

Schlussbericht

der Forschungsstelle(n)

1, Institut für Angewandte Botanik und Pharmakognosie

zu dem über die



im Rahmen des Programms zur
Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF)

vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie
aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

geförderten Vorhaben **15182 N**

Molekularbiologische Authentizitätsprüfung von Pflanzenextrakten

(Bewilligungszeitraum: 1.12.2008 - 31.1.2011)

der AiF-Forschungsvereinigung

Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V.

Institut für Angewandte Botanik
und Pharmakognosie
der Veterinärmedizinischen Universität
A-1210 Wien, Veterinärplatz 1

Wien, 24. 3. 2011

Ort, Datum

A.Prof. Dr. Johannes Novak

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)
an der/den Forschungsstelle(n)

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Technologie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Inhalt

1. Zusammenfassung.....	2
2. Einleitung.....	3
2.1. Forschungsinhalte und Problemstellung.....	3
2.2. Material und Methoden.....	3
2.2.1. Pflanzenmaterial.....	3
2.2.2. DNA Extraktion.....	3
2.2.3. Primer-Entwicklung, PCR und HRM.....	3
3. Ergebnisse.....	5
3.1. Identifizierungen ausgewählter Pflanzenarten.....	5
3.1.1. <i>Helleborus niger</i>	5
3.1.2. <i>Epilobium angustifolium</i> und <i>E. parviflorum</i>	7
3.1.3. <i>Populus tremula</i> und <i>P. tremuloides</i>	9
3.1.4. <i>Gelsemium sempervirens</i>	10
3.1.5. <i>Baptisia tinctoria</i>	11
3.2. Validierung einer HRM-Methode.....	12
3.3. Vergleich von DNA-Extraktionsmethoden in verschiedenen Drogen und deren Endprodukten.....	16
3.4. Quantifizierung von Vermischungen.....	19
3.5. DNA-Extraktion aus Urtinkturen.....	21
3.5.1. DNA-Extraktion mit „Magnetic Beads“.....	21
3.5.2. DNA-Extraktion mit Plant Maxi Kit.....	21
3.5.3. CTAB-Extraktion.....	21
3.5.3.1. DNA-Extraktion aus <i>Helleborus niger</i> Urtinktur.....	22
3.5.3.2. DNA-Extraktion aus <i>Populus tremuloides</i> Urtinktur.....	22
3.5.3.3. DNA-Extraktion aus <i>Gelsemium sempervirens</i> Urtinktur und D1.....	23
3.5.3.4. Vermehrung der DNA mit re-PCR.....	24
3.5.3.5. Zugabe von Fremd-DNA zur Urtinktur.....	24
4. Zielerreichung, Personaleinsatz und Angemessenheit der Arbeiten.....	26
4.1.1. Zielerreichung.....	26
4.1.2. Personaleinsatz, Notwendigkeit und Angemessenheit der Arbeiten.....	26
5. Literatur.....	27
6. Danksagung.....	27
7. Anhang.....	28
7.1. Anhang 1: Protokoll zur verkürzten CTAB-DNA Extraktion.....	28
7.2. Anhang 2: Liste der Primer, welche für die Artidentifizierungen bzw. für die Quantifizierung von Vermischungen verwendet werden können.....	29
7.3. Anhang 3: Liste der <i>Helleborus</i> Proben und Außengruppen, welche für die Analysen verwendet wurden.....	30
7.4. Anhang 4: Liste der gesammelten <i>Epilobium</i> Proben und Außengruppen.....	31
7.5. Anhang 5: Liste der verwendeten <i>Populus</i> Proben.....	33
7.6. Anhang 6: Liste der <i>Gelsemium</i> Proben und Außengruppen, welche für die Analysen verwendet wurden.....	34
7.7. Anhang 7: Liste der gesammelten <i>Baptisia</i> Proben.....	35

1. Zusammenfassung

Identifizierung ausgewählter Pflanzenarten

Das Forschungsziel der molekularbiologischen Bestimmung der botanischen Arten wurde weitgehend erreicht. Die 2009 erarbeiteten Ergebnisse zur Identifizierung von *Helleborus niger* und *H. foetidus* konnten 2010 publiziert werden. Die Identifikationen von *Populus tremuloides*, *P. tremula*, *Epilobium angustifolium* und *E. parviflorum* konnten 2010 vervollständig und abgeschlossen werden. Ein Assay für die Identifikation von *Gelsemium sempervirens* konnte 2010 ebenfalls erfolgreich erstellt werden. Eine zuverlässige Identifikation von *Baptisia tinctoria* konnte mit dem vorhandenen Probenmaterial nicht erreicht werden.

Validierung einer HRM-Methode

Bei der Validierung, die auf Wunsch des projektbegleitenden Ausschusses nachträglich eingebunden wurde, konnten einige wichtige Parameter für die PCR mit HRM untersucht werden. Als Beispiel für die Validierung wurde die Identifizierung von *Helleborus niger* ausgewählt.

Im Allgemeinen gab es bei der Verwendung von unterschiedlichen Chemikalien (Polymerasen, Puffer, Fluoreszenzfarbstoffen), Pipetten und Personen keinen signifikanten Einfluss. Selbst die Verwendung von älteren, billigeren Pipetten (Biohit) im Labor oder der Einsatz einer noch nicht sehr gut eingearbeiteten Hilfskraft ergaben nur geringfügig schlechtere Ergebnisse, ohne aber zu Falschaussagen zu kommen. Auch konnte kein Tageseinfluss auf die Ergebnisse festgestellt werden.

Den größten Einfluss auf das Ergebnis der Identifizierung hatten die Anzahl an PCR-Zyklen, das Alter der Polymerase und der verwendete Gerätetyp des Thermocycler. Es wurden allerdings nicht Geräte der neuesten Generation getestet. Hier dürfte die Übertragbarkeit besser sein als bei den von uns getesteten Geräten. Dies muss aber natürlich noch überprüft werden.

Vergleich unterschiedlicher DNA-Extraktionsmethoden in verschiedenen Drogen und deren Endprodukten

Bei Drogen unterschiedlicher Pflanzenteile (Cortex, Flos, Folium, Fructus und Radix) wurde der Einfluss verschiedener DNA-Extraktionsmethoden auf die Identifizierung getestet. Generell erzielten Säulchen-basierende Fertigungskits (Quiagen und Machery & Nagel) deutlich weniger DNA-Ausbeute als andere Methoden. Allerdings war die Menge und Qualität vollkommen ausreichend. Nur das verwendete Schnellverfahren zur DNA-Extraktion (Promega Wizard) schnitt etwas schlechter als die anderen Verfahren ab.

Quantifizierung von Vermischungen

Das Ziel der quantitativen Bestimmung der botanischen Arten in Vermischungen wurde teilweise erreicht. Es wurde außerdem eine neue, innovative Methode entwickelt und publiziert. Im projektbegleitenden Ausschuss wurde beschlossen, der komplexen Problemstellung des Rückschlusses von quantitativer PCR/HRM auf die tatsächliche Menge an Pflanzenmaterial nicht weiter nachzugehen.

DNA-basierender Nachweis aus Urtinkturen

Für den DNA-Nachweis aus Urtinkturen wurden die Beispiele *Gelsemium sempervirens*, *Populus tremuloides* und *Helleborus niger* gewählt. Aus *Gelsemium* und *Helleborus* Urtinkturen konnte ein positiver Nachweis geführt werden, wobei die Mindestmenge an Urtinktur bei etwa 50 ml lag. Bei der *Populus* Urtinktur gab es Schwierigkeiten des Nachweises, deren Grund nicht ermittelbar war. Dotierte man die Urtinktur mit geringer Menge an DNA, einerseits als Pflanzenpulver, andererseits mit extrahierter DNA, so konnte man die zugesetzte DNA identifizieren.

2. Einleitung

2.1. Forschungsinhalte und Problemstellung

Im gegenständlichen Projekt sollten Arzneipflanzen und deren Extrakte mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden bezüglich ihrer Identität und Artzugehörigkeit authentifiziert werden. Die zu untersuchenden Arzneipflanzen waren

- *Helleborus niger* (Schneerose, Christrose, Ranunculaceae)
- *Epilobium angustifolium* (Schmalblättriges Weidenröschen, Onagraceae)
E. parviflorum (Kleinblütiges Weidenröschen)
- *Populus tremula* (Zitter-Pappel, Salicaceae)
P. tremuloides (Amerikanische Zitter-Pappel)
- *Gelsemium sempervirens* (Carolina-Jasmin, Gelsemiaceae)
- *Baptisia tinctoria* (Wilder Indigo, Fabaceae).

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Pflanzenmaterial

Für eine exakte Zuordnung und Authentifizierung von Pflanzenarten ist es notwendig, jeweils eine möglichst umfassende und repräsentative Stichprobenanzahl der zu untersuchenden Arten, anderen Arten dieser Gattungen und eventuell auch anderer nahe verwandter Gattungen zu testen. Es wurden ca. 230 Proben von *Epilobium*, 110 von *Helleborus* und 75 von *Populus* vor allem in Österreich gesammelt (Pflanzensammelreisen, Herbarien und Botanische Gärten). Ca. 100 Proben von *Gelsemium* und 23 von *Baptisia* wurden im Zuge einer Sammelreise in den USA entweder wild gesammelt oder aus Herbarien entnommen.

Die teilnehmenden Firmen stellten Urtinkturen, teilweise deren Ausgangsmaterialien und Rückstellproben der verschiedenen Arten zur Verfügung.

2.2.2. DNA Extraktion

Aus diesem Material wurde die DNA mittels einer modifizierten, von Doyle (1990) beschriebenen CTAB Methode extrahiert, welche sich v.a. durch kürzere Warte- und Zentrifugierzeiten auszeichnet. Das verwendete Extraktionsprotokoll ist im Anhang angeführt (Anhang 1). Die Qualität der gewonnenen DNA wurde mit Agarosegelen überprüft.

2.2.3. Primer-Entwicklung, PCR und HRM

Für das Primer-Design wurden publizierte Sequenzen von GeneBank® verwendet, wenn nötig mit selbst entwickelten Sequenzen ergänzt, und mit dem Programm Mega4 (Tamura et al., 2007) verglichen. Innerhalb dieser Sequenzen wurde nach Mutationen gesucht, welche möglichst nur die Zielarten von den anderen Arten der jeweiligen Gattung unterscheiden sollen. Mit der Software Primer Express® 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A) wurden HRM-kompatible Primer mit einer optimalen Schmelztemperatur von 55-60°C entworfen.

Mit den entwickelten Primern (Primer-Sequenzen siehe Anhang 2) wurden mit der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) bestimmte Stücke der DNA vermehrt. Diese Stücke wurden unmittelbar nach der PCR mit der Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (high-resolution melting analysis, HRM) untersucht. Für die HRM wird

ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zum PCR-Ansatz beigemischt, welcher nur in doppelsträngige DNA eingelagert ein Fluoreszenzsignal gibt. Bei der HRM wird direkt nach der PCR das PCR-Produkt zuerst abgekühlt und anschließend mit z.B. 0,1 °C/s langsam, schrittweise wieder aufgeheizt. Durch das aufheizen trennen sich die Doppelstränge voneinander („schmelzen auf“), der Farbstoff wird frei und verliert dadurch die Fluoreszenz. Die Schmelzkurve stellt die Verringerung der Fluoreszenz in Abhängigkeit vom Temperaturanstieg dar und ist von der Basenabfolge der DNA abhängig.

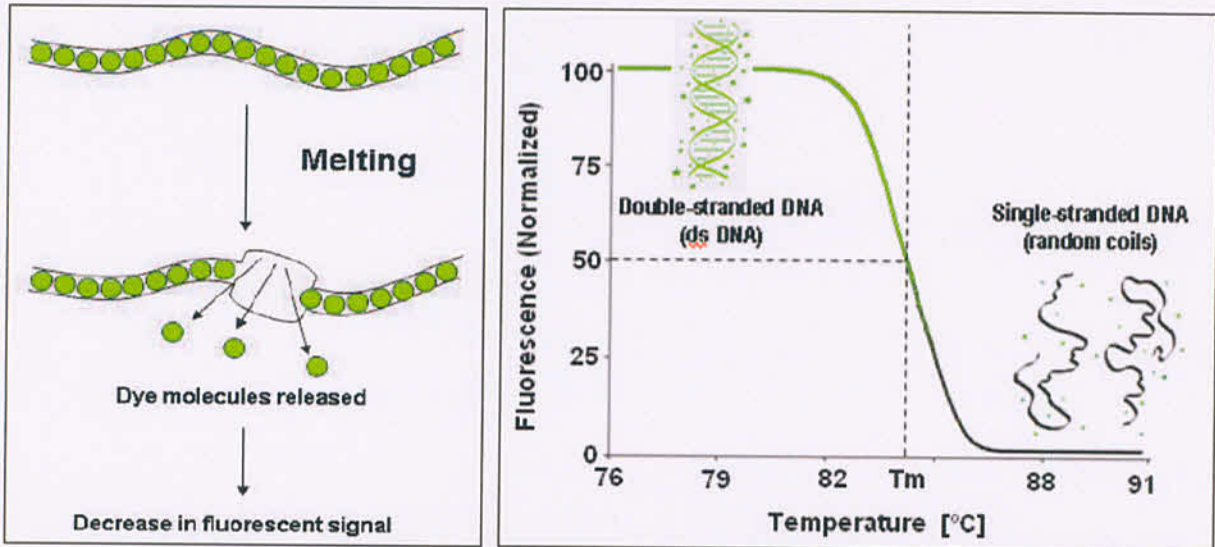


Abbildung 1: Prinzip der Hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (HRM). Links: Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff ist in doppelsträngige DNA gebunden und fluoresziert. Durch den Temperaturanstieg wird der Farbstoff freigesetzt und das Fluoreszenzsignal nimmt ab (Quelle: www.invitrogen.com). Rechts: Beispiel einer Schmelzkurve: Bei niedrigerer Temperatur liegt die DNA doppelsträngig vor und der Farbstoff zeigt ein Fluoreszenzsignal. Durch das Aufheizen der DNA trennen sich die Doppelstränge voneinander, der Farbstoff wird freigesetzt und die Fluoreszenz sinkt ab (Quelle: www.genequantification.de/hrm-dyes.html).

Die Aufgabe bei der Entwicklung von HRM-basierenden Methoden der Identifizierung von Arten war es, Primer zu entwickeln, bei denen sich die Schmelzkurve der Zielart möglichst deutlich von den Kurven der anderen Arten unterscheidet. Primerpaare, welche keine ausreichend gut unterscheidbaren, oder keine artspezifischen Kurventypen generierten, wurden ausgeschieden. Zur Unterscheidung der erhaltenen Kurventypen diente der T_m -Wert (Schmelztemperatur am Wendepunkt/an den Wendepunkten), Anzahl der Wendepunkte und Steigung der Kurve. Nachdem sich selbst durch geringe Konzentrationsveränderungen in der HRM die Schmelzkurven verschieben können, wurden in jedem HRM-Lauf Referenzproben für jeden erwarteten Kurventyp inkludiert und alle Proben doppelt bestimmt. Die Schmelzkurven wurden mit der Rotor-Gene™ 6000 Series Software ausgewertet.

Die PCR mit HRM wurde mit einem Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science, Doncaster, Australien) durchgeführt. Dieses Gerät zeichnet sich dadurch aus, dass die Proben auf einem ständig rotierenden Ring angeordnet sind, wodurch – im Vergleich zu PCR-Geräten mit festem Heizblock – Temperaturunterschiede abhängig von der Probenposition auszuschließen sind. Das Parallelverschieben der Schmelzkurven, welches bei Blockgeräten abhängig von diesen Temperaturunterschieden auftritt, wird dadurch minimiert.

Das PCR Profil begann mit einem Denaturierungsschritt von 12 min bei 95 °C, gefolgt von 40-45 Zyklen von 95 °C für 10 s, 55-60 °C (Primer-abhängig) für 20 s und 72 °C für 20 s. Die Schmelzkurvenanalyse wurde für die Primer-Tests mit einem Temperaturanstieg von 0,07 °C/s im Bereich von 67-91 °C durchgeführt, der Temperaturbereich wurde später zwecks Zeitersparnis – abhängig von den angewandten Primern und den erhaltenen Produkten – auf einen engeren Bereich eingegrenzt.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierungen ausgewählter Pflanzenarten

3.1.1. *Helleborus niger*

Für die Identifizierung von *Helleborus niger* (Schneerose, Christrose) wurden 92 Proben der Gattung *Helleborus* und sechs weitere Arten aus fünf Gattungen der Hahnenfußgewächse von verschiedenen Standorten in Österreich, der Republik Kosovo, Italien (Sizilien), Frankreich (Korsika), u.a. untersucht (Anhang 3).

Für die Gattung *Helleborus* konnten zwei Primerpaare entwickelt werden, mit welchen sowohl *H. niger* als auch *H. foetidus* eindeutig identifiziert werden können (Schmiderer et al., 2010). Das erste Primerpaar, welches einen Teil des Plastidenabschnittes trnL-trnF intergenic spacer amplifiziert, teilte den Probensatz in drei Kurventypen (Abbildung 2A). Gruppe I bestand aus *H. argutifolius*, *H. foetidus*, *H. lividus* und *H. x sternii*, Gruppe II aus der Zielart *H. niger* und einer Probe von *H. viridis* ssp. *occidentalis*, und Gruppe III setzte sich aus *H. bocconeii*, *H. caucasicus*, *H. cyclophyllus*, *H. dumetorum*, *H. multifidus*, *H. odorus*, *H. orientalis*, *H. purpurascens* und *H. viridis* ssp. *viridis* zusammen.

