

Hydrolat-Komposition von drei
Pinus cembra L. Populationen in
Österreich

MASTERARBEIT

Autor

Felix Billiani

Betreuung

Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Johannes Novak

Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe

Veternärmedizinische Universität Wien

Wien, April 2019

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle aus ungedruckten Quellen, gedruckter Literatur oder aus dem Internet im Wortlaut oder im wesentlichen Inhalt übernommenen Formulierungen und Konzepte gemäß den Richtlinien wissenschaftlicher Arbeiten zitiert, durch Fußnoten gekennzeichnet bzw. mit genauer Quellenangabe kenntlich gemacht habe.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'F. Billiani', with a long horizontal line extending to the right.

Felix Billiani

Wien am 04.06.2019

Abstract

Since the composition of volatile compounds of the hydrolate of the Swiss stone pine (*Pinus cembra* L., Pinaceae) was not analyzed yet, the hydrolates from three Austrian *P. cembra* populations (East-Tyrol, Carinthia & Styria) were analyzed. Ten samples (Needles, shoots & branches) from individual trees of each population were taken, processed through water steam distillation and the obtained hydrolate was finally analyzed by GC/MS. Overall 70 components were found in all samples, whereas 49 could be identified. The main components in the population of East-Tyrol were α -terpineol (33.1% \pm 21.8), terpinen-4-ol (7.0% \pm 4.4), verbenone (6.3% \pm 4.3), *cis-p*-menth-2-en-1-ol (4.7% \pm 2.4) and α -cadinol (6.3% \pm 2.8). Main components in the Carinthian population were α -terpineol (34.1% \pm 16.7), terpinen-4-ol (7.8% \pm 1.40), verbenone (7.0 \pm 1.3), *cis-p*-menth-2-en-1-ol (4.2% \pm 2.0) and myrtenal (4.1% \pm 0.6). The population in Styria showed following main compounds: α -terpineol (27.0% \pm 29.5), terpinen-4-ol (6.4% \pm 1.6), verbenone (6.2% \pm 2.5), germacrene-D (6.0% \pm 23.7), *cis-p*-menth-2-en-1-ol (3.9 \pm 0.2) and crypton (3.7% \pm 3.4). Principal Component Analysis (PCA) and Local Fisher Discriminance Analysis (LFDA) showed a clear separation of the Styrian from the two other populations according to the hydrolate profile. This significant difference might be a result of the geographical isolated location of this population.

Key words: *Pinus cembra* L.; Swiss stone pine; Hydrolate; Water steam distillation

Zusammenfassung

Da die Zusammensetzung der flüchtigen Inhaltsstoffe des Hydrolates der Zirbe (*Pinus cembra* L., Pinaceae) noch nicht bekannt ist, obwohl es als wertvolles Handelsprodukt ist, beschäftigt sich diese Masterarbeit mit der Komposition des Hydrolates von drei Zirbenpopulationen aus Österreich (Osttirol, Kärnten & Steiermark). Hierbei wurden jeweils zehn Proben (Nadeln; Triebspitzen & Äste) jeder Population genommen, mittels Wasserdampfdestillation destilliert und das gewonnene Hydrolat mit GC/MS analysiert. Insgesamt wurden 70 Komponenten in allen Proben gefunden, wovon 49 identifiziert werden konnten. Die Hauptkomponenten in der Population in Osttirol waren α -Terpineol (33,1% \pm 21,8), Terpinen-4-ol (7,0% \pm 4,4), Verbenon (6,3% \pm 4,3), cis-p-Menth-2-en-1-ol (4,7% \pm 2,4) und α -Cadinol (6,3% \pm 2,8). In der Kärntner Population waren die Hauptkomponenten α -Terpineol (34,1% \pm 16,7), Terpinen-4-ol (7,8% \pm 1,40), Verbenon (7,0 \pm 1,3), cis-p-Menth-2-en-1-ol (4,2% \pm 2,0) und Myrtenal (4,1% \pm 0,6). In der Population in der Steiermark waren die Hauptkomponenten α -Terpineol (27,0% \pm 29,5), Terpinen-4-ol (6,4% \pm 1,6), Verbenone (6,2% \pm 2,5), Germacrene-D (6,0% \pm 23,7), cis-p-Menth-2-en-1-ol (3,9 \pm 0,2) und Crypton (3,7% \pm 3,4). Durch Principal Component Analysis (PCA) und Local Fisher Discriminance Analysis (LFDA) konnte festgestellt werden, dass sich die Population in der Steiermark signifikant von den anderen beiden unterscheidet. Dieser signifikante Unterschied ergab sich möglicherweise durch die isolierte geographische Lage der steirischen Population.

Schlagwörter: *Pinus cembra* L.; Zirbe; Arve; Zirbelkiefer; Hydrolat; Wasserdampfdestillation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Die Zirbe - <i>Pinus cembra</i> L.....	8
1.1.1 Taxonomie.....	8
1.1.2 Biologie.....	8
1.1.3 Verbreitung.....	10
1.1.4 Nutzung.....	10
1.2. Hydrolate.....	11
1.2.1 Herstellung.....	11
1.2.2 Eigenschaften.....	12
1.2.3 Anwendung.....	13
1.3 Gas Chromatographie.....	14
1.3.1 Berechnung der Retentionsindices.....	16
2. Fragestellung.....	17
3. Material & Methoden.....	18
3.1 Standorte der Probenahme.....	18
3.1.1 Kärnten (Sirnitz).....	18
3.1.2 Osttirol (Defereggental).....	19
3.1.3 Steiermark (Kemetgebirge).....	20
3.2 Pflanzenmaterial.....	21
3.2.1 Zerkleinern der Proben.....	23
3.3.2 Restfeuchtebestimmung.....	23
3.3 Wasserdampfdestillation.....	24
3.3.1 Herstellen der Hydrolat-Proben.....	24

3.4 Analyse der Proben	25
3.4.1 Vorbereitung der Proben für GC/MS.....	25
3.4.2 Parameter GC/MS	25
3.4.3 Datenauswertung & Identifikation der Komponenten	26
3.5 Statistik.....	26
4. Ergebnisse.....	27
4.1 Komposition der Hydrolate	27
4.1 Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).....	36
4.2 Principal Component Analysis (PCA)	38
4.3 Local Fisher Discriminance Analysis (LFDA).....	41
5. Diskussion.....	42
6. Aussichten	45
7. Danksagung	46
8. Tabellenanhang	48
9. Literatur	50

1. Einleitung

Die Zirbe (*Pinus cembra* L., Pinaceae) erfreut sich seit bereits vielen Jahren, dank ihrer robusten Bauholzeigenschaften und ihres Duftes großer Beliebtheit und wird daher gerne zur Herstellung von Innen- und Außenfassaden, als auch als Möbelholz genutzt (Roloff et al. 2014). Durch seine warmen und harzigen Noten ist ihr ätherisches Öl ist speziell in Tourismusregionen ein beliebtes Souvenir. In der Vergangenheit haben sich viele Studien mit der Untersuchung des ätherischen Öls der Zirbe und dessen Eigenschaften befasst, jedoch gibt es bis heute keine Arbeit, welche sich dem Hydrolat oder Pflanzenwasser der Zirbe angenommen hat. Hydrolat oder Pflanzenwasser ist mit sekundären Pflanzenstoffen wie Phenolen und Terpenen, angereichertes, destilliertes Wasser und entsteht als Beiprodukt bei der Herstellung von ätherischen Ölen durch Wasserdampfdestillation (Catty, 2001; Al-Turki, 2007). In vielen Studien wurden bereits die Eigenschaften von Hydrolaten verschiedener Pflanzen untersucht und sowohl ihre antimikrobielle als auch antioxidative Wirkung nachgewiesen (Diba et al, 2015; Rajeswara Rao, 2013; Hussien et al, 2011). Studien von Morshedloo et al. (2018) und Mahdih et al. (2018) untersuchten bereits intraspezifische Unterschiede des ätherischen Öls bei Sumach (*Rhus coriaria* L.) und Salbei (*Salvia nemorosa* L.) und konnten verschiedene Chemotypen in unterschiedlichen geographischen Regionen feststellen. Da bei der Zirbe (*Pinus cembra* L.) keine Chemotypen mit geographischen Bezug zu ihrem Hydrolat bekannt sind, wird in dieser Studie der Chemotyp des Hydrolates von drei Populationen untersucht und damit Rückschluss auf mögliche populationsgenetische Eigenschaften gezogen.

1.1 Die Zirbe - *Pinus cembra* L.

1.1.1 Taxonomie

Die Familie der Kieferngewächse (Pinaceae) ist die größte Familie der Koniferen (Coniferales) und umfasst etwa 225 Spezies (Farjon, 2005). Die Zirbe, Zirbelkiefer oder Arve (*Pinus cembra* L.) gliedert sich neben weiteren 110 Arten in die Gattung *Pinus* ein und wird im deutschsprachigen Raum wegen ihrer einzigartigen sensorischen, biologischen und ökologischen Eigenschaften auch als „Königin der Alpen“ bezeichnet (Holzinger, 2005).

Abteilung	Spermatophyta
Organisationsstufe	Gymnospermae
Unterabteilung	Coniferophytina
Klasse	Coniferopsida
Unterklasse	Coniferae
Ordnung	Pinales
Familie	Pinaceae
Unterfamilie	Pinoideae
Gattung	Pinus
Art	cembra

2.1.2 Biologie

Abb. 1 - Die Zirbe im Defereggental



Die immergrüne Zirbe erreicht eine Höhe von etwa 25 m sowie einen Stammdurchmesser von bis zu 1,7 m und ist optisch leicht durch ihre meist starken Verzweigungen (Ersatztriebe bei Wipfel- oder Astverlust; speziell bei alleinstehenden Altbäumen) zu erkennen (Roloff et al., 2014). Diese Verzweigungen entstehen meist in Folge von Schnee-, Wind- oder Blitzbruch (Holzinger, 2005). Da die Zirbe zu den Lichtholzarten zählt, benötigt sie, außer in ihrer Jugendphase, weite Standräume mit ausreichend Belichtung, um ihren breiten, buschigen Habitus auszubilden.

Charakteristisch für sie sind ihre stumpf, bis eiförmigen, 5-10cm langen und 4-6cm breiten Zapfen sowie ihre maximal 12cm langen Nadeln, welche typisch in Fünfer-Büschel an den Triebspitzen wachsen (Kindel, 1995 & Bussotti, 2002).

Für die Fortpflanzung ist das Verteilen ihrer ovalen, 8-14mm langen Zirbennüsse durch Eichhörnchen (*Sciurus vulgaris*) sowie durch den Tannenhäher (*Nucifraga caryocatactes*) notwendig. Hierbei ist das Horten der Nüsse in Baumlöchern oder unter der Erde, ein Schlüsselmechanismus für die Regenerations- und Etablierungsfähigkeit der Zirbe (Zonga et al., 2010).

Das ätherische Öl der Zirbe wird, so wie auch bei allen Pinaceae, in den Harzkanälen gebildet und von dort aus in der Pflanze verteilt, wobei man hier von primären und sekundären Harzkanal-Systemen spricht (Werker & Fahn, 1969). Das dort gebildete Oleoresin (Harz) besteht hauptsächlich aus Monoterpenen, Sesquiterpenen und Diterpenen, wobei die Hauptkomponenten des ätherischen Öls in der Zirbe, abhängig vom untersuchten Pflanzenteil, Monoterpene (bis zu 87%) und Sesquiterpene (bis zu 12%) sind. Dabei sind meist α -Pinen und β -Pinen, sowie Limonen, β -Phellandren und Germacran-D die Hauptkomponenten im ätherischen Öl der Zirbe (Ioannou, 2014 & Apetrei, 2013).

Durch ihre antimikrobielle und antioxidative Eigenschaften, bieten Terpene nicht nur eine Schutzfunktion gegen Krankheiten und Schädlinge (Chen et al. 2018), sondern können auch als Pheromone für Nützlinge, wie beispielsweise Antagonisten der Borkenkäfer (*Coleoptera: Scolytidae*) dienen (Dudareva et al., 2007 & Gijzen et al., 1993). Ihre antimikrobiellen Eigenschaften sind auch beim Wundverschluss von höchster Bedeutung, da sie bei frischen Wunden verhindern, dass Bakterien oder Pilze in die Wunde eindringen können. Durch ihre Flüchtigkeit verdampfen Monoterpene nach einer bestimmten Zeit aus dem aus der Wunde austretendem Oleoresin, wobei Diterpene durch ihre geringe Flüchtigkeit an der Wundoberfläche zurückbleiben und einen festen Schutzmantel über diese bilden (Gijzen et al., 1993).

Neben ihrer hohen Frostresistenz, welche bis unter -43°C reicht und ihrer Fähigkeit sowohl auf Urgestein (Granit & Gneis) als auch auf Schiefer, Sandstein und kalkreichem Ausgangsgestein zu wachsen, hat sie sich perfekt in alpinen Höhenlagen zwischen 1200 bis 2850 Höhenmetern angepasst. Dort wächst sie als Flachwurzler bevorzugt auf tiefgründigen, frischen und sauren Böden wie Podsol (Wieser, 2006 & Roloff et al, 2014).

Durch ihren langsamen Wuchs, ihre geringen Bodenansprüche und ihre hohe Stressresistenz, weisen Zirben einen sehr persistenten Phänotyp auf, durch welchen sie ein Alter von bis zu 1000 Jahren erreichen können.

1.1.3 Verbreitung

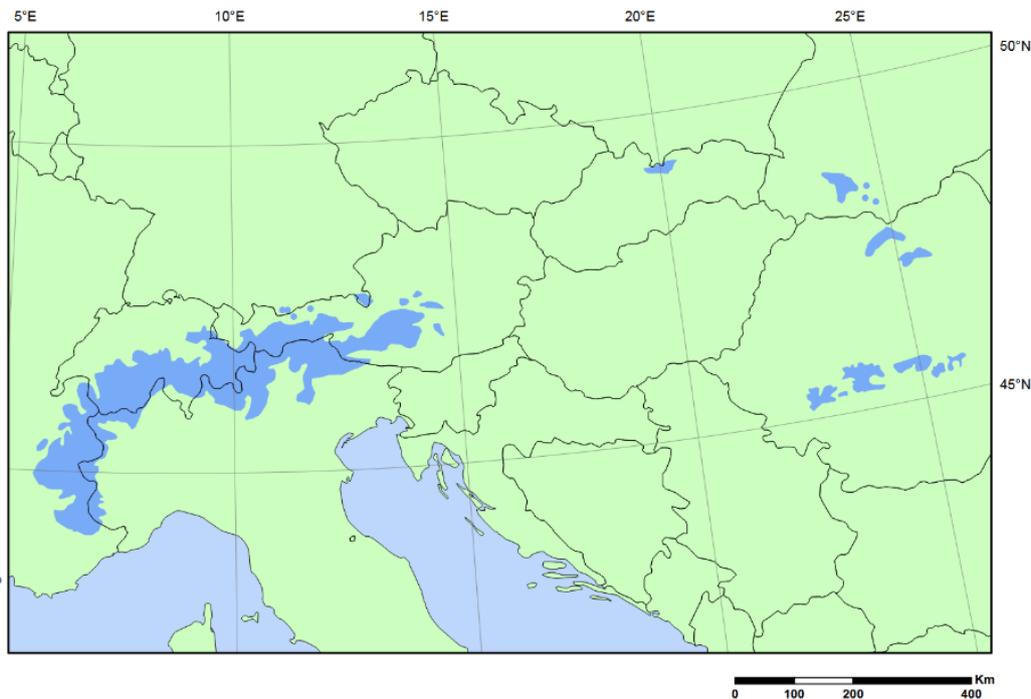


Abb. 2 - Distribution of swiss stone pine (*Pinus cembra* L.) EUFORGEN 2009, www.euforgen.org

Neben ihrer eng verwandten Unterart *P. cembra* var. *sibirica* LOUD. (Roloff et. al, 2014) welche aus Nord-Ost-Asiatischem Raum abstammt, verbreitete sich die europäische Zirbe (*P. cembra*) seit der letzten Eiszeit fortlaufend in den Ostalpen. Von dort aus besiedelte sie nach dem Abschmelzen der Gletscher vor 17.500 bis 18.000 Jahren die Zentralalpen, in denen sie fortlaufend begann, sich an immer höhere Gebirgslagen anzupassen (Vescovi et. al, 2007). In Österreich wächst die Zirbe heute auf 15.000 ha Gesamtfläche, welche sich speziell in den Teilen der nördlichen und südlichen Kalkalpen aufteilen (Heinze & Holzer 2013).

Heute ist die Zirbe in den Schweizer, Nord-Italienischen, Südost-Französischen und Österreichischen Alpen, den Slowenischen und Polnischen Karpaten (Tatra Gebirge), sowie im Rumänischen Retezat-Gebirge verbreitet (Ulber et al. 2004 & Schmidt, 1994).

1.1.4 Nutzung

Durch seine geringe Dichte ($0,45 \text{ g/cm}^3$), ihrem im Vergleich zu anderen Nadelbäumen hohen Anteil an ätherischen Ölen im Holz (0,1 bis 0,2% (Müllner, 2015)) und seinem gleichmäßig festem Aufbau erfreut sich das Zirbenholz seit Jahren bereits einer hohen Nachfrage zur Herstellung von wohlduftenden Möbeln, Saunen, Dekorgegenständen und ist beim Hüttenbau sehr beliebt. Neben der Herstellung des berühmten „Zirbenschnapses“ aus den unreifen Zapfen, ist auch die Herstellung des „Zirbenöls“, durch Wasserdampfdestillation, wegen der hohen Ausbeute ätherischen Öls in den Nadeln, jungen Trieben und Triebspitzen von wirtschaftlichem Interesse.

Durch die wirtschaftliche Übernutzung, Alpenweiderodung und der Verdrängung durch die Fichte (*Picea abies*), dezimierten sich die Bestände der Zirbe in Österreich schon seit dem Mittelalter drastisch (Holzinger, 2005). Dies führte dazu, dass sie von den österreichischen Bundesforsten bundesweit unter Naturschutz gestellt wurde. Bis auf wenige Privatgründe in den Bundesländern Kärnten und Steiermark, ist somit die wirtschaftliche Verwendung der Zirbe untersagt, um ihre Bestände für die nächsten Generationen zu erhalten.

