

# Biodiversität medizinaler Pflanzen

## Abschlussbericht der Kooperationsphase 2012/2013

In Kooperation mit dem Karlsruher Institut für Technologie  
Durchgeführt am Botanischen Institut - Molekulare Zellbiologie  
Betreut von Dipl.-Biol. Thomas Horn

Benedikt Groß  
Langeckweg 6  
76189 Karlsruhe

Patrick Kübler  
Wittumstraße 28  
76646 Bruchsal



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Abstract</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Morphologie</b>	<b>3</b>
<b>2.2 DNA-Extraktion</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	<b>6</b>
<b>2.4 Gelelektrophorese</b>	<b>7</b>
<b>2.5 Primer-Suche</b>	<b>9</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Sequenzierung</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Primer</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Spektrometrie</b>	<b>12</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Erkenntnisse</b>	<b>13</b>
<b>4.2 Ausblick</b>	<b>14</b>
<b>4.3 Probleme</b>	<b>15</b>
<b>5. Danksagung</b>	<b>16</b>
<b>6. Quellen</b>	<b>17</b>
<b>6.1 Bildquellen</b>	<b>17</b>
<b>6.2 Internetquellen</b>	<b>17</b>
<b>7. Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>18</b>

## Abstract

Herbal medicine is becoming a more common way of treating diseases or improving personal well-being. In order to prove if the ingredients, which are listed on the packaging, are really included, you need a complex analysis of all the substances. An easy method could be to use a unique DNA-sequence called primer specific for every examined species. The aim of this project was to find such specific primers.

We compared the DNA-sequences *rbcl* and *matK* of eleven different species of *Dianthus* (*D. superbus*; *D. chinensis*; *D. gratianopolitanus*; *D. barbatus*, *D. turkestanicus*, *D. giganteus*, *D. japonicus*, *D. balbisii ssp. liburnicus*, *D. lusitanus*, *D. knappii*, *D. deltoides*). Although most of those had already been found, we examined the proposed sequences by redoing the DNA-extraction as well as the sequencing to confirm existing data. The used plants came from confirmed sources e. g. other universities.

The final outcome consists of a primer called *Dchi-mkk294T-rv*, which can distinguish *Dianthus chinensis* from any other *Dianthus* species, which as been sequenced. This primer can now easily be used to check whether *Dianthus chinensis* is included in a TCM-product or not. Furthermore there are several other possible primers to identify *Dianthus* species. However these haven't been tested in laboratory yet.

## 1. Einleitung

Das Kooperationsprojekt zwischen dem Botanischen Institut - Molekulare Zellbiologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) und dem Hector-Seminar "Biodiversität medizinaler Pflanzen" beschäftigt sich mit dem Ausbau einer Methode zur Identifikation traditionell-chinesischer Medizinpflanzen (TCM). Diese werden heutzutage in aller Welt gehandelt und exportiert und zu vielfältigen Produkten wie Tees oder Kräutermischungen weiterverarbeitet, denen Heilwirkung nachgesagt wird. Vertreiber und Verarbeiter dieser Pflanzen stehen oft vor dem Problem die gelieferten Pflanzen eindeutig auf ihre Echtheit zu kontrollieren, da diese meist getrocknet oder gemahlen geliefert werden, und somit morphologische Eigenschaften verloren gehen.

So werden manchmal angegebene Substanzen durch billigere ersetzt. Diese sogenannten Surrogate haben jedoch meist keine therapeutische Wirkung.

Ziel dieser Arbeit war es, das Verfahren auszubauen, welches am Botanischen Institut - Molekulare Zellbiologie des KIT in der Abteilung von Prof. Dr. Peter Nick unter der Leitung von Dipl. Biol. Thomas Horn entwickelt wurde. Das Verfahren sucht nach eindeutigen DNA-Sequenzen, mit denen beispielsweise TCM-Pflanzen schnell und kostengünstig identifiziert werden können.<sup>1</sup> Hierfür müssen zunächst die originalen Pflanzen, die aus Instituten und botanischen Gärten in Europa stammen, einer DNA-Extraktion unterzogen werden. Diese DNA wird anschließend abschnittsweise durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vermehrt (PCR) und sequenziert, d. h. es wird die Basenabfolge bestimmt, um artspezifische Nukleotidsequenzen (sog. Primer) zu finden.

Im Projekt wurden 11 verschiedene Arten der Gattung *Dianthus* (dt. Nelke) betrachtet. Mit Hilfe von im Labor konstruierten, passenden Primern, sollten einzelne Nelkenarten, identifiziert werden. Anhand der DNA können durch diesen „Barcode“ künftig auch unbekannte Pflanzenarten in TCM-Produkten eindeutig bestimmt werden.

---

<sup>1</sup> <http://www.botanik.kit.edu/botzell/363.php> (29.07.2013)

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Morphologie

Untersucht wurden die folgenden Nelkenarten: *D. superbus*; *D. chinensis*; *D. gratianopolitanus*; *D. barbatus*, *D. turkestanicus*, *D. giganteus*, *D. japonicus*, *D. balbisii ssp. liburnicus*, *D. lusitanus*, *D. knappii*, *D. deltoides*. Sie unterscheiden sich in bestimmten morphologischen Kriterien, z. B. Aussehen der Stängel oder Form und Struktur der Blätter. Die Stängel unterteilt man nach Wuchsform, Form des Querschnitts und vorhandene Verzweigungen. Die Blätter werden in folgenden Eigenschaften unterschieden: Größe, Vorhandensein eines Stiels, Blattstellung, Form der Blattspitze, relative Farbe, Oberflächenstruktur, sonstige Besonderheiten.

Die Tabelle (im Anhang) zeigt die Blattmaße je eines kleinen, mittleren und großen Blattes verschiedener *Dianthus*-Spezies, die betrachtet wurden.



**Abb. 1:** Unterschiedliche Blattgrößen bei *D. balbisii ssp. liburnicus*



**Abb. 2:** *D. giganteus*; Bestimmung der Wuchshöhe der Pflanze

## 2.2 DNA-Extraktion

Bei der DNA-Extraktion wird die Erbsubstanz, die DNA (Desoxyribonukleinsäure), aus den Zellen isoliert. Dies dient zur Analyse der genetischen Struktur der Pflanzenarten. Nach der Entnahme werden die Blätter für mehrere Tage zusammen mit einem Silikat, welches Feuchtigkeit bindet, in einem luftdichten Behälter getrocknet. Dies ist nötig, um die nachfolgende Zerkleinerung der Proben zu erleichtern, sowie Schwankungen der Zellmasse durch unterschiedliche Wasseranteile zu minimieren. Anschließend werden von jeder Pflanzenart 10 mg Blattmaterial entnommen und in einzelne Reaktionsgefäße, so genannte Tubes, gegeben.



