

Dissertation

Entwicklung eines DNA-Macroarrays zur molekularbiologischen
Identifizierung handelsrelevanter CITES-Holzarten und
ihrer Substitutionshölzer

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

Vorgelegt von
Anna Cordelia Bogun
Hamburg 2023

Erstgutachterin: **Frau Prof. Dr. Elisabeth Magel**
Universität Hamburg
Zentrum Holzwirtschaft
Leuschnerstraße 91
21031 Hamburg

Zweitgutachter: **Herr PD Dr. habil. Gerald Koch**
Thünen-Institut für Holzforschung
Leuschnerstraße 91
21031 Hamburg

Datum der Disputation: **12. Mai 2023**

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir bei der vorliegenden Arbeit geholfen haben. Ohne diese breite Unterstützung wäre das Projekt nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Magel, die nun seit fast 10 Jahren meine Abschlüsse begleitet und jede meiner Abschlussarbeiten betreut und begutachtet hat. Herrn Dr. Gerald Koch danke ich ebenfalls für die Betreuung, das Insiderwissen zum Thema Artenschutz und seine Formulierungsvorschläge.

Die vorliegende Promotion wurde durch die Deutsche Bundesstiftung für Umwelt mit einem Stipendium gefördert. Dafür danke ich allen am Auswahlprogramm beteiligten Personen sowie bei allen Betreuern unserer schönen Stipendiatentreffen.

Für das zur Verfügung stellen von Probenmaterial und den Weg dorthin danke ich besonders Dr. Nele Schmitz (Thünen-Institut), Dr. Olivier Hardy (Université Libre de Bruxelles), Juliane Lemke, Johannes Schwegler und Panduh Tukat (Fairventures Worldwide FVW gGmbH), Dr. Kathelyn Paredes-Villanueva, Dr. William Hawthorne und Dr. Stephen Harris (University of Oxford), den Mitarbeitern der Botanischen Gärten Leipzig, Utrecht und der Wilhelma in Stuttgart sowie des Honolulu Botanical Gardens (Hawaii) und des Meise Botanical Garden (Belgien).

Weiterhin möchte ich unserer technischen Assistenz Olaf Polak, Maria Heyens und Katharina Erdt danken, für die stets offenen Ohren und die hilfreiche Unterstützung im Labor.

Mein Dank geht ebenfalls an Dr. Immo Heinz und Sergej Kaschuro für die Unterstützung beim Mikroskopieren, die zahlreichen Mitfahrgelegenheiten und dem Zuhören bei so mancher Sorge.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Emilin Joma da Silva und Justus Schöpfer für das gemeinsame Durchstehen dieser 4 Jahre.

Außerdem danke ich meiner Familie für den mentalen und finanziellen Beistand und das ständige Korrekturlesen dieser Dissertation.

Inhaltsverzeichnis




Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Zusammenfassung.....	VIII
Abstract.....	X
1 Einleitung.....	1
2 Stand des Wissens	3
2.1 Holzartenerkennung.....	3
2.1.1 Anatomische Strukturmerkmale.....	4
2.1.2 Genetische Analyse.....	7
2.2 DNA-Extraktion und Amplifizierung	9
2.3 DNA-Barcoding.....	14
2.4 Macroarray-Technologie	18
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Material.....	21
3.1.1 Geräte.....	21
3.1.2 Chemikalien	22
3.1.3 Kits	22
3.1.4 Programme und Online-Dienstleistungen	23
3.1.5 Probenmaterial	23
3.2 Methoden	25
3.2.1 DNA-Isolierung.....	26
3.2.2 Quantifizierung der Nukleinsäure-Konzentration.....	27
3.2.3 Amplifizierung der ITS-Region der nrDNA.....	27
3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	29
3.2.5 Aufreinigung und Sequenzierung	29
3.2.6 Sequenzanalyse	29
3.2.7 Oligo-Design.....	31
3.2.8 Macroarray	32

3.2.9	Manuelle Auswertung der Röntgenfilme.....	36
3.2.10	Automatische Auswertung der Röntgenfilme	37
3.2.11	Kreuztests	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Erstellung der ITS-Sequenzen.....	42
4.1.1	MELIACEAE	46
4.1.2	FABACEAE	51
4.1.3	Ramin (<i>Gonystylus</i> spp.) und look-alike species	54
4.1.4	Pockholz (<i>Guaiacum</i> spp.) und look-alike species	58
4.2	DIG-labeling PCR.....	61
4.3	Oligo Design	62
4.4	Macroarray.....	67
4.4.1	Optimierung des Protokolls	67
4.4.2	Kreuztests in den einzelnen Gruppen.....	67
4.4.2.1	MELIACEAE	68
4.4.2.2	FABACEAE.....	69
4.4.2.3	Ramin und Pockholz.....	69
4.4.3	Gesamt-Kreuztest	74
4.4.3.1	Vergleich manuelle und automatisierte Auswertung.....	74
4.5	Einschätzung der Sonden	79
5	Diskussion.....	86
5.1	Verwendetes Probenmaterial und DNA-Isolation	86
5.2	Amplifizierung	88
5.3	Barcode	89
5.4	Oligo-Design	90
5.5	Probleme bei der Auswertung der Macroarrays.....	90
5.6	Vorteile der automatisierten Auswertung der Hybridisierungsreaktionen.	92
5.7	Einschätzung der Sonden	93
5.8	Vor- und Nachteile der Macroarray-Methode	95
5.9	Ausblick	97
6	Literaturverzeichnis	XVIII
7	Anhang	XXVI
	Eidesstattliche Erklärung.....	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AP	Alkaline Phosphatase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOL	Barcode of Life
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
C	Cytosin
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna
COI	Cytochrome c Oxidase I
cpDNA	Chloroplast DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosid triphosphate
dUTP	Desoxyuridine triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU	Europäische Union
EUTR	European Timber Regulation
G	Guanin
IAWA	International Association of Wood Anatomists
ITS	Internal Transcribed Spacer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
mtDNA	Mitochondrial DNA
NaOAc	Natriumacetat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIR	Near Infra Red
NLS	N-Laurylsarcosin
nrDNA	Nuclear ribosomal DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTB	N-Phenacylthiazoliumbromid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Saline-sodium citrate
STTC	Sustainable Tropical Timber Coalition
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime
UV	Ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Methoden der Holznachverfolgung und ihre Anwendungsunterschiede (modifiziert nach Lowe et al., 2011)	4
Abbildung 2 Mikroskopische Radialschnitte von <i>P. santalinus</i> (links) und <i>P. soyauxii</i> (rechts); HS = Holzstrahl	6
Abbildung 3 Schematische Darstellung der genetischen Holzartenidentifizierung	7
Abbildung 4 Schematische Darstellung eines Macroarrays	19
Abbildung 5 Schematische Darstellung des Uridins mit DIG	20
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Chemilumineszenz-Reaktion (modifiziert nach Lottspeich and Engels (2012))	20
Abbildung 7 Fließschema der Arbeitsschritte	26
Abbildung 8 Abfolge der Arbeitsschritte in der Geneious Prime Software	30
Abbildung 9 Beschriftungsschema der Oligos	31
Abbildung 10 Darstellung der manuellen Röntgenbildauswertung	36
Abbildung 11 Automatisierte Messung der Hybridisierungsreaktion	39
Abbildung 12 Aufbringungsraaster der Sonden	41
Abbildung 13 Darstellung der Banden auf zwei Gelen am Beispiel der PCR Nr. 42 und PCR Nr. 44	43
Abbildung 14 Alignment aller vorhandenen <i>C. procera</i> Sequenzen; die jeweils erste Zeile zeigt die daraus erstellte Konsensus-Sequenz	45
Abbildung 15 Darstellung der Pairwise-Distance-Analyse innerhalb der Gruppe der MELIACEAE	48
Abbildung 16-1 Alignment der Konsensus-Sequenzen aller untersuchten MELIACEAE-Arten	49
Abbildung 17 Darstellung der Pairwise-Distance-Analyse innerhalb der Gruppe der FABACEAE	52
Abbildung 18 Alignment der Konsensus-Sequenzen aller untersuchten FABACEAE-Arten	53
Abbildung 19 Darstellung der Pairwise-Distance-Analyse innerhalb der Gruppe Ramin und look-alike species	55
Abbildung 20 Alignment der Konsensus-Sequenzen aller untersuchten Arten der Gruppe Ramin und look-alike species	57
Abbildung 21 Darstellung der Pairwise-Distance-Analyse innerhalb der Gruppe Pockholz und look-alike species	59
Abbildung 22 Alignment der Konsensus-Sequenzen aller untersuchten Arten der Gruppe Pockholz und look-alike species	60
Abbildung 23 Gelbild, Auftrag ungelabelter und DIG-gelabelter PCR-Produkte im Wechsel	61
Abbildung 24 Alignment aller Konsensus-Sequenzen zusammen mit den jeweils designten Oligos	64
Abbildung 25 Ergebnisse der Sondenreaktionen in den einzelnen Versuchen der Gruppe der MELIACEAE; Spalte 2 Zsf: „  “ = Sonde reagierte „richtig positiv“ in allen Versuchen und zeigte maximal eine Fehlreaktion, „  “ = Sonde zeigte einige schwache Fehlreaktionen, „  “ = Sonde reagierte eindeutig	

„falsch“; Kreuztest: „+“ = schwache Reaktion, „++“ = deutliche Reaktion, „+++“ = starke Reaktion, „-“ = keine Reaktion, grün = „richtig positiv“, rot = „falsch positiv“	71
Abbildung 26 Ergebnisse der Sondenreaktionen in den einzelnen Versuchen der Gruppe der FABACEAE; Spalte 2 Zsf: „+“ = Sonde reagierte „richtig positiv“ in allen Versuchen und zeigte maximal eine Fehlreaktion, „++“ = Sonde zeigte einige schwache Fehlreaktionen, „+“ = Sonde reagierte eindeutig „falsch“; Kreuztest: „+“ = schwache Reaktion, „++“ = deutliche Reaktion, „+++“ = starke Reaktion, „-“ = keine Reaktion, grün = „richtig positiv“, rot = „falsch positiv“	72
Abbildung 27 Ergebnisse der Sondenreaktionen in den einzelnen Versuchen der Gruppe „Ramin und Pockholz“; Spalte 2 Zsf: „+“ = Sonde reagierte „richtig positiv“ in allen Versuchen und zeigte maximal eine Fehlreaktion, „++“ = Sonde zeigte einige schwache Fehlreaktionen, „+“ = Sonde reagierte eindeutig „falsch“; Kreuztest: „+“ = schwache Reaktion, „++“ = deutliche Reaktion, „+++“ = starke Reaktion, „-“ = keine Reaktion, grün = „richtig positiv“, rot = „falsch positiv“.....	73
Abbildung 28 Ergebnisse der manuellen Auswertung der Gesamt-Kreuztests.....	76
Abbildung 29 Ergebnisse der automatisierten Auswertung der Gesamt-Kreuztests mit einem Schwellwert von 0,1.....	77
Abbildung 30 Ergebnisse der automatisierten Auswertung der Gesamt-Kreuztests mit den stärksten zwei Signale eines Versuchs	78
Abbildung 31 Darstellung des Kreuztests; blau = Sonden, die zu einer Identifizierung führen; pink = Sonden, die zu einer Identifizierung führen, aber einer Erklärung bedürfen; grau = ausgeschlossene Sonden; grün = „richtig positive“ Werte; rot = „falsch positive“ Werte; gelb und orange = Werte, die durch Störfaktoren zustande kamen	85
Abbildung 32 Sondenreaktionen neben Fehlmessungen auf einem Macroarray.....	91
Abbildung 33 Sondenreaktionsmuster der <i>Pterocarpus</i> -Arten.....	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung wichtiger Referenzen zu Modifikationen in den Extraktionsprotokollen für Holz	12
Tabelle 2 Verwendete Barcode-Regionen zur Identifizierung von Holzarten	16
Tabelle 3 Verwendete Geräte	21
Tabelle 4 Verwendete Chemikalien	22
Tabelle 5 Verwendete Kits.....	23
Tabelle 6 Auflistung der relevanten CITES-geschützten Holzarten und ihrer Substitutionshölzer	23
Tabelle 7 PCR-Programm für den gesamten ITS	27
Tabelle 8 Zusammensetzung des PCR-Mastermix (Qiagen)	28
Tabelle 9 PCR-Programm für die einzelnen ITS-Bereiche	28
Tabelle 10 Verwendete Primer	29
Tabelle 11 Basenkombination und dazugehöriger IUPAC-Nucleotid-Code	31
Tabelle 12 Auflistung der Puffer und ihre Zusammensetzung	32
Tabelle 13 Kurzfassung des optimierten Macroarray-Protokolls	35
Tabelle 14 Bewertungsmatrix für die Intensität der Hybridisierungsreaktion	37
Tabelle 15 Gruppierung der Proben zur Oligoauswahl; Holzart (Probennr.)	40
Tabelle 16 Über den entwickelten Macroarray identifizierbare Holzarten und ihre Sonden	93

Zusammenfassung

Der Handel mit gefährdeten Tier- und Pflanzenarten wird durch das „Washingtoner Artenschutzabkommen“ (CITES) reglementiert. Zu den gefährdeten Arten zählen auch wichtige Handelshölzer, die nach CITES-Richtlinien geschützt sind. Für die Umsetzung der Schutzregularien ist eine eindeutige Artidentifizierung unerlässlich, die die Entwicklung und den Einsatz effektiver Bestimmungsmethoden erfordert.

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war die Entwicklung eines genetischen Schnelltests zur Identifizierung geschützter tropischer Wirtschaftsbaumarten sowie ihrer Substitutionshölzer in Form eines DNA-Macroarrays. Dieser Test soll die bereits vorhandenen genetischen Nachweismethoden ergänzen und hiermit die Effektivität der Kontrollen verbessern.

Untersucht wurden folgende sechs Handelssortimente CITES-geschützter Arten und ihre Substitutionshölzer: Echtes Mahagoni, Cedro, Bubinga, *Pterocarpus*-Arten, Ramin und Pockholz. Zur Entwicklung des Tests wurden nicht vorhandene Barcode-Sequenzen der ausgewählten Holzarten erstellt und darauf basierend Sonden (= Oligonukleotide) entwickelt. Anschließend wurden diese Sonden auf dem Macroarray überprüft.

Als Ergebnis dieser Methodenentwicklung konnten die Einsatzmengen der Chemikalien reduziert und die Dauer des Verfahrens effektiv von 6,7 h auf 3,2 h verringert werden. Zur Artidentifizierung wurde der „internal transcribed spacer“ (ITS) als Barcode-Region gewählt und eine interne Datenbank aus 197 Sequenzen erstellt. Auf dieser Grundlage und öffentlich zugänglichen Datenbanksequenzen wurden 99 Sonden entwickelt und zusammen mit 49 weiteren Oligonukleotiden auf dem Macroarray getestet. Davon stellten sich 66 Sonden als geeignet heraus. Die Ergebnisse der Macroarray-Analysen zeigen, dass von den 53 untersuchten Holzarten 32 mit Hilfe des entwickelten Macroarray eindeutig identifizierbar sind. Weitere 15 Arten werden durch Gattungssonden repräsentiert und auf jeweils zwei bis maximal drei Arten innerhalb einer Gattung eingegrenzt. Für vier Arten ist über die erstellten Sonden keine Identifizierung möglich und zwei Arten konnten aus Mangel an zur Verfügung stehender DNA nicht überprüft werden.

Die Vorteile der Macroarray-Methode für die Holzartenidentifizierung liegen in der parallelen Analyse mehrerer Arten, dem Verzicht auf eine Sequenzierung der DNA und

eine Anwendung ohne eine vorherige Artenkenntnis. Außerdem bietet der entwickelte Test eine Möglichkeit der Zeit- und Kosteneinsparung im Vergleich zu derzeit verwendeten Methoden. Die im Rahmen der Promotion erzielten Ergebnisse zeigen erfolgsversprechend, dass der entwickelte Schnelltest durch seine Praxistauglichkeit einen Beitrag zur Bekämpfung des illegalen Holzhandels und der Einhaltung des Artenschutzes leisten kann.

Abstract

The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) regulates the trade in vulnerable animals and plants. Endangered species also comprise important commercial timbers which are protected according to CITES guidelines. For the implementation of the conservation regulations, a reliable species identification is essential, which requires the development and application of effective identification methods.

In the present study, a rapid genetic test was developed using the DNA microarray method for the identification of CITES protected commercial tree species originated in the tropics and their look-alikes. This methodical approach is intended to complement the existing genetic methods and thus improve the effectiveness of controls.

In detail, the following six commercial assortments of CITES-protected timber species and their look-alikes were selected and investigated: True Mahogany, Cedro, Bubinga, *Pterocarpus* species, Ramin and Guaiacum Wood. Developing the test, non-existent barcode sequences of the selected wood species were created and probes (= oligonucleotides) were designed based on these sequences. Subsequently, the probes were checked on the microarray. As a result of the methodical approach, the quantities of the analytical chemicals could be reduced and the duration of the procedure effectively decreased from 6.7 h to 3.2 h. For species identification, the "internal transcribed spacer" (ITS) was chosen as the barcode region and an internal database of 197 sequences was developed. Based on these and additional database sequences, 99 probes were designed and tested on the microarray together with 49 additional oligonucleotides. In total, 66 of the 148 tested probes are proved to be suitable.

The results of the microarray analyses reveal that of 53 wood species examined, 32 can be clearly identified using the developed microarray. Additional 15 species are represented by genus probes and limited to a maximum of three species within each genus, respectively. For four species, no identification is possible applying the probes created and two species could not be verified due to lack of available DNA.

The advantages of the studied microarray approach offers, (i) parallel analysis of several species, (ii) omission of a DNA sequencing and (iii) application of the technique without prior knowledge of the taxa. Furthermore, the developed test provides a potential of time

and cost savings compared to current established methods. In summary, the results of the PhD thesis reveal that the developed rapid test can contribute to combat illegal timber trade due to its efficient and practical applicability.

1 Einleitung

Klimawandel, Landumwandlung sowie der illegale Einschlag und Handel von Holz bedrohen die Biodiversität und den Artenschutz auf unserem Planeten. Vor allem in tropischen Ländern sind dies treibende Kräfte für die anhaltende Walddegradierung und Entwaldung. Schätzungen von Interpol zufolge sind 15 bis 30 % des weltweiten Holzhandels illegal (Nellemann, 2012, INTERPOL, 2021). In den wichtigsten Herkunftsländern tropischer Holzarten wurden die illegalen Anteile am gesamten nationalen Einschlag auf 35 % in Malaysia, 60 bis 70 % in Kamerun, Ghana, Indonesien, Republik Kongo, Papua Neu Guinea und bis zu über 90 % in der Demokratischen Republik Kongo geschätzt (Hoare, 2015).

Aktuell bereitet die Übernutzung von, im Handel als „Rosewood“ (Rosenholz) bezeichneten Holzarten ein großes Problem. Sie werden im großen Maßstab nach China exportiert zur Herstellung von traditionellen Möbeln, sogenannten Hongmu-Möbeln. Unter dem Namen „Rosewood“ werden mittlerweile nicht nur die üblichen *Dalbergia*-Arten gehandelt, sondern vermehrt auch Arten wie Kosso (*Pterocarpus erinaceus*), Mukula (*P. tinctorius*), Red Sanders (*P. santalinus*) sowie Bubinga (*Guibourtia* spp.). (UNODC, 2020)

Es gibt mehrere gesetzliche Regelungen, die den illegalen Handel mit Holz eindämmen sollen. Die Wichtigste ist das „Washingtoner Artenschutzabkommen“ über den internationalen Handel mit gefährdeten Arten freilebender Tiere und Pflanzen, kurz CITES (Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Flora and Fauna). Diese Konvention beschränkt den Handel mit wildlebenden Arten, die vom Aussterben bedroht sind, und damit auch den Handel exponierter Hölzer. Holz ist unter den von CITES geregelten Waren eines der am meisten gehandelten im internationalen Warenverkehr. Die oben erwähnten „Rosewood“-Arten sind derzeit alle nach CITES-Anhang B (Annex II) geschützt. Das bedeutet, dass ihr Handel nicht verboten, sondern unter strengen Auflagen, die einen Fortbestand der Art garantieren sollen, möglich ist. (CITES.org)

Auf europäischer Ebene unterliegen Holzeinfuhren den Richtlinien der Europäischen Holzhandelsverordnung (Abkürzung EUTR; Verordnung EU Nr. 995/2010). Sie verbietet die Vermarktung von illegal eingeschlagenem Holz und verpflichtet alle Importeure (sog.

Marktteilnehmer), die innerhalb der EU Holz oder Holzprodukte erstmalig in Verkehr bringen, bestimmte Sorgfaltspflichten einzuhalten. Dazu gehören unter anderem Informationspflichten zur Art und Herkunft des Holzes sowie Verfahren zur Einschätzung und Reduzierung des Risikos, dass das Holz aus illegalem Einschlag stammen könnte.

Eine große Herausforderung bei der Umsetzung der genannten Schutzregularien ist die eindeutige Artidentifizierung der gehandelten Hölzer, was unerlässlich für die Legalitätsprüfung des gehandelten Produktes ist (Wiedenhoeft et al., 2016, Gasson et al., 2021). Klassischerweise wird die Holzart mikroskopisch über die anatomischen Strukturmerkmale bestimmt. So ist eine Identifizierung bis auf Artebene jedoch nicht für alle Gattungen möglich. Außerdem wird dafür geschultes Fachpersonal mit sehr viel Erfahrung benötigt. Mit dem Fortschritt in der Gentechnik werden zunehmend auch molekularbiologische Analysen routinemäßig eingesetzt. Oft sind die angewendeten Methoden jedoch zeit- und kostenintensiv. Den Strafverfolgungsbehörden und den Händlern mangelt es somit an schnellen und praktikablen Instrumenten zur Überprüfung der Legalität (Lowe et al., 2016, Low et al., 2022).

Das Dissertationsprojekt beinhaltet die Erarbeitung einer genetischen Methode zur Holzartenidentifizierung, beruhend auf der Macroarray-Technologie und der DNA-Barcode-Region „ITS“ (internal transcribed spacer). Damit sollen sieben handelsrelevante, tropische CITES-Holzarten und ihre Substitutionshölzer schneller und kostengünstiger identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Holzarten: Mahagoni (*Swietenia* spp.), Cedro (*Cedrela* spp.), Bubinga (*Guibourtia* spp.), rotes Sandelholz und Kosso (*Pterocarpus* spp.), Ramin (*Gonystylus* spp.) und Pockholz (*Guaiacum* spp.).

2 Stand des Wissens

In diesem Kapitel werden die bisherigen Methoden der Holzartenerkennung und ihre Grenzen beschrieben. Die Probleme in der genetischen Identifizierung werden genauer beleuchtet. Im Speziellen wird auf die DNA-Isolierung und -Amplifizierung aus dem Material Holz und die verschiedenen Barcode-Regionen zur Artidentifizierung eingegangen. Es folgt eine Erläuterung, warum welche Methoden und Protokolle in der vorliegenden Forschungsarbeit zum Einsatz kamen. Abschließend wird kurz die hier verwendete Macroarray-Technologie skizziert.

2.1 Holzartenerkennung

„Timber identification (of tree species or of geographical origin) is a technical prerequisite for monitoring and controlling wood trade or to control the chain of custody in the context of certification.“ Deguilloux et al. (2002) stellen in diesem Satz sehr gut die Wichtigkeit der Holzartenerkennung im Holzhandel als „technische Voraussetzung“ heraus. Eine Kontrolle des Artenschutzes kann nur erfolgen, wenn das vorliegende Material auch einwandfrei identifiziert werden kann. Die Holzartenbestimmung ist auf verschiedenen Wegen realisierbar. Klassischerweise werden Hölzer anatomisch anhand ihrer Strukturmerkmale bestimmt. Mit dem Einzug der Gentechnik kamen verschiedene molekularbiologische Methoden hinzu. Auch chemische und physikalische Untersuchungen sind möglich.

Je nach Fragestellung – Taxonomie und/oder Herkunft – existieren bereits verschiedene Methoden zur Identifizierung und Nachverfolgung von Holz. Die Holzanatomie kann lediglich die Fragen der Taxonomie beantworten. Techniken der Genetik, Massenspektrometrie und NearInfraRot (NIR) Spektroskopie ermöglichen sowohl eine taxonomische als auch eine geografische Bestimmung in verschiedenen Auflösungen. Die Herkunft kann auch über Isotopen Analysen bestimmt werden. Eine genaue Rückverfolgung eines einzelnen Individuums wird durch das DNA-Fingerprinting erzielt. (Schmitz et al., 2019)

Aktuell wird zusätzlich an maschinellem Lernen auf Grundlage von mikroskopischen Aufnahmen zur Holzartenidentifizierung geforscht (de Andrade et al., 2020, Lens et al., 2020, Low et al., 2022).

Die nachfolgende Grafik gibt eine Übersicht über die oben genannten Methoden und ihre Anwendungsgebiete.

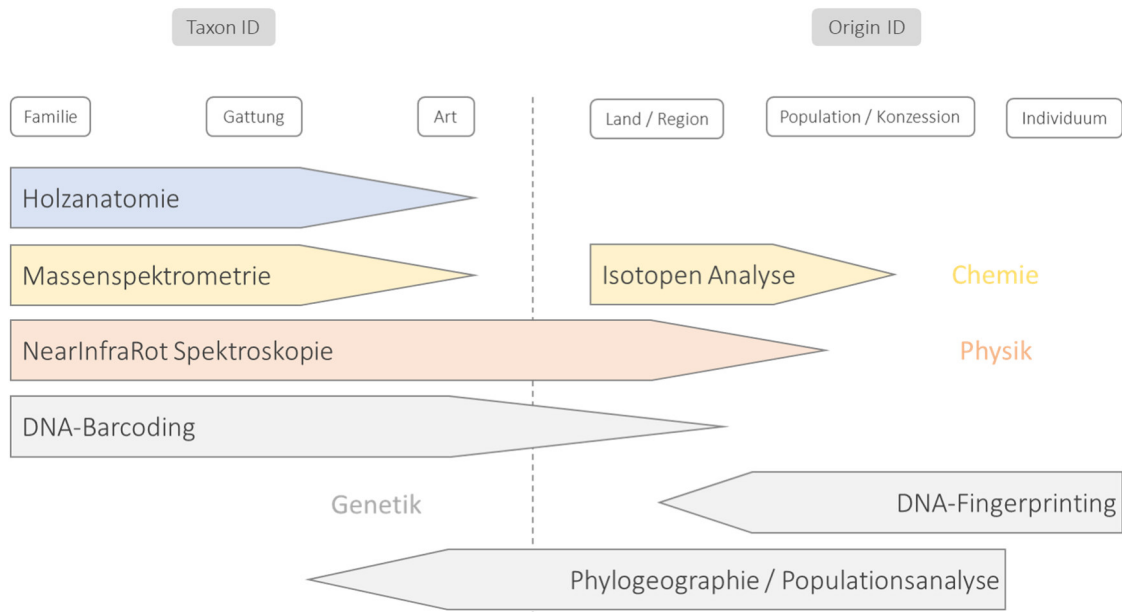


Abbildung 1 Methoden der Holznachverfolgung und ihre Anwendungsunterschiede (modifiziert nach Lowe et al., 2011)

Die folgenden Kapitel beschreiben die Vorgehensweisen und Problematiken der mikroskopischen Analyse anatomischer Strukturmerkmale des Holzes sowie die angewandten genetischen Methoden zur Holzartenidentifizierung. Chemische und physikalische Methoden sind nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit und wurden zuvor aus Gründen der Vollständigkeit erwähnt.

2.1.1 Anatomische Strukturmerkmale

Die Anatomie des Holzes wird in den drei Hauptrichtungen axial, tangential und radial betrachtet. Für eine unbekannte Probe wird zuerst über eine makroskopische Betrachtung das Handelssortiment taxonomisch bestimmt bzw. eingegrenzt. Dafür wird der Querschnitt der Probe mit einer scharfen Klinge angeschnitten. Die klare Schnittkante wird mit bloßem Auge oder mittels Lupe (10 – 12-fache Vergrößerung) untersucht. Somit werden die axial orientierten Gewebetypen deutlich, die wichtige diagnostische Informationen liefern. Die Bestimmung der Art über die erkannten Strukturen kann mit Hilfe von Holzatlantent oder computergestützten Bestimmungsschlüssel wie der „macroHOLZdata“ (Richter and Trockenbrodt, 1995) oder der „CITESwoodID“ (Koch et

al., 2011) realisiert werden. Beide genannten Datenbanken stehen ebenfalls als Apps für mobile Endgeräte zur Verfügung (Koch et al., 2022). Die makroskopische Holzartenbestimmung ist die einfachste und schnellste Methode, um ein Handelsholz oder -sortiment zu erkennen bzw. einzugrenzen und wird routinemäßig als "erstes" Screening-Verfahren eingesetzt. Sie wird jedoch durch zwei Faktoren limitiert, die Probengrößen und den Verwandtschaftsgrad gehandelter Hölzer. So muss der Querschnitt der Probe groß genug sein, um diagnostische Strukturen erkennen zu können. Bei eng verwandten Handelshölzern sind die anatomischen Struktur oft sehr ähnlich und auf makroskopischer Ebene nicht oder nur schwer zu differenzieren. (Koch et al. 2015)

Für eine genauere und juristisch standhafte Bestimmung von Handelshölzern werden die anatomischen Strukturen in der Regel mikroskopisch untersucht. Dafür werden von einer unbekanntem Holzprobe mikroskopische Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms in den drei anatomischen Hauptrichtungen angefertigt. Die so entstandenen Quer-, Tangential- und Radialschnitte werden anschließend mikroskopisch nach bestimmten strukturellen Merkmalen untersucht. So können bis zu 80 Merkmale diagnostiziert werden, die international in den anatomischen Beschreibungen (Merkmalslisten) der „International Association of Wood Anatomists“ (IAWA) standardisiert sind. Darin werden die verschiedenen Ausprägungen der Zelltypen (Gefäße, Parenchym, Fasern usw.) beschrieben und zusätzliche Informationen über mineralische Einschlüsse o.ä. geliefert. Auch für die mikroskopische Bestimmung stehen verschiedene computergestützte Bestimmungsschlüssel zur Verfügung, wie „Commercial timbers“ (Richter and Dallwitz, 2000 onwards) oder „InsideWood“ (Wheeler, 2011). (Koch et al. 2015)

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Holzarten handelt es sich ausschließlich um tropische Laubhölzer. Die wichtigsten Gewebetypen des Laubholzes sind die axialverlaufenden Gefäße, welche in verschiedenen Größenausprägungen und Anordnungen vorhanden sein können. Sie sind für die Wasserleitung im lebenden Baum verantwortlich. Zwischen diesen Gefäßen befinden sich die ebenfalls axial verlaufenden Holzfasern, welche als Stütz- und Festigkeitsgewebe dienen. Sie sind je nach Holzart in verschiedenen Durchmesser und Zellwanddicken ausgeprägt. Des Weiteren gibt es das axial verlaufende Parenchym, dessen Anordnung besonders wichtig für die Erkennung ist sowie die in radialer Richtung verlaufenden Holzstrahlen. Letztere sind für den Wasser- und

Nährstofftransport ins Innere des Baumes sowie die Speicherung von Nährstoffen verantwortlich. Sie sind holzartenspezifisch unterschiedlich aufgebaut. (Matyssek et al., 2010)

Die Holzartenbestimmung auf Grundlage der anatomischen Struktur des Holzes setzt erfahrenes Fachpersonal voraus. Eine Bestimmung bis auf Artebene ist bei sehr eng verwandten Arten unmöglich (Deguilloux et al., 2002).

Um beispielhaft die Grenzen der Erkennung aufzuzeigen, sind folgend mikroskopische Bilder zweier Arten der Gattung *Pterocarpus* dargestellt. Die Aufnahmen stammen aus der wissenschaftlichen Holzsammlung des Thünen-Instituts für Holzforschung, Hamburg. Gegenübergestellt werden die Arten *P. santalinus* und *P. soyauxii*. Beide Arten zeigen keine signifikanten anatomischen Unterscheidungsmerkmale. *P. santalinus* hat einreihig oder mehrreihig ausgeprägte Holzstrahlen. Im Gegensatz dazu kommen die Holzstrahlen von *P. soyauxii* ausschließlich einreihig vor (Richter and Dallwitz, 2000 onwards). Dieses Merkmal trägt nur dann zu einer Unterscheidung beider Arten bei, wenn mehrreihige Holzstrahlen bei *P. santalinus* sichtbar sind. Im folgenden Radialschnitt ist im gesamten Ausschnitt nur ein einziger mehrreihiger Holzstrahl erkennbar.

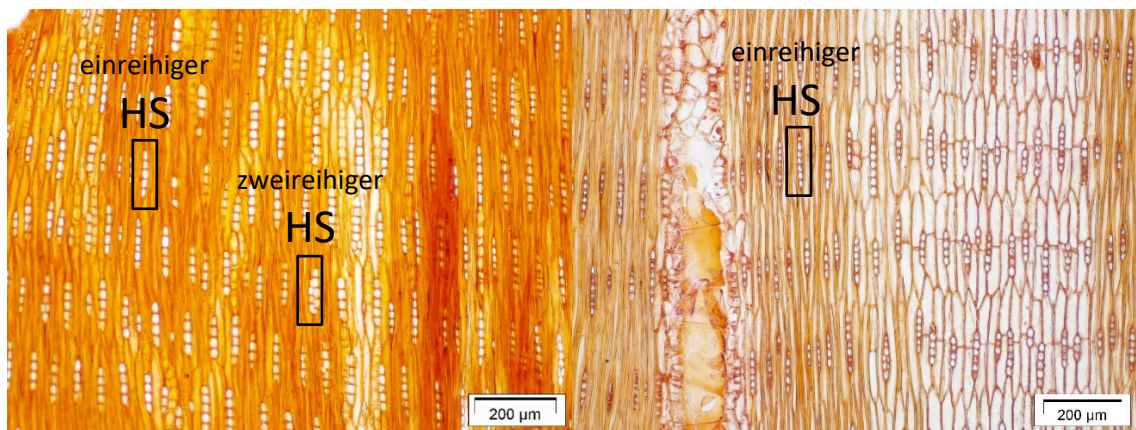


Abbildung 2 Mikroskopische Radialschnitte von *P. santalinus* (links) und *P. soyauxii* (rechts); HS = Holzstrahl

2.1.2 Genetische Analyse

Die genetischen Methoden zur Bestimmung des Holzes reichen von der taxonomischen Identifizierung der Spezies (DNA-Barcoding) bis zur Verifizierung der geografischen Herkunft. Letztere kann sich auf die Region (Phylogeografie) aber auch auf einzelne Konzessionen (populationsgenetische Analysen) oder die Rückverfolgung einzelner Individuen (DNA-Fingerprinting) beziehen. (Lowe and Cross, 2011)

In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die taxonomische Identifizierung der Holzarten konzentriert. Zu den Hauptschritten der molekularbiologischen Identifizierung gehören die Extraktion der DNA aus dem Holzmaterial, die exponentielle Vervielfältigung geeigneter Bereiche der DNA (sogenannter Barcode-Regionen), sowie die Sequenzierung dieses Barcodes. Die Identifizierung basiert auf der Individualität der DNA, also der spezifischen Abfolge der vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Über einen Abgleich der DNA-Sequenz mit Referenzsequenzen, meist aus internationalen Datenbanken, wird eine prozentuale Übereinstimmung errechnet. Die Methode stößt dann an ihre Grenzen, wenn keine Vergleichssequenzen für die zu identifizierende Holzart vorhanden sind. In diesen Fällen sind Sequenzen aus einwandfrei bestimmtem Material zu erstellen. Somit werden internationale Datenbanken wie NCBI (National Center for Biotechnology Information) stetig erweitert. Die folgende Grafik zeigt den schematischen Standardablauf der molekularbiologischen Holzartenidentifizierung über DNA-Barcoding.

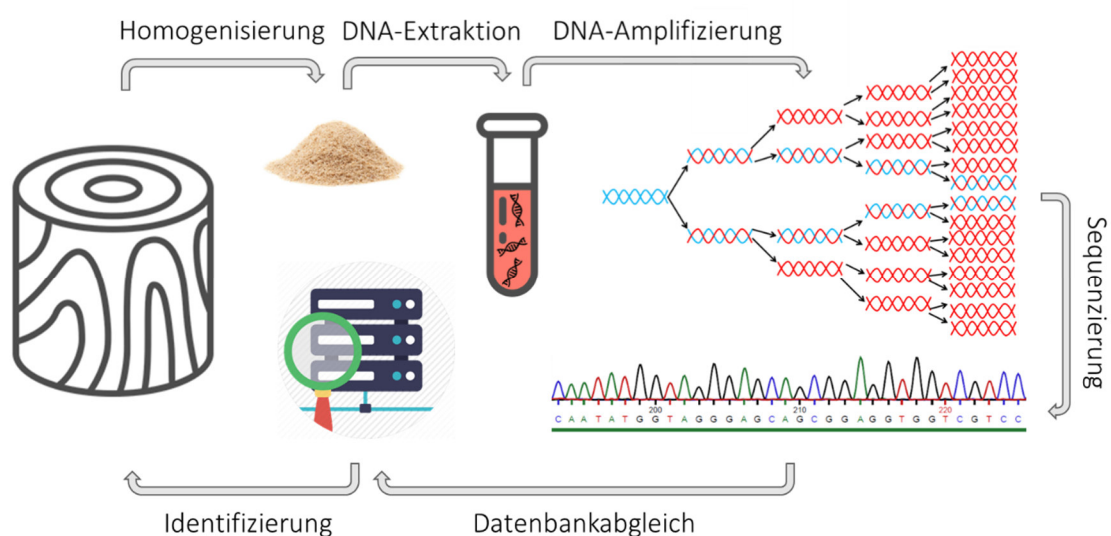


Abbildung 3 Schematische Darstellung der genetischen Holzartenidentifizierung

Die Holzartenbestimmung ist auch über die Anwendung von sogenannten Taxon-Primern in der PCR möglich. Das sind spezifische Oligonukleotide, die nur dann eine Amplifizierung ermöglichen, wenn die DNA der Zielart vorhanden ist. Das heißt, die Primer sind so aufgebaut, dass sie komplementär nur zur DNA einer bestimmten Holzart passen. Der Erfolg der PCR gibt Auskunft darüber, ob die vermutete Holzart vorhanden ist oder nicht. Der PCR-Erfolg wiederum lässt sich durch die Gelelektrophorese visualisieren. Somit ist eine Sequenzierung nicht mehr notwendig. Nachteil dieser Methode ist eine vorherige Eingrenzung der möglichen Holzarten, damit die Anzahl der zu verwendenden Primer eingeschränkt werden kann. (Moreth and Schmidt, 2000, Magnussen et al., 2007, Hanssen et al., 2011, Wallinger et al., 2012, Wischnewski, 2014)

Für die Umsetzung der Schutzregularien (CITES sowie EUTR) ist neben der Identifizierung der Art auch eine Nachverfolgung der Herkunft von großem Interesse. So müssen für CITES-geschützte Arten auch Herkunftsnachweise erbracht werden, um die Legalität zu belegen. Eine Unterscheidung von geografischen Regionen, Populationen, Konzessionen oder Individuen einer Art wird durch evolutionäre Prozesse in den Genen wie Mutation, Drift, Genflow und Selektion ermöglicht (Lowe et al., 2004). Diese Ereignisse führen auf kontinentaler, Populations- oder individueller Ebene zu Diskontinuitäten in der genetischen Struktur, die mit geeigneten molekularen Markern identifiziert werden können (Lowe and Cross, 2011). Dazu werden sogenannte Mikrosatelliten untersucht, auch „simple sequence repeats“ (SSR) genannt. Das sind kleine, sich wiederholende, Basenmotive wie beispielsweise „TAGTAGTAGTAG..“. Die Anzahl der Wiederholungen kann sich auf den oben erwähnten Ebenen unterscheiden und mit Hilfe statistischer Auswertungen zur Herkunftsüberprüfung verwendet werden. Bei der Nachverfolgung von Holz ist es einfacher, die Herkunft aus einem umstrittenen Gebiet auszuschließen, als die tatsächliche Herkunft zu lokalisieren, da für letzteres eine umfangreiche genetische Karte des Gebietes zur Verfügung stehen oder aufgebaut werden muss. (Deguilloux et al., 2003, Rachmayanti et al., 2006, Degen and Fladung, 2007, Degen et al., 2010, Lowe et al., 2010, Lemes et al., 2011, Duminil et al., 2012, Jolivet and Degen, 2012, Degen et al., 2013, Hung et al., 2017, Chaves et al., 2018, Paredes-Villanueva et al., 2019)

2.2 DNA-Extraktion und Amplifizierung

Für alle genetischen Methoden muss zuerst die DNA isoliert werden. Während die Extraktion der DNA aus frischem Blatt- und Kambiummaterial routinemäßig durchgeführt wird, gibt es bei der Isolation von DNA aus Holz immer wieder Schwierigkeiten (Deguilloux et al., 2002, Asif and Cannon, 2005, Finkeldey et al., 2010, Jiao et al., 2012, Tnah et al., 2012, Fatima et al., 2018, Murillo-Sánchez et al., 2021). Der Erfolg einer DNA-Extraktion aus Holz ist stark abhängig von der Spezies, der Gewebeart (Splint- oder Kernholz) und des Gewebealters sowie bereits durchgeführter Verarbeitungsprozesse des Materials. Sowohl die Quantität als auch die Qualität der DNA ist in getrocknetem Holz niedriger als in kambialem Gewebe, Blättern oder frischem Splintholz. Zu prüfende Produkte bestehen jedoch meist aus technisch getrocknetem und verarbeitetem Kernholz.