1.2. Hydrolate

Hydrolate sind unter verschiedenen Bezeichnungen wie Hydrosole, Hydroflorate, Pflanzenwasser, Aromawasser, Blüten-Wasser und weiteren Synonymen bekannt. Dabei sind viele dieser Bezeichnungen irreführend und geben keine Auskunft über die ihre Herstellungsmethode (Rao et. al, 2013). Die Bezeichnung Hydrolat an sich besteht aus zwei Teilen; „Hydro“ aus dem lateinischen für Wasser und „lat“, welches sich vom französischen „lait“ ableitet und mit „Milch“ übersetzt wird. Diese Assoziation ergibt sich durch das milchige Erscheinungsbild des Hydrolates unmittelbar nach dessen Herstellung. Hierbei trübt sich das destillierte Wasser, welches mit verschiedenen sekundäre Pflanzenstoffe, einschließlich ätherische Öle, angereichert ist (Catty, 2001).

1.2.1 Herstellung

Hydrolate entstehen im Zuge der Herstellung ätherischer Öle durch Wasserdampf- oder Hydrodestillation als Nebenprodukt. In beiden Fällen wird Wasser als Lösungsmedium verwendet, um die flüchtigen Pflanzeninhaltsstoffe (Mono-, Sesqui- und Di-Terpene), sowie Ketone und Aldehyde aus dem Pflanzenmaterial zu extrahieren. Nach der Kondensation des mit ätherischem Öl angereichertem Dampfes, trennt sich das Kondensat in dem Auffanggefäß in eine polare und eine apolare Phase auf. Das apolare ätherische Öl schwimmt durch seine geringere Dichte auf dem kondensierten destillierten Wasser, welches mit geringen Mengen ätherischem Öl und weiteren löslichen und teilweise löslichen sekundären Pflanzenstoffen angereichert ist (Aazza et al., 2012). Diese wässrige Phase wird als „Hydrolat“ bezeichnet. „Echte“ Hydrolate enthalten ausschließlich durch den Wasserdampf gelöste ätherische Öle, sekundäre Pflanzenstoffe und destilliertes Wasser. Wird Alkohol oder Glycerin verwendet, um die ätherischen Öle im Wasser zu lösen, trifft eine Bezeichnung als Hydrolat nicht mehr zu (Catty, 2001).

Um eine hohe Qualität zu erzielen, sollte ein langsamer Destillationsprozess unter niedrigem atmosphärischem Druck und mit purem, nicht kontaminiertem Wasser gewährleistet sein (Catty, 2001). Neben der Destillationszeit, hat auch die Lagerung und Lagerdauer einen Einfluss auf die Qualität der Hydrolate. Nach Garneau (2014), wirkt sich eine Lagerzeit von zwei Jahren signifikant auf die Inhaltsstoffe des Hydrolates aus, wobei dies mit einer Komplexbildung von verschiedenen Terpenen und dem Abbau von Phenolen in Verbindung steht. Neben der Lagerzeit ist auch die Lagertemperatur für die Stabilität von bestimmten Komponenten ausschlaggebend. Weiters kann die Dauer des Destillationsvorganges ebenfalls die Qualität des Hydrolates beeinflussen. In einer Studie von Macia & Kalemba (2015), wurde der Zusammenhang zwischen Destillationszeit und Stoffmengenkonzentration des Hydrolates untersucht. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die erste Destillationsphase eine wesentlich höhere

Konzentration (60mg/L) aufwies als die zweite (20-30mg/L), was mit den unterschiedlichen Siedepunkten der extrahierten Terpenen zusammenhängt. Neben der Stoffmengenkonzentration beeinflusst die Destillationszeit auch die Komposition und damit auch die Geruchsbildung des Hydrolates (D'Amato, 2018). Weiters sind auch geographische Lage, Pflanzenspezies, Pflanzenalter (Zatlaa, 2017) sowie Umweltfaktoren wie Ernte-Saison ausschlaggebend für die Komposition des Hydrolats und somit ihrer Qualität und pharmakologischen Aktivität (Gasparetto, 2016).

1.2.2 Eigenschaften

Im Vergleich zu ätherischen Ölen haben ihre zugehörigen Hydrolate eine völlig unterschiedliche Komposition der Inhaltsstoffe, wobei Hydrolate eine wesentlich geringere Menge an flüchtigen Komponenten aufweisen, als das zugehörige ätherische Öl (Catty, 2001). Dadurch unterscheiden sich auch die sensorischen und biologischen Eigenschaften bei Hydrolaten im Vergleich zu ihren zugehörigen ätherischen Ölen meist stark voneinander (Azadeh et al., 2017). Hierbei sind Terpene maßgeblich für diese Eigenschaften verantwortlich.

Im Allgemeinen sind Hydrolate stark verdünnte wässrige Lösungen, in welchen geringe Mengen ätherischer Öle (meist unter 0,1g/L) und flüchtige, wasserlösliche sekundäre Metaboliten enthalten sind und weisen saure pH-Werte zwischen 2,9 und 6,5 auf (Labadie et al., 2015; Zheljzkov & Astatkie, 2011; Catty, 2001). Hierbei befinden sich neben Monoterpenen auch Aldehyde und Ketone im Hydrolat (Garneau et al., 2014). Die polaren, oxidierten, hydrophilen und flüchtigen Komponenten des ätherischen Öls sind in der Lage Wasserstoffbrücken im destillierten Wasser einzugehen, (Rao et al., 2003) und sich in Form von mikronisierten Tröpfchen in ihm zu lösen. Diese Mikrotröpfchen gehen jedoch keine Bindung zueinander ein, um größere Tropfen zu bilden und sich somit von der wässrigen Phase wieder abzuscheiden (Catty, 2001).

Neben ihrer antioxidativen Aktivität durch oxygenierte Monoterpene und Phenylpropanoide (Diba et al., 2015), weisen Hydrolate auch antimikrobielle Eigenschaften bei in vitro Versuchen und auf künstlichen Nährböden, spezifisch gegen pathogene, verderbnisfördernde Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen auf (Rao, 2013). Hierbei wurde von Studien eine Wachstumshemmung von Bakterien wie beispielsweise *Salmonella typhi* und *Staphylococcus aureus* sowie *Escherichia coli* bei Applikation von Hydrolat nachgewiesen (Hussien et al., 2011). Ebenso weisen spezifische Hydrolate fungizide Aktivität gegen *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f. sp. tulipae*, *Botrytis cinerea* und *Alternaria citri* auf und hemmen ihr Wachstum (Boyraz, N. & Musa M., 2005). Ihre antagonistische Aktivität steht hierbei im Zusammenhang mit ihrer chemischen Komposition, speziell ihren phenolischen Fraktionen, welche mit den Zellmembranen, Zellwänden oder direkt mit den Enzymen der Mikroorganismen reagieren (D'Amato, S., 2018).

1.2.3 Anwendung

Pflanzenfamilien wie Apiaceae, Lamiaceae und Asteraceae sowie verschiedene Nadelgehölze aus der Familie der Pinaceae, sind gute Rohstoffe für die Herstellung von ätherischen Ölen & Hydrolaten. Neben den ätherischen Ölen finden auch Hydrolate immer mehr Anklang in vielen verschiedenen wirtschaftlichen Sektoren. Hydrolate finden ihre Anwendung in der Kosmetik-, Lebensmittel- und Getränkeindustrie, sowie in der Aromatherapie und in der Medizin, in der sie zur Behandlung von Störungen des Magen-Darm-Traktes genutzt werden. Durch ihre geringe Stoffmengenkonzentration sind die meisten Hydrolate auch zur sicheren oralen Einnahme geeignet und ermöglichen so ein breites Anwendungsspektrum im Human- und Veterinärbereich (Rose, 1999 & Catty, 2001). Weiters ist Ihre hohe Lagerfähigkeit von bis zu 2 Jahren, durch ihre hohe Phenolkonzentration ein wirtschaftlich großer Vorteil (Jeannot, 2003), was sie für die Weiterverarbeitung erwähnter Industrien interessant macht.

Im persischen Raum werden beispielsweise über 50 verschiedene Hydrolate in größeren Mengen an die Getränkeindustrie gehandelt, verarbeitet und als sogenannten „functional drinks“ vermarktet. Neben ihren gesundheitlichen positiven Effekten werden sie auch als Medikamente für den Oralbereich angewendet (Hamedi et al., 2017). Eine Studie von Yaylaa, et al. (2016) bestätigte ebenfalls, dass eine medizinische Anwendung von bestimmten Hydrolaten bei Krebspatienten eine Linderung der, bei einer Chemotherapie häufig auftretenden, Muskotitis erzielt werden kann.

Auch wurden in der Agrarindustrie bereits Versuche durchgeführt in denen bestätigt wurde, dass bestimmte Hydrolate zur natürlichen Desinfizierung von Gemüsepflanzen, durch ihre antibakterielle Wirkung, geeignet sind (Ozturk, et al., 2016).

Zusammenfassend sollte hier erwähnt werden, dass die Vielseitigkeit der Anwendung von Hydrolaten ein bemerkenswertes Ausmaß annimmt. Durch ihre positiven Eigenschaften im Bezug auf Herstellung, Lagerung und ihrer pharmakologische Aktivität sind Hydrolate mehr als nur ein Nebenprodukt der Herstellung ätherischer Öle und werden ihrer aktuellen Aufmerksamkeit gerecht.

1.3 Gas Chromatographie

Gaschromatographie ist eine einfache und schnelle Methode zur hoch aufgelösten Trennung von flüchtigen, beziehungsweise verdampfbaren Substanzen. Sie dient demnach nicht nur der qualitativen Identifikation von einzelnen Probenkomponenten, sondern ermöglicht auch eine quantitative Analyse durch die Ermittlung ihrer jeweiligen Menge (Baugh, 1993). Bei dieser physikalische Trennmethode werden die Probenkomponenten (Analyten) verdampft und durch mit Hilfe einer „mobilen“, sich in eine bestimmte Richtung bewegte Phase durch die sogenannte „stationäre“ Phase bewegt. (Otto, 2011 & Ettre, 1996).

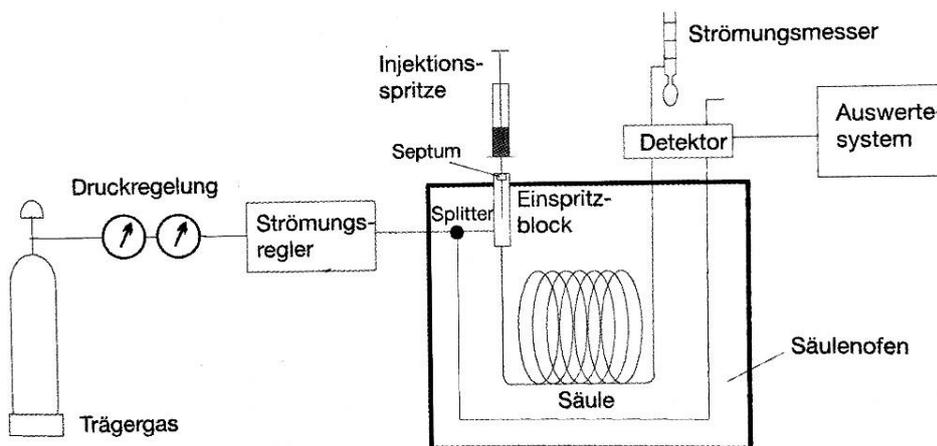


Abb. 3 – Prinzip der Gaschromatographie (Otto, M. 2011)

Ein Probengeber injiziert die in der Trennflüssigkeit gelösten Proben direkt in den Trärgasfluss, wobei diese vorher verdampft werden. Im nächsten Schritt werden die Analyten mittels eines Trärgases (mobile Phase) in die Trennsäule (stationäre Phase) bewegt. Hierbei können Gase wie Helium, Argon, Stickstoff, Kohlendioxid oder Wasserstoff verwendet werden, wobei die Strömungsgeschwindigkeit des Trärgases durch die Säule, durch das Einstellen des Einlassdruckes geregelt werden kann (Otto, 2011).

Die gasförmige Probe und das Trärgas befindet sich nun in der Trennsäule, welche aus Edelstahl, Glas oder hochreinen Quarzrohren hergestellt werden kann, wobei sich Quarzsäulen (Fused silica) deutlich in der heutigen Anwendung durchsetzen. An ihrer Innenseite beinhaltet sie die stationäre Phase, welche entweder ein Feststoff (GSC – Gas Solid Chromatography) oder eine Flüssigkeit (GLC – Gas Liquid Chromatography) sein kann. Weiters unterscheidet man zwischen „gepackten Säulen“ und „Kapillarsäulen“, wobei bei Ersterem die Innenseite mit feinkörnigem Füllmaterial gestopft ist, hingegen bei Kapillarsäulen ist das Rohr wesentlich länger und dünner und die stationäre Phase als dünner Film oder Schicht an der Innenseite haftet (Kolb, 1999 & Otto, 2011).

Die Trennsäule ist im Ofen untergebracht und wird im Zuge des Trennprozesse mit einem auf das Trennproblem optimierten Temperaturprogramm geführt. Die mobile Phase strömt nun durch die stationäre Phase durch und erreicht am Ende des Prozesses verschiedene

nachgeschaltene Detektoren, welche die Daten an einen Computer mit einem Auswertesystem weiterleitet. Gängige universelle Detektoren sind der Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) und der Flammenionisationsdetektor (FID), sowie der massenspektrometrische Detektor (GC-MS). Durch eine ausreichend lange Laufzeit des Prozesses kommt es schließlich auf Grund der Wechselwirkungen zwischen den Substanzen in der mobilen Phase mit der stationären Phase zu einer Trennung dieser Einzelsubstanzen, da manche Substanze mehr und manche weniger stark an der stationären Phase zurückgehalten werden. Weiters sind alle erfassten Daten stark von den experimentellen Bedingungen wie Säulentemperatur, Trägergasgeschwindigkeit, Trägergasart, Abmessung, Art und Druckabfall in der Säule abhängig (Otto, 2011).

Die vom Detektor gelieferten Signale werden grafisch in Form eines Chromatogramms zusammengefasst und dargestellt. Dabei können diese Werte aus dem Chromatogramm entnommen und zur Identifizierung der Einzelsubstanzen herangezogen werden. Jede Substanz wird in einem Chromatogramm als Signal (Peak) dargestellt, welche sich auf einer Zeitachse (x-Achse) verteilen. Jeder dieser Peaks hat eine spezifische Breite, Höhe und Fläche. Zumeist wird die Fläche genutzt, um die Menge der Substanz zu bestimmen. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Retentionszeit oder Durchflusszeit, welche die Zeit angibt, in der sich die Moleküle des Analyten in der stationären Phase während des Trennungsprozesses aufhielten (Ettre, 1996).

In der Massenspektrometrie (MS) werden die zu identifizierenden Komponenten in ionisierte Gase überführt und durch ihre Massenzahl getrennt. Hierbei werden die erzeugten Ionen durch ein Magnetfeld abgelenkt und treffen auf einen Detektor, der ihre Ablenkung misst. Damit ist es möglich die Struktur von organischen Molekülen, ihre Molmasse und Konzentration zu bestimmen. Eine Koppelung der MS and die GC ermöglicht es somit komplex zusammengesetzte Proben zu untersuchen und ihre organische Verbindungen durch ihres Massenspektrums zu identifizieren (Otto, 2011).

1.3.1 Berechnung der Retentionsindices

Um die Einzelkomponenten zu identifizieren dienen also einerseits das Massenspektrum der Substanz. Andererseits erfolgt die Identifizierung durch Retentionsindices. Da, wie bereits erwähnt die Retentionszeit von vielen Faktoren beeinflusst werden kann, müssen sogenannte Retentionsindices (RI) berechnet werden, welche dann in Folge mit bereits standardisierten Indices von KOVATS (1958) verglichen werden. Der KOVATS-Index bedient sich relativer Retentionsindices, welche sich auf die Retentionszeiten von n-Alkanen (n-Hexan 600; n-Octan 800, usw.) bezieht. Für diese Verbindungen erwartet man also Werte die geräteunabhängig sind. Sie können hingegen sehr stark zwischen verschiedenen Säulentypen variieren. Zur Bestimmung des Retentionsindex, müssen zu identifizierende Substanzen also mindestens zwei n-Alkane aufweisen (Otto, 2011; Baugh, 1993).

Der Retentionsindex wird wie folgt berechnet:

$$RI = 100c \frac{\log(t'_R)_x - \log(t'_R)_c}{\log(t'_R)_{c+1} - \log(t'_R)_c} + 100$$

<i>RI</i>	Retentionsindex
<i>c</i>	Anzahl Kohlenstoffatome des vorherigen n-Alkans
<i>c+1</i>	Anzahl Kohlenstoffatome des nächsten n-Alkans
<i>x</i>	zu untersuchende Substanz
(t'_R)	Reduzierte Retentionszeit
$(t'_R)_x$	Reduzierte Retentionszeit der zu gesuchten Substanz

2. Fragestellung

In dieser Studie steht die Zusammensetzung der im Hydrolat der Zirbe gelösten und teilweise gelösten Substanzen im Vordergrund. Dazu wurden Hydrolate mittels Wasserdampfdestillation, von jeweils 10 Individuen der drei Standorte, destilliert und diese anschließend mittels GC/MS auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Hierbei ist der Vergleich der Zusammensetzungen der drei Population der Schwerpunkt dieser Arbeit, weshalb folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welche Zusammensetzung weist das Hydrolat einer *Pinus cembra* L. Population in Kärnten (SIR) auf?
2. Welche Zusammensetzung weist das Hydrolat einer *Pinus cembra* L. Population in Osttirol (DEF) auf?
3. Welche Zusammensetzung weist das Hydrolat einer *Pinus cembra* L. Population in der Steiermark (KEM) auf?
4. Welche Unterschiede der Zusammensetzung gibt es bei Hydrolaten der drei *Pinus cembra* L. Populationen?
5. Gibt es Populationsgenetische Unterschiede zwischen den drei untersuchten Zirbenpopulationen?
6. Wie unterscheidet sich das ätherische Öl vom Hydrolat bei *Pinus cembra* L.?

3. Material & Methoden

3.1 Standorte der Probenahme

3.1.1 Kärnten (Sirnitz)

Das gesamte Gebiet um den Hochrindl-Kegel zählt zum Biosphärenpark Nockberge, welche sich vom Salzburger Lungau bis zu den angrenzenden Kärntner Nockbergen erstreckt. Die Proben wurden am Hochrindl-Kegel in einer Höhe von 1498 bis 1588 m Seehöhe gesammelt, wobei sich hier Schuttmassen aus Phyllite und Grüngesteinen als die dominierenden Ausgangsgesteine abzeichnen (Van Husen, 2012). Die Probenahme wurde in einem Radius von 225m um die Koordinaten L:1556795.34 und B:5920200.71 (EPSG: 3857) durchgeführt.