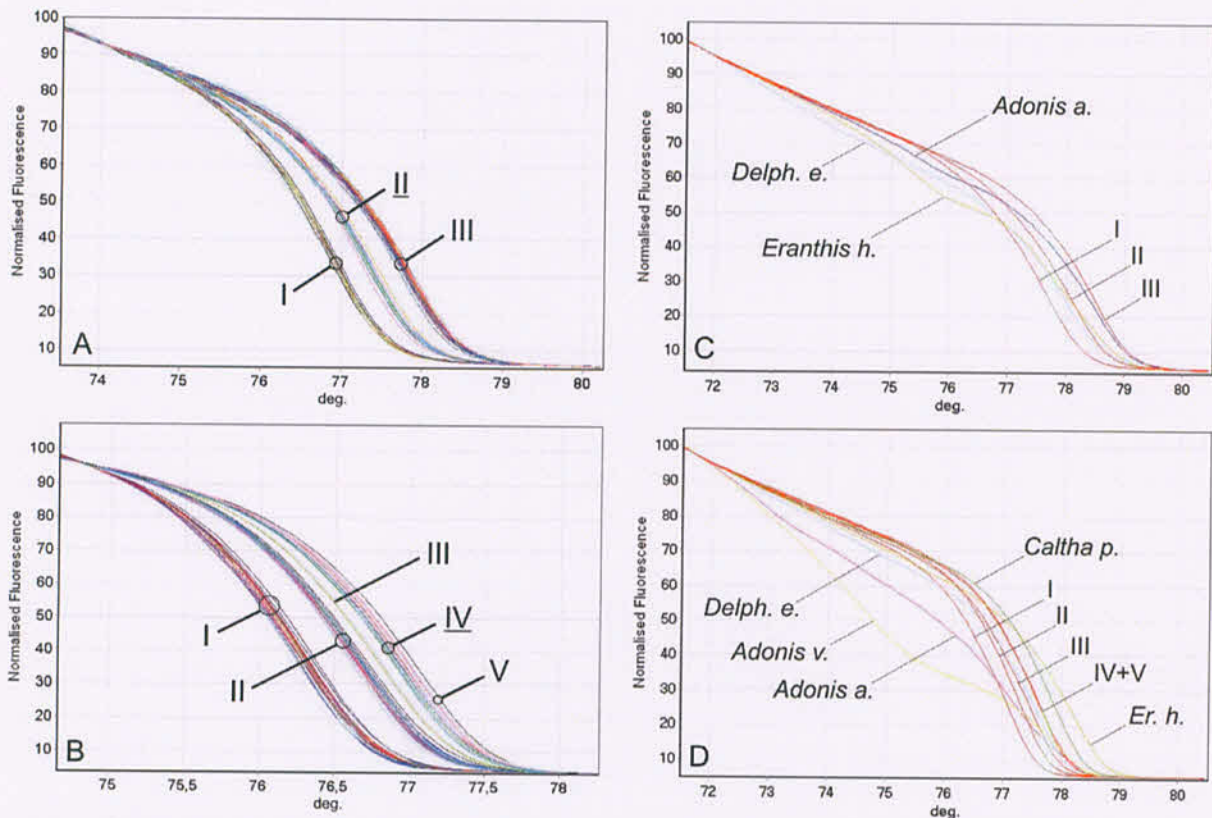


Abbildung 2 A: HRM basierend auf der trnL-trnF Region. Gruppe I besteht aus *H. argutifolius*, *H. foetidus*, *H. lividus* und *H. x sternii*, Gruppe II aus der Zielart *H. niger* und *H. viridis* ssp. *occidentalis* und Gruppe III setzte sich aus *H. bocconeii*, *H. caucasicus*, *H. cyclophyllus*, *H. dumetorum*, *H. multifidus*, *H. odorus*, *H. orientalis*, *H. purpurascens* und *H. viridis* ssp. *viridis* zusammen. B: HRM basierend auf der matK Region. Gruppe I besteht aus *H. cyclophyllus*, *H. dumetorum*, *H. multifidus*, *H. odorus* (p.p.), *H. purpurascens* und *H. viridis*. Gruppe II beinhaltet *H. bocconeii*, *H. caucasicus*, *H. foetidus*, *H. orientalis* und *H. odorus* (p.p.). Gruppe III besteht nur aus *H. lividus*, Gruppe IV nur aus der Zielart *H. niger* und Gruppe V nur aus *H. argutifolius*. C: HRM basierend auf der trnL-trnF Region. Die Außengruppen *Adonis amurensis*, *Delphinum elatum* und *Eranthis hyemalis* bilden PCR-Produkte mit den für *Helleborus* entworfenen Primern. Die Gruppen I-III sind wie in Bild A. D: HRM basierend auf der matK Region. Die Außengruppen *Adonis amurensis* und *A. vernalis*, *Delphinum elatum*, *Caltha palustris* und *Eranthis hyemalis* bilden PCR-Produkte mit den für *Helleborus* entworfenen Primern. Die Gruppen I-V sind wie in Bild B.

Das zweite Primerpaar welches auf dem Plastidengen matK basiert zeigte fünf unterschiedliche Gruppen (Abbildung 2B). Gruppe I bestand aus *H. cyclophyllus*, *H. dumetorum*, *H. multifidus*, einem Teil der Proben von *H. odorus*, *H. purpurascens* und beide Unterarten von *H. viridis*. Gruppe II beinhaltete *H. bocconeii*, *H. caucasicus*, *H. foetidus*, *H. orientalis* und den anderen Teil der *H. odorus* Proben. Gruppe III bestand nur aus Proben von *H. lividus*, Gruppe IV nur aus der Zielart *H. niger* und Gruppe V nur aus *H. argutifolius*.

Obwohl eine Identifizierung von *Helleborus niger* nur mit dem auf dem matK-basierendem Primerpaar möglich wäre, ist es empfehlenswert auch die Informationen vom trnL-trnF intergenic spacer in die Analysen zu inkludieren. *H. niger* (Gruppe IV) ist sehr nahe zu *H. argutifolius* (Gruppe V) in ihrem matK-Kurventyp, jedoch sehr weit entfernt in den trnL-trnF-Kurven. Auf der anderen Seite ist die Probe einer *H. viridis* Unterart ident mit *H. niger* bei trnL-trnF, aber deutlich unterscheidbar bei matK. Durch die Anwendung beider Chloroplastenmarker können ausserdem auch z.B. *H. foetidus* und *H. argutifolius* eindeutig identifiziert werden.

Um eine mögliche Amplifikation anderer Gattungen der Hahnenfußgewächse zu testen wurden sechs weitere Arten aus fünf Gattungen (Anhang 3) mit beiden Primerpaaren getestet. Beim trnL-trnF intergenic spacer (Abbildung 2C) zeigten eine von beiden Adonisröschen Arten (*Adonis amurensis*), Rittersporn (*Delphinium elatum*) und Winterling (*Eranthis hyemalis*) ein PCR-Produkt, bei matK (Abbildung 2D) Rittersporn, Winterling, Sumpfdotterblume (*Caltha palustris*) und beide Adonisröschen (*A. amurensis* und *A. vernalis*). Die Fluoreszenzmessung im Verlauf der PCR weist deutlich darauf hin, dass die Primer bei fast allen nicht-*Helleborus* Proben deutlich schlechter bis überhaupt nicht binden. Obwohl die Primer demnach nicht ganz gattungsspezifisch für *Helleborus* sind, sind die Außengruppen anhand ihrer deutlich unterschiedlichen Schmelzkurven von allen *Helleborus* Arten unterscheidbar.

Tabelle 1: Gruppenbildung der HRM-Kurven der untersuchten *Helleborus*-Proben basierend auf den Primern Hel_trnL-trnF 1 und Hel_matK 3.

<i>Helleborus</i> Arten	Primer	
	trnL-trnF 1	matK 3
<i>H. foetidus</i>	1	2
<i>H. lividus</i> , <i>H. × sternii</i>	1	3
<i>H. argutifolius</i>	1	5
<i>H. viridis</i> ssp. <i>occidentalis</i>	2	1
<i>H. niger</i>	2	4
<i>H. cyclophyllus</i> , <i>H. dumetorum</i> , <i>H. multifidus</i> , <i>H. purpurascens</i> , <i>H. viridis</i> ssp. <i>viridis</i>	3	1
<i>H. odorus</i>	3	1 od. 2
<i>H. bocconeii</i> , <i>H. caucasicus</i> , <i>H. orientalis</i>	3	2

3.1.2. *Epilobium angustifolium* und *E. parviflorum*

Innerhalb der Weidenröschen kann *Epilobium angustifolium* von den anderen Arten der Gattung abgetrennt werden. Ein Primerpaar, basierend auf der Kernregion ITS, bindet nur bei einem Teil der Untergattung/Gruppe *Chamerion* (früher als eigene Gattung angesehen), wobei das morphologisch einfach unterscheidbare *E. dodonei* eine sehr ähnliche Schmelzkurve wie *E. angustifolium* bildet, und das (sub-) arktische Zwerg-Weidenröschen *E. latifolium* eine unterschiedliche Schmelzkurve aufweist. Bei allen anderen Arten bilden sich ausschließlich Primerdimere (bei *E. dodonei* teilweise), welche einen deutlich niedrigeren Schmelzpunkt wie *E. angustifolium* aufweisen.

Mit einem zweiten Primerpaar der Plastidenregion trnL-trnF kann ebenfalls die Gruppe *Chamerion* von allen anderen mitteleuropäischen *Epilobium*-Arten unterschieden werden. Innerhalb der Gruppe *Chamerion* ist Aufgrund der extremen Seltenheit bzw. des deutlich unterschiedlichen Aussehens und Vorkommens der in Mitteleuropa beheimateten Arten *E. rosmarinifolium* und *E. dodonei* die Verwechslungsgefahr mit *E. angustifolium* praktisch auszuschließen.

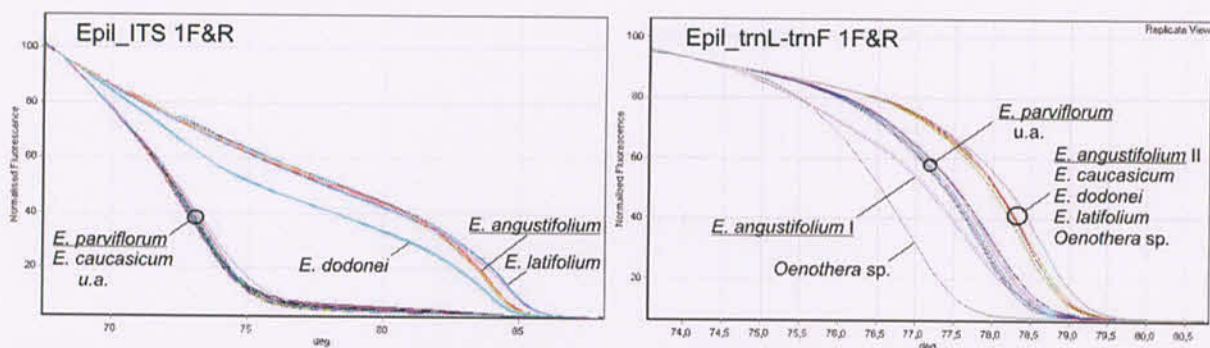


Abbildung 3: Links: HRM basierend auf dem Primerpaar Epil ITS 1F&R. Nur die Proben von *E. angustifolium* und *E. latifolium* bilden Amplifikationsprodukte. Bei allen anderen Arten bilden sich nur Primerdimere. Rechts: HRM basierend auf dem Primerpaar Epil trnL-trnF 1F&R. Die Proben von *E. angustifolium* und *E. latifolium* bilden zwei Kurventypen, alle anderen Arten einen dritten Kurventyp.

Eine Identifikation der zweiten Zielart *E. parviflorum* ist mit dem Primerpaar matK5 möglich. Die Proben von *E. parviflorum* bilden eine eigene Gruppe, welche sich deutlich von den Schmelzkurven aller anderen Arten unterscheidet.

Mit diesem Primerpaar können auch *E. dodonei* und *E. caucasicum* von *E. angustifolium* und allen anderen Arten unterschieden werden. Die beiden

Arten bilden einen dritten Schmelzkurventyp, welcher zwischen *E. angustifolium* und *E. parviflorum* liegt.

Bei der kombinierten Anwendung von drei weiteren matK-Primerpaaren (matK1, matK2 und matK3) konnten die untersuchten Arten entweder identifiziert (*E. caucasicum*, *E. dodonei*, *E. latifolium*, *E. roseum*, *E. adenocaulon*, *E. porphyrium**, *E. prionophyllum*) oder zumindest in Kleingruppen unterteilt werden: *E. alpestre* + *E. alsinifolium* + *E. anagallidifolium* / *E. tetragonum* + *E. obscurum* + *E. nutans* / *E. hirsutum* + *E. macropus** + *E. melanocaulon** / *E. montanum* + *E. palustre*. Die mit * gekennzeichneten Arten stammen aus Neuseeland und sind morphologisch völlig unterschiedlich zu den mitteleuropäischen Arten. Zwei Proben von den relativ nahe verwandten Nachtkerzen (*Oenothera*, Onagraceae) konnten ebenfalls von den Zielarten unterschieden werden.

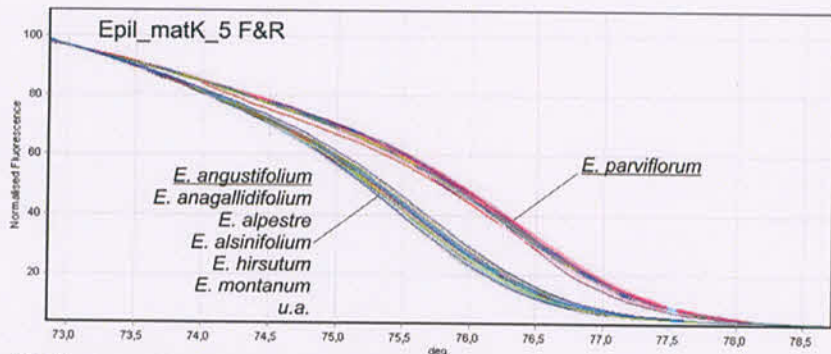


Abbildung 4: HRM basierend auf dem Primerpaar Epil_matK_5 F&R. Die Proben von *E. parviflorum* bilden einen eigenen Kurventyp, welcher sich deutlich von den Proben aller anderen Arten unterscheidet.

Tabelle 2: Gruppenbildung der HRM-Kurven der untersuchten *Epilobium*-Proben mit Primern basierend auf dem Kernlokus ITS, und den Plastidenregionen trnL-trnF und matK.

<i>Epilobium</i> Proben	Epil ITS1	Epil_trnL-F_1	Epil_matK 5	Epil_matK 1	Epil_matK 2	Epil_matK 3
<i>E. angustifolium</i>	1	2 & 4	1	3	4	2
<i>E. dodonei</i>	1	4	2	6	3	2
<i>E. latifolium</i> (E39)	2	4	1	3	4	3
<i>E. latifolium</i> (E40)	2	4	1	1		
<i>E. caucasicum</i>	-	4	2	6	3	2
<i>E. parviflorum</i>	-	3	3	3	3	1
<i>E. alpestre</i> , <i>E. alsinifolium</i> , <i>E. anagallidifolium</i>	-	3	1	2	3	1
<i>E. prionophyllum</i>	-	3	1	3	2	2
<i>E. tetragonum</i> , <i>E. obscurum</i> , <i>E. nutans</i>	-	3	1	3	3	1
<i>E. hirsutum</i> , <i>E. macropus</i> , <i>E.</i> <i>melanocaulon</i>	-	3	1	3	3	2
<i>E. roseum</i>	-	3	1	4	1	2
<i>E. montanum</i> , <i>E. palustre</i>	-	3	1	4	2	1
<i>E. porphyrium</i>	-	3	1	4	3	2
<i>E. adenocaulon</i> (= <i>E. ciliatum</i>)	-	3	1	5	2	2
<i>Oenothera</i> sp.	-	1	1	3	4	2
<i>Oenothera</i> sp.	-	4	1	6	5	4

3.1.3. *Populus tremula* und *P. tremuloides*

Mit einem Primerpaar, das auf dem Chloroplastengen matK entwickelt wurde (Pop_matK 1F&R), können die untersuchten Proben der Amerikanischen Zitter-Pappel *P. tremuloides* von den Proben aller anderen Arten unterschieden werden.

Die Europäische Zitter-Pappel *Populus tremula* kann durch die Anwendung von zwei Primerpaaren, welche auf den Chloroplastenmarkern matK (Pop_matK 2F&R) bzw. trnL-trnF binden (Pop_trnL-trnF 1F&R), von *P. tremuloides*, *P. alba*, *P. nigra* und weiteren 16 Arten abgetrennt werden (Abbildung 6). Nur vier der untersuchte Proben, *P. lasiocarpa*, *P. purdomii*, *P. simonii* und *P. yunnanensis*, zeigen in allen Primerkombinationen die gleichen Schmelzkurventypen wie *P. tremula*.

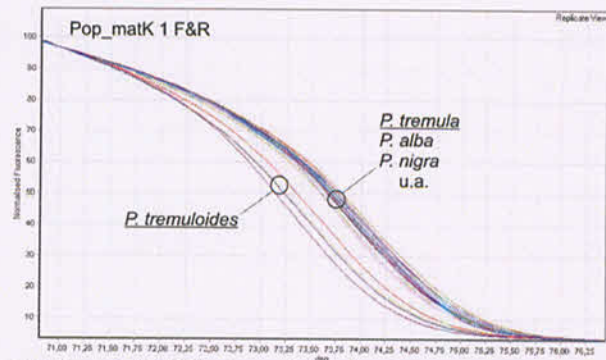


Abbildung 5: HRM basierend auf dem Primerpaar Pop_matK 1F&R. Die Schmelzkurven von *P. tremuloides* bilden einen eigenen Kurventyp und unterscheiden sich von allen anderen untersuchten Proben, welche eine zweite Gruppe bilden.

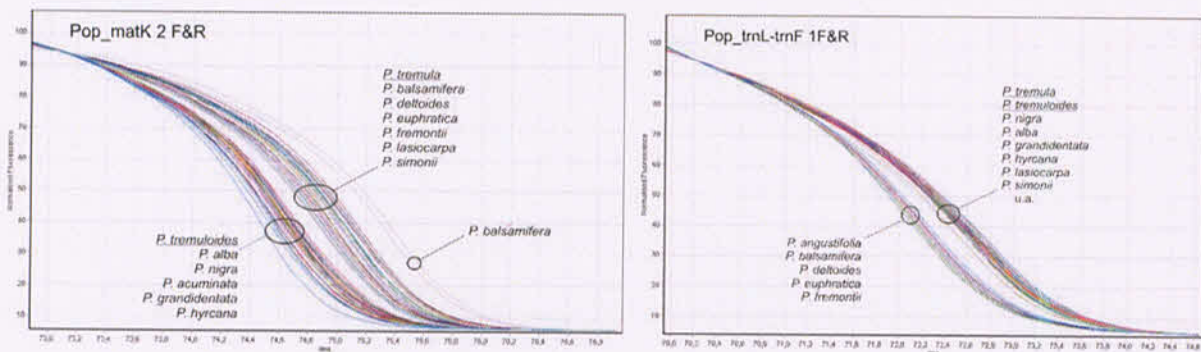


Abbildung 6: Links: HRM basierend auf dem Primerpaar Pop_matK 2F&R. Rechts: HRM basierend auf dem Primerpaar Pop_trnL-trnF 1F&R. Durch die kombinierte Anwendung beider Primerpaare kann *Populus tremula* bis auf wenige Ausnahmen (*P. lasiocarpa*, *P. purdomii*, *P. simonii* und *P. yunnanensis*) von allen anderen untersuchten Arten unterschieden werden.

Tabelle 3: Gruppenbildung der HRM-kurven der untersuchten *Populus*-Proben mit den Primern Pop_matK 1, matK 2 und trnL-trnF 1.

Pappel-Art	Primerpaar		
	Pop_matK 1	Pop_matK 2	Pop_trnL-trnF 1
<i>P. tremuloides</i>	1	1	2
<i>P. tremula</i>	2	2	2
<i>P. alba</i>	2	1	2
<i>P. nigra</i>	2	1	2
<i>P. acuminata</i>	2	1-2	2
<i>P. adenopoda</i>	2	1	2
<i>P. angustifolia</i>	2	2	1
<i>P. balsamifera</i>	2	2	1
<i>P. deltoides</i>	2	2	1
<i>P. euphratica</i>	2	2	1
<i>P. fremontii</i>	2	2	1
<i>P. grandidentata</i>	2	1	2
<i>P. hircana</i>	2	1	2
<i>P. ilicifolia</i>	2	2	1
<i>P. lasiocarpa</i>	2	2	2
<i>P. octatubdos</i>	2	2	1
<i>P. purdomii</i>	2	2	2
<i>P. simonii</i>	2	2	2
<i>P. szechuanica</i>	2	2	1
<i>P. wilsonii</i>	2	2	1
<i>P. yunnanensis</i>	2	2	2

3.1.4. *Gelsemium sempervirens*

Die Gattung *Gelsemium* (Gelsemiaceae/Loganiaceae) umfasst nur drei Arten: *G. sempervirens* und *G. rankinii* sind morphologisch sehr ähnlich und kommen beide im Südosten der USA vor (Wyatt et al., 1993), *G. elegans* ist dagegen in China beheimatet. Für die Identifizierung von *Gelsemium sempervirens* wurden 71 Proben der Gattung *Gelsemium* gesammelt, zehn Proben von cf. *Lonicera* sp. und eine von cf. *Smilax* sp., welche im vegetativen Zustand *Gelsemium* ähnlich sehen und auch gemeinsam vorkommen. Die Proben wurden bei einer Sammelreise im April 2010 in den Südöstlichen USA wild gesammelt oder aus den Herbarien der Universität Wien, der Universität von Mississippi und dem Missouri Botanical Garden's Herbarium entnommen (Anhang 6).