**Abb. 3:** Proben in flüssigem Stickstoff

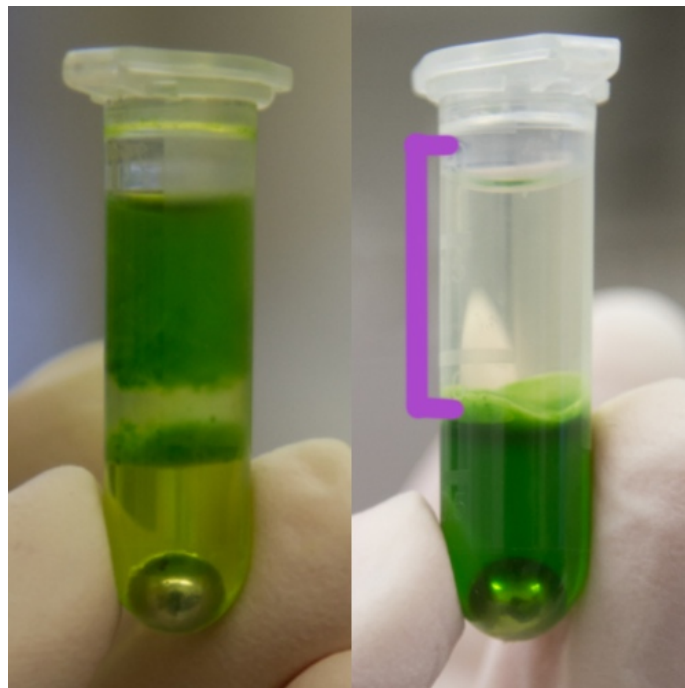
Die Proben werden in flüssigem Stickstoff ( $\vartheta = -196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) schockgefroren (Abb. 3). Je eine kleine Stahlkugel wird in die Tubes gegeben.

In einem Tissuelyzer werden die Proben bei einer Frequenz von 18 Hz durch das Rütteln zu einem feinen Pulver zerkleinert (Abb. 4). Den Proben werden je 900  $\mu\text{l}$



**Abb. 4:** Tissuelyzer zerkleinert die Proben

CTAB-Puffer<sup>2</sup> zugefügt und durch "vortexen" homogenisiert. Der Puffer hilft bei der Bindung von Proteinen, welche die freigewordene DNA beschädigen könnten. Die Proben werden für 15 Minuten in ein 60 °C warmes Wasserbad gegeben, um die Bindung durch den Puffer zu beschleunigen. Der Vorgang wird wiederholt, nachdem eine Proteinase, ein proteinabbauendes Enzym, den Proben beigemischt wurde (Abb. 5). Diese soll verbleibende Enzyme zersetzen, die eine strukturelle Integrität der DNA gefährden. Zur Abtrennung der DNA werden die Proben bei 14000 g für 10 Minuten zentrifugiert.



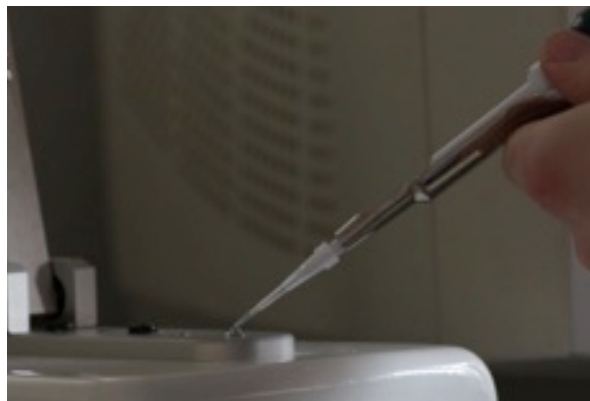
**Abb. 5:** Vor und nach dem Zentrifugieren; DNA-haltige Schicht

Die oberste Schicht enthält die extrahierte DNA und wird in ein kleineres Reagenzgefäß überführt (750 µl). Die nun gewonnene DNA wird mit einer Lithiumchlorid-Lösung ( $c = 3 \text{ mol/l}$ ) und 70 %igen Ethanol gereinigt. Nach weiteren 10 Minuten zentrifugieren bei 14000 g setzen sich die aufgereinigten DNA-Proben am Boden des Reagenzgefäßes ab. Der Überstand wird anschließend abpipetiert und verworfen. Die Proben trocknen bei Raumtemperatur ca. 30 - 60 min. Eine Qualitätskontrolle der Proben wird mit dem Nanodrop-Spektrometer (PEQLAB Biotechnologie ND-1000) durchgeführt. Somit geht man sicher, dass

---

<sup>2</sup> Cetyltrimethylammoniumbromid

die Extraktion gleichmäßig gut verlaufen ist. Hierzu werden 1,5 µl der zu testenden Probe auf den Sensor des Spektrometers aufgetragen (Abb. 6) und mit dem Messarm gleichmäßig verteilt. Das Spektrometer misst das Absorptionsspektrum der Probe und kann die enthaltene Konzentration an Nucleinsäuren und somit auch von DNA bestimmen. Im Experiment waren Proben mit DNA-Konzentrationen zwischen 100 ng/µl und 400 ng/µl üblich. Niedrige DNA-Konzentrationen deuten auf mögliche Fehler in der DNA-Extraktion hin.