Abb. 5 – Versuchsstandort Kärnten – Hochrindl Kegel (Quelle: basemap.at)

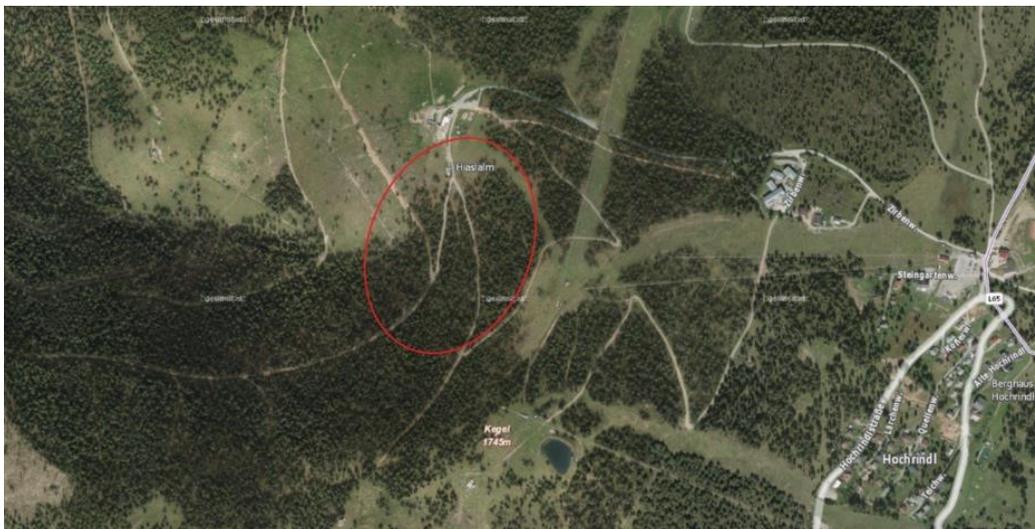


Abb. 6 – Habitus Probe S1



Abb. 7 – Habitus Probe S5



3.1.2 Osttirol (Defereggental)

Im Defereggental erstreckt sich die zweitgrößte zusammenhängende Zirbenpopulationen Österreichs im „Oberhauser Zirbenwald“ (Kral, 1988). Die Deferegger Alpen zählen geologisch gesehen zum Altkristallin und ist durch Granit (Rieserferner Tonalit), Paragneis und Glimmerschiefer als Ausgangsgesteine geprägt (Stricker, 2013). Die Probenahme wurde in einer Höhe von 1660 – 1701 m und in einem Radius von 175 m um die Koordinaten L:1360513.42 und B: 5932889.26 (EPSG: 3857) durchgeführt.

Abb. 8 – Versuchsstandort Osttirol – Oberhauser Zirbenwald (Quelle: basemap.at)



Abb. 9 – Habitus Probe D5



Abb. 10 – Habitus Probe D6



3.1.3 Steiermark (Kemetgebirge)

Der Kemetgebirge gehört zum südöstlichen Dachsteingebirge und somit zu den Nördlichen Kalkalpen (Oberostalpin). Ausgangsgesteine sind hier typischerweise Wettersteinkalk sowie Wettersteindolomit und Hauptdolomit (Mandl, 2000). Die Probenahme wurde in zwei Bereichen, nördlich vom Stoderzinken, in einer Höhe von 1538 – 1640m und in einem Radius von 140 m um die Koordinaten L:1538347.74 und B: 6018725.66 (EPSG: 3857) und in einem Radius von 75 m um die Koordinaten L: 1539069.12 und B:6018439.02 durchgeführt.

Abb. 11 – Versuchsstandort Steiermark – Kemetgebirge - Stoderzinken (Quelle: basemap.at)



Abb. 12 – Habitus Probe K7



Abb. 13 – Habitus Probe K8



3.2 Pflanzenmaterial

Um Unterschiede in der Zusammensetzung der Hydrolate von drei Populationen der Zirbe (*P. cembra* L.) zu untersuchen, wurden drei alpine Standorte in Österreich zum Sammeln der Proben ausgewählt. Hierbei wurden die Proben von jeweils 10 Individuen aus den Standorten Kärnten (SIR), Osttirol (DEF) und Steiermark (KEM) entnommen, um in Folge durch Wasserdampfdestillation ihr Hydrolat herzustellen. Die jeweils 10 Individuen wurden auf Grund von phänotypischen Eigenschaften wie Stammdurchmesser, Höhe und Gesundheitszustand der Bäume selektiert, wobei jeweils 20kg Probematerial pro Individuum gesammelt wurden.

Hierbei wurden ausschließlich gesunde Äste, vorwiegend ohne Chlorosen oder Nekrosen, mit ihren Triebspitzen und Nadeln gesammelt. Diese wiesen einen Maximaldurchmesser von 1,5 cm auf und wurden aus einer Baumhöhe von 1,5 bis 10 m, mit glattem Schnitt abgetrennt und in luftdurchlässige Säcke gepackt, um eine Luftzirkulation zu ermöglichen und etwaige Fermentationsprozesse des Materials bis zur Destillation, zu verhindern.

Die Äste wurden mit sterilisiertem Astschnittwerkzeug abgetrennt, welche nach jedem Baum wieder erneut abgeflammt wurden, um Infektionen des Pflanzensaftes zu verhindern. Es wurden weitere Parameter wie Stammumfang, Seehöhe und Hanglage der einzelnen Individuen dokumentiert (Siehe Tabelle 1), Die Probennahme bei SIR erfolgte am 12.09.2015 bei DEF am 16.09.2015 und am 21.09.2015 bei KEM. Alle Proben wurden unter Aufsicht der örtlichen Bundesforste, beziehungsweise Besitzer der Waldbestände, gesammelt.

Tab. 1 - *Pinus cembra* L. Proben der drei Standorte

Sirnitz – Kärnten (SIR)				Defereggental-Osttirol (DEF)				Kemetgebirge-Steiermark (KEM)			
Probe	Ø Stamm (cm)	Seehöhe (m)	Hanglage	Probe	Ø Stamm (cm)	Seehöhe (m)	Hanglage	Probe	Ø Stamm (cm)	Seehöhe (m)	Hanglage
S1	235	1552	NW 320°	D1	201	1665	SW 335°	K1	184	1538	NW 314°
S2	155	1567	NW 315°	D2	135	1664	SW 313°	K2	170	1539	NW 326°
S3	103	1569	WNW 300°	D3	115	1663	SW 335°	K3	180	1542	NNW 330°
S4	132	1566	NW 316°	D4	99	1660	SSW 201°	K4	250	1546	NE 36°
S5	248	1536	NW 307°	D5	270	1670	SW 235°	K5	164	1548	NE 48°
S6	73	1498	NE 41°	D6	220	1694	NE 44°	K6	131	1624	SSE 158°
S7	208	1510	NE 40°	D7	160	1698	ENE 78°	K7	154	1634	SSE 166°
S8	166	1509	NE 50°	D8	272	1701	ENE 65°	K8	221	1636	S 180°
S9	128	1500	NE 50°	D9	142	1686	ENE 73°	K9	159	1640	SSE 166°
S10	106	1499	NE 34°	D10	68	1685	ENE 68°	EK10	132	1630	SE 133°

3.2.1 Zerkleinern der Proben

Das gesammelte Pflanzenmaterial (Abb. 13) der 30 Individuen wurde durch einen Elektrohäcksler zerkleinert, um eine möglichst gutes Aufschließen der Zellstruktur zu gewährleisten. Der Häcksler wurde nach jeder Probe mit Ethanol gereinigt, um eine Kontamination der nachfolgenden Probe zu vermeiden. Um große Verluste der flüchtigen Inhaltsstoffe zu vermeiden, wurde das zerkleinerte Material (Abb. 14) unmittelbar nach diesem Prozessschritt destilliert. Das Probematerial wurde vor dem Destillationsprozess nicht getrocknet.

Abb. 13 (links) – Frisches Probenmaterial & Abb. 14 (rechts) – Zerkleinertes Probenmaterial



3.3.2 Restfeuchtebestimmung

Die Destillation des Probematerials wurde ein bis drei Tage nach der Probenahme durchgeführt. Von jeder der 30 Proben wurde unmittelbar vor der Destillation, 100 g des zerkleinerten Materials in Plastikbeutel gefüllt, welche luftdicht verschlossen wurden, um später im Labor auf ihre Restfeuchte untersucht zu werden.

Für die Bestimmung der Restfeuchte im Labor wurden die Plastiksäcke einzeln abgewogen und ihr Inhalt in Folge in einen Trockenschrank (HEAREUS) bei 125 °C für 1h und 30 min getrocknet. Das Getrocknete Material wurde erneut eingewogen und durch Abzug der Tara der Plastikbeutel wurde die Restfeuchte bestimmt:

$$\text{Residual Moisture (\%)} = \frac{\text{Fresh weight} - \text{Dry weight}}{\text{Fresh weight}} * 100$$

3.3 Wasserdampfdestillation

Abb. 15 – Alambique-Kupfer-Destille am Versuchsort



Die Herstellung des ätherischen Öls und Hydrolates erfolgte mittels Wasserdampfdestillation, wobei diese mit einer holzbefeuerten Alambique-Kupfer-Destille (Abb. 15) mit einem Kesselvolumen von 80 L durchgeführt wurde. Die Kolonne oder Säule, mit einem Fassungsvermögen von 40 L, wurde mit dem zerkleinerten Pflanzenmaterial befüllt und anschließend auf den Kessel, in dem der Dampf erzeugt wurde, aufgesetzt. Der Kühler der Destillationsanlage wurde konstant auf einer Temperatur von 5°C gehalten. Um Verluste der flüchtigen Komponenten im Pflanzenmaterial zu vermeiden, wurde es am Tag nach der Probenahme destilliert, wobei ein ganzer Standort (á 10 Proben) insgesamt drei Tage für die Destillation in Anspruch nahm. Die Proben wurden nach aufsteigender Probennummern destilliert.

3.3.1 Herstellen der Hydrolat-Proben

Nach dem Reinigen der Destillationsanlage mit Ethanol wurde ein 30-minütiger Reinigungsdurchlauf mit Wasserdampf durchgeführt, wobei hier auch der Kühler kein Kühlwasser führte, um zu gewährleisten, dass Rückstände durch den Wasserdampf abtransportiert werden konnten. In Folge wurde der Kessel mit 30 L Wasser gefüllt, und bei 97 °C zum Kochen gebracht, da auf einer Seehöhe von 1700 m gearbeitet wurde.

12kg (± 0.2 kg) des frisch zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde anschließend in die Kolonne gefüllt und mit einem Druck von 850 kg/m² von oben verdichtet. Nach dem Befüllen und Verfestigen des Pflanzenmaterials in der Kolonne, wurde die Destillationsanlage wieder zusammengesetzt und abdichtet. Als Dichtmaterial wurde ein Roggenteig, mit einem Wasser-, Mehlverhältnis von 1:1, verwendet, welcher um die Verbindungsstellen der Kolonne aufgetragen wurde und im Zuge der Erwärmung des Kupfers aushärtete. Während der Destillation wurde das ätherische Öl und das Hydrolat in einem 1000 mL Scheidetrichter aufgefangen, wobei das Hydrolat in regelmäßigen Abständen in einen separaten, lebensmittelechten 10 L Plastikkanister abgelassen wurde. Nach Abschluss des Destillationsvorganges wurde das restliche Hydrolat im Scheidetrichter ebenfalls in den Kanister abgelassen; somit verblieb das ätherische Öl im Scheidetrichter. Jede der 30 Proben durchlief einer durchschnittlichen Destillationsdauer von 1h (± 15 min), wobei der Destillationsprozess gestoppt wurde, wenn 7.7 L (± 0.2 L) Hydrolat im Kanister aufgefangen wurden.

Nach jedem Destillationsvorgang wurde die Destillationsanlage auseinandgebaut und Teile, die mit dem ätherischen Öl in Kontakt kamen mit Ethanol gereinigt. Anschließend wurde der Kessel wieder mit Wasser aufgefüllt und die gesamte Anlage wieder zusammengebaut. Das Wasser wurde zum Kochen gebracht und es folgte ein 30-minütiger Reinigungsdurchgang mit Wasserdampf, um alle zurückgebliebenen flüchtigen Komponenten aus der Destillationsanlage zu entfernen und somit eine Kontamination der nachfolgenden Probe zu vermeiden. Für die Hydrolatproben wurden 100 mL, nach dem Schütteln der 10L Kanister, mit

einer Pipette aus den Kanistern abgezogen und in 100 mL Braunglas-Flaschen mit Drehverschluss abpipettiert. Alle 30 Probenfläschchen wurden mit einem Probennamen beschriftet und bis zur Untersuchung durch GC/MS kühl gelagert.

3.4 Analyse der Proben

Die Hydrolatproben wurden am 05.10.2018 ins Labor gebracht um dort auf ihre Inhaltsstoffe durch GC/MS untersucht zu werden.

3.4.1 Vorbereitung der Proben für GC/MS

Jede Probe (100 mL) wurden mit 10 mL Hexan in einem 200 mL Scheidetrichter vermengt und anschließend für 20 min ausgeschüttelt, um alle flüchtigen Komponenten im Hexan zu lösen. Die Scheidetrichter wurden anschließend für 15 min mit Stativklammern auf ein Stativ gehängt, um eine vollständige Phasentrennung des Hexans und der wässrigen Phase zu gewährleisten. Nach 15 min konnte ein klarer Phasenübergang beobachtet werden und die wässrige Phase wurde aus dem Scheidetrichter abgelassen. Hierbei wurden jeweils 10 mL des angereicherten Hexans in 10 mL Glasflaschen abgefüllt, welche anschließend beschriftet wurden. Dazu wurden jeweils 1 g Natriumsulfat zugegeben, um mögliche Rückstände der wässrigen Phase zu binden. Die Fläschchen wurden beschriftet und anschließend im Tiefkühler für eine Woche aufbewahrt. Nach einer Woche wurden die Proben aus dem Tiefkühler entnommen und anschließend jeweils 1 mL in 2 mL Autosampler-Vials (Agilent Technologies, Vienna, Austria) abpipettiert. Die Proben wurden in den Autosampler des Gaschromatographen (7890A – Agilent Technologies, Vienna, Austria) gestellt und analysiert.

3.4.2 Parameter GC/MS

Der Gaschromatograph 7890A (Agilent Technologies, Vienna, Austria) wurde mit einem massenspektrometrischen Detektor 5975C VLMSD gekoppelt. Weiters wurden eine HP-5MS-Säule und Helium als Trägergas verwendet. Die Temperatur wurde von 60°C auf 320°C, erhöht wobei die Temperatur um 6 °C/min gesteigert wurde. Die Einströmgeschwindigkeit betrug 14ml/min mit einem Einspritzvolumen von 1 µL in einem Verhältnis von 1:10.

3.4.3 Datenauswertung & Identifikation der Komponenten

Zur Visualisierung der Chromatogramme wurde die Software Openchrom (Lablicate GmbH et al.). Dieses Freeware-Programm zur Analyse von massenspektrographischen Daten der Chromatographie unterstützt unter anderem Datenformate des Herstellers Agilent, weswegen es für die Auswertung der Daten für diese Arbeit geeignet war. Im ersten Schritt wurden die Peaks aller Chromatogramme markiert, die Flächen berechnet und anschließend die Berechnung der Retentionsindices durchgeführt. Anhand der Retentionsindices und Massenspektren, wurde durch die NIST MS 2008 Datenbank eine Identifikation der Einzelkomponenten durchgeführt. Dieser Schritt wurde ebenfalls in Openchrom durchgeführt, da eine Integration der NIST MS 2008 Datenbank in das Programm möglich ist. Da ein Großteil der Peaks von NIST nicht eindeutig identifiziert werden konnte, mussten diese Komponenten über Internetrecherche (www.pherobase.com) und Literatur (Adams, 2007) mit vorhandenen Massenspektren und KOVATS-Indices verglichen werden.

3.5 Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Statistikprogramm „R“ verwendet. Anfänglich wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Komponenten berechnet und eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Um intraspezifische Zusammenhänge der im Hydrolat vorkommenden Hauptkomponenten zwischen den drei Zirben-Populationen festzustellen, wurde eine Local Fisher Discriminance analysis (LFDA) aller drei Populationen durchgeführt, wobei hier eine Datenmatrix aller 29 Proben mit drei Faktoren (DEF; SIR; KEM) und einer reduzierten Datenmenge von 23 Variablen angefertigt wurde. Mit dieser Matrix wurde eine Fisher-Diskriminanzanalyse und eine Principal Component Analysis (PCA) durchgeführt. Um eine Datenmatrix mit reduzierter Datenmenge anzufertigen, wurden die Prozentmengen der jeweiligen Substanzen von allen drei Populationen addiert und ab einer Summe von 10%, mit Ausnahme von β -Pinene, zur Diskriminanzanalyse und PCA herangezogen. Damit sollte die Datenmenge auf die Hauptkomponenten eingeschränkt werden, um vor allem eine bessere graphische Darstellung, speziell in der Fisher Diskriminanz Analyse zu ermöglichen.

4. Ergebnisse

In Tabelle 2 befinden sich alle identifizierte und unidentifizierte Substanzen, welche im Zuge der Analyse im Hydrolat der drei Populationen gefunden wurden. Sie wurden nach aufsteigendem Retentionsindex geordnet. Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, wurden insgesamt 70 Komponenten im Hydrolat aller Populationen gefunden, wovon 21 nicht identifiziert werden konnten.

Das Hydrolat der Population SIR wies insgesamt 51 Komponenten (davon 10 nicht identifiziert); in der Population DEF wurden 47 Komponenten nachgewiesen (davon 6 nicht identifiziert) und in der Population KEM wurden 50 Komponenten gefunden (davon 6 nicht identifiziert) (siehe Tab. 3, 4 und 5).

4.1 Komposition der Hydrolate

Die Berechnung der Mittelwerte der Einzelkomponenten der drei Populationen ergab folgende Hauptkomponenten im Hydrolat der Population in Osttirol (DEF): α -Terpineol mit $33,1\% \pm 21,8$, Terpinen-4-ol mit $7,0\% \pm 4,4$, Verbenon mit $6,3\% \pm 4,3$, cis-p-Menth-2-en-1-ol mit $4,7\% \pm 2,4$ und α -Cadinol mit $4,6\% \pm 2,8$. In der Kärntner Population (SIR) waren die Hauptkomponenten α -Terpineol mit $34,1\% \pm 16,7$, Terpinen-4-ol mit $7,8\% \pm 1,4$, Verbenon mit $7,0\% \pm 1,3$, cis-p-Menth-2-en-1-ol mit $4,2\% \pm 2,0$ und Myrtenal mit $4,1\% \pm 0,6$. In der Population in der Steiermark (KEM) waren die Hauptkomponenten α -Terpineol mit $27,0\% \pm 29,5$, Terpinen-4-ol mit $6,4\% \pm 1,6$, Verbenon mit $6,2\% \pm 2,5$, Germacra-D mit $6,0\% \pm 23,7$, cis-p-Menth-2-en-1-ol mit $3,9\% \pm 0,2$ und Crypton mit $3,7\% \pm 3,4$. Weitere Komponenten sind der Tabelle 2,3,4 & 5 zu entnehmen. Proben aus der Steiermark wiesen deutlich geringere Mengen von Monoterpenen auf als in den anderen beiden Standorten. Bei DEF ergab die Gesamtmenge an Monoterpenen $84,4\%$ ($12,7\%$ Sesquiterpene), bei SIR $89,2\%$ ($10,2\%$ Sesquiterpene), sowie bei KEM $76,2\%$ ($22,7\%$ Sesquiterpene).