Basierend auf publizierten Sequenzen wurden HRM-Primer entworfen. Mit einem Primerpaar welches einen Teil des External Transcribed Spacers (ETS, ein Teil der ribosomalen Kern-DNA) amplifiziert, konnten alle drei Arten gut unterschieden werden (Abbildung 7A). Mit einem zweiten Primerpaar, welches auf dem Chloroplastengen *nadhF* basiert (Abbildung 7B), zeigten *G. sempervirens* und *G. rankinii* die gleiche Schmelzkurvenform, unterscheiden sind aber von *G. elegans*.

Die Proben der Außengruppen wurden mit den beiden Primerpaaren im Durchschnitt deutlich schlechter amplifiziert und zeigen in der Regel ganz andere Kurven wie die *Gelsemium* Proben (Abbildung 7C). Vereinzelt Proben zeigten bei einem der Primerpaare ähnliche Kurven wie *Gelsemium*, waren aber durch die kombinierte Anwendung beider Primerpaare deutlich von *Gelsemium* unterscheidbar.

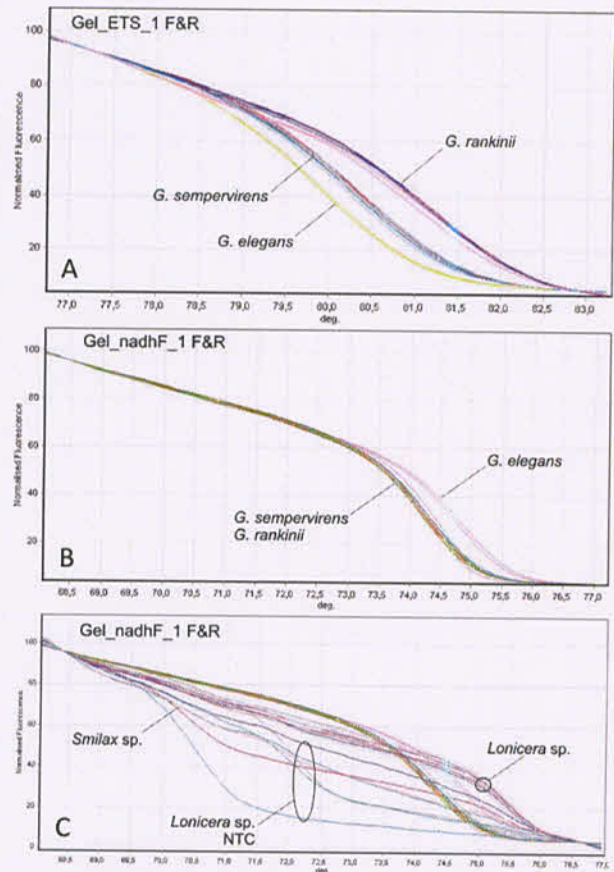


Abbildung 7: Schmelzkurvenanalyse von *Gelsemium* Proben und *Lonicera* sp. und *Smilax* sp. als Außengruppen. A: HRM basierend auf der nuklearen ETS Region. Die Referenzproben der drei Arten bilden jeweils eigene Gruppen. B: HRM basierend auf dem Chloroplastengen *nadhF*. Proben von *G. sempervirens* und *G. rankinii* bilden eine gemeinsame Gruppe, *G. elegans* eine zweite. C: Mit dem gleichen Primerpaar wie in B werden *Lonicera* und *Smilax* (teilweise) amplifiziert, bilden aber deutlich unterschiedliche Schmelzkurven wie die *Gelsemium* Proben.

3.1.5. *Baptisia tinctoria*

Die Gattung *Baptisia* ist im östlichen Nordamerika beheimatet, manche Arten werden auch in Europa als Zierpflanze kultiviert. Das „United States Department of Agriculture“ (<http://plants.usda.gov>) beschreibt 22 Arten (davon 7 Hybridarten), die „World Database of Legumes“ (www.ildis.org) zählt 35 Arten mit etlichen Synonymen auf.

Während der USA-Sammelreise 2010 konnten 15 *Baptisia*-Proben aus Amerikanischen Herbarien entnommen werden, vier weitere Proben wurden im Botanischen Garten Kiel gesammelt. Von den Proben wurden so weit wie möglich ITS-Sequenzen angefertigt und mit den acht bei GeneBank® publiziert Sequenzen verglichen. Bei einigen Proben konnten aufgrund der schlechten Probenqualität keine verlässlichen Sequenzen erstellt werden.

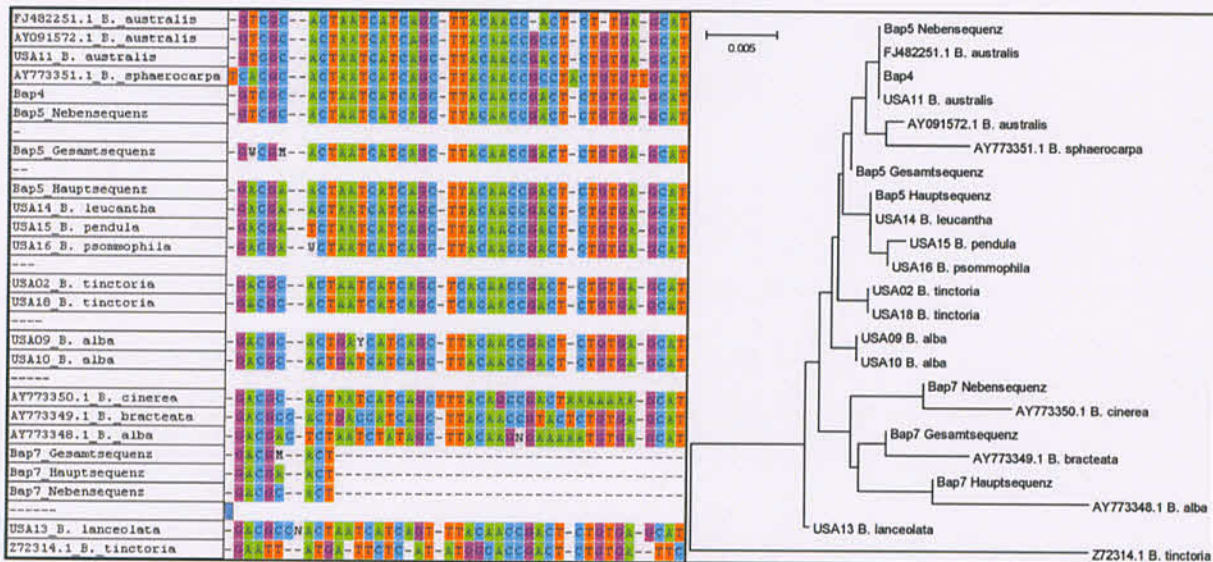


Abbildung 8: Links: Gekürztes ITS-Alignment aller *Baptisia*-Proben, es sind nur die variablen Stellen des Alignments dargestellt. Rechts: Neighbour Joining Baum, welcher auf dem ungekürzten ITS-Alignment basiert.

Die Sammlung der Referenzproben scheint für eine eindeutige Identifizierung nicht ausreichend verlässlich bzw. ausreichend umfangreich zu sein. Einerseits weisen die Sequenzen der verschiedenen Arten zum Teil sehr geringe Unterschiede zueinander auf. Andererseits sind die Sequenzen v.a. von *B. tinctoria* so unterschiedlich, dass die Vermutung nahe liegt, dass zumindest eine der Proben falsch bestimmt wurde. Bei den Referenzen von *B. australis* ist es fraglich, ob es sich bei den auftretenden Unterschieden um natürliche Variabilität innerhalb einer Art handelt, oder auch um falsch bestimmte Proben. Für eine zuverlässige Aussage müssten insgesamt mehr Proben analysiert werden, um erstens alle Arten der Gattung abzudecken, und zweitens die Variabilität innerhalb einer Art abzuklären.

Bei den Proben aus dem Botanischen Garten des Pharmazeutischen Instituts der Universität Kiel handelt es sich offensichtlich um verschiedene Arten. Die Probe „Bap4“ zeigt die gleiche Sequenz wie eine Referenz von *B. australis* („USA11“). Die Proben „Bap5“ und „Bap7“ zeigten in ihren ITS-Sequenzen 1 bzw. 2 Doppelpeaks. Diese Sequenzen wurden zuerst als „Gesamtsequenz“, entsprechend ihrer Sequenzchromatogramme mit den vorhandenen Doppelpeaks ($W=A+T$; $M=A+C$) verrechnet. Da diese Sequenzen allerdings oft zwischen Gruppen im Stammbaum auftauchen, wurden sie jeweils in eine „Hauptsequenz“, welche den dominanten Peak des Sequenzchromatogramms beinhaltet, und eine „Nebensequenz“, welche den kleineren Peak beinhaltet, unterteilt und ebenfalls in den Stammbaum mit einbezogen. Das Auftreten von unterschiedlichen Sequenzen in Kerngenen kann ein Hinweis auf Hybridisierung sein. Entsprechend der vorhandenen Referenzen könnte es sich bei der Probe „Bap5“ um eine Hybride aus *B. leucantha* und *B. australis* handeln, bei „Bap7“ könnte es sich um eine Hybride von *B. leucantha* und *B. tinctoria* handeln.

3.2. Validierung einer HRM-Methode

Während eines projektbegleitenden Ausschusses ergab sich die Frage nach der Validierbarkeit einer HRM-Methode. Es wurden daher Schritte untersucht, die für eine Methodvalidierung wichtig sind. Dazu wurden die beiden Primerpaare getestet, die zur Identifizierung von *Helleborus niger* entworfen wurden.

Einige Faktoren wie Wiederholbarkeit, Änderung der PCR-Reagenzien, Pipettensätze, Personen und HRM-Geräte wurden untersucht (Tabelle 4). Dazu wurde jeweils nur ein Faktor von den Standardbedingungen abgewandelt. Die Schmelzkurvenanalysen wurden automatisch mit der Rotorgene Software berechnet, die Genauigkeit der Ergebnisse wurde in Prozent Ähnlichkeit der Kurve der Probe im Vergleich zu den Kurven der jeweiligen Referenzprobe ausgedrückt (Konfidenz in %).

Tabelle 4: Validierung einer HRM-Methode. Auflistung der variierten Faktoren, deren Standardbedingungen und Abwandlungen.

Variation	Standard	Abwandlungen	Abwandlungen
DNA-Polymerase	HotFire Taq	BioRad Taq	
Puffer	B	B2	
Fluoreszenzfarbstoff	Bebo	EvaGreen	
Alter der Reagenzien	neu	lange gebraucht	
PCR Zyklenzahl	40	45	20+10
Personen	Person 1	Person 2	
Pipetten	Gilson Satz 1	Biohit	Gilson Satz 2
Thermocycler	RotorGene 1	RotorGene 2	Lightcycler
Zwischen Tagen	trnL-F1: 11 Läufe	matK3: 10 Läufe	

Um eine objektive Auswertung zu erhalten wurden auch die Proben in die Berechnungen mit einbezogen, die aufgrund verschiedener möglicher Umstände so stark voneinander abweichende Doppelbestimmungen aufwiesen, sodass sie normalerweise nicht in eine Auswertung mit aufgenommen werden würden.

Siebzehn Referenzproben aus acht Arten (*Helleborus niger*, *H. foetidus*, *H. argutifolius*, *H. lividus*, *H. × sterna*, *H. dumetorum*, *H. prupurascens*, *H. viridis* ssp. *viridis* und *H. viridis* ssp. *occidentalis*) wurden so ausgewählt, dass für jeden zu erwartenden Kurventyp mehrere Proben vorhanden waren. Mit diesen 17 Proben wurden alle oben genannten Variationen mit beiden Primerkombinationen getestet.

Tabelle 5: Auswertung der Schmelzkurvenanalysen basierend auf dem Primerpaar Hel_trnL-trnF 1. Die Übereinstimmung der Kurven der Proben zu den jeweiligen Referenzkurven ist als Konfidenz (in %) angegeben.

Primer Hel_trnL-F 1	Konfidenz (%)					
	Median	MW	STABW	Min	Max	Anzahl
Variation zwischen den Tagen	94	90	11	39	100	225
25.03.2009	96	93	9	47	99	67
30.03.2009	93	90	12	39	100	69
30.07.2009	92	90	9	62	100	55
15.04.2010	90	88	13	49	100	34
Zyklen der PCR	97	90	17	40	100	29
Puffer	96	92	9	59	100	34
DNA-Polymerase	92	89	10	66	100	33
Fluoreszenzfarbstoff	97	91	14	45	100	34
Personen	87	81	17	21	98	32
Pipetten	88	82	17	23	98	34
Thermocycler	93	85	17	37	99	34

Im Allgemeinen gab es bei der Verwendung von unterschiedlichen Chemikalien (Polymerasen, Puffer, Fluoreszenzfarbstoffen), Pipetten und Personen keine signifikanten Unterschiede. Selbst die Verwendung von älteren, billigeren Pipetten (Biohit) oder der Einsatz einer noch nicht sehr gut eingearbeiteten Hilfskraft ergaben nur geringfügig schlechtere Ergebnisse (Tabelle 5). Auch gab es keinen Tageseinfluss auf die Ergebnisse.

Den größten Einfluss auf das Ergebnis der Identifizierung (Ähnlichkeit der Schmelzkurven) hatten die Anzahl an PCR-Zyklen, das Alter der Polymerase und der verwendete Gerätetyp des Thermocycler. Eine Verringerung der Zyklenanzahl zur Verkürzung der Laufzeit der PCR ist nicht anzuraten, eine Verlängerung über das Optimum verbessert die Ergebnisse nicht mehr. Eine Optimierung der Zyklenanzahl muss bei der Entwicklung des Assays unbedingt durchgeführt werden. Die beiden anderen Parameter (Alter der Polymerase und Gerätetyp) werden unten ausführlicher diskutiert.

Verwendung von neuer oder alter Polymerase

Die Funktionsfähigkeit von Polymerasen nimmt mit zunehmendem Alter der Reagenzien und dem häufigen Auftauen und wieder Einfrieren langsam ab. Bei Verwendung von alten Reagenzien funktioniert die PCR zwar zunehmend schlechter, bei guter DNA Qualität und Konzentration wird jedoch genug PCR-Produkt für eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung gebildet. Vergleicht man die PCRs, welche mit einer neuen (Abbildung 9, rechts) bzw. mit einer alten (Abbildung 10, rechts) Polymerase durchgeführt wurden, so erkennt man z.B. anhand der Verdünnungen 1:50 und 1:200 deutlich, dass bei Verwendung der alten Polymerase die Fluoreszenz (entspricht der Menge des gebildeten PCR-Produktes) einen gewissen Schwellenwert später überschreitet. Bei der Verwendung der frischen Polymerase erreicht die PCR der auf 1:50 verdünnten DNA deutlich die Plateauphase und die auf 1:200 verdünnte DNA erreicht das Plateau knapp. Bei Verwendung der alten Polymerase erreicht die 1:50 verdünnte DNA knapp die Plateauphase und die auf 1:200 verdünnte DNA befindet sich noch in der exponentiellen Phase.

Bei der HRM zeigte sich einerseits, dass selbst mit relativ alten Reagenzien und bei sehr stark verdünnter DNA (1:1.000 bis 1:20.000) noch ausreichend PCR-Produkte gebildet wird, um eine positive Schmelzkurvenanalyse durchzuführen, andererseits aber die HRM-Kurven bei schlecht funktionierender PCR zunehmend streuen (Abbildung 9 links, Abbildung 10 links und Tabelle 6).

Tabelle 6: Einfluss der DNA-Verdünnung und des Alters der Polymerase auf die HRM. Die Konfidenzen basieren auf den Daten der Abb. 9 und Abb. 10.

Genotyp	neue Polymerase		alte Polymerase	
	Verdünnung	Konfidenz (%)	Verdünnung	Konfidenz (%)
<i>H. niger</i>	unv.	90	unv.	68,42
<i>H. niger</i>	1:5	99	1:50	100
<i>H. niger</i>	1:10	98	1:200	28,87
<i>H. niger</i>	1:20	89	1:1.000	65,72
<i>H. niger</i>	1:50	100	1:5.000	46,59
<i>H. niger</i>	1:100	99	1:20.000	36,09
<i>H. niger</i>	1:200	82		
<i>H. niger</i>	1:400	60		
<i>H. niger</i>	1:400	8		
<i>H. foetidus</i>	unv.	92	unv.	100
<i>H. foetidus</i>	1:5	95	1:50	93,85
<i>H. foetidus</i>	1:10	95	1:200	63,33
<i>H. foetidus</i>	1:20	97	1:1.000	6,35
<i>H. foetidus</i>	1:50	100	1:5.000	6,04
<i>H. foetidus</i>	1:100	95	1:20.000	27,62
<i>H. foetidus</i>	1:200	77		
<i>H. foetidus</i>	1:400	86		

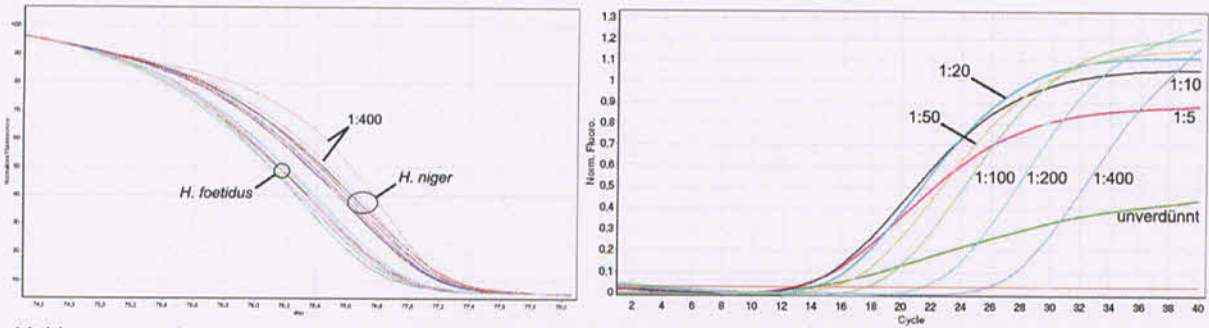


Abbildung 9: Verdünnungsreihe von zwei Proben von *H. niger* und *H. foetidus* (unverdünnt bis 1:400 verdünnt). Die PCR wurde mit einem frisch geöffneten Polymerase durchgeführt. Links: HRM aller Verdünnungen beider Proben. Rechts: Fluoreszenzverlauf der PCR, die Verdünnungsreihe von *H. foetidus* ist exemplarisch dargestellt.

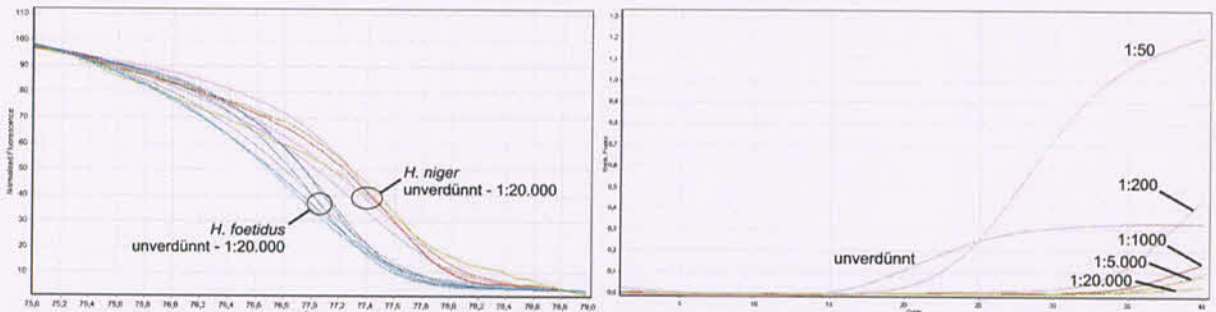


Abbildung 10: Verdünnungsreihe von zwei Proben von *H. niger* und *H. foetidus* (unverdünnt bis 1:20.000 verdünnt). Die PCR wurde mit einer alten, schon häufig gebrauchten Polymerase durchgeführt. Links: HRM allen Verdünnungen beider Proben. Rechts: Fluoreszenzverlauf der PCR. Die Verdünnungsreihe von *H. niger* ist exemplarisch dargestellt.

