyystjärvi, T.; Tyystjärvi, E.** (2006): Action spectrum of photoinhibition in leaves of wild type and npq1-2 and npq4-1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* 47 (3), 391–400. doi: 10.1093/pcp/pcj006.
- Sass, C.; Specht, C.D.** (2010): Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Molecular phylogenetics and evolution* 55 (2), 559–571. doi: 10.1016/j.ympev.2010.01.005.
- Sasu, M.A.; Wall, K.L.; Stephenson, A.G.** (2010): Antimicrobial nectar inhibits a florally transmitted pathogen of a wild *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *American journal of botany* 97 (6), 1025–1030. doi: 10.3732/ajb.0900381.
- Sazima, M.; Buzato, S.; Sazima, I.** (1985): Bat pollination of *Vriesea* in southeastern Brazil 2, 29–37. doi: 10.1080/17550874.2019.1566409.
- Schmid, S.; Schmid, V.S.; Zillikens, A.; Harter-Marques, B.; Steiner, J.** (2011): Bimodal pollination system of the bromeliad *Aechmea nudicaulis* involving hummingbirds and bees. *Plant biology* 13 Suppl 1, 41–50. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00348.x.
- Schmidt-Lebuhn, A.N.; Schwerdtfeger, M.; Kessler, M.; Lohaus, G.** (2007): Phylogenetic constraints vs. ecology in the nectar composition of Acanthaceae. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 202 (1), 62–69. doi: 10.1016/j.flora.2006.02.005.
- Schmitt, A.J.; Sathoff, A.E.; Holl, C.; Bauer, B.; Samac, D.A.; Carter, C.J.** (2018): The major nectar protein of *Brassica rapa* is a non-specific lipid transfer protein, BrLTP2.1, with strong antifungal activity. *Journal of experimental botany* 69 (22), 5587–5597. doi: 10.1093/jxb/ery319.
- Schondube, J.E.; Herrera-M, L.G.; Martínez del Rio, C.** (2001): Diet and the evolution of digestion and renal function in phyllostomid bats. *Zoology* 104 (1), 59–73. doi: 10.1078/0944-2006-00007.
- Schulte, K.; Barfuss, M.H.J.; Zizka, G.** (2009): Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular phylogenetics and evolution* 51 (2), 327–339. doi: 10.1016/j.ympev.2009.02.003.
- Schütz, N.; Krapp, F.; Wagner, N.; Weising, K.** (2016): Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae). Evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. *Bot J Linn Soc* 181 (3), 323–342. doi: 10.1111/boj.12403.

- Schweiger, O.; Biesmeijer, J.C.; Bommarco, R.; Hickler, T.; Hulme, P.E.; Klotz, S. et al.** (2010): Multiple stressors on biotic interactions. How climate change and alien species interact to affect pollination. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 85 (4), 777–795. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00125.x.
- Seo, P.J.; Wielsch, N.; Kessler, D.; Svatos, A.; Park, C.-M.; Baldwin, I.T.; Kim, S.-G.** (2013): Natural variation in floral nectar proteins of two *Nicotiana attenuata* accessions. *BMC plant biology* 13, 101. doi: 10.1186/1471-2229-13-101.
- Sherson, S.M.; Alford, H.L.; Forbes, S.M.; Wallace, G.; Smith, S.M.** (2003): Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 54 (382), 525–531. doi: 10.1093/jxb/erg055.
- Silva, F.A.; Guirgis, A.; Thornburg, R.** (2018): Nectar analysis throughout the genus *Nicotiana* suggests conserved mechanisms of nectar production and biochemical action. *Frontiers in plant science* 9, 1100. doi: 10.3389/fpls.2018.01100.
- Silvera, K.; Santiago, L.S.; Cushman, J.C.; Winter, K.** (2009): Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. *Plant physiology* 149 (4), 1838–1847. doi: 10.1104/pp.108.132555.
- Siqueira Filho, J. de A.** (1998): Biologia floral de *Hohenbergia ridleyi* (Baker) Mez. *Bromélia* 5 (1-4), 3–13. doi: 10.1590/S0102-33062001000300011.
- Solhaug, E.M.; Johnson, E.; Carter, C.J.** (2019 a): Carbohydrate metabolism and signaling in squash nectaries and nectar throughout floral maturation. *Plant physiology* 180 (4), 1930–1946. doi: 10.1104/pp.19.00470.
- Souza, C.S. de; Aoki, C.; Ribas, A.; Pott, A.; Sigríst, M.R.** (2016): Floral traits as potential indicators of pollination vs. theft. *Rodriguésia* 67 (2), 309–320. doi: 10.1590/2175-7860201667203.
- Stahl, J.M.; Nepi, M.; Galetto, L.; Guimarães, E.; Machado, S.R.** (2012): Functional aspects of floral nectar secretion of *Ananas ananassoides*, an ornithophilous bromeliad from the Brazilian savanna. *Annals of Botany* 109 (7), 1243–1252. doi: 10.1093/aob/mcs053.
- Stancato, G.C.; Massafra, P.; Buckeridge, M.S.** (2002): Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe. *Rev. bras. Bot.* 25 (2), 229–235. doi: 10.1590/S0100-84042002000200011.
- Stevenson, P.C.; Nicolson, S.W.; Wright, G.A.; Manson, J.** (2017): Plant secondary metabolites in nectar. Impacts on pollinators and ecological functions. *Funct Ecol* 31 (1), 65–75. doi: 10.1111/1365-2435.12761.
- Stpiczyńska, M.; Davies, K.L.; Gregg, A.** (2005): Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 95 (5), 749–756. doi: 10.1093/aob/mci081.
- Sturm, A.** (1999): Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant physiology* 121 (1), 1–8. doi: 10.1104/pp.121.1.1.
- Takkis, K.; Tscheulin, T.; Petanidou, T.** (2018): Differential effects of climate warming on the nectar secretion of early- and late-flowering Mediterranean plants. *Frontiers in plant science* 9, 874. doi: 10.3389/fpls.2018.00874.