Tab.2 – Mittelwerte der Einzelkomponenten aller drei Populationen (Substanznamen in englischer Sprache)

Substanz	RI	KOVATS	Anteil (%)		
			DEF	SIR	KEM
α -Pinene	933	932	1,37	1,33	2,20
camphene	948	954	0,02	0,02	0,03
β -Pinene	978	979	0,09	0,08	0,27
β -Phellandrene	1032	1029	1,22	1,18	1,99
1, β -Cineol	1034	1031	0,40	0,37	0,50
Fenchone	1088	1086	0,20	0,19	0,19
Linalool	1100	1096	0,21	0,20	0,65
exo-Fenchol	1112	1121	0,87	0,84	0,75
cis-p-Menth-2-en-1-ol	1120	1121	4,71	4,47	3,93
α -Campholenal	1126	1126	0,26	0,26	0,27
trans-Pinocarveol	1137	1139	3,57	3,54	2,37
trans-p-Menth-2-en-1-ol	1139	1140	1,64	1,54	0,78
Camphor	1143	1146	0,63	0,61	0,56

<i>trans</i> -Verbenol	1145	1144	0,92	0,90	1,05
Camphene Hydrate	1147	1149	0,64	0,62	0,48
<i>Unidentified</i>	1149	-	0,54	0,53	0,30
Isoborneol	1157	1160	0,05	0,05	0,14
<i>Unidentified</i>	1159	-	0,13	0,13	0,03
<i>trans</i> -Pinocamphone	1160	1162	0,59	0,57	0,39
Pinocarvone	1162	1164	0,23	0,23	0,27
Borneol	1165	1169	3,50	3,43	2,81
Mentha-1,5-dien-8-ol	1167	1170	1,81	1,77	1,53
<i>cis</i> -Pinocamphone	1173	1175	0,56	0,55	0,63
Terpinen-4-ol	1177	1177	7,00	6,68	6,41
p-Cymen-8-ol	1183	1179	0,12	0,12	0,34
Crypton	1186	1185	3,21	3,14	3,72
<i>Unidentified</i>	1188	-	0,18	0,18	0,15
α -Terpineol	1190	1188	33,10	32,17	27,01
Myrtenal	1196	1195	3,76	3,69	3,65
<i>trans</i> -Piperol	1200	1208	0,34	0,33	0,25
<i>Unidentified</i>	1204	-	0,06	0,05	0,07
<i>Unidentified</i>	1205	-	0,25	0,25	0,16
Verbenone	1209	1205	6,26	6,13	6,18
<i>Unidentified</i>	1216	-	0,08	0,08	0,04
<i>trans</i> -Carveol	1220	1216	1,05	1,04	1,20
<i>Unidentified</i>	1225		0,04	0,04	0,11
<i>cis</i> -p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1230	1230	0,55	0,55	0,85
<i>Unidentified</i>	1232		0,09	0,09	0,08
Thymol-Methylether	1236	1235	0,15	0,14	0,20
Carvotanacetone	1246	1244	0,38	0,38	0,48
Piperitone	1256	1252	3,74	3,48	1,81
<i>trans</i> -Myrtanol	1261	1261	0,21	0,21	0,34
<i>Unidentified</i>	1274	-	0,03	0,03	0,09
<i>Unidentified</i>	1277	-	0,28	0,27	0,17
Isobornyl Acetate	1287	1285	1,94	1,92	1,46
p-Cymen-7-ol	1294	1290	0,02	0,02	0,02
β -Caryophyllene	1423	1419	0,13	0,13	0,32
<i>Unidentified</i>	1458		0,07	0,07	0,34
<i>Unidentified</i>	1480		0,04	0,04	0,34
Germacrene-D	1485	1485	1,38	1,36	5,98
γ -Amorphene	1491	1495	0,02	0,02	0,02
<i>Unidentified</i>	1501		0,70	0,67	0,96
α -Muuroolene	1504	1500	0,14	0,13	0,26
β -Bisabolene	1512	1505	0,11	0,11	0,05
γ -Cadinene	1519	1513	0,37	0,35	0,99
δ -Cadinene	1527	1523	1,47	1,41	3,32
<i>Unidentified</i>	1538	-	0,00	0,00	0,10
<i>Unidentified</i>	1542	-	0,00	0,00	0,03

Spanthulenol	1584	1578	0,27	0,25	0,37
<i>Unidentified</i>	1589	-	0,15	0,15	0,32
<i>Unidentified</i>	1598	-	0,10	0,09	0,10
<i>Unidentified</i>	1606	-	0,04	0,04	0,05
<i>Unidentified</i>	1626	-	0,01	0,01	0,00
cis-Cadin-4-en-7-ol	1634	1636	0,15	0,14	0,26
T-Muurolol	1648	1642	2,42	2,29	2,80
Torreyol	1652	1646	0,48	0,45	0,56
α -Cadinol	1661	1654	4,55	4,28	5,05
α -Bisabolol	1690	1685	0,63	0,61	0,30
<i>Unidentified</i>	1752	-	0,04	0,04	0,05
<i>Unidentified</i>	1771	-	0,03	0,03	0,12
Anteil Monoterpene			84,42%	89,15%	76,91%
Anteil Sesquiterpene			12,67%	10,20%	22,69%

Tab. 3 - Hydrolatkomposition der Einzelindividuen - Population Osttirol (DEF) (Substanzen in englischer Sprache)

Name der Verbindung	RI	KOVATS	Anteil (%)									σ^2
			D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	
α -Pinene	933	932	1,36	1,08	0,67	0,94	1,70	1,48	0,86	2,87	1,40	0,42
β -Phellandrene	1032	1029	1,17	0,80	0,64	1,04	1,49	1,62	0,91	2,22	1,04	0,24
1,8-Cineol	1034	1031	0,21	0,83	0,34	0,23	0,36	0,04	0,80	-	0,77	0,10
Fenchone	1088	1086	0,15	0,22	0,20	0,33	0,31	-	0,16	0,24	0,16	0,01
Linalool	1100	1096	0,14	-	-	-	1,30	-	0,17	-	0,28	0,18
exo-Fenchol	1112	1121	1,05	0,76	1,04	1,00	0,90	0,82	0,81	0,66	0,75	0,02
cis-p-Menth-2-en-1-ol	1120	1121	4,10	3,56	3,48	4,80	7,01	4,21	4,46	3,22	7,58	2,40
α -Campholenal	1126	1126	0,62	0,21	0,11	0,41	0,07	0,37	0,21	0,20	0,12	0,03
trans-Pinocarveol	1137	1139	4,16	1,18	10,66	3,21	0,34	2,70	1,98	7,08	0,82	11,27
trans-p-Menth-2-en-1-ol	1139	1140	3,49	1,94	-	0,46	3,33	0,53	1,28	0,59	3,18	1,91
Camphor	1143	1146	1,49	0,24	0,68	1,22	0,27	0,52	0,40	0,26	0,55	0,20
trans-Verbenol	1145	1144	1,17	0,92	1,27	0,75	0,53	0,81	1,15	0,98	0,72	0,06
Camphene Hydrate	1147	1149	1,32	0,92	0,37	0,52	0,83	0,51	0,05	0,51	0,76	0,13
unidentified	1149	-	0,27	0,75	0,34	1,10	0,15	0,57	0,77	0,62	0,33	0,09
trans-Pinocamphone	1160	1162	1,00	0,14	0,15	0,59	0,30	0,20	0,79	1,63	0,54	0,24
Pinocarvone	1162	1164	0,52	-	0,30	0,76	0,03	0,24	0,19	-	-	0,07
Borneol	1165	1169	4,45	3,56	3,56	4,10	3,58	5,54	2,16	2,20	2,36	1,28
Mentha-1,5-dien-8-ol	1167	1170	2,01	1,17	1,15	2,49	0,99	1,96	3,29	2,04	1,15	0,59
cis-Pinocamphone	1173	1175	1,07	0,40	0,88	0,48	0,13	0,42	0,50	0,94	0,22	0,11
Terpinen-4-ol	1177	1177	5,83	6,40	5,80	4,10	10,62	7,01	6,69	6,36	10,20	4,43
Crypton	1186	1185	1,73	3,00	4,91	4,95	3,14	3,99	4,60	0,50	2,04	2,43
unidentified	1188	-	-	-	-	-	-	-	-	1,63	-	0,29
α -Terpineol	1190	1188	30,06	39,27	38,13	38,30	27,48	30,35	35,75	29,45	29,13	21,87
Myrtenal	1196	1195	4,65	3,94	3,99	5,11	2,71	3,89	3,84	3,42	2,34	0,74
trans-Piperol	1200	1208	0,64	0,69	0,24	0,08	0,02	0,35	0,36	0,46	0,22	0,05
unidentified	1205	-	0,80	0,63	0,27	0,06	0,01	0,22	0,13	0,15	-	0,08
Verbenone	1209	1205	6,07	4,06	4,75	9,45	5,55	7,19	9,48	5,70	4,06	4,28
trans-Carveol	1220	1216	1,01	1,35	1,04	1,41	0,47	1,49	1,23	1,20	0,27	0,18

cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1230	1230	0,64	0,66	1,42	0,30	0,46	0,42	0,62	0,44	-	0,15
Thymol-Methylether	1236	1235	0,29	0,22	-	0,13	0,17	0,08	0,26	-	0,20	0,01
Carvotanacetone	1246	1244	0,34	0,56	0,41	0,47	0,08	0,43	0,86	0,26	-	0,07
Piperitone	1256	1252	1,16	2,27	4,04	3,03	7,90	3,25	2,19	1,59	8,22	6,76
<i>trans</i> -Myrtenol	1261	1261	0,38	0,35	0,22	0,24	-	0,16	0,40	0,17	-	0,02
<i>unidentified</i>	1277	-	0,24	0,28	0,68	0,28	0,30	0,20	0,34	-	0,21	0,03
Isobornyl Acetate	1287	1285	2,65	0,82	1,18	1,46	2,18	6,00	0,71	1,88	0,59	2,81
β -Caryophyllene	1423	1419	0,38	0,46	-	-	0,04	-	-	0,33	-	0,04
Germacrene-D	1485	1485	0,46	0,94	0,71	0,31	2,19	0,51	0,34	6,28	0,67	3,70
<i>unidentified</i>	1501	-	0,46	0,49	-	-	4,28	-	-	0,22	0,86	1,89
γ -Cadinene	1519	1513	0,67	1,41	-	0,14	0,21	0,15	-	0,38	0,33	0,20
δ -Cadinene	1527	1523	2,18	3,94	0,35	0,70	0,79	0,85	0,48	2,16	1,79	1,36
Spanthulenol	1584	1578	0,50	0,38	0,12	0,35	-	0,20	0,22	0,13	0,54	0,03
<i>unidentified</i>	1589	-	-	0,25	0,13	0,05	-	0,20	0,23	0,51	-	0,03
cis-Cadin-4-en-7-ol	1634	1636	0,29	0,18	-	0,13	0,12	0,14	0,14	-	0,33	0,01
T-Muurolol	1648	1642	1,91	2,09	1,39	2,13	1,57	2,90	2,83	2,79	4,21	0,75
Torreyol	1652	1646	0,35	0,26	0,29	0,54	0,29	0,43	0,74	0,44	0,96	0,05
α -Cadinol	1661	1654	4,31	2,43	2,65	3,95	4,27	5,47	4,84	4,83	8,15	2,82
α -Bisabolol	1690	1685	0,85	1,27	0,28	0,80	0,43	0,27	0,35	0,74	0,71	0,11

Tab. 4 - Hydrolatkomposition der Einzelindividuen - Population Kärnten (SIR) (Substanznahmen in englischer Sprache)

Substanz	RI	KOVATS	Anteil (%)										σ^2
			S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
α -Pinene	933	932	0,81	0,41	1,06	1,61	0,60	1,57	0,65	1,31	0,79	1,22	0,17
β -Phellandrene	1032	1029	0,69	0,32	1,41	0,71	0,47	1,88	0,84	1,63	0,63	0,81	0,27
1,8-Cineol	1034	1031	0,18	1,27	-	1,32	0,51	0,33	0,45	1,25	0,17	1,19	0,28
Fenchone	1088	1086	0,45	0,22	0,18	0,29	0,62	0,31	0,17	-	0,27	0,32	0,03
Linalool	1100	1096	0,07	0,25	1,16	-	-	0,22	-	-	0,05	0,08	0,13
exo-Fenchol	1112	1121	0,93	1,03	0,79	0,83	1,01	1,02	0,83	0,67	1,04	1,00	0,02
cis-p-Menth-2-en-1-ol	1120	1121	3,73	4,10	5,54	2,37	2,71	5,71	6,29	5,31	2,73	3,46	2,02
α -Campholenal	1126	1126	0,35	0,21	0,49	0,51	0,46	0,11	0,19	-	0,50	0,40	0,03
trans-Pinocarveol	1137	1139	2,83	1,81	2,29	3,44	7,16	0,37	0,47	3,03	4,99	2,15	4,14
trans-p-Menth-2-en-1-ol	1139	1140	3,38	1,87	1,67	0,57	0,68	2,12	2,22	2,01	1,28	0,67	0,77
Camphor	1143	1146	1,31	0,66	0,38	0,35	2,23	0,77	0,47	0,16	1,35	0,70	0,39
trans-Verbenol	1145	1144	1,42	0,66	1,16	1,35	0,88	0,27	0,46	1,20	0,55	0,77	0,16
Camphene Hydrate	1147	1149	0,19	0,57	0,29	0,38	0,48	0,80	0,31	0,15	0,30	0,40	0,04
unidentified	1149	-	0,55	0,44	0,58	0,86	0,74	0,20	0,33	0,63	0,68	1,05	0,06
trans-Pinocamphone	1160	1162	0,24	0,23	0,29	0,46	0,29	0,06	0,33	0,17	0,46	0,26	0,01
Pinocarvone	1162	1164	0,22	0,44	0,37	0,12	0,30	0,05	0,16	0,16	0,34	0,33	0,02
Borneol	1165	1169	3,92	4,27	2,83	2,27	6,84	3,55	2,40	1,48	4,39	3,58	2,22
Mentha-1,5-dien-8-ol	1167	1170	2,27	3,36	2,54	3,49	2,26	0,83	1,40	1,31	2,59	2,64	0,75
cis-Pinocamphone	1173	1175	0,74	0,38	0,60	0,58	0,68	0,32	0,44	0,46	1,05	0,41	0,05
Terpinen-4-ol	1177	1177	7,15	8,39	7,80	7,12	6,50	8,20	10,29	7,73	6,32	8,88	1,40
p-Cymen-8-ol	1183	1179	-	0,35	0,35	1,15	0,48	0,06	0,31	0,28	0,65	0,43	0,10
Crypton	1186	1185	3,42	4,91	5,11	0,78	0,42	3,29	2,65	2,21	2,20	5,03	2,83
unidentified	1188	-	-	-	-	0,85	1,47	-	0,52	0,37	1,36	-	0,34
α -Terpineol	1190	1188	40,49	33,58	25,67	34,36	38,14	31,24	37,49	33,09	34,38	32,78	16,79
Myrtenal	1196	1195	4,04	4,54	3,61	3,64	3,67	2,84	4,43	4,26	5,64	4,58	0,57
trans-Piperol	1200	1208	0,12	0,36	0,32	0,29	0,36	0,07	0,30	-	0,12	0,30	0,02
unidentified	1205	-	0,19	0,28	0,10	0,24	0,19	0,07	0,10	-	0,23	0,28	0,01

Verbenone	1209	1205	6,77	6,63	7,80	8,48	7,78	5,27	5,26	6,65	7,08	8,27	1,26
<i>trans</i> -Carveol	1220	1216	1,49	1,06	1,34	2,12	1,22	0,38	1,24	1,45	1,72	2,17	0,27
<i>cis</i> -p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1230	1230	0,60	0,30	0,36	0,39	0,36	-	0,33	0,60	0,95	0,44	0,06
<i>unidentified</i>	1232		0,20	0,19	0,11	0,41	0,12	-	0,14	0,25	0,21	-	0,01
Thymol-Methylether	1236	1235	0,20	0,34	0,64	-	0,16	0,25	0,30	0,30	0,12	0,17	0,03
Carvotanacetone	1246	1244	0,78	0,26	0,30	0,77	0,63		0,27	0,59	0,69	0,82	0,08
Piperitone	1256	1252	2,80	2,22	1,88	1,16	1,39	4,03	5,85	3,24	3,09	1,67	2,02
<i>trans</i> -Myrtanol	1261	1261	0,24	0,41	0,54	-	0,35	0,11	0,67	0,19	0,85	-	0,08
<i>unidentified</i>	1274	-	0,10	0,22	0,24	0,08	0,13	0,14	0,22	0,11	0,36	0,23	0,01
<i>unidentified</i>	1277	-	0,45	0,92	0,65	0,20	0,20	0,25	0,76	0,34	0,86	0,55	0,07
Isobornyl Acetate	1287	1285	0,98	5,19	3,12	1,43	3,27	2,35	1,64	0,48	0,80	2,63	2,05
<i>unidentified</i>	1458	-	-	-	0,21	-	-	0,75	-	0,61	-	-	0,08
Germacrene-D	1485	1485	0,74	0,20	1,92	1,06	-	3,38	0,26	4,56	0,40	-	2,46
<i>unidentified</i>	1501	-	0,14	0,14	0,19	0,80	-	0,34	0,16	0,29	-	0,25	0,05
γ -Cadinene	1519	1513	0,08		0,38	0,29	-	0,81	-	0,61	-	-	0,09
δ -Cadinene	1527	1523	0,36	0,45	1,59	1,05	-	2,87	0,24	2,47	0,40	0,31	1,02
Spanthulenol	1584	1578	-	0,21	0,57	0,41	0,10	0,33	-	0,34	-	0,39	0,04
<i>unidentified</i>	1589	-	-	0,13	0,41	0,19	-	0,37	0,51	0,18	-	0,16	0,03
<i>cis</i> -Cadin-4-en-7-ol	1634	1636	-	0,16	0,35	0,33	0,07	0,35	0,06	-	0,16	0,19	0,02
T-Muurolol	1648	1642	0,63	1,50	2,87	2,71	0,87	2,77	1,16	1,75	1,36	2,44	0,70
Torreyol	1652	1646	0,33	0,46	0,51	0,52	0,33	0,54	0,31	0,46	0,31	0,85	0,03
α -Cadinol	1661	1654	2,04	2,55	4,72	4,63	1,71	4,15	1,67	2,85	2,61	3,92	1,38
α -Bisabolol	1690	1685	-	0,30	1,03	1,32	0,38	0,89	1,70	1,25	0,85	0,15	0,32
<i>unidentified</i>	1771	-	-	0,30	-	-	-	-	1,05	-	0,32	-	0,11

