

– Korrigierte Fassung –

Entwicklung spezifischer  
DNA-Markersysteme zur Schnellbestimmung  
von CITES-geschützten Baumarten und deren  
Substitutionshölzern

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Niko Wischnewski

Hamburg 2014



**Tag der Disputation: 16. Dezember 2014**

**Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Elisabeth Magel**

Universität Hamburg  
Zentrum Holzwirtschaft  
Leuschnerstraße 91  
21031 Hamburg

**Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Köhl**

Universität Hamburg  
Zentrum Holzwirtschaft  
Leuschnerstraße 91  
21031 Hamburg



---

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Fachbereich Biologie, Zentrum Holzwirtschaft, der Universität Hamburg. Sie wurde finanziell unterstützt vom Bundesamt für Naturschutz.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Elisabeth A. Magel, für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, die konstruktiven Gespräche sowie für die Möglichkeit, meine Dissertation in dieser Arbeitsgruppe anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Michael Köhl danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Ute Moreth für ihre Hilfsbereitschaft bei allen theoretischen und praktischen Fragen. Andreas Kampe gilt mein Dank für die vielen Stunden informativer Fachgespräche. Weiterhin danke ich allen Bachelor-Kandidaten, BTA-Schülern und Praktikanten, deren Weg ich ein Stück begleiten durfte.

Mein Dank gilt ebenfalls allen Botanischen Gärten und Institutionen, die mir Probenmaterial bereitgestellt haben, ohne das die Anfertigung dieser Arbeit schwer möglich gewesen wäre. Besonders müssen hier die Gärtner des Thünen-Instituts in Hamburg-Bergedorf erwähnt werden.

Allen Mitarbeitern des Zentrums Holzwirtschaft sowie des Instituts für Holzforschung danke ich für die zahlreichen konstruktiven Gespräche im Arbeitsalltag, die große Hilfsbereitschaft und die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit niemals möglich gewesen wäre. Ich danke euch wirklich sehr!

---

---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Danksagung .....</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>XV</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Summary.....</b>	<b>XX</b>
<b>1            Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1       CITES .....	1
1.2       Klassische Methoden zur Holzartenidentifizierung .....	4
1.3       Verwendung von Substitutionshölzern.....	5
1.4       Vorstellung der bearbeiteten Familien .....	7
1.4.1   Bignoniaceae.....	7
1.4.2   Caryocaraceae .....	7
1.4.3   Combretaceae.....	7
1.4.4   Euphorbiaceae.....	8
1.4.5   Fabaceae.....	8
1.4.6   Meliaceae .....	8
1.4.7   Rubiaceae.....	9
1.4.8   Thymelaeaceae.....	9
1.4.9   Zygophyllaceae .....	9
1.5       Wissensstand .....	10
1.5.1   Chemotaxonomie .....	10
1.5.2   Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung .....	11
1.5.2.1   DNA-Extraktion .....	12
1.5.2.2   DNA-Barcoding.....	18

1.5.2.3	Verwendung von art- und gattungsspezifischen Primern für die Identifizierung .....	29
1.5.2.4	Identifizierung der Herkunft .....	30
1.6	Ziel der Arbeit .....	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.1	Material .....	35
2.1.1	Geräte .....	35
2.1.2	Chemikalien .....	36
2.1.3	Verwendete Kits .....	37
2.1.4	Probenmaterial .....	38
2.1.4.1	Pflanzenmaterial für den Aufbau der rDNA ITS-Sequenzdatenbank .....	39
2.1.4.2	Material zur Durchführung verschiedener Validierungen .....	47
2.2	Methoden .....	49
2.2.1	Isolierung der DNA .....	49
2.2.1.1	DNA-Extraktion aus frischem Material .....	49
2.2.1.2	Isolierung der DNA aus Kernholz oder stark abgebautem Material .....	50
2.2.1.3	Invisorb® DNA CleanUp Kit .....	56
2.2.2	Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration .....	57
2.2.3	PCR zur Amplifikation der rDNA ITS-Region .....	57
2.2.3.1	Qiagen <i>Taq</i> Core Kit .....	58
2.2.3.2	KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit .....	59
2.2.3.3	PCR-Primer .....	62
2.2.3.4	Nested-PCR .....	63
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	64
2.2.5	Aufreinigung .....	65
2.2.6	Klonierung .....	66
2.2.6.1	Ligation .....	66
2.2.6.2	Transformation .....	67



2.2.6.3	Kultivierung auf LB-Agarplatten.....	67
2.2.6.4	Blau-Weiß-Selektion .....	68
2.2.6.5	M13-PCR.....	69
2.2.7	Sequenzierung und Sequenzanalyse .....	69
2.2.8	Primerdesign für die rDNA ITS-Region.....	70
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>71</b>
3.1	Entwicklung eines geeigneten DNA-Extraktionssystems für Kern- und Splintholz .....	72
3.1.1	CTAB-, SDS- und PTB-Extraktion .....	73
3.1.1.1	CTAB-Extraktion .....	73
3.1.1.2	SDS-Extraktion.....	75
3.1.1.3	Kombination des CTAB- und des SDS-Puffers .....	76
3.1.1.4	PTB-Extraktion.....	78
3.1.2	Überprüfung kommerzieller DNA-Extraktionskits .....	79
3.1.3	Modifikationen kommerzieller DNA-Extraktionskits .....	81
3.1.3.1	Zugabe von PVP zum Lysis-Puffer des DNeasy® Plant Mini Kits ....	81
3.1.3.2	Kombination des CTAB-Extraktionspuffers mit dem DNeasy® Plant Mini Kit .....	83
3.1.3.3	Kombination des PTB-Extraktionspuffers mit dem DNeasy® Plant Mini Kit .....	85
3.1.3.4	Verwendung eines modifizierten DNeasy® <i>mericon</i> ™ Food Kit Protokolls.....	86
3.2	Aufbau einer rDNA ITS-Sequenzdatenbank .....	89
3.2.1	Meliaceae .....	89
3.2.1.1	Extraktion der DNA.....	89
3.2.1.2	Amplifikation der extrahierten DNA.....	90
3.2.1.3	Sequenzaufbereitung und Sequenzanalyse .....	93

3.2.1.4	Intraspezifische und intraindividuelle Unterschiede der Gattung <i>Swietenia</i> .....	109
3.2.2	Zygophyllaceae und Bignoniaceae.....	112
3.2.3	Fabaceae .....	115
3.2.3.1	Die <i>Intsia</i> -Gruppe.....	115
3.2.3.2	<i>Dalbergia</i> und <i>Machaerium scleroxylon</i> .....	119
3.2.3.3	<i>Caesalpinia</i> und <i>Myrocarpus frondosus</i> .....	123
3.2.3.4	Die Gattung <i>Pterocarpus</i> .....	125
3.2.3.5	Die Gattung <i>Dipteryx</i> und <i>Bowdichia nitida</i> .....	128
3.2.4	Caryocaraceae .....	130
3.2.5	Thymelaeaceae, Euphorbiaceae, Combretaceae und Rubiaceae.....	132
3.3	Entwicklung spezifischer Primer .....	137
3.3.1	Spezifische Primer für die <i>Swietenia</i> -Gruppe .....	137
3.3.2	Spezifische Primer der CITES-geschützten Baumarten und deren Substitutionshölzern.....	144
3.4	Validierung.....	147
3.4.1	Ergebnisse des Blindtests mit 60 unbestimmten Holzproben .....	148
3.4.2	Identifizierung einer Holzbohle .....	152
3.4.3	Validierung der modifizierten <i>mericon</i> <sup>TM</sup> -Extraktion anhand von Palisanderholz .....	155
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>159</b>
4.1	Entwicklung eines Protokolls für die DNA-Isolierung aus Splint- und Kernholz .....	159
4.2	Aufbau der rDNA ITS-Sequenzdatenbank .....	167
4.2.1	ITS-Sequenzen der Meliaceae.....	171
4.2.2	Beurteilung der ITS-Sequenzen der Zygophyllaceae und der Bignoniaceae .....	174
4.2.3	Die ITS-Sequenzen der Fabaceae .....	176

4.2.4	Ramin und dessen Austauschhölzer .....	179
4.3	Entwicklung und Verwendung spezifischer Primer .....	181
4.4	Validierungen des entwickelten Schnelltests .....	185
<b>5</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>191</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>195</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>217</b>
7.1	Probenmaterial aufgelistet nach der Herbarnummer .....	217
7.2	ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der Zygophyllaceae sowie der Bignoniaceae.....	223
7.3	ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der <i>Intsia</i> -Gruppe.....	226
7.4	ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der Gattung <i>Dalbergia</i> sowie von <i>Machaerium scleroxylon</i> .....	230
7.5	ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der Gattung <i>Caesalpinia</i> sowie von <i>Myrocarpus frondosus</i> .....	231
7.6	ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der Gattung <i>Pterocarpus</i> .....	233
7.7	ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der Gattung <i>Bowdichia</i> .....	235
7.8	ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse von <i>Gonystylus</i> spp., <i>Terminalia</i> spp., <i>Endospermum moluccanum</i> und <i>Neolamarckia cadamba</i> .....	236
	<b>Erklärung .....</b>	<b>240</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt von dem CITES-Holz <i>Swietenia macrophylla</i> (links) und dem Substitutionsholz <i>Entandrophragma angolense</i> (rechts). .....	6
Abbildung 2: Aufbau der Internal Transcribed Spacer Region.....	20
Abbildung 3: Darstellung der verwendeten Holzproben für die Validierung des entwickelten Schnelltests zur Holzartenidentifizierung. ....	48
Abbildung 4: Darstellung der rDNA ITS-Region inklusive der verwendeten ITS-Primer. ....	63
Abbildung 5: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec ( <i>Entandrophragma cylindricum</i> ) und Ki ( <i>Khaya ivorensis</i> ) nach Durchführung der CTAB-Extraktion. ....	74
Abbildung 6: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec ( <i>Entandrophragma cylindricum</i> ) und Ki ( <i>Khaya ivorensis</i> ) nach Durchführung der SDS-Extraktion.....	76
Abbildung 7: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec ( <i>Entandrophragma cylindricum</i> ) und Ki ( <i>Khaya ivorensis</i> ) nach Durchführung der CTAB/SDS-Extraktion.....	77
Abbildung 8: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec ( <i>Entandrophragma cylindricum</i> ) und Ki ( <i>Khaya ivorensis</i> ) nach Durchführung der PTB-Extraktion.....	79
Abbildung 9: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec ( <i>Entandrophragma cylindricum</i> ) und Ki ( <i>Khaya ivorensis</i> ) nach Durchführung der mit PVP versetzten DNeasy® Plant Mini Extraktion.....	83
Abbildung 10: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec ( <i>Entandrophragma cylindricum</i> ) und Ki ( <i>Khaya ivorensis</i> ) nach Durchführung der mit dem CTAB-Extraktionspuffer kombinierten DNeasy® Plant Mini Extraktion .....	84
Abbildung 11: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec ( <i>Entandrophragma cylindricum</i> ) und Ki ( <i>Khaya ivorensis</i> ) nach Durchführung der mit dem PTB-Extraktionspuffer kombinierten DNeasy® Plant Mini Extraktion .....	86

Abbildung 12: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec ( <i>Entandrophragma cylindricum</i> ) und Ki ( <i>Khaya ivorensis</i> ) nach Durchführung der modifizierten <i>mericon</i> <sup>TM</sup> -Extraktion (Mm).....	87
Abbildung 13: Amplifikationsprodukte der DNA-Eluate der Proben Ec und Ki nach Durchführung der modifizierten <i>mericon</i> <sup>TM</sup> -Extraktion. ....	88
Abbildung 14: Darstellung von Doppelbanden, die unter Verwendung der Primer ITS1.1/ITS4 amplifiziert wurden. ....	91
Abbildung 15: Gelbild mit Pilzbanden unterschiedlichster Länge. ....	91
Abbildung 16: Beispiel für ein Chromatogramm, das mehrere Peaks an einer Position aufweist. ....	92
Abbildung 17: Amplifikation des ITS1- (ITS1.1/ITS2.1) und des ITS2-Bereichs (ITS3.1/ITS4). ....	93
Abbildung 18: Alignment der ITS-Sequenzen der 70 Individuen der Meliaceae. ....	104
Abbildung 19: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen der Meliaceae. ....	109
Abbildung 20: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Zygophyllaceae und der Bignoniaceae. ....	114
Abbildung 21: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen von <i>Intsia bijuga</i> , <i>I. palembanica</i> , <i>Afzelia africana</i> und <i>Hymenaea courbaril</i> . ....	119
Abbildung 22: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung <i>Dalbergia</i> sowie von <i>Machaerium scleroxylon</i> . ....	122
Abbildung 23: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung <i>Caesalpinia</i> sowie von <i>Myrocarpus frondosus</i> . ....	124
Abbildung 24: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von <i>Pterocarpus indicus</i> und <i>P. macrocarpus</i> . ....	127
Abbildung 25: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung <i>Pterocarpus</i> . ....	128
Abbildung 26: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung <i>Bowdichia</i> . ....	130
Abbildung 27: Alignment der ITS-Sequenzen von <i>Caryocar brasiliense</i> und <i>C. glabrum</i> . ....	131
Abbildung 28: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen von <i>Gonystylus</i> spp., <i>Endospermum moluccanum</i> , <i>Neolamarckia cadamba</i> und <i>Terminalia</i> spp.. ...	136
Abbildung 29: Alignment für die Darstellung der Positionen der spezifischen Primer im ITS der Meliaceae. ....	140
Abbildung 30: Kreuztest für die spezifischen Primer der Meliaceae. ....	143
Abbildung 31: Schematische Darstellung des entwickelten Schnelltests. ....	147

Abbildung 32: Gelelektrophorese für den Nachweis von Ramin. ....	149
Abbildung 33: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die DNA-Eluat der Holzbohle unbekannter Art. ....	153
Abbildung 34: Gelelektrophorese für die Identifizierung einer unbekannten Holzbohle. .....	154
Abbildung 35: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die DNA-Eluat der Hölzer der Gattung <i>Dalbergia</i> . ....	156
Abbildung 36: Anwendung der spezifischen Primer der Gattung <i>Dalbergia</i> . ....	157
Abbildung A 1: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattungen <i>Guaiacum</i> und <i>Handroanthus</i> . ....	225
Abbildung A 2: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen der Zygophyllaceae und Bignoniaceae. ....	226
Abbildung A 3: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung <i>Intsia</i> sowie von <i>Afzelia</i> <i>africana</i> . ....	229
Abbildung A 4: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von <i>Intsia</i> spp., <i>Hymenaea courbaril</i> und <i>Afzelia africana</i> . ....	229
Abbildung A 5: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung <i>Dalbergia</i> . ....	230
Abbildung A 6: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von <i>Dalbergia</i> spp. und <i>Machaerium scleroxylon</i> . ....	231
Abbildung A 7: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung <i>Caesalpinia</i> . ....	232
Abbildung A 8: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von <i>Caesalpinia</i> spp. und <i>Myrocarpus frondosus</i> . ....	233
Abbildung A 9: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen der Gattung <i>Pterocarpus</i> . ....	234
Abbildung A 10: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung <i>Pterocarpus</i> . ....	234
Abbildung A 11: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung <i>Bowdichia</i> . ....	235
Abbildung A 12: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von <i>Bowdichia</i> <i>nitida</i> und <i>B. virgilioides</i> . ....	236
Abbildung A 13: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von <i>Gonystylus</i> spp., <i>Terminalia</i> spp., <i>Endospermum moluccanum</i> und <i>Neolamarckia cadamba</i> . .....	237
Abbildung A 14: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattungen <i>Gonystylus</i> und <i>Terminalia</i> . ....	239

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der CITES-geschützten Hölzer (Stand: 12.06.2013).	3
Tabelle 2: Verwendete Geräte.	35
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.	36
Tabelle 4: Verwendete Kits.	37
Tabelle 5: Aufstellung der zu untersuchenden Holzarten.	39
Tabelle 6: Auflistung des untersuchten Probenmaterials zum Aufbau der internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank.	40
Tabelle 7: Protokoll der DNA-Extraktion mit dem DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen...	50
Tabelle 8: Aufstellung der verwendeten DNA-Extraktionsprotokolle (Gruppe A), der DNA-Extraktionskits (Gruppe B) sowie der abgewandelten DNA-Extraktionskits (Gruppe C).	52
Tabelle 9: Protokoll für die DNA-Extraktion mithilfe des modifizierten DNeasy® <i>mericon</i> ™ Food Kits.	55
Tabelle 10: Protokoll für das Invisorb® DNA CleanUp Kit	56
Tabelle 11: Pipettierschema für den Mastermix des <i>Taq</i> PCR Core Kits.	59
Tabelle 12: PCR-Programm für das <i>Taq</i> PCR Core Kit.	59
Tabelle 13: Pipettierschema für den Mastermix des KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kits (ohne Enhancer).	61
Tabelle 14: Pipettierschema für den Mastermix des KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kits (mit Enhancer).	61
Tabelle 15: PCR-Programm für das KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit.	62
Tabelle 16: Primer zur Amplifikation der sich überlappenden Teilbereiche der ITS-Region.	63
Tabelle 17: Protokoll für die Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem QIAquick® PCR Purification Kit.	65
Tabelle 18: Pipettierschema für den Ligationsmix unter Verwendung des PCR Cloning <sup>plus</sup> Kits.	67
Tabelle 19: Rezept für die Herstellung des LB-Mediums.	68
Tabelle 20: PCR-Programm für eine M13-PCR.	69
Tabelle 21: Definition der Bezeichnung der einzelnen Internal Transcribed Spacer Bereiche.	71

Tabelle 22: IUPAC Nukleotidcode und zugehörige Basen.....	72
Tabelle 23: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der CTAB-Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.....	74
Tabelle 24: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der SDS-Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.....	75
Tabelle 25: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der CTAB/SDS-Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.....	77
Tabelle 26: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der PTB-Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.....	78
Tabelle 27: Auflistung der kommerziellen DNA-Extraktionskits .....	80
Tabelle 28: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der kommerziellen DNA-Extraktionskits und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.....	81
Tabelle 29: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der mit PVP versetzten DNeasy® Plant Mini Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.....	82
Tabelle 30: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der mit dem CTAB-Extraktionspuffer kombinierten DNeasy® Plant Mini Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.....	84
Tabelle 31: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der mit dem PTB-Extraktionspuffer kombinierten DNeasy® Plant Mini Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.....	85
Tabelle 32: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der modifizierten DNeasy® mericon™ Food Kit Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4. ....	87
Tabelle 33: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für die Familie der Meliaceae.....	95



Tabelle 34: Darstellung der intraspezifischen und der intraindividuellen Unterschiede der Gattung <i>Swietenia</i> .	111
Tabelle 35: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für die Familien der Zygophyllaceae und der Bignoniaceae.	112
Tabelle 36: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für <i>Intsia bijuga</i> , <i>I. palembanica</i> , <i>Afzelia africana</i> und <i>Hymenaea courbaril</i> .	116
Tabelle 37: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für <i>Dalbergia</i> spp. und <i>Machaerium scleroxylon</i> .	120
Tabelle 38: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für <i>Caesalpinia</i> spp. und <i>Myrocarpus frondosus</i> .	123
Tabelle 39: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für die Gattung <i>Pterocarpus</i> .	125
Tabelle 40: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für <i>Bowdichia nitida</i> .	129
Tabelle 41: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für <i>Caryocar brasiliense</i> und <i>C. glabrum</i> .	130
Tabelle 42: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für <i>Gonystylus</i> spp., <i>Endospermum moluccanum</i> , <i>Neolamarckia cadamba</i> und <i>Terminalia</i> spp..	133
Tabelle 43: Spezifische Primer für die Gattung <i>Swietenia</i> und deren Austauschhölzer der Gattungen <i>Entandrophragma</i> , <i>Khaya</i> und <i>Carapa</i> .	139
Tabelle 44: Auflistung aller spezifischen Primer für die Holzartenidentifizierung.	145
Tabelle 45: Auflistung der Ergebnisse des Blindtests mit 60 unbestimmten Holzproben.	151
Tabelle 46: Spektralphotometrische Analyse der DNA, die aus einer Holzbohle extrahiert wurde.	153
Tabelle 47: Spektralphotometrische Analyse der DNA, welche aus den Hölzern der Gattung <i>Dalbergia</i> isoliert wurde.	156
Tabelle 48: Vergleich der spektralphotometrischen Werte aller untersuchten DNA-Extraktionsmethoden in Kombination mit dem PCR-Erfolg.	162
Tabelle 49: Aufstellung der Arten oder Gattungen, für die entsprechende Primer zur Identifizierung vorliegen.	183
Tabelle 50: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse.	193
Tabelle A 1: Auflistung des untersuchten Probenmaterials zum Aufbau der internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank.	217

Tabelle A 2: Aufstellung der Individuen der Gattungen <i>Guaiacum</i> und <i>Handroanthus</i> , die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. ....	223
Tabelle A 3: Aufstellung der Individuen der Gattung <i>Intsia</i> sowie von <i>Afzelia africana</i> , welche zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. ....	226
Tabelle A 4: Aufstellung der Individuen der Gattung <i>Dalbergia</i> , die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. ....	231
Tabelle A 5: Aufstellung der Individuen der Gattung <i>Caesalpinia</i> , die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. ....	232
Tabelle A 6: Aufstellung der Individuen der Gattung <i>Pterocarpus</i> , die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. ....	233
Tabelle A 7: Aufstellung der Individuen der Gattung <i>Bowdichia</i> , die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. ....	236
Tabelle A 8: Aufstellung der Individuen der Gattungen <i>Gonystylus</i> und <i>Terminalia</i> , welche zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. ....	237

---

## Abkürzungen

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bt	Blindtest
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CBOL	Consortium for the Barcode of Life
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild and Flora
CO1	Cytochrome C Oxidase 1
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
FTNIR	Fourier-Transform-Nahinfrarot-Spektroskopie
G	Guanin
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
iSP	innuSPEED Plant DNA Kit
iSS	innuSPEED Soil DNA Kit
iSSt	innuSPEED Stool DNA Kit
ITS	Internal Transcribed Spacer
IUCN	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPP	Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kit
NSS	NucleoSpin® Soil Kit
LB	Lysogeny broth
NIR	Nahinfrarot
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pGP	peqGOLD Plant DNA Mini Kit
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis
pt	Plastidär
PTB	N-Phenacylthiazoliumbromid

## Abkürzungen

---

PVP	Polyvinylpyrrolidon
PWG	Plant Working Group
r	Ribosomal
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SSU	Small Subunit
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (DNA-Polymerase)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WA	Washingtoner Artenschutzübereinkommen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

---

## **Zusammenfassung**

Laut Schätzungen der International Union for Conservation of Nature and Natural Resources sind von den ca. 21.000 weltweit vorkommenden Baumarten ein Drittel akut bedroht. Um dieser akuten Bedrohung entgegenzutreten, ist in der Vergangenheit eine Vielzahl an Strategien, welche unter anderem den nationalen und internationalen Handel beschränken, entwickelt worden. Ein weltweit rechtlich bindendes Instrument ist die Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). Je nach Schutzbedürftigkeit werden die gefährdeten Hölzer in einem der drei Anhänge des Artenschutzübereinkommens gelistet. Um die hieraus resultierenden strengen Regularien zu erfüllen bzw. zu umgehen, werden sogenannte Substitutionshölzer gehandelt. Diese Hölzer zeichnen sich dadurch aus, dass sie in ihrer Textur und teilweise in ihren Eigenschaften stark den CITES-Hölzern ähneln. Diese Ähnlichkeit bietet aber auch die Möglichkeit, CITES-geschützte Hölzer als deren Substitutionshölzer auszuweisen, wodurch die Vollstreckungsbehörden getäuscht werden und die entsprechende Holzart noch stärker gefährdet wird. Aus diesem Grund ist die eindeutige Identifizierung der vorliegenden Holzart unabdingbar. Um eine Holzart zu identifizieren, kommen in den meisten Fällen Bestimmungsmethoden auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene zum Einsatz. Ein Nachteil dieser Methoden besteht darin, dass einige CITES-Hölzer anhand dieser Techniken nur schwer bis gar nicht von deren Substitutionshölzern zu unterscheiden sind. Um dieser Problematik entgegenzutreten, sollte in dieser Arbeit ein genetischer Schnelltest entwickelt werden, der durch die Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden bereits nach der Gelelektrophorese darüber Auskunft gibt, ob es sich um die angegebene Holzart handelt. Für die Erarbeitung solcher spezifischen Primer wurde die rDNA Internal Transcribed Spacer Region (ITS-Region) gewählt, da dieser genomische Marker bereits erfolgreich zur Identifizierung von Pflanzen, Pilzen und Tieren eingesetzt wurde. Die für die Entwicklung eines solchen Schnelltests erforderlichen Untersuchungen lassen sich in vier Aufgabengebieten zusammenfassen. (1) Entwicklung eines DNA-Extraktionssystems für schwierige Ausgangsmaterialien, wie altes oder bereits verarbeitetes Splint- und Kernholz. (2) Aufbau einer rDNA ITS-Sequenzdatenbank für CITES- und Substitutionshölzer. (3) Bereitstellung spezifischer Oligonukleotide zur Identifizierung der Holzart. (4) Validierung des entwickelten Schnelltests.

Für die Extraktion von DNA aus Ästen, Blättern und frischem Splintholz, erwies sich die Verwendung des DNeasy® Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden) als vorteilhaft. Um aber auch aus Kernholz oder altem Splintholz DNA in einer Qualität und Quantität zu extrahieren, die eine Amplifikation der ITS-Region sicherstellt, wurden 14 DNA-Extraktionsmethoden untersucht bzw. weiterentwickelt. Die Resultate zeigen, dass eine Modifikation des DNeasy® mericon™ Food Kits (Qiagen, Hilden) ein DNA-Extraktionsprotokoll darstellt, welches eine DNA-Isolierung auch aus Kern- und Splintholz gewährleistet. Für den Aufbau der internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank kam neben frischem Ast- und Blattmaterial, das von Botanischen Gärten zur Verfügung gestellt wurde, auch bereits extrahierte DNA zum Einsatz. Der Zugriff auf diese DNA wurde von verschiedenen Forschungseinrichtungen gewährt. Insgesamt sind durch die Verwendung dieser Ausgangsmaterialien 211 ITS-Bereiche erarbeitet worden. Diese 211 Sequenzen verteilen sich auf 9 Familien, 23 Gattungen sowie 53 Arten und repräsentieren sowohl CITES-Hölzer als auch deren Substitutionsarten. Auf Basis der Informationen der Sequenzdatenbank und der GenBank des National Center for Biotechnology Information wurden die interspezifischen Unterschiede der ITS-Sequenzen genutzt, um art- und gattungsspezifische Primer zu entwickeln. Diese Primer ermöglichen eine Identifizierung der Holzart ohne eine DNA-Sequenzierung. Für folgende Arten stehen artspezifische Primerpaare zur Verfügung: *Caesalpinia echinata* (CITES II), *C. ferrea*, *Cedrela fissilis* (CITES III), *C. odorata* (CITES III), *Dalbergia latifolia*, *D. nigra* (CITES I), *D. retusa* (CITES II), *D. sissoo*, *D. spruceana*, *Entandrophragma angolense*, *E. cylindricum*, *Guaiacum officinale* (CITES II), *G. sanctum* (CITES II), *Hymenaea courbaril*, *Intsia bijuga*, *I. palembanica*, *Machaerium scleroxylon*, *Swietenia macrophylla* (CITES II), *S. humilis* (CITES II) und *S. mahagoni* (CITES II). Auf der Seite der gattungsspezifischen Primer erfolgte für folgende Gattungen die Entwicklung von Primerpaaren: *Afzelia*, *Bowdichia*, *Bulnesia*, *Carapa*, *Endospermum*, *Guaiacum* (CITES II), *Handroanthus*, *Khaya*, *Myrocarpus* und *Neolamarckia*. Die Tatsache, dass für einige der untersuchten Arten kein spezifisches Primerpaar vorhanden ist, liegt darin begründet, dass aufgrund der eigenen Sequenzen und denen der internationalen Datenbanken auf zu wenig Sequenzinformationen zurückgegriffen werden konnte, um spezifische Sequenzabschnitte zu definieren. Für den mit spezifischen Primern arbeitenden Schnelltest erfolgten insgesamt drei Validierungen (zwei Blindtests mit insgesamt 61 Proben und eine Validierung der mericon™-Extraktion), die alle den Nachweis erbrachten, dass mit dieser Methode die

Möglichkeit besteht, Hölzer eindeutig zu identifizieren.

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben deutlich gezeigt, dass es sich bei der ITS-Region um einen Marker handelt, der ausreichend interspezifische Unterschiede aufweist, um eine Identifizierung auf Artebene zu gewährleisten. Zudem bietet das modifizierte DNeasy<sup>®</sup> *mericon*<sup>™</sup> Food Kit ein Protokoll, anhand dessen die DNA-Isolierung aus den im Handel vorkommenden Ausgangsmaterialien durchführbar ist. Die Anwendung der spezifischen Primer sichert weiterhin eine schnelle und kostengünstige Identifizierung der für den CITES-Vollzug relevanten Holzarten. So wird nicht nur der CITES-Vollzug entscheidend unterstützt, sondern es steht ein weiteres Werkzeug zur Verfügung, um der akuten Bedrohung durch den illegalen Holzhandel entgegenzutreten.

---

## Summary

The International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources has estimated that about one third of the approximate 21,000 tree species in the world are threatened and endangered. To counter this important threat a number of strategies have been developed in the past, among some of these are limiting national and international trade. The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) is a global and legal binding instrument. The woody species covered by CITES are listed in three Appendices, according to the degree of protection required. To bypass and legally overcome these resulting strict regulations, substitution woods may be traded. Substitution woods are characterised by being similar to the CITES listed woods in texture, and also partially in characteristics. This similarity offers the possibility to trade CITES protected woods as substitution wood, therefore any misunderstanding with enforcing authorities can endanger corresponding CITES wood species even more. For this reason clear identification of existing wood species is mandatory. To identify a wood species, a set of prior determined methods on a macroscopic and microscopic level are usually used. One disadvantage of these methods is that some CITES woods are hard or impossible to tell from their substitution woods. To resolve these problems, this thesis has developed a quick test based on rDNA Internal Transcribed Spacer Region (ITS region), which enables clear differentiation of CITES woods from their substitution species. The development of this quick test can be summarised into four main areas. (1) Development of a DNA extraction system for difficult raw materials, such as old or already processed sapwood and heartwood. (2) Set-up of an rDNA ITS sequence database for both CITES and substitution woods. (3) Development of specific oligonucleotides for identification of wood species. (4) Validation of the developed quick test method.

Extraction of DNA from plant material such as branches, leaves and fresh sapwood, used the DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden). To extract DNA in the required quality and quantity that ensured PCR amplification of the ITS region from heartwood or old sapwood, modifications to the DNeasy<sup>®</sup> *mericon*<sup>™</sup> Food Kit (Qiagen, Hilden) were required. This modified kit turned out to be the best of 14 isolation methods tested. To develop a robust internal rDNA ITS sequence database, not only fresh branch and leaf material provided by botanic gardens were used, but also already-extracted DNA. This extracted DNA was provided by various research facilities, which permitted



development of 211 ITS regions. The 211 ITS sequences were spread across 9 families, 23 genera and 53 species, representing both CITES woods and their substitution species. Based on the own sequences and the information of the sequence database GenBank (National Center for Biotechnology Information), interspecific differences of the ITS sequences were used to develop species and genus specific primers. These primers permitted identification of wood species without requiring sequencing of the DNA. Species-specific primer pairs are now available for the following species: *Caesalpinia echinata* (CITES II), *C. ferrea*, *Cedrela fissilis* (CITES III), *C. odorata* (CITES III), *Dalbergia latifolia*, *D. nigra* (CITES I), *D. retusa* (CITES II), *D. sissoo*, *D. spruceana*, *Entandrophragma angolense*, *E. cylindricum*, *Guaiacum officinale* (CITES II), *G. sanctum* (CITES II), *Hymenaea courbaril*, *Intsia bijuga*, *I. palembanica*, *Machaerium scleroxylon*, *Swietenia macrophylla* (CITES II), *S. humilis* (CITES II) and *S. mahagoni* (CITES II). Genus-specific primer pairs were also developed for the following genera: *Afzelia*, *Bowdichia*, *Bulnesia*, *Carapa*, *Endospermum*, *Guaiacum* (CITES II), *Handroanthus*, *Khaya*, *Myrocarpus* and *Neolamarckia*. Note that there is no specific primer pair for some of the examined species because using their own DNA sequences and the sequences from the international databases did not provide enough sequence information to define specific sequence sections. There were a total of three validations for the quick test developed here using specific primers (two blind tests with a total of 61 specimens and one validation for the DNA isolation method), all of which prove that the methods developed permitted clear identification of woods.

Results obtained in this thesis clearly showed that the ITS region is a marker that has enough interspecific differences to ensure identification at a species level. The modified DNeasy<sup>®</sup> mericon<sup>™</sup> Food Kit also provided a DNA extraction protocol that permitted isolation of wood DNA from raw materials found in the trade. The use of specific primers also ensured a quick and cost-efficient identification of wood species relevant for CITES implementation. Thus, not only CITES regulation is decisively supported by this method, but also the test provides another tool that may help to counter the acute threat of the illegal wood trade.



---

# 1 Einleitung

Der starke Anstieg der Weltbevölkerung in den letzten 200 Jahren sowie die Industrialisierung führten zwangsläufig zu einer steigenden Nutzung natürlicher Ressourcen. Diese starke Nutzung gefährdet derzeit sehr viele Tier- und Pflanzenarten, im Besonderen immer mehr Baumarten, in ihrem Bestand. Die Bäume dienen hierbei nicht nur als Lieferant von Holz- und Brennmaterial, sondern finden auch Einsatz als Nahrungs- bzw. Futtermittel, für medizinische Zwecke und als Rohstofflieferant für Harze, Öle und Gummis. Laut Erhebungen der International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) sind von den ca. 21.000 weltweit vorkommenden Baumarten schätzungsweise ein Drittel akut bedroht (WWF 2007). Die Gefährdung der Baumarten geschieht nicht nur durch legale, aber zum Teil unregulierte Abholzung, sondern ebenfalls durch illegalen Holzeinschlag. Von illegalem Holzeinschlag spricht man nicht nur dann, wenn er ohne Erlaubnis erfolgt oder mehr als die Konzessionsmenge gefällt wird, sondern auch, wenn der Einschlag aufgrund der Vermeidung von Steuer- bzw. Abgabezahlungen nicht gemeldet wird. Weiterhin gilt der Einschlag als illegal, wenn durch die Convention on International Trade in Endangered Species of Wild and Flora (CITES) geschützte Baumarten gefällt werden oder gegen internationale Handelsregeln, wie Exportverbote, verstoßen wird. Je nach angewandeter Definition kann ein Holzeinschlag sogar als illegal gelten, wenn bei Ernte, Transport oder Verarbeitung gesetzeswidrig gehandelt wird. Im Jahr 2009 betrug der weltweite illegale Einschlag ca. 103-284 Mio. m<sup>3</sup>. Dies entspricht 7-17% des Gesamteinschlags (BMEL 2013).

## 1.1 CITES

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um der Gefährdung von Baumarten entgegenzuwirken. Eine wichtige Strategie ist, den Handel von bedrohten Hölzern zu beschränken bzw. zu verbieten. Ein weltweit rechtlich bindendes Instrument, das hierfür zur Anwendung kommt, ist das Washingtoner Artenschutzübereinkommen (WA = CITES). Die folgenden Informationen wurden der offiziellen CITES-Homepage entnommen (CITES 2014).

Erste Entwürfe des WAs wurden bereits ab 1963, nach einem Beschluss durch die Mitgliedsländer der IUCN, verfasst. Auf einer Gründungskonferenz in Washington

D.C., USA, am 03.03.1973, wurde dem Text des Übereinkommens von 80 Ländern zugestimmt. In Kraft getreten ist das Übereinkommen nach der 10. Ratifizierung eines Unterzeichnerstaats am 01.07.1975. Im Januar 2014 haben mittlerweile 179 Staaten das Übereinkommen ratifiziert.

Ziel des WAs ist, den internationalen Handel von Tieren und Pflanzen zu überwachen bzw. zu reglementieren und somit den natürlichen Bestand zu schützen. Gemäß des Übereinkommens gilt jeder Transport über eine Grenze als Handel, unabhängig davon, aus welchen Grund dieser Transport erfolgt. Die in den CITES-Katalog aufgenommenen Arten sind entsprechend dem Grad ihrer Schutzbedürftigkeit in drei Anhängen aufgelistet, wodurch für den internationalen Handel unterschiedliche Beschränkungen gelten. Die drei Anhänge gestalten sich wie folgt:

- Anhang I: Dieser Anhang listet unmittelbar vom Aussterben bedrohte Arten auf und verbietet den kommerziellen Handel mit ihnen. Eine der wenigen Ausnahmen bildet der genehmigungspflichtige Handel zum Zweck wissenschaftlicher Untersuchungen. Für den Ex- und Import werden Ausfuhr- bzw. Einfuhrgenehmigungen der zuständigen Behörden benötigt. Derzeit sind knapp 980 Arten durch diesen Anhang geschützt. Vertreter sind z.B. alle Walarten, die Meeresschildkröten sowie die Holzarten *Dalbergia nigra* und *Fitzroya cupressoides* (Tabelle 1).
- Anhang II: Hier erfolgt die Listung der Arten, die nicht unmittelbar vom Aussterben bedroht sind, deren Bestand aber durch den internationalen Handel gefährdet werden könnte. Weiterhin finden sich in diesem Anhang Arten, die leicht mit gefährdeten Arten verwechselt werden könnten. Für den Export muss eine Ausfuhrgenehmigung vorliegen. Des Weiteren verlangt die EU zusätzlich eine Importgenehmigung. Der Anhang weist ca. 34.500 Vertreter auf. Als Beispiel können der Weiße Hai, der Amerikanische Schwarzbär und die Gattungen *Swietenia* und *Guaiacum* genannt werden (Tabelle 1).
- Anhang III: In diesem Anhang werden national reglementierte Arten oder Populationen aufgeführt, für deren Schutz eine internationale Kontrolle notwendig ist. Vertreter dieses Anhangs benötigen beim Export aus dem entsprechenden Land eine Ausfuhrgenehmigung. In diesem Anhang sind ca. 160 Arten aufgeführt, wie z.B. *Cedrela fissilis* aus Bolivien (Tabelle 1).

Der Schutz durch einen der drei Anhänge des WAs beinhaltet nicht automatisch, dass der Vertreter oder alle aus ihm gewonnenen Erzeugnisse vom Handel ausgeschlossen oder durch Auflagen beschränkt sind, sondern ergänzende Fußnoten legen fest, was genau durch den entsprechenden CITES-Anhang geschützt wird. Die Überarbeitung der Anhänge erfolgt alle zwei Jahre auf der CITES-Vertragsstaatenkonferenz.

Tabelle 1: Auflistung der CITES-geschützten Hölzer (Stand: 12.06.2013). Die Hölzer sind ihrem entsprechenden CITES-Anhang zugeordnet. \* = Population Madagaskars

Anhang I	Anhang II	Anhang III
<i>Abies guatemalensis</i>	<i>Aquilaria</i> spp.	<i>Cedrela fissilis</i>
<i>Araucaria araucana</i>	<i>Aniba rosaeodora</i>	<i>Cedrela lilloi</i>
<i>Balmea stormiae</i>	<i>Bulnesia sarmientoi</i>	<i>Cedrela odorata</i>
<i>Dalbergia nigra</i>	<i>Caesalpinia echinata</i>	<i>Dalbergia darienensis</i>
<i>Fitzroya cupressoides</i>	<i>Caryocar costaricense</i>	<i>Dipteryx panamensis</i>
<i>Pilgerodendron uviferum</i>	<i>Dalbergia</i> spp.*	<i>Magnolia liliifera</i> var. <i>obovata</i>
<i>Podocarpus parlatorei</i>	<i>Dalbergia conchinchinensis</i>	<i>Pinus koraiensis</i>
	<i>Dalbergia granadillo</i>	<i>Podocarpus neriifolius</i>
	<i>Dalbergia retusa</i>	<i>Tetracentron sinense</i>
	<i>Dalbergia stevensonii</i>	
	<i>Diospyros</i> spp.	
	<i>Gonystylus</i> spp.	
	<i>Guaiacum</i> spp.	
	<i>Gyrinops</i> spp.	
	<i>Oreomunnea pterocarpa</i>	
	<i>Osyris lanceolata</i>	
	<i>Pericopsis elata</i>	
	<i>Platymiscium pleiostachyum</i>	
	<i>Podocarpus neriifolius</i>	
	<i>Pterocarpus santalinus</i>	
	<i>Swietenia humilis</i>	
	<i>Swietenia macrophylla</i>	
	<i>Swietenia mahagoni</i>	
	<i>Taxus chinensis</i>	
	<i>Taxus cuspidata</i>	
	<i>Taxus fuana</i>	
	<i>Taxus sumatrana</i>	
	<i>Taxus wallichiana</i>	

## **1.2 Klassische Methoden zur Holzartenidentifizierung**

Um den Schutz bedrohter Baumarten durch die CITES-Regularien gewährleisten zu können, ist eine zweifelsfreie Bestimmung der vorliegenden Holzart unabdingbar. Die Bestimmung der Holzart erfolgt in den meisten Fällen anhand von makroskopischen oder mikroskopischen Merkmalen. Für die makroskopische Bestimmung werden Quer-, Radial- und Tangentialschnitte einer Probe angefertigt und anhand dieser die Strukturmerkmale mit einer 6- bis 12-fach vergrößernden Lupe betrachtet. Eine genauere Bestimmung ist mithilfe von mikroskopischen Schnitten möglich. Hierdurch können ca. 100 anatomische Strukturmerkmale verglichen werden. Durch die Verwendung von Mikroskop oder Lupe werden in erster Linie die primären Strukturmerkmale, wie Gefäße, Parenchyme, Holzstrahlen und Harzkanäle begutachtet. Als erster Anhaltspunkt für die Unterscheidung von Laub- oder Nadelholz können die Gefäße (Tracheen) herangezogen werden. Hier lässt die Anwesenheit von Tracheen einen Schluss darauf zu, dass es sich bei der vorliegenden Probe um ein Laubholz handelt. Zwar finden sich Tracheen auch bei den höher entwickelten Gymnospermen (siehe Gnetales), aber Vertreter dieser Ordnung sind für die Holzbranche nicht von Relevanz. Auch das Fehlen von Gefäßen lässt keinen sicheren Schluss auf ein Nadelholz zu, da z.B. die Vertreter der Familien der Winteraceae und der Trochodendraceae keinerlei Gefäße aufweisen. Dennoch können die Gefäße sehr gut herangezogen werden, um eine Auskunft über die vorliegende Gattung oder Art zu erhalten. Betrachtet wird hierzu, welche Größe die Gefäße aufweisen. Ab ca. 200 µm Gefäßdurchmesser handelt es sich um grobe und gut sichtbare Poren. Kleine Poren, die nur mit der Lupe zu erkennen sind, weisen eine Größe von < 80 µm auf. Zuzüglich zur Größe wird auch die Verteilung (ring-, halbring- oder zerstreutporig), die Gruppierung (solitär, Gruppen oder Nester), die Anordnung (diagonale Folge etc.) und die Inhalte der Gefäße (Thyllen und organische oder anorganische Substanzen) zur Identifizierung herangezogen. Ein zusätzliches primäres Strukturmerkmal ist die mögliche Anwesenheit von Harzkanälen. Sind diese vorhanden, gibt z.B. eine Anordnung in tangentialen Reihen einen weiteren Hinweis auf die Identität der Probe. Die Holzstrahlen bilden ein weiteres wichtiges primäres Strukturmerkmal. Hierbei dienen deren Anordnung, die Größe sowie deren Breite, bezogen auf die evtl. vorhandenen Gefäße, als Anhaltspunkt. Ein letztes primäres Strukturmerkmal stellt das Parenchym dar. Zur Identifizierung werden hier die verschiedenen Typen bzw. deren Anordnung herangezogen. So kann das Parenchym z.B. gebändert, leiterartig, netzartig oder aliform

angeordnet sein.

Für die Identifizierung der gesuchten Holzart sind nicht nur die primären Strukturmerkmale von Relevanz, sondern ebenfalls die sekundären Merkmale. Es handelt sich dabei um variable Merkmale, wie z.B. Farbe, Geruch, Gewicht und Textur des Holzes.

### **1.3 Verwendung von Substitutionshölzern**

Um die Handelsverbote bzw. strengen Regularien CITES-geschützter Hölzer zu umgehen, werden sogenannte Substitutionshölzer gehandelt. Diese Hölzer unterscheiden sich in ihrer Textur kaum bis gar nicht von den zu ersetzenden CITES-Hölzern. Trotz des identischen Aussehens der Hölzer, bestehen in ihren Eigenschaften jedoch teilweise gravierende Unterschiede. Der Umstand, dass die CITES-Hölzer und die Substitutionshölzer in ihrer Textur nahezu identisch sein können, bietet zudem die Möglichkeit zum Betrug. Im Folgenden werden kurz zwei Beispiele angeführt. Beim ersten Beispiel handelt es sich darum, dass illegal geschlagene CITES-Hölzer mit Namen bzw. Papieren von nicht geschützten Arten ausgestattet werden. So ist es möglich, die geschützten Hölzer ohne Probleme zu exportieren bzw. zu importieren. Ein zweites Beispiel wäre, dass hochpreisig gehandelte CITES-Hölzer durch günstige Substitutionshölzer ersetzt werden und somit ein großer Gewinn, mit allen Nachteilen für den Käufer, erzielt wird. Um diesen Möglichkeiten des Betrugs entgegenzutreten und einen CITES-Vollzug zu gewährleisten, ist die eindeutige Identifizierung der Holzart unerlässlich. Problematisch ist, dass die zuständigen CITES-Vollzugsbehörden in den seltensten Fällen über holzspezifische Kenntnisse verfügen. Abhilfe schaffen einfach handhabbare Erkennungshilfen, wie die Software *CITESwoodID*. Unter Verwendung dieser Software kann für CITES-geschützte Handelshölzer eine erste Einschätzung anhand makroskopischer Merkmale getroffen werden (Koch et al. 2011).

Für die meisten der im Handel befindlichen Hölzer ist es möglich, diese anhand von makroskopischen bzw. mikroskopischen Merkmalen zu unterscheiden und somit zwischen CITES-geschützten Arten und deren Substitutionshölzern zu differenzieren. Für einen geringen Anteil der Handelshölzer reichen die bisher erwähnten Methoden aber nicht aus, wodurch für diese eine Identifizierung bis auf Artebene nicht möglich ist (Gasson 2011). So wird in einigen Fällen die Gewährleistung des CITES-Vollzugs

nahezu unmöglich. Diese Problematik erfordert die Entwicklung bzw. Etablierung neuer Methoden zur Artidentifizierung. Auf diese neuen Methoden wird im Punkt Wissensstand vertiefend eingegangen.

Beispiele für schwer zu unterscheidende Holzarten auf makroskopischer Ebene sind *Swietenia macrophylla* und *Entandrophragma angolense*. Abbildung 1 gibt hierfür die Querschnitte der Hölzer bei 10-facher Vergrößerung wieder.



Abbildung 1: Querschnitt von dem CITES-Holz *Swietenia macrophylla* (links) und dem Substitutionsholz *Entandrophragma angolense* (rechts). Darstellung bei 10-facher Vergrößerung.



## 1.4 Vorstellung der bearbeiteten Familien

Folgend werden die wichtigsten Familien dieser Arbeit vorgestellt. Aus diesen Familien wurden für die Untersuchungen CITES-geschützte Hölzer sowie deren Substitutionshölzer ausgewählt. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass mit den klassischen Methoden eine Unterscheidung bzw. Identifizierung der Hölzer nur schwer bis gar nicht möglich ist. Ein konkretes Beispiel findet sich in der Familie der Meliaceae, in der die CITES-geschützte Gattung *Swietenia* (Anhang II) den Substitutionshölzern aus den Gattungen *Entandrophragma*, *Khaya* und *Carapa* gegenübersteht (Tabelle 5 aus Punkt 2.1.4). Als Quelle für die nachfolgenden Beschreibungen diente Watson und Dallwitz (2014).

### 1.4.1 Bignoniaceae

Bei den Bignoniaceae (Trompetenbaumgewächse) handelt es sich um eine Pflanzenfamilie innerhalb der Ordnung der Lamiales (Lippenblütlerartige). Die Verbreitung dieser Familie liegt hauptsächlich in den Tropen und Subtropen, mit der höchsten Konzentration in Mittel- und Südamerika. Nach einer taxonomischen Bearbeitung, die nur monophyletische Gattungen enthält, weist diese Familie nur noch 82 anstatt 104 Gattungen auf (Lohmann und Ulloa Ulloa 2014). Bei der Wuchsform handelt es sich in den meisten Fällen um Bäume oder Lianen. Weniger kommen Sträucher und krautige Pflanzen vor. Für den Holzhandel sind unter anderem die Gattungen *Tabebuia*, *Handroanthus* und *Paratecoma* von Interesse.

### 1.4.2 Caryocaraceae

Die Caryocaraceae befinden sich in der Ordnung der Malpighiales. Diese Familie weist nur die Gattungen *Anthodiscus* und *Caryocar* auf. Innerhalb dieser Gattungen sind überwiegend Bäume und wenige Sträucher anzutreffen. Die Caryocaraceae sind in der Neotropis, insbesondere im Amazonasgebiet, verbreitet. Das harte Holz der *Caryocar*-Arten ist für den Bootsbau von besonderer Relevanz.

### 1.4.3 Combretaceae

Die Flügelamengewächse (Combretaceae) gehören zu der Ordnung der Myrtales. Die unterschiedlichen Arten der ungefähr 20 Gattungen dieser Familie werden durch

verholzende Pflanzen repräsentiert. Ihr Verbreitungsgebiet liegt in den Tropen und Subtropen. In der Holzindustrie findet die Gattung *Terminalia* besondere Beachtung.

#### 1.4.4 Euphorbiaceae

Wie die Caryocaraceae gehören auch die Euphorbiaceae (Wolfsmilchgewächse) in die Ordnung der Malpighiales. Derzeit befinden sich etwa 300 Gattungen innerhalb dieser Familie. Bei den Wolfsmilchgewächsen sind sowohl Bäume als auch Sträucher, Halbsträucher und krautige Pflanzen vertreten. Die Euphorbiaceae sind von den gemäßigten Breiten über die Subtropen und Tropen fast weltweit verbreitet. Einer der bekanntesten Vertreter dieser Familie ist wahrscheinlich der Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*). Die Holzindustrie ist an vielen Gattungen dieser Familie, wie z.B. der Gattung *Endospermum*, interessiert.

#### 1.4.5 Fabaceae

Die Hülsenfrüchtler (Fabaceae), Ordnung Fabales, bilden in dieser Arbeit sowie im Allgemeinen eine der wichtigsten Pflanzenfamilien. Die ungefähr 20.000 Arten dieser Familie sind in etwa 730 Gattungen aufgeteilt. Aufgrund des großen Artenreichtums sind die Vertreter der Hülsenfrüchtler auf der gesamten Welt wiederzufinden. In ihrem Erscheinungsbild sind sowohl krautige als auch verholzende Pflanzen wie Sträucher, Lianen und Bäume zu finden. Eine der wichtigsten Verwendungsmöglichkeiten dieser Familie, besteht in der Erzeugung von Nahrungsmitteln, wie z.B. Bohnen, Erbsen und Linsen. Aber auch für den Holzhandel besteht durch diverse Gattungen, wie z.B. *Dalbergia* und *Machaerium*, eine starke Nachfrage nach dieser Familie.

#### 1.4.6 Meliaceae

Die Meliaceae (Mahagonigewächse), aus der Ordnung der Sapindales, enthalten mit der Gattung *Swietenia* wahrscheinlich die bekanntesten Hölzer der Welt. Die ca. 50 Gattungen dieser Familie sind überwiegend in den Tropen und selten in den Subtropen anzutreffen. Der Habitus dieser Familie zeichnet sich meist durch Bäume und Sträucher aus, krautige Pflanzen sind hingegen selten. Für den Handel ist diese Familie von besonderem Interesse. So treten hier nicht nur die wertvollen und CITES-geschützten Hölzer der Gattung *Swietenia* auf, sondern auch deren Austauschhölzer aus den Gattungen *Khaya*, *Carapa* und *Entandrophragma*.

#### 1.4.7 Rubiaceae

Die Familie der Rötengewächse (Rubiaceae) gehört zur Ordnung der Gentianales. Mit ihren ungefähr 660 Gattungen und ca. 13.000 Arten ist sie, wie die Fabaceae, eine der artenreichsten Familien der Magnoliopsida. Aufgrund des Artenreichtums sind die Rubiaceae weltweit verbreitet, das Hauptverbreitungsgebiet liegt aber in den Tropen und Subtropen. Ihr Erscheinungsbild zeigt sich bei den meisten Arten in verholzenden Pflanzen, wie Sträuchern oder Bäumen. Seltener sind Lianen oder krautige Pflanzen. Der wohl bekannteste Vertreter dieser Familie ist der Kaffee. Die Verwendung als Holzlieferant spielt innerhalb dieser Familie eine eher untergeordnete Rolle. In dieser Arbeit bildet *Neolamarckia cadamba* ein Substitutionsholz zu den CITES-geschützten Arten der Gattung *Gonystylus* aus der Familie der Thymelaeaceae.

#### 1.4.8 Thymelaeaceae

Neben den Malvaceae gehören auch die Seidelbastgewächse (Thymelaeaceae) zur Ordnung der Malvales. Die Thymelaeaceae enthalten ca. 60 Gattungen und sind von den gemäßigten Zonen bis in die Tropen zu finden, wobei der Verbreitungsschwerpunkt in den Subtropen liegt. Die meisten Arten sind verholzende Pflanzen, die als Bäume oder Sträucher, seltener als Lianen wachsen. Vereinzelt sind auch krautige Pflanzen anzutreffen. Für die Holzindustrie wichtige Hölzer stammen z.B. aus den Gattungen *Gonystylus* und *Aquilaria*.

#### 1.4.9 Zygophyllaceae

Die Familie der Zygophyllaceae (Jochblattgewächse) ist der Ordnung der Zygophyllales zugehörig. Diese Familie umfasst ca. 25 Gattungen, die hauptsächlich in den Tropen und Subtropen auftreten. Neben Sträuchern und Bäumen gehören auch krautige Pflanzen zu ihrer Wuchsform. Die Gattung *Guaiacum* nimmt bereits seit Jahrhunderten eine wichtige Rolle im Holzhandel ein. Es ist hier nicht nur das harte und besonders schwere Holz von Interesse, sondern auch dessen Extraktstoffe.

## 1.5 Wissensstand

Wie bereits angeführt, ist die Artidentifizierung ein elementarer Bestandteil für die Sicherstellung des CITES-Vollzugs. Im Bereich der CITES-geschützten Hölzer werden die ausführenden Behörden in diesem Punkt vor eine besondere Aufgabe gestellt. Die traditionellen Methoden (makroskopisch und mikroskopisch) stoßen aufgrund der Vielzahl der mittlerweile gehandelten Hölzer, immer öfter an ihre Grenzen (Gasson 2011). Aufgrund dieser Tatsache ist die Etablierung neuer Identifizierungsmethoden für CITES-geschützte Hölzer eine wichtige Aufgabe für die nächsten Jahre. Folgend werden alternative Methoden zur Identifizierung von Holzarten vorgestellt. Der Schwerpunkt wird bei den molekularbiologischen Methoden liegen, während auf die Chemotaxonomie nur kurz eingegangen wird.

### 1.5.1 Chemotaxonomie

Im Jahr 1970 berichteten Anderson et al., dass mithilfe der Chemotaxonomie eine Unterscheidung von *Pinus monophylla* und *P. quadrifolia* möglich ist. Hierfür wurden Kern- und Splintholz der beiden Arten auf Monoterpene sowie Fett- und Harzsäuren untersucht. Es ergab sich, dass *P. monophylla* die Terpen-Verbindungen  $\beta$ -Phellandren, Terpinolen und Camphen enthält, während diese Verbindungen bei *P. quadrifolia* offenbar fehlen. Auch Wang et al. (2006) führten Untersuchungen innerhalb der Koniferen durch. In dieser Studie wurden die Riechstoff-Komponenten von *Chamaecyparis formosensis*, *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*, *Calocedrus macrolepis* var. *formosana*, *Taiwania cryptomerioides*, *Cunninghamia lanceolata* und *Cryptomeria japonica* unter Verwendung von Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS) untersucht. Die Ergebnisse deuten die Autoren als hilfreiche Basis für weiterführende chemotaxonomische Untersuchungen.

Einen weiteren Ansatz zur Unterscheidung von Holzarten bildet die Spektroskopie. Bereits 1988 veröffentlichten Wienhaus et al. erste Ergebnisse zur Unterscheidung von Laub- und Nadelholz mittels Infrarot-Spektroskopie. Die Unterscheidung zwischen Gymno- und Angiospermen wurde über den unterschiedlichen chemischen Aufbau des Lignins, welcher einfach über die Spektroskopie nachgewiesen werden konnte, realisiert. Hierauf aufbauend, veröffentlichten Niemz et al. (1989) Ergebnisse zu dem Versuch, unterschiedliche Holzarten aus einem Hackschnitzelgemisch zu identifizieren. Leider fehlten den Autoren noch die erforderlichen statistischen Methoden, die es

ermöglicht hätten, dieses Ziel zu erreichen. Schon im Jahr 1996 wurden durch Brunner et al. neue interessante Ergebnisse zur Holzartenidentifizierung mittels Spektroskopie veröffentlicht. In dieser Studie konnten zwölf verschiedene Holzarten mittels Fourier-Transform-Nahinfrarot-Spektroskopie (FT-NIR-Spektroskopie) unterschieden werden. Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Studie war, dass es mit dieser Methode eventuell möglich ist, die Herkunft der untersuchten Holzart zu ermitteln. Dieses Ergebnis ist daher so interessant, da hierdurch Hölzer, die aus zertifizierten Beständen stammen oder durch den CITES Anhang III geschützt sind, besser kontrolliert werden könnten. Die Möglichkeit der Ermittlung der Herkunft einer bestimmten Holzart mittels Spektroskopie untersuchten auch Rana et al. (2008). In dieser Studie wurden Buchen (*Fagus sylvatica*) von fünf verschiedenen Standorten mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) untersucht. Die FTIR-Spektren dienten weiterführend als Rohdaten für Hauptkomponenten- und Clusteranalysen. Unter Verwendung dieser Analysen war es möglich, vier der fünf untersuchten Herkünfte zu unterscheiden.

Eine von Pastore et al. (2011) veröffentlichte Studie beschäftigte sich mit dem Einsatz von Nahinfrarot-Spektroskopie (NIR-Spektroskopie) zur Unterstützung des CITES-Vollzugs bei *Swietenia macrophylla*. Dafür wurden neben dem bereits erwähnten *S. macrophylla*, weitere, im Aussehen ähnliche, Vertreter der Meliaceae untersucht. Genauer waren dies *Carapa guianensis*, *Cedrela odorata* und *Micropholis melinoniana*. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben gezeigt, dass mithilfe von NIR-Spektroskopie und multivarianten Analysemethoden basierend auf „partial least squares discriminant analysis“ (PLS-DA), die verwendeten Holzarten eindeutig voneinander unterschieden werden können.

Trotz der erwähnten Erfolge, ist die Chemotaxonomie für eine schnelle und eindeutige Identifizierung von Holzarten eher ungeeignet. Bedingt ist dies dadurch, dass eine zuverlässige und stabile Kalibrierung von chemotaxonomischen Methoden einen komplexen und langwierigen Vorgang darstellt.

### **1.5.2 Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung**

Nachfolgend wird ein Überblick über die molekularbiologischen Methoden zur Holzartenidentifizierung gegeben. Genauer eingegangen wird auf die DNA-Extraktion, die verschiedenen Identifizierungsmethoden sowie auf die unterschiedlichen Markergene.

#### 1.5.2.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA ist für alle in den folgenden Punkten erwähnten molekularbiologischen Identifizierungsmethoden ein essentieller Arbeitsschritt. Es ist zwar einer der ersten Arbeitsschritte, dennoch begründet sich hier der Erfolg der späteren Identifizierung. Ein entscheidender Faktor für den Erfolg einer DNA-Extraktion ist nicht nur die gewählte Methode, sondern auch das zur Verfügung stehende Ausgangsmaterial. Die Verwendung von Materialien wie z.B. Knospen, Früchte, Blätter und junge Äste zur Extraktion der gesamten genomischen DNA ist mittlerweile, unter anderem durch Verwendung von kommerziellen DNA-Extraktionskits, zur Routine geworden (Dumolin et al. 1995; Tsumura et al. 1996; Csaikl et al. 1998; Cannon und Manos 2003; Stefenon et al. 2006; Yu et al. 2008; Finkeldey et al. 2010). Im Vergleich zu den erwähnten Materialien stellen Splint- und Kernholz jedoch ein weitaus größeres Problem dar. Zum einen weisen diese Ausgangsmaterialien einen geringeren Anteil an DNA auf (Tang et al. 2011), zum anderen ist diese DNA oftmals von weitaus schlechterer Qualität. Dies ist unter anderem dadurch bedingt, dass die DNA im lebenden Baum durch verschiedene Prozesse (z.B. Kernholzbildung) und post mortem in kleine Fragmente degradiert (Bar et al. 1988; Lindahl 1993; Deguilloux et al. 2002). Zu der geringen Quantität und Qualität der DNA kommt erschwerend hinzu, dass Holz starke PCR-Inhibitoren, wie z.B. phenolische Komponenten, Polysaccharide und Proteine, aufweist (Demeke und Adams 1992; Lee und Cooper 1995; Pandey et al. 1996). Ein weiterer Aspekt ist, dass die zu untersuchenden Hölzer oftmals schon einem oder mehreren Verarbeitungsprozessen unterlegen haben. Bei diesen Prozessen handelt es sich z.B. um Trocknung, Shreddern und Kochen. Bedingt durch diese Verarbeitungsprozesse wird intakte oder bereits fragmentierte DNA einer ersten bzw. weiteren Degradierung unterzogen (Asif und Cannon 2005; Abe et al. 2011; Tnah et al. 2012). Die erwähnten Schwierigkeiten sind unter anderem der Grund dafür, warum bei der DNA-Extraktion aus Holz oft Methoden zur Anwendung kommen, die auch in der Forensik oder Archäologie wiederzufinden sind (Deguilloux et al. 2002; Gugerli et al. 2005).

In den vergangenen Jahren sind eine Vielzahl von Protokollen zur Extraktion von DNA aus Holz veröffentlicht worden. Die Hauptziele dieser publizierten Methoden sind, eine weitere Degradierung durch den Aufreinigungsprozess zu vermeiden, die gelösten Inhibitoren zu entfernen und eine Kontamination mit Fremd-DNA zu verhindern. Idealerweise liegt am Ende der DNA-Isolierung reine genomische DNA vor.

Eine Studie von de Filippis und Magel aus dem Jahr 1998 beschäftigte sich mit der DNA-Extraktion aus frischem Robinienholz (*Robinia pseudoacacia*). Als Ausgangsmaterial dienten Querschnitte frisch gefällter Stämme. Die Stammscheiben wurden vom Bast bis zur Kernmitte in Zonen eingeteilt und aus diesen die DNA extrahiert. Die DNA-Extraktion erfolgte aus 100 mg Holzmehl, das mit einem 2%igen Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) Puffer sowie Proteinase K (10 mg/ml) versetzt war. Anschließende Analysen des DNA-Gehalts bzw. der Qualität ergaben, dass aus jeder Zone zwar DNA extrahiert werden konnte, diese aber in der Quantität und Qualität vom Bast bis zur Kernmitte stark abnahm. Durchgeführte Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCRs (RAPD-PCRs) waren für alle Zonen erfolgreich.

Eine der ersten Studien bezüglich der erfolgreichen Amplifikation von DNA-Fragmenten aus jungen und relativ alten trockenen Holzstücken veröffentlichten Dumolin-Lapègue et al. (1999). Ihnen war es möglich DNA-Fragmente mit einer Größe von 290 bp zu amplifizieren. Für die Extraktion der DNA aus den Holzproben wurde das DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland verwendet. Zum Einsatz kamen je 400 mg Eichenholzmehl. Über das genaue Alter der Holzproben bzw. der Art des verwendeten Holzgewebes wurden keine Angaben gemacht. Der DNA-Gehalt der erhaltenen Eluate war nur sehr gering, wodurch eine Amplifikation der DNA nur über eine Nested-PCR möglich war.

Auch Deguilloux et al. (2002) untersuchten trockene Eichenholzproben mithilfe des DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kits, jedoch wurden für die DNA-Extraktion hier nur 200 mg Probenmaterial verwendet. Die Autoren ermittelten, ähnlich wie de Filippis und Magel (1998), dass die DNA-Qualität und -Quantität von der Stammaußenseite bis zum Zentrum immer geringer wird. Eine weitere wichtige Aussage dieser Veröffentlichung ist, dass bei der Verwendung von Holz, zur Vermeidung von Kontaminationen mit Fremd-DNA, unter absolut sterilen Bedingungen gearbeitet werden muss.

Mit der Extraktion von DNA aus ehemals unter Wasser liegenden Kiefernstämmen, beschäftigte sich eine Studie von Reynolds und Williams (2004). Sie verwendeten hierfür eine veränderte Version des von Doyle und Doyle (1987) entwickelten CTAB-Protokolls, das für die DNA-Extraktion von frischem Blattmaterial ausgearbeitet wurde. Der dort verwendete 2%ige CTAB-Extraktionspuffer wurde mit 1,5% w/v PVP versetzt. Für die DNA-Extraktion kamen ca. 4 g Holzmehl zum Einsatz, welches mit dem CTAB-Puffer und Proteinase K (20 mg/ml) versetzt wurde. Im Anschluss an die DNA-Extraktion wurde eine stringente elektrophoretische Aufreinigung der DNA nach

White et al. (2000) durchgeführt. Die Anwendung dieses Aufarbeitungsprozesses ermöglichte eine Amplifikation eines ~600 bp großen DNA-Fragments.

Eine Gegenüberstellung der bisher erwähnten DNA-Extraktionsmethoden (DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini und CTAB) wurde durch Asif und Cannon (2005) durchgeführt. Des Weiteren verglichen sie die beiden Methoden mit einer weiteren, der N-Phenacylthiazoliumbromid (PTB) Extraktion. Die PTB-Extraktion wurde bereits erfolgreich in paläontologischen Studien zur DNA-Isolierung aus Knochen (Kelman und Kelman 1999; Gugerli et al. 2005) sowie zur Aufarbeitung von Dung eines ausgestorbenen Faultiers verwendet (Poinar et al. 1998). Das eingesetzte Probenmaterial der Studie von Asif und Canon bestand aus Holzdübeln (*Gonystylus* spec.), Möbelholz (Art unbekannt) und Teilen von herbarisierten Stammscheiben (*Shorea* spec. und *Lithocarpus* spec.). Die DNA-Extraktion erfolgte mit 500 mg Ausgangsmaterial für die CTAB-Extraktion, 100 mg für die DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion und 1000 mg für die PTB-Extraktion (ebenfalls 500 mg bei dem herbarisiertem Material). Asif und Cannon kamen zu dem Ergebnis, dass die DNA-Extrakte, die mit der CTAB- und DNeasy<sup>®</sup>-Methode erhalten wurden, nur geringe DNA-Gehalte (< 15 ng/μl) aufwiesen. Des Weiteren wies die DNA eine schlechte Qualität auf, wodurch keine Amplifikation möglich war. Im Gegensatz hierzu wurde mit der PTB-Extraktion eine höhere Ausbeute erzielt (20-50 ng/μl) und die DNA war von ausreichender Qualität, um eine Amplifikation von 500-800 bp großen Fragmenten zu erzielen. Die niedrige DNA-Ausbeute sowie die nicht zu realisierende DNA-Amplifikation im Anschluss an die CTAB- und die DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion, führen die Autoren, neben Inhibitoren, auf Maillard-Produkte zurück. Ein Nebenprodukt der Maillard-Reaktion von Proteinen und Carbohydraten ist oxidierte DNA (Evershed et al. 1997). Diese oxidierte DNA kann aber für eine spätere Amplifikation nicht genutzt werden. Durch die Verwendung von PTB innerhalb einer DNA-Extraktion können diese Quervernetzungen wieder aufgelöst werden, wodurch die DNA wieder in einer nicht oxidierten Form vorliegt.

Ein abgewandeltes Protokoll zur Isolierung von DNA aus Holz mithilfe des DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kits wurde von Rachmayanti et al. (2006) veröffentlicht. Innerhalb dieser Arbeit wurden 48 trockene Holzproben (ohne Kambium und Bast) von verschiedenen Vertretern der Familie der Dipterocarpaceae verarbeitet. Die DNA-Extraktion erfolgte aus 50-100 mg Holzmehl und verlief weitestgehend nach der Anleitung des Herstellers. Die Modifikation der DNA-Isolierung lag hauptsächlich darin, dass der Lysis-Puffer (AP1) mit PVP (3,1% w/v; 40.000 g/mol) versetzt wurde. Weiterhin wurde die



Inkubationszeit auf 18 h ausgedehnt. Eine weitere Inkubation, nach der Zugabe des Puffers AP2, wurde von 5 auf 15 min verlängert. Am Ende der DNA-Extraktion lag der durchschnittliche DNA-Gehalt bei 2,2 µg per 50-100 mg Holzmehl. Durch die Verwendung der angepassten DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion konnte ein Großteil der untersuchten Proben amplifiziert werden. Die Fragmentgrößen lagen zwischen 100 und 1.100 bp. Die Autoren geben abschließend an, dass diese Modifikation nicht als eine allgemeine Lösung für alle Holzarten anzusehen ist, sie ist lediglich die geeignetste Methode.

2009 veröffentlichten Rachmayanti et al. eine weiterführende Studie bezüglich ihrer DNA-Extraktionsmethode. Sie beschrieben hier den Einfluss verschiedener Faktoren, wie den Prozess-Status des Holzes, der Art des verwendeten Holzgewebes und der Fragmentgröße für die Amplifikation, auf den Extraktions- bzw. PCR-Erfolg. Untersucht wurden 406 Holzproben, von denen 332 aus der Familie der Dipterocarpaceae stammten. Der Rest der Proben verteilte sich hauptsächlich auf die Gattungen *Populus*, *Tectona*, *Pinus* und *Picea*. Die DNA-Extraktion wurde wie bereits bei Rachmayanti et al. (2006) beschrieben durchgeführt, einzig die PVP-Konzentration wurde auf 2,6% (w/v; 40.000 g/mol) gesenkt. Für die PCR-Erfolgsrate wird aus einer Probenanzahl n mit derselben Methode die DNA extrahiert und im Anschluss mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert. Können alle n Proben amplifiziert werden, so ist die PCR-Erfolgsrate 100% bzw. 1. In dieser Studie wurden drei verschiedene Fragmente der plastidären DNA (ptDNA) amplifiziert. Die Länge der Fragmente betrug 150 bp, 600 bp und 1.100 bp. Die Ergebnisse geben wieder, dass der PCR-Erfolg vom äußeren Splint bis zur Kernmitte sinkt. Ein deutlicher Trend zeichnet sich bei den Fragmentgrößen ab. Während die Rate bei den kurzen Stücken kaum abnimmt (von 1 auf 0,88), fällt sie über die mittleren (von 1 auf 0,45) bis zu den großen Fragmenten stark ab (von 0,91 auf 0,1). Bezüglich des Einflusses der verschiedenen Verarbeitungsgrade der Hölzer wird deutlich, dass je stärker ein Holz verarbeitet wurde, desto mehr sinkt die PCR-Erfolgsrate. Besonders ausgeprägt ist dies bei den langen DNA-Fragmenten.

Tang et al. (2011) untersuchten Stammscheiben der Arten *Cunninghamia lanceolata*, *Catalpa bungei* und *Fraxinus chinensis* und nutzten hierfür unter anderem verschiedenste Kombinationen der bisher erwähnten DNA-Extraktionsmethoden. Für die verschiedenen DNA-Extraktionen wurden jeweils 100 mg Holzmehl verwendet. Die Entnahme erfolgte hierbei an vier Stellen (Kambium, Splintholz, äußerer Kern und innerer Kern). Allen DNA-Extraktionen war gemeinsam, dass sie auf der

DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion aufbauten, lediglich der Lysis-Puffer AP1 wurde ersetzt. Nachfolgend werden die fünf verschiedenen Lysis-Verfahren kurz vorgestellt. (1) Das Holzmehl wurde mit 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8 versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Durch das Einweichen des Holzmehls in EDTA werden zum einen die wasserlöslichen Holzkomponenten ausgewaschen (Asif und Cannon 2005) und zum anderen die DNA-Moleküle geschützt (Tang et al. 2011). (2) Das Holzmehl wurde mit 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8 versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss wurden 1,0 ml Natrium-Acetat (50 mM, pH 4,9), das mit 0,2 mg Cellulase von *Trichoderma viride* versetzt war, der Lösung hinzugegeben. Daraufhin wurde das Gemisch für 18 h bei 45°C geschüttelt. (3) Das Holzmehl wurde mit 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8 versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Hierauf wurde dem Gemisch 1,0 ml eines 2%igem CTAB-Puffers hinzugefügt und für 15 min bei 65°C inkubiert. (4) Der EDTA-Suspension wurden 1 ml 0,1 M PTB zugefügt und die Inkubation erfolgte für 18 h bei 65°C. (5) Das Holzmehl wurde mit 0,6 ml 0,1 M PTB versetzt und für 18 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 0,4 ml eines 2%igen CTAB-Puffers zugefügt und für weitere 15 min inkubiert. Im Anschluss an die Lysis wurde jeweils der klare Überstand mit dem AP2-Puffer des DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kits gemischt und die weitere DNA-Extraktion folgte den Herstellerangaben. Die erhaltenen DNA-Eluat wurden zwei weitere Male unter Verwendung des Invisorb<sup>®</sup> Fragment CleanUp Kits (Invitek GmbH, Berlin, Deutschland) aufgereinigt. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Behandlung der Proben mit PTB, die besten Ergebnisse bzgl. des DNA-Gehalts bzw. der DNA-Qualität erbrachte. Die Kombination von PTB und CTAB steigerte die Ausbeute noch einmal um 25%, ohne dabei die Qualität der DNA zu verschlechtern. Bezogen auf das Ausgangsmaterial konnte die größte DNA-Ausbeute bei der Verwendung von Kambium erzielt werden. Neben einem hohen DNA-Gehalt weist das Kambium aber auch einen hohen Gehalt an PCR-Inhibitoren auf (Fladung et al. 2004; Rachmayanti et al. 2009). Einen vergleichbaren Effekt konnten die Autoren der vorliegenden Studie auch für *Cunninghamia lanceolata* beobachten. Die Amplifikation von DNA, die aus Kernholz gewonnen wurde, war nur für jene Lysis-Verfahren möglich, welche PTB beinhalteten. Das äußere Kernholz erwies sich hier als geeigneter als das innere. Aufgrund der Ergebnisse empfehlen die Autoren PTB zur Extraktion von Holz. Des Weiteren sollte die Probenentnahme im Splint oder äußerem Kern erfolgen.

Eine Studie bzgl. der Gegenüberstellung der DNeasy<sup>®</sup>-, der CTAB- und einer

CTAB/PTB-Extraktionsmethode veröffentlichten Tnah et al. (2012). Die DNeasy® Plant Mini Extraktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die CTAB-Extraktion nutzten die Autoren das Protokoll von Murray und Thompson (1980) und veränderten dies in nicht angegebener Weise. Zusätzlich wurde eine Aufreinigung unter Verwendung des High Pure PCR Template Preparation Kits (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Als letztes wurde noch eine Kombination von CTAB und PTB untersucht. Hierfür wurde die CTAB-Extraktion von Murray und Thompson insoweit verändert, als das dem Lysis-Puffer noch 0,1 M PTB zugesetzt wurde. Das Ausgangsmaterial stammte von zwei Stämmen der Art *Neobalanocarpus heimii*, denen Proben aus dem Kambium, dem Splintholz und dem Kernholz entnommen wurden. Die Probennahme erfolgte zwei, vier und sechs Wochen bzw. drei, sechs, neun und zwölf Monate nach dem Fällen. Die Autoren fanden heraus, dass die Effektivität der DNA-Extraktion im Kambium bzw. im Splint am höchsten war. Betrachtet man die verschiedenen Methoden, so ist für das Kambium das DNeasy®-Kit am besten geeignet. Bei der DNA-Extraktion von Splint- oder Kernholz, hat die PTB/CTAB-Methode leichte Vorteile gegenüber der CTAB-Methode. Vergleicht man den DNA-Gehalt verteilt über den Stammradius, so kommen die Autoren auch in dieser Studie zu dem Ergebnis, dass der Gehalt von außen nach innen abnimmt. Bezogen auf den bestmöglichen Zeitpunkt der Probennahme, zeigen die Ergebnisse, dass diese innerhalb der ersten sechs Wochen nach dem Fällen erfolgen sollte (bei natürlicher Trocknung). Danach verringert sich die PCR-Erfolgsrate.

Abschließend wird eine Studie von Jiao et al. (2012) angeführt, in der die Autoren zwei DNA-Extraktionsmethoden miteinander verglichen. Bei der ersten DNA-Extraktionsmethode handelte es sich um die modifizierte DNeasy®-Extraktion von Rachmayanti et al. (2006). Die zweite DNA-Extraktionsmethode bildete eine Modifikation der CTAB-Extraktion nach Murray und Thompson (1980). Die Validierung wurde anhand zweier Stämme von *Cunninghamia lanceolata* durchgeführt. Ergebnis der Studie war, dass mit dem Protokoll von Rachmayanti et al. (2006) eine größere Ausbeute bzw. Reinheit erzielt wird. So zeigte das Qiagen-Kit bei frischem Holz eine 40,9% höhere Ausbeute als die CTAB-Extraktion. Bei getrocknetem Holz war die Ausbeute des Qiagen-Kits sogar um 59% größer. Des Weiteren kamen die Autoren auch hier zu dem Ergebnis, dass die DNA-Quantität bzw. die -Qualität über den Radius des Holzes von außen nach innen abnimmt. Versuche zum Einfluss von Trocknungsprozessen (5 h bei 70°C und danach drei Monate Lagerung bei

Raumtemperatur) ergaben, dass sich der DNA-Gehalt um 50% verringerte.

Betrachtet man die Veröffentlichungen der vergangenen Jahre so wird deutlich, dass noch kein allgemein gültiges DNA-Extraktionsprotokoll für Holz existiert. Zwar gibt es mehrere vielversprechende Ansätze, wie die DNeasy<sup>®</sup>-, CTAB- und PTB-Extraktion, nur ist keines dieser Protokolle für die Anwendung bei jeder Holzart oder jeder Art von Holzgewebe geeignet. Weiterer Entwicklungsbedarf für die DNA-Extraktionsprotokolle besteht auch bei der Verwendung von nicht frischem oder bereits verarbeitetem Holz. Aufgrund dieser Tatsachen wird in der vorliegenden Arbeit die Eignung verschiedener Methoden für die DNA-Extraktion aus CITES-geschützten Holzarten und deren Substitutionshölzern untersucht. Hierfür wird teilweise auf die in diesem Punkt angeführten Protokolle zurückgegriffen und darüber hinaus werden auch eigene Protokolle erarbeitet.

#### 1.5.2.2 DNA-Barcoding

Der Begriff DNA-Barcoding wurde durch eine von Herbert et al. (2003a) veröffentlichte Studie geprägt und beschreibt eine Methode, die der Identifizierung von Arten dient. Das Barcoding nutzt hierzu eine kurze Sequenz bestimmter Markergene oder Markerbereiche, bei denen die Abfolge ihrer Basen analog wie ein Strichcode an der Kasse abgelesen wird. Die ermittelte Abfolge der Basen (A,T,C und G) gibt wiederum Auskunft über die untersuchte Art (BOL 2014). Derzeit befinden sich unterschiedliche Marker in der allgemeinen Anwendung. So wird z.B. für die Identifizierung von Prokaryonten die codierende Region des small subunit (SSU) Gens der ribosomalen RNA (rRNA) genutzt (Barns et al. 1996). Im Tierreich und bei den Algen kommt dagegen ein Teilbereich des mitochondrialen Cytochrom C Oxidase 1 (CO1) Gens zur Anwendung. Es handelt sich hierbei um einen 648 bp langen Abschnitt, mit dem eine hoch effektive Unterscheidung von Arten möglich ist (Hebert et al. 2003b). Bis dato konnte eine Reihe von Studien bzgl. der Verwendung des CO1-Markers zur Identifizierung von Tieren und Algen abgeschlossen werden. Im Einzelnen wurden z.B. Spinnen (Greenstone et al. 2005), Vögel (Hebert et al. 2004), Schmetterlinge (Hajibabaei et al. 2006), Fliegen (Smith et al. 2006), Fische (Ward et al. 2005), Kieselalgen (Evans et al. 2007) und Rotalgen (Robba et al. 2006) mithilfe dieses Markers identifiziert. Eine erfolgreiche Anwendung dieses Markers bis auf Artebene scheint aber nicht bei allen Tierarten gegeben zu sein (Whitworth et al. 2007; Shearer und Coffroth 2008). Für die Identifizierung von Pilzen kommt das DNA-Barcoding

ebenfalls erfolgreich zur Anwendung. Hier wurde hauptsächlich die Internal Transcribed Spacer (ITS) Region der ribosomalen DNA (rDNA) als Markerbereich gewählt (Amicucci et al. 2002; Schmidt und Moreth 2002; Schmidt et al. 2012). Aber auch der CO1-Marker fand bereits Verwendung (Seifert et al. 2007). Im Reich der Pflanzen konnte man sich bisher noch nicht auf einen allgemein gültigen Marker einigen. Eine Verwendung des im Tierreich eingesetzten CO1-Markers ist nicht möglich. Die Gründe hierfür liegen zum einen darin, dass sich die mitochondrialen Gene bei den Pflanzen zu langsam entwickeln und zum anderen, dass in diesem Bereich intramolekulare Rekombinationen zu beobachten sind (Mower et al. 2007). Durch den Ausschluss der mitochondrialen DNA, stehen somit nur noch die ribosomale und die plastidäre DNA für die Suche nach einem Markerbereich zur Verfügung (Kress et al. 2005). Bei der Ermittlung eines neuen Markerbereichs müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden. Die folgenden fünf Aspekte formulierte Hollingsworth et al. (2009) als unabdingbar. (1) Die zu untersuchenden Sequenzen müssen entweder in einem konservierten Bereich liegen oder von solchen flankiert werden. So wird eine routinemäßige Identifikation sichergestellt. (2) Der gewählte Bereich muss eine ausreichende interne Variabilität aufweisen, um eine Unterscheidung von Arten zu ermöglichen. (3) Des Weiteren muss die Sequenz kurz genug sein, um auch eine Amplifizierung von degradiertem Material (siehe Holz) zu ermöglichen. (4) Der Bereich sollte keine Heterozygotie aufweisen, damit eine Identifizierung ohne Klonierung ermöglicht wird. (5) Problematische Sequenzzusammensetzungen, wie Bereiche mit Mikrosatelliten, die die Sequenzqualität reduzieren, sollten ausgeschlossen werden.