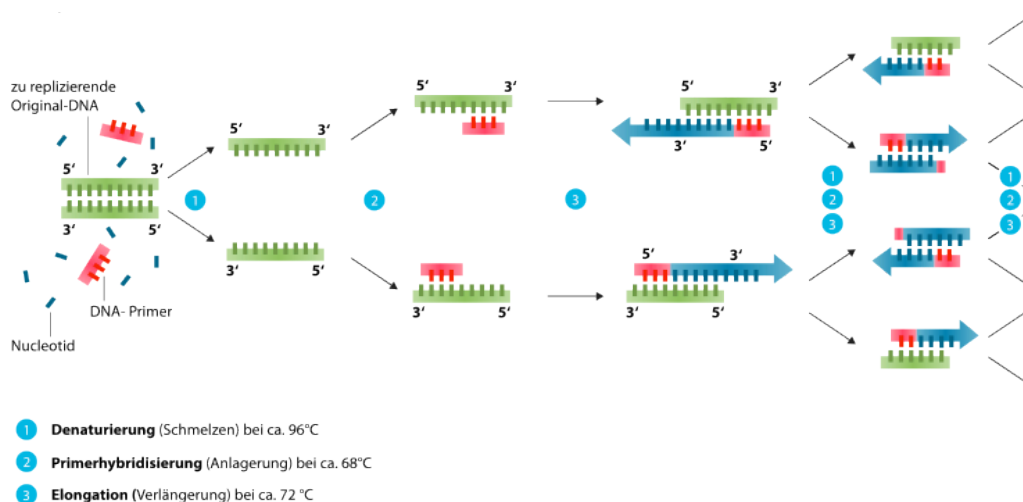


**Abb. 6:** Qualitätskontrolle auf dem Nanodrop-Spektrometer

### 2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die extrahierten DNA-Mengen sind zu gering, um untersucht zu werden. Deshalb wird ein einzelner zu untersuchender DNA-Abschnitt vervielfältigt. Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction; PCR) ist eine Möglichkeit, extrahierte DNA zu vervielfältigen. Dazu wird die DNA zusammen mit dem Enzym DNA-Polymerase (man verwendet als DNA-Polymerase Taq-Polymerase, da diese hitzebeständig ist und somit bei den hohen Temperaturen nicht denaturiert) und geeigneten Primern in eine Pufferlösung mit Desoxyribonucleosidtriphosphaten gegeben. Ein Primer ist eine kurze, komplementäre DNA-Sequenz, welche als Startpunkt für das DNA-replizierende Enzym DNA-Polymerase dient. So kann ein bestimmter, von den beiden Primern begrenzter DNA-Abschnitt, vielfach vermehrt werden. Diese gezielte Vermehrung bezeichnet man als Amplifikation.





**Abb. 7:** Schematische Darstellung der PCR

Der Vorgang gliedert sich in folgende Teilschritte:

- 1. Denaturierung:** DNA, Taq-Polymerase und Nucleotide werden zusammengegeben und auf eine Temperatur zwischen 75 °C und 96 °C erhitzt. Dies bewirkt eine Trennung der beiden komplementären DNA-Stränge.
- 2. Primerhybridisierung:** Die Temperatur wird für ca. 30 Sekunden abgekühlt, um eine Anlagerung der Primer an komplementäre DNA-Abschnitte zu ermöglichen. Die benötigte Temperatur ist vom Primer abhängig.
- 3. Elongation:** Nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung werden neue DNA-Stränge gebildet. Die DNA-Polymerase beginnt dabei am 3'-Ende des Primers und folgt in 5'-Richtung dem DNA-Strang.

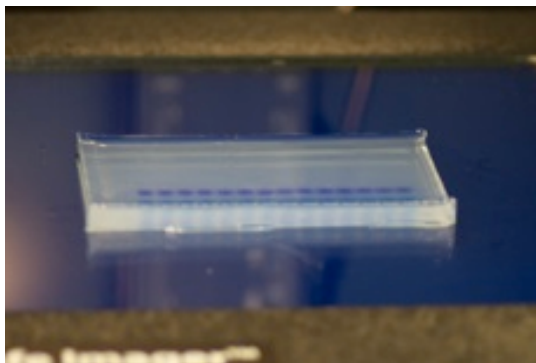
Der Vorgang wird mehrfach wiederholt, hier 35-mal. Dadurch wird der Abschnitt entsprechend oft vermehrt, so dass in diesem Fall  $2^{35}$  Kopien entstehen. Im Experiment wurden die kodierenden Sequenzen *Maturase K* und *Ribulose Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase* verwendet. Diese Sequenzen bestehen aus ca. 700 bis 1500 Basenpaaren.

## 2.4 Gelelektrophorese

Um von der Blattprobe zu einer Basensequenz zu gelangen und aus dieser einen funktionsfähigen Primer zu erstellen, sind eine Vielzahl an Schritten notwendig. Mit der Gelelektrophorese, einem Verfahren bei dem elektrisch gelade-

ne Bestandteile in einer Probe nach ihrer Größe aufgetrennt werden, kann einfach und schnell kontrolliert werden, ob die DNA-Extraktion und Replikation erfolgreich waren.

Die zu testende Probe wird mit einem Ladepuffer versetzt, auf ein Agarose-Gel<sup>3</sup> aufgetragen und eine Spannung ( $U = 100 \text{ V}$ ) für 15 – 25 min, je nach dem wie weit die Banden im Gel laufen, angelegt. Die Bestandteile trennen sich im elektrischen Feld nach ihrer molekularen Größe auf. Nach dem Anfärben ist die Trennung als Bandenmuster auf dem Gel erkennbar. Es wird ein sogenannter Ladepuffer hinzugefügt, der eine Ladung hat und sich an die Probe heftet. Somit wird diese durch den Spannungsunterschied im elektrischen Feld beeinflusst und trennt sich auf. Dieser enthält unter anderen einen fluoreszierenden Farbstoff, wie z. B. SYBR®-Safe, der die Banden unter UV-Licht ( $\lambda \approx 475 \text{ nm}$ ) sichtbar macht.



**Abb. 8:** Agarosegel unter UV-Licht

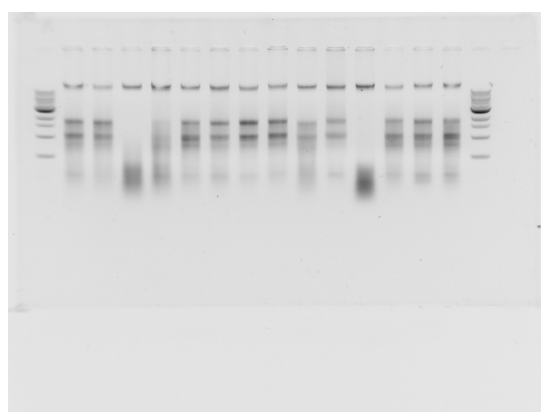


**Abb. 9:** Probentaschen, in die das Gemisch aus Probe und Ladepuffer gegeben wurde

Im Versuch wurde die Gelelektrophorese als Methode eingesetzt, um die Reinheit der Proben zu überprüfen. Verunreinigungen erscheinen als verschwommene Banden (s. Abb. 10).