Selbst am lebenden Baum ist die Menge an DNA im Holz gering, da es sich bei Holz hauptsächlich um „totes“ Gewebe handelt. Die DNA-Quantität und -Qualität ist insgesamt im Splintholz größer als im Kernholz. Dies wird durch die einfache Tatsache gestützt, dass sich im Splintholz noch lebende parenchymatische Zellen befinden, während im Kernholz alle Zellen bereits durch den Prozess der Kernholzbildung abgestorben sind (IAWA, 1964). Nach dem programmierten Zelltod in der Übergangszone zwischen Splint- und Kernholz, der sogenannten „transition zone“, degradieren alle Organellen und die DNA wird durch Nukleasen fragmentiert. Das sich trotzdem DNA im Kernholz findet liegt vermutlich daran, dass kurze DNA-Fragmente absorbiert an der Zellwand vorliegen (Cano, 1996). Ein Zerfall dieser DNA über die Lagerungsdauer und die Lagerungsumstände (feucht oder trocken) wird durch UV-Einstrahlung und Mikroorganismen weiter begünstigt (Murmanis et al., 1987, Vivas et al., 1997). Die Degradation pflanzlicher DNA ist durch eine Längenfraktur der Stränge charakterisiert, was zu einer Verkürzung der vorhandenen DNA-Fragmente führt. Deshalb können aus Holz vornehmlich nur kurze DNA-Abschnitte extrahiert und sequenziert werden (Lowe and Cross, 2011). So zeigten Deguilloux et al. (2002), dass die erfolgreich amplifizierten DNA-Fragmentlängen vom Splintholz (ca. 500 bp) über die „transition zone“ (ca. 350 bp) zum Kernholz (< 300 bp) stetig abnahmen.

In Versuchen von De Filippis and Magel (1998) an Robinie nahm sowohl die DNA-Konzentration als auch der Reinheitsgrad von der Borke bis zum Kern radial ab. Aber auch

innerhalb der einzelnen Zonen (Borke, Splint, Kern) verringerte sich die DNA-Konzentration stetig. Das bedeutet, dass die vorhandene DNA-Menge nicht nur von der Region im Stamm des Baumes, also vom Gewebetyp selbst, sondern auch vom Alter der Gewebe abhängig ist. Das könnte laut De Filippis and Magel (1998) sowohl an den dickeren Zellwänden älterer Gewebe und dem höheren Anteil an Nukleasen liegen, als auch an sekundären Metabolismen, die eine Isolation intakter Nukleinsäuren erschweren. So erhöht sich im Kernholz die Konzentration von Kerninhaltsstoffen, die für eine natürliche Dauerhaftigkeit im Kernholz sorgen. Sie bestehen oft aus Tanninen, Phenolen, Harzen, ätherischen Ölen und Pigmenten, die eine Extraktion und Amplifikation der DNA hemmen können (Deguilloux et al., 2002, Rachmayanti et al., 2009).

Auch die Versuche von Deguilloux et al. (2002) an verschiedenen gelagerten Eichenstämmen sowie frisch gefällttem Eichenholz ergaben, dass die isolierte DNA-Menge von der kambialen Zone über den Splint, die „transition zone“ bis zum Kernholz abnimmt. Die DNA zeigte generell ein hohes Maß an Degradation, die mit der Zeit nach dem Fällen (Trocknungsdauer) zunahm. Auch bei der Amplifizierungsrate und der Größe der erfolgreich amplifizierten Fragmente, zeigte sich ein Abfall im Stamm von außen nach innen. Eine höhere Amplifizierungsrate konnte für kurze und sich wiederholende Target-Sequenzen erzielt werden. Die Versuche zeigten jedoch auch, dass die isolierte DNA aus frischem Kambium und Splint größere Probleme bei der Amplifizierung aufwies. Das ist auf größere Mengen an PCR-Inhibitoren im kambialen Gewebe im Vergleich zum Holz zurückzuführen (Rachmayanti et al., 2009, Murillo-Sánchez et al., 2021).

Die Lagerung des Holzes hat ebenfalls einen Einfluss auf die Isolierbarkeit der DNA. Laut Abe et al. (2011) haben Prozesse die nach der Ernte im Holz stattfinden einen größeren Einfluss auf die DNA-Degradierung als die Kernholzbildung. Sie begründen dies mit der Beobachtung, dass in ihren Versuchen für alle gelagerten im Gegensatz zu frischen Proben keine DNA über UV-Spektrometrie detektiert werden konnte. Sie vermuten, dass Prozesse wie schnelle Dehydrierung, Oxidation und biologische Degradation den DNA-Abbau begünstigen.

Weiterhin beeinflusst der Verarbeitungsstatus des Holzes den Degradationsgrad der DNA. In Versuchen von Rachmayanti et al. (2009), fiel die Amplifizierungsrate

verschiedener DNA-Fragmentlängen von verarbeitetem Holz aus der Familie der DIPTEROCARPACEAE signifikant geringer als von frischem Holz. Bei den Verarbeitungsprozessen handelte es sich vornehmlich um Trocknungen und Einschnitt.

Auch zwischen den Holzarten sind die Möglichkeiten, DNA erfolgreich aus Holz zu extrahieren und zu amplifizieren, unterschiedlich. Vor allem die Kerninhaltsstoffe einer Holzart sind ausschlaggebend für eine erfolgreiche Extraktion. So ist die Isolation der DNA von hellen Holzarten oft einfacher als von dunklen tropischen Hölzern.

Seit den 1990er Jahren wurden verschiedene Extraktionsmethoden für Holz entwickelt und optimiert. Meist basieren diese Extraktionsprotokolle auf der Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Methode von Doyle and Doyle (1987) oder dem kommerziellen DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Diese Protokolle wurden für die Isolierung von DNA aus lebenden, weichen Materialien wie Blättern und Nadeln erstellt. Die Optimierungen für Holz liegen hauptsächlich in der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes, der Entfernung von Kontaminationen, der Eliminierung von Inhibitoren, einer Erhöhung der Probenmenge sowie einer Verlängerung der Dauer von DNA-Lysis und -Ausfällung. (Finkeldey et al., 2010)

Anpassungen waren beispielsweise die Verwendung von Polyvinylpyrrolidon (PVP) und N-Phenacylthiazoliumbromid (PTB). Die Zugabe von PVP reduziert effektiv phenolische Inhibitoren (Rachmayanti et al., 2006). Die Zugabe von PTB wiederum führt zu einer Spaltung von Proteinvernetzungen mit reduziertem Zucker und setzt somit die DNA frei, die möglicherweise in solchen Vernetzungen (Kondensationsprodukten) eingeschlossen wird (Asif and Cannon, 2005). PTB wurde erstmals für die Isolierung von DNA aus alten Knochen verwendet (Kelman and Kelman, 1999, Gugerli et al., 2005). Es wurde nach einem Protokoll von Prime Organics (Asif and Cannon, 2005) oder in Kombination mit dem Qiagen- (Tang et al., 2011) oder CTAB-Protokoll (Tnah et al., 2012) eingesetzt. In den meisten Protokollen kommt zusätzlich Proteinase K zum Einsatz, welche Proteine verdaut.

Die nachstehende Tabelle gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Autoren, die erfolgreich angewendeten Extraktionsmethoden, deren Modifikationen sowie das verwendete Material.

Tabelle 1 Auflistung wichtiger Referenzen zu Modifikationen in den Extraktionsprotokollen für Holz

Autor	Methode	Modifikation	Art/Gattung	Probenmaterial
Dumolin-Lapègue et al. (1999)	Plant Mini	400 mg Holzmehl	<i>Quercus</i>	frische und getrocknete Holzproben
Deguilloux et al. (2002)	Plant Mini	200 mg Holzmehl	<i>Quercus petraea</i>	3 Wochen bis 11 Jahre luftgetrocknete Stämme
Rachmayanti et al. (2006)	Plant Mini	50–100 mg Holzmehl; Zugabe von PVP zu Lysispuffer	DIPTEROCARPACEAE	getrocknete Holzproben
Liepelt et al. (2006)	Plant Mini	keine	<i>Abies, Fagus, Quercus, Pinus</i>	300 – 11.500 Jahre alte Holzproben
Rachmayanti et al. (2009)	Plant Mini	Rachmayanti et al. (2006)	DIPTEROCARPACEAE	getrocknetes und verarbeitete Holzproben
Speirs et al. (2009)	Plant Mini	Zugabe von PVP , Proteinase K, Chelex (Guy et al., 2003); 5 x 20 mg auf eine Säule transferieren	<i>Quercus</i>	1545 gesunkenes Schiff
Abe et al. (2011)	Plant Mini	keine	<i>Cryptomeria japonica</i>	Xylothekproben
Tang et al. (2011)	Plant Mini	Vorbehandlung mit PTB	<i>Catalpa bungei, Cunninghamia lanceolata, Fraxinus, Quercus</i>	luftgetrocknete, 25 bis 30 Jahre alte Holzscheiben
Hanssen et al. (2011)	Plant Mini	keine	<i>Fritzroya cupressoides, Sequoia sempervirens, Thuja plicata</i>	luftgetrocknete Äste
Tsumura et al. (2011)	Plant Mini	QIAshredder Maxi Spin	<i>Shorea, Hopea</i>	Furnierproben
Höltken et al. (2012)	Plant Mini	keine	<i>Carapa, Cedrela, Entandrophragma, Khaya, Swietenia</i>	getrocknete Holzproben
Jiao et al. (2012)	Plant Mini	Rachmayanti et al. (2006)	<i>Cunninghamia lanceolata</i>	frische Holzscheiben
Degen et al. (2013)	Plant Mini	Rachmayanti et al. (2006)	<i>Swietenia macrophylla</i>	Holzbohlen
Jiao et al. (2014)	Plant Mini	Rachmayanti et al. (2006), Buffer A1 auf 65°C erwärmt, 100 mg Holzmehl, RNase A, 1 % PVP , Inkubation 6-8 h, 280 µl AP2, Inkubation 2h bei -20°C	<i>Aquilaria sinensis</i>	frische und ofengetrocknet Holzscheiben
Jiao et al. (2015)	Plant Mini	Jiao et al. (2014)	<i>Populus euphratica</i>	Xylothekproben
Lee et al. (2016)	Plant Mini	Jiao et al. (2014)	<i>Aquilaria</i>	Holzprodukte
Yu et al. (2017)	Plant Mini	Tang et al. (2011)	<i>Dalbergia odorifera</i>	luftgetrocknete Kernholzproben
de Souza Borges et al. (2017)	Plant Mini	keine	<i>Amburana cearensis, Dypterix odorata,</i>	luftgetrocknete Holzproben

Watanabe and Abe (2017)	Plant Mini	keine	<i>Peltogyne confertiflora</i> <i>Torreya nucifera</i>	Xylothekproben
Jiao et al. (2018)	Plant Mini	Jiao et al. (2014), 500 mg Holzmehl	<i>Pterocarpus</i>	Xylothekproben
Lendvay et al. (2018)	Plant Mini	25 mg Holzmehl, 625 µl Lysis Puffer + Proteinase K, Inkubation 12h bei RT	<i>Pinus</i>	subfossiles Holz
Jiao et al. (2019 b)	Plant Mini	Jiao et al. (2018)	<i>Santalum</i>	Xylothekproben
Tanaka and Ito (2020)	Plant Mini	keine	<i>Aquilaria, Gyrinops</i>	getrocknete Holzproben
Lowe et al. (2010)	CTAB	keine	<i>Intsia palembanica</i>	frische Holzproben
Tnah et al. (2012)	CTAB	Zugabe von PTB	<i>Neobalanocarpus heimii</i>	ofengetrocknete Holzproben
Phong et al. (2014)	CTAB	Porebski et al. (1997)	<i>Dalbergia</i>	frische Holzproben
Hartvig et al. (2015)	CTAB	unbekannt	<i>Dalbergia</i>	frische und getrocknete Splintholzproben
Ng et al. (2016)	CTAB	Murray and Thompson (1980); 2x CTAB	<i>Gonystylus, Intsia palembanica,</i>	Borke
Fatima et al. (2018)	CTAB	Erhöhung der Inkubationszeit und Konzentrationen von CTAB, Proteinase, RNase, Lagerung der Proben in Wasser	<i>Dalbergia latifolia, Lagerstroemia lanceolata, Tectona grandis</i>	frische Stammbohrkerne
Lu et al. (2020)	CTAB	Erhöhung der Probenmenge + Lysisdauer	<i>Pterocarpus erinaceus</i>	frische Kernholzproben
Murillo-Sánchez et al. (2021)	CTAB	Méndez-Cea et al. (2019)	<i>Pinus pseudostrobus</i>	frische Holzproben
Asif and Cannon (2005)	PTB	Prime Organics	<i>Gonystylus bancanus</i>	getrocknete Holzdübel

In der Dissertation von Wischnewski (2014) wurden verschiedene Extraktionsmethoden an tropischen Holzarten ausprobiert. Die meisten zeigten einen Extraktions- und Amplifizierungserfolg für die verwendeten Splintholzproben. Allerdings war nur eine Methode erfolgreich in der Extraktion aus Kernholz: das DNeasy® *mericon*™ Food Kit von Qiagen nach leichten Modifizierungen. Laut Herstellerangaben nutzt dieses Kit Mechanismen einer veränderten CTAB-Extraktion, die eine Isolierung degradiertes DNA ermöglicht. DNA-Fragmente bis zu einer Minimallänge von 100 bp können isoliert und amplifiziert werden. Eine Isolierung ist somit aus hochprozessierten Lebensmitteln mit geringem DNA-, hohem Fett- oder Säuregehalt und hoher Inhibitorenzahl möglich

(Qiagen, 2022). Die Veränderungen von Wischnewski (2014) zum Herstellerprotokoll bestehen in der Verwendung von sechsmal 50 mg Holzmehl pro Probe. Diese sechs Extrakte werden nach der DNA-Ausfällung auf eine einzelne Säule zentrifugiert. Somit bleiben trotz einer Erhöhung der Probenmenge auf 300 mg die Verhältnisse zu den Chemikalien gleich. Weiterhin wurde nach der Lysis ein Prefilter (Analytik Jena) verwendet, um eine effektive Trennung von Feststoff und Lösung zu erreichen. Diese Methode wurde bereits erfolgreich bei Bogun (2015) an Stauseeholzproben angewendet. In der vorliegenden Arbeit kamen aus Gründen des oben dargelegten Erfolgs und der einfacheren Handhabbarkeit das DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) für die meisten Proben zum Einsatz. Bei nicht erfolgreicher Isolierung durch dieses Kit, wurde auf das DNeasy® *mericon*™ Food Kit (Qiagen) zurückgegriffen.

2.3 DNA-Barcoding

Das pflanzliche Genom setzt sich aus der DNA im Zellkern (nrDNA), in den Mitochondrien (mtDNA) sowie den Plastiden (cpDNA) zusammen und wird in dieser Weise auch unterschieden. Die Bezeichnung „cpDNA“ ist dahingehend irreführend, dass sie die DNA aller Plastiden beinhaltet (nicht nur der Chloroplasten). Im Holz sind die Plastiden als Amyloplasten in den parenchymatischen Zellen zur Speicherung von Stärke ausdifferenziert (Pizzolato, 1978).

Die Länge des pflanzlichen Genoms variiert stark zwischen den einzelnen Arten. Das erste vollständig sequenzierte Kerngenom eines Baumes stammt von *Populus trichcarpa* und weist eine ungefähre Länge von 500×10^6 bp auf. Das entspricht einem Sechstel der Länge des menschlichen Genoms (Tuskan et al., 2006). Kiefern hingegen können teilweise eine Genomlänge von über 25.000×10^6 bp aufweisen (Ahuja and Neale, 2005). Angesichts dieser enormen Längen der Genome und der räumlichen Verteilung von Variationen, ist die Suche nach informativen Abschnitten zur Identifizierung der Pflanzenart unabdingbar (Finkeldey et al., 2010). Diese informativen Abschnitte werden „DNA-Barcodes“ genannt. Der Begriff „DNA-Barcoding“ wurde von Hebert et al. (2003) eingeführt. Er bezeichnet die taxonomische Bestimmung von Organismen über den standardisierten Gebrauch bestimmter Abschnitte der DNA, sogenannter Barcode-Regionen oder Markergene. Diese Regionen sind durch verschiedene Merkmale gekennzeichnet. Ein Barcode sollte für eine routinemäßige Amplifizierung von taxonomisch-breiten, universellen Bereichen

flankiert werden. Zur Differenzierung von Arten muss eine hohe Variabilität innerhalb der Region gewährleistet sein. Für die routinemäßige Sequenzierung sollte der Barcode kurz genug sein und keine Klonierung benötigen, d.h. keine Heterozygotie aufweisen. Um eine Bearbeitung mit gängigen, genetischer Datenanalyse-Systemen zu gewährleisten, sollten diese Abschnitte ein einfaches Sequenzalignment ermöglichen. Alignment (englisch: Abgleich, Anordnung, Ausrichtung) bezeichnet die Gegenüberstellung und Ausrichtung von Sequenzen mit Hilfe von Algorithmen anhand von Basenübereinstimmungen. Weiterhin sollten keine problematischen Basenzusammensetzungen wie Mikrosatelliten auftreten, welche die Sequenzqualität verringern. (Hollingsworth et al., 2009)

Für die Identifizierung von Tieren wurde das kodierende, mitochondriale Gen „cytochrome c oxidase I“ (COI) etabliert. Dieses Gen ermöglicht zum einen mittels sehr stabiler, universeller Primer eine Amplifizierung für fast alle tierische Lebewesen und zeigt zum anderen die größte Bandbreite an phylogenetischen Signalen im Vergleich zu anderen mitochondrialen Genen (Hebert et al., 2003). Die Identifizierung von Pilzen wird aktuell über den „internal transcribed spacer“ (ITS) der nrDNA realisiert. Für die Artbestimmung von Pflanzen gibt es bisher keinen universellen Barcode. Das mitochondriale Gen COI ist hier als Barcode ungeeignet, da es in höher entwickelten Pflanzen sehr viel langsamer evolviert, als in Tieren (Kress et al., 2005). Die pflanzliche mtDNA weist langsamere Substitutionsraten und intramolekulare Rekombinationen auf (Mower et al., 2007). Das führt schlussendlich zu geringen interspezifischen Varianzen. Deshalb wurde mit der Suche eines Barcodes außerhalb der Mitochondrien begonnen (Kress et al., 2005, Chase et al., 2007). Nicht-kodierende Bereiche eignen sich häufig besser und werden auch häufiger für die Identifizierung untersucht (Hummel, 2003). „Nicht-kodierend“ heißt, dass diese Abschnitte der DNA nicht zur Synthese von Aminosäuren abgelesen werden.

Auf Grund der Dringlichkeit der Bekämpfung des Biodiversitätsverlustes wurde 2008 eine internationale Plattform „international Barcode of Life“, kurz iBOL gegründet, die Erkenntnisse und Daten belegbarer Referenzsequenzen zu allen Pflanzenarten in ihrer Datenbank BOLD (Barcode of Life Data Systems) bündelt. Hier werden verschiedene Plastiden-Barcodes (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*) sowie der ITS zur Artbestimmung höher entwickelter Pflanzen vorgeschlagen (iBOL, 2022).

Für die genetische Bestimmung von holzbildenden Pflanzen wurden verschiedene Regionen untersucht. Die Verwendung der unterschiedlichen Barcodes ist stark abhängig von der Familie bzw. Gattung der untersuchten Arten. In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten untersuchten Barcode-Regionen für Holzarten sowie ihre jeweilige Eignung zur Artidentifizierung aufgelistet.

Tabelle 2 Verwendete Barcode-Regionen zur Identifizierung von Holzarten

Autor	Barcode	Art	Differenzierung möglich?
Chen et al. (2010)	<i>psbA-trnH</i> , <i>matK</i> , <i>rbcl</i> , <i>rpoC1</i> , <i>ycf5</i> , ITS2	medizinische Pflanzen	ITS2 zeigte die höchste Diskriminierungsrate (92,7 %)
Gao et al. (2010)	ITS2	FABACEAE (medizinische Pflanzen)	ITS2 zeigte eine Diskriminierungsrate von 80 %
Pang et al. (2010)	<i>rbcl</i> , <i>matK</i> , ITS	EUPHORBIACEAE	ITS zeigte die höchste Diskriminierungsrate (100 %) auf Grundlage der Divergenzen wurden taxonspezifische Primer erstellt
Hanssen et al. (2011)	ITS	<i>Fitzroya</i> <i>cupressoides</i> , <i>Sequoia</i> <i>sempervirens</i> , <i>Thuja plicata</i>	
Muellner et al. (2011)	<i>rpoC1</i> , <i>rpoB</i> , <i>accD</i> , <i>psbB</i> , <i>psbN</i> , <i>psbT</i> , <i>trnS-</i> <i>trnG</i> , ITS	MELIACEAE	ITS zeigte die höchste Diskriminierungsrate (66,67 %)
Tsumura et al. (2011)	<i>trnL</i> , <i>trnL-trnF</i> , <i>trnH-psbA-trnK</i> , <i>psbC-trnS</i>	<i>Shorea</i>	<i>trnL-trnF</i> zeigte die höchste Nukleotid- diversität, alle Barcodes weisen eine zu geringe Divergenz zur exakten Artidentifizierung auf
Duminil et al. (2012)	<i>trnC-petN1R</i> , <i>trnH-trnK</i> , ITS	<i>Carapa</i>	ITS zeigte die besten Identifizierungserfolge und Übereinstimmungen mit der morphologischen Bestimmung
Höltken et al. (2012)	17 cpDNA- Barcodes	<i>Swietenia</i> , <i>Carapa</i> , <i>Entandrophragma</i> , <i>Khaya</i> , <i>Cedrela</i>	SNPs im Bereich <i>matK-trnK</i> führten zur erfolgreichen Differenzierung
Li et al. (2012)	<i>rbcl</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-</i> <i>psbA</i> , <i>psbK-psbI</i> , <i>atpF-atpH</i> , ITS	<i>Ficus</i>	die Kombination ITS + <i>trnH-psbA</i> zeigte die höchste Diskriminierungsrate (75 %)
Aubriot et al. (2013)	<i>matK</i> , <i>rbcl</i> , <i>psbA-</i> <i>trnH</i> , ITS	<i>Euphorbia</i>	ITS zeigte die höchste Diskriminierungsrate (99,32 %)
Tripathi et al. (2013)	<i>rbcl</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-</i> <i>psbA</i> , ITS	tropische, indische Baumarten	ITS zeigte die höchste Diskriminierungsrate (74,3 %)
Jiao et al. (2014)	<i>rbcl</i> , <i>matK</i> , <i>trnL-</i> <i>trnF</i> , ITS1	<i>Aquilaria</i>	ITS1 zeigte die höchste Diskriminierungsrate
Phong et al. (2014)	<i>trnL</i> , <i>matK</i> , <i>psbA-</i> <i>trnH</i> , ITS	8 <i>Dalbergia</i> -Arten aus Vietnam	ITS zeigte die höchste Diskriminierungsrate (100 %)
Bhagwat et al. (2015)	<i>matK</i> , <i>rbcl</i> , <i>trnH-</i> <i>psbA</i> , ITS	10 <i>Dalbergia-</i> Arten aus Indien	die Kombinationen <i>matK</i> + <i>rbcl</i> , <i>matK</i> + <i>trnH-psbA</i> zeigten die höchste Identifizierungsrate (100 %)

Bolson et al. (2015)	<i>matK, trnH-psbA, rbcL, ITS</i>	30 bedrohte Holzarten aus der Mata Atlântica	ITS zeigte die höchste Diskriminierungsrate (83 %)
Hartvig et al. (2015)	<i>rbcL, matK, ITS</i>	<i>Dalbergia</i>	ITS zeigte die höchste Diskriminierungsrate (100 %)
Huang et al. (2015)	<i>matK, rbcL, trnH-psbA, ITS</i>	asiatische, tropische Baumarten	ITS zeigte die höchste Diskriminierungsrate (58,1 %)
Liu et al. (2015)	<i>rbcL, matK, trnH-psbA, ITS</i>	asiatische, subtropische Baumarten	die Kombination <i>rbcL + matK + ITS</i> zeigte die höchste Diskriminierungsrate (94,19 %)
Hassold et al. (2016)	<i>matK, rbcL, trnL</i>	<i>Dalbergia</i>	eine Differenzierung der geografischen Herkunft (Madagaskar oder afrikanischer Kontinent) ist mit allen drei Barcodes möglich, eine Artidentifizierung nur in Subgruppen
Lee et al. (2016)	<i>matK, rbcL, rpoB, rpoC1, psbA-trnH, trnL-trnF, ITS2</i>	<i>Aquilaria</i>	die Kombination <i>trnL-trnF + ITS2</i> zeigte die höchste Diskriminierungsrate (75 %)
Ng et al. (2016)	<i>trnH-psbA, trnL, ITS</i>	<i>Gonystylus</i>	die Kombination der drei Barcodes zeigte die höchste Diskriminierungsrate (90 %)
Yu et al. (2016)	<i>rpoC1, trnH-psbA, ITS</i>	<i>Dalbergia odorifera</i> vs. <i>D. tonkinensis</i>	<i>trnH-psbA</i> zeigte die höchste Diskriminierungsrate (100 %)
Yu et al. (2017)	7 cpDNA-Barcodes, ITS	<i>Dalbergia</i>	die Kombination <i>ITS2 + trnH-psbA</i> zeigte die höchste Diskriminierungsrate (100 %)
Jiao et al. (2018)	<i>matK, ndhF-rpl32, rbcL, ITS2</i>	<i>Pterocarpus</i>	die Kombination <i>matK + ndhF-rpl32 + ITS2</i> zeigten die höchste Diskriminierungsrate (100 %)
He et al. (2019)	<i>matK, trnH-psbA, trnL, ITS2</i>	8 <i>Dalbergia</i> -Arten	<i>ITS2 + trnH-psbA</i> zeigte die höchste Diskriminierungsrate (100 %)
Jiao et al. (2019 a)	7 cpDNA-Barcodes	<i>Pterocarpus</i>	<i>ycf1b</i> zeigte die höchsten Diskriminierungs- (100 %) und Amplifizierungsraten (76,7 %)
Jiao et al. (2019 b)	<i>matK, psbA-trnH, trnK, trnL</i>	<i>Santalum</i>	die Kombination <i>psbA-trnH + trnK</i> zeigte die höchste Diskriminierungsrate (100 %)
Lu et al. (2020)	<i>matK, ndhF-rpl32, ITS2</i>	<i>Pterocarpus erinaceus</i>	<i>ITS2</i> zeigte die höchsten interspezifischen Differenzen, eine Kombination aus allen drei Barcode-Regionen wird vorgeschlagen
Hu et al. (2022)	<i>matK, rbcL, trnH-psbA, ITS2</i>	chinesische Holzarten	die Kombination <i>matK+trnH-psbA+ITS2</i> zeigte die höchste Diskriminierungsrate
Liu et al. (2022)	<i>ycf1 + ndhF-rps15 + trnL-ycf2, rbcL + matK + trnH-psbA, ITS</i>	LAURACEAE	<i>ITS</i> zeigte die höchste Diskriminierungsrate (66,7 %)
Wu et al. (2022)	cpDNA Genom, ITS	<i>Dalbergia</i>	folgende Barcodes werden für verschiedene <i>Dalbergia</i> -Arten vorgeschlagen: <i>ycf1, trnL-trnT, ndhG-ndhI, ITS2</i>

Es ist festzuhalten, dass die Amplifizierungs- und Sequenzierungserfolgsraten für Plastiden-Barcodes höher sind als die des ITS. Das lässt sich durch die Stabilität der ringförmigen cpDNA im Vergleich zur linearen nrDNA erklären. Die nrDNA wird somit schneller degradiert. Auch liegt die cpDNA im Vergleich zur nrDNA in einer höheren Kopieanzahl im Holz vor (Deguilloux et al., 2002). Zwar eignen sich die bisherigen Plastiden-Barcodes sehr gut für phylogenetische Studien, der ITS weist jedoch in den meisten Untersuchungen die höchste interspezifische Variabilität auf (siehe Tab. 2).

Der ITS der pflanzlichen DNA wurde von Baldwin et al. (1995) entdeckt. Er besteht aus den zwei nicht-kodierenden Unterregionen ITS1 und ITS2, die von den konservierten Bereichen 18S, 5.8S und 26S flankiert werden. ITS1 und ITS2 lassen eine Unterscheidung vieler Pflanzen auf Gattungs- und teilweise auch auf Artebene zu. Die konservierten Bereiche (18S, 5.8S und 26S) ermöglichen eine Amplifizierung der ITS-Region durch universelle Primer (White et al., 1990). Dieser Barcode wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit verwendet.

2.4 Macroarray-Technologie

Die Macroarray-Technologie gehört zu den sogenannten Plotting-Methoden und wurde ursprünglich für Genexpressionsstudien entwickelt. Es handelt sich dabei um eine technisch einfache Methode, die hauptsächlich in der Forschung eingesetzt wird. Darauf basierende Testmethoden werden oft in Form von Microarrays angewendet, die mittlerweile auch in der Forschung vermehrt eingesetzt werden. Trotzdem bietet der Macroarray durch seine sehr geringen Investitionskosten und einfache labortechnische Voraussetzungen weiterhin eine sehr gute Möglichkeit zur Entwicklung von Identifizierungstests.

Macroarrays bzw. Microarrays wurden bereits zur Identifizierung von Fleischsorten (Cottenet et al., 2016), Fischarten (Kochzius et al., 2010), verschiedenen *Theileria*- und *Babesia*-Arten bei Rindern, Pilzarten der Gattung *Amanita* (Harper et al., 2011), pflanzlich pathogenen Pilzen (Lievens et al., 2005 a, Zhang et al., 2008, Lievens et al., 2012) und holzerstörenden Pilzen (Schmidt, 2009) entwickelt.

Die Macro/Microarray-Technologie bietet die Möglichkeit, auf zeitaufwendige und teure Sequenzierungen zur Identifizierung zu verzichten. Es können mehrere Arten gleichzeitig in Mischprodukten identifiziert werden. Die Methode bietet vor allem Herkunftsländern

des Holzes mit geringer Labor- und finanzieller Ausstattung oder geringem Know-How in der Holzartenerkennung die Möglichkeit zur Holzhandelskontrolle. Sie ist durch die mögliche Weiterentwicklung in Form eines Microarrays auch kommerzialisierbar.

Der in dieser Arbeit verwendete Macroarray besteht aus einer Nylon Membran, auf der mehrere spezifische Oligos aufgetragen und kovalent gebunden sind (siehe Abb. 4). Ein Oligo ist eine kurze DNA-Sequenz mit einer Länge von ca. 20 bp und wird im Weiteren auch als Sonde bezeichnet. Jede Sonde besitzt eine spezifische Sequenz einer Holzart. Aus einer unbekanntem Holzprobe wird die DNA extrahiert und die Barcode-Region amplifiziert. Während des Amplifizierungsprozesses werden in die kodierte Barcode-Region Digoxigenin (DIG)-markierte dNTPs eingebaut (in Abb. 4 als Sonnen dargestellt). Stimmen Proben-DNA und die Sequenz einer Sonde auf dem Macroarray komplementär überein, hybridisieren sie. Diese Reaktion ist durch die ausgelöste Chemilumineszenz-Reaktion am DIG-System, die einen Röntgenfilm belichten kann, nachweisbar. Anhand des Aufbringungsmusters der Sonden auf der Membran wird sichtbar, welche spezifische Sonde mit der Probe hybridisiert hat und gibt somit Auskunft über die Holzart der Probe.

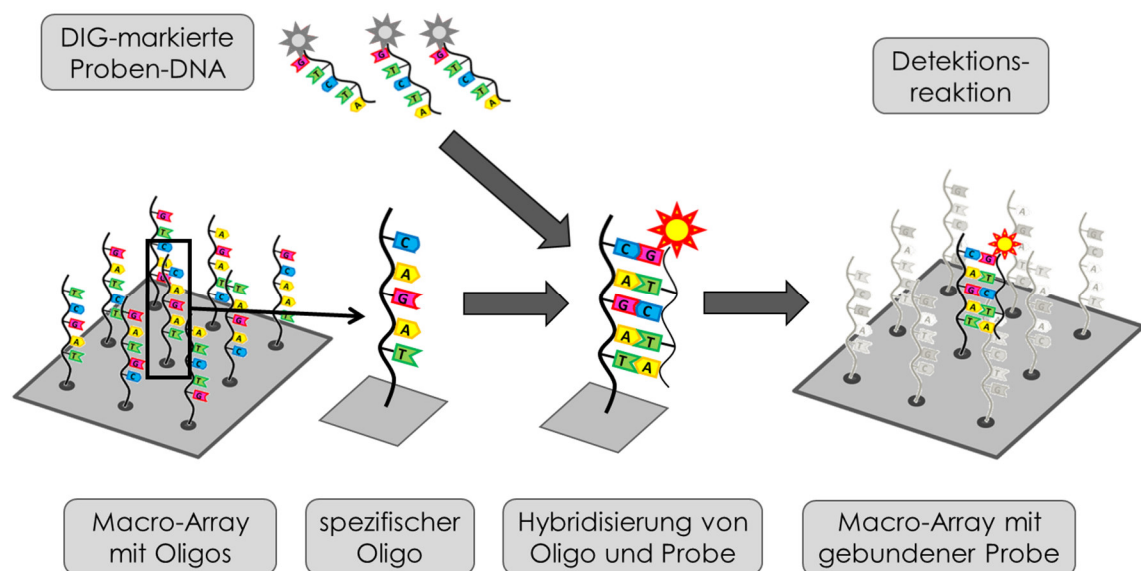


Abbildung 4 Schematische Darstellung eines Macroarrays

Das DIG-System ist eine nichtradioaktive Markierungsmethode für den Nachweis von Nukleinsäuren. Digoxigenin ist ein Cardenolid Steroid, welches aus der Pflanzengattung *Digitalis* (Fingerhut) isoliert wird. Es wird in Form von dUTPs (Desoxyuridintriphosphat)

während der Amplifizierung der Barcode-Region an Stelle von Thymin in die Proben-DNA eingebaut. Im Durchschnitt wird jedes zwanzigste bis fünfundzwanzigste Nukleotid durch ein DIG-markiertes dUTP ersetzt. (Lottspeich and Engels, 2012)

Abbildung 5 zeigt den Zusammenschluss von Digoxigenin über einen Linker mit Uridin.

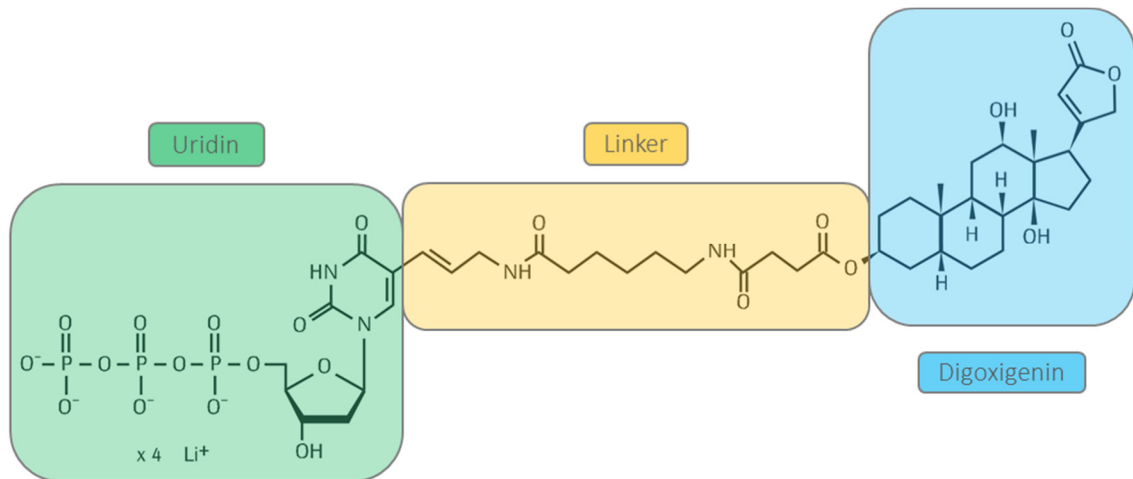


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Uridins mit DIG

Die Chemilumineszenz wird durch eine enzymatische Reaktion am DIG ausgelöst. Am DIG bindet ein spezifischer Antikörper, dem wiederum das Enzym alkalische Phosphatase (AP) angelagert ist. Am AP wird nach der Zugabe von CDP-Star, letzteres gespalten und es entstehen instabile Dioxetane (siehe Abb. 6). Diese senden Licht aus, welches schlussendlich einen Röntgenfilm belichten kann. (Lottspeich and Engels, 2012)

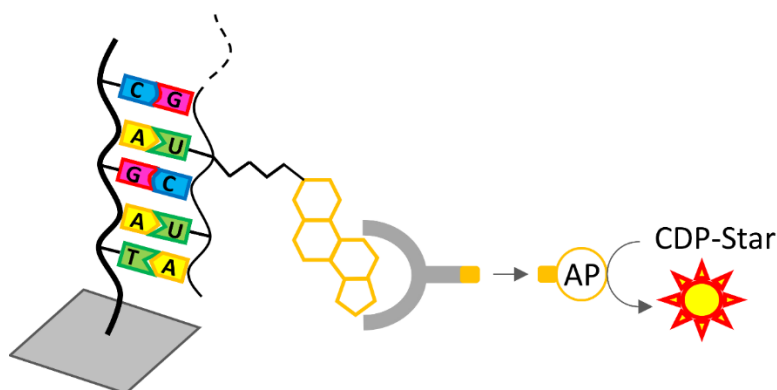


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Chemilumineszenz-Reaktion (modifiziert nach Lottspeich and Engels (2012))

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Geräte, Chemikalien, Kits sowie digitale Programme und Online-Dienstleistungen aufgelistet. Anschließend wird das Probenmaterial beschrieben und die einzelnen Methoden wie DNA-Extraktion, PCR der Barcode-Region, Gelelektrophorese, Sequenzanalyse, Oligo-Design sowie die Macroarray-Kreuztests vorgestellt.

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Die folgende Tabelle listet alle verwendeten Geräte sowie deren Hersteller auf.

Tabelle 3 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Explorer
Autoklav	Varioklav T25, Thermo Scientific
Belichtungskassetten	Hypercassette™, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited; 8 x 10 Inch
Botteltopfilter	Rapid-Flow™ Bottle Top Filter, Nalgene®, ThermoFisher scientific; 0,2 µm aPES Membran, Ø 75 mm + 500 ml und Ø 50 mm + 150 ml
Röntgenfilme	Super RX-N, Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm; 13 x 8 cm
Gefriertrockner	Heto Power Dry LL1500, Thermo Electron Corporation
Gelelektrophoresekammer	i-MUPID Mini Gel, COSMO BIO Co., Ltd.
Geldokumentationssystem	mit Universal-Haube II, BIO-RAD Laboratories GmbH
Heizmagnetrührer	RH-KT/C, IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Mini Hybridisierungsöfen	OV 2, Biometra, Analytic Jena Company
Inkubationsofen	WTB Binder, Fa. BINDER GmbH
Kolbenhubpipetten (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Eppendorf Research®, Eppendorf AG
Kreisschüttler	VIBRAX VXR basic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Laminiergerät	V.300® Premium Linie®, Landig + Lava GmbH & Co. KG
Magnetrührer	MR 1000, Heidolph
Mikrowelle	Panasonic
Mühle	MM200, Retsch
pH-Meter	Five Easy FE20, Mettler Toledo
Schüttler	Polymax 2040, Heidolph
Spektrophotometer	NanoDrop 2000, Thermo Scientific
Thermocycler	TGradient und TPersonal Thermoblock, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH
Thermoschüttler	Heating Block Thermostat, HLC Biotech
Vortexer	MS2 Minishaker, IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Zentrifugen	Heraeus Pico 17 und BIOFUGE fresco, Thermo scientific

3.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und ihre Hersteller sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 4 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	UltraPure™ Agarose, Invitrogen
Anti DIG-AP	Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, 150 U (200 µl), Roche Deutschland Holding GmbH
Blocking Reagent	Roche Deutschland Holding GmbH
Bromphenolblau	Bromphenolblau, Carl Roth GmbH & Co. KG
Casein	aus Kuhmilch, Sigma-Aldrich®
CPD-Star®	Roche Deutschland Holding GmbH
Chloroform	Rotipuran® Chloroform ≥ 99 % p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG
DNA-Fragmentmarker	FastGene® 100 bp Ladder, NIPPON Genetics EUROPE GmbH
EDTA	EDTA analytical grade, SERVA Electrophoresis GmbH
Entwickler	Röntgen-Entwickler G150, Agfa-Gevaert N.V.
Ethanol	Rotipuran® Ethanol ≥ 99,5 % p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethidiumbromid (EtBr)	≥ 98 %, Carl Roth GmbH & Co. KG
Fixierer	Röntgen-Fixierer G354, Agfa-Gevaert N.V.
Maleinsäure	≥ 99 %, Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumacetat (NaOAc)	krist. z.A., Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	krist. reinst., Merck KGaA
Tri-Natriumcitratdihydrat	≥ 99 % p.a., Carl Roth GmbH & Co. KG
N-Laurylsarcosin (NLS)	Sigma-Aldrich®
Natriumdodecylsulfat (SDS)	≥ 98,5 %, Sigma-Aldrich®
Trisaminomethan (TRIS)	TRIS Pufferan® ≥ 99,9 % p.a, Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG
NaOH-Pellets	Carl Roth GmbH & Co. KG

3.1.3 Kits

Alle verwendeten Kits sowie deren Hersteller sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt. Kits sind Bausätze von Materialien und Chemikalien, die Arbeitsschritte oder Methoden wie beispielsweise die DNA-Extraktion vereinfachen und beschleunigen, jedoch oft mit höheren Kosten verbunden sind.