Tab. 5 - Hydrolatkomposition der Einzelindividuen - Population Steiermark (KEM) (Substanznahmen in englischer Sprache)

Substanz	RI	KOVATS	Anteil (%)										σ^2
			K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	
α -Pinene	933	932	2,47	2,58	2,12	2,13	2,84	1,22	2,69	1,49	3,22	1,18	0,49
β -Pinene	978	979	0,23	0,27	0,07	-	0,32	0,24	0,60	0,15	0,38	0,20	0,03
β -Phellandrene	1032	1029	0,82	1,82	1,45	1,22	2,87	2,00	3,81	1,55	2,26	1,37	0,78
1,8-Cineol	1034	1031	0,67	0,40	0,39	0,37	0,51	0,28	0,57	0,15	0,89	0,65	0,05
Fenchone	1088	1086	0,14	0,11	0,22	0,17	0,23	0,11	0,13	0,07	0,26	0,47	0,01
Linalool	1100	1096	0,35	0,13	0,36	0,48	0,06	0,12	3,65	0,09	0,93	0,14	1,19
exo-Fenchol	1112	1121	0,57	0,74	0,81	0,91	0,39	0,55	0,75	0,85	1,05	1,02	0,04
cis-p-Menth-2-en-1-ol	1120	1121	2,79	4,56	1,51	1,42	2,04	5,18	5,52	5,11	4,55	4,07	2,52
α -Campholenal	1126	1126	0,23	0,37	0,26	0,24	0,09	0,32	0,11	0,22	0,31	0,55	0,02
trans-Pinocarveol	1137	1139	4,47	2,73	2,19	2,22	1,05	1,91	1,59	2,44	1,64	3,30	0,95
trans-p-Menth-2-en-1-ol	1139	1140	0,55	0,86	0,20	0,20	0,56	1,24	1,41	0,66	0,88	0,67	0,15
Camphor	1143	1146	0,07	0,43	2,34	2,08	0,01	0,15	0,30	0,40	0,33	0,99	0,70
trans-Verbenol	1145	1144	1,23	0,98	0,20	0,21	0,79	1,59	1,37	0,71	1,06	1,51	0,24
Camphene Hydrate	1147	1149	0,35	0,51	1,14	1,34	0,21	0,19	0,66	0,31	0,38	0,55	0,15
unidentified	1149	-	0,35	0,46	0,16	0,24	0,21		0,37	0,42	0,31	0,37	0,02
trans-Pinocamphone	1160	1162	0,16	0,17	0,47	0,42	0,10	0,92	0,68	0,25	0,11	0,59	0,08
Pinocarvone	1162	1164	0,34	0,45		0,12	0,16	0,23	0,38	0,23	0,24	0,43	0,02
Borneol	1165	1169	3,05	3,74	5,53	6,11	1,24	1,48	3,13	2,54	1,61	2,98	2,67
Mentha-1,5-dien-8-ol	1167	1170	1,82	1,37	1,07	1,33	0,96	2,14	0,94	1,90	1,63	1,94	0,19
cis-Pinocamphone	1173	1175	0,66	0,59	0,65	0,52	0,22	0,87	0,67	0,70	0,51	0,85	0,03
Terpinen-4-ol	1177	1177	6,21	6,35	4,01	4,82	5,12	7,42	7,49	6,31	7,65	7,15	1,56
p-Cymen-8-ol	1183	1179	0,44	0,11	0,71	0,74	0,44	0,36	0,20	0,30	0,21	0,34	0,04
Crypton	1186	1185	1,14	4,90	5,04	6,11	3,27	0,69	3,40	5,26	4,13	5,66	3,41
α -Terpineol	1190	1188	27,10	22,20	27,89	33,87	17,87	24,89	25,20	29,79	34,55	33,59	29,50
Myrtenal	1196	1195	3,49	4,59	1,87	1,87	1,68	4,10	3,87	4,32	3,62	5,33	1,59
trans-Piperol	1200	1208	0,39	0,20	0,14	-	0,69	0,09	0,13	0,16	0,33	0,12	0,04
unidentified	1205	-	0,12	0,37	0,48	0,25	-	0,05	0,06	0,19		0,17	0,03

Verbenone	1209	1205	5,54	8,45	5,72	5,83	3,19	7,58	4,97	7,79	5,39	6,95	2,45
<i>trans</i> -Carveol	1220	1216	1,05	1,42	1,27	1,10	0,73	1,07	1,06	1,69	1,23	1,28	0,07
<i>cis</i> -p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1230	1230	1,81	0,28	0,86	0,60	0,29	0,89	0,50	1,13	1,51	0,42	0,27
Thymol-Methylether	1236	1235	-	0,32	0,06	-	0,17	0,17	0,48	0,17	0,19	0,27	0,02
Carvotanacetone	1246	1244	0,26	0,66	0,63	0,67	0,21	0,40	0,45	0,72	0,44	0,52	0,03
Piperitone	1256	1252	1,50	2,60	0,75	0,62	1,40	3,60	1,50	1,78	1,46	1,72	0,74
<i>trans</i> -Myrtanol	1261	1261	0,29	0,17	0,21	0,24		0,33	0,22	0,63	0,35	0,90	0,07
Isobornyl Acetate	1287	1285	0,48	3,97	1,61	1,53	0,48	0,25	2,34	1,29	0,94	1,77	1,21
β -Caryophyllene	1423	1419	1,09	0,13	-	-	1,26	0,16	-	-	0,23	-	0,23
<i>unidentified</i>	1458	-	0,50	-	-	-	1,43	0,44	-	0,18	0,47	-	0,20
<i>unidentified</i>	1480	-	0,64	0,11	0,39	0,03	1,19	0,27	-	0,12	0,30	0,05	0,13
Germacrene-D	1485	1485	11,65	2,75	6,01	2,24	16,51	6,30	2,62	3,74	2,74	1,48	23,70
<i>unidentified</i>	1501	-	0,69	1,21	0,58	0,16	1,94	2,77	0,27	0,53	0,37	0,26	0,73
α -Muuroleone	1504	1500	0,53	0,19	0,40	0,10	0,61	0,05	0,17	0,16	0,23	-	0,04
γ -Cadinene	1519	1513	1,12	0,56	1,01	0,31	3,61	0,77	0,39	0,40	0,84	0,20	0,98
δ -Cadinene	1527	1523	3,92	2,34	3,64	1,39	10,34	2,94	1,47	1,67	2,66	0,90	7,41
Spanthulenol	1584	1578	0,21	0,40	0,55	0,71	0,50	0,50	0,13	0,27	0,36	0,42	0,03
<i>unidentified</i>	1589	-	0,35	0,04	0,14	-	0,69	0,65	0,13	0,37	0,52	-	0,07
<i>cis</i> -Cadin-4-en-7-ol	1634	1636	0,16	0,29	0,41	0,31	0,49	0,27	0,11	0,18	0,29	0,15	0,01
T-Muurolol	1648	1642	2,23	3,36	4,17	4,18	3,25	3,20	2,68	2,55	2,17	1,63	0,71
Torreyol	1652	1646	0,48	0,66	1,13	1,27	0,35	0,49	0,41	0,66	0,45	0,39	0,10
α -Cadinol	1661	1654	3,47	6,87	8,07	8,32	4,49	5,49	7,00	4,49	2,66	2,87	4,41
α -Bisabolol	1690	1685	-	-	-	-	-	0,42	1,35	0,96	-	-	0,24

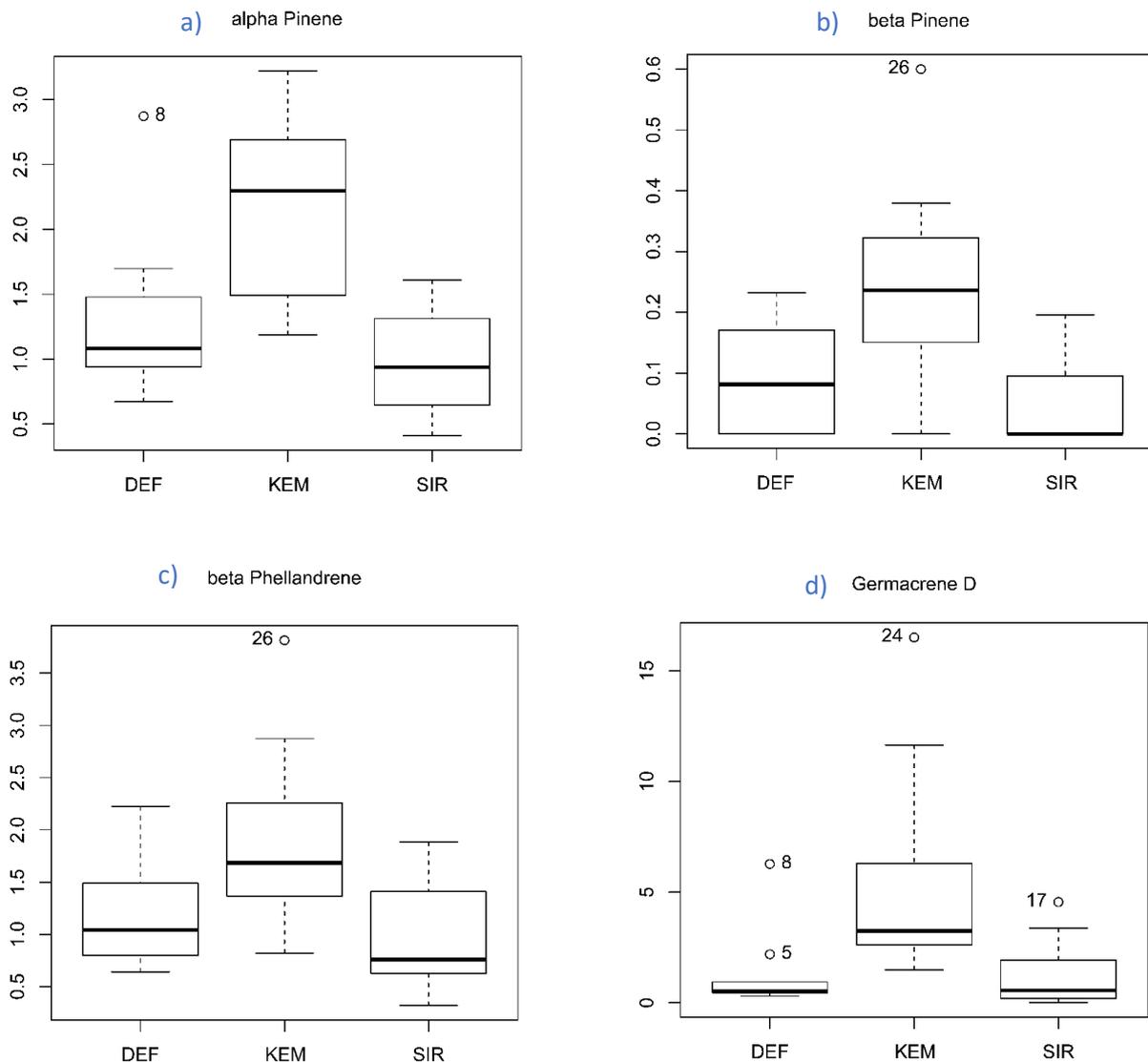
4.1 Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

In einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) wurden alle Komponenten der reduzierten Datenmatrix auf signifikante Unterschiede in ihrem Auftreten untersucht. Im Zuge der ANOVA konnten bei α -Pinen, β -Pinen, β -Phellandren, Terpinen-4-ol, p-Cymen-8-ol, Germacran-D, δ -Cadinen und T-Muurolol signifikante Unterschiede in ihrem Auftreten festgestellt werden (siehe Tabelle 6). Hierbei wurden p-Werte $\leq 0,05$ als „signifikant“ angenommen. Besonders hohe Signifikanz wiesen α -Pinen ($p = 0,00049$), β -Pinen ($p = 0,00151$), β -Phellandren ($p = 0,00818$) und Germacran-D ($p = 0,00746$) auf. Hierzu wurden Boxplots angefertigt, um ihre Signifikanz graphisch zu veranschaulichen (siehe Abb. 16a, 16b, 16c & 16d).

Tab. 6 – Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) aller Einzelkomponenten mit signifikanten Unterschieden ($p \leq 0,05$) (Substanzen in englischer Sprache)

<i>Substanz</i>	<i>RI</i>	<i>KOVATS</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p-Wert</i>
α -Pinene	933	932	7,54	3,77	10,36	0,000491
β -Pinene	978	979	0,24	0,11	8,427	0,00151
β -Phellandrene	1032	1029	5,16	2,57	5,814	0,00818
Terpinen-4-ol	1177	1177	13,41	6,70	3,418	0,0481
p-Cymen-8-ol	1294	1290	0,45	0,22	3,978	0,0311
Germacrene-D	1485	1485	121,4	60,72	5,948	0,00746
δ -Cadinene	1527	1523	25,7	12,85	3,858	0,0341
T-Muurolol	1648	1642	6,50	3,25	5,397	0,011

Abb. 16 – Boxplots: a) α -Pinene b) β -Pinene c) β -Phellandrene und d) Germacrene-D aller drei *Pinus cembra* L. Populationen (Substanznahmen in englischer Sprache)



In einem Tukey-Honesty Significant Difference Post-hoc-Tests (HSD), wurde die Signifikanz der Unterschiede der Einzelkomponenten zwischen den drei untersuchten Populationen gemessen. Um aussagekräftige Unterschiede sichtbar zu machen, wurden Substanzen zum Vergleich ausgewählt, welche in der ANOVA signifikante Werte ($p \leq 0,05$) aufwiesen.

Hierbei fällt auf, dass sich die Populationen SIR und DEF in der Komposition der Hydrolate sehr ähnelten, da keine der 10 untersuchten Substanzen signifikante Unterschiede zeigten. Im Vergleich der Population KEM und DEF wurden vier von zehn signifikante Unterschiede bei α -Pinen ($p = 0,0117$), β -Pinen ($p = 0,0159$), p-Cymen-8-ol ($p = 0,0425$) und Germacran-D ($p = 0,0201$) festgestellt. Die Populationen KEM und SIR unterschieden sich am stärksten voneinander, da neun von zehn Substanzen signifikante Unterschiede zeigten. Die Substanz p-Cymen-8-ol ($p=0,9756$) war hierbei die einzige Komponente mit einem p-Wert $> 0,05$ und zeigte daher keine Signifikanz (siehe Tab. 7).

Tab. 7 – Ergebnisse des Tukey Honesty Significant Difference Test (HSD) (Substanzen in englischer Sprache)

<i>Substanz</i>	<i>RI</i>	<i>KOVATS</i>	<i>p - Werte</i>		
			SIR - DEF	KEM - DEF	KEM - SIR
α -Pinene	933	932	0,4800	0,0117	0,0005
β -Pinene	978	979	0,6992	0,0159	0,0017
β -Phellandrene	1032	1029	0,7099	0,0596	0,0080
Terpinen_4_ol	1177	1177	0,1874	0,7902	0,0453
p-Cymen-8-ol	1294	1290	0,0658	0,0425	0,9756
Germacrene-D	1485	1485	0,9971	0,0201	0,0140
δ -Cadinene	1527	1523	0,8602	0,1219	0,0358
T-Muurolol	1648	1642	0,1800	0,3772	0,0081

4.2 Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA)

Im Zuge einer PCA wurden Biplots (siehe Abb. 8a & b) angefertigt, um einen intraspezifischen Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Hydrolate aller drei Populationen sichtbar zu machen. Hierbei wurde der reduzierte Datensatz der drei Populationen mit 23 Komponenten verwendet (siehe Tab. 9). Beide erstellten Plots repräsentieren die zwei Dimensionen PC1 & PC2 46% der gesamten Varianz (siehe Tab 4.).

Tab. 8 - Daten der PCA-Auswertung der reduzierten Datenmenge

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
<i>Standard deviation</i>	2,507	2,056	1,689	1,477	1,242	1,020	0,981	0,889
<i>Proportion of Variance</i>	0,273	0,184	0,124	0,095	0,067	0,045	0,042	0,034
<i>Cumulative Proportion</i>	0,273	0,457	0,581	0,676	0,743	0,788	0,830	0,864
	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16
<i>Standard deviation</i>	0,844	0,738	0,601	0,562	0,505	0,490	0,440	0,386
<i>Proportion of Variance</i>	0,031	0,024	0,016	0,014	0,011	0,010	0,008	0,006
<i>Cumulative Proportion</i>	0,895	0,919	0,935	0,949	0,960	0,970	0,978	0,985
	PC17	PC18	PC19	PC20	PC21	PC22	PC23	
<i>Standard deviation</i>	0,325	0,298	0,257	0,209	0,167	0,102	0,040	
<i>Proportion of Variance</i>	0,006	0,004	0,003	0,002	0,001	0,000	0,000	
<i>Cumulative Proportion</i>	0,990	0,994	0,996	0,998	0,999	1,000	1,000	

In der graphischen Abbildung des PCA Score Plots (Abb. 17) ist eine Überschneidung von den drei Populationen ersichtlich, wobei SIR mit 3 von 10 Individuen am wenigsten Überschneidungspunkte aufweist. KEM zeigt 5 von 10 und KEM 6 von 10 Überschneidungen.

Bei SIR bilden die Punkte 14 (S4) und 16 (S6) den höchsten Abstand zu den anderen Populationen. S4 zeigt hohe Menge *trans*-Pinocarveol (2,1%) und Verbenon (8,5%), wobei S6 hohe Menge an *cis*-p-Menth-2-en-1-ol (5,7%) aufweist.

In der Population DEF liegt Punkt 5 (D5) weit über der PC2 Achse (< 37,5). D5 weist hohe Mengen *cis*-p-Menth-2-en-1-ol (7,0%) Terpinen-4-ol (10,6%), Piperitone (7,9%) und *trans*-p-Menth-2-en-1-ol (3,3%) auf.