Bei der Suche nach einem geeigneten Marker für den Pflanzenbereich behindert in den letzten Jahren ein Dissens den Fortschritt (Pennisi 2007). In der Diskussion stehen die ITS-Region sowie verschiedene codierende und nicht codierende Regionen der ptDNA. Nachfolgend werden daher kurz die ITS-Region der rDNA sowie das Plastom erläutert. Die ITS-Region ist ein Teil der rDNA. Als rDNA werden solche Teile der DNA bezeichnet, die die Gene für die rRNA enthalten. Auf dem Genom befinden sich etwa 30.000 Kopien (Dubouzet und Shinoda 1999) der ITS-Region. Die Größe schwankt für die meisten Organismen zwischen 600 und 3.500 bp. Während der ITS der Angiospermen in der Regel eine Größe von ca. 700 bp aufweist, liegt der ITS der Gymnospermen in einer Spanne von 1.000-3.500 bp (Liston et al. 1996). In eukaryotischen Organismen gibt es zwei Internal Transcribed Spacer, den ITS1 und den

ITS2. Die ITS1-Region wird von den Genen 18S rDNA (kleine Untereinheit) und 5.8S rDNA flankiert. Das 5.8S rDNA Gen flankiert, zusätzlich mit dem 26S rDNA Gen (große Untereinheit), auch die ITS2-Region. Letztendlich wird die ITS-Region durch den ITS1 und den ITS2 sowie dem dazwischenliegenden 5.8S gebildet (Abbildung 2).

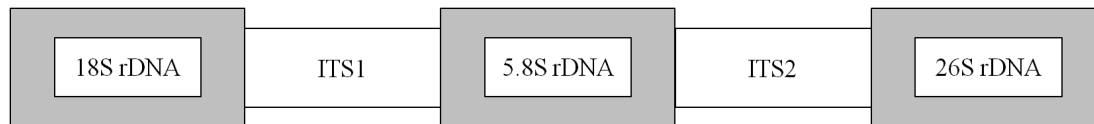


Abbildung 2: Aufbau der Internal Transcribed Spacer Region.

Wie bereits angeführt stehen neben dem ITS-Bereich auch verschiedene Bereiche der ptDNA als Marker zur Identifizierung von Landpflanzen zur Diskussion. Die ptDNA ist doppelsträngig und hat eine ringförmige Struktur. Betrachtet man die Größe des Plastoms, so schwankt sie zwischen 35 kb für *Eimeria tenella*, 156 kb für *Nicotiana tabacum* L. und 204 kb für *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dang.. Bezüglich der Anzahl der Gene auf dem Plastom, wird von 60 bis 264 Stück ausgegangen. Je nach Aufgabe der Plastiden existieren unterschiedliche Typen. Im Genaueren sind dies Proplastiden, Chloroplasten (Gerontoplasten in herbstlichen Blättern), Chromoplasten, Leukoplasten, Amyloplasten, Proteinoplasten, Elaioplasten und Etioplasten (Scharff 2006).

Im weiteren Verlauf dieses Punkts werden verschiedene Studien, die die Verwendung unterschiedlichster DNA-Marker zur Identifizierung von Landpflanzen beinhalten, aufgeführt. Die Darstellung erfolgt in chronologischer Reihenfolge.

Nach der Veröffentlichung von Herbert et al. (2003a), welcher das DNA-Barcoding als eine neue Möglichkeit der Artidentifizierung etablierte, wurde durch Kress et al. (2005) eine der ersten ausführlichen Studien, zur Suche nach geeigneten Barcoding Regionen für das Pflanzenreich, veröffentlicht. Die Autoren schlagen hier zwei Bereiche für die Verwendung als Barcode vor. Beim ersten handelt es sich um den rDNA ITS-Bereich, der nach ihren Aussagen den am häufigsten verwendeten Marker für phylogenetische Untersuchungen an Pflanzen auf Artebene darstellt. Der ITS zeigte hier einen hohen Level an interspezifischen Divergenzen. Der zweite vorgeschlagene Marker ist ein kurzer intergenischer Bereich (~450 bp) zwischen den Genen *trnH* und *psbA*

(*trnH-psbA*) der ptDNA. Für Angiospermen ist dieser Spacer einer der variabelsten Plastidenbereiche. Die Entscheidung für diese beiden Loci fiel aufgrund ausführlicher Untersuchungen. Einer der ersten Schritte war die Überprüfung der vollständigen Plastidengenome von *Nicotiana tabacum* (Virginischer Tabak) und *Atropa belladonna* L. (Schwarze Tollkirsche) auf potenzielle Markerbereiche. Im Anschluss wurden die potenziellen Bereiche des Plastidengenoms (*trnK-rps16*, *trnH-psbA*, *rp136-rps8*, *atpB-rbcL*, *ycf6-psbM*, *trnV-atpE*, *trnC-ycf6*, *psbM-trnD* und *trnL-F*) sowie der ITS-Bereich, anhand von 19 Arten (je zwei bis drei Arten innerhalb von acht Gattungen aufgeteilt auf sieben Familien) innerhalb der Angiospermen auf ihre Eignung als Marker untersucht. Des Weiteren wurde anschließend ein zweites Probenet aus dem Bereich der Angiospermen (83 Arten aus 72 Gattungen bzw. 50 Familien; Plummers Island Flora) anhand der gewählten Marker untersucht. Die Autoren kamen abschließend zu dem Ergebnis, dass die zu Anfang erwähnten Marker (ITS und *trnH-psbA*) das größte Potenzial zur Unterscheidung von Angiospermen bieten. Die Autoren weisen aber auch darauf hin, dass die Verwendung von nur einem Marker für die Identifizierung von Landpflanzen nicht ausreicht. Die Kombination von zwei oder mehr Loci könnte für diese Aufgabe geeigneter sein.

Eine weitere Studie aus dem Jahr 2005 wurde von Chase et al. veröffentlicht. Innerhalb dieser Studie untersuchen die Autoren die These, dass die typischen phylogenetischen Marker für Landpflanzen (wie z.B. *rbcL*, *trnL-F* und *matK*) sich aufgrund ihrer geringen Variationen nicht als Barcoding-Regionen eignen. Hierfür untersuchten sie einerseits den ITS und andererseits das plastidäre Gen *rbcL*. Sie führten ihre Untersuchungen anhand von Sequenzen durch, die in der GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) hinterlegt waren und verglichen diese mithilfe des blastn-Algorithmus. Zum Zeitpunkt der Studie waren für den ITS-Bereich 33.508 und für das *rbcL*-Gen 6.741 Sequenzen verfügbar. Die Auswertung dieses Datenpools erbrachte das Ergebnis, dass sich diese beiden Regionen gut für die Unterscheidung von Pflanzen auf Artniveau eignen. Die Autoren sprechen sich weiterhin dafür aus, dass noch weitere plastidäre Regionen untersucht werden müssen.

Ein Kommentar von Newmaster et al. (2006) beschäftigte sich unter anderem mit der Verwendung des *rbcL*-Gens als Barcoding-Marker. Die Autoren überprüften die Eignung von *rbcL* ebenfalls anhand der Sequenzen der GenBank, nutzten aber anstatt des blastn-Algorithmus eine Pairwise-Distance Analyse. Da das *rbcL*-Gen eine Länge von ~1.428 bp aufweist, wurden für die Analyse nur solche Sequenzen verwendet, für

die eine Mindestlänge von 1.000 bp zu verzeichnen war. Zum Zeitpunkt der Analyse standen den Autoren ungefähr 10.300 Sequenzen zur Verfügung. Im Endergebnis kamen die Autoren zu dem Schluss, dass das *rbcL*-Gen als ein „core“-Locus angesehen werden kann. Es könnte aber trotzdem in einigen Fällen notwendig sein, einen zweiten Marker zu verwenden. Ob bzw. welcher Marker dann Anwendung finden sollte, müsste laut den Autoren von Fall zu Fall entschieden werden.

Eine empirische Studie von Kress und Erickson (2007) ergab, dass die nicht codierende *trnH-psbA* Region, in Kombination mit einem Teilstück des *rbcL*-Gens (*rbcL*-a, 550-600 bp, lokalisiert am 5'-Ende), einen global anwendbaren Pflanzen-Barcode darstellt. Laut Kress und Erickson besitzt diese Kombination die Eigenschaften universell einsetzbar zu sein sowie eine Identifizierung bis auf Artebene zu ermöglichen. Die Autoren erlangten dieses Ergebnis, nachdem sie neun potenzielle Barcoding-Loci untersucht hatten. Sie legten hierbei den Schwerpunkt auf die Möglichkeit der universellen Verarbeitung der Loci sowie auf deren Gehalt an Unterschieden auf Artebene. Die neun Marker (ITS1, *trnH-psbA*, *rbcL*-a, *matK*, *rpoC1*, *ycf5*, *rpoB2*, *ndhJ* und *accD*) wurden anhand von 96 Arten (zwei pro Gattung) aus 43 Familien untersucht. Einzeln verwendet konnten die Loci nur 79% der Artenpaare unterscheiden. Wurde der Locus *trnH-psbA* mit *rbcL*-a, *rpoC1* oder *rpoB2* kombiniert, so stieg der Identifizierungserfolg auf 88%. Weitere *in silico* Studien zeigten, unter Hinzuziehung der GenBank des NCBI, dass die Kombination von *trnH-psbA* mit dem Teilstück des *rbcL*-Gens die größte Auflösungskraft auf Artebene besitzt.

Eine weitere Studie, die die Verwendung eines Multi-Locus Barcodes propagiert, ist von Chase et al. (2007). Nach Untersuchungen der zu diesem Zeitpunkt vorgeschlagenen und diskutierten Marker auf ihre Vor- und Nachteile, kamen die Wissenschaftler zu der Erkenntnis, dass sich zwei Kombinationen von je drei chloroplasten Markern gut für die Identifizierung von Landpflanzen eignen. Diese lauten wie folgt: *rpoC1*, *rpoB* und *matK* oder *rpoC1*, *matK* und *psbA-trnH*.

Sass et al. (2007) untersuchten unter anderem einige der eben erwähnten Marker auf die Anwendbarkeit bei den Palmfarnen (Ordnung Cycadales). Im Einzelnen waren dies die Marker *matK*, *rpoC1*, *rpoB*, *accD*, *ycf5* und *ndhJ*, die zu diesem Zeitpunkt durch die Plant Working Group (PWG) des Consortium for the Barcode of Life (CBOL) als potenzielle Marker für Landpflanzen vorgeschlagen wurden. Zusätzlich kamen noch der *trnH-psbA* Bereich und die ITS-Region zum Einsatz. Im Zuge der Studie nutzten die Autoren auch die bereitgestellten Primersequenzen der PWG (siehe Chase et al. 2007).



Laut den Autoren ermöglichte keiner der untersuchten Marker eine eindeutige Identifizierung der Palmfarne. In drei Fällen (*ndhJ*, *rpoB* und *matK*) war sogar eine Amplifikation mit den allgemeinen Primern der PWG kaum möglich. Die beste Auflösung auf Artebene zeigte die ITS-Region. Leider waren aber aufgrund der Länge des ITS-Bereichs (1.100-1.400 bp) Sequenzierungsschwierigkeiten zu verzeichnen.

Auch Lahaye et al. (2008) verwendeten die bei Sass et al. (2007) beschriebenen Marker. Sie untersuchten die Marker anhand von 1.667 Proben (86 Arten), die Bäume, Büsche und Orchideen repräsentierten. Sie kamen zu dem Schluss, dass sich ein Teilbereich des *matK* aufgrund seiner ausreichenden Variationsrate, der guten Amplifikationsrate sowie der guten Alignmentfähigkeit, sehr gut als Barcode eignet. Genauer handelt es sich hierbei um das 5'-Ende des *matK*, das mit den Primern 390F und 1326R von Cuénoud et al. (2002) amplifiziert wurde. Ein zusätzlicher Test mit dem *matK*-Marker, der anhand von 1.566 Orchideen (1.084 Arten) durchgeführt wurde, ergab, dass dieser Marker ein zuverlässiges Werkzeug für den Einsatz bei CITES gelisteten Orchideen darstellt.

Die Untersuchungen von Newmaster et al. (2008) stellten ebenfalls den *matK* als einen geeigneten Kandidaten für das Barcoding heraus. Innerhalb dieser Arbeit untersuchten die Autoren sieben Regionen (*UPA*, *rpoB*, *rpoC1*, *accD*, *rbcL*, *matK* und *trnH-psbA*) anhand der Gattung *Compsonuera* (Myristicaceae). Ergebnis war, dass sich nur zwei der untersuchten Regionen, *matK* und *trnH-psbA*, für die Identifizierung dieser Gattung eignen. Durch die Kombination dieser beiden Loci wurde ein Identifizierungserfolg von ca. 95% erreicht.

Für eine Multi-Locus Lösung sprechen sich auch Fazekas et al. (2008) aus. Die Autoren untersuchten 251 Proben (92 Arten in 32 Gattungen) aus diversen Familien. Unter Verwendung dieser Proben testeten sie diverse Marker der ptDNA (*rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH* und *psbK-psbI*) sowie einen Marker der rDNA (23S) auf ihre Verwendungsmöglichkeit als Barcode. Einzeln verwendet konnten die Loci max. 59% (*matK*) der Arten identifizieren. Aber auch die verschiedenen Kombinationen brachten keinen absoluten Erfolg. Die Erfolgsraten lagen hier immer (unter Verwendung von zwei bis sieben Markern) bei etwa 70%. Diese Ergebnisse veranlassten die Autoren zu der Aussage, dass es gewisse Limits bei der Artidentifizierung durch DNA-Marker gibt. Die bisher bekannten und zukünftigen Marker müssen daher stärker auf ihre praktische Anwendbarkeit untersucht werden.

Auf eine Veröffentlichung von Ford et al. (2009) wird hier nur kurz eingegangen. Die

Autoren, teilweise Mitglieder in der PWG, untersuchten die bei Sass et al. (2007) erwähnten Marker der PWG und führten an, dass diese kombiniert werden sollten und weitere Untersuchungen dieser Loci empfehlenswert sind. Im gleichen Jahr veröffentlichte die PWG aber eine Untersuchung, in der sie die Kombination von *matK* und *rbcL* als universellen Barcode („core“ Barcode Loci) für Landpflanzen vorschlug (CBOL Plant Working Group et al. 2009). Innerhalb dieser Studie wurden die Loci *atpF-atpH*, *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *psbK-psbI* und *trnH-psbA* anhand von 907 Proben unter anderem auf deren Sequenzqualität und den Identifizierungserfolg untersucht. Die Proben repräsentierten 550 Arten aus den Gymnospermen (38), Angiospermen (445) und Kryptogamen (67). Sowohl kein eigenständiger als auch keine Kombination von Barcodes war in der Lage alle Arten zu identifizieren. Laut der Autoren stellt die Kombination von *matK* und *rbcL* (72% positiver Identifizierungen) eine pragmatische Lösung dar. Die Kombination erfüllt am ehesten folgende Punkte: (1) universell einsetzbar, (2) hohe Sequenzqualität, (3) gute Identifizierungsmöglichkeit und (4) geringe Kosten.

Als Teil der PWG untersuchten Hollingsworth et al. (2009) ebenfalls die Marker *rpoC1*, *rpoB*, *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH* und *psbK-psbI*. Diese Studie wurde anhand der Gattungen *Inga*, *Araucaria* und *Asterella* durchgeführt. Keiner der Marker konnte eigenständig eine zufriedenstellende Unterscheidung der Arten ermöglichen. Zwar zeigte die Verknüpfung mehrerer Marker eine Verbesserung der Ergebnisse, jedoch wurde keine zu bevorzugende Kombination ermittelt. Die besten Ergebnisse zeigten 3-Locus Lösungen, welche aus den Markern *rpoC1*, *rbcL*, *matK* und *trnH-psbA* zusammengestellt wurden. Weiter treffen die Autoren die Aussage, dass die Gattungen *Inga* und *Araucaria* anspruchsvolle Kandidaten für das DNA-Barcoding darstellen.

Eine Studie, die sich mit der praktischen Anwendung von DNA-Barcodes befasste, wurde von Gonzalez et al. (2009) veröffentlicht. Im Rahmen einer umfassenden Bestandsaufnahme aller Bäume auf einer Fläche von zwei Hektar (in Französisch-Guayana), untersuchten die Autoren, ob das DNA-Barcoding dazu beitragen kann, die Geschwindigkeit und die Qualität der Bestandsaufnahme zu erhöhen. Angewendet wurden hier folgende Marker: *rbcL-a*, *rpoC1*, *rpoB*, *matK*, *ycf5*, *trnL*, *psbA-trnH* und der ITS. Als kritisch empfanden die Autoren die Tatsache, dass der ITS (41%) und der *matK*-Bereich (68%) nur geringe Sequenzierungserfolge aufwiesen. Bei der Identifizierung zeigten die Marker der ptDNA nur eine Erfolgsrate von max. 70%, ganz gleich, ob die Marker einzeln oder kombiniert verwendet wurden.

Der ITS wies zwar eine höhere Identifizierungsrate auf, doch lässt der geringe PCR-Erfolg keine abschließende Aussage zu.

Zu einem positiven Ergebnis in Bezug auf die Verwendung des ITS-Bereichs als universellen Marker kommen vier Veröffentlichungen aus dem Jahr 2010 (Chen et al. 2010; Gao et al. 2010; Pang et al. 2010; Yao et al. 2010). Genauer gesagt propagieren die vier Veröffentlichungen den ITS2 als potenziellen Kandidaten für einen universellen DNA-Barcode. Die erste Veröffentlichung von Chen et al. (2010) untersuchte sieben potenzielle Marker (*psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, ITS2 und ITS) anhand von Pflanzen, die für China von medizinischer und dadurch von wirtschaftlicher Bedeutung sind. Hier stellte sich der ITS2 als geeignetster Marker heraus, wobei er nur geringfügig bessere Qualitäten in Bezug auf die PCR-Erfolgsrate und die Fähigkeit Arten zu differenzieren aufwies, als die *trnH-psbA* Region. In einer zweiten Phase dieser Untersuchung wurde der ITS2 anhand von ~6.600 Proben (~4.800 Arten in 753 Gattungen) weiter beurteilt. Die Proben repräsentierten Vertreter der Angiospermen, Gymnospermen, Farne, Moose, Lebermoose, Algen und Pilze. Die Verwendung des ITS2 ermöglichte eine Identifizierung auf Artebene von 92,7%. Insgesamt kamen bei dieser Studie 8.557 Proben aufgeteilt auf 5.905 Arten bzw. 1.010 Gattungen aus 219 Familien zur Anwendung.

Pang et al. (2010) untersuchten in ihrer Studie 1.183 Proben (871 Arten bzw. 66 Gattungen in der Familie der Euphorbiaceae) anhand von vier Markern (*rbcL*, *matK*, ITS und ITS2). Unter Verwendung des ITS bzw. des ITS2 konnten sie mehr als 90% der Proben auf Artebene und 100% der Proben auf Gattungsebene identifizieren. Die Resultate zeigen, dass sich mithilfe des ITS/ITS2 die Vertreter der Euphorbiaceae erfolgreich identifizieren lassen. Auf der Studie von Chen et al. (2010) aufbauend, veröffentlichten Gao et al. (2010) Ergebnisse bezüglich der Verwendung des ITS2 zur Identifizierung von Fabaceae. Hierzu erarbeiteten sie Sequenzen von 114 Proben und kombinierten diese mit Sequenzen von Fabaceae aus der GenBank des NCBI. So standen insgesamt 1.507 Sequenzen von 1.126 Arten und 196 Gattungen aus allen drei Unterfamilien zur Verfügung. Anhand der Sequenzanalysen war es möglich, 100% der Gattungen und 80% der Arten voneinander zu unterscheiden. Aufgrund dieser Ergebnisse schlugen die Autoren den ITS2 als einen Barcode für die Fabaceae vor. Die Studie von Yao et al. (2010) baut ebenfalls auf den Resultaten von Chen et al. (2010) auf. Die Autoren untersuchten hier das Potenzial des ITS2-Bereichs als universellen Marker und nutzten ebenfalls Sequenzen der GenBank des NCBI. Genauer waren dies

50.790 Sequenzen aus dem Pflanzenreich und 12.221 Sequenzen aus dem Tierreich. Die Untersuchung der ITS2-Sequenzen ergab, dass die interspezifischen Unterschiede sowohl im Pflanzen-, als auch im Tierreich die intraspezifischen Unterschiede übertreffen. Die Auflösungsrate auf Artebene lag für die Dicotyledonen bei 76,1%, die Monocotyledonen bei 74,2%, die Gymnospermen bei 67,1%, die Farne bei 88,1%, die Moose bei 77,4% und die Tiere bei 91,7%. In Bezug auf die Ergebnisse schlugen die Autoren den ITS2 als zusätzlichen Marker für das Tierreich vor. Im Pflanzenreich sollte der ITS2 als universeller Barcode verwendet werden.

Ebenfalls im Jahr 2010 wurde durch Roy et al. (2010) eine Studie veröffentlicht, in der die Marker *rbcL* und *matK*, die durch die PWG als universelle Marker vorgeschlagen wurden, als kritisch angesehen werden. Auch die *trnH-psbA* Region sowie die ITS-Region werden als Marker mit geringfügigen Schwierigkeiten betrachtet, da sie nicht in der Lage waren, alle untersuchten Arten voneinander zu differenzieren. Die eben beschriebenen Marker wurden anhand der Gattungen *Berberis* (166 Proben aufgeteilt auf 16 Arten), *Ficus* (33 Proben aufgeteilt auf 11 Arten) und *Gossypium* (51 Proben aufgeteilt auf vier Arten) auf ihre Auflösungsrate untersucht. Keiner der Marker, alleine oder kombiniert, war geeignet, die Arten der Gattung *Berberis* zu differenzieren. Dagegen konnten die untersuchten Arten der Gattungen *Ficus* und *Gossypium* zu 100% mittels der ITS-Sequenzen unterschieden werden (*trnH-psbA*: *Ficus* = 82%). Die Loci *matK* und *rbcL* wiesen die geringste Eignung zur Differenzierung der Arten der drei Gattungen auf. Die Autoren sehen zwar großes Potenzial in den Markern *trnH-psbA* und ITS, aber sie verdeutlichen auch, dass es schwierig wird, einen universellen Barcode für alle Landpflanzen zu finden.

Neben der Identifizierung von neuen Arten, kann das Barcoding auch für den Schutz von gefährdeten Arten eingesetzt werden. Bezüglich dieses konkreten Einsatzes des Barcodings veröffentlichte Müllner et al. (2011) eine Untersuchung zur Identifizierung verschiedener Arten der Meliaceae. Sie konzentrierten sich hierbei auf die teilweise stark gefährdeten Baumarten der Gattungen *Cedrela* und *Toona*. In ihrer Studie ermittelten die Autoren unter anderem, welcher der untersuchten Marker (*rpoC1*, *rpoB*, *accD*, *psbB*, *psbN*, *psbT*, *trnS-trnG* und ITS) das größte Potenzial besitzt, den CITES-Vollzug zu unterstützen. Sie kamen zu dem Schluss, dass sich für die Familie der Meliaceae der ITS-Bereich am besten eignet, da die Marker der cpDNA in diesem Fall nur eine geringe Auflösungsrate zeigten. Die Kombination von verschiedenen Markern erbrachte keine wesentliche Verbesserung der Ergebnisse.

Die durchweg positiven Ergebnisse des ITS-Bereichs wurden auch durch eine Studie der China Plant BOL Group et al. (2011) bestätigt. Durch die Untersuchung von 6.286 Samenpflanzen (1.757 Arten bzw. 141 Gattungen in 75 Familien) unter Einsatz der „core“ Barcode Loci *matK* und *rbcL* (CBOL Plant Working Group et al. 2009) sowie den Markern *trnH-psbA* und ITS, kommen die Autoren zu dem Schluss, dass der ITS-Bereich als zusätzlicher „core“ Barcode Locus für Samenpflanzen aufgenommen werden sollte.

Der Einsatz des ITS-Bereichs bzw. der ITS2-Region als zusätzlicher oder sogar alleinstehender „core“ Barcode Loci wurde ebenfalls durch Ergebnisse von Li et al. (2012), Pang et al. (2012) und Zhang et al. (2012) unterstützt. Li et al. (2012) bearbeiteten die Gattung *Ficus* (228 Proben verteilt auf 63 Arten) mithilfe der Marker *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH* und ITS und urteilten, dass der ITS-Bereich sich hier als alleinstehender Marker am besten für die Identifizierung eignet. Die Marker *matK*, *rbcL* und *atpF-atpH* eignen sich dagegen nicht für die Anwendung in der Gattung *Ficus*.

Die Verwendung von DNA-Markern zur Identifizierung von Nacktsamern untersuchte eine Studie von Pang et al. (2012). Im Zuge der Untersuchungen beurteilten die Autoren verschiedene Marker (*psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, ITS und ITS2) anhand der PCR-Erfolgsrate, der Divergenz zwischen intraspezifischen sowie interspezifischen Unterschieden und ihrer Auflösungsrate auf Artebene. In einer zweiten Phase wurden 1.531 Sequenzen der GenBank (608 Arten bzw. 80 Gattungen) mithilfe der Marker *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, ITS und ITS2 untersucht. In beiden Phasen der Untersuchung stellte sich der ITS2-Bereich als geeignetster Marker für Nacktsamer heraus.

Untersuchungen zu nah verwandten Arten wurden von Zhang et al. (2012) durchgeführt. Diese Studie wurde als wichtig erachtet, da bekannt ist, dass *rbcL* und *matK* nicht stark genug sind, um eng verwandte Arten aufzulösen. Für die Untersuchungen wählten die Autoren die Gattung *Lysimachia* (Myrsinaceae). Neben den Markern *matK* und *rbcL* kamen noch die *trnH-psbA* Region und der ITS zur Anwendung. Die Beurteilung der Marker fand anhand von 97 Individuen bzw. 37 Arten statt. Die Ergebnisse bestätigten eine nicht ausreichende Auflösung bei Verwendung der „core“ Barcode loci (*matK* und *rbcL*). Auch eine Kombination mit der *trnH-psbA* Region brachte keine verbesserten Resultate. Im Gegensatz dazu zeigte der ITS eine hohe Auflösungsrate auf Artebene. Dies war sowohl bei der eigenständigen Verwendung gegeben, als auch bei der Kombination mit *rbcL* und/oder *matK*. Auch in

dieser Studie empfehlen die Autoren, den ITS als „core“ Barcode Locus zu nutzen. Die Verwendung des ITS-Bereichs als einen eigenständigen oder zusätzlichen Marker schlagen ebenfalls Aubriot et al. (2013) und Tripathi et al. (2013) vor. Aubriot et al. (2013) untersuchten, anhand der Gattung *Euphorbia* (CITES Anhang I und II), verschiedene Marker auf deren Potenzial zur Unterstützung des CITES-Vollzugs. Bei den Markern handelte es sich um die „core“ Barcode Loci *matK* und *rbcL* sowie um den *trnH-psbA* Bereich und die ITS-Region. Die Loci wurden anhand von 148 Proben verteilt auf 41 Arten überprüft. Unter Nutzung der „core“ Barcode Loci, einzeln oder in Kombination, konnte nur eine Auflösung von 40-60% erreicht werden. Wurde jedoch der ITS verwendet (eigenständig oder in Kombination mit den „core“ Barcode Loci), konnte der Erfolg der Identifizierung auf nahezu 100% gesteigert werden. Der Einsatz von *trnH-psbA*, wieder einzeln oder kombiniert mit den „core“ Barcode Loci, erzielte zwischen 80 und 85%. Die Anwendung aller Marker zeigte eine Auflösung von 96-98%. In Anbetracht dieser Ergebnisse, beurteilen die Autoren die ITS-Region als einen zuverlässigen Barcode in der Gattung *Euphorbia*. Weiter stellt die Nutzung der ITS-Region ein hilfreiches Werkzeug bei der Unterstützung des CITES-Vollzugs dar. Den Einsatz der ITS-Region bei den tropischen Baumarten Indiens überprüften Tripathi et al. (2013). Insgesamt bewerteten sie fünf Marker (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, ITS und ITS2) anhand von 300 Proben, die 149 Arten bzw. 82 Gattungen aus 38 Familien repräsentieren. In Bezug auf die PCR-Erfolgsrate und den Sequenzierungserfolg zeigte der *rbcL* Locus, gefolgt vom ITS und der *trnH-psbA* Region, die höchsten Werte. Betrachtet man dagegen die Fähigkeit Arten zu differenzieren, so sind die Marker ITS und *trnH-psbA* klar den anderen vorzuziehen. Die Auflösungsrate von 60-70% stellt zwar keinen absoluten Erfolg für die Ermittlung eines potenziellen Barcodes dar, doch vergleicht man dieses Ergebnis mit vorherigen Studien, so stellen die beiden Loci eine gute Möglichkeit für die Identifizierung von tropischen Baumarten dar.

Die Veröffentlichungen der letzten Jahre zeigen deutlich, dass man sich bis zum heutigen Zeitpunkt nicht auf einen universellen Marker einigen konnte. Die vielversprechendsten Marker scheinen *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA* und die ITS-Region zu sein. Welcher eigenständige Marker oder welche Kombination verwendet werden soll, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Weiterhin ist fraglich, ob überhaupt ein universeller Marker bzw. eine universelle Markerkombination für alle Pflanzen gefunden werden kann.

In der vorliegenden Arbeit kommt die ITS-Region für die Identifizierung von

CITES-geschützten Holzarten und deren Substitutionshölzern zur Anwendung. Wie bereits angeführt, konnte mithilfe dieses Markers eine Vielzahl von Landpflanzen eindeutig identifiziert werden. Bis dato stehen für CITES-geschützte Hölzer jedoch nur wenige Sequenzinformationen des ITS-Bereichs zur Verfügung. Durch die Erarbeitung der benötigten Informationen kann diese Lücke geschlossen werden.

#### 1.5.2.3 Verwendung von art- und gattungsspezifischen Primern für die Identifizierung

Eine Methode, die auf dem DNA-Barcoding aufbaut, ist die Identifizierung unter Einsatz von spezifischen Primern. Primer sind Oligonukleotidsequenzen (18-24 bp), die bei einer PCR den Startpunkt für die DNA-Polymerase bilden. Für die Entwicklung von spezifischen Oligonukleotiden benötigt man die Informationen des DNA-Barcodings. In den DNA-Barcodingbereichen liegt die benötigte Sequenzinformation zur Identifizierung verschiedener Individuen, Arten, Gattungen, Familien etc. vor. Anhand dieser Sequenzinformationen können DNA-Abschnitte ermittelt werden, die für eine Art oder Gattung charakteristisch sind. Innerhalb der gewählten Bereiche werden daraufhin spezifische Primer erstellt, die die Identifizierung der Art oder Gattung ermöglichen. Durch die Verwendung solcher spezifischen Oligonukleotidsequenzen können z.B. Hölzer unbekannter Art bestimmt werden, ohne deren Markersequenz auslesen zu müssen.

Diese Art der Identifizierung findet im Bereich der Pilze bereits eine breite Anwendung. So wurden z.B. von Moreth und Schmidt (2000) spezifische Primer für die Identifizierung von Hausfäulepilzen veröffentlicht (*Serpula lacrymans*, *Serpula himantoides*, *Coniophora puteana*, *Donkioporia expansa*, *Antrodia vaillantii*, *Tyromyces placenta* und *Gloeophyllum sepiarium*). Als Marker für die Bereitstellung der Oligonukleotidsequenzen diente in diesem Fall der ITS-Bereich. Takamatsu und Kano (2001) verwendeten für diverse Mehltauarten ebenfalls den ITS-Bereich zur Ermittlung spezifischer Primer. Im Jahr 2005 zeigten Kendall und Rygiewicz, dass es durch den Einsatz von Primern im ITS-Bereich ebenfalls möglich ist, Pflanzen und Pilze zu unterscheiden. Für die Pilze wird abschließend noch eine Studie von Horisawa et al. (2009) erwähnt, die mit spezifischen Primern im ITS-Bereich verschiedene Holzfäulepilze wie *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes versicolor*, *Coniophora puteana* und *Serpula lacrymans* bestimmten.

Im Tierreich diente der ITS-Bereich ebenfalls als Basis zur Entwicklung von spezifischen Primern. Besonders muss hier eine Studie Erwähnung finden, in der

spezifische Primer für die Unterstützung des CITES-Vollzugs veröffentlicht wurden. Es handelt sich hierbei um eine Untersuchung zum Schutz des Riesenhais von Magnussen et al. (2007), in der der ITS2 für die Ermittlung von spezifischen Oligonukleotidsequenzen eingesetzt wurde.

Schließlich ist ein Beispiel aus dem Bereich der Landpflanzen zu nennen. Die von Wallinger et al. (2012) veröffentlichte Studie nutzte im Gegensatz zu den bisher angeführten Studien nicht den ITS-Bereich als Marker, sondern verwendete die *trnT-F* Region der ptDNA. Dieser Marker ermöglichte den Autoren, spezifische Primer zu erarbeiten, mit denen es möglich ist, zwei Familien (Poaceae und Apiaceae), zwei Gattungen (*Trifolium* und *Plantago*) und neun Arten (*Achillea millefolium*, *Fagopyrum esculentum*, *Lolium perenne*, *Lupinus angustifolius*, *Phaseolus coccineus*, *Sinapis alba*, *Taraxacum officinale*, *Triticum aestivum* und *Zea mays*) zu identifizieren.

Die angeführten Studien zeigen deutlich, dass die Verwendung von spezifischen Primern eine sichere Methode zur Bestimmung verschiedenster Arten darstellt. Aufbauend auf den eigenen ITS-Sequenzen und den Sequenzen der GenBank des NCBI werden in dieser Arbeit art- und gattungsspezifische Primer entwickelt, die es ermöglichen, den CITES-Vollzug durch schnelle und korrekte Identifizierung zu unterstützen. Bei der Entwicklung der Primer liegt das Hauptaugenmerk auf Hölzern, die für den Handel von gesteigertem Interesse sind. Auszugsweise ist hier die Mahagonigruppe, die sich aus den Gattungen *Swietenia*, *Entandrophragma*, *Khaya* und *Carapa* aufbaut, zu nennen (Tabelle 5).

#### 1.5.2.4 Identifizierung der Herkunft

Für die Unterstützung des CITES-Vollzugs spielt in einigen Fällen neben der Identifizierung der Art eines Individuums auch dessen Herkunft eine wichtige Rolle. So muss für alle Vertreter des CITES Anhangs III nicht nur die Art, sondern auch deren Herkunft ermittelt werden. Vor der Betrachtung der molekularbiologischen Methoden zur Herkunftsbestimmung, wird kurz auf die Stabilisotopen-Methode eingegangen. Bei dieser Methode wird die Tatsache ausgenutzt, dass die stabilen Isotope wie Sauerstoff, Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel regional sowie lokal eine unterschiedliche Verteilung aufweisen. Da die stabilen Isotope der angeführten Elemente über die Luft, das Wasser und den Boden in den Nahrungs- bzw. Stoffkreislauf gelangen, ergeben sich in Pflanzen und Lebewesen, je nach geographischer und geologischer Situation, unterschiedliche Stabilisotopen-



häufigkeitsverhältnisse mit regional typischen Isotopensignaturen. Diese Isotopensignaturen („Isotopic Fingerprint“) können unter anderem zur Herkunftsidentifizierung herangezogen werden. Neben der häufigen Verwendung der Stabilisotopen-Methode im Lebens- und Futtermittelbereich, kommt der „Isotopic Fingerprint“ auch für Hölzer zum Einsatz (Agroisolab 2014).

Erste Resultate zur Anwendung der Stabilisotopen-Methode bei Holz wurden 2008 veröffentlicht (Förstel et al. 2008a; Förstel et al. 2008b). Hierauf aufbauend, kam es zur Durchführung einer weiteren Studie, deren Ergebnisse im Jahr 2011 veröffentlicht wurden (Förstel et al. 2011). Die Resultate der Untersuchungen aus 2008 und 2011 zeigen deutlich, dass die Stabilisotopen-Methode auch bei Holz eine Aussage über dessen Herkunft zulässt.

Die Informationen dieses Absatzes stammen aus Lowe und Cross (2011). Betrachtet man die molekularbiologischen Methoden, so verdeutlicht sich, dass das DNA-Barcoding derzeit in erster Linie für die Identifizierung angewendet wird. Steht aber die Ermittlung der Herkunft einer Probe im Mittelpunkt, sind derzeit andere Methoden vorzuziehen. Eine der wichtigsten Methoden ist in diesem Zusammenhang das DNA-Fingerprinting (auch genetischer Fingerabdruck genannt). Mittels DNA-Fingerprinting können einzelne Individuen einer Population zweifelsfrei voneinander unterschieden werden, wodurch ein Baum über die gesamte Wertschöpfungskette verfolgt werden kann. Neben der Beurteilung einzelner Individuen findet das DNA-Fingerprinting auch in der Populationsgenetik Anwendung und ermöglicht hier die Unterscheidung verschiedener Populationen. Zusätzlich zur Unterscheidung von verschiedenen Individuen und Populationen wird das Fingerprinting auch in der Phylogeographie angewendet. Es gewährleistet in diesem Zusammenhang die Differenzierung von Individuen unterschiedlicher Regionen, die durch eine biogeographische Barriere getrennt sind. Die verwendeten Techniken innerhalb des Fingerprintings sind z.B. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), Mikrosatelliten, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) und RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Nachstehend werden noch einige Studien erwähnt, bei denen die Identifizierung der Herkunft einen Kernpunkt der Arbeit darstellte. Mit dem Einsatz des DNA-Fingerprintings zur Rückverfolgung einzelner Stämme bis zu deren Ursprung beschäftigten sich unter anderem zwei Studien. Eine der Studien untersuchte *Intsia palembanica* aus Peninsular Malaysia und verwendete hierfür Mikrosatelliten (Lowe et

al. 2010b). Die weitere Studie nutzte „Direct Amplification of Length Polymorphism“ (DALP) Analysen um DNA-Fingerprints für *Gonystylus bancanus* aus Indonesien zu erarbeiten (Fatma et al. 2011). Um die übergreifende Anwendung des DNA-Fingerprintings zu verdeutlichen, wird die folgende Studie von Jolivet und Degen (2010) angeführt. Die Autoren veröffentlichten in dieser Studie ihre Ergebnisse zur Erarbeitung von DNA-Fingerprints (über Mikrostalliten) für *Entandrophragma cylindricum*, um hierüber eine Zuordnung auf Forst-Konzessionen-Ebene zu ermöglichen. Als Studien aus der Phylogeographie sind die Unterscheidung von *Cedrela odorata* in der Neotropis (Cavers et al. 2013), von *Swietenia macrophylla* aus Zentral Amerika und Amazonien (Lemes et al. 2010), von *Pterocarpus officinalis* in der Karibik (Rivera-Ocasio et al. 2002) und von *Irvingia gabonensis* aus Kamerun, Nigeria und Gabun (Lowe et al. 2010a) zu nennen.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Identifizierung einer zu untersuchenden Probe. Die Ermittlung der Herkunft ist nicht Inhalt der Arbeit. So wird der hier zu entwickelnde Schnelltest, nur Informationen über die Art einer vorliegenden Probe bereitstellen und keine Aussagen über deren Herkunft treffen.

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung spezifischer DNA-Markersysteme zur Schnellbestimmung von CITES-geschützten Baumarten und deren Substitutionshölzern. Für die Bereitstellung eines solchen Schnelltests, müssen im Vorfeld verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden, die sich in vier Aufgabengebieten zusammenfassen lassen:

- Das erste Aufgabengebiet beinhaltet die Entwicklung eines geeigneten Protokolls zur Extraktion von DNA aus Holz.
- Neben der Entwicklung eines DNA-Extraktionssystems muss eine interne rDNA ITS-Sequenzdatenbank aufgebaut werden. Diese Datenbank wird sowohl Sequenzen von CITES-geschützten Baumarten enthalten, als auch Informationen der entsprechenden Substitutionshölzer aufweisen.
- Aufbauend auf der internen Sequenzdatenbank und den Sequenzinformationen der GenBank des NCBI werden sogenannte spezifische Primer entwickelt. Diese Oligonukleotide sollen die Identifizierung unbekannter Hölzer ermöglichen, ohne dass eine Auswertung der Sequenzinformationen von Nöten ist.
- Abschließend werden Validierungen der entwickelten Schnellbestimmungsmethode anhand von Blindtests durchgeführt.

Mithilfe des in dieser Arbeit entwickelten Schnelltests soll eine weitere Möglichkeit geschaffen werden, den CITES-Vollzug und somit den Schutz gefährdeter Baumarten zu unterstützen.

---

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sowie deren Hersteller angegeben.

Tabelle 2: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Explorer, Ohaus, USA
Autoklav	Varioklav T25, Thermo Scientific, Waltham USA
Gelelektrophoresekammer	i-MUPID Mini Gel, COSMO BIO Co., Ltd., Tokyo, Japan
Geldokumentation	Gel Dokumentations System mit Universal-Haube II, BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Rotationsschüttler mit Inkubationshaube	SM 30 control, Inkubationshaube TH 30, Bühler Technologies GmbH, Ratingen
Kolbenhubpipetten (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Eppendorf Research <sup>®</sup> , Eppendorf AG, Hamburg
Kühl/Gefrierkombination	Bosch, Gerlingen
Mikrowellengerät	Panasonic, Hamburg
pH-Meter	Five Easy FE20, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Prefilter	Prefilter, Analytik Jena, Jena
Reinstwasseranlage	Barnstead <sup>™</sup> Nanopure <sup>™</sup> , Thermo Scientific, Waltham USA
Spektralphotometer	NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Waltham USA
Sterilfilter	Rotilabo <sup>®</sup> Spritzenfilter 0,22 µm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Thermocycler	TGradient und TPersonal Thermoblock, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Thermoschüttler	Heating Block Thermostat, HLC Biotech, Bovenden
Tiefkühlagerschrank (-80°C)	HFU 486, Heraeus, Hanau
Rotations-Vakuumkonzentrator	Concentrator Plus, Eppendorf AG, Hamburg
Vortexmischer	MS2 Minishaker, IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Zentrifugen	Biofuge Fresco, Heraeus, Kendro Laboratories, Langenselbold; Sorvall™ Stratos™, Thermo Scientific, Waltham, USA
-------------	---

### 2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3 gibt die benötigten Chemikalien sowie deren genauere Spezifikation und Hersteller wieder.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Agar	Oxoid Agar No.1, Thermo Scientific, Waltham USA
Agarose	Agarose Serva research grade, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin	Ampicillin Natriumsalz $\geq 99\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Bromphenolblau, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloroform	Rotipuran® Chloroform $\geq 99\%$ p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
CTAB	CTAB $\geq 98\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DNA-Fragmentmarker	GelPilot 100 bp Plus Ladder, Qiagen, Hilden
	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Waltham, USA
	Invitrogen 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Waltham, USA
DTT	DTT $\geq 99\%$ p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EDTA	EDTA analytical grade, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure	Essigsäure 100%, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Rotipuran® Ethanol $\geq 99,5\%$ p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid $\geq 98\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycerin	Glycerin 85%, Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt	Oxoid Yeast Extract, Thermo Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	Rotipuran® Isopropanol $\geq 99,8\%$ p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kanamycin	Kanamycinsulfat $\geq 750$ I.U./mg, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumacetat	Natriumacetat wasserfrei reinst., Merck KGaA, Darmstadt

Natriumchlorid	NaCl krist. reinst., Merck KGaA, Darmstadt
Proteinase K	Proteinase K lyophilisiert, $\geq 30$ mAnson U/mg, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PTB	PTB, Prime Organics, Woburn, USA
PVP	PVP K25, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Salzsäure	Rotipuran <sup>®</sup> Salzsäure $\geq 32\%$ p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS	SDS $\geq 98,5\%$ , Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
TRIS	TRIS Pufferan <sup>®</sup> $\geq 99,9\%$ p.a, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypton	Oxois Trypton, Thermo Scientific, Waltham, USA
X-Gal	X-Gal $\geq 99\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### 2.1.3 Verwendete Kits

Die in dieser Arbeit eingesetzten Kits zur Extraktion, Amplifizierung und Aufreinigung der DNA sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: Verwendete Kits.

Name	Hersteller
DNeasy <sup>®</sup> <i>mericon</i> <sup>TM</sup> Food Kit	Qiagen, Hilden
DNeasy <sup>®</sup> Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
innuSPEED Plant DNA Kit	Analytik Jena, Jena
innuSPEED Soil DNA Kit	Analytik Jena, Jena
innuSPEED Stool Kit	Analytik Jena, Jena
Invisorb <sup>®</sup> DNA CleanUp Kit	Stratec, Berlin
KAPA2G <sup>TM</sup> Robust Hot Start PCR Kit	Kapa Biosystems, Boston, USA
Nucleon <sup>TM</sup> PhytoPure <sup>TM</sup> Genomic DNA Extraktion Kit	GE Healthcare, Freiburg
NucleoSpin <sup>®</sup> Soil Kit	Machery-Nagel, Düren
PCR Cloning <sup>plus</sup> Kit	Qiagen, Hilden
peqGOLD Plant Mini Kit	Peqlab, Erlangen
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden

#### 2.1.4 Probenmaterial

Für die Entwicklung eines Schnelltests zur sicheren Identifizierung der derzeit marktrelevantesten CITES-Hölzer und deren Austauscharten, lag das Hauptaugenmerk auf Hölzern, die sich in ihrer Textur ähneln. Auf der CITES-Seite lag der Fokus auf insgesamt 18 Holzarten, denen 29 Holzarten auf der Seite der Austauschhölzer gegenüberstanden (Tabelle 5). Es wurde besonderer Wert darauf gelegt, dass die entsprechenden Hölzer nur sehr schwer bis gar nicht mit den traditionellen Methoden zu unterscheiden sind. Diese Ähnlichkeiten treten sowohl zwischen CITES-geschützten Hölzern, als auch zwischen CITES-Holz und Austauschholz auf. So ist es z.B. mit den traditionellen Methoden nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, welche Art der Gattung *Swietenia* (CITES Anhang II) zur Untersuchung vorliegt. Als schwer abzugrenzende Austauschhölzer der Gattung *Swietenia* sind *Carapa guianensis*, *Khaya ivorensis* und *Entandrophragma angolense* anzuführen. Eine weitere Gruppe ist die Ramingruppe. Hier stehen den Vertretern der CITES-geschützten Gattung *Gonystylus* (Anhang II), die schwer abzugrenzenden Arten *Pterygota bequaertii*, *Terminalia superba*, *Endospermum moluccanum* und *Neolamarckia cadamba* (Tabelle 5) gegenüber.

Im Laufe der Untersuchungen stand nicht für alle der in Tabelle 5 aufgeführten Holzarten entsprechendes Material zur Verfügung. So konnte bis zum Abschluss der Untersuchungen z.B. kein Material für die Gattung *Dipteryx* verarbeitet werden. Weiter wurden in dieser Arbeit Arten untersucht, die nicht in Tabelle 5 aufgeführt sind. Es handelte sich hierbei um Arten, der in Tabelle 5 aufgezeigten Gattungen. Die nicht aufgeführten Arten kamen zur Anwendung, um im späteren Verlauf art- oder gattungsspezifische Primer zu erstellen. Eine Auflistung sowie eine Erläuterung des verwendeten Materials ist in Tabelle 6 des Punkts 2.1.4.1 wiedergegeben.



Tabelle 5: Aufstellung der zu untersuchenden Holzarten. Auf der linken Seite sind die CITES-geschützten Hölzer inkl. des Grads ihrer Schutzbedürftigkeit aufgeführt. Rechts sind die entsprechenden Austauschhölzer wiedergegeben. \* = Die gesamte *Dalbergia*-Population Madagaskars ist derzeit durch CITES-Anhang II geschützt.

<b>CITES-Holz</b>		<b>Austauschhölzer</b>
Art	Anhang	Art
<i>Caesalpinia echinata</i>	II	<i>Myrocarpus frondosus</i> <i>Caesalpinia ferrea</i> <i>Hymenolobium elatum</i>
<i>Caryocar costaricense</i>	II	<i>Caryocar brasiliense</i> <i>Caryocar glabrum</i>
<i>Cedrela odorata</i> <i>Cedrela fissilis</i>	III	<i>Toona sureni</i> <i>Tectona grandis</i>
<i>Dalbergia nigra</i> *	I	<i>Dalbergia spruceana</i> * <i>Dalbergia latifolia</i> * <i>Machaerium scleroxylon</i>
<i>Dalbergia retusa</i> * <i>Dalbergia stevensonii</i> *	II	<i>Dalbergia maritima</i> * <i>Dalbergia spruceana</i> * <i>Dalbergia sissoo</i> * <i>Dalbergia latifolia</i> *
<i>Dipteryx panamensis</i>	III	<i>Dipteryx odorata</i> <i>Bowdichia nitida</i>
<i>Gonystylus bancanus</i> <i>Gonystylus macrophyllus</i>	II	<i>Pterygota bequaertii</i> <i>Terminalia superba</i> <i>Endospermum moluccanum</i> <i>Neolamarckia cadamba</i>
<i>Guaiacum officinale</i> <i>Guaiacum sanctum</i>	II	<i>Bulnesia arborea</i> <i>Handroanthus spp.</i>
<i>Intsia bijuga</i> <i>Intsia palembanica</i>	Antrag gestellt	<i>Azelia bipendensis</i> <i>Hymenaea courbaril</i>
<i>Pterocarpus santalinus</i>	II	<i>Pterocarpus indicus</i> <i>Pterocarpus soyauxii</i>
<i>Swietenia humilis</i> <i>Swietenia macrophylla</i> <i>Swietenia mahagoni</i>	II	<i>Carapa guianensis</i> <i>Khaya ivorensis</i> <i>Entandrophragma angolense</i>

#### 2.1.4.1 Pflanzenmaterial für den Aufbau der rDNA ITS-Sequenzdatenbank

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen lagen in der GenBank des NCBI nicht ausreichend ITS-Sequenzinformationen der zu bearbeiteten Holzarten vor. Aus diesem Grund war der Aufbau einer internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank erforderlich. Bei dem verwendeten Untersuchungsmaterial handelte es sich um frisches Blattmaterial (B), frisches Astmaterial (A) oder DNA (D). In wenigen Fällen wurde auch Splintholz (S)

verwendet. Dieses kam aber nur eingeschränkt zur Anwendung, da die Qualität und Quantität der in diesem Material enthaltenen DNA nicht ausreichend ist. Auf die Verwendung von Kernholz wurde verzichtet. Während das Ast- und Blattmaterial von nationalen und internationalen Botanischen Gärten zur Verfügung gestellt wurde, gewährten verschiedene Forschungseinrichtungen den Zugriff auf DNA-Eluate. Des Weiteren ermöglichte die Unterstützung verschiedener Sammlungen sowie holzverarbeitender Unternehmen die Untersuchung von Splintholz. Für alle verwendeten Individuen ist in Tabelle 6 der wissenschaftliche Name, die Herbarnummer (Herbarium des Thünen-Instituts, Hamburg), die Form und die Herkunft angegeben. Für eine übersichtlichere Darstellung erfolgte die Einteilung der Proben nach Familienzugehörigkeit. Die Individuen repräsentierten 9 Familien, 23 Gattungen und 53 Arten, wobei je Art mindestens ein Individuum vorlag. Eine Tabelle, in der die Proben nach aufsteigender Herbarnummer sortiert sind, ist dem Anhang zu entnehmen (Punkt 7.1, Tabelle A 1).

Tabelle 6: Auflistung des untersuchten Probenmaterials zum Aufbau der internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank. Die Anordnung der Proben erfolgte nach Familienzugehörigkeit. Aufgeführt sind jeweils die Herbarnummer (Herbarium des Thünen-Instituts, Hamburg), der wissenschaftliche Name, die Herkunft und die Form des untersuchten Materials. A = Ast, B = Blatt, D = DNA und S = Splintholz

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
Bignoniaceae			
449	<i>Handroanthus chrysanthus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
446	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Münster	B
459	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Ulm	B
463	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
465	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
466	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
Caryocaraceae			
208	<i>Caryocar brasiliense</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
627	<i>Caryocar glabrum</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
Combretaceae			
464	<i>Terminalia arenicola</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
506	<i>Terminalia avicennioides</i>	Bot. Garten der Uni. Rostock	B
458	<i>Terminalia bellirica</i>	Bot. Garten der Uni. Wien	B

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
174	<i>Terminalia bentzoe</i>	Bot. Garten Uni. Heidelberg	A
467	<i>Terminalia bentzoe</i>	Palmengarten Frankfurt	B
172	<i>Terminalia catappa</i>	Bot. Garten Uni. Heidelberg	A
424	<i>Terminalia catappa</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
437	<i>Terminalia catappa</i>	Bot. Garten der Stadt Köln	B
440	<i>Terminalia catappa</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	B
507	<i>Terminalia glaucescens</i>	Bot. Garten der Uni. Rostock	B
Euphorbiaceae			
634	<i>Endospermum moluccanum</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
Fabaceae			
50	<i>Afzelia africana</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
504	<i>Afzelia africana</i>	Bot. Garten der Uni. Rostock	B
624	<i>Bowdichia nitida</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
206	<i>Caesalpinia echinata</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
207	<i>Caesalpinia echinata</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
643	<i>Caesalpinia echinata</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
471	<i>Caesalpinia ferrea</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
625	<i>Caesalpinia ferrea</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
626	<i>Caesalpinia ferrea</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
425	<i>Caesalpinia spinosa</i>	Bot. Garten Frankfurt	B
426	<i>Caesalpinia spinosa</i>	Bot. Garten Frankfurt	B
474	<i>Dalbergia decipularis</i>	Max Cropp e.K.	S
630	<i>Dalbergia latifolia</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
378	<i>Dalbergia melanoxylon</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	B
142	<i>Dalbergia miscolobium</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
144	<i>Dalbergia nigra</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
631	<i>Dalbergia nigra</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
461	<i>Dalbergia obovata</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
143	<i>Dalbergia retusa</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
344	<i>Dalbergia retusa</i>	Fritz Kohl Furnier	S
632	<i>Dalbergia retusa</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
513	<i>Dalbergia sissoo</i>	Bot. Garten Hawaii	B
628	<i>Dalbergia sissoo</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
629	<i>Dalbergia spruceana</i>	DNA Bank Kew Gardens	D

# Material und Methoden

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
633	<i>Dalbergia spruceana</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
86	<i>Hymenaea courbaril</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	A
170	<i>Hymenaea courbaril</i>	Palmengarten Frankfurt	A
201	<i>Hymenaea courbaril</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
202	<i>Hymenaea courbaril</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
203	<i>Hymenaea courbaril</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
438	<i>Hymenaea courbaril</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	B
515	<i>Hymenaea courbaril</i>	Bot. Garten Hawaii	B
81	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten Graz	A
85	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	A
166	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten der Uni. Köln	A
204	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
401	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
402	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
403	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
404	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
405	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
406	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
407	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
408	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
409	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
410	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
411	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
453	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
511	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten Hawaii	B
205	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
399	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
400	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
412	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
413	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
414	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
415	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
417	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
418	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
419	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
420	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
421	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
422	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
341	<i>Machaerium scleroxylon</i>	Fritz Kohl Furnier	S
444	<i>Myrocarpus frondosus</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	B
448	<i>Pterocarpus indicus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
640	<i>Pterocarpus indicus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
641	<i>Pterocarpus indicus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
642	<i>Pterocarpus indicus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
462	<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
636	<i>Pterocarpus santalinus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
637	<i>Pterocarpus santalinus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
638	<i>Pterocarpus soyauxii</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
639	<i>Pterocarpus soyauxii</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
Meliaceae			
49	<i>Carapa guianensis</i>	Bot. Garten der Uni. Düsseldorf	A
80	<i>Carapa guianensis</i>	Bot. Garten Graz	A
11	<i>Cedrela fissilis</i>	Unbekannt	A
36	<i>Cedrela fissilis</i>	Bot. Garten der Uni Bochum	A
55	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
606	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
607	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
608	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
609	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
10	<i>Cedrela odorata</i>	Unbekannt	A
23	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten der Uni. Jena	A
30	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	A
56	<i>Cedrela odorata</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
71	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	A
82	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten Graz	A
452	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
83	<i>Entandrophragma angolense</i>	Bot. Garten der Uni. Würzburg	A
192	<i>Entandrophragma angolense</i>	Holzwerk Nagel	S
74	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
76	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
345	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Fritz Kohl Furnier	S

# Material und Methoden

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
393	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
394	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
395	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
477	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Max Cropp e.K.	S
8	<i>Khaya grandifolia</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
457	<i>Khaya grandifolia</i>	Bot. Garten der Uni. Wien	B
134	<i>Khaya ivorensis</i>	Holzwerk Nagel	S
38	<i>Khaya nyasica</i>	Bot. Garten der Uni. Oldenburg	A
447	<i>Khaya nyasica</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
5	<i>Khaya senegalensis</i>	Unbekannt	A
6	<i>Khaya senegalensis</i>	Unbekannt	A
35	<i>Khaya senegalensis</i>	Bot. Garten der Uni. Bochum	A
41	<i>Khaya senegalensis</i>	Bot. Garten der Uni. Halle	A
456	<i>Khaya senegalensis</i>	Bot. Garten der Uni. Wien	B
505	<i>Khaya senegalensis</i>	Bot. Garten der Uni. Rostock	B
209	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
210	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
211	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
212	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
213	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
235	<i>Swietenia humilis</i>	Mexiko	S
423	<i>Swietenia humilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	B
2	<i>Swietenia macrophylla</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
3	<i>Swietenia macrophylla</i>	Bot. Garten der Uni. Göttingen	A
18	<i>Swietenia macrophylla</i>	Bot. Garten der Uni. Tübingen	A
19	<i>Swietenia macrophylla</i>	Bot. Garten der Uni. Tübingen	A
33	<i>Swietenia macrophylla</i>	Bot. Garten der Uni. Bochum	A
224	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
225	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
226	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
227	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
228	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
249	<i>Swietenia macrophylla</i>	USA	S
251	<i>Swietenia macrophylla</i>	USA	S
252	<i>Swietenia macrophylla</i>	USA	S
385	<i>Swietenia macrophylla</i>	Fritz Kohl Furnier	S

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
4	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Göttingen	A
7	<i>Swietenia mahagoni</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
21	<i>Swietenia mahagoni</i>	Unbekannt	A
24	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Jena	A
40	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Halle	A
165	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Köln	A
168	<i>Swietenia mahagoni</i>	Palmengarten Frankfurt	A
175	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Heidelberg	A
229	<i>Swietenia mahagoni</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	A
57	<i>Toona sinensis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
450	<i>Toona sinensis</i>	Forstbot. Garten Göttingen	B
451	<i>Toona sinensis</i>	Späth-Arbor. Humb.-Uni. Berlin	B
610	<i>Toona sinensis</i>	Bot. Garten der Uni. Ulm	B
Rubiaceae			
635	<i>Neolamarcia cadamba</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
Thymelaeaceae			
244	<i>Gonystylus bancanus</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
247	<i>Gonystylus bancanus</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
482	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
483	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
486	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
487	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
489	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
491	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
492	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
493	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
499	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
500	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
611	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
612	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
613	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
614	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
615	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
616	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
617	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
618	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
619	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
620	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
621	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
622	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
623	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
Zygophyllaceae			
442	<i>Bulnesia arborea</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	B
509	<i>Bulnesia arborea</i>	Reiman Gardens, USA	B
94	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	A
101	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Erlangen	A
117	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Greifswald	A
119	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Zürich	A
156	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Berlin	A
163	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Jena	A
167	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Köln	A
377	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Bonn	A
508	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten Nancy	B
510	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Marburg	B
514	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten Hawaii	B
603	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Tübingen	B
604	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Heidelberg	B
605	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Heidelberg	B
162	<i>Guaiacum sanctum</i>	Bot. Garten der Uni. Jena	A
173	<i>Guaiacum sanctum</i>	Bot. Garten der Uni. Heidelberg	A
231	<i>Guaiacum sanctum</i>	Mexiko	S
232	<i>Guaiacum sanctum</i>	Brasilien	B
233	<i>Guaiacum sanctum</i>	Mexiko	S
455	<i>Guaiacum sanctum</i>	Bot. Garten der Uni. Ulm	B
469	<i>Guaiacum sanctum</i>	Palmengarten Frankfurt	B



#### 2.1.4.2 Material zur Durchführung verschiedener Validierungen

Für die Validierung des in dieser Arbeit entwickelten Schnelltests zur Identifizierung von Holzarten, wurden zwei Blindtests durchgeführt. Der erste Test beinhaltete 60 unbekannte Proben (Bt1-Bt60). Das Ziel des Blindtests war, herauszuarbeiten, bei welchen es sich um *Gonystylus* spp. handelt. Weiter erfolgte eine Bestimmung der Proben, bei denen es sich nicht um Ramin handelte. Das Ausgangsmaterial bestand aus Splintholz in Hackschnitzelgröße (Bt9 = Bast) und wurde von Herrn PD Dr. Gerald Koch zur Verfügung gestellt (Abbildung 3 A). Die Proben wurden den Außenseiten der auf dem Rundholzplatz der Indah Kiat Perawang Pulp Mill, Indonesien, lagernden Stämme zwischen Februar 2011 und Januar 2012 entnommen (Greenpeace 2014). Die Durchführung des Blindtests erfolgte im Sommer 2012.

Für den zweiten Blindtest wurde ein Stück einer Holzbohle (Meliaceae) verwendet (Abbildung 3 B), die durch den deutschen Zoll beschlagnahmt wurde. Über das Alter und die vorangegangenen Arbeitsprozesse waren keine Informationen bekannt. Ziel für die Untersuchung der Holzbohle war, die Art, unter Verwendung der spezifischen Primer, zu identifizieren.

Eine weitere Validierung erfolgte anhand von drei alten Holzstücken (Abbildung 3 C). Da bei den Holzstücken die Art bereits feststand, lag der Fokus dieser Validierung auf der Beurteilung der entwickelten DNA-Extraktion. Die Arten waren *Dalbergia nigra* (Dal 1), *Dalbergia retusa* (Dal 2) und *Dalbergia latifolia* (Dal 3). Die Holzprobe von *Dalbergia nigra* stammte aus der Holzsammlung des Thünen-Instituts. Die beiden anderen Proben wurden freundlicherweise von Max Cropp e.K., Hamburg, Deutschland zur Verfügung gestellt. Für alle drei Holzproben konnten keinerlei Informationen über deren vorherige Verarbeitungsschritte oder deren Lagerdauer in Erfahrung gebracht werden. Es stand lediglich fest, dass ein Einschnitt erfolgte und die Lagerung mehrere Jahre betrug.

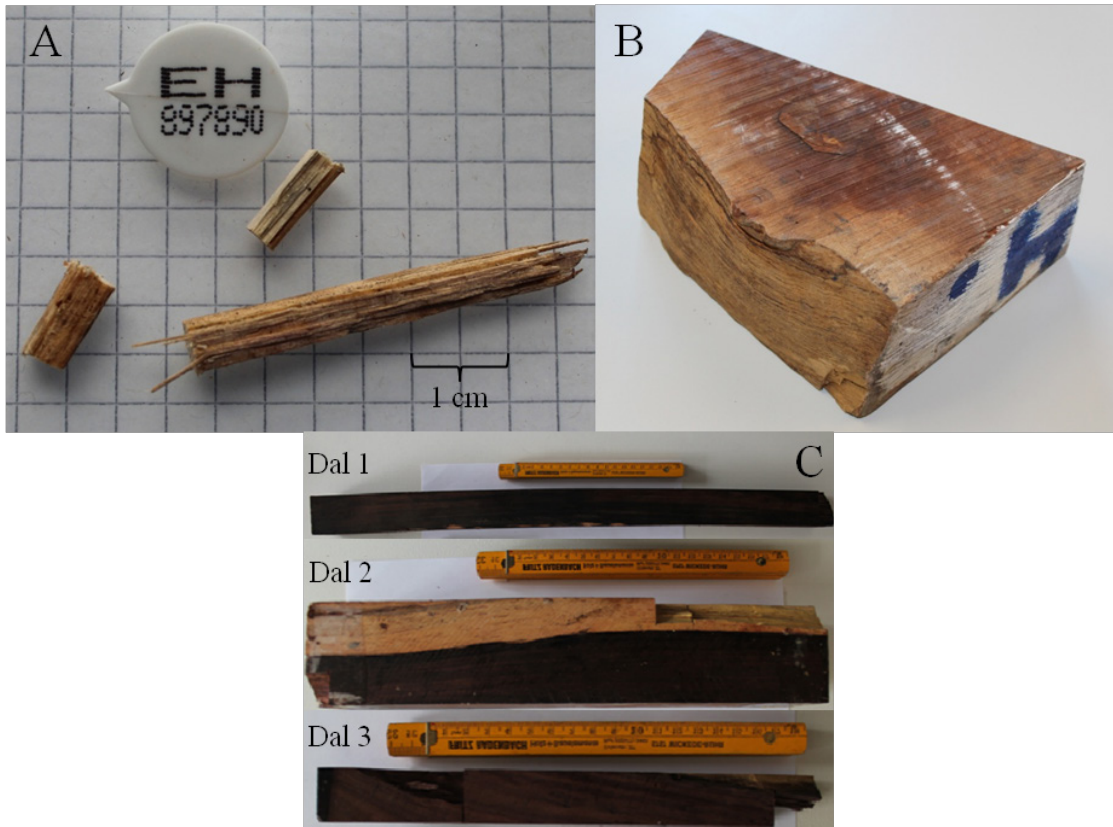


Abbildung 3: Darstellung der verwendeten Holzproben für die Validierung des entwickelten Schnelltests zur Holzartenidentifizierung. A = Splintholz unbekannter Art, B = Holzbohle aus der Familie der Meliaceae und C = Holzproben von *Dalbergia nigra* (Dal 1), *Dalbergia retusa* (Dal 2) und *Dalbergia latifolia* (Dal 3).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Isolierung der DNA**

#### **2.2.1.1 DNA-Extraktion aus frischem Material**

Zur Isolierung der genomischen DNA aus Blatt-, Ast-, oder Splintholzmaterial wurde das DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Um Kontaminationen zu verhindern, fand die gesamte Aufarbeitung unter sterilen Bedingungen statt. Zur Vermeidung von Verunreinigungen während der Aufarbeitung von Ästen, wurde deren Rinde mit Hilfe eines Stechbeitels entfernt. Bei dem Einsatz von Splintholz wurden die äußeren Schichten ebenfalls mithilfe des Stechbeitels abgetragen. Anschließend wurde das Ast- oder Splintholzmaterial mit einer feinen Reibe homogenisiert. Für die Verarbeitung der Blattmaterialien wurde ein steriles Skalpell verwendet. Die daraufhin durchgeführte DNA-Extraktion beinhaltete hauptsächlich folgende Schritte (Tabelle 7): Zelllyse durch eine Pufferlösung und anschließende Fällung von Proteinen und Polysacchariden; Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Verwendung einer Filtermatrix; Fällung der DNA auf Ethanol-Basis; Binden der DNA auf eine Silikat-Matrix; Reinigung der DNA durch mehrmaliges Waschen mit einer Pufferlösung; Eluieren der DNA. Für sämtliche Zentrifugationsschritte bis 13.000 rpm kam die Zentrifuge Biofuge Fresco, Heraeus zum Einsatz. Bei Geschwindigkeiten über 13.000 rpm, wurde eine Sorvall<sup>™</sup> Stratos<sup>™</sup> Zentrifuge (Thermo Scientific, Waltham, USA) verwendet.

Tabelle 7: Protokoll der DNA-Extraktion mit dem DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen.

<b>Isolation der genomischen DNA</b>	
1.	Einwaage von 50 mg Holzmehl oder Blattpartikeln in ein 2 ml Eppi
2.	Zugabe von 600 µl AP1, vortexen; 10 min bei 65°C im Thermoschüttler
3.	Zugabe von 200 µl AP2, vortexen; 5 min bei -20°C (Gefrierschrank)
4.	Überführung auf QIAshredder Mini Spin-Säulen; Zentrifugation, 2 min bei 13.000 rpm
5.	500 µl Filtrat (ohne Pellet) in 2 ml Eppi überführen
6.	Zugabe von 750 µl AP3, sehr vorsichtig durch Drehen und Rollen mischen
7.	650 µl der DNA-Lösung auf DNeasy® Mini Spin-Säulen überführen und bei 8.000 rpm 1 min zentrifugieren
8.	Filtrat verwerfen; restliche DNA-Lösung auf die Säule geben und 1 min bei 8.000 rpm zentrifugieren
9.	Filtrat verwerfen; Zugabe von 500 µl AW, 30 s bei 8.000 rpm zentrifugieren
10.	Filtrat verwerfen; Zugabe von 500 µl AW, 30 s bei 8.000 rpm zentrifugieren
11.	Filtrat verwerfen und Säule bei 13.000 rpm 1 min trocken zentrifugieren
12.	Säule auf neues 1,5 ml Eppi setzen und 15-50 µl AE auf die Mitte der Säule geben, Inkubation 5 min bei Raumtemperatur
13.	Zentrifugation 1 min 10.000 rpm
14.	Säule auf neues 1,5 ml Eppi setzen und 15-50 µl AE auf die Mitte der Säule geben, Inkubation 5 min bei Raumtemperatur
15.	Zentrifugation 1 min 10.000 rpm
16.	Das 1te und 2te DNA Eluat bei 4°C aufbewahren

#### 2.2.1.2 Isolierung der DNA aus Kernholz oder stark abgebautem Material

Für die Isolierung der DNA aus Kernholz oder Materialien, die vergleichbar stark abgebaute DNA oder Inhibitoren aufweisen, sind in dieser Arbeit diverse DNA-Extraktionskits unterschiedlichster Hersteller getestet worden. Ebenso wurden in diesem Zusammenhang verschiedene in Fachzeitschriften veröffentlichte DNA-Extraktionsprotokolle überprüft. Mithilfe dieser Untersuchungen wurde ermittelt, ob sich eines der Kits oder der DNA-Extraktionsprotokolle für alle untersuchten Materialien eignet. Die getesteten DNA-Extraktionsmethoden, die in Tabelle 8 gelistet sind, können in drei Gruppen eingeteilt werden. Die Gruppe A beinhaltet die SDS-, die CTAB- und die PTB-Extraktion, welche ursprünglich für die Nukleinsäure-Isolierung aus Materialien wie Pflanzen, Erdreich und Knochen entwickelt wurden. Die größten Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden bestehen in der Zusammensetzung

der Lysispuffer. Im weiteren Verlauf werden organische Lösungsmittel für einzelne Waschschriffe eingesetzt. Im Anschluss erfolgt eine alkoholische Fällung der DNA. Die gefällte DNA wird durch Zentrifugation pelletiert und am Ende resuspendiert. Gruppe B führt kommerzielle Kits auf, die für die Nukleinsäure-Isolierung aus Pflanzen, verarbeiteten Nahrungsmitteln, Bodenproben und Stuhlproben, angeboten werden. Diese Kits bauen größtenteils auf den zuvor erwähnten DNA-Extraktionsmethoden auf. Die Gemeinsamkeit dieser Kits liegt darin, dass sie alle die reversiblen Bindungseigenschaften von Silikafiltern, verbaut in Zentrifugationssäulen, nutzen. Hierdurch wird die DNA selektiv an die Matrix gebunden, gewaschen und danach wieder eluiert. Bei Verwendung der kommerziellen Extraktionskits wurde strikt den Herstellerangaben gefolgt. Gruppe C wird durch Kombinationen der Gruppen A und B bzw. durch die Abwandlung kommerzieller DNA-Extraktionskits gebildet.

Tabelle 8: Aufstellung der verwendeten DNA-Extraktionsprotokolle (Gruppe A), der DNA-Extraktionskits (Gruppe B) sowie der abgewandelten DNA-Extraktionskits (Gruppe C). Die verschiedenen Methoden wurden auf die Eignung für die Extraktion von DNA aus Holz überprüft.

Methode/Kit	Autoren/Hersteller
<b>Gruppe A</b>	
CTAB-Extraktion	Doyle und Doyle 1987
PTB-Extraktion	Asif und Cannon 2005
SDS-Extraktion	Volossiuk et al. 1995
CTAB/SDS-Extraktion	N. Wischniewski
<b>Gruppe B</b>	
DNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
innuSPEED Plant DNA Kit	Analytik Jena, Jena
innuSPEED Soil DNA Kit	
innuSPEED Stool DNA Kit	
peqGOLD Plant DNA Mini Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kit	GE Healthcare, Freiburg
NucleoSpin® Soil Kit	Machery-Nagel, Düren
<b>Gruppe C</b>	
PVP + DNeasy® Plant Mini Kit	Rachmayanti et al. 2006; Qiagen, Hilden
CTAB + DNeasy® Plant Mini Kit	N. Wischniewski; Qiagen, Hilden
PTB + DNeasy® Plant Mini Kit	Erickson et al. 2005; Qiagen, Hilden
Modifiziertes DNeasy® <i>mericon</i> ™ Food Kit	N. Wischniewski; Qiagen, Hilden

#### 2.2.1.2.1 Durchführung der CTAB-Extraktion

Für die auf Doyle und Doyle (1990) basierende CTAB-Extraktionsmethode wurden 100 mg Holzmehl mit 1 ml CTAB-Puffer (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 1% PVP, 20 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8, autoklaviert) versetzt. Weiter wurden der Suspension 50 µl DTT (1 M DTT in 10 mM NaAc-Lösung, sterilfiltriert) hinzugegeben. Darauf folgte die Inkubation des Gemischs im Thermoschüttler für 18 h bei 900 rpm und 55°C. Hierauf wurde die Lösung für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde im Anschluss mit 400 µl Chloroform versetzt und das gesamte Gemisch für 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase (400 µl) entnommen und ein weiteres Mal mit Chloroform gewaschen. Anschließend an diesen weiteren Waschschrift wurden

wiederum 400 µl der oberen Phase abpipettiert und diese mit 1 ml Isopropanol (99,8%) versetzt. Für die Fällung der DNA musste die Lösung für 1 h bei -20°C gelagert werden. Zur Pelletierung der DNA folgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 13.000 rpm (RT). Nach Entfernung des Isopropanols wurde das zurückbleibende Pellet mit 1 ml Ethanol (76%) gewaschen (15 min bei 13.000 rpm (RT)). Das Ethanol wurde abgegossen und Restbestände mit dem Rotations-Vakuumkonzentrator Concentrator Plus, Eppendorf AG, Hamburg (20 min bei 30°C) entfernt. Das DNA Pellet wurde im Anschluss in 30 µl AE (10 mM Tris/HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9) resuspendiert.

### 2.2.1.2.2 Durchführung der SDS-Extraktion

Aufbauend auf einer von Volossiuk et al. (1995) veröffentlichten Studie wurden zwei SDS-Extraktionspuffer (x% SDS, 0,14 M NaCl, 50 mM NaAc, pH 5,1) mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen (0,3 bzw. 1%) hergestellt. Die Extraktion der DNA erfolgte aus 100 mg Holzmehl. Der Verlauf der DNA-Extraktion ist der CTAB-Extraktion aus Punkt 2.2.1.2.1 zu entnehmen. Lediglich der Lysis-Puffer wurde durch einen der SDS-Extraktionspuffer ersetzt.

### 2.2.1.2.3 Durchführung der CTAB/SDS-Extraktion

Für die CTAD/SDS-Extraktion wurden zwei CTAB/SDS-Puffer hergestellt, die folgende Komponenten aufwiesen: 2% CTAB, 1% SDS, 1,4 M NaCl, 50 mM NaAc, 20 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl. Der erste Puffer wurde, wie von Volossiuk et al. (1995) angegeben, auf einen pH-Wert von 5,1 eingestellt. Der zweite Puffer wurde ohne weitere pH-Wert Einstellung verwendet und wies somit einen pH-Wert von 7,2 auf. Die Nukleinsäure-Isolierung erfolgte aus 100 mg Holzmehl und verlief nach dem Protokoll aus Punkt 2.2.1.2.1.

### 2.2.1.2.4 Durchführung der PTB-Extraktion

Erickson et al. veröffentlichten im Jahr 2005 eine Studie, in der unter anderem ein DNA-Extraktionspuffer vorgestellt wurde, der sich insbesondere für die Extraktion von alter DNA eignet. Dieser Puffer wurde auf die Anwendbarkeit für die hier verwendeten Hölzer überprüft. Als Ausgangsmaterial für die Nukleinsäure-Isolierung dienten 100 mg Holzmehl. Dieses wurde mit 600 µl des Puffers versetzt (1% SDS, 10 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM NaCl, 50 mM DTT, 20 mg/ml Proteinase K, 10 mM EDTA, 2,5 mM PTB) und für 18 h bei 37°C sowie leichtem Schütteln (250 rpm) in einem Brutschrank inkubiert. Die auf die Inkubation folgende Aufreinigung verlief wie in der CTAB-Extraktion (Punkt 2.2.1.2.1) beschrieben.

#### 2.2.1.2.5 DNeasy® Plant Mini Kit in Kombination mit PVP

Rachmayanti et al. veröffentlichten im Jahr 2006 eine Studie, in der unter anderem eine modifizierte Version der DNeasy® Plant Mini Extraktion vorgestellt wurde. Für die DNA-Extraktion wurden wiederum 100 mg Holzmehl verwendet, das mit 600 µl Lysis-Puffer (AP1), dem 3,1% (w/v) PVP (K25) beigemengt waren, versetzt wurde. Die Suspension wurde über Nacht bei 65°C und 900 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Im Anschluss folgte die DNA-Extraktion den Herstellerangaben.

#### 2.2.1.2.6 Kombination des CTAB-Extraktionspuffers mit dem DNeasy® Plant Mini Kit

In einer weiteren Variation des DNeasy® Plant Mini Kits wurde der Lysispuffer AP1 durch den CTAB-Extraktionspuffer aus Punkt 2.2.1.2.1 ersetzt. 100 mg Holzmehl wurden mit 600 µl des Puffers versetzt und für 18 h bei 55°C im Thermoschüttler (900 rpm) inkubiert. Hierauf wurde mit der DNA-Extraktion nach den Angaben des Herstellers fortgefahren.

#### 2.2.1.2.7 Kombination des PTB-Extraktionspuffers mit dem DNeasy® Plant Mini Kit

Erickson et al. (2005) verwendeten den in Punkt 2.2.1.2.4 angeführten DNA-Extraktionspuffer in Kombination mit dem DNeasy® Plant Mini Kit. Daher wird jene Kombination in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Die Nukleinsäure-Isolierung wurde wie von den Autoren beschrieben durchgeführt. Lediglich die Menge des Ausgangsmaterials wurde von 200 mg auf 100 mg Holzmehl reduziert. Die Inkubation erfolgte wiederum für 18 h im Brutschrank (37°C und 250 rpm).

#### 2.2.1.2.8 Modifizierte DNeasy® *mericon*™ Food Kit Extraktion

Für diese DNA-Isolierung kam ein angepasstes Protokoll der *mericon*™-Extraktion zum Einsatz. Eine Anpassung lag darin, dass ein Prefilter der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) verwendet wurde (Schritt 3, Tabelle 9). Dieser Filter diente zur vollständigen Trennung von festen und flüssigen Bestandteilen der Lysis-Mischung. Eine weitere Anpassung war, dass nach der zweimaligen Fällung der Lösung mit Chloroform, der größtmögliche Überstand, anstatt von nur 250 µl, abgenommen wurde. Je 250 µl wurden dann mit 1 ml PB-Puffer des Kits versetzt (Fällung der DNA). Im Anschluss an die DNA-Fällung wurden alle erhaltenen Lösungen einer Probe in 600 µl Schritten auf eine QIAquick Spin Säule gegeben (Schritt 11-14; Tabelle 9). Das vollständige Protokoll der DNA-Extraktion gibt die Tabelle 9 wieder. Als Ausgangsmaterial dienten 100 mg Holzmehl. Die Elution der DNA erfolgte unter Verwendung von 50 µl des in dem Kit bereitgestellten Elutionspuffers (EB).