Übertragbarkeit des Assays auf andere Geräte

Es zeigte sich, dass die Assays zwar genauso gut auf einem anderen Gerät der gleichen Marke (RotorGene) funktionierten, aber nicht direkt auf das Gerät einer anderen Firma (Lightcycler, Roche) übertragbar waren.

Beim Lightcycler werden die Proben in einem fixen Block aufgeheizt, wobei innerhalb des Heizblockes die Temperaturen nicht überall exakt gleich sind. Dadurch können sich die Schmelzkurven entlang der Temperaturachse verschieben. Bei diesem Versuch konnten ein Teil der Proben von *Helleborus foetidus* nicht eindeutig zugeordnet werden da die Proben sich scheinbar in zwei Gruppen teilten. Eine Probe von *H. niger* wurde sogar falsch identifiziert.

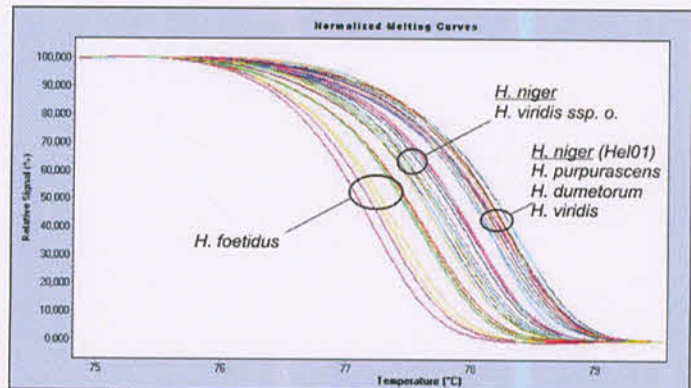


Abbildung 11: HRM-Analyse basierend auf dem Primerpaar Hel_trnL-trnF 1. Die PCR und HRM wurden auf einem Lightcycler (Roche) durchgeführt.

Bei der Übertragung auf andere Marken ist daher eventuell mit der Notwendigkeit einer Anpassung der Methode zu rechnen. Mit dem Lightcycler bzw. RotorGene wurden Geräte der 1. bzw. 2. Generation getestet. Neuere Geräte erreichen aufgrund des technischen Fortschrittes aber bereits zum Teil höhere Genauigkeit als der RotorGene.

Zuordnung von Proben zu einem HRM-Kurventyp

Für die Primerkombination Hel_trnL-trnF 1 wurden die Ähnlichkeiten aller Proben in zwei Relationen berechnet. Erstens wurden alle Proben im Vergleich zu einer Referenzprobe von *Helleborus niger* (vgl. 3.1.1) berechnet (Abbildung 12 links). Die Proben von *Helleborus niger* und *H. viridis* ssp. *occidentalis*, die die Gruppe 2 bilden, und alle anderen Arten, die Gruppe 1 und 3 bilden, wurden in der Abbildung getrennt dargestellt. Zwischen den Proben von *H. niger* (inkl. *H. viridis* ssp. *occidentalis*) mit Konfidenzen von ca. 40-100% und den Proben aller anderen Arten mit den Konfidenzen von 0-15% gab es keine Überlappungen, d.h. es gab keine falsche Identifizierung. Zweitens wurden die Konfidenzen der Proben im Vergleich zur jeweils zugehörigen Referenzprobe pro Gruppe errechnet. Dabei wurde ein Mittelwert der Konfidenz von 89 % erreicht. Auch so wurden alle Proben entsprechend ihrer Art richtig zur jeweiligen Gruppe zugeordnet (Abbildung 12 rechts).

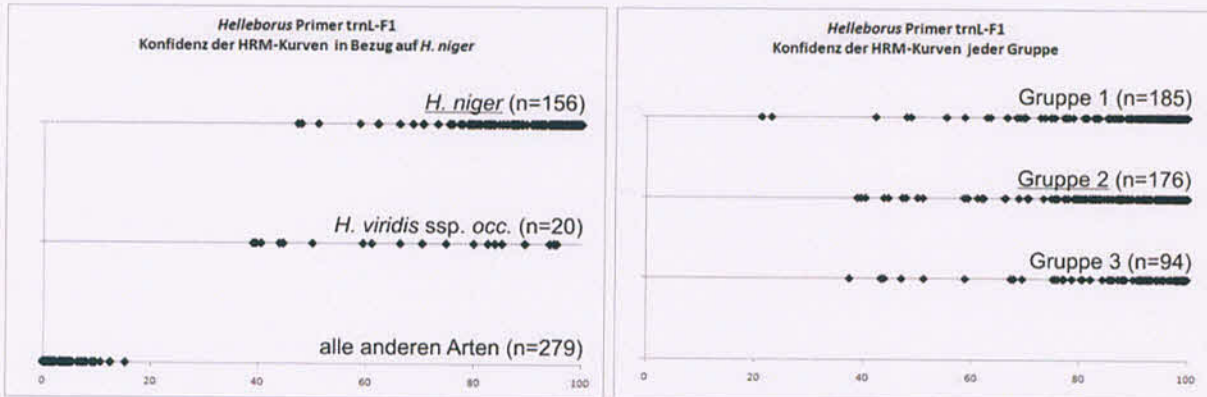


Abbildung 12: Zuordnung von Proben zu einem HRM-Kurventyp basierend auf dem Primerpaar Hel_trnL-trnF 1. Links: Übereinstimmung der Proben im Vergleich zu einer Referenz von *Helleborus niger*. Rechts: Konfidenzen der Proben im Vergleich zur jeweils zugehörigen Referenzprobe pro HRM-Kurventyp.

Die errechneten Übereinstimmungen basierend auf dem Primerpaar Hel_matK 3 (vergleiche 3.1.1) wurden im Vergleich zu einer Referenz von *H. niger* errechnet. In der Abbildung 13 sind die Proben von *H. niger* (Gruppe IV) in der ersten Zeile abgebildet, die relativ nahe gelegenen Schmelzkurven von *H. lividus* (Gruppe III) und *H. argutifolius* (Gruppe V) gemeinsam in der zweiten Zeile, und die Proben aller anderen Arten (Gruppen I und II) in der dritten Zeile. Mit diesem Primerpaar sind die unselektierten Schmelzkurven von *H. lividus* und *H. argutifolius* nicht immer deutlich von *H. niger* zu unterscheiden. Auch gibt es, wenn man ausschließlich die errechneten Konfidenzen betrachtet, keine deutliche Grenze zwischen *H. niger* und Proben der Gruppe II.

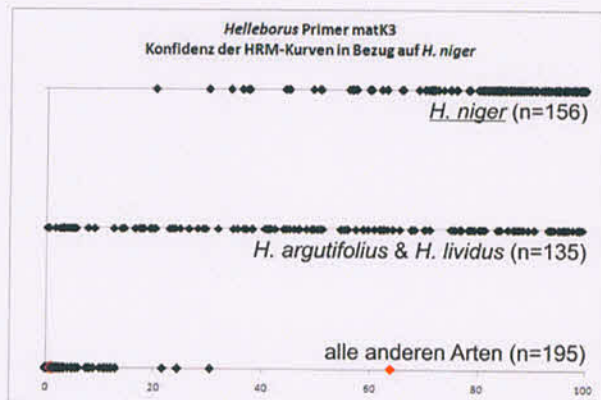


Abbildung 13: Ähnlichkeiten der Proben in Relation zu *Helleborus niger*, basierend auf dem Primerpaar Hel_matK 3.

Selektiert man jedoch die Proben aus, deren Duplikate sehr weit auseinander liegen (Abbildung 13, rote Rechtecke in der dritten Zeile – die Übereinstimmungen liegen hier für eine Doppelbestimmung z.B. bei ca. 2% bzw. 65%), treten nur mehr sehr wenige Überschneidungen zwischen *H. argutifolius* und *H. niger* auf.

Kombiniert man die Auswertung beider Primerpaare miteinander, wurden alle Proben richtig identifiziert.

Die Proben von *H. viridis* ssp. *occidentalis*, welche mit dem Primerpaar Hel_trnL-trnF 1 den gleichen Kurventyp ergeben wie *H. niger* sind mit dem Primerpaar Hel_matK 3 deutlich unterscheidbar. Im Gegenzug sind die Proben von *H. argutifolius* und *H. lividus*, welche mit dem Primerpaar Hel_matK 3 sehr nahe gelegene HRM-Kurven zu *H. niger* ergeben oder deren Gruppen sich sogar überschneiden, mit dem Primer Hel_trnL-trnF 1 ganz deutlich unterscheidbar.

3.3. Vergleich von DNA-Extraktionsmethoden in verschiedenen Drogen und deren Endprodukten

Aus in Apotheken und Drogeriemärkten kommerziell erhältlichen Monopräparaten (Tabelle 7) wurde mittels fünf verschiedener DNA-Extraktionsmethoden (2 Extraktionsmethoden aus der Fachliteratur und drei kommerziell erhältliche Extraktionskits, Extraktion laut Herstelleranleitung) DNA extrahiert:

1. CTAB-Protokoll (Anhang 1)
2. "Finnische Methode" (Pirttilä et al., 2001)
3. Nucleospin (Machery & Nagel) – Säulchen
4. Promega Wizard (Promega) – Schnellmethode
5. DNEasy Plant Mini Kit (Quiagen) – Säulchen

Tabelle 7: Liste der verwendeten Drogen und deren Hersteller/Verkäufer

Pflanzenteil	Droge	Hersteller / Produktname
Cortex	Cinnamomi cortex	Droge (Apotheke) Alnatura Zimt gemahlen Kotany Zimt gemahlen
	Salicis cortex	Droge (Apotheke)
Flos	Matricariae flos	Droge (Apotheke) Alnatura Kamillentee Teekanne FixMille
Folium	Menthae piperitae folium	Droge (Apotheke) Alnatura Pfefferminztee Teekanne FixMinze
	Salviae officinalis folium	Droge (Apotheke) Teekanne FixSalbei
Fructus	Foeniculi fructus	Droge (Apotheke) Alnatura Fencheltee Teekanne FixFenchel
	Juniperi pseudo-fructus	Droge (Apotheke) Fuchs Wacholderbeeren Kotany Wacholderbeeren
Radix	Valerianae radix	Droge (Apotheke) Magister Doskar Baldrian
	Ginseng radix	Droge (Apotheke) Aurita Lecithin-Ginseng-Plus Mag. Doskar Ginseng-Plus

Tabelle 8: DNA-Gehalte der Extraktion mit dem Quiagen Kit von Drogen ohne Lagerung, Apothekerware und einigen Produkten

Droge	Herkunft	DNA-Konzentration [ng/µl]
Salicis cortex	Droge ohne Lagerung	3,0
	Droge aus der Apotheke	4,0
Matricariae flos	Droge ohne Lagerung	199,1
	Droge aus der Apotheke	28,8
	Alnatura Kamillentee	14,1
	Teekanne FixMille	11,3
Menthae piperitae folium	Droge ohne Lagerung	57,5
	Droge aus der Apotheke	9,0
	Alnatura Pfefferminztee	9,0
	Teekanne FixMinze	12,3
Salviae officinalis folium	Droge ohne Lagerung	63,0
	Droge aus der Apotheke	6,8
	Alnatura Salbeitee	2,3
	Teekanne FixSalbei	1,5
Foeniculi fructus	Droge ohne Lagerung	11,9
	Droge aus der Apotheke	26,6
	Alnatura Fencheltee	20,1
	Teekanne FixFenchel	7,3
Valerianae radix	Droge ohne Lagerung	2,6
	Droge aus der Apotheke	4,8

Die Konzentration der extrahierten DNA wurde mit einem Fluorometer vermessen. Dabei stellte sich heraus, dass die CTAB-Extraktion und der Promega Wizard die höchsten DNA-Konzentrationen ergaben und die „Finnische Methode“ einen mittleren Wert. Mit dem DNeasy Plant Mini Kit und dem Nucleospin Kit konnten jedoch nur viel geringere DNA-Konzentrationen erreicht werden (Abbildung 14).

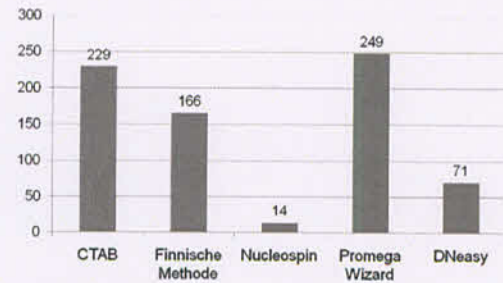


Abbildung 14: Durchschnittliche erhaltene DNA-Konzentration [ng/μl] bei der Anwendung von unterschiedlichen Extraktionsmethoden.

Mit dem Quiagen-Kit wurde von *Salicis cortex*, *Matricariae flos*, *Menthae piperitae folium*, *Salviae officinalis folium*, *Foeniculi fructus* und *Valerianae radix* auch nicht gelagerte Droge mit der Apothekerware verglichen (Tabelle 8). Bei

Salicis cortex, *Foeniculi fructus* und *Valerianae radix* hatte die Dauer der Lagerung keinen Einfluss auf die DNA-Ausbeute, bei *Matricariae flos*, *Menthae piperitae folium* und *Salviae officinalis folium* war die Ausbeute jedoch bei nicht gelagerter Droge mindestens siebenmal höher als bei Apothekerware oder Fertigprodukten.

Anschließend wurden PCRs mit zwei Primerkombinationen, die häufig für DNA-barcoding eingesetzt werden, durchgeführt. Die Primerpaare amplifizierten die Kernregion ITS (internal transcribed spacer) bzw. das Chloroplastengen *psbA*. Die DNA wurde jeweils in drei Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:50 und 1:500 verdünnt) verwendet, um die Qualität und Brauchbarkeit der verschiedenen DNA-Extrakte beurteilen zu können.

Die Ergebnisse zeigten, dass die DNA-Extraktqualität eher vom Ausgangsmaterial als von der Extraktionsmethode beeinflusst wird und dass keine generelle Empfehlung für eine der fünf Extraktionsmethoden gegeben werden kann. Im Durchschnitt lag der PCR-Erfolg bei 50-55% über alle Verdünnungen, nur der Promega Wizard erzielte mit 35% eine durchschnittlich schlechtere Amplifikationsrate (Tabelle 9).

Tabelle 9: Effizienzvergleich verschiedener Extraktionsverfahren. Die Werte ergeben sich aus erfolgreichen PCR-Nachweisen in Prozent gemittelt über alle Produkte.

Extraktionsmethode	ITS			psbA			Mittelwert
	unv.	1:50	1:500	unv.	1:50	1:500	
CTAB	42%	46%	52%	65%	69%	55%	55%
Finnisch	50%	67%	60%	73%	15%	53%	53%
Nucleospin	38%	54%	60%	50%	48%	50%	50%
Wizard	17%	42%	60%	27%	31%	35%	35%
DNeasy	60%	56%	54%	67%	27%	53%	53%

Aus Wurzeln, Rinden und Beeren wurden im Allgemeinen eher geringe DNA-Mengen extrahiert, in vielen Fällen kam deswegen auch kein brauchbares PCR-Produkt zustande. Aus Blättern, Blüten und Fenchelfrüchten wurde generell zwar mehr DNA extrahiert, aber auch mehr sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die auf die PCR inhibierend wirken. Bei diesen Proben funktionierte die PCR der unverdünnten DNA deswegen generell schlechter als bei den verdünnten Proben. Aus Apothekenware konnte grundsätzlich DNA von besserer Qualität extrahiert werden als aus Produkten von Drogeriemärkten (Abbildung 15).

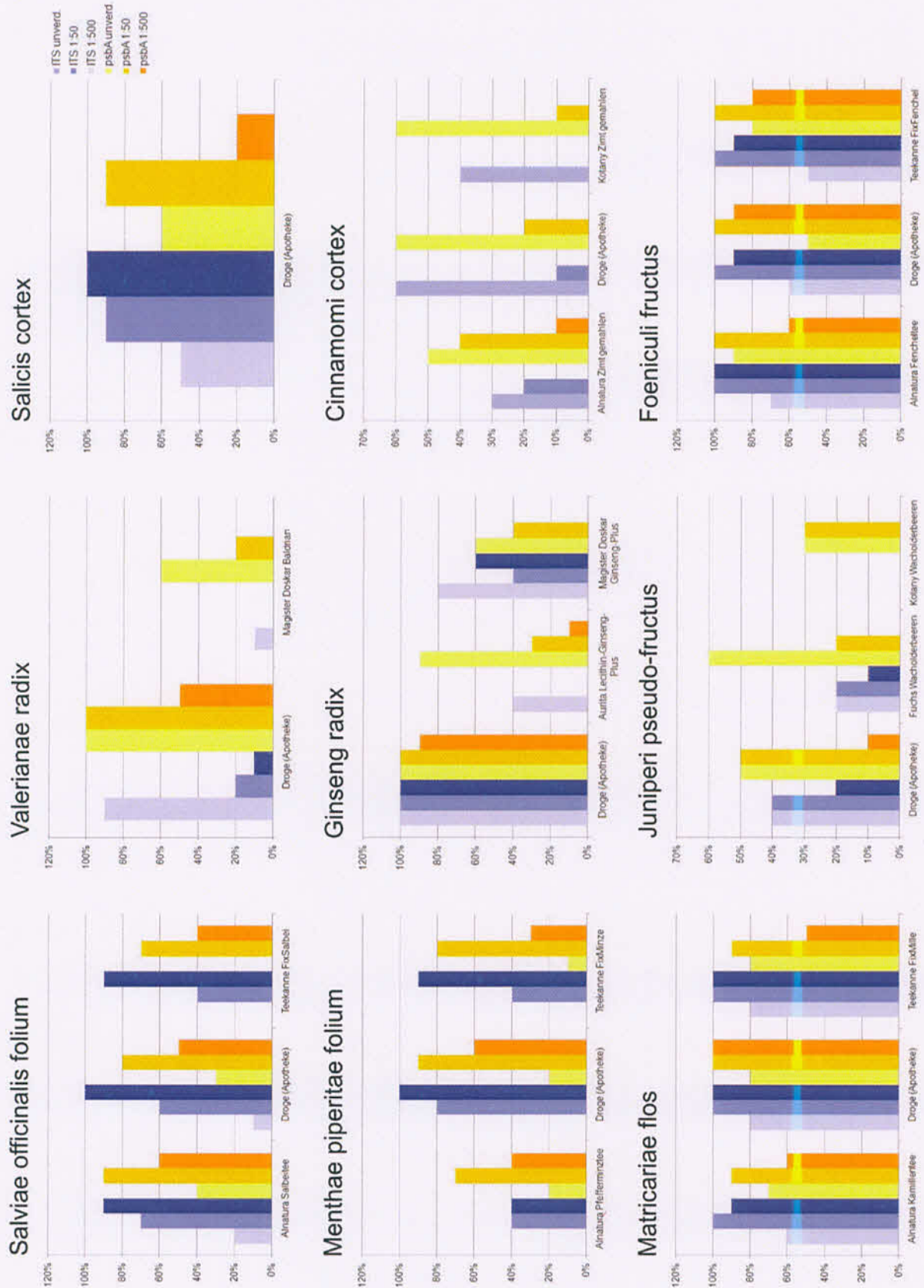


Abbildung 15: Erfolgsraten der PCR-Amplifikation aller untersuchten Produkte (in %) in Abhängigkeit von der DNA-Verdünnung, gemittelt über die verschiedenen Extraktionsmethoden.