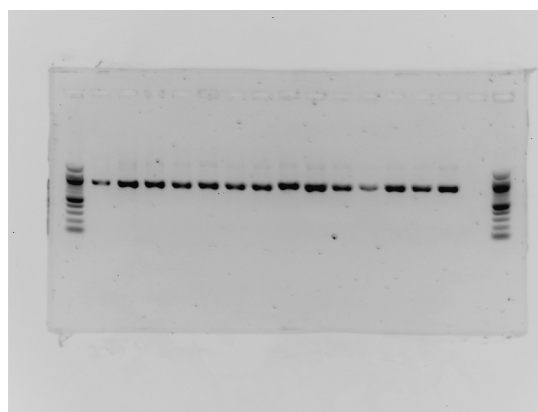
---

3 1 - 1,5 %ig – TAE-Puffer (0,5) + Agarose



User1 Exp Time: 1.00 sec Upper: 255 Lower: 0 Int.  
Date: 30.06.2003 Time: 03:32:02

**Abb. 10:** verunreinigte Proben, mit genomischer DNA, rRNA und fragmentierte DNA, nach DNA-Extraktion, 25 min, 100 V



15 Marz.tif  
A.C.15 Marz.tif

**Abb. 11:** reine Proben, nach Aufreinigung, 15 min, 100 V

Eindeutige Banden im Gel (Abb.11) zeigen, dass keine oder nur geringe Verunreinigungen vorliegen. Nach einer PCR kann das Produkt ebenfalls mit einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden, um zu überprüfen, ob die Proben-DNA beschädigt wurde (Abb. 11). Mögliche Ursachen hierfür können falsch gewählte Temperaturen oder Verunreinigungen in den vorangegangenen Verfahrensschritten sein. Ist dies der Fall, kann keine eindeutige Bande der entsprechenden Größe festgestellt werden.

Erfolgreiche Anlagerungen von Primern können auch auf diese Weise nachgewiesen werden. Nur wenn die PCR erfolgreich war, ist auf dem Gel eine ausgeprägte Bande der PCR-Produkte zu erkennen.

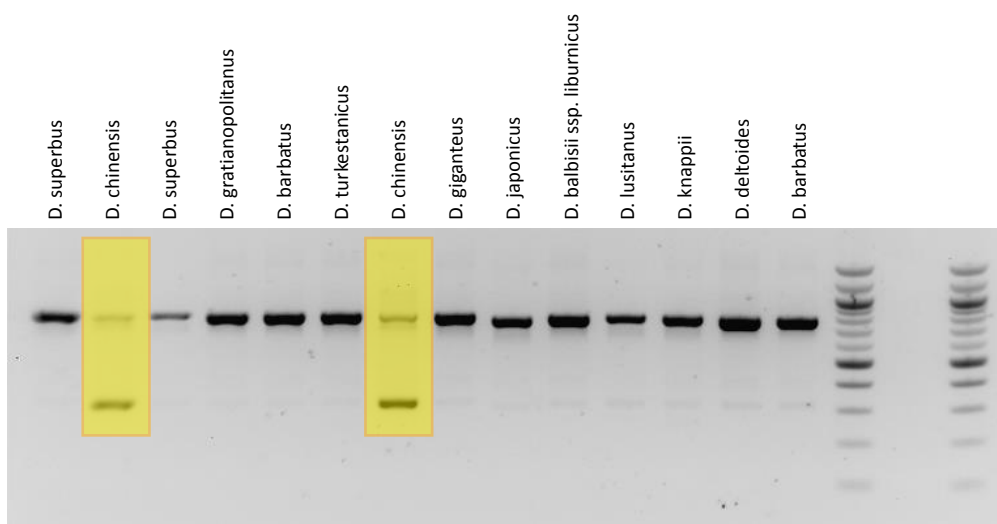
## 2.5 Primer-Suche

Die extrahierte DNA kann an bestimmte Firmen, wie SeqLab, verschickt werden, welche die genaue Basensequenz eines DNA-Abschnitts ermitteln. Diese DNA-Sequenzen können mit Programmen wie MEGA5 visualisiert werden. Werden von verschiedenen Arten die Sequenzen bestimmter DNA-Abschnitte, wie Maturase K, einem 700-1500 bp langes Exon<sup>4</sup>, parallel aufgelistet, können artspezifische Unterschiede in der Basensequenz leicht erkannt werden (Abb. 14). Ist ein solcher Unterschied bekannt, kann ein

<sup>4</sup> Exon: Kodierender DNA-Abschnitt bei Eukaryoten

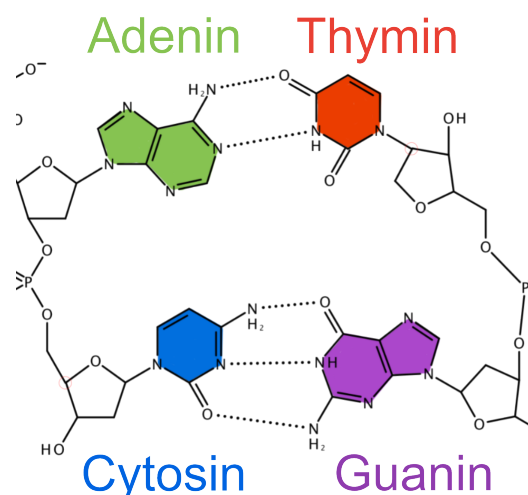
Primer entwickelt werden, welcher an diese spezifische Basensequenz bindet, sie vervielfältigt und eine eindeutige Identifikation ermöglicht. Unterschiede sind allerdings nur dann geeignet, wenn sie bei lediglich einer Art vorkommen. Die Bindung des Primers an die DNA verwandter Arten darf nicht möglich sein. Wird mit einem solchen Primer eine PCR durchgeführt, wird lediglich bei der zu identifizierenden Art ein DNA-Abschnitt vermehrt. Dieser ist in einer Gelelektrophoresebande deutlich zu erkennen (Abb. 12). Die Pflanze kann so eindeutig identifiziert werden.

*Dianthus* matK (matK472F+1248R) multiplex PCR with *D. chinensis* diagnostic primer  
**Dchi-mkk294T-rv**



**Abb. 12:** Ergebnis der Primer-Anlagerung Dchi-mKK294T-rv

In der Abb. 14 ist die Sequenz des Primers Dchi-mkk294T-rv zu sehen (3. Zeile v. o.). In der oben blau markierten Spalte wurde Guanin eingebaut, eine Purinbase, welche aufgrund ihrer Größe nicht an Adenin binden kann. Dadurch wird eine Bindung des Primers an die DNA anderer Arten verhindert. In der rot markierten Spalte wurde eine Thyminbase eingebaut. Da die *D. chi-*



**Abb. 13:** Basen im Größenvergleich

*nensis* an der dortigen Stelle ebenfalls eine Thyminbase aufweist, und folglich auf der gegenüberliegenden Seite eine Adeninbase, kann der Primer nur bei dieser Art dort binden. Bei allen anderen Arten ist dies nicht der Fall.