In der Population KEM zeigen auch Punkte 22 (K2), 23 (K3) und 24 (K4) hohe Abstände zu den restlichen Punkten. Hierbei weist K2 hohe Menge T-Muurolol (3,4%), α -Cadinol (6,9%), Verbenon (8,5%) und Isobornylacetate (3,4%) auf. K3 zeigt hohe Mengen Crypton (5,0%) und α -Cadinol (8,1%), während in K4 hohe Mengen Borneol (6,1%), Crypton (6,1%), α -Terpineol (33,9%) und T-Muurolol (4,2%) enthalten sind.

Alle restlichen Punkte sind sich auf Grund ihrer Nähe zueinander in ihrer Komposition sehr ähnlich und werden daher nicht genauer behandelt.

Abb. 18 zeigt eine deutliche Gruppierung über der PC2-Achse über 25 bei den Substanzen *cis*-p-Menth-2-en-1-ol, Terpinen-4-ol, Piperiton und *trans*-p-Menth-2-en-1-ol. Eine weitere Gruppe ist ab 19 der PC2 Achse zu erkennen, welche sich aus β -Pinene, β -Phellandrene, δ -Cadinene, Germacrene-D, α -Pinene, α -Cadinol und T-Muurolol zusammensetzt. Ebenso bildet sich eine Gruppe im Bereich PC2 < 12,5 und PC1 < 0,0, wobei sich in dieser Gruppe die Substanzen *trans*-Verbenol, Myrtenal, 1,8-Cineol, α -Terpineol, Isobornylacetat, Mentha-1,5-dien-8-ol, Verbenon, Crypton, *trans*-Pinocarveol, *trans*-Carveol, Borneol und Camphor befinden.

Abb. 17 - PCA Score Plot: Variation der Hydrolat Komposition der 3 *Pinus cembra* L. Populationen

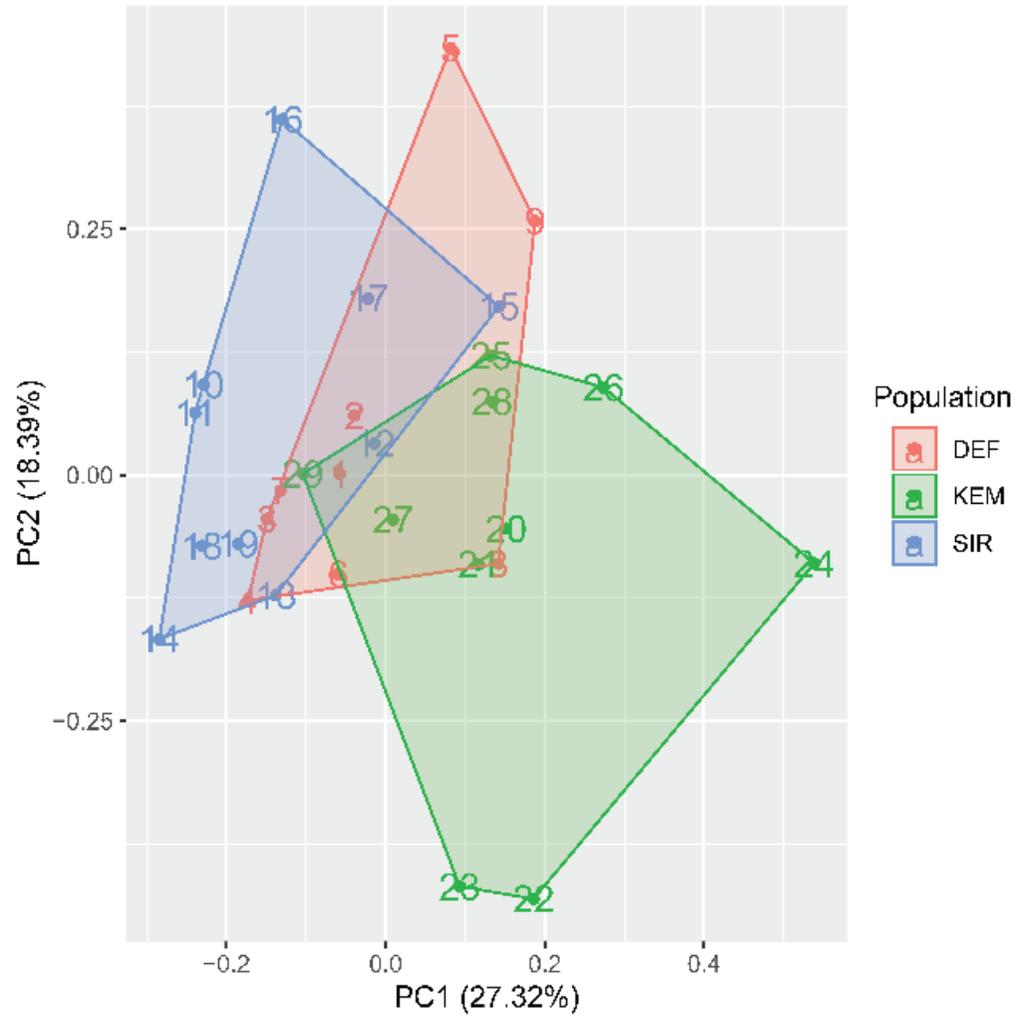
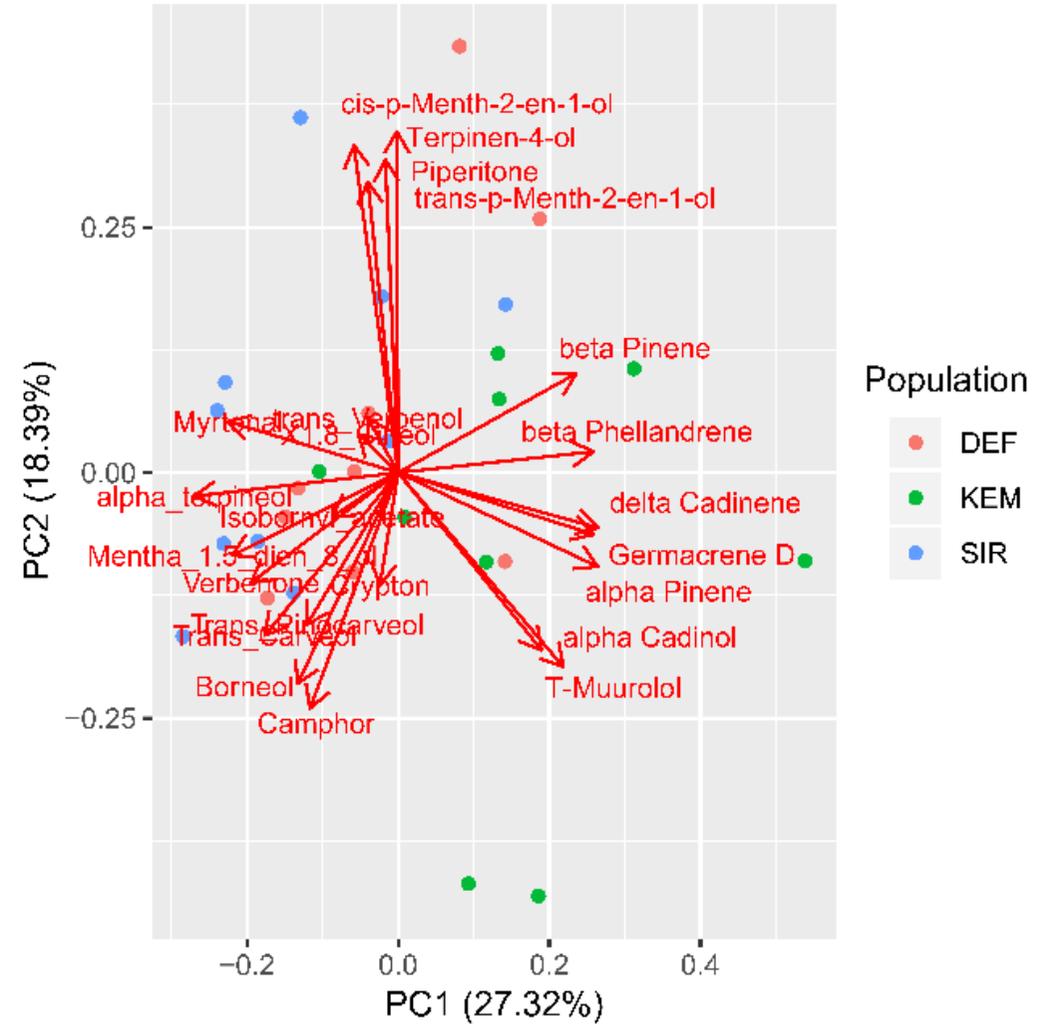


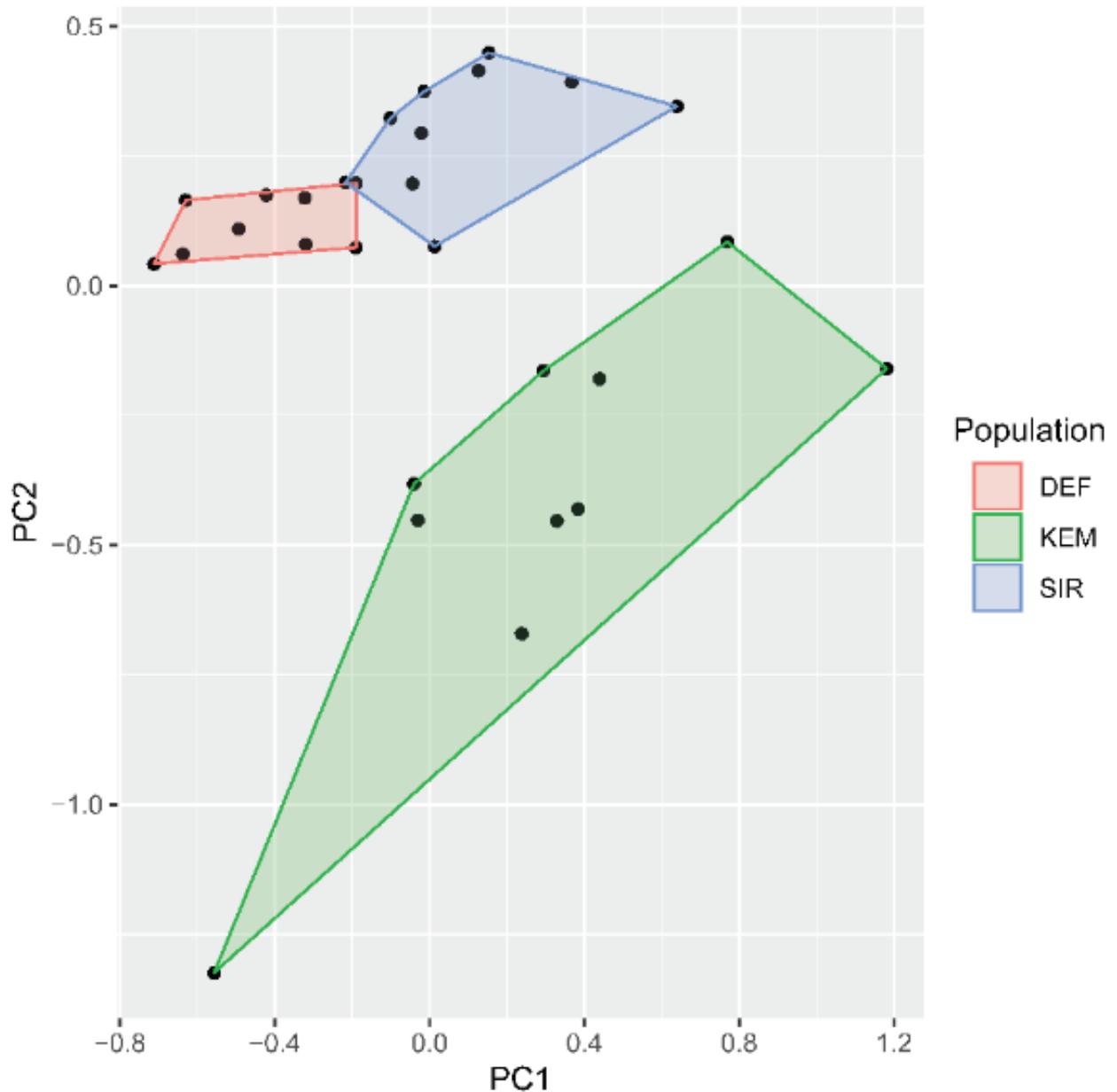
Abb. 18 - PCA Loading Plot: Flüchtige Bestandteile welche 45,71% der gesamten Varianz der reduzierten Datenmatrix repräsentieren.



4.3 Local Fisher Discriminance Analysis (LFDA)

Bei der Verteilung der Flächen in der LFDA (Abb. 19) kann eine Trennung der drei Populationen festgestellt werden. Die Fläche DEF und KEM überschneiden sich hierbei lediglich in zwei Punkten. Die Population KEM liegt deutlich weiter entfernt und bestätigt die Ergebnisse der PCA, dass sich diese Population in ihrem Chemotyp sehr von den anderen beiden unterscheidet.

Abb. 19 - Local Fisher Discriminant analysis (LFDA) – Visualisierung durch ggfortify



5. Diskussion

Da bereits einige Studien zum Thema des ätherischen Öls der Zirbe (Apetrei et al., 2011 & 2013; Müllner, 2015; Ioannou et al., 2014; Lis et al., 2017; Ochocka et al., 2002; Nikolić et al., 2018), jedoch keine Studien über das Hydrolat der Zirbe verfasst wurden, beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Vergleich der flüchtigen Inhaltsstoffe im Hydrolat von drei Zirbenpopulationen in Österreich. Es wurden dazu Hydrolatproben von 29 *Pinus cembra* L. Individuen aus drei Versuchsstandorten in Osttirol, Kärnten und der Steiermark auf ihre Inhaltsstoffe und inter- sowie intraspezifisch auf ihre Unterschiede und Zusammenhänge in ihrer Zusammensetzung durch eine Varianzanalyse (ANOVA), eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) und einer Diskriminanzanalyse (LFDA) untersucht.

Da es bis zum aktuellen Zeitpunkt keine Untersuchung des Hydrolates der Zirbe gibt, sind Vergleiche mit Ergebnissen anderer Studien nicht möglich. Eine Studie von Vitoa (2019) zeigte, dass das Hydrolat von *Monarda citriodora* im Vergleich zu seinem ätherischen Öl keine Komponenten aufwies, welche nicht auch im ätherischen Öl vorkamen. Interessant ist jedoch der Vergleich des Hydrolates mit dem ätherischen Öl der Zirbe aus anderen Arbeiten. Hierbei haben Ioannou et al. (2014) in einer Studie festgestellt, dass die Hauptkomponenten in dem von ihnen untersuchten ätherischen Öl einer Zirbe aus dem Royal Botanic Garden Edinburgh (England), Germacran-D mit 21,2%, α -Pinen mit 21,1%, β -Phellandren mit 13,5% und Germacran-D-4-ol mit 9,4% aufwies. Nach Apetrei et al. (2013), wurde in einer Zirbe aus den Calimani Bergen (Rumänien) α -Pinen mit über 69,1% im ätherischen Öl der Nadeln festgestellt, wohingegen Germacran-D nur unter 0,1% auftrat. In den Ästen kam α -Pinen zu 25,0% vor, wohingegen Limonen/ β -Phellandren mit 41% die Hauptkomponenten waren. In einer Studie von Müllner (2015) wurde in den Nadeln des ätherischen Öls einer Zirbe aus Kärnten (Österreich) α -Pinen mit 47,7% und Germacran-D mit 10,8% nachgewiesen. In den Trieben hingegen kam α -Pinen mit 15,7%, Limonen/ β -Phellandren mit 52,5% unter Germacran-D unter 0,1% vor. Dies weist darauf hin, dass die Menge der auftretenden Inhaltsstoffe sehr vom untersuchten Pflanzenteil abhängig ist. Weiters ist die geographische Lage der Pflanze und die Vegetationsperiode ausschlaggebend für die Komposition der flüchtigen Inhaltsstoffe (Mahdih, 2018, Gasparetto, et al., 2016 & Morshedloo, 2018). Nachdem hauptsächlich flüchtige Inhaltsstoffe im Hydrolat, speziell Mono- und Sesquiterpene, in den untersuchten Hydrolaten vorkamen, kann diese Behauptung auch auf die Ergebnisse dieser Studie angewendet werden.

Bei den in dieser Studie untersuchten Hauptkomponenten der Hydrolatproben im Vergleich zum ätherischen Öl der Zirbe ist auffällig, dass unter den Monoterpenen α -Terpineol in hohen Mengen bei allen 29 Proben auftrat ($31,3\% \pm 33,5$; min. = 17,9%; max. = 40,5%). In Studien von Apetrei, et al. (2011 & 2013), Müllner (2015) und Dormont et al. (1997), kam α -Terpineol nur spurenweise ($< 0,1\%$) oder gar nicht im ätherischen Öl der Zirbe vor. Das Auftreten von α -Terpineol im Hydrolat kann durch seine Löslichkeit in Wasser erklärt werden, wobei hier der n -Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{OW}) von Bedeutung ist. α -Terpineol weist hierbei $\log K_{OW}$ von 2,98 auf, wohingegen α -Pinen und β -Pinen $\log K_{OW}$ -Werte von 4,83 und 4,16 aufweisen (PubChem Database, 2019). Der $\log K_{OW}$ -Wert ist ein Verteilungskoeffizient, repräsentiert die Menge der untersuchten Substanz, welche nach Ausschütteln mit einem Oktanol-Wasser-Gemisch, im Oktanol verbleibt. Hierbei ist zu beachten, dass der höhere $\log K_{OW}$ des α -Pinen und β -Pinen darauf hinweist, dass mehr der beiden Substanzen in Oktanol

gelöst wurde, als im Wasser. Dies erklärt die geringe Menge an α -Pinen und β -Pinen und die hohe Menge α -Terpineol der Hydrolatproben im Vergleich zur Zusammensetzung des ätherischen Öls in der ausgewählten Literatur. Hierbei ist anzumerken, dass durch unterschiedliche Löslichkeit der flüchtigen Komponenten einer Pflanze, sich die Gesamtheit des Chemotypen nicht nur aus dem ätherischen Öl, oder im Hydrolat separat, sondern aus der Kombination dieser beiden ergibt.