Tabelle 9: Protokoll für die DNA-Extraktion mithilfe des modifizierten DNeasy<sup>®</sup>  
*mericon*<sup>™</sup> Food Kits.

---

<b>Extraktionsprotokoll des modifizierten DNeasy<sup>®</sup> <i>mericon</i><sup>™</sup> Food Kits</b>	
1.	100 mg Holzmehl in einem 2 ml Eppi mit 1 ml Food Lysis Buffer und 2,5 µl Proteinase K Solution versetzen und gut durchmischen.
2.	30 min bei 60°C und 1.000 rpm in einem Thermoschüttler inkubieren und danach auf Raumtemperatur (20°C) herunterkühlen lassen.
3.	Gesamten Inhalt des Eppis auf einen Prefilter der Firma Analytik Jena übertragen.
4.	5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren.
5.	700 µl Überstand in ein neues 2 ml Eppi pipettieren (möglichst ohne Feststoffe)
6.	500 µl Chloroform zu dem Überstand hinzufügen und gut vermischen (kräftig schütteln).
7.	15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren.
8.	Die klare obere Phase abnehmen (Vorsicht! Nichts von der Inter- oder Unterphase entnehmen. Ansonsten Lösung zurückführen und neu zentrifugieren!). Obere Phase wiederum mit 500 µl Chloroform versetzen und Schritt 7 wiederholen.
9.	Klaren Überstand in 250 µl Anteilen abnehmen und jeweils in ein neues 2 ml Eppi geben.
10.	Je 1 ml PB hinzugeben. Lösungen durch vorsichtiges Drehen und Rollen mischen. (Vorsicht DNA wird gefällt!)
11.	600 µl der Lösung auf eine QIAquick Spin Säule geben (Sämtliche Lösungen einer Probe werden in den folgenden Schritten auf einen Filter konzentriert.)
12.	1 min bei 17.900 x g zentrifugieren.
13.	Filtrat verwerfen.
14.	Schritte 11-13 mit den restlichen Lösungen, aber derselben Säule wiederholen.
15.	500 µl AW2 auf die QIAquick Spin Säule geben.
16.	1 min bei 17.900 x g zentrifugieren.
17.	Filtrat verwerfen. (Filter farbig = zusätzlicher Waschschritt mit 500 µl Ethanol p.a.)
18.	Trockenzentrifugieren für 1 min bei 14.000 x g.
19.	QIAquick Spin Säule auf ein neues 1,5 ml-Tube setzen.
20.	30-100 µl EB auf den Filter geben.
21.	5 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
22.	1 min bei 17.900 x g zentrifugieren.
23.	Schritt 20-22 wiederholen.

---

### 2.2.1.3 Invisorb® DNA CleanUp Kit

Unter Verwendung des Invisorb® DNA CleanUp Kits der Firma Stratec (Berlin, Deutschland) wird ein DNA-Eluat, das nach dem DNA-Extraktionsprozess noch störende Inhibitoren enthält, weiter aufgereinigt. Durch dieses Kit besteht weiterhin die Möglichkeit, DNA-Eluate, die durch eine zu groß gewählte Elutionsmenge einen geringen DNA-Gehalt aufweisen, aufzukonzentrieren. Das Protokoll für die Aufreinigung von DNA-Eluaten mit einem Volumen von 50-200 µl umfasst das Fällern der DNA, das Binden der DNA auf eine Silikamatrix, das Waschen der DNA mit zwei unterschiedlichen Puffern sowie die Elution der DNA (Tabelle 10).

Tabelle 10: Protokoll für das Invisorb® DNA CleanUp Kit zur Aufreinigung von DNA-Eluaten, die mit Inhibitoren verunreinigt sind. Ausgangsmenge des DNA-Eluats: 50-200 µl.

<b>Protokoll für das Invisorb® DNA CleanUp Kit</b>	
1.	Vorsichtiges Mischen von 300 µl des Puffers P und dem vorhandenem DNA-Eluat in einem 1,5 ml Eppli.
2.	Gesamte Lösung auf den Spin Filter übertagen. Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur.
3.	Zentrifugieren für 30 s bei 10.000 rpm.
4.	Filtrat verwerfen.
5.	500 µl des Wasch-Puffers I auf den Spin Filter geben und für 30 s bei 10.000 rpm zentrifugieren.
6.	Filtrat verwerfen.
7.	700 µl des Wasch-Puffers II auf den Spin Filter geben und für 30 s bei 10.000 rpm zentrifugieren.
8.	Filtrat verwerfen.
9.	Trockenzentrifugieren für 3 min bei 12.000-14.000 rpm.
10.	Spin Filter auf ein neues 1.5 ml Eppli. Zugabe von 30 µl, des auf 70°C vorgewärmten Elution-Puffers, auf das Zentrum des Spin Filters. Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min.
11.	1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren.
12.	Schritt 10-11 wiederholen.

### **2.2.2 Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration**

Unter Verwendung des NanoDrop™ 2000 der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) konnte die Konzentration und die Reinheit der gewonnenen DNA gemessen werden. Die Messungen erfolgten nicht nur nach der DNA-Isolierung, sondern auch nach der Aufreinigung von PCR-Produkten.

Für die Messung wurde 1 µl des Eluats auf das Spektralphotometer aufgetragen und anschließend ein Wellenlängenscan von 350 bis 230 nm durchgeführt. Zur Quantifizierung der Nukleinsäure wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Verunreinigungen durch Proteine oder phenolische Komponenten konnten durch die Bestimmung der Absorption bei den Wellenlängen 280 oder 230 nm nachgewiesen werden. Die Reinheit des DNA-Eluats wurde durch die Absorptionsverhältnisse 260/280 und 260/230 wiedergegeben. Das Verhältnis für 260/280 sollte je nach Ausgangsmaterial zwischen 1,8-2,0 liegen. Für 260/230 werden Werte zwischen 1,8-2,2 als Hinweis für „reine“ DNA angesehen.

### **2.2.3 PCR zur Amplifikation der rDNA ITS-Region**

Die PCR dient dazu, einen kurzen und genau definierten Abschnitt der DNA zu vervielfältigen. Das Prinzip und die einzelnen Schritte der PCR werden nachstehend kurz erläutert.

Ausgangspunkt für die Amplifizierung eines definierten Teilabschnitts eines DNA-Strangs ist die zuvor extrahierte DNA, das Template. Der im Template befindliche DNA-Doppelstrang wird zunächst durch Einsatz von Wärme (94-95°C) einer einmaligen Anfangsdenaturierung unterzogen. Die Dauer beträgt je nach Ausgangsprodukt und verwendetem Kit 1-5 min. Durch diesen Schritt wird sichergestellt, dass zu Beginn der Reaktion nur noch Einzelstränge vorliegen. Als Beginn eines sich wiederholenden Zyklus, folgt auf die Anfangsdenaturierung eine weitere Denaturierung bei gleicher Temperatur aber kürzerer Zeit. In der Regel dauert dieser Schritt 30 s. Anschließend werden innerhalb von 30 s und einer Temperatur von 40-60°C spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, an die Einzelstränge angelagert (Annealing). Hierbei binden jeweils der sense-Primer (forward-Primer) sowie der antisense-Primer (reverse-Primer) an den komplementären DNA-Strang. Die spezifische Temperatur für die Anlagerung eines Primers bzw. eines Primerpaars ergibt sich aus deren Nukleotidzusammensetzung. Im nächsten Schritt, der Elongation, erfolgt die Synthese eines neuen Doppelstrangs. Die Synthese findet unter Verwendung eines

Enzyms, in der Regel der *Taq*-Polymerase, das dem grampositiven und thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) entstammt, statt. Durch dieses Enzym und dem Einsatz freier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) wird bei einer Temperatur von 72°C ein neuer Doppelstrang gebildet. Die Dauer der Elongation hängt von der Länge des zu amplifizierenden Teilstücks ab. In der Regel können 30-60 s für 1000 bp angegeben werden. Denaturierung, Annealing und Elongation bilden einen kompletten Zyklus, durch den der gesuchte Teilabschnitt kopiert wird. Innerhalb einer PCR werden 30-40 Zyklen durchgeführt, wodurch ein exponentieller Anstieg des gesuchten Teilabschnitts zu verzeichnen ist. Nach Beendigung der Zyklusphase kann optional noch eine Endelongation (72°C; 1-15 min) durchgeführt werden. In diesem abschließenden Schritt werden nur partiell vervollständigte Teilbereiche endgültig synthetisiert. Zum Beenden sämtlicher Reaktionen wird das amplifizierte Produkt auf 4°C heruntergekühlt.

#### 2.2.3.1 Qiagen *Taq* Core Kit

Für die Amplifizierung der aus Ästen, Blättern oder Splintholz gewonnenen DNA kam das *Taq* PCR Core Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) zum Einsatz. Angesetzt wurde je Probe ein Reaktionsmix von 12,5 µl. Der Reaktionsansatz enthielt Reinstwasser, Q-Solution, 10x Reaktionspuffer, dNTPs, Primer, *Taq* und DNA Template. Den jeweiligen Anteil der Lösungen sowie deren Endkonzentration gibt Tabelle 11 wieder. Die Amplifizierung des DNA-Fragments erfolgte nach einer Anfangsdenaturierung bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Abschließend wurde eine Endelongation durchgeführt. Die Annealingtemperatur wurde anhand des verwendeten Primerpaars ermittelt. Die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Primer wurden einem Online-Tool der Eurofins MWG GmbH entnommen ([https://ecom.mwgdna.com/services/oligo/appl-oligos.tcl?ot=OLIGO\\_PCR](https://ecom.mwgdna.com/services/oligo/appl-oligos.tcl?ot=OLIGO_PCR)). Je nach Fragmentgröße wurde eine unterschiedliche Elongationszeit gewählt. Als Faustregel galt 60 s/kb (Tabelle 12). Zur Kontrolle der PCR-Bedingungen wurde sowohl eine Positiv-, als auch eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Für die Positiv-Kontrolle wurde ein Template genutzt, das unter den gegebenen Bedingungen zuverlässig amplifiziert wird. In der Negativ-Kontrolle wurde auf den Einsatz eines Template verzichtet. Alle Amplifikationen dieser Arbeit erfolgten in den Thermocyclern Tpersonal und TGradient der Firma Biometra® (Göttingen, Deutschland).

Tabelle 11: Pipettierschema für den Mastermix des *Taq* PCR Core Kits. Angegeben sind die Komponenten, deren Menge sowie deren Endkonzentration.

Reaktionsmix für 1 Probe (12,5 µl)		
Komponente	µl	Endkonzentration
Reinstwasser	7,775	-
Q-Solution	2,5	1x
10x Reaktionspuffer	1,25	1x
dNTP-Mix	0,25	0,2 mM
forward-Primer	0,075	0,6 µM
reverse-Primer	0,075	0,6 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,075	0,3 U
Template	0,5	10-50 ng

Tabelle 12: PCR-Programm für das *Taq* PCR Core Kit. Die Annealingtemperatur ergibt sich aus den verwendeten Primern. Die erwartete Fragmentgröße bestimmt die Elongationszeit.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
Anfangsdenaturierung	94	4	
Denaturierung	94	0,5	} 35 Zyklen
Annealing	45-68	0,5	
Elongation	72	60 s/kb	
Endelongation	72	7	
Lagerung	4	-	

### 2.2.3.2 KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit

Die Amplifizierung von Kernholz-DNA oder Materialien, die starken Verarbeitungsschritten, wie Kochung und Trocknung, ausgesetzt waren, stellt besondere Ansprüche an das zu verwendende PCR-System. Die DNA liegt hier zumeist nicht nur in einem stark degradierten Zustand vor, sondern es ist zusätzlich mit der Anwesenheit von Inhibitoren, wie z.B. phenolischen Komponenten, zu rechnen. Aus diesem Grund wurde die entsprechende DNA mit dem KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit der Firma Kapa Biosystems (Boston, USA) amplifiziert. Dieses PCR Kit bietet die Möglichkeit, auf die Besonderheiten problematischer DNA-Templates zu reagieren.

Gewährleistet wird dies über den Einsatz verschiedener Puffer (A, B oder GC) sowie die Verwendung des KAPAEhancers 1. Puffer A ist der empfohlene Puffer für DNA-Templates mit einem GC-Gehalt  $< 65\%$ . Puffer B sollte insbesondere bei der Anwesenheit anionischer Inhibitoren verwendet werden. Der GC-Puffer ist speziell für DNA-Fragmente, die einen GC-Gehalt von  $> 65\%$  aufweisen. Weiter kommt der Puffer bei Templates mit stabilen Sekundärstrukturen zum Einsatz. Der KAPAEhancer 1 wird in Kombination mit Puffer A oder B verwendet und ist ein firmeneigenes Additiv, das zum einen die Reaktionseffizienz verbessert und zum anderen die Spezifität der Primer/Template Kombination erhöht. Welcher der zur Verfügung stehenden Puffer am besten für ein Template geeignet ist, muss individuell erarbeitet werden. In dieser Arbeit haben sich der Puffer A ohne Enhancer und der Puffer GC bewährt. Die Reaktionsansätze betrugen in allen Fällen  $12,5\ \mu\text{l}$ . Die Zusammensetzung (Menge und Endkonzentration) der verschiedenen Reaktionsansätze (Puffer A, B oder GC) ohne KAPAEhancer 1 sind in Tabelle 13 wiedergegeben. Die Kombination der Puffer A oder B mit dem KAPAEhancer 1 gibt Tabelle 14 wieder. Der Aufbau des PCR-Programms ist vergleichbar mit dem des Qiagen *Taq* PCR Core Kits. Lediglich die verschiedenen Denaturierungsschritte erfolgten bei  $95^\circ\text{C}$ . Weiterhin wurden 40 anstatt der 35 Zyklen durchgeführt. Für den Puffer GC gelten beim Annealing besondere Parameter, so dass die Annealingzeit von 30 s auf 15 s gesenkt werden musste (Tabelle 15). Für die Kontrolle der PCR-Bedingungen wurden wiederum eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt.

Tabelle 13: Pipettierschema für den Mastermix des KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kits (ohne Enhancer). Angegeben sind die Komponenten, deren Menge sowie deren Endkonzentration.

<b>Reaktionsmix für 1 Probe ohne Enhancer (12,5 µl)</b>		
<b>Komponente</b>	<b>µl</b>	<b>Endkonzentration</b>
Reinstwasser	9,1	-
Puffer A, B oder GC	2,5	1x
dNTP Mix	0,25	je 0,2 mM
Primer for (100 µM)	0,05	0,4 µM
Primer rev (100 µM)	0,05	0,4 µM
KAPA2G™ Robust Hot Start DNA Polymerase	0,05	0,25 U
Template DNA	0,5	10-50 ng

Tabelle 14: Pipettierschema für den Mastermix des KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kits (mit Enhancer). Angegeben sind die Komponenten, deren Menge sowie deren Endkonzentration.

<b>Reaktionsmix 1 Probe mit Enhancer (12,5 µl)</b>		
<b>Komponente</b>	<b>µl</b>	<b>Endkonzentration</b>
Reinstwasser	6,6	-
Puffer <b><u>A oder B</u></b>	2,5	1x
KAPAEhancer	2,5	1x
dNTP Mix	0,25	je 0,2 mM
Primer for (100 µM)	0,05	0,4 µM
Primer rev (100 µM)	0,05	0,4 µM
KAPA2G™ Robust Hot Start DNA Polymerase	0,05	0,25 U
Template DNA	0,5	10-50 ng

Tabelle 15: PCR-Programm für das KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit. Die Annealingtemperatur ergibt sich aus den verwendeten Primern. Durch Verwendung des Puffers GC ergibt sich eine Annealingzeit von 15 s. Die erwartete Fragmentgröße bestimmt die Elongationszeit.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Vorheizen	95°C	Pause
2. Anfangsdenaturierung	95°C	4 min
3. Denaturierung	95°C	30 s
4. Annealing	45-68°C	15 oder 30 s
5. Elongation	72°C	60 s/kb
6. Endelongation	72°C	7 min
7. Kühlen	4°C	Pause

} 40 Zyklen

### 2.2.3.3 PCR-Primer

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Primer stammten von der Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland). Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mithilfe von Reinstwasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt.

Für den Aufbau der internen Sequenzdatenbank wurde der ITS-Bereich in zwei sich überlappenden Teilbereichen amplifiziert (Abbildung 4). Die Teilung erfolgte hierbei im 5.8S Gen. Für die Amplifikation des ITS1-Bereichs kamen die Primer ITS1.1 und ITS2.1 zum Einsatz (Hanssen et al. 2011). Für den ITS2-Bereich wurde die Primerkombination ITS3.1/ITS4 gewählt (White et al. 1990; Hanssen et al. 2011). Für beide Teilbereiche konnte eine Annealingtemperatur von 55°C ermittelt werden. Die Größe der ITS-Fragmente betrug ~380 bzw. ~445 bp, woraus sich eine Elongationszeit von 25-30 s ergab (Tabelle 16).

Die getrennte Amplifikation der ITS-Region erfolgte aus zwei Gründen. (1) Durch die getrennte Amplifizierung des ITS-Bereichs wird auf degradierte DNA reagiert. (2) Bei den Primern ITS2.1 und ITS3.1 handelt es sich um sogenannte „holzspezifische“ Primer. Hierdurch wird die Vervielfältigung von eventuell vorhandener Pilz-DNA verhindert (Zhang et al. 1997).



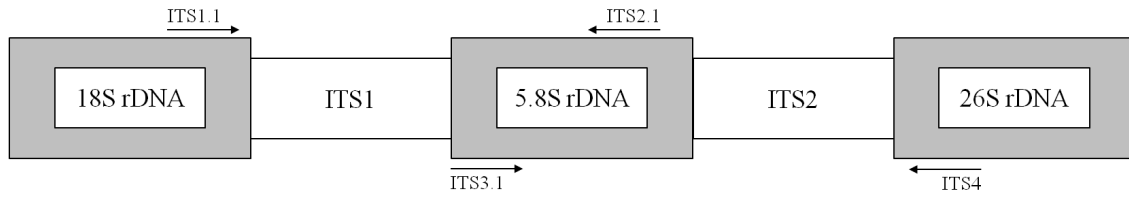


Abbildung 4: Darstellung der rDNA ITS-Region inklusive der verwendeten ITS-Primer. ITS1.1 und ITS2.1 amplifizieren die ITS1-Region. Die ITS2-Region wird durch ITS3.1 und ITS4 generiert.

Tabelle 16: Primer zur Amplifikation der sich überlappenden Teilbereiche der ITS-Region. Die Tabelle gibt die Primernamen, die Primersequenzen, die Fragmentlängen der verschiedenen Kombinationen sowie deren Annealingtemperatur wieder.

Primer	Primersequenz 5'-3'	Fragmentlänge (bp)	Annealing (°C)
ITS1.1	GAA CCT GCG GAA GGA TCA T (Hanssen et al. 2011)	~380	55
ITS2.1	GAC TCG ATG RTT CAC GGG (Hanssen et al. 2011)		
ITS3.1	GAC TCT CGG CAA CGG ATA TC (Hanssen et al. 2011)	~445	55
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC (White et al. 1990)		

#### 2.2.3.4 Nested-PCR

Die Nested-PCR (geschachtelte PCR) ist eine Methode mit der sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität einer PCR deutlich erhöht wird. So können auch geringste Spuren von DNA nachgewiesen werden, die nach einer einfachen PCR kein detektierbares Amplifikat erbrachten. Um diesen Nachweis gewährleisten zu können, werden zwei PCR-Reaktionen nacheinander durchgeführt. Hierbei dient ein geringer Anteil des Reaktionsansatzes der ersten PCR als Template für die zweite PCR. Weiter hybridisiert in der zweiten PCR mindestens einer der verwendeten Primer innerhalb des Amplifikats der ersten PCR. Durch die Verschachtelung der verwendeten Primer wird eine starke und spezifische Anreicherung des gewünschten Teilbereichs der DNA erzielt.

Die Nested-PCR wurde wie nachfolgend erläutert durchgeführt. Für die erste PCR kam die Primerkombination ITS1.1/ITS4 zum Einsatz. Durch die Verwendung dieser Primerkombination wurde gezielt der ITS-Bereich amplifiziert (Abbildung 4, Punkt 2.2.3.3). Je nach Anforderung wurden in der zweiten PCR verschiedene Primerkombinationen eingesetzt. Um gezielt eine gesuchte Holzart nachzuweisen,

kamen die in dieser Arbeit entwickelten spezifischen Primer zur Anwendung. Zur Erarbeitung des ITS-Bereichs einer Probe wurde in der zweiten PCR der ITS1- (ITS1.1/ITS2.1) bzw. der ITS2-Bereich (ITS3.1/ITS4) amplifiziert (Abbildung 4, Punkt 2.2.3.3).

#### **2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Überprüfung der PCR-Amplifikate erfolgte über die Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine elektrophoretische Trennung von Substanzen, wie z.B. Nukleinsäuren oder Proteinen. Die Agarose, ein Polysaccharid der Rotalgengattungen *Gelidium* oder *Gracillaria*, bildet hierbei, in Abhängigkeit ihrer Konzentration, durch Aufkochen in einem Puffer unterschiedlich große Poren (1%ige Gele weisen Porengrößen um 150 nm, 0,15%ige Gele Porengrößen um 500 nm auf). Durch Anlegen eines elektrischen Felds an ein im Puffer befindliches Agarose-Gel, wandert die negativ geladene DNA in Richtung der Anode. Die Geschwindigkeit ist hierbei von der Länge und der Konformität der DNA abhängig. Kurze DNA-Fragmente wandern schneller als lange und Supercoiled-DNA schneller als lineare DNA.

Für die in dieser Arbeit erhaltenen DNA-Amplifikate wurden hauptsächlich 2,5%ige Agarose-Gele verwendet. Zur Herstellung eines solchen Gels wurden 2,5 g Agarose (Serva) in 100 ml 0,5%igem TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA) gelöst. Als Elektrophoresekammer wurde eine i-MUPID Mini Gelkammer (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) eingesetzt. Als Laufpuffer innerhalb der Kammer diente ebenfalls 0,5%iger TAE-Puffer. Für das Beladen eines Gels wurden 2,5 µl PCR-Produkt mit etwa 0,5 µl Loading Buffer (0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin in TAE-Puffer) versetzt. Zur Ermittlung der Größe der DNA-Fragmente kamen DNA-Ladder verschiedener Firmen zum Einsatz. Die Elektrophorese wurde für 30 min bei 135 V durchgeführt.

Im Anschluss an die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Anfärbung der Amplifikate. Dies wurde mithilfe von Ethidiumbromid realisiert (2 min in einem 0,00015 %igen Ethidiumbromidbad). Unspezifische Anfärbungen konnten durch einen anschließenden Waschschrift (20 min in Reinstwasser) entfernt werden. Die Auswertung des Gels erfolgte unter dem Dokumentationssystem GelDoc der Firma Bio-RAD Laboratories GmbH (München, Deutschland).

### 2.2.5 Aufreinigung

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das QIAquick® PCR Purification Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Durch eine Aufreinigung werden die zuvor eingebrachten Bestandteile der PCR, wie z.B. Primer, Enzyme, Nukleotide und Salze, entfernt. Die Entfernung der Bestandteile erfolgt durch folgende Schritte: Fällung der DNA, Binden der DNA auf eine Silikamatrix, zweimalige Verwendung eines Waschpuffers und Elution der DNA (Tabelle 17). Der gesamte Prozess der Aufreinigung folgt dem Ziel, eine optimale Sequenzierung der DNA-Fragmente zu gewährleisten.

Tabelle 17: Protokoll für die Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem QIAquick® PCR Purification Kit.

Aufreinigung des PCR-Produkts	
1.	PCR-Produkt und das 5fache Volumen PBI zusammenmischen (Probe muss gelb sein. Ist die Probe orange oder violett = Zugabe von 10µl 3M Na-Acetat, pH 5)
2.	Probe auf die QIAquick Spin-Säule geben
3.	30 s bei 8.000 rpm zentrifugieren
4.	Filtrat erneut auf die Säule geben
5.	30 s bei 8.000 rpm zentrifugieren
6.	Filtrat verwerfen
7.	600 µl PE dazugeben
8.	30 s bei 8.000 rpm zentrifugieren
9.	Filtrat verwerfen
10.	2ter Waschschrift mit 600 µl PE
11.	30 s bei 8.000 rpm zentrifugieren
12.	Filtrat verwerfen
13.	Die Säule 1 min bei 13.000 rpm trocken zentrifugieren
14.	Die Säule auf ein neues 1,5ml Eppi setzen
15.	Zugabe von 35-50 µl EB (je nach Stärke der Ausgangsbande)
16.	2 min Inkubation bei Raumtemperatur
17.	1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren
18.	Lagerung bei 4°C

### 2.2.6 Klonierung

Intention der Klonierung war, die intraindividuellen Unterschiede der ITS-Region zu untersuchen. Für die Versuche wurde das PCR Cloning<sup>plus</sup> Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

Der nachstehende Absatz gibt den allgemeinen Ablauf der Klonierung wieder. Im ersten Arbeitsschritt wird das mittels PCR amplifizierte DNA-Fragment, das im Anschluss an die PCR aufgereinigt wurde, in einen Plasmidvektor eingebaut. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Ligation. Die Ligation baut darauf auf, dass die mit der *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte grundsätzlich am 3'-Ende einen Adenin-Überhang aufweisen. Der im Klonierungs-Kit bereitgestellte pDrive Klonierungsvektor, der während der Ligation in linearisierter Form vorliegt, weist am 3'-Ende einen Uracil-Überhang auf. Durch diese komplementären Überhänge, den „sticky ends“, wird eine Hybridisierung mit hoher Spezifität sichergestellt. Am Ende der Ligation liegt ein zirkularisiertes rekombinantes Plasmid vor. Im Anschluss an die Ligation folgt die Transformation. Das Plasmid wird hier in sogenannte kompetente *Escherichia coli*-Zellen transformiert. Die Zellen (Qiagen EZ competent Cells) sind im verwendeten Kit enthalten. Nach erfolgreicher Transformation werden die Zellen auf einem LB-Nährmedium ausplattiert und kultiviert. Nach Abschluss der Kultivierung wird, als Vorbereitung für die M13-PCR, eine sogenannte Blau-Weiß-Selektion vorgenommen. Mit der M13-PCR wird die Amplifizierung des eingebauten Fragments erzielt. Das erhaltene PCR-Produkt wird im Anschluss wieder aufgereinigt und sequenziert. Ziel der Klonierung ist, dass am Ende jede auf dem Selektivmedium gewachsene Bakterien-Kolonie nur genau eine Kopie der ITS-Region als Information trägt.

#### 2.2.6.1 Ligation

Zur Durchführung der Ligation kam ausschließlich ein PCR-Produkt desselben Tags zur Anwendung, um hierdurch einen aus zu langer Lagerung resultierenden Abbau der Adenin-Überhänge am 3'-Ende zu verhindern. Vor der Ligation wurde das PCR-Produkt mithilfe des in Punkt 2.2.5 beschriebenen Protokolls aufgereinigt.

Die Ligation erfolgte durch Herstellen einer Lösung, die sich aus dem PCR-Produkt, dem Ligations Master Mix und dem pDrive Cloning Vector zusammensetzte (Tabelle 18). Die Lösung wurde für 2 h bei 10°C im Thermocycler inkubiert.

Tabelle 18: Pipettierschema für den Ligationsmix unter Verwendung des PCR Cloning<sup>plus</sup> Kits.

Komponente	µl
PCR-Produkt	4
2x Ligation Master Mix	5
pDrive Cloning Vector	1

#### 2.2.6.2 Transformation

Im Anschluss an die Ligation folgte die Transformation des rekombinanten Vektors in kompetente *Escherichia coli*-Zellen. Die kompetenten Zellen (EZ Competent Cells) lagerten bei -80°C und wurden 20 min vor Ende der Ligation auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurde den Zellen 2 µl des Ligationsprodukts hinzugegeben und die gesamte Lösung für 5 min auf Eis inkubiert. Auf die Inkubation folgte ein Hitzeschock, welcher für 40 s bei 42°C in einem Thermoblock ausgeführt wurde und ein Schließen der Zellen herbeiführte. Auf den Hitzeschock folgend, wurde die Lösung wieder für 2 min auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde der Lösung 250 µl SOC Medium (SOC = Super Optimal broth with Catabolite repression), das auf Raumtemperatur aufgewärmt wurde, hinzugegeben. Das durch das Kit bereitgestellte SOC-Medium (Trypton, Hefeextrakt, NaCl, KCl, Glucose, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, steriles Wasser) bewirkte hierbei eine Erhöhung der Transformations-Effizienz.

#### 2.2.6.3 Kultivierung auf LB-Agarplatten

Im direkten Anschluss an die Transformation wurden die *E. coli*-Zellen auf LB-Agarplatten (LB = lysogeny broth) kultiviert. Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton und 10 g NaCl in einem Liter Reinstwasser gelöst (Tabelle 19). Dem LB-Medium wurden vor der Weiterverarbeitung 250 ml entnommen. Diese Lösung diente später der Resuspendierung der gewachsenen Kolonien bzw. zur Herstellung von Flüssigkulturen. Die verbleibenden 750 ml des LB-Mediums wurden mit 11,25 g Oxoid Agar No. 1 (Thermo Scientific, Waltham, USA) versetzt und im Anschluss zusammen mit dem reinen LB-Medium für 30 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das LB-Agar-Medium auf ca. 50°C heruntergekühlt und, unter Verwendung von Sterilfiltern, mit 4 ml Ampicilin-Lösung (0,05 mg/ml) versetzt. War eine gute Verteilung der Ampicilin-Lösung gewährleistet, wurde das Medium auf Petrischalen ausgegossen. Wiesen die Agar-Platten einen ausreichenden

Grad an Aushärtung auf, so wurden für die spätere Blau-Weiß-Selektion (siehe 2.2.6.4) je 40 µl X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside; 40 mg/ml) mithilfe eines Drigalskispatels ausgestrichen. Nach dem Ausstreichen des X-Gals folgte das Ausplattieren von 30-50 µl der transformierten Zellen je Platte. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler TH 30 der Firma Edmund Bühler (Hechingen, Deutschland) kultiviert.

Für die spätere Verwendung wurde auch dem reinen LB-Flüssigmedium ein Antibiotikum zugesetzt. Zum Einsatz kamen 1,25 ml Kanamycin (0,05 mg/ml), für dessen Zugabe wiederum ein Sterilfilter genutzt wurde.

Tabelle 19: Rezept für die Herstellung des LB-Mediums. (LB = lysogeny broth)

Komponente	Menge
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Reinstwasser	1 l

#### 2.2.6.4 Blau-Weiß-Selektion

Die Selektion der rekombinanten Klone erfolgte mithilfe der Blau-Weiß-Selektion. Für eine optimale Selektion wurden die LB-Agarplatten, nach der Kultivierung im Inkubationsschüttler, für ca. 4-6 h bei 4°C gelagert.

Die Blau-Weiß-Selektion wird dadurch realisiert, dass das in den Vektor eingebaute DNA-Fragment die Codierung des *lacZ*-Gens unterbricht. So wird dieses Gen nicht exprimiert, was die Bildung des Enzyms β-Galactosidase, das X-Gal unter Freisetzung eines blauen Farbstoffs spaltet, verhindert. Somit erscheinen Kolonien, die rekombinante Vektoren enthalten, weiß. Kolonien ohne rekombinanten Vektor können das X-Gal spalten und zeigen dadurch eine blaue Färbung.

Aufgrund der zuvor erläuterten Vorgänge wurden von den LB-Agarplatten nur weiße Kolonien gepickt. Die einzelnen Kolonien wurden mittels einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und daraufhin in 20 µl LB-Flüssigmedium resuspendiert.

#### 2.2.6.5 M13-PCR

Unter Anwendung der M13-PCR konnte anhand der Länge der amplifizierten Fragmente überprüft werden, ob das gewünschte Teilstück in die Vektoren eingebaut wurde. Als Template kamen Aliquote der resuspendierten Kolonien, die im Verhältnis 1:10 mit LB-Flüssigmedium verdünnt wurden, zum Einsatz. Für den PCR-Mastermix wurde der in Tabelle 11 wiedergegebene Ansatz verwendet. Für die Zelllyse der im Mastermix vorhandenen Bakterien wurde eine Anfangsdenaturierung von 98°C gewählt. Als Primer für die PCR kamen M13for (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3') und M13rev (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') zum Einsatz (Annealingtemperatur: 50°C). Die zu verwendende Elongationszeit ergibt sich bei der M13-PCR aus dem eingebauten Fragment und zwei, insgesamt ca. 250 bp großen, Reststücken des verwendeten Plasmidvektors (Tabelle 20). Im Anschluss an die zur Überprüfung durchgeführte Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte mit der erwartenden Fragmentlänge.

Tabelle 20: PCR-Programm für eine M13-PCR. Für die PCR wurde das *Taq* PCR Core Kit (Qiagen) verwendet. Die erwartete Fragmentgröße bestimmt die Elongationszeit.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
Anfangsdenaturierung	98	4	
Denaturierung	94	0,5	} 35 Zyklen
Annealing	50	0,5	
Elongation	72	1/kb	
Endelongation	72	7	
Kühlung	4	-	

#### 2.2.7 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der PCR-Produkte fand außer Haus bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) statt. Jede Einzelstrangsequenzierung erforderte 15 µl des aufgereinigten PCR-Produkts. Die DNA-Konzentration der Lösung musste auf 5 ng/µl eingestellt werden. Die für die Sequenzierung benötigten Primer wurden dem Sequenzierservice zur Verfügung gestellt. Sie wiesen, bei einer Konzentration von 10 pmol/µl, ein Volumen von 15 µl auf.

Die Auswertung der erhaltenen Rohdaten erfolgte mit den Programmen MEGA5

(Tamura et al. 2011) und ClustalW (Thompson et al. 1994). Die Rohdaten sowie die erstellten ITS-Sequenzen wurden weiterhin mit der GenBank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) abgeglichen. Aufgrund der International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) werden durch einen Abgleich mit der Genbank ebenfalls weitere Datenbanken, wie das European Nucleotide Archive (ENA) vom Europäischen Bioinformatik-Institut und die DNA Data Bank of Japan (DDBJ) vom National Institute of Genetics, abgefragt. So ist sichergestellt, dass die Sequenzen stets mit dem größtmöglichen Datenpool verglichen werden.

### **2.2.8 Primerdesign für die rDNA ITS-Region**

Auf Basis der eigenen ITS-Sequenzen, die für den Aufbau der Sequenzdatenbank erarbeitet wurden, und den ITS-Sequenzen, die in der Sequenzdatenbank GenBank hinterlegt waren, wurden für jede Holzart spezifische Primer entwickelt. Diese spezifischen Primer dienen dem Zweck, Holzarten auf Gattungs- oder Art-Niveau zu identifizieren. Für die Entwicklung dieser spezifischen Primer wurden Sequenzen der gesuchten Art sowie Sequenzen weiterer Arten in ein Sequenzalignment geladen. Bei den weiteren Arten handelte es sich z.B. um zusätzliche Arten der Gattung, Arten nah verwandter Gattungen und die entsprechenden CITES- oder Austauschhölzer. Anhand des Alignments wurden spezifische Unterschiede in den Sequenzen ermittelt und diese auf ihre Anwendbarkeit als Primer überprüft. Für die Eignung eines Sequenzfragments als Primer muss dieses folgende Voraussetzungen erfüllen. (1) Die Länge sollte 18-24 bp betragen. (2) Das Optimum für die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) liegt bei 52-58°C. (3) Der GC-Gehalt befindet sich zwischen 40-65%. (4) Am 3'-Ende sollten innerhalb der letzten fünf Basen nicht mehr als drei G oder C vorhanden sein. (5) Die Ausbildung von Hairpins sollte vermieden werden. (6) Ebenfalls muss eine geringe Neigung zur Ausbildung von Eigen- oder Cross-Dimeren gewährleistet sein. (7) Es müssen di-Nukleotid Wiederholungen vermieden werden (Repeats; max. vier Stück). (8) Abschließend sollten nicht mehr als vier gleiche Basen hintereinander gewählt werden (Runs).

Bei der Entwicklung der spezifischen Primer wurden die angeführten Voraussetzungen durch die Verwendung der Software Primer Premier 5 (Premier Biosoft International, Palo Alto, USA; (Lalitha 2000)) überprüft.



---

### 3 Ergebnisse

Dieser Teil der Arbeit stellt die Ergebnisse der Entwicklung eines geeigneten DNA-Extraktionssystems für Kern- und altes Splintholz (3.1), des Aufbaus einer internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank (3.2), der Entwicklung von spezifischen Primern für die Holzartenidentifizierung (3.3) und die Validierung des entwickelten Schnelltests (3.4) dar.

Ab diesem Punkt werden für bestimmte Bereiche des ITS streng definierte Begriffe verwendet. So ist der ITS-Bereich definiert als 18S\*+ITS1+5.8S+ITS2+26S\* (\* = Teilbereich). Im Gegensatz dazu setzt sich der ITS nur aus ITS1+5.8S+ITS2 zusammen. Der ITS1- bzw. der ITS2-Bereich ist definiert als 18S\*+ITS1+5.8S\* bzw. 5.8S\*+ITS2+26S\*. Wird der Begriff ITS1 bzw. ITS2 verwendet, so handelt es sich ausschließlich um die variablen Bereiche ohne die codierende Regionen (Tabelle 21).

Weiter finden in diesem Abschnitt der Arbeit die sogenannten International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Nukleotidcodes Verwendung. Durch diese Codes können Positionen dargestellt werden, an denen der eindeutige Nachweis einer Base nicht möglich ist. Der Buchstabe N steht für die Basen Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) oder Guanin (G). Das Y repräsentiert die Basen C oder T (Tabelle 22).

Tabelle 21: Definition der Bezeichnung der einzelnen Internal Transcribed Spacer Bereiche.  
\* = Teilbereich

Bezeichnung	Bereiche
ITS-Bereich	18S*-ITS1-5.8S-ITS2-26S*
ITS	ITS1-5.8S-ITS2
ITS1-Bereich	18S*-ITS1-5.8S*
ITS2-Bereich	5.8S*-ITS2-26S*
ITS1	ITS1
ITS2	ITS2

Tabelle 22: IUPAC Nukleotidcode und zugehörige Basen.

IUPAC Nukleotid Code	Basen
R	A+G
M	A+C
W	A+T
S	G+C
Y	C+T
K	G+T
V	A+G+C
H	A+C+T
D	A+G+T
B	G+T+C
N	A+G+C+T

### 3.1 Entwicklung eines geeigneten DNA-Extraktionssystems für Kern- und Splintholz

Der Schwerpunkt wird folgend auf die Ergebnisse für die Entwicklung eines geeigneten DNA-Extraktionssystems gelegt. Hierfür wurden unterschiedliche Protokolle aus wissenschaftlichen Artikeln sowie kommerzielle DNA-Extraktionskits auf ihre Verwendbarkeit geprüft und gegebenenfalls für die eigene Verwendung angepasst. Eine Übersicht der untersuchten Methoden gibt Tabelle 8 aus Punkt 2.2.1 wieder. Die Untersuchung der verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden aus wissenschaftlichen Veröffentlichungen (vgl. Punkt 3.1.1) erfolgte teilweise im Rahmen einer (mit)betreuten Bachelorarbeit (Kulac 2012).

Für den Vergleich der verschiedenen Methoden kam bei allen Versuchen das gleiche Ausgangsmaterial zur Anwendung. Es bestand aus zwei Holzproben, die von der Max Cropp e.K., Hamburg, Deutschland, zur Verfügung gestellt wurden. Die erste Probe stellte ein Stück Splintholz von *Entandrophragma cylindricum* Sprague (Sprague), folgend bezeichnet als Ec, dar. Dieses Stück Splintholz zeichnete sich dadurch aus, dass es bereits Weiterverarbeitungsprozessen (Einschnitt und Trocknung) unterlegen hat, aber hieraus dennoch zuverlässig DNA extrahiert werden konnte. Weiterhin war die Amplifikation bzw. Sequenzierung der ITS-Region für diese Probe ohne Probleme möglich (Daten nicht gezeigt). Daher wurde dieses Stück Holz als Positiv-Kontrolle für

die DNA-Extraktionsversuche verwendet. Bei der zweiten Probe handelte es sich um ein Stück Kernholz von *Khaya ivorensis* A. Chev. (Ki). Die DNA der Probe Ki wurde in Vorversuchen mit dem DNeasy® Plant Mini Kit extrahiert. Die anschließende Amplifikation der erhaltenen DNA erwies sich aufgrund von Inhibitoren als unmöglich (Daten nicht gezeigt).

Die Extraktion der DNA erfolgte, je nach Autoren- oder Herstellerangaben, aus 50, 100 oder 200 mg Holzmehl. Die erhaltenen DNA-Eluate lagerten bei -80°C. Die Beurteilung der DNA-Extraktionen fand anhand von spektralphotometrischen Analysen statt. Des Weiteren wurde für jedes DNA-Eluat der jeweilige PCR-Erfolg ermittelt. Hierfür wurde die DNA mit der allgemeinen Primerkombination ITS1.1/ITS4 amplifiziert (2.2.3.3 und 3.2.1.2), da hierdurch sowohl die Holz-DNA als auch die DNA von im Holz befindlichen Pilzen amplifiziert wird. Die zusätzliche Amplifizierung der Pilz-DNA ermöglichte es, Aussagen darüber zu treffen, ob einerseits die Lysis für das Holz nicht ausreichte (nur Pilz wird amplifiziert) oder andererseits, eine Amplifizierung durch Inhibitoren verhindert wurde (keinerlei Amplifizierung möglich). In Anbetracht der verwendeten Primerkombination stellten in diesem Fall eine einzelne Holzbande (~700 bp), eine einzelne Pilzbande (~600 bp) und eine Doppelbande, bestehend aus einer Holz- und einer Pilzbande, einen PCR-Erfolg dar.

In einigen Versuchen wurde zur Amplifizierung der DNA das Qiagen *Taq* PCR Core Kit (siehe Kulac 2012) verwendet. Im Laufe der Versuche wurde dazu übergegangen, die Amplifizierung mit dem KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit der Firma Kapa Biosystems durchzuführen. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Proben, deren Amplifizierung mit dem *Taq* PCR Core Kit stattfand, ein weiteres Mal mit dem KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit bearbeitet.

### **3.1.1 CTAB-, SDS- und PTB-Extraktion**

#### **3.1.1.1 CTAB-Extraktion**

Nach Vollendung der DNA-Extraktion mittels der CTAB-Methode (Punkt 2.2.1.2.1), zeigt die spektralphotometrische Analyse, dass die Probe Ec einen DNA-Gehalt von 129 ng/µl aufweist. Das 260/280- bzw. das 260/230-Verhältnis liegt für diese Probe bei 1,38 bzw. 0,43. Mit 12,4 ng/µl ist der DNA-Gehalt der Probe Ki um das 10-fache niedriger. Auch die 260/280- bzw. 260/230-Verhältnisse zeigen mit 0,84 und 0,17 schlechtere Werte (Tabelle 23). Bei der Beurteilung der DNA-Kurven wird deutlich,

dass diese nicht den typischen Verlauf, der bei „reiner“ DNA auftritt, aufweisen. Der typische Peak bei 260 nm ist nicht ausgebildet. Auch das „Tal“, das bei 230 nm erwartet wird, fehlt völlig. Anstatt des sinusähnlichen Verlaufs, zeigt die Kurve eher einen linearen Verlauf (Abbildung 5).

Tabelle 23: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der CTAB-Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4. (Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurden sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
Ec	129,0	2,58	1,87	1,38	0,43	38,70	✓
Ki	12,4	0,25	0,30	0,84	0,17	3,72	✓ (Pilz)

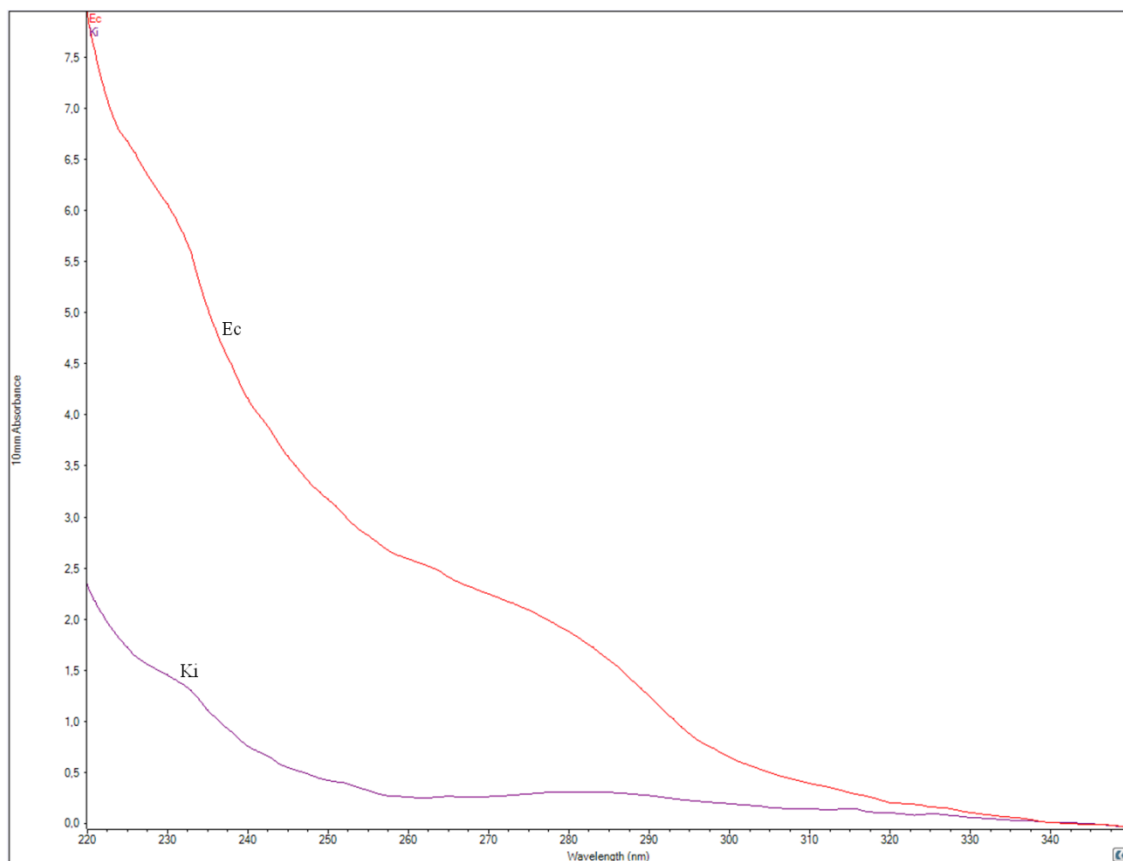


Abbildung 5: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec (*Entandrophragma cylindricum*) und Ki (*Khaya ivorensis*) nach Durchführung der CTAB-Extraktion. Auftrag = 1 µl.

Im Anschluss an die Messungen erfolgte, mittels der Primerkombination ITS1.1/ITS4, die Amplifizierung der DNA (Tabelle 16). Zur Anwendung kamen folgende Template-Variationen: 1 µl (Ec = 129 ng, Ki = 12,4 ng), 0,5 µl (Ec = 64,5 ng, Ki = 6,2 ng) und je 1 µl einer 1:10 (Ec = 12,9 ng, Ki = 1,24 ng), 1:100 (Ec = 1,29 ng,

Ki = 0,124 ng) und 1:1000 (Ec = 0,129 ng, Ki = 0,0124 ng) Verdünnung. Diese Primerkombination bzw. diese Template-Variationen (bezogen auf die Volumina) kamen, soweit nicht anders angegeben, für alle DNA-Extraktionsversuche zum Einsatz. Für die Probe Ec konnten alle fünf Templates, mit je einer Bande für Holz (~700 bp) und Pilz (~600 bp), amplifiziert werden. Für die Probe Ki war eine Amplifizierung bei der 1:100 bzw. der 1:1000 Verdünnung nicht möglich. Die anderen drei Template-Variationen zeigten lediglich eine Pilzbande (Tabelle 23, PCR-Erfolg).

### 3.1.1.2 SDS-Extraktion

Im Vergleich zur CTAB-Extraktion zeigt die SDS-Extraktion (Punkt 2.2.1.2.2) höhere DNA-Gehalte (Tabelle 24). Für die Probe Ec 0,3% SDS liegt der DNA-Gehalt bei 308,4 ng/μl (260/280 = 1,14; 260/230 = 0,40). Probe Ec 1% SDS weist 515,5 ng/μl (260/280 = 1,08; 260/230 = 0,33) auf. Betrachtet man die Absorptionswerte für die Messpunkte 260 und 280 nm, so wird deutlich, dass hier höhere Einzelwerte als bei der CTAB-Extraktion gemessen wurden. So ergeben sich für die 0,3%/1% SDS-Puffer Werte von 6,17/10,31 und 5,43/9,56. Auch die Probe Ki wies höhere Messwerte auf. Der DNA-Gehalt liegt bei dieser Probe, für den Puffer mit 0,3% SDS, bei 52,1 ng/μl (260/280 = 0,98; 260/230 = 0,31). Der Einsatz des Puffers mit 1% SDS ergab am Ende der DNA-Extraktion einen DNA-Gehalt von 75,2 ng/μl (260/280 = 0,93; 260/230 = 0,27). Betrachtet man die erhaltenen Absorptionskurven, so wird ein vergleichbarer Verlauf wie in der CTAB-Extraktion aus Punkt 3.1.1.1 deutlich. Lediglich Probe Ec 0,3% zeigt im Vergleich zu den anderen Proben eine Abweichung. Diese Abweichung zeichnet sich dadurch aus, dass diese Kurve ihr Maximum im Bereich von 230 nm ausbildet (Abbildung 6).

Tabelle 24: Spektralphotometrische Analyse von je 1 μl der DNA-Eluate der SDS-Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4. (Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; 0,3 bzw. 1% SDS-Konzentration; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurden sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
Ec 0,3%	308,4	6,17	5,43	1,14	0,40	92,52	✓
Ki 0,3%	52,1	1,04	1,06	0,98	0,31	15,63	-
Ec 1%	515,5	10,31	9,56	1,08	0,33	154,65	✓
Ki 1%	75,2	1,51	1,63	0,93	0,27	22,56	-

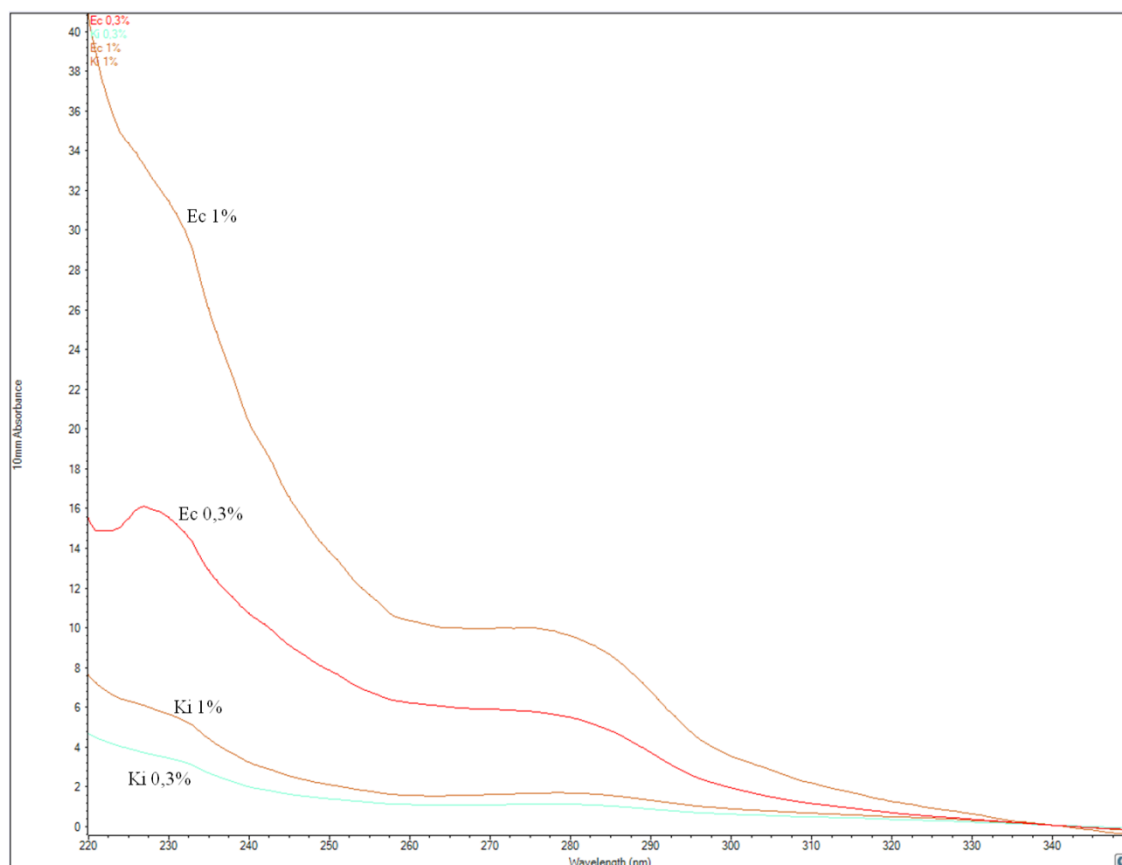


Abbildung 6: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec (*Entandrophragma cylindricum*) und Ki (*Khaya ivorensis*) nach Durchführung der SDS-Extraktion. SDS-Konzentration 0,3 bzw. 1%. Auftrag = 1 µl.

Eine Amplifizierung des ITS-Bereichs mittels der Primerkombination ITS1.1/ITS4 war für Probe Ki nicht möglich. Probe Ec zeigte für beide Pufferversionen (0,3 bzw. 1% SDS) lediglich bei der 1:1000 Verdünnung (Ec 0,3% = 0,308 ng; Ec 1% = 0,516 ng) eine schwache Doppelbande (Tabelle 24, PCR-Erfolg).

### 3.1.1.3 Kombination des CTAB- und des SDS-Puffers

Wird die DNA aus den Hölzern Ec und Ki nach der CTAB/SDS-Methode (Punkt 2.2.1.2.3) extrahiert, liegt der DNA-Gehalt des erhaltenen Eluats für die Probe Ec bei beiden Pufferversionen (pH 5,1 und pH 7,2) deutlich niedriger als bei den vorangegangenen DNA-Extraktionsversuchen. Die spektralphotometrische Analyse ergibt DNA-Gehalte von 28,6 (pH 5,1) und 36,9 ng/µl (pH 7,2). Probe Ki weist Werte von 31,2 (pH 5,1) und 24,1 ng/µl (pH 7,2) auf. Drei der vier Werte des 260/280 Absorptionsverhältnisses liegen zwischen 0,78 und 0,82. Lediglich Probe Ki pH 5,1 zeigt einen Wert von 1,26. Für das 260/230 Verhältnis ergeben sich Werte von

0,07-0,15 (Tabelle 25). Die Absorptionskurven zeigen zwischen 340 und 260 nm ihr Maximum bei 280 nm. Ab 260 nm steigen die Kurven stark an. Diesen Anstieg zeigt Probe Ki pH 5,1 ebenfalls, jedoch ist bei 230 nm ein kurzzeitiger Abfall der Absorption zu beobachten (Abbildung 7).

Tabelle 25: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der CTAB/SDS-Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4. Eingestellter pH-Wert des Extraktionspuffers: 5,1 und 7,2. (Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurden sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
Ec pH 5,1	28,6	0,57	0,74	0,78	0,15	8,58	✓
Ki pH 5,1	31,2	0,63	0,50	1,26	0,07	9,36	-
Ec pH 7,2	36,9	0,74	0,90	0,82	0,15	11,07	✓
Ki pH 7,2	24,1	0,48	0,61	0,78	0,10	7,23	-

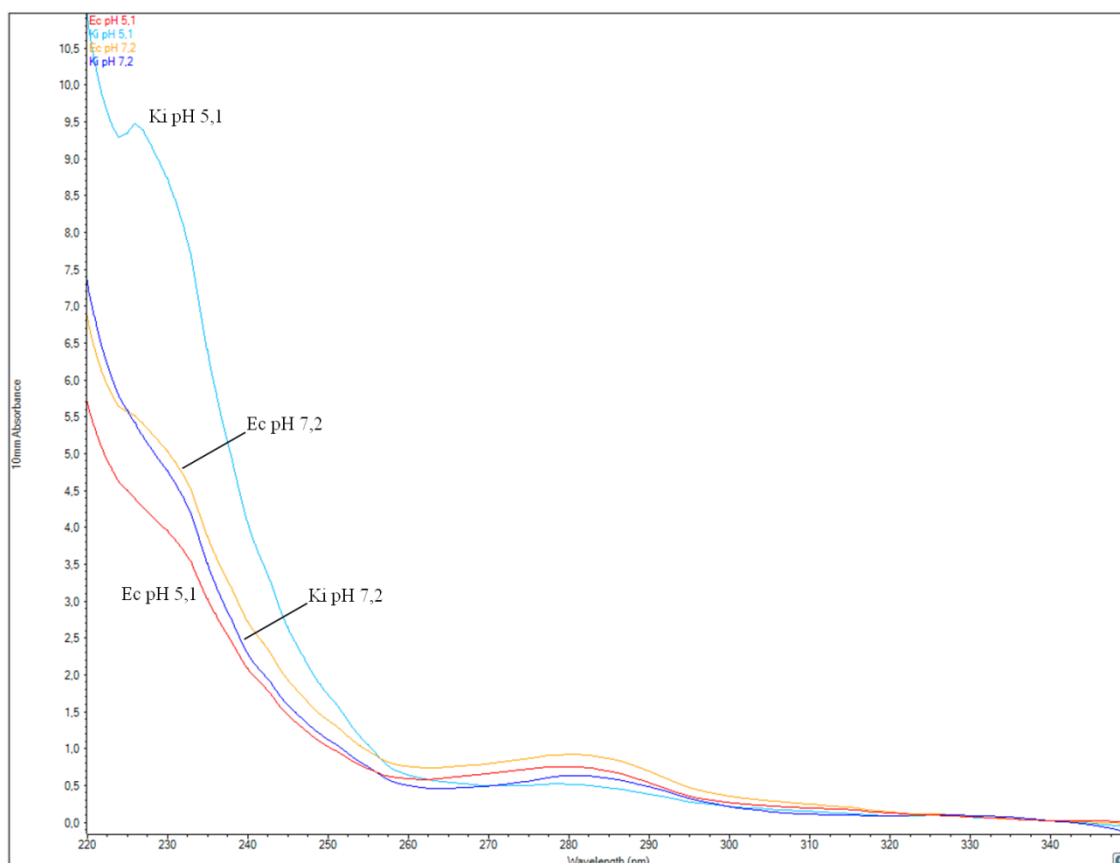


Abbildung 7: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec (*Entandrophragma cylindricum*) und Ki (*Khaya ivorensis*) nach Durchführung der CTAB/SDS-Extraktion. Eingestellter pH-Wert des Extraktionspuffers: 5,1 und 7,2. Auftrag = 1 µl.

Die Amplifikation des ITS-Bereichs ergab für Probe Ki wiederum kein DNA-Fragment. Probe Ec konnte lediglich bei den Templates 0,5 und 1 µl amplifiziert werden (Tabelle 25, PCR-Erfolg). Hierbei verdeutlichte eine stärkere Bande bei ca. 600 bp, dass mehr Pilz- als Holz-DNA amplifiziert wurde.

#### 3.1.1.4 PTB-Extraktion

Die PTB-Extraktion stellt eine weitere Methode dar, mit der die DNA aus den Hölzern Ec und Ki extrahiert wurde (Punkt 2.2.1.2.4). Sie weist von den bisher dargestellten DNA-Extraktionsmethoden die besten 260/280-Verhältnisse auf. Die Proben Ec und Ki zeigen Werte von 1,64 und 2,20. Für das 260/230-Verhältnis konnte dagegen, mit Werten von 0,47 und 0,18, keine wesentliche Verbesserung erzielt werden. Die DNA-Gehalte der extrahierten Proben liegen mit 101,2 (Ec) und 8,3 ng/µl (Ki) bei vergleichbaren Werten, wie für die CTAB-Extraktion ermittelt (Tabelle 26). Trotz des verbesserten 260/280-Verhältnisses beider Proben, zeigen die Absorptionskurven immer noch keinen typischen Verlauf. Es liegt wiederum nur ein linearer Anstieg der Kurve vor (Abbildung 8).

Trotz der teilweise besseren Werte der spektralphotometrischen Analyse konnte, unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4, keines der DNA-Templates amplifiziert werden (Tabelle 26, PCR-Erfolg).

Tabelle 26: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der PTB-Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4. (Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurden sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
Ec	101,2	2,02	1,23	1,64	0,47	30,36	-
Ki	8,3	0,17	0,08	2,20	0,18	2,49	-



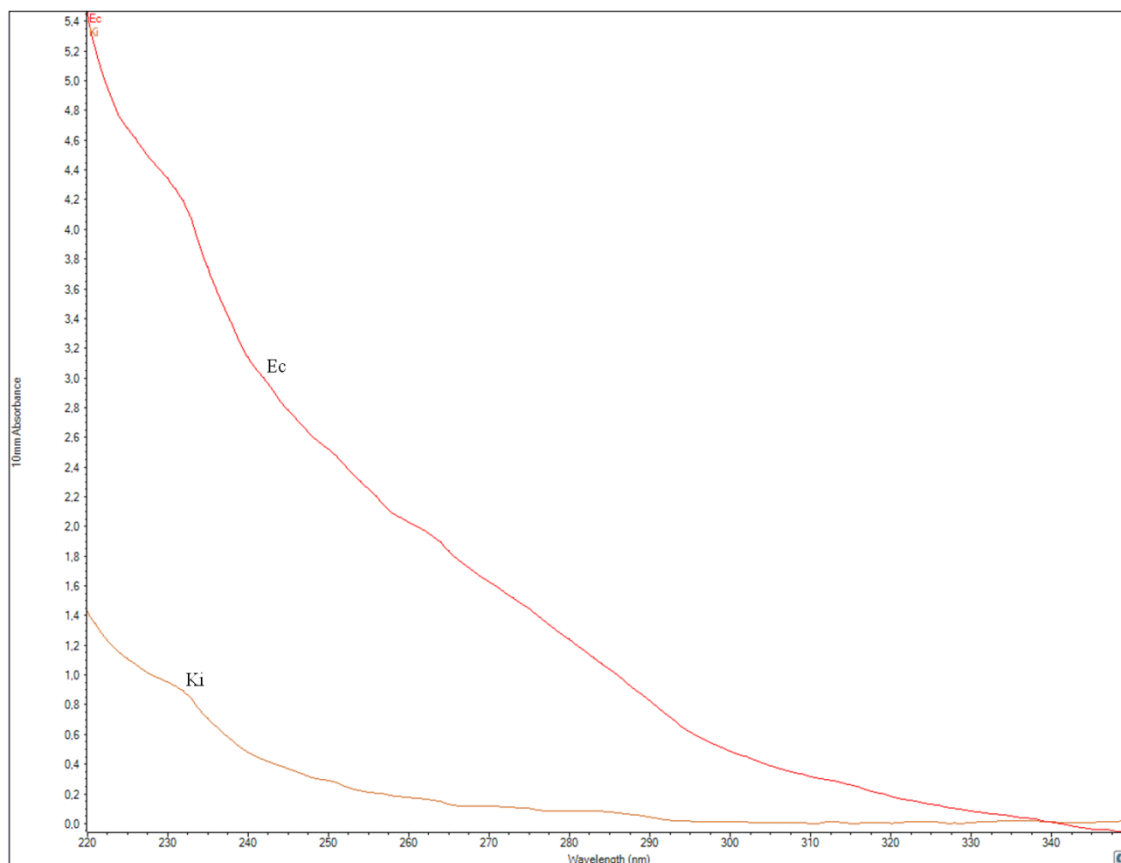


Abbildung 8: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec (*Entandrophragma cylindricum*) und Ki (*Khaya ivorensis*) nach Durchführung der PTB-Extraktion. Auftrag = 1 µl.

### 3.1.2 Überprüfung kommerzieller DNA-Extraktionskits

Weiter folgen die Ergebnisse, die mittels Einsatz verschiedener DNA-Extraktionskits diverser Hersteller erzielt wurden (Tabelle 27). Auf die Untersuchung des DNeasy® Plant Mini Kits der Firma Qiagen wurde verzichtet. Vorversuche verdeutlichten, dass sich dieses Kit für die Extraktion von DNA aus Kernholz nicht eignet (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse werden zusammengefasst dargestellt, da keines dieser Systeme eine spätere Amplifizierung der DNA der Probe Ki ermöglichte. Bei den verwendeten Kits handelte es sich um DNA-Extraktionssysteme für verschiedene Ausgangsmaterialien, wie Pflanzen, Erde und Stuhl. Die Extraktion der DNA erfolgte wiederum aus 100 mg Holzmehl und verlief nach den Herstellerangaben. Eine Auflistung der verwendeten Kits, deren Kürzel sowie deren Hersteller gibt Tabelle 27 wieder.

Tabelle 27: Auflistung der kommerziellen DNA-Extraktionskits inkl. des Produktnamens, des verwendeten Kürzels und des entsprechenden Herstellers.

<b>Kit</b>	<b>Kürzel</b>	<b>Hersteller</b>
innuSPEED Plant DNA Kit	iSP	Analytik Jena, Jena, Deutschland
innuSPEED Soil DNA Kit	iSS	
innuSPEED Stool DNA Kit	iSSt	
peqGOLD Plant DNA Mini Kit	pGP	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kit	NPP	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
NucleoSpin® Soil Kit	NSS	Machery-Nagel, Düren, Deutschland

Das innuSPEED Soil DNA Kit (iSS) erbrachte mit 2,1 ng/μl, den geringsten DNA-Gehalt für die Probe Ec. Mit nur 9,4 ng/μl liegt das innuSPEED Plant DNA Kit (iSP) in einem vergleichbaren Bereich für diese Probe. Die Verwendung der Kits Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction (NPP), NucleoSpin® Soil (NSS) und peqGOLD Plant DNA Mini (pGP) ergab Werte zwischen 70,7 und 97,3 ng/μl. Der höchste DNA-Gehalt für Probe Ec wurde nach der Verwendung des innuSPEED Stool DNA Kits (iSSt) gemessen (299,1 ng/μl). Für Probe Ki weisen die gemessenen DNA-Gehalte eine wesentlich homogenere Verteilung auf. So liegen fünf der sechs untersuchten Kits zwischen 2,5 und 12,4 ng/μl. Lediglich das Kit NPP ermöglichte mit 61,2 ng/μl eine Steigerung des DNA-Gehalts. Die für die Proben Ec und Ki erhaltenen 260/230-Verhältnisse liegen mit 0,02-0,75 deutlich unter dem geforderten Wert von 1,8-2,2. Eine inhomogenere Verteilung der Werte ist bei dem Absorptionsverhältnis 260/280 zu beobachten. So ergeben sich für die Proben Ec und Ki unter Verwendung des iSS Kits negative Werte von -1,32 und -1,45. Diese negativen Verhältnisse resultieren aus den gemessenen Absorptionen (-0,03 und -0,04) bei der Wellenlänge von 280 nm. Deutlich über dem idealen Wert von 1,8-2,0 liegen die Verhältnisse von Ki pGP, Ec NPP und Ki NPP. Hier wurden Verhältnisse von 4,33, 3,64 und 4,31 errechnet. Mit 1,77, 1,76 und 1,94 zeigen die Proben Ec iSP, Ki iSP und Ec pGP die besten 260/280 Absorptionsverhältnisse (Tabelle 28).

Tabelle 28: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der kommerziellen DNA-Extraktionskits und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.

(Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; iSP = innuSPEED Plant DNA Kit, iSS = innuSPEED Soil DNA Kit, iSSt = innuSPEED Stool DNA Kit, pGP = peqGOLD Plant DNA Mini Kit, NPP = Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kit, NSS = NucleoSpin® Soil Kit; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurden sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
Ec iSP	9,4	0,19	0,11	1,77	0,55	4,70	✓
Ki iSP	4,2	0,08	0,05	1,76	0,21	2,10	-
Ec iSS	2,1	0,04	-0,03	-1,32	0,02	1,05	✓
Ki iSS	2,5	0,05	-0,04	-1,45	0,03	1,25	-
Ec iSSt	299,1	5,98	3,79	1,58	0,75	149,55	✓
Ki iSSt	12,4	0,25	0,21	1,16	0,19	6,20	-
Ec pGP	97,3	1,95	1,01	1,94	0,44	48,65	✓
Ki pGP	5,2	0,10	0,02	4,33	0,39	2,60	-
Ec NPP	70,7	1,42	0,39	3,64	0,32	35,35	✓
Ki NPP	61,2	1,22	0,28	4,31	0,27	30,60	-
Ec NSS	87,3	1,75	1,27	1,38	0,55	43,65	✓
Ki NSS	4,0	0,08	0,08	1,02	0,42	2,00	-

Für alle aufgezeigten DNA-Extraktionskits wurde wieder eine Amplifikation des ITS-Bereichs durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, kamen wiederum die in den vorherigen Punkten angeführten Template-Variationen zur Anwendung. Zusammenfassend ergibt sich für Probe Ki, dass in keinem Fall eine Amplifikation der DNA möglich war. Für Probe Ec war für alle Kits unter Verwendung der Templates 1 µl, 0,5 µl und der 1:10 Verdünnung, die Amplifikation einer Doppelbande zu verzeichnen. Die Holz- und Pilz-DNA wurden gleichermaßen amplifiziert. Für die 1:100 bzw. die 1:1000 Verdünnung wiesen lediglich Probe Ec iSP und Probe Ec iSS keinerlei Amplifikat auf (Tabelle 28, PCR-Erfolg).

### 3.1.3 Modifikationen kommerzieller DNA-Extraktionskits

#### 3.1.3.1 Zugabe von PVP zum Lysis-Puffer des DNeasy® Plant Mini Kits

Nachfolgend werden die Ergebnisse der modifizierten DNeasy® Plant Mini Extraktion (Rachmayanti et al. 2006) präsentiert (Punkt 2.2.1.2.5). Zur Deutung bzw. besseren Vergleichbarkeit der Resultate, erfolgte parallel eine DNA-Extraktion mit dem

herkömmlichen Protokoll des DNeasy® Plant Mini Kits (Protokoll nach Herstellerangaben).

Tabelle 29: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der mit PVP versetzten DNeasy® Plant Mini Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4. Zum Vergleich werden zwei Eluate, die ohne PVP extrahiert wurden, dargestellt.

(Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurden sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
Ec PVP	10,4	0,21	0,12	1,73	1,84	5,20	✓
Ki PVP	5,6	0,11	0,09	1,31	1,32	2,80	-
Ec	15,1	0,30	0,19	1,56	1,85	7,55	✓
Ki	2,7	0,05	0,04	1,45	-1,18	1,35	-

In Anbetracht der Ergebnisse wird deutlich, dass sich die erhaltenen Absorptionswerte beider Proben unter Verwendung von PVP im Lysis-Puffer verbessern oder nahezu gleich bleiben (Tabelle 29). Probe Ec PVP weist für das 260/280 Verhältnis eine Verbesserung von 1,56 auf 1,73 (260/230 → 1,85 zu 1,84) auf. Für Probe Ki PVP ergibt sich eine Steigerung des 260/230 Verhältnisses von -1,18 auf 1,32 (260/280 → 1,45 zu 1,31). Der DNA-Gehalt bei Probe Ec PVP hat sich von 15,1 auf 10,4 ng/µl verschlechtert. Im Gegensatz dazu steht die Steigerung der DNA-Konzentration bei Probe Ki PVP (2,7 auf 5,6 ng/µl). Die Absorptionskurven von Probe Ec PVP bzw. Ec zeigen den typischen Verlauf, der in Anwesenheit „reiner“ DNA zu erwarten ist. Die Kurve von Probe Ki PVP deutet erstmalig Ansätze des typischen Verlaufs an. Zwar ist der erwartete Peak bei 260 nm zu beobachten, jedoch verläuft die Absorptionskurve zwischen 340 und 260 nm eher linear. Des Weiteren ist die Absorption bei 230 nm deutlich zu niedrig ausgeprägt. Insgesamt zeigt die Kurve, wie auch bei Probe Ki, einen unruhigen Verlauf, der typisch für sehr kleine Absorptionswerte ist (Abbildung 9).

Probe Ec PVP bzw. Probe Ec wiesen bei der Amplifikation des ITS-Bereichs für alle Templates eine Doppelbande auf. Für Probe Ki PVP oder Probe Ki war keine Amplifikation möglich (Tabelle 29, PCR-Erfolg).

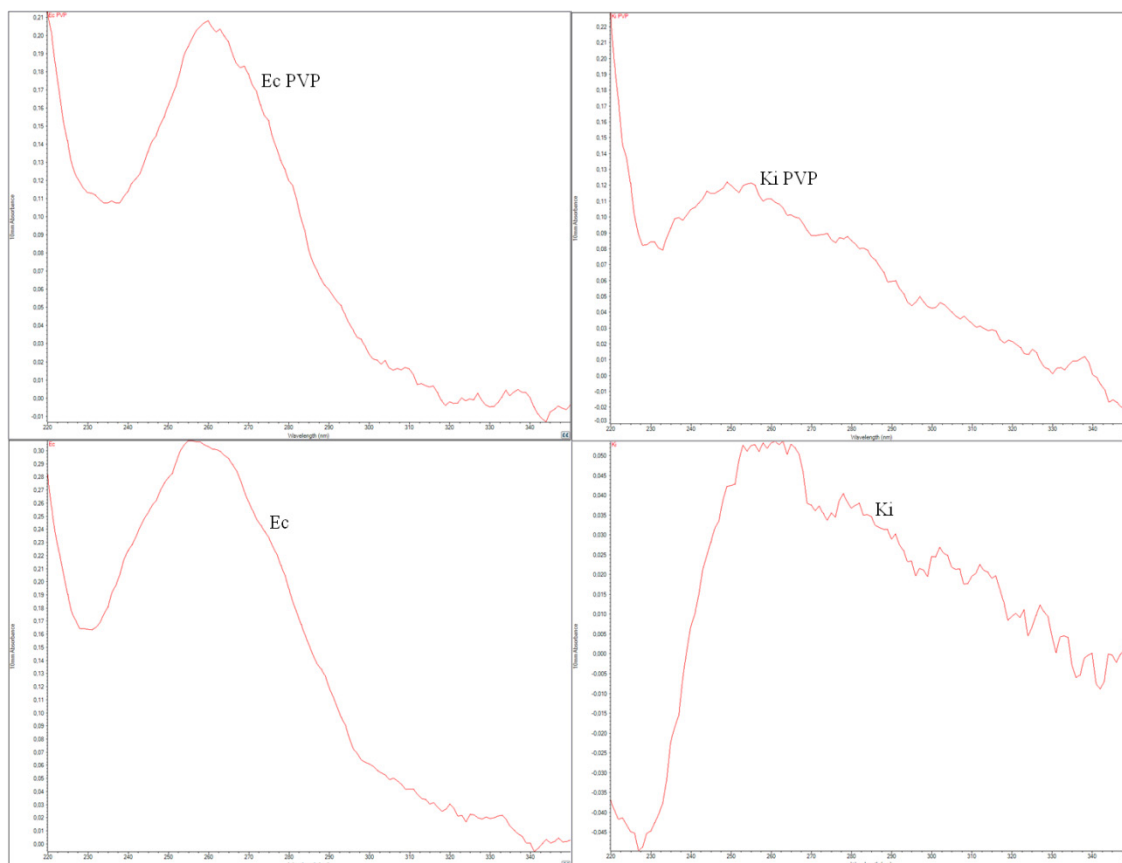


Abbildung 9: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec (*Entandrophragma cylindricum*) und Ki (*Khaya ivorensis*) nach Durchführung der mit PVP versetzten DNeasy® Plant Mini Extraktion. Zum Vergleich werden zwei Eluate dargestellt, die ohne PVP extrahiert wurden. Auftrag = 1 µl.

### 3.1.3.2 Kombination des CTAB-Extraktionspuffers mit dem DNeasy® Plant Mini Kit

Der folgende Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine Kombination des CTAB-Extraktionspuffers mit dem DNeasy® Plant Mini Kit eine Verbesserung der Ergebnisse bewirkt (2.2.1.2.6). Für einen besseren Vergleich wurden wiederum die Werte für die unmodifizierte DNeasy®-Extraktion angegeben.

Durch die Verwendung des CTAB-Puffers konnte der DNA-Gehalt des Eluats von Probe Ec DN CTAB um das 4,6-fache, auf 68,8 ng/µl, gegenüber der Probe Ec gesteigert werden. Die Absorptionsverhältnisse fallen dagegen niedriger aus. Für das 260/280-Verhältnis ergibt sich ein Wert von 1,34 (260/230-Verhältnis = 0,53). Probe Ki DN CTAB zeigt ebenfalls eine Steigerung des DNA-Gehalts. Hier liegt der gemessene Wert bei 6,8 ng/µl. Mit 1,13 (260/280) und 0,83 (260/230) liegen die Werte für die Absorptionsverhältnisse wieder unter den geforderten (Tabelle 30).

Die Absorptionskurve von Ec DN CTAB steigt bei 300 nm an und weist zwischen 270

und 260 nm eine schwach ausgeprägte Schulter auf. Ein hierauf abfallender Verlauf, der bei 230 nm sein Minimum hat, ist nicht gegeben. Im Gegensatz hierzu steht die Kurve von Ki DN CTAB. Diese zeigt zwar aufgrund der niedrigen Absorptionswerte eine unruhige Struktur, jedoch ist der typische Verlauf „reiner DNA“ zu erkennen. Lediglich das Minimum bei 230 nm ist schwach ausgeprägt. (Abbildung 10).

Tabelle 30: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der mit dem CTAB-Extraktionspuffer kombinierten DNeasy® Plant Mini Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4. Zum Vergleich werden zwei Eluate dargestellt, die mit dem klassischen DNeasy® Plant Mini Kit extrahiert wurden. (Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurde sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
Ec DN CTAB	68,8	1,38	1,03	1,34	0,53	34,40	✓
Ki DN CTAB	6,8	0,14	0,12	1,13	0,83	3,40	-
Ec	15,1	0,30	0,19	1,56	1,85	7,55	✓
Ki	2,7	0,05	0,04	1,45	-1,18	1,35	-

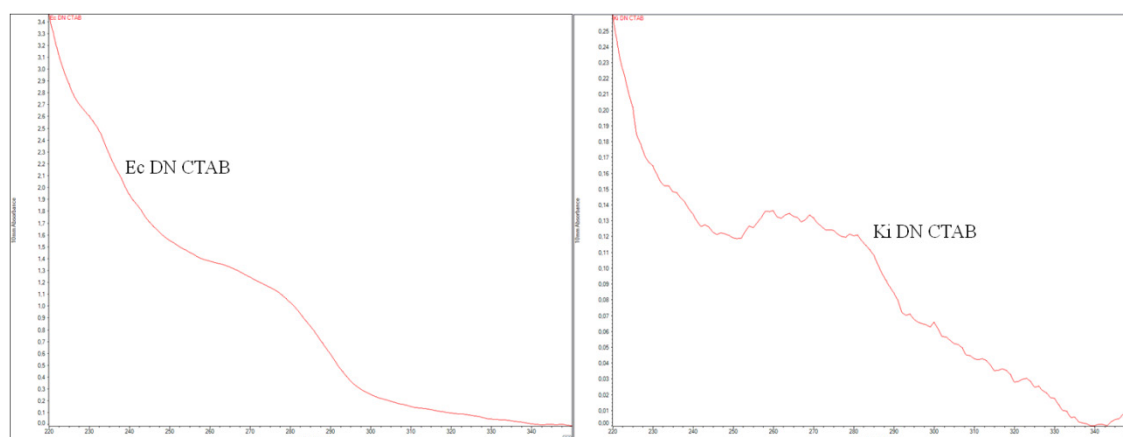


Abbildung 10: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec (*Entandrophragma cylindricum*) und Ki (*Khaya ivorensis*) nach Durchführung der mit dem CTAB-Extraktionspuffer kombinierten DNeasy® Plant Mini Extraktion Auftrag = 1 µl.

Die Amplifikation des ITS-Bereichs wies für alle Templates der Probe EC DN CTAB eine Doppelbande auf. Probe Ki DN CTAB zeigte in keiner Variation eine Bande (Tabelle 30, PCR-Erfolg).

### 3.1.3.3 Kombination des PTB-Extraktionspuffers mit dem DNeasy® Plant Mini Kit

Erickson et al. (2005) verwendeten den in Punkt 2.2.1.2.4 angeführten DNA-Extraktionspuffer in Kombination mit dem DNeasy® Plant Mini Kit. Jene Kombination wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht (Punkt 2.2.1.2.7). Als Standard sind wiederum die Werte der klassischen DNeasy®-Extraktion wiedergegeben. Unter Verwendung des PTB-Extraktionspuffers konnte, im Vergleich zur klassischen DNeasy®-Extraktion, eine deutliche Steigerung der DNA-Konzentrationen erzielt werden. Ec DN PTB und Ki DN PTB weisen Konzentrationen von 158,1 bzw. 98,8 ng/µl auf. Betrachtet man die 260/280 (1,53-1,55) sowie die 260/230 (0,67-0,72) Verhältnisse der Proben Ec DN PTB und Ki DN PTB, so wird deutlich, dass diese in einem sehr ähnlichen Bereich liegen (Tabelle 31). Entgegen den erhöhten DNA-Gehalten bzw. den verbesserten 260/280-Verhältnissen steht der Verlauf der beiden Absorptionskurven. Diese zeigen bis 225 nm einen nahezu linearen Anstieg und fallen dann wieder ab (Abbildung 11).