3.4. Quantifizierung von Vermischungen

Die HRM-Analyse ergibt für eine bestimmte DNA-Sequenz eine charakteristische Kurvenform. Wir konnten feststellen, dass sich bei der Mischung aus zwei DNA-Sequenzen die Kurvenform der Mischung zwischen den Kurvenformen der einzelnen DNA-Sequenzen befindet. Die Frage, die sich stellte, war, ob die Verschiebung der Kurvenform einer Mischung zwischen den beiden einzelnen DNA-Sequenzen mit dem Mischungsverhältnis korreliert. Wenn dies der Fall wäre, könnten sich Vermischungen sowohl qualitativ als auch quantitativ abschätzen lassen.

Zur Überprüfung des Ansatzes wurde der entwickelte Assay zur Identifizierung von *Helleborus niger* als Ausgangspunkt genommen und zwei Fälle untersucht:

1. Nachweis einer Beimischung einer bekannten Verfälschung (spezifischer Assay): als Beispiel einer Verfälschung wurde *Veratrum nigrum* gewählt, weil er wie *H. niger* im englischsprachigen Raum oft auch als „black hellebore“ bezeichnet wird. Für die Zielart und die Verfälschung *Veratrum nigrum* wurden jeweils artspezifische Primer eingesetzt (Tabelle 10). Beide Primerpaare wurden einer PCR-Reaktion beigemischt, d.h. es kann hier nur zu einer Amplifikation kommen, wenn die Zielart oder/und die spezifische Verfälschung vorhanden sind. Alle anderen eventuell vorkommenden Arten werden nicht nachgewiesen.
2. Nachweis einer Beimischung unbekannter Verfälschungen (universeller Assay): Hier wurde der Zielart *Helleborus niger* eine Mischung von neun verschiedenen Arten als Verfälschung zugemischt. Neben dem spezifischen Primerpaar für *Helleborus niger* wurde auch ein universelles Primerpaar zugemischt (Tabelle 10), das bei den meisten Pflanzen zur Amplifikation führt. Somit sollte es möglich sein, eine unspezifische Verunreinigung feststellen zu können.

In beiden Fällen hat das Amplicon von *Helleborus* jeweils eine niedrigere Schmelztemperatur (T_m -Wert), dissoziiert im Lauf der ansteigenden Temperatur in der HRM daher früher als jenes der Beimischung(en). Die Detektion einer Verunreinigung erfolgt also durch eine erhöhte Fluoreszenz unmittelbar nach dem Aufschmelzen des *Helleborus*-Amplicons.

Es wurden Verdünnungsreihen von mehreren Individuen von *Veratrum nigrum*, *V. album*, den Komponenten der Kontaminationsmischung und der Kontaminationsmischung selbst hergestellt. Diese wurden mit einer konstanten Menge an *Helleborus*-DNA vermischt und mit den vorgestellten Verfahren getestet. Die PCR/HRM wurde an insgesamt fünf verschiedenen *Helleborus* Individuen (Hel02, Hel27, Hel71, Hel72, Hel77), fünf *Veratrum* Individuen und der Kontaminationsmischung in verschiedenen Kombinationen durchgeführt.

Nachweis einer Beimischung einer bekannten Verfälschung (spezifischer Assay)

Reine Proben von *Helleborus niger* bzw. *Veratrum nigrum* zeigen jeweils einen charakteristischen Wendepunkt bei 77,5°C bzw. 81,5°C (Abbildung 16). Die Mischungen zeigen die Schmelzdomänen beider Kurven und haben daher zwei Wendepunkte. Eine Zumischung von *V. nigrum* konnte bis zu einem Verhältnis von 1:50.000 nachgewiesen werden.

Werden andere *Helleborus*-Arten zugemischt, die auch durch den spezifischen *Helleborus*-Primer amplifiziert werden, kann man diese durch die Lage des Wendepunktes links von *H. niger* (geringere Schmelztemperatur als 77,5°C) einfach unterscheiden.

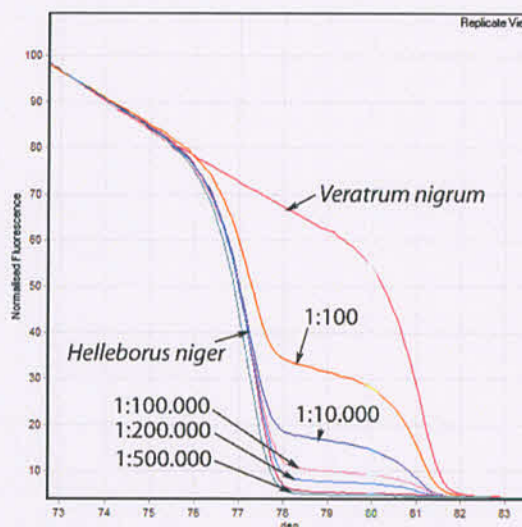


Abbildung 16: HRM-Kurven einer Mischungsreihe von *Helleborus niger* und *Veratrum nigrum*. Bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:200.000 ist aufgrund der erhöhten Fluoreszenz im Bereich von 78,5 bis 81 °C ein Nachweis möglich.

Nachweis einer Beimischung unbekannter Verfälschungen (universeller Assay)

Bei der Zumischung einer Mischung aus 9 verschiedenen Arten ist die Kurvenform der Mischung ohne *Helleborus niger* natürlich komplexer, da alle hier verwendeten Arten mit dem universellen Primer ein Produkt ergeben (Abbildung 17). Sie hat zwei Wendepunkte bei 79,9°C und 81,2°C und liegt deshalb ebenfalls rechts der Kurve der reinen Probe von *Helleborus niger*. Die Mischungen zeigen einerseits die Form der Schmelzdomäne von *H. niger*, andererseits die beiden Wendepunkte der Mischung bei 79,9°C und 81,2°C. Hier konnte eine Verunreinigung bis zu 1:1000 nachgewiesen werden.

Die Regressionsgerade zwischen der Konzentration der Verunreinigung und der Fluoreszenz, gemessen bei 78,8°C zeigt die extreme hohe Korrelation ($R^2=0,988$) und damit die generelle Eignung, mit diesem Verfahren Beimischungen auch quantifizieren zu können (Abbildung 18).

Beide Assays zeigen, dass eine Zumischung sehr gut erkannt und auch quantifiziert werden kann. Durch die genauere Abstimmung der Primersequenz (Amplifikationseffizienz), der Mischungsverhältnisse der Primerpaare und anderer Parameter kann die Sensitivität gesteuert und noch erhöht werden. Wenn man z.B. die Primerkonzentration für die Zielart verringert, bleibt der Zumischung mehr Raum bei der Amplifikation und es können dadurch noch geringere Konzentrationen der Zumischung nachgewiesen werden.

Ein Nachteil der sogenannten „universellen“ Primer, die in der molekularen Systematik sehr gerne verwendet werden und von denen einer in dem universellen Assay eingesetzt wurde ist, dass zwar sehr viele Arten ein PCR-Produkt ergeben, aber doch nicht alle. Daher sollte man mehrere universelle Assays mit unterschiedlichen „universellen“ Primern entwickeln und parallel laufen lassen.

Die Analyse von Vermischungen lieferte vielversprechende Ergebnisse in Hinblick auf die Sensitivität der eingesetzten Methode. Eine große Herausforderung stellt allerdings in weiterer Folge die Quantifizierung von Pflanzenmaterialmischungen aufgrund ihres DNA-Gehalts dar, da die DNA-Gehalte in Pflanzenteilen und verschiedenen Arten großen Schwankungen unterworfen sind.

Tabelle 10: Primer die für das Beispiel zur Detektion von Verunreinigungen verwendet wurden.

Primer	Assay	Genort	Amplikon Größe (bp)
Hel_matK 3F&R	Zielart (spezifischer und universeller Assay)	matK	129
Verat_trnLintron 112F & 154R	Spezifischer Assay	trnL intron	120
Syst_matK1f Syst_ccmp1r	Universeller Assay	matK / intron	328

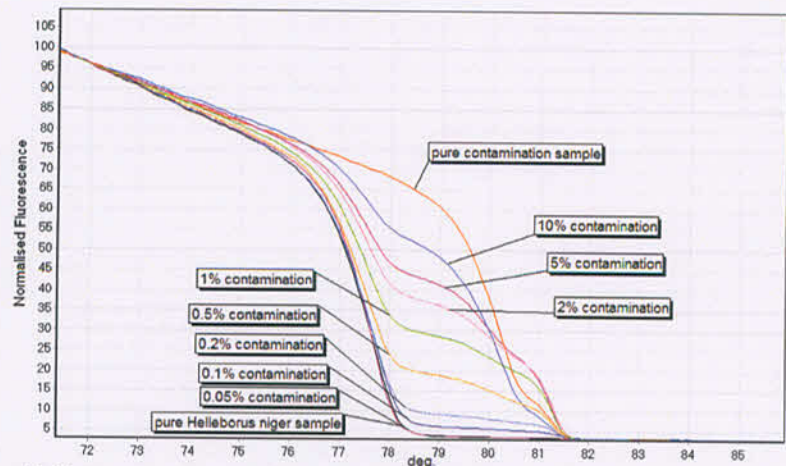


Abbildung 17: HRM-Kurven einer Mischungsreihe von *Helleborus niger* und einer DNA-Mischung aus 9 verschiedenen Arten („Kontamination“). Bis zu einer Beimischung der Verunreinigung von 0,05% ist aufgrund der erhöhten Fluoreszenz im Bereich von 78,5 bis 81 °C ein Nachweis möglich.

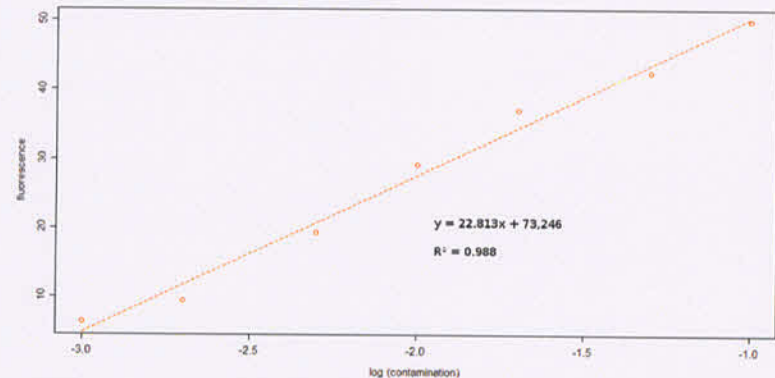


Abbildung 18: Standardgerade basierend auf der Fluoreszenz bei 78,8°C (y-Achse) und der Verdünnungsreihe der Zielart mit der DNA-Mischung aus 9 verschiedenen Arten („Kontamination“) (x-Achse, logarithmisch).

3.5. DNA-Extraktion aus Urtinkturen

3.5.1. DNA-Extraktion mit „Magnetic Beads“

„Magnetic Beads“ sind magnetische Nanopartikel (Größe < 1 µm), die aus einem magnetischen Kern und einer Siliziumhülle bestehen. Sie binden durch ihre physikalischen Eigenschaften DNA an sich und werden in der Molekularbiologie deswegen auch zur DNA-Extraktion eingesetzt. Durch ihre geringe Größe und hohe Anzahl wären sie gut geeignet, DNA aus Flüssigkeiten zu binden.

In mehreren Versuchen wurden jeweils 1 ml verschiedener Urtinkturen mit 1 µl Magnetic Beads, 1 ml Urtinkturen mit 3 µl Magnetic Beads oder 25 ml Urtinktur mit 25 µl Magnetic Beads verwendet, wobei entweder dem Extraktions-Protokoll des Herstellers gefolgt wurde oder zusätzlich eine CTAB-Extraktion angeschlossen wurde. Keine dieser Versuche ergab ausreichende Mengen DNA in ausreichend guter Qualität. Aufgrund der häufigen Braunfärbung der DNA-Extrakte lag die Vermutung nahe, dass mit den Magnetic Beads zusätzlich zur DNA auch sekundäre Inhaltsstoffe aus den Urtinkturen mit extrahiert wurden, welche die PCR inhibieren.

3.5.2. DNA-Extraktion mit Plant Maxi Kit

Jeweils 30 ml mehrerer Urtinkturen wurden in einem Glaskolben bei 45 °C am Rotovapor angeschlossen und auf 5 ml eingengt. Die verbleibende Flüssigkeit wurde mit dem Plant Maxi Kit (Qiagen) dem Herstellerprotokoll folgend (Einstieg bei Punkt 8: Zugabe von Lysis Puffer AP1) extrahiert. Auch mit dieser Extraktionsmethode konnte keine für die PCR ausreichende DNA Menge erhalten werden.

3.5.3. CTAB-Extraktion

In Anlehnung an einen früheren gelungenen Versuch DNA aus Pflanzenextrakten zu isolieren (Novak et al., 2007) wurde eine besondere Probenvorbereitung durchgeführt. Die Urtinkturen wurden in 50 ml Falcon Tubes 5 min bei 4000 rpm (~3000 g) zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen und das Sediment 2x mit 70% Ethanol und 2x mit Aqua dest. gewaschen. Dazwischen wurde jeweils 5 min zentrifugiert und die Waschlösung abpipettiert. Aus dem gewaschenen Sediment wurde mit der CTAB-Methode die DNA extrahiert. Die Konzentrationen von BME, PVP und SDS wurden auf das 1,5-fache der in Anhang 1 angegebenen Werte angehoben, um eventuell vorhandene Proteine und Pflanzeninhaltsstoffe besser entfernen zu können. Die weiteren Arbeitsschritte folgten exakt dem Protokoll. Die DNA wurde – sofern vorhanden – mit den spezifischen Primern nachgewiesen, welche in den vorigen Kapiteln beschrieben wurden. Die DNA-Extrakte wurden jeweils unverdünnt, 1:5, 1:20 und 1:100 verdünnt für die PCR mit HRM verwendet.

Für den Versuch wurden folgende Mengen verschiedener Urtinkturen verwendet:

- 25 ml und 50 ml *Helleborus niger* Urtinktur
- 25 ml und 37 ml *Populus tremuloides* Urtinktur
- 25 ml und 100 ml *Gelsemium sempervirens* Urtinktur
- D1 aus *Gelsemium sempervirens* Urtinktur (100 ml Urtinktur wurden mit 300 ml Aqua dest. und 600 ml 96 % Ethanol verdünnt)
- 50 ml *Gelsemium sempervirens* Urtinktur unter Zugabe von Fremd-DNA

Tabelle 11: Trockensubstanzanteil der verwendeten Urtinkturen.

Urtinktur	5 ml [g]	TM [g]	TM % [w/w]
<i>Gelsemium</i>	4,607	0,141	3,06
<i>Helleborus</i>	4,384	0,007	0,16
<i>Populus</i>	4,443	0,239	5,38

Zusätzlich wurde der Trockensubstanzanteil der Urtinkturen bestimmt (Tabelle 11). Dazu wurden je 5 ml Urtinktur in eine Glas-Petrischale eingewogen, und die Petrischalen in einem Trockenschrank bei 125 °C eine Stunde lang getrocknet und rückgewogen.

3.5.3.1. DNA-Extraktion aus *Helleborus niger* Urtinktur

Für den Nachweis von DNA wurden die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen *Helleborus*-Primer verwendet. Während in 25 ml Urtinktur keine DNA nachgewiesen werden konnte, konnte aus 50 ml Urtinktur mit dem unverdünnten und 1:5 verdünnten DNA-Extrakt schon DNA nachgewiesen werden. Die Schmelzkurven der Urtinktur-DNA waren entweder ident oder sehr ähnlich jener der *H. niger*-Referenzprobe (Abbildung 19 links). Betrachtet man den Fluoreszenzanstieg während der PCR (Abbildung 19 rechts), so erkennt man, dass die Menge der vorhandenen DNA in der Urtinktur weit geringer ist als die der Referenzproben. Beim Primerpaar Hel_trnL-trnF 1 ist die Fluoreszenz der Urtinktur ähnlich gering wie beim Primerpaar Hel_matK 3, allerdings deutlich höher als die der Negativkontrolle (NTC), wo praktisch keine Primerdimere entstehen. Bei optimaler DNA-Vervielfältigung (Verdoppelung pro Zyklus) würde ein Abstand zwischen Referenz- und Urtinktur-DNA um 20 Zyklen bedeuten, dass in der Urtinktur nur ca. ein Millionstel soviel DNA vorhanden ist wie in den Referenzen.

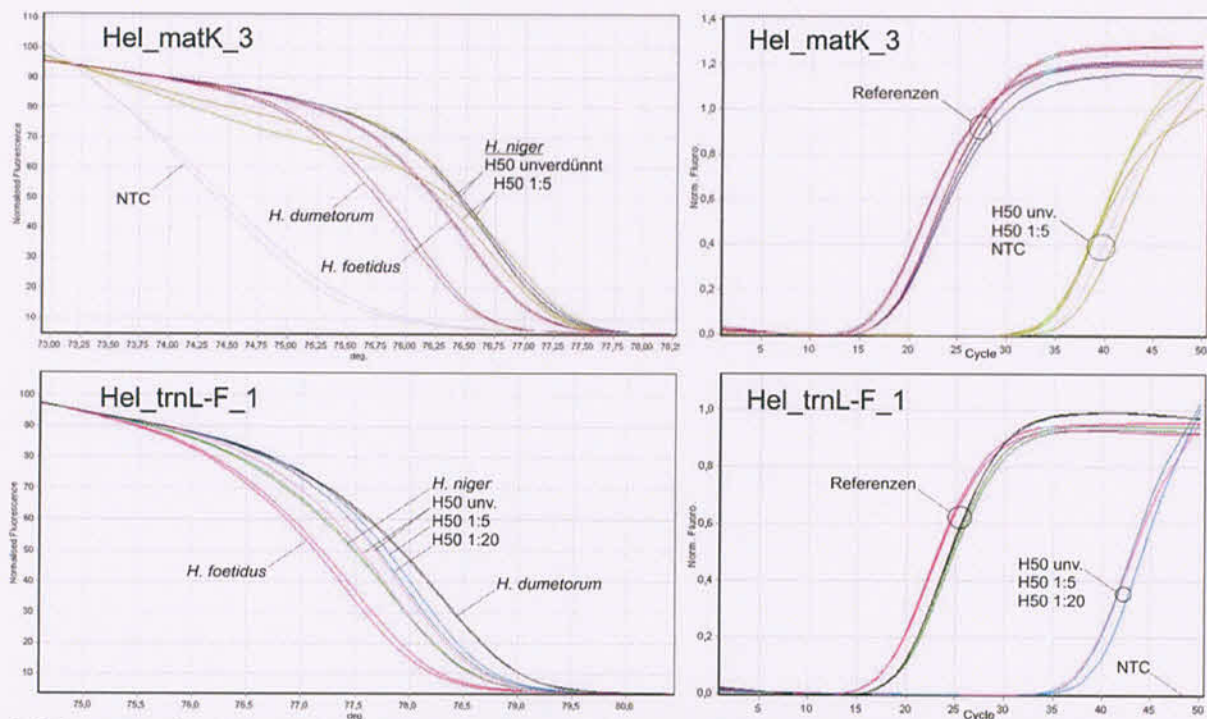


Abbildung 19: Links: Schmelzkurvenanalyse der DNA, welche aus der *Helleborus niger* Urtinktur extrahiert wurde. Rechts: Fluoreszenzmessung während der PCR. Die beiden oberen Grafiken basieren auf dem Primerpaar Hel_matK 3, die unteren beiden basieren auf dem Primerpaar Hel_trnL-trnF 1. (Die DNA wurden aus 50ml Urtinktur extrahiert und in verschiedenen Verdünnungen verwendet; Referenzproben: *H. niger*, *H. dumetorum* und *H. foetidus*.)

3.5.3.2. DNA-Extraktion aus *Populus tremuloides* Urtinktur

Mit dem Primerpaar Pop_matK 1 konnte kein zuverlässiges Ergebnis erzielt werden. Die Schmelzkurven der Probe waren entweder ident mit der Negativkontrolle oder zwischen der Negativkontrolle und der Referenzprobe. Die Menge an extrahierter DNA reichte hier für eine Identifizierung nicht aus.