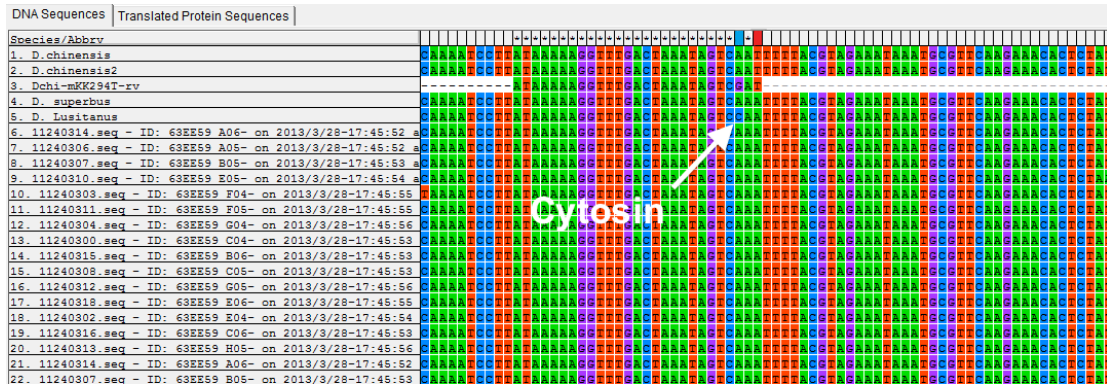


Abb. 14: Alignment der Proben von matK; Programm: MEGA5 (s. auch Anhang)

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Sequenzierung

Die DNA-Abschnitte *rbcl* und *matK* wurden amplifiziert und zur Sequenzierung eingeschickt. Dadurch wurden die DNA-Sequenzen dieser DNA-Abschnitte von elf verschiedenen Nelkenarten analysiert: *D. superbus*, *D. chinensis*, *D. gratianopolitanus*, *D. barbatus*, *D. turkestanicus*, *D. giganteus*, *D. japonicus*, *D. balbissii ssp. liburnicus*, *D. lusitanus*, *D. knappii*, *D. deltoides*.

In Abb. 14 sieht man einen Ausschnitt der *matK*-Sequenz der oben genannten Arten. In der blau markierten Spalte ist ein Unterschied in der Basensequenz zwischen *D. lusitanus* und den anderen Arten zu erkennen. Dort befindet sich eine Cytosin- statt einer Adeninbase (s. Pfeil). An dieser Stelle wird eine Guaninbase in den Primer eingebaut. Da ein DNA-Strang komplementär aufgebaut ist, befindet sich an dieser Stelle bei der *D. lusitanus* auf der gegenüberliegenden Seite eine Guaninbase. Bei einer Bindung des Primers müsste also eine Bindung zwischen zwei Guaninbasen eingegangen werden. Da diese als Purinbasen sehr groß sind und normalerweise drei Wasserstoffbrücken bilden, ist eine solche Bindung nicht möglich. Folglich verhindert das eingebaute Guanin eine Bindung des Primers an *D. lusitanus*. Wird Guanin nicht eingebaut, so erhält man Banden wie in Abb. 12.

In der rot markierten Spalte weist die *D. chinensis* eine Thyminbase auf. Dies unterscheidet sie von den anderen *Dianthus*-Arten. An dieser Stelle weist der Primer ebenfalls eine Thyminbase auf. Da auf der gegenüberliegenden Seite der Thyminbase eine Adeninbase zu finden ist, kann sich der Primer ohne Probleme binden. Bei den anderen Arten, welche an dieser Stelle auf dem angegebenen Strang Adenin statt Thymin besitzen, müssten zwei Thyminbasen eine Bindung eingehen um den Primer binden zu können. Da auch dies nicht möglich ist kann sich der Primer nur an der *D. chinensis* binden.

### 3.2 Primer

Auf Basis der gefundenen Sequenzen wurde der Primer Dchi-mkk294T-rv entwickelt, er dient zur Identifikation der Nelkenart *Dianthus chinensis*. Die angepassten Basen sind weiß dargestellt.

Seine Sequenz lautet:

ATAAAAAGGTTTGACTAAATAGTCGAT

### 3.3 Spektrometrie

Die Ergebnisse des Nanodrop-Spektrometers zeigen die Nukleinsäurenkonzentrationen der 14 Proben. Zunächst wurden Messungen am Extraktionsprodukt aller Proben durchgeführt, um die extrahierte Menge an DNA zu überprüfen. In der ersten Messung nach der Extraktion (siehe Anhang) wurden jeweils mehrere Durchgänge mit jeder Probe durchgeführt, um Messschwankungen auszugleichen. Diese Schwankungen können in erster Linie durch eine ungleichmäßige Verteilung der DNA im Reagenzgefäß verursacht sein.

Alle Proben weisen eine Nukleinsäurekonzentration zwischen 104,07 ng/µl (Probe 2) und 416,25 ng/µl (Probe 13) auf.

In einer zweiten Messung wurden die gewonnenen Daten überprüft.

Da für das weitere Verfahren möglichst einheitliche Konzentrationen erforderlich sind, wurden die Proben auf 50 ng/µl verdünnt und der Nukleinsäuregehalt nachmals spektrometrisch überprüft.

## 4. Diskussion

### 4.1 Erkenntnisse

Bei der Durchführung der Versuche und anhand der Ergebnisse wurden verschiedene Erkenntnisse gewonnen:

#### **DNA-Extraktion:**

Bei der DNA-Extraktion zeigten sich verschiedene Konzentrationen an Nukleinsäure. Die Messwerte liegen zwischen ca. 105 ng/µl und 415 ng/µl. Dennoch hatten diese Schwankungen keine bemerkbaren Auswirkungen auf den weiteren Projektverlauf und konnten durch Verdünnen der Proben auf einen einheitlichen Wert ausgeglichen werden.

#### **Sequenzierung:**

Erwartungsgemäß waren Unterschiede in der DNA-Sequenz der verwandten Dianthusarten nur bedingt vorhanden, dennoch reichen die 11 Unterschiede auf dem 600bp langen Abschnitt matK aus, um die Arten zu unterscheiden. So konnte in diesem Projekt *D. chinensis* eindeutig identifiziert werden.

#### **Primer:**

Abb. 12 zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophorese. Grundlage für diese Banden ist DNA, mit welcher zuvor unter Zugabe des Primers Dchi-mkk294-rv eine PCR durchgeführt wurde. Dieser Primer ähnelt dem Primer Dchi-mkk294T-rv, welcher jedoch an drittletzter Stelle eine Guaninbase statt einer Cytosinbase aufweist (s. 3.2).

Deshalb kann der Primer Dchi-mkk294-rv auch an der *D. lusitanus* binden, weshalb auch die DNA dieser Art vermehrt wird. Dchi-mkk294-rv ist demnach nicht zur eindeutigen Identifikation geeignet (s. Abb. 15).