Tabelle 31: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der mit dem PTB-Extraktionspuffer kombinierten DNeasy® Plant Mini Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4. Zum Vergleich werden zwei Eluate dargestellt, die mit dem klassischen DNeasy® Plant Mini Kit extrahiert wurden. (Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurde sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
Ec DN PTB	158,1	3,16	2,06	1,53	0,72	79,05	✓
Ki DN PTB	98,8	1,98	1,27	1,55	0,67	49,40	-
Ec	15,1	0,30	0,19	1,56	1,85	7,55	✓
Ki	2,7	0,05	0,04	1,45	-1,18	1,35	-

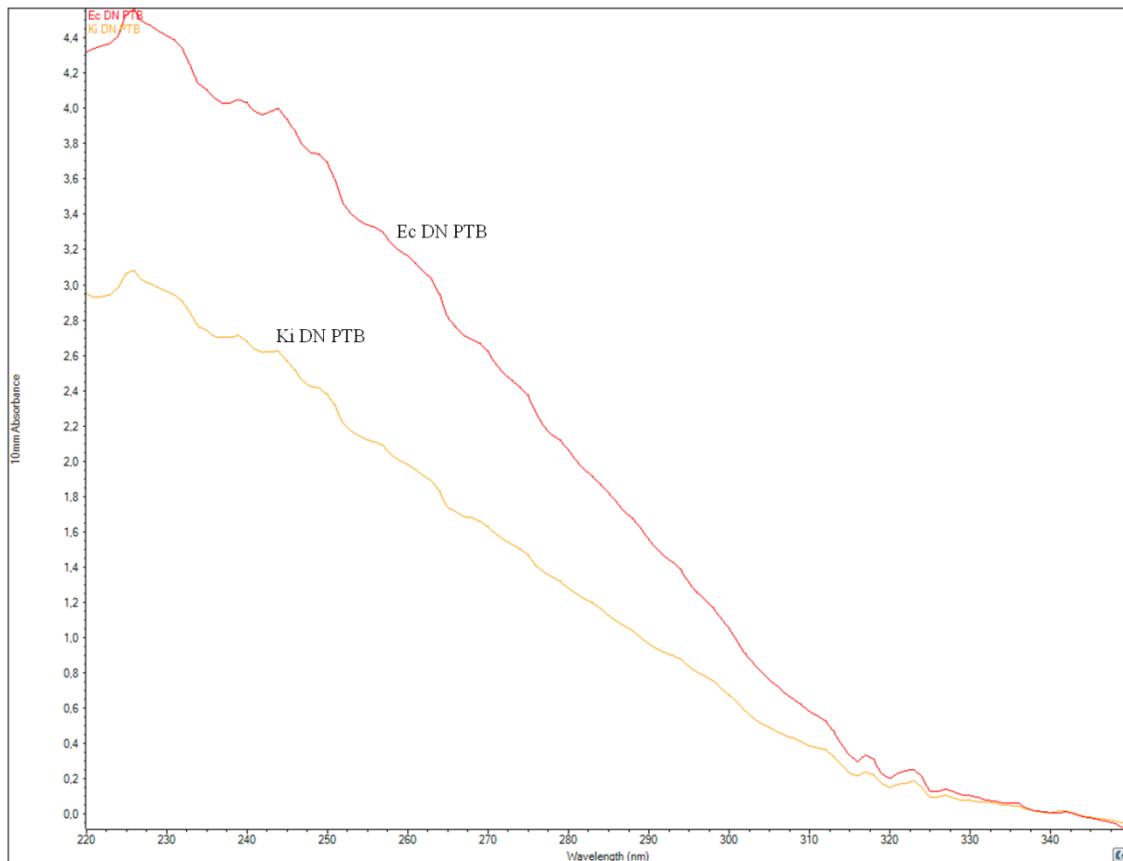


Abbildung 11: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec (*Entandrophragma cylindricum*) und Ki (*Khaya ivorensis*) nach Durchführung der mit dem PTB-Extraktionspuffer kombinierten DNeasy® Plant Mini Extraktion Auftrag = 1 µl.

Die Amplifikation des ITS-Bereichs mittels des Primerpaars ITS1.1/ITS4 ergab für die fünf Template-Variationen der Probe Ec jeweils die erwartete Doppelbande. Trotz der teilweise hohen DNA-Gehalte war für Probe Ki in keinem Fall eine Amplifikation möglich (Tabelle 31, PCR-Erfolg).

#### 3.1.3.4 Verwendung eines modifizierten DNeasy® mericon™ Food Kit Protokolls

Weiter werden die Ergebnisse der Verwendung eines modifizierten DNeasy® mericon™ Food Kits (Mm) zur DNA-Extraktion aus Holz dargestellt. Das DNA-Extraktionsprotokoll wurde in der in Punkt 2.2.1.2.8 beschriebenen Weise verändert.

Für die Probe Ec Mm wurde nach Verwendung der modifizierten mericon™-Extraktion ein DNA-Gehalt von 108,0 ng/µl gemessen. Mit 1,70 liegt das 260/280 Verhältnis nur knapp unter dem geforderten Wert von 1,80. Für das 260/230 Verhältnis ergibt sich der Wert 1,30. Der DNA-Gehalt von Probe Ki Mm verzeichnet einen Wert von 34,1 ng/µl.



Die Absorptionsverhältnisse 260/280 und 260/230 liegen für Ki Mm bei 1,57 und 1,10 (Tabelle 32).

Die Absorptionskurve von Ec Mm zeigt den gewünschten Verlauf und bestätigt die guten Ergebnisse dieser DNA-Extraktion. Die Kurve von Ki Mm bildet zwar bei 260 nm ihr Maximum aus, der vorhergehende Anstieg ist jedoch nur schwach ausgeprägt. Ebenfalls fehlt das charakteristische Minimum bei 230 nm sowie der darauf folgende Anstieg bis 220 nm (Abbildung 12).

Tabelle 32: Spektralphotometrische Analyse von je 1 µl der DNA-Eluate der modifizierten DNeasy® mericon™ Food Kit Extraktion und Darstellung des PCR-Erfolgs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4.

(Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurde sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
Ec Mm	108,0	2,16	1,27	1,70	1,30	54,00	✓
Ki Mm	34,1	0,68	0,43	1,57	1,10	17,05	✓

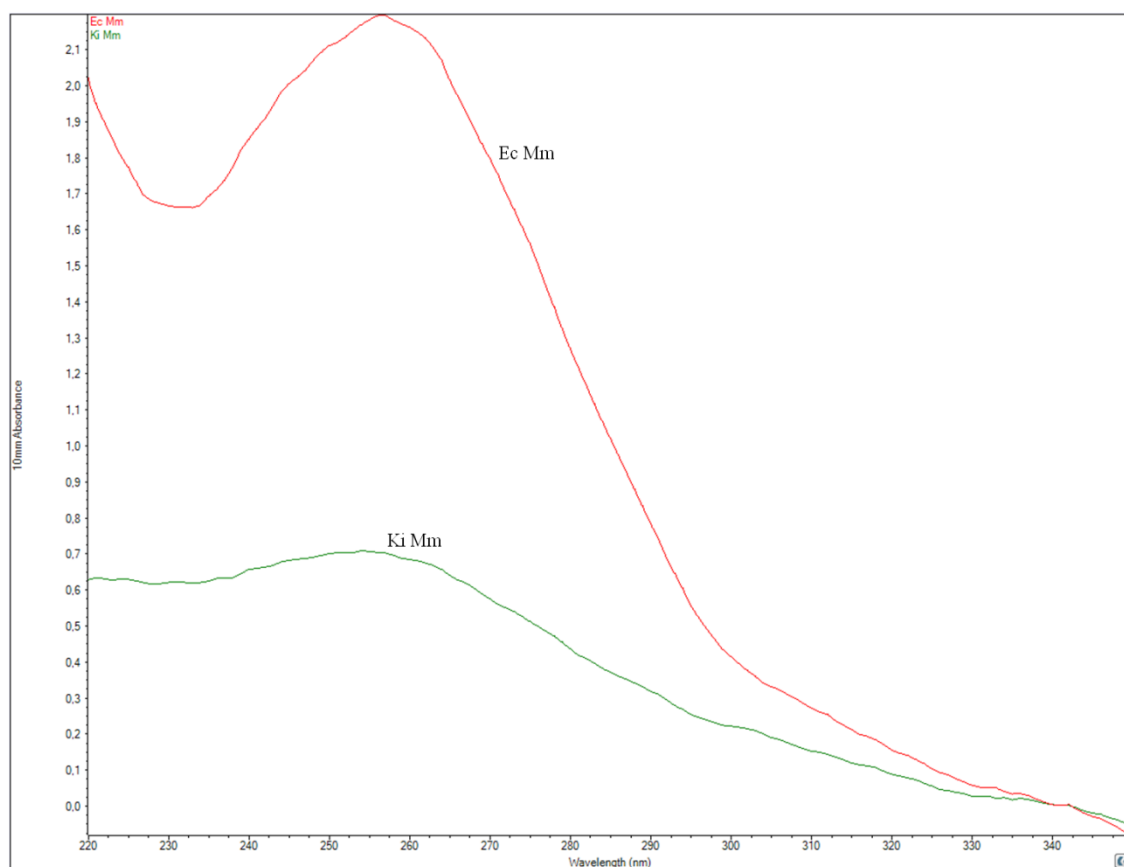


Abbildung 12: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die Proben Ec (*Entandrophragma cylindricum*) und Ki (*Khaya ivorensis*) nach Durchführung der modifizierten mericon™-Extraktion (Mm). Auftrag = 1 µl.

Die anschließende Amplifikation des ITS-Bereichs mit den fünf Template-Variationen (1 µl = 108 ng, 0,5 µl = 54 ng, Verdünnungen: 1:10 = 10,8 ng, 1:100 = 1,08 ng, 1:1000 = 0,108 ng) ergab für Probe Ec Mm in allen Fällen die erwartete Doppelbande. Mittels der Probe Ki Mm war es zum ersten Mal möglich, die Holz-DNA der Kernholzprobe zu amplifizieren (Tabelle 32, PCR-Erfolg). Bei den amplifizierten Template-Variationen handelte es sich um 1 µl (34,1 ng), 0,5 µl (17,05 ng) und die 1:10 Verdünnung (3,41 ng). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine zweite PCR durchgeführt. Innerhalb dieser PCR wurden die holzspezifischen Primer ITS1.1/ITS2.1 zur Amplifizierung des ITS1-Bereichs verwendet. Eingesetzt wurden alle Templates, für die in der ITS1.1/ITS4-PCR eine Doppelbande (Holz- und Pilzbande) zu verzeichnen war. Die im Anschluss an die PCR durchgeführte Gelelektrophorese wies für alle eingesetzten Templates eine Bande in der erwarteten Länge von ~380 bp (Abbildung 13) auf. Um sicherzustellen, dass keine Kontamination vorlag, wurde jeweils ein PCR-Produkt der Probe Ec Mm und Ki Mm aufgereinigt und sequenziert. Der Abgleich der Sequenzen ergab, dass die DNA-Fragmente die jeweiligen Sequenzinformationen des ITS1-Bereichs von *Entandrophragma cylindricum* und *Khaya ivorensis* in sich trugen.

Eine Validierung der hier dargestellten DNA-Extraktionsmethode wird in Punkt 3.4 angeführt.

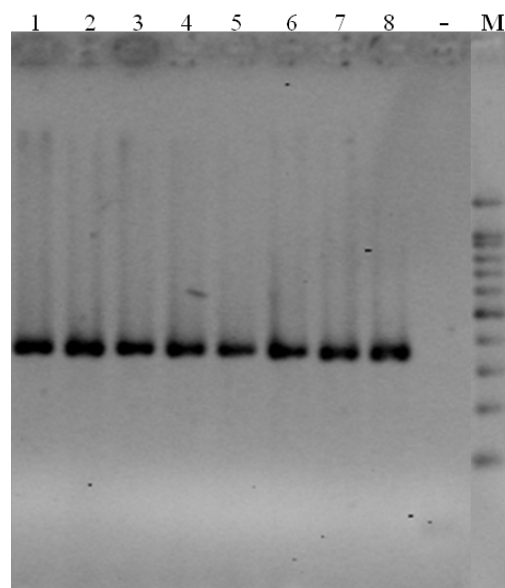


Abbildung 13: Amplifikationsprodukte der DNA-Eluate der Proben Ec und Ki nach Durchführung der modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion. Es wurde der ITS1-Bereich unter Verwendung der holzspezifischen Primer ITS1.1 und ITS2.1 amplifiziert. 1 = Ec Mm 1 µl, 2 = Ec Mm 0,5 µl, 3 = Ec Mm 1:10, 4 = Ec Mm 1:100, 5 = Ec Mm 1:1000, 6 = Ki Mm 1 µl, 7 = Ki Mm 0,5 µl, 8 = Ki Mm 1:10. - = Negativ-Kontrolle, M = 100 bp Ladder.

### 3.2 Aufbau einer rDNA ITS-Sequenzdatenbank

Der Aufbau der internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank, der die Schritte DNA-Extraktion, Amplifizierung und Sequenzanalyse beinhaltet, wird im Folgenden ausführlich am Beispiel der Meliaceae dargestellt. Die Ergebnisse der weiteren Familien werden anschließend in gekürzter Form angeführt.

#### 3.2.1 Meliaceae

Aus der Familie der Meliaceae wurden für die rDNA ITS-Sequenzdatenbank folgende Proben anhand von Blättern, Ästen und Splintholz untersucht: vierzehn *Swietenia macrophylla* King, sieben *Swietenia humilis* Z., neun *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq., sieben *Cedrela odorata* L., sieben *Cedrela fissilis* Vell., zwei *Entandrophragma angolense* (Welw.) C. DC., sieben *Entandrophragma cylindricum* Sprague (Sprague), zwei *Khaya grandifolia* C. DC., zwei *Khaya nyasica* Stapf ex Baker f., sechs *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss., eine *Khaya ivorensis* A. Chev., zwei *Carapa guianensis* Aubl. und vier *Toona sinensis* (A.Juss.) M.Roem. (Tabelle 6). Insgesamt erfolgte die Bearbeitung von 70 Individuen aus der Familie der Meliaceae. Für die Erarbeitung des ITS wurde in den meisten Fällen auf frisches Ausgangsmaterial, wie Äste und Blätter, zurückgegriffen, da die DNA im Splint- und Kernholz oft in degradiert Form vorliegt. Eventuell vorhandene Inhibitoren, wie phenolische Komponenten oder Polysaccharide, erschweren die Amplifikation zusätzlich.

##### 3.2.1.1 Extraktion der DNA

Unter Verwendung des DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kits konnte aus allen Proben erfolgreich die DNA isoliert werden. Der mit dem Spektralphotometer gemessene DNA-Gehalt lag zwischen 5 und 220 ng/μl. Bezüglich der Abhängigkeit der DNA-Quantität bzw. der DNA-Qualität zum verwendeten Material wurde deutlich, dass bei Verwendung von jungen Ästen die besten Ergebnisse erzielt wurden. Sowohl die Ausbeute als auch die Reinheit der DNA zeigten hier die besten Werte. Wurde dagegen Blattmaterial verwendet, konnte dies zwar einfacher und schneller verarbeitet werden, jedoch sank der DNA-Gehalt auf 20-40 ng/μl. Im Verlauf der Untersuchungen wurde bei der Verarbeitung von Blattmaterial ein angepasstes Protokoll verwendet. Die Anpassung des Protokolls erfolgte aufgrund der Tatsache, dass bei einigen Blattmaterialien am Ende der DNA-Extraktion ein grünliches Eluat beobachtet wurde. Diese grünliche Verfärbung resultierte daraus, dass das Chlorophyll nur unvollständig von der

Silikamatrix entfernt wurde. Dem Problem des verunreinigten Filters wurde dadurch entgegengetreten, dass beim Auftreten einer grünlichen Verfärbung (nach dem Waschen der Silikamatrix mit dem Waschpuffer AW; siehe Tabelle 7 aus Punkt 2.2.1, Schritt 9 und 10) solange zusätzliche Waschschrte mit 500 µl unverdünntem Ethanol p.a. durchgeführt wurden, bis keine Verfärbung des Filters mehr zu erkennen war. Im Anschluss wurde wieder mit Schritt 11 des Protokolls begonnen.

Die Verwendung von Splintholz ergab in Kombination mit dem DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit die geringste DNA-Quantität bzw. -Qualität. Hier konnten lediglich Konzentrationen von 5-20 ng/µl gemessen werden. Diese Konzentrationen wurden aber nur dadurch erzielt, dass die Eluationsmenge von 50 auf 15 µl gesenkt wurde. Da die DNA-Qualität für Splintholz-DNA am geringsten war, wurde für den Aufbau der rDNA ITS-Sequenzdatenbank weitestgehend auf dieses Material verzichtet.

#### 3.2.1.2 Amplifikation der extrahierten DNA

Amplifikationen des ITS-Bereichs unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4 stellten sich nach wenigen Versuchen als ungeeignet heraus. Zwar konnte die PCR erfolgreich durchgeführt werden, doch die Ergebnisse waren in vielen Fällen nicht zufriedenstellend. Die Probleme mit dem Primerpaar ITS1.1/ITS4 stellten sich entweder nach der Gelelektrophorese oder auch erst nach der Sequenzierung heraus. Die mangelnde Eignung, die vor der Sequenzierung ersichtlich wurde, zeigte sich z.B. dadurch, dass die Primerkombination in vielen Fällen eine Doppelbande hervorrief. Abbildung 14 stellt die erhaltenen Doppelbanden, welche Längen von 700 (Holz) und 600 bp (Pilz) aufwiesen, dar. Eine Sequenzierung eines solchen PCR-Produkts ist ausgeschlossen, da sich die erhaltenen Signale überlagern. Weiterhin kam es bei der Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4 dazu, dass die im Template vorhandene Pilz-DNA so dominant war, dass die Amplifizierung des ITS-Bereichs vom Holz unterdrückt wurde. Dies wird durch die Anwesenheit nur einer Bande von ca. 600 bp deutlich (Proben 345, 394, 395, 427 und 471 aus Abbildung 15).

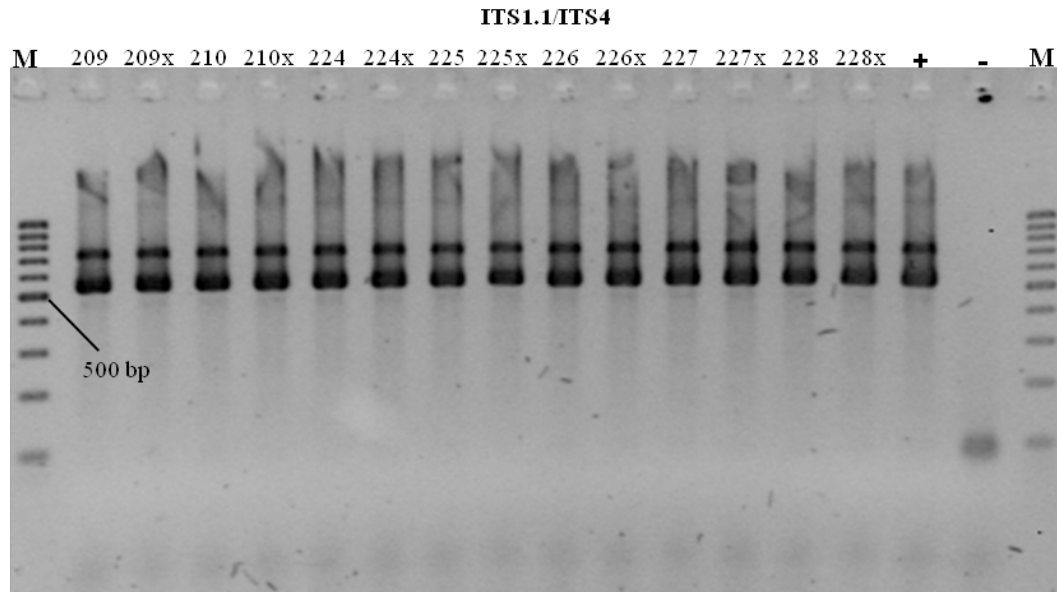


Abbildung 14: Darstellung von Doppelbanden, die unter Verwendung der Primer ITS1.1/ITS4 amplifiziert wurden. Über den Banden ist die jeweilige Herbarnr. wiedergegeben. x = zweites Eluat, + = Positiv-Kontrolle, - = Negativ-Kontrolle, M = 100 bp Ladder.

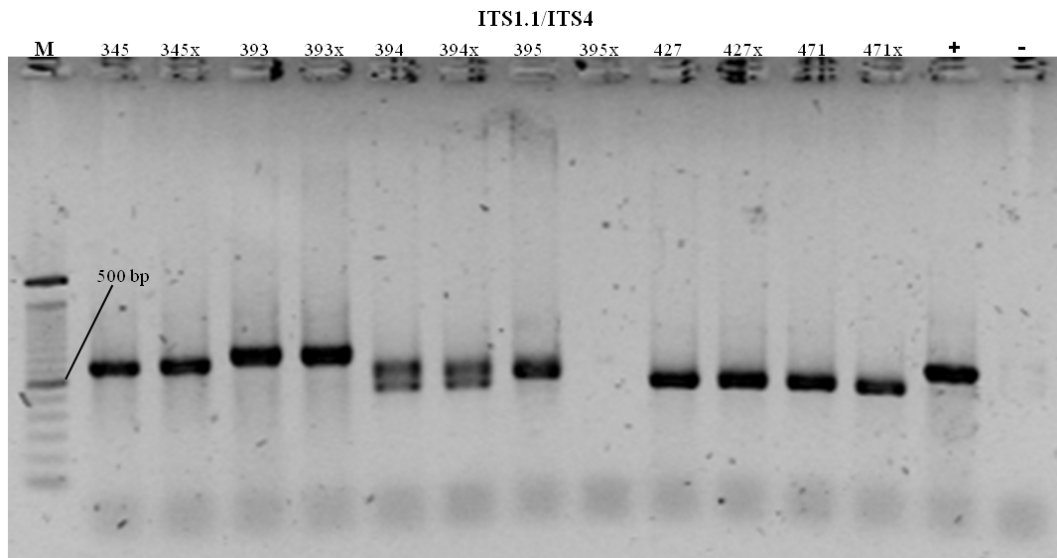


Abbildung 15: Gelbild mit Pilzbanden unterschiedlicher Länge. Die Amplifikation erfolgte mithilfe der Primer ITS1.1/ITS4. Über den Banden ist die jeweilige Herbarnr. wiedergegeben. x = zweites Eluat, + = Positiv-Kontrolle, - = Negativ-Kontrolle, M = 100 bp Ladder.

Die Schwierigkeiten des Primerpaars ITS1.1/ITS4, die erst nach der Sequenzierung kenntlich wurden, werden im Weiteren genauer ausgeführt. In einigen Fällen ergab die BLAST-Analyse, dass es sich bei den vorliegenden Sequenzen um Fragmente der Pilz-DNA handelte. Das der ITS-Bereich eines Pilzes sequenziert wurde, lässt sich dadurch erklären, dass dieser eine Länge aufwies, welche dem ITS-Bereich der Holz-DNA ähnelte (Probe 393 aus Abbildung 15). Weiterhin ist hierfür anzuführen, dass die Pilz-DNA die Amplifikation der Holz-DNA unterdrückte. Ein weiterer Mangel war die Überlagerung der Sequenzierungssignale (Abbildung 16). Dieses trat auf, wenn das zu sequenzierende PCR-Produkt, sowohl Fragmente der Pilz-DNA als auch der Holz-DNA enthielt. Hervorgerufen wurde dies dadurch, dass die ITS-Bereiche der Pilz- und Holz-DNA wiederum identische Längen aufwiesen.

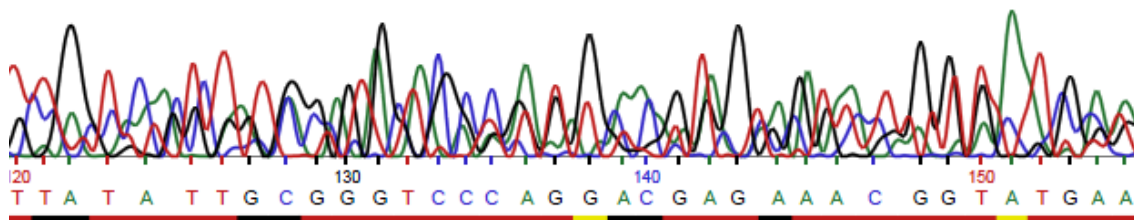


Abbildung 16: Beispiel für ein Chromatogramm, das mehrere Peaks an einer Position aufweist.

Aufgrund der angeführten Probleme wurde für alle Proben dazu übergegangen, den ITS-Bereich mithilfe der „holzspezifischen“ Primer (Punkt 2.2.3.3 oder Hanssen et al. 2011) zu amplifizieren. Durch die Verwendung der „Holz-Primer“ erfolgte die Amplifikation des ITS-Bereichs in zwei Fragmenten (ITS1-Bereich = ~350 bp; ITS2-Bereich = ~450 bp; Abbildung 17), die sich im 5.8S überschneiden. Die Verwendung dieser spezifischen Primer verhalf zu einer erfolgreichen Amplifikation aller 70 Proben der Meliaceae. Eine Verunreinigung der Sequenzierungsergebnisse durch Pilz-DNA wurde vollständig ausgeschlossen.

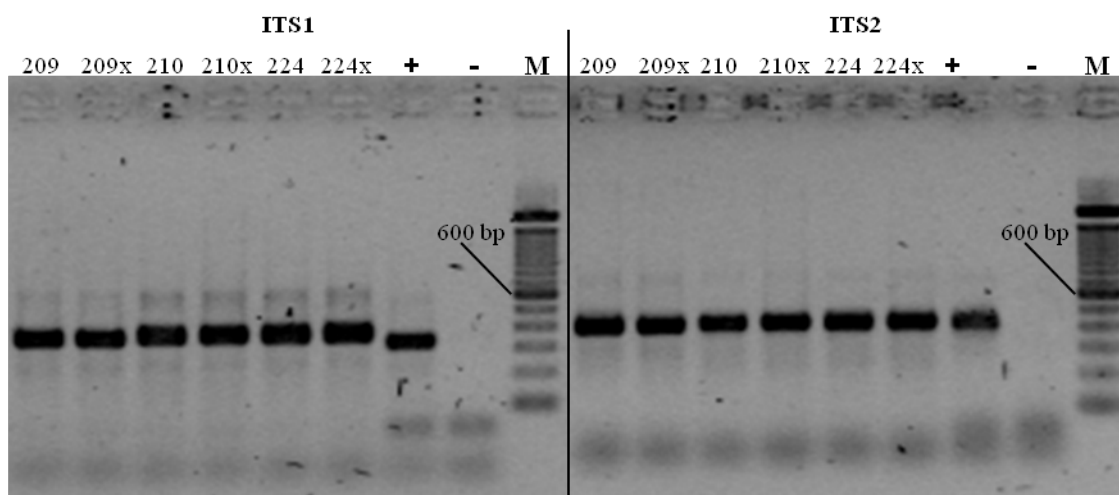


Abbildung 17: Amplifikation des ITS1- (ITS1.1/ITS2.1) und des ITS2-Bereichs (ITS3.1/ITS4). Über den Banden ist die jeweilige Herbarnr. wiedergegeben, x = zweites Eluat, + = Positiv-Kontrolle, - = Negativ-Kontrolle, M = 100 bp Ladder.

### 3.2.1.3 Sequenzaufbereitung und Sequenzanalyse

Die mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Punkt 2.2.5) aufgereinigten PCR-Produkte wurden außer Haus bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Pro Einzelstrangsequenzierung wurden dem Sequenzierservice 15 µl (5 ng/µl) des im Eluationspuffer gelösten PCR-Amplikons zur Verfügung gestellt. Für jedes zu untersuchende Individuum wurde der ITS1- bzw. der ITS2-Bereich, jeweils vom forward- sowie vom reverse-Primer ausgehend, sequenziert. Die Bearbeitung der Sequenzrohdaten erfolgte mit der Software MEGA5 (Tamura et al. 2011). Die erhaltenen Sequenzrohdaten des ITS1- bzw. des ITS2-Bereichs wurden jeweils zu einer Sequenz zusammengefasst (ITS1.1 → ITS2.1; ITS3.1 → ITS4). Durch die Überlappung der beiden Teilbereiche im 5.8S konnte daraufhin für 68 Proben je eine individuelle Gesamtsequenz des ITS-Bereichs erstellt werden (ITS1.1 → ITS4). Lediglich für Probe 8 (*Khaya grandifolia*) und Probe 38 (*Khaya nyasica*) fehlen der Teilbereich des 18S sowie ein Teil des ITS1. Die fehlenden Bereiche der Proben 8 und 38 konnten auch nach mehrfacher Sequenzierung nicht erarbeitet werden.

Nachstehend werden die Längen des ITS der diversen Arten der Meliaceae angegeben. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen in der GenBank des NCBI hinterlegten Sequenzen gewährleisten zu können, erfolgt die Darstellung der Längen ohne die Teilbereiche von 18S und 26S. Für die untersuchten Vertreter der Meliaceae liegen die Längen des ITS zwischen 648 und 671 bp. Im Einzelnen ergeben

sich die Längen der Arten wie folgt: 661 bp für *Carapa guianensis*, 657-660 bp für *Cedrela odorata*, 658-659 bp für *C. fissilis*, 663 bp für *Entandrophragma angolense*, 655 bp für *E. cylindricum*, 645 bp für *Khaya grandifolia*, 667 bp für *K. ivorensis*, 668 bp für *K. nyasica*, 668-669 bp für *K. senegalensis*, 670-671 bp für *Swietenia humilis*, 670-671 bp für *S. macrophylla*, 666 bp für *S. mahagoni* und 648 bp für *Toona sinensis*. Aufgrund der Tatsache, dass alle Individuen einen 5.8S mit der Größe von 162 bp aufweisen, resultieren die verschiedenen Längen des ITS aus interspezifischen bzw. intraspezifischen Unterschieden des ITS1 bzw. des ITS2. Wie in Tabelle 33 wiedergegeben, zeigt der ITS1 für *C. guianensis* eine Länge von 254-255 bp. Dagegen ist *Cedrela odorata* mit 249 bp und *C. fissilis* mit 248 bp anzugeben. In der Gattung *Entandrophragma* zeigen *E. angolense* und *E. cylindricum* Längen von 259 und 253 bp. Für *K. grandifolia*, *K. ivorensis*, *K. nyasica* und *K. senegalensis* treten Werte von 236, 258, 259 und 259-260 bp auf. Über die Länge des ITS1 von *K. grandifolia* ist keine abschließende Angabe möglich. Insgesamt wurden für diese Art zwei Proben untersucht (8 und 457). Nach mehrmaligem Sequenzieren stand für Probe 8 nur ein Teilbereich des ITS1 zur Verfügung (der 18S-Teilbereich fehlt vollständig). Probe 457 weist dagegen ein Indel von 23 bp auf (Abbildung 18, Alignmentposition 88-110). *S. humilis* und *S. macrophylla* haben eine identische Länge von 259-260 bp. *S. mahagoni* zeigt eine Größe von 260 bp. Der ITS1 von *Toona sinensis* ist mit 232 bp der kürzeste. Der ITS2 hat für *C. guianensis*, *C. odorata*, *C. fissilis*, *E. angolense*, *E. cylindricum* und die Gattung *Khaya* Längen von 244-245, 246-249, 248-249, 242, 240 und 247 bp. *S. humilis* und *S. macrophylla* haben wiederum identische Längen (248-250 bp). *S. mahagoni* hat einen kürzeren ITS2 von 244 bp. Im Gegensatz zum ITS1, weist *Toona sinensis*, mit 254 bp, den längsten ITS2 (Tabelle 33) auf. Die unterschiedlichen Längen des ITS1 bzw. des ITS2 innerhalb einer Art ergeben sich durch intraspezifische Unterschiede.



Tabelle 33: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für die Familie der Meliaceae. Angaben in bp.

Art	ITS1	5.8S	ITS2	ITS	ITS-Bereich
<i>Carapa guianensis</i>	254-255	162	244-245	661	720
<i>Cedrela odorata</i>	249		246-249	657-660	716-719
<i>Cedrela fissilis</i>	248		248-249	658-659	717-718
<i>Entandrophragma angolense</i>	259		242	663	722
<i>Entandrophragma cylindricum</i>	253		240	655	714
<i>Khaya grandifolia</i>	236		247	645	704
<i>Khaya ivorensis</i>	258		247	667	726
<i>Khaya nyasica</i>	259		247	668	727
<i>Khaya senegalensis</i>	259-260		247	668-669	727-728
<i>Swietenia humilis</i>	259-260		248-250	670-671	729-730
<i>Swietenia macrophylla</i>	259-260		248-250	670-671	729-730
<i>Swietenia mahagoni</i>	260		244	666	725
<i>Toona sinensis</i>	232		254	648	707

Abbildung 18 zeigt die Sequenzabfolge des jeweiligen ITS-Bereichs der 70 Individuen der Meliaceae. Das dargestellte Alignment wurde mithilfe von ClustalW (Thompson et al. 1994) berechnet. Innerhalb des Alignments sind die codierenden Regionen (18S, 5.8S und 26S) sowie die universellen Primer (ITS1.1, ITS2.1, ITS3.1 und ITS4) wiedergegeben. Einzelne Basen, die auch durch mehrmaliges Sequenzieren nicht eindeutig aufgelöst werden konnten, sind durch „Wobbles“ (IUPAC Code, Tabelle 22 Seite 72) dargestellt. Die über dem Alignment befindlichen \* weisen auf Positionen hin, die bei allen 70 Sequenzen identisch sind. Unter Verwendung der im Alignment abgebildeten Sequenzen wurde mithilfe des blastn-Algorithmus ein Vergleich mit GenBank-Sequenzen des NCBI durchgeführt (Altschul et al. 1997). Durch den Abgleich mit den Sequenzen der GenBank wurde die Identität einer Probe, wie auch die Spezifität der „Holzprimer“ überprüft. Je nachdem, ob die entsprechende Art in der Datenbank hinterlegt war, ergaben sich für die einzelnen Sequenzen Homologien (Identity) von 98-100%. War die Art nicht hinterlegt, so war es in allen Fällen möglich, die Probe der entsprechenden Gattung zuzuordnen (Homologien von 91-95%).

18S	ITS1
<i>ITS1.1</i>	

[illegible]

ITS1
------



[illegible]

	5.8S	ITS2
<i>ITS2.1</i>		

[illegible]



[illegible]



ITS2	26S
	<i>ITS4</i>

Abbildung 18: Alignment der ITS-Sequenzen der 70 Individuen der Meliaceae. Die Abbildung gibt die Zusammensetzung der einzelnen ITS-Bereiche wieder. Weiterhin wurden die allgemeinen Primer (gestrichelte Linien) zur Amplifizierung der ITS-Teilbereiche eingezeichnet (ITS1.1/ITS2.1 = ITS1-Bereich und ITS3.1/ITS4 = ITS2-Bereich). Die ID besteht aus dem Namenskürzel und der Herbarnummer. cg = *Carapa guianensis*, co = *Cedrela odorata*, cf = *C. fissilis*, enta = *Entandrophragma angolense*, entc = *E. cylindricum*, khg = *Khaya grandifolia*, khi = *K. ivorensis*, khn = *K. nyasica*, khs = *K. senegalensis*, sh = *Swietenia humilis*, smc = *S. macrophylla*, smh = *S. mahagoni*, ts = *Toona sinensis*.  
\* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen

Die Sequenzen des Alignments aus Abbildung 18 weisen deutliche interspezifische Unterschiede im ITS1 bzw. ITS2 auf. Lediglich für *S. humilis* und *S. macrophylla* sind keine interspezifischen Unterschiede erkennbar. Um die inter- bzw. intraspezifischen Sequenzunterschiede der Arten noch einmal zu verdeutlichen, wurden die Unterschiede über eine sogenannte Pairwise-Distance Analyse berechnet (Abbildung 19). Die folgend angegebenen prozentualen Werte ergeben sich durch die Multiplizierung der in Abbildung 19 angeführten Einzelwerte mit 100. Durch die Verwendung der Pairwise-Distance Analyse wird deutlich, dass sich die intraspezifischen Unterschiede für die meisten Arten in einem Bereich von 0-1% bewegen. Lediglich für *C. fissilis*, *K. nyasica* und *K. senegalensis* liegen die Unterschiede bei bis zu 1,9%. Deutlich größere Unterschiede lassen sich auf der interspezifischen Ebene innerhalb der einzelnen Gattungen beobachten. Betrachtet man z.B. die Gattung *Cedrela*, so zeigen die beiden untersuchten Arten Unterschiede von 3,2-4,2%. Noch stärkere Unterschiede lassen sich innerhalb der Gattung *Entandrophragma* feststellen, denn hier ergeben sich Werte von 6,3-6,7%. Die Gattung *Swietenia* erbrachte zwei sehr gegensätzliche Ergebnisse. Während sich *S. mahagoni* zu 2,8-3,3% von *S. macrophylla* bzw. *S. humilis* unterscheidet, so bewegen sich die Unterschiede von *S. macrophylla* und *S. humilis* nur auf intraspezifischen Niveau (max. 1%). Für die Gattung *Khaya* ergeben sich die heterogensten Werte. Diese liegen zwischen 0,6 und 3%. Wie zu erwarten, sind die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Gattungen zu verzeichnen. Auszugsweise wird hier der Unterschied zwischen den Gattungen *Carapa* und *Cedrela* angeführt. Die errechneten Werte liegen bei 12,1-12,9%. Ähnlich verhält sich *Swietenia* gegenüber *Cedrela*. Hier ergeben sich Werte von 13,2-14,9%. Vergleicht man die Gattung *Cedrela* mit der Gattung *Toona*, so sind die Unterschiede mit 4,0-5,6% wesentlich geringer.

# Ergebnisse

Nr.	ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	cg49																			
2	cg80	0,007																		
3	co10	0,128	0,129																	
4	co23	0,127	0,128	0,003																
5	co30	0,127	0,128	0,007	0,004															
6	co56	0,128	0,129	0,000	0,003	0,007														
7	co71	0,127	0,128	0,006	0,003	0,001	0,006													
8	co82	0,128	0,129	0,001	0,001	0,006	0,001	0,004												
9	co452	0,127	0,128	0,001	0,001	0,006	0,001	0,004	0,003											
10	cf11	0,123	0,124	0,036	0,036	0,034	0,036	0,034	0,038	0,035										
11	cf36	0,121	0,123	0,035	0,035	0,032	0,035	0,032	0,036	0,034	0,007									
12	cf55	0,123	0,127	0,041	0,041	0,038	0,041	0,038	0,042	0,039	0,004	0,008								
13	cf606	0,122	0,127	0,036	0,036	0,034	0,036	0,034	0,038	0,035	0,006	0,013	0,007							
14	cf607	0,122	0,127	0,036	0,036	0,034	0,036	0,034	0,038	0,035	0,006	0,013	0,007	0,000						
15	cf608	0,122	0,127	0,036	0,036	0,034	0,036	0,034	0,038	0,035	0,006	0,013	0,007	0,000	0,000					
16	cf609	0,122	0,127	0,036	0,036	0,034	0,036	0,034	0,038	0,035	0,006	0,013	0,007	0,000	0,000	0,000				
17	enta83	0,144	0,147	0,113	0,110	0,107	0,113	0,107	0,113	0,110	0,097	0,095	0,096	0,099	0,099	0,099	0,099			
18	enta192	0,147	0,150	0,110	0,107	0,104	0,110	0,104	0,110	0,107	0,099	0,096	0,097	0,099	0,099	0,099	0,099	0,006		
19	entc74	0,143	0,146	0,113	0,111	0,107	0,113	0,109	0,113	0,111	0,105	0,100	0,103	0,106	0,106	0,106	0,106	0,063	0,065	
20	entc76	0,143	0,146	0,113	0,111	0,107	0,113	0,109	0,113	0,111	0,105	0,100	0,103	0,106	0,106	0,106	0,106	0,063	0,065	0,000
21	entc345	0,143	0,146	0,113	0,111	0,107	0,113	0,109	0,113	0,111	0,105	0,100	0,103	0,106	0,106	0,106	0,106	0,063	0,065	0,000
22	entc393	0,143	0,144	0,113	0,111	0,107	0,113	0,109	0,113	0,111	0,105	0,100	0,103	0,106	0,106	0,106	0,106	0,065	0,066	0,001
23	entc394	0,143	0,146	0,113	0,111	0,107	0,113	0,109	0,113	0,111	0,105	0,100	0,103	0,106	0,106	0,106	0,106	0,063	0,065	0,000
24	etnc395	0,143	0,146	0,113	0,111	0,107	0,113	0,109	0,113	0,111	0,105	0,100	0,103	0,106	0,106	0,106	0,106	0,063	0,065	0,000
25	entc477	0,141	0,143	0,111	0,110	0,106	0,111	0,107	0,111	0,110	0,103	0,099	0,102	0,105	0,105	0,105	0,105	0,066	0,067	0,004
26	khg8	0,060	0,064	0,139	0,138	0,135	0,139	0,135	0,139	0,138	0,123	0,126	0,121	0,121	0,121	0,121	0,121	0,140	0,143	0,141
27	khg457	0,058	0,062	0,132	0,131	0,128	0,132	0,128	0,132	0,131	0,115	0,118	0,113	0,112	0,112	0,112	0,112	0,129	0,132	0,131
28	khil34	0,066	0,070	0,135	0,134	0,131	0,135	0,131	0,135	0,134	0,120	0,121	0,121	0,121	0,121	0,121	0,121	0,135	0,137	0,140
29	khn38	0,076	0,079	0,125	0,124	0,121	0,125	0,121	0,125	0,124	0,112	0,115	0,110	0,110	0,110	0,110	0,110	0,127	0,132	0,135
30	khn447	0,063	0,069	0,132	0,131	0,128	0,132	0,128	0,132	0,131	0,117	0,120	0,116	0,116	0,116	0,116	0,116	0,135	0,138	0,139
31	khs5	0,059	0,063	0,131	0,130	0,127	0,131	0,127	0,131	0,130	0,116	0,118	0,114	0,114	0,114	0,114	0,114	0,129	0,132	0,131
32	khs6	0,060	0,064	0,129	0,128	0,125	0,129	0,125	0,129	0,128	0,114	0,117	0,113	0,113	0,113	0,113	0,113	0,129	0,132	0,131
33	khs35	0,066	0,070	0,133	0,132	0,129	0,133	0,129	0,133	0,132	0,117	0,119	0,115	0,115	0,115	0,115	0,115	0,134	0,137	0,138
34	khs41	0,063	0,064	0,129	0,128	0,125	0,129	0,125	0,129	0,128	0,114	0,117	0,115	0,115	0,115	0,115	0,115	0,132	0,134	0,134
35	khs456	0,056	0,060	0,132	0,131	0,128	0,132	0,128	0,132	0,131	0,117	0,120	0,116	0,115	0,115	0,115	0,115	0,130	0,133	0,133
36	khs505	0,056	0,060	0,131	0,130	0,127	0,131	0,127	0,131	0,130	0,116	0,119	0,114	0,114	0,114	0,114	0,114	0,131	0,134	0,135
37	sh209	0,093	0,101	0,142	0,141	0,142	0,142	0,142	0,143	0,141	0,136	0,136	0,135	0,134	0,134	0,134	0,134	0,138	0,141	0,145
38	sh210	0,092	0,099	0,144	0,143	0,143	0,144	0,143	0,144	0,143	0,137	0,137	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,140	0,142	0,147
39	sh211	0,092	0,099	0,144	0,143	0,143	0,144	0,143	0,144	0,143	0,137	0,137	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,139	0,142	0,147
40	sh212	0,092	0,099	0,141	0,140	0,140	0,141	0,140	0,141	0,140	0,135	0,135	0,133	0,133	0,133	0,133	0,133	0,137	0,139	0,147
41	sh213	0,092	0,099	0,144	0,143	0,143	0,144	0,143	0,144	0,143	0,137	0,137	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,140	0,142	0,147
42	sh235	0,092	0,099	0,141	0,140	0,140	0,141	0,140	0,141	0,140	0,135	0,135	0,133	0,133	0,133	0,133	0,133	0,137	0,139	0,144
43	sh423	0,092	0,099	0,141	0,140	0,140	0,141	0,140	0,141	0,140	0,135	0,135	0,133	0,133	0,133	0,133	0,133	0,137	0,139	0,144
44	smc2	0,093	0,101	0,141	0,140	0,140	0,141	0,140	0,141	0,140	0,135	0,135	0,133	0,133	0,133	0,133	0,133	0,135	0,138	0,145
45	smc3	0,095	0,102	0,141	0,140	0,140	0,141	0,140	0,141	0,140	0,135	0,135	0,133	0,133	0,133	0,133	0,133	0,137	0,139	0,147
46	smc18	0,093	0,100	0,140	0,139	0,139	0,140	0,139	0,140	0,139	0,133	0,133	0,132	0,132	0,132	0,132	0,132	0,135	0,138	0,145
47	smc19	0,091	0,098	0,142	0,141	0,142	0,142	0,142	0,143	0,141	0,136	0,136	0,135	0,134	0,134	0,134	0,134	0,138	0,141	0,145
48	smc33	0,091	0,098	0,142	0,141	0,142	0,142	0,142	0,143	0,141	0,136	0,136	0,135	0,134	0,134	0,134	0,134	0,138	0,141	0,145
49	smc224	0,091	0,098	0,142	0,141	0,142	0,142	0,142	0,143	0,141	0,136	0,136	0,135	0,134	0,134	0,134	0,134	0,138	0,141	0,145
50	smc225	0,092	0,099	0,141	0,140	0,140	0,141	0,140	0,141	0,140	0,135	0,135	0,133	0,133	0,133	0,133	0,133	0,137	0,139	0,144
51	smc226	0,092	0,099	0,141	0,140	0,140	0,141	0,140	0,141	0,140	0,135	0,135	0,133	0,133	0,133	0,133	0,133	0,137	0,139	0,147
52	smc227	0,092	0,099	0,141	0,140	0,140	0,141	0,140	0,141	0,140	0,135	0,135	0,133	0,133	0,133	0,133	0,133	0,137	0,139	0,147
53	smc228	0,092	0,099	0,144	0,143	0,143	0,144	0,143	0,144	0,143	0,137	0,137	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,140	0,142	0,147
54	smc249	0,093	0,100	0,140	0,139	0,139	0,140	0,139	0,140	0,139	0,133	0,133	0,132	0,132	0,132	0,132	0,132	0,135	0,138	0,145
55	smc251	0,093	0,100	0,140	0,139	0,139	0,140	0,139	0,140	0,139	0,133	0,133	0,132	0,132	0,132	0,132	0,132	0,135	0,138	0,145
56	smc252	0,093	0,100	0,140	0,139	0,139	0,140	0,139	0,140	0,139	0,133	0,133	0,132	0,132	0,132	0,132	0,132	0,135	0,138	0,145
57	smc385	0,091	0,098	0,142	0,141	0,142	0,142	0,142	0,143	0,141	0,136	0,136	0,135	0,134	0,134	0,134	0,134	0,138	0,141	0,145
58	smh4	0,098	0,107	0,149	0,148	0,148	0,149	0,148	0,149	0,148	0,141	0,141	0,139	0,140	0,140	0,140	0,140	0,150	0,154	0,155
59	smh7	0,098	0,107	0,149	0,148	0,148	0,149	0,148	0,149	0,148	0,141	0,141	0,139	0,140	0,140	0,140	0,140	0,150	0,154	0,155
60	smh21	0,098	0,107	0,149	0,148	0,148	0,149	0,148	0,149	0,148	0,141	0,141	0,139	0,140	0,140	0,140	0,140	0,150	0,154	0,155
61	smh24	0,098	0,107	0,149	0,148	0,148	0,149	0,148	0,149	0,148	0,141	0,141	0,139	0,140	0,140	0,140	0,140	0,150	0,154	0,155
62	smh40	0,100	0,108	0,147	0,146	0,146	0,147	0,146	0,147	0,146	0,139	0,139	0,138	0,139	0,139	0,139	0,139	0,148	0,152	0,154
63	smh165	0,100	0,108	0,149	0,148	0,148	0,149	0,148	0,149	0,148	0,141	0,141	0,139	0,140	0,140	0,140	0,140	0,150	0,154	0,155
64	smh168	0,098	0,107																	

# Ergebnisse

Nr.	ID	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
21	entc345	0,000																		
22	entc393	0,001	0,001																	
23	entc394	0,000	0,000	0,001																
24	etnc395	0,000	0,000	0,001	0,000															
25	entc477	0,004	0,004	0,003	0,004	0,004														
26	khg8	0,141	0,141	0,139	0,141	0,141	0,138													
27	khg457	0,131	0,131	0,130	0,131	0,131	0,128	0,009												
28	khil34	0,140	0,140	0,140	0,140	0,140	0,139	0,023	0,030											
29	khn38	0,135	0,135	0,133	0,135	0,135	0,131	0,023	0,031	0,020										
30	khn447	0,139	0,139	0,139	0,139	0,139	0,137	0,012	0,021	0,014	0,015									
31	khs5	0,131	0,131	0,130	0,131	0,131	0,129	0,007	0,011	0,026	0,026	0,015								
32	khs6	0,131	0,131	0,130	0,131	0,131	0,129	0,009	0,016	0,028	0,030	0,017	0,006							
33	khs35	0,138	0,138	0,137	0,138	0,138	0,135	0,012	0,021	0,021	0,018	0,008	0,015	0,017						
34	khs41	0,134	0,134	0,133	0,134	0,134	0,131	0,012	0,018	0,028	0,033	0,019	0,008	0,001	0,019					
35	khs456	0,133	0,133	0,131	0,133	0,133	0,130	0,006	0,013	0,026	0,030	0,017	0,004	0,006	0,017	0,008				
36	khs505	0,135	0,135	0,133	0,135	0,135	0,132	0,007	0,010	0,026	0,030	0,017	0,007	0,004	0,017	0,007	0,004			
37	sh209	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,085	0,085	0,092	0,096	0,088	0,082	0,080	0,091	0,082	0,081	0,077		
38	sh210	0,147	0,147	0,147	0,147	0,147	0,145	0,082	0,082	0,089	0,090	0,085	0,079	0,077	0,088	0,079	0,078	0,074	0,007	
39	sh211	0,147	0,147	0,147	0,147	0,147	0,145	0,082	0,082	0,089	0,090	0,085	0,079	0,077	0,088	0,079	0,078	0,074	0,007	0,000
40	sh212	0,147	0,147	0,147	0,147	0,147	0,145	0,082	0,082	0,089	0,092	0,085	0,079	0,077	0,088	0,079	0,078	0,074	0,007	0,003
41	sh213	0,147	0,147	0,147	0,147	0,147	0,145	0,082	0,082	0,089	0,090	0,085	0,079	0,077	0,088	0,079	0,078	0,074	0,007	0,000
42	sh235	0,144	0,144	0,144	0,144	0,144	0,142	0,084	0,084	0,091	0,094	0,087	0,081	0,078	0,089	0,081	0,080	0,076	0,001	0,005
43	sh423	0,144	0,144	0,144	0,144	0,144	0,142	0,084	0,084	0,091	0,094	0,087	0,081	0,078	0,089	0,081	0,080	0,076	0,001	0,005
44	smc2	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,084	0,083	0,091	0,094	0,087	0,081	0,078	0,089	0,081	0,080	0,076	0,008	0,004
45	smc3	0,147	0,147	0,147	0,147	0,147	0,145	0,085	0,083	0,092	0,094	0,088	0,082	0,079	0,091	0,082	0,081	0,077	0,010	0,005
46	smc18	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,083	0,082	0,091	0,092	0,087	0,081	0,078	0,089	0,081	0,079	0,076	0,008	0,004
47	smc19	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,081	0,081	0,088	0,090	0,084	0,078	0,075	0,086	0,078	0,077	0,073	0,005	0,001
48	smc33	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,081	0,081	0,088	0,090	0,084	0,078	0,075	0,086	0,078	0,077	0,073	0,005	0,001
49	smc224	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,081	0,081	0,088	0,090	0,084	0,078	0,075	0,086	0,078	0,077	0,073	0,005	0,001
50	smc225	0,144	0,144	0,144	0,144	0,144	0,142	0,084	0,084	0,091	0,094	0,087	0,081	0,078	0,089	0,081	0,080	0,076	0,001	0,005
51	smc226	0,147	0,147	0,147	0,147	0,147	0,145	0,082	0,082	0,089	0,092	0,085	0,079	0,077	0,088	0,079	0,078	0,074	0,007	0,003
52	smc227	0,147	0,147	0,147	0,147	0,147	0,145	0,082	0,082	0,089	0,092	0,085	0,079	0,077	0,088	0,079	0,078	0,074	0,007	0,003
53	smc228	0,147	0,147	0,147	0,147	0,147	0,145	0,082	0,082	0,089	0,090	0,085	0,079	0,077	0,088	0,079	0,078	0,074	0,007	0,000
54	smc249	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,083	0,082	0,091	0,092	0,087	0,081	0,078	0,089	0,081	0,079	0,076	0,008	0,004
55	smc251	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,083	0,082	0,091	0,092	0,087	0,081	0,078	0,089	0,081	0,079	0,076	0,008	0,004
56	smc252	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,083	0,082	0,091	0,092	0,087	0,081	0,078	0,089	0,081	0,079	0,076	0,008	0,004
57	smc385	0,145	0,145	0,145	0,145	0,145	0,144	0,081	0,081	0,088	0,090	0,084	0,078	0,075	0,086	0,078	0,077	0,073	0,005	0,001
58	smh4	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,154	0,094	0,093	0,097	0,106	0,093	0,090	0,087	0,098	0,088	0,088	0,084	0,033	0,031
59	smh7	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,154	0,094	0,093	0,097	0,106	0,093	0,090	0,087	0,098	0,088	0,088	0,084	0,033	0,031
60	smh21	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,154	0,094	0,093	0,097	0,106	0,093	0,090	0,087	0,098	0,088	0,088	0,084	0,033	0,031
61	smh24	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,154	0,094	0,093	0,097	0,106	0,093	0,090	0,087	0,098	0,088	0,088	0,084	0,033	0,031
62	smh40	0,154	0,154	0,154	0,154	0,154	0,152	0,096	0,094	0,098	0,104	0,094	0,091	0,088	0,099	0,090	0,090	0,086	0,032	0,029
63	smh165	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,154	0,096	0,094	0,098	0,108	0,094	0,091	0,088	0,099	0,090	0,090	0,086	0,033	0,032
64	smh168	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,154	0,094	0,093	0,097	0,106	0,093	0,090	0,087	0,098	0,088	0,088	0,084	0,033	0,031
65	smh175	0,154	0,154	0,154	0,154	0,154	0,153	0,094	0,093	0,097	0,106	0,093	0,090	0,087	0,098	0,088	0,088	0,085	0,033	0,031
66	smh229	0,155	0,155	0,155	0,155	0,155	0,154	0,096	0,094	0,098	0,108	0,094	0,091	0,088	0,099	0,090	0,090	0,086	0,033	0,032
67	ts57	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,092	0,126	0,125	0,123	0,126	0,122	0,120	0,120	0,122	0,120	0,120	0,121	0,140	0,140
68	ts450	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,092	0,126	0,125	0,123	0,126	0,122	0,120	0,120	0,122	0,120	0,120	0,121	0,140	0,140
69	ts451	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,092	0,126	0,125	0,123	0,126	0,122	0,120	0,120	0,122	0,120	0,120	0,121	0,140	0,140
70	ts610	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,092	0,126	0,125	0,123	0,126	0,122	0,120	0,120	0,122	0,120	0,120	0,121	0,140	0,140

# Ergebnisse

Nr.	ID	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
40	sh212	0,003																		
41	sh213	0,000	0,003																	
42	sh235	0,005	0,005	0,005																
43	sh423	0,005	0,005	0,005	0,000															
44	smc2	0,004	0,001	0,004	0,007	0,007														
45	smc3	0,005	0,003	0,005	0,008	0,008	0,003													
46	smc18	0,004	0,001	0,004	0,007	0,007	0,001	0,001												
47	smc19	0,001	0,001	0,001	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003											
48	smc33	0,001	0,001	0,001	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003	0,000										
49	smc224	0,001	0,001	0,001	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003	0,000	0,000									
50	smc225	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000	0,007	0,008	0,007	0,004	0,004	0,004								
51	smc226	0,003	0,000	0,003	0,005	0,005	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005							
52	smc227	0,003	0,000	0,003	0,005	0,005	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005	0,000						
53	smc228	0,000	0,003	0,000	0,005	0,005	0,004	0,005	0,004	0,001	0,001	0,001	0,005	0,003	0,003					
54	smc249	0,004	0,001	0,004	0,007	0,007	0,001	0,001	0,000	0,003	0,003	0,003	0,007	0,001	0,001	0,004				
55	smc251	0,004	0,001	0,004	0,007	0,007	0,001	0,001	0,000	0,003	0,003	0,003	0,007	0,001	0,001	0,004	0,000			
56	smc252	0,004	0,001	0,004	0,007	0,007	0,001	0,001	0,000	0,003	0,003	0,003	0,007	0,001	0,001	0,004	0,000	0,000		
57	smc385	0,001	0,001	0,001	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003	0,000	0,000	0,000	0,004	0,001	0,001	0,001	0,003	0,003	0,003	
58	smh4	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,031	0,032	0,029	0,029	0,029	0,032	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,029
59	smh7	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,031	0,032	0,029	0,029	0,029	0,032	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,029
60	smh21	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,031	0,032	0,029	0,029	0,029	0,032	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,029
61	smh24	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,031	0,032	0,029	0,029	0,029	0,032	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,029
62	smh40	0,029	0,029	0,029	0,031	0,031	0,031	0,029	0,031	0,028	0,028	0,028	0,031	0,029	0,029	0,029	0,031	0,031	0,031	0,028
63	smh165	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,033	0,032	0,033	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,032	0,033	0,033	0,033	0,031
64	smh168	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,031	0,032	0,029	0,029	0,029	0,032	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,029
65	smh175	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,031	0,032	0,029	0,029	0,029	0,032	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,029
66	smh229	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,033	0,032	0,033	0,031	0,031	0,031	0,032	0,032	0,032	0,032	0,033	0,033	0,033	0,031
67	ts57	0,139	0,138	0,140	0,138	0,138	0,138	0,138	0,137	0,140	0,140	0,140	0,138	0,138	0,138	0,140	0,137	0,137	0,137	0,140
68	ts450	0,139	0,138	0,140	0,138	0,138	0,138	0,138	0,137	0,140	0,140	0,140	0,138	0,138	0,138	0,140	0,137	0,137	0,137	0,140
69	ts451	0,139	0,138	0,140	0,138	0,138	0,138	0,138	0,137	0,140	0,140	0,140	0,138	0,138	0,138	0,140	0,137	0,137	0,137	0,140
70	ts610	0,139	0,138	0,140	0,138	0,138	0,138	0,138	0,137	0,140	0,140	0,140	0,138	0,138	0,138	0,140	0,137	0,137	0,137	0,140

# Ergebnisse

Nr.	ID	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
-----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

59	smh7	0,000												
60	smh21	0,000	0,000											
61	smh24	0,000	0,000	0,000										
62	smh40	0,001	0,001	0,001	0,001									
63	smh165	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003								
64	smh168	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001							
65	smh175	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000						
66	smh229	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,000	0,001	0,000					
67	ts57	0,140	0,140	0,140	0,140	0,139	0,140	0,140	0,139	0,140				
68	ts450	0,140	0,140	0,140	0,140	0,139	0,140	0,140	0,139	0,140	0,000			
69	ts451	0,140	0,140	0,140	0,140	0,139	0,140	0,140	0,139	0,140	0,000	0,000		
70	ts610	0,140	0,140	0,140	0,140	0,139	0,140	0,140	0,139	0,140	0,000	0,000	0,000	

Abbildung 19: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen der Meliaceae.  
 cg = *Carapa guianensis*, co = *Cedrela odorata*, cf = *C. fissilis*, enta = *Entandrophragma angolense*, entc = *E. cylindricum*, khg = *Khaya grandifolia*, khi = *K. ivorensis*,  
 khn = *K. nyasica*, khs = *K. senegalensis*, sh = *Swietenia humilis*, smc = *S. macrophylla*,  
 smh = *S. mahagoni*, ts = *Toona sinensis*. Arabische Zahl = Herbarnummer.

#### 3.2.1.4 Intraspezifische und intraindividuelle Unterschiede der Gattung *Swietenia*

Für die Beurteilung der intraindividuellen Unterschiede im Vergleich zu den intraspezifischen Unterschieden sowie für die weitere Untersuchung der identischen Sequenzen von *S. humilis* und *S. macrophylla*, wurde für vier Individuen dieser Gattung der ITS-Bereich (ITS1.1 → ITS4) kloniert. Die Klonierung bietet die Möglichkeit die Sequenzinformation nur einer einzigen Kopie des ITS bereitzustellen. Für *S. macrophylla* kamen die Proben 225 sowie 226 zur Anwendung und *S. humilis* war durch Probe 235 vertreten. *S. mahagoni* wurde durch Probe 175 repräsentiert. Es wurde der Gesamtbereich des ITS kloniert, um jeweils eine vollständige Kopie einer auf dem Genom zusammenhängenden ITS-Region zu erhalten. Die Klonierung wurde anhand des in Punkt 2.2.6 aufgeführten Protokolls durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob die intraindividuellen Unterschiede des ITS auch per PCR zu ermitteln sind, wurden für die vier angeführten Proben je fünf unabhängige PCRs durchgeführt. Die erhaltenen Amplifikate wurden im Anschluss sequenziert, so dass letztendlich für jede Probe fünf Sequenzen zur Verfügung standen. Der gewählte Ansatz erwies sich als erfolglos, da alle fünf Sequenzierungen einer Probe identische Sequenzen aufweisen. Deutlich wird, dass die Erarbeitung des ITS mittels Standard-PCR die auf dem Genom am häufigsten vertretene ITS-Kopie wiedergibt.

Der Ansatz, verschiedene Variationen des ITS mittels Klonierung zu erarbeiten, war erfolgreich. Für Probe 225 (*S. macrophylla*) wurden durch die Sequenzierung von acht Klonen vier weitere Variationen des ITS ermittelt. Probe 226 (*S. macrophylla*) wies durch die Auswertung von sechs Klonen fünf neue Variationen des ITS auf. Die Bearbeitung von Probe 235 (*S. humilis*) erbrachte fünf Klone, die vier weitere Variationen des ITS aufdeckten. Die für *S. mahagoni* bearbeitete Probe (175) ergab bei sieben Klonen sechs zusätzliche ITS-Variationen.

Für die Darstellung der intraspezifischen und intraindividuellen Unterschiede wurden alle Klone sowie alle bereits vorhandenen *Swietenia*-Sequenzen in ein Alignment geladen. Das Alignment wurde im Anschluss auf jene Positionen reduziert, die intraspezifische oder intraindividuelle Unterschiede aufweisen (Tabelle 34). Probe 385

wurde hierbei als Standard definiert. In der Regel weisen die untersuchten Klone einer Probe ein bis fünf intraindividuelle Punktmutationen auf. Einige Punktmutationen treten innerhalb einer Sequenz auch gemeinsam auf. Für Probe 225 Klon3 zeigt sich, dass wenn Position 260 ein T aufweist, an Position 286 ein A folgt. Ist jenes Muster im ITS1 zu beobachten, so folgt im ITS2 ein weiteres Muster. Die Positionen 677, 680 und 681 weisen dann, im Gegensatz zu Probe 385, ein A, C sowie Gap (-) auf (Tabelle 34). Diese Variationen finden sich außer bei Probe 225 Klon3 auch in weiteren Sequenzen (Probe 225: Klon6, Klon11, Klon12, Klon13 und Klon14; Probe 209; Probe 235: alle Klone; Probe 423). Tritt das eben beschriebene Muster in einem Individuum auf, so ist dies zwar dominant bzw. oft vertreten, jedoch finden sich ebenfalls Klone, die in keiner Position von der als Standard definierten Sequenz (385) abweichen (siehe Probe 225 Klon7).

Vergleicht man die Klone mittels einer Pairwise-Distance Analyse mit der entsprechenden „Standard-PCR“ Sequenz, so liegen die intraindividuellen Unterschiede für Probe 225 zwischen 0 und 0,69%. Für die Individuen 226 sowie 235 bewegen sich diese Unterschiede in einem Bereich von 0,14-0,27% und 0-0,27%. Probe 175 ist mit Werten von 0-0,28% anzugeben.

Da die interspezifischen Unterschiede (vgl. Punkt 3.2.1.3 und Abbildung 19) deutlich größer sind als die intraindividuellen Unterschiede, wurde für die verbleibenden Arten auf eine Klonierung des ITS verzichtet.

Bezüglich der Unterscheidung von *S. macrophylla* und *S. humilis* brachte die Klonierung des ITS-Bereichs keine weiteren Ergebnisse. Es ist somit festzuhalten, dass diese beiden Arten anhand des ITS-Bereichs nicht zu unterscheiden sind.





### 3.2.2 Zygophyllaceae und Bignoniaceae

Die Gattung *Guaiacum* aus der Familie der Zygophyllaceae ist aktuell im CITES Anhang II gelistet. In dieser Arbeit wurden die Arten *Guaiacum sanctum* und *G. officinale* bearbeitet. Als Substitutionshölzer werden derzeit Vertreter aus den Gattungen *Bulnesia* (Zygophyllaceae) und *Handroanthus* (Bignoniaceae) eingesetzt. Aufgrund dieser Tatsache werden die Ergebnisse für diese beiden Familien gemeinsam dargestellt. Für den Aufbau der Sequenzdatenbank wurden Blätter, Äste oder frisches Splintholz von vierzehn *Guaiacum officinale* L., sieben *Guaiacum sanctum* L., zwei *Bulnesia arborea* (Jacq.) Engl., eine *Handroanthus chrysanthus* (Jacq.) S. O. Grose und fünf *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos verarbeitet (Tabelle 6). Das Alignment aus Abbildung 20 gibt die erhaltenen ITS-Sequenzen aller Proben wieder. Für dieses Alignment wurden die Sequenzen einer Art zu einer oder mehreren Consensussequenzen zusammengefasst. Eine Darstellung aller 29 Sequenzen ist dem Anhang zu entnehmen. Die Längen des ITS liegen bei: 613 und 616 bp für *G. sanctum*, 607-608 bp für *G. officinale*, 645 bp für *H. chrysanthus*, 646 bp für *H. impetiginosus* und 607 bp für *B. arborea*. Der ITS1 hat für *G. sanctum*, *G. officinale*, *H. chrysanthus*, *H. impetiginosus* und *B. arborea* Längen von 216, 212, 228, 228 und 203 bp. Der ITS2 weist Längen von 235 und 238 bp für *G. sanctum*, 233-234 bp für *G. officinale*, 255 bp für *H. chrysanthus*, 256 bp für *H. impetiginosus* und 242 bp für *B. arborea* auf. Der 5.8S zeigt wiederum eine Länge von 162 bp (Tabelle 35).

Tabelle 35: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für die Familien der Zygophyllaceae und der Bignoniaceae. Angaben in bp.

Art	ITS1	5.8S	ITS2	ITS	ITS-Bereich
<i>Guaiacum sanctum</i>	216	162	235 u. 238	613 u. 616	672 u. 675
<i>Guaiacum officinale</i>	212		233-234	607-608	666-667
<i>Bulnesia arborea</i>	203		242	607	666
<i>Handroanthus chrysanthus</i>	228		255	645	704
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	228		256	646	705

Sechs der sieben untersuchten *G. sanctum* Individuen zeigen keinerlei intraspezifische Unterschiede. Einzige Ausnahme ist der ITS von Probe 162 (Cons.2, Abbildung 20), der gegenüber den anderen Proben (Cons.1 = 173, 231, 232, 233, 455 und 469, Abbildung 20) eine Abweichung von 1,5% aufweist. Da die für *G. officinale* erarbeiteten Sequenzen zwei Gruppen bilden, die sich zu 2,3% unterscheiden, wurden für diese zwei Consensus-Sequenzen erstellt (Cons.3 = 94, 101, 117, 119, 163, 167, 508, 510, 514 und 603 ↔ Cons.4 = 156, 377, 604 und 605, Abbildung 20). Trotz der intraspezifischen Unterschiede, ist eine Differenzierung der beiden Arten der Gattung *Guaiacum* möglich. Die interspezifischen Unterschiede von *G. officinale* gegenüber *G. sanctum* liegen für Cons.3 bzw. Cons.4 bei 6,2-6,3% bzw. 5,3-5,6%. Betrachtet man die CITES-geschützten Hölzer im Vergleich zu den Austauschhölzern, so weisen die beiden Gattungen der Zygophyllaceae (*Guaiacum* und *Bulnesia*) Unterschiede von ~12,9 % auf. Die Unterschiede der Gattung *Handroanthus* (Bignoniaceae) gegenüber der Gattung *Guaiacum* liegen bei ca. 29%. Mit 28,3% bewegen sich die Abweichungen der Gattungen *Bulnesia* und *Handroanthus* in einem vergleichbaren Bereich.

## Ergebnisse

```

Cons.1  AAACCTTCGCACAGGCAGAACGACCCGCGGACCCGTTGTTAAAAACCCGGGAC-----GGGGCGAGC---GAGAGCGAGCCCCTTCCCCCAGCG
Cons.2  AAACCTTCGCACAGGCAGAACGACCCGCGGACCCGTTGTTAAAAACCCGGGAC-----GGGGCGAGC---GAGAGCGAGCCCCTTCCCCCAGCG
Cons.3  --AAACCTTCGCAGGGCAGAACGACCCGCGGACCCGTTGTCAGAACCCGGGAC-----GGGGCGAGC---GAGAGCGAGCCCCTTCCCCCAGCG
Cons.4  --AAACCTTCGCAGGGCAGAACGACCCGCGGACCCGTTGTCAGAACCCGGGAC-----GGGGCGAGC---GAGAGCGAGCCCCTTCCCCCAGCG
Cons.5  --ACACCTTCGCAGGGCAGAACGACCCGCGGACCCGTTGTTAAAA--CCGGG-----GGGACGGGC---C---CGACCCGAATCCCCCGCGG
Cons.6  -----AAACCTTCGCAAGCAGACCCGTAACACGTTCTCGAACACTAGGGGAAATCGACGTGGGGGGCGACCTCCCGTCTGACCCCTCCCCCGCGCG
Cons.7  -----AAACCTTCGCAAGCAGACCCGTAACACGTTCTCGAACACTAGGGGAAATCGACGTGGGGGGCGACCTCCCGTCTGACCCCTCCCCCGCGCG
ruler  1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100

Cons.1  TCGGGACGACCCGGGGGTGTCAGAACCCGCGG---GGCGTCCCGTCGCCCGAACAAACCCA-CGGCGCGGAACCGCGCAAGGAATCCGAACGGAAGG
Cons.2  TCGGGACGACCCGGGGGTGTCAGAACCCGCGG---GGAGTCCCGTCGCCCGAACAAACCCA-CGGCGCGGAACCGCGCAAGGAATCCGAACGGAAGG
Cons.3  TCGGGACGACCCGGGGGTGTCAGAACCCGCGG---GTCGTCCCGTCGCCCGAACAAACCCA-CGGCGCGGAACCGCGCAAGGAATCCGAACGGAAGG
Cons.4  TCGGGACGACCCGGGGGTGTCAGAACCCGCGG---GCGCTCCCGTCGCCCGAACAAACCCA-CGGCGCGGAACCGCGCAAGGAATCCGAACGGAAGG
Cons.5  CCGGACGCGACCGCGGGGACCCCTTTCGCCCGG---GGCGTCCCGTCGCCCGAACAAACCCA-CGGCGCGGAACCGCGCAAGGAATCCGAATCCGAAGG
Cons.6  CAAGCGCGAGCTCCGTCGTCGCGGCTAAAGAAATCCCGCGCGGATCGCCCAAGGAAACTCAACGAAGCGCTGCCCGCGTTGCCCGCTTCGCGGTTGT
Cons.7  CGAGCGCGAGCTCCCGTCGTCGCGGCTAAAGAAATCCCGCGCGGATCGCCCAAGGAAACTCAACGAAGCGCTGCCCGCGTTGCCCGCTTCGCGGTTGT
ruler  .....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200

Cons.1  CCGCGCCCGCGTGGGCTTTCACCGAACATAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCCGATACCTTG
Cons.2  CCGCGCCCGCGTGGGCTTTCACCGAACATAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCCGATACCTTG
Cons.3  CCGCGCCCGCGTGGGCTTTCACCGAACATAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCCGATACCTTG
Cons.4  CCGCGCCCGCGTGGGCTTTCACCGAACATAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCCGATACCTTG
Cons.5  CCGCGCCCGCGTGGGCTTTCACCGAACATAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCCGATACCTTG
Cons.6  GTGCGGGTGGAGTGTGCTCTTGAATGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCCGATACCTTG
Cons.7  GCGCGGGTGGAGTGTGCTCTTGAATGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCCGATACCTTG
ruler  .....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

Cons.1  GTGTGAATTGCAGAAATCCCGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTCCGCCCGAAGCCCTCCGGGCGAGGGCACGTCTCCCTGGGCGTCAACGCAAGT
Cons.2  GTGTGAATTGCAGAAATCCCGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTCCGCCCGAAGCCCTCCGGGCGAGGGCACGTCTCCCTGGGCGTCAACGCAAGT
Cons.3  GTGTGAATTGCAGAAATCCCGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTCCGCCCGAAGCCCTCCGGGCGAGGGCACGTCTCCCTGGGCGTCAACGCAAGT
Cons.4  GTGTGAATTGCAGAAATCCCGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTCCGCCCGAAGCCCTCCGGGCGAGGGCACGTCTCCCTGGGCGTCAACGCAAGT
Cons.5  GTGTGAATTGCAGAAATCCCGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTCCGCCCGAAGCCCTCCGGGCGAGGGCACGTCTCCCTGGGCGTCAACGCAAGT
Cons.6  GTGTGAATTGCAGAAATCCCGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTCCGCCCGAAGCCCTCCGGGCGAGGGCACGTCTCCCTGGGCGTCAACGCAAGT
Cons.7  GTGTGAATTGCAGAAATCCCGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTCCGCCCGAAGCCCTCCGGGCGAGGGCACGTCTCCCTGGGCGTCAACGCAAGT
ruler  .....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400

Cons.1  CCGACCCCC---GCCCGCCCTCGGGG---GGMGAACGGGGGAGCGGAGATGGCCTCCCGCTGCTCCCGCCCGGGTGGGCCAAACACGAGTC
Cons.2  CCGACCCCC---GCCCGCCCT---AGGG---GGAGAACGGGGGAGCGGAGATGGCCTCCCGCTGCTCCCGCCCGGGTGGGCCAAACACGAGTC
Cons.3  CCGACCCCC---GCCCGCCCT---GGGGT---CGAACGGGGGAGCGGAGATGGCCTCCCGCTGCTCCAGCCCGGGTGGGCCAAACACGAGTC
Cons.4  CCGACCCCC---GCCCGCCCT---GGGGG---CGAACGGGGGAGCGGAGATGGCCTCCCGCTGAGTCCCGCCCGGGTGGGCCAAACACGAGTC
Cons.5  CCGACCCCCCGGAG---CGCGCCACGGCCTCGCGGCTGAGACGACCTTCCGGGAGAGCCGTGCGCG---CGTCCCCCGCTTGGGGGAGCTCCCGACCGT
Cons.6  GTCGCCCCCT---CCCGCTCTCTGTA---GCGGGCGCCGGGGGCGGAAATGGCCTCCCGCTGCGCTCCCGCTGCGCGGCGGGCCAAATGCGATCC
Cons.7  GTCGCCCCCT---CCC---GCTCCTCTGA---GCGGGCGCCGGGGGCGGAAATGGCCTCCCGCTGCGCTCCCGCTGCGCGGCGGGCCAAATGCGATCC
ruler  .....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500

Cons.1  CCGGTCGCGGACCGCGCCAGGGCTCGGTGGTCGAACGACCCCTTCCGGAAAGCCGTGCGCG---CGTCCCCCGCCCCGAGGGCGCTCCCGACCGT
Cons.2  CCGGTCGCGGAGAACCGCCACGGCCTCGGTGGTCGAACGACCCCTTCCGGAGACCGCTGCGCG---CGTCCCCCGCCCCGAGGGCGCTCCCGACCGT
Cons.3  CCGGTCGCGGAG---CGCGCCACGGCCTCGGTGGTCGAGACGACCCCTTCCGGGAGAGCCGTGCGCG---CGTCCCCCGCTTGGAGGAGCTCCCGACCGT
Cons.4  CCGGTCGCGGAG---CGCGCCACGGCCTCGCGGCTGAGACGACCCCTTCCGGGAGAGCCGTGCGCG---CGTCCCCCGCTTGGGGGAGCTCCCGACCGT
Cons.5  CCGGTCGCGGAG---CGCGCCACGGCCTCGGTGGTTGGAACGACCCCTTCCGGGAGAGCCGTGCGCG---CG---CGCGCCCGCTTGGGGGAGCTCCCGACCGA
Cons.6  CCGGTCGATG---CAGGTCACGACCACTGGTGGTTGAAACCTCAACTCGCGCTGCTGCTGCGGAGACGGCATCTCCAGCGGCATCAATGACCCA
Cons.7  CCGGTCGATG---CAGGTCACGACCACTGGTGGTTGAAATCTCAACTCGCGCTGCTGCTGCGGAGACGGCATCTCCAGCGGCATCAATGACCCA
ruler  .....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600

Cons.1  CGG-----CGCGAACCGGCCAACGA-----CGCGAACCCAGGTCAGGCGGGACC
Cons.2  CGG-----CGCGAACCGGCCAACGA-----CGCGAACCCAGGTCAGGCGGGACC
Cons.3  CGG-----CGCGAACCGGCCAACGA-----CGCGAACCCAGGTCAGGCGGGACC
Cons.4  CGG-----CGCGAACCGGCCAACGA-----CGCGAACCCAGGTCAGGCGGGACC
Cons.5  AGG-----CGCGCGCGGCCAACGA-----CGCGAACCCAGGTCAGGCGGGACC
Cons.6  TAGGCGCTTCTCTTGGCGAGCAGCGACCGCAAGGTGCTTCCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATT
Cons.7  TGGGCGCTTCTCTTGGCGAGCAGCGACCGCAAGGTGCTTCCGACCGCGACCCAGGTCAGGCGGGATT
ruler  .....610.....620.....630.....640.....650.....660.....

```

Abbildung 20: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Zygothylaceae und der Bignoniaceae. Cons.1 = *Guaiacum sanctum*: 173, 231, 232, 233, 455 und 469; Cons.2 = *G. sanctum*: 162; Cons.3 = *G. officinale*: 94, 101, 117, 119, 163, 167, 508, 510, 514 und 603; Cons.4 = *G. officinale*: 156, 377, 604 und 605; Cons.5 = *Bulnesia arborea*: 442 und 509; Cons.6 = *Handroanthus impetiginosus*: 446, 459, 463, 465 und 466; Cons.7 = *H. chrysanthus*: 449. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

### 3.2.3 Fabaceae

Aufgrund der Vielfalt innerhalb der Familie der Hülsenfrüchtler, werden die Ergebnisse anhand der in Tabelle 5 aufgeführten Gruppen, die aus CITES-Arten und Austauschhölzern bestehen, präsentiert. Insgesamt wurden 73 Individuen innerhalb der Fabaceae bearbeitet. Als Ausgangsmaterial dienten Blätter, Äste, DNA und Splintholz.

#### 3.2.3.1 Die *Intsia*-Gruppe

Die Gattung *Intsia* (Caesalpinioideae) ist zwar derzeit noch nicht Teil des CITES-Katalogs, doch bestehen Verhandlungen, die Gattung in näherer Zukunft aufzunehmen. Aus diesem Grund wurden die beiden wichtigsten Vertreter dieser Gattung, *Intsia bijuga* (Colebr.) Kuntze und *Intsia palembanica* Miq., untersucht. Die Gattung *Afzelia* (Caesalpinioideae) sowie die Holzart *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinioideae) bilden die Austauschhölzer. Zum Aufbau der Datenbank wurden letztendlich siebzehn *I. bijuga*, dreizehn *I. palembanica*, zwei *Afzelia africana* Sm. ex Pers. und sieben *Hymenaea courbaril* verarbeitet (Äste, Blätter und DNA; Tabelle 6). Für die ITS-Sequenzen wurde das in Abbildung 21 wiedergegebene Alignment, in dem identische oder sich stark ähnelnde Sequenzen in einer Consensus-Sequenz zusammengefasst wurden, angefertigt.