Mit dem Primerpaar Pop_trnL 1 konnte zwar DNA nachgewiesen werden, die Schmelzkurve zeigte allerdings eine deutlich andere Form als die Referenz und die NTC (Abbildung 20). Da nur geringe Mengen an *Populus tremuloides*-Urtinkturen zur Verfügung standen, wurden die Restmengen von drei verschiedenen Chargen (jeweils ca. 10-15 ml) gemischt und verwendet. Die Extraktion konnte daher nicht wiederholt werden. Eine Wiederholung der PCR und HRM und eine re-PCR (siehe Kapitel 3.5.3.4) zeigten das gleiche Ergebnis.

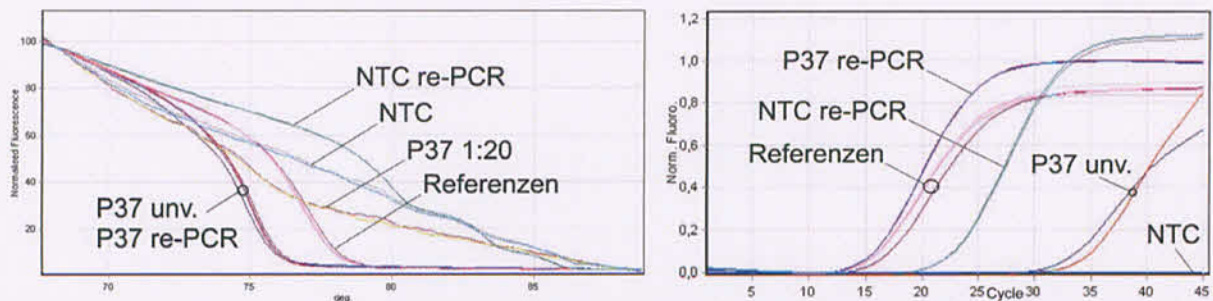


Abbildung 20: Links: Schmelzkurvenanalyse mit dem Primerpaar Pop_trnL 1 und DNA, welche aus der *Populus tremuloides* Urntinktur extrahiert wurde. Rechts: Fluoreszenzmessung während der PCR. (Die Proben wurden aus 37 ml Urntinktur extrahiert und in verschiedenen Verdünnungen verwendet).

3.5.3.3. DNA-Extraktion aus *Gelsemium sempervirens* Urntinktur und D1

Für den Nachweis von *Gelsemium*-DNA in der Urntinktur wurden die in 3.1.4 beschriebenen Primerpaare verwendet. Bei dieser Urntinktur konnte sogar aus 25 ml und der D1 ausreichend DNA für einen Nachweis extrahiert werden. Der Nachweis war in allen DNA-Verdünnungen zwischen unverdünnt und 1:100 verdünnt positiv und die Schmelzkurven der Urntinktur entsprachen sehr gut jener der Referenzprobe (Abbildung 22). Beim Primerpaar Gel_nadhF 1 (Abbildung 22 rechts) ist erkennbar, dass sich die Schmelzkurven der unverdünnten Proben geringfügig nach links verschieben, d.h. etwas früher aufschmelzen, und sich die 1:100 Verdünnungen etwas nach rechts von der Referenzprobe verschieben.

Abbildung 21 zeigt den Verlauf der PCR. Während mit den ETS-Primern (linke Kurvengruppe) eine größere Menge DNA amplifiziert werden kann, ist die PCR mit den nadhF-Primern (rechte Kurven) als grenzwertig zu bezeichnen. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die ETS-Region (external transcribed spacer, Teil der ribosomalen DNA im Zellkern) in wesentlich höherer Kopienanzahl pro Pflanzenzelle vorkommt als das Plastidengen nadhF. Bei allen Proben fällt auf, dass bei der unverdünnten DNA deutliche Inhibitionseffekte auftreten. Es entsteht ein deutlich flacherer Kurvenverlauf, und die Plateauphase der PCR (hier nur bei den ETS-Primern erreicht) liegt deutlich tiefer als bei den Verdünnungen. Die nadhF-Primer erreichen hier die Plateauphase überhaupt nicht, was durch die geringe Menge der DNA zu erklären ist.

Vergleicht man die amplifizierte DNA-Menge der ETS-Primer (hier z.B. bei 40 % der normalisierten Fluoreszenz), so erkennt man, dass bei der 1:5 Verdünnung der 25 ml Urntinktur nicht nur theoretisch sondern auch praktisch genau gleich viel DNA vorhanden ist, wie bei der 1:20 Verdünnung der 100 ml Urntinktur. Bei der D1 aus 100 ml Urntinktur ist die Kurve der 1:20 Verdünnung ca. 1 Zyklus nach hinten verschoben, d.h. im Zuge der Extraktion scheint hier DNA verloren gegangen zu sein.

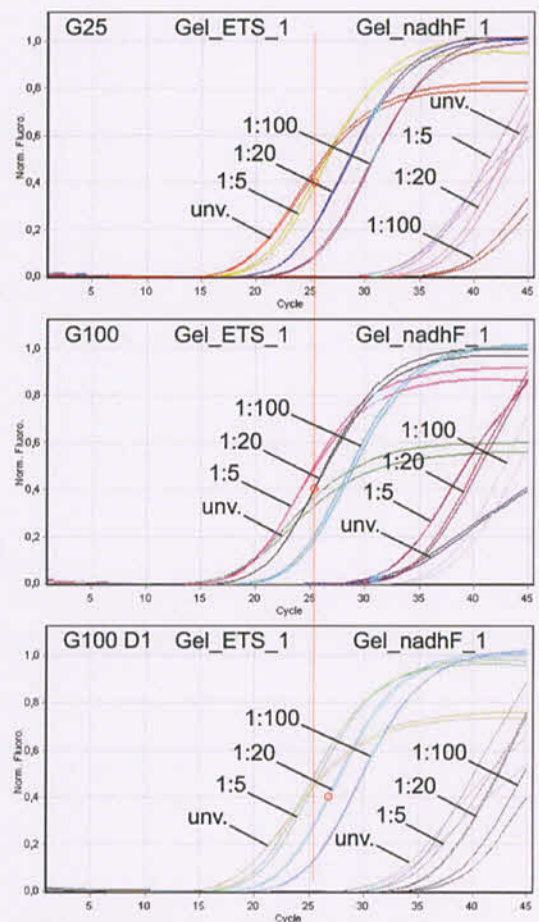


Abbildung 21: Fluoreszenzmessung während der PCR. Die jeweils linken Kurvenpaare zeigen den Verlauf der PCR mit dem Primerpaar Gel_ETS_1, die rechten den Verlauf mit dem Primerpaar Gel_nadhF_1. Oben: DNA aus 25 ml Urntinktur. Mitte: DNA aus 100 ml Urntinktur. Unten: DNA aus D1. (Die Proben in verschiedenen Verdünnungen verwendet).

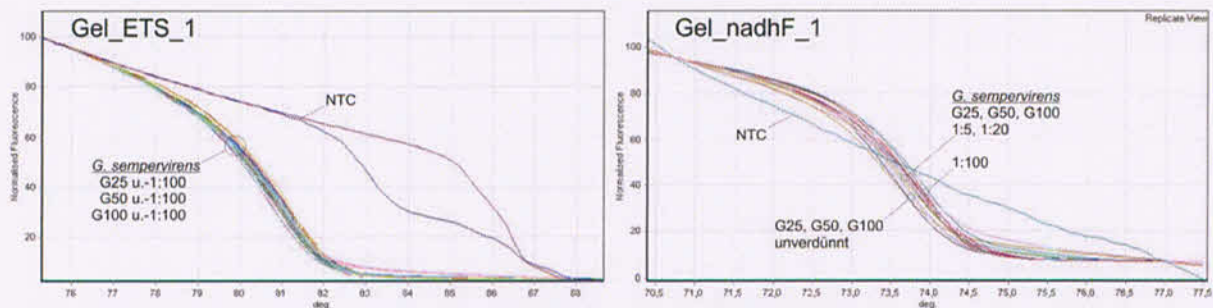


Abbildung 22: Links: Schmelzkurvenanalyse der DNA, welche aus der *Gelsemium sempervirens* Urtinktur extrahiert wurde. Die linke Grafik basiert auf dem Primerpaar Gel_ETS_1, die rechte auf dem Primerpaar Gel_nadhF_1. (Die Proben wurden aus 20, 50 bzw. 100 ml Urtinktur extrahiert und in verschiedenen Verdünnungen verwendet; Referenz: *G. sempervirens*).

3.5.3.4. Vermehrung der DNA mit re-PCR

Die re-PCR ist eine Möglichkeit geringste DNA-Mengen zu vermehren. Dazu wird eine PCR (ohne Schmelzkurvenanalyse) gemacht, mit einem Aufreinigungsschritt Primerreste entfernt und eine zweite PCR angeschlossen. Im Optimalfall verwendet man für die erste PCR Primer die ein etwas größeres DNA-Stück amplifizieren und für die zweite PCR andere Primer die weiter innen liegen und ein kürzeres DNA-Stück vervielfachen. Der Vorteil dabei ist, dass eventuell vorhandene Primerdimere aus der ersten PCR nicht weiter vervielfacht werden. Hat man keine passenden äußeren Primer, bzw. wäre das zu amplifizierende Stück zu lange, kann für beide PCRs auch die gleiche Primerkombination verwendet werden. Allerdings werden hier Primerdimere weiter vervielfacht.

Für den DNA-Nachweis in den Urtinkturen hat es sich gezeigt, dass diese Methode keine wesentlichen Vorteile gebracht hat. Im Fall von *Helleborus* war zwar sehr wenig DNA vorhanden, aber die Schmelzkurve war ausreichend gut für die Identifizierung. Bei einer durchgeführten re-PCR wurde die DNA-Menge zwar auf ein Vielfaches der Referenzproben weiter erhöht, allerdings zeigte die Schmelzkurven der Urtinktur-DNA dadurch ebenfalls eine geringe Abweichungen zu den Referenzen (Ergebnisse nicht abgebildet).

Im Fall der Pappel-Primer Pop_matK 1, bei welchen nach der ersten PCR nicht ausreichend Pappel-DNA für eine Schmelzkurvenanalyse vorhanden war, wurden in der zweiten PCR die Primerdimere so stark vervielfacht, dass auch hier keine Identifizierung möglich wurde (Ergebnisse nicht abgebildet). Wie man bei dem Primerpaar Pop_trnL 1 (Abbildung 20) sehen kann, bilden sich besonders in der Negativkontrolle in der ersten PCR verschiedene Primerdimere, die bei der re-PCR ein beträchtliches Ausmaß annehmen können und eine entsprechende Schmelzkurve zeigen. Im Allgemeinen gab es in dieser Versuchsserie keinen einzigen Fall, bei dem die zweite PCR/HRM erfolgreich war wenn in der ersten PCR noch keine DNA nachweisbar war.

3.5.3.5. Zugabe von Fremd-DNA zur Urtinktur

Bei der DNA-Extraktion aus Urtinkturen ergab sich folgende Frage:

Kann man nur in Pflanzenzellen eingeschlossene DNA aus der Urtinktur nachweisen oder auch frei in der Urtinktur vorkommende DNA? (Hintergrund: pflanzliche Sekundärstoffe können an die DNA binden. Diese Bindung inhibiert in weiterer Folge die DNA-Polymerase bei der PCR.)

Um diesen Fragen nachzugehen wurde zu 50 ml *Gelsemium* Urtinktur DNA in zwei Formen beigemischt. 1. fein gemahlenes Blattmaterial, soviel und wie normalerweise für eine DNA-Extraktion verwendet wird. Die DNA liegt hier (vorwiegend) in den Pflanzenzellen eingeschlossen vor. Es wurde eine schon zuvor getestete Probe von *Epilobium angustifolium* gewählt, da hier sowohl ITS- als auch Plastidenprimer zur Identifizierung vorhanden waren. 2. Bereits extrahierte DNA wurde der Urtinktur zugesetzt. Hier wurde eine Probe von *Peucedanum ostruthium* (Apiaceae) verwendet, da hier aus einem anderen Projekt ITS-Primer zur Identifizierung und Probenmaterial zur Verfügung standen. Es wurde 20 µl DNA-Extrakt, die Hälfte der Menge die man bei einer CTAB-Extraktion erhält, zur Urtinktur zugefügt. Die Urtinktur wurde dann zwei Stunden bei Raumtemperatur

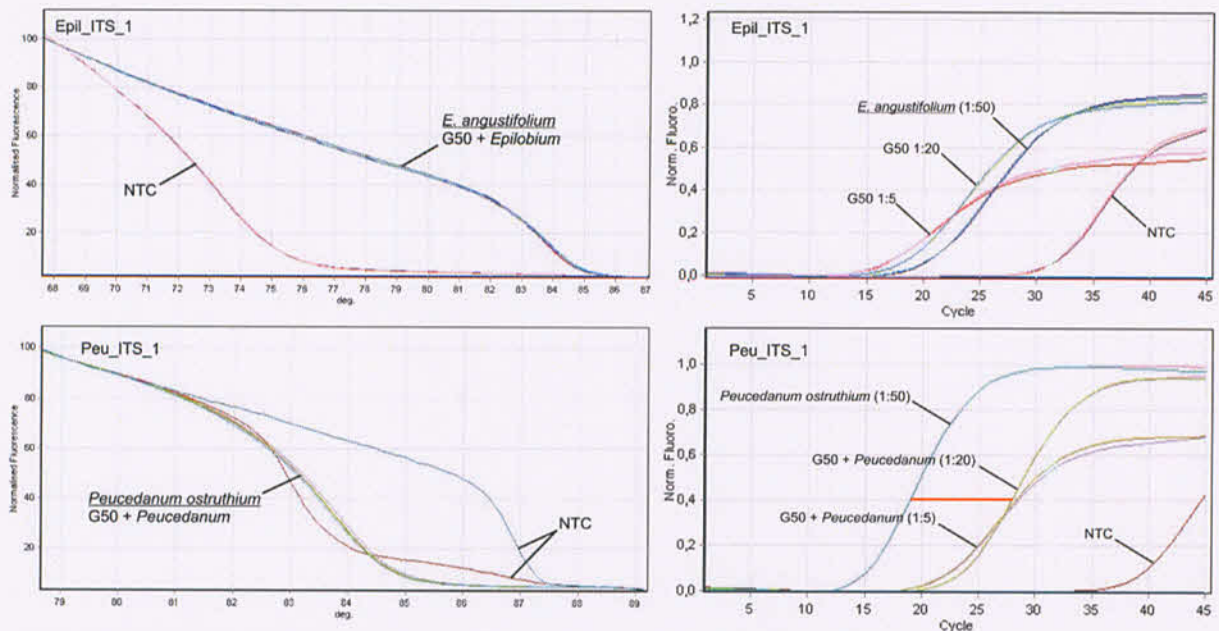


Abbildung 23: Nachweis von zugesetzter DNA zu *Gelsemium* Urntinktur. Oben: Nachweis von *Epilobium angustifolium*, welches als pulverisiertes Blatt zur Urntinktur beigemischt wurde. Unten: Nachweis von *Peucedanum ostruthium*, von welchem extrahierte DNA zugesetzt wurde. Links: Schmelzkurvenanalysen. Rechts: Fluoreszenzverlauf während der PCR.

gelagert, in der Annahme, dass sich inhibierende Inhaltsstoffe gegebenenfalls innerhalb dieser Zeit an die DNA binden würden. Danach wurde die Probenvorbereitung und DNA-Extraktion wie bei den anderen Urntinkturen durchgeführt. Als Referenzen wurde bei *Epilobium* DNA von derselben Probe verwendet, bei *Peucedanum* DNA aus demselben Extrakt der auch zugesetzt wurde.

Wie in Abbildung 23 links erkennbar, war sowohl die in Zellen gebundene *Epilobium*-DNA als auch die frei in der Urntinktur gelöste *Peucedanum*-DNA mit der Schmelzkurvenanalyse gut nachweisbar. Da die 1:20 Verdünnung der *Epilobium*-DNA einen um ca. 1,5-2 Zyklen niedrigeren C_T Wert wie die 1:50 Verdünnung der Referenz zeigt, kann die amplifizierte DNA-Menge als ca. gleich angesehen werden. Die in Zellen eingeschlossene *Epilobium*-DNA konnte also etwa vollständig aus der Urntinktur rückextrahiert werden.

Die freie DNA von *Peucedanum ostruthium* konnte dagegen nur in geringem Maße rückextrahiert werden. Da sich die C_T -Werte zwischen zugesetzter DNA und Referenzprobe um ca. 9-10 Zyklen (roter Balken in Abbildung 23, rechts unten) unterscheiden, würde (bei einer optimalen PCR) bei der zugesetzten DNA nur ein Fünfhundertstel bis Tausendstel der ursprünglich zugesetzten Menge vorliegen. Es ist naheliegend, dass die freie DNA mit den Waschschritten bei der Probenvorbereitung Großteils entfernt wird. Ein Anlagern von Inhaltsstoffen, die die DNA für die PCR völlig unbrauchbar macht, ist unwahrscheinlich, da die Verdünnung 1:20 im Verlauf der PCR keine Inhibition erkennen läßt.

4. Zielerreichung, Personaleinsatz und Angemessenheit der Arbeiten

4.1.1. Zielerreichung

Das Forschungsziel der molekularbiologischen Bestimmung der botanischen Arten wurde weitgehend erreicht. Die 2009 erarbeiteten Ergebnisse zur Identifizierung von *Helleborus niger* und *H. foetidus* konnten 2010 publiziert werden (Schmiderer et al., 2010). Die Identifikationen von *Populus tremuloides*, *P. tremula*, *Epilobium angustifolium* und *E. parviflorum* konnten 2010 vervollständigt und abgeschlossen werden. Ein Assay für die Identifikation von *Gelsemium sempervirens* konnte ebenfalls 2010 erfolgreich erstellt werden. Eine zuverlässige Identifikation von *Baptisia tinctoria* konnte mit dem vorhandenen Probenmaterial nicht erreicht werden.

Das Ziel der quantitativen Bestimmung der botanischen Arten in Vermischungen wurde teilweise erreicht. Es wurden außerdem neue, innovative Methoden entwickelt und publiziert (Mader et al., 2011). Im projektbegleitenden Ausschuß wurde beschlossen, der umfangreichen Problemstellung des Rückschlusses von quantitativer PCR/HRM auf die tatsächliche Menge an Pflanzenmaterial nicht weiter nachzugehen. Stattdessen konnte für die im Lauf der Projektsitzungen zusätzlich entstandene Frage nach der Validierbarkeit einer HRM-Methode ein gutes Ergebnis erzielt werden.

Auch für den Bereich der DNA-Extraktion aus Urtinkturen konnten gute Ergebnisse erzielt werden.

4.1.2. Personaleinsatz, Notwendigkeit und Angemessenheit der Arbeiten

Die Notwendigkeit und Angemessenheit der durchgeführten Arbeiten wird bestätigt. Das wissenschaftliche Personal wurde zur planmäßigen Erreichung der vorgegebenen Ziele eingesetzt. Die Aufteilung des Personaleinsatzes erfolgte vorwiegend nach Themenbereichen: Herr DI. Mader, welcher die Stelle des allgemeinen Projektassistenten bekleidete, hat den im Jahr 2009 bearbeiteten Bereich der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Beimischungen 2010 ergänzt und die Daten einem international angesehenen Journal publiziert. Weiters hat Herr Mader die Thematik der DNA-Extraktion aus Urtinkturen begonnen, welche von seiner Nachfolgerin, Frau Mag. Joana Ruzicka fertiggestellt wurde. Frau Ruzicka ergänzte ebenso den 2009 begonnenen Vergleich der DNA-Extraktionsmethoden und wertete die Ergebnisse aus.