Tabelle 5 Verwendete Kits

Kit	Hersteller
DNeasy® <i>mericon</i> ™ Food Kit	Qiagen, Hilden
DNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
PCR DIG Probe Synthesis mix; 10x	Roche Deutschland Holding GmbH
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden

3.1.4 Programme und Online-Dienstleistungen

Zum Abgleich der erstellten Sequenzen wurde der Online-Service BLAST (Altschul et al., 1990) von NCBI (National Center for Biotechnology Information) verwendet. Die Bearbeitung der Sequenzierungsergebnisse und das Design der Oligos wurde über die Software Geneious Prime (Version 2022.1) realisiert.

3.1.5 Probenmaterial

Die Untersuchungen umfassen sechs Gattungen CITES-geschützter, handelsrelevanter Holzarten und ihre Substitutionshölzer, sogenannte look-alike species. Die Auswahl der Arten wurde mit der Betreuerin Frau Prof. Dr. Magel unter zur Hilfenahme der CITESwoodID-Datenbank (Richter et al., 2014 onwards) und in Gesprächen mit Experten des Thünen-Kompetenzzentrums Holzherkünfte getroffen. Die Tabelle 6 zeigt die ausgewählten CITES-geschützten Arten (grau hinterlegt), ihre Handelsnamen sowie den CITES-Schutzstatus und die jeweiligen look-alike species. Mit der 19. CITES-Vertragsstaatenkonferenz (November 2022) wurden zum Ende der vorliegenden Arbeit die afrikanischen Populationen der Gattungen *Khaya* und *Pterocarpus* unter Schutz gestellt. Die Listung dieser Hölzer tritt mit dem 23.02.2023 völkerrechtlich in Kraft. Weiterhin wurde die Listung der Gattung *Handroanthus* mit einem Inkrafttreten zum 25.22.2024 beschlossen.

Tabelle 6 Auflistung der relevanten CITES-geschützten Holzarten und ihrer Substitutionshölzer

Familie	CITES-Art	Handelsname	Anhang
MELIACEAE	<i>Cedrela angustifolia</i> Moc. & Sessé ex DC.	Cedro	II
	<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	Cedro	II
	<i>Cedrela odorata</i> L.	Cedro	II
	<i>Toona ciliata</i> M.Roem.	Kalantas, surian, toon	
	<i>Toona sureni</i> (Blume) Merr.	Kalantas, surian, toon	
	<i>Swietenia humilis</i> Zucc.	"echtes" Mahagoni	II
	<i>Swietenia macrophylla</i> King in Hook.	"echtes" Mahagoni	II

	<i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq.	"echtes" Mahagoni	II
	<i>Carapa guianensis</i> Aubl.	Andiroba	
	<i>Carapa procera</i> DC.	African crabwood	
	<i>Entandrophragma angolense</i> C.DC.	Tiama	
	<i>Entandrophragma cylindricum</i> Sprague	Sapeli	
	<i>Entandrophragma utile</i> Sprague	Sipo, utile	
	<i>Lepalea cedrata</i> (A.Chev.) E.J.M.Koenen & J.J.de Wilde	Bossé	
	<i>Lepalea thompsonii</i> (Sprague & Hutch.) E.J.M.Koenen & J.J.de Wilde	Diambi, Bossé foncé	
	<i>Khaya anthotheca</i> C.DC.	African mahogany	II _{23.02.2023}
	<i>Khaya grandifoliola</i> C.DC.	African mahogany	II _{23.02.2023}
	<i>Khaya ivorensis</i> A.Chev.	African mahogany	II _{23.02.2023}
	<i>Khaya nyasica</i> Stapf ex Baker fil.	African mahogany	II _{23.02.2023}
	<i>Khaya senegalensis</i> A.Juss.	African mahogany	II _{23.02.2023}
	<i>Sandoricum koetjape</i> Merr.	Sentul	
FABACEAE	<i>Guibourtia demeusei</i> (Harms) J.Léonard	Bubinga	II
	<i>Guibourtia pellegriniana</i> J.Léonard	Bubinga	II
	<i>Guibourtia tessmannii</i> (Harms) J.Léonard	Bubinga	II
	<i>Guibourtia arnoldiana</i> (De Wild. & T.Durand) J.Léonard	Mutenye	
	<i>Guibourtia ehie</i> (A.Chev.) J.Léonard	Amazakoue, ovengkol	
	<i>Copaifera salikounda</i> Heckel	Etimoé	
	<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Jatobá, courbaril	
	<i>Pterocarpus erinaceus</i> Poir	Vène, Kosso	II
	<i>Pterocarpus santalinus</i> L.f.	Red Sanders	II
	<i>Pterocarpus indicus</i> Willd.	Amboina, narra	
	<i>Pterocarpus macrocarpus</i> Kurz	Amboina	
	<i>Pterocarpus soyauxii</i> Taub.	Padouk	II _{23.02.2023}
THYMELAEACEAE	<i>Gonystylus</i> Teijsm. & Binn.	Ramin	II
APOCYNACEAE	<i>Alstonia scholaris</i> (L.) R.Br.	Pulai	
	<i>Dyera costulata</i> Hook.f.	Jelutong	
MORACEAE	<i>Antiaris toxicaria</i> (J.F.Gmel.) Lesch.	Ako	
	<i>Brosimum alicastrum</i> Sw.	Ramón	
SAPOTACEAE	<i>Donella pruniformis</i> Pierre	Aningré blanc	
EUPHORBIACEAE	<i>Endospermum moluccanum</i> (Teijsm. & Binn.) Kurz	Sesendok	
BIGNONIACEAE	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D.Don	Copaia	
RUBIACEAE	<i>Neolamarckia cadamba</i> (Roxb.) Bosser	Kadam	
MALVACEAE	<i>Pterygota bequaertii</i> De Wild.	Koto	
	<i>Pterygota macrocarpa</i> K.Schum.	Koto	
COMBRETACEAE	<i>Terminalia ivorensis</i> A.Chev.	Framiré	
	<i>Terminalia superba</i> Engl. & Diels	Limba	
ZYGO-PHYLLACEAE	<i>Guaiacum coulteri</i> A.Gray	Pockholz	II
	<i>Guaiacum officinale</i> L.	Pockholz	II
	<i>Guaiacum sanctum</i> L.	Pockholz	II
	<i>Plectrocarpa arborea</i> (Jacq.) Christenh. & Byng	Vera	
LAURACEAE	<i>Chlorocardium rodiei</i> (R.H.Schomb.) Rohwer, H.G.Richt. & van der Werff	Greenheart	
BIGNONIACEAE	<i>Handroanthus heptaphyllus</i> (Mart.) Mattos	Ipé	II _{25.11.2024}
	<i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S.O.Grose	Ipé	II _{25.11.2024}

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden 264 Proben untersucht. Sie stammen von 14 Familien, 27 Gattungen und 53 Arten. Die Proben lagen in Form von luft-, seltener auch gefriergetrocknetem Blatt-, Ast-, Kambium- und Splint- sowie Kernholzmaterial vor. Verwendet wurden Individuen aus den Botanischen Gärten Leipzig, Utrecht und der Wilhelma in Stuttgart. Weiterhin wurden Proben von Honolulu Botanical Gardens (Hawaii), von Herr Dr. Hawthorne und Herr Dr. Harris aus dem Herbarium der Universität Oxford, dem Herbarium des Meise Botanical Garden (Belgien) und von Frau Dr. Paredes-Villanueva (Bolivien), Herr Panduh Tukat (Mitarbeiter der Fairventures Worldwide FVW gGmbH, Indonesien) zur Verfügung gestellt. Das Thünen-Kompetenzzentrum unterstützte die Arbeit mit Proben aus dem LargeScaleProject und aus der wissenschaftlichen Sammlung des Thünen-Instituts für Holzforschung. Weitere Proben stammen aus den Botanische Gärten Basel, Bayreuth, Berlin, Bochum, Bonn, Dresden, Düsseldorf, Erlangen, Frankfurt, Göttingen, Graz, Greifswald, Halle, Heidelberg, Hamburg, Hohenheim, Jena, Köln, Marburg, Nancy, Oldenburg, Osnabrück, Tübingen, Ulm, Wien, Würzburg, Zürich, von den Firmen und Instituten Max Cropp e.K., KEW DNA Bank sowie Rob Odgen. Diese Proben wurden bereits in vorherigen Projekten beschafft.

3.2 Methoden

Aus den oben genannten Proben wurde die DNA isoliert, der „internal transcribed spacer“ (ITS) amplifiziert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der NCBI-Datenbank abgeglichen und mit Hilfe der Geneious Prime Software zusammengeführt und verglichen. Auf dieser Grundlage wurden Sonden für den Macroarray designt und in den anschließenden Macroarray-Versuchen verwendet. Bei schlechten Ergebnissen wurden weitere Oligos für die entsprechende Holzart kreiert. Das folgende Schema zeigt den Ablauf der wichtigsten Arbeitsschritte in verkürzter Form.

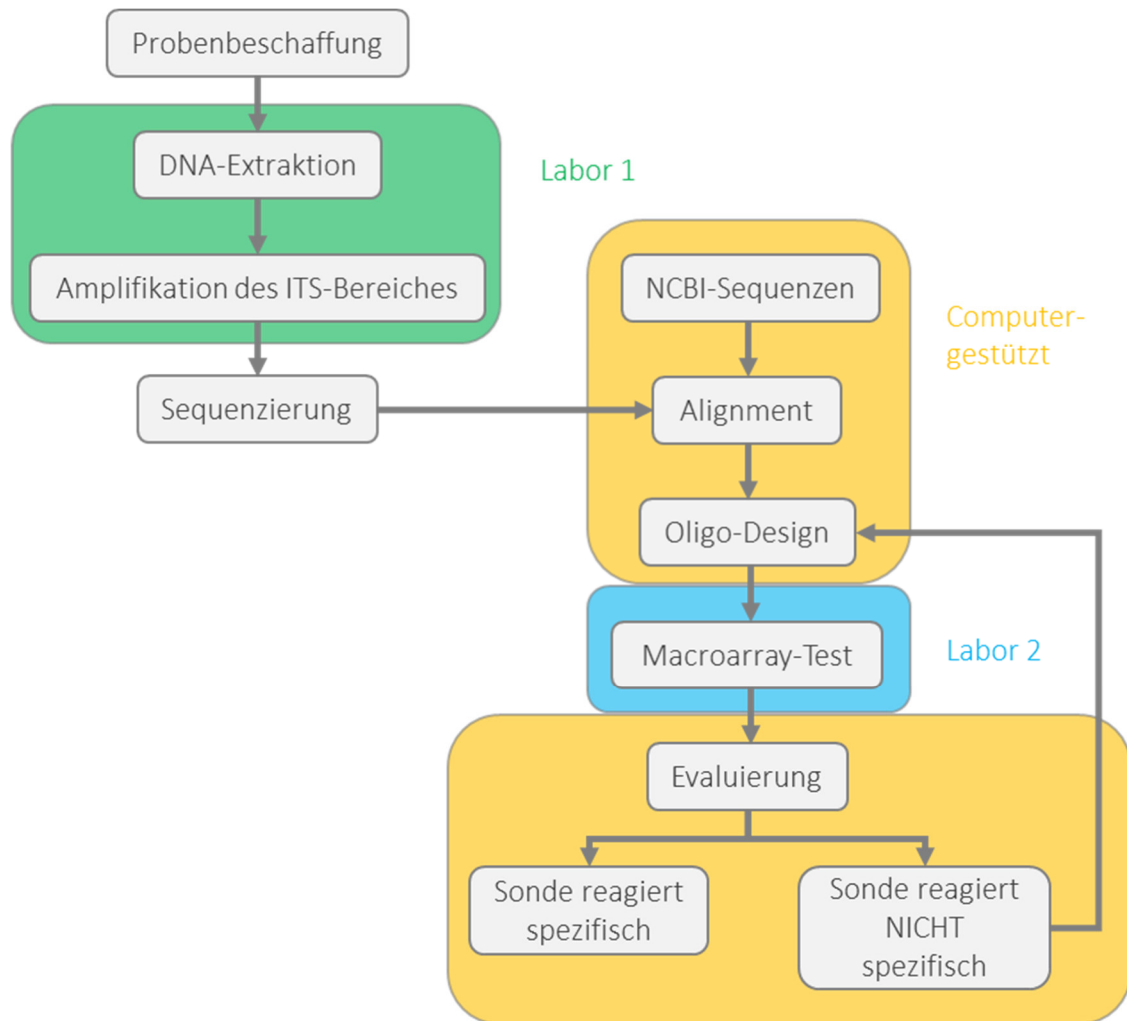


Abbildung 7 Fließschema der Arbeitsschritte

3.2.1 DNA-Isolierung

Das verwendete Probenmaterial wurde je nach Beschaffenheit geraspelt (Äste, Splint- und Kernholz) bzw. mit einer Mühle (Retsch MM200) für 1 min bei 30 s^{-1} gemahlen (Blattmaterial und Kambium). Die DNA wurde aus ca. 50 mg des generierten Mehles mit Hilfe der Extraktionskits DNeasy® Plant Mini (Qiagen) nach Angaben des Herstellerprotokolls extrahiert. Bei schwer zu isolierenden Proben wurden ca. 300 mg Holzmehl eingesetzt und das DNeasy® *mericon*™ Food Kit (Qiagen) angewendet. Für letzteres wurde ein modifiziertes Protokoll nach Wischnewski (2014) verwendet. Die Protokolle sind dem Anhang 1 und 2 zu entnehmen.

3.2.2 Quantifizierung der Nukleinsäure-Konzentration

Reinheit und DNA-Gehalt der (aus der DNA-Isolierung entstandenen) Eluate wurden mittels Spektrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo scientific) bestimmt. Hierfür wurde 1 μl des Eluates auf die Linse pipettiert. Das Spektrophotometer misst die Absorptionsraten in einem Wellenlängenbereich von 220 bis 350 nm. Nukleinsäure absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm, Phenole und Kohlenhydrate hingegen bei einer Wellenlänge von 280 nm und Proteine bei 230 nm. Die Nukleinsäure-Konzentration konnte somit in $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ermittelt und die Reinheit des Eluates durch das Verhältnis der Absorptionsraten im Wellenbereich von 260 nm/230 nm und 260 nm/280 nm festgestellt werden. Als rein gelten 260/230-Verhältnisse von 2,0 bis 2,2 und 260/280-Verhältnisse von 1,8 bis 2,0. Geringere Werte zeigen den Grad der Verunreinigung an.

3.2.3 Amplifizierung der ITS-Region der nrDNA

Nach eingehender Literaturrecherche wurde der „internal transcribed spacer“ (ITS) als Barcode-Region für das weitere Vorgehen der Holzartenidentifizierung gewählt. Der gesamte ITS der extrahierten DNA wurde mittels PCR nach folgendem Programm (siehe Tab. 7) und mit dem *Taq* PCR Core Kit (Qiagen) im Thermocycler amplifiziert. Die Zusammensetzung des Mastermixes zeigt Tabelle 8. Es wurden die Primer ITS1.1 (Hanssen et al., 2011) und ITS4 (White et al., 1990) sowie Templatemengen von 0,5 μl oder 1 μl eingesetzt.

Tabelle 7 PCR-Programm für den gesamten ITS

PCR-Abschnitt	Programm	
Anfangsdenaturierung	94°C	4 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	55°C	30 s
Elongation	72°C	40 s
Endelongation	72°C	7 min
Zyklenzahl	37	



Tabelle 8 Zusammensetzung des PCR-Mastermix (Qiagen)

Mastermix 1 x 12 μ l	Menge in [μ l]
Bidest. Wasser	7,775
Q-Solution	2,500
10 x Puffer	1,250
dNTP bzw. DIG-labelt dNTPs (Roche)	0,250
Primer forward (100 pmol/ μ l)	0,075
Primer reverse (100 pmol/ μ l)	0,075
<i>Taq</i>	0,075

Bei fehlgeschlagener oder unsauberer Amplifizierung wurden die ITS-Bereiche ITS1 und ITS2 getrennt voneinander mit Hilfe der Primer-Kombinationen ITS1.1 und ITS2.1 sowie ITS3.1 und ITS4 (White et al., 1990, Hanssen et al., 2011) vervielfältigt. In beiden Kombinationen wurde die Annealing-Temperatur auf 56°C und die Elongationszeit auf 30 s angepasst (siehe Tab. 9).

Tabelle 9 PCR-Programm für die einzelnen ITS-Bereiche

PCR-Abschnitt	Programm	
Anfangsdenaturierung	94°C	4 min
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	56°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Endelongation	72°C	7 min
Zyklenzahl	37	



Zur Verwendung in den Macroarray-Versuchen wurden die Proben mittels spezieller dNTPs (von Roche) mit Digoxigenin (DIG) gelabelt. Dafür wurden weiterhin die oben aufgeführten PCR-Programme, Mastermix-Zusammensetzungen und Primer-Kombination verwendet. Es wurden lediglich die dNTPs ausgetauscht. Zur Kontrolle wurden in derselben PCR eine Probe sowohl mit, also auch ohne DIG amplifiziert. Falls sich Banden nur für die ungelabelten PCR-Produkte ergaben, wurden diese Amplifizierungsprodukte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt und erneut mit gelabelten dNTPs amplifiziert.

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Primer aufgeführt.

Tabelle 10 Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Referenz
ITS1.1	GAACCTGCGGAAGGATCAT	Hanssen et al. (2011)
ITS2.1	GACTCGATGR TTCACGGG	Hanssen et al. (2011)
ITS3.1	GACTCTCGGCAACGGATATC	Hanssen et al. (2011)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der Amplifizierungsergebnisse kam die Gelelektrophorese zum Einsatz. Als Trägermaterial diente 1,5-prozentiges Agarosegel in 0,5 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA). 2,5 µl des PCR-Produkts wurden mit ca. 1 µl Ladepuffe (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin) gemischt, auf das Gel aufgetragen und für 30 min unter eine Spannung von 135 V gesetzt. Als Marker wurden 0,5 µl FastGene® 100 bp (Nippon Genetics Europe) eingesetzt. Das Gel wurde anschließend 2 min in Ethidiumbromid (15 x 10⁻⁴ %) gefärbt und für 20 min im Wasserbad gewaschen. Eine Visualisierung erfolgte mittels UV-Lichtschirm (Gel Doc™ XR+ System, Bio-Rad).

3.2.5 Aufreinigung und Sequenzierung

Zeigte das PCR-Produkt auf dem Gel saubere Banden in den erwarteten Basenpaarlängen (ITS ca. 700 bp; ITS1 und ITS2 ca. 300 bp – 400 bp), wurde es von Eurofins Genomics Germany GmbH (D-85560, Ebersberg) sequenziert. Dafür wurden die verbliebenen 10 µl PCR-Produkt vorher mittels QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellerprotokolls (siehe Anhang 3) aufgereinigt. Für die Sequenzierung ist mindestens eine Konzentration von 5 ng/µl in einer Mindestmenge von 15 µl pro Sequenzierungsrichtung notwendig.

3.2.6 Sequenzanalyse

Die gelieferten Sequenzen wurden zuerst mit dem Online-Service BLAST (Altschul et al., 1990) von NCBI auf ihre Übereinstimmung mit der erwarteten Art bzw. Gattung (bei Arten, für die sich keine Referenzen in der Datenbank befinden) überprüft. Zeigten sie die höchsten Homologien mit der erwarteten Art bzw. Gattung, wurden die einzelnen

Sequenzstücke mit Hilfe der Software Geneious Prime zusammengeführt, bearbeitet und ausgewertet. Dafür wurden die nachfolgend dargestellten Schritte durchgeführt (siehe Abb. 8). Das Alignment der Sequenzen wurde über den Muscle5 Algorithmus (Edgar, 2004) in Geneious ausgeführt.

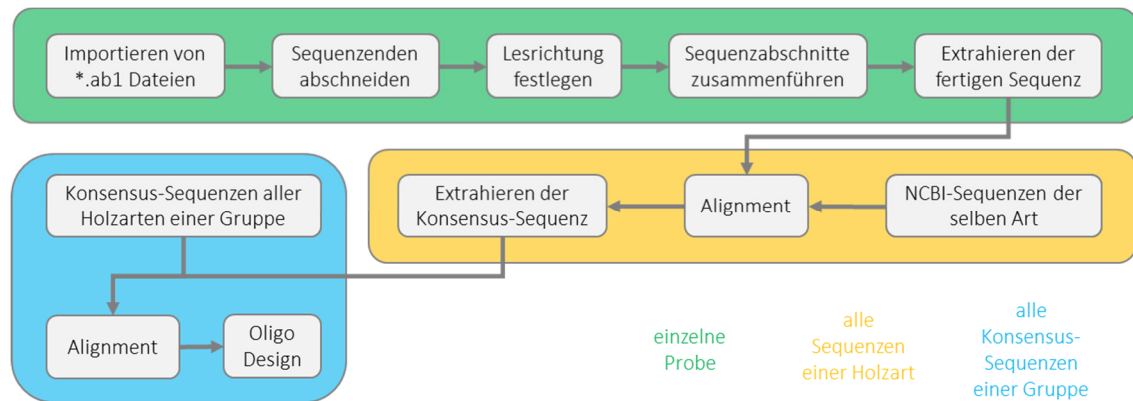


Abbildung 8 Abfolge der Arbeitsschritte in der Geneious Prime Software

Die unsaubereren Sequenzenden wurden weggeschnitten, die Leserichtungen festgelegt und die einzelnen Sequenzabschnitte eines Individuums zusammengeführt. Nicht eindeutige Basen wurden gespottet und durch den IUPAC-Nucleotid-Code ausgedrückt. Dieser Code spiegelt das gleichzeitige Auftreten von mehr als einer Base an einer Position in der Sequenz wider (siehe Tab. 11). Aus den einzelnen, alignierten Sequenzabschnitten einer Probe wurde eine vollständige Sequenz generiert und extrahiert. Diese generierten Proben-Sequenzen wurden mit bereits veröffentlichten Sequenzen derselben Art aus der NCBI-Datenbank aligniert. Somit konnten intraspezifische Varianzen innerhalb einer Art aufgedeckt und berücksichtigt werden. Diese Unterschiede eingeschlossen, wurde anschließend eine Konsensus-Sequenz aus allen Sequenzen einer Art erstellt, um den darauffolgenden interspezifischen Vergleich zu erleichtern. Diese Konsensus-Sequenzen wurden wiederum in den einzelnen Handelssortimenten der CITES-geschützten Holzart und ihren jeweiligen Substitutionshölzern in einem Sequenzalignment zusammengeführt. Somit entstand eine Übersicht, die die jeweiligen interspezifischen Unterschiede in den Sequenzen der Arten innerhalb einer Vergleichsgruppe herausstellt.

Tabelle 11 Basenkombination und dazugehöriger IUPAC-Nucleotid-Code

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

3.2.7 Oligo-Design

Die in Geneious Prime erschaffene Übersicht der Sequenzen verdeutlicht die Unterschiede der Holzarten. An Sequenzstellen mit hoher interspezifischer Differenz wurden Abschnitte von ca. 20 bp auf folgende Eigenschaften hin untersucht (Lottspeich and Engels, 2012):

- 1) Die Sequenzabschnitte am 5'-Ende sollten mit G oder C beginnen.
- 2) Es sollten sich keine mehrfach hintereinander gereihten, gleichen Basen bzw. keine wiederkehrenden Motive ergeben.
- 3) Der G/C-Gehalt sollte zwischen 40 % und 60 % liegen.
- 4) Die Schmelztemperatur sollte zwischen 55°C und 65°C liegen.

Weiterhin wurden diese kurzen Abschnitte auf das theoretische Bilden von Hairpins und Dimeren durch den „Primer3“-Algorithmus in der Geneious Prime Software kontrolliert. Bei ausreichender interspezifischer Variabilität und Besitz der aufgeführten Eigenschaften wurden die Sequenzen dieser kurzen Abschnitte zur Herstellung von C6-Aminolinked Oligonukleotiden (Oligos) durch biomers.net GmbH (D-89077, Ulm) verwendet. Die erstellten Oligos dienten anschließend als Sonden für die Macroarrays. Die Oligos wurden nach folgendem Schema beschriftet:

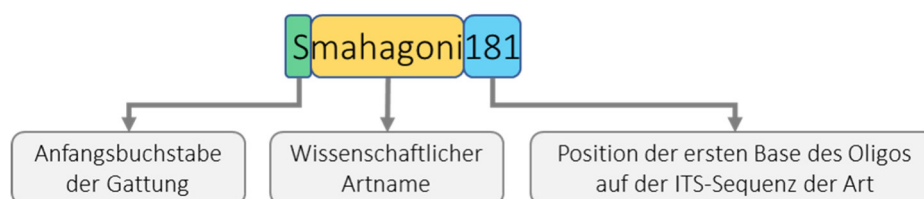


Abbildung 9 Beschriftungsschema der Oligos

Sonden, die nicht diesem Beschriftungsmuster folgen, wurden aus vorherigen Arbeiten übernommen (Wegner, 2013, Matthies, 2014, Peters, 2015).

3.2.8 Macroarray

Die Macroarray-Versuche wurden in Anlehnung an das Protokoll von Lievens et al. (2012) durchgeführt. Das Verfahren wurde im Zuge der Abschlussarbeiten von Wegner (2013), Matthies (2014) und Peters (2015) an die vorhandenen Laborbedingungen und die Aufgabenstellung angepasst. In der vorliegenden Arbeit wurden Schwenk- und Rotationszeiten sowie Chemikalienmengen des Ausgangsprotokolls weiter optimiert, um eine schnellere und effizientere Durchführung zu erreichen. Alle Schwenkprozesse wurden bei 15 rpm und Raumtemperatur (RT) und alle Rotationsprozesse im Hybridisierungs-ofen bei 9 rpm und 58°C durchgeführt. Im Hybridisierungsschritt wurde das DIG-gelabelte PCR-Produkt (siehe Kapitel 3.2.3.) aufgebracht. Der Ablauf des optimierten Protokolls ist im folgenden Abschnitt erläutert und bezieht sich auf eine von maximal vier gleichzeitig bearbeitbaren Membranen. Bei einer gleichzeitigen Verwendung von vier Membranen wurden die vorbereiteten Puffermengen dementsprechend vervierfacht. Die Schritte werden in Tabelle 12 zusammengefasst.

Zu Beginn wurden alle notwendigen Puffer hergestellt und die gelieferten Oligos mit 0,5 M Printing Puffer angesetzt. „H₂O“ steht in der folgenden Tabelle für destilliertes Wasser.

Tabelle 12 Auflistung der Puffer und ihre Zusammensetzung

Lösung	Herstellung und Lagerung
10 mM TRIS	Für 100 ml: 0,12114 g TRIS in 100 ml H ₂ O lösen, pH 8,0 einstellen
5'-C6-amino-labeled Oligos	x µl (für x siehe Oligo-Datenblatt) mit TRIS-Puffer auf eine Konzentration von 200 µM ansetzen, bei -20°C lagern
0,5 M Printing Buffer	0,5 M NaHCO ₃ , pH 8,4, 0,004 % Bromophenolblau (BPB) Für 100 ml: 4,2 g NaHCO ₃ in 80 ml H ₂ O lösen, pH 8,4 mit 0,2 M NaOH einstellen, Volumen auf 99 ml auffüllen, 1 ml BPB zugeben, filtrieren und bei 4°C lagern
Oligo-Raster	40 µl 0,5 M Printing Buffer + 10 µl Oligo in Mikrotiterplatte pipettieren, verschließen und bei -20°C lagern
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat (Tri-Natriumdihydrat), pH 7,0 Für 800 ml: 140,3 g NaCl + 70,6 g Natriumcitrat in 650 ml H ₂ O lösen, pH 7,0 mit 1 M HCl einstellen, Volumen auf 800 ml auffüllen, filtrieren und bei RT lagern
2x SSC	Für 1 l: 100 ml 20x SSC + 900 ml H ₂ O
6x SSC	Für 1 l: 333 ml 20x SSC + 667 ml H ₂ O

10 % NLS N-Lauroyl Sarcosine	Für 50 ml: 5 g NLS in 40 ml H ₂ O lösen, Volumen auf 50 ml auffüllen, filtrieren und bei RT lagern
10 % SDS Sodium Dodecyl Sulfate	Für 50 ml: 5 g SDS in 40 ml H ₂ O lösen, Volume auf 50 ml auffüllen, filtrieren und bei RT lagern
Blocking Buffer I 50 ml	2x SCC, 0,5 % Casein, 0,05 % Tween20 Für 2 Membranen: 0,5 g Casein in 100 ml 2x SSC lösen, dabei auf 80°C erhitzen, filtrieren, 50 µl Tween20 zugeben (erst wenn Lösung auf 20 - 40°C abgekühlt ist)
Hybridization Buffer	6x SSC, 0,1 % NLS, 0,02 % SDS Für 1 l: 10 ml 10 % NLS + 2 ml 10 % SDS + 1 l 6x SSC, bei RT lagern
Prehybridization Buffer 40 ml	Hybridization Buffer, 1 % Casein Für 2 Membranen: 0,8 g Casein in 80 ml Hybridization Buffer lösen, dabei bis auf 80°C erhitzen, filtrieren
Hybridization Wash Buffer I	6x SSC, 1 % SDS Für 1 l: 10 ml 10 % SDS + 990 ml 6x SSC
5x Buffer I	0,5 M Maleinsäure, 0,75 M NaCl, pH 7,5 Für 800 ml: 46,4 g Maleinsäure + 35,1 g NaCl in 650 ml H ₂ O lösen, pH 7,5 mit NaOH-Pellets einstellen, Volumen auf 800 ml auffüllen, filtrieren und bei RT lagern
1x Buffer I	Für 1 l: 200 ml 5x Buffer I + 800 ml H ₂ O.
Hybridization Wash Buffer II 220 ml	1x Buffer I, 0,3 % Tween20 Für 2 Membranen: 440 ml 1x Buffer I + 1,32 ml Tween20
Blocking Reagent 10x	Für 100 ml: 10 g Blocking Reagent in 100 ml 1x Buffer I lösen, Lösung autoklavieren und bei 4 °C lagern
Blocking Reagent 2x	Für 2 Membranen: 176 ml 1x Buffer I + 44 ml Blocking Reagent 10x
5x Buffer II	0,5 M TRIS, 0,5 M NaCl, pH 9,5 Für 800 ml: 48,5 g TRIS + 23,4 g NaCl in 650 ml H ₂ O lösen, pH 9,5 mit 1 M NaOH einstellen, Volumen auf 800 ml auffüllen, filtrieren und bei RT lagern
Detection Buffer	Für 1 l: 200 ml 5x Buffer II + 800 ml H ₂ O

Die mit Printing Puffer in einer Mikrotiterplatte angesetzten Oligos wurden mit einem Multiplotter auf die zurecht geschnittene (12 cm x 8 cm) Immunodyne ABC Membran (Pall Europe ltd) gespottet und für 15 min getrocknet. Währenddessen wurden 40 ml Prähybridisierungspuffer auf 58°C erhitzt. Die Membran wurde beschriftet und in einer Schale (11 cm x 15 cm) platziert. Anschließend wurde die Membran für 15 min in 55 ml Blocking Buffer I auf einem Schüttler gewaschen. Nach dem Verwerfen des Puffers wurde die Membran ein weiteres Mal für 5 min in 75 ml 2xSSC gewaschen. An diesem Punkt ist eine Lagerung der Membran in selbigem Puffer bei 4°C möglich. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit Hilfe zweier Pinzetten in ein Falcontube gedreht. Die Rückseite der Membran lag an der Wand des Falcontubes an und durfte sich nicht überlappen. Das Gewinde des Falcontubes wurde im Vorhinein mit Teflonband umwickelt, um ein

Auslaufen des Puffers bei der waagerechten Drehbewegung im Ofen zu verhindern. Der auf 58°C erhitzte Prähybridisierungspuffer wurde zur Membran in den Falcontube gegeben und für 15 min im Hybridisierungsofen gedreht. In der Zwischenzeit wurden 40 ml Hybridisierungspuffer auf 65°C erhitzt. 3,4 ml des Hybridisierungspuffers wurden zu je 1,7 ml-Teilen abgenommen und in einem 2 ml-Eppendorftube mit je 1,7 µl DIG-gelabeltem PCR-Produkt gemischt. Anschließend wurde die Probe für 10 min im Thermo-schüttler denaturiert. Nachdem der Prähybridisierungspuffer aus dem Falcontube verworfen wurde, erfolgte die Zugabe des vorgeheizten Hybridisierungspuffers zusammen mit der denaturierten Probe zur Membran im Falcontube. Die Hybridisierung fand für 30 min im Hybridisierungsofen statt. Während dieses Vorganges wurden 80 ml Hybridisierungswaschpuffer auf 65°C erhitzt. Davon wurden 40 ml nach dem Hybridisierungsprozess und dem Verwerfen des Puffers zur Membran gegeben. Dieser Waschschrift fand im Hybridisierungsofen für 10 min statt und wurde nach Verwerfen des Puffers erneut wiederholt. Anschließend wurde die Membran wieder in der Schale auf dem Schüttler platziert und alle weiteren Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Es wurden 50 ml HWP II für 5 min zur Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran in 55 ml 2xBR für 5 min inkubiert. Zum restlichen 2xBR Puffer wurde 1,1 µl Anti-DIG-AP gemischt. Darin wurde die Membran für 15 min geschwenkt. Auf diesen Schritt folgten weitere drei je fünfminütige Waschschriffe mit HWP II. Der letzte Schüttelschritt erfolgte 10 min in 75 ml Detektionspuffer. Davon wurden 350 µl in einem 2 ml-Eppendorftube mit 3,5 µl CDP-Star gemischt und das Tube anschließend lichtdicht mit Alufolie umwickelt. Die Membran wurde auf eine zugeschnittene und geöffnete Klarsichtfolie gebettet. Das CDP-Star-Detektionspuffergemisch wurde dort auf der Membran mit Hilfe einer Pipette verteilt. Mehrfaches Öffnen und Schließen der Klarsichtfolie gewährleistete eine ausreichende Verteilung des CDP-Star auf der Membran. Beim Schließen der Folie musste auf das Vermeiden von Luftblasen geachtet werden. Die Membran ruhte so anschließend für 5 min bei 37°C im Inkubationsofen. Im letzten Schritt wurde ein Röntgenfilm auf der Folie mit Membran in einer Belichtungskassette unter Lichtausschluss platziert. Der Film wurde 1 h belichten und anschließend unter Rotlicht entwickelt. Im Folgenden ist eine Kurzfassung des Protokolls dargestellt.

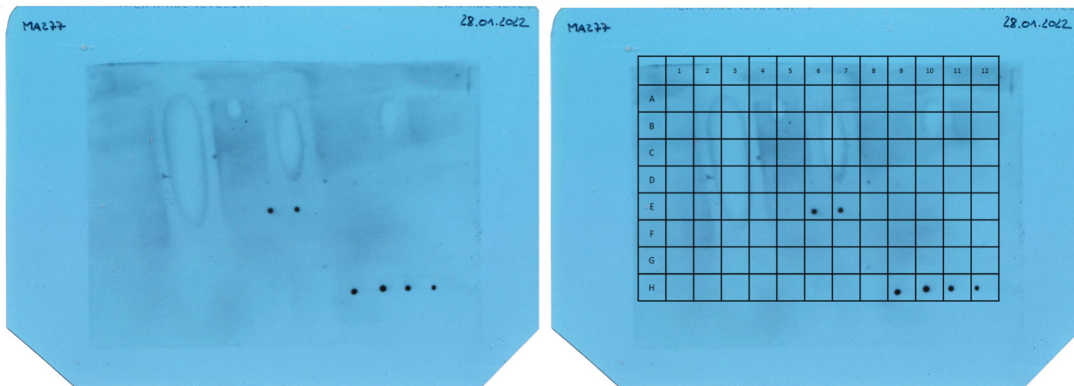
Tabelle 13 Kurzfassung des optimierten Macroarray-Protokolls

Vorgang	Zeit [min]	Volumen*	Ort der Reaktion	Temperatur	Lösung und Material
Spotten der Membran	15	0,2 µl	Schale statisch	RT	Immunodyne ABC Membran + Multi Blot Replikator
erstes Blocken	15	55 ml	Schale auf Schüttler 15 rpm	RT	Blocking Puffer I
Waschen	5	75 ml	Schale auf Schüttler 15 rpm	RT	2xSSC
Hier kann eine Lagerung der Membranen in 2xSSC über Nacht bei 4°C eingefügt werden.					
Prähybridisierung	15	40 ml	Falcontube im Hyb.ofen 9 rpm	Lsg: 58°C Ofen: 58°C	Prähybridisierungspuffer
Probendenaturierung	8	3,4 µl + 3,4 ml	Eppi im Thermoschüttler	95°C	DIG-labelt PCR-Produkt + Hybridisierungspuffer
Hybridisierung	30	36 ml + 3,4 ml	Falcontube im Hyb.ofen 9 rpm	Lsg: 65°C Ofen: 58°C	Hybridisierungspuffer + denaturierte Probe
Waschen 1	10	40 ml	Falcontube im Hyb.ofen 9 rpm	Lsg: 65°C Ofen: 58°C	Hybridisierungswaschpuffer I
Waschen 2	10	40 ml	Falcontube im Hyb.ofen 9 rpm	Lsg: 65°C Ofen: 58°C	Hybridisierungswaschpuffer I
Waschen	5	50 ml	Schale auf Schüttler 15 rpm	RT	Hybridisierungswaschpuffer II
zweites Blocken	5	55 ml	Schale auf Schüttler 15 rpm	RT	Blocking Reagent 2x
Blocken mit Antikörper	15	55 ml + 1,1 µl	Schale auf Schüttler 15 rpm	RT	Blocking Reagent 2x + Anti-DIG-AP
Waschen 1	5	50 ml	Schale auf Schüttler 15 rpm	RT	Hybridisierungswaschpuffer II
Waschen 2	5	50 ml	Schale auf Schüttler 15 rpm	RT	Hybridisierungswaschpuffer II
Waschen 3	5	50 ml	Schale auf Schüttler 15 rpm	RT	Hybridisierungswaschpuffer II
Detektion	10	50 ml	Schale auf Schüttler 15 rpm	RT	Detektionspuffer
Inkubation mit CDP-Star	5	350 µl + 3,5 µl	Inkubationsofen	Ofen: 37°C	Detektionspuffer + CDP-Star in Eppi mit Alufolie
Röntgenfilmbelichtung	30		Dunkelkassette	RT	Röntgenfilm auf Membran
Entwicklung	1,5	109 ml + 391 ml	Fotoschalen	RT	Kodak Developer + dest. Wasser
Waschen	1	500 ml	Fotoschalen	RT	dest. Wasser
Fixierung	3	109 ml + 391 ml	Fotoschalen	RT	Kodak Fixer + dest. Wasser
Waschen	1	500 ml	Fotoschalen	RT	dest. Wasser
Trocknen			Trockenleine	RT	
	191,5	min			
	3,2	h			frisch ansetzen

* bezieht sich auf Plastikschaale mit einer Abmessung von 11 cm * 15 cm
 Entwickler und Fixierer sind wieder verwendbar

3.2.9 Manuelle Auswertung der Röntgenfilme

Die Auswertung der Röntgenfilme wurde zuerst visuell durchgeführt (siehe Abb. 10). Der Film wurde eingescannt (Abb. 10(a)) und ein Raster anhand der Positivkontrollen (H9-12) auf dem Röntgenbild positioniert (Abb. 10(b)). Somit wurde die Position der hybridisierten Sonden im Vergleich zum aufgebrauchten Muster (Abb. 10(c)) erkennbar.



(a) Eingescannter Röntgenfilm

(b) Ausrichtung des Rasters anhand der vier Positiv-Kontrollen (H9-H12)

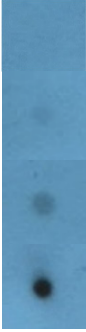
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Smahagoni181	Mahagoni for4	Smahagoni649	Smacrophylla112	Macrophylla rev1	Carapa for3	Carapa for2	Carapa rev1	Cprocera 50	Ent ango for2	Ent cyl for2	Ecylicindricum264
B	Eutile 86	Khaya for2	Khaya rev1	Khaya243	Kivorensis 106	Lcedrata 35	Lcedrata 459	Lthompsonii35	Lthompsonii457	Ced fissilis for1	Ced odorata for1	Cedrela 29
C	Toona70	Gpelle 221	Gtess 225	Gtess 579	Garnoldiana79	Garnoldiana219	Garnoldiana629	Gehie 44	Csalikounda41	Csalikounda93	Hcourb for1	Hcourb for2
D	Perinaceus615	Psantalinus487	Psantalinus682	Pindicus 487	Pindicus 597	Pmacrocarpus71	Pindimacro32	Psoyauxii 501	Gonystylus48	Gonystylus137	Ramin for1	Gonystylus422
E	Ramin rev1	Alstonia 481	Aboonei 408	Atoxicaria 149	Atoxicaria 553	1Balicastrum483	1Balicastrum502	Dprunifor mis33	Dprunifor mis512	Jcopaia 28	Jcopaia 510	Jcopaia 589
F	Koto for1	Pbequaertii175	Pmacrocarpa26	Limba for1	Limba rev1	Tivorensis 111	Tivorensis 224	Tsuperba 219	Guaiacum for1	Gcoulteri 172	Gofficinal e172	Gua offic for1
G	Gua sanct for1	Gua sanct rev1	Bulnesia for1	Bulnesia rev1	Parborea 34	Chlorocardium111	lpe for1	Handroanthus211	lpe rev1			
H									Holz for1	Holz for2	Holz rev1	Holz rev2

(c) Raster der aufgebrauchten Sonden (H9-H12 = Positiv-Kontrollen)

Abbildung 10 Darstellung der manuellen Röntgenbildauswertung

Eine Hybridisierung von Sonde und Probe ist als schwarzer Punkt auf dem Film erkennbar. Die Intensität dieser Punkte wurde in drei Kategorien eingeteilt – schwache, deutliche und starke Reaktion. Ist im Rasterfeld kein Punkt erkennbar, hat keine Reaktion stattgefunden. Die abgelesenen Reaktionen wurden in einer Tabelle zusammengeführt, in der die getesteten Sonden den einzelnen Versuchen und somit den einzelnen Holzarten gegenübergestellt wurden. Die Hybridisierungsreaktion der Sonden ist durch „+“ (positives Signal) gekennzeichnet bzw. durch „-“ (negatives Signal), wenn keine Reaktion stattfand. Entspricht die Reaktion der Erwartung, ist die Zelle grün unterlegt („richtig positives“ Signal). „Falsch positive“ Signale sind rot hinterlegt und zeigen, dass für diese Sonde in Kombination mit jener Probe keine Reaktion erwartet wurde. Die Anzahl von „+“ deutet auf die Intensität des Signales hin. Die Bewertung der Hybridisierungssignale ist im folgenden Schema veranschaulicht.