Anhand des Alignments stellte sich heraus, dass der ITS der Gattung *Intsia* deutlich länger als der der weiteren Vertreter dieser Gruppe ist. Z.B. weist der ITS von *I. bijuga* Längen von 715 und 718 bp auf. *I. palembanica* zeigt dagegen zwar nur Längen von 704-705 bp, dies ist aber dennoch deutlich länger als bei den anderen Mitgliedern dieser Gruppe. Die Längendifferenz resultiert hauptsächlich aus einem deutlich längeren ITS2. Der ITS2 liegt für *I. bijuga* und *I. palembanica* bei 322 bzw. 307-310 bp. Für den ITS1 von *I. bijuga* wurde eine Länge von 231-234 bp ermittelt, während *I. palembanica* einen ITS1 von 233-235 bp aufweist. Vergleicht man die nah verwandte Gattung *Afzelia*, hier vertreten durch *A. africana*, mit der Gattung *Intsia*, so verdeutlicht dies, dass diese einen wesentlich kürzeren ITS (637 bp) zu verzeichnen hat. Die Längen des ITS1 bzw. des ITS2 liegen bei 217 bzw. 258 bp. Die Längen der erstellten *Hymenaea*-Sequenzen fallen sehr unterschiedlich aus. Während der ITS1 zwischen 228 und 244 bp liegt, weist der ITS2 Längen von 232 bis 251 bp auf. Für den ITS von *H. courbaril* ergeben sich somit Längen von 633-656 bp. Für alle beschriebenen Arten hat der 5.8S eine Ausdehnung von 162 bp (Tabelle 36).

Tabelle 36: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für *Intsia bijuga*, *I. palembanica*, *Afzelia africana* und *Hymenaea courbaril*. Angaben in bp.

Art	ITS1	5.8S	ITS2	ITS	ITS-Bereich
<i>Intsia bijuga</i>	231-234	162	322	715-718	774-777
<i>Intsia palembanica</i>	233-235		307-310	704-705	763-764
<i>Afzelia africana</i>	217		258	637	696
<i>Hymenaea courbaril</i>	228-244		232-251	633-656	689-712

Für den ITS von *I. bijuga* wurden zwei verschiedene Variationen erarbeitet. Cons.8, bestehend aus den Proben 85, 166, 204, 402, 403, 404, 407 und 453, unterscheidet sich in erster Linie durch ein zusätzliches Basentriplett (GCG, Position 93-95) gegenüber Cons.9 (Proben 81, 401, 405, 406, 408, 409, 410, 411 und 511). Auch für *I. palembanica* sind zwei ITS-Variationen zu beobachten (siehe Cons10 und Cons.11, Abbildung 21). Für die Sequenzen von *H. courbaril* musste auf die Anfertigung einer Consensus-Sequenz verzichtet werden. Die sieben Individuen unterschieden sich so stark, dass eine übersichtliche Darstellung mithilfe einer oder mehrerer Consensus-Sequenzen nicht möglich gewesen wäre. Der Abgleich der *Hymenaea*-Sequenzen mit den ITS-Sequenzen der GenBank des NCBI lässt darauf schließen, dass es sich bei den Individuen 86 und 170 nicht um *H. courbaril* handelt. In der Sequenzdatenbank GenBank waren zum Zeitpunkt des Abgleichs zwei ITS-Sequenzen von *H. courbaril* hinterlegt (AY955800.1 und FJ009817.1). AY955800.1 weist eine Sequenzabdeckung von 100% zu den eigenen Sequenzen auf. Bei der Sequenz FJ009817.1 handelt es sich um eine Teilsequenz des ITS, die eine Sequenzabdeckung von 77% hat. Der Abgleich der Sequenzen 201-203, 438 und 515 mit den beiden GenBank-Sequenzen zeigt eine Homologie von 96-99%. Erfolgt der Abgleich mit der Probe 86, so liegt die Homologie lediglich bei 86 und 92%. Für Probe 170 konnte eine Homologie von je 89% ermittelt werden. Anhand der Ergebnisse des Sequenzabgleichs mit der GenBank des NCBI lässt sich keine Aussage darüber treffen, um welche Arten es sich bei den Proben 86 und 170 handelt. Die größte Übereinstimmung der ITS-Sequenzen (86-92%) ergab sich für die zwei ITS-Sequenzen von *H. courbaril* (AY955800.1 und FJ009817.1). Weiter zeigen die Proben 86 und 170 Übereinstimmungen zu den Arten *Guibourtia hymenaeifolia* (AY955802.1), *Guibourtia ehie* (AY955801.1) und *Eurypetalum tessmannii* (AY955804.1). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den Proben um Vertreter der Caesalpinioideae handelt.

Trotz vorhandener intraspezifischer Unterschiede sind die interspezifischen Unterschiede immer noch ausreichend, um die untersuchten Arten voneinander zu differenzieren. Die interspezifischen Unterschiede der Gattung *Intsia* bewegen sich in einem Bereich von 2,7-3,3%, hingegen betragen die intraspezifischen Unterschiede dieser Gattung max. 0,7%. Die Austauschhölzer können trotz der teilweise nahen Verwandtschaft zur Gattung *Intsia* klar von dieser differenziert werden. Betrachtet man *A. africana*, ergeben sich hier Unterschiede von ca. 11%. *H. courbaril* zeigt Unterschiede von ungefähr 17,5%. Einen vergleichbaren Wert weist *H. courbaril* auch gegenüber *A. africana* auf (18-18,8%). Vergleicht man die Proben 86 und 170 mit den restlichen Individuen von *H. courbaril*, so zeigen die errechneten Unterschiede deutlich, dass diese Individuen nicht der Art *H. courbaril* angehören. Die Unterschiede liegen hier bei 8,5-9,1% bzw. 7,5-8,3%.

[illegible]



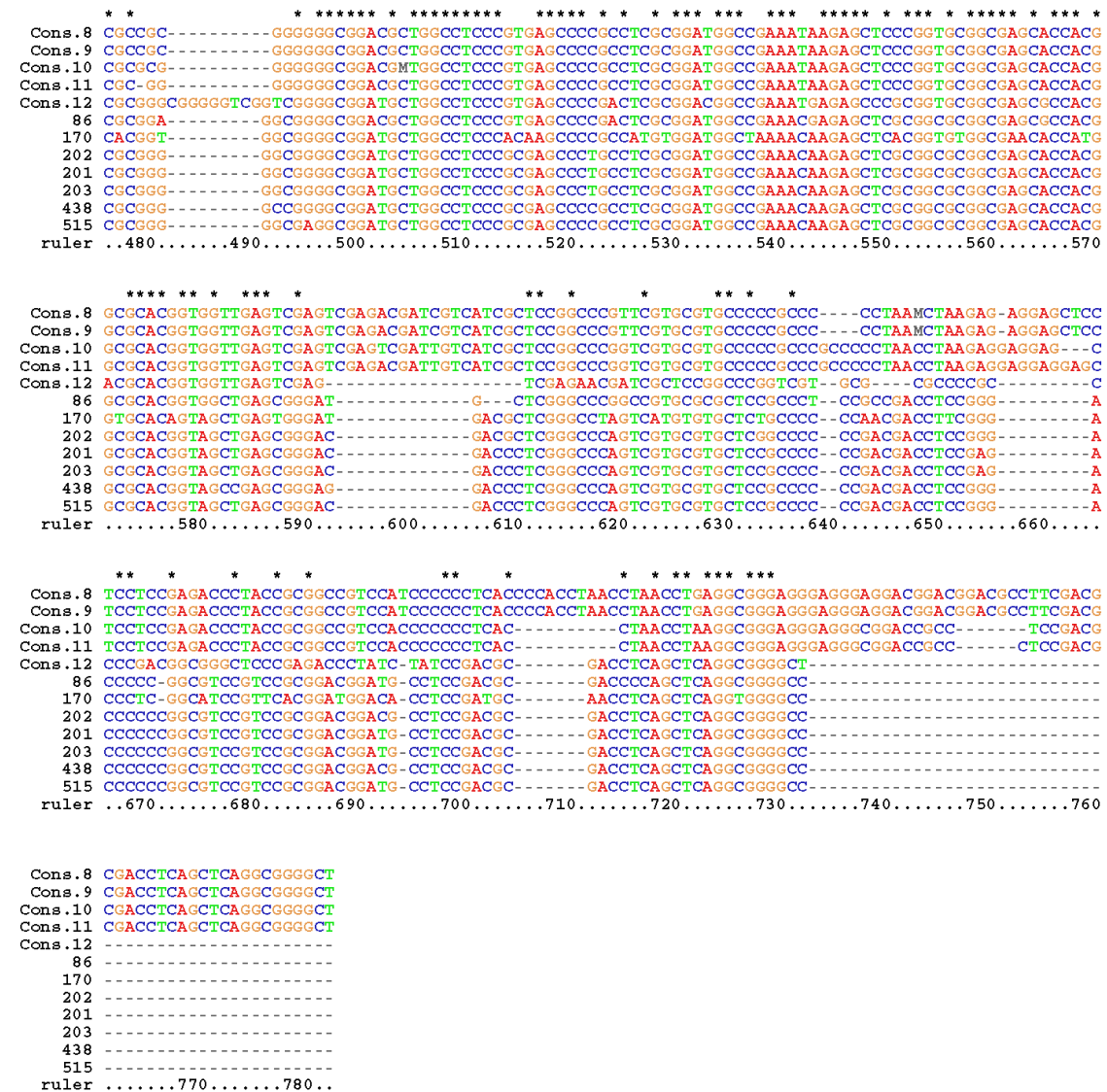


Abbildung 21: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen von *Intsia bijuga*, *I. palembanica*, *Afzelia africana* und *Hymenaea courbaril*. Cons.8 = *Intsia bijuga*: 85, 166, 204, 402-404, 407 und 453; Cons.9 = *I. bijuga*: 81, 401, 405, 406, 408-411 und 511; Cons.10 = *I. palembanica*: 399, 400, 413-415 und 417-422; Cons.11 = *I. palembanica*: 205 und 412; Cons.12 = *Afzelia africana*: 50 und 504; *Hymenaea courbaril*: 86, 170, 201-203, 438 und 515. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

#### 3.2.3.2 *Dalbergia* und *Machaerium scleroxylon*

Für die Gattung *Dalbergia* (Faboideae) lag der Fokus auf den CITES-geschützten Hölzern *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth. (CITES I), *Dalbergia retusa* Hemsl. und *Dalbergia stevensonii* Standley (CITES II). Als Austauschhölzer wurden weitere Arten der Gattung *Dalbergia* und *Machaerium scleroxylon* Tul. (Faboideae) herangezogen. Für folgendes Probenmaterial war eine Untersuchung möglich: zwei *Dalbergia nigra*, drei *D. retusa*, eine *D. latifolia* Roxb., zwei *D. spruceana* Benth., zwei *D. sissoo* Roxb.,

eine *D. melanoxyton* Guill. & Perr., eine *D. miscolobium* Benth., eine *D. decipularis* Rizz. & Matt., eine *D. obovata* E. Meyer und eine *Machaerium scleroxyton*. Das eingesetzte Material bestand aus Ästen, Blättern, Splintholz und DNA (Tabelle 6). Die Basenabfolgen der erstellten ITS-Sequenzen sind im Alignment aus Abbildung 22 wiedergegeben. Sequenzen einer Art wurden wiederum zu einer Consensus-Sequenz zusammengefasst. Eventuell vorhandene intraspezifische Unterschiede werden durch den entsprechenden IUPAC-Code dargestellt. Einige der hier präsentierten Ergebnisse entstanden im Rahmen einer (mit)betreuten Bachelorarbeit (Zatt Schardosin 2013).

Die ITS-Sequenzen der untersuchten Individuen weisen eine Länge von 633-640 bp auf (Tabelle 37). Lediglich *D. retusa* und *M. scleroxyton* zeigen kürzere Sequenzen. Die Längen liegen hier bei 621 bzw. 618 bp. Betrachtet man die einzelnen Abschnitte des ITS, so ergeben sich hierfür folgende Längen: ITS1 = 234-242 bp (*D. retusa* lediglich 226 bp), 5.8S = 162 bp und ITS2 = 232-237 bp (*D. retusa* = 224 bp; *M. scleroxyton* = 222 bp).

Tabelle 37: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für *Dalbergia* spp. und *Machaerium scleroxyton*. Angaben in bp.

Art	ITS1	5.8S	ITS2	ITS	ITS-Bereich
<i>Dalbergia nigra</i>	238	162	235	635	694
<i>Dalbergia retusa</i>	226		224	612	671
<i>Dalbergia latifolia</i>	242		232	636	695
<i>Dalbergia spruceana</i>	236		235	633	692
<i>Dalbergia sissoo</i>	240		232	634	693
<i>Dalbergia melanoxyton</i>	240		232	634	693
<i>Dalbergia miscolobium</i>	240		232	634	693
<i>Dalbergia decipularis</i>	241		237	640	699
<i>Dalbergia obovata</i>	242		234	638	697
<i>Machaerium scleroxyton</i>	234		222	618	677

Eine Analyse der Unterschiede der einzelnen ITS-Sequenzen zeigt, dass die Sequenzen von *D. melanoxyton* (378) und *D. miscolobium* (142) absolut homolog sind (Abbildung 22). Durchgeführte Vergleiche mit der GenBank des NCBI ergaben, dass Probe 378 zu 99% (Sequenzabdeckung: 92%) identisch mit einer in der GenBank hinterlegten

ITS-Sequenz von *D. melanoxylo* ist (Accession AB828650). Wurde dagegen die ITS-Sequenz von *D. miscolobium* mit den 30 in der GenBank hinterlegten ITS-Sequenzen von *D. miscolobium* verglichen (Accession: JQ582850.1-JQ582876.1, DQ787405.1, EF451069.1 und EF451070.1), so liegt die Homologie bei maximal 90% (Query coverage: 98%). Daher ist bei der Probe 142 von einer Fehlbestimmung auszugehen.

Für die verbleibenden Vertreter der *Dalbergia*-Gruppe ermöglicht der ITS eine klare Unterscheidung der Arten. Innerhalb der Gattung *Dalbergia* liegen die intraspezifischen Unterschiede bei maximal 1,2% (629 ↔ 633). Demgegenüber stehen die interspezifischen Unterschiede von minimal 6,1% (461 ↔ 474) und maximal 11% (461 ↔ Cons.14). Vergleicht man *M. scleroxylo* mit den verschiedenen Arten der Gattung *Dalbergia* so zeichnen sich Unterschiede von 10,5-12,6% ab.

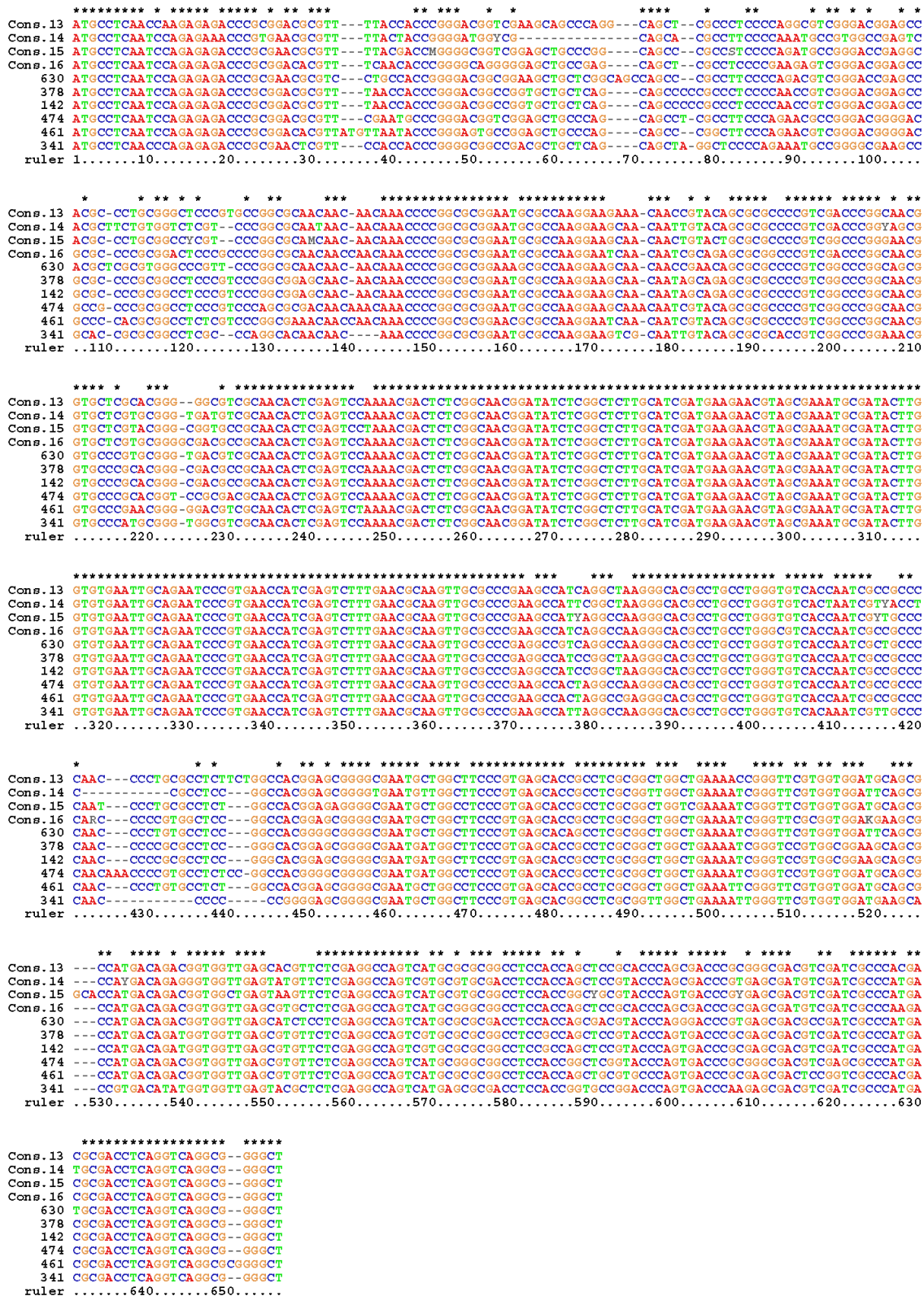


Abbildung 22: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung *Dalbergia* sowie von *Machaerium scleroxylon*. Cons.13 = *Dalbergia nigra*: 144 und 631; Cons.14 = *D. retusa*: 143, 344 und 632; Cons.15 = *D. spruceana*: 629 und 633; Cons.16 = *D. sissoo*: 513 und 628; *D. latifolia*: 630; *D. melanoxylon*: 378; *D. miscolobium*: 142; *D. decipularis*: 474; *D. obovata*: 461; *Machaerium scleroxylon*: 341. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

### 3.2.3.3 *Caesalpinia* und *Myrocarpus frondosus*

Die *Caesalpinia*-Gruppe wird durch die Gattungen *Caesalpinia* (Caesalpinioideae) und *Myrocarpus* (Faboideae) gegründet. Innerhalb dieser Gruppe wurde die durch CITES Anhang II geschützte Holzart *Caesalpinia echinata* Lam. untersucht. Auf der Seite der Austauschhölzer fanden sich weitere Arten der Gattung *Caesalpinia* (in erster Linie Bäume) und *Myrocarpus frondosus* Fr. Allem. wieder. Für die Untersuchungen standen drei *Caesalpinia echinata*, drei *C. ferrea* Mart. ex Tul., zwei *C. spinosa* (Mol.) Kuntze und eine *Myrocarpus frondosus* zur Verfügung. Für die Bereitstellung der Sequenzen wurden Blätter, DNA und Splintholz verarbeitet (Tabelle 6). Die Unterschiede in der Basenabfolge der einzelnen ITS-Sequenzen sind in Abbildung 23 wiedergegeben. Hierfür wurden die einzelnen Sequenzen einer Art wiederum zu einer Consensus-Sequenz zusammengefasst. Intraspezifische Unterschiede sind durch den entsprechenden IUPAC-Code dargestellt.

Die Sequenzen von *C. echinata* weisen für den ITS eine Länge von 639 bp auf. Mit 643 und 645 bp ist der ITS von *C. ferrea* und *C. spinosa* nur minimal länger. Für den ITS von *M. frondosus* ist eine Länge 620 bp zu verzeichnen. Während der ITS1 von *C. echinata* über eine Länge von 240 bp verfügt, haben *C. ferrea* und *C. spinosa* für diesen eine Größe von 237 bp. Der insgesamt längere ITS von *C. ferrea* und *C. spinosa* gegenüber *C. echinata* ergibt sich aus dem ITS2. Hier zeigen *C. ferrea* und *C. spinosa* Längen von 244 und 246 bp, während der ITS2 von *C. echinata* nur eine Größe von 237 bp hat. Für den ITS1 und den ITS2 von *M. frondosus* wurden die Längen von 235 sowie 223 bp festgesetzt. Für den 5.8S wurde wie bisher eine Länge von 162 bp erarbeitet (Tabelle 38).

Tabelle 38: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für *Caesalpinia* spp. und *Myrocarpus frondosus*. Angaben in bp.

Art	ITS1	5.8S	ITS2	ITS	ITS-Bereich
<i>Caesalpinia echinata</i>	240	162	237	639	698
<i>Caesalpinia ferrea</i>	237		244	643	702
<i>Caesalpinia spinosa</i>	237		246	645	704
<i>Myrocarpus frondosus</i>	235		223	620	679

Die intraspezifischen Unterschiede für *C. echinata*, *C. ferrea* und *C. spinosa* liegen bei 0%, 0-0,4% und 0%. Dagegen stehen die interspezifischen Unterschiede dieser drei Arten von 13,2% (*C. echinata* ↔ *C. ferrea*), 10,4% (*C. echinata* ↔ *C. spinosa*) und 14,5% (*C. ferrea* ↔ *C. spinosa*). Beim Vergleich von *M. frondosus* mit der Gattung *Caesalpinia* liegen die Unterschiede zwischen 19,9 und 21,5%.



Abbildung 23: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung *Caesalpinia* sowie von *Myrocarpus frondosus*. Cons.17 = *Caesalpinia echinata*: 206, 207 und 643; Cons.18 = *C. ferrea*: 471, 625 und 626; Cons.19 = *C. spinosa*: 425 und 426; *Myrocarpus frondosus*: 444. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

### 3.2.3.4 Die Gattung *Pterocarpus*

Ein weiterer Vertreter der Faboideae ist die Gattung *Pterocarpus*. Diese beinhaltet mit *Pterocarpus santalinus* L.f. ein weiteres Holz, das durch den CITES Anhang II geschützt ist. Auf der Seite der Austauschhölzer standen *P. soyauxii* Taub. und *P. indicus* Willd..

Im Zuge der Arbeit wurde Material von zwei *P. santalinus*, zwei *P. soyauxii*, vier *P. indicus* und einer *P. macrocarpus* Kurz. verarbeitet. Ausgangsmaterial waren DNA-Extrakte und Blätter (Tabelle 6). Die Unterschiede in der Basenabfolge der einzelnen ITS-Sequenzen sind in Abbildung 25 wiedergegeben. Die Sequenzen einer Art wurden auch in diesem Punkt zu einer Consensus-Sequenz zusammengefasst. Intraspezifische Unterschiede sind durch den zugehörigen IUPAC-Code dargestellt. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erbrachte die nachfolgenden Ergebnisse.

Der ITS für *P. santalinus* weist eine Länge von 650 bp auf, die ebenfalls für *P. macrocarpus* und Probe 642 (*P. indicus*) zu verzeichnen ist. Im Gegensatz zu Probe 642 haben die restlichen drei Individuen von *P. indicus* nur eine Länge von 642 bp. Für *P. soyauxii* ist eine Angabe der Länge des ITS nicht möglich, da die Erarbeitung des ITS1 nicht erfolgreich war. Zwar konnte unter Verwendung der allgemeinen „Holzprimer“ der ITS1 amplifiziert werden, jedoch brachten die anschließenden Sequenzierungen keine Ergebnisse. Für die weiteren Arten ergibt sich die Länge des ITS1 wie folgt: 250 bp für *P. santalinus*, 242 sowie 250 bp für *P. indicus* und 250 bp für *P. macrocarpus*. Der 5.8S zeigt für alle Arten eine Länge von 162 bp. Für den ITS2 sind Längen von 238 bp (*P. santalinus*, *P. indicus* und *P. macrocarpus*) und 243 bp (*P. soyauxii*) berechnet worden (Tabelle 39).

Tabelle 39: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für die Gattung *Pterocarpus*.  
Angaben in bp.

Art	ITS1	5.8S	ITS2	ITS	ITS-Bereich
<i>Pterocarpus santalinus</i>	250	162	238	650	709
<i>Pterocarpus soyauxii</i>	-		243	-	-
<i>Pterocarpus indicus</i>	242 u. 250		238	642 u. 650	701 u. 709
<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	250		238	650	709



Die unterschiedlichen Längen des ITS1 von *P. indicus* resultieren aus einem Indel, das Probe 642 aufweist. Dieses 8 bp (CCG GCA GC) große Indel ist in Abbildung 25 an Alignmentposition 61-68 wiedergegeben. Weiterhin zeigt das Alignment, dass die untersuchten Vertreter der Gattung *Pterocarpus* sehr homologe Sequenzen aufweisen. Mithilfe der Pairwise-Distance Analyse ergeben sich intraspezifische Unterschiede von max. 0,5%. Dagegen stehen interspezifische Unterschiede von max. 5,9-6,4% (*P. indicus* ↔ *P. soyauxii*). *P. soyauxii* unterscheidet sich von *P. macrocarpus* zu 5,9%. Mit 4,9-5,4% liegen die interspezifischen Unterschiede von *P. santalinus* und *P. soyauxii* in einem ähnlichen Bereich. Vergleicht man dagegen *P. santalinus* mit *P. indicus* und *P. macrocarpus*, so liegen die Unterschiede zwischen 3,1 und 3,7%. Anhand der vorliegenden Sequenzen ist eine zuverlässige Differenzierung von *P. indicus* und *P. macrocarpus* nicht möglich. Die Unterschiede betragen hier konstant 0,8%. Zur Absicherung dieser geringen Unterschiede wurde eine weitere Pairwise-Distance Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Sequenzen von *P. indicus* und *P. macrocarpus* mit entsprechenden ITS-Sequenzen der Sequenzdatenbank GenBank aligned. Zum Zeitpunkt der Analyse lagen für *P. indicus* vier ITS2-Sequenzen vor (AF269177.1, JN083482.1, JN083481.1 und JN083480.1). *P. macrocarpus* war mit zwei Sequenzen in der GenBank vertreten, wobei eine den ITS (AF269176.1) und die andere den ITS2-Bereich (JN083487.1) wiedergab. Für *P. indicus* ergibt die Pairwise-Distance Analyse, dass alle Sequenzen (eigene und GenBank-Sequenzen) geringe oder keine intraspezifischen Unterschiede aufweisen (max. 0,6%; Abbildung 24). Betrachtet man die intraspezifischen Unterschiede von *P. macrocarpus*, so sind diese Sequenzen weniger homolog. Während JN083487.1 (ITS2-Bereich) keinerlei Abweichung zur Sequenz von Probe 462 zeigt, weicht AF269176.1 (ITS) zu 8,8% ab. Die Abweichung der beiden Netzsequenzen zueinander liegt bei 0,7%. Bezüglich der interspezifischen Unterschiede von *P. macrocarpus* zu *P. indicus* zeigt JN083487.1 (ITS2-Bereich) mit 0,7-1,3% vergleichbare Werte, wie in der ersten Analyse ermittelt (0,8%). Betrachtet man die interspezifischen Unterschiede von AF269176.1 ergeben sich Unterschiede von 7,4-8,3% zu den Sequenzen der Proben 448 und 640-642 (ITS-Bereich von *P. indicus*). Steht nur der ITS2-Bereich zur Verfügung (siehe GenBank-Sequenzen), so bestehen außer für AF269177.1 (0,6%) keinerlei Unterschiede. Die interspezifischen Unterschiede der eigenen Sequenz von *P. macrocarpus* (462) zu den GenBank-Sequenzen liegen konstant bei 0,6%. Lediglich AF269177.1 zeigt eine stärkere Abweichung von 1,2%.



## Ergebnisse

Nr.	ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	641 <i>P. indicus</i> , ITS-Bereich										
2	640 <i>P. indicus</i> , ITS-Bereich	0,000									
3	448 <i>P. indicus</i> , ITS-Bereich	0,000	0,000								
4	642 <i>P. indicus</i> , ITS-Bereich	0,002	0,002	0,002							
5	AF269177.1 <i>P. indicus</i> , ITS2-Bereich	0,006	0,006	0,006	0,006						
6	JN083482.1 <i>P. indicus</i> , ITS2-Bereich	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006					
7	JN083481.1 <i>P. indicus</i> , ITS2-Bereich	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000				
8	JN083480.1 <i>P. indicus</i> , ITS2-Bereich	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000			
9	JN083487.1 <i>P. macrocarpus</i> , ITS2-Bereich	0,007	0,007	0,007	0,007	0,013	0,007	0,007	0,007		
10	AF269176.1 <i>P. macrocarpus</i> , ITS-Bereich	0,074	0,074	0,074	0,083	0,006	0,000	0,000	0,000	0,007	
11	462 <i>P. macrocarpus</i> , ITS-Bereich	0,008	0,008	0,008	0,008	0,012	0,006	0,006	0,006	0,000	0,088

Abbildung 24: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von *Pterocarpus indicus* und *P. macrocarpus*. Verglichen wurden selbst erstellte Sequenzen (448, 462 und 640-642) sowie ITS-Sequenzen der GenBank (AF269176.1, JN083487.1, AF269177.1, JN083480.1, JN083481.1 und JN083482.1).

```

Cons.20 ATGCCTCACAATCCAGTCGACCCGCGAACGCTGTTTGGCACACGGGCGAGGCGATGCTCTCGGCAGCTCGGTTGCCCGCGGTGCCGGAACGGGC
Cons.21 -----
Cons.22 ATGCCTCACAATCCAGTCGACCCGCGAACGCTGTTT-CCACACGGGCGAGGCGATGCTGC-----TCGGCTGCCCGCGGTGCCGGAACGGGC
642 ATGCCTCACAATCCAGTCGACCCGCGAACGCTGTTT-CCACACGGGCGAGGCGATGCTCGGCTGCCCGCGGTGCCGGAACGGGC
462 ATGCCTCACAATCCAGTCGACCCGCGAACGCTGTTT-CCACACGGGCGAGGCGATGCTCTCGGCAGCTCGACTGCCCGCGGTGCCGGAACGGGC
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....

Cons.20 ATCAGCCCCGTGCGTGCGGGCGCTGCCCGGCACACAACAACAAA-CCCCGGCGCGGAATGCCCAAGGAAGTCGTAACTGTTGGTGCCCGA
Cons.21 -----
Cons.22 ATCAGCCCCGAGCGTGCGGGCGCTGCCCGGCACACAACAACAAAACCCCGCGCGGAATGCCCAAGGAAGTCGTAACTGTTGGTGCCCGAG
642 ATCAGCCCCGAGCGTGCGGGCGCTGCCCGGCACACAACAACAAAACCCCGCGCGGAATGCCCAAGGAAGTCGTAACTGTTGGTGCCCGAG
462 ATCAGCCCCGAGCGTGCGGGCGCTGCCCGGCACACAACAACAAAACCCCGCGCGGAATGCCCAAGGAAGTCGTAACTGTTGGTGCCCGAG
ruler ..100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190

Cons.20 CCCTTTTGGCCCGGAACGGTGCTCGTACGGGCGGCGCCGCAACACACTCGAGTCTRAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCAATC
Cons.21 -----
Cons.22 CCCTTTTGGCCCGGAACGGTGCTCGTACGGGCGGCGCCGCAACACACTCGAGTCTAGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCAATC
642 CCCTTTTGGCCCGGAACGGTGCTCGTACGGGCGGCGCCGCAACACACTCGAGTCTAGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCAATC
462 CCCTTTTGGCCCGGAACGGTGCTCGTACGGGCGGCGCCGCAACACACTCGAGTCTAGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCAATC
ruler .....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....

*****
Cons.20 GATGAAGAACGTAGCGAAATCCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCCCGCGAAGCCATTAG
Cons.21 GATGAAGAACGTAGCGAAATCCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCCCGCGAAGCCATTAG
Cons.22 GATGAAGAACGTAGCGAAATCCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCCCGCGAAGCCATTAG
642 GATGAAGAACGTAGCGAAATCCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCCCGCGAAGCCATTAG
462 GATGAAGAACGTAGCGAAATCCGATACCTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCCCGCGAAGCCATTAG
ruler ..290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380

*****
Cons.20 GCTAAGGCGACGCTCGCTGGGTGTACGAAATCGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCCGGGCGGCGGGGCGAATCTGGCTTCCCG
Cons.21 GCTAAGGCGACGCTCGCTGGGTGTACGAAATCGTTGCCCAATCAATCCCGCGCTAATAAAGGCGTCGGGCGGGGCGAATCTGGCTTCCCG
Cons.22 GCTAAGGCGACGCTCGCTGGGTGTACGAAATCGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCCGGGCGGCGGGGCGAATCTGGCTTCCCG
642 GCTAAGGCGACGCTCGCTGGGTGTACGAAATCGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCCGGGCGGCGGGGCGAATCTGGCTTCCCG
462 GCTAAGGCGACGCTCGCTGGGTGTACGAAATCGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCCGGGCGGCGGGGCGAATCTGGCTTCCCG
ruler .....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....

*****
Cons.20 TGAGCGAGTGCTCGGTTGGCCGAAATCGGGTTCGTGGTGGAGGGTAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTCCAACTCTCAGGCCAGTCGT
Cons.21 TGAGCGAGTGCTCGGTTGGCCGAAATCGGGTTCGTGGTGGAGGGCAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTGCATCTCAGGCCAGTCGT
Cons.22 TGAGCGAGTGCTCGGTTGGCCGAAATCGGGTTCGTGGTGGAGGGCAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTGCATCTCAGGCCAGTCGT
642 TGAGCGAGTGCTCGGTTGGCCGAAATCGGGTTCGTGGTGGAGGGCAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTGCATCTCAGGCCAGTCGT
462 TGAGCGAGTGCTCGGTTGGCCGAAATCGGGTTCGTGGTGGAGGGCAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTGCATCTCAGGCCAGTCGT
ruler ..480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570

*****
Cons.20 CGCGGTCCTCCGCTAGTACGGAATCCGCTGACCCG-TGAGCGGACCCGATCGCCCATGATGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
Cons.21 CGCGGTCCTCCGCTAGTACGGAATCCGCTGACCCGCTGAGCGGACCCGATCGCCCATGATGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
Cons.22 CGCGGTCCTCCGCTAGTACGGAATCCGCTGACCCGACACGCGCATCGCCCATGATGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
642 CGCGGTCCTCCGCTAGTACGGAATCCGCTGACCCGACACGCGCATCGCCCATGATGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
462 CGCGGTCCTCCGCTAGTACGGAATCCGCTGACCCGACACGCGCATCGCCCATGATGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
ruler .....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640.....650.....

```

Abbildung 25: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung *Pterocarpus*.

Cons.20 = *P. santalinus*: 636 und 637; Cons.21 = *P. soyauxii*: 638 und 639;  
 Cons.22 = *P. indicus*: 448, 640 und 641; *P. indicus*: 642; *P. macrocarpus*: 462. \* = Position mit  
 identischer Base für alle Sequenzen.

### 3.2.3.5 Die Gattung *Dipteryx* und *Bowdichia nitida*

Eine weitere Gruppe innerhalb der Fabaceae bilden *Dipteryx panamensis* (Pittier) Record & Mell. (CITES Anhang III), *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. und *Bowdichia nitida* Benth.. Beide Gattungen sind Vertreter der Unterfamilie Faboideae. Für die Gruppe stand lediglich DNA eines Individuums von *B. nitida* zur Verfügung (Tabelle 6). Die ITS-Sequenz dieses Individuums gibt Abbildung 26 wieder. Die Länge der Sequenz beträgt 645 bp und setzt sich aus folgenden Einzellängen zusammen: 237 bp für den ITS1, 162 bp für den 5.8S und 246 bp für den ITS2 (Tabelle 40).

Tabelle 40: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für *Bowdichia nitida*.  
Angaben in bp.

Art	ITS1	5.8S	ITS2	ITS	ITS-Bereich
<i>Bowdichia nitida</i>	237	162	246	645	704

Der Abgleich der Sequenz von Probe 624 mit den ITS-Sequenzen der GenBank des NCBI ergab eine 100%ige Homologie (100% Sequenzabdeckung) zu einer Sequenz von *B. nitida* (JX124479.1, (Cardoso et al. 2012)). Zwei weitere für *B. nitida* hinterlegte Sequenzen (JX124477.1 und JX124478.1, (Cardoso et al. 2012)) hatten eine Homologie von 99% (100% Sequenzabdeckung). Des Weiteren lagen für die Gattung *Bowdichia* drei Sequenzen von *B. virgilioides* vor (JX124475.1, JX124476.1 (Cardoso et al. 2012) und EF457709.1 (Edwards und Hawkins 2007)). Alle drei Sequenzen zeigten eine Homologie von 99% zu der Sequenz von Probe 624. Eine Pairwise-Distance Analyse mit den insgesamt sieben Sequenzen ergab interspezifische Unterschiede von 0,2-0,6%. Für *B. nitida* stehen diesen geringen interspezifischen Unterschieden, intraspezifische Unterschiede von 0-0,3% gegenüber. Für *B. virgilioides* wurden Werte von 0,3-0,6% errechnet.

Die jeweils drei ITS-Sequenzen der beiden Arten der GenBank wurden zu je einer Consensus-Sequenz zusammengefasst und mit der Sequenz von Probe 624 in Abbildung 26 dargestellt. Insgesamt zeigt das Alignment nur an sieben Positionen Abweichungen zu der Sequenz von Probe 624. Sechs der sieben Positionen weisen IUPAC-Codes auf (Positionen 1, 369, 408, 511, 522 und 557). Bei den Positionen mit einem IUPAC-Code wird deutlich, dass mindestens eine der Sequenzen, die die entsprechende Consensus-Sequenz bilden, eine Base aufweist, die der von Probe 624 entspricht. An der siebten Position (Position 567) zeigt die Consensus-Sequenz von *B. nitida* (Cons.23) entweder ein T oder ein Gap (dargestellt durch: t).

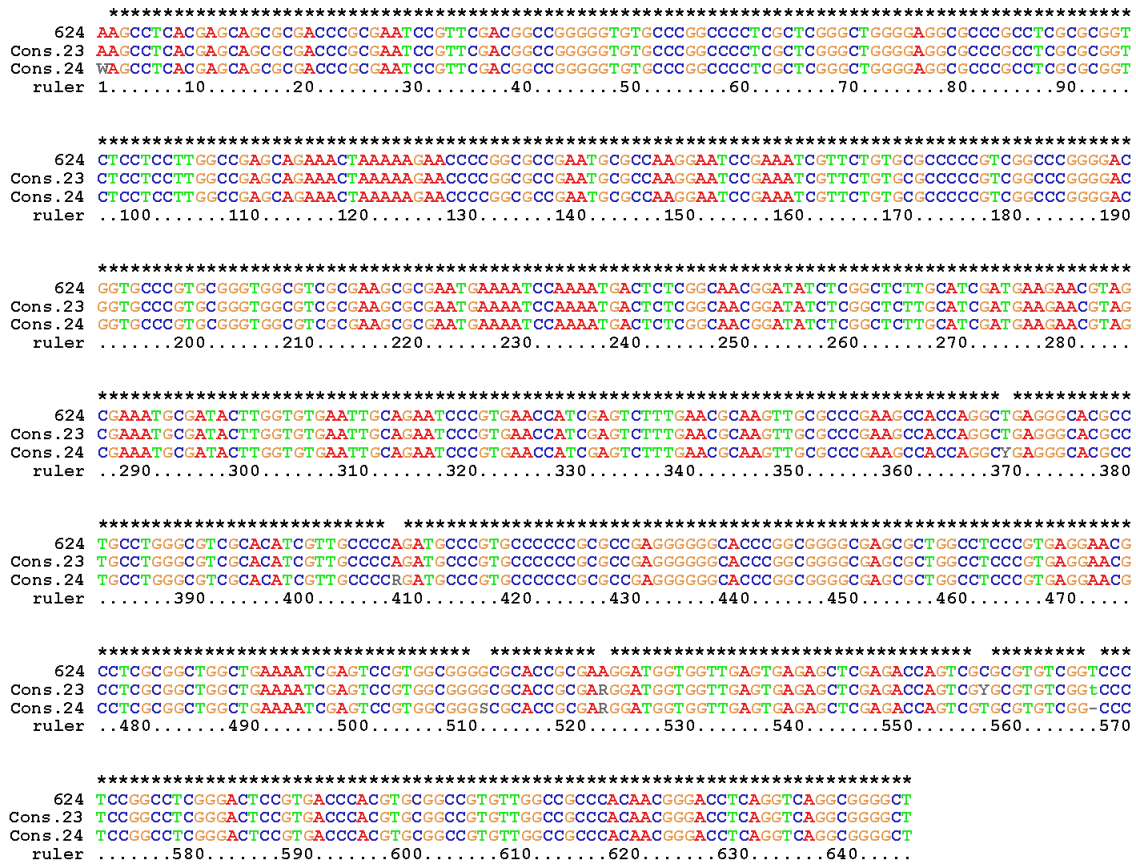


Abbildung 26: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung *Bowdichia*. *Bowdichia nitida*: 624; Cons.23 = *Bowdichia nitida* mit GenBank-Nr.: JX124477.1, JX124478.1 und JX124479.1; Cons.24 = *Bowdichia virgilioides* mit GenBank-Nr.: JX124475.1, JX124476.1 und EF457709.1. t = Position mit T oder Gap. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

### 3.2.4 Caryocaraceae

Für die Familie der Caryocaraceae wurde die Gattung *Caryocar* untersucht. Innerhalb der Gattung lag der Fokus auf *Caryocar costaricense* Donn. Sm. (CITES Anhang II) und dessen Austauschhölzern *Caryocar brasiliense* Camb. und *Caryocar glabrum* Pers.. Für die Untersuchungen lagen für ein Individuum Blätter (*C. brasiliense*) und für ein weiteres DNA (*C. glabrum*) vor (Tabelle 6).

Tabelle 41: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für *Caryocar brasiliense* und *C. glabrum*. Angaben in bp.

Art	ITS1	5.8S	ITS2	ITS	ITS-Bereich
<i>Caryocar brasiliense</i>	221	162	245	628	687
<i>Caryocar glabrum</i>	221		245	628	687

Für den ITS von *C. brasiliense* und *C. glabrum* wurde eine Länge von 687 bp ermittelt. Der ITS1 ist mit 221 bp kürzer als der ITS2 (245 bp). Für den 5.8S wurde wiederum eine Länge von 162 bp festgelegt (Tabelle 41).

Die ITS-Sequenzen der beiden untersuchten Arten unterscheiden sich in 14 Positionen (Positionen ohne \* im Alignment, Abbildung 27). Der Abgleich mit der Sequenzdatenbank GenBank ergab für die Sequenzen eine 93%ige Homologie (Sequenzabdeckung 100%) zur einzigen hinterlegten ITS-Sequenz der Gattung *Caryocar* (*C. glabrum*, FJ037803.1). Eine durchgeführte Pairwise-Distance Analyse wies für *C. brasiliense* (208) und *C. glabrum* (627) interspezifische Unterschiede von 2% aus. Dagegen stehen die intraspezifischen Unterschiede von 6,7% der beiden ITS-Sequenzen von *C. glabrum* (627 ↔ FJ037803.1). Die interspezifischen Unterschiede der ITS-Sequenzen von *C. brasiliense* (208) und *C. glabrum* (FJ037803.1) betragen 6,4%.

```

***** * *****
208 AAACCTGCTGACGCAGCACGACCCGCGAACGAGTTCCCACTCAATCTTCGGCGCACCGGGGGCACGTTCCTCCCGGGGCTCGGACAGCCGGGGGCA
627 AAACCTGCTGACGCAGCACGACCCGCGAACGAGTTCCCACTCAAGCGTTCGGCGCACCTGGGGGCACGTTCCTCCCGGGGCTCGGACAGCCGGGGGCA
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....

*** *****
208 CCGCCCCCGCGCGCCCCAACGAAACACCGGCGCGGGATGCGCCAAGGAACACAAACAGGATGGCGCCCGCCGACCCCAACGAGACGGGGGGCG
627 CCGCCCCCGCGCGCCCCAACGAAACACCGGCGCGGGATGCGCCAAGGAACACAAACAGGATGGCGCCCGCCGACCCCAACGAGACGGGGGGCG
ruler ..100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190

*****
208 GCGGTGCGATTTCGAACCATTAAGTCTAAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTG
627 GCGGTGCGATTTCGAACCATTAAGTCTAAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTG
ruler .....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....

*****
208 GTGTGAATTGCAGAAATCCCGCGAACCATCGAGTTTGTGAACGCAAGTTGCGCCAAAGCCTTATGGCCGAGGGCAGCTCTGCTGGGTGTCAAGC
627 GTGTGAATTGCAGAAATCCCGCGAACCATCGAGTTTGTGAACGCAAGTTGCGCCAAAGCCTTATGGCCGAGGGCAGCTCTGCTGGGTGTCAAGC
ruler ..290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380

*****
208 AACGTGCCCCCCCCCTCCACCCCCGCGCGACGGACAGGGGCGAGGGAAGGGCGGAGATTGGCCTCCCGTGCGCTCCCGCTCACGGCAGGCCCAA
627 AACGTGCCCCCCCCCTCCACCCCCGCGCGACGGACAGGGGTTGGGAAGGGCGGAGATTGGCCTCCCGTGCGCTCCCGCTCACGGCAGGCCCAA
ruler .....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....

*** *****
208 AAATGGATCCCCCGATGGCGGCAGCCACGGCAAGCGGTGGTTGTCAAGACCCCTCAATCGGGCCGTGCGCACGCTGCCACCCCTGGTGGGACCCG
627 AAACGGATCCCCCGATGGCGGCAGCCACGGCAAGCGGTGGTTGTCAAGACCCCTCAATCGAGCCGTGCGCACGCTGCCACCCCTGGGCGGGACCC
ruler ..480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570

*****
208 GAAGGACCCCTCGGCGCCTCTGGCGCATCGCTACGCGACCCCAAGTCAAGCGGGACC
627 GAAGGACCCCTCGGCGCCTCTGGCGCAATCGCTACGCGACCCCAAGTCAAGCGGGACC
ruler .....580.....590.....600.....610.....620.....

```

Abbildung 27: Alignment der ITS-Sequenzen von *Caryocar brasiliense* und *C. glabrum*. *C. brasiliense*: 208; *C. glabrum*: 627. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

### 3.2.5 Thymelaeaceae, Euphorbiaceae, Combretaceae und Rubiaceae

Die folgende Gruppe von CITES-geschützten Holzarten sowie deren Austauschhölzern wird auch als Ramin-Gruppe bezeichnet und umfasst Vertreter aus vier Familien. Derzeit sind sämtliche Arten der Gattung *Gonystylus* (Thymelaeaceae) in Anhang II des Washingtoner Artenschutzabkommens vertreten. Der geschützten Gattung *Gonystylus* stehen die Austauschhölzer *Terminalia superba* Engl. & Diels (Combretaceae), *Endospermum moluccanum* (Teijsm. & Binn.) Kurz (Euphorbiaceae) und *Neolamarckia cadamba* (Roxb.) Bosser (Rubiaceae) gegenüber.

Für den Aufbau der rDNA ITS-Sequenzdatenbank standen Äste, Blätter, Splintholz und DNA von verschiedenen Arten mit teilweise mehreren Individuen zur Verfügung (dreißig *Gonystylus* spec., zwei *G. bancanus* (Miq.) Kurz, eine *Endospermum moluccanum*, eine *Neolamarckia cadamba*, zwei *Terminalia bentzoe* (L.) L. f., vier *T. catappa* L., eine *T. bellirica* (Gaertn.) Roxb., eine *T. avicennioides* Guill. & Perr., eine *T. arenicola* Byrnes und eine *T. glaucescens* Planch. ex Benth.; Tabelle 6). Die Proben von *Gonystylus* spec. waren Teil eines Probensets, das für einen Blindtest zur Verfügung stand (Punkt 3.4). Das Material bestand aus Splintholz in Hackschnitzelgröße. Für alle der in diesem Punkt untersuchten Proben konnte erfolgreich der ITS analysiert werden. Die ITS-Sequenzen sind in dem Alignment aus Abbildung 28 wiedergegeben. Für dieses Alignment wurden wiederum identische oder sich stark ähnelnde Sequenzen in einer Consensus-Sequenz zusammengefasst.

Die Gattung *Gonystylus* weist im ITS eine Länge von 635 und 636 bp auf. *E. moluccanum* hat mit 648 bp eine etwas längere Ausdehnung. *N. cadamba* und die Gattung *Terminalia* zeigen mit 632 bp bzw. 629-632 bp eine nahezu identische Länge. Die Längen des ITS1 ergeben sich wie folgt: 216-218 bp für die Gattung *Gonystylus*, 259 bp für *E. moluccanum*, 232 bp für *N. cadamba* und 238-241 bp für die Gattung *Terminalia*. Der 5.8S wurde für alle untersuchten Proben mit einer Länge von 162 bp definiert. Mit 256-258 bp hat die Gattung *Gonystylus* einen deutlich längeren ITS2 als die restlichen Vertreter. Auf die Gattung *Gonystylus* folgt *N. cadamba* mit einer Länge von 238 bp. *E. moluccanum* und die Gattung *Terminalia* kommen für den ITS2 auf Längen von 227 bp bzw. 229 bp (Tabelle 42).

Tabelle 42: Länge der unterschiedlichen Bereiche des ITS für *Gonystylus* spp., *Endospermum moluccanum*, *Neolamarckia cadamba* und *Terminalia* spp.. Angaben in bp.

Art	ITS1	5.8S	ITS2	ITS	ITS-Bereich
<i>Gonystylus</i> spec.	216-218	162	256-258	635-636	694-695
<i>Gonystylus bancanus</i>	217		256	635	694
<i>Endospermum moluccanum</i>	259		227	648	707
<i>Neolamarckia cadamba</i>	232		238	632	691
<i>Terminalia bentzoe</i>	240		229	631	690
<i>Terminalia catappa</i>	241		229	632	691
<i>Terminalia bellirica</i>	238		229	629	688
<i>Terminalia avicennioides</i>	239		229	630	689
<i>Terminalia arenicola</i>	240		229	631	690
<i>Terminalia glaucescens</i>	239		229	630	689

Die Aufarbeitung der Sequenzdaten verdeutlicht, dass sich hinter den 23 Individuen von *Gonystylus* spec. zwei Arten verbergen. Sie werden nachfolgend als Art1 (z.B. Cons.26 = 482, 489, 491-493, 499, 614-617, 619, 621 und 623) und Art2 (Cons.28 = 611-613, 618, 620 und 622) bezeichnet. Zu Art1 werden auch die Sequenzen von Probe 486 und Cons.27 (483, 487 und 500) aus Abbildung 28 gezählt. Cons.27 weicht nur an Position 130 von Cons.26 ab (T gegen Gap). Probe 486 zeigt gegenüber Cons.26 eine Abweichung von 0,4%. Da Art1 keinerlei oder nur geringe Abweichung zu den Sequenzen von *G. bancanus* (Cons.25 = 244 und 247) aufweist, wird davon ausgegangen, dass es sich bei Art1 um *G. bancanus* handelt. Die Zuordnung von Art2 zu einer Sequenz der internen Sequenzdatenbank war nicht möglich. Der Unterschied von Art1 zu Art2 liegt bei 2,5-2,6% (vgl. z.B. Cons.26 und Cons.28, Abbildung 28). Ein Abgleich der Sequenzen von Art1 und Art2 mit den ITS-Sequenzen der GenBank brachte keine weiteren Ergebnisse, da zum Zeitpunkt des Abgleichs keine entsprechenden ITS-Sequenzen hinterlegt waren (Abbildung 28).

Wie zu erwarten, treten für die unterschiedlichen Gattungen/Arten der verschiedenen Familien klare interspezifische Unterschiede auf. Für *E. moluccanum* (Euphorbiaceae) liegen die Unterschiede gegenüber der Gattung *Gonystylus* bei ~32% (Thymelaeaceae). Mit Abweichungen von ~35% bzw. ~25,5% ist *E. moluccanum* auch klar von *N. cadamba* (Rubiaceae) und der Gattung *Terminalia* (Combretaceae) abzugrenzen. *N. cadamba* weist im Vergleich mit den Gattungen *Gonystylus* und *Terminalia*

interspezifische Unterschiede von ~27% bzw. ~33,5% auf. Eine klare Differenzierung der beiden Gattungen *Terminalia* und *Gonystylus* ist mit Unterschieden von ~33% sichergestellt. Die interspezifischen Unterschiede innerhalb der Gattung *Terminalia* liegen zwischen 1,4%, für *T. catappa* (Cons.30) gegenüber *T. arenicola* (464) und 9,2% für *T. catappa* (Cons.30) gegenüber *T. bellirica* (458). Für *T. avicennioides* (506) und *T. glaucescens* (507) reichen die Unterschiede für eine Differenzierung nicht aus. Weiter zeigt Abbildung 28, dass *T. bentzoe* und *T. catappa* keinerlei interspezifische Unterschiede aufweisen (vgl. Cons.29 und Cons.30).



Cons. 25 AATCTCTGCACAGCAGCAGCAGCCCGTGAACCTTGAATTA-----TACAAACG-----ATCGAGTGGTGGGTGGGCCCCGGCTCCC  
Cons. 26 AATCTCTGCACAGCAGCAGCAGCCCGTGAACCTTGAATTA-----TACAAACG-----ATCGAGTGGTGGGTGGGCCCCGGCTCCC  
Cons. 27 AATCTCTGCACAGCAGCAGCAGCCCGTGAACCTTGAATTA-----TACAAACG-----ATCGAGTGGTGGGTGGGCCCCGGCTCCC  
486 AATCTCTGCACAGCAGCAGCAGCCCGTGAACCTTGAATTA-----TACAAACG-----ATCGAGTGGTGGGTGGGCCCCGGCTCCC  
Cons. 28 AATCTCTGCACAGCAGCAGCAGCCCGTGAACCTTGAATTA-----TACAAACG-----ATCGAGTGGTGGGTGGGCCCCGGCTCCC  
634 AAGCCCTGCTATGCAGAACGACCCCGTGAACCTTGAATTA-----TACAAACG-----ATCGAGTGGTGGGTGGGCCCCGGCTCCC  
635 AATCTCTGCACAGCAGCAGCAGCCCGTGAACCTTGAATTA-----TACAAACG-----ATCGAGTGGTGGGTGGGCCCCGGCTCCC  
Cons. 29 ACACCTGCAAAAGCAGAGCGACCCCGGAAC-CGTTTTTAAATGCCCCGGGATACCGGGG---GGCGCTAGCCGCTGGTAGCCCCAAAGCTCCG  
Cons. 30 ACACCTGCAAAAGCAGAGCGACCCCGGAAC-CGTTTTTAAATGCCCCGGGATACCGGGG---GGCGCTAGCCGCTGGTAGCCCCAAAGCTCCG  
458 ATACCTGCAAAAGCAGAGCGACCCCGGAAC-CGTTTTTAAATGCCCCGGGATACCGGGG---GGCGCTAGCCGCTGGTAGCCCCAAAGCTCCG  
464 ACACCTGCAAAAGCAGAGCGACCCCGGAAC-CGTTTTTAAATGCCCCGGGATACCGGGG---GGCGCTAGCCGCTGGTAGCCCCAAAGCTCCG  
506 ACACCTGCAAAAGCAGAGCGACCCCGGAAC-CGTTTTTAAATGCCCCGGGATACCGGGG---GGCGCTAGCCGCTGGTAGCCCCAAAGCTCCG  
507 ACACCTGCAAAAGCAGAGCGACCCCGGAAC-CGTTTTTAAATGCCCCGGGATACCGGGG---GGCGCTAGCCGCTGGTAGCCCCAAAGCTCCG  
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....

Cons. 25 TTCCC-----TCCT--CGATCGGCCCTT--GTGGCC--TAACACCA--AACCCCGCGCGGACTGCGCCAAAGGAAA-TAAATTTTGA  
Cons. 26 TTCCC-----TCCT--CGATCGGCCCTT--GTGGCC--TAACACCA--AACCCCGCGCGGACTGCGCCAAAGGAAA-TAAATTTTGA  
Cons. 27 TTCCC-----TCCT--CGATCGGCCCTT--GTGGCC--TAACACCA--AACCCCGCGCGGACTGCGCCAAAGGAAA-TAAATTTTGA  
486 TTCCC-----TCCT--CGATCGGCCCTT--GTGGCC--TAACACCA--AACCCCGCGCGGACTGCGCCAAAGGAAA-TAAATTTTGA  
Cons. 28 TTCCC-----TCCT--CGATCGGCCCTT--GTGGCC--TAACACCA--AACCCCGCGCGGACTGCGCCAAAGGAAA-TAAATTTTGA  
634 G-CGCGGGGAGGGGACACCGGCGCATCTCCAAACCCGCTGCGAGCGGCGGCAACCAAAACCCCGCGCGGAGCGCCAAAGGAAAACGCTGACGACG  
635 GTTCGCGCTCCGCTGCTTTTC--CGTTCGCTGCTGCGCGGAGCT--TGTAATCT--AAACCCCGCGCGGAGCGCCAAAGGAAAACGCTGACGACG  
Cons. 29 GACGCTAGGGGTGCAAC--CCACCCCTC-AGCGGACGGAGCT--CCAAACAA--AACCCCGCGCGGAGCGCCAAAGG--TACTCCAAACGA  
Cons. 30 GACGCTAGGGGTGCAAC--CCACCCCGCAGGGACGGAAGCT--CCAAACAA--AACCCCGCGCGGAGCGCCAAAGG--TACTCCAAACGA  
458 GACCGCAGGGGTGCAAC--CCACCTCC-GGCGGATGGAGCT--TCAACAAA--AACCCCGCGCGGAGCGCCAAAGG--TACTCCAAACGA  
464 GACGCTAGGGGTGCAAC--CCACCCCGCAGGGACGGAAGCT--CCAAACAA--AACCCCGCGCGGAGCGCCAAAGG--TACTCCAAACGA  
506 GACGCTAGGGGTGCAAC--CCACCCCGC-AGCGAACGGATCT--CGGAACAA--AACCCCGCGCGGAGCGCCAAAGG--TACTCCAAACGA  
507 GACGCTAGGGGTGCAAC--CCACCCCGC-AGCGAACGGATCT--CGGAACAA--AACCCCGCGCGGAGCGCCAAAGG--TACTCCAAACGA  
ruler ..100.....110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190

Cons. 25 CAGAAAGCTTCTCCCCACACCTTCGGAAACGCTGGTCTGGTGGGGGGAAGCGCTTGT-TGCACAACCCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
Cons. 26 CAGAAAGCTTCTCCCCACACCTTCGGAAACGCTGGTCTGGTGGGGGGAAGCGCTTGT-TGCACAACCCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
Cons. 27 CAGAAAGCTTCTCCCCACACCTTCGGAAACGCTGGTCTGGTGGGGGGAAGCGCTTGT-TGCACAACCCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
486 CAGAAAGCTTCTCCCCACACCTTCGGAAACGCTGGTCTGGTGGGGGGAAGCGCTTGT-TGCACAACCCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
Cons. 28 CAGAAAGCTTCTCCCCACACCTTCGGAAACGCTGGTCTGGTGGGGGGAAGCGCTTGT-TGCACAACCCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
634 AAGAGCGCTCTCCCCGGGCTCCGAAACGCGAGCCTCGGGGAGCGTCCACTCTTTCAGAACCTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
635 GTTCGAGACCCCTCATGTCGCC--CGTTCGCGGTGCGCTCGGGGAGGTGTTGTGTGCTGCTGTAATTCAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
Cons. 29 TAGGGCATCGCCCCGTAGCCCTGGGTTCCAGTGTGCTCGGGCTGCTGTTCAACATCATAAAGTCTA-AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
Cons. 30 TAGGGCATCGCCCCGTAGCCCTGGGTTCCAGTGTGCTCGGGCTGCTGTTCAACATCATAAAGTCTA-AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
458 AAGGGCATCGCCCCGTAGCCCTGGGTTCCAGTGTGCTCGGGCTGCTGTTCAACATCATAAAGTCTA-AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
464 TAGGGCATCGCCCCGTAGCCCTGGGTTCCAGTGTGCTCGGGCTGCTGTTCAACATCATAAAGTCTA-AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
506 TAGGGCATCGCCCCGTAGCCCTGGGTTCCAGTGTGCTCGGGCTGCTGTTCAACATCATAAAGTCTA-AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
507 TAGGGCATCGCCCCGTAGCCCTGGGTTCCAGTGTGCTCGGGCTGCTGTTCAACATCATAAAGTCTA-AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGC  
ruler .....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....

Cons. 25 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
Cons. 26 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
Cons. 27 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
486 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
Cons. 28 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
634 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
635 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
Cons. 29 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
Cons. 30 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
458 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
464 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
506 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
507 TCTCGCATCGATGAAGAACGCTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAAACCATCGAGCTCTTTGAACCGAAGTTGCGCCCTA  
ruler ..290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380

Cons. 25 CGCCTTCGGGGCGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGTAGCCATCTCTACACTCATTCCAGATGGGCGCGGGTGTATGTGTCGG-GC  
Cons. 26 CGCCTTCGGGGCGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGTAGCCATCTCTACACTCATTCCAGATGGGCGCGGGTGTATGTGTCGG-GC  
Cons. 27 CGCCTTCGGGGCGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGTAGCCATCTCTACACTCATTCCAGATGGGCGCGGGTGTATGTGTCGG-GC  
486 CGCCTTCGGGGCGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGTAGCCATCTCTACACTCATTCCAGATGGGCGCGGGTGTATGTGTCGG-GC  
Cons. 28 CGCCTTCGGGGCGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGTAGCCATCTCTACACTCATTCCAGATGGGCGCGGGTGTATGTGTCGG-GC  
634 AGCCTTTAGGGCGAGGGCAGCGCTCGCTGGGTGTGTCAGCATCG-CGTTGC-----CCCTCACCCTCCCATACGGAGG---GGCGCGGGGGC  
635 AGCCTTTAGGGCGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCG---GTCGCCCAACCACTATGCTGGG-----GCG-GC  
Cons. 29 AGCCTT--GGCTGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGCGGTTGCTCCAAACCCCTCACCTTCGCAACCTGCTGGGTGATGCTGGGTGCG  
Cons. 30 AGCCTT--GGCTGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGCGGTTGCTCCAAACCCCTCACCTTCGCGACGTTGCGGTGATGCTGGGTGCG  
458 AGCCTC--GGCTGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGCGGTTGCTCCATACCTCCACCCCTCGAGCGATGGGGAGACCGCTCCGGAAGC  
464 AGCCTT--GGCTGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGCGGTTGCTCCAAACCCCTCACCTTCGCTGTTGCGGTGATGCTGGGTGCG  
506 AGCCTT--GGCTGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGCGGTTGCTCCAAACCCCTCACCTTCGCGACGTTGCGGTGATGCTGGGTGCG  
507 AGCCTT--GGCTGAGGGCAGCTCTGCTCGTGGGTGTGTCAGCATCGCGGTTGCTCCAAACCCCTCACCTTCGCGACGTTGCGGTGATGCTGGGTGCG  
ruler .....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....

## Ergebnisse

```

          **      *****      *          **      ****      *          **      ****      *****
Cons.25  TGAGAATGGCCTCCCGTT-CCCTTGTGGTGGTGGCCCAAAAA-GAGGAGCCCAAGGCGGCGTACGCCACGATAA-CGGGTGGT-GTGTA
Cons.26  TGAGAATGGCCTCCCGTT-CCCTTGTGGTGGTGGCCCAAAAA-GAGGAGCCCAAGGCGGCGTACGCCACGATAA-CGGGTGGT-GTGTA
Cons.27  TGAGAATGGCCTCCCGTT-CCCTTGTGGTGGTGGCCCAAAAA-GAGGAGCCCAAGGCGGCGTACGCCACGATAA-CGGGTGGT-GTGTA
486      TGAGAATGGCCTCCCGTT-CCCTTGTGGTGGTGGCCCAAAAA-GAGGAGCCCAAGGCGGCGTACGCCACGATAA-CGGGTGGT-GTGTA
Cons.28  TGAGAATGGCCTCCCGTT-CCCTTGTGGTGGTGGCCCAAAAAAGGTTGCCGGAAGGCGGCGTACGCCACGATAAAGCGGTGGT-GTGTA
634      GGAAATTTGGCCTCCCGTGGCCCGCAGCTCGGGTGGCCCAAAAA--CACCTGCTCCCGCGGCGCGCTACCGCAA-TGGTGGT---TGA-
635      GGATGTTGGCCTCCCGTG-CCGTTA--GGCGTGGCCGGCCATAATG--AGAGTCCTCAG-CGAGGGACGTCACGATGA-GTGGTGGTAGAATGC
Cons.29  GGAAGCTGGCCTCCCGCG-GCCACTAGC-CACGGATGGCCCAAA--CACGTGCTAGGGAAGCGAAGCGCCACGGCAT-TGGTGGT---TGAT
Cons.30  GGAAGCTGGCCTCCCGCG-GCCACGAGC-CACGGATGGCCCAAA--CACGTGCTAGGGAAGCGAAGCGCCACGGCAT-TGGTGGT---TGAT
458      GGAAGCTGGCCTCCCGTG-ACCAAGAGC-CACGGATGGCCCAAA--TACGCGCTGGGGAAGCAAGCGCCACGGCAT-TGGTGGT---CGAT
464      GGAAGCTGGCCTCCCGCG-GCCACGAGC-CACGGATGGCCCAAA--CACGTGCTAGGGAAGCGAAGCGCCACGGCAT-TGGTGGT---TGAT
506      GGAAGCTGGCCTCCCGCG-GCCGCGAGC-CACGGATGGCCCAAA--CACGTGCTAGGGAAGCGAAGCGCCACGGCAT-TGGTGGT---TGAT
507      GGAAGCTGGCCTCCCGCG-GCCGCGAGC-CACGGATGGCCCAAA--CACGTGCTAGGGAAGCGAAGCGCCACGGCAT-TGGTGGT---TGAT
ruler   ..480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570

          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
Cons.25  TCGTGCAATTCGTTGCAACGTCGTGGGCGTCTCTTAACAAAGGCTCTTCGTA-GACCCCTG--ATGCCATCACT-TGTGGTAGCACGC--A
Cons.26  TCGTGCAATTCGTTGCAACGTCGTGGGCGTCTCTTAACAAAGGCTCTTCGTA-GACCCCTG--ATGCCATCACT-TGTGGTAGCACGC--A
Cons.27  TCGTGCAATTCGTTGCAACGTCGTGGGCGTCTCTTAACAAAGGCTCTTCGTA-GACCCCTG--ATGCCATCACT-TGTGGTAGCACGC--A
486      TCGTGCAATTCGTTGCAACGTCGTGGGCGTCTCTTAACAAAGGCTCTTCGTA-GACCCCTG--ATGCCATCACT-TGTGGTAGCACGC--A
Cons.28  TCGTGCAATTCGTTGCAACGTCGTGGGCGTCTCTTAACAAAGGCTCTTCGTA-GACCCCTG--ATGCCATCACT-TGTGGTAGCACGC--A
634      --GAGACCTCGGACGCGCGCGTCTCGCAGCCGCGGCGGACGGGGACCCGA--AGGGCCCTA--ATGGGAAGCTC-----CC--A
635      CCGGACTCGAGTTCTTCGTCGTCGCTTCCCTCGACTTACGGATGACCCCTGTTGCGCGCTCTCTCTTGGAGTTTCGCCCCGA
Cons.29  CCAAGCCCCAGAACAGTGCCTGGTGGGCGGCAT-CTGTCCCTAGCCC--ACGACCCATA--ACGTTAA-----CC--A
Cons.30  CCAAGCCCCAGAACAGTGCCTGGTGGGCGGCAT-CTGTCCCTAGCCC--ACGACCCATA--ACGTTAA-----CC--A
458      CCGAGCCCCAGAACAGTGCCTGGTGGGCGGCAT-CTGTCCCTAGCCC--ACGACCCATA--ACGTTAA-----CC--A
464      CCAAGCCCCAGAACAGTGCCTGGTGGGCGGCAT-CTGTCCCTAGCCC--ACGACCCATA--ACGTTAA-----CC--A
506      CCAAGCCCCAGAACAGTGCCTGGTGGGCGGCAT-CTGTCCCTAGCCC--ACGACCCATA--ACGTTAA-----CC--A
507      CCAAGCCCCAGAACAGTGCCTGGTGGGCGGCAT-CTGTCCCTAGCCC--ACGACCCATA--ACGTTAA-----CC--A
ruler   .....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640.....650.....660.....

          *****
Cons.25  TTGCGACCCAGGTCAGGCGGGAAAC
Cons.26  TTGCGACCCAGGTCAGGCGGGAAAC
Cons.27  TTGCGACCCAGGTCAGGCGGGAAAC
486      TTGCGACCCAGGTCAGGCGGGAAAC
Cons.28  TTGCGACCCAGGTCAGGCGGGAAAC
634      ACGCGACCCAGGTCAGGCGGGAACT
635      CCGCGACCCAGGTCAGGCGGGAACT
Cons.29  ACGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
Cons.30  ACGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
458      ACGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
464      ACGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
506      ACGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
507      ACGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCT
ruler   ..670.....680.....690

```

Abbildung 28: Consensus-Alignment der ITS-Sequenzen von *Gonystylus* spp., *Endospermum moluccanum*, *Neolamarckia cadamba* und *Terminalia* spp.. Cons.25 = *G. bancanus*: 244 und 247; Cons.26 = *G. spec.*: 482, 489, 491-493, 499, 614-617, 619, 621 und 623; Cons.27 = *G. spec.*: 483, 487 und 500; Cons.28 = *G. spec.*: 611-613, 618, 620 und 622; Cons.29 = *T. bentzoe*: 174 und 467; Cons.30 = *T. catappa*: 172, 424, 437 und 440; *G. spec.*: 486; *E. moluccanum*: 634; *N. cadamba*: 635; *T. bellirica*: 458; *T. arenicola*: 464; *T. avicennioides*: 506; *T. glaucescens*: 507. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

### 3.3 Entwicklung spezifischer Primer

Für die Schnellbestimmung von CITES-geschützten Baumarten und deren Substitutionshölzern wurden spezifische Primer gewählt. Aufgrund der Verwendung dieser Primer ist es bereits im Anschluss an die Gelelektrophorese möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob es sich um das vermutete Holz handelt. Diese „ja/nein“-Entscheidung wird durch die Entwicklung sogenannter art- oder gattungsspezifischer Primer ermöglicht (Tabelle 5). Durch diese spezifischen Oligonukleotide ist eine an die Amplifizierung anschließende Aufreinigung und Sequenzierung der erhaltenen DNA-Fragmente überflüssig.

Für die Entwicklung der spezifischen Primer wurden die bereitgestellten ITS-Sequenzen (Punkt 3.2) mit den entsprechenden Sequenzen der GenBank des NCBI ergänzt. Im ersten Schritt wurde ein Alignment erstellt, das sowohl ein oder mehrere CITES-geschützte Hölzer, als auch deren Austauschhölzer enthielt (Tabelle 5). Des Weiteren wurden zusätzliche Vertreter der verwendeten Gattungen/Familien in das Alignment geladen. Anhand dieses Alignments wurden im ITS1 und im ITS2 gattungs- oder artspezifische Sequenzabschnitte herausgearbeitet, die eine Identifizierung ermöglichen. Neben der Einmaligkeit des zur Identifizierung gewählten Sequenzbereichs, musste die Basenabfolge weitere Kriterien erfüllen, um im späteren Verlauf als Primer verwendet werden zu können. Diese Kriterien umfassten Punkte wie Sequenzlänge, Schmelztemperatur, GC-Gehalt etc. (Punkt 2.2.8). Für jede Gattung oder Art wurde versucht, ein spezifisches Primerpaar, das jeweils aus einem spezifischen forward- und reverse-Primer bestand, zu erstellen. War es nicht möglich zwei spezifische Primer zu erarbeiten, so wurde ein spezifischer Primer (forward oder reverse) mit einem allgemeinen Primer (ITS1.1, ITS2.1, ITS3.1 oder ITS4) kombiniert. Die Entwicklung von spezifischen Primern wird exemplarisch an der *Swietenia*-Gruppe verdeutlicht. Die Ergebnisse der restlichen Gruppen werden gekürzt präsentiert.

#### 3.3.1 Spezifische Primer für die *Swietenia*-Gruppe

Für die CITES-geschützte Gattung *Swietenia* wurden für die drei zugehörigen Arten spezifische Primer entwickelt. Aufgrund mangelnder Sequenzunterschiede von *S. macrophylla* und *S. humilis* wurde für diese Arten ein gemeinsames Primerpaar erstellt. Auf der Seite der Austauschhölzer standen zu Beginn *Entandrophragma angolense*, *Khaya ivorensis* und *Carapa guianensis*. Aufgrund der Tatsache, dass auch *E. cylindricum* als Austauschholz verwendet wird und für diese Art genügend

Informationen vorhanden waren, wurden sowohl für *E. angolense* als auch für *E. cylindricum* artspezifische Primer entwickelt. Da für *K. ivorensis* und *C. guianensis* nur wenige ITS-Sequenzinformationen zur Verfügung standen, wurden für diese beiden Arten jeweils gattungsspezifische Primer gewählt.

Nachdem für die Entwicklung von spezifischen Primern aus dem Alignment aus Abbildung 18 geeignete Bereiche des ITS1 bzw. des ITS2 gewählt wurden, erfolgte eine Überprüfung dieser Basenabfolgen mithilfe der Software Primer Premier 5. Erwiesen sich die gewählten Sequenzabschnitte aufgrund der geforderten Primerkriterien als tauglich, folgte die Synthetisierung der Primer (biomerns.net GmbH, Ulm). Zur ausführlichen Beurteilung der Primerkombinationen wurde für diese, mithilfe eines Gradientencyclers (T-Gradient, Biometra, Göttingen, Deutschland), ihr entsprechendes Annealingoptimum ermittelt. Daraufhin wurde das Primerpaar anhand mehrerer Individuen auf dessen Eignung zur Amplifikation der entsprechenden Holzart getestet. Der PCR-Erfolg musste zwingend 100% aufweisen. Zusätzlich wurden einige der Amplicons sequenziert. Die Sequenzierung der DNA-Fragmente stellte sicher, dass es sich bei dem Fragment um das gesuchte Teilstück handelte. Erfüllte eine Primerkombination ein Kriterium nicht, so wurde diese Kombination von der weiteren Überprüfung ausgeschlossen.

Tabelle 43 gibt die gattungs- oder artspezifischen Primerkombinationen für die *Swietenia*-Gruppe wieder. Genauer sind die Namen der Primer, die Sequenzabfolge, die Größe des amplifizierten Fragments sowie die Annealingtemperatur angeführt. Ob es sich bei einer Probe z.B. um *S. mahagoni* handelt, ist durch die Verwendung der Primer S mah for/S mah rev2 nachweisbar. Erhält man nach der Amplifizierung (Annealing: 57°C) ein Fragment mit der Größe von 298 bp, so ist die vorliegende Probe als *S. mahagoni* identifiziert (Tabelle 43).

Tabelle 43: Spezifische Primer für die Gattung *Swietenia* und deren Austauschhölzer der Gattungen *Entandrophragma*, *Khaya* und *Carapa*. Dargestellt werden der Primernamen, die Primersequenz, die Fragmentgröße sowie die zugehörige Annealingtemperatur.

Art oder Gattung	Primer	Primersequenz 5'-3'	bp	°C
<i>Swietenia macrophylla</i> / <i>Swietenia humilis</i>	S m/h for1 S m/h rev1	CGG TCC GCG CCA AGG AAA ATT GGC GCG CAG GGG GGG TC	470- 472	60
<i>Swietenia mahagoni</i>	S mah for S mah rev2	CCG CGC CAA GGA AGA ATC CAA CGC CCG TCG AGA GG	298	57
<i>Entandrophragma cylindricum</i>	E cyl for2 E cyl rev3	TTC TCC GAA CGA ATG TCC AAA A TTT CCG CGA GCC GGC AGA T	370	56
<i>Entandrophragma angolense</i>	E ang for2 E ang rev2	CCT TCC GAC GAA ATA TCC AA TTC CTC GAG CCG GCA TCT	371	55
<i>Khaya</i> spp.	Khay for1 Khay rev2	GAA CTC GTG ACC GAT TGC ACC TAG ATT ACG ATC GAA GAA GGC G	207- 230	59
<i>Carapa</i> spp.	Cara for1 Cara rev2	GCG AAC TCG TGA TCG AAT GC GGA TTC TTA CAG AAA GAA GGC G	226- 227	56

Die Lage der spezifischen Primer aus Tabelle 43 sowie deren amplifiziertes Fragment, gibt Abbildung 29 wieder. Für die Gattungen *Khaya* und *Carapa* liegen der forward- (gestrichelte Linie) und der reverse-Primer (durchgezogene Linie) im ITS1. Für alle anderen Primer gilt, dass sich der for-Primer im ITS1 und der rev-Primer im ITS2 befindet.

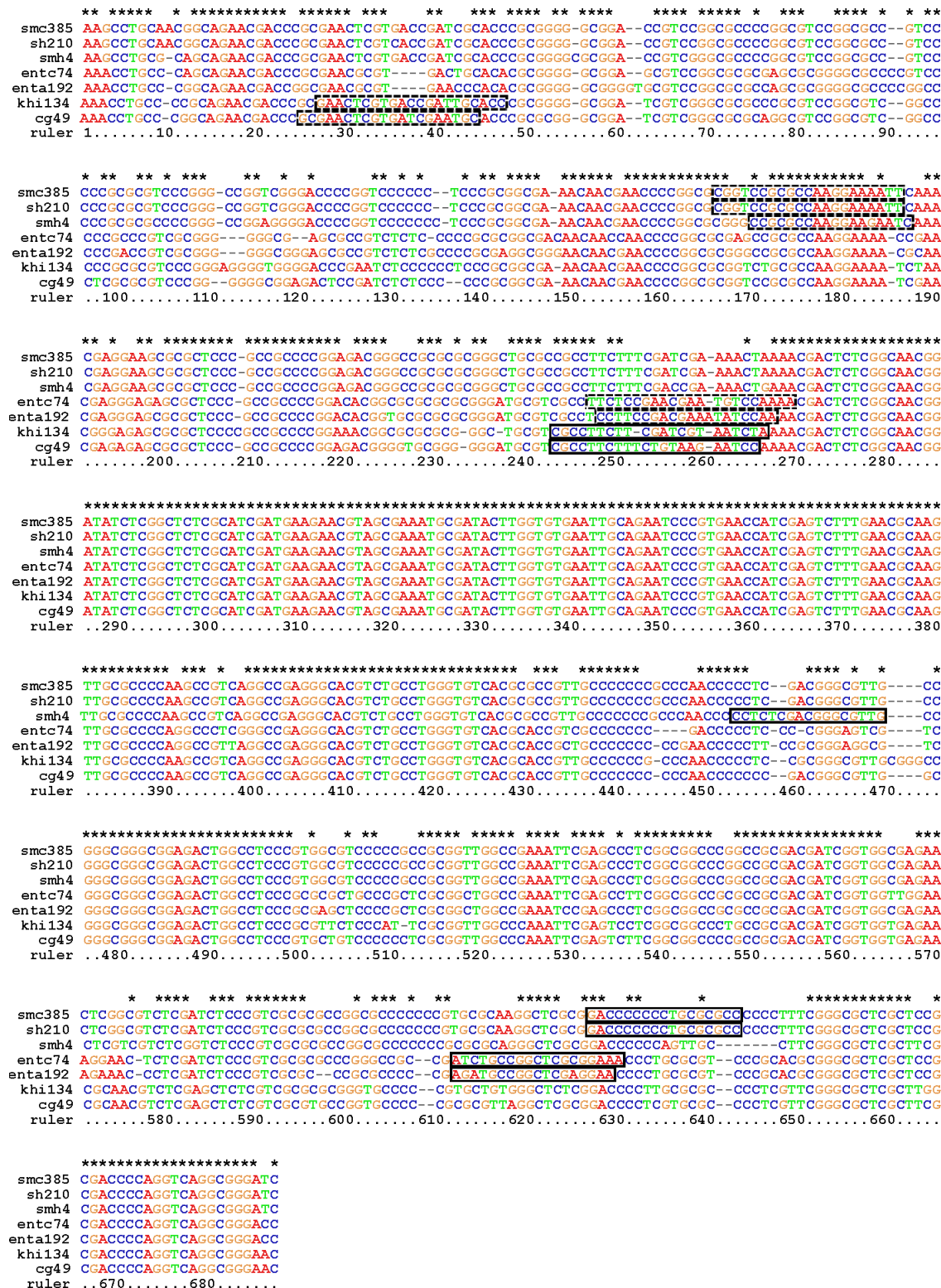
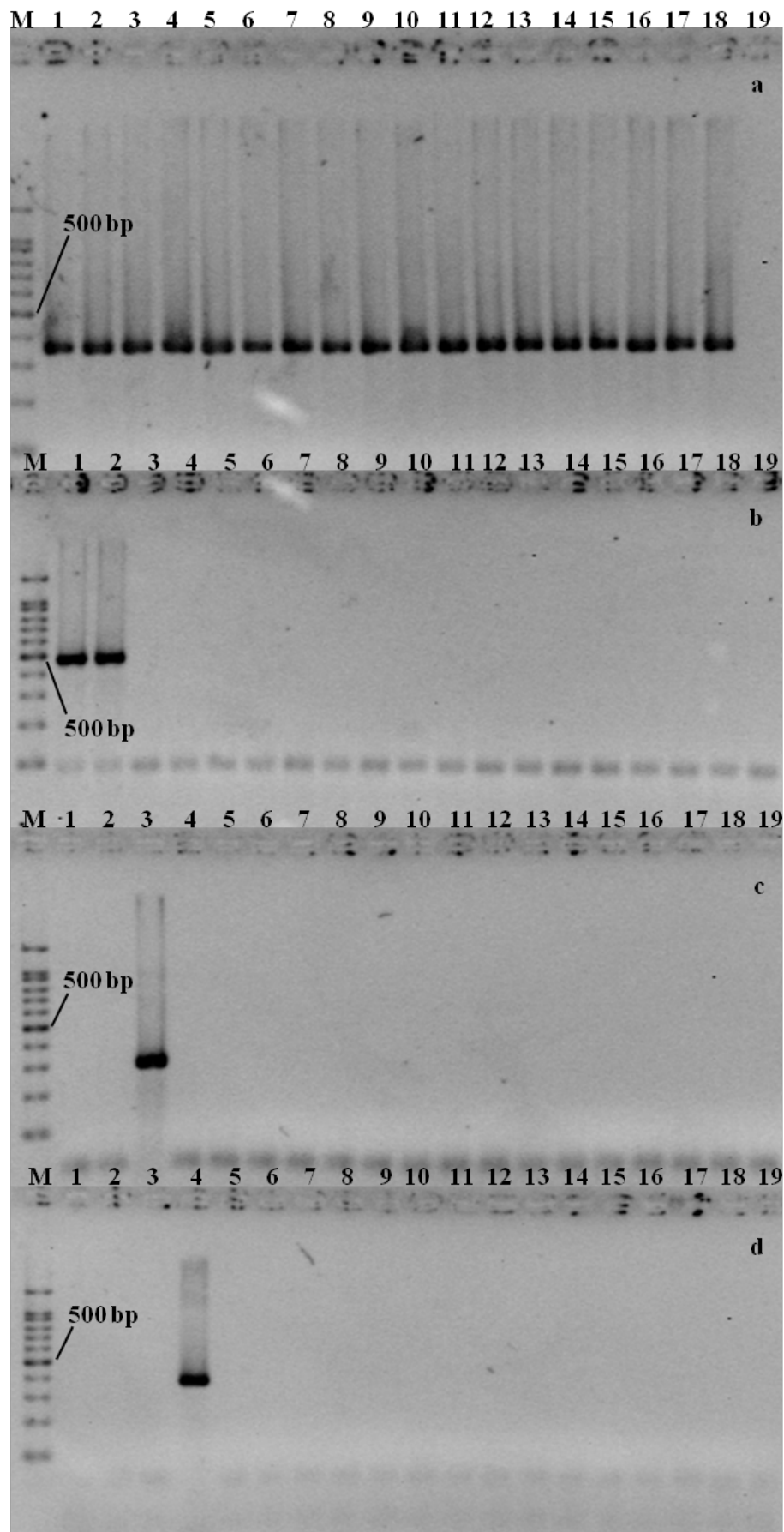


Abbildung 29: Alignment für die Darstellung der Positionen der spezifischen Primer im ITS der Meliaceae. Die Basen des forward-Primers werden durch eine gestrichelte Linie eingerahmt.