Frau Mag. Corinna Schmiderer (wissenschaftlich-technische Projektassistentin) beschäftigte sich mit der Sammlung und Bestimmung der Referenzpflanzen aus dem Freiland und von den zur Verfügung gestellten Sammlungen. Sie erstellte die Identifizierungsassays der einzelnen Zielarten und übernahm die damit verbundenen Tätigkeiten wie z.B. der Erstellung von DNA-Sequenzen und Alignments und der Primerentwicklung.

Die studentischen Hilfskräfte wurden unter Anleitung der Projektassistenten im Wesentlichen für die DNA-Extraktionen der gesammelten Pflanzenproben nach Routineprotokollen eingesetzt. Zusätzlich wurden sie für Routinearbeiten wie z.B. für die Herstellung von Agarosegelen, Gebrauchslösungen und Verdünnungen und teilweise auch zum Pipettieren von PCRs eingesetzt.

In der Vergangenheit ist bereits mehrmals aufgefallen, dass publizierte Daten von einzelnen Proben oder Handelswaren wegen einer falschen Artidentifikation oder einer unzureichenden Probenanzahl nicht unbedingt zuverlässig sind. Die Sammlung und Untersuchung von einem morphologisch einwandfreien, repräsentativen, ausreichend umfangreichen Probenset für alle gewählten Zielarten ist daher für die Zuverlässigkeit der entwickelten Identifikationsmethoden extrem sinnvoll und notwendig.

Die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM) wurde als vorwiegende Analysenmethode gewählt, weil sie sich schon in vorangegangenen Projekten als zuverlässige, effektive Methode erwiesen hat. Aufgrund des geringen Zeitaufwandes und der vergleichsweise geringen laufenden Kosten pro Probe ist sie auch für Routinelabore praktikabel. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass bereits Spuren von DNA nachgewiesen und einer Pflanzenart zugeordnet werden können.

Es wurden keine Gegenstände über 410 € angeschafft.

5. Literatur

- DOYLE J (1991): DNA protocols for plants. In G Hewitt, A Johnston, J Young (eds): Molecular techniques in taxonomy. Berlin: Springer Verlag, p 283-5.
- MADER E, RUZICKA J, SCHMIDERER C, NOVAK J (2011): **Quantitative high-resolution melting analysis for detecting adulterations.** *Analytical Biochemistry* 409: 153-5.
- NOVAK J, GRAUSGRUBER-GRÖGER S, LUKAS B (2007): DNA-based authentication of plant extracts. *Food Research International* 40: 388-92.
- PIRTTILÄ AM, HIRSIKORPI M, KÄMÄRÄINEN T, JAAKOLA L, HOHTOLA A (2001): DNA Isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 273a-f.
- SCHMIDERER C, MADER E, NOVAK J. (2001): **DNA-based identification of *Helleborus niger* by high-resolution melting analysis.** *Planta Medica* 76: 1934-7.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S (2007): Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-9.
- WEISING K, GARDNER R (1999): A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
- WHITE TJ, BURNS T, LEE S, TAYLOR J (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In MA Inns, DH Geffand, JJ Sninsky, TJ White (eds): PCR Protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, p 315-1.
- WYATT R, BROYLES SB, HAMRICK JL, STONEBURNER A (1993): Systematic relationships within *Gelsemium* (Loganiaceae): Evidence from isozymes and cladistics. *Systematic Botany* 18: 345-55.

6. Danksagung

Wir danken folgenden Kollegen und Freunden herzlich dafür, dass sie in ihrer Freizeit unentgeltlich Pflanzenproben für uns gesammelt haben (in alph. Reihenfolge): Avni Hajdari (Kosovo), Dr. Brigitte Lukas, Dr. Monika Nell (Schweden u.a.), Dr. Thomas Pacher, Mag. Joana Ruzicka (Korsika), Jutta und Regina Sekara, Angelika Taurok und Martin Billensteiner (Irland), Erich Unterweger, A.Prof. Dr. Karin Zitterl-Eglseer.

Unser Dank gilt auch Dr. Walter Till, Herbarium der Universität Wien, Daniel Rohrauer und Dipl.Ing. Brigitte Mang, Bundesgärten Wien-Innsbruck, dem Herbarium der Universität Oxford, dem Missouri Botanical Garden Herbarium und den Kew Botanical Gardens, dass sie ihre Sammlung für dieses Projekt zur Verfügung gestellt haben und dass wir DNA Proben entnehmen durften.

Wir danken Ao.Prof. Dr. Rose Samuel, Department für Botanische Systematik und Evolutionsforschung der Universität Wien und Ao.Prof. Dr. Ralf Steinborn und Georg Mair, Technologieplattform VetOMICS der Veterinärmedizinischen Universität Wien, dass wir ihre Realtime-PCR Geräte unentgeltlich für die Methodvalidierung benutzen durften.

Schlußendlich danken wir auch den beteiligten Firmen und ihren Mitarbeitern für ihre Unterstützung und dass sie uns Urtinkturen und Pflanzenproben zur Verfügung gestellt haben: Dr. Wolfgang Guilliard (Hevert Arzneimittel), Dr. Gero Beckmann (Institut Romeis Bad Kissingen), Dr. Bernd Müller (Kräuter Mix), Dr. Lothar Kabelitz (PhytoLab), Ap. Michael Münch (Dr. Reckeweg), Dr. Rainer Volk (Schaper & Brümmer), Dr. Werner Müsch (Dr. Willmar Schwabe) und Dr. Menelaos Papagiannopoulos und Rene Wiget (Weleda).

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Frau Dr. Birgit Grohs und Frau Monika Saul (FAH) für die perfekte Organisation der Projektsitzungen und ihre prompte und geduldige Hilfe bei der Bewältigung aller Formalitäten. Das IGF-Vorhaben (15182 N) der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), Bonn wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

7. Anhang

7.1. Anhang 1: Protokoll zur verkürzten CTAB-DNA Extraktion

Ziel

Extraktion von Pflanzen-DNA nach der CTAB-Methode. Verkürzung des Originalprotokolls durch verringerte Zentrifugier- und Wartezeiten, nur für frisch getrocknetes, grünes Pflanzenmaterial empfohlen, bei welchen man DNA in guter Qualität und reichlicher Menge erwartet.

1. Vorbereitung

Wasserbad auf 65 °C vorheizen

Proteinase K auftauen (wenn nicht gleich gebraucht, auf Eis lagern)

2. Extraktion

Mastermix (MM): parallel zum Vermahlen der Proben in 50 ml Falcontubes herstellen, für 24 Proben 4 weitere als Pipettierüberschuss rechnen. MM im Wasserbad einige Minuten auf 65°C aufheizen.

Chemikalie	für 1 Probe	für 24 Proben (24+4)
CTAB-Extraktionspuffer	950 µl	26,6 ml
BME	0,95 µl	26,6 µl
10% SDS	41 µl	1,148 ml
Proteinase K	4,1 µl	114,8 µl
PVP 40 oder PVP K30	10 mg	280 mg

- 5-10 Glaskügelchen und getrocknetes Blattmaterial (ca. $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ cm²) in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße („Eppis“) geben, in der Retsch-Mühle ca. 1-3 min bei 30 Hz zu feinem Pulver vermahlen
- 1 ml MM zu jeder Probe pipettieren
- Eppis in einen Schaumstoffschwimmer klemmen, Proben $\frac{1}{2}$ Stunde bei 65°C im Wasserbad verdauen lassen, zwischendurch 1-2 mal schütteln
- Proben herausnehmen, abtrocknen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- 405 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zufügen, den Satz Proben 2 mal kräftig der Reihe nach durchschütteln
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand vorsichtig abheben und in ein neues beschriftetes 2 ml Eppi bringen, Rest entsorgen
- Erneut 405 µl Chloroform/IAA zugeben, schütteln und zentrifugieren wie oben
- ca. 0,9 ml Überstand in ein neues 1,5 ml Eppi bringen, Rest entsorgen

3. Fällung

- Überstand mit 540 µl Isopropanol überschichten (mind. 60 % des Extraktvolumens zugeben), vorsichtig mischen, ca. 30 min bei -20°C zur Fällung belassen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand vorsichtig dekantieren und entsorgen

4. DNA-Pellet waschen

- 1 ml Wash 1 zugeben, Pellet vom Eppi loslösen, den Satz Proben 2 mal aufschütteln
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand dekantieren und entsorgen
- 1 ml Wash 2 zugeben, Pellet wie oben 2 mal aufklopfen und schütteln
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand dekantieren und entsorgen
- DNA-Pellets bei 60°C 15-30 min (je nach restlicher Flüssigkeitsmenge) trocknen

5. DNA lösen

- 40 µl TE pH 8 zugeben, über Nacht im Kühlschrank lösen

7.2. Anhang 2: Liste der Primer, welche für die Artidentifizierungen bzw. für die Quantifizierung von Vermischungen verwendet werden können

Gattung	Primernamen	Annealing-Temperatur	Primer Sequenzen (5'→3')
<i>Helleborus</i>	Hel_trnL- trnF 1	57 °C	F: GGGCCATACTCCCTAACGAT R: GAAAGAGTAGAATGCCCGAGAA
	Hel_matK 3	56 °C	F: ATCCCTTCATGCATTATTTCCG R: TGAGACCAAAAAGTAAAAATGATATTCCC
<i>Veratrum</i>	Verat_trnLintron 112F Verat_trnLintron 154R	59/58 °C	F: AATAAAAAAGATAGGTGCAGAGACTCAAT R: TGTGGGCCATCCTTTCTTTAA
systematische Primer	Syst_matK1f ¹ Syst_comp1r ¹	58 °C	F: AACTCCTGAAAGATAAGTGG R: CCGAAGTCAAAAGAGCGATT
<i>Epilobium</i>	Epil_ITS 1	55 °C	F: GTTAATAACCAACTGGGATAATGGG R: GACCCGTTGGGCTACCC
	Epil_trnL- trnF 1	55 °C	F: GAACTTAGTTTTAGCGAGGAATCG R: CTTACCCAGGACCAAGTSTTTC
	Epil_matK 1	59 °C	F: TCATTGCACACGGCTTTCC R: AAGAAGAGTAGAGTAAGGGTTGATTAATGAG
	Epil_matK 2	59 °C	F: CCAAATACCAAATTCGACCTCTATATAAC R: TGGACGAATTCCTTACAGAGGAAG
	Epil_matK 3	55 °C	F: ACATAGTGCATACGGTCAAAGC R: TGATGAGTCTATTTATTICCGAGGTATT
	Epil_matK 5	59 °C	F: ATTCGTCCACTAATTCGGAACC R: CGTAAACATAAAAGTAGTGTACGCGC
<i>Populus</i>	Pop_matK 1	55 °C	F: CCTCTTCTGATGAAAAAATGGAA R: AAGCACACATCAAATGACATTG
	Pop_matK 2	57 °C	F: CATTTGCTCATGATCGTGACTTAAA R: CTGTTGATACATTTCGAGTAATTAACGTT
	Pop_trnL- trnF 1	57 °C	F: TCTTTGAGTAAAAACAAGGAATCCC R: GGTATTCTAAAGTCTTATCATTGTTAATCATT
<i>Gelsemium</i>	Gel_ETS 1	59 °C	F: GCCCGACGGTTTCCTG R: TTGGGACAAACGAATGCC
	Gel_nadhF 1	59 °C	F: AATAATTTGATGGATTGGTATGAATTT R: CTATAAATATCCCAAATAAGCTATACTGA
<i>Baptisia</i> (syst. Primer)	Syst_ITS5 ² Syst_ITS4 ²	60 °C	* ITS5: GGAAGGAGAAGTCGTAACAAG * ITS4: TCCTTCCGCTTATTGATATGC

¹ Weising & Gardner (1999)

² White et al. (1990)

7.3. Anhang 3: Liste der *Helleborus* Proben und Außengruppen, welche für die Analysen verwendet wurden

Probe	Proben Nummer	Herkunft / Fundort
<i>Helleborus argutifolius</i> Viv.	Hel22	AGB, kultiviert
<i>Helleborus argutifolius</i> Viv.	Hel09	Frankreich, Corse, Foret de Bonifatu
<i>Helleborus argutifolius</i> Viv.	Hel07-8	Frankreich, Corse, Lac de Nino
<i>Helleborus bocconeii</i> Ten.	Hel23	AGB, kultiviert
<i>Helleborus bocconeii</i> Ten.	Hel11	Italien, Sizilien, Melia
<i>Helleborus bocconeii</i> Ten.	Hel46	WU, Italien, Toskana
<i>Helleborus caucasicus</i> A. Braun	Hel48	WU, Georgien, Kartli
<i>Helleborus caucasicus</i> A. Braun	Hel47	WU, Georgien, Samtskhe-Javakheti
<i>Helleborus cyclophyllus</i> Boiss.	Hel24-25	AGB, kultiviert
<i>Helleborus cyclophyllus</i> Boiss.	Hel49	WU, Griechenland, Epirus orientalis
<i>Helleborus dumetorum</i> Waldst. & Kit. ex Willd.	Hel68-69	Österreich, Steiermark, Klapping
<i>Helleborus dumetorum</i> Waldst. & Kit. ex Willd.	Hel66-67	Österreich, Steiermark, Königsberg
<i>Helleborus dumetorum</i> Waldst. & Kit. ex Willd.	Hel63-65	Österreich, Steiermark, Weixelbaum
<i>Helleborus dumetorum</i> Waldst. & Kit. ex Willd.	Hel51	WU, Österreich, Burgenland, Pinkafeld
<i>Helleborus dumetorum</i> Waldst. & Kit. ex Willd.	Hel50	WU, Österreich, Steiermark, Mitterbachtal
<i>Helleborus foetidus</i> L.	Hel26	AGB, kultiviert
<i>Helleborus foetidus</i> L.	Hel03	Österreich, VetMedUni Wien, kultiviert
<i>Helleborus foetidus</i> L.	Hel02,06	kultiviert
<i>Helleborus foetidus</i> L.	Hel53	WU, Österreich, Niederösterreich, Blumau
<i>Helleborus foetidus</i> L.	Hel52	WU, Frankreich, Valon de Casterine
<i>Helleborus lividus</i> Ait. f.	Hel27	AGB, kultiviert
<i>Helleborus multifidus</i> Vis.	Hel54	WU, Botanischer Garten Uni Wien, kultiviert
<i>Helleborus multifidus</i> Vis.	Hel55	WU, Italien, Belluno, Cazzano Valtraminga
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel28-29	AGB, kultiviert
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel04-5	Österreich, VetMedUni Wien, kultiviert
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel99-104	Österreich, Niederösterreich, Lackenhof
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel71-77	Österreich, Niederösterreich, Maria Seesal
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel80-91	Österreich, Salzburg, Schafberg
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel01	Österreich, Steiermark
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel92	Österreich, Steiermark, Mitterbach
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel98	Österreich, Steiermark, Seebach Au
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel93	Österreich, Steiermark, Seebergalm
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel94-97	Österreich, Steiermark, Seewiesen
<i>Helleborus niger</i> L.	Hel56	WU, Österreich, Kärnten, Arnoldstein
<i>Helleborus odoratus</i> Waldst. & Kit. ex Willd.	Hel30	AGB, kultiviert
<i>Helleborus odoratus</i> Waldst. & Kit. ex Willd.	Hel12-14	Kosovo, Germe
<i>Helleborus odoratus</i> Waldst. & Kit. ex Willd.	Hel18-20	Kosovo, Prizren
<i>Helleborus odoratus</i> Waldst. & Kit. ex Willd.	Hel15-17	Kosovo, Suhareke
<i>Helleborus orientalis</i> Lam.	Hel33-35	AGB, kultiviert
<i>Helleborus orientalis</i> ssp. <i>abchasicus</i> Lam.	Hel57	WU, Österreich, Niederösterreich, Baden, kultiviert
<i>Helleborus orientalis</i> ssp. <i>guttatus</i> Lam.	Hel58	WU, Österreich, Niederösterreich, Baden, kultiviert
<i>Helleborus purpurascens</i> Waldst. & Kit.	Hel59-60	WU, Ungarn
<i>Helleborus</i> sp.	Hel40-42	AGB, kultiviert

<i>Helleborus viridis</i> Boiss.	Hel62	WU, Spanien, Navarra, Espinal-Anzperri
<i>Helleborus viridis</i> ssp. <i>occidentalis</i> Boiss.	Hel61	WU, Spanien, Cantrabria, Puerto de Palombera
<i>Helleborus</i> x <i>sternii</i> (<i>H. argutifolius</i> x <i>H. lividus</i>)	Hel36-37	AGB, kultiviert
<i>Aconitum lycoctonum</i> L. em. Koell.	Hel78	Österreich, VetMedUni Wien, kultiviert
<i>Adonis amurensis</i> Regel & Radde	Hel43	AGB, kultiviert
<i>Adonis vernalis</i> L.	Hel45	WU, AGB, kultiviert
<i>Caltha palustris</i> L.	Hel70	Österreich, Steiermark, Fohnsdorf
<i>Delphinium elatum</i> L.	Hel79	Österreich, VetMedUni Wien, kultiviert
<i>Eranthis hyemalis</i> (L.) Salisb.	Hel44	kultiviert

AGB: "Alpengarten" im Belvedere (Bundesgärten Wien-Innsbruck), Wien, Österreich
VedMedUni: Botanischer Garten der Universität für Veterinärmedizin Wien, Österreich
WU: Herbarium der Universität Wien, Österreich

7.4. Anhang 4: Liste der gesammelten *Epilobium* Proben und Außengruppen

Probe	Proben- Nummer	Herkunft / Fundort
<i>E. angustifolium</i>	E01	WU: Ö, Wien, S-Bahnstation Rennweg
<i>E. angustifolium</i>	E02	WU: Ö, Niederösterreich, Hühnerberg bei Baden
<i>E. angustifolium</i>	E03	WU: Ö, Niederösterreich, Kamptal
<i>E. angustifolium</i> ssp. <i>circumvagum</i>	E04	WU
<i>E. alsinifolium</i>	E05	WU: Georgien
<i>E. alsinifolium</i>	E06	WU: Ö, Tuxer Alpen, Schmirner Tal
<i>E. cf. parviflorum</i>	E07	WU: Ö, Niederösterreich, Wienerherberg
<i>E. parviflorum</i>	E08	WU: Ö, Niederösterreich, Weissenbachtal
<i>E. ciliatum</i> (= <i>E. adenocaulon</i>)	E09	WU: Ö, Niederösterreich, Bürgerspitalswald Baden
<i>E. ciliatum</i> (= <i>E. adenocaulon</i>)	E10	WU: Ö, Steiermark, Kl. Erlaufthal
<i>E. caucasicum</i>	E11	WU: Georgien
<i>E. parviflorum</i>	E12-25	Kräuter Mix, kultiviert in Ungarn oder Bulgarien
<i>E. angustifolium</i>	E26-33	Kräuter Mix, kultiviert in Deutschland
<i>E. adenocaulon</i>	E34	WU: Ö, Wien, S-Bahnstation Rennweg
<i>E. alpestre</i>	E35	WU: N-Italien, Trentiner Dolomiten
<i>E. alsinifolium</i>	E36	WU: Georgien
<i>E. alsinifolium</i>	E37	WU: Ö, Steiermark, Koralpe
<i>E. alsinifolium</i>	E38	WU: Ö, Steiermark, Altenberg a. d. Rax
<i>E. latifolium</i>	E39	WU: Altai, Valley of Chibitka
<i>E. latifolium</i>	E40	WU: W-Grönland
<i>E. macropus</i>	E41	WU: Neuseeland, Canterbury, Fog Peak
<i>E. melanocaulon</i>	E42	WU: Neuseeland, Canterbury
<i>E. montanum</i>	E43	WU: Ö, Burgenland, Pauliberg
<i>E. montanum</i>	E44	WU: Ö, Steiermark, Weichselboden
<i>E. montanum</i>	E45	WU: Spanien, Camino de Santiago
<i>E. montanum</i>	E46	WU: N-Italien, Trentiner Dolomiten
<i>E. nutans</i>	E47	WU: Pyren. orient.
<i>E. obscurum</i>	E48	WU: Ö, Oberösterreich, Tal des Wagnerbaches
<i>E. obscurum</i>	E49	WU: Ö, Oberösterreich, Bayrische Au S Torfau
<i>E. obscurum</i>	E50	WU: Ö, Steiermark, Altenberg a. d. Rax
<i>E. palustre</i>	E51	WU: Schweden
<i>E. palustre</i>	E52	WU: CH, Kanton Vaud
<i>E. palustre</i>	E53	WU: Ö, Steiermark, Ramsau b. Schladming
<i>E. palustre</i>	E54	WU: Spanien, Camino de Santiago
<i>E. cf. palustre</i>	E55	WU: Georgien