In den Ergebnissen der ANOVA dieser Arbeit konnten bei acht Komponenten (Siehe Tab. 3) signifikante p-Werte festgestellt werden. α -Pinen zeigte den niedrigsten p-Wert und wies jedoch hohe Signifikanz auf, wobei die Schwankungsbreite der Werte gering war (Standardabweichung = 0,61; Min. = 0,6%; Max = 3,22%). Germacran-D zeigte einen sehr signifikanten p-Wert ($p=0,00746$) und hohe Varianz im Auftreten bei allen 29 Hydrolatproben und einer Standardabweichung von 13,8. In den Proben S5 und S10 trat Germacran-D unter 0,01% auf, wohingegen Probe K5 16,5% aufwies. Hierbei sind bereits erste Hinweise ersichtlich, dass die Population KEM deutliche Unterschiede in der Menge an Sesquiterpenen, im Vergleich zu DEF und SIR aufweist. In der Population KEM betrug der Anteil an Sesquiterpenen 22,7%, wohingegen die Population DEF nur 12,7% und SIR 10,2% Sesquiterpene aufwies. Im Vergleich zu DEF, wies KEM somit eine um 179% und im Vergleich zu SIR eine um 222% höhere Menge an Sesquiterpenen auf. Grund dafür könnte eine Korrelation durch das karbonatreiche Ausgangsgestein (Wettersteinkalk, Wettersteindolomit und Hauptdolomit) beim Standort KEM vorliegen, da bei den Standorten DEF und SIR Silikatgestein (Paragneis, Phyllit und Grüngesteine) als Ausgangsgesteine vorlag. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass in der Population KEM ein Schädlingsbefall eine vermehrte Produktion von Sesquiterpenen, speziell Germacrene-D, δ -Cadinene und T-Muurolol, angeregt wurde. Allerdings konnte kein signifikanter Schädlingsbefall vor Ort festgestellt werden. Der Habitus der Bäume war in den Populationen DEF (Abb. 9 & 10) und SIR (Abb. 6 & 7) sehr ähnlich und äußerte sich in höherem Stammumfang und vielen Seitenästen. Im Vergleich zu der Population KEM (Abb. 12 & 13), war die Baumdicke geringer und die Höhe der Bäume auch deutlich niedriger. Auf Grund des Habitus allein, kann hierbei aber keine genaue Aussage im Bezug auf den Chemotyp geschlossen werden, weswegen dieser im Zuge einer PCA auf Unterschiede untersucht wurde. Wie in den Resultaten ersichtlich, überschneiden sich alle drei Flächen der drei Populationen im Score Plot (Abb. 17), wobei manche Punkte (S4, S6, D5, K2, K3, K4) weite Abstände um den Null-Punkt aufwiesen. Durch einen Loading Plot (Abb. 18) konnten Tendenzen der auftretenden Substanzen graphisch veranschaulicht werden, wobei hier auch eine deutliche Trennung von drei Gruppen ersichtlich war. Da die Überschneidung der Flächen jedoch sehr stark war, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass es sich hier um drei Chemotypen handelte.

Bei der graphischen Veranschaulichung der LFDA (Abb. 19) ist ersichtlich, dass die sich die drei Population bis auf eine Überschneidung von zwei Punkten bei SIR und DEF, deutlich voneinander unterscheiden. Dies bestätigt die Annahme, dass jede Population, speziell KEM, einen eigenen Chemotypen aufweist. KEM unterscheidet sich in den Resultaten stark von DEF und SIR, da ihr Abstand der Fläche zu DEF und SIR außergewöhnlich hoch ist. Dies wiederum könnte mit einem populationsgenetischen Unterschied in Zusammenhang stehen. Kurz Holzer untersuchte in zwischen 1958 und 1989 in mehreren Studien die Genetik der Zirbe, indem auf phänotypische Eigenschaften selektiert wurde, um keimfähigere Samen der Zirbe zu züchten. Belokon et al. (2005) untersuchten intra- und interspezifische Unterschiede im Genom von Populationen in den Alpen und den Karpaten. Sie fanden jedoch nur leichte Unterschiede in

den Populationen selbst und stellten fest, dass die genetische Diversität in den Karpaten wesentlich höher war als in den Alpen, wohingegen Heinze & Holzer (2013) vermuten, dass es durch die geographische Nähe der österreichischen Zirbe zu ehemaligen Gletscher-Refugien in den Alpen eine höhere genetische Variation vorliegt, als bis jetzt gefunden wurde.

Somit konnten kaum Hinweise gefunden werden, dass die Zirbe in den Alpen unterschiedliche Genotypen aufweist. Jedoch bestätigen die Ergebnisse dieser Studie, dass signifikante Unterschiede der Chemotypen, speziell in der Population KEM, vorhanden sind.

Es wird nun angenommen, dass dieser Unterschied durch eine geographische Isolierung der Zirbenpopulation im Kemetgebirge im Zusammenhang steht. Der Dachstein mit seinem mächtigen nach Osten auslaufenden Hochplateau könnte hier als Barriere für eine Einwanderung von Zirbenpopulationen aus dem Westen verantwortlich sein. Nevole (1911) beschreibt bereits, dass die Zirbenpopulation im Dachsteingebiet, speziell im Süd-Östlichen Teil im Bereich des Stoderzinken, gegen Süden durch das Ennstal isoliert gelegen ist. Hierbei bezeichnet Nevole diese Population als eine der wenigen *Pinus cembra* L. Populationen, welche vom Hauptareal dieser Spezies getrennt vorkommt. Somit kann behauptet werden, dass der genetische Austausch der Population KEM mit DEF und SIR kaum stattgefunden hat und sich dies in der unterschiedlichen Entwicklung ihrer Chemotypen auswirken könnte. Gleichzeitig könnten die Unterschiede der Chemotypen auch ein Resultat der phylogenetischen Entwicklung der Zirbe in der Population KEM sein.

Um jedoch präzisere Aussagen über den Einfluss der Umweltbedingungen auf die Komposition flüchtiger Inhaltsstoffe im Hydrolat treffen zu können, sollten bei zukünftigen Studien jährliche Proben in der gleichen Vegetationsperiode genommen und die jeweiligen Klimadaten wie Jahresniederschlagsmenge und Wärmesummen als Faktoren miteinbezogen werden. Da auch eine Korrelation der Inhaltsstoffe der untersuchten Hydrolate mit den Bodeneigenschaften interessante Fragestellungen liefern könnten, sollten bei Folgestudien auch Bodenproben um die untersuchten Zirbenbäume genommen werden. Hierbei könnten Auswirkungen von silikat- und kalkreichen Böden auf den Chemotypen bei *Pinus cembra* L. untersucht werden.

6. Aussichten

Die in dieser Arbeit untersuchten Zirbenhydrolate geben Aufschluss über die Diversität der Chemotypen, welche sowohl durch die untersuchten Pflanzenteile, die phylogenetischen Eigenschaften als auch durch populationsgenetische Unterschiede unterschiedliche Komposition aufgewiesen haben. Die zeigt die enorme Vielfältigkeit dieser Spezies, auch auf regionaler Skalierung. Die Zirbe ist wegen ihrer langen Entwicklungsgeschichte und ihren interessanten biologischen als auch ökologischen Eigenschaften, eine äußerst interessante Baumart, welche noch viele Fragen im Bereich ihrer Populationsgenetischen Entwicklung offen lässt. Nachdem die Nachfrage nach ihrem Holz durch eine starke regionale Vermarktung, speziell in Kärnten und Steiermark (Hier ist sie teilweise noch unter Privatbesitz), steigt, ist es aus ökologischer Sicht notwendig, eine Übernutzung zu vermeiden. Trotz ihrer guten Regenerationsfähigkeit und Persistenz, ist der menschliche Eingriff in ihren Lebensraum durch die Ausweitung von Weiden stark für ihren Rückgang mitverantwortlich. Um jedoch ihre Schönheit zu erhalten, ist in Zukunft ein angepasstes Waldmanagement fundamental wichtig (Casalegno et al., 2010).

Da in dieser Arbeit durch den untersuchten Chemotypen des Hydrolates der Zirbe und der geographischen Recherche eine potenziell isolierte Zirbenpopulation (KEM) bestimmt werden konnte, sollten auch zukünftige Studien zu ihrer populationsgenetischen Entwicklung, eine Untersuchung der Hydrolate ins Auge fassen. Hierbei könnte die zusätzliche Untersuchung der Bodenparameter weitere nützliche Informationen liefern, inwiefern die Bildung von Terpenen und Phenolen von den Bodeneigenschaften abhängig sind. Weiters wäre es von hohem Interesse, eine Kombination der Untersuchung des ätherischen Öls gemeinsam mit dem Hydrolat als eine ganzheitlichere Methode zur Untersuchung von Chemotypen anzuwenden. Viele Inhaltsstoffe haben hierbei eine höhere Affinität haben zur polaren als zur apolaren Phase und scheinen daher bei getrennten Analysen kaum oder nicht auf.

Das Thema der ätherischen Öle und Hydrolaten ist nach wie vor eine der spannendsten Möglichkeiten, um das Reich der Pflanzen in ihrer Komplexität besser verstehen zu können. Speziell Hydrolate, finden trotz ihrer wissenschaftlich nachgewiesenen positiven Eigenschaften in der westlichen Welt kaum eine Anwendung, da das ätherische Öl bis jetzt im Vordergrund stand. Auch hier ist es wichtig durch weitere Studien ihre Anwendbarkeit zu prüfen, um sie als nützliches Naturprodukt in der Getränke- und Kosmetikindustrie, sowie auch in der Medizin einsetzbar machen zu können.

7. Danksagung

Ich möchte am Beginn dieser Danksagung mit dem formellen Teil beginnen und mich bei der Universität für Bodenkultur Wien und der Veterinärmedizinischen Universität Wien für das Ermöglichen dieser Arbeit bedanken. Eine große Danksagung geht an die Personen, welche uns die praktische Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben. Hierbei danke ich der ARGE Nockholz, vor allem Ing. Mathias Leitgeb für die Möglichkeit der Probenahme im wunderschönen Hochrindler Zirbenwald. Gleicher Dank geht an die beiden Forstverwalter Albin Passler und DI Andreas Pircher von den Bundesforsten, die die Probenahme in Osttirol und der Steiermark möglich gemacht haben.

Nun möchte noch ein wenig ausholen und die Geschichte teilen, welche Geschichte diese Arbeit mit sich gebracht hat:

Am Anfang dieser Arbeit stand die Bachelorarbeit („Essential Oil Composition of a *Pinus cembra* L. Population in East-Tyrol – Austria“), welche ich mit meinem engen Freund Stefan Singer vor zwei Jahren schreiben durfte. Seit dem Tag, an dem wir unsere Versuche im Zirbenwald begannen, stand uns unser Betreuer Johannes Novak mit Rat und Tat zur Seite und ermutigte uns immer wieder unser Wissen in die Praxis umzusetzen und uns im Bereich der Produktion von ätherischen Ölen in Österreich selbstständig zu werden. Aus dieser Bachelorarbeit entstand schließlich das Unternehmen „Kesselwerk“, das ich mit Stefan Singer bis zum heutigen Tag mit Passion betreiben darf, dass mir die spannende Welt der sekundären Pflanzenstoffe immer wieder aufs Neue schmackhaft macht und mir sehr viel über mich selbst gezeigt hat.

An dieser Stelle möchte ich Stefan danken; Danke für deine Geduld, für dein unerschöpfliches Wissen, für deine Hingabe und deine Freundschaft. Du hast mir eine Welt gezeigt, die ich ohne dich nie betreten hätte und damit mein Leben unermesslich bereichert.

Ich möchte auch Anna Pflanzner für ihre große Hilfe, ihrer fantastischen kulinarischen und mentalen Verpflegung und ihre durch die letzten Jahre ganzheitlichen Unterstützung von ganzem Herzen danken.

Die Unterstützung und die Stärkung aus meiner Familie und meinem Freundeskreis war das Fundament für diese Arbeit und meine studentische Zeit. Hierbei danke ich ganz besonders meinen Eltern Monika und Viktor Billiani, die mich meiner Passion nachgehen ließen und mich stetig motiviert und immer großes Interesse an meinem Fortschritt in dieser Arbeit gezeigt haben. Danke für eure Geduld und die Freiheit die ihr mir geschenkt habt.

Ein großer Dank geht auch an meine Schwester Marie Billiani, ihrem Partner Sebastian Schramm und den Kindern Greta und Fritz, sowie an meinen Cousin Philipp Tenschert für all die Energie, die ich durch euch schöpfen durfte.

Danke Clemens Nolz, Michael Klaffenböck, Marco Fischer, Isabella Posmosan, dass ihr mir immer die loyalsten und besten Freunde wart, die man sich wünschen kann und mich immer zum Lachen gebracht habt, auch wenn die Zeiten schwierig waren.

Danke Peter Dorrigli, dass du mir die BOKU gezeigt hast du mich motiviert hast hier zu studieren. Danke Laura Bragagna und Julia Kammerhuber für die immer lustige Zeit mit euch am Institut und im Labor.

Und schließlich möchte ich meinem Betreuer und Mentor Johannes Novak aus tiefstem Herzen danken. Danke, dass du mir die Chance gegeben und das Vertrauen entgegengebracht hast diese Arbeit zu verfassen und mir immer wieder das Gefühl gegeben hast, dass du professionell und menschlich für mich da warst. Jede Minute, die du dir Zeit genommen hast, war sowohl für diese Arbeit als auch für mich selbst sehr wertvoll.

Danke auch an all die vielen hier nicht erwähnten fantastischen Menschen für diese wunderschöne Studienzeit;

Es war mir eine Ehre!

8. Tabellenanhang

Figure 1 Tab. 9 - Reduzierte Datenmenge mit 23 Komponenten aller drei Populationen (Substanznamen in englischer Sprache)

	α -Pinene	β -Pinene	β -Phellandrene	1, β -Cineol	cis-p-Menth-2-en-1-ol	trans-Pinocarveol	trans-p-Menth-2-en-1-ol	Camphor	trans-Verbenol	Borneol	Mentha-1,5-dien-8-ol	Terpinen-4-ol	Crypton	α -Terpineol	Myrtenal	Verbenone	trans-Carveol	Piperitone	Isobornyl-Acetate	Germacrene-D	δ -Cadinene	T-Murolol	α -Cadinol
D1	1,36	0,17	1,17	0,21	4,10	4,16	3,49	1,49	1,17	4,45	2,01	5,83	1,73	30,06	4,65	6,07	1,01	1,16	2,65	0,46	2,18	1,91	4,31
D2	1,08	0	0,80	0,83	3,56	1,18	1,94	0,24	0,92	3,56	1,17	6,40	3,00	39,27	3,94	4,06	1,35	2,27	0,82	0,94	3,94	2,09	2,43
D3	0,67	0	0,64	0,34	3,48	10,66	0	0,68	1,27	3,56	1,15	5,80	4,91	38,13	3,99	4,75	1,04	4,04	1,18	0,71	0,35	1,39	2,65
D4	0,94	0,08	1,04	0,23	4,80	3,21	0,46	1,22	0,75	4,10	2,49	4,10	4,95	38,30	5,11	9,45	1,41	3,03	1,46	0,31	0,70	2,13	3,95
D5	1,70	0,23	1,49	0,36	7,01	0,34	3,33	0,27	0,53	3,58	0,99	10,62	3,14	27,48	2,71	5,55	0,47	7,90	2,18	2,19	0,79	1,57	4,27
D6	1,48	0	1,62	0,04	4,21	2,70	0,53	0,52	0,81	5,54	1,96	7,01	3,99	30,35	3,89	7,19	1,49	3,25	6,00	0,51	0,85	2,90	5,47
D7	0,86	0	0,91	0,80	4,46	1,98	1,28	0,40	1,15	2,16	3,29	6,69	4,60	35,75	3,84	9,48	1,23	2,19	0,71	0,34	0,48	2,83	4,84
D8	2,87	0,17	2,22	0	3,22	7,08	0,59	0,26	0,98	2,20	2,04	6,36	0,50	29,45	3,42	5,70	1,20	1,59	1,88	6,28	2,16	2,79	4,83
D9	1,00	0,10	0,74	0,55	5,39	0,58	2,26	0,39	0,51	1,68	0,82	7,25	1,45	20,72	1,66	2,88	0,19	5,85	0,42	0,47	1,27	2,99	5,79
S1	0,81	0	0,69	0,18	3,73	2,83	3,38	1,31	1,42	3,92	2,27	7,15	3,42	40,49	4,04	6,77	1,49	2,80	0,98	0,74	0,36	0,63	2,04
S2	0,41	0	0,32	1,27	4,10	1,81	1,87	0,66	0,66	4,27	3,36	8,39	4,91	33,58	4,54	6,63	1,06	2,22	5,19	0,20	0,45	1,50	2,55
S3	1,06	0,10	1,41	0	5,54	2,29	1,67	0,38	1,16	2,83	2,54	7,80	5,11	25,67	3,61	7,80	1,34	1,88	3,12	1,92	1,59	2,87	4,72
S4	1,61	0	0,71	1,32	2,37	3,44	0,57	0,35	1,35	2,27	3,49	7,12	0,78	34,36	3,64	8,48	2,12	1,16	1,43	1,06	1,05	2,71	4,63
S5	0,60	0	0,47	0,51	2,71	7,16	0,68	2,23	0,88	6,84	2,26	6,50	0,42	38,14	3,67	7,78	1,22	1,39	3,27	0,00	0,00	0,87	1,71
S6	1,57	0,20	1,88	0,33	5,71	0,37	2,12	0,77	0,27	3,55	0,83	8,20	3,29	31,24	2,84	5,27	0,38	4,03	2,35	3,38	2,87	2,77	4,15
S7	0,65	0,11	0,84	0,45	6,29	0,47	2,22	0,47	0,46	2,40	1,40	10,29	2,65	37,49	4,43	5,26	1,24	5,85	1,64	0,26	0,24	1,16	1,67
S8	1,31	0	1,63	1,25	5,31	3,03	2,01	0,16	1,20	1,48	1,31	7,73	2,21	33,09	4,26	6,65	1,45	3,24	0,48	4,56	2,47	1,75	2,85
S9	0,79	0	0,63	0,17	2,73	4,99	1,28	1,35	0,55	4,39	2,59	6,32	2,20	34,38	5,64	7,08	1,72	3,09	0,80	0,40	0,40	1,36	2,61
S10	1,22	0	0,81	1,19	3,46	2,15	0,67	0,70	0,77	3,58	2,64	8,88	5,03	32,78	4,58	8,27	2,17	1,67	2,63	0,00	0,31	2,44	3,92
K1	2,47	0,23	0,82	0,67	2,79	4,47	0,55	0,07	1,23	3,05	1,82	6,21	1,14	27,10	3,49	5,54	1,05	1,50	0,48	11,65	3,92	2,23	3,47
K2	2,58	0,27	1,82	0,40	4,56	2,73	0,86	0,43	0,98	3,74	1,37	6,35	4,90	22,20	4,59	8,45	1,42	2,60	3,97	2,75	2,34	3,36	6,87
K3	2,12	0,07	1,45	0,39	1,51	2,19	0,20	2,34	0,20	5,53	1,07	4,01	5,04	27,89	1,87	5,72	1,27	0,75	1,61	6,01	3,64	4,17	8,07
K4	2,13	0	1,22	0,37	1,42	2,22	0,20	2,08	0,21	6,11	1,33	4,82	6,11	33,87	1,87	5,83	1,10	0,62	1,53	2,24	1,39	4,18	8,32
K5	2,84	0,32	2,87	0,51	2,04	1,05	0,56	0,01	0,79	1,24	0,96	5,12	3,27	17,87	1,68	3,19	0,73	1,40	0,48	16,51	10,34	3,25	4,49
K6	1,22	0,24	2,00	0,28	5,18	1,91	1,24	0,15	1,59	1,48	2,14	7,42	0,69	24,89	4,10	7,58	1,07	3,60	0,25	6,30	2,94	3,20	5,49
K7	2,69	0,60	3,81	0,57	5,52	1,59	1,41	0,30	1,37	3,13	0,94	7,49	3,40	25,20	3,87	4,97	1,06	1,50	2,34	2,62	1,47	2,68	7,00
K8	1,49	0,15	1,55	0,15	5,11	2,44	0,66	0,40	0,71	2,54	1,90	6,31	5,26	29,79	4,32	7,79	1,69	1,78	1,29	3,74	1,67	2,55	4,49
K9	3,22	0,38	2,26	0,89	4,55	1,64	0,88	0,33	1,06	1,61	1,63	7,65	4,13	34,55	3,62	5,39	1,23	1,46	0,94	2,74	2,66	2,17	2,66
K10	1,18	0,20	1,37	0,65	4,07	3,30	0,67	0,99	1,51	2,98	1,94	7,15	5,66	33,59	5,33	6,95	1,28	1,72	1,77	1,48	0,90	1,63	2,87
SUMME	43,94	3,62	39,19	14,91	118,93	83,99	37,56	20,94	26,45	97,77	53,74	200,98	97,92	907,69	109,20	186,55	35,49	75,55	53,85	80,76	53,72	68,08	123,15

9. Literatur

Farjon, A. (2005): Monograph of Cupressaceae and Sciadopitys. Royal Botanic Gardens, Kew. ISBN 1-84246-068-4.