Die reverse-Primer weisen eine durchgezogene Linie auf. Die ID besteht aus dem Namenskürzel und der Herbarnummer: cg = *Carapa guianensis*, enta = *Entandrophragma angolense*, entc = *E. cylindricum*, khi = *K. ivorensis*, sh = *Swietenia humilis*, smc = *S. macrophylla*, smh = *S. mahagoni*. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen



Die Wahl fiel auf die in Tabelle 43 angegebenen Primerkombinationen, nachdem für diese eine Spezifitätsverifizierung (Kreuztest) durchgeführt wurde. Die Überprüfung der Spezifität erfolgte für jedes Primerpaar anhand von 18 Arten. Die benötigte DNA wurde dem Material zum Aufbau der rDNA ITS-Sequenzdatenbank entnommen (*S. macrophylla* (2), *S. humilis* (213), *S. mahagoni* (7), *E. cylindricum* (477), *E. angolense* (83), *K. grandifolia* (8), *K. nyasica* (447), *K. senegalensis* (456), *K. ivorensis* (134), *Carapa guianensis* (80), *Cedrela odorata* (452), *C. fissilis* (36), *Toona sinensis* (451), *Tectona grandis* (84), *Guaiacum officinale* (101), *G. sanctum* (162), *Dalbergia retusa* (143) und *Hymenaea courbaril* (438), Tabelle 6). Für den Kreuztest wurde mittels der Primerkombination ITS1.1/ITS2.1 zuerst die Qualität und Quantität der extrahierten DNA überprüft. So konnte sichergestellt werden, dass in den folgenden PCRs nur Templatemenen (10-50 ng) zum Einsatz kamen, die einen PCR-Erfolg garantierten (Abbildung 30 a). Im Anschluss an diese PCR erfolgten die Kreuztests für die jeweiligen spezifischen Primerpaare. Die Primerkombination S m/h for1/S m/h rev1 ermöglicht nur eine Amplifizierung, wenn Templates der Arten *S. macrophylla* und *S. humilis* eingesetzt werden (Abbildung 30 b, Tasche 1 und 2). Das Amplicon zeigt die erwartete Länge von 470 bp. Abbildung 30 c verdeutlicht, dass die Spezifität von S mah for/S mah rev2 ebenfalls gegeben ist. Nur in Anwesenheit von DNA, die aus *S. mahagoni* extrahiert wurde, ergibt sich eine Bande von 298 bp (Tasche 3). Die Spezifität der Primer E cyl for2/E cyl rev3 wird durch Abbildung 30 d nachgewiesen. Diese Primer ermöglichen nur bei DNA von *E. cylindricum* (Tasche 4) eine Amplifikation (370 bp). Die Spezifität der Primerkombination E ang for2/E ang rev2 wird dadurch nachgewiesen, dass nur bei *E. angolense* (Tasche 5) ein Amplicon vorhanden ist (371 bp, Abbildung 30 e). Die Identifizierung der Gattung *Khaya* (Taschen 6, 7, 8 und 9) erfolgt über die Primer Khay for1/Khay rev2. Wie Abbildung 30 f zeigt, wird nur in der Anwesenheit von *Khaya*-DNA ein 229 bp Fragment amplifiziert. Abbildung 30 g gibt die Spezifität des Primerpaars Cara for1/Cara rev2 wieder. Die Anwesenheit einer Bande von 226 bp ist hier nur gegeben, wenn DNA von *C. guianensis* zum Einsatz kommt (Tasche 10).





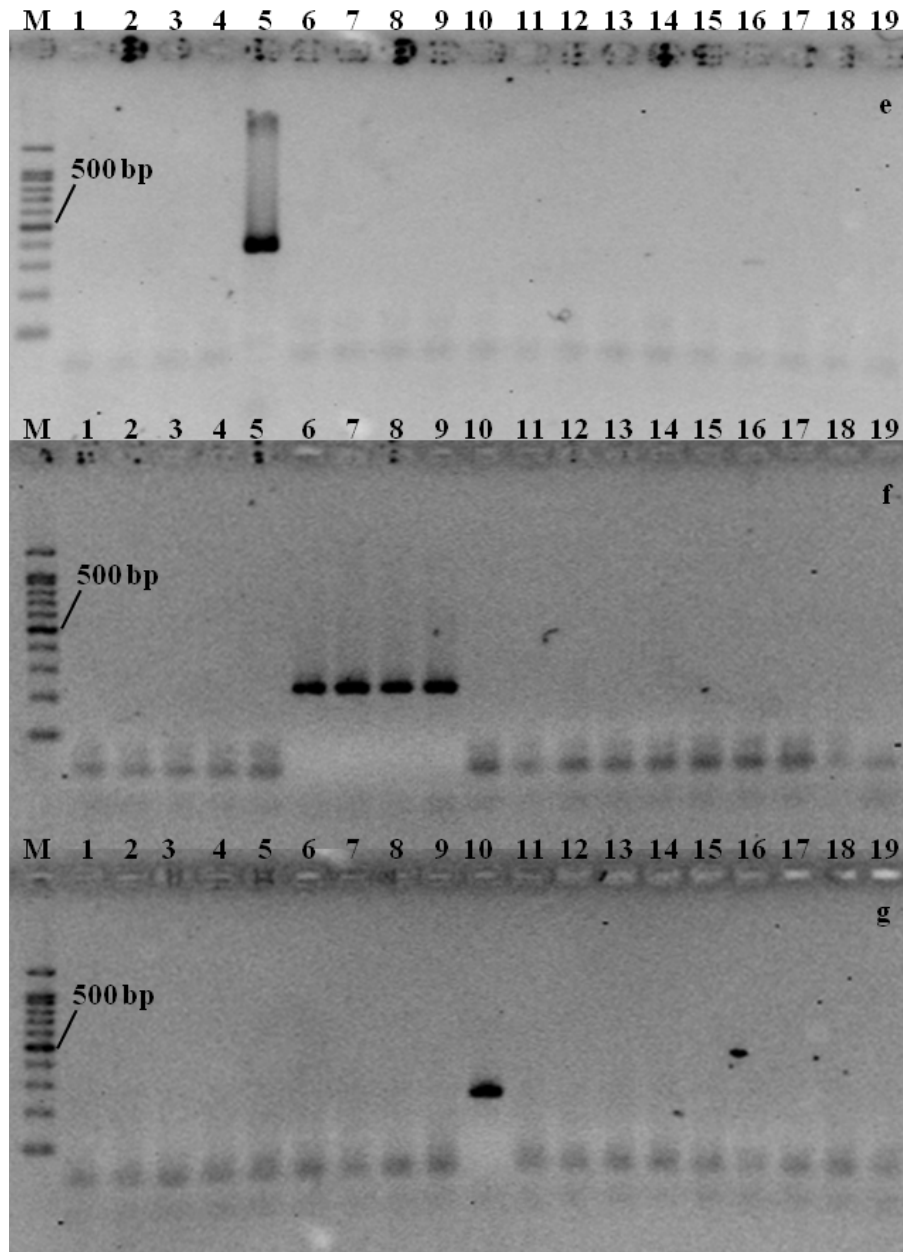


Abbildung 30: Kreuztest für die spezifischen Primer der Meliaceae. **a:** Unter Verwendung der holzspezifischen Primer ITS1.1 und ITS2.1 wurde der passende DNA-Gehalt für die Amplifizierung der einzelnen Proben ermittelt (Bandengröße: ~380 bp).

**b:** Das Primerpaar S m/h for1/S m/h rev1 zeigt nur in der Anwesenheit von *Swietenia macrophylla* und *S. humilis* eine Bande von 470 bp. **c:** S mah for/S mah rev2 amplifizieren nur *S. mahagoni* (298 bp). **d:** *E. cylindricum* wird durch E cyl for2/E cyl rev3 und eine 370 bp Bande identifiziert. **e:** Ein 371 bp Fragment zeigt nur *E. angolense* (E ang for2/E ang rev2).

**f:** Unter Verwendung von Khay for1 und Khay rev2 wird die Gattung *Khaya* identifiziert (229 bp). **g:** Cara for1 und Cara rev2 zeigen nur in Anwesenheit von *Carapa guianensis* ein Amplicon (226 bp). 1 *Swietenia macrophylla*, 2 *S. humilis*, 3 *S. mahagoni*, 4 *Entandrophragma cylindricum*, 5 *E. angolense*, 6 *Khaya grandifolia*, 7 *K. nyasica*, 8 *K. senegalensis*, 9 *K. ivorensis*, 10 *Carapa guianensis*, 11 *Cedrela odorata*, 12 *C. fissilis*, 13 *Toona sinensis*, 14 *Tectona grandis*, 15 *Guaiacum officinale*, 16 *G. sanctum*, 17 *Dalbergia retusa*, 18 *Hymenaea courbaril* und 19 Negativ-Kontrolle. M = 100 bp Ladder.

### 3.3.2 Spezifische Primer der CITES-geschützten Baumarten und deren Substitutionshölzern

Nachstehend werden alle spezifischen Primer, die für die wichtigsten Handelshölzer erstellt wurden, dargestellt. Es erfolgt eine kurze Vorstellung der Primersequenzen sowie einiger Besonderheiten. Für alle gezeigten Primer wurde die Spezifität getestet und nachgewiesen. Bei der Überprüfung der Primerspezifität wurde darauf geachtet, dass Proben eingesetzt wurden, die nah verwandte Arten oder Arten nah verwandter Gattungen repräsentieren. In Tabelle 44 sind für die spezifischen Primer der Name, die Sequenz, die Annealingtemperatur (°C) sowie die Länge des amplifizierten Fragments (bp) aufgelistet. Die Fragmentlängen schwanken von 207 bis 549 bp. Für die Annealingtemperatur ergeben sich Werte von 55-60°C.

Für einige der untersuchten Arten konnte, trotz Vorhandenseins selbst erarbeiteter Sequenzen, kein spezifischer Primer erstellt werden. Genauer betraf dies die entsprechenden Arten der Gattungen *Pterocarpus* und *Caryocar*. Für *P. soyauxii* fehlen die Informationen des ITS1 und für die Gattung *Caryocar* sind insgesamt zu wenige Informationen (eigene Sequenzen + GenBank-Sequenzen) zur Primerentwicklung vorhanden. Des Weiteren wurde bei der Erstellung der spezifischen Primer von *Hymenaea courbaril* auf die Verwendung der Sequenzen der Proben 86 und 170 verzichtet. Es handelt sich hierbei offensichtlich nicht um Individuen dieser Art.

Da sich die Sequenzen von *Cedrela odorata* und *C. fissilis* stark ähneln und sich nur am Anfang des ITS1 eine geeignete Stelle für das Erstellen artspezifischer Primer befindet, wurde für diese beiden Arten jeweils nur ein forward-Primer erstellt. Diese forward-Primer wurden jeweils mit dem allgemeinen Holzprimer ITS2.1 kombiniert. Der durchgeführte Kreuztest zeigt trotz der Verwendung nur eines spezifischen Primers dessen uneingeschränkte Spezifität.

Für die durch den CITES Anhang II geschützte Gattung *Guaiacum*, wurden sowohl ein gattungsspezifisches Primerpaar als auch artspezifische Primerpaare erstellt. Genauer wurde für *G. sanctum* nur ein spezifischer Primer (forward-Primer) erarbeitet und dieser mit dem ITS4-Primer kombiniert.

Standen nicht ausreichend Sequenz-Informationen (eigene Sequenzen + GenBank-Sequenzen) zur Verfügung, um erfolgreich artspezifische Primer zu erstellen (z.B. bei *Bowdichia nitida*, *Endospermum moluccanum* und *Neolamarckia cadamba*), so wurden die erstellten und getesteten Primer als Gattungsprimer definiert.

Das spezifische Primerpaar der Gattung *Khaya* ergibt ein DNA-Fragment mit der Länge

von 229-230 bp. Lediglich für Probe 457 wird ein Fragment von 207 bp erhalten. Bedingt ist dieses kürzere Fragment durch die Anwesenheit eines 23 bp großen Indels (Tabelle 44).

Tabelle 44: Auflistung aller spezifischen Primer für die Holzartenidentifizierung. Dargestellt werden der Primernamen, die Primersequenz, die Fragmentgröße sowie die zugehörige Annealingtemperatur.

Art oder Gattung	Primer	Primersequenz 5'-3'	bp	°C
<i>Swietenia macrophylla</i> / <i>Swietenia humilis</i>	S m/h for1 S m/h rev1	CGGTCCGCGCCAAGGAAAATT GGCGCGCAGGGGGGGTTC	470-472	60
<i>Swietenia mahagoni</i>	S mah for S mah rev2	CCGCGCCAAGGAAGAATC CAACGCCCCGTCGAGAGG	298	57
<i>Entandrophragma</i> <i>cylindricum</i>	E cyl for2 E cyl rev3	TTCTCCGAACGAATGTCCAAAA TTTCCGCGAGCCGGCAGAT	370	56
<i>Entandrophragma</i> <i>angolense</i>	E ang for2 E ang rev2	CCTTCCGACGAAATATCCAA TTCCTCGAGCCGGCATCT	371	55
<i>Khaya</i> spp.	Khay for1 Khay rev2	GAAGTCGTGACCGATTGCACC TAGATTACGATCGAAGAAGGCG	207-230	59
<i>Carapa</i> spp.	Cara for1 Cara rev2	GCGAACTCGTGATCGAATGC GGATTCTTACAGAAAGAAGGCG	226-227	56
<i>Cedrela odorata</i>	C odo for1 ITS2.1	GCACACGCGATGGCTAAGC GACTCGATGRTTCACGGG	310	57
<i>Cedrela fissilis</i>	C fis for1 ITS2.1	CACGCGCGGGGAAAGGC GACTCGATGRTTCACGGG	308	58
<i>Guaiacum</i> spp.	Guai for2 Guai rev1	AGCGAGAGCGAGCCCCTT ACTCGTGTTTGGGCCAACC	408-413	57
<i>Guaiacum officinale</i>	G off for1 G off rev2	AATCCAAACGAAAGAGCCGC CTCTCCCGCAAGGGTCGTCT	358-359	58
<i>Guaiacum sanctum</i>	G san for2 ITS4	AGGAATCCGAACGGAAGGGC TCCTCCGCTTATTGATATGC	486-489	57
<i>Bulnesia</i> spp.	Buln for1 Buln rev1	CCAAGGAATCCCAATCGGA CGCTCCGCCCTCTCTCTTA	269	56
<i>Handroanthus</i> spp.	Hand for1 Hand rev1	ATGCGCCAAGGAAAACCTCAA ACTGGTCGTGACGTGCATCG	371-372	56
<i>Intsia bijuga</i>	I bij for1 I bij rev1	ACGCCATTCTATCCAATATCCA TAGGGTCTCGGAGGAGGAGCT	408	57

# Ergebnisse

<i>Intsia palembanica</i>	I pal for1 I pal rev2	GTATTATCCACAACGACTCTCG TCCCGCCTTAGGTTAGGTGA	438-440	55
<i>Afzelia</i> spp.	Afze for2 Afze rev1	TCCCGCGCCGTCCCGGAGA GCTCTCATTTTCGGCCGTC	338	58
<i>Hymenaea courbaril</i>	H cou for1 H cou rev1	GCCAAGGAACAGATGCGAT CGAGCTCTTGTTTCGGCCAT	364-371	56
<i>Dalbergia nigra</i>	D nig for D nig rev	GCCAAGGAAGAAACAACCGTA GTCTGTCATGGCGCTGCATC	368	58
<i>Dalbergia retusa</i>	D ret for2 D ret rev2	CAGCACGCCTTCCCCAAAT GAGGTCGCACGCACGACTG	488	58
<i>Dalbergia latifolia</i>	D lat for D lat rev	AGACGTCGGGACCGAGCCA GGTCCCTGGGTACGTCGCTG	505	60
<i>Dalbergia spruceana</i>	D spr for D spr rev	GCGGTGCCGCAACACTCGA GTCATGGTGCCGCTGCATC	306	59
<i>Dalbergia sissoo</i>	D sis for D sis rev	GAAGAGTCGGGACGGAGCC TCGAGAGCACGCTCAACCAC	463	59
<i>Machaerium scleroxylon</i>	M scl for M scl rev	ACTCGTTCCACCACCCGGG TATGTCACGGTGCTTCATCCAC	476	58
<i>Caesalpinia echinata</i>	C ech for1 C ech rev2	AGCACGACGACATTCGTATACAG TTCGCGTCCTCCTCGAGAG	230	57
<i>Caesalpinia ferrea</i>	C fer for C fer rev	CCAAGGAAATCTGAGAAACGAG AGGACTCCCTTTTCGACCAAC	347	56
<i>Myrocarpus</i> spp.	Myro for2 Myro rev1	GCCAAGGAAACGCAACAGTG TGCTCACTCATCCACCGTGG	382	58
<i>Bowdichia</i> spp.	Bowd for Bowd rev	GGAATCCGAAATCGTTCTGTG CTCTCACTCAACCACCATCC	394	56
<i>Endospermum</i> spp.	Endo for Endo rev	CCATCTCCCAACCCGTCTC CTCTCAACCACCGATTGCCG	437	58
<i>Neolamarckia</i> spp.	Neol for Neol rev	CCTGTGTCAATAGCCAAGCG AAGGGTCATCCGTCAAGTCG	549	56

### 3.4 Validierung

Der entwickelte Schnelltest zur Identifizierung von CITES-geschützten Holzarten und deren Substitutionshölzern wurde mehreren Validierungen unterzogen. Nachfolgend wird der Ablauf der entwickelten Methode noch einmal gekürzt wiedergegeben (Abbildung 31). (1) Die DNA wird aus dem homogenisierten Ausgangsmaterial mithilfe des modifizierten Protokolls des DNeasy® mericon™ Food Kits (Punkt 2.2.1.2.8) extrahiert. (2) Unter Verwendung der „holzspezifischen“ Primer aus Punkt 2.2.3.3 wird die DNA-Konzentration ermittelt, welche es ermöglicht, einen Teilbereich des ITS zu amplifizieren. So wird sichergestellt, dass im nächsten Schritt eine optimale DNA-Menge eingesetzt wird. Die PCR innerhalb dieses Schritts sowie im darauffolgenden, wird unter Zuhilfenahme des im Punkt 2.2.3.2 angeführten KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kits durchgeführt. (3) In der folgenden PCR wird, unter Verwendung der verschiedenen spezifischen Gattungs- oder Artprimer, die vorliegende Holzart identifiziert (Punkt 3.3.2). Die Identifizierung erfolgt hierbei über die Anwesenheit eines DNA-Fragments in spezifischer Länge.

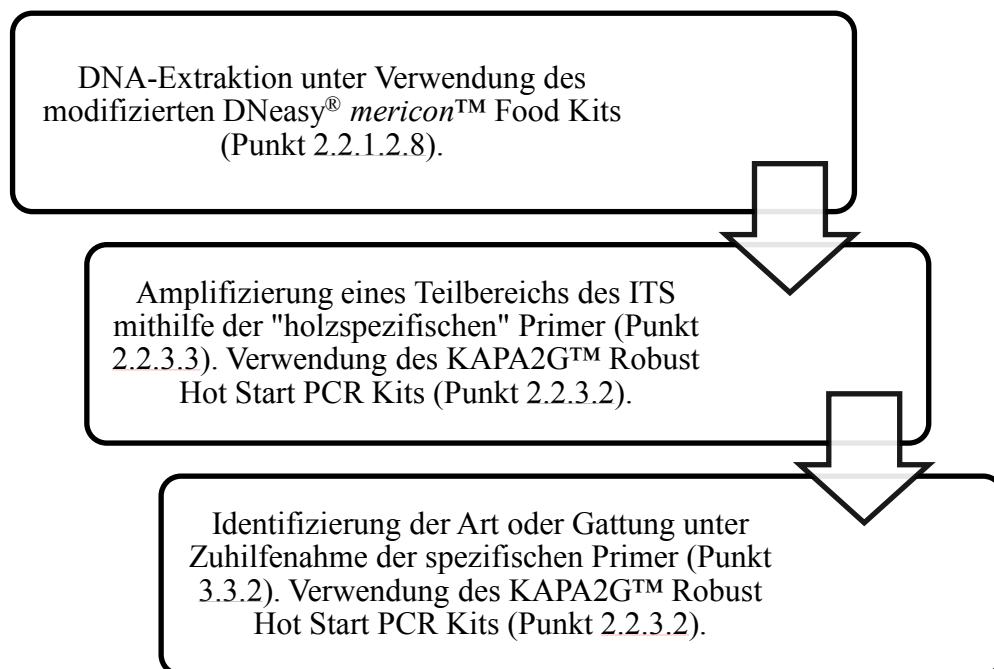


Abbildung 31: Schematische Darstellung des entwickelten Schnelltests.

### 3.4.1 Ergebnisse des Blindtests mit 60 unbestimmten Holzproben

Für den ersten Blindtest standen 60 Holzproben in Hackschnitzelgröße zur Verfügung (vgl. Punkt 2.1.4.2). Diese Holzproben wurden mithilfe des Schnelltests daraufhin untersucht, ob sich innerhalb dieser die Gattung *Gonystylus* (CITES Anhang II) nachweisen lässt.

Ein Teil der folgenden Ergebnisse entstand im Rahmen einer (mit)betreuten Bachelorarbeit (Schwartz 2012). Die Isolierung der DNA erfolgte unter Verwendung der modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktionsmethode (Punkt 3.1.3.4). Als Ausgangsmaterial dienten 100 mg Holzmehl. Lediglich für Probe Bt34 und Bt39 standen nur 83 bzw. 47 mg zur Verfügung. Durch die Anwendung der modifizierten DNA-Extraktionsmethode wurde für alle Proben erfolgreich DNA isoliert. Die DNA-Gehalte des ersten Eluats lagen zwischen 3,7 und 227,6 ng/μl (Mittelwert 65 ng/μl) sowie für das zweite Eluat zwischen 5,4 und 291,3 ng/μl (Mittelwert 50 ng/μl). Da das 260/280-Verhältnis der vorliegenden DNA bei 1,7-2,0 lag, wurde auf eine Aufreinigung des DNA-Eluats mithilfe des Invisorb<sup>®</sup> DNA CleanUp Kits verzichtet (Punkt 2.2.1.3). Die Amplifikationen der DNA erfolgten mit dem KAPA2G<sup>TM</sup> Robust Hot Start PCR Kit (Punkt 2.2.3.2). Nach Beurteilung der Wirkung der drei zur Verfügung stehenden PCR-Puffer, fand bei diesem Material der Puffer A Anwendung. Als erste PCR wurde für jede Probe eine Amplifikation mit den „Holzprimern“ ITS1.1/ITS2.1 durchgeführt. Hierdurch konnte ermittelt werden, bei welcher DNA-Menge, die stärkste Holzbande amplifiziert wird. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 8 und 125 ng (Mittelwert: 43 ng). Trotz Ermittlung der idealen Ausgangskonzentration ergaben die Proben Bt1-3, Bt7, Bt29 und Bt37-39 nur sehr schwache DNA-Fragmente. Auf die Weiterverarbeitung dieser Proben wird im späteren Verlauf genauer eingegangen. Für alle weiteren Proben wurde eine Amplifikation mit den spezifischen Primern der Gattung *Gonystylus* (Ramin-for: 5'-GAC AGA ACG TTC TCC CCA CAC-3' und Ramin-rev: 5'-GAC GTT GCA ACG AAT GCA C-3') durchgeführt (Vay 2008). Aufgrund des Einsatzes der spezifischen Primer wurden folgende Proben, durch ein Fragment mit der Größe von 358 bp, als Vertreter der Gattung *Gonystylus* identifiziert: Bt4-6, Bt11, Bt13-16, Bt25-28, Bt30-31, Bt36, Bt41-43, Bt45-60 (Abbildung 32). Für die Proben Bt8-10, Bt12, Bt17-24, Bt32-35, Bt40 und Bt44, die keine Raminbande aufwiesen, bedeutet dies, dass es sich bei diesen nicht um Ramin handelt.

Mit den Proben Bt1-3, Bt7, Bt29 und Bt37-39, die unter Verwendung der

Primerkombination ITS1.1/ITS2.1 nur eine sehr schwache Bande aufwies, wurde eine Nested-PCR durchgeführt (Punkt 2.2.3.4). Hierfür wurde zuerst der ITS-Bereich (ITS1.1/ITS4) amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend in einer weiteren PCR, in der die spezifischen Primer der Gattung *Gonystylus* zum Einsatz kamen, als Template eingesetzt. Durch die Nested-PCR konnten die Proben Bt1-3, Bt7, Bt29 und Bt37-39 als Ramin identifiziert werden.

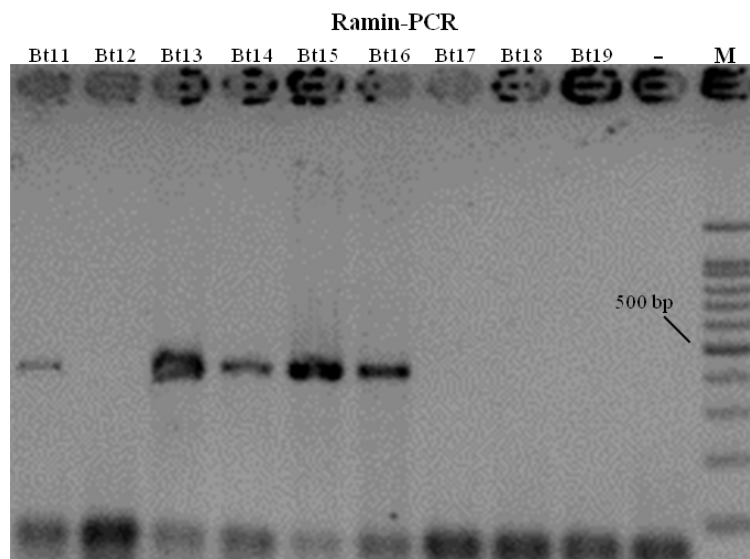


Abbildung 32: Gelelektrophorese für den Nachweis von Ramin. Unter Verwendung der spezifischen Primer Ramin-for und Ramin-rev werden die Proben Bt11 und Bt13-16 durch ein DNA-Fragment von 358 bp als Vertreter der Gattung *Gonystylus* identifiziert.  
- = Negativ-Kontrolle; M = 100 bp Ladder.

Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse wurden 23 Amplifikate (Bt4-6, Bt13-16, Bt25-27, Bt30-31, Bt36, Bt42-43, Bt46-47, Bt49, Bt51-53 und Bt58-59) der „Ramin-PCR“ sequenziert. Die Sequenzierung und der darauf folgende Abgleich der Sequenzen mit der internen ITS-Sequenzdatenbank bestätigte, dass es sich bei diesen Proben um Ramin handelt.

Zur Erweiterung der rDNA ITS-Sequenzdatenbank, erfolgte für die Proben Bt4-6, Bt13-16, Bt25-27, Bt30-31, Bt36, Bt42-43, Bt46-47, Bt49, Bt51-53 und Bt58-59 die Amplifikation und Sequenzierung der ITS1-Region sowie der ITS2-Region (Punkt 3.2.5). Die Basenabfolge der 23 Sequenzen deutet auf zwei *Gonystylus*-Arten unter den Blindtestproben hin. Die erste Art (Art1), vertreten durch Bt13-16, Bt26, Bt30, Bt36, Bt42-43, Bt46-47, Bt49, Bt51-53 und Bt58-59, ist nahezu 100%ig homolog zu den

Proben 244 und 247 aus der internen Sequenzdatenbank (vgl. Cons.25 aus Punkt 3.2.5). Es handelt sich bei diesen Proben um Holzstücke von *Gonystylus bancanus* aus der Sammlung des Thünen-Instituts. Die zweite Art (Art 2), vertreten durch Bt4-6, Bt25, Bt27 und Bt31, kann durch einen Vergleich mit der internen Sequenzdatenbank keiner bestimmten *Gonystylus*-Art zugeordnet werden. Auch ein Abgleich mit der GenBank des NCBI brachte keine weiteren Ergebnisse, da zu diesem Zeitpunkt für *Gonystylus* keine ITS-Sequenzen hinterlegt waren. Insgesamt zeigte der Vergleich der beiden Sequenztypen (Art1 und Art2) mit der GenBank des NCBI die größten Homologien (~83%) zu den nah verwandten Gattungen *Paddiea*, *Lachnaea* und *Dirca* (Thymelaeaceae).

Für die Identifikation der verbleibenden 18 Holzproben (Bt8-10, Bt12, Bt17-24, Bt32-35, Bt40 und Bt44) wurden die Amplifikate des ITS1-Bereichs sequenziert. Des Weiteren wurde zusätzlich der ITS2-Bereich erarbeitet und ebenfalls sequenziert. Für die Proben stand somit der gesamte ITS-Bereich zur Verfügung. Die Analyse der ITS-Bereiche ergab, dass die 18 Proben sechs Arten (Art3-8) mit jeweils identischen ITS-Sequenzen repräsentieren. Ein Abgleich der ITS-Sequenzen mit der internen Sequenzdatenbank führte zu keinerlei Homologien. Die folgende Einteilung in die jeweiligen Familien erfolgte somit nach dem Abgleich mit der GenBank des NCBI. Art3, die die Proben Bt12, Bt17-18 und Bt20-21 beinhaltet, zeigt die höchsten Homologien zu Vertretern der Dipterocarpaceae. Art4 (Bt9, Bt33-34 und Bt40), Art5 (Bt8, Bt19 und Bt32) sowie Art6 (Bt35 und Bt44) haben die größten Sequenzübereinstimmungen zu Individuen der Familie der Sapotaceae. Bt10, welche Art7 darstellt, konnte durch die BLAST-Analyse den Apocynaceae zugeordnet werden. Die Sequenzen von Bt22-24 (Art8) waren nicht bestimmbar, da es sich hier um eine Kontamination handelte. Für eine erneute Untersuchung dieser Proben war kein weiteres Material verfügbar. Für Art3-7 wurde eine Einteilung in Familien gewählt, da keine der Sequenzen eine absolute Übereinstimmung mit den ITS-Sequenzen der GenBank des NCBI aufwies. Nach Abschluss der Untersuchungen fand ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit denen holzanatomischer Untersuchungen, die im Vorfeld durch Herrn PD Dr. Gerald Koch durchgeführt wurden, statt (Tabelle 45). Bezüglich der Zuordnung der Proben zur Gattung *Gonystylus*, kamen beide Untersuchungen zu demselben Ergebnis. Durch die genetischen Untersuchungen wurde aber nicht nur die zutreffende Gattung ermittelt, sondern es wurde noch zusätzlich auf zwei verschiedene



Arten (Art1 und Art2) hingewiesen. Für die Proben, bei denen es sich nicht um Ramin handelte, ergab der Vergleich, dass die Zuordnung der ITS-Sequenzen zu den

Tabelle 45: Auflistung der Ergebnisse des Blindtests mit 60 unbestimmten Holzproben. In der Tabelle sind die Ergebnisse des DNA-Barcoding gegenüber den Ergebnissen der Mikroskopie dargestellt. Die ID besteht aus dem Namenskürzel Bt für Blindtest und der Blindtestnummer. Einige Proben wurden in die interne ITS-Datenbank aufgenommen und weisen zusätzlich eine Herbarnummer auf. <sup>1-8</sup> = Proben mit jeweils identischer Sequenz.

ID	Mikroskopie	Barcoding	ID	Mikroskopie	Barcoding
Bt1	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.	Bt31/622	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>2</sup>
Bt2	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.	Bt32	<i>Palaquium</i> spp.	Sapotaceae <sup>5</sup>
Bt3	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.	Bt33	<i>Madhuca</i> spp.	Sapotaceae <sup>4</sup>
Bt4/611	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>2</sup>	Bt34	<i>Madhuca</i> spp.	Sapotaceae <sup>4</sup>
Bt5/612	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>2</sup>	Bt35	<i>Payena</i> spp.	Sapotaceae <sup>6</sup>
Bt6/613	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>2</sup>	Bt36/623	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt7	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.	Bt37	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt8	<i>Palaquium</i> spp.	Sapotaceae <sup>5</sup>	Bt38	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt9	nicht bestimmbar	Sapotaceae <sup>4</sup>	Bt39	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt10	<i>Alstonia</i> spp.	Apocynaceae <sup>7</sup>	Bt40	<i>Madhuca</i> spp.	Sapotaceae <sup>4</sup>
Bt11	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.	Bt41	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt12	<i>Shorea</i> spp.	Dipterocarpaceae <sup>3</sup>	Bt42/482	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt13/614	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>	Bt43/483	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt14/615	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>	Bt44	<i>Payena</i> spp.	Sapotaceae <sup>6</sup>
Bt15/616	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>	Bt45	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt16/617	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>	Bt46/486	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt17	<i>Shorea</i> spp.	Dipterocarpaceae <sup>3</sup>	Bt47/487	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt18	<i>Shorea</i> spp.	Dipterocarpaceae <sup>3</sup>	Bt48	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt19	<i>Palaquium</i> spp.	Sapotaceae <sup>5</sup>	Bt49/489	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt20	<i>Shorea</i> spp.	Dipterocarpaceae <sup>3</sup>	Bt50	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt21	<i>Shorea</i> spp.	Dipterocarpaceae <sup>3</sup>	Bt51/491	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt22	<i>Tetramerista glabra</i>	kein Ramin <sup>8</sup>	Bt52/492	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt23	<i>Koompassia malaccensis</i>	kein Ramin <sup>8</sup>	Bt53/493	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt24	<i>Tetramerista glabra</i>	kein Ramin <sup>8</sup>	Bt54	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt25/618	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>2</sup>	Bt55	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt26/619	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>	Bt56	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt27/620	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>2</sup>	Bt57	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.
Bt28	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.	Bt58/499	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt29	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec.	Bt59/500	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>
Bt30/621	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Gonystylus</i> spec. <sup>1</sup>	Bt60	<i>Gonystylus</i> spec.	<i>Gonystylus</i> spec.

verschiedenen Familien richtig erfolgte. So wurden durch die holzanatomischen Untersuchungen, wie auch durch die genetischen Analysen (Art4-6), drei Vertreter

(*Palaquium*, *Madhuca* und *Payena*) für die Familie der Sapotaceae identifiziert (Tabelle 45). Durch die Analyse des ITS wurde ebenfalls Probe Bt9 (Art4), die nur Bastmaterial aufwies, den Sapotaceae zugewiesen. Dies war durch die anatomische Bestimmung nicht möglich.

### 3.4.2 Identifizierung einer Holzbohle

Ein weiterer Blindtest wurde anhand einer Holzbohle (Kernholz) ausgeführt. Über das Holz stand lediglich die Information zur Verfügung, dass es ein Vertreter der Meliaceae war (vgl. Punkt 2.1.4.2). Der Holzbohle wurden 200 mg Holzmehl entnommen und die DNA wurde mit der *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktionsmethode extrahiert (Punkt 3.1.3.4). Da im Anschluss an die DNA-Extraktion noch eine Aufreinigung der erhaltenen Eluate durchgeführt werden sollte (Invisorb<sup>®</sup> DNA CleanUp Kit, Punkt 2.2.1.3), erfolgte die Eluation der DNA mit je 100 µl.

Messung 1 und 2 aus Tabelle 46 geben die erhaltenen DNA-Werte für das 1. und 2. Eluat wieder. Für das 1. Eluat ergibt sich eine DNA-Konzentration von 23,5 ng/µl. Das 260/280-Verhältnis liegt aber lediglich bei 0,97 (260/230-Verhältnis: 0,34). Das 2. Eluat zeigt bei einem 260/280-Verhältnis von 1,09 (260/230-Verhältnis: 0,39) einen DNA-Gehalt von 6,1 ng/µl. Die erhaltenen Messwerte sowie der Verlauf der Absorptionskurven (Messung 1 und 2, Abbildung 33) lassen auf eine hohe Inhibitorenkonzentration schließen. Die Absorptionskurven der Messungen 1 und 2 zeigen zwischen 340 und 280 nm einen schwachen (Messung 2) bzw. starken (Messung 1) Anstieg und bilden anschließend eine Schulter zwischen 280 und 250 nm aus. Ab 250 nm ist für beide Kurven ein starker Anstieg zu verzeichnen. Aufgrund der Inhibitorenbelastung der DNA-Eluate wurde eine weitere Aufreinigung der Lösungen durchgeführt. Für die Aufreinigung der extrahierten DNA wurden beide Eluate zusammengefügt und mit dem Invisorb<sup>®</sup> DNA CleanUp Kit weiterverarbeitet. Um die Verluste, die bei der Aufreinigung auftreten können, auszugleichen, wurde für die Eluation ein Volumen von 30 µl gewählt. Die spektralphotometrische Messung der erhaltenen DNA-Eluate weist auf eine Verbesserung der 260/280-Verhältnisse hin. Für das 1. Eluat ergibt sich ein Wert von 1,88 (260/230-Verhältnis: 2,48) und für das 2. Eluat ist ein Wert von 2,17 zu verzeichnen (260/230-Verhältnis: -1,37, Abbildung 33). Ein Vergleich der DNA-Konzentrationen vor (Messung 1: 23,5 ng/µl; Messung 2: 6,1 ng/µl) und nach (Messung 3: 28,3 ng/µl; Messung 4: 5,1 ng/µl) der Aufreinigung, ergibt einen DNA-Verlust von rechnerisch 40%. Für den Verlauf der Absorptionskurve

von Messung 3 wird deutlich, dass diese den typischen Verlauf „reiner“ DNA aufweist (Tabelle 46).

Tabelle 46: Spektralphotometrische Analyse der DNA, die aus einer Holzbohle extrahiert wurde. Gemessen wurden je 1 µl der DNA-Eluate der modifizierten DNeasy® *mericon*™ Food Kit Extraktion. Zusätzlich wurde eine Aufreinigung mit dem Invisorb® DNA CleanUp Kit durchgeführt und ebenfalls analysiert (Aufr.).

Messung	Probenname	DNA Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
1	Mel. 1. Eluat	23,5	0,471	0,486	0,97	0,34
2	Mel. 2. Eluat	6,1	0,122	0,112	1,09	0,39
3	Mel. Aufr. 1. Eluat	28,3	0,566	0,301	1,88	2,48
4	Mel. Aufr. 2. Eluat	5,1	0,103	0,047	2,17	-1,37

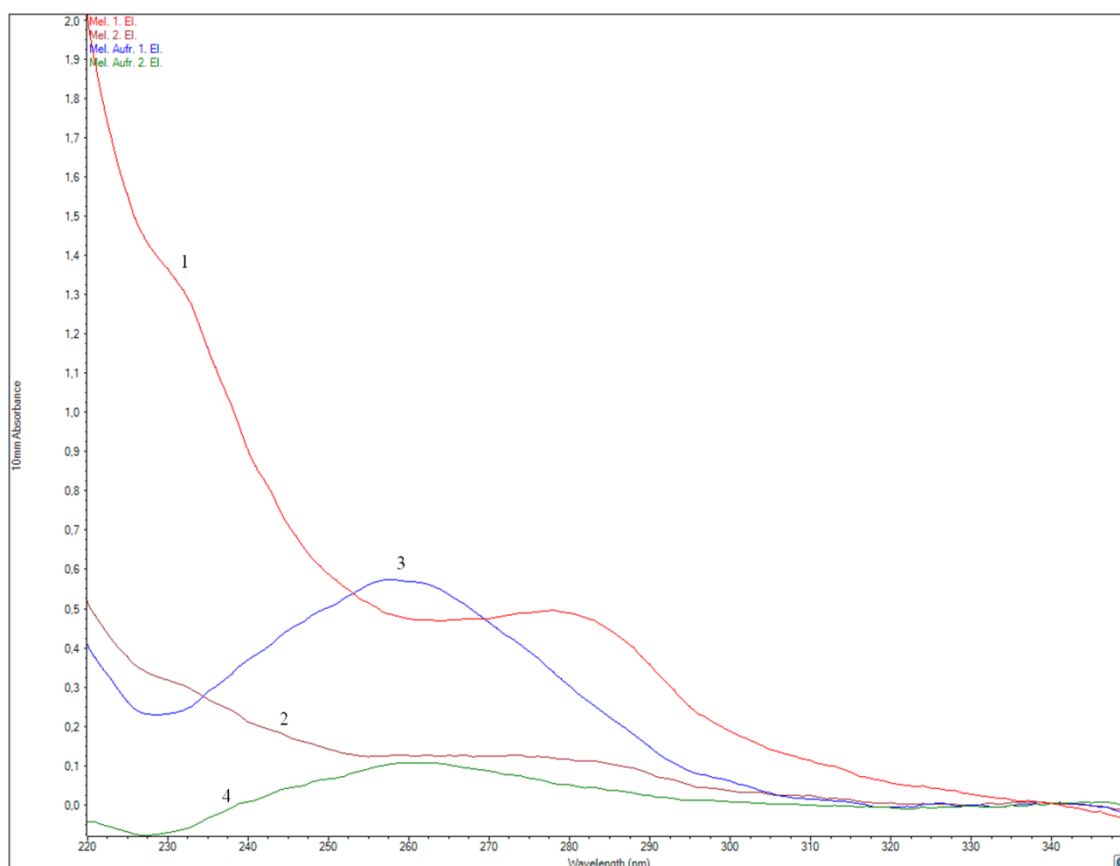


Abbildung 33: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die DNA-Eluate der Holzbohle unbekannter Art. Dargestellt sind die Kurven nach der modifizierten *mericon*™ Food Kit Extraktion (1 = Mel. 1. Eluat und 2 = Mel. 2. Eluat) und nach der Aufreinigung mit dem Invisorb® DNA CleanUp Kit (3 = Mel. Aufr. 1. Eluat und 4 = Mel. Aufr. 2. Eluat). Auftrag = 1 µl.

Die Amplifizierung der erhaltenen DNA geschah mithilfe des KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kits (Punkt 2.2.3.2). Als Template kam das 1. Eluat der aufgereinigten DNA zum Einsatz. Unter Verwendung der „holzspezifischen“ Primerkombination ITS1.1/ITS2.1 wurde zuerst die optimale DNA-Konzentration bzw. der optimale PCR-Puffer ermittelt. Es stellte sich heraus, dass die Verwendung des GC-Puffers in Kombination mit einer DNA-Menge von 28,3 ng für diesen Versuch am geeignetsten war. Im zweiten Schritt kamen die spezifischen Primer von *Swietenia macrophylla*, *S. humilis*, *S. mahagoni*, *Entandrophragma cylindricum*, *Khaya* spp. und *Carapa* spp. zur Anwendung (vgl. Punkt 3.3.1). Für *E. angolense* existierte zu diesem Zeitpunkt noch kein Primerpaar. Durch die Verwendung der spezifischen Primer S m/h for1 und S m/h rev1, wurde das Stück Holz durch ein 470-472 bp großes DNA-Fragment als *S. macrophylla* bzw. *S. humilis* identifiziert (Abbildung 34). Eine zusätzlich durchgeführte Sequenzierung des DNA-Fragments ergab, dass die erhaltene Sequenz absolut homolog zu den Datenbanksequenzen von *S. macrophylla* und *S. humilis* ist.

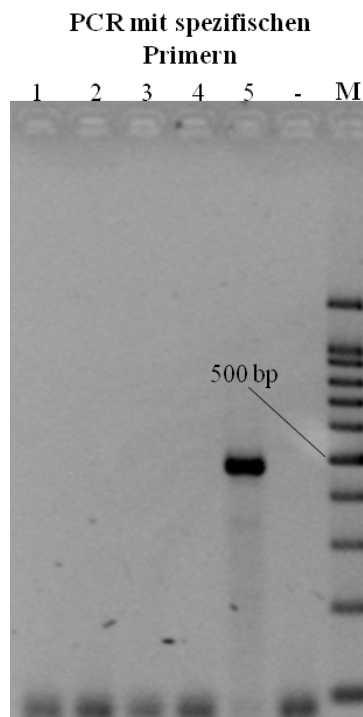


Abbildung 34: Gelelektrophorese für die Identifizierung einer unbekannten Holzbohle. Die Anwesenheit einer Bande von 470-472 bp, unter Verwendung der Primer S m/h for1 und S m/h rev1, identifiziert die Holzbohle eindeutig als Vertreter der Art *Swietenia macrophylla* bzw. *S. humilis*. 1 = E cyl for2/E cyl rev3, 2 = Khay for1/Khay rev2, 3 = Cara for1/Cara rev2, 4 = S mah for/S mah rev2 und 5 = S m/h for1 mit S m/h rev1. - = Negativ-Kontrolle, M = 100 bp Ladder.

Die holzanatomische Bestimmung der Probe wurde von Herrn PD Dr. Gerald Koch durchgeführt. Dieser kam zu dem Ergebnis, dass es sich bei der Holzbohle um *Swietenia spec.* handelt. Für die Gattung *Swietenia* ist eine Identifizierung auf Artebene, anhand der holzanatomischen Merkmale, nicht möglich. Somit stimmen die Ergebnisse beider Untersuchungen auf Gattungsebene überein. Durch die Verwendung der DNA-Analyse wurde zusätzlich noch die Art *S. mahagoni* ausgeschlossen.

### **3.4.3 Validierung der modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion anhand von Palisanderholz**

Die Untersuchung der Holzproben fand im Rahmen einer (mit)betreuten Bachelorarbeit (Zatt Schardosin 2013) statt. Der in diesem Punkt wiedergegebene Versuch diente der Frage, ob sich die modifizierte *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion aus Punkt 3.1.3.4 für die DNA-Extraktion aus Kern- und Splintholz, das bereits mehreren negativen Einflüssen (Einschnitt und lange Lagerdauer) unterlag, eignet. Zur Validierung der entwickelten DNA-Extraktionsmethode wurden folgende drei Proben der Gattung *Dalbergia* verwendet: *D. nigra* (Dal 1), *D. retusa* (Dal 2) und *D. latifolia* (Dal 3). Die Probe von *D. nigra* stammte aus der Holzsammlung des Thünen-Instituts und die anderen Proben wurden freundlicherweise von Max Cropp e.K., Hamburg, Deutschland, zur Verfügung gestellt (vgl. Punkt 2.1.4.2). Als Ausgangsmaterial für die Extraktion der DNA wurden 200 mg Holzmehl eingesetzt. Für Probe Dal 1 und Dal 3 wurde dieses aus bereits verkerntem Gewebe entnommen. Im Gegensatz hierzu erfolgte für Probe Dal 2 die Entnahme aus dem Splintholzbereich. Die Eluationsmenge der DNA-Extraktion betrug 50 µl.

Das DNA-Eluat, das aus dem Splintholz gewonnen wurde (Dal 2), zeigt den höchsten DNA-Gehalt der drei Proben. Es wurde hier eine DNA-Konzentration von 166,5 ng/µl gemessen (Tabelle 47). Das berechnete 260/280-Verhältnis liegt für diese Probe bei 1,90 (260/230-Verhältnis: 0,91). Die Absorptionskurve von Dal 2 weist weiterhin den typischen Verlauf „reiner“ DNA auf (Abbildung 35). Wesentlich geringere DNA-Konzentrationen wurden für die Proben Dal 1 und Dal 3 gemessen. Diese lagen lediglich bei 7,9 bzw. 7,5 ng/µl. Zwar haben die Proben mit 2,09 und 1,40 noch annehmbare 260/280-Verhältnisse (Tabelle 47), jedoch zeigen die Absorptionskurven nicht den erwarteten Verlauf. Dal 1 und Dal 3 verlaufen zwischen 340 und 240 nm nahezu parallel zur x-Achse. Ab 240 nm ergibt sich für beide Kurven ein Anstieg, der für Dal 1 stärker ausfällt (Abbildung 35). Aufgrund der geringen DNA-Konzentrationen

der Proben Dal 1 und Dal 3 wurde auf eine weitere Aufreinigung der Proben mit dem Invisorb® DNA CleanUp Kit der Firma Stratec verzichtet.

Tabelle 47: Spektralphotometrische Analyse der DNA, welche aus den Hölzern der Gattung *Dalbergia* isoliert wurde. Dal 1 = *Dalbergia nigra*; Dal 2 = *D. retusa*; Dal 3 = *D. latifolia*. Analysiert wurde je 1 µl des DNA-Eluats der modifizierten DNeasy® mericon™ Food Kit Extraktion.

Probenname	DNA Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
Dal 1	7,9	0,16	0,08	2,09	0,11
Dal 2	166,5	3,33	1,75	1,90	0,91
Dal 3	7,5	0,15	0,11	1,40	0,28

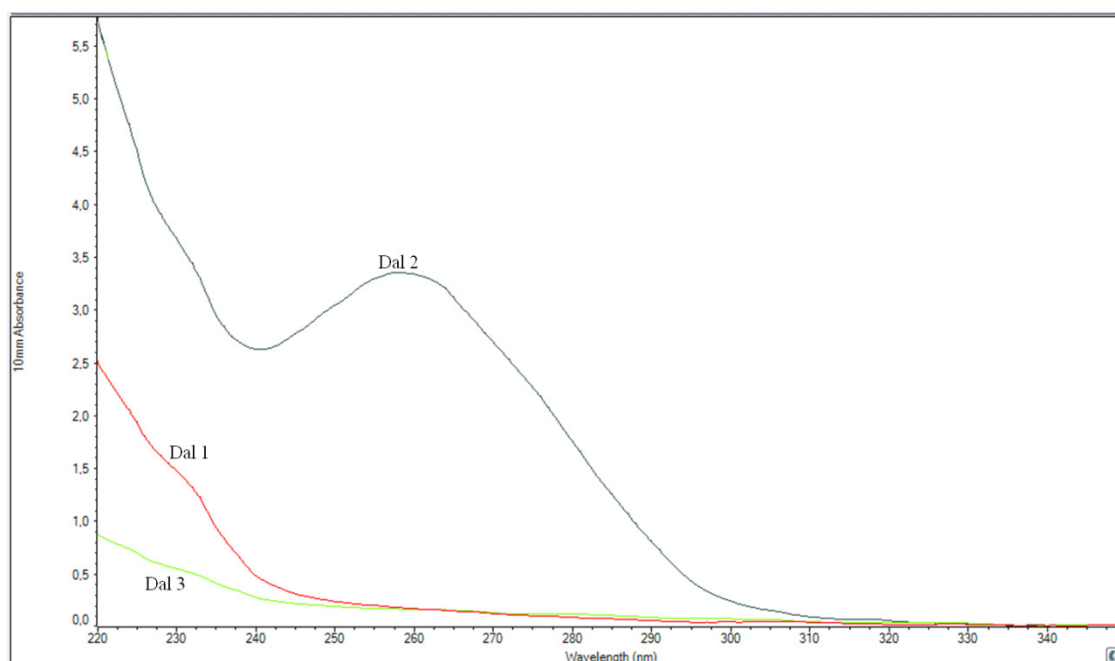


Abbildung 35: Verlauf der Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge für die DNA-Eluats der Hölzer der Gattung *Dalbergia*. Zur Anwendung kam die modifizierte DNeasy® mericon™ Food Kit Extraktion Auftrag = 1 µl.

Für die Amplifizierung der DNA wurde das KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit eingesetzt. Die Ermittlung des geeignetsten PCR-Puffers bzw. der optimalen Templatmenge erfolgte ein weiteres Mal anhand der Primerkombination ITS1.1/ITS2.1. Bei den vorliegenden DNA-Eluaten wies der GC-Puffer die beste Eignung auf. Die optimalen Template-Mengen waren: Dal 1 = 7,9 ng, Dal 2 = 83,3 ng und Dal 3 = 7,5 ng. Mithilfe des GC-Puffers, den ermittelten DNA-Templates sowie den entsprechenden spezifischen Primern (vgl. Tabelle 44) erfolgte im Anschluss die

Amplifizierung der DNA. Dal 1 zeigt bei Verwendung der Primerkombination D nig for/D nig rev ein DNA-Fragment mit der erwarteten Länge von 368 bp und wird somit als *D. nigra* bestätigt. Die Probe Dal 2 wird durch die Primerkombination D ret for2/D ret rev2 und einer Bande von 488 bp als *D. retusa* identifiziert. Die Anwendung der Primer D lat for und D lat rev (505 bp) ergibt, dass es sich bei Dal 3 um *D. latifolia* handelt (Abbildung 36). Anhand der anschließenden Sequenzierung der erhaltenen DNA-Fragmente und dem Vergleich der Sequenzen mit der rDNA ITS-Sequenzdatenbank, wurden die Ergebnisse des Schnelltests bestätigt. Die in diesem Punkt erhaltenen Resultate bestätigen eindeutig, dass sich die modifizierte *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktionsmethode auch für die DNA-Extraktion von bereits länger gelagertem Kern- und Splintholz eignet.

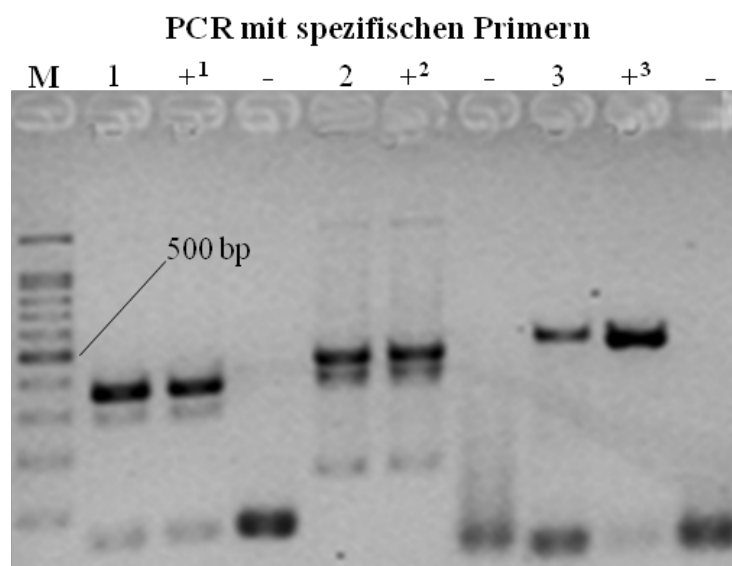


Abbildung 36: Anwendung der spezifischen Primer der Gattung *Dalbergia*. D nig for/D nig rev identifiziert Dal 1, durch die Anwesenheit eines 368 bp großen Fragments, eindeutig als *Dalbergia nigra* (1). Dal 2 wird durch die Primerkombination D ret for2/D ret rev2 und einer Bande von 488 bp als *Dalbergia retusa* identifiziert (2). Abschließend zeigt die Anwendung der Primer D lat for und D lat rev (505 bp), dass es sich bei Dal 3 um *Dalbergia latifolia* handelt (3). +<sup>1-3</sup> = entsprechende Positiv-Kontrolle des verwendeten Primerpaars.  
- = Negativ-Kontrolle

---



---

## **4 Diskussion**

Ziel der Arbeit war, einen Schnelltest zu entwickeln, der es ermöglicht, CITES-geschützte Baumarten sowie deren Substitutionshölzer auf Basis von spezifischen DNA-Markersystemen zu identifizieren. Die Bereitstellung eines solchen Schnelltests erforderte verschiedene Untersuchungen, die sich in mehreren Aufgabengebieten zusammenfassen lassen. Um die benötigte DNA aus den verschiedensten Ausgangsmaterialien, wie z.B. Splint- und Kernholz, zu isolieren, wurde ein geeignetes DNA-Extraktionsprotokoll erarbeitet. Neben der Entwicklung dieses DNA-Extraktionssystems, war für die Identifizierung der CITES-Hölzer sowie deren Substitutionsarten, die Wahl eines geeigneten Markers, in diesem Fall der ITS-Bereich der rDNA, nötig. Da für diesen Marker aber nur wenige bis gar keine Sequenzinformationen zu Verfügung standen, musste eine interne ITS-Sequenzdatenbank aufgebaut werden. Mithilfe dieser internen Sequenzdatenbank, wurden im Anschluss spezifische Primer entwickelt. Diese Oligonukleotide ermöglichen die Identifizierung unbekannter Holzproben, ohne dass eine Auswertung der Sequenzinformationen erforderlich ist. Abschließend wurde eine Validierung der entwickelten Schnellbestimmungsmethode anhand mehrerer Blindtests durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen werden nachfolgend zusammengefasst und in Bezug zur aktuellen Literatur diskutiert.

### **4.1 Entwicklung eines Protokolls für die DNA-Isolierung aus Splint- und Kernholz**

Für die erfolgreiche molekularbiologische Identifizierung von Holzarten ist, neben einem geeigneten DNA-Extraktionsprotokoll, auch das zur Verfügung stehende Ausgangsmaterial ausschlaggebend. Während unter Einsatz von kommerziellen DNA-Extraktionskits die Verwendung von Knospen, Früchten, Blättern, jungen Ästen und Kambium zur Routine geworden ist (Dumolin et al. 1995; Tsumura et al. 1996; Csaikl et al. 1998; Cannon und Manos 2003; Stefenon et al. 2006; Yu et al. 2008; Finkeldey et al. 2010), stellen Splint- und Kernholz eine besondere Herausforderung dar. Bei der Verwendung dieses Ausgangsmaterials wird deutlich, dass die Effizienz der DNA-Extraktion vom äußeren Splint bis zur Kernmitte stark abnimmt (De Filippis und Magel 1998; Deguilloux et al. 2002; Rachmayanti et al. 2009; Tang et al. 2011).

Verursacht wird dies unter anderem dadurch, dass während das Zentrum des Kernholzes nur totes Gewebe aufweist, im äußeren Splint eine Mixtur von lebendem und totem Gewebe anzutreffen ist (Fengel 1970; Bamber 1976; Abe et al. 2011). Das tote Gewebe stellt in diesem Zusammenhang einen sehr wichtigen Aspekt dar, da das Absterben der Zellen eine Degradation der DNA bewirkt (Bar et al. 1988; Lindahl 1993; Deguilloux et al. 2002). Diese Degradation wird nicht nur durch endogene Faktoren, wie den Zelltod, ausgelöst, sondern auch exogene Faktoren, z.B. Lagerung, Trocknung (technisch oder natürlich) und Mikroorganismen, führen zu einer Fragmentierung der DNA (Yoshida et al. 2006; Jiao et al. 2012; Tnah et al. 2012). Neben der fragmentierten DNA, weisen Splint- und Kernholz weiterhin noch PCR-Inhibitoren auf, welche die Effizienz der DNA-Extraktion negativ beeinflussen. Diese Inhibitoren (Polysaccharide, Proteine und phenolische Komponenten) treten, je nach Gewebetyp, in unterschiedlich starker Konzentration auf (Demeke und Adams 1992; Lee und Cooper 1995; Pandey et al. 1996).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde zwar eine Reihe von DNA-Extraktionsprotokollen für Splint- und Kernholz veröffentlicht, doch keines dieser Protokolle hatte die Eigenschaft, generell für alle Hölzer verwendet werden zu können (Rachmayanti et al. 2006). Betrachtet man die bisher veröffentlichten Protokolle, so wird deutlich, dass diese größtenteils auf CTAB, PTB und dem DNeasy® Plant Mini Kit basieren (De Filippis und Magel 1998; Dumolin-Lapègue et al. 1999; Deguilloux et al. 2002; Reynolds und Williams 2004; Asif und Cannon 2005; Rachmayanti et al. 2006; Tang et al. 2011; Jiao et al. 2012; Tnah et al. 2012). Da noch kein allgemeingültiges DNA-Extraktionsprotokoll für Holz existiert, wurden in dieser Arbeit verschiedene Ansätze auf ihre Eignung überprüft (vgl. Punkt 3.1). Um den Vergleich der verschiedenen DNA-Isolierungsversuche (Tabelle 8) gewährleisten zu können, wurden für alle Versuche dieselben Holzproben als Ausgangsmaterial verwendet. Zur Anwendung kamen eine Splintholzprobe von *Entandrophragma cylindricum* (Ec), die als Positiv-Kontrolle diente, und eine Kernholzprobe von *Khaya ivorensis* (Ki), aus der in Vorversuchen keine DNA isoliert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Bei nahezu allen DNA-Extraktionsversuchen wies die Positivkontrolle Ec wesentlich höhere DNA-Gehalte als die Kernholzprobe Ki (Tabelle 48) auf. Lediglich in zwei Fällen konnte für Ki ein höherer Wert gemessen werden. Zum einen war dies der Fall bei der CTAB/SDS-Extraktion (pH 5,1) und zum anderen beim Einsatz des innuSPEED Soil DNA Kits der Firma Analytik Jena.

Für die Beurteilung einer DNA-Extraktion spielt neben dem DNA-Gehalt der PCR-Erfolg eine sehr wichtige Rolle (Rachmayanti et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser unter Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4 ermittelt. Durch diese Primerkombination konnte sowohl die Holz-DNA, als auch die DNA des im Holz befindlichen Pilzes amplifiziert werden. Die simultane Amplifizierung der DNA beider Organismen ermöglichte die Kontrolle, ob PCR-Inhibitoren vorhanden waren (keine Bande vorhanden) und ob die Lysis ausreichte, um die Holz-DNA in Lösung zu bringen (Holz- und Pilz-DNA wird amplifiziert). Während die Holz-DNA der Probe Ec nach der Verwendung nahezu aller DNA-Extraktionsmethoden amplifiziert werden konnte (lediglich nach der PTB-Extraktion war kein Amplifikat vorhanden, Tabelle 48), war dies für die Holz-DNA der Probe Ki nur durch die modifizierte *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion möglich (vgl. Punkt 3.1.3.4). Durch die Amplifikation der Holz-DNA der Probe Ki wird ausgeschlossen, dass die Größe des gewählten DNA-Fragments (Ki = 726 bp) einen negativen Einfluss auf den PCR-Erfolg hatte. Dass für Splint- und Kernholz ein starker Einfluss bezüglich der Größe des gewählten DNA-Fragments auf den PCR-Erfolg zu verzeichnen ist, wurde bereits in verschiedenen Studien berichtet (Pääbo 1990; Deguilloux et al. 2003; Rachmayanti et al. 2009). So zeigten z.B. DNA-Fragmente mit einer Größe von 300-500 bp nur geringe PCR-Erfolge (Cotton et al. 2000; Krenke et al. 2002). Beim Einsatz von degradierter DNA hat nicht nur die Größe des DNA-Fragments Einfluss auf den PCR-Erfolg, sondern auch der gewählte Marker. Betrachtet man die derzeit diskutierten Regionen der cpDNA bzw. den ITS der rDNA, so wird darauf hingewiesen, dass sich Marker der cpDNA besser für die Amplifizierung von fragmentierter DNA eignen (Jiao et al. 2012). Dies ist durch die zirkuläre Struktur der cpDNA, welche zu einer höheren Stabilität führt, bedingt. Die Frage, ob cp-Marker bei den in diesen Versuchen erhaltenen DNA-Eluaten einen höheren PCR-Erfolg aufgezeigt hätten, bleibt unbeantwortet.

Tabelle 48: Vergleich der spektralphotometrischen Werte aller untersuchten DNA-Extraktionsmethoden in Kombination mit dem PCR-Erfolg. Die PCR wurde mit der Primerkombination ITS1.1/ITS4 durchgeführt. Diese Kombination ermöglichte sowohl die Amplifikation der Holz-DNA, als auch der im Holz befindlichen Pilz-DNA. (Ec = *Entandrophragma cylindricum* und Ki = *Khaya ivorensis*; iSP = innuSPEED Plant DNA Kit, iSS = innuSPEED Soil DNA Kit, iSSt = innuSPEED Stool DNA Kit, pGP = peqGOLD Plant DNA Mini Kit, NPP = Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kit, NSS = NucleoSpin® Soil Kit; DNeasy = DNeasy® Plant Mini Kit; ✓ = Soweit nicht anders angegeben, wurden sowohl die Holz- als auch die Pilz-DNA amplifiziert.)

Probenname	DNA-Konz. (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230	Ausbeute (ng/mg)	PCR-Erfolg
<b>Gruppe A</b>							
CTAB							
Ec	129	2,58	1,87	1,38	0,43	38,70	✓
Ki	12,4	0,25	0,30	0,84	0,17	3,72	✓ (Pilz)
SDS (x% SDS)							
Ec 0,3%	308,4	6,17	5,43	1,14	0,40	92,52	✓
Ki 0,3%	52,1	1,04	1,06	0,98	0,31	15,63	-
Ec 1%	515,5	10,31	9,56	1,08	0,33	154,65	✓
Ki 1%	75,2	1,51	1,63	0,93	0,27	22,56	-
CTAB/SDS							
Ec pH 5,1	28,6	0,57	0,74	0,78	0,15	8,58	✓
Ki pH 5,1	31,2	0,63	0,50	1,26	0,07	9,36	-
Ec pH 7,2	36,9	0,74	0,90	0,82	0,15	11,07	✓
Ki pH 7,2	24,1	0,48	0,61	0,78	0,10	7,23	-
PTB							
Ec	101,2	2,02	1,23	1,64	0,47	30,36	-
Ki	8,3	0,17	0,08	2,20	0,18	2,49	-
<b>Gruppe B</b>							
div. kommerzielle Extraktions-Kits							
Ec iSP	9,4	0,19	0,11	1,77	0,55	4,70	✓
Ki iSP	4,2	0,08	0,05	1,76	0,21	2,10	-
Ec iSS	2,1	0,04	-0,03	-1,32	0,02	1,05	✓
Ki iSS	2,5	0,05	-0,04	-1,45	0,03	1,25	-
Ec iSSt	299,1	5,98	3,79	1,58	0,75	149,55	✓
Ki iSSt	12,4	0,25	0,21	1,16	0,19	6,20	-
Ec pGP	97,3	1,95	1,01	1,94	0,44	48,65	✓
Ki pGP	5,2	0,10	0,02	4,33	0,39	2,60	-
Ec NPP	70,7	1,42	0,39	3,64	0,32	35,35	✓
Ki NPP	61,2	1,22	0,28	4,31	0,27	30,60	-
Ec NSS	87,3	1,75	1,27	1,38	0,55	43,65	✓
Ki NSS	4,0	0,08	0,08	1,02	0,42	2,00	-
Ec DNeasy	15,1	0,30	0,19	1,56	1,85	7,55	✓
Ki DNeasy	2,7	0,05	0,04	1,45	-1,18	1,35	-

<b>Gruppe C</b>							
DNeasy® Plant Mini Kit mit PVP							
Ec PVP	10,4	0,21	0,12	1,73	1,84	5,20	✓
Ki PVP	5,6	0,11	0,09	1,31	1,32	2,80	-
DNeasy® Plant Mini Kit mit CTAB							
Ec DN CTAB	68,8	1,38	1,03	1,34	0,53	34,40	✓
Ki DN CTAB	6,8	0,14	0,12	1,13	0,83	3,40	-
DNeasy® Plant Mini Kit mit PTB							
Ec DN PTB	158,1	3,16	2,06	1,53	0,72	79,05	✓
Ki DN PTB	98,8	1,98	1,27	1,55	0,67	49,40	-
Modifiziertes <i>mericon</i> ™ Food Kit							
Ec Mm	108,0	2,16	1,27	1,70	1,30	54,00	✓
Ki Mm	34,1	0,68	0,43	1,57	1,10	17,05	✓

Für den PCR-Erfolg ist, neben dem Einsatz eines geeigneten Barcoding-Bereichs, weiterhin die Isolierung von inhibitorenfreier DNA maßgeblich (DNA-Qualität). Die häufigsten im Holz vorkommenden Inhibitoren sind phenolische Komponenten, Terpene, Polysaccharide und Proteine (Demeke und Adams 1992; Lee und Cooper 1995; Pandey et al. 1996). Bereits bei der Wahl des Ausgangsmaterials kann auf niedrige Inhibitorenbelastung geachtet werden. So liegen zwar im Kambium die höchsten DNA-Gehalte vor, doch verschiedene Untersuchungen berichteten auch, dass einige Arten (z.B. *Populus tremula* x *P. tremuloides* und *Cunninghamia lanceolata*) in diesem Bereich höhere Inhibitorenkonzentrationen als im Splint- oder Kernholz aufweisen (Fladung et al. 2004; Tang et al. 2011). Die PCR-Erfolge der in dieser Arbeit durchgeführten DNA-Extraktionsversuche zeigen eindeutig, dass in Anbetracht des Stammquerschnitts, das Splintholz den aussichtsreichsten Bereich für die DNA-Extraktion darstellt. Aus der Splintholzprobe Ec konnte unter Verwendung fast aller DNA-Extraktionsmethoden (außer der PTB-Methode, Tabelle 48) DNA in ausreichender Quantität und Qualität isoliert werden, um anschließend eine erfolgreiche PCR durchzuführen. Zwar lassen die verschiedenen spektralphotometrischen Messungen auf die Anwesenheit von Inhibitoren schließen (Tabelle 48), doch scheint deren Konzentration nicht ausreichend zu sein, um die PCR zu inhibieren. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Tang et al. (2011). Sie trafen die Aussage, dass das Splintholz als ein Bereich zu beurteilen ist, der es ermöglicht, DNA in ausreichender Quantität und Qualität zu extrahieren.

Anhand der Proben Ec und Ki konnten die unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden, die in drei Gruppen eingeteilt wurden (Gruppe A, B und C), auf ihre Eignung für Holz verglichen werden. Die Ergebnisse der Gruppe A (CTAB-, SDS-, CTAB/SDS- und PTB-Extraktion; vgl. Punkt 3.1.1) aus Tabelle 48 zeigen deutlich, dass sich diese Gruppe am wenigstens für die verwendeten Hölzer eignet. Bis auf die PTB-Extraktion wurde zwar für Probe Ec ein 100%iger PCR-Erfolg erzielt (Tabelle 48), doch weisen die 260/280-Verhältnisse (CTAB = 1,38, SDS = 1,14 bzw. 1,08, CTAB/SDS = 0,78 bzw. 0,82; Tabelle 48), die für Holz bei 1,8-2,0 liegen sollten, ebenso wie der Verlauf der Absorptionskurven (Abbildung 5, Abbildung 6 und Abbildung 7), auf die Anwesenheit von Inhibitoren hin. Für Probe Ki war nur für die CTAB-Extraktion, und hier auch nur partiell, ein PCR-Erfolg zu verzeichnen. Dieser partielle Erfolg resultierte aus der Amplifikation von Pilz-DNA (Template: 1 µl, 0,5 µl und 1:10). Durch das Fehlen der Holzbande wird darauf geschlossen, dass die Lysis nicht ausreichte, um die Holz-DNA der Probe Ki in Lösung zu bringen. Die hier festgestellte eingeschränkte Eignung von CTAB zur DNA-Isolierung aus Holz, ist mit den Ergebnissen unterschiedlichster Studien vergleichbar (De Filippis und Magel 1998; Reynolds und Williams 2004; Asif und Cannon 2005; Tang et al. 2011; Tnah et al. 2012).

Die SDS-Extraktionen (0,3 bzw. 1%) wiesen zwar wesentlich höhere DNA-Ausbeuten als die CTAB-Extraktion (92,52 bzw. 154,65 ng/mg gegen 38,70 ng/mg für Ec, Tabelle 48) auf, doch war der PCR-Erfolg wesentlich geringer. Insgesamt konnte nur die 1:1000 Verdünnung der Probe Ec amplifiziert werden (Holz- und Pilz-DNA). Dies lässt wiederum auf eine hohe Inhibitorenkonzentration schließen. Ob es sich bei der inhibierenden Substanz um das verwendete SDS handelt, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Für die bisher besprochenen Methoden führte die Verwendung des von Erickson et al. (2005) veröffentlichten PTB-Extraktionspuffers zu den besten 260/280-Verhältnissen (Ec: 1,64 und Ki: 2,20). Trotz der positiven Ergebnisse der spektralphotometrischen Analyse, ergab die Amplifikation der DNA-Eluate keinen PCR-Erfolg. Der nahezu lineare Verlauf der gemessenen Absorptionskurven (Abbildung 8) lässt den Schluss zu, dass die DNA-Eluate wiederum Inhibitoren aufwiesen.

In der Gruppe B wurden kommerzielle Extraktionskits zusammengefasst, die die Aufreinigung der DNA über Silikafilter realisieren (Tabelle 48). Diese DNA-Extraktionskits wurden untersucht, da verschiedene Studien, z.B. Jiao et al.

(2012) berichtet haben, dass durch die Verwendung von Silikafiltern eine Verminderung der Inhibitorenkonzentration erreicht werden kann. Die Ergebnisse der Versuche zeigen (vgl. Punkt 3.1.2), dass sich alle kommerziellen Kits für die DNA-Isolierung aus der Positivkontrolle Ec eignen. Die besten Ergebnisse für die DNA-Quantität erzielten das innuSPEED Stool DNA Kit (iSSt: 149,55 ng/mg) und das peqGOLD Plant DNA Mini Kit (pGP: 48,65 ng/mg). Im Hinblick auf die DNA-Qualität sind das innuSPEED Plant DNA Kit (iSP:  $260/280 = 1,77$ ) und wiederum das pGP Kit ( $260/280 = 1,94$ ) als besonders geeignet hervorzuheben. Bezüglich des PCR-Erfolgs ist anzuführen, dass eine Amplifikation der Holz- und Pilz-DNA möglich war. Diese positiven Ergebnisse lassen sich leider nicht auf die Probe Ki übertragen. Für diese war in keinem Fall eine Amplifikation möglich. Dies lässt sich sowohl auf das Vorkommen von starken Inhibitoren, als auch auf eine geringe DNA-Ausbeute (1,25-6,20 ng/mg, ausgenommen das Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction mit 30,60 ng/mg, Tabelle 48) zurückführen.

Beruhend auf der Tatsache, dass die Qualität der DNA-Eluate der Proben Ec und Ki durch die Verwendung von Silikafiltern gesteigert werden konnte (z.B. beim innuSPEED Plant DNA Kit im Vergleich mit der Gruppe A), wurden unter anderem verschiedene Lysis-Puffer der Gruppe A mit dem DNeasy® Plant Mini Kit kombiniert (vgl. Punkt 3.1.3 und Tabelle 48). Ziel der Versuche war, zu untersuchen, ob die Verwendung alternativer Lysis-Puffer die DNA-Ausbeute steigert. Als „Basis-Kit“ wurde das DNeasy® Plant Mini Kit der Firma Qiagen gewählt, da bereits unterschiedliche Studien zur erfolgreichen Anwendung bei Holz vorliegen (Dumolin-Lapègue et al. 1999; Deguilloux et al. 2002; Rachmayanti et al. 2006; Yoshida et al. 2007; Hanssen et al. 2011). Bei der ersten Variation handelte es sich um die durch Rachmayanti et al. (2006) veröffentlichte Modifikation des DNeasy® Plant Mini Kits (Zusatz von PVP zum Lysis-Puffer; Punkt 3.1.3.1). Im Gegensatz zu dieser und weiteren Veröffentlichungen (Rachmayanti et al. 2009; Jiao et al. 2012), konnte durch die Verwendung des modifizierten Kits keine Amplifizierung der aus dem Kernholzgewebe gewonnenen DNA (Probe Ki) ermöglicht werden. Vergleicht man die entsprechenden Werte ( $260/280$ -Verhältnis für Ki = 1,45) der spektralphotometrischen Analyse mit den Werten einer klassischen DNeasy®-Extraktion ( $260/280$ -Verhältnis für Ki = 1,31), so wird deutlich, dass die erhaltenen Unterschiede vernachlässigbar sind (Tabelle 48). Sie sind in diesem Fall so gering, dass sie sich auch durch die unterschiedliche Qualität des Ausgangsmaterials erklären lassen. Eine weitere Variation

bestand in der Kombination des CTAB-Puffers mit dem DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (vgl. Punkt 3.1.3.2). Für diese Variante konnte für den PCR-Erfolg keinerlei Veränderung gegenüber der CTAB-Extraktion bzw. der klassischen DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion festgestellt werden. Wurde jedoch der PTB-Puffer mit dem DNeasy<sup>®</sup>-Kit (PTB/DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion) verwendet (vgl. Punkt 3.1.3.3), so konnten hier deutliche Verbesserungen gegenüber der PTB-Extraktion bzw. der klassischen DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion beobachtet werden. Die eindeutigste Verbesserung lag in der Steigerung des DNA-Gehalts. Genauer gesagt, stieg der DNA-Gehalt für Probe Ec von 101,2 (PTB-Extraktion) auf 158,1 ng/µl (PTB/DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion) an. Für Probe Ki war sogar eine Steigerung von 8,3 auf 98,8 ng/µl zu verzeichnen. Wesentlich stärkere Steigerungen sind für die PTB/DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion gegenüber der klassischen DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Extraktion anzuführen. Hier erhöht sich der DNA-Gehalt für die Proben Ec und Ki um das 10- bzw. 40-fache. Diese Verbesserung der DNA-Ausbeute lässt sich zum einen durch die bessere Zelllyse (bedingt durch die Verwendung von SDS) und zum anderen durch den Einsatz von PTB erklären. Die Verwendung von PTB ermöglicht in diesem Zusammenhang die Aufspaltung von Maillard-Produkten, wodurch die DNA wieder in reduzierter Form vorliegt (Poinar et al. 1998). Eine weitere Verbesserung, die beim Vergleich der PTB/DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion mit der PTB-Extraktion deutlich wird, ist, dass nach dem Einsatz der PTB/DNeasy<sup>®</sup>-Extraktion alle Template-Varianten für Probe Ec amplifiziert werden konnten. Die Amplifikation der Probe Ki blieb wiederum erfolglos.