Tabelle 14 Bewertungsmatrix für die Intensität der Hybridisierungsreaktion

Signalstärke	Kennzeichnung	Bewertung
	-	negativ
	+	leicht positiv
	++	deutlich positiv
	+++	stark positiv
	+...	richtig positiv
	+...	falsch positiv
	+...	nicht eindeutig
	-	falsch negativ

3.2.10 Automatische Auswertung der Röntgenfilme

Unter Konsolidierung einer Expertin für Bildverarbeitung (Frau Krüger, Dr. rer. nat. der Informatik, spezialisiert auf Bildverarbeitung), wurde ein Prototyp zur automatischen Bestimmung der Signalintensitäten jeder Sonde implementiert (Programmiersprache Python).

Folgende beschriebene Schritte (siehe Abb. 11), wurden hierfür durchlaufen:

Zuerst wurden die eingescannten Filme (Abb. 11(a)) vom Farbraum (Rot-Gelb-Blau-Raum) in einen Grauwertebereich überführt und das Raster (weiße Punkte in Abb. 11(b)) für alle möglichen Positionen der Sonden festgelegt. Anschließend wurde der Film am festgelegten Raster ausgerichtet (Abb. 11(c)). Um eine möglichst gute und vergleichbare Ausrichtung für jede einzelne Sonde zu erzielen, wurde ein lokaler Ausschnitt um jede Sonde automatisch zu einem gegebenen „Punkt-Template“ ausgerichtet, indem eine größtmögliche Ähnlichkeit zwischen Film-Ausschnitt und Template erzielt wird (Abb. 11(d)). Im Anschluss kann automatisch die Signalintensität für jede Sonde bestimmt werden, indem die mittleren Grauwertintensitäten (GI) zweier festgelegter Regionen pro lokalem Ausschnitt gegenübergestellt werden (Abb. 11(e)). Diese Herangehensweise (Vergleich der Werte „innerhalb der Sonde“ (R1) mit einer lokalen Nachbarschaft (R2)) wurde gewählt, um vergleichbare Werte ($W = GI(R1) - GI(R2)$) für Sonden zu erhalten, die in helleren oder dunkleren Bereichen desselben Films liegen. Um abschließend eine Vergleichbarkeit der Signalintensitäten über die Filme hinweg zu gewährleisten, werden die ermittelten Werte (W) mit dem mittleren Wert der jeweils vier Positiv-Kontrollen (W_{pK}) jedes Films normalisiert:

$$\text{normW} = W / ((W_{pK1} + W_{pK2} + W_{pK3} + W_{pK4}) * 1/4).$$

Dadurch entstehen Werte normW zwischen 0 und 1, wobei 1 „Sonde misst gleiche Signalintensität wie Positiv-Kontrollen“ bedeutet (Abb. 11(f)). Werte > 1 werden als = 1 interpretiert.

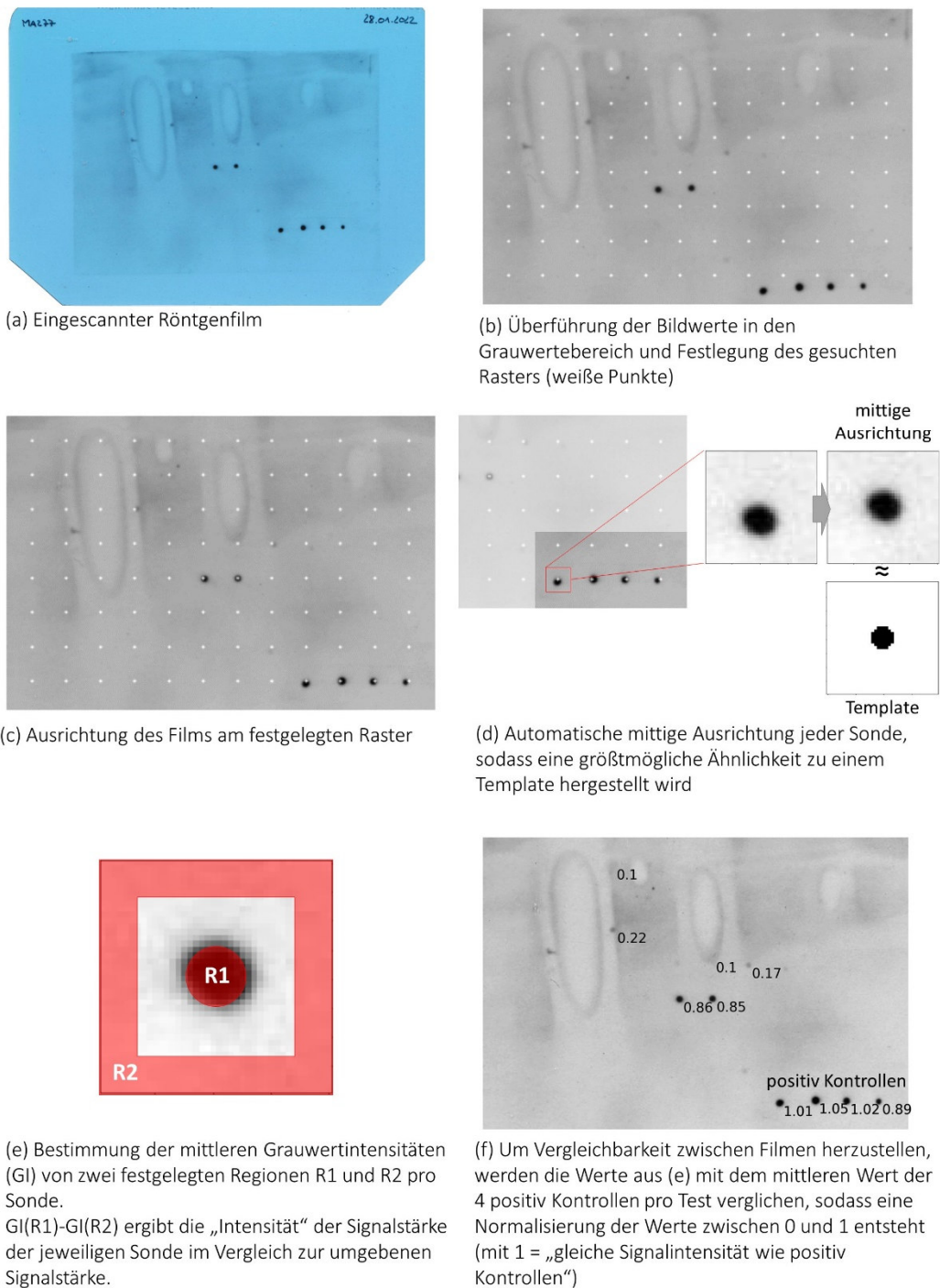


Abbildung 11 Automatisierte Messung der Hybridisierungsreaktion

Die so automatisch bestimmten Werte pro Rasterpunkt wurden in eine Tabelle überführt, in der die Sonden den jeweiligen Proben gegenüberstehen. Dadurch ist ein Vergleich der manuellen Einschätzung mit den automatisch generierten Werten einfach möglich.

3.2.11 Kreuztests

Für jede Holzart wurden drei Versuchsdurchgänge innerhalb von drei Gruppen gefahren, um eine Vorauswahl der Oligos zu treffen. Die Versuchsgruppierungen sind in Tabelle 15 aufgestellt. Die CITES-geschützten Holzarten sind grau unterlegt, gefolgt von ihren Austauschhölzern.

Tabelle 15 Gruppierung der Proben zur Oligoauswahl; Holzart (Probennr.)

Gruppe 1 MELIACEAE	Gruppe 2 FABACEAE	Gruppe 3 Ramin + Pockholz
<i>Swietenia macrophylla</i> (183)	<i>Guibourtia demeusei</i> (BR06)	<i>Gonystylus bancanus</i> (244)
<i>Swietenia mahagoni</i> (165)	<i>Guibourtia pellegriniana</i> (BR12)	<i>Alstonia boonei</i> (Ab2)
<i>Carapa guianensis</i> (920)	<i>Guibourtia tessmannii</i> (BR16)	<i>Antiaris toxicaria</i> (At2)
<i>Carapa procera</i> (Cp1)	<i>Guibourtia arnoldiana</i> (BR03)	<i>Brosimum alicastrum</i> (Ba1)
<i>Entandro. angolense</i> (Ea4)	<i>Guibourtia ehie</i> (Ge1)	<i>Donella pruniformis</i> (Chp2)
<i>Entandro. cylindricum</i> (Ec1)	<i>Copaifera salikounda</i> (Cs2)	<i>Jacaranda copaia</i> (BR17)
<i>Entandro. utile</i> (Eu6)	<i>Hymenaea courbaril</i> (945)	<i>Pterygota bequaertii</i> (Pb3)
<i>Khaya anthotheca</i> (Ka2)	<i>Pterocarpus erinaceus</i> (BR22)	<i>Pterygota macrocarpa</i> (Pm1)
<i>Khaya grandifoliola</i> (691)	<i>Pterocarpus santalinus</i> (Psa1)	<i>Terminalia ivorensis</i> (Ti5)
<i>Khaya ivorensis</i> (911)	<i>Pterocarpus indicus</i> (448)	<i>Terminalia superba</i> (Ts7)
<i>Khaya nyasica</i> (688)	<i>Pterocarpus macrocarpus</i> (BR24)	<i>Guaiacum coulteri</i> (Gco1)
<i>Khaya senegalensis</i> (456)	<i>Pterocarpus soyauxii</i> (Ps2)	<i>Guaiacum officinale</i> (919)
<i>Leplaea cedrata</i> (Gc6)		<i>Guaiacum sanctum</i> (162)
<i>Leplaea thompsonii</i> (Gt3)		<i>Plectrocarpa arborea</i> (509)
<i>Cedrela angustifolia</i> (947)		<i>Handroanthus heptaphyllus</i> (914)
<i>Cedrela fissilis</i> (36)		<i>Handroanthus serratifolius</i> (Hs2)
<i>Cedrela odorata</i> (452)		
<i>Toona ciliata</i> (Tc2)		
<i>Toona sureni</i> (133)		

Erfolgreiche, d.h. „richtig positiv“ und „richtig negativ“ reagierende Sonden fanden Berücksichtigung in den weiteren Tests. „Falsch positiv“ oder „falsch negativ“ reagierende Sonden wurden verworfen.

Sonden, die in diesen Versuchen gut abschnitten, wurden dann im abschließenden Gesamt-Kreuztest gegen Proben aller untersuchten Holzarten geprüft, um Kreuzreaktionen mit Arten anderer Gruppen auszuschließen. Von diesen Gesamtversuchen wurden zwei Durchgänge gefahren. Anschließend erfolgte eine Beurteilung der Sonden. Die Aufbringungsmuster der Sonden in den drei Gruppen sowie des Gesamtversuchs sind in der Abbildung 12 dargestellt. Auf den Positionen H9-H12 finden sich jeweils die Kontroll-Oligos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Mahagontax for1	Mahagontax for2	Mahagontax for3	Mahagontax for4	Mahagontax rev1	Mahagontax rev2	Smahagoni12	Smahagoni181	Smahagoni649			
B	Macchumtax for1	Macchumtax for2	Macchumtax for3	Macchumtax rev1	Macchumtax rev2	Smacchumtax rev1	Smacchumtax rev2	Smacchumtax rev3				Cprocera 50
C	Carapa for1	Carapa for2	Carapa for3	Carapa rev1	Carapa rev2	Gguianensis266	Gguianensis652	Gguianensis122	Cprocera 121	Gguianensis614	Cprocera 609	Gguianensis74
D	Entandri for1	Entandri for2	Entandri for3	Entandri rev1	Entandri rev2	Entandri rev3	Ecylin drum264	Ecylin drum264	Ecylin drum87	Eutile 33	Entandri rev2	
E	Khaya for1	Khaya for2	Khaya for3	Khaya rev1	Khaya rev2	Kivorensis266	Kivorensis465	Kivorensis106	Kivorensis182			Eutile 86
F	Limba for1	Limba for2	Lcedrata 35	Lthompsoni135	Lcedrata 197	Lthompsoni164	Lcedrata 459	Lthompsoni457				
G	Ced fissilis for1	Ced odorata for1	Cedrela 29	Cangustifolia544	Cangustifolia557				Skoetjape 576	Skoetjape 55		
H	Tciliata36	Toona70							Holz for1	Holz for2	Holz rev1	Holz rev2

(a) Raster Gruppe *Meliaceae*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Gdemus ei186	Gpelle 482	Gtess 579	Garnoldina219	Gehie 44	Gleo 101	Gdemus ei169	Gpelle 624	Garnoldina629	Gdemus ei1635	Gpelle 221	Gtess 225
B	Csalikoumda41	Csalikoumda559	Csalikoumda93									Garnoldina79
C	Hcourb for1	Hcourb for2	Hcourb rev1	Hcourbari1294								
D	Perinaceus615	Psantalinus487	Pindicus 487	Psouyaxi1501	Psantalinus682	Pindicus 597	Pmacrocrapsa71	Psantalinus52	Pindimacro32			
E												
F												
G												
H										Holz for1	Holz for2	Holz rev1

(b) Raster Gruppe *Fabaceae*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ramin for1	Ramin rev1	Gonystylus48	Gonystylus422		Gonystylus137						
B	Alstonia 481	Aboonei 408			Atoxicaria 553	Atoxicaria 149		1Ballastrum502	1Ballastrum483			
C	Dprunifomis33	Dprunifomis12	Dprunifomis1	Jcopala 28	Jcopala 510	Jcopala 589	Ncadamb a21					
D	Koto for1	Koto rev1	Pbequaer tili175	Pmacrocrapsa26			Tivorensis111	Tivorensis224		Tsuperba 219		
E	Guaiaacum for1	Guaiaacum rev1	Gua officinalis1	Gua officinalis26	Gua sanctiflor1	Gua sanctiflor1	Goultieri 13	Gofficinalis209	Guanctum 14	Goultieri 172	Gofficinalis172	Gofficinalis171
F	Bulnesia for1	Bulnesia rev1	Parborea 34			Chlorocardium111	Crodiei 207					
G	Ipe for1	Ipe rev1	Handroanthus147	Handroanthus211	Handroanthus438							
H									Holz for1	Holz for2	Holz rev1	Holz rev2

(c) Raster Gruppe „Ramin+Pockholz“

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Smahagoni181	Mahagontax for4	Smahagoni649	Smacchumtax rev1	Macchumtax rev1	Carapa for3	Carapa for2	Carapa rev1	Cprocera 50	Entandri for2	Entandri for2	Ecylin drum264
B	Eutile 86	Khaya for2	Khaya rev1	Khaya243	Kivorensis106	Lcedrata 35	Lcedrata 459	Lthompsoni135	Lthompsoni457	Ced fissilis for1	Ced odorata for1	Cedrela 29
C	Toona70	Gpelle 221	Gtess 225	Gtess 579	Garnoldina79	Garnoldina219	Garnoldina629	Gehie 44	Csalikoumda41	Csalikoumda93	Hcourb for1	Hcourb for2
D	Perinaceus615	Psantalinus487	Psantalinus682	Pindicus 487	Pindicus 597	Pmacrocrapsa71	Pindimacro32	Psouyaxi1501	Gonystylus48	Gonystylus422	Ramin for1	Gonystylus422
E	Ramin rev1	Alstonia 481	Aboonei 408	Atoxicaria 149	Atoxicaria 553	1Ballastrum483	1Ballastrum502	Dprunifomis33	Dprunifomis12	Jcopala 28	Jcopala 510	Jcopala 589
F	Koto for1	Pbequaer tili175	Pmacrocrapsa26	Limba for1	Limba rev1	Tivorensis111	Tivorensis224	Tsuperba 219	Guaiaacum for1	Goultieri 172	Gofficinalis172	Gua officinalis171
G	Gua sanctiflor1	Gua sanctiflor1	Bulnesia for1	Bulnesia rev1	Parborea 34	Chlorocardium111	Ipe for1	Handroanthus211	Ipe rev1			
H									Holz for1	Holz for2	Holz rev1	Holz rev2

(d) Raster Gesamt-Kreuztest

Abbildung 12 Aufbringungs raster der Sonden

4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der DNA-Extraktion, Amplifizierung und Sequenzierung gebündelt im Kapitel „Erstellung der ITS-Sequenzen“ betrachtet. Darin wird zuerst auf die Gesamtheit der Proben eingegangen, um darauffolgend eine genauere Betrachtung in den einzelnen Gruppen vorzunehmen. In den anschließenden Kapiteln wird das Design der Oligos beschrieben und ihr Abschneiden in den Macroarray-Versuchen dargestellt. Die Auswertung der Gesamt-Kreuztests wurde manuell und automatisiert durchgeführt. Beide Methoden werden miteinander verglichen. Abschließend wird eine Bewertung über die Einsatzfähigkeit der Sonden in der Praxis vorgenommen.

4.1 Erstellung der ITS-Sequenzen

Die DNA wurde aus verschiedenen zur Verfügung stehenden Materialien wie Blatt, Kambium, Splint aus Ast und Stamm sowie Kernholz extrahiert. Für die Isolation wurde das DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) verwendet, im Weiteren als Kit 1 bezeichnet. Proben, die mit dieser Methode keine Ergebnisse zeigten wurden mittels DNeasy® *mericon*™ Food Kit (Qiagen) extrahiert, im Weiteren als Kit 2 bezeichnet. Die DNA-Konzentration und die Reinheit der Eluate wurden durch Spektrophotometrie gemessen. Anschließend wurden aus den Extraktionseluaten der ITS amplifiziert und der Erfolg in der Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Abbildung 13 stellt beispielhaft zwei Gele dar. Auf dem oberen Gel wurde zuerst der gesamte ITS in der PCR amplifiziert und das PCR-Produkt auf dem Gel aufgetragen. Die grün unterlegten PCR-Produkte zeigten saubere Banden in der erwarteten Länge von ca. 700 bp und wurden zur weiteren Verarbeitung verwendet. Die anderen Proben wurden erneut amplifiziert, diesmal mittels holzspezifischer Primer (siehe Kapitel 3.2.3). Die blau umrandeten Proben zeigen die PCR-Produkte des ITS1. Die PCR-Produkte des ITS2 sind orange gekennzeichnet. In diesem Gel sind ebenfalls die Proben mit sauberen Banden mit den erwarteten Längen von ca. 380 bp (ITS1) und ca. 440 bp (ITS2) grün unterlegt. Die Proben Ps8 und Ts4 zeigten in diesem Beispiel im ITS2 zu schwache Banden für eine Sequenzierung.

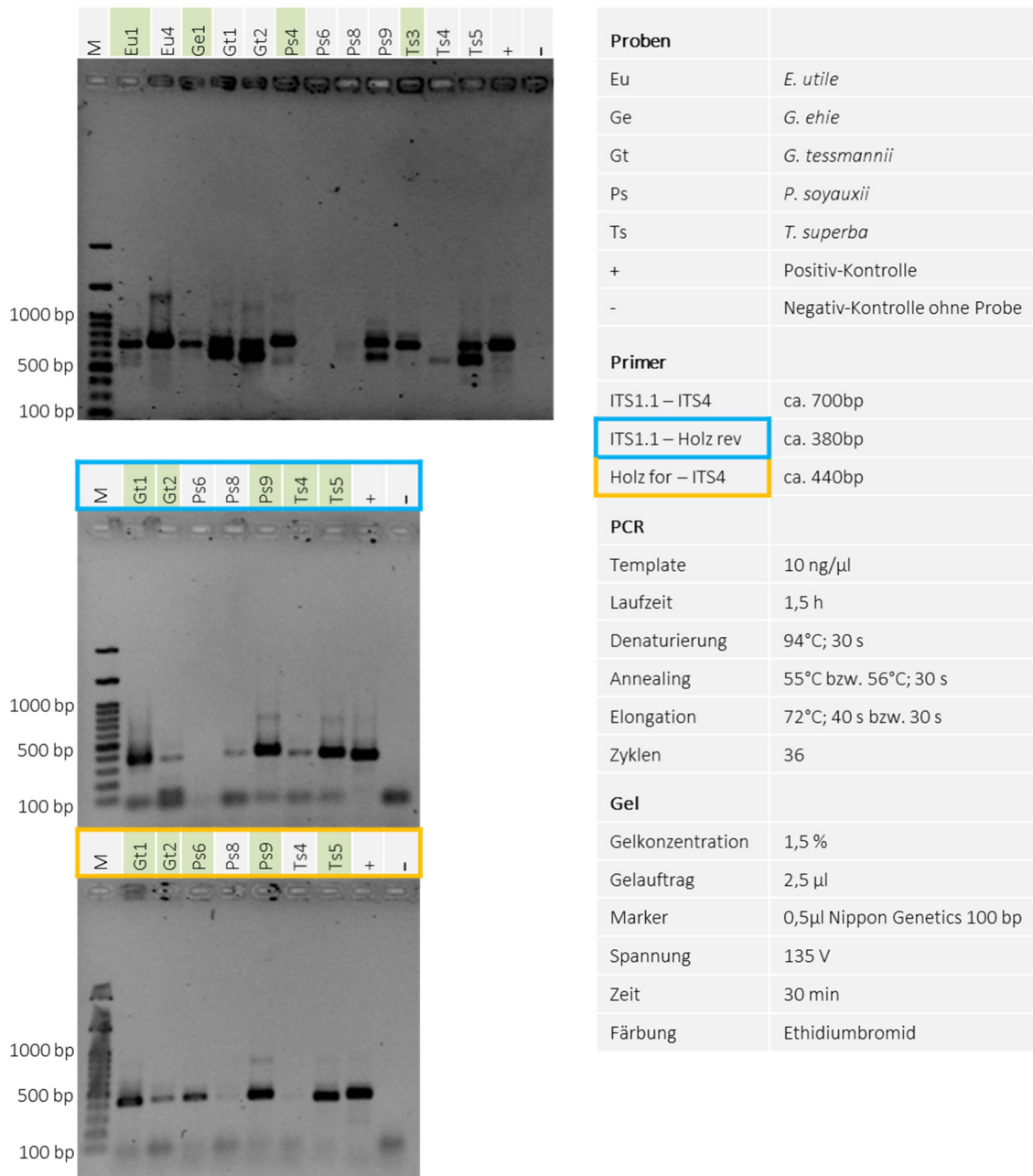


Abbildung 13 Darstellung der Banden auf zwei Gelen am Beispiel der PCR Nr. 42 und PCR Nr. 44

Insgesamt wurden zur Erstellung neuer Sequenzen 264 Proben bearbeitet. Davon wurden 255 Proben erfolgreich extrahiert und amplifiziert. 194 dieser Proben wurden mit Kit 1 und weitere 61 Proben durch Kit 2 bearbeitet. Die amplifizierten Proben wurden aufgereinigt und außer Haus sequenziert. Zusätzlich wurde die DNA weiterer acht Proben, deren Sequenzen bereits in früheren Arbeiten erstellt (Wischnewski, 2014) und veröffentlicht wurden, isoliert und die DNA für die folgenden Macroarray-Versuche

verwendet. Für neun Proben waren die DNA-Extraktion und die Amplifizierung nicht erfolgreich.

Die erhaltenen Sequenzen wurden zuerst auf ihre Homologien mit der erwarteten Art oder Gattung mit Hilfe des BLAST-Services kontrolliert. 199 der 254 erfolgreich isolierten und amplifizierten Proben zeigten höchste Übereinstimmungen mit den deklarierten Arten bzw. Gattungen. Elf weitere Proben konnten zwar erfolgreich sequenziert werden, wiesen jedoch in der Auswertung eine falsche Bestimmung des Ausgangsmaterials auf. 44 Proben ergaben in der BLAST-Analyse entweder keine Ergebnisse oder Kontaminationen.

Anschließend wurden die einzelnen Sequenzen der beiden ITS-Bereiche und der beiden Sequenzierungsrichtungen in der Geneious Prime Software zu einer kompletten Sequenz des ITS zusammengeführt. Für 129 Proben konnten vollständige ITS-Sequenzen erstellt werden. Sie wiesen Längen des ITS (ITS1 + 5.8S + ITS2) von 615 bp bis 681 bp auf. Bei 51 Proben fehlten kleine Teile (< 50 bp) des ITS1 bzw. des ITS2. Große Lücken (> 50 bp) ergaben sich in 17 Sequenzen und zwei Sequenzen zeigten eine sehr schlechte Qualität, was eine Zusammensetzung verhinderte.

Auf Basis der erhaltenen ITS-Sequenzen wurde ein Alignment der einzelnen Individuen einer Holzart erstellt und eine Konsensus-Sequenz pro Holzart extrahiert, die intra-spezifische Varianzen berücksichtigte. In der folgenden Abbildung ist die erstellte Konsensus-Sequenz am Beispiel von *C. procera* in der jeweils obersten Zeile dargestellt. Die Konsensus-Sequenz wurde aus zehn in dieser Arbeit erstellten (Cp1-Cp10) und einer Datenbank-Sequenz (FJ518880) generiert (Abb. 14).

Für 60 Holzarten konnten Konsensus-Sequenzen auf diese Art und Weise aus dem Vergleich der neu erstellten Sequenzen und jenen aus der NCBI-Datenbank kreiert werden. Diese Konsensus-Sequenzen wurden schließlich innerhalb ihrer Gruppen einander gegenübergestellt, um interspezifische Differenzen aufzudecken. Die alignnten Konsensus-Sequenzen sind im Anschluss an das Kapitel 4.3 zusammen mit den designten Sonden dargestellt.

Die Ergebnisse der spektrophotometrischen Messung, der Homologien der Sequenzen und deren Basenpaarlängen werden im Folgenden getrennt nach den CITES-geschützten Holzarten und ihren Substitutionshölzern genauer betrachtet.

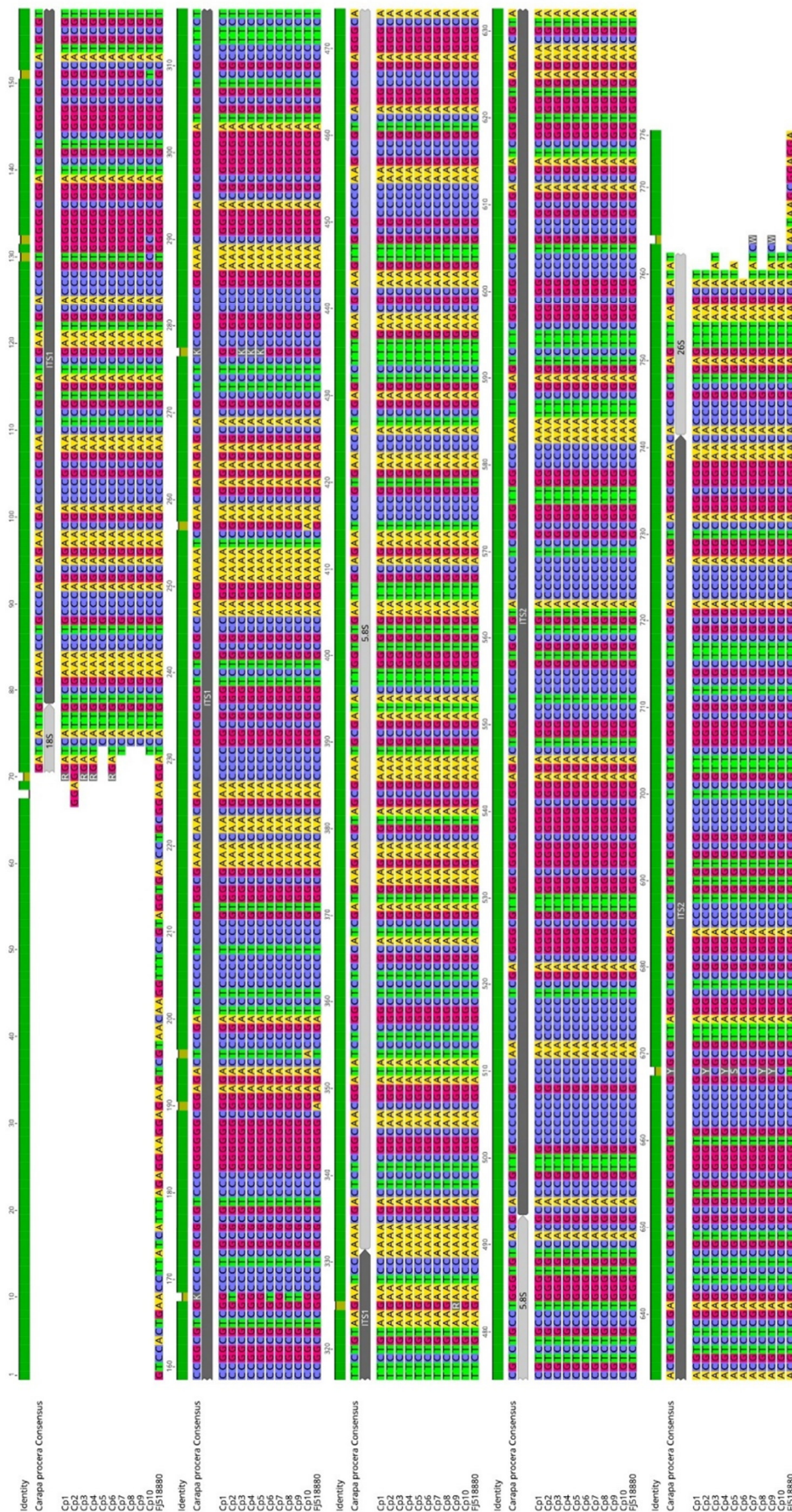


Abbildung 14 Alignment aller vorhandenen *C. procerca* Sequenzen; die jeweils erste Zeile zeigt die daraus erstellte Konsensus-Sequenz

4.1.1 MELIACEAE

In der Familie der MELIACEAE stehen zum einen die drei Arten der Gattung *Swietenia* *S. humilis*, *S. macrophylla* und *S. mahagoni*, zum anderen alle Arten der Gattung *Cedrela* unter CITES-Schutz. Für Letztere wurden in der vorliegenden Arbeit stellvertretend die Arten *C. angustifolia*, *C. fissilis* und *C. odorata* als wichtige handelsrelevante Cedro-Arten verwendet. Mit der CITES-Vertragsstaaten Konferenz im November 2022 wurden weiterhin alle Arten der Gattung *Khaya* unter CITES-Schutz (Appendix II) gestellt, mit einem völkerrechtlichen Inkrafttreten zum 23.02.2023. Für diese Gattung wurden stellvertretend die Arten *K. anthotheca*, *K. grandifoliola*, *K. ivorensis*, *K. nyasica* und *K. senegalensis* untersucht. Insgesamt wurden 81 Individuen von folgenden Arten bearbeitet (Probenanzahl):

- *Carapa guianensis* (8 Proben), *C. procera* (10)
- *Cedrela angustifolia* (3)
- *Entandrophragma angolense* (11), *E. cylindricum* (1), *E. utile* (7)
- *Khaya anthotheca* (2), *K. grandifoliola* (2), *K. ivorensis* (2), *K. nyasica* (3), *K. senegalensis* (2)
- *Lepalaea cedrata* (10), *L. thompsonii* (4)
- *Sandoricum koetjape* (3)
- *Swietenia humilis* (2), *S. macrophylla* (1)
- *Toona* spp. (1), *T. ciliata* (7), *T. sureni* (2)

71 dieser Proben wurden erfolgreich mittels Kit 1 bearbeitet. Sie zeigten DNA-Konzentrationen zwischen 4,9 ng/μl und 593,5 ng/μl mit 260/280-Werten von 1,19 bis 2,01. Für die Probe 658 (*C. guianensis*) wurde in der Konzentration ein negativer Wert von -0,2 ng/μl und ein 260/280-Wert von 0,2 sowie ein 260/230-Wert von 0,1 gemessen. Diese Verhältniswerte weisen auf eine extreme Verunreinigung mit phenolischen Bestandteilen und Proteinen hin, die eine saubere Messung verhindern. Die 260/230-Werte zeigten insgesamt eine starke Streuung von -6,58 bis 5,85, was ebenfalls auf eine starke Verunreinigung einiger Eluate schließen lässt. Trotz dieser teilweise schlechten Werte wurden für alle Proben, mit Ausnahme von Sk1 (*S. koetjape*), saubere Banden in der PCR erzielt und Sequenzierungen durchgeführt.

Bei sieben Proben ergab die DNA-Extraktion mit Kit 1 keine Erfolge. Sie wurden zusätzlich und zwei weitere Proben direkt mit Kit 2 bearbeitet. Sie wiesen DNA-Konzentrationen von 10,9 ng/μl bis 71,8 ng/μl und 260/280-Werte von 1,65 bis 1,87 sowie 230/280-Werte von 0,53 bis 1,15 auf. Ausnahmen bildeten die Proben BR25 (*S. koetjape*) und BR29

(*T. sureni*). Sie zeigten große Abweichungen mit negativen Konzentrationen von -4,7 ng/μl und -1,4 ng/μl, 260/280-Werte von -6,8 und 3,13 sowie 260/230-Wert von -0,18 und 0,09. Auch bei diesen Proben wurden trotz dieser Werte saubere Banden in der PCR erzielt.

Die erhaltenen Sequenzen wiesen für 71 Proben die höchsten Homologien mit den erwarteten Arten oder Gattungen (73,62 % – 100 %) auf. Bei den Proben 658, 660 (beide *C. guianensis*) und Eu4 (*E. utile*) handelte es sich um Fehlbestimmungen. Es ergaben sich höchste Übereinstimmungen mit *Andira surinamensis* (92,2 %), *Trichilia lepidota* (80,88 %) und *Harpephyllum caffrum* (91,8 %). Bei weiteren sechs Proben (234, 380, 428, Eu1, BR25, BR29) wurden keine Ergebnisse oder Kontaminationen festgestellt. Probe 133 (*T. sureni*) hatte höchste Übereinstimmung mit *T. ciliata* (98,4 %) und Probe BR30 (*Toona* spp.) zeigte eine Homologie von 98,8 % mit *T. ciliata* und 97,4 % mit *T. sureni*.

Für alle 71 Proben wurden ITS-Sequenzen zusammengeführt. Davon hatten 44 Sequenzen den vollständigen ITS1 und ITS2, mit Längen von 232 bp bis 270 bp (ITS1) und 244 bp bis 253 bp (ITS2). Der 5.8S wies für alle Sequenzen 162 bp auf. Bei 24 Sequenzen fehlten kleine (< 50 bp) Sequenzabschnitte des ITS1 und/oder ITS2. Der Sequenz der Probe Ec1 (*E. cylindricum*) fehlten große (> 50 bp) Teile des ITS1 und der Probe 963 (*K. senegalensis*) im ITS2. Die jeweiligen Längen beliefen sich auf 173 bp des ITS1 der Probe Ec1 und 139 bp des ITS2 der Probe 963. Bei der Probe 429 (*E. angolense*) fehlte große Stücke im ITS1 (206 bp) und ITS2 (75 bp).

Durch Gegenüberstellung aller Sequenzen einer Art sowohl der neu erstellten als auch jener aus der NCBI-Datenbank wurden für alle 21 Holzarten Konsensus-Sequenzen erstellt. Die interspezifischen Unterschiede wurden durch die Pairwise-Distance-Analyse prozentual bestimmt (siehe Abb. 15). Daraus ist abzulesen, dass die Übereinstimmung des ITS innerhalb einer Gattung höher ist als zwischen den Gattungen. Innerhalb der Gattungen reichen sie von einer Übereinstimmung von 88,7 % zwischen den beiden *Leplaea*-Arten und 99,5 % zwischen den beiden *Swietenia*-Arten *S. humilis* und *S. macrophylla*. Wohingegen die Übereinstimmungen zwischen den unterschiedlichen Gattungen von 73,2 % (*L. thompsonii* – *K. grandifoliola*) bis 93,7 % (*C. angustifolia* – *T. ciliata*) variiert. Problematische Homologien, was eine Unterscheidung der Arten

angeht, betrafen folgende Arten: *S. humilis* – *S. macrophylla* (99,5 %), *K. anotheca* – *K. nyasica* und *K. senegalensis* (98 % und 98,3 %), *T. ciliata* – *T. sureni* (99,2 %).

	<i>Swietenia humilis</i>	<i>Swietenia macrophylla</i>	<i>Swietenia mahagoni</i>	<i>Carapa guianensis</i>	<i>Carapa procera</i>	<i>Entandrophragma angolense</i>	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	<i>Entandrophragma utile</i>	<i>Khaya anotheca</i>	<i>Khaya grandifoliola</i>	<i>Khaya ivorensis</i>	<i>Khaya nyasica</i>	<i>Khaya senegalensis</i>	<i>Lepalaea cedrata</i>	<i>Lepalaea thompsonii</i>	<i>Sandoricum koetjape</i>	<i>Cedrela angustifolia</i>	<i>Cedrela fissilis</i>	<i>Cedrela odorata</i>	<i>Toona ciliata</i>	<i>Toona sureni</i>
<i>S. humilis</i>		99,5	94,9	88,8	87,6	84,7	83,9	81,8	89,6	86,5	89,2	89,2	89,6	77,1	75,5	79,5	82,1	82,9	83,6	83,5	82,8
<i>S. macrophylla</i>	99,5		94,7	88,9	87,6	84,7	83,8	81,7	89,7	86,7	89,2	89,2	89,6	77,1	75,4	79,5	82,2	82,9	83,7	83,5	82,9
<i>S. mahagoni</i>	94,9	94,7		87,7	85,7	82,9	82,5	80,4	87,2	84	87,5	87	87,4	76,3	75,4	78,3	81,1	81,6	82,8	82,8	82
<i>C. guianensis</i>	88,8	88,9	87,7		95,8	84,8	85,4	82,9	90,6	87,9	90,4	90,4	90,6	78,8	77,3	80,8	84,3	84	84,7	85,4	84,7
<i>C. procera</i>	87,6	87,6	85,7	95,8		83,1	83,5	81,7	90,3	87	90,3	90,1	89,8	79,1	77,6	80,2	83,9	83,3	83,9	84,5	84,7
<i>E. angolense</i>	84,7	84,7	82,9	84,8	83,1		91,6	89,7	83,8	80,8	84,1	83,3	84,2	79,6	77,9	81,2	85,3	85,1	86,2	87,6	86,8
<i>E. cylindricum</i>	83,9	83,8	82,5	85,4	83,5	91,6		91,2	82,9	80	83,2	82,4	83,2	80,5	78,8	82,1	85,2	85,7	86,6	87,9	87,2
<i>E. utile</i>	81,8	81,7	80,4	82,9	81,7	89,7	91,2		81,2	78,5	80,8	80,9	80,9	79,5	79,3	79,6	83,9	84,3	84,8	86,1	85,8
<i>K. anotheca</i>	89,6	89,7	87,2	90,6	90,3	83,8	82,9	81,2		95	97,2	98	98,3	77,5	75,7	80,1	83,2	82,8	83,4	83,8	84
<i>K. grandifoliola</i>	86,5	86,7	84	87,9	87	80,8	80	78,5	95		93,9	94,7	95	74,6	73,2	76,8	82,5	79,7	80,1	80,8	81
<i>K. ivorensis</i>	89,2	89,2	87,5	90,4	90,3	84,1	83,2	80,8	97,2	93,9		97,9	97	77,6	76	79,8	82,8	82,1	82,9	83,9	83,2
<i>K. nyasica</i>	89,2	89,2	87	90,4	90,1	83,3	82,4	80,9	98	94,7	97,9		97,7	77	75,5	79,7	83	82,5	82,9	83,3	83,5
<i>K. senegalensis</i>	89,6	89,6	87,4	90,6	89,8	84,2	83,2	80,9	98,3	95	97	97,7		77,1	75,5	79,6	83,1	82,5	83,5	84,2	83,6
<i>L. cedrata</i>	77,1	77,1	76,3	78,8	79,1	79,6	80,5	79,5	77,5	74,6	77,6	77	77,1		88,7	82,3	82,3	81,7	81,7	83,6	83,7
<i>L. thompsonii</i>	75,5	75,4	75,4	77,3	77,6	77,9	78,8	79,3	75,7	73,2	76	75,5	75,5	88,7		80,8	80,2	79,5	80,2	81,9	81,9
<i>S. koetjape</i>	79,5	79,5	78,3	80,8	80,2	81,2	82,1	79,6	80,1	76,8	79,8	79,7	79,6	82,3	80,8		81,4	81,2	81,7	83,5	83,7
<i>C. angustifolia</i>	82,1	82,2	81,1	84,3	83,9	85,3	85,2	83,9	83,2	82,5	82,8	83	83,1	82,3	80,2	81,4	93,6	93,6	93,3	93,7	93,6
<i>C. fissilis</i>	82,9	82,9	81,6	84	83,3	85,1	85,7	84,3	82,8	79,7	82,1	82,5	82,5	81,7	79,5	81,2	93,6		95,6	93,2	93,3
<i>C. odorata</i>	83,6	83,7	82,8	84,7	83,9	86,2	86,6	84,8	83,4	80,1	82,9	82,9	83,5	81,7	80,2	81,7	93,3	95,6		93,4	93,1
<i>T. ciliata</i>	83,5	83,5	82,8	85,4	84,5	87,6	87,9	86,1	83,8	80,8	83,9	83,3	84,2	83,6	81,9	83,5	93,7	93,2	93,4		99,2
<i>T. sureni</i>	82,8	82,9	82	84,7	84,7	86,8	87,2	85,8	84	81	83,2	83,5	83,6	83,7	81,9	83,7	93,6	93,3	93,1	99,2	

Abbildung 15 Darstellung der Pairwise-Distance-Analyse innerhalb der Gruppe der MELIACEAE

Der Vergleich der Basen bestätigte die Ergebnisse vorheriger Abhandlungen (Wischniewski, 2014) in der Gattung *Swietenia*. Die beiden Arten *S. humilis* und *S. macrophylla* zeigten in ihren Sequenzen des ITS kaum Differenzen. Sie unterscheiden sich in drei Basen, die jeweils unklare Positionen zwischen Cytosin und Thymin bzw. Cytosin und Guanin betrafen und ein zusätzliches Thymin. Eine Unterscheidung ist somit nicht möglich. Die Sequenz von *S. mahagoni* hingegen zeigte in mehreren Stellen Abweichungen von den anderen beiden Arten. In der Gattung *Khaya* waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Arten sehr gering und ebenfalls hauptsächlich auf mehrdeutige Positionen zurückzuführen. Gleiches zeigte sich bei den beiden *Toona*-Arten. Hier waren fünf mehrdeutige Positionen betroffen (siehe Abb. 16).