Tranquillini, W. (1976): Physiological Ecology of the Alpine Timberline: Tree Existence at High Altitudes with Special Reference to the European Alps. Ecological Studies. Vol 31.

Holzinger, A. (2005): Die Zirbe (*Pinus cembra* L.): Ein Baumportrait der „Königin der Alpen“. Im Gseis Zeit für Natur...Das Nationalpark Gesäuse Magazin. Herbst 2005: 12-13.

Wieser, G., Manning, W.J., Tausz, M. & Bytnerowicz, A. (2006): Evidence for potential impacts of ozone on *Pinus cembra* L. at mountain sites in Europe: An overview. Environmental Pollution. Vol. 139: 53-58. Doi: 10.1016/j.envpol.2005.04.037

Ulber, M., Gugerli, F. & Bozi, G. (2004): EUFORGEN Technical Guidelines for Genetic Conservation and Use of Swiss Stone Pine (*Pinus cembra* L.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 6 pages. Online: http://www.euforgen.org/fileadmin/templates/euforgen.org/upload/Publications/Technical_guidelines/928_Technical_Guidelines_for_genetic_conservation_and_use_for_Swiss_stone_pine__Pinus_cembra_.pdf (27.02.2019).

Schmidt, W.C. & Holtmeier, F.K. (1994): Distribution of stone pines. Proceedings-International Workshop on Subalpine Stone Pines and Their Environment: The Status of Our Knowledge. USDA Forest Service, Intermountain Research Station Oregon UT, General technical report INT-GTR-309: 1-6.

Holtmeier, F.K. (1967): Die Verbreitung Der Holzarten Im Oberengadin unter Dem Einfluss des Menschen und des Lokalklimas. Erdkunde. Band 21. Heft 4: 251-258.

Vescovi, E., Ravazzi, C., Arpentini, E., Finsinger, W., Pini, R., Valsecchi, V., Wick, L., Ammann, B. & Tinner, W. (2007): Interactions between climate and vegetation during the lateglacial period as recorded by lake and mire sediment archives in northern Italy and southern Switzerland. Quaternary Science Reviews. Vol 26. Issue 11–12: 1650–1669. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2007.03.005>

Roloff, A., Weisgeber, H., Lang, U.M., Stimm, B. & Schütt, P. (2014): Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie: Begründet von Peter Schütt. *Pinus Cembra* III: 1-12. Doi: 10.1002/9783527678518

Aazza, S., Lyoussi, B. & Miguel, M.G. (2012): Antioxidant activity of eight hydrosols from Morocco. Asian J Plant Science. Vol 11(3): 137-142. Doi: 10.3923/ajps.2012.137.142

Gasparetto, A., Bella Cruz, A., Wagner, T.M., Bonomini, T.J., Correa, R. & Malheiros, A. (2016): Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. Industrial Crops and Products. Vol 95: 256–263. Doi: 10.1016/j.indcrop.2016.10.030

Dib, M.E.A., Djaboua, N., Allalia, H., Paolinib, J., Tabtia, B., Costab, J. & Muselli, A. (2015): Chemical Composition of Essential Oils and Hydrosol Extracts of *Daucus muricatus* and Assessment of Its Antioxidant Activity. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. Vol 21: 23–37. Doi: 10.1080/10496475.2014.891093

Hussien, J., Teshale, C. & Mohammed, J. (2011): Assessment of the Antimicrobial Effects of Some Ethiopian Aromatic Spice and Herb Hydrosol. *International Journal of Pharmacology* Vol 7(5): 635-640. Doi: 10.3923/ijp.2011.635.640

Hamedi, A., Moheimani, S.M., Sakhteman, A., Etemadfard, H. & Moein, M. (2017): An Overview on Indications and Chemical Composition of Aromatic Waters (Hydrosols) as Functional Beverages in Persian Nutrition Culture and Folk Medicine for Hyperlipidemia and Cardiovascular Conditions. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. Vol 22(5): 544-561. Doi: 10.1177/2156587216686460

Garneau, F.X., Collin, G. & Gagnon, H. (2014): Chemical composition and stability of the hydrosols obtained during essential oil production. I. The case of *Melissa officinalis* L. and *Asarum canadense* L. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 2014. Vol 2(1): 54-62. ISSN: 2321 9114

Boyraz, N. & Özcan M. (2005): Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia* Vol 76: 661– 665. Doi: 10.1016/j.fitote.2005.08.016

Zatlaa, A.T., Dibb, M., Djaboua, N., Iliasc, F., Costad J. & Musellid, A. (2017): Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage. *Journal of Essential Oil Research*. Vol 5. Issue 5: 391-399. Doi: 10.1080/10412905.2017.1322008

Al-Turki, A.I. (2007): Antibacterial effect of thyme, peppermint, sage, black pepper and garlic hydrosols against *Bacillus subtilis* and *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol 5(2): 92-94.

D'Amato, S., Serio, A., Lopez, C. & Paparella, A. (2018): Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food Applications. *Food Control*. Vol 86: 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.030>

Labadie, C., Ginies, C., Guinebretiere, M. H., Renard, C. M. G. C., Cerutti, C. & Carlin, F. (2015): Hydrosols of orange blossom (*Citrus aurantium*) and rose flower (*Rosa damascena* and *Rosa centifolia*) support the growth of a heterogeneous spoilage microbiota. *Food Research International*. Vol 76. 576-586. Doi: 10.1016/j.foodres.2015.07.014

Zheljzakov, V. D. & Astatkie, T. (2011): Effect of residual distillation water of 15 plants and three hormones on scotch spearmint (*Mentha x gracilis* Sole). *Industrial Crops and Products*. Vol 3: 704-709. Doi: 10.1016/j.indcrop.2011.01.011

Rao, R.B.R. (2013): Hydrosols and water-soluble essential oils: Medicinal and biological properties. *Recent progress in medicinal plants. Essential Oils I*. Vol 36: 119-140.

Rao, R.B.R., Kaul, P.N., Syamasundar, K.V. & Ramesh, S. (2003): Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol 18: 133-135. Doi: 10.1002/ffj.1157

Rose, J. (1999): 375 Essential Oils and Hydrosols. Frog Ltd., Berkely, California. ISBN: 1883319897 / 978-1883319892

Catty, S. (2001): *Hydrosols: The Next Aromatherapy*. Healing Arts Press, Rochester Vermont. ISBN: 0892819464 / 978-0892819461

Maciąg, A. & Kalemba, D. (2015): Composition of rugosa rose (*Rosa rugosa* thunb.) hydrolate according to the time of distillation. *Phytochemistry Letters*. Vol 11: 373-377. Doi: 10.1016/j.phytol.2014.10.024

Yaylaa, E.M., Izgua, N., Ozdemira, L., Erdemb, S.A. & Kartalb, M. (2016): Sage tea–thyme–peppermint hydrosol oral rinse reduceschemotherapy-induced oral mucositis: A randomized controlled pilotstudy. *Complementary Therapies in Medicine*. Vol 27: 58–64. Doi: 10.1016/j.ctim.2016.05.010

Jeannot, V., Chahboun, J., Russel, D. & Casabianca, H. (2003): *Origanum compactum* Bentham: composition of the hydrolat aromatic fraction, comparison with the essential oil and its interest in aromatherapy. *The international Journal of Aromatherapy* 2003. Vol 13: 90-94. Doi: 10.1016/S0962-4562(03)00076-6

Ozturk, I., Tornuk, F., Caliskan-Aydogan, O. & Durak, M.Z. (2016): Osman SagdicDecontamination of iceberg lettuce by some plant hydrosols. *LWT - Food Science and Technology*. Vol 74: 48-54. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.067>

Baugh, P.J. (1993): *Gaschromatographie: Eine anwenderorientierte Darstellung*. Vieweg Verlag. ISBN 3-528-06657-1

Ettre, L.S., Hinshaw, J.V. & Rohrschneider, L. (1996): *Grundbegriffe und Gleichungen der Gaschromatographie*. Hüthig Verlag Heidelberg. ISBN 3-7785-2418-6

Otto, M. (2011): *Analytische Chemie*. 4. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN 978-3-527-32881-9

Kolb, B. (1999): *Gaschromatographie in Bildern: Eine Einführung*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN 3-527-29794-4

Van Husen, D. (2012): Zur glazialen Entwicklung des oberen Gurktales. *Jahrbuch der geologischen Bundesanstalt*. Band 152. Heft 1-4: 39-56. ISSN 0016-7800. Online (25.02.2019): https://opac.geologie.ac.at/wwwopacx/wwwopac.ashx?command=getcontent&server=image&value=JB0063_508_A.pdf

Mayer, H. (1974): *Wälder des Ostalpenraumes; Standort, Aufbau und waldbauliche Bedeutung der wichtigsten Waldgesellschaften in den Ostalpen samt Vorland*. - Gustav Fischer Verlag Stuttgart. ISBN 3437301667

- Kindel, K.H. (1995): Kiefern in Europa. Gustav Fischer Verlag. ISBN 3-437-30771-1
- Bussotti, F. (2002): Pinus Cembra. Pines of Silvicultural Importance. CABI Publishing. 50-53. ISBN: 9780851995397
- Zonga, C., Wautersa, L.A., Van Dongenc, S., Maria, V., Romeoa, C, Martinolia, A., Preatonia, D. & Tosi, G. (2010): Annual variation in predation and dispersal of Arolla pine (*Pinus cembra* L.) seeds by Eurasian red squirrels and other seed-eaters. *Forest Ecology and Management*. Vol 260: 587–594. Doi: 10.1016/j.foreco.2010.05.014
- Apetrei, C.L., Spac, A., Brebu, M., Tuchilus, C. & Miron, A. (2013): Composition, and antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of a full-grown *Pinus cembra* L. tree from the Calimani Mountains (Romania). *Journal of the Serbian Chemical Society*. Vol 78 (1): 27–37. Doi: 10.2298/JSC120409075A
- Gijzen, M., Lewinsohn, E., Savage, T.J., & Croteau, R.B. (1993): Resin ducts of *Pinus halepensis* Mill.-Their structure, development and pattern of arrangement. *Bioactive Volatile Compounds from Plants*. Vol 525. Chapter 2: 8–22. Doi: 10.1021/bk-1993-0525.ch002
- Werker, E. and Fahn, A. (1969): Resin ducts of *Pinus halepensis* Mill.-Their structure, development and pattern of arrangement. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 62. Issue 4: 379-411. Doi: 10.1111/j.1095-8339.1969.tb01974.x
- Apetrei, C.L., Tuchilus, C., Aprotosoia, A.C., Oprea, A., 4, Malterud, K.E. & Miron, A. (2011): Chemical, Antioxidant and Antimicrobial Investigations of *Pinus cembra* L. Bark and Needles. *Molecules*. Vol 16. Issue 9: 7773-7788. Doi: 10.3390/molecules16097773
- Chen, R., He, X., Chen, J., Gu, T., Liu, P., Xu, T., Teale, S.A. & Hao, D. (2018): Traumatic Resin Duct Development, Terpenoid Formation, and Related Synthase Gene Expression in *Pinus massoniana* Under Feeding Pressure of *Monochamus alternatus*. *Journal of Plant Growth Regulation*. Doi: 10.1007/s00344-018-9900-1
- Ioannou, E., Koutsaviti, A., Tzakou, O. & Roussis, V. (2014): The genus *Pinus*: a comparative study on the needle essential oil composition of 46 pine species. *Phytochemistry Reviews*. Vol 13. Issue 4: 741–768. Doi: 10.1007/s11101-014-9338-4
- Kral, F. (1988): Pollenanalytische Ergebnisse Zu Waldgeschichtlichen Fragen In Den Hohen Tauern. *Sauteria* 4: 43-53. Online: https://www.zobodat.at/pdf/Sauteria_4_0043-0053.pdf (27.02.2019)
- Stricker, A. (2013): Geologischer Lehrkoffer des Bezirks Lienz. Online unter: https://www2.uibk.ac.at/downloads/oegg/Geol_Lehrkoffer_Lienz_Beiheft.pdf (26.02.2019)
- Mandl, G. (2000): The Alpine sector of the Tethyan shelf – Examples of Triassic to Jurassic sedimentation and deformation from the Northern Calcareous Alps. *Mitteilungen der österreichischen geologischen Gesellschaft* 92: 61–77. ISSN 0251-7493
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A. & Orlova, I. (2007): Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*. Vol 5. Issue 5: 417-440. Doi: 10.1080/07352680600899973

Dormont, L., Roques, A. And Malosse, C. (1997): Cone And Foliage Volatiles Emitted By Pinus Cembra And Some Related Conifer Species. *Phytochemistry*. Vol 49. No 5: 1269-1277. Doi: 10.1016/S0031-9422(98)00105-8

Mahdieh, M., Talebi, M.S. & Akhiani, M. (2018): Intraspecific essential oil and anatomic al variations of *Salvia nemorosa* L. (Labiatae) populations in Iran. *Industrial Crops & Products*. Vol 123: 35–45. Doi: 10.1016/j.indcrop.2018.06.061

Morshedlooa, M.R., Salamib, S.A., Nazerib, V., Maggic, P. & Craker, L. (2018): Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. *Industrial Crops & Products*. Vol 119. 183–190. Doi: 10.1016/j.indcrop.2018.03.049

Vitoa, M.D., Bellardia, M.G., Mondellob, F., Modestoa, M., Michelozzic, M., Buglid, F., Sanguinetti, M., Sclocchie, M.C., Sebastianie, M.L., Biffif, S., Barbantia, L. & Mattarelli P. (2019): *Monarda citriodora* hydrolyzed essential oil comparison in several anti-microbial applications. *Industrial Crops & Products*. Vol 128: 206–212. Doi: 10.1016/j.indcrop.2018.11.007

Nikolić, B., Todosijević, M., Ratknić, M.a, Đorđević, I., Stanković, J., Cvetković, M., Marin, P.D. & Tešević, V. (2018): Terpenes and n-alkanes in needles of *Pinus cembra*. *Natural Product Communications*. Vol 13. Issue 8: 1035-1037. Doi: 10.1076/phbi.40.5.395.8452

Lis, A., Kalinowska, A., Krajewska, A. & Mellor, K. (2017): Chemical Composition of the Essential Oils from Different Morphological Parts of *Pinus cembra* L. *Chemistry and Biodiversity*. Vol 14. Issue 4.: Article number e1600345. Doi: 10.1002/cbdv.201600345

Ochocka, R., Asztemborska, M., Sybilska, D. and Langa, W. (2008): Determination of Enantiomers of Terpenic Hydrocarbons in Essential Oils Obtained from Species of *Pinus* and *Abies*. *Pharmaceutical Biology*. Vol 40. Issue 5: 395–399. Doi: 10.1076/phbi.40.5.395.8452

Heinze, B. & Holzer, K. (2013): A review of research on *Pinus cembra* in Austria, with special reference to the conservation of genetic resources. *Nationalpark Hohe Tauern – Conference*. Vol 5: 279-283. Online unter: https://www.zobodat.at/pdf/NP-Hohe-Tauern-Conference_5_0279-0283.pdf (28.03.2019)

Bergmann, F. & Hattemer, H.H. (1995): Isozyme gene loci and their allelic variation in *Pinus sylvestris* L. and *Pinus cembra* L. *Silvae Genetica*. Vol 44: 286-289.

Belokon, M.M., Belokon, Y.S., Politov, D.V. & Altukhov, Y.P. (2005): Allozyme polymorphism of Swiss stone pine *Pinus cembra* L. in mountain populations of The Alps and the Eastern Carpathians. *Russian Journal of Genetics*. Vol 41. Issue 11: 1268-1280.

Casalegno, S., Amatulli, G., Camia, A., Nelson, A. & Pekkarinen, A. (2010): Vulnerability of *Pinus cembra* L. in the Alps and the Carpathian Mountains under present and future climates. *Forest Ecology and Management*. Vol 259: 750–761. Doi: 10.1016/j.foreco.2009.10.001

Morshedloo, M.R., Maggib, F., H., Nekoc, H.T. & Aghdamd, M.S. (2018): Sumac (*Rhus coriaria* L.) fruit: Essential oil variability in Iranian populations. *Industrial Crops & Products*. Vol 111: 1–7. Doi: 10.1016/j.indcrop.2017.10.002

Mahdieh, M., Talebi, S.M. & Akhiani, M. (2018): Intraspecific essential oil and anatomical variations of *Salvia nemorosa* L. (Labiatae) populations in Iran. *Industrial Crops & Products*. Vol 123: 35–45. Doi: 10.1016/j.indcrop.2018.06.061

Nevole, J. (1911): Ein Beitrag zur Verbreitung der Zirbe in Steiermark. *Österreichische botanische Zeitschrift*. Vol 61. Issue 11: 427–429. Doi: 10.1007/BF01667376

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. alpha-TERPINEOL, CID=17100. Online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17100> (05.04.2019)