- Tiedge, K.** (2018): Regulation der Nektarzusammensetzung bei tag- und nachtblühenden Arten der Gattung *Nicotiana*. PhD thesis. Bergische Universität Wuppertal, Wuppertal.
- Tiedge, K.; Lohaus, G.** (2017): Nectar sugars and amino acids in day- and night-flowering *Nicotiana* species are more strongly shaped by pollinators' preferences than organic acids and inorganic ions. *PloS one* 12 (5), e0176865. doi: 10.1371/journal.pone.0176865.
- Tiedge, K.; Lohaus, G.** (2018): Nectar sugar modulation and cell wall invertases in the nectaries of day- and night-flowering *Nicotiana*. *Frontiers in plant science* 9. doi: 10.3389/fpls.2018.00622.
- Torreias, S.R. da S.; Ferreira-Keppler, R.L.** (2011): Macroinvertebrates inhabiting the tank leaf terrestrial and epiphyte bromeliads at Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas. *Braz. arch. biol. technol.* 54 (6), 1193–1202. doi: 10.1590/S1516-89132011000600015.
- Tschapka, M.; Dressler, S.** (2002): Chiropterophily. On bat-flowers and flower-bats. *Curtis's Botanical Magazine* 19 (2), 114–125. doi: 10.1111/1467-8748.00340.
- Van der Pijl, L.** (1961): Ecological aspects of flower evolution. II. Zoophilous flower classes. *Evolution* 15 (1), 44. doi: 10.2307/2405842.
- Vannette, R.L.; Fukami, T.** (2016): Nectar microbes can reduce secondary metabolites in nectar and alter effects on nectar consumption by pollinators. *Ecology* 97 (6), 1410–1419. doi: 10.1890/15-0858.1.
- Vannette, R.L.; Fukami, T.** (2018): Contrasting effects of yeasts and bacteria on floral nectar traits. *Annals of Botany* 121 (7), 1343–1349. doi: 10.1093/aob/mcy032.
- Vannette, R.L.; Gauthier, M.-P.L.; Fukami, T.** (2013): Nectar bacteria, but not yeast, weaken a plant-pollinator mutualism. *Proceedings. Biological sciences* 280 (1752), 20122601. doi: 10.1098/rspb.2012.2601.
- Vázquez, D.P.; Morris, W.F.; Jordano, P.** (2005): Interaction frequency as a surrogate for the total effect of animal mutualists on plants. *Ecology letters* 8 (10), 1088–1094.
- Versieux, L.M.; Barbará, T.; Wanderley, M.D.G.L.; Calvente, A.; Fay, M.F.; Lexer, C.** (2012): Molecular phylogenetics of the Brazilian giant bromeliads (*Alcantarea*, Bromeliaceae). Implications for morphological evolution and biogeography. *Molecular phylogenetics and evolution* 64 (1), 177–189. doi: 10.1016/j.ympev.2012.03.015.
- Vesprini, J.L.; Nepi, M.; Pacini, E.** (1999): Nectary structure, Nectar secretion patterns and nectar composition in two *Helleborus* species. *Plant biol* 1 (5), 560–568. doi: 10.1111/j.1438-8677.1999.tb00784.x.
- Voigt, C.C.; Winter, Y.** (1999): Energetic cost of hovering flight in nectar-feeding bats (Phyllostomidae. Glossophaginae) and its scaling in moths, birds and bats. *Journal of Comparative Physiology B* 169 (1), 38–48.
- Voigt, C.C.; Kelm, D.H.; Visser, G.H.** (2006): Field metabolic rates of phytophagous bats. Do pollination strategies of plants make life of nectar-feeders spin faster? *Journal of Comparative Physiology B* 176 (3), 213–222. doi: 10.1007/s00360-005-0042-y.