Zum Abschluss dieses Punkts, wird auf das DNeasy<sup>®</sup> *mericon*<sup>™</sup> Food Kit der Firma Qiagen eingegangen (vgl. Punkt 3.1.3.4). Es handelt sich hierbei um ein Kit, welches für die DNA-Isolierung aus bereits verarbeiteten Nahrungsmitteln entwickelt wurde. Um diese Aufgabe zu erfüllen, wurde eine klassische CTAB-Methode in nicht angegebener Weise verändert. Dieses Kit ist für den Einsatz bei Holz von besonderem Interesse, da es für die Extraktion von besonders stark fragmentierter DNA optimiert wurde (Qiagen 2014). Für die hier verwendeten Ausgangsmaterialien wurde das DNA-Extraktionsprotokoll, wie in Punkt 3.1.3.4 beschrieben, angepasst. Die Verwendung eines Filters nach der Lysis, welcher die Aufteilung von flüssigen und festen Bestandteilen ermöglichen sollte, erwies sich als äußerst vorteilhaft. Durch diesen Schritt konnte ein Großteil des Lysis-Puffers, der durch das Quellen des trockenen Ausgangsmaterials für die weitere DNA-Extraktion nicht mehr zur Verfügung gestanden hätte, zurückgewonnen werden. Diese Rückgewinnung ist deshalb



von besonderer Bedeutung, da der Lysis-Puffer die gelöste DNA bereithält. Somit führt die Rückgewinnung zu einer Erhöhung der DNA-Ausbeute. Die Anwendung des modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktionsprotokolls resultierte in DNA-Ausbeuten von 54,00 (Ec) und 17,05 ng/mg (Ki). Beurteilt man die erhaltenen 260/280-Verhältnisse, so zeigen diese mit 1,70 (Ec) und 1,57 (Ki) vergleichbar gute Werte für altes und getrocknetes Ausgangsmaterial. Für das 260/280-Verhältnis von frischem und getrocknetem Splint- und Kernholz von *Cunninghamia lanceolata* berichteten Jiao et al. (2012) Werte von 1,1-1,6. Ähnliche Werte wurden auch von de Filippis und Magel (1998) für die DNA-Extraktion aus frischem Splint- und Kernholz von *Robinia pseudoacacia* gemessen. Sie erhielten mit einer CTAB-Extraktion Reinheiten von 1,48-1,88. Wichtiger als die für die *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion erhaltenen Reinheiten ist, neben der erfolgreichen Amplifikation der Probe Ec, der PCR-Erfolg für die Probe Ki. Im Anschluss an die modifizierte *mericon*<sup>TM</sup>-Isolierung konnte zum ersten Mal die Holz-DNA der Probe Ki amplifiziert werden. Aufgrund der erfolgreichen Amplifikation des gesamten ITS- bzw. ITS1-Bereichs steht mit der *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion eine Methode zur Verfügung, die es ermöglicht, DNA aus lange gelagertem Kernholz in einer Qualität und Quantität zu isolieren, die zu einer erfolgreichen Amplifizierung beiträgt. Die Validierung der entwickelten DNA-Extraktionsmethode findet im Verlauf der Diskussion genauere Ausführung.

Die Ergebnisse der DNA-Extraktionsversuche sowie der durchgeführten Validierungen haben deutlich gezeigt, dass mit der modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktionsmethode ein DNA-Extraktionsprotokoll zur Verfügung steht, das es ermöglicht, DNA in ausreichender Qualität und Quantität aus Splint- und Kernholz zu isolieren.

#### **4.2 Aufbau der rDNA ITS-Sequenzdatenbank**

Für die Entwicklung des Schnelltests zur Identifizierung von CITES-Holzarten sowie deren Austauschhölzern war der Aufbau einer rDNA ITS-Sequenzdatenbank notwendig (vgl. Punkt 3.2). Dies war erforderlich, da für die Hölzer aus Tabelle 5 bisher nur wenige bis gar keine ITS-Sequenzinformationen in den internationalen Datenbanken, wie der GenBank des NCBI, hinterlegt waren. Die Wahl fiel auf die in Tabelle 5 wiedergegebenen Hölzer, da bei der Zusammenstellung der CITES-Hölzer sowie deren Substitutionsarten der Fokus darauf lag, dass diese nur schwer bis gar nicht mit den herkömmlichen Methoden (z.B. auf makroskopischer oder mikroskopischer Ebene)

voneinander zu unterscheiden sind. Die Tatsache, dass in einigen Fällen die Differenzierung von CITES-geschützten Hölzern und deren Substitutionshölzern nicht realisierbar ist, macht den CITES-Vollzug nahezu unmöglich. Aber nicht nur die Unterscheidung von CITES- und Ersatz-Hölzern stellt Experten vor eine Herausforderung, sondern auch die Trennung von CITES-Hölzern untereinander. Die korrekte Bestimmung der Art und somit die Einteilung in den zugehörigen CITES-Anhang, hat großen Einfluss auf die rechtlichen Folgen. Eine Gattung die alle diese Punkte der CITES-Problematik erfüllt, ist *Dalbergia*. Sie beinhaltet sowohl CITES-geschützte Hölzer als auch Substitutionshölzer, die nur schwer mit herkömmlichen Methoden zu unterscheiden sind (Gasson 2011).

Eine Methode, die es ermöglicht, Hölzer bis auf Artebene zu bestimmen, ist das sogenannte DNA-Barcoding. Das Barcoding nutzt kurze Sequenzabschnitte bestimmter Gene oder intergenischer Bereiche, bei denen die Abfolge ihrer Basen wie ein Strichcode an der Kasse abgelesen wird. In dieser Arbeit wurde der ITS-Bereich als Marker gewählt, da dieser unter anderem die von Hollingsworth et al. (2009) angeführten Eigenschaften, die ein potenzieller Barcoding Locus aufweisen sollte, erfüllt. (1) Der ITS-Bereich weist konservierte Regionen auf, die eine routinemäßige Amplifizierung ermöglichen. (2) Der ITS1 und der ITS2 besitzen ausreichend Punktmutationen oder Indels, um die Identifizierung von Holzarten zu ermöglichen. (3) Die ITS1- bzw. ITS2-Region können getrennt voneinander amplifiziert werden, was den ITS-Bereich insoweit verkürzt, als dass auch eine Amplifizierung von stark degradiertem Material möglich ist. (4) Der ITS ist einfach zu alignen, wodurch die Verwendung von auf Zeichen basierenden Datenanalyseverfahren ermöglicht wird. Weitere Vorteile des ITS bestehen darin, dass die rDNA in jedem Gewebe des Baums zu finden ist und dass der ITS bis zu 30.000 Kopien auf dem Genom aufweist (Dubouzet und Shinoda 1999). Die hohe Kopienzahl des ITS ist besonders vorteilhaft, da in Fällen, in denen nur sehr wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung steht oder die DNA bereits stark abgebaut ist, eine Amplifikation noch mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich ist. Die Summe der angeführten Vorteile bzw. Eigenschaften veranlasste verschiedene Autoren den ITS-Bereich, als einen zusätzlichen oder eigenständigen Marker, für die Identifizierung von Landpflanzen vorzuschlagen (Chen et al. 2010; Gao et al. 2010; Pang et al. 2010; Yao et al. 2010; China Plant BOL Group et al. 2011; Li et al. 2012; Pang et al. 2012; Zhang et al. 2012). Trotz der bewiesenen Eignung des ITS als Pflanzenmarker wurde durch die PWG des CBOL im Jahr 2009 eine Kombination

der Loci *matK* und *rbcL* als „core“ Barcode zur Identifizierung von Landpflanzen vorgeschlagen (CBOL Plant Working Group et al. 2009). Dies verdeutlicht die Uneinigkeit bei der Wahl eines Markers oder einer Markerkombination zur Landpflanzenidentifizierung. Es besteht aber nicht nur Uneinigkeit darüber, ob der ITS als zusätzlicher oder eigenständiger „core“ Barcode Locus geeignet ist, sondern auch, ob der gesamte ITS oder nur ein Teilbereich (ITS1 oder ITS2) zum Einsatz kommen sollte. So wird zum Beispiel durch Chen et al. (2010), Gao et al. (2010), Pang et al. (2010), Yao et al. (2010) und Pang et al. (2012) der ITS2 als „core“ Barcode Locus für Landpflanzen vorgeschlagen. Dem stehen die Ergebnisse von Müllner et al. (2011) gegenüber, die für die Unterscheidung der Meliaceae den ITS1 als geeigneter ansehen. Trotz der Vorteile des ITS1 kommen Müllner et al. (2011), wie auch andere Studien (China Plant BOL Group et al. 2011; Li et al. 2012; Zhang et al. 2012), zu dem Ergebnis, dass der gesamte ITS als zusätzlicher „core“ Barcode Locus verwendet werden sollte.

Der ITS hat nicht nur bei der Unterscheidung von bekannten Arten großes Potenzial, sondern dieser Marker wurde auch unterstützend zur Entdeckung neuer Arten eingesetzt. So berichtete eine Studie von Yesson et al. (2004), dass die verschiedenen Individuen, die bisher zur Art *Trema micrantha* gezählt wurden, eigentlich zwei eigenständige Arten repräsentieren. Müllner et al. (2010) zeigten in ihrer Studie auf, dass sich mithilfe des ITS für *Cedrela odorata* drei biologische Arten wiedergeben lassen. Für die abschließende Klärung müssen hier aber noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Ebenfalls in der Gattung *Cedrela* konnten durch den ITS die neuen Arten *C. nebulosa*, *C. molinensis*, *C. kuelapensis* und *C. monroensis* bestätigt werden (Pennington und Müllner 2010).

Für den Aufbau einer rDNA ITS-Sequenzdatenbank, welche zur Identifizierung von Hölzern beitragen soll, ist nicht nur die Wahl eines geeigneten Markers wichtig, sondern auch die Beschaffung von zuverlässig bestimmtem Ausgangsmaterial (vgl. Punkt 2.1.4.1). In dieser Arbeit wurden nationale sowie internationale Botanische Gärten mit der Bitte angeschrieben, Äste bzw. Blätter zur Verfügung zu stellen. Weiterhin wurden DNA-Eluate von verschiedenen Forschungseinrichtungen, wie der DNA Bank des Kew Royal Botanic Gardens, eingesetzt. Beim Ausgangsmaterial lag der Fokus auf Blättern und dünnen Ästen, da in diesen Materialien eine hohe Anzahl von lebenden Zellen zu finden ist. Der Vorteil von Probenmaterialien mit einer hohen Anzahl von lebenden Zellen erklärt sich dadurch, dass hiermit große DNA-Ausbeuten

bei der DNA-Extraktion erzielt werden. Weiter lässt sich durch die Verwendung solchen Untersuchungsmaterials sicherstellen, dass aus diesem DNA von guter Qualität extrahiert wird. Neben der hohen Quantität und Qualität der DNA ist ein weiterer Vorteil, dass durch die Verwendung von DNA-Extraktionskits die DNA einfach und kostengünstig zu isolieren ist.

Betrachtet man die erhaltenen Proben, so wird deutlich, dass in den verschiedenen Botanischen Gärten häufig Material derselben Arten anzutreffen ist (Tabelle 6). Hieraus ergibt sich, dass z.B. für einzelne Arten der Meliaceae und Zygophyllaceae erheblich mehr Material zur Verfügung stand, als für andere Familien. Neben der Problematik, dass in den verschiedenen Botanischen Gärten dieselben Arten vertreten sind, kommt für den Aufbau einer Sequenzdatenbank erschwerend hinzu, dass vereinzelt Fehlbestimmungen vorliegen (siehe *Hymenaea courbaril* aus Punkt 3.2.3.1). Ein weiteres Problem bei der Wahl von Botanischen Gärten als Probenlieferant entsteht dadurch, dass teilweise nicht mehr nachzuvollziehen ist, ob die verschiedenen Individuen einer Art Klonmaterial von ein um demselben Baum darstellen. Trotz dieser Schwierigkeiten wurde hauptsächlich auf frische Blätter oder Äste zurückgegriffen, da bei der Verwendung von Splint- und Kernholz die bereits angesprochenen Schwierigkeiten auftreten.

Für die Verarbeitung der Proben aus Tabelle 6 kam das DNeasy® Plant Mini Kit zur Anwendung (vgl. Punkt 2.2.1.1). Bei diesem DNA-Extraktionskit handelt es sich um ein System, dass speziell für die DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterialien angepasst wurde. Vorversuche (Daten nicht gezeigt) bestätigten die positive Eignung des Kits für die verwendeten Materialien. Mithilfe dieses Kits konnte aus allen Proben erfolgreich DNA extrahiert werden. Die gemessenen DNA-Gehalte lagen zwischen 5 und 220 ng/μl und waren von dem verwendeten Ausgangsmaterial abhängig (Äste = 20-220 ng/μl, Blätter = 20-40 ng/μl, Splintholz = 5-20 ng/μl).

Die angeführten DNA-Konzentrationen dürfen aber nicht nur auf die baumeigene DNA zurückgeführt werden, sondern auch die eventuell im Ausgangsmaterial befindlichen Pilze müssen Berücksichtigung finden (Butin 1995; Sinclair und Lyon 2005). Dies sind in den meisten Fällen parasitäre Pilze, die hauptsächlich den Basidiomyceten und Ascomyceten zugeordnet werden können. Einige bekannte Arten parasitärer Ascomyceten (z. B. *Microsphaera alphitoides*, Erysiphaceae) werden unter der Bezeichnung „Echter Mehltau“ geführt (Pap et al. 2013). Die Basidiomyceten enthalten mit der Gattung *Armillaria* eine Gruppe holzerstörender Pilze mit großer

wirtschaftlicher Bedeutung. Bei einem Großteil der Arten dieser Gattung handelt es sich zwar um Saprobionten, jedoch treten einige Arten, wie z.B. *A. mellea* und *A. osotryae*, auch als Primärparasiten auf (Schmidt 2006). Durch die Verwendung von pilzspezifischen Primern wurden nahezu in allen verwendeten Proben Pilze nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits angeführt, weist der ITS-Bereich codierende Regionen auf, welche es ermöglichen, Pflanzen-DNA durch allgemeine Primer zu amplifizieren (vgl. Punkt 2.2.3.3). Unglücklicherweise kann es bei der Verwendung solch allgemeiner Primer zu einer ungewollten Vervielfältigung von Pilz-DNA kommen (Zhang et al. 1997; Hollingsworth 2011). Diese Tatsache war ebenfalls in der vorliegenden Arbeit zu beobachten. Im Genaueren trat das Phänomen bei der Verwendung der Primerkombination ITS1.1/ITS4 auf (White et al. 1990; Hanssen et al. 2011). Eine Lösung dieses Problems ist, Primer zu verwenden, die eine hohe Spezifität aufweisen (Gardes und Bruns 1993; Zhang et al. 1997; Takamatsu und Kano 2001; Kendall und Rygiewicz 2005). Zwei Primerkombinationen, die diese hohe Spezifität aufweisen, sind ITS1.1/ITS2.1 und ITS3.1/ITS4 (vgl. Punkt 2.2.3.3; (White et al. 1990; Hanssen et al. 2011)). Der Einsatz dieser Primerpaare ergab für alle Proben eine spezifische Amplifikation der Holz-DNA. Diese Spezifität wird dadurch ermöglicht, dass für die Primer ITS2.1 und ITS3.1 Sequenzabschnitte im 5.8S gewählt wurden, die eine Differenzierung von Pflanzen und Pilzen gewähren (Hanssen et al. 2011).

Die „holzspezifischen“ Primer wurden für jede untersuchte Probe ohne weitere Anpassung eingesetzt und ermöglichten beim Aufbau der rDNA ITS-Sequenzdatenbank einen 100%igen PCR-Erfolg. Somit ist der in anderen Studien berichtete geringe PCR-Erfolg bei der Verwendung des ITS hier nicht nachzuvollziehen (Kress et al. 2005; Kress und Erickson 2007; Gonzalez et al. 2009; Chen et al. 2010).

#### **4.2.1 ITS-Sequenzen der Meliaceae**

Innerhalb der Meliaceae wurde der ITS für die handelsrelevantesten Arten der Gattungen *Swietenia*, *Entandrophragma*, *Khaya*, *Carapa*, *Cedrela* und *Toona* erarbeitet (vgl. Punkt 3.2.1.3). Besonderes Augenmerk wurde somit auf die CITES-geschützten Holzarten und deren Substitutionshölzer gelegt (Tabelle 5). Die Untersuchungen fanden anhand von 70 Individuen statt. Eine Studie die die Eignung des ITS zur Unterscheidung der Meliaceae propagiert, wurde von Müllner et al. (2011) veröffentlicht. Die Autoren untersuchten diverse Barcoding Loci (*trnS-G*, *rpoC1*,

*psbB*-T-N, *rpoB*, *accD* und ITS) auf ihre Eignung zur Unterscheidung verschiedener Arten der Meliaceae. Ihr Hauptaugenmerk lag dabei auf den Gattungen *Cedrela* und *Toona*. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass der ITS die beste Eignung für diese Aufgabe aufweist.

Die für die Meliaceae erarbeiteten Sequenzen des ITS ergeben beim Abgleich mit der GenBank des NCBI große Übereinstimmungen mit dort hinterlegten ITS-Sequenzinformationen entsprechender Arten. Dies bezieht sich sowohl auf deren Länge, als auch auf deren Basenabfolge (Müllner et al. 2010; Garcia et al. 2011; Müllner et al. 2011; Duminil et al. 2012; Cavers et al. 2013; Tripathi et al. 2013). Bezüglich der ermittelten Länge des 5.8S von 162 bp (Tabelle 33) ergibt sich für die Meliaceae sowie für alle anderen Familien, dass dieser eine Größe aufweist, die auch in anderen Studien berichtet wurde (Hershkovitz und Lewis 1996; Gernandt und Liston 1999; Liu et al. 2009; Hanssen et al. 2011; Hribova et al. 2011; Hynniewta et al. 2014). Beim Vergleich der ITS-Sequenzen mit der Sequenzdatenbank GenBank wurde zusätzlich deutlich, dass dies nicht für alle Gattungen bzw. Arten möglich war. Betrachtet man die Gattung *Swietenia*, so lagen für *S. humilis* keine ITS-Sequenzen vor. Für *S. macrophylla* und *S. mahagoni* waren lediglich fünf bzw. zwei Sequenzen des ITS in der Sequenzdatenbank hinterlegt. Vergleichbar gering war der ITS auch für die Gattungen *Entandrophragma* und *Khaya* vertreten. Insgesamt lag nur für zwei bzw. drei Individuen eine ITS-Sequenz vor. Im Gegensatz dazu standen für die Gattungen *Carapa*, *Cedrela* und *Toona*, 37, 137 bzw. 26 Sequenzen des ITS zur Verfügung. Die ungleiche Verteilung der in der GenBank hinterlegten ITS-Sequenzen verdeutlicht die Notwendigkeit des Aufbaus einer internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank. Zusätzlich zum Aufbau der internen Datenbank muss ebenfalls der Aufbau der zentralen Sequenzdatenbanken (z. B. die GenBank) stetig vorangetrieben werden. Nur durch die Bereitstellung umfangreicher Datenbanken ist die Barcoding-Identifizierung von geschützten und ungeschützten Tier- und Pflanzenarten möglich.

Die aufgezeigten Sequenzunterschiede des ITS zeigen deutlich, dass sich dieser zur Unterscheidung der verschiedenen Gattungen oder Arten der Meliaceae eignet. Die errechneten interspezifischen Unterschiede liegen in den meisten Fällen über den intraspezifischen (Abbildung 19). Während die intraspezifischen Unterschiede für *C. odorata* und *C. fissilis* bei max. 0,7 bzw. 1,3% liegen, weisen diese Arten interspezifische Unterschiede von 3,2-4,1% auf. Noch deutlicher werden die interspezifischen Unterschiede im Vergleich mit anderen Gattungen. Zur Gattung

*Swietenia* zeigt *Cedrela* Unterschiede in Höhe von 13,2-14,9%. Zusammenfassend ist anzuführen, dass sich für die untersuchten Vertreter der Meliaceae die intraspezifischen Unterschiede auf einem Niveau von 0-1,9% bewegen. Demgegenüber stehen interspezifische Unterschiede innerhalb einer Gattung von 0,6-6,7%. Erweitert man die Betrachtung der interspezifischen Unterschiede auf die Gattungsebene, so ergeben sich Werte von 4,0-15,5%.

Sowohl die interspezifischen Unterschiede zwischen den Arten oder Gattungen, als auch die intraspezifischen Unterschiede, gehen größtenteils auf Sequenzunterschiede innerhalb der variablen Bereiche ITS1 bzw. ITS2 zurück. Im Alignment aus Abbildung 18, in dem alle 70 Individuen der Meliaceae abgebildet sind, wird deutlich, dass im codierenden 5.8S lediglich sechs Positionen (von 162) vorhanden sind, an denen wenigstens eine der Sequenzen eine Abweichung in der Basenabfolge zeigt.

Für die Unterscheidung von *S. humilis* und *S. macrophylla* ist der ITS nicht geeignet. Für diese beiden Arten liegen die intra- und interspezifischen Unterschiede auf demselben Niveau von max. 1%. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Höltnen et al. (2012). Die Autoren untersuchten in ihrer Studie 17 non-coding Regionen der cpDNA, anhand derer verschiedene Vertreter der Meliaceae unterschieden werden sollten. Eines ihrer Ergebnisse war, dass sich keiner der Loci dazu eignete, *S. macrophylla* und *S. humilis* zu unterscheiden. Aufgrund der Gesamtheit der Ergebnisse (vorliegende Arbeit und Höltnen et al. 2012) ist für diese Arten von einem ungeklärten taxonomischen Status auszugehen. Ebenfalls einen ungeklärten taxonomischen Status weist die Art *C. odorata* auf. Müllner et al. veröffentlichten im Jahr 2010 Ergebnisse zur Biogeographie von *Cedrela* in Mittel- und Südamerika. Teil der Resultate war, dass sich hinter *C. odorata* drei biologische Arten verbergen. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen ITS-Sequenzen entsprechen alle dem Typ, der von Müllner et al. (2010) der zentralamerikanischen Art zugeordnet und in der Studie als *C. odorata* s.s. bezeichnet wurde.

Bezüglich der Verwendung des ITS als Marker zur Art-Identifizierung, stellen sich die intraspezifischen Unterschiede als problematisch dar (Ko und Jung 2002; Schmidt und Moreth 2002). Neben diesen intraspezifischen Unterschieden wurde in verschiedenen Untersuchungen auch von intraindividuellen Unterschieden berichtet (Álvarez und Wendel 2003; Campbell et al. 2005; Hanssen et al. 2011), die ebenfalls als Problem angesehen werden können. Diesen Aussagen entgegen stehen die Ergebnisse dieser Arbeit sowie eine Aussage von Hollingsworth (2011), der anführt, dass trotz der

verschiedenen Kopien des ITS stets ein Hauptklon zur Verfügung steht, welcher eine Identifizierung ermöglicht. Zur Untersuchung der Bedeutung der verschiedenen ITS-Kopien wurden die ITS-Regionen der Proben 175 (*Swietenia mahagoni*), 225 (*S. macrophylla*), 226 (*S. macrophylla*) und 235 (*S. humilis*) kloniert (vgl. Punkt 3.2.1.4). Die Klonierung ergab für Probe 175 sechs weitere ITS-Varianten, für Probe 225 vier weitere ITS-Varianten, für Probe 226 fünf weitere ITS-Varianten und für Probe 235 vier weitere ITS-Varianten. Die verschiedenen Varianten weisen intraindividuelle Unterschiede von max. 0,96% auf. Keine der weiteren ITS-Kopien zeigte eine Sequenz, anhand der eine Identifizierung der untersuchten Art nicht möglich gewesen wäre. Neben der Erarbeitung der intraindividuellen Unterschiede erbrachte die Klonierung noch Erkenntnisse zur Differenzierung von *S. macrophylla* und *S. humilis*. Die Arten teilen sich nicht nur denselben Hauptklon, sondern die Klonierung zeigte zusätzlich, dass Varianten des ITS einer Art auch jeweils bei der anderen Art zu finden sind (Tabelle 34).

Aufgrund der erhaltenen Resultate für *S. humilis* und *S. macrophylla* ist für die Gattung *Swietenia* darüber nachzudenken, ob bezüglich dessen taxonomischen Status weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssen oder ob der ITS bzw. die von Höltken et al. (2012) gewählten Marker nicht zur Unterscheidung der beiden Arten ausreichen.

#### **4.2.2 Beurteilung der ITS-Sequenzen der Zygothylaceae und der Bignoniaceae**

Innerhalb der Zygothylaceae bzw. der Bignoniaceae wurden verschiedene Arten der Gattungen *Guaiacum* (CITES II), *Bulnesia* und *Handroanthus* bearbeitet (vgl. Punkt 3.2.2). Die erarbeiteten ITS-Sequenzen wiesen beim Vergleich mit der GenBank große Übereinstimmungen in Länge und Aufbau zu dort hinterlegten ITS-Sequenzen derselben Gattung oder Art auf (Lia et al. 2001; Simpson et al. 2004; Collevatti et al. 2012; Laport et al. 2012; Tripathi et al. 2013). Zum Zeitpunkt der Probenbearbeitung standen für die entsprechenden Gattungen nur wenige bis gar keine Sequenzen in der Genbank des NCBI zur Verfügung. Für die Gattung *Bulnesia* war nur eine und für *H. chrysanthus* keine Sequenz hinterlegt. Lediglich für *H. impetiginosus* (280 ITS-Sequenzen) und für die Gattung *Guaiacum* (28 ITS-Sequenzen) war kurz nach Abschluss der eigenen Untersuchungen ein großer Pool an Vergleichssequenzen zugänglich. Die insgesamt vier Consensus-Sequenzen von *G. sanctum* und *G. officinale* wurden anhand der seit September bzw. November 2013 in der GenBank abgelegten ITS-Sequenzen überprüft (vgl. Punkt 3.2.2). Eine Consensus-Sequenz fasst



vergleichbare ITS-Sequenzen verschiedener Individuen einer Art zusammen. Die erste ITS-Version von *G. sanctum*, Cons.1 (Proben 173, 231, 232, 233, 455 und 469), zeigt Übereinstimmungen mit den GenBank-Sequenzen folgender Accession-Nummern: JX486718.1 und JX486719.1. Cons.2 (Probe 162) gibt die zweite ITS-Version von *G. sanctum* wieder und stimmt mit den GenBank-Sequenzen JX486713.1 und JX486714.1 überein. Vergleicht man Cons.3 (*G. officinale*, Proben 94, 101, 117, 119, 163, 167, 508, 510, 514 und 603) mit der GenBank, so zeigt diese Homologien zu den Sequenzen der Nummern JX901015.1-JX901021 und JX901023.1. Abschließend ist noch Cons.4 (Proben 156, 377, 604 und 605), die die zweite Version von *G. officinale* wiedergibt, zu erwähnen. Diese weist Übereinstimmungen mit den Sequenzen JX901022.1, JX901024.1 und JX901025.1 auf. Diese Homologien der verschiedenen ITS-Versionen mit den GenBank-Sequenzen bestätigen die Existenz von jeweils zwei ITS-Versionen für *G. sanctum* und *G. officinale*. Ob es sich bei den jeweiligen ITS-Versionen einer Art um herkunftsbedingte Sequenzunterschiede handelt, konnte nicht nachvollzogen werden. Für das Probenmaterial aus den Botanischen Gärten war eine Ermittlung der Ursprungsherkunft nicht möglich und für die ITS-Sequenzen der GenBank gab es keine Auskunft über deren mögliche Herkunft.

Trotz der Erarbeitung von je zwei ITS-Versionen für *G. sanctum* und *G. officinale*, welche sich zu 1,5 bzw. 2,3% unterscheiden, ist die Differenzierung der beiden Arten durch die größeren interspezifischen Unterschiede (5,3-6,3%) möglich. Hinsichtlich der Unterscheidung der Gattungen *Guaiacum* und *Bulnesia*, zeigen die errechneten interspezifischen Unterschiede von 12,5-13,3% deutlich, dass der ITS eine Differenzierung dieser beiden Gattungen sicherstellt. Noch deutlicher werden die Sequenzunterschiede beim Vergleich der Individuen der Zygophyllaceae und der Bignoniaceae. So weisen die Gattungen *Guaiacum* und *Handroanthus* Unterschiede von 28,4-29,3% (*Handroanthus* und *Bulnesia* = 28,2-28,4%) auf. Insgesamt verdeutlichen die berechneten Werte, dass mit einem sinkenden Verwandtschaftsgrad, die Sequenzunterschiede der untersuchten Proben größer werden. So steigen für diese Proben die Unterschiede auf Artebene von 5,3-6,3%, auf 28,2-29,3% auf Familienebene an. Diese Tatsache ermöglicht eine klare Differenzierung der CITES-geschützten Hölzer der Gattung *Guaiacum* gegenüber den Substitutionshölzern der Gattungen *Bulnesia* und *Handroanthus*.

#### 4.2.3 Die ITS-Sequenzen der Fabaceae

Die Fabaceae bilden eine der artenreichsten Pflanzenfamilien. Neben der großen Bedeutung für die Nahrungsmittelindustrie, hat auch der Holzhandel ein starkes Interesse an verschiedenen Vertretern dieser Familie (z.B. *Acacia*, *Robinia*, *Dalbergia*, *Hymenaea* und *Intsia*). Insgesamt wurden 73 Individuen, die sich auf neun Gattungen der Unterfamilien Faboideae und Caesalpinioideae verteilen, untersucht (vgl. 3.2.3). Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt anhand der einzelnen CITES-Hölzer in Kombination mit deren Substitutionsarten (Tabelle 5).

Für die untersuchten Individuen der Gattung *Intsia* (CITES-Schutz beantragt) und deren Austauschhölzer war ein Abgleich der Ergebnisse nur schwer möglich (vgl. Punkt 3.2.3.1). So standen für die Gattungen *Intsia* und *Afzelia* keinerlei ITS-Sequenzen innerhalb der GenBank des NCBI zur Verfügung. Lediglich für *Hymenaea courbaril* waren zwei ITS-Sequenzen in der Sequenzdatenbank GenBank hinterlegt (GenBank-Nr. FJ009817.1 (Conceicao et al. 2009) und AY955800.1 (Fougere-Danezan et al. 2007)). Der Vergleich der erstellten ITS-Sequenzen von *H. courbaril* (Proben 86, 170, 201-203, 438 und 515) mit den ITS-Sequenzen FJ009817.1 und AY955800.1, zeigte überwiegend klare Übereinstimmungen in Länge und Basenabfolge (98-99% Homologie). Lediglich die geringe Homologie (86-92%) der Proben 86 und 170 lässt die Überlegung zu, dass dies nicht Individuen der Art *H. courbaril* sind. Wahrscheinlicher ist, dass es sich bei diesen Individuen um eine andere Art der Gattung *Hymenaea* handelt. Die Homologien zu weiteren Vertretern des Tribus Detarieae erreichten Werte von 79-85% (*Guibourtia*, *Microberlinia*, *Eurypetalum* und *Peltogyne*). Trotz der aufgetretenen Unsicherheiten hinsichtlich der wahrscheinlich falsch bestimmten Individuen von *H. courbaril* wird deutlich, dass die ermittelten interspezifischen Unterschiede eindeutig ausreichen, um die verschiedenen Arten dieser Gruppe voneinander zu unterscheiden. So zeigen *I. palembanica* und *I. bijuga* interspezifische Unterschiede von 2,7-3,3%, während die Unterschiede zu den Gattungen *Hymenaea* und *Afzelia* sogar ~17,5 bzw. ~11% betragen.

Eine weitere Gruppe innerhalb der Fabaceae wurde durch die Gattung *Dalbergia* und *Machaerium scleroxylon* gebildet (vgl. Punkt 3.2.3.2). Zum Zeitpunkt der durchgeführten Untersuchungen waren in der GenBank des NCBI 66 bzw. 18 ITS-Sequenzen hinterlegt (Lavin et al. 2000; Ribeiro et al. 2007; Lage Novaes et al. 2013; Tripathi et al. 2013). Vergleicht man die ITS-Sequenzen dieser Arbeit mit denen der GenBank, so wird für Probe 142 (*D. miscolobium*) deutlich, dass diese zu den 30

GenBank-Sequenzen von *D. miscolobium* eine maximale Homologie von 90% aufweist. Die höchste Übereinstimmung (99%) zeigt Probe 142 zu *D. melanoxydon*. Diese hohe Homologie zwischen den Sequenzen von *D. miscolobium* und *D. melanoxydon* ist auch in der internen Datenbank zu beobachten (vgl. Probe 142 mit Probe 378). Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei Probe 142 um *D. melanoxydon* handelt. Beurteilt man die Eignung des ITS, die einzelnen Arten der hier untersuchten Gattungen (*Dalbergia* und *Machaerium*) zu unterscheiden, so ergibt sich, dass der ITS dafür klar geeignet ist. So liegen z.B. für *Dalbergia* die intraspezifischen Werte von max. 1,2% deutlich unter den interspezifischen Unterschieden dieser Gattung (6,1-11,5%).

Auch die Ergebnisse für die Gattung *Caesalpinia* und *Myrocarpus frondosus* indizieren, dass die Sequenzunterschiede der ITS-Bereiche ausreichen, um zwischen den verschiedenen Arten zu differenzieren (vgl. Punkt 3.2.3.3). Für die untersuchten Individuen bzw. Arten wurden minimale intraspezifische Unterschiede (0,4%) ermittelt, denen interspezifische Unterschiede von 11,4-23,9% gegenüberstehen. Ein Vergleich der Sequenzen mit den ITS-Sequenzen der GenBank des NCBI, war nur auf Gattungsebene und das auch nur für *Caesalpinia* möglich. Resultat war, dass die hinterlegten Sequenzen in ihrer Länge und deren Basenabfolge (Homologie 83-86%) vergleichbar mit denen der eigenen Datenbank sind (Simpson et al. 2006; Chen et al. 2010; Tripathi et al. 2013).

Innerhalb der *Pterocarpus*-Gruppe wurden *P. santalinus* (CITES Anhang II) und die Austauschhölzer *P. indicus*, *P. soyauxii* sowie *P. macrocarpus* untersucht (vgl. Punkt 3.2.3.4). Diese Gruppe ist die einzige, in der nicht alle Individuen erfolgreich sequenziert werden konnten. Es trat zwar ein 100%iger PCR-Erfolg auf, jedoch schlug die Sequenzierung des ITS1 für beide Individuen von *P. soyauxii* (378 und 379) fehl. Für die verbleibenden Proben der Gattung *Pterocarpus* wurde der komplette ITS-Bereich erarbeitet. Von Schwierigkeiten bei der Verwendung des ITS1 wurde ebenfalls in anderen Studien berichtet (Kress und Erickson 2007; Chen et al. 2010). Diese Studien beschreiben jedoch einen geringen PCR-Erfolg, welcher aber in diesem Fall nicht vorlag. Bei dem verwendeten Ausgangsmaterial für die Proben 378 und 379 handelte es sich um DNA-Eluate, die von Kew Gardens zur Verfügung gestellt wurden. Laut Begleitinformation wurde darauf hingewiesen, dass die DNA dieser Proben bereits stark degradiert war. Es ist zu verneinen, dass dies einen Einfluss auf die Sequenzierung hatte. Zum einen konnte der ITS2, der ca. 30 bp länger ist als der ITS1, sauber sequenziert werden und zum anderen waren weitere Proben von Kew Gardens

(*P. santalinus* = 636 und 637; *P. indicus* = 640-642) ebenfalls stark degradiert, ließen sich aber trotzdem zuverlässig bearbeiten.

Ein Vergleich der ITS-Sequenzen von *Pterocarpus* mit den ITS-Sequenzen der GenBank des NCBI war überwiegend nur für den ITS2-Bereich möglich. Zwar lagen für *Pterocarpus* 79 ITS-Sequenzen in der GenBank vor, jedoch betrafen 75 dieser Sequenzen nur den ITS2-Bereich. Hinterlegt wurden diese Sequenzen im Rahmen einer phylogenetischen Studie, für die der ITS2 eine gute Eignung aufweist (Lavin et al. 2001; Ribeiro et al. 2007; Saslis-Lagoudakis et al. 2008; Pirie et al. 2009; Saslis-Lagoudakis et al. 2011). Der Vergleich der ITS-Sequenzen ergab für nahezu alle Individuen eine Homologie von 99-100% (Lavin et al. 2001; Ribeiro et al. 2007; Saslis-Lagoudakis et al. 2011; Klitgard et al. 2013). Wie schon bei den anderen Vertretern der Fabaceae nachgewiesen wurde, ist auch bei den *Pterocarpus*-Arten eine Differenzierung auf Basis des ITS durchführbar. So stehen 3,1-6,4% interspezifische Unterschiede gegen max. 0,5% intraspezifische Unterschiede. Lediglich die eng verwandten Arten *P. indicus* und *P. macrocarpus*, die nur sehr schwer anhand von morphologischen Merkmalen voneinander zu unterscheiden sind (Francis 2002), können mittels des ITS nicht differenziert werden. Hier liegen die Unterschiede bei 0,8%. Ein vergleichbares Ergebnis ist auch unter Berücksichtigung der GenBank-Sequenzen von *P. indicus* (AF269177.1, JN083482.1, JN083481.1 und JN083480.1) und *P. macrocarpus* (AF269176.1 und JN083487.1) zu beobachten. Bis auf AF269176.1 (ITS-Bereich von *P. macrocarpus*) repräsentieren diese angeführten GenBank-Sequenzen den ITS2-Bereich, welcher keine Differenzierung der beiden Arten ermöglicht. Beim Vergleich der ITS-Sequenzen von Probe 462 (*P. macrocarpus*) und AF269176.1 (ITS-Bereich von *P. macrocarpus*) wird deutlich, dass diese zu 8,8% voneinander abweichen. Diese Unterschiede (in der Hauptsache ein Indel von 25 bp) liegen nahezu ausschließlich im ITS1 und würden eine Differenzierung von *P. macrocarpus* und *P. indicus* zulassen. Eine Klärung der Frage, welcher ITS von *P. macrocarpus*, der selbst erarbeitete oder der in der GenBank hinterlegte, die Art repräsentiert, war nicht möglich. Eine wiederholte DNA-Extraktion sowie Sequenzierung von *P. macrocarpus* (Probe 462, Frischmaterial aus Botanischem Garten), bestätigte die erarbeitete ITS-Sequenz. Ob sich der ITS zur Differenzierung von *P. indicus* und *P. macrocarpus* eignet, muss in weiteren Untersuchungen herausgearbeitet werden.

Für das CITES geschützte Holz *Dipteryx panamensis* und dessen Substitutionsholz

*Dipteryx odorata* stand kein Untersuchungsmaterial zur Verfügung (vgl. Punkt 3.2.3.5). Lediglich das Austauschholz *Bowdichia nitida* konnte anhand einer Probe untersucht werden. Die erarbeitete ITS-Sequenz wies laut GenBank des NCBI eine 99-100%ige Homologie zu dort hinterlegten ITS-Sequenzen von *B. nitida* auf. Allerdings bestand ebenfalls eine 99%ige Homologie zu ITS-Sequenzen von *B. virgilioides* (Edwards und Hawkins 2007; Cardoso et al. 2012). Aufgrund der vorliegenden Daten ist nicht nachzuvollziehen, ob der ITS für eine Unterscheidung dieser beiden Arten ungeeignet ist oder ob es sich um ein und dieselbe Art handelt.

#### **4.2.4 Ramin und dessen Austauschhölzer**

In Anbetracht des starken illegalen Handels und der voranschreitenden Lebensraumzerstörung ist die Gattung *Gonystylus* (Ramin, Thymelaeaceae) seit dem Jahr 2005 durch den CITES Anhang II geschützt. Diese Gattung und die Substitutionshölzer der Gattungen *Endospermum* (Euphorbiaceae), *Neolamarckia* (Rubiaceae) und *Terminalia* (Combretaceae) bilden eine weitere Gruppe beim Aufbau einer internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank (vgl. Punkt 3.2.5). Die Ramin-Gruppe war nicht nur in Bezug auf die verschiedenen Familien sehr abwechslungsreich, sondern auch für das Ausgangsmaterial war eine große Vielfalt zu verzeichnen. Neben Blättern, Ästen und DNA, stand in dieser Gruppe auch länger gelagertes Splintholz zur Verfügung (Tabelle 6). Durch die Verwendung der entwickelten DNA-Extraktionsmethode (vgl. Punkt 3.1.3.4) konnte aus diesem älteren Splintholzmaterial erfolgreich DNA extrahiert werden. Die Amplifizierung der ITS-Teilbereiche erfolgte für die Splintholzproben mit dem KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit (vgl. Punkt 2.2.3.2). Die Kombination der entwickelten DNA-Isolierung mit dem KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kit ermöglichte einen 100%igen PCR-Erfolg. Ein vergleichbares Ergebnis hinsichtlich eines 100%igen PCR-Erfolgs bei der Verwendung von altem Splintholz als Ausgangsmaterial erzielten auch Tnah et al. (2012). In ihren Untersuchungen zum PCR-Erfolg von nukleärer und plastidärer DNA unterschiedlichen Alters, wies nach einer einjährigen Lagerung des Holzes nur noch die nukleäre DNA des Splintholzes einen 100%igen PCR-Erfolg auf.

Wie zu erwarten, wurden für den ITS starke interspezifische Unterschiede (~25,5-35%) zwischen den verschiedenen Familien errechnet. Aber auch innerhalb einer Familie bzw. der Gattungen *Gonystylus* und *Terminalia* weisen die ITS-Sequenzen ausreichend interspezifische Unterschiede auf (1,4-9,2%), um eine Identifizierung zu ermöglichen.

Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit den ITS-Sequenzen der GenBank des NCBI konnte nur für *N. cadamba* (vier Sequenzen in der GenBank) sowie für die Gattung *Terminalia* (56 Sequenzen in der GenBank) vorgenommen werden. Für die ITS-Sequenz von *N. cadamba* (Probe 635) wurde eine 97%ige Homologie zu Sequenzen derselben Art errechnet (Razafimandimbison und Bremer 2002; Tripathi et al. 2013; Lofstrand et al. 2014). Für die Gattung *Terminalia* lagen die Homologien bei  $\leq 99\%$  (Chen et al. 2010; Maurin et al. 2010; Tripathi et al. 2013). In Hinblick auf die identischen Sequenzen von *T. avicennioides* und *T. glaucescens* erbrachte auch der Vergleich mit der GenBank des NCBI keine neuen Erkenntnisse. Es müssen daher noch weitere Untersuchungen folgen, um festzustellen, ob es sich bei einer Probe um eine Fehlbestimmung handelt oder ob der ITS nicht ausreicht, um diese Arten zu unterscheiden. Weitere Untersuchungen sind auch in der Gattung *Gonystylus* notwendig. Für diese Gattung wurden bei dem eingesetzten Splintholzmaterial zwei verschiedene Arten (Art1 und Art2, vgl. Punkt 3.2.5) herausgearbeitet. Es war aber lediglich für Art1 möglich, diese genauer als *Gonystylus bancanus* zu bestimmen. Art2 konnte zwar eindeutig als Vertreter der Gattung *Gonystylus* identifiziert werden, doch aufgrund fehlender Vergleichssequenzen war eine weiterführende Bestimmung nicht möglich. Die mikroskopischen Untersuchungen der Splintholzproben erbrachten ebenfalls keine genaueren Ergebnisse, da für Ramin mit dieser Methode nur eine Bestimmung bis auf Gattungsebene möglich ist (Gasson 2011). Zwar wurde für Art2 durch die mikroskopischen Untersuchungen bestätigt, dass es sich hierbei um die Gattung *Gonystylus* handelt, doch für den weiteren Aufbau der internen ITS-Sequenzdatenbank ist die genaue Identifizierung der Art unabdingbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine interne rDNA ITS-Sequenzdatenbank aufgebaut, die 211 Individuen, aufgeteilt auf 53 Arten, 23 Gattungen und 9 Familien, beinhaltet. Der Einsatz der „holzspezifischen“ Primer erwies sich in diesem Zusammenhang als besonders vorteilhaft, da hierdurch die Amplifikation von Pilz-DNA vermieden werden konnte. Es besteht somit eine Methode, die es ermöglicht, den Aufbau einer rDNA ITS-Sequenzdatenbank schnell und kostengünstig zu realisieren. Die für den ITS erhaltenen Ergebnisse, in Bezug dessen Einsatz zur Unterscheidung von CITES-geschützten Holzarten und deren Substitutionshölzern, zeigen deutlich, dass sich dieser hierfür besonders eignet. Unter Verwendung der variablen Bereiche ITS1 und ITS2 wird eine Identifizierung bis auf Artebene ermöglicht.

### 4.3 Entwicklung und Verwendung spezifischer Primer

Für eine schnelle sowie kostengünstige Identifizierung von CITES-geschützten Holzarten und deren Substitutionshölzern wurden in dieser Arbeit spezifische Primer gewählt (vgl. Punkt 3.3). Spezifische Primer, auch Taxonprimer genannt, sind Oligonukleotide, die nur in Anwesenheit der DNA ihrer Zielart eine Amplifikation ermöglichen. So ist es bereits nach der Gelelektrophorese möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob es sich um die vermutete Art handelt. Die Identifizierung einer Probe erfolgt über die Anwesenheit eines Amplicons, das weiterhin eine definierte Länge aufweisen muss (Wallinger et al. 2012). Die Tatsache, dass für ein spezifisches Amplicon eine definierte Länge existiert, stellt eine weitere Absicherung der zu erhaltenen Information dar. Sollte ein Primerpaar doch einmal eine Fehlbindung aufweisen, so wird dies voraussichtlich über die falsche Länge des DNA-Fragments nachgewiesen. In der Regel wird für die Identifizierung ein spezifisches Primerpaar, bestehend aus forward- und reverse-Primer, verwendet. Es ist aber auch möglich, einen spezifischen Primer mit einem allgemeinen Primer zu kombinieren. Durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide zur Bestimmung einer Holzart, ist eine zeitaufwendige und kostenintensive Sequenzierung der DNA nicht mehr von Nöten.

Die Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden zur Identifizierung verschiedenster Organismen wird seit Jahren erfolgreich angewendet. So wurden z.B. bereits diverse Primer im ITS entwickelt, die die Bestimmung von Pilzen ermöglichen. Spezifische Primer dienen aber nicht nur der Identifizierung von Gattungen oder Arten, sondern sie ermöglichen ebenfalls eine Differenzierung von Pilzen und Pflanzen (Gardes und Bruns 1993; Moreth und Schmidt 2000; Takamatsu und Kano 2001; Amicucci et al. 2002; Kendall und Rygielwicz 2005; Horisawa et al. 2009; Hanssen et al. 2011). Neben dem Reich der Pilze werden ITS-Taxonprimer auch bei Tieren und Pflanzen verwendet. Während für das Tierreich eine Studie von Magnussen et al. (2007) zu erwähnen ist, muss für das Pflanzenreich besonders eine Veröffentlichung von Hanssen et al. (2011) angeführt werden. Für diese Studie wurden spezifische Primer zur Identifizierung von *Fitzroya*, *Sequoia* und *Thuja* entwickelt. Wie schon in der Einleitung angeführt (vgl. Punkt 1.5.2.2), haben neben dem ITS auch verschiedene Marker der cpDNA eine wichtige Bedeutung für die Identifizierung von Landpflanzen. So entwickelten Wallinger et al. (2012) ein Primerset in der *trnT-F* Region, mit dem es möglich ist, zwei Familien, zwei Gattungen und neun Arten zu bestimmen. Aufgrund der teilweise geringen Sequenzunterschiede der cp-Marker finden bei der Schnellbestimmung von

Pflanzenarten, hier neben den spezifischen Oligonukleotiden, auch Restriktionsenzyme Einsatz (Höltken et al. 2012).

Unter Zuhilfenahme der aufgebauten rDNA ITS-Sequenzdatenbank (vgl. Punkt 3.2) sowie der GenBank des NCBI wurden 29 spezifische Primerpaare erarbeitet (vgl. Punkt 3.3.2). Für die CITES-Arten liegen für folgende Hölzer gattungs- und/oder artspezifische Primer vor: *Swietenia macrophylla*, *S. humilis*, *S. mahagoni*, *Cedrela odorata*, *C. fissilis*, *Guaiacum sanctum*, *G. officinale*, *Dalbergia nigra*, *D. retusa* und *Caesalpinia echinata*. Da für *Intsia bijuga* und *I. palembanica* bereits ein Antrag zur Aufnahme in den CITES-Katalog gestellt wurde, wurde für diese Hölzer ebenfalls ein Primerpaar entwickelt. Darüber hinaus stehen nach Abschluss der Untersuchungen für folgende Substitutionshölzer art- oder gattungsspezifische Primer zur Verfügung: *Entandrophragma cylindricum*, *E. angolense*, *Khaya*, *Carapa*, *Bulnesia*, *Handroanthus*, *Afzelia*, *Hymenaea courbaril*, *Dalbergia latifolia*, *D. spruceana*, *D. sissoo*, *Machaerium scleroxylon*, *Caesalpinia ferrea*, *Myrocarpus*, *Bowdichia*, *Endospermum* und *Neolamarckia* (Tabelle 49). Durch das Fehlen von entsprechendem Probenmaterial bzw. nicht ausreichenden Sequenzinformationen, konnten für die Gattungen *Pterocarpus*, *Caryocar* und *Dipteryx* keine spezifischen Primer bereitgestellt werden.



Tabelle 49: Aufstellung der Arten oder Gattungen, für die entsprechende Primer zur Identifizierung vorliegen. Den CITES-Hölzern (linke Seite) sind die entsprechenden Substitutionshölzer gegenübergestellt (rechte Seite). \* = Die gesamte *Dalbergia*-Population Madagaskars ist derzeit durch CITES-Anhang II geschützt.<sup>1</sup> = Es steht ebenfalls ein Gattungsprimerpaar zur Verfügung.

CITES-Holz		Substitutionsholz
Art	Anhang	Gattung oder Art
<i>Caesalpinia echinata</i>	II	<i>Caesalpinia ferrea</i> <i>Myrocarpus</i> spp.
<i>Cedrela odorata</i> <i>Cedrela fissilis</i>	III	-
<i>Dalbergia nigra</i> *	I	<i>Dalbergia spruceana</i> * <i>Dalbergia latifolia</i> *
<i>Dalbergia retusa</i> *	II	<i>Dalbergia sissoo</i> * <i>Machaerium scleroxylon</i>
(Ramin-Gruppe)	II	<i>Endospermum</i> spp. <i>Neolamarckia</i> spp.
<i>Guaiacum officinale</i> <sup>1</sup> <i>Guaiacum sanctum</i> <sup>1</sup>	II	<i>Bulnesia</i> spp. <i>Handroanthus</i> spp.
<i>Intsia bijuga</i> <i>Intsia palembanica</i>	Antrag gestellt	<i>Azelia</i> spp. <i>Hymenaea courbaril</i>
<i>Swietenia humilis</i> <i>Swietenia macrophylla</i> <i>Swietenia mahagoni</i>	II	<i>Entandrophragma angolense</i> <i>Entandrophragma cylindricum</i> <i>Carapa</i> spp. <i>Khaya</i> spp.
(Dipteryx-Gruppe)	III	<i>Bowdichia</i> spp.

Wie bereits angeführt, stellen die entwickelten Oligonukleotide sogenannte Art- oder Gattungsprimer dar. Während Artprimer eine Bestimmung bis auf Artebene ermöglichen, wird eine Probe durch die Verwendung der Gattungsprimer nur als ein Vertreter einer bestimmten Gattung identifiziert. Gattungsspezifische Primer wurden in den Fällen gewählt, in denen nicht ausreichend ITS-Informationen zur Erstellung von artspezifischen Primern zur Verfügung standen oder wenn die Bestimmung der Gattung ausreicht. Letzteres ist der Fall, wenn die gesamte Gattung durch einen CITES Anhang geschützt ist oder die entsprechende Gattung nur Austauschhölzer aufweist. Die Möglichkeit, neben artspezifischen Primern auch gattungsspezifische zu verwenden, wird durch Studien von Hanssen et al. (2011) und Wallinger et al. (2012) bestätigt.

Für die Entwicklung aller art- oder gattungsspezifischen Primer wurden die variablen Bereiche ITS1 und ITS2 gewählt. In der Regel liegt der forward-Primer im ITS1 und der reverse-Primer im ITS2. In wenigen Fällen liegen beide Primer in nur einem der variablen Bereiche (z.B. für *Khaya* und *Carapa*). Neben der Verwendung einer Kombination aus spezifischen forward- und reverse-Primern, wurden ebenfalls

Kombinationen aus einem art- oder gattungsspezifischen Primer (forward-Primer) und den „holzspezifischen“ Primern ITS2.1 bzw. ITS4 (reverse-Primer) verwendet (*Guaiacum sanctum*, *Cedrela odorata* und *C. fissilis*). Diese letzteren Kombinationen zeigten dieselbe Spezifität, wie die Verwendung von zwei Art- oder Gattungsprimern. Studien von Moreth und Schmidt (2000) bzw. Horisawa et al. (2009), die sich beide mit der molekularbiologischen Identifizierung von Holzfäulepilzen beschäftigten, kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Kombination von spezifischen und allgemeinen Primern ausreicht, um Amplifikationen mit hoher Spezifität durchzuführen. In dieser Arbeit, wie auch in diversen anderen Studien (Magnussen et al. 2007; Ogden et al. 2008; Horisawa et al. 2009; Hanssen et al. 2011; Wallinger et al. 2012), wurde die Spezifität durch mehrere Kreuztests nachgewiesen (vgl. Punkt 3.3.1). Keines der vorgestellten Primerpaare wies hierbei eine Fehlbindung auf. Es wurde somit gezeigt, dass die verwendeten Oligonukleotidpaare nur die ihnen zugeordnete Art oder Gattung amplifizieren und hierdurch eine zuverlässige Identifizierung ermöglichen.

Zusätzlich zur DNA-Extraktion stellt der Einsatz der „holzspezifischen“ Primerpaare (vgl. Punkt 2.2.3.3) einen wichtigen Arbeitsschritt vor der endgültigen Identifizierung der Holzart dar. Durch die Verwendung der allgemeinen Primer wird sichergestellt, dass das DNA-Template, welches in der PCR zur Identifizierung der Probe eingesetzt wird, die ideale Quantität und Qualität aufweist. Der Einsatz von anderen allgemeinen ITS-Primerpaaren (wie z.B. ITS1/ITS4 von White et al. (1990)) bietet sich in diesem Fall nicht an, da eventuell nur die DNA des im Holz befindlichen Pilzes amplifiziert werden würde (Zhang et al. 1997). Neben der Tatsache, dass durch die „Holz-Primer“ keine Pilz-DNA amplifiziert wird, weisen diese Primerpaare eine weitere wichtige Eigenschaft auf. Es handelt sich hierbei um deren hervorragende allgemeine Eigenschaft bei der Amplifizierung des ITS-Bereichs der untersuchten Holzarten. Ausgedrückt wird dies durch einen 100%igen PCR-Erfolg. Die in verschiedenen Studien berichteten geringen PCR-Erfolge für den ITS konnten somit nicht beobachtet werden (Kress et al. 2005; Kress und Erickson 2007; Gonzalez et al. 2009; Chen et al. 2010).

Ein weiterer Vorteil der „holzspezifischen“ Primer besteht darin, dass im Falle geringer DNA-Ausgangskonzentrationen, die Durchführung einer Nested-PCR möglich ist (vgl. Punkt 2.2.3.4). Eine Nested-PCR bietet die Chance des Einsatzes geringster DNA-Mengen zur Identifizierung einer Probe (Dumolin-Lapègue et al. 1999; Höltnen et al. 2012). Die Kombination der allgemeinen „holzspezifischen“ Primerpaare mit den

art- oder gattungsspezifischen Primern ist aber nur dann möglich, wenn die forward- und reverse-Primer der Art- oder Gattungskombination im selben variablen Bereich des ITS liegen, welcher durch die allgemeinen Primer amplifiziert wird. Ein konkretes Beispiel ist die Kombination der allgemeinen ITS1-Primer mit den spezifischen Primerpaaren der Gattungen *Khaya* und *Carapa*. Befinden sich die forward- und reverse-Primer der art- oder gattungsspezifischen Primerpaare jedoch im ITS1 und im ITS2, so muss in der vorhergehenden PCR die allgemeine Primerkombination ITS1.1/ITS4 zur Anwendung kommen.

Bisher wurde nur die Option angesprochen, die verschiedenen PCRs zur Identifizierung („Holz-PCR“ und „Identifizierungs-PCRs“) nacheinander auszuführen. Es besteht aber auch die Alternative, sogenannte Multiplex-PCRs durchzuführen (Amicucci et al. 2002; Magnussen et al. 2007). Bei sogenannten Multiplex-PCRs werden statt eines Primerpaars, gleich mehrere Primerpaare gleichzeitig eingesetzt. Dies bietet im Fall der Identifizierung die Möglichkeit, die „Holz-Primer“ mit mehreren art- oder gattungsspezifischen Primerpaaren zu kombinieren. Diese Zusammenfassung mehrerer PCRs bewirkt eine nicht unerhebliche Zeitersparnis. Im Anschluss an die PCR gibt ein spezifisches Bandenmuster darüber Auskunft, welche Holzart vorliegt. Die Anwendung der Multiplex-PCR wurde im Laufe der Untersuchungen ebenfalls berücksichtigt (Daten nicht gezeigt) und erwies sich als aussichtsreich.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Verwendung von spezifischen Primern nicht nur eine zuverlässige Bestimmungsmöglichkeit von unbekannten Proben darstellt, sondern zusätzlich, dass diese schnell und kostengünstig durchführbar ist.

#### **4.4 Validierungen des entwickelten Schnelltests**

Mithilfe der Entwicklung einer DNA-Extraktionsmethode, dem Aufbau einer rDNA ITS-Sequenzdatenbank sowie der Erstellung von spezifischen Primern wurde in dieser Arbeit ein Schnelltest zur Identifizierung von CITES-geschützten Holzarten und deren Substitutionshölzern entwickelt. Der Schnelltest (vgl. Abbildung 31) beinhaltet die folgenden Arbeitsschritte. (1) DNA-Extraktion unter Verwendung des modifizierten DNeasy<sup>®</sup> mericon<sup>™</sup> Food Kits (Punkt 2.2.1.2.8). (2) Amplifizierung eines Teilbereichs des ITS mithilfe der „holzspezifischen“ Primer (Punkt 2.2.3.3). Verwendung des KAPA2G<sup>™</sup> Robust Hot Start PCR Kits (Punkt 2.2.3.2). (3) Identifizierung der Art oder Gattung unter Zuhilfenahme der spezifischen Primer (Punkt 3.3.2). Verwendung des

KAPA2G™ Robust Hot Start PCR Kits (Punkt 2.2.3.2).

Zur Validierung der entwickelten Methode wurden zwei Blindtests (vgl. Punkt 3.4.1 bzw. 3.4.2) mit insgesamt 61 Proben und eine Überprüfung der DNA-Extraktionsmethode (vgl. Punkt 3.4.3) durchgeführt. Der erste Blindtest (3.4.1) erfolgte anhand von 60 Proben, die auf einem Rundholzplatz in Indonesien gesammelt wurden. Für diese Proben wurde überprüft, bei welchen es sich um Vertreter der Gattung *Gonystylus* (CITES Anhang II) handelt. Zum Abgleich der Ergebnisse wurden die Proben ebenfalls anhand anatomischer Merkmale von Herrn PD Dr. Gerald Koch bestimmt. Durch die Verwendung des DNA-Extraktionsprotokolls der modifizierten *mericon*™-Extraktion (vgl. Punkt 2.2.1.2.8) wurde, trotz problematischen Ausgangsmaterials, aus allen Proben Holz-DNA in ausreichender Qualität und Quantität isoliert. Die Probleme beim Ausgangsmaterial lagen darin, dass dieses schon eine Lagerdauer von über einem Jahr zu verzeichnen hatte und dass hierdurch die Degradation der DNA bereits stark vorangeschritten war (Yoshida et al. 2006; Jiao et al. 2012; Tnah et al. 2012). Des Weiteren unterlagen die Proben Einflüssen wie UV-Licht und Mikroorganismen, die sich ebenfalls negativ auf die Qualität und Quantität der DNA auswirken (Murmanis et al. 1987; Lindahl 1993; Cano 1996). UV-Licht war in diesem Fall ein besonderes Problem, da die Proben nur von den Stammaußenseiten entnommen wurden. Hinsichtlich der Mikroorganismen ist anzuführen, dass das tropische Klima des anfänglichen Lagerplatzes (Rundholzplatz des Papierwerks) den Befall und das Wachstum von Pilzen und Bakterien stark unterstützte. Hier ist insbesondere der schnelle Befall von Ramin mit Bläuepilzen zu erwähnen. Da die Probennahme unter der Prämisse durchgeführt wurde, illegal geschlagenes Ramin nachzuweisen, sind vornehmlich Stämme mit Bläuebefall beprobt worden. Nach der Probennahme wurden die Holzstückchen weiterhin unter idealen Bedingungen für das Pilzwachstum gelagert (Plastiktüte). Hierdurch ergab sich, dass die Proben zum Zeitpunkt der Verarbeitung bereits stark verpilzt waren.

Der Nachweis, bei welchen der 60 Proben es sich um Ramin handelte, wurde anhand von spezifischen Primern erbracht (vgl. Punkt 4.3). Spezifische Primer wurden bereits in verschiedenen Studien, teilweise für CITES-Arten, erfolgreich zur Bestimmung eingesetzt (Moreth und Schmidt 2000; Magnussen et al. 2007; Hanssen et al. 2011). Der Einsatz der Ramin-Gattungsprimer identifizierte 42 der 60 Proben als Vertreter der Gattung *Gonystylus* (Schwartz 2012). Zum selben Ergebnis kamen auch die anatomischen Untersuchungen, für die zu erwähnen ist, dass sie ebenfalls nur eine

Identifizierung bis auf Gattungsebene ermöglichen (Gasson 2011). Dass für Ramin derzeit nur eine Identifizierung bis auf Gattungsebene möglich ist, stellt für den CITES-Vollzug keine Schwierigkeiten dar, da derzeit alle *Gonystylus*-Arten den gleichen Schutzstatus aufweisen. Ein Vorteil der genetischen Untersuchungen ist in diesem Fall, dass durch die zusätzlich durchgeführte Sequenzierung zwei verschiedene *Gonystylus*-Arten, welche sich zu 2,5-2,6% in der Basenabfolge unterscheiden, nachgewiesen werden konnten (vgl. Art1 (*Gonystylus bancanus*) und Art2 aus Punkt 3.2.5 bzw. 3.4.1). Sollten in naher Zukunft ausführlichere ITS-Sequenzinformationen für die Gattung *Gonystylus* zur Verfügung stehen, so können auch für Art2 genauere Aussagen darüber getroffen werden, um welche Art es sich hierbei handelt. Darüber hinaus wäre die Erstellung von artspezifischen Primern möglich.

Für die Identifizierung der 18 Proben, bei denen es sich nicht um Ramin handelte, wurde der ITS-Bereich erarbeitet und anschließend ein Abgleich der Sequenzen mit der eigenen und der Sequenzdatenbank GenBank des NCBI durchgeführt. Lediglich die Proben Bt22-24 konnten angesichts einer Kontamination nicht abschließend bestimmt werden. Durch diese Kontamination wird deutlich, dass bei der DNA-Isolierung aus Holz strengstens auf Sauberkeit zu achten ist (Deguilloux et al. 2002). Für alle weiteren Proben ermöglichte der Vergleich der Sequenzen mit der GenBank des NCBI eine Einteilung auf Familienebene. Dass für die unbekannten Arten nur die Familie bestimmt werden konnte, liegt nicht an der mangelnden Eignung des ITS, sondern an der geringen Anzahl der in der GenBank hinterlegten ITS-Sequenzen. Um eine Bestimmung solcher Proben zu gewährleisten, muss sich in den folgenden Jahren auf Marker zur Identifizierung von Pflanzen geeinigt und für diese der Ausbau der Datenbanken konsequent vorangetrieben werden (Chen und Filippis 1996; Deguilloux et al. 2002). Der Vergleich der Ergebnisse der genetischen und der anatomischen Untersuchungen zeigte, dass die Einteilung der Proben in die jeweiligen Familien richtig erfolgte. Durch die lange Anwendung der klassischen Methoden zur Bestimmung von Holzarten und den damit einhergehenden Aufbau entsprechender Vergleichssammlungen, konnten die verbleibenden 18 Proben mindestens bis auf Gattungsebene bestimmt werden. Durch diese Bestimmung stehen der internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank weitere Sequenzen zum Ausbau der Datenbank zur Verfügung (z.B. *Madhuca* spec., *Palaquium* spec., *Shorea* spec. und *Tetramerista glabra*). Bezüglich der parallelen Anwendung der klassischen Identifizierungsmethode und der Verwendung der neueren molekularbiologischen Methode ergibt sich, dass sich diese beiden Methoden

hervorragend ergänzen. So profitiert z.B. die genetische Methode von den bereits existierenden und sehr umfangreichen Vergleichssammlungen der klassischen Methode. Auch die klassische Methode profitiert stark von der genetischen Methode. Dies liegt nicht nur in der Tatsache begründet, dass die Genetik eine Bestimmung bis auf Artebene ermöglicht, sondern auch, dass alternative Materialien, wie Bast (Probe Bt9 aus Punkt 3.4.1), zur Bestimmung eingesetzt werden können.

Ein zweiter Blindtest (3.4.2) erfolgte anhand einer Probe, für die bestimmt werden sollte, um welchen Vertreter der Meliaceae es sich hierbei handelt. Die Probe wurde dem Kernholz einer vom Zoll beschlagnahmten Holzbohle entnommen. Über die Lagerdauer des Holzes oder ob dieses bereits technischen Prozessen, die die Qualität und Quantität der DNA ebenfalls negativ beeinflussen (Deguilloux et al. 2002; Yoshida et al. 2007; Tnah et al. 2012), unterlag, wurden keine Informationen bereitgestellt. Trotz dieser eventuellen negativen Einflüsse und weiteren störenden Faktoren wie z.B. Inhibitoren, konnte mit der modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion und dem Invisorb<sup>®</sup> DNA CleanUp Kit (vgl. Punkt 2.2.1.3) DNA in ausreichender Qualität und Quantität isoliert werden. Die DNA der Probe wurde unter Einsatz der verschiedenen spezifischen Primerpaare der Meliaceae amplifiziert und das Holz hierdurch als *Swietenia macrophylla* bzw. *S. humilis* identifiziert. Eine Unterscheidung dieser beiden Arten ist anhand des ITS nicht möglich. Untersuchungen von Höltnen et al. (2012) ergaben, dass ebenfalls die Verwendung verschiedenster Loci der cpDNA nicht ausreicht, um diese beiden Arten voneinander zu unterscheiden. Für *S. macrophylla* und *S. humilis* muss daher der taxonomische Status noch abschließend geklärt werden. Das durch die genetischen Untersuchungen erhaltene Ergebnis, wurde wiederum durch anatomische Untersuchungen abgesichert. Durch diese wurde die Bohle als Vertreter der Gattung *Swietenia* identifiziert. Da die gesamte Gattung *Swietenia* durch den CITES Anhang II geschützt ist, reichen sowohl die Ergebnisse der genetischen, als auch die der anatomischen Untersuchungen aus, um einen Verstoß gegen die CITES-Regularien nachzuweisen. In diesem Fall sind die Ergebnisse der spezifischen Primer als Hilfe für die anatomische Bestimmung anzusehen, da eine klassische Bestimmung der drei Arten der Gattung *Swietenia* nicht möglich ist (Gasson 2011).

Die Validierung der modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion (3.4.3) erfolgte mit Proben der Holzarten *Dalbergia nigra* (Kernholz), *D. retusa* (Splintholz) und *D. latifolia* (Kernholz). Für diese Hölzer war wiederum nicht bekannt, welchen Prozessen sie bereits unterlagen oder wie lange sie bereits gelagert wurden. Durch die Verwendung

des modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktionsprotokolls war es für alle drei Proben möglich, DNA in ausreichender Quantität und Qualität zu isolieren. Die im Anschluss mit den jeweiligen artspezifischen Primern durchgeführten PCRs, erzielten einen 100%igen PCR-Erfolg.

In Anbetracht der CITES-Problematik ist die Gattung *Dalbergia* von besonderem Interesse. Während *D. nigra* durch den CITES Anhang I geschützt ist, sind *D. retusa*, *D. stevensonii*, *D. conchinchinensis* sowie *D. granadillo* im CITES Anhang II und *D. darienensis* im CITES Anhang III gelistet. Seit Juni 2013 ist zusätzlich die gesamte *Dalbergia*-Population Madagaskars durch den CITES Anhang II geschützt. Diese Unterschiede im Schutzgrad sowie der fehlende Schutz für viele *Dalbergia*-Arten, macht eine Bestimmung auf Artebene unumgänglich. Aber gerade diese Bestimmung auf Artebene ist in der Gattung *Dalbergia* durch anatomische Untersuchungen nur schwer bis gar nicht möglich (Gasson 2011). In Anbetracht des rechtlichen Hintergrunds müssen hier Methoden zur Anwendung kommen, die eine sichere Bestimmung auf Artebene gewährleisten. Durch die Verwendung von artspezifischen Primern ist eine derartige Methode gegeben.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass der ITS eine Unterscheidung bis auf Artebene ermöglicht. Weiterhin steht mit der modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion eine DNA-Extraktionsmethode zur Verfügung, mit der die Verarbeitung von gelagertem und getrocknetem Kern- und Splintholz möglich ist. Somit erfüllt die DNA-Extraktionsmethode die Anforderungen, die durch den Holzhandel gegeben sind. Bevor der hier entwickelte Schnelltest aber zur Schaffung rechtlich relevanter Fakten eingesetzt werden kann, müssen weitere Untersuchungen auf Grundlage der Methodenvalidierung durchgeführt werden.

---



---

## 5 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung spezifischer DNA-Markersysteme zur Schnellbestimmung von CITES-geschützten Baumarten und deren Substitutionshölzern. Für die Bereitstellung eines solchen Schnelltests auf Basis der rDNA ITS-Region, mussten im Vorfeld verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden. Diese ließen sich zu folgenden Aufgabengebieten zusammenfassen: Entwicklung einer DNA-Extraktion, Aufbau einer ITS-Sequenzdatenbank, Ermittlung von spezifischen Primern und Validierung des Schnelltests.

Mit der modifizierten *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion steht eine Methode zur Verfügung, welche es ermöglicht, DNA aus schwierigen Ausgangsmaterialien (z.B. getrocknetes Splint- und Kernholz) in hoher Quantität und Qualität zu isolieren. Es konnte somit eine Methode entwickelt werden, die sicherstellt, dass ein Großteil der im Handel befindlichen Holzwaren verarbeitet werden kann. In den folgenden Jahren muss die *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion aber dennoch an einer Vielzahl von weiteren Hölzern getestet werden, um zu gewährleisten, dass die große Bandbreite von Inhibitoren kein Hindernis darstellt.

Durch die Untersuchung von 211 Individuen (vgl. Tabelle 50), die 53 Arten aus 23 Gattungen und 9 Familien repräsentieren, wurde eine umfangreiche rDNA ITS-Sequenzdatenbank aufgebaut. Die Verwendung der „holzspezifischen“ Primerpaare ITS1.1/ITS2.1 und ITS3.1/ITS4 sowie der Einsatz von frischen Ausgangsmaterialien ermöglichten einen schnellen und kostengünstigen Aufbau der Sequenzdatenbank. Um aber den Schutz weiterer bzw. neuer CITES- Hölzer gewährleisten zu können, muss die Erweiterung der Datenbank stetig vorangetrieben werden. Nur durch den Ausbau der eigenen und der internationalen Datenbanken kann auf die ständig steigende Anzahl an weltweit gehandelten Hölzern reagiert werden. Diese Notwendigkeit profitiert davon, dass immer bessere und kostengünstigere PCR-Systeme bzw. Direkt-PCR-Systeme entwickelt werden und diese die Verarbeitung immer größerer Probensets ermöglichen. Der Ansatz, art- oder gattungsspezifische Sequenzabschnitte der ITS-Regionen für die Ermittlung von spezifischen Primern zu verwenden, erwies sich als erfolgreich. Insgesamt wurden 29 spezifische Primerpaare entwickelt (vgl. Tabelle 50), mit denen eine Identifizierung von CITES- und Substitutionshölzern auf Art- oder Gattungsebene sichergestellt ist. Die Tatsache, dass nicht für jede untersuchte Art ein spezifisches Primerpaar vorliegt, begründet sich durch mehrere Punkte. Als wichtigster Aspekt

erwies sich, dass aufgrund der eigenen Sequenzen und denen der internationalen Datenbanken auf zu wenige Informationen zurückgegriffen werden konnte, um art- oder gattungsspezifische Sequenzabschnitte zu definieren. Weiterhin ist anzuführen, dass auf spezifische Primer verzichtet wurde, wenn die entsprechende Holzart klar anhand von klassischen Bestimmungsmethoden identifiziert werden kann. Durch den Einsatz der spezifischen Oligonukleotide ist es bereits nach der Gelelektrophorese möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob es sich um die deklarierte Holzart handelt. Folglich ist eine kosten- und zeitaufwendige Sequenzierung der DNA überflüssig. Die Möglichkeit, Hölzer bis auf Artebene zu identifizieren, verleiht der rDNA ITS-Region eine große Bedeutung gegenüber klassischen Bestimmungsmethoden, da hiermit viele Hölzer nicht bis auf Artebene bestimmt werden können. Ein weiterer Vorteil der molekularbiologischen Bestimmung anhand von spezifischen Primern ist, dass nahezu jedes Standardlabor und somit jede entsprechend ausgestattete Behörde, die Identifizierung durchführen kann. Es sind folglich keine holzspezifischen Expertenkenntnisse für die eindeutige Bestimmung notwendig. Für die Zukunft ist zu überlegen, ob die bisher entwickelten und noch folgenden Primer für Microarrays verwendet werden können. So könnte mittels eines einzigen Tests eine Vielzahl von in Frage kommenden Holzarten überprüft werden.

Die Validierungen des Schnelltests haben im Endergebnis deutlich gezeigt, dass der Einsatz von spezifischen Primern ein probates Mittel darstellt, um den CITES-Vollzug zu unterstützen. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die modifizierte *mericon*<sup>TM</sup>-Extraktion für die im Holzhandel vorkommenden Ausgangsmaterialien sehr gut geeignet ist. Zur weiteren Absicherung der entwickelten Methode sollte aber dennoch eine ausführlichere Methodvalidierung durchgeführt werden. Diese würde sicherstellen, dass der Schnelltest in zukünftigen Gerichtsverfahren Anwendung finden könnte.

Der entwickelte Schnelltest bietet eine weitere Möglichkeit, um den internationalen Holzhandel zu kontrollieren und somit zu gewährleisten, dass bedrohte Baumarten nicht weiter in ihrem Bestand gefährdet werden.

Tabelle 50: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse. Die Tabelle gibt die bearbeiteten Arten sowie die Anzahl (n) der untersuchten Individuen je Art wieder. Weiterhin wird aufgeführt, welcher Sequenzabschnitt für die jeweiligen Individuen erarbeitet wurde und ob ein spezifisches Primerpaar für die Art oder Gattung zur Verfügung steht. - = Es wurde kein Primerpaar erstellt. I-III = Die Holzart ist durch den angegebenen CITES Anhang geschützt. (A) = artspezifisches Primerpaar; (G) = gattungsspezifisches Primerpaar; \* = Für *Guaiacum* steht zusätzlich noch ein Gattungssprimerpaar zur Verfügung.