## Dianthus-matK472F\_1248R-ARMS

Primer: matK472F, 1248R  
 Diagnostic Primer: Dchi-mKK294-rv

Gel: 2% Agarose  
 Voltage: 100V  
 Duration: 30min  
 Marker: 100bp

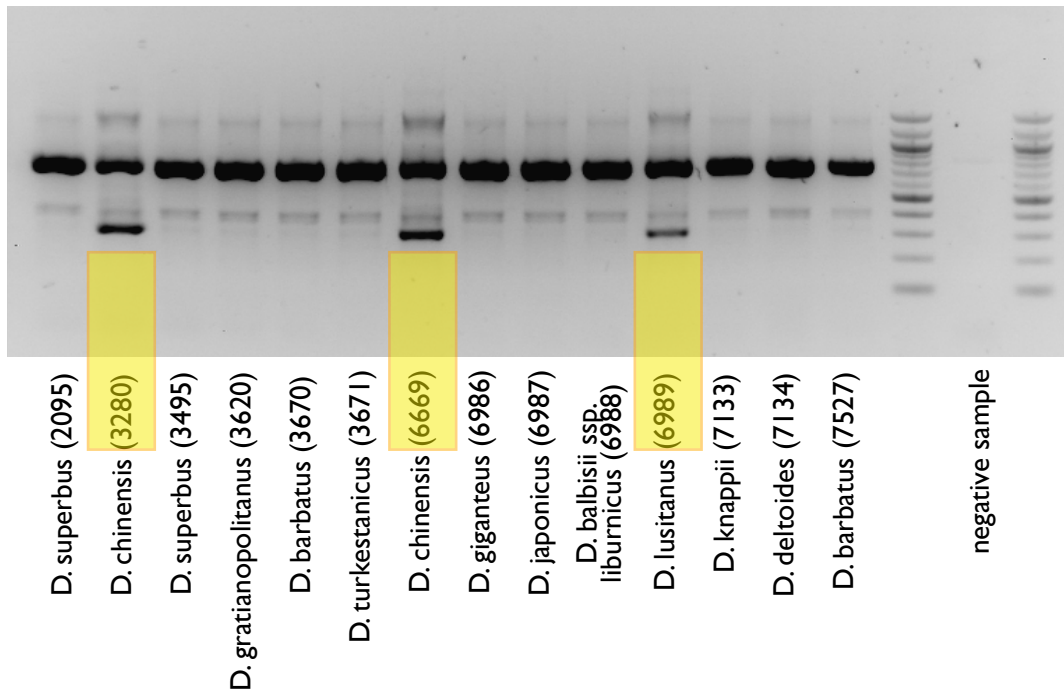


Abb. 15: Ergebnis der Primer-Anlagerung Dchi-mKK294-rv

Setzt man dagegen den durch Einfügen einer Guaninbase veränderten Primer Dchi-mkk294T-rv ein, kann dieser, im Gegensatz zu *D. chinensis*, nicht mehr bei *D. lusitanus* binden. *D. chinensis* kann somit eindeutig identifiziert werden (Abb. 12).

### 4.2 Ausblick

Da das gefundene Verfahren zur Identifikation geeignet ist und zudem billiger ist als die momentan gängigen Prüfungsmethoden, erscheint eine Übernahme dieser Technik für Prüfungsstellen als durchaus sinnvoll. Allerdings muss für jede zu prüfende Pflanzenart ein eigener Primer entwickelt werden. Da in Produkten der Traditionellen Chinesischen Medizin viele unterschiedliche Pflanzen verwendet werden, erfordert dies die Entwicklung einer Vielzahl spezifischer Primer.



Bis dieses aufwändige Verfahren abgeschlossen ist, werden jedoch noch viele Jahre vergehen. Somit wird das oben beschriebene Verfahren noch einige Zeit brauchen, in der Praxis umgesetzt zu werden. Das Verfahren beschränkt sich jedoch nicht nur auf Medizinpflanzen, auch andere Pflanzen oder Fleisch können damit überprüft werden.

### 4.3 Probleme

Die verschiedenen *Dianthus*-Arten zeigen nur geringe Unterschiede in der DNA-Sequenz. Es war daher schwer, geeignete Primer zu finden. Wie gezeigt konnte im DNA-Bereich *matK* bisher nur ein Primer bisher entwickelt werden. Um für jede Art einen spezifischen Primer zu finden, müssten weitaus mehr DNA-Abschnitte untersucht und sequenziert werden.

Ein weiteres Problem lag in den oft nicht optimal aufbereiteten Proben. Dies ist beispielsweise an den NanoDrop-Messungen nach der Extraktion (Anhang) zu erkennen. Die Proben unterscheiden sich in der bestimmten Nukleinsäurekonzentration. Folglich mussten diese ein weiteres Mal aufgereinigt und kontrolliert werden, um vergleichbare Versuche durchführen zu können. Die Ursache für diese Mängel sind wahrscheinlich hauptsächlich in der Versuchsdurchführung zu sehen. So könnten im Verlauf der Extraktion die Proben, und damit die DNA, nicht vollständig in Reaktionsgefäße überführt worden sein.

Trotz der bestehenden Fehlerquellen liefert das Verfahren verlässliche Ergebnisse, die eine eindeutige Identifikation über den „Genetischen Barcode“ erlauben.

## 5. Danksagung

Wir danken dem Botanischen Institut Molekulare Zellbiologie; Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Abteilung von Prof. Dr. Peter Nick für die Möglichkeit an diesem aktuellen Forschungsprojekt teilzunehmen. Besonders danken wir unserem Projektleiter Dipl.-Biol. Thomas Horn, welcher das Projekt betreute.

Unseren Kursleitern am Hector-Seminar, insbesondere Anke Richert, danken wir für ihre Unterstützung.

Unser besonderer Dank gilt Dr. Hans-Werner und Josephine Hector und der Hector-Stiftung, ohne die das Projekt und die langjährige Förderung nicht möglich gewesen wären.

## 6. Quellen

### 6.1 Bildquellen

Abbildung 1 – 6: Eigene Abbildungen

Abbildung 7:

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerasekettenreaktion.svg>  
(19.07.2013)

Abbildung 8 – 15: Eigene Abbildungen

### 6.2 Internetquellen

KIT Botanisches Institut: Molekulare Zellbiologie – Nick-Labor

<http://www.botanik.kit.edu/botzell/363.php> (29.07.2013)

life technologies: SYBR® Safe DNA Gel Stain

<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/DNA-RNA-Purification-Analysis/Nucleic-Acid-Gel-Electrophoresis/DNA-Stains/SYBR-Safe.html> (04.08.2013)

life technologies: Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/DNA-RNA-Purification-Analysis/Nucleic-Acid-Gel-Electrophoresis/Gel-Documen-tation/Blue-Light-Transilluminator.html> (04.08.2013)

## 7. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichern wir, dass wir diese Arbeit unter der Beratung von Herrn Dipl. Biol. Thomas Horn und Anke Richert, Kursleiterin am Hector-Seminar, selbstständig verfasst haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden, sowie wörtliche Übernahmen als solche kenntlich gemacht wurden.