- Von Helversen, O.; Winter, Y.** (2003): Glossophagine bats and their flowers: cost and benefit for plant and pollinator. *Ecology of Bats*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Waller, G.D.** (1972): Evaluating responses of honey bees to sugar solutions using an artificial-flower feeder. *Annals of the Entomological Society of America* 65 (4), 857–862. doi: 10.1093/aesa/65.4.857.
- Waser, N. M.; Price, M. V.** (2016): Drought, pollen and nectar availability, and pollination success. *Ecology* 97 (6), 1400–1409. doi: 10.1890/15-1423.1.
- Waser, N.M.; Chittka, L.; Price, M.V.; Williams, N.M.; Ollerton, J.** (1996): Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77 (4), 1043–1060. doi: 10.2307/2265575.
- Wiese, N.; Fischer, J.; Heidler, J.; Lewkowski, O.; Degenhardt, J.; Erler, S.** (2018): The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (*Thymus vulgaris*) inhibit growth of bee disease-associated microbes. *Scientific reports* 8 (1), 14634. doi: 10.1038/s41598-018-32849-6.
- Wilson, C.M.** (1983): Staining of proteins on gels. Comparisons of dyes and procedures. In: Hirs, C.H.W. (Hg.): *Enzyme structure*. Academic Press, New York, New York. 236–247.
- Winter, K.; Smith, J.A.C.** (1996): An Introduction to crassulacean acid metabolism. *Biochemical principles and ecological diversity*, Bd. 114, 1–13.
- Witt, T.; Jürgens, A.; Gottsberger, G.** (2013): Nectar sugar composition of European Caryophylloideae (Caryophyllaceae) in relation to flower length, pollination biology and phylogeny. *Journal of evolutionary biology* 26 (10), 2244–2259. doi: 10.1111/jeb.12224.
- Woodson, R.E.; Schery, R.W.; Moldenke, H.N.** (1973): Flora of Panama. Part IX. Family 168. Verbenaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 60 (1), 41. doi: 10.2307/2394768.
- Wyatt, R.; Broyles, S.B.; Derda, G.S.** (1992): Environmental influences on nectar production in milkweeds (*Asclepias syriaca* and *A. exaltata*). *Am. J. Bot.* 79 (6), 636. doi: 10.2307/2444879.
- Yurtsever, S.; Okyar, Z.; Guler, N.** (2010): What colour of flowers do *Lepidoptera* prefer for foraging? *Biologia* 65 (6), 2501. doi: 10.2478/s11756-010-0125-4.
- Zhang, F.-P.; Yang, Q.-Y.; Zhang, S.-B.** (2016): Dual effect of phenolic nectar on three floral visitors of *Elsholtzia rugulosa* (Lamiaceae) in SW China. *PloS one* 11 (4), e0154381. doi: 10.1371/journal.pone.0154381.
- Zizka, G.; Schneider, J. V.; Schulte, K.; Novoa, P.** (2013): Taxonomic revision of the Chilean *Puya* species (Puyoideae, Bromeliaceae), with special notes on the *Puya alpestris*-*Puya berteroniana* species complex. *Brittonia* 65 (4), 387–407. doi: 10.1007/s12228-012-9290-9.
- Zotz, G.** (2013): The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update. *Bot J Linn Soc* 171 (3), 453–481. doi: 10.1111/boj.12010.