Abbildung 16-1. Alignment der Konsensus-Sequenzen aller untersuchten MELIACEAE-Arten



Abbildung 16-2 Alignment der Konsensus-Sequenzen aller untersuchten MELIACEAE-Arten

4.1.2 FABACEAE

In diesem Kapitel werden zum einen die Ergebnisse der CITES-geschützten Bubingahölzer (*G. demeusei*, *G. pellegriniana* und *G. tessmannii*) und zum anderen der ebenfalls geschützten *Pterocarpus*-Arten (*P. erinaceus* und *P. santalinus*) sowie die ihrer jeweiligen Austauschhölzer beschrieben. Mit dem 23.02.2023 ist weiterhin die Art *P. soyauxii* unter CITES-Schutz (Appendix II) gestellt. Folgende Arten von 58 Proben wurden bearbeitet:

- *Copaifera salikounda* (5)
- *Guibourtia* spp. (1), *G. arnoldiana* (5), *G. demeusei* (5), *G. ehie* (8), *G. leonensis* (5), *G. pellegriniana* (3), *G. tessmannii* (5)
- *Hymenaea courbaril* (4)
- *Pterocarpus erinaceus* (5), *P. macrocarpus* (1), *P. santalinus* (1), *P. soyauxii* (10)

Es wurden für 42 mit Kit 1 extrahierten Proben Konzentrationen zwischen 2,5 ng/μl und 276,5 ng/μl sowie 260/280-Werte von 1,1 bis 1,92 und 260/230-Werte von -4,49 bis 5,74 gemessen. Es ergab sich erneut eine große Abweichung des 260/230-Wertes aus dem Toleranzbereich (0 – 2,2), was wiederum auf eine große Verunreinigung der Eluate mit Proteinen schließen lässt. Trotzdem war eine Amplifizierung des ITS möglich. Die Probe BR19 (*P. erinaceus*) wurde dafür stark verdünnt. Sie zeigte eine sehr hohe DNA-Konzentration von 1.181,9 ng/μl. Für 14 Proben zeigte die Amplifikation keine Erfolge. Diese Proben wurden anschließend und zwei weitere direkt mit Kit 2 extrahiert. Es wurden Konzentrationen von 6,6 ng/μl bis 199,7 ng/μl mit 260/280-Werten von 1,58 bis 1,89 und 260/230-Werten von 0,49 bis 65,1 gemessen. Die Proben BR01 und BR02 (*G. arnoldiana*) wiesen negative Konzentrationen und Reinheitswerte auf, trotzdem ergaben sich Banden im Gelbild, die sich in der Sequenzierung jedoch als Pilz-DNA herausstellten. 45 Proben wurden erfolgreich sequenziert und ergaben höchste Homologien (63,24 % – 100 %) mit der erwarteten Art bzw. Gattung. Elf weitere ebenfalls sequenzierte Proben zeigten jedoch Kontaminationen oder keine Ergebnisse im Abgleich. Die Probe Cs1 (*C. salikounda*) ergab eine Homologie von 100 % mit *G. ehie*. Es handelte sich somit um eine Fehlbestimmung.

Komplette ITS-Sequenzen wurden für 17 Proben aus den einzelnen Fragmenten zusammengeführt. Ihre Längen beliefen sich auf 225 bp bis 257 bp für den ITS1, 242 bp bis 264 bp für den ITS2 und Gesamtlängen von 631 bp bis 677 bp. Der 5.8S wies Längen von 161 bp bis 163 bp auf. 20 Proben hatten kleine Lücken (< 50 bp) im ITS1 und/oder ITS2. Probe BR04 (*G. arnoldiana*) wies eine partielle Sequenz des ITS1 von 196 bp auf. Drei

Sequenzen (Proben: BR09, Ps7, Ps8) zeigten nur den ITS1 und vier Proben (Proben: Ge4, Ge8, BR14, Ps6) nur den ITS2.

Für alle zwölf Holzarten wurden erfolgreich Konsensus-Sequenzen erstellt. In der Pairwise-Distance-Analyse ließen sich große Unterschiede erkennen (siehe Abb. 17). Innerhalb der Gattung *Guibourtia* ergaben sich Übereinstimmungen zwischen 71,8 % (*G. demeusei* – *G. tessmannii* und *G. arnoldiana*) und 92,4 % (*G. pellegriniana* – *G. tessmannii*). In der Gattung *Pterocarpus* variierten die Homologien zwischen 79,8 % (*P. erinaceus* – *P. soyauxii*) und 97,8 % (*P. indicus* – *P. macrocarpus*). Die Gattungen untereinander wiesen eine maximale Übereinstimmung von 80,7 % (*C. salikunda* – *H. courbaril*) auf.

	<i>Guibourtia demeusei</i>	<i>Guibourtia pellegriniana</i>	<i>Guibourtia tessmannii</i>	<i>Guibourtia arnoldiana</i>	<i>Guibourtia ehie</i>	<i>Copaifera salikunda</i>	<i>Hymenaea courbaril</i>	<i>Pterocarpus erinaceus</i>	<i>Pterocarpus santalinus</i>	<i>Pterocarpus indicus</i>	<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	<i>Pterocarpus soyauxii</i>
<i>G. demeusei</i>		74,1	71,8	71,8	72,4	67,6	73,9	64,2	63,6	63,1	63,7	62,9
<i>G. pellegriniana</i>	74,1		92,4	76,1	76,6	75,5	80,7	67,1	67	67,9	68,2	67,9
<i>G. tessmannii</i>	71,8	92,4		74,5	74,4	72,6	78,3	66	66	66,2	67,1	66
<i>G. arnoldiana</i>	71,8	76,1	74,5		91,3	75,7	76,8	65	69,5	68,4	69,6	65,9
<i>G. ehie</i>	72,4	76,6	74,4	91,3		78,8	78	65,5	69,4	68,3	69,8	66,6
<i>C. salikunda</i>	67,6	75,5	72,6	75,7	78,8		76,4	67,8	69,5	68,2	68,9	67,2
<i>H. courbaril</i>	73,9	80,7	78,3	76,8	78	76,4		68,2	67,7	67,4	68	66,9
<i>P. erinaceus</i>	64,2	67,1	66	65	65,5	67,8	68,2		81,2	80,9	80,8	79,8
<i>P. santalinus</i>	63,6	67	66	69,5	69,4	69,5	67,7	81,2		92,4	91,5	86,7
<i>P. indicus</i>	63,1	67,9	66,2	68,4	68,3	68,2	67,4	80,9	92,4		97,8	86,6
<i>P. macrocarpus</i>	63,7	68,2	67,1	69,6	69,8	68,9	68	80,8	91,5	97,8		86,4
<i>P. soyauxii</i>	62,9	67,9	66	65,9	66,6	67,2	66,9	79,8	86,7	86,6	86,4	

Abbildung 17 Darstellung der Pairwise-Distance-Analyse innerhalb der Gruppe der FABACEAE

Bei genauerer Betrachtung der Konsensus-Sequenzen von *P. indicus* und *P. macrocarpus* bestätigte sich eine sehr hohe Übereinstimmung. Sie unterschieden sich in nur drei Basenpositionen. An weiteren drei Positionen waren Unterschiede auf mehrdeutige Basen zurückzuführen. Ein Motiv von 8 bp fehlte bei *P. indicus* (siehe Abb. 18).

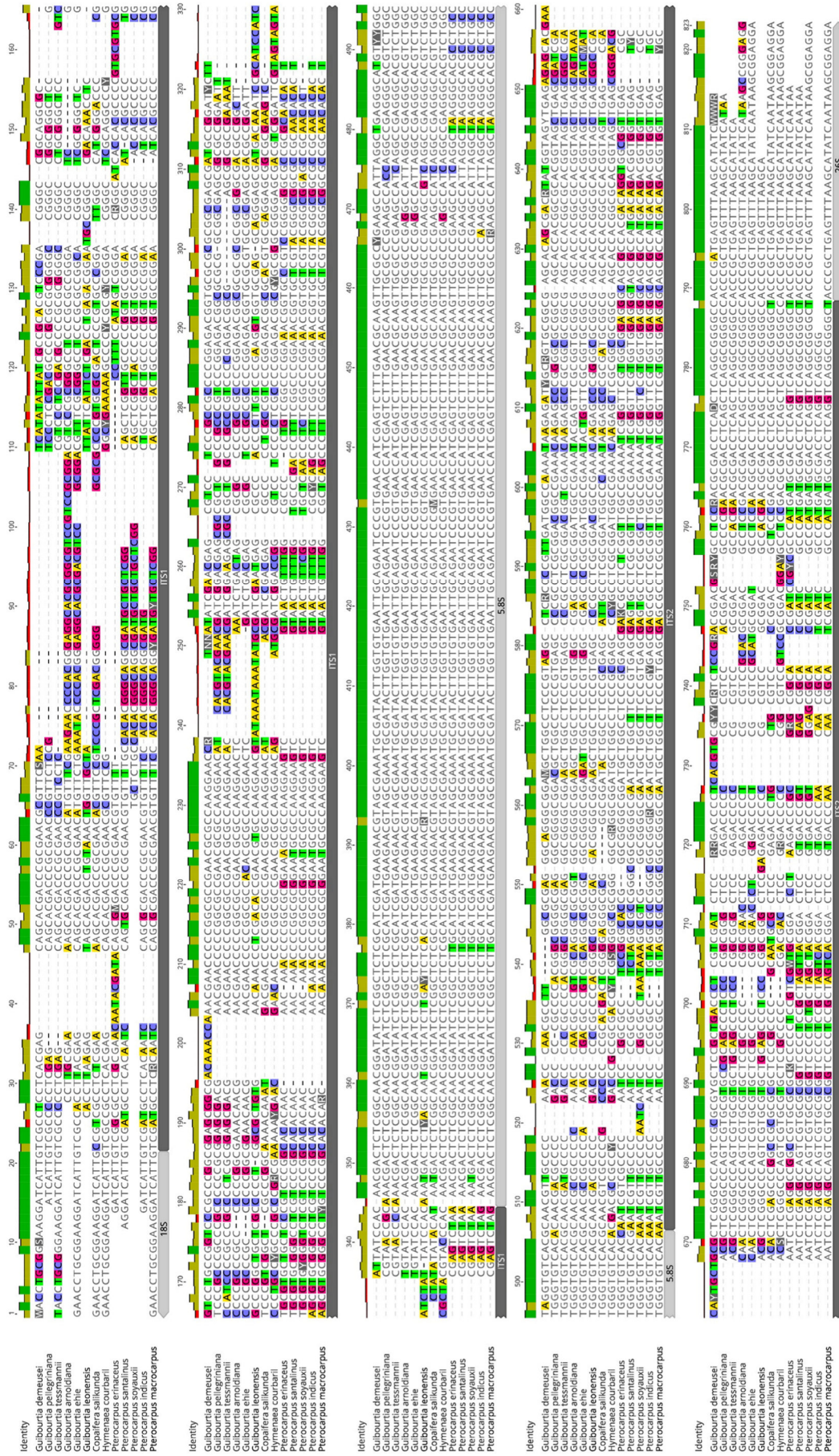


Abbildung 18 Alignment der Konsensus-Sequenzen aller untersuchten FABACEAE-Arten

4.1.3 Ramin (*Gonystylus* spp.) und look-alike species

Für eine genetische Bestimmung des CITES-geschützten Handelssortiments Ramin und eine Abgrenzung ähnlicher Hölzer (look-alike species) wurden 108 Individuen der folgenden Arten bearbeitet:

- *Alstonia boonei* (13), *A. scholaris* (2)
- *Antiaris toxicaria* (12)
- *Brosimum alicastrum* (3)
- *Chrysophyllum africanum* (10), *C. subnudum* (4)
- *Donella pruniformis* (2)
- *Dyera costulata* (4)
- *Endospermum malaccense* (2), *E. moluccanum* (1)
- *Gambeya gigantea* (2)
- *Gonystylus* spp. (1), *G. bancanus* (3), *G. warburgianus* (1)
- *Jacaranda copaia* (2)
- *Neolamarckia cadamba* (1)
- *Pterygota* spp. (4), *P. bequaertii* (9), *P. macrocarpa* (2)
- *Simarouba amara* (3)
- *Terminalia ivorensis* (10), *T. superba* (15)

76 Proben wurden erfolgreich mit Kit 1 extrahiert. Ihre Konzentrationen lagen zwischen 1,9 ng/µl und 544,3 ng/µl. 260/280-Werte wurden von 1,0 bis 2,38 und 260/230 von -5,88 bis 3,7 gemessen. Es zeichnete sich erneut eine starke Verunreinigung im Absorptionsbereich von 230 nm Wellenlänge ab. Acht Proben zeigten keine erfolgreiche Amplifizierung. Sieben dieser Proben wurden zusammen mit 24 weiteren Proben mittels Kit 2 extrahiert. Für vier Proben konnte keine DNA extrahiert oder amplifiziert werden. Die Konzentrationen der erfolgreich extrahierten Proben lagen zwischen 7,9 ng/µl und 210,9 ng/µl. 260/280-Werte wurden von 1,16 bis 1,87 und 260/230-Werte von 0,38 bis 1,85 gemessen. Drei Proben wiesen negative Konzentrationen und Reinheitswerte auf. Zwei davon wurden trotzdem erfolgreich amplifiziert. Insgesamt wurden 74 Proben erfolgreich sequenziert und ergaben höchste Homologien (61,9 % – 100 %) mit der erwarteten Art oder Gattung. Sieben Proben waren falsch bestimmt und 21 blieben ergebnislos oder hatten Kontaminationen.

Insgesamt wurden für 72 der 74 Proben ITS-Sequenzen zusammengeführt. Komplette ITS-Sequenzen wurden für 65 Proben erreicht, mit Gesamtlängen von 615 bp bis 679 bp und Einzellängen von 207 bp bis 256 bp für den ITS1 und 233 bp bis 270 bp für den ITS2. Drei Proben wiesen kleine Lücken (< 50 bp) im ITS1 oder ITS2 auf. Die Probe 918 (*A. toxicaria*) besaß eine Länge des partialen ITS1 von 189 bp, Probe 73 (*T. superba*) von

208 bp, Probe 135 von 160 bp und Probe 383 (*P. bequaertii*) des partialen ITS2 von 256 bp. Zwei Proben (Ti8, Ts4) wiesen nur Ergebnisse des ITS1 und Probe Ti7 nur für den ITS2 auf.

Für 19 Holzarten wurden Konsensus-Sequenzen erstellt. Fünf dieser Holzarten entsprachen nicht der anfänglichen Zielvorgabe und wurden zusätzlich aufgenommen, da für sie Probenmaterial zur Verfügung stand und erfolgreich bearbeitet wurde. Es handelt sich um die Arten *A. boonei*, *C. africanum*, *C. subnudum*, *E. malaccense* und *G. gigantea*. Die Konsensus-Sequenzen der Arten *A. scholaris*, *D. costulata*, *E. moluccanum* und *S. amara* wurden aus Mangel an erfolgreich extrahierten Probenmaterial komplett aus Datenbank-Sequenzen erstellt. Für die Arten *E. malaccense*, *E. moluccanum*, *J. copaia*, *P. macrocarpa* und *S. amara* stand jeweils nur eine einzige Sequenz des ITS zur Verfügung. Die Sequenzen für *D. costulata* wies nur einen partialen ITS1 auf. Die Übereinstimmungen in der Pairwise-Distance-Analyse beliefen sich auf 62,8 % bis 96,7 % (*C. africanum* – *C. subnudum*) innerhalb der Gattungen und 53,9 % bis 85,9 % zwischen den Gattungen (siehe Abb. 19).

	<i>Gonystylus</i> spp.	<i>Alstonia boonei</i>	<i>Alstonia scholaris</i>	<i>Antiaris toxicaria</i>	<i>Brosimum alicastrum</i>	<i>Chrysophyllum africanum</i>	<i>Chrysophyllum subnudum</i>	<i>Donella pruniformis</i>	<i>Dyera costulata</i>	<i>Gambeya gigantea</i>	<i>Endospermum malaccense</i>	<i>Endospermum moluccanum</i>	<i>Jacaranda copaia</i>	<i>Neolamarckia cadamba</i>	<i>Pterygota bequaertii</i>	<i>Pterygota macrocarpa</i>	<i>Simarouba amara</i>	<i>Terminalia ivorensis</i>	<i>Terminalia superba</i>
<i>Gonystylus</i> spp.		61,3	65,8	61,0	61,7	60,3	60,2	58,4	67,9	58,3	57,3	58,5	58,8	62,1	58,8	58,4	63,7	53,9	55,2
<i>A. boonei</i>	61,3		94,1	60,5	60,1	61,0	61,0	59,9	84,8	60,2	57,6	60,5	62,4	63,5	60,8	58,4	61,2	56,9	56,7
<i>A. scholaris</i>	65,8	94,1		62,6	60,4	61,1	61,4	59,4	85,9	59,9	59,6	61,8	64,2	67,2	61,7	59,4	62,5	57,5	57,0
<i>A. toxicaria</i>	61,0	60,5	62,6		70,6	57,3	57,9	57,0	63,7	56,0	62,4	60,3	60,9	62,0	61,7	60,2	62,8	55,4	56,5
<i>B. alicastrum</i>	61,7	60,1	60,4	70,6		60,7	61,5	60,9	62,4	60,5	58,9	60,3	60,2	58,6	60,0	58,6	61,1	56,9	58,3
<i>C. africanum</i>	60,3	61,0	61,1	57,3	60,7		96,7	86,7	68,7	85,4	58,5	61,4	63,0	61,9	60,0	59,1	63,1	58,3	59,2
<i>C. subnudum</i>	60,2	61,0	61,4	57,9	61,5	96,7		86,3	68,4	84,9	57,9	61,4	63,6	62,2	60,3	59,6	63,7	58,7	59,8
<i>D. pruniformis</i>	58,4	59,9	59,4	57,0	60,9	86,7	86,3		66,8	84,7	57,8	60,5	62,9	61,2	59,0	58,2	61,5	58,4	59,4
<i>D. costulata</i>	67,9	84,8	85,9	63,7	62,4	68,7	68,4	66,8		66,2	64,3	67,5	72,2	73,6	66,0	63,3	68,7	60,4	61,0
<i>G. gigantea</i>	58,3	60,2	59,9	56,0	60,5	85,4	84,9	84,7	66,2		59,0	60,7	61,5	60,3	58,5	59,0	61,4	59,7	60,0
<i>E. malaccense</i>	57,3	57,6	59,6	62,4	58,9	58,5	57,9	57,8	64,3	59,0		62,8	62,0	60,9	59,4	57,4	63,0	57,0	57,0
<i>E. moluccanum</i>	58,5	60,5	61,8	60,3	60,3	61,4	61,4	60,5	67,5	60,7	62,8		64,8	60,6	63,9	64,2	65,3	58,1	58,9
<i>J. copaia</i>	58,8	62,4	64,2	60,9	60,2	63,0	63,6	62,9	72,2	61,5	62,0	64,8		67,0	63,2	61,3	65,9	59,8	59,6
<i>N. cadamba</i>	62,1	63,5	67,2	62,0	58,6	61,9	62,2	61,2	73,6	60,3	60,9	60,6	67,0		59,4	59,3	62,0	57,6	57,2
<i>P. bequaertii</i>	58,8	60,8	61,7	61,7	60,0	60,0	60,3	59,0	66,0	58,5	59,4	63,9	63,2	59,4		84,0	69,5	57,3	57,6
<i>P. macrocarpa</i>	58,4	58,4	59,4	60,2	58,6	59,1	59,6	58,2	63,3	59,0	57,4	64,2	61,3	59,3	84,0		68,3	57,6	58,6
<i>S. amara</i>	63,7	61,2	62,5	62,8	61,1	63,1	63,7	61,5	68,7	61,4	63,0	65,3	65,9	62,0	69,5	68,3		59,0	61,4
<i>T. ivorensis</i>	53,9	56,9	57,5	55,4	56,9	58,3	58,7	58,4	60,4	59,7	57,0	58,1	59,8	57,6	57,3	57,6	59,0		84,0
<i>T. superba</i>	55,2	56,7	57,0	56,5	58,3	59,2	59,8	59,4	61,0	60,0	57,0	58,9	59,6	57,2	57,6	58,6	61,4	84,0	

Abbildung 19 Darstellung der Pairwise-Distance-Analyse innerhalb der Gruppe Ramin und look-alike species

Die Sequenzen zeigen, dass ausreichend Unterschiede zwischen den Arten innerhalb der Gattungen *Alstonia*, *Chrysophyllum*, *Pterygota* und *Terminalia* vorhanden sind, die eine Unterscheidung gewährleisten (siehe Abb. 20).

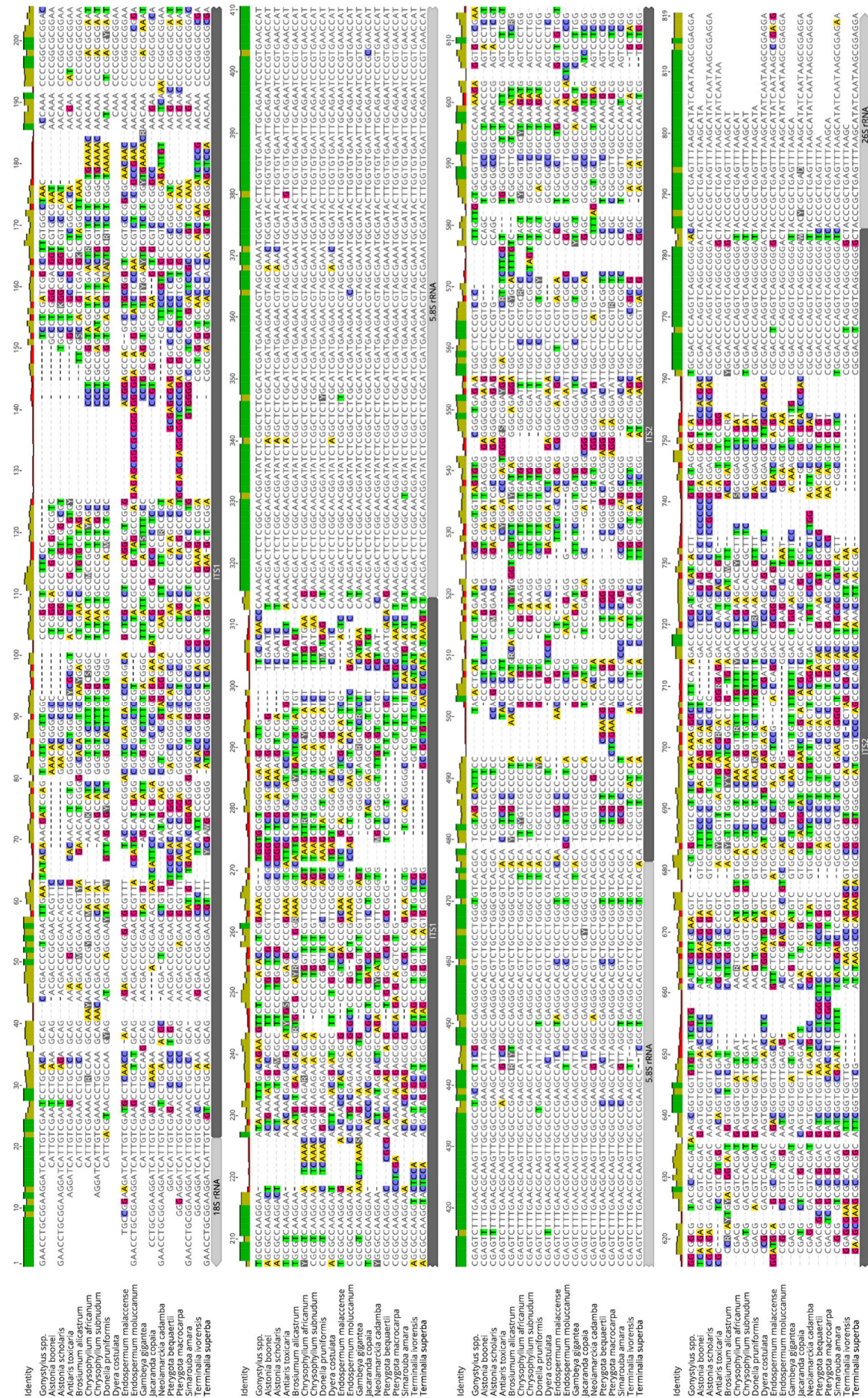


Abbildung 20 Alignment der Konsensus-Sequenzen aller untersuchten Arten der Gruppe Ramin und look-alike species

4.1.4 Pockholz (*Guaiacum* spp.) und look-alike species

Für die Erstellung neuer Sequenzen wurden in dieser Gruppe 17 Individuen von folgenden Holzarten verwendet:

- *Chlorocardium rodiei* (3)
- *Guaiacum coulteri* (1), *G. officinale* (1)
- *Handroanthus heptaphyllus* (4), *H. serratifolius* (3)
- *Plectrocarpa sarmientoii* (3)
- *Tabebuia rosea* (2)

Fünf Proben wurden erfolgreich mittels Kit 1 extrahiert und amplifiziert. Es wurden Konzentrationen von 15,7 ng/μl bis 113,4 ng/μl, 260/280-Werte von 1,6 bis 1,91 und 260/230-Werte von -5,65 bis 4,83 gemessen. Zwölf Proben wurden direkt mit Kit 2 bearbeitet und zeigten folgende Werte: Konzentrationen 12 ng/μl – 95,9 ng/μl, 260/280 1,45 – 1,69 und 260/230 0,45 – 1,19. Zwei Proben konnten nicht extrahiert oder amplifiziert werden. Neun Proben wurden erfolgreich sequenziert und zeigten höchste Homologien (73,7 % – 99,8 %) mit der erwarteten Art. Keine Ergebnisse in der BLAST-Analyse wurden für sechs Proben verzeichnet.

Für drei Proben der Holzart *H. heptaphyllus* (914, 962, Hh1) wurden komplette Sequenzen des ITS zusammengeführt mit einer Länge von 649 bp. Der ITS1 zeigte eine Länge von 227 bp bis 228 bp und der ITS2 von 259 bp bis 260 bp. Bei vier Proben fehlten kleine Teile des ITS1 bzw. des ITS2. Eine Probe (Hs2) wies den ITS1 nur partiell (172 bp) und eine weitere Probe (Bs2) Ergebnisse für den ITS2, nicht aber für den ITS1 auf.

Acht Konsensus-Sequenzen wurden erstellt. Für *C. rodiei* stand nur eine Datenbank-Sequenz zur Verfügung. Die Isolierung von DNA blieb aus dem zur Verfügung stehenden Material erfolglos. Die Unterschiede innerhalb der Gattungen fielen zwischen 90,4 % und 95,2 % aus. Zwischen den Gattungen beliefen sich die Unterschiede auf 59,4 % bis 83,3 % (siehe Abb. 21).

	<i>Guaiacum coulteri</i>	<i>Guaiacum officinale</i>	<i>Guaiacum sanctum</i>	<i>Chlorocardium rodiei</i>	<i>Plectrocarpa aborea</i>	<i>Handroanthus heptaphyllus</i>	<i>Handroanthus serratifolia</i>	<i>Tabebuia rosea</i>
<i>G. coulteri</i>		90,7	95,2	63,3	80,5	62,9	64,3	62,7
<i>G. officinale</i>	90,7		91,5	62,5	83,3	64,6	63,5	64,4
<i>G. sanctum</i>	95,2	91,5		63,4	82,2	65,0	63,9	64,4
<i>C. rodiei</i>	63,3	62,5	63,4		59,9	59,4	61,3	59,7
<i>P. arborea</i>	80,5	83,3	82,2	59,9		64,2	63,0	63,6
<i>H. heptaphyllus</i>	62,9	64,6	65,0	59,4	64,2		94,1	94,6
<i>H. serratifolia</i>	64,3	63,5	63,9	61,3	63,0	94,1		90,4
<i>T. rosea</i>	62,7	64,4	64,4	59,7	63,6	94,6	90,4	

Abbildung 21 Darstellung der Pairwise-Distance-Analyse innerhalb der Gruppe Pockholz und look-alike species

Die Unterschiede in den Sequenzen der *Guaiacum*-Arten fielen zwar gering aus, aber eine Differenzierung war trotzdem möglich (siehe Abb. 22). Im Gegensatz dazu fielen die Differenzen in der Gattung *Handroanthus* so geringfügig aus, dass keine eindeutige Unterscheidung der beiden untersuchten Arten möglich war.

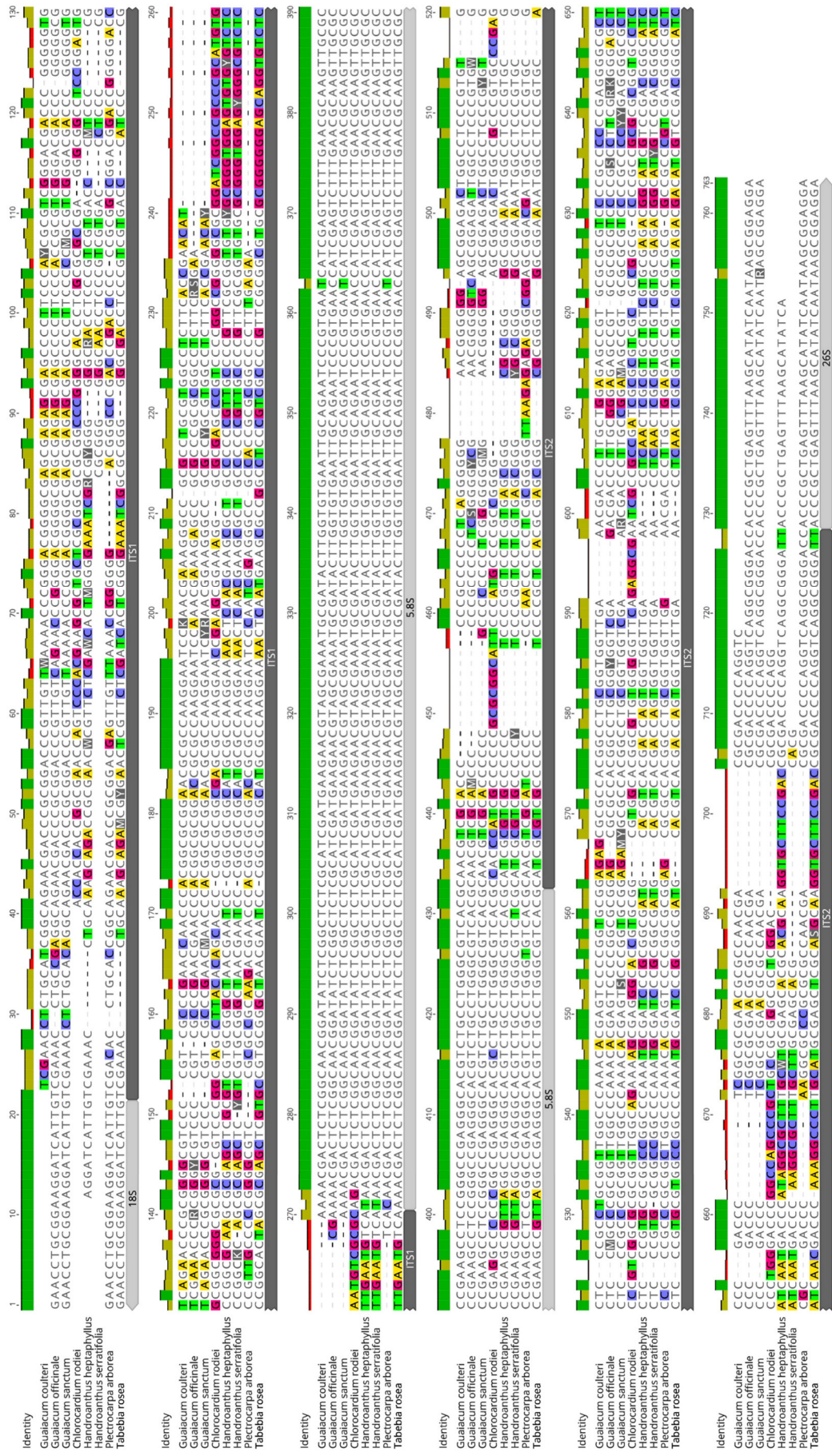


Abbildung 22 Alignment der Konsensus-Sequenzen aller untersuchten Arten der Gruppe Pockholz und look-alike species

4.2 DIG-labeling PCR

Pro Holzart wurde je eine Probe mittels DIG-gelabelter dNTPs amplifiziert, um sie anschließend in den Macroarray-Tests zu verwenden.

Der Amplifizierungserfolg wurde durch die Gelelektrophorese nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde in derselben PCR jede Probe sowohl mit als auch ohne DIG amplifiziert. Im Gel wurden abwechselnd das ungelabelte und das gelabelte PCR-Produkt aufgetragen. Die gelabelten Produkte zeigten im Gel etwas längere Banden im Vergleich zu den Nicht-Markierten, da das DIG zu einem verlangsamten Fließen der PCR-Produkte im Gel führt. Eine repräsentative Aufnahme der Gelbilder für alle Proben ist in Abbildung 23 von den Proben 165 (*S. mahagoni*) und 183 (*S. macrophylla*) dargestellt. Die hinteren beiden Taschen enthalten die Negativ-Kontrollen, in denen der „Mastermix“ ohne Probe eingesetzt wurde, um Kontaminationen in den Chemikalien ausschließen zu können.

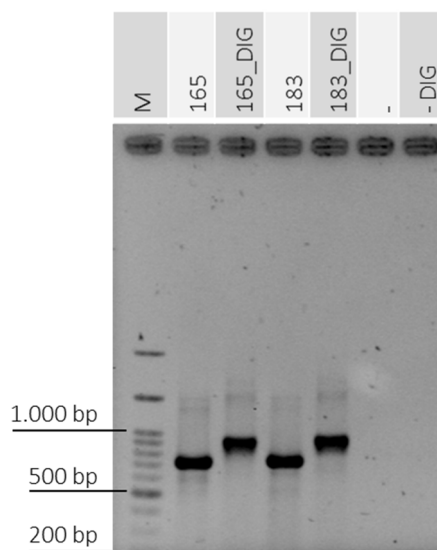


Abbildung 23 Gelbild, Auftrag ungelabelter und DIG-gelabelter PCR-Produkte im Wechsel

Für die meisten Proben wurde der gesamte ITS amplifiziert und markiert. Wenn die Proben keine erfolgreiche Amplifizierung des gesamten ITS-Bereiches zuließen, wurden die ITS-Bereiche einzeln amplifiziert und markiert. Beide Bereiche wurden anschließend gleichzeitig im selben Macroarray-Test eingesetzt.

Einige Proben zeigten im Gel Banden für die ungelabelten PCR-Produkte, jedoch keine Banden für die Gelabelten. Für diese Proben wurden die ungelabelten PCR-Produkte als

Template (1,0 µl) für eine zweite Amplifizierung mit gelabelten dNTPs eingesetzt. Anschließend ergaben sich dann auch für diese Proben klare Banden für die gelabelten PCR-Produkte.

Für 47 von 50 Holzarten wurden die ITS-Bereiche erfolgreich mit DIG markiert und amplifiziert. Die Holzarten *S. humilis*, *A. scholaris* und *C. rodiei* konnten nicht erfolgreich extrahiert oder amplifiziert werden (siehe Kapitel 4.1).

4.3 Oligo Design

Anhand des Alignments der Konsensus-Sequenzen und dem Vergleich der Arten untereinander wurden 99 Oligos designt. Unterstützt wurde das Design durch den Primer3-Algorithmus innerhalb der Geneious-Prime-Software, welcher direkt beim Erzeugen der Oligos folgende Parameter berechnete: Schmelztemperatur, bp-Länge, GC-Gehalt, das Bilden von Hairpins und Dimeren. Anhang 4 zeigt alle Oligos und ihre Parameter. Ihre Schmelztemperaturen lagen teilweise außerhalb des vorgeschlagenen Bereichs (55°C – 65°C) zwischen 46,4°C und 71,9°C. Der GC-Gehalt zeigte mit 25 % – 88,2 % teilweise starke Abweichungen vom vorgeschlagenen Bereich (40 % – 60 %). Die Längen lagen zwischen 16 bp und 23 bp. Ein Abweichen der Schmelztemperaturen und des GC-Gehalts von den vorgeschlagenen Bereichen war durch die Limitierung interspezifischer Varianzen notwendig, um art- oder gattungsspezifische Oligos zu kreieren. Außerdem handelte es sich bei den Vorgaben nur um Empfehlungen für das Erstellen von Primern, die hier als Anhaltspunkte genutzt wurden. Teilweise wurden Oligos auch als „reverse compliment“ erstellt, da die Anfangsbasen eines Oligos eine relevante Rolle bei der Bindungsfähigkeit spielen. Beginnt der Oligo mit den Basen „C“ oder „G“ ist die Bindung stärker, da diese beiden Basen drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbauen, im Gegensatz zu zwei bei den Basen „A“ und „T“.

Ziel war die Erarbeitung artspezifischer Oligos, die mit nur einer einzigen Art reagieren. Gattungs- oder gruppenspezifische (zwei bis drei Arten) Oligos wurden entweder zusätzlich eingesetzt oder die Arten wiesen kaum interspezifische Unterschiede im ITS auf und ermöglichten somit keine Erstellung von Oligos für eine einzelne Art. So ergaben sich beispielsweise keine interspezifischen Differenzen zwischen die beiden Arten *S. humilis* und *S. macrophylla*, die eine Erstellung artspezifischer Oligos ermöglicht hätte. Die Sonden Machum tax for1, Macrophylla for2, Macrophylla for3, Macrophylla rev1,

Machum tax rev2, Smacrophylla10 und -112 repräsentieren demnach beide Arten. Als gattungsspezifische Oligos wurden Oligos beschrieben, die alle in den Versuchen verwendeten (handelsrelevanten) Arten einer Gattung repräsentieren. So wurden für die Arten folgender Gattungen auch „gattungsspezifische“ Oligos erstellt: *Carapa*, *Entandrophragma*, *Khaya*, *Cedrela*, *Toona*, *Gonystylus*, *Alstonia*, *Guaiacum*, *Plectrocarpa*, *Chlorocardium* und *Handroanthus*.

Die folgende Abbildung 24 zeigt das Alignment der Konsensus-Sequenzen der einzelnen Gruppen von CITES-geschützten Holzarten und ihren jeweiligen Substitutionshölzern. Ebenfalls der Abbildung zu entnehmen sind alle darauf basierend designten Oligos.



Abbildung 24-1 Alignment aller Konsensus-Sequenzen zusammen mit den jeweils designten Oligos

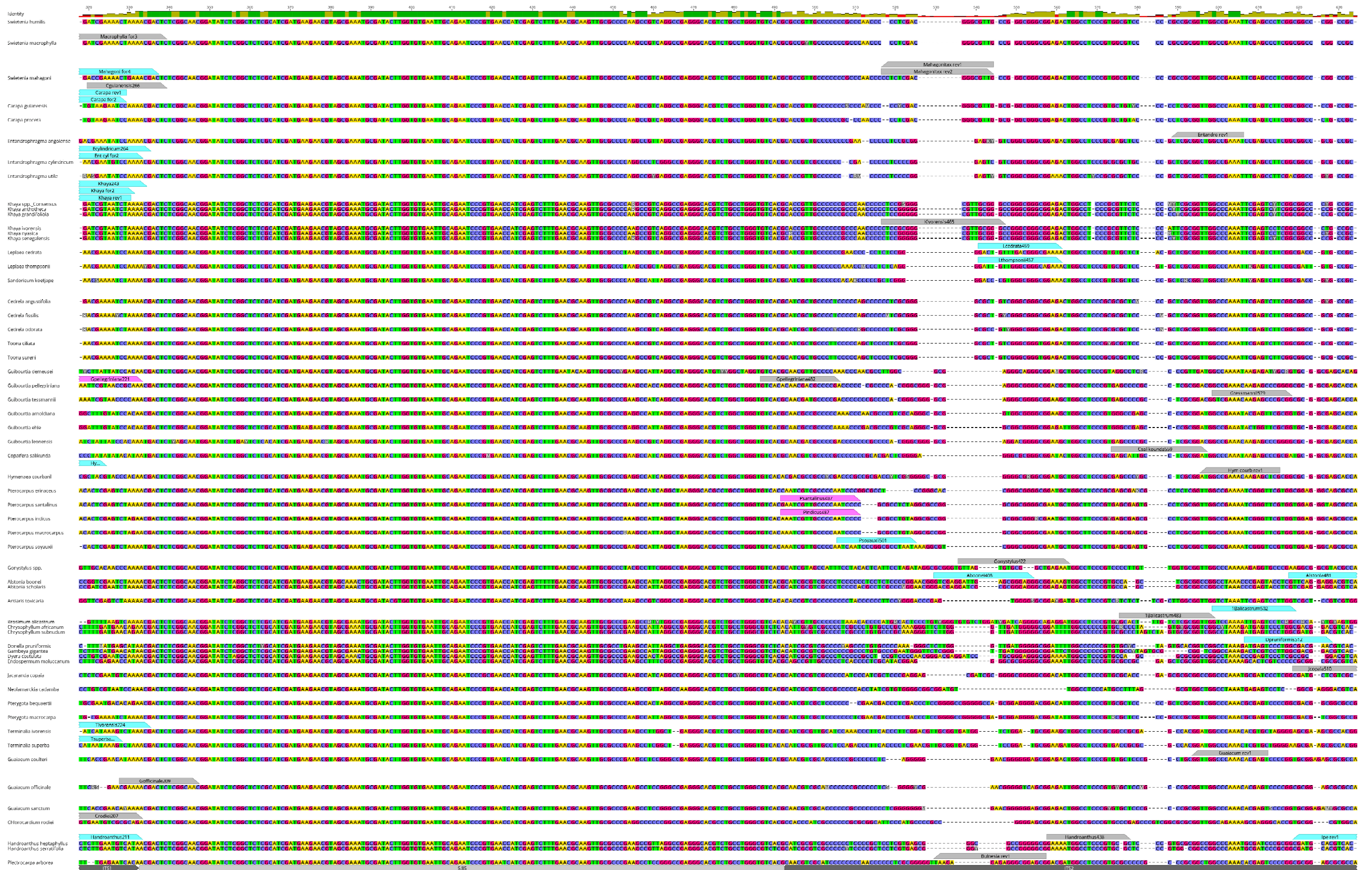


Abbildung 24-2 Alignment aller Konsensus-Sequenzen zusammen mit den jeweils designten Oligos



Abbildung 24-3 Alignment aller Konsensus-Sequenzen zusammen mit den jeweils designten Oligos

4.4 Macroarray

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Protokolloptimierung sowie der Macroarray-Versuche beschrieben. Letztere sind aufgeteilt in Vorversuche in den einzelnen Gruppen und den Gesamt-Kreuztest. Die Vorversuche dienten der Auswahl erfolgsversprechender Sonden, die anschließend in den Gesamtversuchen validiert wurden. In diesen stehen sich alle untersuchten Arten und ihre zuvor bewährten spezifischen Oligos gegenüber. Die Gesamtversuche wurden sowohl manuell als auch automatisiert ausgewertet. Beide Methoden wurden miteinander verglichen.