Karlsruhe, den

---

Benedikt Groß

---

Patrick Kübler

**Anhang 1: Morphologie**

Blattmaße bei verschiedenen *Dianthus*-Arten  
 Unterteilt in drei Kategorien – klein, mittel, groß

Größe in mm	Länge			Breite			Durchschnitt	
	klein	mittel	groß	klein	mittel	groß	Länge	Breite
2095 <i>D. superbus</i>	59,933	95,601	123,465	6,446	9,396	8,915	93,000	8,252
3280 <i>D. chinensis</i>	37,133	71,702	97,981	5,858	11,085	10,623	68,939	9,189
3495 <i>D. superbus</i>	66,798	70,439	81,47	5,075	8,489	5,878	72,902	6,481
3620 <i>D. gratianopolitanus</i>	19,654	29,623	32,489	1,412	2,028	2,111	27,255	1,850
3670 <i>D. barbatus</i>	66,724	68,812	76,488	10,153	10,674	11,975	70,675	10,9
3671 <i>D. tukestanicus</i>	24,286	54,363	67,099	3,77	3,02	2,859	48,583	3,216
6669 <i>D. chinensis</i>	28,948	56,514	57,307	2,172	7,485	5	47,590	4,886
6986 <i>D. giganteus</i>	34,631	37,443	61,511	2217	2,631	2,975	44,528	740,9
6987 <i>D. japonicus</i>	33,98	52,462	58,834	17,86	16,647	15,811	48,425	16,77
6988 <i>D. balbisii</i> ssp. <i>Libumicus</i>	33,84	77,465	93,854	4,283	3,611	4,013	68,386	4,0
6989 <i>D. lusitanus</i>	16,833	17,361	20,459	1,66	1,463	1,335	18,218	1,5
7133 <i>D. knappii</i>	56,27	59,151	60,873	2,963	2,343	3,343	58,765	2,9
7134 <i>D. deltoides</i>	10,327	18,351	22,247	2,581	3,917	4,453	17,0	3,650
7527 <i>D. barbatus</i>	69,513	105,593	110,211	16,245	18,288	13,26	95,106	15,9

## Anhang 2: Nanodrop Spektrometer –Ergebnisse

### Qualitätskontrolle DNA-Extraktion

Page # 1

02.03.2013 12:43

Date/time

Nucleic Acid

Test Type

Report *Qualitätskontrolle - Pflanzen*

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
1	Default	02.03.2013	12:27	187,65	3,753	1,727	2,17	2,19	50,00	230	1,717	0,496
1	Default	02.03.2013	12:00	175,40	3,508	1,582	2,22	2,23	50,00	230	1,573	0,034
2	Default	02.03.2013	12:28	109,80	2,196	1,019	2,16	1,84	50,00	230	1,192	0,383
2	Default	02.03.2013	12:02	104,07	2,081	0,985	2,11	2,03	50,00	230	1,026	0,028
3	Default	02.03.2013	12:30	198,25	3,965	1,783	2,22	2,29	50,00	230	1,735	0,096
3	Default	02.03.2013	12:03	202,28	4,046	1,848	2,19	2,28	50,00	230	1,773	0,051
4	Default	02.03.2013	12:31	190,04	3,801	1,705	2,23	2,13	50,00	230	1,782	0,060
4	Default	02.03.2013	12:05	174,51	3,490	1,512	2,31	2,15	50,00	230	1,625	0,043
5	Default	02.03.2013	12:32	191,63	3,833	1,726	2,22	2,28	50,00	230	1,681	0,202
5	Default	02.03.2013	12:06	174,82	3,496	1,580	2,21	2,35	50,00	230	1,491	0,030
6	Default	02.03.2013	12:33	176,75	3,535	1,589	2,22	2,14	50,00	230	1,651	0,087
6	Default	02.03.2013	12:07	177,07	3,541	1,588	2,23	2,14	50,00	230	1,657	0,105
7	Default	02.03.2013	12:19	225,90	4,518	2,027	2,23	2,33	50,00	230	1,937	0,043
7	Default	02.03.2013	12:41	309,85	6,197	2,838	2,18	2,14	50,00	230	2,896	0,474
7	Default	02.03.2013	12:08	325,70	6,514	2,931	2,22	2,36	50,00	230	2,754	0,037
8	Default	02.03.2013	12:34	157,47	3,149	1,428	2,20	2,08	50,00	230	1,515	0,078
8	Default	02.03.2013	12:10	154,21	3,084	1,354	2,28	2,10	50,00	230	1,467	0,064
9	Default	02.03.2013	12:11	139,04	2,781	1,261	2,21	1,87	50,00	230	1,486	0,056
9	Default	02.03.2013	12:35	129,19	2,584	1,159	2,23	1,73	50,00	230	1,494	0,056
10	Default	02.03.2013	12:13	144,41	2,888	1,373	2,10	1,48	50,00	230	1,946	0,190
10	Default	02.03.2013	12:37	105,21	2,104	0,997	2,11	1,48	50,00	230	1,423	0,070
11	Default	02.03.2013	12:14	171,84	3,437	1,532	2,24	2,26	50,00	230	1,518	0,043
11	Default	02.03.2013	12:38	180,07	3,601	1,574	2,29	2,27	50,00	230	1,587	0,043
12	Default	02.03.2013	12:15	117,87	2,357	1,083	2,18	2,03	50,00	230	1,160	0,050
12	Default	02.03.2013	12:25	248,06	4,961	2,283	2,17	2,07	50,00	230	2,397	0,082
12	Default	02.03.2013	12:42	242,55	4,851	2,201	2,20	2,07	50,00	230	2,347	0,101
13	Default	02.03.2013	12:16	414,75	8,295	3,772	2,20	2,20	50,00	230	3,766	0,090
13	Default	02.03.2013	12:23	416,25	8,325	3,822	2,18	2,16	50,00	230	3,852	0,109
14	Default	02.03.2013	12:17	277,41	5,548	2,516	2,21	2,30	50,00	230	2,414	0,073
14	Default	02.03.2013	12:39	301,95	6,039	2,735	2,21	2,30	50,00	230	2,628	0,066