Appendix

Auflistung der analysierten Bromelien

Fettgedruckt = Bromelienarten verwendet in Göttlinger et al. (2019)

Gattung	Art	Zucker	Aminosäuren	Anionen	Kationen	Organische Säuren
Brocchinioideae						
<i>Brocchinia</i>	<i>reducta</i>	1	1	1	0	0
Bromelioideae						
<i>Acanthostachys</i>	<i>strobilacea</i>	1	1	1	1	0
<i>Aechmea</i>	<i>alopecurus</i>	3	3	0	3	0
<i>Aechmea</i>	<i>angustifolia</i>	2	0	0	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>abbreviata</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>aquilega</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>bracteata</i>	2	2	0	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>bromeliifolia</i>	2	0	0	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>bruggeri</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>callichroma</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>cariocae</i>	2	2	2	2	2
<i>Aechmea</i>	<i>caudata</i>	3	2	0	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>chrysocoma</i>	1	1	1	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>conifera</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>cylindrata</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>distichantha</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>distichantha schlumbergeri</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>eurycorymbus</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>farinosa discolor</i>	1	1	0	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>fasciata</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>fendleri</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>gamosepala</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>gracilis</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>lasseri</i>	2	2	2	1	0
<i>Aechmea</i>	<i>leptantha</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>lueddemanniana</i>	3	3	3	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>macrochlamys</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>marauensis</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>mariae-reginae</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>melinonii</i>	1	0	0	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>miniata discolor</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>mulfordii</i>	1	1	1	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>nudicaulis</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>nudicaulis cuspidata</i>	2	2	1	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>pectinata</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>penduliflora</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>pineliana</i>	2	2	0	2	0
<i>Aechmea</i>	<i>pineliana minuta</i>	3	2	0	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>pubescens</i>	2	1	0	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>pyramidalis</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>racinae</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>recurvata</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>tessmannii</i>	2	1	1	1	0
<i>Aechmea</i>	<i>victoriana</i>	2	2	2	2	0
<i>Aechmea</i>	<i>weilbachii</i>	3	3	3	3	3
<i>Aechmea</i>	<i>weilbachii pendula</i>	3	3	3	0	0
<i>Aechmea</i>	<i>zebrina</i>	3	3	3	3	3
<i>Alcantarea</i>	<i>geniculata</i>	3	3	3	3	3
<i>Alcantarea</i>	<i>imperialis</i>	3	3	3	3	3
<i>Ananas</i>	<i>nanus</i>	1	1	1	1	0
<i>Billbergia</i>	<i>amoena</i>	3	3	3	3	3
<i>Billbergia</i>	<i>brasiliensis</i>	3	3	3	3	3