<i>E. porphyrium</i>	E56	WU: Neuseeland, Nelson Lakes NP
<i>E. prionophyllum</i>	E57	WU: Armenien
<i>E. roseum</i>	E58	WU: Ö, Niederösterreich, Ybbstaler Alpen
<i>E. roseum</i>	E59	WU: Ö, Wien, Bot. Garten der Uni Wien
<i>E. tetragonum</i> ssp. <i>tetragonum</i>	E60	WU: Ö, Burgenland, Seewinkel
<i>E. tetragonum</i> ssp. <i>tetragonum</i>	E61	WU: Ö, Niederösterreich, Marchegg
<i>E. tetragonum</i> ssp. <i>tetragonum</i>	E62	WU: Ö, Niederösterreich, Sollenau
<i>E. tetragonum</i>	E63	WU: Spanien, Camino de Santiago
<i>Oenothera</i> sp.	E64	Ö, Wien, Praterstraße
<i>E. dodonaei</i>	E65	Ö, Niederösterreich, Leiser Berge
<i>E. angustifolium</i>	E66-8	Ö, Steiermark, zw. St. Marein und Maria Schnee
<i>E. montanum</i>	E69-70	Ö, Steiermark, Maria Schnee
<i>E. cf. collinum</i>	E71-5	Ö, Steiermark, Maria Schnee
<i>E. montanum</i>	E76-8	Ö, Niederösterreich, Leiser Berge
<i>E. angustifolium</i>	E79-84	Ö, Wien, Universität für Bodenkultur
<i>E. montanum</i>	E85-7	Ö, Wien, Veterinärmedizinische Universität
<i>E. montanum</i>	E88-97	Ö, Steiermark, Spielberg
<i>E. adenocaulon</i>	E98	Ö, Steiermark, Spielberg
<i>E. angustifolium</i>	E99-101	Ö, Niederösterreich, Leiser Berge
<i>E. parviflorum</i>	E102-4	D, Heppenheim
<i>E. montanum</i>	E105-7, E111	Ö, Tirol, Raststation Angath
<i>E. cf. tetragonum</i>	E108	Ö, Tirol, Raststation Angath
<i>E. parviflorum</i> - ? Hybrid	E109-10	Ö, Tirol, Raststation Angath
<i>E. alpestre</i>	E112-3	Ö, Tirol, Weissensee NO des Fernpass
<i>E. angustifolium</i>	E114-6	Ö, Tirol, Weissensee NO des Fernpass
<i>E. cf. tetragonum</i>	E117	Ö, Tirol, Weissensee NO des Fernpass
<i>E. angustifolium</i>	E118-9	Ö, Tirol, zw. Oetz und Kühtai
<i>E. montanum</i>	E120	Ö, Tirol, zw. Oetz und Kühtai
<i>E. cf. tetragonum</i>	E121	Ö, Tirol, zw. Oetz und Kühtai
<i>E. cf. montanum x tetragonum</i>	E122	Ö, Tirol, zw. Oetz und Kühtai
<i>E. alpestre</i>	E123-4	Ö, Tirol, Wasserspeicher Längental
<i>E. angustifolium</i>	E125-7	Ö, Tirol, Wasserspeicher Längental
<i>E. cf. anagallidifolium</i>	E128-30	Ö, Tirol, zw. Kühtai und Gries
<i>E. Hybrid, non parviflorum</i>	E131	Ö, Tirol, zw. Kühtai und Gries
<i>E. cf. montanum x anagallidifolium</i>	E132-5	Ö, Tirol, zw. St. Sigmund und Gries
<i>E. angustifolium</i>	E136-7	Ö, Tirol, zw. Axams und Axamer Lizum
<i>E. montanum</i>	E138	Ö, Tirol, zw. Axams und Axamer Lizum
<i>E. cf. montanum</i>	E139	Ö, Tirol, zw. Axams und Axamer Lizum
<i>E. cf. anagallidifolium</i>	E140-1	Ö, Tirol, zw. Axams und Axamer Lizum
<i>E. angustifolium</i>	E142-3	Ö, Tirol, zw. St. Sigmund und Gries
<i>E. angustifolium</i>	E144-5	Ö, Tirol, Fernpaß
<i>E. angustifolium</i>	E146	Ö, Vorarlberg, Lech am Arlberg
<i>E. anagallidifolium</i>	E147	Ö, Vorarlberg, Lech am Arlberg
<i>E. cf. montanum</i>	E148	Ö, Vorarlberg, Lech am Arlberg
<i>E. Hybrid, non parviflorum</i>	E149	Ö, Vorarlberg, Lech am Arlberg
<i>E. cf. alsinifolium</i>	E150	Ö, Vorarlberg, Lech am Arlberg
<i>E. alpestre</i>	E151	Ö, Vorarlberg, Lech am Arlberg
<i>E. alpestre</i>	E152	Ö, Vorarlberg, Zug im Lechtal
<i>E. Hybrid, non parviflorum</i>	E153	Ö, Salzburg, Paß Thurn
<i>E. montanum</i>	E154-5	Ö, Salzburg, Maishofen bei Zell am See
<i>E. montanum</i> - Hybrid ?	E156	Ö, Salzburg, Maishofen bei Zell am See
<i>E. angustifolium</i>	E157-9	Ö, Salzburg, Maishofen bei Zell am See
<i>E. collinum</i>	E160-1	Ö, Salzburg, Maishofen bei Zell am See
<i>E. angustifolium</i>	E162-4	Ö, Ost-Tirol, Felber-Tauern
<i>E. angustifolium</i>	E165	Ö, Kärnten, Plöckenpaßstraße

<i>E. montanum</i>	E166-7	Ö, Kärnten, Plöckenpaßstraße
<i>E. angustifolium</i>	E168	Ö, Kärnten, Plöckenpaß
<i>E. montanum</i>	E169-72	Ö, Kärnten, Plöckenpaß
<i>E. angustifolium</i>	E173-4, E187	Ö, Kärnten, Turracher Höhe
<i>E. alpestre</i>	E175	Ö, Kärnten, Turracher Höhe
<i>E. anagallidifolium</i>	E176-7	Ö, Kärnten, Nockberge
<i>E. montanum</i>	E178	Ö, Kärnten, Nockberge
<i>E. cf. montanum</i>	E179-81	Ö, Kärnten, zw. Himmelberg und Feldkirchen
<i>E. parviflorum</i>	E182	Ö, Kärnten, St. Urban am Ossiacher See
<i>E. hirsutum</i>	E183	Ö, Kärnten, St. Urban am Ossiacher See
<i>Oenothera</i> sp.	E184	Ö, Kärnten, St. Urban am Ossiacher See
<i>E. cf. parviflorum</i>	E185	Ö, Niederösterreich, Lackenhof
<i>E. parviflorum</i>	E186	Ö, Oberösterreich, Botanischer Garten Linz
<i>E. hirsutum</i>	E188-9	Ö, Wr. Neustädter Kanal nahe Mödling
<i>Epilobium</i> sp.	E190-3	Ö, Steiermark, Gaberl
<i>Epilobium</i> sp.	E194-7	Ö, Steiermark, Rettlkirchspitze
<i>E. alpestre</i>	E198	Ö, Niederösterreich, Ötscher
<i>Epilobium</i> sp.	E199-204	Ö, Niederösterreich, Ötscher
<i>E. parviflorum</i>	E205	WU: Ö, Niederösterreich, Marchfeld
<i>E. parviflorum</i>	E206	WU: Ö, Niederösterreich, Oberwaltersdorf
<i>E. parviflorum</i>	E207	WU: Ö, Niederösterreich, Lanitzberg
<i>E. parviflorum</i>	E208	WU: Spanien, Camino de Santiago, El Bierzo
<i>E. hirsutum</i>	E209-11	Ö, Kärnten, St. Urban am Ossiacher See
<i>E. parviflorum</i>	E212	Ö, Niederösterreich, Ötscher
<i>E. angustifolium</i>	E213	Süd-Irland
<i>E. parviflorum</i>	E214-8	Süd-Irland
<i>E. hirsutum</i>	E219-23	Süd-Irland
<i>E. angustifolium</i>	E224	Schottland, Edinburgh

7.5. Anhang 5: Liste der verwendeten *Populus* Proben

Probe	Proben- Nummer	Herkunft / Fundort
<i>Populus alba</i>	Pop01	WU: Ö, Wien
<i>Populus alba</i>	Pop02	WU: Süd-Frankreich, Alpes des Hautes Provençe
<i>Populus angustifolia</i>	Pop03	WU: USA, Wyoming
<i>Populus balsamifera</i>	Pop04	WU: USA, Wyoming
<i>Populus deltoides</i>	Pop05-6	WU: USA, Ohio
<i>Populus fremonti</i> cf. var. <i>wislizeni</i>	Pop07	WU: Mexiko, Paso del Norte
<i>Populus grandidentata</i>	Pop08-9	WU: USA, Kentucky, Laurel County, SW von London
<i>Populus hyrcana</i>	Pop10	WU: Aserbaidschan, Waldreservat Qirkan qorugu
<i>Populus hyrcana</i>	Pop11	WU: Aserbaidschan, Stausee Xanbulaq su anb.
<i>Populus euphratica</i>	Pop12	WU: Jordanien, District of Amman
<i>Populus nigra</i>	Pop13	Ö, Wien, 22. Bezirk
<i>Populus</i> cf. <i>nigra</i>	Pop14	WU: Wien, kultiviert im Bot. Garten der Uni Wien
<i>Populus nigra</i>	Pop15	Ö, Wien, 3. Bezirk, Prater
<i>Populus</i> cf. <i>nigra</i>	Pop16	WU: Ö, Wien, 22. Bezirk
<i>Populus nigra</i> cf. cv. <i>serotina</i>	Pop17	WU: Niederösterreich, Wiener Becken
<i>Populus nigra</i> var. <i>pyramidalis</i>	Pop18	Wien, Bot. Garten der Uni Wien
<i>Populus nigra</i> var. <i>pyramidalis</i>	Pop19	WU: Ö, Wien, 3. Bezirk
<i>Populus tremula</i>	Pop20	Ö, Wien, Bot. Garten der Uni Wien
<i>Populus tremula</i>	Pop21	Ö, Wien, Wienerwald
<i>Populus tremula</i>	Pop22	WU: Ö, Steiermark
<i>Populus tremula</i>	Pop23	WU: Ö, Wien, Lobau
<i>Populus tremula</i>	Pop24	WU: Ö, Oberösterreich, Lichtenverg

<i>Populus tremula</i>	Pop25	WU
<i>Populus tremuloides</i>	Pop26	WU: USA, California, Alpine County
<i>Populus tremuloides</i>	Pop27	WU: Canada, Halifax
<i>Populus tremuloides</i>	Pop28	WU: Canada, Yukon Territory
<i>Populus villosa</i>	Pop29	WU: Spanien
<i>Populus villosa</i>	Pop30	WU: Ungarn, Budapest
<i>Populus alba</i>	Pop31-3	Ö, Wien, Prater
<i>Populus tremula</i>	Pop34-5	Ö, Wien, 14. Bezirk, Wienerwald
<i>Populus tremula</i>	Pop36-7	Fa. Hevert
<i>Populus tremuloides</i>	Pop38	Fa. Hevert
<i>Populus nigra</i> var. <i>pyramidalis</i>	Pop39	Ö, Niederösterreich, Petronell
<i>Populus</i> sp.	Pop40-1	Ö, Niederösterreich, Petronell
<i>Populus tremula</i>	Pop42	Ö, Steiermark, Spielberg
<i>Populus tremula</i>	Pop43	Ö, Steiermark, Semmering
<i>Populus tremula</i>	Pop44-5	Ö, Niederösterreich, Leiser Berge
<i>Populus lasiocarpa</i>	Pop46	Ö, Wien, kultiviert
<i>Populus</i> sp.	Pop47-8	Schweden, Uppsala
<i>Populus tremula</i>	Pop49	Ö, Niederösterreich, zw. Haidlhof und Steinbruch Großau
<i>Populus tremula</i>	Pop50	Ö, Steiermark, Maria Schnee
<i>Populus tremula</i>	Pop51	Ö, Oberösterreich, Linz
<i>Populus alba</i>	Pop52	Ö, Oberösterreich, Linz
<i>Populus simonii</i>	Pop53	Ö, Oberösterreich, Linz
<i>Populus balsamifera</i>	Pop54	Ö, Oberösterreich, Linz
<i>Populus</i> cf. <i>balsamifera</i>	Pop55	Ö, Wien, 12. Bezirk
<i>Populus tremula</i>	Pop56	Ö, Salzburg, Maishofen
<i>Populus tremula</i>	Pop57	Ö, Kärnten, Kötschach-Mauthern
<i>Populus tremula</i>	Pop58	Ö, Steiermark, Übelbachgraben
<i>Populus</i> sp.	Pop59	Mexiko, zw. Bernal und Ezequiel Montes
<i>Populus</i> sp.	Pop60	Ö, Niederösterreich, Petronell
<i>Populus</i> sp.	Pop61-3	USA, Indiana
<i>Populus acuminata</i>	Pop64	RBG Kew: Living Collection
<i>Populus adenopoda</i>	Pop65	RBG Kew: China, Yunnan
<i>Populus balsamifera</i>	Pop66	RBG Kew
<i>Populus euphratica</i>	Pop67	RBG Kew: unknown
<i>Populus euphratica</i>	Pop68	RBG Kew: unknown
<i>Populus ilicifolia</i>	Pop69-70	RBG Kew: Kenia, Athi-galana
<i>Populus nigra</i> var. <i>betulifolia</i>	Pop71	RBG Kew: UK, E Sussex, valley of River Ouse
<i>Populus octarabdos</i>	Pop72	RBG Kew: Living Collection
<i>Populus purdomii</i>	Pop73	RBG Kew: Living Collection
<i>Populus szechuanica</i>	Pop74	RBG Kew: Living Collection
<i>Populus wilsonii</i>	Pop75	RBG Kew: Living Collection
<i>Populus yunnanensis</i>	Pop76	RBG Kew: China, Yunnan

RBG Kew: Royal Botanical Garden Kew, GB

7.6. Anhang 6: Liste der *Gelsemium* Proben und Außengruppen, welche für die Analysen verwendet wurden

Probe	Anzahl	Proben-Nummer	Herkunft / Fundort
<i>G. rankinii</i>	1	Gel01	WU
<i>G. rankinii</i>	1	USA06	MOBOT: Picayune, Mississippi
<i>G. elegans</i>	1	USA07	MOBOT: China
<i>G. rankinii</i>	1	USA21	Oxford (23476): Johnson State Park, Mississippi
<i>G. rankinii</i>	1	USA22	Oxford (74567)

<i>G. sempervirens</i>	1	USA23	Oxford (66847)
cf. <i>Lonicera</i>	1	USA25	USA: Vicksburg, Mississippi (32°18.384' N; 090°53.420' W; 165ft)
<i>G. sempervirens</i>	1	USA26	USA: Natchez, Mississippi (31°33.815' N; 091°24.256' W; 203ft)
<i>G. sempervirens</i>	3	USA27-29	USA: Meadville, Mississippi (31°26.486' N; 090°51.448' W; 216ft)
<i>G. sempervirens</i>	14	USA30-50	USA: Pensacola, Florida (30°40.759' N; 087°19.597' W; 30ft)
cf. <i>Lonicera</i>	7	USA30-50	USA: Pensacola, Florida (30°40.759' N; 087°19.597' W; 30ft)
<i>G. sempervirens</i>	5	USA51-55	USA: Defuniak Springs, Florida (30°41.677' N; 086°07.237' W; 224ft)
<i>Gelsemium</i> sp.	13	USA56-68	USA: Statenville, Georgia (30°45'07.1" N; 083°06'41.5" W; 189ft)
<i>G. sempervirens</i>	11	USA71-81	USA: Valdosta, Georgia (30°51'36" N; 083°10'47.0" W; 229ft)
cf. <i>Smilax</i>	1	USA82	USA: Valdosta, Georgia (30°51'36" N; 083°10'47.0" W; 229ft)
<i>Gelsemium</i> sp.	18	USA83-100	USA: Belvedere, S-Carolina (33°37'26.1" N; 082°01'58.6" W; 232ft)
cf. <i>Lonicera</i>	2	USA101-02	USA: Belvedere, S-Carolina (33°37'26.1" N; 082°01'58.6" W; 232ft)

MOBOT: Missouri Botanic Garden's Herbarium, St. Louis, USA

Oxford: University of Mississippi, Oxford, USA

WU: Herbarium der Universität Wien, Österreich

7.7. Anhang 7: Liste der gesammelten *Baptisia* Proben

Probe	Proben-Nummer	Herkunft / Fundort
<i>B. tinctoria</i>	USA001	MOBOT: Baltimore, Co, Maryland
<i>B. tinctoria</i>	USA002	MOBOT: Georgia, Rabun County, Chattahoochee National Forest
<i>B. serенаe</i> Curtis?	USA003	MOBOT: North Carolina
<i>B. alba</i> (L.) Vent. var. <i>macrophylla</i>	USA004	MOBOT: Madison, McDonough Lake
<i>B. alba</i>	USA008	Oxford: Herbar Nr. 74017
<i>B. alba</i>	USA009	Oxford: Herbar Nr. 76828
<i>B. alba</i>	USA010	Oxford: Herbar Nr. 22954; Greenville, S-Carolina, USA
<i>B. australis</i>	USA011	Oxford: Herbar Nr. 23061; Durham, N-Carolina, USA
<i>B. bracteata</i>	USA012	Oxford: Herbar Nr. 23082; McCormick, S-Carolina, USA
<i>B. lanceolata</i>	USA013	Oxford: Herbar Nr. 65331; Union, Florida, USA
<i>B. leucantha</i>	USA014	Oxford: Herbar Nr. 9275; George, Mississippi, USA
<i>B. pendula</i>	USA015	Oxford: Herbar Nr. 23117; McCormick, S-Carolina, USA
<i>B. psommophila</i>	USA016	Oxford: Herbar Nr. 5828; Tattall, Georgia, USA
<i>B. tinctoria</i>	USA017	Oxford: Herbar Nr. 48794; Hampshire, Massachusetts, USA
<i>B. tinctoria</i>	USA018	Oxford: Herbar Nr. 50935; Washington, Rhode Island, USA
<i>B. australis</i>	Bap01	WU: Bot. Garten der Uni Wien
<i>B. tinctoria</i>	Bap02	Fa. Hevert, Rückstellmuster
<i>B. tinctoria</i>	Bap03	Fa. Hevert, Rückstellmuster
<i>B. ? tinctoria</i>	Bap04	Pharmazeutisches Institut der Uni Kiel
<i>B. ? tinctoria</i>	Bap05	Pharmazeutisches Institut der Uni Kiel
<i>B. ? tinctoria</i>	Bap06	Pharmazeutisches Institut der Uni Kiel
<i>B. ? tinctoria</i>	Bap07	Pharmazeutisches Institut der Uni Kiel