Art	CITES	n	Sequenz	spez. Primer
Bignoniaceae				
<i>Handroanthus chrysanthus</i>		1	ITS-Bereich	Hand for1+ Hand rev1 (G)
<i>Handroanthus impetiginosus</i>		5	ITS-Bereich	
Caryocaraceae				
<i>Caryocar brasiliense</i>		1	ITS-Bereich	-
<i>Caryocar glabrum</i>		1	ITS-Bereich	-
Combretaceae				
<i>Terminalia arenicola</i>		1	ITS-Bereich	Primerpaar bereits vorhanden (G) (Vay 2008)
<i>Terminalia avicennioides</i>		1	ITS-Bereich	
<i>Terminalia bellirica</i>		1	ITS-Bereich	
<i>Terminalia bentzoe</i>		2	ITS-Bereich	
<i>Terminalia catappa</i>		4	ITS-Bereich	
<i>Terminalia glaucescens</i>		1	ITS-Bereich	
Euphorbiaceae				
<i>Endospermum moluccanum</i>		1	ITS-Bereich	Endo for + Endo rev (G)
Fabaceae				
<i>Afzelia africana</i>		2	ITS-Bereich	Afze for2 + Afze rev1 (G)
<i>Bowdichia nitida</i>		1	ITS-Bereich	Bowd for + Bowd rev (G)
<i>Caesalpinia echinata</i>	II	3	ITS-Bereich	C ech for1 + C ech rev2 (A)
<i>Caesalpinia ferrea</i>		3	ITS-Bereich	C fer for + C fer rev (A)
<i>Caesalpinia spinosa</i>		2	ITS-Bereich	-
<i>Dalbergia decipularis</i>		1	ITS-Bereich	-
<i>Dalbergia latifolia</i>		1	ITS-Bereich	D lat for + D lat rev (A)
<i>Dalbergia melanoxylon</i>		1	ITS-Bereich	-
<i>Dalbergia miscolobium</i>		1	ITS-Bereich	-
<i>Dalbergia nigra</i>	I	2	ITS-Bereich	D nig for + D nig rev (A)
<i>Dalbergia obovata</i>		1	ITS-Bereich	-
<i>Dalbergia retusa</i>	II	3	ITS-Bereich	D ret for2 + D ret rev2 (A)
<i>Dalbergia sissoo</i>		2	ITS-Bereich	D sis for + D sis rev (A)
<i>Dalbergia spruceana</i>		2	ITS-Bereich	D spr for + D spr rev (A)
<i>Hymenaea courbaril</i>		7	ITS-Bereich	H cou for1 + H cou rev1 (A)
<i>Intsia bijuga</i>		17	ITS-Bereich	I bij for1 + I bij rev1 (A)
<i>Intsia palembanica</i>		13	ITS-Bereich	I pal for1 + I pal rev2 (A)
<i>Machaerium scleroxylon</i>		1	ITS-Bereich	M scl for + M scl rev (A)
<i>Myrocarpus frondosus</i>		1	ITS-Bereich	Myro for2 + Myro rev1 (A)

Art	CITES	n	Sequenz	spez. Primer
<i>Pterocarpus indicus</i>		4	ITS-Bereich	-
<i>Pterocarpus macrocarpus</i>		1	ITS-Bereich	-
<i>Pterocarpus santalinus</i>	II	2	ITS-Bereich	-
<i>Pterocarpus soyauxii</i>		2	ITS2-Bereich	-
Meliaceae				
<i>Cara guianensis</i>		2	ITS-Bereich	Cara for1 + Cara rev2 (G)
<i>Cedrela fissilis</i>	III	7	ITS-Bereich	C fis for1 + ITS2.1 (A)
<i>Cedrela odorata</i>	III	7	ITS-Bereich	C odo for1 + ITS2.1 (A)
<i>Entandrophragma angolense</i>		2	ITS-Bereich	E ang for2 + E ang rev2 (A)
<i>Entandrophragma cylindricum</i>		7	ITS-Bereich	E cyl for2 + E cyl rev3 (A)
<i>Khaya grandifolia</i>		2	ITS-Bereich	Khay for1 + Khay rev2 (G)
<i>Khaya ivorensis</i>		1	ITS-Bereich	
<i>Khaya nyasica</i>		2	ITS-Bereich	
<i>Khaya senegalensis</i>		6	ITS-Bereich	
<i>Swietenia humilis</i>	II	7	ITS-Bereich	S m/h for1 + S m/h rev1 (A)
<i>Swietenia macrophylla</i>	II	14	ITS-Bereich	
<i>Swietenia mahagoni</i>	II	9	ITS-Bereich	S mah for + S mah rev2 (A)
<i>Toona sinensis</i>		4	ITS-Bereich	-
Rubiaceae				
<i>Neolamarckia cadamba</i>		1	ITS-Bereich	Neol for + Neol rev (A)
Thymelaeaceae				
<i>Gonystylus bancanus</i>	II	2	ITS-Bereich	Primerpaar bereits vorhanden (G) (Vay 2008)
<i>Gonystylus spec.</i>	II	23	ITS-Bereich	
Zygophyllaceae				
<i>Bulnesia arborea</i>		2	ITS-Bereich	Buln for1 + Buln rev1 (G)
<i>Guaiacum officinale</i> *	II	14	ITS-Bereich	G off for1 + G off rev2 (A)
<i>Guaiacum sanctum</i> *	II	7	ITS-Bereich	G san for2 + ITS4 (A)

---

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe H, Watanabe U, Yoshida K, Kuroda K, Zhang CH (2011) Changes in organelle and DNA quality, quantity, and distribution in the wood of *Cryptomeria japonica* over long-term storage. *Iawa J* 32 (2):263-272
- Agroisolab (2014) Geografische Herkunftsüberprüfung - Isotopen Analytik. <http://www.agroisolab.de/index.htm>. Abgerufen am 19.05.2014
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (17):3389-3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389
- Álvarez I, Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogen Evol* 29 (3):417-434. doi:10.1016/s1055-7903(03)00208-2
- Amicucci A, Guidi C, Zambonelli A, Potenza L, Stocchi V (2002) Molecular approaches for the detection of truffle species in processed food products. *J Sci Food Agric* 82 (12):1391-1397. doi:10.1002/jsfa.1196
- Anderson AB, Riffer R, Wong A (1970) Chemistry of genus *Pinus* VII. Monoterpenes, fatty and resin acids of *Pinus monophylla* and *Pinus quadrifolia*. *Holzforschung* 24 (6):182-184. doi:10.1515/hfsg.1970.24.6.182
- Asif M, Cannon C (2005) DNA extraction from processed wood: A case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Mol Biol Rep* 23 (2):185-192. doi:10.1007/bf02772709
- Aubriot X, Lowry PP, II, Cruaud C, Couloux A, Haevermans T (2013) DNA barcoding in a biodiversity hot spot: potential value for the identification of Malagasy *Euphorbia* L. listed in CITES Appendices I and II. *Mol Ecol Resour* 13 (1):57-65. doi:10.1111/1755-0998.12028

- Bamber RK (1976) Heartwood, its function and formation. *Wood Sci Technol* 10 (1):1-8. doi:10.1007/bf00376379
- Bar W, Kratzer A, Machler M, Schmid W (1988) Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci Int* 39 (1):59-70. doi:10.1016/0379-0738(88)90118-1
- Barns SM, Delwiche CF, Palmer JD, Pace NR (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (17):9188-9193
- BMEL (2013) Presseinformation - Illegal Holzeinschlag. [http://www.bmel.de/DE/Wald-Fischerei/02\\_Internationale-Waldpolitik/\\_texte/PressemappeHolzherkuenfte.html](http://www.bmel.de/DE/Wald-Fischerei/02_Internationale-Waldpolitik/_texte/PressemappeHolzherkuenfte.html). Abgerufen am 01.03.2013
- BOL (2014) What is DNA barcoding? <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>. Abgerufen am 24.01.2014
- Brunner M, Eugster R, Trenka E, Berganmin-Strotz L (1996) FT-NIR spectroscopy and wood identification. *Holzforschung* 50 (2):130-134. doi:10.1515/hfsg.1996.50.2.130
- Butin H (1995) Tree diseases and disorders: causes, biology, and control in forest and amenity trees. Oxford University Press, Oxford
- Campbell CS, A.Wright W, Cox M, Vining TF, Major CS, Arsenault MP (2005) Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) in *Picea* (Pinaceae): sequence divergence and structure. *Mol Phylogen Evol* 35 (1):165-185. doi:10.1016/j.ympev.2004.11.010
- Cannon CH, Manos PS (2003) Phylogeography of the Southeast Asian stone oaks (*Lithocarpus*). *J Biogeogr* 30 (2):211-226. doi:10.1046/j.1365-2699.2003.00829.x
- Cano RJ (1996) Analysing ancient DNA. *Endeavour* 20 (4):162-167. doi:10.1016/S0160-9327(96)10031-4

- Cardoso D, de Lima HC, Rodrigues RS, de Queiroz LP, Pennington RT, Lavin M (2012) The *Bowdichia* clade of Genistoid legumes: Phylogenetic analysis of combined molecular and morphological data and a recircumscription of *Diplotropis*. *Taxon* 61 (5):1074-1087
- Cavers S, Telford A, Arenal Cruz F, Pérez Castañeda AJ, Valencia R, Navarro C, Buonamici A, Lowe AJ, Vendramin GG (2013) Cryptic species and phylogeographical structure in the tree *Cedrela odorata* L. throughout the Neotropics. *J Biogeogr* 40 (4):732-746. doi:10.1111/jbi.12086
- CBOL Plant Working Group, Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M, Chase MW, Cowan RS, Erickson DL, Fazekas AJ, Graham SW, James KE, Kim K-J, Kress WJ, Schneider H, van AlphenStahl J, Barrett SCH, van den Berg C, Bogarin D, Burgess KS, Cameron KM, Carine M, Chacón J, Clark A, Clarkson JJ, Conrad F, Devey DS, Ford CS, Hedderson TAJ, Hollingsworth ML, Husband BC, Kelly LJ, Kesanakurti PR, Kim JS, Kim Y-D, Lahaye R, Lee H-L, Long DG, Madriñán S, Maurin O, Meusnier I, Newmaster SG, Park C-W, Percy DM, Petersen G, Richardson JE, Salazar GA, Savolainen V, Seberg O, Wilkinson MJ, Yi D-K, Little DP (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (31):12794-12797. doi:10.1073/pnas.0905845106
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, van den Berg C, Madrinan S, Petersen G, Seberg O, Jorgensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly L, Wilkinson M (2007) A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56 (2):295-299
- Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, Savolainen V (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci* 360 (1462):1889-1895. doi:10.1098/rstb.2005.1720

- Chen DM, Filippis Lfd (1996) Application of genomic DNA and RAPD-PCR in genetic analysis and fingerprinting of various species of woody trees. *Australian Forestry* 59 (1):46-55
- Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5 (1):e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613
- China Plant BOL Group, Li D-Z, Gao L-M, Li H-T, Wang H, Ge X-J, Liu J-Q, Chen Z-D, Zhou S-L, Chen S-L, Yang J-B, Fu C-X, Zeng C-X, Yan H-F, Zhu Y-J, Sun Y-S, Chen S-Y, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan G-W (2011) Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc Natl Acad Sci, USA* 108 (49):19641-19646. doi:10.1073/pnas.1104551108
- CITES (2014) Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. [www.cites.org](http://www.cites.org). Abgerufen am 31.01.2014
- Collevatti RG, Terribile LC, Lima-Ribeiro MS, Nabout JC, Oliveira G, Rangel TF, Rabelo SG, Diniz JAF (2012) A coupled phylogeographical and species distribution modelling approach recovers the demographical history of a Neotropical seasonally dry forest tree species. *Mol Ecol* 21 (23):5845-5863. doi:10.1111/mec.12071
- Conceicao AD, de Queiroz LP, Lewis GP, de Andrade MJG, de Almeida PRM, Schnadelbach AS, van den Berg C (2009) Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. *Taxon* 58 (4):1168-1180
- Cotton EA, Allsop RF, Guest JL, Frazier RRE, Koumi P, Callow IP, Seager A, Sparkes RL (2000) Validation of the AMPF/STR® SGM Plus™ system for use in forensic casework. *Forensic Sci Int* 112 (2-3):151-161. doi:10.1016/s0379-0738(00)00182-1



- Csaikl UM, Bastian H, Brettschneider R, Gauch S, Meir A, Schauerte M, Scholz F, Sperisen C, Vornam B, Ziegenhagen B (1998) Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Mol Biol Rep* 16 (1):69-86. doi:10.1023/a:1007428009556
- Cuénoud P, Savolainen V, Chatrou LW, Powell M, Grayer RJ, Chase MW (2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *Am J Bot* 89 (1):132-144. doi:10.3732/ajb.89.1.132
- De Filippis L, Magel EA (1998) Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in *Robinia* trees using RAPD-PCR. *Trees - Struct Funct* 12 (6):377-384. doi:10.1007/pl00009723
- Deguilloux M, Pemonge M, Petit R (2002) Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proc R Soc Lond [Biol]* 269 (1495):1039-1046. doi:10.1098/rspb.2002.1982
- Deguilloux MF, Pemonge MH, Bertel L, Kremer A, Petit RJ (2003) Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. *Mol Ecol* 12 (6):1629-1636. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01836.x
- Demeke T, Adams RP (1992) The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques* 12 (3):332-334
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Dubouzet JG, Shinoda K (1999) Relationships among Old and New World *Alliums* according to ITS DNA sequence analysis. *Theor Appl Genet* 98 (3):422-433. doi:10.1007/s001220051088

- Duminil J, Kenfack D, Viscosi V, Grumiau L, Hardy OJ (2012) Testing species delimitation in sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). *Mol Phylogen Evol* 62 (1):275-285. doi:10.1016/j.ympev.2011.09.020
- Dumolin-Lapègue S, Pemonge MH, Gielly L, Taberlet P, Petit RJ (1999) Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. *Mol Ecol* 8 (12):2137-2140. doi:10.1046/j.1365-294x.1999.00788.x
- Dumolin S, Demesure B, Petit RJ (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theor Appl Genet* 91 (8):1253-1256. doi:10.1007/bf00220937
- Edwards D, Hawkins JA (2007) Are Cape floral clades the same age? Contemporaneous origins of two lineages in the genistoids s.l. (Fabaceae). *Mol Phylogen Evol* 45 (3):952-970. doi:10.1016/j.ympev.2007.09.014
- Erickson DL, Smith BD, Clarke AC, Sandweiss DH, Tuross N (2005) An Asian origin for a 10,000-year-old domesticated plant in the Americas. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (51):18315-18320. doi:10.1073/pnas.0509279102
- Evans KM, Wortley AH, Mann DG (2007) An assessment of potential diatom "barcode" genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist* 158 (3):349-364. doi:10.1016/j.protis.2007.04.001
- Evershed RP, Bland HA, vanBergen PF, Carter JF, Horton MC, RowleyConwy PA (1997) Volatile compounds in archaeological plant remains and the Maillard reaction during decay of organic matter. *Science* 278 (5337):432-433. doi:10.1126/science.278.5337.432
- Fatma NAH, Wickneswari R, Cannon CH (2011) Detection of genetic structure among Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz) populations in Peninsular Malaysia using a RAPID DNA fingerprinting technique. *Malays Appl Biol* 40 (2):43-50

- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SCH (2008) Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3 (7):e2802. doi:10.1371/journal.pone.0002802
- Fengel D (1970) Ultrastructural changes during aging of wood cells. *Wood Sci Technol* 4 (3):176-188
- Finkeldey R, Leinemann L, Gailing O (2010) Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. *Appl Microbiol Biotechnol* 85 (5):1251-1258. doi:10.1007/s00253-009-2328-6
- Fladung M, Nowitzki O, Ziegenhagen B, Markussen T (2004) Identification of transgenes from wood of genetically transformed poplar trees. *Wood Sci Technol* 38 (3):207-215. doi:10.1007/s00226-004-0233-9
- Ford CS, Ayres KL, Toomey N, Haider N, Van Alphen Stahl J, Kelly LJ, Wikström N, Hollingsworth PM, Duff RJ, Hoot SB, Cowan RS, Chase MW, Wilkinson MJ (2009) Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Bot J Linn Soc* 159 (1):1-11. doi:10.1111/j.1095-8339.2008.00938.x
- Förstel H, Boner M, Höltnen A, Fladung M, Degen B, Zahnen J (2011) Bekämpfung des illegalen Holzeinschlags durch Einführung einer Kombination der Isotopenmethode zur Herkunftsidentifizierung von Holz und der DNA-Analyse zur Artdifferenzierung von Holz. WWF Deutschland, Berlin
- Förstel H, Boner M, Sommer T, Erven C, Zahnen J, Griesshammer N, Sonnenberg A (2008a) The natural variation of stable isotopes of wood as a fingerprint to trace back its origin. *Forst und Holz* 63 (3):31-34
- Förstel H, Boner M, Zahnen J (2008b) Überprüfung der Herkunftsdeklaration von Holz mittels Isotopenverteilung. WWF Deutschland, Frankfurt am Main

- Fougere-Danezan M, Maumont S, Bruneau A (2007) Relationships among resin-producing Detarieae s.l. (Leguminosae) as inferred by molecular data. *Syst Bot* 32 (4):748-761
- Francis JK (2002) *Pterocarpus macrocarpus* Kurz. In: Vozzo JA (ed) Tropical tree seed manual. USDA, Forest Service, Washington DC,
- Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, Pang X, Xu H, Chen S (2010) Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *J Ethnopharmacol* 130 (1):116-121. doi:10.1016/j.jep.2010.04.026
- Garcia MG, Silva RS, Carniello MA, Veldman JW, Rossi AAB, de Oliveira LO (2011) Molecular evidence of cryptic speciation, historical range expansion, and recent intraspecific hybridization in the Neotropical seasonal forest tree *Cedrela fissilis* (Meliaceae). *Mol Phylogen Evol* 61 (3):639-649. doi:10.1016/j.ympev.2011.08.026
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2 (2):113-118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
- Gasson P (2011) How precise can wood identification be? Wood anatomy's role in support of the legal timber trade, especially CITES. *Iawa J* 32 (2):137-154
- Gernandt DS, Liston A (1999) Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Am J Bot* 86 (5):711-723. doi:10.2307/2656581
- Gonzalez MA, Baraloto C, Engel J, Mori SA, Pétronelli P, Riéra B, Roger A, Thébaud C, Chave J (2009) Identification of amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS ONE* 4 (10):e7483. doi:10.1371/journal.pone.0007483
- Greenpeace (2014) Ramin at APP's flagship pulp mill. <http://www.greenpeace.org/international/en/campaigns/forests/asia-pacific/app/ramin/mill/>. Abgerufen am 07.03.2014

- Greenstone MH, Rowley DL, Heimbach U, Lundgren JG, Pfannenstiel RS, Rehner SA (2005) Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: carabids and spiders. *Mol Ecol* 14 (10):3247-3266. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02628.x
- Gugerli F, Parducci L, Petit RJ (2005) Ancient plant DNA: review and prospects. *New Phytol* 166 (2):409-418. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01360.x
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical *Lepidoptera*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (4):968-971. doi:10.1073/pnas.0510466103
- Hanssen F, Wischniewski N, Moreth U, Magel EA (2011) Molecular identification of *Fitzroya cupressoides*, *Sequoia sempervirens*, and *Thuja plicata* wood using taxon-specific rDNA-ITS primers. *Iawa J* 32 (2) (2):273-284
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond [Biol]* 270 (1512):313-321. doi:10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond [Biol]* 270:S96-S99. doi:10.1098/rsbl.2003.0025
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2 (10):1657-1663. doi:e31210.1371/journal.pbio.0020312
- Hershkovitz MA, Lewis LA (1996) Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol Biol Evol* 13 (9):1276-1295
- Hollingsworth ML, Andra Clark A, Forrest LL, Richardson J, Pennington RT, Long DG, Cowan R, Chase MW, Gaudeul M, Hollingsworth PM (2009) Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level

- sampling in three divergent groups of land plants. *Mol Ecol Resour* 9 (2):439-457. doi:10.1111/j.1755-0998.2008.02439.x
- Hollingsworth PM (2011) Refining the DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (49):19451-19452. doi:10.1073/pnas.1116812108
- Höltken AM, Schroder H, Wischnewski N, Degen B, Magel E, Fladung M (2012) Development of DNA-based methods to identify CITES-protected timber species: a case study in the Meliaceae family. *Holzforschung* 66 (1):97-104. doi:10.1515/hf.2011.142
- Horisawa S, Sakuma Y, Doi S (2009) Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. *J Wood Sci* 55 (2):133-138. doi:10.1007/s10086-008-1011-3
- Hribova E, Cizkova J, Christelova P, Taudien S, de Langhe E, Dolezel J (2011) The ITS1-5.8S-ITS2 sequence region in the Musaceae: Structure, diversity and use in molecular phylogeny. *PLoS ONE* 6 (3). doi:10.1371/journal.pone.0017863
- Hynniewta M, Malik SK, Rao SR (2014) Genetic diversity and phylogenetic analysis of *Citrus* (L) from north-east India as revealed by meiosis, and molecular analysis of internal transcribed spacer region of rDNA. *Meta Gene* 2 (0):237-251. doi:10.1016/j.mgene.2014.01.008
- Jiao L, Yin Y, Xiao F, Sun Q, Song K, Jiang X (2012) Comparative analysis of two DNA extraction protocols from fresh and dried wood of *Cunninghamia lanceolata* (Taxodiaceae). *Iawa J* 33 (4):441-456. doi:10.1163/22941932-90000106
- Jolivet C, Höltken A, Liesebach H, Steiner W, Degen B (2010) Spatial genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.): I. variation among natural populations of different density. *Tree Genet Genom*:1-13. doi:10.1007/s11295-010-0330-x
- Kelman LM, Kelman Z (1999) The use of ancient DNA in paleontological studies. *J Vert Paleontol* 19 (1):8-20. doi:10.1080/02724634.1999.10011118

- Kendall M, Rygiewicz P (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol* 5 (1):28
- Klitgard BB, Forest F, Booth TJ, Saslis-Lagoudakis CH (2013) A detailed investigation of the *Pterocarpus* clade (Leguminosae: Dalbergieae): *Etaballia* with radially symmetrical flowers is nested within the papilionoid-flowered *Pterocarpus*. *S Afr J Bot* 89:128-142. doi:10.1016/j.sajb.2013.07.006
- Ko KS, Jung HS (2002) Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum*. *Mol Phylogen Evol* 23 (2):112-122. doi:10.1016/s1055-7903(02)00009-x
- Koch G, Richter HG, Schmitt U (2011) Design and application of CiteswoodID computer-aided identification and description of CITES-protected timbers. *Iawa J* 32 (2):213-220
- Krenke BE, Tereba A, Anderson SJ, Buel E, Culhane S, Finis CJ, Tomsey CS, Zachetti JM, Masibay A, Rabbach DR, Amriott EA, Sprecher CJ (2002) Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J Forensic Sci* 47 (4):773-785
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2 (6):e508
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (23):8369-8374. doi:10.1073/pnas.0503123102
- Kulac D (2012) Entwicklung einer Methode zur DNA Extraktion aus Kernholz. Bachelorarbeit, Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg, Hamburg
- Lage Novaes RM, Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Lovato MB (2013) Concordance between phylogeographical and biogeographical patterns in the Brazilian Cerrado: Diversification of the endemic tree *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). *PLOS ONE* 8 (12). doi:10.1371/journal.pone.0082198

- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (8):2923-2928. doi:10.1073/pnas.0709936105
- Lalitha S (2000) Primer Premier 5. *Biotechnol Sotw I J* 1 (6):270-272. doi:10.1089/152791600459894
- Laport RG, Minckley RL, Ramsey J (2012) Phylogeny and cytogeography of the North American creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Syst Bot* 37 (1):153-164. doi:10.1600/036364412x616738
- Lavin M, Pennington RT, Klitgaard BB, Sprent JI, de Lima HC, Gasson PE (2001) The dalbergioid legumes (Fabaceae): Delimitation of a pantropical monophyletic clade. *Am J Bot* 88 (3):503-533. doi:10.2307/2657116
- Lavin M, Thulin M, Labat JN, Pennington RT (2000) Africa, the odd man out: Molecular biogeography of dalbergioid legumes (Fabaceae) suggests otherwise. *Syst Bot* 25 (3):449-467. doi:10.2307/2666689
- Lee AB, Cooper TA (1995) Improved direct PCR screen for bacterial colonies - wooden toothpicks inhibit PCR amplification. *BioTechniques* 18 (2):225-226
- Lemes M, Dick C, Navarro C, Lowe A, Cavers S, Gribel R (2010) Chloroplast DNA microsatellites reveal contrasting phylogeographic structure in mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) from Amazonia and Central America. *Trop Plant Biol* 3 (1):40-49. doi:10.1007/s12042-010-9042-5
- Li HQ, Chen JY, Wang S, Xiong SZ (2012) Evaluation of six candidate DNA barcoding loci in *Ficus* (Moraceae) of China. *Mol Ecol Resour* 12 (5):783-790. doi:10.1111/j.1755-0998.2012.03147.x
- Lia VV, Confalonieri VA, Comas CI, Hunziker JH (2001) Molecular phylogeny of *Larrea* and its allies (Zygophyllaceae): Reticulate evolution and the probable



- time of creosote bush arrival to North America. *Mol Phylogen Evol* 21 (2):309-320. doi:10.1006/mpev.2001.1025
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (6422):709-715. doi:10.1038/362709a0
- Liston A, Robinson WA, Oliphant JM, AlvarezBuylla ER (1996) Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of non-flowering seed plants. *Syst Bot* 21 (2):109-120. doi:10.2307/2419742
- Liu Z, Liu Y, Liu S, Ding X, Yang Y, Huang H (2009) Analysis of the sequence of ITS1-5.8S-ITS2 regions of the three species of *Fructus evodiae* in Guizhou province of China and identification of main ingredients of their medicinal chemistry *Comput Sci Syst Biol* 2:200-207. doi:10.4172/jcsb.1000032
- Lofstrand SD, Kruger A, Razafimandimbison SG, Bremer B (2014) Phylogeny and generic delimitations in the sister tribes Hymenodictyeae and Naucleaeae (Rubiaceae). *Syst Bot* 39 (1):304-315. doi:10.1600/036364414x675116
- Lohmann LG, Ulloa Ulloa C (2014) Bignoniaceae in iPlants prototype checklist. [www.iplants.org](http://www.iplants.org). Abgerufen am 04.02.2014
- Lowe AJ, Cross HB (2011) The application of DNA methods to timber tracking and origin verification. *Iawa J* 32 (2):251-262
- Lowe AJ, Harris D, Dormontt E, Dawson IK (2010a) Testing putative African tropical forest refugia using chloroplast and nuclear DNA phylogeography. *Trop Plant Biol* 3 (1):50-58. doi:10.1007/s12042-010-9045-2
- Lowe AJ, Wong KN, Tiong YS, Iyerh S, Chew FT (2010b) A DNA method to verify the integrity of timber supply chains; Confirming the legal sourcing of Merbau Timber from logging concession to sawmill. *Silvae Genet* 59 (6):263-268

- Magnussen JE, Pikitch EK, Clarke SC, Nicholson C, Hoelzel AR, Shivji MS (2007) Genetic tracking of basking shark products in international trade. *Anim Conserv* 10 (2):199-207. doi:10.1111/j.1469-1795.2006.00088.x
- Maurin O, Chase MW, Jordaan M, Van Der Bank M (2010) Phylogenetic relationships of Combretaceae inferred from nuclear and plastid DNA sequence data: implications for generic classification. *Bot J Linn Soc* 162 (3):453-476. doi:10.1111/j.1095-8339.2010.01027.x
- Monteiro Pastore TC, Batista Braga JW, Rauber Coradin VT, Esteves Magalhaes WL, Arakaki Okino EY, Alves Camargos JA, Bonzon de Muniz GI, Bressan OA, Davrieux F (2011) Near infrared spectroscopy (NIRS) as a potential tool for monitoring trade of similar woods: Discrimination of true mahogany, cedar, andiroba, and curupixa. *Holzforschung* 65 (1):73-80. doi:10.1515/hf.2011.010
- Moreth U, Schmidt O (2000) Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzforschung* 54 (1):1-8. doi:10.1515/hf.2000.001
- Mower JP, Touzet P, Gummow JS, Delph LF, Palmer JD (2007) Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial genes of seed plants. *BMC Evol Biol* 7. doi:10.1186/1471-2148-7-135
- Müllner AN, Pennington TD, Koecke AV, Renner SS (2010) Biogeography of *Cedrela* (Meliaceae, Sapindales) in Central and South America. *Am J Bot* 97 (3):511-518. doi:10.3732/ajb.0900229
- Müllner AN, Schaefer H, Lahaye R (2011) Evaluation of candidate DNA barcoding loci for economically important timber species of the mahogany family (Meliaceae). *Mol Ecol Resour* 11 (3):450-460. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.02984.x
- Murmanis L, Highley TL, Palmer JG (1987) Cytochemical-localization of cellulases in decayed and nondecayed wood. *Wood Sci Technol* 21 (2):101-109

- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8 (19):4321-4325. doi:10.1093/nar/8.19.4321
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Ragupathy S (2006) DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Can J Bot* 84 (3):335-341. doi:10.1139/b06-047
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD, Janovec J (2008) Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Mol Ecol Resour* 8 (3):480-490. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.02002.x
- Niemz P, Wienhaus O, Schaarschmidt K, Ramin R (1989) Untersuchungen zur Holzartendifferenzierung mit Hilfe der Infrarot-Spektroskopie, Teil 2. *Holzforsch Holzverw* 41 (2):22-26
- Ogden R, McGough H, Cowan R, Chua L, Groves M, McEwing R (2008) SNP-based method for the genetic identification of Ramin *Gonystylus* spp. timber and products: applied research meeting CITES enforcement needs. *Endang Species Res* 9 (3):255-261. doi:10.3354/esr00141
- Pääbo S (1990) Amplifying ancient DNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, London, UK, pp 159-166
- Pandey RN, Adams RP, Flournoy LE (1996) Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol Biol Rep* 14 (1):17-22. doi:10.1007/bf02671898
- Pang X, Luo H, Sun C (2012) Assessing the potential of candidate DNA barcodes for identifying non-flowering seed plants. *Plant Biol* 14 (5):839-844. doi:10.1111/j.1438-8677.2011.00554.x
- Pang XH, Song JY, Zhu YJ, Xie CX, Chen SL (2010) Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. *Planta Med* 76 (15):1784-1786. doi:10.1055/s-0030-1249806

- Pap P, Rankovic B, Masirevic S (2013) Effect of temperature, relative humidity and light on conidial germination of oak powdery mildew (*Microsphaera alphitoides* Griff. et Maubl.) under controlled conditions. Arch Biol Sci 65 (3):1069-1077. doi:10.2298/abs1303069p
- Pennington TD, Müllner AN (2010) A monograph of *Cedrela*. DH Books, Sherborne, UK
- Pennisi E (2007) Wanted: A barcode for plants. Science 318 (5848):190-191. doi:10.1126/science.318.5848.190
- Pirie MD, Klitgaard BB, Pennington RT (2009) Revision and biogeography of *Centrolobium* (Leguminosae - Papilionoideae). Syst Bot 34 (2):345-359
- Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed RP, Possnert G, Pääbo S (1998) Molecular coproscopy: Dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. Science 281 (5375):402-406. doi:10.1126/science.281.5375.402
- Qiagen (2014) DNeasy<sup>®</sup> mericon<sup>™</sup> Food Kit Handbook. <http://www.qiagen.com/products/lab-focus/food-safety-testing/ingredient-authentication/animal-derived-ingredients/sample-preparation/dneasy-mericon-food-kit?applicationflowStep={116C0422-B88E-46D2-93F1-A47E1B91B48B}#resources>. Abgerufen am 02.04.2014
- Rachmayanti Y, Leinemann L, Gailing O, Finkeldey R (2006) Extraction, amplification and characterization of wood DNA from Dipterocarpaceae. Plant Mol Biol Rep 24 (1):45-55. doi:10.1007/bf02914045
- Rachmayanti Y, Leinemann L, Gailing O, Finkeldey R (2009) DNA from processed and unprocessed wood: Factors influencing the isolation success. Forensic Sci Int-Genet 3 (3):185-192. doi:DOI: 10.1016/j.fsigen.2009.01.002
- Rana R, Mueller G, Naumann A, Polle A (2008) FTIR spectroscopy in combination with principal component analysis or cluster analysis as a tool to distinguish

- beech (*Fagus sylvatica* L.) trees grown at different sites. *Holzforschung* 62 (5):530-538. doi:10.1515/hf.2008.104
- Razafimandimbison SG, Bremer B (2002) Phylogeny and classification of Naucleaeae s.l. (Rubiaceae) inferred from molecular (ITS, *rbcL*, and *trnT-F*) and morphological data. *Am J Bot* 89 (7):1027-1041. doi:10.3732/ajb.89.7.1027
- Reynolds MM, Williams CG (2004) Extracting DNA from submerged pine wood. *Genome* 47 (5):994-997. doi:10.1139/g04-045
- Ribeiro RA, Lavin M, Lemos-Filho JP, Mendonca Filho CV, Dos Santos FR, Lovato MB (2007) The genus *Machaerium* (Leguminosae) is more closely related to *Aeschynomene* sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: Inferences from combined sequence data. *Syst Bot* 32 (4):762-771
- Rivera-Ocasio E, Aide TM, McMillan WO (2002) Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. *Mol Ecol* 11 (4):675-683. doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01476.x
- Robba L, Russell SJ, Barker GL, Brodie J (2006) Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *Am J Bot* 93 (8):1101-1108. doi:10.3732/ajb.93.8.1101
- Roy S, Tyagi A, Shukla V, Kumar A, Singh UM, Chaudhary LB, Datt B, Bag SK, Singh PK, Nair NK, Husain T, Tuli R (2010) Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: A case study with Indian *Berberis* species. *PLoS ONE* 5 (10):e13674
- Saslis-Lagoudakis C, Chase MW, Robinson DN, Russell SJ, Klitgaard BB (2008) Phylogenetics of neotropical *Platymiscium* (leguminosae: dalbergieae): systematics, divergence times and biogeography inferred from nuclear ribosomal and plastid DNA sequence data. *Am J Bot* 95 (10):1270-1286. doi:10.3732/ajb.0800101

- Saslis-Lagoudakis CH, Klitgaard BB, Forest F, Francis L, Savolainen V, Williamson EM, Hawkins JA (2011) The use of phylogeny to interpret cross-cultural patterns in plant use and guide medicinal plant discovery: An example from *Pterocarpus* (Leguminosae). PLoS ONE 6 (7). doi:10.1371/journal.pone.0022275
- Sass C, Little DP, Stevenson DW, Specht CD (2007) DNA barcoding in the Cycadales: Testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of Cycads. PLoS ONE 2 (11):e1154. doi:10.1371/journal.pone.0001154
- Scharff L (2006) Plastidäre DNA-Replikation. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, München
- Schmidt O (2006) Wood and tree fungi. Biology, damage, protection, and use. Springer, Berlin
- Schmidt O, Gaiser O, Dujesiefken D (2012) Molecular identification of decay fungi in the wood of urban trees. Eur J Forest R 131 (3):885-891. doi:10.1007/s10342-011-0562-9
- Schmidt O, Moreth U (2002) Data bank of rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. Wood Sci Technol 36 (5):429-433. doi:10.1007/s00226-002-0152-6
- Schwartz M (2012) Validierung eines Schnelltests zur Identifizierung der CITES-geschützten Holzart Ramin (*Gonystylus* spp.). Bachelorarbeit, Universität Hamburg, Hamburg
- Seifert KA, Samson RA, deWaard JR, Houbraken J, Lévesque CA, Moncalvo J-M, Louis-Seize G, Hebert PDN (2007) Prospects for fungus identification using *COI* DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. Proc Natl Acad Sci, USA 104 (10):3901-3906. doi:10.1073/pnas.0611691104

- Shearer TL, Coffroth MA (2008) Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Mol Ecol Resour* 8 (2):247-255. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01996.x
- Simpson B, Larkin L, Weeks A, McDill J (2006) Phylogeny and biogeography of *Pomaria* (Caesalpinioideae : Leguminosae). *Syst Bot* 31 (4):792-804. doi:10.1600/036364406779695915
- Simpson BB, Weeks A, Helfgott DM, Larkin LL (2004) Species relationships in *Krameria* (Krameriaceae) based on ITS sequences and morphology: Implications for character utility and biogeography. *Syst Bot* 29 (1):97-108. doi:10.1600/036364404772974013
- Sinclair WA, Lyon HH (2005) Diseases of trees and shrubs. Cornell University Press, Ithaca
- Smith MA, Woodley NE, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (10):3657-3662. doi:10.1073/pnas.0511318103
- Stefenon VM, Gailing O, Finkeldey R (2006) Phylogenetic relationship within genus *Araucaria* (Araucariaceae) assessed by means of AFLP fingerprints. *Silvae Genet* 55 (2):45-52
- Takamatsu S, Kano Y (2001) PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. *Mycoscience* 42 (1):135-139. doi:10.1007/bf02463987
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. doi:10.1093/molbev/msr121

- Tang X, Zhao G, Ping L (2011) Wood identification with PCR targeting noncoding chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 77 (6):609-617. doi:10.1007/s11103-011-9837-2
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22 (22):4673-4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Tnah L, Lee S, Ng K, Bhassu S, Othman R (2012) DNA extraction from dry wood of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae) for forensic DNA profiling and timber tracking. *Wood Sci Technol* 46 (5):813-825. doi:10.1007/s00226-011-0447-6
- Tripathi AM, Tyagi A, Kumar A, Singh A, Singh S, Chaudhary LB, Roy S (2013) The internal transcribed spacer (ITS) region and *trnH-psbA* are suitable candidate loci for DNA barcoding of tropical tree species of India. *PLOS ONE* 8 (2):e57934. doi:10.1371/journal.pone.0057934
- Tsumura Y, Kawahara T, Wickneswari R, Yoshimura K (1996) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theor Appl Genet* 93 (1-2):22-29. doi:10.1007/bf00225722
- Vay O (2008) Molekulargenetische Identifikation von CITES Holzarten und deren Substitutionshölzer. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Hamburg
- Volossiuk T, Robb E, Nazar R (1995) Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl Environ Microbiol* 61 (11):3972-3976
- Wallinger C, Juen A, Staudacher K, Schallhart N, Mitterrutzner E, Steiner E-M, Thalinger B, Traugott M (2012) Rapid plant identification using species- and group-specific primers targeting chloroplast DNA. *PLoS ONE* 7 (1):e29473. doi:10.1371/journal.pone.0029473



- Wang S-Y, Wang Y-S, Tseng Y-H, Lin C-T, Liu C-P (2006) Analysis of fragrance compositions of precious coniferous woods grown in Taiwan. *Holzforschung* 60 (5):528-532. doi:10.1515/hf.2006.087
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci* 360 (1462):1847-1857. doi:10.1098/rstb.2005.1716
- Watson L, Dallwitz MJ (2014) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 19th October 2013. <http://delta-intkey.com/>. Abgerufen am 04.02.2014
- White E, Hunter J, Dubetz C, Brost R, Bratton A, Edes S, Sahota R (2000) Microsatellite markers for individual tree genotyping: application in forest crime prosecutions. *J Chem Technol Biotechnol* 75 (10):923-926. doi:10.1002/1097-4660(200010)75:10<923::aid-jctb309>3.0.co;2-s
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protocols A guide to Methods and Applications*. Academic Press, London, UK, pp 315-322
- Whitworth TL, Dawson RD, Magalon H, Baudry E (2007) DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protophthora* (Diptera: Calliphoridae). *Proc R Soc Lond [Biol]* 274 (1619):1731-1739. doi:10.1098/rspb.2007.0062
- Wienhaus O, Niemz P, Fabian J (1988) Untersuchungen zur Holzartendifferenzierung mit Hilfe der Infrarotspektroskopie, Teil 1. *Holzforsch Holzverw* 40 (6):120-125
- WWF (2007) Hintergrundinformation - CITES und bedrohte Baumarten. <http://www.wwf.de/themen-projekte/weitere-artenschutzthemen/politische-instrumente/cites/>. Abgerufen am 27.11.2013

- Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, Pang X, Xu H, Zhu Y, Xiao P, Chen S (2010) Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. PLoS ONE 5 (10):e13102. doi:10.1371/journal.pone.0013102
- Yesson C, Russell SJ, Parrish T, Dalling JW, Garwood NC (2004) Phylogenetic framework for *Trema* (Celtidaceae). Plant Syst Evol 248 (1-4):85-109. doi:10.1007/s00606-004-0186-3
- Yoshida K, Kagawa A, Igasaki T, Nishiguchi M, Mukai Y (2006) Influence of the position in xylem, storage period and heat treatment on the efficiency of DNA extraction and on the quality of DNA from wood. Bull For For Prod Res Inst 5 (4):289-298
- Yoshida K, Kagawa A, Nishiguchi M (2007) Extraction and detection of DNA from wood for species identification. International symposium on development of improved methods to identify *Shorea* species wood and its origin, Yayoi Auditorium Ichijo Hall, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 25-26 September, 2007:27-34
- Yu H, Fan X, Zhang C, Ding C, Wang X, Zhou Y (2008) Phylogenetic relationships of species in *Pseudoroegneria* (Poaceae: Triticeae) and related genera inferred from nuclear rDNA ITS (internal transcribed spacer) sequences. Biologia 63 (4):498-505. doi:10.2478/s11756-008-0091-2
- Zatt Schardosin (2013) Desenvolvimento e teste de iniciadores para a identificação biomolecular de três espécies do gênero *Dalbergia* (Fabaceae-Faboideae). Universidade Federal do Paraná, Curitiba
- Zhang C-Y, Wang F-Y, Yan H-F, Hao G, Hu C-M, Ge X-J (2012) Testing DNA barcoding in closely related groups of *Lysimachia* L. (Myrsinaceae). Mol Ecol Resour 12 (1):98-108. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03076.x
- Zhang W, Wendel JF, Clark LG (1997) Bamboozled again! Inadvertent isolation of fungal rDNA sequences from Bamboos (Poaceae: Bambusoideae). Mol Phylogen Evol 8 (2):205-217. doi:10.1006/mpev.1997.0422

## 7 Anhang

### 7.1 Probenmaterial aufgelistet nach der Herbarnummer

Das in Punkt 2.1.4.1 vorgestellte Pflanzenmaterial für den Aufbau einer rDNA ITS-Sequenzdatenbank wird an dieser Stelle noch einmal anhand der Herbarnummer dargestellt. Für jedes Individuum wird sowohl dessen Herbarnummer, der wissenschaftliche Name, die Herkunft und die Form des Ausgangsmaterials angegeben (Tabelle A 1).

Tabelle A 1: Auflistung des untersuchten Probenmaterials zum Aufbau der internen rDNA ITS-Sequenzdatenbank. Die Anordnung der Proben erfolgte in Bezug auf deren Herbarnummer. Aufgeführt sind jeweils die Herbarnummer, der wissenschaftliche Name, die Herkunft und die Form des untersuchten Materials. A = Ast, B = Blatt, D = DNA und S = Splintholz.

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
2	<i>Swietenia macrophylla</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
3	<i>Swietenia macrophylla</i>	Bot. Garten der Uni. Göttingen	A
4	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Göttingen	A
5	<i>Khaya senegalensis</i>	Unbekannt	A
6	<i>Khaya senegalensis</i>	Unbekannt	A
7	<i>Swietenia mahagoni</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
8	<i>Khaya grandifolia</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
10	<i>Cedrela odorata</i>	Unbekannt	A
11	<i>Cedrela fissilis</i>	Unbekannt	A
18	<i>Swietenia macrophylla</i>	Bot. Garten der Uni. Tübingen	A
19	<i>Swietenia macrophylla</i>	Bot. Garten der Uni. Tübingen	A
21	<i>Swietenia mahagoni</i>	Unbekannt	A
23	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten der Uni. Jena	A
24	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Jena	A
30	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	A
33	<i>Swietenia macrophylla</i>	Bot. Garten der Uni. Bochum	A
35	<i>Khaya senegalensis</i>	Bot. Garten der Uni. Bochum	A
36	<i>Cedrela fissilis</i>	Bot. Garten der Uni Bochum	A
38	<i>Khaya nyasica</i>	Bot. Garten der Uni. Oldenburg	A
40	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Halle	A
41	<i>Khaya senegalensis</i>	Bot. Garten der Uni. Halle	A
49	<i>Carapa guianensis</i>	Bot. Garten der Uni. Düsseldorf	A

# Anhang

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
50	<i>Afzelia africana</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
55	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
56	<i>Cedrela odorata</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
57	<i>Toona sinensis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
71	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	A
74	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
76	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
80	<i>Carapa guianensis</i>	Bot. Garten Graz	A
81	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten Graz	A
82	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten Graz	A
83	<i>Entandrophragma angolense</i>	Bot. Garten der Uni. Würzburg	A
85	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	A
86	<i>Hymenaea courbaril</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	A
94	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	A
101	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Erlangen	A
117	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Greifswald	A
119	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Zürich	A
134	<i>Khaya ivorensis</i>	Holzwerk Nagel	S
142	<i>Dalbergia miscolobium</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
143	<i>Dalbergia retusa</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
144	<i>Dalbergia nigra</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
156	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Berlin	A
162	<i>Guaiacum sanctum</i>	Bot. Garten der Uni. Jena	A
163	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Jena	A
165	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Köln	A
166	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten der Uni. Köln	A
167	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Köln	A
168	<i>Swietenia mahagoni</i>	Palmengarten Frankfurt	A
170	<i>Hymenaea courbaril</i>	Palmengarten Frankfurt	A
172	<i>Terminalia catappa</i>	Bot. Garten Uni. Heidelberg	A
173	<i>Guaiacum sanctum</i>	Bot. Garten der Uni. Heidelberg	A
174	<i>Terminalia bentzoe</i>	Bot. Garten Uni. Heidelberg	A
175	<i>Swietenia mahagoni</i>	Bot. Garten der Uni. Heidelberg	A
192	<i>Entandrophragma angolense</i>	Holzwerk Nagel	S
201	<i>Hymenaea courbaril</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
202	<i>Hymenaea courbaril</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
203	<i>Hymenaea courbaril</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
204	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
205	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
206	<i>Caesalpinia echinata</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
207	<i>Caesalpinia echinata</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
208	<i>Caryocar brasiliense</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
209	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
210	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
211	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
212	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
213	<i>Swietenia humilis</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
224	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
225	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
226	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
227	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
228	<i>Swietenia macrophylla</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
229	<i>Swietenia mahagoni</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	A
231	<i>Guaiacum sanctum</i>	Mexiko	S
232	<i>Guaiacum sanctum</i>	Brasilien	B
233	<i>Guaiacum sanctum</i>	Mexiko	S
235	<i>Swietenia humilis</i>	Mexiko	S
244	<i>Gonystylus bancanus</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
247	<i>Gonystylus bancanus</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
249	<i>Swietenia macrophylla</i>	USA	S
251	<i>Swietenia macrophylla</i>	USA	S
252	<i>Swietenia macrophylla</i>	USA	S
341	<i>Machaerium scleroxylon</i>	Fritz Kohl Furnier	S
344	<i>Dalbergia retusa</i>	Fritz Kohl Furnier	S
345	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Fritz Kohl Furnier	S
377	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Bonn	A
378	<i>Dalbergia melanoxylon</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	B
385	<i>Swietenia macrophylla</i>	Fritz Kohl Furnier	S
393	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
394	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
395	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	B
399	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D

# Anhang

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
400	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
401	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
402	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
403	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
404	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
405	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
406	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
407	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
408	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
409	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
410	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
411	<i>Intsia bijuga</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
412	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
413	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
414	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
415	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
417	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
418	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
419	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
420	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
421	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
422	<i>Intsia palembanica</i>	Forstgenetik, Thünen-Institut	D
423	<i>Swietenia humilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	B
424	<i>Terminalia catappa</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	A
425	<i>Caesalpinia spinosa</i>	Bot. Garten Frankfurt	B
426	<i>Caesalpinia spinosa</i>	Bot. Garten Frankfurt	B
437	<i>Terminalia catappa</i>	Bot. Garten der Stadt Köln	B
438	<i>Hymenaea courbaril</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	B
440	<i>Terminalia catappa</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	B
442	<i>Bulnesia arborea</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	B
444	<i>Myrocarpus frondosus</i>	Bot. Garten der Uni. Osnabrück	B
446	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Münster	B
447	<i>Khaya nyasica</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
448	<i>Pterocarpus indicus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
449	<i>Handroanthus chrysanthus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
450	<i>Toona sinensis</i>	Forstbot. Garten Göttingen	B

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
451	<i>Toona sinensis</i>	Späth-Arbor. Humb.-Uni. Berlin	B
452	<i>Cedrela odorata</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
453	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
455	<i>Guaiacum sanctum</i>	Bot. Garten der Uni. Ulm	B
456	<i>Khaya senegalensis</i>	Bot. Garten der Uni. Wien	B
457	<i>Khaya grandifolia</i>	Bot. Garten der Uni. Wien	B
458	<i>Terminalia bellirica</i>	Bot. Garten der Uni. Wien	B
459	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Ulm	B
461	<i>Dalbergia obovata</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
462	<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
463	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
464	<i>Terminalia arenicola</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
465	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
466	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
467	<i>Terminalia bentzoe</i>	Palmengarten Frankfurt	B
469	<i>Guaiacum sanctum</i>	Palmengarten Frankfurt	B
471	<i>Caesalpinia ferrea</i>	Bot. Garten der Uni. Bayreuth	B
474	<i>Dalbergia decipularis</i>	Max Cropp e.K.	S
477	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Max Cropp e.K.	S
482	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
483	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
486	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
487	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
489	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
491	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
492	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
493	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
499	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
500	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
504	<i>Azelia africana</i>	Bot. Garten der Uni. Rostock	B
505	<i>Khaya senegalensis</i>	Bot. Garten der Uni. Rostock	B
506	<i>Terminalia avicennioides</i>	Bot. Garten der Uni. Rostock	B
507	<i>Terminalia glaucescens</i>	Bot. Garten der Uni. Rostock	B
508	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten Nancy	B
509	<i>Bulnesia arborea</i>	Reiman Gardens, USA	B
510	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Marburg	B

# Anhang

Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
511	<i>Intsia bijuga</i>	Bot. Garten Hawaii	B
513	<i>Dalbergia sissoo</i>	Bot. Garten Hawaii	B
514	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten Hawaii	B
515	<i>Hymenaea courbaril</i>	Bot. Garten Hawaii	B
603	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Tübingen	B
604	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Heidelberg	B
605	<i>Guaiacum officinale</i>	Bot. Garten der Uni. Heidelberg	B
606	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
607	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
608	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
609	<i>Cedrela fissilis</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S
610	<i>Toona sinensis</i>	Bot. Garten der Uni. Ulm	B
611	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
612	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
613	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
614	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
615	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
616	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
617	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
618	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
619	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
620	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
621	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
622	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
623	<i>Gonystylus spec.</i>	Indonesien, Greenpeace	S
624	<i>Bowdichia nitida</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
625	<i>Caesalpinia ferrea</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
626	<i>Caesalpinia ferrea</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
627	<i>Caryocar glabrum</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
628	<i>Dalbergia sissoo</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
629	<i>Dalbergia spruceana</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
630	<i>Dalbergia latifolia</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
631	<i>Dalbergia nigra</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
632	<i>Dalbergia retusa</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
633	<i>Dalbergia spruceana</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
634	<i>Endospermum moluccanum</i>	DNA Bank Kew Gardens	D



Herbarnr.	Art	Herkunft	Form
635	<i>Neolamarckia cadamba</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
636	<i>Pterocarpus santalinus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
637	<i>Pterocarpus santalinus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
638	<i>Pterocarpus soyauxii</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
639	<i>Pterocarpus soyauxii</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
640	<i>Pterocarpus indicus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
641	<i>Pterocarpus indicus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
642	<i>Pterocarpus indicus</i>	DNA Bank Kew Gardens	D
643	<i>Caesalpinia echinata</i>	Holzforschung, Thünen-Institut	S

## 7.2 ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der Zygothylaceae sowie der Bignoniaceae

In Abbildung A 1 sind die jeweiligen ITS-Sequenzen der Individuen wiedergegeben, die in Punkt 3.2.2 zu Consensus-Sequenzen (Cons.) zusammengefasst wurden. Für jedes Individuum wird der ITS, bestehend aus ITS1+5.8S+ITS2, dargestellt. Jeder Sequenz ist die Herbarnummer und die entsprechende Consensus-Nr. vorangestellt. Tabelle A 2 gibt alle Individuen und deren Art wieder, die jeweils zu einer Consensus-Sequenz zusammengefasst wurden. Für die durchgeführte Pairwise-Distance Analyse führt Abbildung A 2 die errechneten Einzelwerte auf.

Tabelle A 2: Aufstellung der Individuen der Gattungen *Guaiacum* und *Handroanthus*, die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. Dargestellt sind die Nr. der Consensus-Sequenz (ID), die entsprechenden Herbarnummern sowie die Art.

ID	Art	Herbarnummer
Cons.1	<i>Guaiacum sanctum</i>	173, 231-233, 455, 469
Cons.2	<i>Guaiacum sanctum</i>	162
Cons.3	<i>Guaiacum officinale</i>	94, 101, 117, 119, 163, 167, 508, 510, 514, 603
Cons.4	<i>Guaiacum officinale</i>	156, 377, 604, 605
Cons.5	<i>Bulnesia arborea</i>	442, 509
Cons.6	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	446, 459, 463, 465, 466
Cons.7	<i>Handroanthus chrysanthus</i>	449

[illegible]

[illegible]

Cons.1 = *G. sanctum*: 173, 231, 232, 233, 455 und 469; Cons.2 = *G. sanctum*: 162;  
 Cons.3 = *G. officinale*: 94, 101, 117, 119, 163, 167, 508, 510, 514 und 603;  
 Cons.4 = *G. officinale*: 156, 377, 604 und 605; Cons.5 = *Bulnesia arborea*: 442 und 509;  
 Cons.6 = *H. impetiginosus*: 446, 459, 463, 465 und 466; Cons.7 = *H. chrysanthus*: 449

\* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

Nr.	ID	1	2	3	4	5	6
1	Cons.1						
2	Cons.2	0,015					
3	Cons.3	0,062	0,063				
4	Cons.4	0,053	0,056	0,023			
5	Cons.5	0,128	0,128	0,133	0,125		
6	Cons.6	0,296	0,293	0,291	0,287	0,284	
7	Cons.7	0,293	0,290	0,288	0,284	0,282	0,013

Abbildung A 2: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen der Zygophyllaceae und Bignoniaceae. Cons.1 = *Guaiacum sanctum*: 173, 231, 232, 233, 455 und 469; Cons.2 = *G. sanctum*: 162; Cons.3 = *G. officinale*: 94, 101, 117, 119, 163, 167, 508, 510, 514 und 603; Cons.4 = *G. officinale*: 156, 377, 604 und 605; Cons.5 = *Bulnesia arborea*: 442 und 509; Cons.6 = *Handroanthus impetiginosus*: 446, 459, 463, 465 und 466; Cons.7 = *H. chrysanthus*: 449.

### 7.3 ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der *Intsia*-Gruppe

In Abbildung A 3 sind die jeweiligen ITS-Sequenzen der Individuen wiedergegeben, welche in Punkt 3.2.3.1 zu Consensus-Sequenzen (Cons.) zusammengefasst wurden. Für jedes Individuum wird der ITS, bestehend aus ITS1+5.8S+ITS2, dargestellt. Jeder Sequenz ist die Herbarnummer und die entsprechende Consensus-Nr. vorangestellt. Des Weiteren gibt Tabelle A 3 alle Individuen und deren Art wieder, welche jeweils zu einer Consensus-Sequenz zusammengefasst wurden. Für die durchgeführte Pairwise-Distance Analyse führt Abbildung A 4 die errechneten Einzelwerte auf.

Tabelle A 3: Aufstellung der Individuen der Gattung *Intsia* sowie von *Afzelia africana*, welche zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. Dargestellt sind die Nr. der Consensus-Sequenz (ID), die entsprechenden Herbarnummern sowie die Art.

ID	Art	Herbarnummer
Cons.8	<i>Intsia bijuga</i>	85, 166, 204, 402-404, 407, 453
Cons.9	<i>Intsia bijuga</i>	81, 401, 405, 406, 408-411, 511
Cons.10	<i>Intsia palembanica</i>	399, 400, 413-415, 417-422
Cons.11	<i>Intsia palembanica</i>	205, 412
Cons.12	<i>Afzelia africana</i>	50, 504



## 227

[illegible]



```

85 Cons.8 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
166 Cons.8 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
204 Cons.8 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
402 Cons.8 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
403 Cons.8 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
404 Cons.8 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
407 Cons.8 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
453 Cons.8 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
81 Cons.9 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
401 Cons.9 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
405 Cons.9 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
406 Cons.9 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
408 Cons.9 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
409 Cons.9 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
410 Cons.9 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
411 Cons.9 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
511 Cons.9 TAACCTGAGGCGGGAGGGAGGAGGAGGACGGACGGACGCTTCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
399 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
400 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
413 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
414 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
415 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
417 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
418 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
419 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
420 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
421 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
422 Cons.10 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGAC-----CGCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
205 Cons.11 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGACCG--CCCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
412 Cons.11 TAACCTAAGGCGGGAGGGAGGGAGGACCG--CCCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
50 Cons.12 -----CCCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
504 Cons.12 -----CCCTCCGACCGGACCTCAGCTCAGGCAGGGCT
ruler .....700.....710.....720.....730.....740.....750.....

```

Abbildung A 3: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung *Intsia* sowie von *Afzelia africana*.

Dargestellt sind jene Individuen, die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden.

Cons.8 = *I. bijuga*: 85, 166, 204, 402-404, 407 und 453; Cons.9 = *I. bijuga*: 81, 401, 405, 406, 408-411 und 511; Cons.10 = *I. palembanica*: 399, 400, 413-415 und 417-422;

Cons.11 = *I. palembanica*: 205 und 412; Cons.12 = *A. africana*: 50 und 504. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

Nr.	ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Cons.8											
2	Cons.9	0,000										
3	Cons.10	0,027	0,028									
4	Cons.11	0,032	0,033	0,007								
5	Cons.12	0,111	0,110	0,107	0,107							
6	86	0,179	0,176	0,181	0,178	0,181						
7	170	0,208	0,208	0,209	0,205	0,214	0,129					
8	202	0,174	0,174	0,174	0,171	0,180	0,091	0,075				
9	201	0,177	0,177	0,178	0,176	0,185	0,086	0,080	0,021			
10	203	0,177	0,177	0,178	0,176	0,184	0,085	0,078	0,016	0,006		
11	438	0,177	0,176	0,180	0,177	0,185	0,090	0,080	0,031	0,016	0,021	
12	515	0,182	0,181	0,184	0,180	0,188	0,091	0,083	0,027	0,013	0,018	0,010

Abbildung A 4: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von *Intsia* spp., *Hymenaea courbaril* und *Afzelia africana*. Cons.8 = *I. bijuga*: 85, 166, 204, 402-404, 407 und 453; Cons.9 = *I. bijuga*: 81, 401, 405, 406, 408-411 und 511; Cons.10 = *I. palembanica*: 399, 400, 413-415 und 417-422; Cons.11 = *I. palembanica*: 205 und 412; Cons.12 = *A. africana*: 50 und 504; 86, 170, 201-203, 438 und 515 = *H. courbaril*.





Tabelle A 4: Aufstellung der Individuen der Gattung *Dalbergia*, die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. Dargestellt sind die Nr. der Consensus-Sequenz (ID), die entsprechenden Herbarnummern sowie die Art.

ID	Art	Herbarnummer
Cons.13	<i>Dalbergia nigra</i>	144, 631
Cons.14	<i>Dalbergia retusa</i>	143, 344, 632
Cons.15	<i>Dalbergia spruceana</i>	629, 633
Cons.16	<i>Dalbergia sissoo</i>	513, 628

Nr.	ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Cons.13									
2	Cons.14	0,086								
3	Cons.15	0,066	0,071							
4	Cons.16	0,070	0,099	0,091						
5	630	0,083	0,081	0,078	0,097					
6	378	0,065	0,092	0,082	0,070	0,088				
7	142	0,065	0,092	0,082	0,070	0,088	0,000			
8	474	0,077	0,108	0,079	0,084	0,101	0,071	0,071		
9	461	0,078	0,110	0,087	0,081	0,094	0,078	0,078	0,061	
10	341	0,108	0,112	0,105	0,110	0,112	0,114	0,114	0,121	0,126

Abbildung A 6: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von *Dalbergia* spp. und *Machaerium scleroxylon*. Cons.13 = *D. nigra*: 144 und 631; Cons.14 = *D. retusa*: 143, 344 und 632; Cons.15 = *D. spruceana*: 629 und 633; Cons.16 = *D. sissoo*: 513 und 628; 630 = *D. latifolia*; 378 = *D. melanoxyton*; 142 = *D. miscolobium*; 474 = *D. decipularis*; 461 = *D. obovata*; 341 = *M. scleroxylon*.

## 7.5 ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der Gattung *Caesalpinia* sowie von *Myrocarpus frondosus*

In Abbildung A 7 sind die jeweiligen ITS-Sequenzen der Individuen wiedergegeben, die in Punkt 3.2.3.3 zu Consensus-Sequenzen (Cons.) zusammengefasst wurden. Für jedes Individuum wird der ITS, bestehend aus ITS1+5.8S+ITS2, dargestellt. Jeder Sequenz ist die Herbarnummer und die entsprechende Consensus-Nr. vorangestellt. Des Weiteren gibt Tabelle A 5 alle Individuen und deren Art wieder, die jeweils zu einer Consensus-Sequenz zusammengefasst wurden. Für die durchgeführte Pairwise-Distance Analyse führt Abbildung A 8 die errechneten Einzelwerte auf.



Nr.	ID	1	2	3
1	Cons.17			
2	Cons.18	0,132		
3	Cons.19	0,104	0,145	
4	444	0,215	0,199	0,209

Abbildung A 8: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von *Caesalpinia* spp. und *Myrocarpus frondosus*. Cons.17 = *C. echinata*: 206, 207 und 643; Cons.18 = *C. ferrea*: 471, 625 und 626; Cons.19 = *C. spinosa*: 425 und 426; 444 = *M. frondosus*.

## 7.6 ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der Gattung *Pterocarpus*

In Abbildung A 10 sind die jeweiligen ITS-Sequenzen der Individuen wiedergegeben, welche in Punkt 3.2.3.4 zu Consensus-Sequenzen (Cons.) zusammengefasst wurden. Für jedes Individuum wird der ITS, bestehend aus ITS1+5.8S+ITS2, dargestellt. Die Herbarnummer und die entsprechende Consensus-Nr. sind jeder Sequenz vorangestellt. Tabelle A 6 gibt alle Individuen und deren Art wieder, welche jeweils zu einer Consensus-Sequenz zusammengefasst wurden. Für die durchgeführte Pairwise-Distance Analyse führt Abbildung A 9 die errechneten Einzelwerte auf.

Tabelle A 6: Aufstellung der Individuen der Gattung *Pterocarpus*, die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. Dargestellt sind die Nr. der Consensus-Sequenz (ID), die entsprechenden Herbarnummern sowie die Art.

ID	Art	Herbarnummer
Cons.20	<i>Pterocarpus santalinus</i>	636, 637
Cons.21	<i>Pterocarpus soyauxii</i>	638, 639
Cons.22	<i>Pterocarpus indicus</i>	448, 640, 641

Nr.	ID	1	2	3	4	5	6	7	8
1	637								
2	636	0,002							
3	638	0,054	0,054						
4	639	0,049	0,049	0,005					
5	641	0,031	0,033	0,064	0,059				
6	640	0,031	0,033	0,064	0,059	0,000			
7	642	0,034	0,035	0,064	0,059	0,002	0,002		
8	448	0,031	0,033	0,064	0,059	0,000	0,000	0,002	
9	462	0,035	0,037	0,059	0,059	0,008	0,008	0,008	0,008

Abbildung A 9: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen der Gattung *Pterocarpus*.  
 462 = *P. macrocarpus* ; 636 und 637 = *P. santalinus*; 638 und 639 = *P. soyauxii*; 448 und  
 640-642 = *P. indicus*.

```

636_Cons.20 ATGCTTCACAAATCCAGTGCACCCGGAACGTGTTTCCACACGGCAGGCATGCTGCTGGCAGCTCGGTGCCCCGGTCCGGAACGGGCATCACGCCCTGTGCGTGG
637_Cons.20 ATGCTTCACAAATCCAGTGCACCCGGAACGTGTTTCCACACGGCAGGCATGCTGCTGGCAGCTCGGTGCCCCGGTCCGGAACGGGCATCACGCCCTGTGCGTGG
638_Cons.21 .....
639_Cons.21 .....
448_Cons.22 ATGCTTCACAAATCCAGTGCACCCGGAACGTGTTTCCACACGGCAGGCATGCTGCTGGC-----TGCCCCGGTCCGGAACGGGCATCACGCCCTGTGCGTGG
640_Cons.22 ATGCTTCACAAATCCAGTGCACCCGGAACGTGTTTCCACACGGCAGGCATGCTGCTGGC-----TGCCCCGGTCCGGAACGGGCATCACGCCCTGTGCGTGG
641_Cons.22 ATGCTTCACAAATCCAGTGCACCCGGAACGTGTTTCCACACGGCAGGCATGCTGCTGGC-----TGCCCCGGTCCGGAACGGGCATCACGCCCTGTGCGTGG
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....

636_Cons.20 GGCCCTGTCGCCGCACACAAACAAA-CCCCGGCGGGAATGCGCAAGGAAGTCGTAACGTGTTGGTCCCGACCCCTTCGGCCGGAACGGTCTCTACGGCGGCGCCG
637_Cons.20 GGCCCTGTCGCCGCACACAAACAAA-CCCCGGCGGGAATGCGCAAGGAAGTCGTAACGTGTTGGTCCCGACCCCTTCGGCCGGAACGGTCTCTACGGCGGCGCCG
638_Cons.21 .....
639_Cons.21 .....
448_Cons.22 GGCCCTGTCGCCGCACACAAACAAA-CCCCGGCGGGAATGCGCAAGGAAGTCGTAACGTGTTGGTCCCGACCCCTTCGGCCGGAACGGTCTCTACGGCGGCGCCG
640_Cons.22 GGCCCTGTCGCCGCACACAAACAAA-CCCCGGCGGGAATGCGCAAGGAAGTCGTAACGTGTTGGTCCCGACCCCTTCGGCCGGAACGGTCTCTACGGCGGCGCCG
641_Cons.22 GGCCCTGTCGCCGCACACAAACAAA-CCCCGGCGGGAATGCGCAAGGAAGTCGTAACGTGTTGGTCCCGACCCCTTCGGCCGGAACGGTCTCTACGGCGGCGCCG
ruler ..120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230

*****
636_Cons.20 CAACACACTCAGTCTGAACGACTCTCGCAACGGATATCTCGGCTCTTCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCG
637_Cons.20 CAACACACTCAGTCTGAACGACTCTCGCAACGGATATCTCGGCTCTTCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCG
638_Cons.21 .....
639_Cons.21 .....
448_Cons.22 CAACACACTCAGTCTGAACGACTCTCGCAACGGATATCTCGGCTCTTCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCG
640_Cons.22 CAACACACTCAGTCTGAACGACTCTCGCAACGGATATCTCGGCTCTTCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCG
641_Cons.22 CAACACACTCAGTCTGAACGACTCTCGCAACGGATATCTCGGCTCTTCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCG
ruler .....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....

*****
636_Cons.20 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGGAAGCCATTAGGCTAAGGGCACGCTCGCTGGGTGTCAAGAACTGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCGGGCGGGCGGGCG
637_Cons.20 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGGAAGCCATTAGGCTAAGGGCACGCTCGCTGGGTGTCAAGAACTGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCGGGCGGGCGGGCG
638_Cons.21 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGGAAGCCATTAGGCTAAGGGCACGCTCGCTGGGTGTCAAGAACTGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCGGGCGGGCGGGCG
639_Cons.21 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGGAAGCCATTAGGCTAAGGGCACGCTCGCTGGGTGTCAAGAACTGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCGGGCGGGCGGGCG
448_Cons.22 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGGAAGCCATTAGGCTAAGGGCACGCTCGCTGGGTGTCAAGAACTGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCGGGCGGGCGGGCG
640_Cons.22 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGGAAGCCATTAGGCTAAGGGCACGCTCGCTGGGTGTCAAGAACTGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCGGGCGGGCGGGCG
641_Cons.22 AGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGGAAGCCATTAGGCTAAGGGCACGCTCGCTGGGTGTCAAGAACTGTTGCCCAATC---CCCGCGCTCTAGGCGCGGGCGGGCGGGCG
ruler ..350.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450.....460

*****
636_Cons.20 AATCTGCTTCCCTTGAGCGAGTGCCTCGCGTTGCGCCAAAATCGGTTCTGTTGGTGGAGGTAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTCCCAATCTCAGGCCAGTCTGCGCG
637_Cons.20 AATCTGCTTCCCTTGAGCGAGTGCCTCGCGTTGCGCCAAAATCGGTTCTGTTGGTGGAGGTAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTCCCAATCTCAGGCCAGTCTGCGCG
638_Cons.21 AATCTGCTTCCCTTGAGCGAGTGCCTCGCGTTGCGCCAAAATCGGTTCTGTTGGTGGAGGTAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTCCCAATCTCAGGCCAGTCTGCGCG
639_Cons.21 AATCTGCTTCCCTTGAGCGAGTGCCTCGCGTTGCGCCAAAATCGGTTCTGTTGGTGGAGGTAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTCCCAATCTCAGGCCAGTCTGCGCG
448_Cons.22 AATCTGCTTCCCTTGAGCGAGTGCCTCGCGTTGCGCCAAAATCGGTTCTGTTGGTGGAGGTAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTCCCAATCTCAGGCCAGTCTGCGCG
640_Cons.22 AATCTGCTTCCCTTGAGCGAGTGCCTCGCGTTGCGCCAAAATCGGTTCTGTTGGTGGAGGTAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTCCCAATCTCAGGCCAGTCTGCGCG
641_Cons.22 AATCTGCTTCCCTTGAGCGAGTGCCTCGCGTTGCGCCAAAATCGGTTCTGTTGGTGGAGGTAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGTCCCAATCTCAGGCCAGTCTGCGCG
ruler .....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....

*****
636_Cons.20 GTCCCTTCGGCTAGTTACGGACTCCGTGACCCGTG-AGCGGCACCGATGCCCATGATCGGACCTCAGGTCAAGCGGGGCT
637_Cons.20 GTCCCTTCGGCTAGTTACGGACTCCGTGACCCGTG-AGCGGCACCGATGCCCATGATCGGACCTCAGGTCAAGCGGGGCT
638_Cons.21 GTCCCTTCGGCTAGTTACGGACTCCGTGACCCGTGAGGCGCGCACCGATGCCCATGATCGGACCTCAGGTCAAGCGGGGCT
639_Cons.21 GTCCCTTCGGCTAGTTACGGACTCCGTGACCCGTGAGGCGCGCACCGATGCCCATGATCGGACCTCAGGTCAAGCGGGGCT
448_Cons.22 GTCCCTTCGGCTAGTTACGGACTCCGTGACCCAAC-AAAGGATCGATGCCCATGATCGGACCTCAGGTCAAGCGGGGCT
640_Cons.22 GTCCCTTCGGCTAGTTACGGACTCCGTGACCCAAC-AAAGGATCGATGCCCATGATCGGACCTCAGGTCAAGCGGGGCT
641_Cons.22 GTCCCTTCGGCTAGTTACGGACTCCGTGACCCAAC-AAAGGATCGATGCCCATGATCGGACCTCAGGTCAAGCGGGGCT
ruler ..580.....590.....600.....610.....620.....630.....640.....650.....

```

Abbildung A 10: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung *Pterocarpus*. Dargestellt sind jene Individuen, die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. Cons.20 = *P. santalinus*: 636 und 637; Cons.21 = *P. soyauxii*: 638 und 639; Cons.22 = *P. indicus*: 448, 640 und 641.  
 \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

## 7.7 ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse der Gattung *Bowdichia*

In Abbildung A 11 sind die jeweiligen ITS-Sequenzen der Individuen wiedergegeben, die in Punkt 3.2.3.5 zu Consensus-Sequenzen (Cons.) zusammengefasst wurden. Für jedes Individuum wird der ITS, bestehend aus ITS1+5.8S+ITS2, dargestellt. Jeder Sequenz ist die GenBank-Nr. und die entsprechende Consensus-Nr. vorangestellt. Tabelle A 7 gibt alle Individuen und deren Art wieder, die jeweils zu einer Consensus-Sequenz zusammengefasst wurden. Für die durchgeführte Pairwise-Distance Analyse führt Abbildung A 12 die errechneten Einzelwerte auf.

```

*****
JX124477.1 Cons.23 AAGCCTCAGAGCAGCGCGACCCGCGAATCCGTTTCAGCGCGGGGGGTGTGCCCGCCCTCGCTCGGGCTGGGAGGCCCGCCGCTGCGCGGGTCTCTCTCTGGCCGAGCAGA
JX124478.1 Cons.23 AAGCCTCAGAGCAGCGCGACCCGCGAATCCGTTTCAGCGCGGGGGGTGTGCCCGCCCTCGCTCGGGCTGGGAGGCCCGCCGCTGCGCGGGTCTCTCTCTGGCCGAGCAGA
JX124479.1 Cons.23 AAGCCTCAGAGCAGCGCGACCCGCGAATCCGTTTCAGCGCGGGGGGTGTGCCCGCCCTCGCTCGGGCTGGGAGGCCCGCCGCTGCGCGGGTCTCTCTCTGGCCGAGCAGA
JX124475.1 Cons.24 AAGCCTCAGAGCAGCGCGACCCGCGAATCCGTTTCAGCGCGGGGGGTGTGCCCGCCCTCGCTCGGGCTGGGAGGCCCGCCGCTGCGCGGGTCTCTCTCTGGCCGAGCAGA
JX124476.1 Cons.24 TAGCCTCAGAGCAGCGCGACCCGCGAATCCGTTTCAGCGCGGGGGGTGTGCCCGCCCTCGCTCGGGCTGGGAGGCCCGCCGCTGCGCGGGTCTCTCTCTGGCCGAGCAGA
EF457709.1 Cons.24 AAGCCTCAGAGCAGCGCGACCCGCGAATCCGTTTCAGCGCGGGGGGTGTGCCCGCCCTCGCTCGGGCTGGGAGGCCCGCCGCTGCGCGGGTCTCTCTCTGGCCGAGCAGA
ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....

*****
JX124477.1 Cons.23 AACTAAAAAGAACCCCGCGCCGAATCGCCCAAGGAATCCGAATCGTTCTGTGCGCCCCCTCGGCCCGGGGACGGTCCCGCTGCGGGTGGCGTCCGGAAGCGCGAATGAAAAAT
JX124478.1 Cons.23 AACTAAAAAGAACCCCGCGCCGAATCGCCCAAGGAATCCGAATCGTTCTGTGCGCCCCCTCGGCCCGGGGACGGTCCCGCTGCGGGTGGCGTCCGGAAGCGCGAATGAAAAAT
JX124479.1 Cons.23 AACTAAAAAGAACCCCGCGCCGAATCGCCCAAGGAATCCGAATCGTTCTGTGCGCCCCCTCGGCCCGGGGACGGTCCCGCTGCGGGTGGCGTCCGGAAGCGCGAATGAAAAAT
JX124475.1 Cons.24 AACTAAAAAGAACCCCGCGCCGAATCGCCCAAGGAATCCGAATCGTTCTGTGCGCCCCCTCGGCCCGGGGACGGTCCCGCTGCGGGTGGCGTCCGGAAGCGCGAATGAAAAAT
JX124476.1 Cons.24 AACTAAAAAGAACCCCGCGCCGAATCGCCCAAGGAATCCGAATCGTTCTGTGCGCCCCCTCGGCCCGGGGACGGTCCCGCTGCGGGTGGCGTCCGGAAGCGCGAATGAAAAAT
EF457709.1 Cons.24 AACTAAAAAGAACCCCGCGCCGAATCGCCCAAGGAATCCGAATCGTTCTGTGCGCCCCCTCGGCCCGGGGACGGTCCCGCTGCGGGTGGCGTCCGGAAGCGCGAATGAAAAAT
ruler ..120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230

*****
JX124477.1 Cons.23 CCAAAATGACTCTCGGCACACGGATATCTCGGCTCTTTCATCGATGAAGAACCTAGCGAAATGCGATCTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCGA
JX124478.1 Cons.23 CCAAAATGACTCTCGGCACACGGATATCTCGGCTCTTTCATCGATGAAGAACCTAGCGAAATGCGATCTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCGA
JX124479.1 Cons.23 CCAAAATGACTCTCGGCACACGGATATCTCGGCTCTTTCATCGATGAAGAACCTAGCGAAATGCGATCTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCGA
JX124475.1 Cons.24 CCAAAATGACTCTCGGCACACGGATATCTCGGCTCTTTCATCGATGAAGAACCTAGCGAAATGCGATCTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCGA
JX124476.1 Cons.24 CCAAAATGACTCTCGGCACACGGATATCTCGGCTCTTTCATCGATGAAGAACCTAGCGAAATGCGATCTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCGA
EF457709.1 Cons.24 CCAAAATGACTCTCGGCACACGGATATCTCGGCTCTTTCATCGATGAAGAACCTAGCGAAATGCGATCTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCGA
ruler .....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....

*****
JX124477.1 Cons.23 AGTTGCGCCCGAAGCCACACAGGCTGAGGGCACGCTGCTGGGCGTCCGCACATCCTTGCCCCAGATGCCCGTCCCCCGCCCGCAGGGGGGGCACCAGCGGGGGCAGCGCTGGC
JX124478.1 Cons.23 AGTTGCGCCCGAAGCCACACAGGCTGAGGGCACGCTGCTGGGCGTCCGCACATCCTTGCCCCAGATGCCCGTCCCCCGCCCGCAGGGGGGGCACCAGCGGGGGCAGCGCTGGC
JX124479.1 Cons.23 AGTTGCGCCCGAAGCCACACAGGCTGAGGGCACGCTGCTGGGCGTCCGCACATCCTTGCCCCAGATGCCCGTCCCCCGCCCGCAGGGGGGGCACCAGCGGGGGCAGCGCTGGC
JX124475.1 Cons.24 AGTTGCGCCCGAAGCCACACAGGCTGAGGGCACGCTGCTGGGCGTCCGCACATCCTTGCCCCAGATGCCCGTCCCCCGCCCGCAGGGGGGGCACCAGCGGGGGCAGCGCTGGC
JX124476.1 Cons.24 AGTTGCGCCCGAAGCCACACAGGCTGAGGGCACGCTGCTGGGCGTCCGCACATCCTTGCCCCAGATGCCCGTCCCCCGCCCGCAGGGGGGGCACCAGCGGGGGCAGCGCTGGC
EF457709.1 Cons.24 AGTTGCGCCCGAAGCCACACAGGCTGAGGGCACGCTGCTGGGCGTCCGCACATCCTTGCCCCAGATGCCCGTCCCCCGCCCGCAGGGGGGGCACCAGCGGGGGCAGCGCTGGC
ruler ..350.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450.....460

*****
JX124477.1 Cons.23 CTCCCCGTAGGAGACGCTCGCGGCTGGCTGAAATCGAGTCCGTTGGCGGGGCGACCCGAGGGATGGTGGTTGAGTGAGAGCTCGAGACCACTCGCGCTGTCTGGTCCCTCCGG
JX124478.1 Cons.23 CTCCCCGTAGGAGACGCTCGCGGCTGGCTGAAATCGAGTCCGTTGGCGGGGCGACCCGAGGGATGGTGGTTGAGTGAGAGCTCGAGACCACTCGCGCTGTCTGGTCCCTCCGG
JX124479.1 Cons.23 CTCCCCGTAGGAGACGCTCGCGGCTGGCTGAAATCGAGTCCGTTGGCGGGGCGACCCGAGGGATGGTGGTTGAGTGAGAGCTCGAGACCACTCGCGCTGTCTGGTCCCTCCGG
JX124475.1 Cons.24 CTCCCCGTAGGAGACGCTCGCGGCTGGCTGAAATCGAGTCCGTTGGCGGGGCGACCCGAGGGATGGTGGTTGAGTGAGAGCTCGAGACCACTCGCGCTGTCTGGG-CCCTCCGG
JX124476.1 Cons.24 CTCCCCGTAGGAGACGCTCGCGGCTGGCTGAAATCGAGTCCGTTGGCGGGGCGACCCGAGGGATGGTGGTTGAGTGAGAGCTCGAGACCACTCGCGCTGTCTGGG-CCCTCCGG
EF457709.1 Cons.24 CTCCCCGTAGGAGACGCTCGCGGCTGGCTGAAATCGAGTCCGTTGGCGGGGCGACCCGAGGGATGGTGGTTGAGTGAGAGCTCGAGACCACTCGCGCTGTCTGGG-CCCTCCGG
ruler .....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....

*****
JX124477.1 Cons.23 CCTCGGGACTCCTGACCCACGTGCGGCGGTGTTGGCCGCCCAACAGGACCTCAGGTCAGCGGGGCT
JX124478.1 Cons.23 CCTCGGGACTCCTGACCCACGTGCGGCGGTGTTGGCCGCCCAACAGGACCTCAGGTCAGCGGGGCT
JX124479.1 Cons.23 CCTCGGGACTCCTGACCCACGTGCGGCGGTGTTGGCCGCCCAACAGGACCTCAGGTCAGCGGGGCT
JX124475.1 Cons.24 CCTCGGGACTCCTGACCCACGTGCGGCGGTGTTGGCCGCCCAACAGGACCTCAGGTCAGCGGGGCT
JX124476.1 Cons.24 CCTCGGGACTCCTGACCCACGTGCGGCGGTGTTGGCCGCCCAACAGGACCTCAGGTCAGCGGGGCT
EF457709.1 Cons.24 CCTCGGGACTCCTGACCCACGTGCGGCGGTGTTGGCCGCCCAACAGG
ruler ..580.....590.....600.....610.....620.....630.....640.....

```

Abbildung A 11: Alignment der ITS-Sequenzen der Gattung *Bowdichia*. Dargestellt sind jene Individuen, die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. Cons.23 = *Bowdichia nitida* mit GenBank-Nr.: JX124477.1, JX124478.1 und JX124479.1; Cons.24 = *Bowdichia virgilioides* mit GenBank-Nr.: JX124475.1, JX124476.1 und EF457709.1. \* = Position mit identischer Base für alle Sequenzen.

Tabelle A 7: Aufstellung der Individuen der Gattung *Bowdichia*, die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. Dargestellt sind die Nr. der Consensus-Sequenz (ID), die entsprechenden GenBank-Nr. sowie die Art.

ID	Art	GenBank-Nr.
Cons.23	<i>Bowdichia nitida</i>	JX124477.1, JX124478.1, JX124479.1
Cons.24	<i>Bowdichia virgilioides</i>	JX124475.1, JX124476.1, EF457709.1

Nr	ID	1	2	3	4	5	6
1	624						
2	JX124479.1	0,000					
3	JX124477.1	0,003	0,003				
4	JX124478.1	0,000	0,000	0,002			
5	EF457709.1	0,005	0,005	0,002	0,003		
6	JX124475.1	0,006	0,006	0,003	0,005	0,003	
7	JX124476.1	0,003	0,003	0,003	0,003	0,005	0,006

Abbildung A 12: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von *Bowdichia nitida* und *B. virgilioides*. 624 = *B. nitida*; GenBank-Nr. JX124477.1, JX124478.1 und JX124479.1 = *B. nitida*; GenBank-Nr. JX124475.1, JX124476.1 und EF457709.1 = *B. virgilioides*.

## 7.8 ITS-Sequenzen und Pairwise-Distance Analyse von *Gonystylus* spp., *Terminalia* spp., *Endospermum moluccanum* und *Neolamarckia cadamba*

In Abbildung A 14 sind die jeweiligen ITS-Sequenzen der Individuen wiedergegeben, die in Punkt 3.2.5 zu Consensus-Sequenzen (Cons.) zusammengefasst wurden. Für jedes Individuum wird der ITS, bestehend aus ITS1+5.8S+ITS2, dargestellt. Die Herbarnummer und die entsprechende Consensus-Nr. sind jeder Sequenz vorangestellt. Weiterhin gibt Tabelle A 8 alle Individuen und deren Art wieder, die jeweils zu einer Consensus-Sequenz zusammengefasst wurden.

Für die durchgeführte Pairwise-Distance Analyse führt Abbildung A 13 die errechneten Einzelwerte auf.

Tabelle A 8: Aufstellung der Individuen der Gattungen *Gonystylus* und *Terminalia*, welche zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden. Dargestellt sind die Nr. der Consensus-Sequenz (ID), die entsprechenden Herbarnummern sowie die Art.

ID	Art	Herbarnummer
Cons.25	<i>Gonystylus bancanus</i>	244, 247
Cons.26	<i>Gonystylus</i> spec.	482, 489, 491-493, 499, 614-617, 619, 621, 623
Cons.27	<i>Gonystylus</i> spec.	483, 487, 500
Cons.28	<i>Gonystylus</i> spec.	611-613, 618, 620, 622
Cons.29	<i>Terminalia bentzoe</i>	174, 467
Cons.30	<i>Terminalia catappa</i>	172, 424, 437, 440

Nr.	ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Cons.25												
2	Cons.26	0,000											
3	Cons.27	0,000	0,000										
4	486	0,004	0,004	0,004									
5	Cons.28	0,025	0,025	0,025	0,026								
6	634	0,319	0,319	0,320	0,319	0,316							
7	635	0,265	0,265	0,266	0,269	0,276	0,348						
8	Cons.29	0,326	0,326	0,327	0,326	0,318	0,258	0,342					
9	Cons.30	0,329	0,329	0,330	0,329	0,322	0,253	0,338	0,022				
10	458	0,324	0,324	0,325	0,324	0,319	0,253	0,327	0,081	0,092			
11	506	0,332	0,332	0,333	0,332	0,324	0,256	0,340	0,036	0,041	0,084		
12	464	0,330	0,330	0,331	0,330	0,324	0,258	0,344	0,028	0,014	0,089	0,045	
13	507	0,332	0,332	0,333	0,332	0,324	0,256	0,340	0,036	0,041	0,084	0,000	0,045

Abbildung A 13: Evolutionäre Divergenz zwischen den ITS-Sequenzen von *Gonystylus* spp., *Terminalia* spp., *Endospermum moluccanum* und *Neolamarckia cadamba*.  
 Cons.25 = *G. bancanus*: 244 und 247; Cons.26 = *G. spec.*: 482, 489, 491-493, 499, 614-617, 619, 621 und 623; Cons.27 = *G. spec.*: 483, 487 und 500; Cons.28 = *G. spec.*: 611-613, 618, 620 und 622; Cons.29 = *T. bentzoe*: 174 und 467; Cons.30 = *T. catappa*: 172, 424, 437 und 440;  
 458 = *T. bellirica*; 464 = *T. arenicola*; 486 = *G. spec.*; 506 = *T. avicennioides*;  
 507 = *T. glaucescens*; 634 = *E. moluccanum*; 635 = *N. cadamba*.



[illegible]



[illegible]

Dargestellt sind jene Individuen, die zu Consensus-Sequenzen zusammengefasst wurden.  
 Cons.25 = *Gonystylus bancanus*: 244 und 247; Cons.26 = *Gonystylus* spec.: 482, 489, 491-493,  
 499, 614-617, 619, 621 und 623; Cons.27 = *Gonystylus* spec.: 483, 487 und 500;  
 Cons.28 = *Gonystylus* spec.: 611-613, 618, 620 und 622; Cons.29 = *Terminalia bentzoe*: 174  
 und 467; Cons.30 = *T. catappa*: 172, 424, 437 und 440. \* = Position mit identischer Base für  
 alle Sequenzen.

---

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen sowie Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Außerdem erkläre ich, dass ich mich weder an einer anderen Universität um eine Promotion beworben, noch die Dissertation an einer anderen Universität eingereicht habe.

Hamburg, September 2014

---

(Niko Wischnewski)