Billbergia	buchholtzii	3	3	3	3	3
Billbergia	decora	1	1	1	1	0
Billbergia	distachia	3	3	3	3	3
Billbergia	euphemiae	3	3	3	3	3
Billbergia	fosteriana	3	3	3	3	3
Billbergia	intermedia	3	3	3	3	3
Billbergia	iridifolia concolor	3	3	3	3	3
Billbergia	morelii	3	3	3	3	3
Billbergia	nutans	3	3	3	3	3
Billbergia	pyramidalis	3	3	3	3	3
Billbergia	reichardtii	3	3	3	3	3
Billbergia	saundersiana	3	3	3	3	3
Billbergia	viridiflora	3	3	3	3	3
Billbergia	vittata	3	3	3	3	3
Bromelia	balansae	3	2	2	2	0
Bromelia	urbaniana	1	1	0	1	0
Bromelia	viridiflora	3	3	3	3	3
Canistropsis	billbergioides	3	3	3	3	3
Canistropsis	burchellii	3	2	0	0	0
Canistropsis	microps microps	3	3	1	1	0
Canistropsis	seidelii	3	3	3	3	3
Canistrum	auratum	2	2	1	1	0
Canistrum	exigua	2	2	2	2	0
Canistrum	seidelianum	3	2	2	1	0
Cryptanthus	bahianus	3	1	2	2	0
Cryptanthus	zonatus	3	3	2	1	0
Hohenbergia	correia-araujoii	3	3	3	3	3
Hohenbergia	leopoldo-horstii	3	3	3	3	3
Hohenbergia	pennae	1	0	0	1	0
Hohenbergia	rosea	3	3	3	3	3
Hohenbergia	stellata	3	3	3	3	3
Hohenbergia	utriculosa	3	3	3	3	3
Lymania	globosa	1	1	0	0	0
Lymania	smithii	3	3	3	3	3
Neoregelia	ampullacea	3	3	3	3	3
Neoregelia	carmorimiana	3	3	3	3	3
Neoregelia	carolinae	3	3	3	3	3
Neoregelia	carolinae tricolor	3	3	3	3	3
Neoregelia	compacta	3	3	3	3	3
Neoregelia	concentrica	2	2	2	0	0
Neoregelia	coriacea	1	1	1	0	0
Neoregelia	dungsiana	2	1	0	1	0
Neoregelia	farinosa	3	3	3	3	3
Neoregelia	fosteriana	3	3	3	3	3
Neoregelia	johannis	3	3	3	3	3
Neoregelia	kautskyi	3	3	3	3	3
Neoregelia	kuhlmannii	3	2	2	3	0
Neoregelia	laevis	3	3	3	3	3
Neoregelia	lilliputiana	2	2	0	0	0
Neoregelia	martinellii	3	3	3	3	3
Neoregelia	mooreana	3	3	3	3	3
Neoregelia	myrmecophila	3	1	1	0	0
Neoregelia	olens	3	3	3	3	3
Neoregelia	pineliana	3	3	3	3	3
Neoregelia	roethii	1	1	0	1	0
Neoregelia	sarmentosa	1	1	1	0	0
Neoregelia	seideliana	3	3	3	3	3
Neoregelia	wilsoniana	3	3	3	3	3
Neoregelia	wurdackii	3	3	3	3	3
Nidularium	amazonicum	3	3	3	3	3
Nidularium	billbergioides rubrifolius	3	3	3	3	3
Nidularium	innocentii	3	3	3	3	3
Nidularium	innocentii lineatum	3	3	3	3	3
Nidularium	procerum	3	3	3	3	3
Nidularium	purpureum	3	3	3	3	3

Nidularium	rutilans	3	3	3	3	3
Nidularium	scheremetiewii	3	3	3	3	3
Nidularium	utriculosum	3	3	3	3	3
Orthophytum	disjunctum	2	0	1	0	0
Orthophytum	foliosum	3	3	3	3	3
Orthophytum	grossiorum	3	3	3	3	3
Orthophytum	sucrei	2	1	0	0	0
Portea	petropolitana	3	3	3	3	3
Quesnelia	edmundoi	3	3	3	3	3
Quesnelia	lateralis	3	3	3	3	3
Quesnelia	liboniana	2	0	1	0	0
Quesnelia	quesneliana	3	3	3	3	3
Ursulaea	macvaughii	2	3	3	3	0
Wittrockia	cyathiformis	3	3	3	3	3
Wittrockia	smithii	1	3	3	3	0
Pitcairnioideae						
Deuterocohnia	brevispicata	3	3	3	3	3
Deuterocohnia	longipetala	3	3	3	3	3
Deuterocohnia	meziana carmineoviridiflora	3	3	3	3	3
Deuterocohnia	recurvipetala	3	3	3	3	3
Deuterocohnia	scapigera	3	3	2	1	0
Dyckia	choristaminea	3	3	3	3	3
Dyckia	ferox	2	2	1	0	0
Dyckia	goehringii	3	3	3	3	3
Dyckia	hebdingii	3	3	3	3	0
Dyckia	leptostachya	3	3	3	3	3
Dyckia	tobatiensis	2	2	2	2	0
Dyckia	vestita	3	3	3	3	3
Fosterella	penduliflora	1	1	0	0	0
Fosterella	villosula	1	1	1	0	0
Fosterella	petiolata	2	1	1	0	0
Pitcairnia	angustifolia	3	3	3	3	3
Pitcairnia	atrotubens	3	3	3	3	0
Pitcairnia	bromeliifolia	3	3	3	3	3
Pitcairnia	carnosepala	3	3	0	3	0
Pitcairnia	chiapensis	3	3	3	3	3
Pitcairnia	chiriquensis	3	3	3	3	3
Pitcairnia	corallina	2	2	2	0	0
Pitcairnia	devansayana	3	3	1	0	0
Pitcairnia	flagellaris	3	3	3	3	0
Pitcairnia	grafii	3	3	3	3	3
Pitcairnia	heterophylla	1	1	0	1	0
Pitcairnia	integrifolia	3	3	3	3	0
Pitcairnia	longissimiflora	3	3	3	3	0
Pitcairnia	paniculata	3	3	3	3	0
Pitcairnia	piepenbringii	3	2	2	0	0
Pitcairnia	rectiflora	1	1	1	0	0
Pitcairnia	recurvata	3	3	3	3	3
Pitcairnia	rubronigriflora	3	3	3	3	3
Pitcairnia	schultzei	3	3	3	3	0
Pitcairnia	sprucei	3	3	3	3	3
Pitcairnia	suaveolens	3	3	3	3	3
Pitcairnia	undulatosepala	2	2	1	1	0
Pitcairnia	utcubambensis	3	3	3	3	3
Pitcairnia	villetaensis	3	3	3	3	3
Pitcairnia	wendlandii	3	3	3	3	0
Pitcairnia	xanthocalyx	3	3	3	3	3
Puyoideae						
Puya	coerulea violacea	3	3	3	3	3
Puya	densiflora	3	3	3	3	3
Puya	ferruginea	3	3	3	3	3
Puya	humilis	1	1	1	1	0
Puya	spathacea	3	3	3	3	3
Puya	vasquezii	3	3	3	3	0
Tillandsioideae						