### Anhang 3: Nanodrop Spektrometer – Ergebnisse Qualitätskontrolle 2 DNA-Extraktion

Report	Test Type	Nucleic Acid	Date/time	Page #								
			15.03.2013 15:54	1								
Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
1	Default	15.03.2013	15:32	150,19	3,004	1,356	2,22	2,26	50,00	230	1,332	0,021
2	Default	15.03.2013	15:34	97,20	1,944	0,899	2,16	1,83	50,00	230	1,061	0,100
3	Default	15.03.2013	15:35	161,95	3,239	1,309	2,47	2,86	50,00	230	1,133	-1,008
4	Default	15.03.2013	15:36	192,34	3,847	1,722	2,23	2,09	50,00	230	1,839	0,010
5	Default	15.03.2013	15:37	160,15	3,203	1,473	2,17	2,31	50,00	230	1,389	0,044
6	Default	15.03.2013	15:38	146,64	2,933	1,339	2,19	2,19	50,00	230	1,340	0,029
7	Default	15.03.2013	15:39	233,33	4,667	2,112	2,21	2,25	50,00	230	2,073	0,221
8	Default	15.03.2013	15:40	182,14	3,643	1,668	2,18	1,98	50,00	230	1,840	0,056
9	Default	15.03.2013	15:41	110,32	2,206	0,967	2,28	1,86	50,00	230	1,185	0,020
10	Default	15.03.2013	15:42	89,25	1,785	0,823	2,17	1,32	50,00	230	1,357	0,008
11	Default	15.03.2013	15:43	159,53	3,191	1,474	2,16	2,20	50,00	230	1,449	0,070
12	Default	15.03.2013	15:51	193,40	3,868	1,761	2,20	2,13	50,00	230	1,816	0,006
13	Default	15.03.2013	15:52	432,28	8,646	3,991	2,17	2,10	50,00	230	4,121	0,078
14	Default	15.03.2013	15:53	360,21	7,204	3,296	2,19	2,18	50,00	230	3,299	0,050

## Anhang 4: Nanodrop Spektrometer – Ergebnisse Kontrolle der Verdünnung 50 ng/µl

Report:  Test Type:  Date/time:  Page #

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw	Measurement Type	Serial #	Config.
1	Default	25.03.2013	14:46	50.93	1.019	0.509	2.00	0.33	50.00	230	3.124	0.197	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
2	Default	25.03.2013	14:47	46.60	0.932	0.490	1.90	0.16	50.00	230	5.935	0.338	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
3	Default	25.03.2013	14:48	43.62	0.872	0.451	1.94	0.61	50.00	230	1.424	0.307	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
4	Default	25.03.2013	14:49	42.73	0.855	0.418	2.04	0.37	50.00	230	2.307	0.058	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
5	Default	25.03.2013	14:50	57.78	1.156	0.603	1.92	0.43	50.00	230	2.682	0.524	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
7	Default	25.03.2013	14:51	56.42	1.128	0.603	1.87	0.33	50.00	230	3.467	0.283	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
8	Default	25.03.2013	14:52	35.54	0.711	0.357	1.99	0.34	50.00	230	2.116	0.236	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
9	Default	25.03.2013	14:53	45.19	0.904	0.474	1.91	0.22	50.00	230	4.046	0.297	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
10	Default	25.03.2013	14:53	22.63	0.453	0.204	2.22	0.34	50.00	230	1.325	0.033	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
11	Default	25.03.2013	14:54	35.03	0.701	0.338	2.07	0.60	50.00	230	1.158	0.081	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
12	Default	25.03.2013	14:55	38.98	0.780	0.412	1.89	0.40	50.00	230	1.971	0.209	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
13	Default	25.03.2013	14:56	51.28	1.026	0.518	1.98	0.32	50.00	230	3.192	0.228	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8
14	Default	25.03.2013	14:57	38.75	0.775	0.398	1.95	0.19	50.00	230	4.063	0.054	Measure	USB2G18112B7116	1,112110/0,52/88/8



Anhang 5: Ausschnitt aus matK in MEGA5  
 Abb. 14 vergrößert

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	
1. <i>D. chinensis</i>	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
2. <i>D. chinensis</i> 2	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
3. <i>Dchi-mKK294T-rv</i>	-----ATAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
4. <i>D. superbus</i>	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
5. <i>D. Lusitanus</i>	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
6. 11240314.seq - ID: 63EE59 A06- on 2013/3/28-17:45:52 a	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
7. 11240306.seq - ID: 63EE59 A05- on 2013/3/28-17:45:52 a	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
8. 11240307.seq - ID: 63EE59 B05- on 2013/3/28-17:45:53 a	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
9. 11240310.seq - ID: 63EE59 F05- on 2013/3/28-17:45:54 a	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
10. 11240303.seq - ID: 63EE59 F04- on 2013/3/28-17:45:55 a	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
11. 11240311.seq - ID: 63EE59 F05- on 2013/3/28-17:45:55 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
12. 11240304.seq - ID: 63EE59 G04- on 2013/3/28-17:45:56 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
13. 11240300.seq - ID: 63EE59 C04- on 2013/3/28-17:45:53 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
14. 11240315.seq - ID: 63EE59 B06- on 2013/3/28-17:45:53 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
15. 11240308.seq - ID: 63EE59 C05- on 2013/3/28-17:45:53 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
16. 11240312.seq - ID: 63EE59 G05- on 2013/3/28-17:45:56 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
17. 11240318.seq - ID: 63EE59 E06- on 2013/3/28-17:45:56 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
18. 11240302.seq - ID: 63EE59 E04- on 2013/3/28-17:45:54 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
19. 11240316.seq - ID: 63EE59 C06- on 2013/3/28-17:45:53 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
20. 11240313.seq - ID: 63EE59 H05- on 2013/3/28-17:45:56 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
21. 11240314.seq - ID: 63EE59 A06- on 2013/3/28-17:45:52 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT
22. 11240307.seq - ID: 63EE59 B05- on 2013/3/28-17:45:53 c	CAAAA TCCCTTA TAAAAA GGTTTTC TAAAA TAGTCA TTTTTC AATAA TAAATCCCA TCTCTAT

**Anhang 6: Zuordnung****Probennummern 1 – 14 den *Dianthus*-Arten zugeordnet**

Probe	<i>Dianthus</i> -Art	ID
1	<i>D. superbus</i>	2095
2	<i>D. chinensis</i>	3280
3	<i>D. superbus</i>	3495
4	<i>D. gratianopolitanus</i>	3620
5	<i>D. barbatus</i>	3670
6	<i>D. tukestanicus</i>	3671
7	<i>D. chinensis</i>	6669
8	<i>D. giganteus</i>	6986
9	<i>D. japonicus</i>	6987
10	<i>D. balbisii ssp. liburnicus</i>	6988
11	<i>D. lusitanus</i>	6989
12	<i>D. knappii</i>	7133
13	<i>D. deltoides</i>	7134
14	<i>D. barbatus</i>	7527