4.4.1 Optimierung des Protokolls

Das in vorherigen Arbeiten (Wegner, 2013, Matthies, 2014, Peters, 2015) entwickelte Macroarray-Protokoll in Anlehnung an Lievens et al. (2012) konnte in seiner zeitlichen Dauer von 6,9 h auf 3,2 h reduziert werden. Dafür wurden sowohl die Waschschritte als auch die Hybridisierung selbst zeitlich verkürzt und Puffermengen sowie Schüttel- und Drehgeschwindigkeiten angepasst. Eine Holzartenidentifizierung ist somit innerhalb eines Tages möglich, was eine praxistaugliche Anwendung sicherstellt. Anhang 5 zeigt die Zeiten und Rüttel- sowie Drehgeschwindigkeiten vom Ausgangsprotokoll in blau und die Optimierungen in rot.

4.4.2 Kreuztests in den einzelnen Gruppen

Die Kreuztests wurden innerhalb von drei Gruppen durchgeführt. Gruppe 1 und 2 bilden die Arten der Familien der MELIACEAE und der FABACEAE. Die dritte Gruppe beinhaltet die Gattungen *Gonystylus* (Ramin) und *Guaiacum* (Pockholz) mit ihren jeweiligen Substitutionshölzern. Das Abschneiden der Oligos, also die Hybridisierungsreaktion der Sonden, wurde in die Kategorien „richtig positiv“, „richtig negativ“, „falsch positiv“ und „falsch negativ“ aufgeteilt. „Positiv“ bedeutet, dass die Sonden eine Hybridisierungsreaktion im jeweiligen Versuch zeigten. „Negativ“ wurde das Ergebnis bewertet, wenn die Sonden nicht erkennbar reagierten. „Richtig“ oder „falsch“ wurde das Resultat bewertet, je nachdem ob die Reaktion der Sonde mit der jeweiligen Holzart erwartet wurde oder nicht. Die Erwartung ist auch am jeweiligen Namen der Sonde erkennbar. Pro Gruppe wurden drei Durchläufe gefahren, in denen jeweils eine Probe pro Holzart getestet wurde. Nach jedem Durchgang wurden die Ergebnisse ausgewertet. Für Arten,

die im ersten von drei Durchgängen keine richtigen Resultate zeigten, wurden in zusätzlichen Durchläufen weitere Oligos designt und eingesetzt. Somit wurden insgesamt 99 neu erarbeitete Oligos verwendet. Außerdem kamen 45, bereits in vorherigen Arbeiten designte, Oligos zum Einsatz. Die nachstehenden Tabellen (siehe Seiten 71 bis 73) zeigen alle verwendeten Oligos und ihre Ergebnisse in den Kreuztests innerhalb der drei Gruppen MELIACEAE, FABACEAE und „Ramin und Pockholz“. Den Sonden in der linken Spalte stehen die einzelnen Proben in der oberen Zeile gegenüber. Hellgrau sind die in vorherigen Arbeiten designten Oligos und dunkelgrau die neu designten Sonden unterlegt. Das angewendete Bewertungsschema ist ausführlich in Kapitel 3.2.9 aufgeführt. Die zweite Spalte gibt eine Zusammenfassung der Bewertungen wieder. In dieser Spalte mit „plus“ gekennzeichnete Sonden kamen in den anschließenden Gesamt-Kreuztests zum Einsatz. „Minus“ steht für Sonden, die verworfen wurden.

4.4.2.1 MELIACEAE

In der Gruppe der MELIACEAE wurden insgesamt 68 spezifische Oligos und vier pflanzenspezifische Kontrollen verwendet. Alle vier Kontroll-Oligos schlugen bei fast allen Proben an und bestätigten somit die Funktionsfähigkeit des Versuchsverlaufs. Ausnahme bildete die Probe 955 (*Sandoricum koetjape*), bei welcher Oligo Holz for2 in allen drei Durchläufen keine Reaktion zeigte. Auch die holzspezifischen Oligos dieser Art (Skoetjape 55, Skoetjape 576) reagierten beim Einsatz dieser Probe nicht, weshalb diese Art im folgenden Gesamt-Kreuztest nicht weiter einbezogen wurde. Insgesamt reagierten 41 Oligos eindeutig „falsch negativ“ oder „falsch positiv“ (in Abb. 25, Spalte „Zsf“ rot markiert) und wurden im folgenden Verlauf nicht weiterverwendet. Eindeutig „richtig positive“ und „richtig negative“ Ergebnisse zeigten 19 Oligos. Acht weitere Oligos reagierten sehr leicht (kaum erkennbar) „falsch negativ“ und wurden zusammen mit den eindeutig richtig abschneidenden Sonden im Gesamt-Kreuztest verwendet. Für 10 der 21 Arten konnten artspezifische (nur eine einzelne Holzart) Sonden für den Gesamt-Kreuztest übernommen werden. Die Sonden „*Machrophylla rev1*“ und „*Smacrophylla112*“ repräsentierten die beiden Arten *S. humilis* und *S. macrophylla*, da diese Arten über den ITS nicht zu unterscheiden waren. Ähnlich ließen die beiden *Toona*-Arten und vier der fünf *Khaya*-Arten kein artspezifisches Oligo-Design (für nur eine einzelne Holzart) zu, da der ITS für diese Arten keine ausreichenden Differenzen aufwies.

Für die Gattung *Carapa*, *Khaya*, *Cedrela* und *Toona* wurden gattungsspezifische Oligos übernommen. Zusätzlich zeigten artspezifische Sonden in diesen Gattungen mit den Arten *C. procera*, *K. ivorensis*, *C. fissilis* und *C. odorata* gute Ergebnisse. Durch die Kombination der positiven Reaktion der gattungs- und der negativen Reaktion der artspezifischen Sonden ließ sich auch auf die Arten *C. guianensis* und *C. angustifolia* schließen.

4.4.2.2 FABACEAE

In der Gruppe der FABACEAE wurden 29 spezifische Oligos verwendet. Die ebenfalls eingesetzten, vier Kontroll-Oligos zeigten für alle Proben „richtig positive“ Ergebnisse und bestätigten somit den korrekten Ablauf des Versuchs. Zehn Oligos reagierten eindeutig „falsch positiv“ bzw. „falsch negativ“ und wurden nicht in die Gesamt-Kreuztests einbezogen. Eindeutig „richtig positiv“ und „richtig negativ“ schnitten sechs Oligos ab (Gehie44, Garnoldiana79, Hcourb for1, Hcourb for2, Perinaceus615, Psoyauxii501). Sie wurden zusammen mit vier Oligos, die leichte Fehlreaktionen zeigten (Gtessmannii579, Garnoldiana629, Csalikounda41 und -93) und neun Oligos, die durch Kombinationen der Sonden eine Identifizierung ermöglichten, im Gesamttest verwendet. So ergab für die Gattung *Guibourtia* die Kombination der Sonden Gpellegriana221, Gtessmannii225 und Gtessmannii579 eine Unterscheidungsmöglichkeit der Arten *G. demeusei* und *G. pellegriniana* von *G. tessmannii*. Die beiden Arten *G. demeusei* und *G. pellegriniana* ließen keine Differenzierung durch die Oligoreaktionen zu. Für die Gattung *Pterocarpus* wurden die Reaktionen der Sonden Pindicus487 und -597, Pindimacro32, Pmacrocarpus71, Psantalinus487 und -682 kombiniert.

4.4.2.3 Ramin und Pockholz

In der dritten Gruppe „Ramin und Pockholz“ wurden 47 Oligos eingesetzt, 11 Sonden zeigten eindeutig „richtig positive“ bzw. „richtig negative“ Reaktionen. 24 Oligos reagierten leicht „falsch positiv“ und wurden ebenfalls in den Gesamt-Tests weiterverwendet. 12 Oligos schnitten eindeutig „falsch“ ab und wurden vom weiteren Verlauf ausgeschlossen. Kontroll-Oligo Holz for2 reagierte als einziger Kontroll-Oligo negativ in allen drei Versuchen der Probe 954 (*Neolamarckia cadamba*) und der Ramin-Probe 953. Die Probe 954 reagierte auch sonst mit keiner Sonde. Die Art wurde vom

weiteren Verlauf wegen des Mangels an weiteren Proben ausgeschlossen. Probe 953 reagierte nicht mit den Ramin-Sonden, zeigte auch in der Sequenzierung eine Fehlbestimmung und wurde im weiteren Verlauf durch die Probe 244 ersetzt. Auf Grund dessen ließ sich keine Aussage über die fünf Ramin Oligos (Ramin for1, - rev1, Gonystylus48, -422, -137) treffen. Sie wurden alle in den weiteren Verlauf einbezogen. Nach dieser Auswahl standen für 13 der 17 Arten artspezifische Sonden zur Verfügung. Für Ramin wurden gattungsspezifische Oligos eingesetzt, da die Arten der Gattung *Gonystylus* keine Differenzierung im ITS zuließen. Da die gesamte Gattung unter Schutz steht, ist eine tiefergehende Unterscheidung nicht zwingend notwendig. Weiterhin standen gattungsspezifische Sonden für *Alstonia*, *Guaiacum*, *Plectrocarpa*, *Chlorocardium* und *Handroanthus* zur Verfügung. Der Oligo *Alstonia*481 wurde zur Einbeziehung der Art *A. scholaris* designt, für die es keine Probe für den Kreuztest gab. Gleiches galt für *Chlorocardium*111 für *C. rodiei*. Die beiden Arten der Gattung *Handroanthus* ließen, wegen Mangels an Differenzen des ITS, kein Design artspezifischer Oligos zu. Die gattungsspezifischen Sonden der Gattungen *Plectrocarpa* und *Guaiacum* wurden zusätzlich zu den artspezifischen Sonden eingesetzt.

4.4.3 Gesamt-Kreuztest

Auf Grundlage der Auswertung der oben beschriebenen Gruppen-Kreuztests wurden 81 der 144 Oligos für einen Gesamt-Kreuztest aller verwendeten Arten ausgewählt. Zusätzlich wurden ebenfalls die vier Kontroll-Oligos eingesetzt. Der Gesamt-Kreuztest wurde einmal wiederholt, um eine Replizierbarkeit zu gewährleisten. Die folgenden Darlegungen können anhand der Abbildung 28, 29 und 30 verfolgt werden. Die Spalten 2 bis 5 zeigen die Anzahl der „richtig negativen“ (TN), „richtig positiven“ (TP), „falsch positiven“ (FP) sowie der „falsch negativen“ (FN) Reaktionen insgesamt pro Sonde.

Die Auswertung der Versuche wurde zum einen manuell vorgenommen, wie bereits in den Vorversuchen veranschaulicht, und zum anderen automatisiert. Die Ergebnisse beider Methoden wurden miteinander verglichen, um eine Evaluierung der Automatisierung vorzunehmen.

4.4.3.1 Vergleich manuelle und automatisierte Auswertung

In der manuellen Auswertung zeigten 98,4 % der Positionen „richtige“ Ergebnisse. Im ersten Durchgang waren 4.134 Positionen „richtig negativ“. Das entspricht 91,6 % des Macroarrays. 292 Positionen reagierten „richtig positiv“ (6,5 %). Somit entsprachen 98,1 % der Reaktionen den Erwartungen. 1,9 % zeigten „falsche“ Ergebnisse. 84 Reaktionen waren „falsch positiv“ und zwei „falsch negativ“. Im zweiten Durchlauf zeichnete sich ein ähnliches Ergebnis ab. 98,6 % der Positionen reagierten „richtig“. 4.167 Positionen waren „richtig negativ“ und 286 reagierten „richtig positiv“. Es ergaben sich 51 „falsch positive“ Signale und zehn „falsch negative“.

Zusätzlich zum manuellen Ablesen der Hybridisierungsreaktionen vom Film, wurden die Signale automatisiert bestimmt. Für die automatisierten Werte wurde ein Schwellenwert von 0,1 festgelegt. Somit wurden Reaktionen ab einer Intensität von 0,1 gezählt. Alle Messungen unterhalb 0,1 wurden nicht als positive Reaktionen gewertet. Insgesamt zeigten 96,5 % der Positionen „richtige“ Ergebnisse. Im ersten Durchgang reagierten 96,6 % „richtig“, davon waren 4.070 Positionen „richtig negativ“ und 287 „richtig positiv“. „Falsch positiv“ reagierten 148 Positionen und sieben reagierten „falsch negativ“. Im zweiten Durchlauf zeigte sich ein sehr ähnliches Ergebnis. 4.069 Positionen waren „richtig negativ“ und 282 reagierten „richtig positiv“. Somit waren im zweiten Durchgang 96,4 %

der Reaktionen „richtig“. 149 Reaktionen waren „falsch positiv“ und zwölf „falsch negativ“.

Weiterhin wurden die einzelnen Positionen der manuellen und der automatisierten Auswertung einander gegenübergestellt. Hier ergab sich eine Übereinstimmung der beiden Auswertungsmethoden von 97,6 %. 214 Zellen zeigten Abweichungen. 183 davon waren auf Positionen zurückzuführen, die in der manuellen Auswertung ein „richtig negatives“ Ergebnis erkannten. In der automatisierten Auswertung wurde jedoch eine schwache „falsch positive“ Reaktion detektiert. 22 Stellen zeigten das umgekehrte Ergebnis. An acht Positionen wurde ein „richtig positives“ Signal in der manuellen Auswertung gedeutet, wo in der Automatisierung keine Reaktion gemessen wurde, bzw. diese Reaktion unter dem Schwellwert von 0,1 lag. Eine Zelle zeigte in der automatisierten Auswertung eine „richtig positive“ Reaktion (0,2), die in der manuellen Auswertung nicht erkannt wurde.

Somit waren 85,5 % der Abweichungen auf Positionen zurückzuführen, bei denen die manuelle Auswertung „richtig negative“ Ergebnisse angab, wo in der Automatisierung Werte über 0,1 und somit „falsch positive“ Ergebnisse gemessen wurden. Deshalb wurde in der automatisierten Auswertung der feste Schwellenwert von 0,1 durch einen flexiblen Schwellenwert ersetzt, der die stärksten zwei Signale in jedem Versuch auswählt (ausgenommen die Signale der Positiv-Kontrollen). Dadurch ergaben sich folgende Reaktionen: 8.389 „richtig negativ“, 509 „richtig positiv“, 47 „falsch positiv“ und 79 „falsch negativ“. Somit waren 98,6 % der Ergebnisse „richtig“. Das ergab eine Erhöhung um 2,1 % im Vergleich zu den automatisierten Ergebnissen mit einem fixen Schwellenwert von 0,1. Eine Gegenüberstellung der stärksten zwei Signale mit den manuellen Bewertungen zeigte eine 98-prozentige Übereinstimmung der Reaktionen. Diesmal wichen 194 Zellen ab und somit 20 Positionen weniger als im Vergleich der manuellen Auswertung mit der automatisierten mit einem festen Schwellenwert von 0,1. Die Mehrheit der Unterschiede ging in diesem Fall auf „richtig negative“ Bewertungen durch die Betrachtung der stärksten zwei Signale zurück.

4.5 Einschätzung der Sonden

In diesem Kapitel wird anhand der Messwerte der automatisierten Auswertung und einer manuellen Überprüfung eine abschließende Einschätzung der einzelnen Sonden zur Identifizierbarkeit der verwendeten Holzarten getroffen. Die Ausführungen sind anhand der Abbildung 31 nachzuvollziehen. Alle Messwerte unter 0,1 wurden aus der Betrachtung ausgeschlossen, ebenso Werte, die aufgrund eines unruhigen Hintergrundes (in Abb. 31 gelb hinterlegt) oder anderer Störfaktoren (in Abb. 31 orange hinterlegt) zustande kamen. Da die interspezifischen Unterschiede einiger Arten innerhalb einer Gattung (z.B. *Guibourtia* und *Pterocarpus*) teilweise sehr gering ausfallen und somit die erstellten Oligos nicht 100 % artspezifisch reagierten, werden weiterhin Kombinationen von Sonden vorgeschlagen, die trotzdem eine Bestimmung oder Eingrenzung ermöglichen.

Die Sonde Smahagoni181 reagierte in beiden Durchgängen deutlich mit *C. fissilis* und wurde somit als ungeeignet für die Identifizierung eingeschätzt. Sonde Mahagoni for4 hingegen zeigte keine Fehlreaktionen. Leichte Reaktion mit *B. alicastrum* (0,14) und *H. heptaphyllus* (0,11) wurden für die Sonde Smahagoni649 gemessen, die sich allerdings im zweiten Durchgang nicht bestätigten. Somit wurden die Sonden Mahagoni for4 und Smahagoni649 als geeignet für die Identifizierung der Holzart *S. mahagoni* eingeschätzt. Die Holzarten *S. macrophylla* und *S. humilis* können, wie im Kapitel 4.1.1 beschrieben, nicht anhand des ITS-Bereiches unterschieden werden. Somit wurden Oligos erstellt, die beide Arten repräsentieren. Die Sonde Macrophylla rev1 eignet sich zur Identifizierung beider Arten. Sie zeigte nur im ersten Durchgang eine leichte Reaktion (0,11) mit *G. arnoldiana*. Die Sonde Smacrophylla112 wird für eine Identifizierung ausgeschlossen. Sie reagierte nur sehr schwach im ersten (0,13) und gar nicht im zweiten Durchgang mit *S. macrophylla*.

Die drei gattungsspezifischen Sonden Carapa for2, Carapa for3 und Carapa rev1 zeigten wiederholt sehr gute Ergebnisse. Alle drei *Carapa*-Sonden wurden somit als geeignet zur Bestimmung eingeschätzt. Cprocera50 reagierte spezifisch mit *C. procera* und nicht mit *C. guianensis*, was in Kombination mit den reagierenden Gattungs-Oligos eine Bestimmung beider Arten ermöglicht. Eine leichte Fehlreaktion der Sonde Cprocer50 mit

K. ivorensis (0,16) kann in Kombination mit den Gattungs-Sonden vernachlässigt werden.

Die drei Arten der Gattung *Entandrophragma* reagierten deutlich artspezifisch mit den jeweiligen Sonden Ent angofor2, Ent cylfor2, Ecyndricum264 und Eutile86. Alle drei Arten sind über ihre jeweiligen Sonden bestimmbar.

Die gattungsspezifischen *Khaya*-Oligos wiesen gute Ergebnisse auf. Im zweiten Durchlauf reagierte die Sonde *Khaya rev1* jedoch mit *G. bancanus* (0,21). Da die Sonden *Khaya for2* und *Khaya243* keine Fehlreaktionen zeigten, werden diese beiden zur Identifizierung der Gattung *Khaya* vorgeschlagen. Eine Unterscheidung der Art *K. ivorensis* von den anderen *Khaya*-Arten schien im ersten Durchgang durch eine leichte Reaktion der Sonde *Kivorensis106* möglich, wurde jedoch im zweiten Durchgang durch die Reaktion der Sonde mit der Art *K. nyasica* nicht bestätigt. Eine Unterscheidung der *Khaya*-Arten ist im Test also nicht möglich.

Für die Art *L. cedrata* wurden die beiden Sonden *Lcedrata35* und *Lcedrata459* getestet, die beide stark mit dieser Holzart reagierten und keine Fehlreaktionen mit anderen Arten zeigten. Sie sind somit zur Identifizierung der Art *L. cedrata* geeignet. Im Gegensatz dazu reagierte die Sonde *Lthompsonii35* leicht mit *E. utile* (0,19) in beiden Durchgängen und mit *L. cedrata* (0,13) im ersten Durchlauf. *Lthompsonii457* zeigte im ersten Durchgang eine Reaktion mit *C. procera* (0,19), die im zweiten Durchlauf keine Bestätigung fand. Da in beiden Fällen die stärksten Reaktionen mit der Art *L. thompsonii* (0,76 und 0,91) zu verzeichnen waren, werden beide Sonden weiterhin als geeignet zur Identifizierung der Art eingeschätzt.

Die CITES-geschützten *Cedrela*-Arten reagierten alle drei deutlich mit der Sonde *Cedrela29*, welche somit zur Identifizierung der Gattung vorgeschlagen werden. Zusätzlich reagierten die Sonden *Ced fissilis for1* und *Ced odorata for1* deutlich artspezifisch. Somit ist die Art *C. angustifolia* über die Kombination der reagierenden *Cedrela29* Sonde ohne eine Reaktion der Sonden *Ced fissilis for1* und *Ced odorata for1* bestimmbar.

Die beiden Holzarten *T. ciliata* und *T. sureni* zeigten im ITS zu geringe interspezifische Differenzen, weshalb für diese Arten eine gemeinsame Sonde zum Einsatz kam, *Toona70*. Sie reagierte leicht mit *T. sureni* (0,16 und 0,24), was sie zur Bestimmung dieser Art

qualifiziert, jedoch nicht mit *T.ciliata*. Somit kann nur *T.sureni* mit der entwickelten Sonde identifiziert werden.

Die drei CITES-geschützten *Guibourtia*-Arten reagierten alle deutlich mit der Sonde Gtessmannii225. Es wird zwar die eigentliche Art *G.tessmannii* nicht identifizierbar, jedoch eignet sich die Sonde zur Bestimmung der Gruppe dieser drei Arten. Die beiden Arten *G.demeusei* und *G.pellegriniana* zeigten beide deutliche Reaktionen mit der Sonde Gpellegriniana221, im Gegensatz zu *G.tessmannii*, die hier nur leicht im ersten und gar nicht im zweiten Durchgang reagierte. Über die Kombination der beiden Sonden kann die Holzart *G.tessmannii* von den beiden anderen Bubinga-Arten unterschieden werden. Eine Bestätigung der Holzart *G.tessmannii* durch die Sonde Gtessmannii579 ist wegen mehrerer Fehlreaktionen dieser Sonde nicht möglich. Die beiden nicht geschützten Arten *G.arnoldiana* und *G.ehie* sind durch die eindeutigen Reaktionen der jeweiligen Sonden Garnoldiana79 und Gehie44 identifizierbar. Auch die Sonde Garnoldiana219 zeigte gute Ergebnisse, jedoch auch eine leichte Fehlreaktion mit *G.ehie* (0,12) im ersten Durchgang, die sich im zweiten nicht bestätigte.

Für die beiden Sonden Csalikounda41 und Csalikounda93 zeigten sich leichte bis deutliche, artspezifische Reaktionen. Csalikounda93 reagierte jedoch zu gering im ersten Durchlauf und nur ganz schwach (0,1) im zweiten. Deshalb wird die Sonde Csalikounda41 zur Bestimmung der Art vorgeschlagen.

Die Sonden der Holzart *H.courbaril* Hcourb for1 und Hcourb for2 reagierten deutlich artspezifisch und sind zur Identifizierung dieser Art geeignet.

Die untersuchten Arten der Gattung *Pterocarpus* wiesen alle fünf deutliche Reaktionen mit den Sonden Psantalinus487 und Pindicus487 auf. Psantalinus487 reagierte leicht mit *L.cedrata*, was sich im zweiten Durchlauf nicht bestätigte. Beide Sonden werden als gattungsspezifische Sonden vorgeschlagen. Sonde Perinaceus615 reagierte artspezifisch. Auch Sonde Psoyauxii501 reagierte deutlich mit der gewünschten Art, zeigte jedoch auch leichte Fehlreaktionen mit *B.alicastrum* (0,14 und 0,18) in beiden Durchläufen und mit *H.heptaphyllus* (0,13) in einem Durchgang. Da die Reaktionen mit *P.soyauxii* mit 0,72 und 0,7 sehr viel deutlicher waren, werden beide artspezifischen Oligos als geeignet zur Identifizierung der jeweiligen Art eingeschätzt. Die drei Holzarten *P.erinaceus*, *P.santalinus* und *P.soyauxii* reagierten alle drei positiv auf die Sonde Psantalinus682. Die

Sonde wies nur eine sehr leichte Fehlreaktion im ersten Durchgang mit *S. macrophylla* (0,1) auf, welche sich im zweiten Durchgang nicht bestätigten. Somit ist die Holzart *P. santalinus* in Kombination dieser Sonde mit dem Ausbleiben einer Reaktion der zuvor erwähnten artspezifischen Sonden Perinaceus615 und Psoyauxii501 bestimmbar. Sonde Pindicus597 reagierte mit den vier Arten *P. santalinus*, *P. indicus*, *P. macrocarpus* und *P. soyauxii*, ebenso wie die Sonde Pmacrocarpus71. Diese Sonde reagierte jedoch nur leicht auf die Arten *P. santalinus* und *P. macrocarpus*. Beide Sonden wiesen mehrere Fehlreaktionen auf. Die Sonde Pindimacro32 reagiert auf die beiden Arten *P. macrocarpus* sowie *P. santalinus* und leicht auf *P. indicus*. Eine Kombination der Sonden Pindicus487 oder Psantalinus487 und Sonden Pindicus597, Pmacrocarpus71 oder Pindimacro32 und ein Ausbleiben von Reaktionen der Sonden Psantalinus682 sowie Psoyauxii501 lassen auf die beiden Arten *P. indicus* und *P. macrocarpus* schließen. Die zuvor erwähnten Fehlreaktionen können durch die Kombination mit den Reaktionen der anderen Sonden ignoriert werden. Die beiden zuletzt genannten Arten können auf Grund der geringen interspezifischen Unterschiede des ITS nicht voneinander differenziert werden.

Die CITES-geschützte Gattung *Gonystylus* ist über die eindeutigen Reaktionen der Sonden Gonystylus48, Ramin for1 und Ramin rev1 bestimmbar. Bei der Sonde Gonystylus422 traten leichte Fehlreaktionen mit *H. heptaphyllus* auf. Diese Sonde ist ebenso wie Gonystylus137, welche nur leichte Reaktionen mit der *G. bancanus* Probe zeigte und viele Fehlreaktionen, für die Identifizierung ungeeignet. Artspezifische Sonden konnten durch den Mangel an interspezifischen Differenzen in den ITS-Bereichen der *Gonystylus*-Arten nicht kreiert werden.

Die Sonden Alstonia481 und Abooneii481 reagierten spezifisch auf die Art *A. booneii* und eignen sich somit zur Identifizierung der Art. Nur Alstonia481 zeigte eine leichte Fehlreaktion mit *G. pellegriniana* (0,14). Ob eine weitere Bestimmung der Art *A. scholaris* über den Gattungs-Oligo möglich ist, muss in zusätzlichen Versuchen mit dieser Art untersucht werden. Das war aus Mangel an isolierbarem bzw. amplifizierbarem Probenmaterial in dieser Arbeit nicht möglich.

Auch die Sonden Atoxicaria149 und Atoxicaria553 reagierten deutlich artspezifisch. Erstere wies leichte bis deutliche Fehlreaktionen in beiden Durchläufen mit *D. pruniformis* auf. Somit wird die Sonde Atoxicaria553 zur Identifizierung der Art vorgeschlagen.

Die Sonde Balic astrum483 zeigte mehrere deutliche Fehlreaktionen und wird somit für eine Bestimmung dieser Art ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu wies die Sonde Balic astrum502 nur eine leichte Fehlreaktion mit *K. ivorensis* (0,12) auf, die sich nur im ersten Durchlauf, nicht aber im Zweiten zeigte. Eine Identifizierung der Art ist über diese Sonde möglich.

Zur Bestimmung der Art *D. pruniformis* wird die Sonde Dpruniformis512, die deutlich artspezifisch reagierte, empfohlen. Sie zeigte nur eine sehr leichte Fehlreaktion mit *G. pellegriniana* (0,15). Die Reaktionen der Sonde Dpruniformis33 fielen sehr leicht aus, zusätzlich zu mehreren Fehlreaktionen.

Alle drei Sonden für die Art *J. copaia* wiesen deutliche artspezifische Reaktionen auf. Die Sonden Jcopaia510 und Jcopaia589 reagierten in beiden Durchgängen zusätzlich auf die Art *H. heptaphyllus*. Somit wird die Sonde Jcopaia28 zur Identifizierung dieser Art empfohlen.

Die Sonde Koto for1 reagierte im ersten Durchgang deutlich auf *P. macrocarpa*. Diese Reaktion blieb jedoch im zweiten Durchlauf aus. Im Gegensatz dazu zeigten die Sonden Pbequaertii175 und Pmacrocarpa26 jeweils deutliche, artspezifische Reaktionen. Eine leichte Fehlreaktion der Sonde Pmacrocarpa26 wurde im zweiten Durchlauf nicht bestätigt. Beide Sonden werden für die Identifizierung der jeweiligen Art vorgeschlagen.

Die Sonde Limba for1 reagierte deutlich auf die beiden Arten *T. ivorensis* und *T. superba* und reagierte nur im ersten Durchlauf ganz leicht mit *A. boonei* (0,11). Sie eignet sich somit zur Bestimmung der Gattung. Eindeutige artspezifische Reaktionen wiesen die Sonden Limba rev1 und Tsuperba219 für die Holzart *T. superba* und Tivorensis111 sowie Tivorensis234 für *T. ivorensis* auf. Alle vier Sonden sind zur Identifizierung der jeweiligen Art geeignet.

Die CITES-geschützten Pockholz-Arten *G. coulteri*, *G. officinale* und *G. sanctum* reagierten alle drei deutlich mit der gattungsspezifische Sonde Guaiacum for1. Diese Sonde eignet sich somit zur Bestimmung der Gattung. Im ersten Durchgang wies die Sonde Gcoulteri172 eine deutliche artspezifische Reaktion auf, welche im zweiten Durchlauf

nicht auftrat. Jedoch zeigte sich in den Vorversuchen eine deutlich artspezifische Reaktion der Sonde, weshalb sie trotzdem zur Identifizierung dieser Art vorgeschlagen wird. Ähnliches gilt für die Sonden Gofficinale172 und Gua offic for1, welche jedoch im ersten Durchlauf sowohl auf die Art *G. officinale*, als auch auf *G. coulteri* reagierten. Sie zeigten jedoch auch in den Vorversuchen Fehlreaktionen mit der Art *G. sanctum* und werden deshalb als ungeeignet zur Identifizierung der Art *G. officinale* eingeschätzt. Die beiden Sonden Gua sanct for1 und rev1 reagierten beide deutlich artspezifisch in beiden Durchläufen. Erstere wies eine leichte Fehlreaktion mit *G. officinale* auf, die im zweiten Durchgang nicht bestätigt wurde. Beide Sonden werden zur Identifizierung der Art *G. sanctum* vorgeschlagen. Durch eine Kombination der Gattungssonden und ein Ausbleiben der Reaktionen der spezifischen Sonden für die Arten *G. coulteri* und *G. sanctum*, ist auch die Art *G. officinale* identifizierbar.

Die Sonde Bulnesia for1 wies deutliche Reaktionen mit der Art *P. arborea* in beiden Durchgängen auf. Die Sonden Bulnesia rev1 und Parborea34 zeigten selbiges im ersten Durchgang, jedoch blieb die Reaktion im zweiten Durchlauf aus. Auch in den zwei von drei Vorversuchen war die Reaktion nur sehr leicht, weshalb die beiden Sonden als ungeeignet eingeschätzt werden. Die Sonde Bulnesia for1 wird zur Bestimmung der Art vorgeschlagen.

Die Sonde Chlorocardium111 reagierte wie erwartet auf keine getestete Holzart, da für diese Holzart keine DNA zur Verfügung stand. Ob eine Bestimmung der Gattung *Chlorocardium* durch diese Sonden gewährleistet werden kann, muss durch zusätzliche Versuche geklärt werden.

Alle drei *Handroanthus*-Sonden wiesen gute Ergebnisse auf. Sie reagierten deutlich auf die beiden getesteten Arten *H. heptaphyllus* und *H. serratifolius*. Leichte Fehlreaktionen zeigten sich nur im ersten Durchlauf und fanden im zweiten keine Bestätigung. Alle drei Sonden sind zur Bestimmung der beiden Arten *H. heptaphyllus* und *H. serratifolius* geeignet.

5 Diskussion

Ziel der Forschungsarbeit war die Erstellung eines neuen Holzartenidentifizierungstests in Form eines DNA-Macroarrays. Durch diesen Test soll eine schnelle und einfache Identifizierung CITES-geschützter, handelsrelevanter, tropischer Holzarten und ihrer Austausch- bzw. Verwechslungshölzer, sog. look-alike species, ermöglicht werden. Diese Arbeiten sind von großer praktischer Bedeutung für die Kontrolle geschützter Hölzer und Holzprodukte im internationalen Warenverkehr (Dormontt et al., 2015). Für die Erstellung des Tests waren verschiedene molekularbiologische Methoden notwendig. Da für einige Holzarten nur wenige bis keine Sequenzen zur Identifizierung in der NCBI-Datenbank zur Verfügung standen, wurden neue Barcode-Sequenzen erarbeitet. Als Barcode-Region wurde nach eingehender Literaturrecherche der ITS gewählt. Aus dem gesammelten Probenmaterial wurde die DNA isoliert, der ITS amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzen wurden zusammen mit Datenbanksequenzen (wenn vorhanden) verglichen. Auf dieser Grundlage wurde eine Konsensus-Sequenz pro Holzart erstellt, die intraspezifische Varianzen berücksichtigt. Das vereinfachte den Vergleich der Arten untereinander. Auf Grundlage ihrer Differenzen wurden spezifische Oligos erstellt, die anschließend auf dem Macroarray gegen die untersuchten Holzarten getestet wurden. Die Macroarray-Versuche wurden manuell und automatisiert ausgewertet. Beide Auswertungen wurden anschließend miteinander verglichen. Die wichtigsten Ergebnisse werden im Folgenden mit Bezug auf die aktuelle Literatur diskutiert.

5.1 Verwendetes Probenmaterial und DNA-Isolation

Die Isolierung von DNA aus frischem Pflanzenmaterial von Blättern, Knospen, Blüten, Früchten, Kambium und jungen Ästen ist heutzutage routinemäßig über kommerzielle Extraktionskits möglich (Finkeldey et al., 2010, Lowe and Cross, 2011, Jiao et al., 2020). Eine Beschaffung frischen Materials von mehreren Individuen setzt jedoch eine Reise in die Herkunftsländer voraus und ist deshalb mit einem hohen Personal-, Zeit- und Kostenaufwand verbunden. Für geschützt Holzarten ist eine Beschaffung frischen Materials sehr schwierig bis unmöglich (Jiao et al., 2020). Frisches Untersuchungsmaterial stand nur in einem geringen Umfang in dieser Forschungsarbeit zur Verfügung. Ein Großteil der untersuchten Proben ging auf Blattmaterial aus Herbarbeständen, Holzgewebe aus der

Xylothek des Thünen-Instituts für Holzforschung sowie auf Probenmaterial früherer Forschungsarbeiten zurück. Die Verwendung von Herbarmaterial zum Aufbau von DNA-Datenbanken wurde bereits in Särkinen et al. (2012) als geeignete DNA-Quelle bestätigt, ebenso wie die Verwendung von Holzproben aus Xylotheke von Yu et al. (2017) und Jiao et al. (2018).

Ein Großteil des Probenmaterials konnte über das DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) extrahiert werden. Es handelt sich um eine gängige Methode zur Extraktion von DNA aus Holz (Dumolin-Lapègue et al., 1999, Deguilloux et al., 2002, Rachmayanti et al., 2006, Yoshida et al., 2007, Rachmayanti et al., 2009, Abe et al., 2011, Hanssen et al., 2011). Trotzdem stellt die Extraktion eine Herausforderung dar, da sowohl die Quantität als auch die Qualität der DNA im Holz gering sind (Abe et al., 2011, Lowe and Cross, 2011). Die Quantität der DNA nimmt von der Borke über den Splint bis zum Kernholz signifikant ab, wohingegen Inhibitoren zunehmen (De Filippis and Magel, 1998). Für die Isolierung von DNA aus Holz eignet sich besonders junges, frisches Splintholz (Tang et al., 2011). Im Kernholz hingegen können Extraktstoffe wie Tannine, Harze, ätherische Öle und Pigmente eine Isolierung behindern (Deguilloux et al., 2002, Rachmayanti et al., 2009). Aber auch die Lagerung, das Alter und eventuelle Bearbeitungsprozesse sorgen für eine Degradierung der DNA im Holz (Jiao et al., 2012, Tnah et al., 2012). Prozesse die nach der Ernte im Holz stattfinden, sollen laut Abe et al. (2011) einen größeren Einfluss auf die DNA-Degradierung als die Kernholzbildung haben. Somit gab es einige Proben, die keine Erfolge in der Isolation und Amplifikation zeigten. Diese wurde mit Hilfe des DNeasy® *mericon*™ Food Kits (Qiagen) nach einem modifiziertem Protokoll (Wischnewski, 2014) bearbeitet, welches sich bereits in früheren Arbeiten mit alten Holzproben bewährt hat (Bogun, 2015). Proben die über eine herkömmliche Extraktion nicht isoliert werden konnten, zeigten Erfolge mittels dieser Methode.

Die anschließend gemessenen spektrophotometrischen Werte der DNA-Konzentration und -Reinheit schienen keinen großen Einfluss auf die Verwendbarkeit der DNA für die Amplifizierung zu haben. Sie zeigten teilweise sehr hohe Verunreinigungen an. In einigen Fällen waren die Messwerte negativ. Dies lässt darauf schließen, dass eine exakte Messung durch hohe Verunreinigungen mit inhibitorischen Substanzen und zu geringen DNA-Mengen nicht möglich war (Rachmayanti et al., 2009, Abe et al., 2011). Trotz dieser

augenfälligen Werte konnten meist Banden in der PCR erzielt und diese Proben sequenziert werden. Es lässt sich aber keine Aussage über das verwendete Material und die erreichten Messwerte ableiten, da dieses Phänomen sowohl bei Holzproben (Ästen, Splint- und Kernholz) als auch bei Blattmaterial (Herbarmaterial) vorkam.

Der Erfolg der DNA-Extraktion wurde somit durch die PCR-Amplifikation bewertet. Aus neun Proben konnte keine DNA amplifiziert werden. Es handelte sich bei diesen Proben um vier Herbarproben (Blatt), zwei Splint- und drei Kernholzproben. Das Probenmaterial war in diesen Fällen vermutlich zu alt oder zur Konservierung behandelt (Herbarmaterial), sodass die DNA bereits in großem Umfang degradiert war. Eine Nachverfolgung des Alters oder der Behandlung war in meisten Fällen der Proben nicht möglich.

5.2 Amplifizierung

Die Amplifizierung der ITS-Region wurde mittels der Primer ITS1.1 und ITS4 (White et al., 1990, Hanssen et al., 2011) durchgeführt. Beide Primer liegen in konservierten Bereichen und amplifizieren den gesamten ITS-Bereich mit den Teilbereichen ITS1, 5.8S und ITS2 (insgesamt ca. 700 bp). Diese Primerkombination vervielfältigt jedoch sowohl die DNA von Pflanzen als auch von Pilzen (Baldwin et al., 1995). Um eine eventuell vorhandene Pilz-DNA aus der Amplifizierung auszuschließen, wurden bei Doppelbanden im Gelbild oder ausbleibendem, sauberem Amplifizierungserfolg die Primerkombinationen „ITS1.1/ITS2.1“ und „ITS3.1/ITS4“ (White et al., 1990, Hanssen et al., 2011) verwendet. Sie amplifizieren die einzelnen ITS-Bereiche (ITS1 bzw. ITS2) mit ca. 380 bp bis 440 bp. Versuche von Rachmayanti et al. (2009) zeigten, dass kurze DNA-Fragmente (150 bp) eine höhere Amplifizierungsrate aufwiesen im Vergleich zu längeren Fragmenten (1.100 bp), was ebenfalls für den Einsatz der holzspezifischen Primer spricht.