<i>Barfussia</i>	<i>wagneriana</i>	3	3	3	3	3
<i>Catopsis</i>	<i>hahnii</i>	3	3	3	3	0
<i>Catopsis</i>	<i>nutans</i>	2	1	1	0	0
<i>Goudaea</i>	<i>ospinae</i>	3	3	3	3	0
<i>Guzmania</i>	<i>acorifolia</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>calothyrsus</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>conifera</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>cylindrica</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>farciminiformis</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>killipiana</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>lingulata</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>melinonis</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>minor</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>monostachia</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>nicaraguensis</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>osyana</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>patula</i>	2	2	1	0	0
<i>Guzmania</i>	<i>recurvobracteata</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>rhonhofiana</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>roseiflora</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>sanguinea</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>variegata</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>wittmackii</i>	3	3	3	3	3
<i>Guzmania</i>	<i>zahnii</i>	3	3	3	3	3
<i>Lemeltonia</i>	<i>narthecioides</i>	3	3	3	3	0
<i>Lemeltonia</i>	<i>scaligera</i>	3	3	3	3	0
<i>Lutheria</i>	<i>splendens formosa</i>	1	3	2	1	0
<i>Lutheria</i>	<i>splendens</i>	3	3	3	3	0
<i>Pseudalcantarea</i>	<i>grandis</i>	3	3	3	3	3
<i>Pseudalcantarea</i>	<i>macropetala</i>	3	3	3	3	3
<i>Pseudalcantarea</i>	<i>viridiflora</i>	3	3	3	3	3
<i>Racinaea</i>	<i>dyeriana</i>	1	1	1	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>achyrostachys</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>aeranthos</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>aeranthos grisens</i>	2	2	0	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>albertiana</i>	2	2	2	2	0
<i>Tillandsia</i>	<i>andreaana</i>	1	1	1	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>argentina</i>	2	0	0	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>bergeri</i>	1	1	1	1	0
<i>Tillandsia</i>	<i>butzii</i>	1	0	0	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>cacticola</i>	1	0	0	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>caput-medusae</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>circinnatoides</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>clavigera</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>clavigera pendula</i>	3	3	3	3	0
<i>Tillandsia</i>	<i>concolor</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>corninea</i>	1	0	0	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>cucaensis</i>	2	1	1	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>denudata vivipara</i>	1	1	2	2	0
<i>Tillandsia</i>	<i>durangensis</i>	2	1	1	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>erici</i>	1	1	1	1	0
<i>Tillandsia</i>	<i>flabellata</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>floribunda</i>	1	0	0	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>foliosa</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>funckiana</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>geminiflora</i>	3	3	2	1	0
<i>Tillandsia</i>	<i>gerdae</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>globosa</i>	3	3	1	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>guatemalensis</i>	2	2	1	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>heterophylla</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>ionantha</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>ionantha maxima</i>	1	1	1	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>ixioides</i>	3	3	3	3	3
<i>Tillandsia</i>	<i>kolbii</i>	1	0	0	0	0
<i>Tillandsia</i>	<i>krukoffiana</i>	3	3	3	3	3

