## Extended Abstract

# DNA Barcoding von pflanzlichen Handelswaren – irrsinnig einfach oder einfach irrsinnig?

Corinna Schmiderer & Johannes Novak

Die Überprüfung der Identität der Art(en) ist ein wichtiger Teil der Qualitätskontrolle pflanzlicher Handelswaren. In den letzten Jahren wurden im zunehmenden Maße Methoden zur Identitätsbestimmung von pflanzlichen Handelswaren publiziert, bei welchen mittels ‚*DNA-Barcoding*' die Artzugehörigkeit dieser Proben nachgewiesen werden sollte. Dazu wird in der Regel DNS von Handelsproben extrahiert, ein oder mehrere Standard ‚*DNA barcode loci*' mittels PCR amplifiziert, und die durch Sanger-Sequenzierung erhaltenen DNS-Sequenzen mit Referenzsequenzen verglichen. Im Grunde genommen klingt dieses Vorgehen zwar ziemlich einfach, allerdings sollten die Ergebnisse kritisch überprüft werden, um ein gutes Maß an Verlässlichkeit gewährleisten zu können. Einige Kritikpunkte sollen hier aufgezeigt werden.

Bei den meisten pflanzlichen Handelsproben sollte man eigentlich davon ausgehen, dass es sich immer um Mischproben handelt, da weder im Anbau, noch bei Wildsammlungen vermieden werden kann, dass zumindest geringe Anteile an Unkräutern, versehentlich mitgeernteten Pflanzen oder sonstigen Verunreinigungen vorhanden sind. Obwohl selbst für Arzneidrogen geringe Verunreinigungen erlaubt sind (entsprechend dem Europäischen Arzneibuch im Regelfall 2 %), können diese die PCR-Ergebnisse wesentlich verzerren. Selbst von häufig verwendenten, sogenannten „universellen" Primern, die für Standard *DNA barcode loci* (z.B. rbcL, matK, psbA-trnH, ITS) verwendet werden, ist bekannt, dass sie nicht bei allen Taxa gleich gut binden und daher teilweise keine sequenzierbaren PCR-Produkte liefern. Unterschiedliche Mutationen in den Primerbindungsstellen und unterschiedliche PCR Effizienzen können dazu führen, dass einerseits der Großteil der DNS in der Probe unzureichend amplifiziert wird, andererseits aber geringe Beimischungen unverhältnismäßig gut vervielfältigt werden. Das daraus entstehende Sequenzchromatogramm könnte daher eindeutig einer Beimischung zuzuordnen sein. Bei Handelswaren, die dafür bekannt sind, häufig mit bestimmten Arten verfälscht zu werden, sollte also getestet werden, wie gut die gewünschte Art und die Verfälschung mit den verwendeten Primern detektiert werden können. Es kann so besser abgeschätzt werden, ob mit der angewandten Methode der Anteil der Verfälschung wesentlich über- oder unterschätzt wird. Ein weiteres unterschätztes Problem sind die derzeit unvollständigen Referenz-Datenbanken. Um eine Sequenz sicher einer Art zuordnen zu können, muss nicht nur eine Referenz (oder besser mehrere Referenzen) der mutmaßlichen Zielart, sondern auch Referenzen nahe verwandter Arten zugänglich sein. Es kann sonst nicht ausgeschlossen werden, dass es sich selbst bei sehr hoher Sequenzähnlichkeit tatsächlich nur um eine nah verwandte Art handelt.

Kurz zusammengefaßt kann man also feststellen, dass die Methode des *DNA-barcodings* von pflanzlichen Handelsproben zwar grundsätzlich „irrsinnig einfach" ist, bei fehlender kritischer Überprüfung der Ergebnisse – besonders bei unerwarteten, aber auch bei erwarteten – man sich aber auch sehr einfach in die Irre führen lassen kann.

**Schmiderer C. & Novak J., 2017: DNA Barcoding of botanicals – insanely simple or simply insane?**
The verification of the species is an important part of quality control of herbal trade samples. In the last years sophisticated methods have been published, where DNA barcoding was used in order to assign botanicals to species. For this purpose DNA was extracted from the botanicals, one or several standard DNA barcode loci were PCR amplified and sequenced by Sanger sequencing. Subsequently, the obtained sequences were compared with reference sequences. This approach is rather simple, but such results need to be critically reviewed to allow reliable conclusions. Some critical points are highlighted below.
In general, one should assume that all botanicals are species mixtures. It is impossible to avoid contaminations with weeds, co-harvested plants or other adulterations, neither in cultivated plants nor in plant materials collected from the wild. Therefore, in most regulations, a certain degree of impurities is allowed (in the European Pharmacopoeia e.g. the general limit is 2 %), these contaminants can significantly distort the PCR results. For commonly used "universal" or "general" primers amplifying standard DNA barcoding loci (like *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *ITS*) it is known that amplification works not equally well in all plant families. Hence, depending on the primers applied, several taxa may not show any or no adequate PCR products, which can be sequenced. Various mutations in the primer binding sites and varying PCR efficiencies can for instance prevent the proper amplification of the major sample part, while minor admixtures might be efficiently amplified. In such a case it would be likely, that resulting sequence chromatograms unambiguously show the sequence of the corresponding admixtures although the respective species is present in the sample below the required limit only. For trade materials which are known to be commonly substituted by other species, it should be compared how efficiently the desired material and commonly used substitutes can be amplified. Thus, it can be evaluated, which species would be over- or underestimated in a species mixture. Another problem rarely considered is the current incompleteness of reference databases. To reliably assign a specimen to a species, at least one reference sequence (better several references) of the target species and also references of closely related species are obligatory. If only references of the target species are available, but no references of related species, the assignment to the species remains doubtful, even if the sequence similarity to the reference sequence is very high.
It can be concluded, that the procedure of DNA barcoding of botanicals is in principle rather simple, but without careful revision of the results, particularly unforeseen results but also expected ones, the findings can be easily misleading.

**Keywords:** DNA barcoding, plants, critique, quality control, trade samples.

## Anschriften:

Dr. Corinna Schmiderer, Institut für Tierernährung und Funktionelle Pflanzenstoffe, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.
E-mail: Corinna.Schmiderer@vetmeduni.ac.at

Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Johannes Novak, Institut für Tierernährung und Funktionelle Pflanzenstoffe, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.
E-mail: Johannes.Novak@vetmeduni.ac.at

# ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien. Frueher: Verh.des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien. seit 2014 "Acta ZooBot Austria"

Jahr/Year: 2017

Band/Volume: 154

Autor(en)/Author(s): Schmiderer Corinna, Novak Johannes

Artikel/Article: DNA Barcoding von pflanzlichen Handelswaren – irrsinnig einfach oder einfach irrsinnig? 203-204