Eine weitere Verbesserung des Amplifizierungserfolgs konnte durch unterschiedliche Verdünnungsstufen der Probeneluat und den Einsatz von nested-PCRs erreicht werden. Die Verdünnung der DNA-Eluat vor dem Einsatz in der PCR führt auch zu einer Verdünnung der Inhibitoren auf eine eventuell tolerable Konzentration für die PCR (Bickley and Hopkins, 1999). Der Einsatz von nested-PCRs bedeutet, dass ein PCR-Produkt in einer zweiten PCR als Template zum Einsatz kommt. Dadurch wird eine höhere Spezifität und Sensitivität erreicht (Olatunbosun et al., 2001). Der Amplifizierungsbereich der zweiten PCR muss innerhalb des Sequenzbereiches der Ersten liegen. Somit ist eine

nested-PCR mit den holzspezifischen Primerkombinationen nach einer vorgestellten Amplifizierung mit den allgemeinen ITS Primern möglich.

Für die Sequenzerstellung wurden die Sequenzierungsergebnisse der einzelnen ITS-Abschnitte anschließend zu einer Sequenz zusammengeführt. Insgesamt wurden 197 ITS-Sequenzen für 51 Arten erarbeitet.

5.3 Barcode

Das internationale Konsortium „Barcode of Life“ (BOL) schlägt die Barcode-Regionen *rbcL*, *matK* und *trnH-psbA* (aus cpDNA) sowie ITS (aus nrDNA) in Kombinationen für die Identifizierung von Landpflanzen vor. Die Amplifizierungserfolge von cpDNA-Barcodes sind zwar höher, jedoch zeigt der ITS die höheren Auflösungen zur Differenzierung auf Artebene für Hölzer. Die besseren Amplifizierungsraten der cpDNA sind durch ihren ringförmigen Aufbau zu erklären, welcher die DNA effektiver vor Abbauprozessen schützt. Außerdem liegt die cpDNA allgemein in größerer Kopienzahl vor. (Deguilloux et al., 2002, Jiao et al., 2012)

In der vorliegenden Arbeit wurde der ITS als Barcode verwendet, weil er bisher für die untersuchten Holzarten eine genauere Artidentifizierung zulässt (siehe Tab. 2 in Kapitel 2.3). Er besitzt die von Hollingsworth et al. (2009) propagierten Eigenschaften (siehe Kapitel 2.3). Er wird von den konservierten Bereichen 18S und 26S flankiert, was eine routinierte Amplifizierung gewährleistet. Zwischen den Gattungen und den meisten hier untersuchten Arten sind die Bereiche dazwischen ausreichend variabel zur Artunterscheidung. Mit 700 bp ist der ITS ohne Probleme sequenzierbar. Die Anzahl unterschiedlicher Kopien innerhalb eines Individuums ist bei Laubhölzern sehr gering. Weiterhin zeigt der ITS in allen Geweben des Baumes eine ausreichend hohe Kopienzahl. (Baldwin et al., 1995)

Der ITS zeigte bereits, wie in Tabelle 2, Kapitel 2.3 dargestellt, gute Ergebnisse in der Identifizierung von Holzarten. Es lagen jedoch auch Einschränkungen in der Identifizierung auf Artebene innerhalb einiger Gattungen vor. So zeigten die Arten *S. macrophylla* und *S. humilis* keine ausreichenden Unterschiede im ITS, um die beiden Arten von einander zu differenzieren. Beide Arten waren jedoch eindeutig von *S. mahagoni* zu unterscheiden. Gleiches zeigte sich auch in Sequenzvergleichen von Höltken et al. (2012) von der *matK-trnK* Region der cpDNA. Das bedeutet, dass die beiden

Arten weder über den ITS noch über die bisher untersuchten cpDNA Marker zu unterscheiden sind.

Auch die folgenden Arten konnten über den ITS nicht eindeutig unterschieden werden: alle untersuchten *Khaya*-Arten, *T. ciliata*/*T. sureni*, *P. indicus*/*P. macrocarpus*, *H. heptaphyllus*/*H. serratifolius*.

5.4 Oligo-Design

Ziel war es, Oligos sowohl aus dem ITS1 als auch dem ITS2 zu erarbeiten. Die Unterschiede einiger Arten reichten jedoch nicht in beiden Regionen aus. Die weiterhin vorgeschlagenen Eigenschaften für das Oligo-Design (siehe Kapitel 3.2.7) wurden teilweise nicht eingehalten. Da es sich hier um Empfehlungen für eine erhöhte Erfolgschance handelt, wurde ein Abweichen von den Vorschlägen zu Gunsten der Spezifität der Sequenz des Oligos als sinnvoll erachtet. Die Schmelztemperaturen der Oligos bewegen sich somit zwischen 46,4°C und 71,9°C und der GC-Gehalt zwischen 25 % und 88,2 %. Eine Abweichung von den in Kapitel 3.2.7 beschriebenen Vorgaben ist durch die Begrenztheit der variablen Sequenzabschnitte begründet.

Es wurden 99 Oligos designiert. Zusammen mit 49 Sonden aus vorherigen Projekten wurden insgesamt 148 getestet, inklusive vier Positivkontrollen. Davon haben sich 66 als geeignet zur Identifizierung herausgestellt. Diese Diskrepanz zwischen dem Oligo-Design *in silico* und der eigentlichen Hybridisierung im Experiment zeigt, dass es viele Einflussfaktoren gibt. Es sind längst nicht alle Dynamiken und Prozesse der Hybridisierung bekannt (Kochzius et al., 2010).

In Tabelle 16 im Kapitel 5.7 sind alle erfolgreich identifizierbaren Holzarten und ihre jeweiligen Sonden dargestellt.

5.5 Probleme bei der Auswertung der Macroarrays

Die Macroarray-Versuche waren aufgeteilt in je drei Vorversuche in drei Gruppen, um eine Auswahl der Sonden zu treffen. Abschließend wurden 81 dieser Sonden in zwei Gesamt-Kreuztests validiert. Die Hybridisierungsreaktionen wurden manuell und automatisiert ausgewertet.

Die Auswertung wurde durch schwankend auftretende Hintergrundschattierungen erschwert. Ein „wolkiger“ Hintergrund kann verschiedene Ursachen haben, wie das kurzzeitige Austrocknen der Membran während des Prozesses, ein unzureichendes Waschen oder Blocken der Membran, eine zu hohe Antikörperkonzentration, sekundäre Kreuzreaktionen zwischen Antikörper und Blockingreagent, unzureichende Auswaschung ungebundener Antikörper, unspezifische Antikörperbindung oder ein zu langes Exponieren der Membran (Bio-rad, 2022). Ursachen basierend auf der Anzahl der Waschschriffe, der Konzentration des Antikörpers und der Exponierung können ausgeschlossen werden. Sie waren in allen Versuchsdurchläufen gleich und nicht alle Filme zeigten einen wolkigen Hintergrund. In der automatisierten Auswertung führten diese Hintergrundschattierungen auch zu leichten Fehlmessungen (siehe Abb. 32(a)). Zusätzlich entstanden Fehlmessungen durch Störfaktoren, die auf Artefakte zurückzuführen sind. Sie zeigen meist eine dunklere Ausprägung, die jedoch in Form und Größe von einer Sondenreaktion abweichen (siehe Abb. 32(b)).

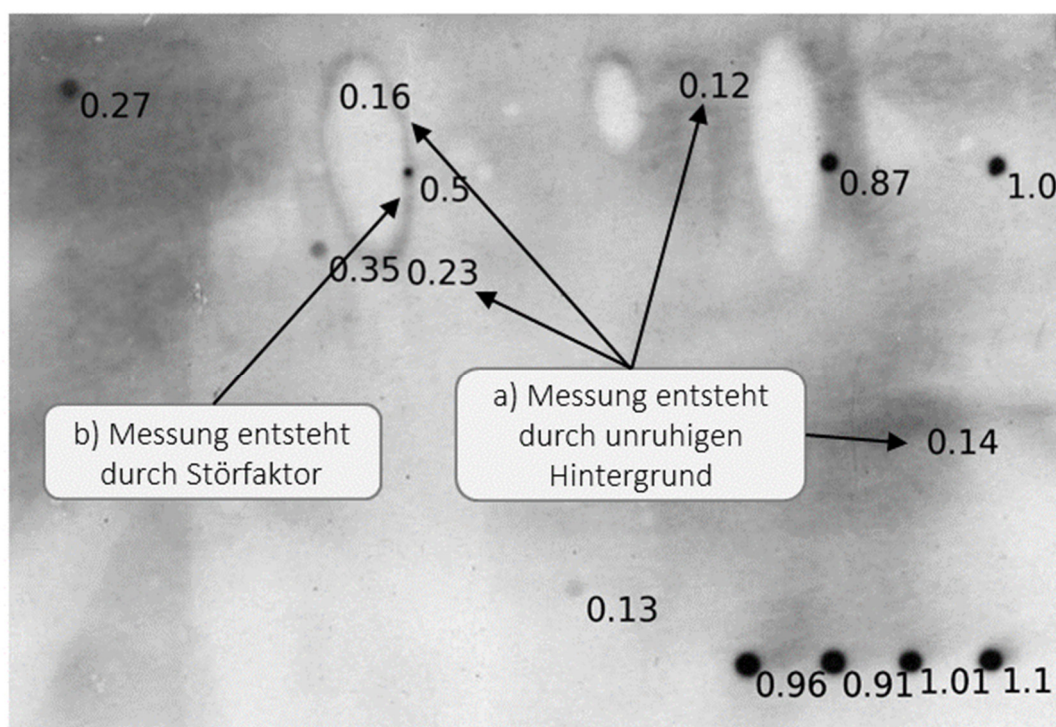


Abbildung 32 Sondenreaktionen neben Fehlmessungen auf einem Macroarray

Das Auftreten gering ausfallender Fehlhybridisierungen, die sich im zweiten Durchgang nicht bestätigten, sind durch unspezifische Bindungen zu erklären. Diese Reaktionen waren hier in der Regel eher schwach. Eindeutige Fehlhybridisierungen wiederum sind auf zu ähnliche Sequenzen der Arten zurückzuführen. Um eine etwaige Übereinstimmung der Oligosequenz mit dem Genom anderer Arten so gering wie möglich zu halten, wurden alle Oligos mit der BLAST-Funktion von NCBI auf prozentuale Übereinstimmungen hin untersucht. Unterschiede in den Signalstärken, lassen sich mit den unterschiedlichen Abständen der Fluoreszenzmarkierung von der Bindungsstelle erklären. Die Signalstärke verringert sich mit der Vergrößerung des Abstandes, das sogenannte „Position of Label“-Problem (Peytavi et al., 2005, Zhang et al., 2005). Außerdem entstehen solche Unterschiede beim Auftragen der Oligos auf die Membran. Über das Auftragen mittels Multiplotter wird eine ungefähre Menge von 0,2 µl auf die Membran gespottet, die jedoch nicht exakt bemessen werden kann. Somit schwanken die tatsächlichen Oligomengen pro Spott leicht, was wiederum die Strahlungsintensität beeinflusst (Lievens et al., 2005 a).

5.6 Vorteile der automatisierten Auswertung der Hybridisierungsreaktionen

Es wurden zwei automatisierte Auswertungsvarianten mit der manuellen verglichen. Zum einen wurde ein starrer Schwellenwert der Signale von 0,1 festgelegt und zum anderen nur die stärksten zwei Signale einbezogen. Beide Varianten zeigten eine rund 98-prozentige Übereinstimmung der Hybridisierungsreaktionen mit der manuellen Auswertung. Ein starrer Schwellenwert von 0,1 hat zur Folge, dass sehr viele leichte Fehlmessungen und Fehlreaktionen in die Auswertung einbezogen werden. Darauf basierten 85,5 % der Unterschiede zur manuellen Auswertung. Dies betraf Positionen, an denen der unruhige Hintergrund zu einer Messung führte, manuell aber keine Reaktion erkennbar war. Es handelte sich meist um Messungen schwacher Signale zwischen 0,1 und 0,2. Insgesamt zeigten 176 Positionen in der Signalwertmessung solche Fehlerstellen. Davon waren die Meisten auf einen sehr unruhigen Hintergrund zurückzuführen. 23 Positionen zeigten Störfaktoren. In beiden Fällen erkannte die Automatisierung den Unterschied zwischen Hybridisierungsreaktion und Störfaktoren nicht. Zusätzlich wird bei einer sehr schwachen, richtig positiven Reaktion der Sonden (unter 0,1) keine Reaktion gemessen. Eine flexible Festlegung des Schwellenwertes, der die stärksten zwei Signale

eines Versuches misst, sorgte wiederum dafür, dass viele Fehlreaktionen aus der Betrachtung ausgeschlossen wurden. Gleiches gilt für die meisten Fehlhybridisierungen mit anderen Arten, da diese ebenfalls oft geringe Signale aussenden. Diese Variante der Auswertung ist jedoch nur sinnvoll, wenn jeweils zwei Sonden zu jeder Art vorhanden sind. Da nicht für alle Holzarten die gleiche Anzahl von Sonden vorlag, wird schlussendlich eine automatisierte Auswertung mit einem starren Schwellenwert von 0,1 und manueller Kontrolle vorgeschlagen. Eine Automatisierung der Auswertung wird als sinnvoll erachtet, da eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse vorlag und sie zusätzlich die Vorteile der Objektivität und einen schnelleren Ablauf gewährleistet. Durch die manuelle Kontrolle werden Fehlmessungen durch unruhigen Hintergrund oder Artefakte ausgeschlossen. Eine rein manuelle Auswertung bietet sich bei entsprechender Ressourcenbegrenzung an.

5.7 Einschätzung der Sonden

Es ist festzustellen, dass 32 Arten der 53 vormalig Untersuchten über die entwickelten Sonden identifizierbar sind. 15 Arten können durch diesen Test in Gruppen von maximal drei Arten eingegrenzt werden. Für die zwei Arten *A. scholaris* und *C. rodiei* stand keine DNA zur Verfügung. Für die vier Arten *S. koetjape*, *D. costulata*, *E. moluccanum* und *N. cadamba* zeigten die Tests keine ausreichenden Ergebnisse. Die nachstehende Tabelle listet alle untersuchten Holzarten mit den jeweiligen, zur Identifizierung führenden, Sonden auf.

Tabelle 16 Über den entwickelten Macroarray identifizierbare Holzarten und ihre Sonden

Gruppe	Holzart	Sonden
MELIACEAE	<i>Cedrela angustifolia</i>	Cedrela29 + negativ Ced fissilisC6for1 + negativ Ced odrataC6for1
	<i>Cedrela fissilis</i>	Cedrela29 + Ced fissilisC6for1
	<i>Cedrela odorata</i>	Cedrela29 + Ced odorataC6for1
	<i>Toona ciliata</i>	-
	<i>Toona sureni</i>	Toona70
	<i>Swietenia humilis</i> / <i>S. macrophylla</i>	Macrophylla rev1
	<i>Swietenia mahagoni</i>	Mahagoni for4, Smahagoni649
	<i>Carapa guianensis</i>	Carapa for2, Carapa for3, Carapa rev1
	<i>Carapa procera</i>	Carapa for2, Carapa for3, Carapa rev1 + Cprocera50

	<i>Entandrophragma angolense</i>	Ent ango for2
	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Ent cyl for2, Ecyndricum264
	<i>Entandrophragma utile</i>	Eutile86
	<i>Leplaea cedrata</i>	Lcedrata35, Lcedrata459
	<i>Leplaea thompsonii</i>	Lthompsonii35, Lthompsonii457
	<i>Khaya</i> spp.	Khaya for2, Khaya243
	<i>Sandoricum koetjape</i>	-
FABACEAE	<i>Guibourtia demeusei/</i> <i>G. pelleginiana</i>	Gtessmannii225 + Gpellegriniana221
	<i>Guibourtia tessmannii</i>	Gtessmannii225
	<i>Guibourtia arnoldiana</i>	Garnoldiana79
	<i>Guibourtia ehie</i>	Gehie44
	<i>Copaifera salikounda</i>	Csalikounda41
	<i>Hymenaea courbaril</i>	Hcourb for1, Hcourb for2
	<i>Pterocarpus erinaceus</i>	Psantalinus487, Pindicus487 + Perinaceus615
	<i>Pterocarpus santalinus</i>	Psantalinus487, Pindicus487 + Pindicus597, Pmacrocarpus71, Pindimacro32 + Psantalinus682
	<i>Pterocarpus indicus/</i> <i>P. macrocarpus</i>	Psantalinus487, Pindicus487 + Pindicus597, Pmacrocarpus71, Pindimacro32
	<i>Pterocarpus soyauxii</i>	Psantalinus487, Pindicus487 + Pindicus597, Pmacrocarpus71 + Psoyauxii501
Ramin	<i>Gonystylus</i> spp.	Gonystylus48, Ramin for1, Ramin rev1
	<i>Alstonia booneii</i>	Alstonia481, Abooneii481
	<i>Dyera costulata</i>	-
	<i>Antiaris toxicaria</i>	Atoxicaria553
	<i>Brosimum alicastrum</i>	Balicastrum502
	<i>Donella pruniformis</i>	Dpruniformis512
	<i>Endospermum moluccanum</i>	-
	<i>Jacaranda copaia</i>	Jcopaia28
	<i>Neolamarckia cadamba</i>	-
	<i>Pterygota bequaertii</i>	Pbequaertii175
	<i>Pterygota macrocarpa</i>	Pmacrocarpa26
	<i>Terminalia ivorensis</i>	Tivorensis111, Tivorensis234
	<i>Terminalia superba</i>	Tsuperba219, Limba rev1
Pockholz	<i>Guaiacum coulteri</i>	Guaiacum for1 + Gcoulteri172
	<i>Guaiacum officinale</i>	Guaiacum for1 + negativ Gcoulteri172 + negativ Gua sanct rev1
	<i>Guaiacum sanctum</i>	Guaiacum for1 + Gua sanct rev1
	<i>Plectrocarpa arborea</i>	Bulnesia for1
	<i>Chlorocardium rodiei</i>	Chlorocardium111
	<i>Handroanthus heptaphyllus/</i> <i>H. serratifolius</i>	Handroanthus211, lpe for1, lpe rev1

Für einige Arten waren Kombinationen von Reaktionen und nicht anschlagenden Sonden notwendig, um die vorliegende Art zu identifizieren. So ist beispielsweise eine Bestimmung der Holzart *C. angustifolia* durch die Kombination der positiven Reaktion der Gattungssonde Cedrela29 und dem Ausbleiben einer Reaktion der Sonden Ced fissilis for1 und Ced odorata for1 möglich. Gleiches gilt für die Bestimmung von *G. officinale*. Die Art ist über die Reaktion der Gattungssonde Guaiacum for1 und das Ausbleiben einer Reaktion mit den artspezifischen Sonden Gcoulteri172 und Gua sanct rev1 bestimmbar. In der Gattung *Pterocarpus* reagierten mehrere Sonden gattungs- bzw. gruppenspezifisch. So stellten sich die Sonden Psantalinus487 und Pindicus487 als ungeeignet für einen artspezifischen Einsatz heraus, können jedoch als Gattungssonden verwendet werden. Die folgende Abbildung zeigt das Sondenreaktionsmuster für die Arten der Gattung *Pterocarpus* für eine einfachere Interpretation.

Holzart \ Sonde	<i>P. erinaceus</i>	<i>P. santalinus</i>	<i>P. indicus</i>	<i>P. macrocarpus</i>	<i>P. soyauxii</i>
Psantalinus487	•	•	•	•	•
Pindicus487	•	•	•	•	•
Perinaceus615	•				
Psantalinus682	•	•			•
Pindicus597		•	•	•	•
Pmacrocarpus71		•	•	•	•
Pindimacro32		•	•	•	
Psouyauxii501					•

Abbildung 33 Sondenreaktionsmuster der *Pterocarpus*-Arten

5.8 Vor- und Nachteile der Macroarray-Methode

Der beschriebene Holzartentest mittels Macroarray, hat verschiedene Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden. Im Vergleich zur konventionellen mikroskopischen Artenbestimmung ist für die genetische Holzartenidentifizierung keine jahrelange Erfahrung und Expertise in der Erkennung von Holzarten notwendig. Eine Ausbildung zur labortechnischen Assistenz befähigt zur Durchführung der beschriebenen

Methoden. Für einige Gattungen bietet die Genetik auch eine genauere Bestimmung der Art, die über die Mikroskopie nicht möglich ist.

Bei der Macroarray-Technologie handelt es sich um eine „low-tech“ Methode, die hauptsächlich in der Forschung zum Einsatz kommt. Sie ist günstiger in den Investitions- und Durchführungskosten als herkömmliche genetischen Identifizierungsmethoden wie die Sequenzierung und kann in Regionen mit geringer materieller und finanzieller Ausstattung eingesetzt werden. Sie bietet sich vor allem dort an, wo es keine kommerziellen Sequenzierungsangebote gibt. Da mittlerweile die Weiterentwicklung der Methoden eine Sequenzierung innerhalb von wenigen Stunden ermöglichen, relativiert sich die zeitliche Einsparung durch einen Macroarray. In diesem Punkt würde eine Weiterentwicklung des Tests auf die Ebene eines Microarrays eine Kommerzialisierbarkeit und Beschleunigung mit sich bringen. Allerdings sind Macroarrays im Vergleich zu Microarrays sensitiver, da sie auf Grund ihres Aufbaus eine größere Menge an Oligos pro Spot aufweisen (Cho and Tiedje, 2002). Weitere Vorteile der Methode zeigen sich gegenüber der Bestimmung durch den Einsatz spezifischer Primer in der PCR. Hierfür ist eine vorherige Eingrenzung der Holzarten notwendig, um eine Auswahl der einzusetzenden spezifischen Primer zu ermöglichen. Auch im Einsatz einer Multiplex PCR mit mehreren Primerkombinationen ist die Anzahl der Holzarten begrenzter. In der Macroarray-Methode hingegen können alle Holzarten, für die Oligos auf der Membran vorhanden sind, ohne eine vorherige Vermutung der Holzart oder -gattung bestimmt werden. Theoretisch kann durch die Array-Technologie auf eine unbegrenzte Anzahl an Holzarten gleichzeitig getestet werden (Lievens and Thomma, 2005 b). Eine Begrenzung findet nur durch die Größe der Membran und die Anzahl der vorhandenen Oligos statt. Weiterhin können mehrere Holzarten in Mischprodukten identifiziert werden. Auch die in dem angewandten Protokoll verwendeten Chemikalien sind unbedenklich, besonders im Vergleich mit radioaktiven Markierungsmethoden in anderen Macroarray-Protokollen (Stöcker and Schlumberger, 2019).

Der Macroarray soll jedoch nicht als vollständiger Ersatz zur Mikroskopie oder herkömmlicher genetischer Methoden verstanden werden, sondern das Repertoire der Bestimmungsmethoden erweitern. Der in dieser Arbeit entwickelte Macroarray eignet sich vor allem für die Fragestellung: Steht das vorliegende Holz unter CITES-Schutz oder

handelt es sich um ein Austauschholz und wenn ja, um welches? Ist die Deklaration richtig? Je nach Veränderung der Fragestellung kann der Macroarray durch das Aufbringen verschiedener Oligos angepasst werden. Wenn beispielweise die Herkunftsregion des Holzes von Interesse ist, können die Sonden durch Oligos aus anderen Barcode-Regionen erstellt werden. Für solche Zwecke müssen allerdings dementsprechende Datenbanken vorhanden sein bzw. aufgebaut werden.

Für alle genetischen Methoden bleibt das anfängliche Vorgehen gleich. Zuerst wird die DNA aus der vorliegenden Probe isoliert und anschließend die gewünschte Barcode-Region amplifiziert. Ist dies nicht möglich, weil die Inhaltsstoffe, die Behandlungen des Holzes oder das Alter eine Extraktion behindern, so ist nur eine Bestimmung über die anatomischen Strukturmerkmale möglich.

5.9 Ausblick

Der hier entwickelte Macroarray-Test zur Identifizierung von CITES-Hölzern und ihren Substituten ist ein weiterer Schritt zu einem praktikablen Werkzeug für die Kontrolle des Holzhandels. Um den Test in der Praxis anwenden zu können, sollte eine umfangreichere Methodvalidierung mit Blindproben aus dem Holzhandel durchgeführt werden. Folgende Faktoren müssen dabei berücksichtigt werden: Spezifität, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit, Genauigkeit der Ergebnisse, Zuverlässigkeit des Nachweises (Lievens and Thomma, 2005 b). Die Proben sollten aus verschiedenen geografischen Regionen stammen. Somit kann eine stichhaltige juristische Verwendung sichergestellt werden.

Weiterhin muss für die Anwendung die Kompatibilität des Sonden Musters geklärt sein. Der hier erarbeitete Test ist für die Identifizierung von 47 handelsrelevanten, tropischen Holzarten entwickelt wurden. Für Fragen der Legalität, die über eine Artbestimmung hinausgehen, müssten Sonden aus geeigneten Barcode-Regionen designt werden. Das ist beispielsweise wichtig, wenn die genaue geografische Herkunft des Holzes von Interesse ist, die Rückschlüsse auf das Herkunftsland (CITES Appendix III) zulässt. Diese Fragestellung ist von besonderer Bedeutung, da die EU auch individuelle, regionale Einfuhrverbote für CITES-Hölzer erlassen hat, z.B. *Guibourtia demeusei* aus Kamerun oder *Pterocarpus erinaceus* aus Nigeria (BfN, 2022). Für geografische Rückschlüsse steht immer der Aufbau von Referenzdatenbanken an erster Stelle. Eine Kombination mehrerer Barcode-Regionen würde somit eine Ausweitung der Fragestellung

ermöglichen. Die Einbeziehung von cpDNA Markern in den Test ist die Voraussetzung für einen Herkunftsnachweis.

Der Test ermöglicht durch seine sehr geringen Investitionskosten eine Anwendung in Herkunftsländern mit einfacher Labor- und geringer finanzieller Ausstattung. So ist auch ein Aufbau von und die Durchführung in mobilen Laboren im Feld vorstellbar.

Ein Ausbau des Tests für weitere Holzarten, die mit Blick auf den kommerziellen Holzhandel ebenfalls von starker Übernutzung und illegalem Handel betroffen sind, wird vorgeschlagen. Beispielsweise ist die die Gattung *Dalbergia* (Palisanderhölzer) von hoher Relevanz. Alle Arten dieser Gattung stehen unter CITES-Schutz (Appendix II, *D. nigra* Appendix I). Eine Unterscheidung der verschiedenen Arten ist sehr schwierig und holzanatomisch nur mit sehr viel Erfahrung möglich.

6 Literaturverzeichnis

- ABE, H., WATANABE, U., YOSHIDA, K., KURODA, K. & ZHANG, C. 2011. Changes in organelle and DNA Quality, Quantity, and distribution in the wood of *Cryptomeria Japonica* over long-term storage. *IAWA Journal*, 32, 263-272.
- AHUJA, M. R. & NEALE, D. B. 2005. Evolution of Genome Size in Conifers. *Journal of Silvae Genetica*, 54, 126-137.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10.
- ASIF, M. J. & CANNON, C. H. 2005. DNA extraction from processed wood: A case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 23, 185-192.
- AUBRIOT, X., LOWRY, P. P., 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. *Molecular Ecology Resources*, 13, 57-65.
- BALDWIN, B. G., SANDERSON, M. J., PORTER, J. M., WOJCIECHOWSKI, M. F., CAMPBELL, C. S. & DONOGHUE, M. J. 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82, 247.
- BFN. 2022. *Beschlüsse der 19. CITES-Vertragstaatenkonferenz zu Listungs- und Anmerkungsänderungen im Bereich Baumarten* [Online]. Available: <https://www.bfn.de/holz-holzprodukte> [Accessed 14.02.2023].
- BHAGWAT, R. M., DHOLAKIA, B. B., KADOO, N. Y., BALASUNDARAN, M. & GUPTA, V. S. 2015. Two New Potential Barcodes to Discriminate *Dalbergia* Species. *PLOS ONE*, 10, e0142965.
- BICKLEY, J. & HOPKINS, D. 1999. Inhibitors and enhancers of PCR. *Analytical Molecular Biology: quality and validation*, 81-102.
- BIO-RAD. 2022. *Western Blot Troubleshooting: High Background Signal on the Blot* [Online]. Available: <https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blot-high-background-signal-on-the-blot.html> [Accessed 03.09.2022].
- BOGUN, A. 2015. Molekulare und mikroskopische Identifizierung Molekulare und mikroskopische Identifizierung von Stauseeholz am Beispiel *Anogeissus leiocarpa*. Bachelorarbeit.
- BOLSON, M., SMIDT, E. D. C., BROTTTO, M. L. & SILVA-PEREIRA, V. 2015. ITS and trnH-psbA as Efficient DNA Barcodes to Identify Threatened Commercial Woody Angiosperms from Southern Brazilian Atlantic Rainforests. *PLOS ONE*, 10, e0143049.
- CANO, R. J. 1996. Analysing ancient DNA. *Endeavour*, 20, 162-167.
- CHASE, M. W., COWAN, R. S., HOLLINGSWORTH, P. M., VAN DEN BERG, C., MADRIÑÁN, S., PETERSEN, G., SEBERG, O., JØRGENSEN, T., CAMERON, K. M., CARINE, M., PEDERSEN, N., HEDDERSON, T. A. J., CONRAD, F., SALAZAR, G. A., RICHARDSON, J. E., HOLLINGSWORTH, M. L., BARRACLOUGH, T. G., KELLY, L. & WILKINSON, M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *TAXON*, 56, 295-299.
- CHAVES, C. L., DEGEN, B., PAKULL, B., MADER, M., HONORIO, E., RUAS, P., TYSKLIND, N. & SEBBENN, A. M. 2018. Assessing the Ability of Chloroplast and Nuclear DNA Gene Markers to Verify the Geographic Origin of *Jatoba* (*Hymenaea courbaril* L.) Timber. *Journal of Heredity*, 109, 543-552.
- 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, e8613.
- CHO, J.-C. & TIEDJE, J. M. 2002. Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1425-1430.

- CITES.ORG. *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* [Online]. Available: <https://www.cites.org> [Accessed 17.11.2022].
- COTTENET, G., SONNARD, V., BLANCPAIN, C., HO, H. Z., LEONG, H. L. & CHUAH, P. F. 2016. A DNA macro-array to simultaneously identify 32 meat species in food samples. *Food Control*, 67, 135-143.
- DE ANDRADE, B. G., BASSO, V. M. & DE FIGUEIREDO LATORRACA, J. V. 2020. Machine vision for field-level wood identification. *IAWA Journal*, 41, 681-698.
- DE FILIPPIS, L. & MAGEL, E. J. T. 1998. Differences in genomic DNA extracted from bark and from wood of different zones in Robinia trees using RAPD-PCR. 12, 377-384.
- DE SOUZA BORGES, K. C. A., DE MELO DIAS, S., GALVÃO, E., MENDONÇA, R. C. C. L., LEANDRO, A. S., DE SOUZA, S. R. & DA MADEIRA, L. D. B. 2017. DNA extraction and anatomic characterization in dried heartwood from Fabaceae species. *Wood Research*, 62, 13-26.
- DEGEN, B. & FLADUNG, M. 2007. Use of DNA-markers for tracing illegal logging.
- DEGEN, B., HÖLTKEN, A. & ROGGE, M. 2010. Use of DNA-Fingerprints to Control the Origin of Forest Reproductive Material. 59, 268.
- DEGEN, B., WARD, S. E., LEMES, M. R., NAVARRO, C., CAVERS, S. & SEBBENN, A. M. 2013. Verifying the geographic origin of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) with DNA-fingerprints. *Forensic Science International: Genetics*, 7, 55-62.
- DEGUILLOUX, M., PEMONGE, M. & PETIT, R. 2002. Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. 269, 1039-1046.
- DEGUILLOUX, M. F., PEMONGE, M. H., BERTEL, L., KREMER, A. & PETIT, R. J. 2003. Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. 12, 1629-1636.
- DORMONTT, E. E., BONER, M., BRAUN, B., BREULMANN, G., DEGEN, B., ESPINOZA, E., GARDNER, S., GUILLERY, P., HERMANSON, J. C., KOCH, G., LEE, S. L., KANASHIRO, M., RIMBAWANTO, A., THOMAS, D., WIEDENHOEFT, A. C., YIN, Y., ZAHNEN, J. & LOWE, A. J. 2015. Forensic timber identification: It's time to integrate disciplines to combat illegal logging. *Biological Conservation*, 191, 790-798.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.
- DUMINIL, J., KENFACK, D., VISCOSI, V., GRUMIAU, L. & HARDY, O. J. 2012. Testing species delimitation in sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 275-285.
- DUMOLIN-LAPÈGUE, S., PEMONGE, M.-H., GIELLY, L., TABERLET, P. & PETIT, R. J. 1999. Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. *Molecular Ecology*, 8, 2137-2140.
- EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792-1797.
- FATIMA, T., SRIVASTAVA, A., HANUR, V. S. & RAO, M. S. 2018. An Effective Wood DNA Extraction Protocol for Three Economic Important Timber Species of India %J American Journal of Plant Sciences. Vol.09No.02, 11.
- FINKELDEY, R., LEINEMANN, L. & GAILING, O. 2010. Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1251-1258.
- 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. *Journal of ethnopharmacology*, 130, 116-121.
- GASSON, P. E., LANCASTER, C. A., YOUNG, R., REDSTONE, S., MILES-BUNCH, I. A., REES, G., GUILLERY, R. P., PARKER-FORNEY, M. & LEBOW, E. T. 2021. WorldForestID: Addressing the need for standardized wood reference collections to support authentication analysis technologies; a way forward for checking the origin and identity of traded timber. *Plants, People, Planet*, 3, 130-141.

- GUGERLI, F., PARDUCCI, L. & PETIT, R. J. 2005. Ancient plant DNA: review and prospects. *New Phytologist*, 166, 409-418.
- GUY, R. A., PAYMENT, P., KRULL, U. J. & HORGAN, P. A. 2003. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5178-5185.
- HANSEN, F., WISCHNEWSKI, N., MORETH, U. & MAGEL, E. 2011. Molecular Identification of *Fitzroya Cupressoides*, *Sequoia Sempervirens*, and *Thuja Plicata* Wood Using Taxon-Specific rDNA-ITS Primers. *IAWA Journal*, 32, 273–284.
- HARPER, K. A., SMART, C. D. & MICHAEL DAVIS, R. 2011. Development of a DNA-Based Macroarray for the Detection and Identification of *Amanita* Species. *Journal of Forensic Sciences*, 56, 1003-1009.
- HARTVIG, I., CZAKO, M., KJÆR, E. D., NIELSEN, L. R. & THEILADE, I. 2015. The Use of DNA Barcoding in Identification and Conservation of Rosewood (*Dalbergia* spp.). *PLOS ONE*, 10, e0138231.
- HASSOLD, S., LOWRY, P. P., II, BAUERT, M. R., RAZAFINTSALAMA, A., RAMAMONJISOA, L. & WIDMER, A. 2016. DNA Barcoding of Malagasy Rosewoods: Towards a Molecular Identification of CITES-Listed *Dalbergia* Species. *PLOS ONE*, 11, e0157881.
- HE, T., JIAO, L., YU, M., GUO, J., JIANG, X. & YIN, Y. 2019. DNA barcoding authentication for the wood of eight endangered *Dalbergia* timber species using machine learning approaches %J *Holzforschung*. *Holzforschung*, 73, 277-285.
- HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L. & DEWAARD, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences*, 270, 313–321.
- HOARE, A. 2015. Tacking Illegal Logging and the Related Trade. What Progress and Where Next? *Chatham House Report*. Chatham House, The Royal Institute of International Affairs.
- HOLLINGSWORTH, M. L., ANDRA CLARK, A., FORREST, L. L., RICHARDSON, J., PENNINGTON, R. T., LONG, D. G., COWAN, R., CHASE, M. W., GAUDEUL, M. & HOLLINGSWORTH, P. M. 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources*, 9, 439-457.
- HÖLTKEN, A. M., SCHRÖDER, 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*.
- HU, J. L., CI, X. Q., LIU, Z. F., DORMONTT, E. E., CONRAN, J. G., LOWE, A. J. & LI, J. 2022. Assessing candidate DNA barcodes for Chinese and internationally traded timber species. *Molecular Ecology Resources*, 22, 1478-1492.
- HUANG, X.-C., CI, X.-Q., CONRAN, J. G. & LI, J. 2015. Application of DNA Barcodes in Asian Tropical Trees – A Case Study from Xishuangbanna Nature Reserve, Southwest China. *PLOS ONE*, 10, e0129295.
- HUMMEL, S. 2003. *Ancient DNA typing: methods, strategies and applications*, Springer Science & Business Media.
- HUNG, K.-H., LIN, C.-H. & JU, L.-P. 2017. Tracking the geographical origin of timber by DNA fingerprinting: a study of the endangered species *Cinnamomum kanehirae* in Taiwan %J *Holzforschung*. 71, 853-862.
- IAWA 1964. *Multilingual glossary of terms used in wood anatomy*, Verlagsanstalt Buchdruckerei Konkordia Winterthur.
- IBOL. 2022. *DNA-Barcoding* [Online]. Available: <https://ibol.org/about/dna-barcoding/> [Accessed 06.09.2022].
- INTERPOL 2021. Forest Crime Fact sheet 2021.
- JIAO, L., HE, T., DORMONTT, E. E., ZHANG, Y., LOWE, A. J. & YIN, Y. 2019 b. Applicability of chloroplast DNA barcodes for wood identification between *Santalum album* and its adulterants. *Holzforschung*, 73, 209-218.

- JIAO, L., LIU, X., JIANG, X. & YIN, Y. 2015. Extraction and amplification of DNA from aged and archaeological *Populus euphratica* wood for species identification %J *Holzforschung*, 69, 925-931.
- JIAO, L., LU, Y., HE, T., GUO, J. & YIN, Y. 2020. DNA barcoding for wood identification: global review of the last decade and future perspective. *IAWA Journal*, 41, 620-643.
- JIAO, L., LU, Y., HE, T., LI, J. & YIN, Y. 2019 a. A strategy for developing high-resolution DNA barcodes for species discrimination of wood specimens using the complete chloroplast genome of three *Pterocarpus* species. *Planta*, 250, 95-104.
- JIAO, L., YIN, Y., CHENG, Y. & JIANG, X. 2014. DNA barcoding for identification of the endangered species *Aquilaria sinensis*: comparison of data from heated or aged wood samples. *Holzforschung*, 68, 487-494.
- 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) %J *IAWA Journal*. 33, 441-456.
- JIAO, L., YU, M., WIEDENHOEFT, A. C., HE, T., LI, J., LIU, B., JIANG, X. & YIN, Y. 2018. DNA Barcode Authentication and Library Development for the Wood of Six Commercial *Pterocarpus* Species: the Critical Role of Xylarium Specimens. *Scientific Reports*, 8, 1945.
- JOLIVET, C. & DEGEN, B. 2012. Use of DNA fingerprints to control the origin of sapelli timber (*Entandrophragma cylindricum*) at the forest concession level in Cameroon. *Forensic Science International: Genetics*, 6, 487-493.
- KELMAN, L. M. & KELMAN, Z. 1999. The use of ancient DNA in paleontological studies. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 19, 8-20.
- KOCH, G., KOCH, S. & RICHTER, H.-G. 2022. Holzartenbestimmung per Smartphone : Eine App für alles. *DEGA: GaLaBau : das Magazin für den Garten- und Landschaftsbau*, 28-30.
- KOCH, G., RICHTER, H. G. & SCHMITT, U. 2011. Design and application of CITESwoodID Computer-aided identification and description of CITES-protected timbers. *Iawa Journal*, 32, 213-220.
- KOCHZIUS, M., SEIDEL, C., ANTONIOU, A., BOTLA, S. K., CAMPO, D., CARIANI, A., VAZQUEZ, E. G., HAUSCHILD, J., HERVET, C., HJÖRLEIFSDOTTIR, S., HREGGVIDSSON, G., KAPPEL, K., LANDI, M., MAGOULAS, A., MARTEINSSON, V., NÖLTE, M., PLANES, S., TINTI, F., TURAN, C., VENUGOPAL, M. N., WEBER, H. & BLOHM, D. 2010. Identifying Fishes through DNA Barcodes and Microarrays. *PLOS ONE*, 5, e12620.
- KRESS, W. J., WURDACK, K. J., ZIMMER, E. A., WEIGT, L. A. & JANZEN, D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8369–8374.
- LEE, S. Y., NG, W. L., MAHAT, M. N., NAZRE, M. & MOHAMED, R. 2016. DNA Barcoding of the Endangered *Aquilaria* (Thymelaeaceae) and Its Application in Species Authentication of Agarwood Products Traded in the Market. *PLOS ONE*, 11, e0154631.
- LEMES, M. R., ESASHIKA, T. & GAOUE, O. G. 2011. Microsatellites for mahoganies: Twelve new loci for *Swietenia macrophylla* and its high transferability to *Khaya senegalensis*. 98, e207-e209.
- LENDVAY, B., HARTMANN, M., BRODBECK, S., NIEVERGELT, D., REINIG, F., ZOLLER, S., PARDUCCI, L., GUGERLI, F., BÜNTGEN, U. & SPERISEN, C. 2018. Improved recovery of ancient DNA from subfossil wood – application to the world's oldest Late Glacial pine forest. *New Phytologist*, 217, 1737-1748.
- LENS, F., LIANG, C., GUO, Y., TANG, X., JAHANBANIFARD, M., DA SILVA, F. S. C., CECCANTINI, G. & VERBEEK, F. J. 2020. Computer-assisted timber identification based on features extracted from microscopic wood sections %J *IAWA Journal*. 41, 660-680.
- LI, H. Q., CHEN, J. Y., WANG, S. & XIONG, S. Z. 2012. Evaluation of six candidate DNA barcoding loci in *Ficus* (Moraceae) of China. *Molecular ecology resources*, 12, 783–790.