Tillandsia	makoyana	3	3	3	3	3
Tillandsia	malzinei	3	3	3	3	3
Tillandsia	novakii	2	2	2	2	0
Tillandsia	paucifolia	1	0	0	0	0
Tillandsia	polystachia	3	3	3	3	3
Tillandsia	ponderosa	3	3	3	3	3
Tillandsia	propagulifera	3	3	3	3	3
Tillandsia	rauhii	3	3	3	3	3
Tillandsia	roland-gosselinii	3	3	3	3	3
Tillandsia	samaipatensis	3	3	3	3	3
Tillandsia	schiedeana	3	2	2	3	0
Tillandsia	stricta	2	2	1	1	0
Tillandsia	sucrei	1	0	0	0	0
Tillandsia	tectorum	3	2	3	0	0
Tillandsia	tenuifolia surinamensis	2	0	0	0	0
Tillandsia	tillii	1	1	1	0	0
Tillandsia	tortilis	2	1	0	1	0
Tillandsia	tricolor	3	3	3	3	3
Tillandsia	vernica	2	2	2	0	0
Tillandsia	xiphioides	3	3	3	3	3
Vriesea	bituminosa	3	3	3	3	3
Vriesea	bleheri	3	3	3	3	3
Vriesea	drepanocarpa	3	3	3	3	3
Vriesea	dubia	3	3	3	3	3
Vriesea	eltoniana	3	3	3	3	3
Vriesea	fenestralis	3	3	3	3	3
Vriesea	fosteriana	2	0	0	0	0
Vriesea	friburgensis	3	3	3	3	3
Vriesea	friburgensis tucumanensis	3	3	3	3	3
Vriesea	gravisiana	1	0	0	0	0
Vriesea	guttata	3	3	3	3	3
Vriesea	maxoniana	3	3	3	3	3
Vriesea	nanuzae	3	3	3	3	3
Vriesea	oxapampae	1	1	1	0	0
Vriesea	psittacina	3	3	3	3	0
Vriesea	racinae	3	3	3	3	3
Vriesea	saundersii	3	3	3	3	3
Vriesea	scalaris	3	3	3	3	3
Vriesea	unilateralis	3	3	3	3	3
Vriesea	wawraea	1	1	1	0	0
Vriesea	zamorensis	2	3	2	0	0
Wallisia	lindeniana	3	3	3	3	3
Wallisia	pretiosa	3	3	3	3	3
Wallisia	cyanea	3	3	3	3	3
Werauhia	gladioliflora	3	3	3	3	3
Werauhia	nutans	3	3	3	3	3
Werauhia	patzeltii	3	3	3	3	3
Werauhia	pectinata	3	3	3	3	3
Werauhia	sanguinolenta	3	3	3	3	3
Werauhia	werkleana	3	3	3	3	3
Zizkaea	tuerckheimii	3	3	3	3	3

Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Firma
Acetonitril	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (A/B 29:1)	Roth
Adenosin-5'-triphosphat (ATP) Dinatriumsalz	Roth
Agar-Agar	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth
Chloroform	VWR
Chinablau-Lactose-Agar	Merck
Coomassie Brilliant Blue R250	AppliChem
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O)	Roth
Dithiothritol (DTT)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Entellan	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Chemsolute
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (FMOC-Cl)	Roth
D(+)Fructose	Roth
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Roth
Formaldehyd	Roth
D(+)Glucose	Merck
Glycin	Roth
Hefe-Extrakt	Roth
Histoclear	Sigma
Histowax	Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth
Kupfer(II)sulfat (CuSO ₄)	Merck
Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Methanol	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth
N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Natriumacetat	Roth
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Roth
Nicotinamidadeninukleotidphosphat (NADP) Dinatriumsalz	Roth
o-Phthaldialdehyd (OPA)	Roth
Pepton	Roth
Phenol	Roth
Reinstwasser	Millipore Milli-Q® Anlage
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
Roti-Mark Proteinstandard	Roth
D(+)Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	VWR
Silbernitrat (AgNO ₃)	Chempur
Stickstoff, flüssig	Linde
Thiosulfat	Roth
Toluidinblau O	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Trypton	Roth
Tween 20	Fluka

Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Firma
Autoklav	H+P Labortechnik
Binokular	Zeiss
Brutschrank	Binder
Elektrophoresekammer	Biorad
Feinwaage	Ohaus Corporation
Gefriertruhe -80°C	FRYKA
Grobwaage	Ohaus Corporation
Heizblock	Biometra
HPLC	Dionex, Thermo Fisher Scientific
Horizontalschüttler	VWR
Kugelmühle	Retsch
Kolbenhubpipette	Gilson Pipetman, VWR
Kühlzentrifuge	Hettich, VWR
Magnetrührer	Phoenix Instrument
Mikrotom	Leica
Mikroskop	Zeiss
Minizentrifuge	Roth
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Thermo Scientific
Rotationsverdampfer	VWR
Schüttelinkubator	Biometra
Spannungsgeber	Consort
Sterilarbeitsbank	Thermo Scientific
Thermo-Schüttler	Biometra, Grant-Bio
Tischzentrifuge	Eppendorf, Heraeus, VWR
Trockenschrank	Binder, Memmert
Vortex-Schüttler	VWR
Wasserbad	VWR

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen in der deutschen Sprache wurden gemäß Duden genutzt. Die Abkürzung von chemischen Elementen erfolgte nach Ihrer Bezeichnung im Periodensystem. Für Basisgrößen und ihren Einheiten wurden die international gebräuchlichen SI-Einheiten verwendet.

Abkürzung	Bedeutung
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CW-INV	Zellwandinvertase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FG (FW)	Frischgewicht
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
LB	lysogeny broth (Nährmedium)
NADP	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
N-INV	Cytoplasmatische Invertase
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	Über Nacht
V-INV	Vakuoläre Invertase

Abkürzungen der Bromelien-Gattungen

Abkürzung	Bedeutung
A.	<i>Aechmea</i>
Alc.	<i>Alcantarea</i>
B.	<i>Billbergia</i>
Bro.	<i>Brocchinia</i>
Deu.	<i>Deuterocohnia</i>
D.	<i>Dyckia</i>
G.	<i>Guzmania</i>
H.	<i>Hohenbergia</i>
L.	<i>Lemeltonia</i>
N.	<i>Neoregelia</i>
Nid.	<i>Nidularium</i>
Pit.	<i>Pitcairnia</i>
Po.	<i>Portea</i>
Pse.	<i>Pseudalcantarea</i>
P.	<i>Puya</i>
Q.	<i>Quesnelia</i>
T.	<i>Tillandsia</i>
V.	<i>Vriesea</i>
W.	<i>Wallisia</i>
Wer.	<i>Werauhia</i>

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof'in Dr. Gertrud Lohaus bedanken. Für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe dieses interessante Thema zu bearbeiten, die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung, die geduldige und motivierende Betreuung, die Freiheiten, eigene Ideen umzusetzen und den Freiraum beim Schreiben der Publikationen sowie dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Frau Prof'in Dr. Gela Preisfeld für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ebenfalls möchte ich der Arbeitsgruppe molekulare Pflanzenforschung/ Pflanzenbiochemie danken. Die wissenschaftlichen und persönlichen Gespräche und die tolle Arbeitsatmosphäre haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ein großer Dank an Euch alle. An Kira für die Einarbeitung im Labor. An Elena und Daniel für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen. An Laura für die Hilfe bei der Paraffineinbettung. An Basel für die Diskussionen bezüglich der HPLC, sowie das Gießen im Gewächshaus. An Antje, Rosi und Wiebke für die netten Gespräche. An Tim für die Hilfe bei den Extraktionen und für die Hilfe im Laboralltag. Ebenso an Ralf für die Hilfe bei der Reparatur der HPLC. An Anja für das kurzfristige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Rosi für das teils kurzfristige Korrekturlesen der Publikationen.

Den Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen Zoologie und Mikrobiologie danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich den folgenden Botanischen Gärten danken für das zur Verfügung stellen von Pflanzenmaterial: Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin, Botanischer Garten der Universität Bochum, Botanischer Garten der Universität Göttingen, Botanischer Garten der Universität Heidelberg und Botanischer Garten der Universität Wien.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglicht haben und meine Entscheidungen immer unterstützt und respektiert haben.