- LIEPELT, S., SPERISEN, C., DEGUILLOUX, M.-F., PETIT, R. J., KISSLING, R., SPENCER, M., DE BEAULIEU, J.-L., TABERLET, P., GIELLY, L. & ZIEGENHAGEN, B. 2006. Authenticated DNA from Ancient Wood Remains. *Annals of Botany*, 98, 1107-1111.
- LIEVENS, B., BROUWER, M., VANACHTER, A. C. R. C., LÉVESQUE, C. A., CAMMUE, B. P. A. & THOMMA, B. P. H. J. 2005 a. Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA macroarray. 7, 1698-1710.
- LIEVENS, B., JUSTÉ, A. & WILLEMS, K. A. 2012. Fungal Plant Pathogen Detection in Plant and Soil Samples Using DNA Macroarrays. In: BOLTON, M. D. & THOMMA, B. P. H. J. (eds.) *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- LIEVENS, B. & THOMMA, B. P. 2005 b. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. *PHYTOPATHOLOGY*, 1374–1380.
- LIU, J., YAN, H.-F., NEWMASER, S. G., PEI, N., RAGUPATHY, S. & GE, X.-J. 2015. The use of DNA barcoding as a tool for the conservation biogeography of subtropical forests in China. *Diversity and Distributions*, 21, 188-199.
- LIU, Z.-F., MA, H., ZHANG, X.-Y., CI, X.-Q., LI, L., HU, J.-L., ZHANG, C.-Y., XIAO, J.-H., LI, H.-W. & CONRAN, J. G. 2022. Do taxon-specific DNA barcodes improve species discrimination relative to universal barcodes in Lauraceae? *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- LOTTSPEICH, F. & ENGELS, J. W. (eds.) 2012. *Bioanalytik*, Berlin; Heidelberg: Springer Spektrum.
- LOW, M. C., SCHMITZ, N., BOESCHOTEN, L. E., CABEZAS, J. A., CRAMM, M., HAAG, V., KOCH, G., MEYER-SAND, B. R. V., PAREDES-VILLANUEVA, K., PRICE, E., THORNHILL, A. H., VAN BRUSSELEN, J., ZUIDEMA, P. A., DEKLERCK, V., DORMONTT, E. E., SHAPCOTT, A. & LOWE, A. J. 2022. Tracing the world's timber: the status of scientific verification technologies for species and origin identification. *IAWA Journal*, 1-22.
- LOWE, A. & CROSS, H. 2011. The application of DNA methods to timber tracking and origin verification. *IAWA Journal*, 32, 251-262.
- LOWE, A., HARRIS, S. & ASHTON, P. 2004. Ecological genetics: design *Analysis, and Application*. Blackwell Publishing, Oxford.
- LOWE, A. J., DORMONTT, E. E., BOWIE, M. J., DEGEN, B., GARDNER, S., THOMAS, D., CLARKE, C., RIMBAWANTO, A., WIEDENHOEFT, A., YIN, Y. & SASAKI, N. 2016. Opportunities for Improved Transparency in the Timber Trade through Scientific Verification. *BioScience*, 66, 990-998.
- LOWE, A. J., WONG, K. N., TIONG, Y. S., IYERH, S. & CHEW, F. T. 2010. A DNA Method to Verify the Integrity of Timber Supply Chains; Confirming the Legal Sourcing of Merbau Timber From Logging Concession to Sawmill. 59, 263.
- LU, Y., JIAO, L., HE, T., ZHANG, Y., JIANG, X. & YIN, Y. 2020. An optimized DNA extraction protocol for wood DNA barcoding of *Pterocarpus erinaceus*. *IAWA Journal*, 41, 644-659.
- MAGNUSSEN, J. E., PIKITCH, E. K., CLARKE, S., NICHOLSON, C., HOELZEL, A. R. & SHIVJI, M. S. 2007. Genetic tracking of basking shark products in international trade. *Animal Conservation*, 10, 199-207.
- MATTHIES, H. 2014. Optimierung eines Oligonukleotid-Arrays zur Identifizierung von Holzarten: Bachelorarbeit.
- MÉNDEZ-CEA, B., COBO SIMÓN, I., PÉREZ GONZÁLEZ, A., GARCÍA GARCÍA, I., LINARES, J. C. & GALLEGO RODRÍGUEZ, F. J. 2019. DNA extraction and amplification from Pinaceae dry wood.
- MORETH, U. & SCHMIDT, O. 2000. Identification of Indoor Rot Fungi by Taxon-Specific Priming Polymerase Chain Reaction. *Holzforschung*, 54, 1-8.
- MOWER, J. P., TOUZET, P., GUMMOW, J. S., DELPH, L. F. & PALMER, J. D. 2007. Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial genes of seed plants. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 135.

- MUELLNER, A. N., SCHAEFER, H. & LAHAYE, R. 2011. Evaluation of candidate DNA barcoding loci for economically important timber species of the mahogany family (Meliaceae). *Molecular Ecology Resources*, 11, 450-460.
- MURILLO-SÁNCHEZ, I. E., LÓPEZ-ALBARRÁN, P., SANTOYO-PIZANO, G., MARTÍNEZ-PACHECO, M. M. & VELÁZQUEZ-BECERRA, C. 2021. Molecular identification of timber species from sawn timber and roundwood. *Conservation Genetics Resources*.
- MURMANIS, L., HIGHLEY, T. L. & PALMER, J. G. 1987. Cytochemical localization of cellulases in decayed and nondecayed wood. *Wood Science and Technology*, 21, 101-109.
- MURRAY, M. & THOMPSON, W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8, 4321-4326.
- NELLEMANN, C. 2012. Green Carbon, Black Trade: Illegal Logging, Tax Fraud and Laundering in the Worlds Tropical Forests. A Rapid Response Assessment. In: PROGRAMME, I. E. C. (ed.). United Nations Environment Programme, GRID-Arendal.
- NG, K. K. S., LEE, S. L., TNAH, L. H., NURUL-FARHANAH, Z., NG, C. H., LEE, C. T., TANI, N., DIWAY, B., LAI, P. S. & KHOO, E. 2016. Forensic timber identification: a case study of a CITES listed species, *Gonystylus bancanus* (Thymelaeaceae). *Forensic Science International: Genetics*, 23, 197-209.
- OLATUNBOSUN, O., DENEER, H. & PIERSON, R. 2001. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. *Obstetrics & Gynecology*, 97, 357-360.
- PANG, X., SONG, J., ZHU, Y., XIE, C. & CHEN, S. 2010. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. *Planta medica*, 76, 1784-1786.
- PAREDES-VILLANUEVA, K., DE GROOT, G. A., LAROS, I., BOVENSCHEN, J., BONGERS, F. & ZUIDEMA, P. A. 2019. Genetic differences among *Cedrela odorata* sites in Bolivia provide limited potential for fine-scale timber tracing. *Tree Genetics & Genomes*, 15, 33.
- PETERS, S. 2015. Erweiterung eines Oligonukleotid-Arrays zum Nachweis von CITES geschützten Hölzern und ihren Substitutionshölzern: Bachelorarbeit.
- PEYTAVI, R., TANG, L.-Y., RAYMOND, F. R., BOISSINOT, K., BISSONNETTE, L., BOISSINOT, M., PICARD, F. J., HULETSKY, A., OUELLETTE, M. & BERGERON, M. G. 2005. Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid. *Biotechniques*, 39, 89-96.
- PHONG, D. T., HIEN, V. T. T., TON, N. D. & VAN HAI, N. 2014. Nucleotide diversity of a nuclear and four chloroplast DNA regions in rare tropical wood species of *Dalbergia* in Vietnam: a DNA barcode identifying utility. *Asian Journal of Applied Sciences*, 2.
- PIZZOLATO, T. D. 1978. A Tannic Acid-Ferric Chloride-Toluidine Blue Stain for Wood Amyloplasts Embedded in Epoxy Resin. *Forest Science*, 24, 49-51.
- POREBSKI, S., BAILEY, L. G. & BAUM, B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular biology reporter*, 15, 8-15.
- QIAGEN. 2022. *DNeasy mericon Food Kit* [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-mericon-food-kit/> [Accessed 06.09.2022].
- RACHMAYANTI, Y., LEINEMANN, L., GAILING, O. & FINKELDEY, R. 2006. Extraction, amplification and characterization of wood DNA from dipterocarpaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24, 45-55.
- RACHMAYANTI, Y., LEINEMANN, L., GAILING, O. & FINKELDEY, R. 2009. DNA from processed and unprocessed wood: Factors influencing the isolation success. *Forensic Science International: Genetics*, 3, 185-192.
- RICHTER, H. G. & DALLWITZ, M. J. 2000 onwards. Commercial timber: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. <http://delta-intkey.com>.

- RICHTER, H. G., GEMBRUCH, K. & KOCH, G. 2014 onwards. CITESwoodID: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. In English, French, German, and Spanish. Version: 19th August 2019. delta-intkey.com.
- RICHTER, H. G. & TROCKENBRODT, M. 1995. Computergestützte Holzartenbestimmung unter Einsatz des DELTA/INTKEY-Programmpaketes. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 53, 215-219.
- SÄRKINEN, T., STAATS, M., RICHARDSON, J. E., COWAN, R. S. & BAKKER, F. T. 2012. How to Open the Treasure Chest? Optimising DNA Extraction from Herbarium Specimens. *PLOS ONE*, 7, e43808.
- SCHMIDT, O. 2009. Molekulare Diagnostik und Charakterisierung holzerstörender Basidiomyceten—Übersicht. *Holztechnologie*, 50, 16-20.
- SCHMITZ, N., BEECKMAN, H., CABEZAS, J. A., CERVERA, M. T., ESPINOZA, E., FERNANDEZ-GOLFIN, J., GASSON, P., HERMANSON, J. C., ARTEAGA, M. J., KOCH, G., LENS, F., MARTÍNEZ-JARQUÍN, S., VILLANUEVA, K. P., PASTORE, T. C. M., RAMANANANTOANDRO, T., SCHRAML, R., SCHROEDER, H., SEBBENN, A. M., TYSKLIND, N., WATKINSON, C. & WIEDENHOEFT, A. C. 2019. The Timber Tracking Tool Infogram. Overview of wood identification methods' capacity.
- SPEIRS, A. K., MCCONNACHIE, G., LOWE, A. J. A. S. U. A. M. S. I. R. & AUSTRALIS, A. D. A. I. H. O. T. H. L. T. 2009. Chloroplast DNA from 16th century waterlogged oak in a marine environment: initial steps in sourcing the Mary Rose timbers. 30, 175-189.
- STÖCKER, W. & SCHLUMBERGER, W. 2019. Makroarray. In: GRESSNER, A. M. & ARNDT, T. (eds.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- TANAKA, S. & ITO, M. 2020. Species identification of Indonesian agarwood using a DNA-barcoding method. *Journal of natural medicines*, 74, 323-330.
- TANG, X., ZHAO, G. & PING, L. J. P. M. B. 2011. Wood identification with PCR targeting noncoding chloroplast DNA. 77, 609-617.
- TNAH, L. H., LEE, S. L., NG, K. K. S., BHASSU, S., OTHMAN, R. Y. J. W. S. & TECHNOLOGY 2012. DNA extraction from dry wood of *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae) for forensic DNA profiling and timber tracking. 46, 813-825.
- TRIPATHI, A. M., TYAGI, A., KUMAR, A., SINGH, A., SINGH, S., CHAUDHARY, L. B. & ROY, S. 2013. The Internal Transcribed Spacer (ITS) Region and trnhH-psbA Are Suitable Candidate Loci for DNA Barcoding of Tropical Tree Species of India. *PLOS ONE*, 8, e57934.
- TSUMURA, Y., KADO, T., YOSHIDA, K., ABE, H., OHTANI, M., TAGUCHI, Y., FUKUE, Y., TANI, N., UENO, S. & YOSHIMURA, K. 2011. Molecular database for classifying *Shorea* species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products. *Journal of plant research*, 124, 35-48.
- TUSKAN, G. A., DIFAZIO, S., JANSSON, S., BOHLMANN, J., GRIGORIEV, I., HELLSTEN, U., PUTNAM, N., RALPH, S., ROMBAUTS, S., SALAMOV, A., SCHEIN, J., STERCK, L., AERTS, A., BHALERAO, R. R., BHALERAO, R. P., BLAUDEZ, D., BOERJAN, W., BRUN, A., BRUNNER, A., BUSOV, V., CAMPBELL, M., CARLSON, J., CHALOT, M., CHAPMAN, J., CHEN, G.-L., COOPER, D., COUTINHO, P. M., COUTURIER, J., COVERT, S., CRONK, Q., CUNNINGHAM, R., DAVIS, J., DEGROEVE, S., DÉJARDIN, A., DEPAMPHILIS, C., DETTER, J., DIRKS, B., DUBCHAK, I., DUPLESSIS, S., EHLTING, J., ELLIS, B., GENDLER, K., GOODSTEIN, D., GRIBSKOV, M., GRIMWOOD, J., GROOVER, A., GUNTER, L., HAMBERGER, B., HEINZE, B., HELARIUTTA, Y., HENRISSAT, B., HOLLIGAN, D., HOLT, R., HUANG, W., ISLAM-FARIDI, N., JONES, S., JONES-RHOADES, M., JORGENSEN, R., JOSHI, C., KANGASJÄRVI, J., KARLSSON, J., KELLEHER, C., KIRKPATRICK, R., KIRST, M., KOHLER, A., KALLURI, U., LARIMER, F., LEEBENS-MACK, J., LEPLÉ, J.-C., LOCASCIO, P., LOU, Y., LUCAS, S., MARTIN, F., MONTANINI, B., NAPOLI, C., NELSON, D. R., NELSON, C., NIEMINEN, K., NILSSON, O., PEREDA, V., PETER, G., PHILIPPE, R., PILATE, G., POLIAKOV, A., RAZUMOVSKAYA, J., RICHARDSON, P., RINALDI, C., RITLAND, K., ROUZÉ, P., RYABOY, D., SCHMUTZ, J., SCHRADER, J., SEGERMAN, B., SHIN, H.,

-
- SIDDIQUI, A., STERKY, F., TERRY, A., TSAI, C.-J., UBERBACHER, E., UNNEBERG, P., et al. 2006. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). 313, 1596-1604.
- UNODC 2020. Chapter 2: Rosewood timber. *World Wildlife Crime Report: Trafficking in Protected Species*.
- VIVAS, N., AMRANI-JOUTEI, K., GLORIES, Y., DONECHE, B. & BRECHENMACHER, C. Développement de microorganismes dans le bois de cœur de chêne (*Quercus petraea* Liebl) au cours du séchage naturel à l'air libre. *Annales des sciences forestières*, 1997. EDP Sciences, 563-571.
- 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, e29473.
- WATANABE, U. & ABE, H. 2017. Sequencing and quantifying plastid DNA fragments stored in sapwood and heartwood of *Torreya nucifera*. *Journal of Wood Science*, 63, 201-208.
- WEGNER, K. 2013. Erarbeitung eines Oligonukleotid-Arrays: Bachelorarbeit.
- WHEELER, E. A. 2011. Inside Wood – A Web resource for hardwood anatomy. *IAWA Journal*, 32, 199-211.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Academic Press*, 315–322.
- WIEDENHOEFT, A. J. I. U. N. O. O. D., CRIME: INTERNATIONAL CONSORTIUM ON COMBATING WILDLIFE CRIME. VIENNA, A. L., SCIENTIFIC SECTION, G. P. F. C. W. & 1-226., F. C. 2016. Best practice guide for forensic timber identification. 1-226.
- WISCHNEWSKI, N. 2014. Entwicklung spezifischer DNA-Markernsysteme zur Schnellbestimmung von CITES-geschützten Baumarten und deren Substitutionshölzern: Dissertation.
- WU, H.-Y., WONG, K.-H., KONG, B. L.-H., SIU, T.-Y., BUT, G. W.-C., TSANG, S. S.-K., LAU, D. T.-W. & SHAW, P.-C. 2022. Comparative Analysis of Chloroplast Genomes of *Dalbergia* Species for Identification and Phylogenetic Analysis. *Plants*, 11, 1109.
- YOSHIDA, K., KAGAWA, A. & NISHIGUCHI, M. Extraction and detection of DNA from wood for species identification. *Proceedings of the International Symposium on Development of Improved Methods to Identify Shorea Species Wood and its Origin*, 2007. 27-34.
- YU, M., JIAO, L., GUO, J., WIEDENHOEFT, A. C., HE, T., JIANG, X. & YIN, Y. 2017. DNA barcoding of vouchered xylarium wood specimens of nine endangered *Dalbergia* species. *Planta*, 246, 1165-1176.
- YU, M., LIU, K., ZHOU, L., ZHAO, L. & LIU, S. 2016. Testing three proposed DNA barcodes for the wood identification of *Dalbergia odorifera* T. Chen and *Dalbergia tonkinensis* Prain. *Holzforschung*, 70, 127-136.
- ZHANG, L., HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. 2005. Position of the fluorescent label is a crucial factor determining signal intensity in microarray hybridizations. *Nucleic Acids Research*, 33, e166-e166.
- ZHANG, N., MCCARTHY, M. L. & SMART, C. D. 2008. A macroarray system for the detection of fungal and oomycete pathogens of solanaceous crops. *Plant disease*, 92, 953-960.

7 Anhang

Anhang 1 DNeasy® Plant Mini (Qiagen) Extraktionsprotokoll

Vorgehensweise	Hinweise
Einwaage von 50 mg Holzmehl je Probe in 2 ml Eppendorf-Tubes	
Zugabe von 600 µl AP1 Puffer, vortexen, 10 min bei 65 °C im Thermoblock	Zellyse
Zugabe von 200 µl P3 Puffer, vortexen, 5 min bei -20 °C im Gefrierschrank herunterkühlen	Ausfällen von Proteinen und Zuckern
Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm	
Überführung auf QiaSchredder-Säule, Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm	Entfernung von Zelltrümmern
500 µl Überstand in 2 ml Eppendorf-Tube überführen	
Zugabe von 750 µl AW1 Puffer (mit Ethanol), sehr vorsichtig mischen	DNA-Fällung
650 µl der DNA-Lösung auf DNeasyMiniSpin-Säule geben, Zentrifugation für 1 min bei 8.000 rpm	Bindung der DNA an die Säule
Filtrat verwerfen, restliche DNA-Lösung auf die Säule geben, Zentrifugation für 1 min bei 8.000 rpm	
Filtrat verwerfen, Zugabe von 500 µl AW2 Puffer, Zentrifugation für 30 sek bei 8.000 rpm	Waschen der DNA
Wiederholung Schritt 10	
Filtrat verwerfen, Säule für 1 min bei 13.000 rpm trocken zentrifugieren	
Säule auf neues 1,5 ml Eppendorf-Tube setzen, 30 – 50 µl AE auf die Mitte der Säule geben, Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur	
Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm, erstes Eluat entsteht	Lösen der DNA von der Säule
Wiederholung Schritt 13 und 14, zweites Eluat entsteht	
Eluate bei 4 °C aufbewahren	

Anhang 2 DNeasy® *mericon*™ Food Kit (Qiagen) Extraktionsprotokoll

Vorgehensweise	Hinweise
Einwaage von 200 mg Holzmehl je Probe in 2 ml Eppendorf-Tubes	
Zugabe von 1,5 ml Food Lysis Puffer und 2,5 µl Proteinase K Solution, vortexen, 30 min bei 60 °C und 1.000 rpm im Thermoschüttler inkubieren	Zelllyse
5 min bei -20 °C im Gefrierschrank herunterkühlen	
Zentrifugation für 5 min bei 10.000 rpm	
700 µl Überstand und 500 µl Chloroform in einem neuen Eppendorf-Tube mit Pipette mischen (Unterm Abzug!)	
Zentrifugation für 15 min bei 17.000 rpm	Separierung der Phasen
1 ml PB Puffer und 250 µl obere, wässrige Phase vorsichtig in neuem Eppendorf-Tube mischen	DNA-Fällung
600 µl Lösung auf QIAquickSpin-Säule geben, Zentrifugation für 1 min bei 17.000 rpm	Bindung der DNA an Säulenmembran
Filtrat verwerfen, restliche Lösung auf Säule geben, Zentrifugation für 1 min bei 17.000 rpm	
Filtrat verwerfen, Zugabe von 500 µl AW2 Puffer, Zentrifugation für 1 min bei 17.000 rpm	Waschen der DNA
Filtrat verwerfen, Säule für 1 min bei 17.000 rpm trocken zentrifugieren	
Säule auf neues 1,5 ml Eppendorf-Tube setzen, 100 µl EB auf die Mitte der Säule geben, Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur	Lösen der DNA von Bindungsmembran
Zentrifugation für 1 min bei 17.000 rpm, erstes Eluat entsteht	
Wiederholung Schritt 12 und 13, zweites Eluat entsteht	
Eluate bei 4 °C aufbewahren	

Anhang 3 QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) Aufreinigungsprotokoll

Vorgehensweise

PCR-Produkt + 5-faches Volumen PB zusammenmischen

Probe auf QIAquick-Säule geben

Zentrifugation für 30 sec. bei 8.000 rpm

Probe erneut auf QIAquick-Säule geben

Zentrifugation für 30 sec. bei 8.000 rpm

Filtrat verwerfen

600 µl PE mit Ethanol dazugeben

Zentrifugation für 30 sec. bei 8.000 rpm

Filtrat verwerfen

Zweiter Waschschritt mit 600 µl PE

Zentrifugation für 30 sec. bei 8.000 rpm

Filtrat verwerfen

Trockenzentrifugieren für 1 min bei 13.000 rpm

Säule auf neues 1,5 ml Eppendorf-Tube setzen

Zugabe von 30 µl EB

Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur

Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm

Elate bei 4 °C aufbewahren

Anhang 4 Auflistung verwendeter Sonden und ihre Eigenschaften

Art	Oligo Name	ITS	Primer 5'-->3'	Tm [°C]	GC [%]	Length [bp]	Hairpin	Dimer	
<i>Swietenia humilis</i> und	Machumtax for1	1	CGGTCCGGCCCAAGGAAAAATT	64,4	57,1	21,0	39,8	None	
	Macrophylla for2	1	AATTTTCTTGGCGGGACCG					RC	
<i>Swietenia macrophylla</i>	Macrophylla for3	1	CGATCGAAAAAATAAACGACTC	56,6	39,1	23	35,9	10,3	
	Machumtax rev2	2	GACCCCTTGGCGGCC	68,6	88,2	17,0	None	30,8	
	Macrophylla rev1	2	GGCGCGCAGGGGGGTC					RC	
	Smacrophylla10	1	GCAACGGCAGAACGACCC	61,7	66,7	18	40,7	None	
	Smacrophylla112	1	GTCGGACCCCGTCCCC	66,5	83,3	18	66,6	36,1	
<i>Swietenia mahagoni</i>	Mahagonitax for1	1	CCGCGCCAAGGAAGAATC	58,9	61,1	18,0	None	None	
	Mahagonitax for2	1	GATTTCTTGGCGGG					RC	
	Mahagoni for3	1	GAATCAAACGAGGAAGCGC	57,4	52,6	19	33,9	None	
	Mahagoni for4	1	CGACCGAAAACGAAACGAC	57,7	50,0	20	None	None	
	Mahagonitax rev2	2	CCTCTCGACGGGGGTTG	60,2	70,6	17,0	41,8	1,9	
	Mahagonitax rev1	2	CAACGCCGTCGAGAGG					RC	
	Smahagoni12	1	GCAGCAGAACGACCCGC	61,5	70,6	17	None	None	
	Smahagoni181	1	GCCGGCCAAGGAAGAATC	62,1	63,2	19	None	None	
		Smahagoni649	2	CAGTTGCCTTCGGGCGCTC	64,2	68,4	19	62,5	7,6
		Carapa for1	1	GCGAACTCGTGCATCGAATGC	60,0	55,0	20	45,6	19,3
	Carapa for2	1	CGCCTTCTTCTGTAAAGATCC	57,1-59,4	47,6	22	54,7	9,5	
	Carapa for3	1	GGCGGAGACTTCGATCTCT	61,1	60,0	20	44,0	7,5	
	Carapa rev1	1	GGATTCTTACAGAAAGAGGGC	57,1	45,5	22,0	54,7	9,5	
	Carapa198	1	CGAACGAGAGACACGCT	59,8	61,1	18	None	None	
<i>Carapa guianensis</i>	Cguianensis74	1	CAGGCGTCGGCGTCCGGC	68,9	83,3	18	54,5	29,1	
	Cguianensis122	1	GATCTCTCCCTCCGGC	61,3	72,2	18	None	6,1	
	Cguianensis266	1	GTAAGAATCCAAAACGACTC	52,0	40,0	20	None	None	
	Cguianensis614	2	CTCGGGCGCCCTTCGTTTC	65,5	77,8	18	42,7	39,2	

Art	Oligo Name	ITS	Primer 5'-->3'	Tm [°C]	GC [%]	Length [bp]	Hairpin	Dimer
	Cguyanensis652	2	GCGCCCTCGTTCGGGCG	69,0	83,3	18	72,8	32,7
<i>Carapa procera</i>	Cprocera50	1	CGTGGGGCGGATCGTC	62,7	76,5	17	None	None
	Cprocera121	1	GATCTCCCTCCGTGGCGA	65,7	70,0	20	None	None
	Cprocera609	2	CTGTGTGGCCCTCGTTC	63,8	68,4	19	41,1	4,2
	Entandro rev1	2	ATTTGGCCAGCCCGGAG	RC	66,7	18,0	60,9	33,8
<i>Entandrophragma angolense</i>	Ent ango for1	1	GAACAACGAACCCCGGCG	61,7	66,7	18	43,9	None
	Ent ango for2 (2)	1	CGGGAGCGCCGTCTCTC	62,3	76,5	17	33,7	2,3
	Eangolense135	1	GAGCGGGGAACAACGAACCC	63,7	65,0	20	40,2	None
	Eangolense577	2	CGAGAAAGAAACCCCTCGATC	56,0	50,0	20	49,0	None
<i>Entandrophragma cylindricum</i>	Ent cyl for 2	1	TTCTCCGAACGAATGTCCAAAA	58,5	40,9	22	None	None
	Ent cyl rev1	2	CTTTCCAACCCGATCGTC	RC	55,0	20,0	None	21,0
	Ecyllindricum87	1	GTCCCGCCCGCTCGC	65,7	87,5	16,0	36,7	None
	Ecyllindricum264	1	CGAACGAATGTCCAAAAACG	55,5	47,4	19	None	None
Ecyllindricum576	2	GTTGGAAGGAACTCTCGATC	56,4	47,6	21	38,5	None	
<i>Entandrophragma utile</i>	Eutile33	1	GAGTGATTGCACACGAGGGG	61,0	60,0	20	47,6	2,1
	Eutile86	1	GTTCCCTTGCCCTCCGCGG	63,4	72,2	18	42,1	22,1
<i>Khaya</i> spp.	Khaya for1	1	GAACTCGTGACCGATTGCACC	61,8	57,1	21	43,3	None
	Khaya for2	1	GCCTTCTTCGATCGTAATCTAA	55,8	40,9	22	None	15,9
	Khaya for3	1	GGAATAATCAACGGGAGAGC	57,1	50,0	20	None	None
	Khaya rev1	1	TAGATTACGATCGAAGAAGGG	RC	57,9	45,5	22,0	None
	Khaya243	1	CTTCGATCGTAATCTAAAAAC	49,5	35,0	20	None	15,9
<i>Khaya ivorensis</i>	Kivorensis106	1	GAGGGTGGGACCCGAATC	61,6	65,0	20	57,1	None
	Kivorensis182	1	CTAACGGGAGAGCGCGCTC	63,1	68,4	19	52,3	45,5
	Kivorensis465	2	CTCCGGGGCGTTGCCGGC	71,9	84,2	19	65,4	27,8
	Kivorensis626	2	GTGCTGTGGCTCTCGGA	61,7	66,7	18	42,4	None
<i>Leplaea cedrata</i>	Lcedrata35	1	GTGATTGTGCTTGAGGGGGT	60,3	55,0	20	None	None
	Lcedrata197	1	GCACGCTGTTGCCGCCGC	68,5	77,8	18	36,4	None

Art	Oligo Name	ITS	Primer 5'-->3'	Tm [°C]	GC [%]	Length [bp]	Hairpin	Dimer
	Lcedrata459	2	GACTGTTTGACGGGCGAAAA	59,3	50,0	20	None	None
<i>Leplaea thompsonii</i>	Lthompsoniii35	1	GTGATTACGCATGAGGGGGT	59,8	55,0	20	37,7	None
	Lthompsoniii64	1	GTCGCTCGAGCTCGCTGAGT	64,6	65,0	20	39,3	32,9
	Lthompsoniii457	2	GATTGTTGGCGGGCAGAAAA	61,5	55,0	20	None	3,3
	Skoetjape55	1	GTAGCTCGGGTCCCTCGGGC	66,6	75,0	20	52,5	6,3
	Skoetjape576	2	GTTGAAACAAGCCTCTCGAG	56,8	50,0	20	None	5,9
<i>Cedrela</i> spp.	Cedrela29	1	GAACCGGTGAACGCACG	59,1	64,7	17	46,1	8,5
	Cangustifolia544	2	GCGAACACGGAGGCGCGAG	66,6	73,7	19	40,1	12,1
<i>Cedrela angustifolia</i>	Cangustifolia557	2	GTTGCGGCTCGCGGACC	66,7	77,8	18	65,5	30,7
	Ced fissilis for1	1	CACGGCGGGGAAAGGC	64,6	76,5	17	None	35,2
<i>Cedrela odorata</i>	Ced odorata for1	1	GCACACGCGATGGCTAAGC	62,4	63,2	19	36,9	15,9
<i>Toona</i> spp.	Toona70	1	CGAGTGCCTGGCGCCA	62,6	75,0	16	40,2	30,6
<i>Toona ciliata</i>	Tciliata34	1	CAGTGAATGCACACGCGGG	62,3	63,2	19	47,6	6,9
<i>Guibourtia demeusei</i>	Gdemeusei86	1	CATATATTATGCGCGCAC	50,7	44,4	18	None	None
	Gdemeusei169	1	GAGCGGCGACAAACCAACG	63,0	60,0	20	None	13,0
	Gdemeusei635	2	GCACGAACATTGCTGCGCTC	63,4	60,0	20	37,0	9,7
<i>Guibourtia pellegriniana</i>	Gpellegriniana221	1	GGAATTCGTAACCGCAAA	53,4	44,4	18	None	None
	Gpellegriniana482	2	GTCACACAACGACGCCCCCGA	65,4	65,0	20	None	None
	Gpellegriniana624	2	GATCGAACGCTCGGGCCCGAG	65,6	70,0	20	45,5	24,9
	Gtessmannii225	1	CGTACGAACGATCGGAAGA	57,1	52,6	19	52,8	21,0
	Gtessmannii579	2	GTCGAAACAAGAGCCCCGCGG	64,3	65,0	20	None	21,0
<i>Guibourtia arnoldiana</i>	Garnoldiana79	1	GTTTCGAAGAACCCACCGG	58,8	57,9	19	45,9	None
	Garnoldiana219	1	CAAATCTGACTAGCGGCGCC	61,8	60,0	20	None	30,3
	Garnoldiana629	2	GAGCAGTAAACAACACTCGG	53,1	50,0	18	35,8	None
	Gehie44	1	TGTTCTGAAATACCCACCGG	57,5	50,0	20	None	None
<i>Guibourtia leonensis</i>	Gleონensis101	1	GACCTGAGACGGAATGCC	57,5	61,1	18	None	None
<i>Copaifera salikounda</i>	Csalikounda41	1	CACGTTCCGTCGCCGCTCGAC	65,7	70	20	38,3	None

Art	Oligo Name	ITS	Primer 5'-->3'	Tm [°C]	GC [%]	Length [bp]	Hairpin	Dimer
	Csalikounda93	1	CGGATTGCCATCGGGAC	60,6	66,7	18	45,4	6,1
	Csalikounda559	2	GAGCATTGCCTCGGGAT	60,6	61,1	18	None	6,1
<i>Hymenaea courbaril</i>	Hym courb for1	1	GCCAAAGGAACAGATGCGAT	58,2	52,6	19	None	None
	Hym courb for2	1	GGATTCGTAGTAGCTACG	58,0	50,0	22	53,4	29,8
	Hym courb rev1	2	ATGGCCGAAACAAGAGCTCG	61,0	55,0	20	None	8,4
	Hcourbaril294	1	GTCGGATTCGTAGTAGTA	49,8	44,4	18	37,7	None
<i>Pterocarpus erinaceus</i>	Perinaceus615	2	GACAGGTGGCGTTGAGC	61,1	66,7	18	None	None
<i>Pterocarpus santalinus</i>	Psantalinus52	1	CTGTGCGTGGGGCCTCG	66,6	77,8	18	42,8	5,9
	Psantalinus487	2	GAATCGTTGCCCAATCCCC	61,4	60,0	20	None	None
	Psantalinus682	2	GTGAGCGGCACCGATCGC	64,2	72,2	18	54,6	22,9
<i>Pterocarpus indicus/P. macro.</i>	Pindimacro32	1	CGAGCGTGGCGCCTCGT	68	77,8	18	41,7	14
<i>Pterocarpus indicus</i>	Pindicus487	2	AAATCGTTGCCCAATCCCC	61	55,0	20	None	None
	Pindicus597	2	CAACAACGGCATCGATCGCC	62,6	60,0	20	46,6	21,8
<i>Pterocarpus macrocarpus</i>	Pmacrocarpus71	2	CGACTGCCCGGTGCGG	68,4	83,3	18	39,4	10,4
<i>Pterocarpus soyauxii</i>	Psoyauxii501	2	ATCAATCCCGCGCCTAATA	59	50	20	None	26,7
<i>Gonystylus</i> spp.	Ramin for1	1	GACAGAAGTTCTCCCCACAC	60,9	57,1	21	34,7	27,5
	Ramin rev1	2	GACGTTGCAACGAATGCAC	58,6	52,6	19	61,2	41,2
<i>Gonystylus bancanus</i>	Gonystylus48	1	GATCGAGTGGTTGGTTGGC	61,3	60	20	None	None
	Gonystylus137	1	GAAATAAAATTTGACAGAAC	46,4	25	20	None	None
	Gonystylus422	2	GTTAGTGTGGGCTGAGAAT	58,3	50	20	None	None
<i>Alstonia</i> spp.	Alstonia481	2	GTTCAGGAGGACGTACGAC	60,4	60	20	None	18,9
<i>Alstonia boonei</i>	Aboonei408	2	GTCGAGGATTGAGCGGGGAGG	62,4	65	20	None	None
<i>Antiaris toxicaria</i>	Atoxicaria149	1	GAAAAACAACGACGGGCA	59,3	50	20	None	None
	Atoxicaria553	2	GTTGGACTTGCATCGAGACT	57,9	50	20	None	None
<i>Brosimum alicastrum</i>	1Balicastrum483	2	GCACITTTGTCTCGCGGTTGG	62,4	60	20	None	6,1
	1Balicastrum502	2	GTCCAAAATTGAGTCTCTCGGC	59,5	52,4	21	None	None
<i>Donella pruniformis</i>	Dpruniformis1	1	ACGTAACCTGCCAAGCAGAT	59,7	50	20	57,5	17,9

Art	Oligo Name	ITS	Primer 5'→3'	Tm [°C]	GC [%]	Length [bp]	Hairpin	Dimer
Dpruniformis33	1	1	TAGTACGTTAGCAGCCACTG	57,1	50	20	34,1	None
	2	2	ATGAGTCCCTGGCAGCAAC	62,2	60	20	37,9	None
<i>Jacaranda copaia</i>	1	1	ACGTAATCATTCCACATCGG	55,6	45	20	None	None
	2	2	CGATGCTCGCGCACCAGT	65,2	65	20	43,3	29,9
	2	2	CACGATCGACCCCAACGGCGC	66,7	70	20	36	24,3
<i>Neolamarckia cadamba</i>	1	1	GACTGCGAACCTGTGCAAT	58,5	50	20	None	None
<i>Pterygota</i> spp.	1	1	CCTCGAAAAGAAAAAGGAGC	54,9	45	20	41,3	None
	2	2	GAAGACGAGGGAAGCCGAG	59,9	63,2	19	None	None
<i>Pterygota bequaertii</i>	1	1	GAAAGCAAAGAGACACGTC	57,4	50	20	None	None
<i>Pterygota macrocarpa</i>	1	1	CGAGAACGCGTTTCCACAC	60,4	55	20	None	29,8
<i>Terminalia</i> spp.	1	1	GAAGCGCCAAGGTACTCC	57,8	61,1	18	38,5	2,3
	2	2	CTTCTGGGCTTAGATCGAC	57,5	55	20	None	None
<i>Terminalia ivorensis</i>	1	1	CACCCCAGCGAACGGATCT	64,4	65	20	None	None
	1	1	GACATCATAAAGTCTAAACG	49,4	35	20	None	None
<i>Terminalia superba</i>	1	1	GTTCAACGTCATAATAAAGT	49,1	30	20	None	None
<i>Guaiacum</i> spp.	1	1	AGCGAGAGCGAGCCCCCTT	63,5	66,7	18	66,9	None
	2	2	ACTCGTGTGGGCCAACCC	60,8	57,9	19	30,5	6,7
<i>Guaiacum coulteri</i>	1	1	ATCGGCAGAACGACCCCGG	65,5	68,4	19	46,6	None
	1	1	CCCTTCGTTAGGATTCCT	53,8	47,4	19	37,5	10,7
<i>Guaiacum officinale</i>	1	1	AATCCAAACGAAAGAGCCGC	59,5	50,0	20	None	None
	2	2	CTCTCCCGCAAGGTGCTCT	63,7	65,0	20	55,6	3,3
	1	1	CGAAAACGACTCTCGGCAAC	59,8	55,0	20	45,6	None
<i>Gofficinale</i> 171	1	1	TCCTTCGTTGGATTCCT	50,9	38,9	18	None	4
	1	1	CTCTTCGTTGGATTCCT	52,5	42,1	19	None	4,0
<i>Guaiacum sanctum</i>	1	1	AGGAATCCGAACGGAAGGGC	62,3	60,0	20,0	48,6	19,5
	1	1	CCCTTCGTTGGATTCCT	RC	RC	RC	RC	RC
	1	1	ACAGGCAGAACGACCCCGC	65,4	68,4	19,0	47,9	None

Art	Oligo Name	ITS	Primer 5'-->3'	Tm [°C]	GC [%]	Length [bp]	Hairpin	Dimer
<i>Plectrocarpa arborea</i>	Bulnesia for1	1	CCAAGGAATCCCAATCGGA	56,8	52,6	19	47,8	None
	Bulnesia rev1	2	CGCTCCGCCCTCTCTTA	60,8	63,2	19	67,1	None
	Parborea34	1	GAGTTGTTTAAACCGGG	53,2	50,0	18	None	15,6
<i>Chlorocardium</i> spp.	Chlorocardium11	1	GCGAACCCAGTCCCACGAAGC	64,0	65,0	20	None	None
<i>Chlorocardium rodiei</i>	Crodiei207	1	GCATGTGAATGTCGCGCAGA	62,0	55,0	20	None	8,8
<i>Handroanthus</i> spp.	lpe for1	1	ATGCGCCAAGGAAAACTCAA	58,7	45,0	20	None	4,2
	lpe rev1	2	ACTGGTCGTGACGTGCATCG	63,1	60,0	20	46,0	7,1
	Handroanthus147	1	CAAGGAAAACTCAACGAAGC	55,5	45,0	20	None	None
	Handroanthus211	1	GCGTCTCTTGAATGTCATAA	53,5	40,0	20	None	None
	Handroanthus438	2	GAAAAATGGCCTCCCGTGCGC	65,0	65,0	20	None	3,3

Anhang 5 Optimierungen des Macroarray-Protokolls

Vorgang	Zeit [min]	Volumen	Ort der Reaktion	[rpm]	Temp.	Lösung und Material
Spotten der Membran	30	0,2 µl	Schale statisch		RT	Membran + Multi Blotter
erstes Blocken	15	55 ml	Schale auf Schüttler	9	15	Blocking Puffer I
Waschen	15	55 ml	Schale auf Schüttler	9	15	2xSSC
Prähybridisierung	60	40 ml	Falcontube im Hyb.ofen	6	9	Prähybridisierungspuffer
Probendenaturierung	10	3,4 µl + 3,4 ml	Eppi im 'Thermoschüttler		95°C	DIG-labelt PCR-Produkt + HP
Hybridisierung	120	36 ml + 3,4 ml	Falcontube im Hyb.ofen	6	9	HP + denaturierte Probe
Waschen 1	20	40 ml	Falcontube im Hyb.ofen	6	9	HPW I
Waschen 2	20	40 ml	Falcontube im Hyb.ofen	6	9	HWP I
Waschen	5	55 ml	Schale auf Schüttler	9	15	HWP II
zweites Blocken	15	55 ml	Schale auf Schüttler	9	15	BR 2x
Blocken mit Antikörper	20	55 ml + 1,1 µl	Schale auf Schüttler	9	15	BR 2x + Anti-DIG-AP
Waschen 1	10	55 ml	Schale auf Schüttler	9	15	HWP II
Waschen 2	10	55 ml	Schale auf Schüttler	9	15	HWP II
Waschen 3	10	55 ml	Schale auf Schüttler	9	15	HWP II
Detektion	10	55 ml	Schale auf Schüttler	9	15	DP
Inkubation mit CDP-Star	5	350 µl + 3,5 µl	Inkubationsofen		37°C	DP + CDP-Star in Eppi mit Alufolie
Röntgenfilmbelichtung	30		Dunkelkassette		RT	Röntgenfilm auf Membran
Entwicklung	1,5	109 ml + 391 ml	Fotoschalen		RT	Kodak Developer + dest. Wasser
Waschen	1	500 ml	Fotoschalen		RT	dest. Wasser
Fixierung	5	109 ml + 391 ml	Fotoschalen		RT	Kodak Fixer + dest. Wasser
Waschen/Spülen	10	500 ml	Fotoschalen		RT	dest. Wasser
Summe	412,5					

191,5 min

6,9 h

3,2 h

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift