

**Entwicklung und Validierung molekularbiologischer Methoden zur
Identifizierung von Arzneipflanzen in Ausgangsdrogen, Drogen-
zubereitungen und in Fertigarzneimitteln**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thomas Kersten

aus

Pritzwalk

Bonn 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter:	Prof. Dr. Werner Knöß
2. Gutachter:	Prof. Dr. Gabriele M. König
Tag der Promotion:	17.10.2013
Erscheinungsjahr:	2013

Für Aude

Nam plerisque longiore tractatu vis quaedam et pondus accedit.

Gaius Plinius Caecilius Secundus (61- 113 n. Chr.)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

T. Kersten, C. Daniel, G. M. König, W. Knöb (2008). "Das Potential PCR-basierter Markermethoden zur Identifizierung von Arzneipflanzen." Z. Phytother. 29(3): 122-128.

C. Daniel, T. Kersten, S. Kehraus, G. M. König, W. Knöb (2008): "Identifizierung und Charakterisierung von Arzneipflanzen mit »Metabolic Fingerprinting«." Z. Phytother. 29(6): 270-274.

Tagungsbeiträge:

T. Kersten, W. Knöb: DNA-fingerprints zur Identifizierung von Arzneipflanzen: Möglichkeiten und Grenzen, Tagung der Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft (DBG), Kaub, 16. bis 18. März 2005, Tagungsband: 23

T. Kersten, C. Daniel, W. Knöb: The Potential of PCR-related Methods to Identify Medicinal Plants in Herbal Medicinal Products, Jahrestagung der Pharmazeutischen Gesellschaften der Tschechischen Republik, Ungarns und Deutschlands, Marburg, 4. bis 7. Oktober 2006, Tagungsband: 108 B023

W. Knöb, T. Kersten, C. Daniel: PCR-related methods – a further tool for the authentication and retracability of starting material in (traditional) herbal products, Jahrestagung der Pharmazeutischen Gesellschaften der Tschechischen Republik, Ungarns und Deutschland, Marburg, 4. bis 7. Oktober 2006, Tagungsband: 57 PS B08

T. Kersten, C. Daniel, G. M. König, W. Knöb: The Potential of PCR-related Methods to Identify Medicinal Plants in Herbal Medicinal Products, Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Graz, Österreich, 2. bis 6. September 2007, Planta Med. 73(9): 903 P256

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Werner Knöß für die Überlassung dieser Arbeit, seine Geduld und Ausdauer, sowie die Freiheiten, die er mir beim Ausgestalten des Themas gewährte.

Frau Prof. Dr. G. M. König möchte ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme der Zeitbetreuung sowie die bereitwillige Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe danken.

Herrn Prof. Dr. Harald G. Schweim und Frau Prof. Dr. Heike Wägele danke ich für ihr Wirken als fachnahes bzw. fachfremdes Mitglied in der Promotionskommission.

Herrn Prof. Dr. Thomas Borsch und seinen Mitarbeitern Kim Govers, Dr. Cornelia Löhne und Dr. Andreas Worberg danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken.

Meinen ehemaligen Kollegen am Institut für Pharmazeutische Biologie Bonn danke ich für die gute Zusammenarbeit, die vielen Anregungen und bereichernden Diskussionen.

Allen involvierten Mitarbeitern im Forschungs- und Materialbeschaffungsbereich des BfArM, insbesondere Frau Karin Hubrich und Herrn Ulrich Schneidenbach, möchte ich meinen Dank für die gute Kooperation und die kurzen Dienstwege aussprechen.

Meinen früheren Vorgesetzten Herrn Dr. Konstantin Keller, Herrn Klaus Reh sowie Herrn Prof. Dr. Werner Knöß danke ich für die eingeräumten zeitlichen Freiräume, die mir die Vereinbarkeit von Berufstätigkeit und Promotion ermöglichten.

Bedanken möchte ich mich ferner beim EDQM, bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Bauer, Herrn Dr. Stefan Wanke sowie allen anderen nicht namentlich genannten Institutionen, Firmen und Personen für ihre Beiträge zur Vollendung der Arbeit.

Mein abschließender Dank gilt dem BfArM für die Finanzierung dieses Projektes.

1	Einleitung	1
1.1	Arzneimittel aus Pflanzen	1
1.2	Anforderungen an die Qualität pflanzlicher Arzneimittel	1
1.3	Identifizierung pflanzlicher Stoffe	3
1.4	Identifizierung pflanzlicher Stoffe mit molekularen Markertechniken	4
1.4.1	Geeignete molekulare Markersysteme	5
1.4.1.1	Fragmentbasierte Marker	5
1.4.1.1.1	Auswahl einer fragmentbasierten Markermethode	6
1.4.1.2	Sequenzbasierte Marker	7
1.4.2	Geeignete Markerregionen	8
1.4.2.1	Mitochondriale-DNA	9
1.4.2.2	Chloroplasten-DNA	9
1.4.2.3	Kern-DNA	10
1.4.3	Auswahl einer geeigneten Markerregion	11
1.5	Problemstellungen und Ziele der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Probenmaterialien	15
2.1.2	Oligonukleotide	15
2.1.3	Chemikalien, Enzyme, Kits, Lösungen und sonstige Materialien	17
2.1.3.1	Chemikalien	17
2.1.3.2	Enzyme	18
2.1.3.3	Reagenzien- und Zubehör-Komplettsätze (Kits)	18
2.1.3.4	Puffer und Lösungen	19
2.1.3.5	Sonstige Materialien	21
2.1.4	Software und Datenbanken	22
2.1.5	Laborbedingungen und Geräte	22
2.1.5.1	Reinstwasseraufbereitung	22
2.1.5.2	Sterilisationsmethoden	23

2.1.5.3	Geräte	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	DNA-Isolierung	24
2.2.1.1	CTAB-Methode	24
2.2.1.2	DNeasy Plant Mini Kit	25
2.2.1.3	PSP Spin Stool DNA Kit	25
2.2.2	RAPD- Analyse	26
2.2.2.1	Allgemeines	26
2.2.2.2	Durchführung der Methode	26
2.2.3	Vergleichende DNA-Sequenzanalyse	28
2.2.3.1	Allgemeines	28
2.2.3.2	Durchführung der Methode	28
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.5	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	30
2.2.6	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	30
2.2.7	Sequenzierung der PCR-Fragmente	31
2.2.8	Editierung und Sequenzvergleich	32
3	Ergebnisse und Diskussion	33
3.1	DNA-Isolierungen	33
3.1.1	Ganze und geschnittene pflanzliche Stoffe	33
3.1.2	Gepulverte pflanzliche Stoffe	35
3.1.3	Pflanzliche Zubereitungen / Fertigarzneimittel	37
3.2	Evaluierung der Markermethoden	39
3.2.1	RAPD Fingerprints	39
3.2.2	Amplifikation und Analyse der nrITS-Region	42
3.2.2.1	Amplifikation mit ITS-Standardprimern	42
3.2.2.2	Ermittlung neuer ITS-Primer	44
3.2.2.3	Amplifikationen mit neuen ITS-Primern	47
3.2.3	Eignung der PCR-Methode	49

3.2.3.1	Präzision der Methode	50
3.2.3.2	Spezifität der Primer	55
3.2.3.3	Robustheit der Methode	58
3.2.3.4	Sensitivität - Ermittlung der Nachweisgrenze	59
3.3	Ergänzende Marker zur Identifizierung	62
3.3.1	Amplifikation der ETS-Region	62
3.3.1.1	Amplifikation von Kamillen-Arten	62
3.3.1.2	Amplifikation von pflanzlichen Stoffen der Gattung Echinacea	64
3.3.2	Amplifikation des psbA-trnH Spacers	66
3.3.2.1	Amplifikation von Kamillen-Arten	66
3.3.2.2	Amplifikation von pflanzlichen Stoffen der Gattung Echinacea	68
3.4	Praktische Anwendung der Methode	70
3.4.1	Erfassung von Sequenzdaten europäischer Arzneipflanzen	70
3.4.2	Sequenzdatenerfassung von TCM-Referenzdrogen des EDQM	73
3.4.3	Analyse von Zubereitungen pflanzlicher Stoffe	76
3.4.4	Analyse von Fertigarzneimitteln	78
4	Zusammenfassende Diskussion	81
4.1	Wissenschaftlicher und regulatorischer Hintergrund der Arbeit	81
4.2	Kritische Betrachtung der Ergebnisse	84
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	89
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	95
7	Anhang	103
7.1	Probenmaterialien	103
7.2	GenBank-Sequenzen	109

Abkürzungsverzeichnis

Betain	: N,N,N-trimethylglycin
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: Basenpaar(e)
BSA	: Rinderserumalbumin
CTAB	: Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	: Dimethylsulfoxid
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
dNTP	: Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTAB	: Dodecyltrimethylammoniumbromid
EDQM	: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
EDTA	: Ethylendiamintetraessigsäure
<i>g</i>	: Erdbeschleunigung
kbp	: Kilobasenpaare
MW	: Molekulargewicht
NaCl	: Natriumchlorid
NaOAc	: Natriumacetat
NaOH	: Natriumhydroxid
NH ₄ Ac	: Ammoniumacetat
PCR	: Polymerase-Kettenreaktion
Ph. Eur.	: Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch)
ppm	: Teile pro Million
PVP	: Polyvinylpyrrolidon
RNase	: Ribonuclease
RT	: Raumtemperatur
SDS	: Natriumdodecylsulfat
TBE	: TRIS-Borat-EDTA (-Puffer)
TE	: TRIS-EDTA (-Puffer)
T _m	: Schmelztemperatur
TRIS	: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	: Unit (Enzymeinheit)

Abkürzungsverzeichnis der Nucleotide (Ambiguity-Codes)

A	: Adenin
C	: Cytosin
G	: Guanin
T (oder U)	: Thymin (oder Uracil)
R	: <u>A</u> denin oder <u>G</u> uanin
Y	: <u>C</u> ytosin oder <u>T</u> hymin
S	: <u>C</u> ytosin oder <u>G</u> uanin
W	: <u>A</u> denin oder <u>T</u> hymin
K	: <u>G</u> uanin oder <u>T</u> hymin
M	: <u>A</u> denin oder <u>C</u> ytosin
B	: <u>C</u> ytosin oder <u>G</u> uanin oder <u>T</u> hymin
D	: <u>A</u> denin oder <u>G</u> uanin oder <u>T</u> hymin
H	: <u>A</u> denin oder <u>C</u> ytosin oder <u>T</u> hymin
V	: <u>A</u> denin oder <u>C</u> ytosin oder <u>G</u> uanin
N	: <u>A</u> denin oder <u>C</u> ytosin oder <u>G</u> uanin oder <u>T</u> hymin
- (.)	: Gap (Lücke oder Leerstelle)

1. Einleitung

1.1 Arzneimittel aus Pflanzen

Heilpflanzen werden seit der frühesten Geschichte der Menschheit verwendet. Auch heute noch sind zahlreiche von ihnen therapeutisch relevant [01]. Sie werden in entweder ursprünglicher Form als ganze oder zerkleinerte Pflanzen und Pflanzenteile oder pharmazeutisch verarbeitet (Abb. 1.01) in Tropfen, Tabletten, Kapseln, Salben etc. als Arzneimittel eingesetzt [02].

Arzneimittel mit pflanzlichem Ursprung haben über ihre therapeutische Nutzung hinaus eine wichtige wirtschaftliche Bedeutung. So werden einer Erhebung des Marktforschungsinstitutes IMS International zufolge allein die Umsätze des europäischen Marktes für pflanzliche Arzneimittel auf insgesamt etwa 4 Mrd. Euro geschätzt [03].



Abb. 1.01: Pflanzliche Stoffe und daraus hergestellte pharmazeutische Zubereitungen [04, mod.]

1.2 Anforderungen an die Qualität pflanzlicher Arzneimittel

Arzneimittel dürfen aus Gründen des Verbraucherschutzes und der Gewährleistung der öffentlichen Gesundheit erst dann in den Verkehr gebracht werden, wenn diese erfolgreich eine behördliche Überprüfung durchlaufen haben und somit zugelassen oder registriert werden konnten [05]. Bei der Überprüfung, für die in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union vereinheitlichte Standards vereinbart sind, werden die pharmazeutische Qualität, die Wirksamkeit und die Unbedenklichkeit der Präpa-

rate beurteilt. Für die Gruppe der pflanzlichen Arzneimittel bedarf es aufgrund spezifischer Besonderheiten allerdings spezieller Beurteilungsmaßgaben. So gilt hier z. B. das aus dem Prozess der Herstellung resultierende Vielstoffgemisch, das verschiedene Inhaltsstoffe des pflanzlichen Stoffes enthält, in seiner Gesamtheit als eigentlicher Wirkstoff. Pflanzliche Arzneimittel unterscheiden sich dadurch wesentlich von den Arzneimitteln, die chemisch-definierte Einzelsubstanzen als Wirkstoffe enthalten [06, 07, 08, 09].

Der therapeutische Erfolg eines pflanzlichen Arzneimittels kann aufgrund seiner Beschaffenheit als Vielstoffgemisch nur dann konsistent gewährleistet werden, wenn die Qualität des gesamten pflanzlichen Wirkstoffs Charge für Charge sichergestellt ist. Ein wichtiges Element sind daher möglichst gleichbleibend zusammengesetzte Inhaltsstoffspektren. Letztere resultieren maßgeblich aus validen und reproduzierbaren Herstellungsverfahren (Abb. 1.02), für die wiederum eindeutig definierte und zuverlässig überprüfte Ausgangsmaterialien unabdingbar sind [10, 11, 12].

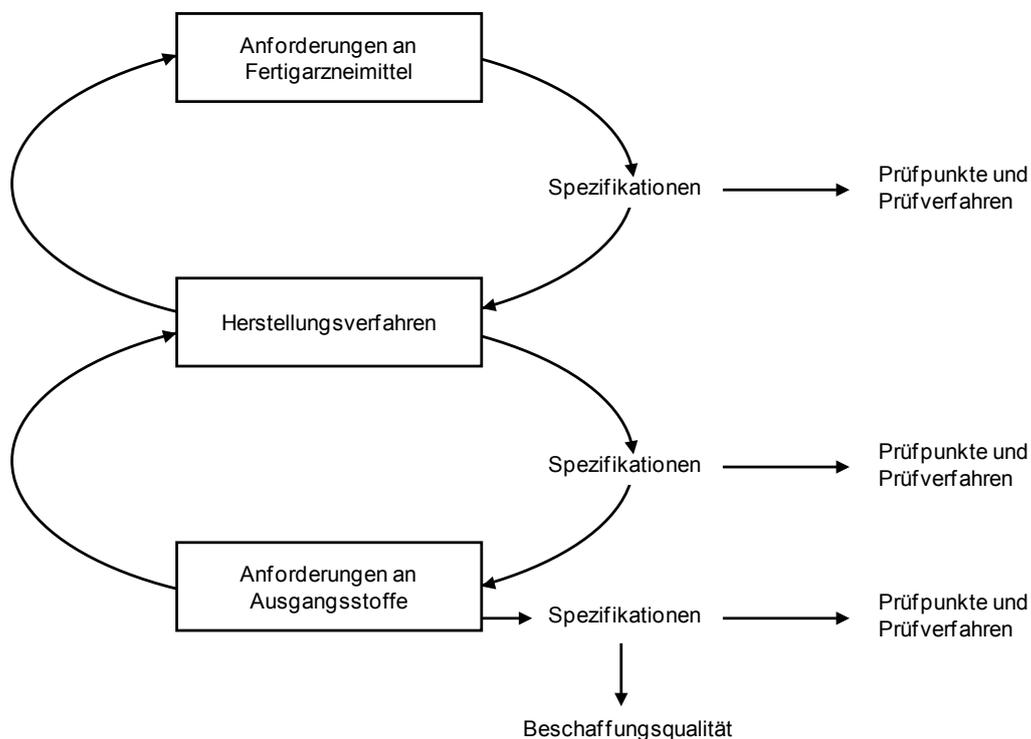


Abb. 1.02: Einfluss von Ausgangsstoffen auf die Qualität pflanzlicher Arzneimittel [13]

1.3 Identifizierung pflanzlicher Stoffe

Da die Qualität der in pflanzlichen Arzneimitteln verarbeiteten pflanzlichen Stoffe einen direkten Einfluss auf die Beschaffenheit der Fertigprodukte hat, kommt der umfangreichen Kontrolle der Ausgangsstoffe eine essentielle Bedeutung zu. Eine der grundlegenden Untersuchungen ist die Verifizierung der botanischen Identität. Hierzu sind in den europäischen- bzw. nationalen Arzneibüchern eine Reihe von etablierten Methoden beschrieben [07]. Dennoch werden mit den bisherigen Ansätzen, d. h. mittels einer Überprüfung der mikroskopischen und makroskopischen Merkmale bzw. der Analyse des phytochemischen Profils, nicht immer eindeutige Ergebnisse erzielt. So ist z. B. die Identität einer Reihe von pflanzlichen Stoffen und Stoffgemischen aus fremden Kulturkreisen und Therapiesystemen (TCM, Ayurveda etc.) oftmals nur schwierig zu belegen. Gerade für diese Gruppe von pflanzlichen Stoffen wurde in den letzten Jahren jedoch mehrfach über zum Teil schwerwiegende Vergiftungen infolge von Verfälschungen und Verwechslungen mit toxischen und kanzerogenen Materialien berichtet [14].

Ein Hauptproblem bei der Identifizierung von in der EU noch nicht etablierten pflanzlichen Stoffen sind nicht reproduzierbare DC-Fingerprints. Zudem ist die Nomenklatur der pflanzlichen Stoffe häufig nicht einheitlich, so dass bei der Sammlung der Stoffe zum Teil unterschiedliche Arten einer Pflanzengattung verwendet werden. Daneben existieren von einigen pflanzlichen Stoffen teilweise unterschiedliche Zubereitungsformen, die vom ursprünglichen Aussehen der pflanzlichen Stoffe abweichen [15, 16]. Valide Aussagen zur Identität bzw. zur Verunreinigung der pflanzlichen Ausgangsmaterialien sind allerdings auch für in der EU bereits etablierte Stoffe nicht immer einfach zu treffen. So kann es in Fällen stark schwankender, weitgehend identischer Inhaltsstoffmuster oder bei Verwechslungen morphologisch-anatomisch sehr ähnlicher Stammpflanzen ebenfalls zu Schwierigkeiten bei der Identifizierung kommen [17].

Einen sinnvollen Ansatz zur Ergänzung der bislang von den Arzneibüchern verwendeten Methoden zur Untersuchung der Identität und Reinheit verspricht hier die Nutzung von Nachweistechiken aus der Molekularbiologie. Vor allem PCR-basierte Markermethoden können dabei als wertvolle Instrumente zur gezielten Detektion von Verfälschungen mit risikorelevanten Materialien dienen. Sie werden bereits seit Jahren erfolgreich in der molekularen Phylogenie oder der Pflanzenzucht eingesetzt [18].

1.4 Identifizierung pflanzlicher Stoffe mit molekularen Markertechniken

Die Identität pflanzlicher Stoffe und deren Zubereitungen kann neben der klassischen Kontrolle von morphologischen und biochemischen Merkmalen (sogenannten phänotypischen Markern) auch anhand molekularer Marker untersucht werden.

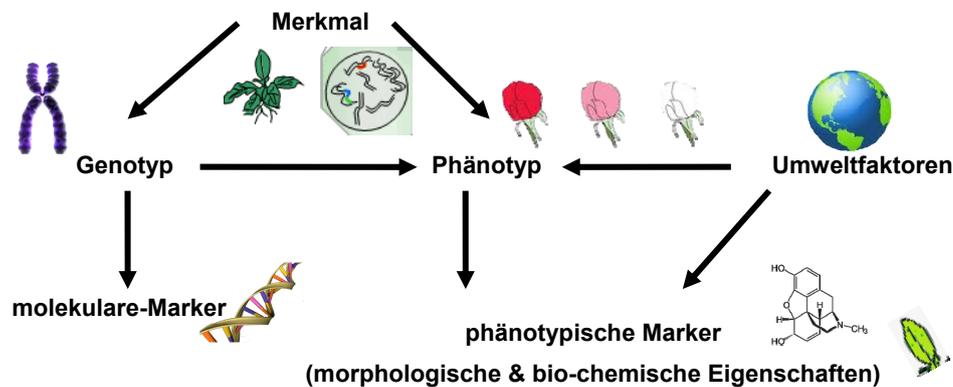


Abb. 1.03: Marker [19, mod.]

Molekulare Marker (Abb. 1.03) sind im Allgemeinen kurze DNA-Abschnitte, die in verschiedenen Arten unterschiedliche Nukleotidsequenzen aufweisen. Sie werden mit Hilfe von geeigneten molekulargenetischen Methoden analysiert.

Daten, die anhand molekularer Marker-Informationen gewonnen werden, sind weitestgehend unbeeinflusst von Umwelteinflüssen, dem Entwicklungsstadium, bzw. dem Ursprung oder Zerkleinerungs-/ Verarbeitungszustand des untersuchten Pflanzenorgans oder -gewebes [20]. Hierin liegt ein entscheidender Vorteil gegenüber jenen Daten, die auf der Grundlage phänotypischer Merkmalsausprägungen mittels der in den Arzneibüchern bereits etablierten Analysemethoden erhoben werden. Erbgutunterschiede lassen sich mit den klassischen Kontrollen nur indirekt über das Erscheinungsbild der Pflanze/ des Pflanzenteils bzw. über die individuellen Inhaltsstoffe nachvollziehen.

Trotz all dieser Aspekte haben sich molekulare Markertechniken als Methoden zur Identifizierung von pflanzlichen Stoffen noch nicht als gebräuchliche Routine etabliert. Im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätskontrolle wird bislang nur über vereinzelte Anwendungen berichtet [17, 18, 81].

1.4.1 Geeignete molekulare Markersysteme

Prinzipiell sind die Methoden zur Bestimmung der Identität von Pflanzen mit geeigneten molekularen Markern in fragment- und sequenzbasierende Verfahren zu unterteilen. Dabei wird wiederum zwischen Typen von Markern unterschieden, die ohne weitere Vorinformation (Sequenzdaten) bzw. Vorarbeiten (Sequenzierung / Klonierung) verfügbar sind und solchen, die erst nach einer Etablierungsphase bereitstehen [21].

1.4.1.1 Fragmentbasierte Marker

Die Anwendung fragmentbasierter Markerstrategien ist vor allem auf Unterschiede in der Länge der zu analysierenden DNA-Teilstücke ausgerichtet. Die erhaltenen Reaktionsprodukte werden zum visuellen Nachweis in der Regel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch interkalierende DNA-Farbstoffe (z. B. Ethidiumbromid oder SYBR[®] Green I) angefärbt. Hierbei resultieren verschiedene charakteristische Einzelbanden oder Bandenmuster, die später weiter ausgewertet werden können. Die Genauigkeit bei der Bestimmung von Fragmentlängen im Gel ist allerdings oftmals limitiert. So sind z. B. kurze Fragmente häufig nur sehr unscharf abgegrenzt bzw. mehrere Fragmente mit geringer Längendifferenz nur als einzelne Bande sichtbar. Diese Einschränkungen haben zur Entwicklung einer Reihe von hochspezifischen Methoden beigetragen [22]. Aufgrund des teilweise hohen technischen Anspruchs eignen sich letztere jedoch nicht in der Routineanalytik

In der Vergangenheit, als Sequenzierungen nur äußerst zeit- und kostenaufwendig durchzuführen waren, gehörten Fragmentmarkermethoden zu den besonders beliebten Markermethoden. Heutzutage hat sich die Bedeutung dieser Markergruppe in Anbetracht stetig weiterentwickelter und immer günstiger gewordener Möglichkeiten zur Sequenzanalyse erheblich reduziert [20].

Folgende fragmentbasierte Markermethoden wurden besonders häufig an Pflanzen eingesetzt [21]:

Markermethoden, die ohne weitere Vorinformationen einsetzbar sind:

- **ISSR** (Inter simple sequences repeats) [23]:
Eine Technik, bei der die Region zwischen zwei nahe genug benachbarten und entgegengesetzt-orientierten Mikrosatelliten amplifiziert wird.
- **RAPD** (Random amplified polymorphic DNA) [24]:
Eine Technik, bei der mittels eines Zufalls-Primers DNA-Abschnitte amplifiziert werden, die die Primersequenz nahe genug zweimal enthalten: zum einen in 5'-3'-Richtung, zum anderen komplementär im Gegenstand.
- **AFLP** (Amplified fragment length polymorphisms) [25]:
Eine Technik, bei der eine Teilmenge von mittels Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmenten selektiv amplifiziert wird.

Markermethoden, die auf Vorarbeiten aufbauen:

- **RFLP** (Restriction fragment length polymorphisms) [26]:
Eine Technik, bei der mittels Restriktionsverdau entstandene DNA-Fragmente analysiert werden.
- **SSR** (Simple sequences repeats / Microsatellites) [27]:
Eine Technik, bei der mittels spezifischer Primer tandemartig angeordnete Sequenzmotive, die sich in der Anzahl der Wiederholungen der repetitiven Einheiten voneinander unterscheiden können, amplifiziert werden.
- **CAPS** (Cleaved amplified polymorphic sequences / PCR-RFLP) [28]:
Eine Technik, bei der mittels Restriktionsverdau entstandene DNA-Fragmente mit spezifischen Primern amplifiziert werden.
- **SCAR** (Sequences characterized amplified regions) [29]:
Eine Technik, mit der mittels spezifischer Primer bekannte Fragmente aus RAPD oder AFLP-Produkten amplifiziert werden.

1.4.1.1.1 Auswahl einer fragmentbasierten Markermethode

Bei der Auswahl einer Markermethode zur Bestimmung der Identität von Arzneipflanzenmaterialien sind neben dem maximal erzielbaren Informationsgehalt auch weitere methodische Charakteristika zu berücksichtigen. Hierzu gehören z. B. der für die Etablierung des Markers erforderliche Entwicklungsaufwand, der technische Anspruch der Methode oder die Schnelligkeit und Kosten je Informationseinheit [21]. Letztlich sollen auch größere Probenmengen bearbeitbar bleiben.

Die in dieser Arbeit in Frage kommenden Markermethoden (Kap. 1.4.1.1) wurden bezüglich sieben verschiedener Parameter miteinander verglichen (Tab. 1.01). Klassifiziert wurden letztere dabei aufgrund von Literaturlauswertungen sowie eigenen Erfahrungen.

Tabelle 1.01: Pro und Kontra ausgewählter fragmentbasierter Markermethoden

Marker	erforderl. DNA-Menge	Detektion von Polymorphismen	Reproduzierbarkeit	Entwicklungskosten	Technischer Anspruch	Laboraufwand	Arbeitskosten
ISSR	gering	mittel	mittel-hoch	gering	gering-mittel	gering	gering-mittel
RAPD	gering	mittel	variabel	gering	gering	gering	gering
AFLP	mittel	mittel	hoch	gering	mittel	mittel	mittel
RFLP	hoch	mittel	hoch	mittel-hoch	hoch	hoch	hoch
SSR	gering	hoch	hoch	sehr hoch	gering-mittel	gering	gering-mittel
CAPS	gering	gering-mittel	hoch	hoch	gering-mittel	gering-mittel	gering-mittel
SCAR	gering	mittel	hoch	hoch	gering	gering	gering

Im Hinblick auf eine möglichst einfach zu implementierende Methode galt das Hauptaugenmerk bei der Auswahl vor allem solchen Ansätzen, die ohne aufwendige Vorarbeiten/ Vorabinformation der Proben anwendbar sind. Der Zielsetzung dieser Arbeit am ehesten entsprach dabei die Analytik der zufällig amplifizierten polymorphen DNA-Fragmente (RAPD). Enzymatische Vorbehandlungsschritte oder eine spezielle Gelelektrophorese-Apparatur zur Auswertung sind bei dieser Methode nicht erforderlich.

1.4.1.2 Sequenzbasierte Marker

Die zweite Kategorie von Markern basiert auf der Untersuchung von Nukleotidsequenzen. Je nach Fragestellung werden hierzu DNA-Bereiche unterschiedlicher Herkunft (aus den Mitochondrien, den Plastiden oder dem Kern) und Funktion (codierende- bzw. nicht codierende Abschnitte) analysiert (Abb. 1.04).

Die Analyse der Sequenzen von DNA-Markern bringt wesentliche Vorteile mit sich, denn im Unterschied zur Auswertung von DNA-Banden (unter denen sich stets auch mehrere Moleküle verbergen können) kann über die Abfolge der Nukleotide auf eindeutige und diskrete Merkmale zurückgegriffen werden. Hierbei ist eine valide Probenuntersuchung selbst bei Vorliegen von nur noch sehr geringen Mengen DNA möglich, da sich die gewünschten Nukleinsäurebereiche mit Hilfe einer PCR selektiv bis um den Faktor 10^8 bis 10^9 anreichern lassen [30].

Prinzipiell besitzen Sequenzdaten einen sehr hohen Informationsgehalt. So lassen sich – zumindest vom theoretischen Ansatz her – bereits durch die Sequenzierung eines einzelnen als Marker definierten Erbgutbereichs bis zu tausend Merkmale bereitstellen.

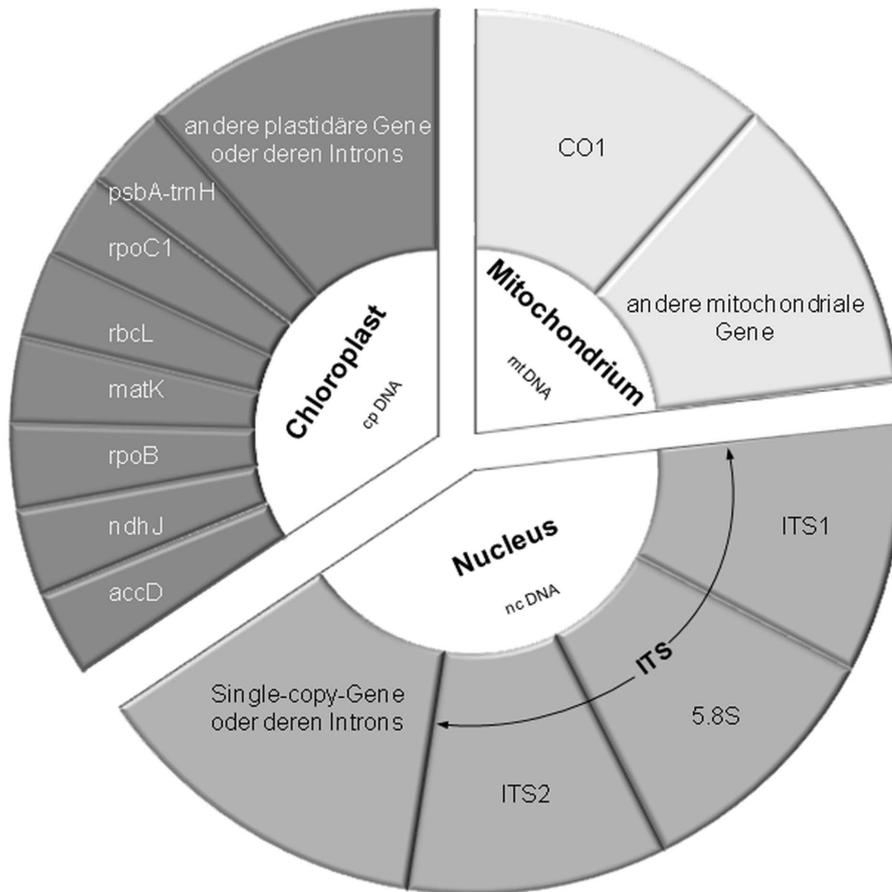


Abb. 1.04: Häufig verwendete DNA-Marker zur Identifizierung von Pflanzen [31, mod.]

1.4.2 Geeignete Markerregionen

Bei der Auswahl einer Markerregion muss den Besonderheiten des pflanzlichen Erbguts Rechnung getragen werden. Dieses verteilt sich in einer typischen Pflanzenzelle entwicklungsgeschichtlich bedingt auf drei Kompartimente: Zellkern, Mitochondrien und Plastiden. Die Funktionalität des pflanzlichen Erbgutsystems wird zwar durch ein gemeinsames Arrangement aller drei Teilgenome gewährleistet, d. h. es bestehen verschiedene Interaktionen zwischen den Subgenomen [32, 33], dennoch verlaufen zahlreiche Vorgänge in den Kompartimenten weitestgehend autonom. Hierzu gehört z. B., dass sich Sequenzmodifikationen in der nuklearen, chloroplastidären oder mitochondrialen DNA aufgrund untereinander verschiedener DNA-Polymerasen und Reparatur- Enzyme unterschiedlich schnell manifestieren. Dies bedingt, dass die DNA des Kerns bis zu fünfmal schneller als die des Plastiden-Genoms, bzw. sogar bis zu zwanzigmal schneller als die des mitochondrialen Genoms evolviert [34]. Für

eine Differenzierung über Merkmalsvariationen sind daher die Markerregionen der drei Teilgenome unterschiedlich gut geeignet. Letztlich muss noch die unterschiedliche Verfügbarkeit der Marker berücksichtigt werden, damit auch bei sehr geringen Probenmengen eine ausreichende Grundlage zur Erhebung der Merkmalsdaten besteht.

1.4.2.1 Mitochondriale-DNA

Das mitochondriale Genom (Chondriom) besteht aus ringförmig angeordneten DNA-Molekülen (mtDNA). Es wird uniparental (fast immer maternal) vererbt und ist bei den Pflanzen, im Vergleich zu den Chondriomen der Tiere und Pilze, um etwa den Faktor zehn bis hundert vergrößert [35]. Ferner evolvieren die Gene der pflanzlichen mtDNA nur äußerst langsam, so dass sich die DNA-Sequenzen zwischen den Arten nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Zudem ist die Anordnung bzw. Anzahl der Gene sehr variabel, was auf häufige Rekombinationsvorgänge, den Transfer von Genen in das Kerngenom und die Aufnahme fremder Gene zurückgeführt wird [36, 37]. Mitunter lassen sich deshalb innerhalb eines Individuums, einer Zelle oder gar eines einzelnen Mitochondriums verschiedene Formen und Größen von mtDNA nachweisen [20]. Als Datenquelle zur Identifizierung von Arten wird aus diesen Gründen nur selten auf das pflanzliche Chondriom zurückgegriffen. Auch in diesem Projekt wird es als nicht geeignet betrachtet.

1.4.2.2 Chloroplasten-DNA

Chloroplasten gehen ebenso wie die übrigen Plastidentypen aus den noch undifferenzierten Proplastiden des Meristemgewebes hervor [38]. Daher verfügen sämtliche Plastiden einer Pflanze über ein identisches Genom (Plastom) [39]. Das Plastom besteht ebenso wie das Chondriom aus einem circular angeordneten DNA-Molekül. Letzteres kommt in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium, den vorliegenden Umweltbedingungen und dem umgebenden Gewebe in unterschiedlicher Kopienzahl in den verschiedenen Typen der Plastiden vor. In den photosynthetisch aktiven Zellen mit ihren grünen Chloroplasten ist die Anzahl der Kopien im Allgemeinen am höchsten [39]. Das Plastom ist etwa 20- bis 40-mal in jedem einzelnen Chloroplasten vorhanden. Da in einer einzigen Pflanzenzelle wiederum bis zu 40 Chloroplasten enthal-

ten sind, werden bei einer DNA-Isolierung aus den entsprechenden Gewebeproben vergleichsweise hohe Ausbeuten an chloroplastidärer DNA (cpDNA) erzielt [35]. Die nicht grünen Plastidentypen verfügen ganz im Gegenteil oftmals über viel geringere Kopiezahlen des Plastoms. So beträgt die Anzahl der Plastome in den Plastiden der Wurzeln bspw. nur ein Fünftel derer in den Chloroplasten [39]. Dies erklärt den überwiegenden Einsatz von Blattmaterialien bei DNA-Analysen.

Das (chloro)plastidäre Genom ist generell recht strukturstabil, haploid, nicht rekombinierend und wird bei den höheren Pflanzen bei etwa 70% der Arten uniparental (maternal) vererbt [30, 34]. Es evolviert schneller als das Chondriom, jedoch deutlich langsamer als das Genom des Kerns. Daher ist es – zumindest bei Analyse nur eines einzelnen Markers – zur Unterscheidung von Arten nur bedingt geeignet [40, 41].

1.4.2.3 Kern-DNA

Das Erbgut des Zellkerns ist in Chromosomen organisiert. Es wird biparental vererbt und stellt mit einem Anteil von mehr als 99% am Gesamtgenom [42] die größte DNA-Menge der pflanzlichen Zelle dar. Das Kerngenom umfasst kodierende Abschnitte, die als einzelne Gene (single-copy-Gene) und als Genfamilien auftreten. Der größte Teil des Genoms besteht indessen aus nichtkodierender DNA. Im Vergleich zu den Genomen von Chloroplasten und Mitochondrien evolviert das Genom des Kerns mit fünf- bis zwanzigfacher Geschwindigkeit [34]. Daher wird in phylogenetischen Studien bei der Klärung von Zusammenhängen auf niedrigem taxonomischen Niveau (z.B. auf der Stufe Gattungen und Arten) oft auf das Kerngenom zurückgegriffen. Der in diesem Zusammenhang bislang am häufigsten verwendete DNA-Marker ist die in den 18S-, 5,8S-, 26S-nrDNA-Clustern lokalisierte Internal transcribed spacer-Region (nrITS-Region) [43]. Single-copy-Gene sowie die in ihnen enthaltenen nichtkodierenden Bereiche (Introns) sind aufgrund fehlender universell flankierender Primerbindungsstellen, bzw. auch infolge ihrer geringen Anzahl, für molekulargenetische Identifizierungsansätze weniger gut geeignete Marker [31].

1.4.3 Auswahl einer geeigneten Markerregion

Neue Ansätze zur Identifizierung von Pflanzen mittels DNA-analytischer Methoden sind seit einigen Jahren das Ziel verschiedener Forschergruppen [44]. Der Fokus in diesen Arbeiten liegt allerdings auf zumeist botanisch-systematischen Fragestellungen [41]. Dennoch lassen sich wesentliche Elemente wie etwa die Anforderungen an den idealen Markerbereich auch auf die Belange bei der Untersuchung von pflanzlichen Stoffen und deren Zubereitungen übertragen.

So sollte der Marker idealerweise:

- pflanzenspezifisch und idealerweise variabel genug sein, um Differenzierungen bis hin zur Artenebene zu ermöglichen,
- eine geringere innerartliche- als zwischenartliche Variabilität aufweisen,
- möglichst robust, d. h. unabhängig von der zu untersuchenden Pflanzengruppe oder dem zur Verfügung stehenden Pflanzenteil einsetzbar sein,
- über hoch konservierte flankierende Primerbindungsregionen verfügen,
- sehr zuverlässig in Bezug auf seine Amplifikation und Sequenzierung sein,
- kurz genug sein, um mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in degradiertem DNA amplifiziert werden zu können [45].

Eine den vorstehend genannten Kriterien in vollem Umfang entsprechende Markerregion wurde im Genom der Pflanzen bislang jedoch noch nicht ausfindig gemacht [41]. In dieser Arbeit wurde daher auf das bereits bekannte Spektrum an Markern zurückgegriffen. Im Hauptaugenmerk standen dabei die nukleär ribosomalen DNA-Cluster, da diese bezogen auf ihre Sequenz eine insgesamt größere Divergenz (d. h. mehr Variationen und somit größere Merkmalsgehalte) als vergleichbare Regionen des Plastoms besitzen [34]. Als zu evaluierender Marker wurde die nukleäre ribosomale Internal transcribed spacer-Region (nrITS-Region) ausgewählt. Darüber hinaus wurde ergänzend auch ein Teil des benachbarten External transcribed spacers (nrETS) untersucht.

Die ITS-Region und der ETS sind Teil einer Transkriptionseinheit (Abb. 1.06), deren Gene für drei der vier ribosomalen RNAs der cytoplasmatischen Ribosomen kodieren. Die Gene in der Transkriptionseinheit werden durch zwei Spacer (ITS-1 und ITS-2) voneinander getrennt und gemeinsam durch den ETS angeführt. Zusammen mit dem Non transcribed spacer (NTS), bildet der ETS einen Intergenic spacer (IGS), der wiederum die ribosomalen DNA-Cluster (Wiederholungseinheiten) voneinander separiert. Die Spacer selbst besitzen keine kodierende Funktion, weshalb sich Mutationen in ihnen weit häufiger manifestieren als in den benachbarten Genen.

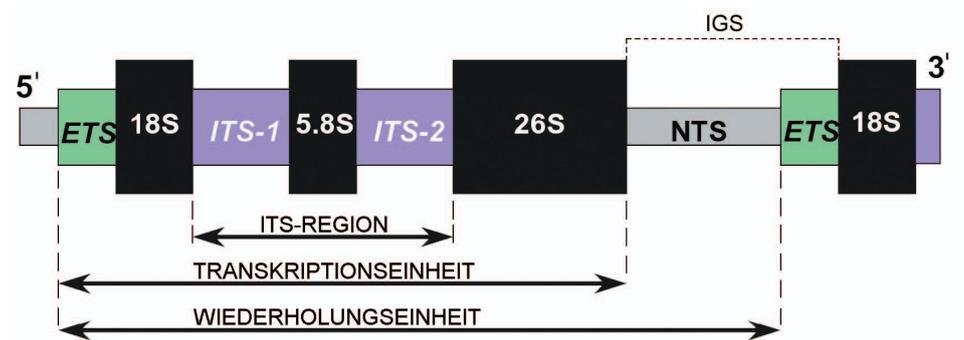


Abb. 1.06: nrDNA-Cluster [46, mod.]

(ETS: External transcribed spacer; IGS: Intergenic spacer; ITS: Internal transcribed spacer; NTS: Non transcribed spacer; Gene sind schwarz hervorgehoben)

In Pflanzenzellen liegen bis zu 40.000 Kopien [47] der Gencluster in den so genannten Nukleolus-Organisator-Regionen, speziellen repetitiven Chromosomenabschnitten, vor. Die nrDNA-Cluster werden dabei durch Mechanismen wie inäquales Crossingover und/oder Genkonversion [40, 43] untereinander homogenisiert. Beide Marker sind somit prinzipiell auch in Proben mit nur noch geringem Zellanteil und/oder degradierter DNA verfügbar.

Neben den Multigenbereichen des Kerngenoms wurden in dieser Arbeit auch Abschnitte des Plastoms mit in die Suche nach einem geeigneten Marker eingeschlossen. Aufgrund der in diesem Genom relativ geringeren Evolutionsraten (Kap 1.4.2.2) wurde der Fokus dabei schwerpunktmäßig auf variabelere, nicht-kodierende DNA-Bereiche gerichtet. Letztendlich fiel die Auswahl auf den *trnH-psbA*-Spacer, der in-

nerhalb der Angiospermen (zu denen der größte Teil der Europäischen Arzneipflanzen gehört) als variabelste Markerregion [41] des Plastoms gilt.

Der *trnH-psbA*-Spacer ist zwischen den Genen, die für die tRNA Histidin (*trnH*) und das sogenannte D1- Protein (*psbA*), eines der Reaktionszentrumsproteine des Photosystems II kodieren (Abb. 1.05), lokalisiert. Aufgrund seiner Länge von durchschnittlich 450 bp ist er auch für Amplifikationen aus degradiertem Erbgut geeignet und war bzw. ist daher als einer der Markerregionen der in der Pflanzensystematik gestarteten „DNA-Barcoding“-Initiative in Diskussion [41, 48, 49].



Abb. 1.05: *trnH-psbA*-Spacer im Chloroplastengenom [50]

1.5 Problemstellungen und Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte mit dem Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn angefertigt. Der Themenschwerpunkt der Forschung lag dabei in der Entwicklung und beispielhaften Anwendung einer alternativen, nicht chromatographischen Prüfmethode zum Nachweis der Identität pflanzlicher Stoffe. Ferner sollten mit der Forschung neue Erkenntnisse für die Bewertung aktueller regulatorischer Fragestellungen, z. B. als Konsequenz geänderter oder neuer gemeinschaftlicher Rahmenbedingungen (wie der im Jahre 2004 in Kraft getretenen Richtlinie 2004/24/EG), zur Verfügung gestellt werden.

Die spezielle Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand darin, verschiedene PCR-Strategien hinsichtlich ihrer Zweckdienlichkeit bei der Identifizierung von pflanzlichen Stoffen systematisch zu analysieren. Im Ziel sollte dabei eine möglichst einfache, robuste und weithin anwendbare Methode herausgearbeitet und im Rahmen einer Eignungsprüfung näher evaluiert werden.

Für die Methodenentwicklung, die anhand von bekannten und gut charakterisierten Modellobjekten durchgeführt werden sollte, wurden exemplarisch Vertreter von typischen in der Europäischen Union genutzten pflanzlichen Stoffen (Blüten-, Kraut- und Wurzelmaterialien) ausgewählt. Nach Abschluss der Entwicklungsphase sollte die Übertragbarkeit und Anwendbarkeit der Methode zur Identifizierung und Rückverfolgbarkeit pflanzlicher Stoffe auch in pflanzlichen Zubereitungen und Fertigarzneimitteln evaluiert werden, um deren Grenzen und Möglichkeiten genauer zu bestimmen.

Schließlich sollten anhand eines breiten Spektrums von in den europäischen Mitgliedsstaaten häufig verwendeten pflanzlichen Stoffen systematisch Daten gesammelt werden, um den Aufbau einer Datenbank zu initiieren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Probenmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Probenmaterialien sind in Tabelle 6.01 (Anhang, S. 103) aufgelistet.

2.1.2 Oligonukleotide

Alle als Primer eingesetzten Oligonukleotide (Tab. 2.01a/b) wurden in Form salzfreier Lyophilisate von der Firma Operon Biotechnologies GmbH (Köln) bezogen. Die Lyophilisate wurden direkt nach Wareneingang durch Zugabe von molekularbiologisch reinem Wasser resuspendiert und durch weitere Volumenzugaben auf eine einheitliche Primerkonzentration von 100 pmol/ μ L eingestellt. Die fertigen Primerlösungen wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C im Gefrierfach aufbewahrt. Primerlösungen für laufende Versuche wurden bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert.

Tab. 2.01a: Eukaryoten-Primer nach White et al. [51]

Primer-Sequenz (5' \rightarrow 3')	Bezeichnung
TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS1
GCTGCGTTCTTCATCGATGC	ITS2
GCATCGATGAAGAACGCAGC	ITS3
TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS4
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS5

Tab. 2.01b: Sonstige Eukaryoten-Primer

Nr.	Primer-Sequenz (5' → 3')	Referenz
Ker001-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[51]
Ker002-R	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	[51]
Ker003-R	ATCCGTTGCCGAGAGTCGT	[52]
Ker004-F	ACGACTCTCGGCAACGGAT	[52]
Ker005-F	GAACCTGCGGAAGGATCATTG	neu abgeleitet
Ker006-R	GCAATTCACACCAAGTATCGC	[53]
Ker007-F	CATCGATGAAGAACGTAGC	neu abgeleitet
Ker008-F	GTAAAACCCTCGTTCTTTG	neu abgeleitet
Ker009-R	GCTTAAACTCAGCGGGTAGTCC	neu abgeleitet
Ker010-F	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC	neu abgeleitet
Ker011-R	TGACCTGGGGTCGCG	neu abgeleitet
Ker012-R	CTGACCTGGGGTCGCG	neu abgeleitet
Ker013-R	GCAGGATCAACCAGGTAGCA	[54]
Ker014-F	CGTAAAGGTGCATGAGTGGTGT	[55]
Ker015-R	AGGTAGCATTCTCTTCGAC	neu abgeleitet
Ker016-F	ATACGGAACATATAGTGGGCATG	neu abgeleitet
Ker017-F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	[56]
Ker018-R	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	[57]
Ker019-F	GTGGGTTGAGCACTTGTTTG	neu abgeleitet

2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits, Lösungen und sonstige Materialien

2.1.3.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt in Analysenqualität (p.a.) bezogen.

Tab. 2.02: Lösungsmittel und Feinchemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Universal Agarose	Peqlab (Erlangen)
Ammoniumacetat	Roth (Karlsruhe)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
CTAB	Roth (Karlsruhe)
EDTA-Na ₂ * 2H ₂ O	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (absolut, unvergällt)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid (Lösung 1%)	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (Lösung 25 mM)	Promega (Mannheim)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
PVP K30	Roth (Karlsruhe)
Stärke aus Mais (für biochem. Zwecke)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Stärke aus Weizen (für biochem. Zwecke)	Merck (Darmstadt)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Wasser (molekularbiologisch rein)	Eppendorf (Hamburg)

2.1.3.2 Enzyme

Tab. 2.03: Enzyme zum Aufschluss und für die PCR der Proben

Enzym	Bezugsquelle
GoTaq™ DNA Polymerase (5 U/ µL)	Promega (Mannheim)
JumpStart™ KlenTaq® LA DNA Polymerase (1,25 U/ µL)	Sigma-Aldrich (München)
Proteinase K	Invitek (Berlin)
RNase A (100 mg/ mL; 7.000 U/ mL, Lösung)	Qiagen (Hilden)

2.1.3.3 Reagenzien- und Zubehör-Komplettsätze (Kits)

Tab. 2.04: Kits für die Aufreinigung und Sequenzierung der Proben

Kit	Bezugsquelle
ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare (München)
Invisorb Spin Forensic Kit	Invitek (Berlin)
Invisorb Spin Food Kit II	Invitek (Berlin)
PSP Spin Stool DNA Kit	Invitek (Berlin)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.3.4 Puffer und Lösungen

Tab. 2.05: Herstellungsvorschriften der verwendeten Lösungen und Puffer

Puffer / Lösung	Herstellung
NH ₄ Ac (7,5 M) – 250 mL	144,5 g NH ₄ Ac (MW 77,1 g/mol) in 250 mL H ₂ O gelöst, anschließend autoklaviert und bei RT aufbewahrt.
NaOAc (3 M) – 250 mL	61,5 g NaOAc (MW 82,0 g/mol) in 250 mL H ₂ O gelöst, anschließend autoklaviert und bei RT aufbewahrt.
NaCl (5 M) – 100 mL	29,2 g NaCl (MW 58,4 g/mol) in ca. 80 mL H ₂ O gelöst und mit H ₂ O auf 100 mL aufgefüllt, anschließend autoklaviert und bei RT aufbewahrt.
NaOH (5 M) – 100 mL	20,0 g NaOH (MW 40,0 g/mol) in ca 80 mL H ₂ O gelöst, nach Erkalten mit H ₂ O auf 100 mL aufgefüllt, anschließend autoklaviert und bei RT aufbewahrt.
EDTA (0,5 M, pH 8) – 100 mL	18,6 g EDTA-Na ₂ * 2 H ₂ O (MW 372,2 g/mol) in ca. 80 mL H ₂ O gelöst, mit NaOH-Lsg. auf pH 8 eingestellt und mit H ₂ O auf 100 mL aufgefüllt, anschließend autoklaviert und bei RT aufbewahrt.
Tris-HCl (1 M, pH 8) – 100 mL	12,1 g Tris (MW 121,1 g/mol) in ca. 70 mL H ₂ O gelöst, mit ca. 4 mL HCl (konz.) auf pH 8 eingestellt und mit H ₂ O auf 100 mL aufgefüllt, anschließend autoklaviert und bei RT aufbewahrt.
2 x CTAB Puffer – 100 mL	10 mL Tris-HCl (1 M, pH 8) mit 28 mL NaCl (5 M), 4 mL EDTA (0,5 M, pH 8), 2 g CTAB (MW 364,4 g/mol) und 1 g PVP (MW 40.000 g/mol) in ca 80 mL H ₂ O gelöst und mit H ₂ O auf 100 mL aufgefüllt, anschließend autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

Material und Methoden

TE-Puffer (pH 8) – 100 mL	1 mL Tris-HCl (1 M, pH 8) mit 200 µL EDTA (0,5 M, pH 8) gemischt und um 99 mL H ₂ O ergänzt, anschließend autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.
10 x TBE-Puffer – 1.000 mL	108 g Tris (MW 121,1 g/mol) und 55 g Borsäure (MW 61,8 g/mol) in ca. 800 mL H ₂ O gelöst, 40 mL EDTA (0,5 M, pH 8) hinzugefügt, mit NaOH (5 M) auf pH 8,57 eingestellt und mit H ₂ O auf 1000 mL aufgefüllt, anschließend autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

2.1.3.5 Sonstige Materialien

Tab. 2.06: Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenz / Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
GeneRuler 50 bp	Fermentas (St. Leon-Rot)
O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
TrackIt 50 bp DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
100 bp DNA Ladder	Promega (Mannheim)
1 kb DNA Ladder	Promega (Mannheim)
Blue/Orange Loading Dye, 6x	Promega (Mannheim)
dNTP Mix (jeweils 10 mM)	Promega (Mannheim)
0,2 ml PCR Gefäße	Eppendorf (Hamburg)
0,5 ml PCR Gefäße	Eppendorf AG (Hamburg)
Biopur Safe-Lock Tubes 1,5 mL	Eppendorf AG (Hamburg)
Biopur Safe-Lock Tubes 2,0 mL	Eppendorf AG (Hamburg)
PCR-Cooler	Eppendorf AG (Hamburg)
0,1-10 µL Extended Length Filter Tips	Starlab (Ahrensburg)
1-100 µL Bevelled Filter Tips	Starlab (Ahrensburg)
0,1- 1 mL Extended Length Filter Tips	Starlab (Ahrensburg)
Tungsten Carbide Beads, 3 mm	Qiagen (Hilden)
Stainless Steel Beads, 5 mm	Qiagen (Hilden)
Silica Gel Orange 2-5 mm	Roth (Karlsruhe)

2.1.4 Software und Datenbanken

Tab. 2.07: Software zur Dokumentation und Sequenzauswertung

Programm (Vers.)	Software-Hersteller
BioEdit (7.0.5.2)	Ibis Therapeutics, USA
FinchTV (1.4.0)	Geospize Inc., USA
Photoshop (CS2)	Adobe Systems Inc., USA
Kodak D1 (3.5.4)	Eastman Kodak, USA

Tab. 2.08: Internetdatenbanken zur Charakterisierung der Primer und Proben

Online-Datenbank	Zugang unter:
NCBI (GenBank)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide
NCBI Nucleotide BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
GRIN	http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/queries.pl
Oligo Analysis	https://www.operon.com/oligos/toolkit.php?

2.1.5 Laborbedingungen und Geräte

2.1.5.1 Reinstwasseraufbereitung

Für alle selbst hergestellten Lösungen (Kap. 2.1.3.4, Tab. 2.05) wurde ausschließlich Reinstwasser aus einem Milli-Q Academic Wasseraufbereitungssystem (Millipore, Eschborn) verwendet. In PCR-Ansätzen, sowie zur Resuspendierung der Primer wurde aus dem Handel bezogenes, molekularbiologisch reines Wasser (Kap. 2.1.3.1, Tab. 2.02) eingesetzt.

2.1.5.2 Sterilisationsmethoden

Soweit möglich wurden Lösungen und Gebrauchsgegenstände in einem Varioklav 500E Dampfsterilisator (Thermo Scientific, Langenselbold) bei 121°C und einem Überdruck von 1 bar mindestens 20 min lang autoklaviert.

Zur Sterilisation der Arbeitsflächen wurde Antifect N Liquid (Schülke & Mayr, Nordstedt) verwendet.

2.1.5.3 Geräte

Neben laborüblichen Standardgeräten wie Präzisionspipetten, Laborwaagen, Magnetrührern u. ä. wurden die nachfolgend aufgeführten Gerätschaften verwendet:

Tab. 2.09: Spezifische Laborgeräte

Gerät	Typenbezeichnung und Hersteller
Gelkammersystem	Horizon 58 (Biometra, Göttingen)
Spannungsgeber	PowerPac 200 (BioRad, München)
Schwingmühle + Adapter	TissueLyser & Adapter Set 2 x 24 (Qiagen, Hilden)
Geldokumentationssystem	Kodak EDAS 290 (Kodak, Stuttgart)
UV-Transilluminator	TI 4 (Biometra, Göttingen)
Zentrifuge	Biofuge fresco (Thermo Scientific, Langenselbold)
Zentrifuge	Fuge/Vortex Combi-Spin FVL-2400 (Peqlab, Erlangen)
Feinstwaage	MC 210S (Sartorius, Göttingen)
Gradienten-Thermocycler	Px2 Thermal Cycler (Thermo Scientific, Langenselbold)
Thermocycler	Primus advanced 96 (Peqlab, Erlangen)
Thermocycler	T3 (Biometra, Göttingen)
PCR Werkbank	Biocap DNA (Captair, Köln)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolierung

Genomische DNA wurde ausschließlich aus getrockneten Pflanzenproben / pflanzlichen Zubereitungen isoliert. Die Isolierung erfolgte nach der CTAB-Methode (Kap. 2.2.6.1) bzw. mit Hilfe kommerziell erhältlicher Isolierungs-Kits (Kap. 2.2.6.2 & 2.2.6.3).

2.2.1.1 CTAB-Methode

Das ursprünglich durch Murray und Thompson [58] entwickelte CTAB-Protokoll beschreibt eine geeignete und zuverlässige Methode zur Isolierung von Nukleinsäuren aus pflanzlichen Materialien. Die heutzutage üblicherweise verwendeten CTAB-Methoden sind überwiegend an verschiedene Problemstellungen angepasste Modifikationen verschiedener Forschergruppen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische DNA nach dem Protokoll von Borsch et al. [59] isoliert. Die Isolierung der DNA erfolgt dabei in folgenden Schritten: Eine kleine Menge Probenmaterial (ca. 50 mg) wird zusammen mit 3 Carbid- oder Stahlkugeln in ein 2,0 mL Eppendorf-Cap überführt und 60 s bei 30 Hz im TissueLyser fein vermahlen. In das Eppendorf-Cap mit dem zerkleinerten Probenmaterial werden 700 μ L des vorgewärmten CTAB-Puffers hinzugefügt. Der Ansatz wird kurz aufgeschüttelt und unter gelegentlichem Schwenken 1h lang bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wird 5 Minuten lang bei 21.000 x g (RT) zentrifugiert um einen Großteil der Zelltrümmer zu entfernen. Die Epiphase wird anschließend vorsichtig in ein 2,0 mL Phase-Lock-Gel-Gefäß überführt und mit 600 μ L Chloroform versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren wird erneut 2 Minuten lang bei 21.000 x g (RT) zentrifugiert. Die oberhalb der Gelmatrix befindliche wässrige Phase wird hierauf in ein neues 2,0 mL Phase-Lock-Gel-Gefäß überführt und eine weitere Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Der nach der zweiten Chloroform-Extraktion verbleibende wässrige Überstand wird in ein 2,0 mL Eppendorf- Cap überführt und um etwa 2/3 seines Volumens mit Isopropanol (vorgekühlt) ergänzt. Nachdem der Ansatz einige Male invertiert wurde, stellt man ihn für mindestens 2h bei -20°C kühl. Anschließend wird 10 Minuten lang bei 21.000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird mittels Pipette vorsichtig vom

Präzipitat (Pellet) abgehoben und verworfen. Das verbleibende Pellet wird mit 200 µL 70%igem Ethanol unter leichten Schwenkbewegungen gewaschen und der Ethanol nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 21.000 x g (4°C) wieder entfernt.

Das Pellet wird bei RT getrocknet und anschließend in 100 µL TE-Puffer aufgenommen. Im Weiteren wird der Ansatz zunächst um 50 Volumen-% mit einer 7,5 M NH₄Ac-Lösung (4°C) sowie nachfolgend um das Doppelte des Gesamtvolumens mit absolutem Ethanol (4°C) versetzt. Der Ansatz wird einige Male invertiert und erneut mindestens 2h lang bei -20°C aufbewahrt. Anschließend wird 30 Minuten lang bei 21.000 x g (4°C) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig vom Pellet abgehoben und verworfen. Das Pellet wird wie zuvor mit 200 µL 70%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50 µL TE-Puffer aufgenommen. Abschließend erfolgt eine weitere Ethanol-Fällung mit einer 3 M NaAc-Lösung (ebenfalls bei -20°C), mit nachfolgendem Waschschrift analog zum Vorgehen bei der ethanolischen Fällung mit NH₄Ac. Nach der Trocknung des Pellet wird dieses schließlich in 50 µL TE-Puffer gelöst.

2.2.1.2 DNeasy Plant Mini Kit

Zur Isolierung genomischer DNA mit Hilfe des DNeasy Plant Mini Kits wird das Probenmaterial zerkleinert (Kap. 2.2.6.1). Die anschließenden Schritte erfolgen entsprechend dem Protokoll des Kit-Herstellers. Abschließend wird mit 50 µL des beigegeführten AE-Puffers eluiert.

2.2.1.3 PSP Spin Stool DNA Kit

Zur Isolierung genomischer DNA mit Hilfe des PSP Spin Stool DNA Kits werden von festen Probenmaterialien zunächst 50 mg zerkleinert (Kap 2.2.6.1). Von flüssigen pflanzlichen Zubereitungen werden 200 µL als Probe eingesetzt. Die anschließenden Schritte entsprechen dem Protokoll des Kit-Herstellers. Abschließend wird mit 50 µL des auf 70°C vortemperierten Elutionspuffers eluiert.

2.2.2 RAPD- Analyse

2.2.2.1 Allgemeines

Die RAPD-Methode (Random Amplified Polymorphic DNA) wurde erstmals im Jahre 1990 durch Williams et al. [24] beschrieben. Sie ermöglicht es, Pflanzenarten auch ohne die Kenntnis über deren genaue DNA-Sequenz voneinander zu unterscheiden. Im Kern basiert die Methode auf einer PCR, bei der einzelne aus 10 Desoxynukleotiden bestehende Oligonukleotide mit willkürlich kombinierter Sequenz als Primer eingesetzt werden. Während der PCR binden die Primer mit statistischer Wahrscheinlichkeit an in der DNA-Probe vorhandene komplementäre Sequenzmotive. Sind letztere auf beiden Strängen entgegengesetzt orientiert und liegen nicht zu weit auseinander, werden die eingeschlossenen Bereiche amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung entsteht so ein für die Probe typisches Bandenmuster.

2.2.2.2 Durchführung der Methode

Die RAPD-Versuche in dieser Arbeit erfolgen analog dem von H.-T. Wolf [60] beschriebenen Protokoll.

Sämtliche PCRs werden in Reaktionsvolumen von 25 µL, in 200 µL- PCR Gefäßen durchgeführt. Als Primer werden die in Tab. 2.10 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Das Pipettierschema und Temperaturprogramm für die Amplifikation sind in Tab. 2.11 bzw. Tab 2.12 dargestellt.

Nach Abschluss der PCR werden die amplifizierten Fragmente in einem 1,5%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet (Kap. 2.2.9).

Tabelle 2.10: RAPD Primer [60]

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Roth-A04	AATCGGGCTG
Roth-C19	GTTGCCAGCC
Roth-M02	ACAACGCCTC

Tabelle 2.11: Reaktionsansätze der RAPD-PCR

Reaktionskomponente	Volumen
5 x Taq Puffer (incl. 7,5 mM MgCl ₂)	5,000 µL
MgCl ₂ (25 mM)	0,500 µL
dNTP Mix (jedes Nukleotid 10 mM)	0,125 µL
Primer (100 µM)	0,200 µL
Taq-Polymerase (5 U / µL)	0,200 µL
Template-DNA*	0,700 µL
Wasser	18,275 µL

*Als Template-DNA wird das aus der DNA-Isolierung (Kap. 2.2.6) resultierende Eluat eingesetzt.

Tabelle 2.12: Temperaturprogramm der RAPD-PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	60 s
Primerhybridisierung	35°C	30 s
Elongation	72°C	90 s
Denaturierung	95°C	30 s
Primerhybridisierung	35°C	30 s
Elongation	72°C	90 s
Denaturierung	95°C	15 s
Finale Elongation	72°C	150 s
Kühlung	4°C	∞

2.2.3 Vergleichende DNA-Sequenzanalyse

2.2.3.1 Allgemeines

Organismen lassen sich anhand von Sequenzvariationen, die auch als Merkmale betrachtet werden können, unterscheiden. Die vergleichende DNA-Sequenzierung ist dabei eine häufig genutzte Methode um genetische Variationen zu erfassen [61]. Hierbei wird eine geeignete DNA-Region mit Hilfe der PCR in vitro amplifiziert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen werden mittels spezieller Computerprogramme gegen Referenzdaten abgeglichen. Grundsätzlich können verschiedene Bereiche der drei pflanzlichen Teilgenome, d. h. des nukleären, (chloro-)plastidären oder mitochondrialen Genoms einer Pflanzenzelle als Marker für vergleichende Sequenzuntersuchungen herangezogen werden. Die spezifische Auswahl einer Zielregion richtet sich nach der jeweiligen Fragestellung (Kap. 1.4.2).

2.2.3.2 Durchführung der Methode

Sequenzspezifische PCR werden in dieser Arbeit nach den in Tab. 2.13 bzw. 2.14 dargestellten Pipettierschema und Temperaturprogramm durchgeführt. Als Primer werden die in Tabelle 2.01a/b aufgeführten Oligonukleotide verwendet.

Sämtliche PCR werden in Reaktionsvolumen von 25 μL in 200 μL - PCR-Gefäßen durchgeführt. Nach Abschluss der PCR werden die amplifizierten Fragmente in einem 3%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet (Kap. 2.2.9).

Tabelle 2.13: Pipettierschema der Standard PCR

Reaktionskomponente	Volumen
5 x Taq Puffer (incl. 7,5 mM MgCl ₂)	10,0 µL
dNTP Mix (jedes Nukleotid 10 mM)	2,0 µL
Vorwärts-Primer (100 µM)	1,0 µL
Rückwärts-Primer (100 µM)	1,0 µL
Taq-Polymerase (5 U / µL)	0,5 µL
Template-DNA*	0,5 µL
Wasser	35,0 µL

*Als Template-DNA wird das aus der DNA-Isolierung (Kap. 2.2.6) resultierende Eluat eingesetzt.

Tabelle 2.14: Temperaturprogramm der Standard PCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	120 s
Primerhybridisierung	61°C**	20 s
Elongation	72°C	30 s
Denaturierung	95°C	30 s
Primerhybridisierung	61°C*	20 s
Finale Elongation	72°C	240 s
Kühlung	4°C	∞

**die Hybridisierungstemperatur in PCR mit der Primerkombination Ker008-F & Ker002-R beträgt abweichend 55°C, bei Ker001-F & Ker002-R 58°C

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Konzentration der in dieser Arbeit verwendeten Agarosegele beträgt 1,5% (m/m) für aufzutrennende RAPD- Fragmente, bzw. 3% (m/m) für alle weiteren PCR Produkte. Als Laufpuffer dient 1 x TBE- Puffer. Die DNA-Marker zum Größenvergleich sind in Tabelle 2.06 aufgeführt.

Von den Proben werden vorsichtig je 5 μL (bzw. 10 μL bei RAPD-Analysen) mit ca. der Hälfte ihres Volumens an Auftragspuffer (Blue/Orange Loading Dye - Promega) vermischt und in die Geltaschen eingetragen. Die Fragmente werden 50 bzw. 75 Minuten lang (entsprechend 1- bzw. 3%igen Gelen) bei einer Feldstärke von 4,6 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die im Auftragspuffer beinhalteten verschiedenen Farbstoffanteile ermöglichen eine gute Abschätzung des Verlaufes der Probenauf-trennung. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das Gel 15 – 20 Minuten lang in einer Ethidiumbromid- Lösung (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) gefärbt, kurz gewässert und mit dem Dokumentationssystem digital erfasst.

2.2.5 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Bei präparativen Agarosegelen wird die betreffende DNA-Bande mittels eines Deckgläschens direkt auf einem UV-Transilluminator herauspräpariert. Die DNA-Fragmente werden mit Hilfe des illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits gemäß Herstellerangaben extrahiert. Abschließend wird mit 50 μL des mitgelieferten AE Wassers eluiert.

2.2.6 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

PCR-Amplifikate werden mit Hilfe des illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Abschließend wird mit 50 μL des mitgelieferten AE Wassers eluiert.

2.2.7 Sequenzierung der PCR-Fragmente

Für die Sequenzierreaktion wurde das ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit verwendet.

Der Sequenzansatz und das Temperaturprogramm für die Amplifikation der PCR-Produkte im konventionellen Thermocycler waren wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 2.15: Pipettierschema der Sequenzansätze

Reaktionskomponente	Volumen
5 x BigDye Sequenzierungspuffer	4,0 µL
Primer (100 µM)	1,0 µL
BigDye Terminator Mix	5,0 µL
Template-DNA	1,0 µL
Wasser	9,0 µL

Tabelle 2.16: Temperaturschema der Sequenzansätze

Programmschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	180 s
Primerhybridisierung	50°C	15 s
Elongation	60°C	240 s
Denaturierung	95°C	30 s
Kühlung	4°C	∞ s

} 25x

Die Elektrophorese und Fragmentdetektion der Sequenzierprodukte wurden im Anschluss an die Sequenzierreaktion als Auftragsarbeit (z. B. bei der Firma Genterprise Mainz) durchgeführt.

2.2.8 Editierung und Sequenzvergleich

Die übermittelten Elektropherogramme wurden mit dem Programm FinchTV begutachtet und soweit erforderlich manuell nacheditiert. Analysiert wurden die Sequenzdaten unter Zuhilfenahme der Alignment-Software BioEdit.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 DNA-Isolierungen

3.1.1 Ganze und geschnittene pflanzliche Stoffe

Genomische DNA wurde reproduzierbar aus ganzen und geschnittenen pflanzlichen Stoffen isoliert. Zur Isolierung wurden sowohl ein kommerzielles DNA-Isolierungs-Kit als auch ein klassisches Isolierungsverfahren (CTAB-Protokoll, Kap. 2.2.6) erfolgreich eingesetzt. Die mit Hilfe des DNA-Isolierungs-Kit erhaltenen Eluate enthielten im Vergleich zum CTAB-Protokoll deutlich weniger störende Begleitstoffe. Das Kit wurde daher bevorzugt zur DNA-Isolierung verwendet.

Erste Rückschlüsse auf die Qualität der isolierten DNA wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung der erhaltenen Eluate getroffen. Die erhaltenen DNA-Banden waren z. B. unterschiedlich scharf abgegrenzt bzw. fluoreszierten ungleich intensiv. Die entsprechenden Merkmale konnten dabei auf unterschiedliche Reinheiten und Gehalte der DNA im jeweiligen Eluat zurückgeführt werden.

Die Unterschiede in den Abgrenzungen und Intensitäten der DNA-Banden sind exemplarisch in den Abbildungen der Gelelektropherogramme zweier Eluate (CTAB- sowie Kit-Methode) dargestellt (Abb. 3.01).

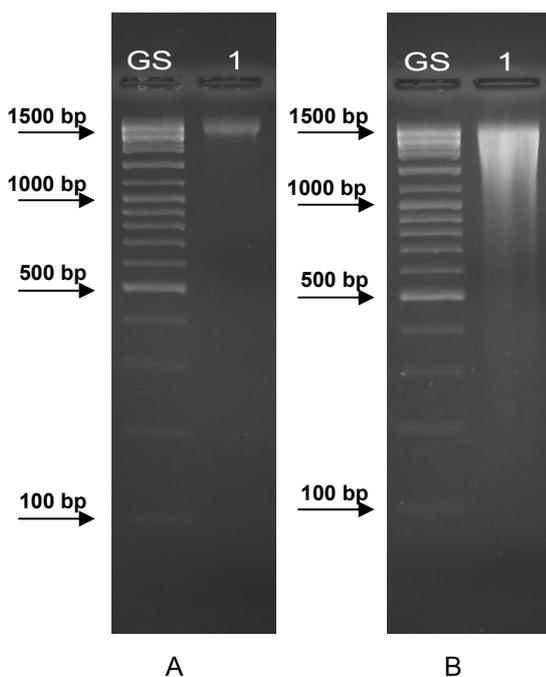


Abb. 3.01:
Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA aus unterschiedlichen Isolierungsverfahren

Gel A: DNA-Eluat mittels DNeasy Plant Mini Kit

Gel B: DNA-Eluat mittels CTAB-Methode

GS = Größenstandard

Probe: *Matricariae flos* [Probe 015]

In der Probenspur des elektrophoretisch aufgetrennten DNeasy Plant Kit-Eluates (Abb. 3.01 - Gel A) ist etwa auf Höhe des Größenmarkers bei 1,5 kbp eine einzelne DNA-Bande zu erkennen. Sie ist scharf begrenzt, erscheint hinsichtlich ihrer Intensität allerdings ein wenig schwächer als die bei etwa derselben Fragmentlänge im elektrophorisierten CTAB-Eluat zu beobachtende Fluoreszenz (Abb. 3.01 - Gel B). Sehr wahrscheinlich geht die geringere Fluoreszenzintensität der Bande (in Gel A) mit der limitierten DNA-Bindungskapazität der Säulchen des Kits einher. Ausgehend von den in beiden Verfahren eingesetzten Probenmengen (Kap. 2.2.6) wären praktisch vergleichbare DNA-Gehalte zu erwarten gewesen. Die distinkte Begrenzung der Bande deutet zudem auf eine weitestgehend einheitliche Fragmentlänge der isolierten DNA-Moleküle hin. Weitere Banden / Zonen sind in der betreffenden Probenspur nicht festzustellen. Es bestehen daher keine konkreten Anhaltspunkte auf weitere im Eluat vorhandene Stoffe mit möglicherweise oder bekannt PCR-inhibierenden Eigenschaften. Die Qualität des DNA-Eluats ist somit sehr wahrscheinlich ausreichend für den Einsatz in einer PCR.

Im Kontrollgel des mit Hilfe der CTAB-Methode (aus demselben Probenmuster) erhaltenen Eluats ist hingegen ein im Fragmentgrößenbereich von etwa 1500 - 250 bp deutlich sichtbarer „Schmier“ zu erkennen (Abb. 3.01 - Gel B). Dieser kann ursächlich auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden, wie z. B. auf eine „überladene“ Probenspur (zu hoher DNA-Gehalt / zu großes Probenvolumen), auf nicht ausreichend entfernte Zellinhaltsstoffe (z.B. Proteine) oder auf degradierte DNA.

Im vorliegenden Fall sind vermutlich mehrere der genannten Gründe zutreffend. Das Eluat der CTAB-Methode ist daher nur bedingt als Template für die PCR geeignet.

Mit den als Template direkt eingesetzten Eluaten der beiden DNA-Isolierkits wurden in den Versuchen regelmäßig PCR-Produkte erhalten. Ganz im Gegensatz hierzu mussten die CTAB-Eulate noch verdünnt oder in einigen Fällen erneut aufgereinigt werden, bevor es gelang die enthaltene DNA zu amplifizieren. Es liegt daher nahe, dass in den CTAB-Eluaten noch zu hohe Konzentrationen an störenden Stoffen vorhanden waren. Beide Isolierungsverfahren standen hinsichtlich des zeitlichen Arbeitsaufwands, aber auch ohne die zusätzlichen Aufreinigungsschritte, in einem sehr ungünstigen Verhältnis zueinander. So gelang die Isolierung der genomischen DNA nach der Kit-Prozedur etwa 2- bis 4-mal so schnell als mit dem

CTAB-Protokoll. Die Verwendung der Kits wurde deshalb für den routinemäßigen Einsatz bevorzugt. Priorisiert wurde hierbei aufgrund untereinander vergleichbarer Resultate das hinsichtlich seines Protokollaufwands weniger umfangreiche DNeasy Plant Mini Kit eingesetzt.

3.1.2 Gepulverte pflanzliche Stoffe

Bei der Herstellung der gepulverten pflanzlichen Stoffe kommt es infolge der einwirkenden Scherkräfte zur physikalischen Fragmentierung der enthaltenen DNA. Der Prozess der Fragmentierung wird zudem durch die Reibungswärme beim Vermahlen bzw. durch oxidative Prozesse infolge der Oberflächenvergrößerung begünstigt.

Aus den gepulverten Proben wurde dennoch reproduzierbar PCR-geeignete (d. h. amplifizierbare) genomische DNA isoliert. Hierzu wurden dieselben Kits wie bei der Aufarbeitung der ganzen und geschnittenen pflanzlichen Stoffe verwendet, da es sich bei den getesteten Proben (Kap. 6.1) vorwiegend um native pflanzliche Stoffe handelte. Auch hier wurde bevorzugt das DNeasy Plant Mini Kit eingesetzt.

Bei der gelelektrophoretischen Kontrolle der aus den Pulverproben isolierten DNA wurden kaum distinkte Einzelbanden, sondern mehrheitlich unspezifische Schmierbanden beobachtet. Die typischen Banden werden exemplarisch anhand von zwei DNA-Eluaten in Abb. 3.02 gezeigt.

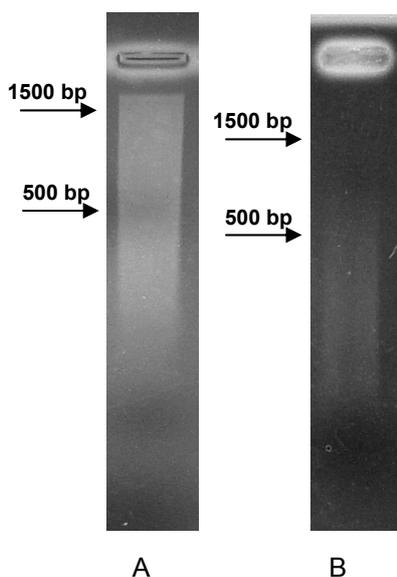


Abb. 3.02:
Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA aus verschieden stark prozessierten Zubereitungen von *Matricariae flos*

Gel A: DNA-Eluat aus losem Pflanzenpulver
[Probe 033]

Gel B: DNA-Eluat aus kompaktiertem Pflanzenpulver
[Probe 032]

In der Abbildung sind die unterschiedlichen Intensitäten und Fragmentgrößenbereiche zu erkennen, über die sich die aufgetrennte DNA erstreckt. In Gel A, der Probenspur des DNA-Eluates aus dem losen Pflanzenpulver, ist die DNA als fluoreszierende Zone im Bereich von etwa 1500 - 250 bp sichtbar. Für das aus dem Kompaktat (Tablette) gewonnene Eluat (Gel B) ist dagegen nur eine äußerst schwache Zone im Bereich zwischen 500 – 250 bp zu erkennen.

Die unspezifischen Banden werden aller Wahrscheinlichkeit nach durch fragmentierte DNA verursacht. Der „Schmier“ kann im Gegensatz zu den CTAB-Eluaten aus den ganzen und geschnittenen pflanzlichen Stoffen (Kap. 3.1.1) aber kaum auf bei der Isolierung mit übergegangene Zellbegleitstoffe zurückgeführt werden. Auch „überladene“ Probespuren, d. h. zu große Mengen eingebrachter DNA, sind aufgrund der Isolierung mit Hilfe von Kits mit vordefinierten Endvolumina in den Eluaten (Kap. 2.2.6) bzw. durch konstante Probenaufgabemengen bei der Elektrophorese (Kap. 2.2.9) weitestgehend auszuschließen.

In allen PCR-Versuchsansätzen in denen DNA-Eluate direkt als Template eingesetzt wurden entstanden Amplifikate. Von relevanten Konzentrationen an Inhaltsstoffen, die einen störenden Einfluss auf die Kettenreaktion ausüben, war somit nicht auszugehen. Eine mögliche Ursache für den „Schmier“ könnten oxidative Reaktionsprozesse während der Lagerung der Pflanzenpulver sein. Prinzipiell wurden alle festen Proben vor der DNA-Isolierung gemahlen. Vergleichbare unspezifische Zonen wurden hier kaum beobachtet. Dies unterstützt die These einer fortschreitenden DNA-Degradierung bei gelagerten Pflanzenpulvern.

3.1.3 Pflanzliche Zubereitungen / Fertigarzneimittel

Die Isolierung von PCR-tauglicher (amplifizierbarer) DNA aus pflanzlichen Zubereitungen und Fertigarzneimitteln war problematisch. Die Proben enthielten nur noch geringe Mengen DNA, die wiederum sehr stark degradiert war. Während der Aufarbeitungen kam es immer wieder zu Ausfällungen. Die Isolierungen mussten deshalb häufig nach nur wenigen Arbeitsschritten abgebrochen werden (Abb. 3.03). Zwischen den verwendeten Pufferlösungen und den Hilfs- bzw. Trägerstoffen der Proben bestanden offensichtlich Inkompatibilitäten.



Abb. 3.03:
Unerwünschte Reaktion während der Isolierung von DNA

Spontane Präzipitation nach Zugabe des Extraktionspuffers zu einer flüssigen Zubereitung [Probe 098]

Aus einigen der untersuchten Proben gelang es dennoch DNA-Fragmente zu isolieren. Allerdings waren bei der Sichtkontrolle der gelelektrophoretisch aufgetrennten Eluate keinerlei DNA-typische Banden bzw. Zonen zu erkennen. Auf das Vorhandensein der DNA wurde indirekt über die Bildung von Amplifikaten in Test-PCR geschlossen. Gemeinsam mit den Versuchsansätzen durchgeführte Negativ-Kontrollen dienten dabei zur Absicherung gegenüber falsch-positiven Ergebnissen.

Die typischen DNA-Gehalte in den Eluaten lagen unterhalb der Nachweisgrenze des Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplexes (in Agarosegelen ca. 5-10 ng DNA) [62]. Absolut, d. h. bezogen auf das eingebrachte Probenvolumen je Gelspur, betrug die Eluat-Konzentrationen der DNA weniger als 1-2 ng / μL .

Die Isolierung von DNA aus pflanzlichen Zubereitungen und Fertigarzneimitteln wurde vorab an einem Fluidextrakt (Probe 098) getestet. Der Extrakt wurde exemplarisch ausgewählt, da für den Nachweis der DNA des verarbeiteten pflanzlichen Ausgangsmaterials (*Matricariae flos*) auch ein gattungsspezifischer Primer (Ker008-F) zur Verfügung stand. Der mit diesem Primer amplifizierte Bereich der ITS-Region ist bei *Matricariae flos* (bzw. deren Stammpflanze *Matricaria recutia* L.) nur etwa halb so lang wie jener, der mittels der standardmäßig eingesetzten Primer (Kap. 3.2.2.3, Tab. 3.01) vervielfältigt wird. Es war insofern optional möglich, auch DNA-Fragmente unterhalb von ~ 400 bp nachzuweisen.

Zur Isolierung der DNA wurde zunächst das DNeasy Plant Mini Kit eingesetzt. Doch die mit diesem Kit aus dem Fluidextrakt gewonnenen Eluate waren jedoch auch nach zweimaliger Aufreinigung nicht für PCR-Untersuchungen geeignet (nicht amplifizierbar). Es wurde deshalb durch sukzessiven Zusatz der Additive DMSO, BSA und Betain versucht, den Einfluss im Eluat potentiell vorhandener, störender Stoffe abzuschwächen. Hiermit sollten die Ausbeuten und die Spezifität der PCR-Produkte bei der Vervielfältigung verbessert werden. Die Versuche die Resultate der PCR durch Additive zu beeinflussen, führten letztlich jedoch nicht zum erhofften Erfolg. In weiteren Versuchen wurde die Isolierung der DNA mit Hilfe eines Kits für Lebensmittel sowie mit Hilfe eines Kits für forensische Proben getestet (Kap. 2.1.3.3). Beide Kits waren entsprechend der Angaben ihrer Hersteller speziell für die Isolierung von (pflanzlicher) DNA aus prozessierten Materialien entwickelt worden. Aus dem Fluid wurde aber dennoch keine amplifizierbare DNA isoliert.

Die reproduzierbare Isolierung PCR-geeigneter DNA gelang schließlich mit einem DNA-Isolierungs-Kit für Stuhlproben (Kap. 2.2.6.3). Ausfällungen, wie bei den anderen Kits zu Beginn der Isolierungsprozedur beobachtet wurden, traten während der Aufarbeitung der Fluid-Probe nicht auf. Das Kit wurde überdies auch erfolgreich zur Isolierung von DNA aus weiteren Zubereitungen pflanzlicher Stoffe und Fertigarzneimitteln (Kap. 3.3.3 / 3.3.4) verwendet. Eine nachträgliche Aufreinigung der Eluate war nur in sehr wenigen Fällen notwendig.

3.2 Evaluierung der Markermethoden

3.2.1 RAPD Fingerprints

Die Eignung von RAPD Fingerprints (Kap. 2.2.7) zur Identifizierung verarbeiteter und unverarbeiteter pflanzlicher Stoffe wurde beispielhaft mit den in Kap. 2.2.7.2 aufgeführten Primern überprüft. In ersten Versuchen wurden zunächst die Bandenmuster verschiedener Asteraceen- bzw. Aristolochiaceen-Proben (Proben 001 – 015) erfasst. Die Abb. 3.04 und 3.05 zeigen exemplarisch die erhaltenen Bandenmuster.

Abb. 3.04:

Gelelektrophoretisch aufgetrennte RAPD-Amplifikate unterschiedlicher Primer

Matricariae flos [Probe 012] mit:

Roth-M02 (Spur 1); Roth-A04 (Spur 2);

Roth-C19 (Spur 3)

GS: Größenstandard

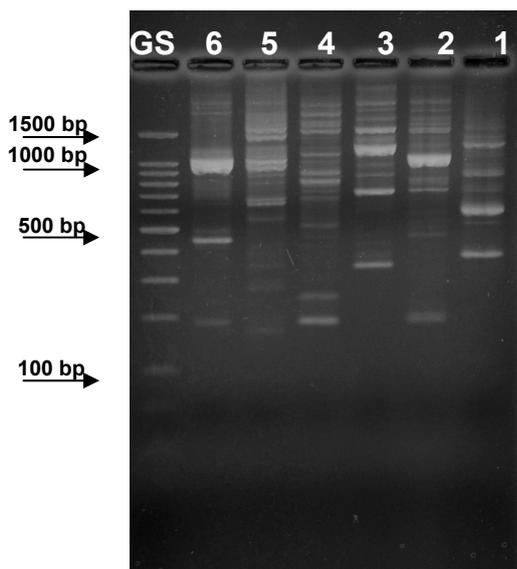
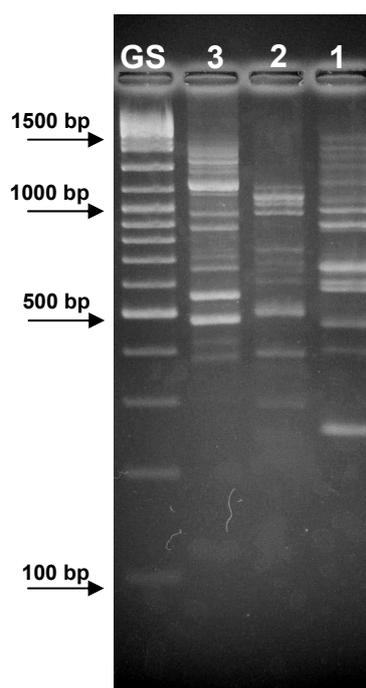


Abb. 3.05:

Gelelektrophoretisch aufgetrennte RAPD-Amplifikate unterschiedlicher Proben

Aristolochiaceen-Proben [Proben 010 – 005]:

A. clematits L. (Spur 1); *A. triangularis* Cham.

(Spur 2); *A. elegans* Mast. (Spur 3); *A.*

westlandii Hemsl. (Spur 4); *A. tomentosa* Sims

(Spur 5); *A. ringens* Vahl QSB6 (Spur 6);

GS: Größenstandard;

Primer: Roth-M02

Die Proben der Belegpflanzen stammten aus dem Garten des Institutes für Pharmazeutische Biologie Bonn. Zu Beginn der Versuche wurden unter den dort verfügbaren Kulturen die Stammpflanzen der Stoffe *Matricariae flos* [*Matricaria recutita* L.], *Chamomillae romanae flos* [*Chamaemelum nobile* (L.) All.] und *Aristolochia clematidis* [*Aristolochia clematidis* L.] ausgewählt. Ebenfalls standen Kulturen von Pflanzen zur Verfügung, die als typische Verwechslungen/ Verfälschungen der offizinellen Stammpflanzen in Betracht kommen.

Die RAPD-Primer wurden zunächst an mehreren Kamillen sowie den Vergleichspflanzen des Institutsgartens getestet. Die kürzesten Fragmente wurden hierbei mit Hilfe des Primers Roth-M02 amplifiziert (siehe Abb. 3.04). Der Primer Roth-M02 wurde anschließend auch in den PCR der Aristolochiaceen-Proben eingesetzt. Deutlich sind in Abb. 3.05 die unterschiedlichen Bandenmuster von sechs verschiedenen Aristolochiaceen zu erkennen.

Weiterhin wurde versucht aus dem Eluat einer Zubereitung aus *Matricariae flos* (Probe 032) RAPD-Fragmente zu amplifizieren. Für diese Zubereitung, eine Tablette, die u. a. gepulvertes pflanzliches Material enthielt, wurden allerdings keine der für Kamille typischen Bandenmuster erhalten. Wie in Abb. 3.06 zu erkennen ist, deutet sich jedoch ein schwacher Bandenschmear unterhalb von 500 bp an.

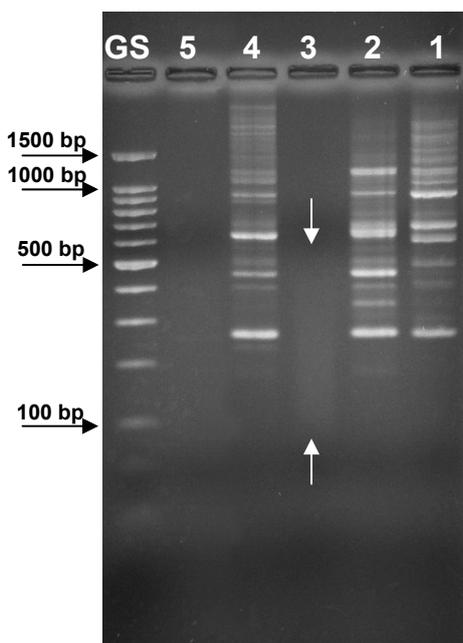


Abb. 3.06:
Gelelektrophoretische Auftrennung von RAPD-
Amplifikaten einer pflanzlichen Zubereitung

Kamille-Kräuter-Tablette (Spur 3 - Probe 032) und Referenzproben: *M. recutita* L. (Spur 1 - Probe 012); *M. recutita* L. (Spur 2 - Probe 013) und *M. recutita* L. (Spur 4: - Probe 019); Blank (Spur 5); GS: Größenstandard verwendeter Primer: Roth-M02

Der Bandenschmier in Spur 3 ist vermutlich auf fragmentierte DNA der Probe zurückzuführen. Möglicherweise enthielten die DNA-Fragmente aufgrund ihrer geringen Länge keine gegenläufigen Primerbindungsstellen.

Bei den RAPD-PCR wurde auch unter veränderten Reaktionsbedingungen (z. B. abweichenden Temperaturzyklen oder Pipettierschema) keine bessere Auflösung erreicht. Die Eignung des Eluates für die PCR wurde indessen in Positivkontrollen mit ITS-Primern bestätigt. Hier entstanden die entsprechenden Amplifikate.

Ein weiteres Problem bei der RAPD-PCR waren unterschiedliche Bandenmuster bei speziesgleichen Proben verschiedener Herkünften. Beispielhaft sind die Abweichungen in Abb. 3.06 (Spur 2 & 4) zu erkennen.

Mit wiederholt aufgetragenen Proben (vgl. Spur 1 in Abb. 3.04 und 3.06) wurden dagegen reproduzierbare Bandenmuster erhalten. Möglicher Weise sind die Unterschiede in den Bandenmustern auf geringfügige Variationen zwischen den Vertretern einer Art zurückzuführen.

Bewertung der RAPD-Fingerprintmethode:

Die in den Versuchen erstellten RAPD-Fingerprints waren grundsätzlich geeignet, um die untersuchten pflanzlichen Stoffe voneinander zu differenzieren. Je nach pflanzlichem Stoff wurden mit den Primern jedoch unterschiedlich geeignete Bandenmuster erzeugt. Bei einigen pflanzlichen Stoffen kam es durch intraspezifische Variationen darüber hinaus zu Unterschieden in den Bandenmustern.

Der Nutzen der Markermethode bei prozessierten Materialien mit fragmentierten DNA-Anteilen war weitaus geringer. Eine sichere Zuordnung des Ausgangsmaterials bei Fragmenten mit weniger als 500 bp Länge war hier aufgrund des geringen Anteils an Merkmalen (Anzahl der Banden) nur schwer möglich. Zudem ist die Methode empfindlich in Bezug auf Begleitsubstanzen (z. B. Hilfsstoffe aus den zubereiteten pflanzlichen Stoffen), die bei der DNA-Isolierung nicht vollständig entfernt wurden. RAPD-Fingerprints sind von daher für die Identifizierung der Ausgangsmaterialien in zubereiteten pflanzlichen Stoffen und pflanzlichen Fertigarzneimitteln nicht geeignet.

3.2.2 Amplifikation und Analyse der nrITS-Region

3.2.2.1 Amplifikation mit ITS-Standardprimern

Die von White et al. [51] publizierten ITS-Primer (Kap. 2.1.2, Tab. 2.01a) wurden an den DNA-Eluaten von 50 einheimischen pflanzlichen Stoffen (Kap. 3.3.1, Tab. 3.06) getestet. Ziel der Versuche war es die komplette nrITS-Region (Kap. 1.4.3, Abb. 1.06), mittels der beiden Primerkombinationen ITS-1 / ITS4 und ITS-5 / ITS-4, aus der gesamtgenomisch vorliegenden DNA eines jeden Eluats zu amplifizieren.

Da die DNA in den Eluaten aus weitgehend intakten bzw. grob geschnittenen Probenmaterialien isoliert wurde, war in den Versuchen von ausreichend großen DNA-Fragmenten (<1000 bp) auszugehen (Kap. 3.11). Überdies war der mit Hilfe der beiden Primerkombinationen theoretisch amplifizierte Bereich (die erwarteten Fragmentlängen lagen zwischen 600 - 800 bp) kurz genug, um in nur einem einzigen Sequenzierlauf vollständig erfasst (Kap. 3.2.2.2) werden zu können. Auf Versuche die Spacerbereiche ITS1 und ITS2 einzeln zu amplifizieren wurde verzichtet, wodurch sich der gesamte Probenumfang deutlich reduzierte.

Bei den PCR Ansätzen mit der Primerkombination ITS-5 / ITS-4 wurden nur sehr wenige Amplifikate gebildet. Mit der Primerkombination ITS-1 / ITS-4 wurden in etwa 2/3 der Versuchsansätze PCR-Produkte mit jeweils nur einer distinkten Gelbande im erwarteten Fragmentgrößenbereich (s.o.) erhalten. Dies wurde als Hinweis für die erfolgreich verlaufene Amplifikation der nrITS-Region gewertet. Bei den restlichen PCR-Ansätzen waren entweder mehrere sehr schwache oder gar keine Banden zu erkennen. Die letzteren Resultate sind sehr wahrscheinlich auf nicht vollständig komplementäre Primerbindungsstellen oder auf divergente Kopien der nrRNA-Cluster [43] im Genom der jeweiligen Spezies zurückzuführen (Abb. 3.07). Derartige Proben wurden nicht weiter verfolgt, da diese eine zeitaufwändige Aufarbeitung (z. B. durch Klonierungen) bedingt hätten, auf die aber bewusst verzichtet werden sollte. Aufgereinigt wurden daher nur die PCR-Ansätze mit distinkt nachgewiesenen Gelbanden. Von diesen wiederum wurden bei etwa 60% „verwertbare Ergebnisse“ (d. h. eindeutige, nicht überlagerte Signale) bei der Direktsequenzierung erhalten.

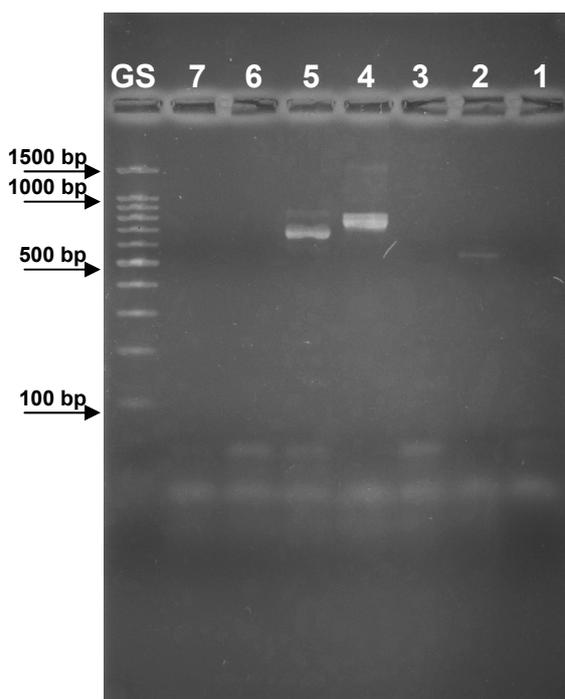


Abb. 3.07:
Gelelektrophoretische Auftrennung von
ITS-Amplifikaten (Standard-Primer)

Verschiedene Arten aus der Familie der
 Aristolochiaceae

Mit der Primerkombination ITS-1 / ITS-4 (\triangleq Ker001-F / Ker002-R; Kap. 2.1.2, Tab. 2.01b) wurden bei etwa 40% der untersuchten Proben auswertbare ITS-Sequenzen erhalten. Die Sequenzen wurden über BLAST-Analysen mit den Einträgen von Gen-Bank verglichen. Hierbei wurden durchgängig hohe Sequenzübereinstimmungen (>99%) mit pflanzlichen Organismen ermittelt. Hinweise auf Pilze, die ubiquitär verbreitet sind und daher auf allen pflanzlichen Stoffen vorkommen können (insbesondere Wurzelmaterialien sind häufig belastet [63]), bestanden nicht.

Prinzipiell wurde der Nachweis von amplifizierter bzw. co-amplifizierter pilzlicher DNA bei zumindest einem Teil der Eluate erwartet [64], da die ITS-Primer nach White et al. ursprünglich für Studien fungaler RNA-Gen-Sequenzen konzipiert worden waren. Die Primer sind aufgrund konservierter Bindungsstellen im Genom anderer Eukaryoten allerdings auch bei weiten Teilen der Pflanzen einsetzbar [65].

Das in den PCR dennoch nur pflanzliche Zielbereiche amplifiziert wurden ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Primer tatsächlich bevorzugt an die im Überangebot vorhandene DNA binden [66]. Unter dieser Annahme würde die Amplifikation von fungalen Produkten erst bei einem weitaus höheren Anteil fungaler DNA im Eluat erfolgen. Dies wäre potentiell z. B. bei stark pilz-befallenen, mikrobiologisch nicht mehr Arzneibuch-konformen Proben der Fall.

Zusammenfassend wird die Eignung der universellen ITS-Primer nach White et al. [51] als nicht hinlänglich für die Identifizierung von pharmazeutisch genutzten pflanzlichen Stoffen angesehen. Verlässliche Rückschlüsse aus dem Abgleich der Proben mit den Referenzdaten der jeweils betreffenden Stammpflanzen sind aufgrund der mit diesen Primern zu erwartenden Erfolgsquoten nicht möglich. Es wurde daher versucht effektivere, möglichst pflanzenspezifische Primer zu ermitteln.

3.2.2.2 Ermittlung neuer ITS-Primer

Zur Ermittlung neuer Primersequenzen wurden pflanzliche Sequenzen in GenBank mittels BLAST-Abfragen nach den RNA-Genen der nrITS-Region durchsucht. Unter den Treffern der Suche wurden je etwa 150 verschiedene Datensätze ausgewählt und auf das Vorhandensein von konservierten Bereichen untersucht. Ausgehend von den konservierten Bereichen wurden letztlich mehrere sehr nahe am Anfang bzw. Ende der Gene liegende Primerpaare abgeleitet. Das Ziel dieser Strategie war es möglichst kurze Fragmente zu amplifizieren, um einen Nachweis von Amplifikaten auch für Probenmaterialien mit degradierter DNA zu erbringen.

Im Hinblick auf potentiell falsch interpretierte Basen in den Sequenzen der BLAST-Abfragen (die in Genbank hinterlegten Daten werden vor ihrer Veröffentlichung nur sehr eingeschränkt überprüft [67]) wurden die in den Vergleichen berücksichtigten Datensätze vorselektiert. Das Kriterium für die Auswahl war eine Zahl von noch mindestens 50 über die beiden Enden der jeweiligen Gene hinausgehenden Basen. Hierdurch sollte die Fehlerwahrscheinlichkeit minimiert werden, die typischerweise zu Beginn (im 5'-Bereich) bzw. am Ende (im 3'-Bereich) einer Sequenz erhöht ist.

Fehler im 5'-Bereich einer Sequenz sind hauptsächlich auf zu kurze Fragmente (<30 bp) zurückzuführen, da diese im Sequenzierautomaten nicht geordnet migrieren. Die ersten Basen in Sequenzen sind daher fast immer unscharf, d. h. vieldeutig aufgelöst. Fehler im 3'-Bereich von Sequenzen treten dagegen häufig bei längeren Fragmenten (> 550 bp) auf. Sie sind vor allem darauf zurückzuführen, dass die amplifizierten Fragmente mengenmäßig in nur noch geringer Anzahl und mit zunehmend immer geringer werdenden relativen Massenunterschieden vorhanden sind.

Die nach den BLAST-Abfragen selektierten Sequenzen wurden mit Hilfe der in Kap. 2.2.13 beschriebenen Software miteinander auf konservierte Bereiche untersucht. Anschließend wurden die neuen Primer abgeleitet.

Aus dem Vergleich (Alignment) der Sequenzen resultierte im 3'-Bereich des 18S-rRNA-Gens ein ca. 70 bp langer und recht gut konservierter Abschnitt (Abb. 3.08 – grau unterlegt). Innerhalb dieses Abschnittes sind auch weitere bereits beschriebene Amplifikationsprimer, z.B. "ITS-5" [51], "ITS-A" [53], und "N18L18" [68] lokalisiert. Ausgehend von diesem Genabschnitt wurden die neuen Primer Ker005-F und Ker010-F (Kap. 2.1.2, Tab. 2.01a) abgeleitet und verwendet.

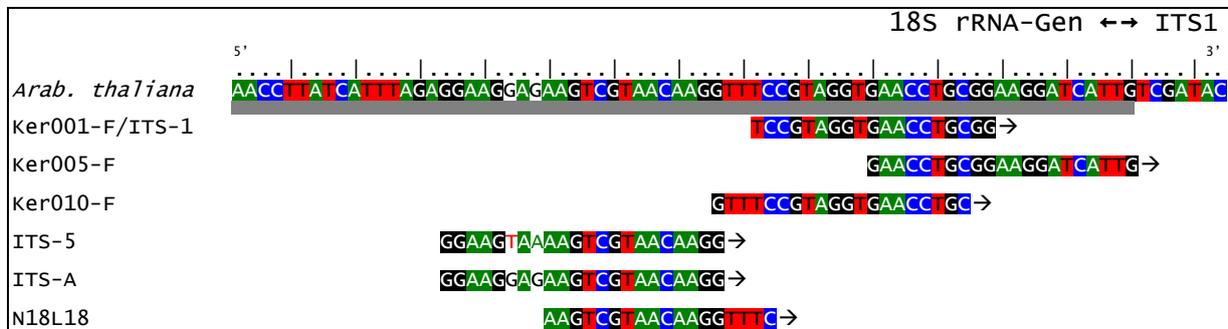


Abb. 3.08: ITS-Primer im 3'-Bereich des 18S-rRNA-Gens

Lage der Primer relativ zur Referenz-Genomsequenz von: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
[GenBank-Accession-Code CP002686; Basen-Position: 14.199.415 – 14.199.491]

In den Alignments der 5.8S-rRNA-Gensequenzen wurden keine größeren konservierten Abschnitte beobachtet. Es gab jedoch mehrere kleinere konservierte Bereiche in der Nähe des 5'-Endes des Genes. Dort wurde schließlich der Vorwärtsprimer Ker007-F platziert (Abb. 3.09). Nahe der Primerbindungsstelle wurden zudem weitere, bereits beschriebene Primersequenzen wie ITS-2/ITS-3 [51], ITS-D [53] und ITS-E [53] lokalisiert.

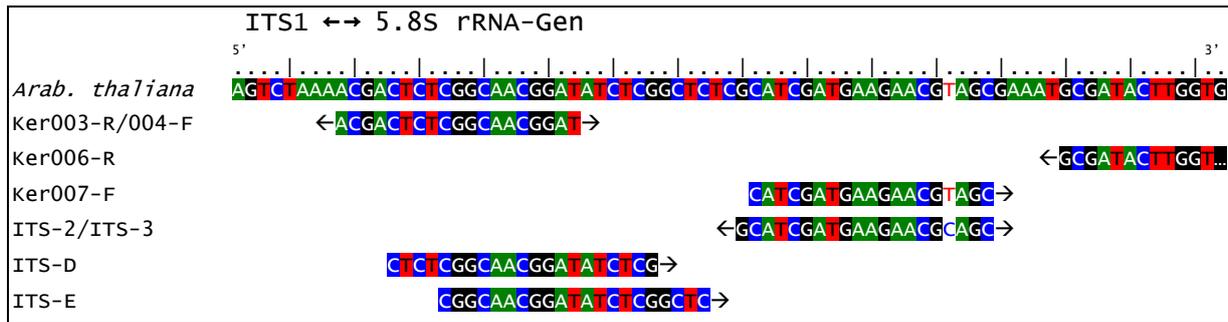


Abb. 3.09: ITS-Primer im 5'-Bereichs des 5.8S-rRNA-Gens

Lage der Primer relativ zur Referenz-Genomsequenz von: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
 [GenBank-Accession-Code CP002686; Basen-Position: 14.199.748 - 14.199.824]

Die in den Alignments der 26S-rRNA-Gensequenzen beobachteten konservierten Bereiche waren sehr heterogen über das Gen verteilt. Die ersten potentiell geeigneten konservierten Abschnitte sind mindestens 300 bp vom 3'-Ende des 26S-rRNA-Gens entfernt. Ausgehend von hier platzierten Primern sind allein für die Amplifikation des ITS2-Spacers Fragmentlängen von mindestens 600 bp zu erwarten. Dies erschien für die Auswahl einer ebenfalls für die Amplifikation von degradierter DNA geeigneten Primerkombination nicht sinnvoll. Zudem wäre die Sequenzierung eines Fragments, das beide Internal Transcribed Spacer umfasst, aufgrund seiner Länge kaum mit einem einzigen Primerpaar zu bewältigen. Als Kompromiss wurde insofern das 5'-Ende des 26S-rRNA-Gens für die Ableitung der Primer ausgewählt.

Der Anfangsbereich des 26S-rRNA-Gens ist allerdings auch keine optimale Region für die Ableitung von Primern. Das 5'-Ende des Gens besitzt einen recht hohen Gehalt der Nukleinbasen Guanin und Cytosin. Die resultierenden Primer weisen infolgedessen hohe Schmelztemperaturen auf. Eine Kombination mit den oft schon bei niedrigeren Temperaturen schmelzenden Primern der Bereiche der 18S und 5.8S rRNA-Gene ist sehr schwierig. Außerdem scheint das 5'-Ende des 26S-rRNA-Gens weit weniger gut konserviert zu sein als die entsprechenden Primerbindungsbereiche in den beiden anderen Genen.

In Abb. 3.10 sind die Positionen der neuen Primer Ker009-R und Ker012-R sowie zweier in der Literatur beschriebener Primersequenzen wie "ITS-B" [53] oder "N-nc26S1" [69] dargestellt.

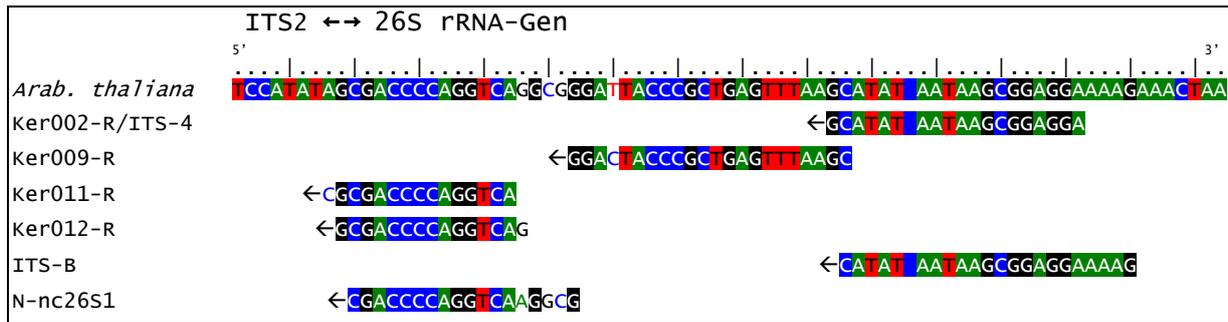


Abb. 3.10: ITS-Primer im 5'-Bereich des 26S-rRNA-Gens

Lage der Primer relativ zur Referenz-Genomsequenz von: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

[GenBank-Accession-Code CP002686; Basen-Position: 14.200.097 - 14.200.173]

3.2.2.3 Amplifikationen mit neuen ITS-Primern

Die Primer Ker003-R bis Ker012-R (Kap. 2.1.2, Tab. 2.01b) wurden zusammen mit den DNA-Eluaten der 50 pflanzlichen Stoffe (Kap. 3.3.1, Tab. 3.06) in mehr als 1500 einzeln pipettierten PCR-Ansätzen untersucht. Dabei wurden gegenüber den Versuchen mit den Primerkombinationen ITS1/ITS4 bzw. ITS5/ITS4 nach White et al. [51] verbesserte Ergebnisse erzielt.

Mit den neuen/ alternativen Primern wurden bei 34 der 50 Proben einzelne und distinkte Gelbanden im erwarteten Fragmentgrößenbereich (etwa 600 - 750 bp) erhalten. Für 31 der Proben lagen nach der Sequenzierung auswertbare ITS-Sequenzen vor. Damit konnten etwa 60% der überprüften pflanzlichen Stoffe anhand ihrer ITS-Sequenzen identifiziert werden. Dies entspricht einer etwa anderthalbmal höheren PCR-Effizienz als bei den Versuchen mit beiden White Primerpaaren (Kap. 3.2.2.1). Auch in der Literatur, z. B. in den ITS-Studien von Chen et al. [31] und Gonzalez et al. [70] wurden nicht mehr als durchschnittlich 41 - 42% der Proben identifiziert. Für eine separate Gruppe von Proben (Magnoliopsida - Bedecktsamer), zu der auch fast alle der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben gehören, wird von Chen et al. zwar eine PCR-Effizienz von etwa 48% angegeben. Dieser Wert liegt aber dennoch deutlich unter dem mit den alternativen Primerkombinationen erzielten Ergebnis.

Die mit den neuen Primern ermittelten Sequenzen wurden ebenso wie bei den Versuchen mit den Primern nach White et al. (Kap. 3.2.2.1) mittels BLAST-Suche auf ihren möglichen Ursprung aus Pilzen untersucht. Entsprechende Übereinstimmungen wurden dabei nicht gefunden.

Die in den PCR-Versuchen eingesetzten Primerpaare sind in Tabelle 3.01 aufgeführt.

Tabelle 3.01: Neue Primer-Kombinationen zur Amplifikation von nrITS-Fragmenten

Zu amplifizierendes Fragment	Primerkombination
nrITS-Region	Ker005-F – Ker009-R
	Ker010-F – Ker011-R
	Ker010-F – Ker012-R
ITS1	Ker005-F – Ker003-R
	Ker005-F – Ker006-R
	Ker010-F – Ker003-R
	Ker010-F – Ker006-R
ITS2	Ker004-F – Ker009-R
	Ker004-F – Ker012-R
	Ker007-F – Ker009-R
	Ker007-F – Ker011-R

3.2.3 Eignung der PCR-Methode

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte PCR-Methode wurde eingangs dahingehend optimiert, die komplette nrITS-Region als Marker zu amplifizieren. Primer zur spezifischen Amplifikation der einzelnen Spacer (ITS1 / ITS2) wurden erst später abgeleitet. Als Basis für die Ableitung der neuen Primer dienten die im Kap. 3.2.2.2 beschriebenen Sequenzmotive der flankierenden bzw. eingeschlossenen rRNA-Gene. Keines dieser Primerpaare war jedoch dazu geeignet mit sämtlichen der getesteten Proben (Kap. 3.3) spezifische Amplifikate zu bilden. Auch die in der Tab. 3.01 (Kap. 3.2.2.3) genannten Kombinationen von Primern wurden nur bei einer Teilmenge (wenn gleich auch dem Großteil) der Proben erfolgreich eingesetzt. Der absolute Verlauf einer PCR war insbesondere für die zuvor noch nicht untersuchten Proben nicht vorherzubestimmen.

Um dennoch grundlegende Aussagen zur Eignung der Methode treffen zu können, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Als Modellobjekt wurde hierzu exemplarisch *Matricariae flos* ausgewählt. Zu diesem pflanzlichen Stoff waren einerseits mehrere Verfälschungen / Verwechslungen (Kap. 3.3.1) verfügbar, andererseits war durch vorausgehende Versuche bekannt, dass sich alle betreffenden Proben gut amplifizieren und sequenzieren lassen.

3.2.3.1 Präzision der Methode

Zur Beurteilung der Präzision der Methode wurden zunächst zwei exemplarische PCR-Versuchsreihen an Proben von *Matricariae flos* (Stammpflanze: *Matricaria recutita* L.) durchgeführt (Abb. 3.11).

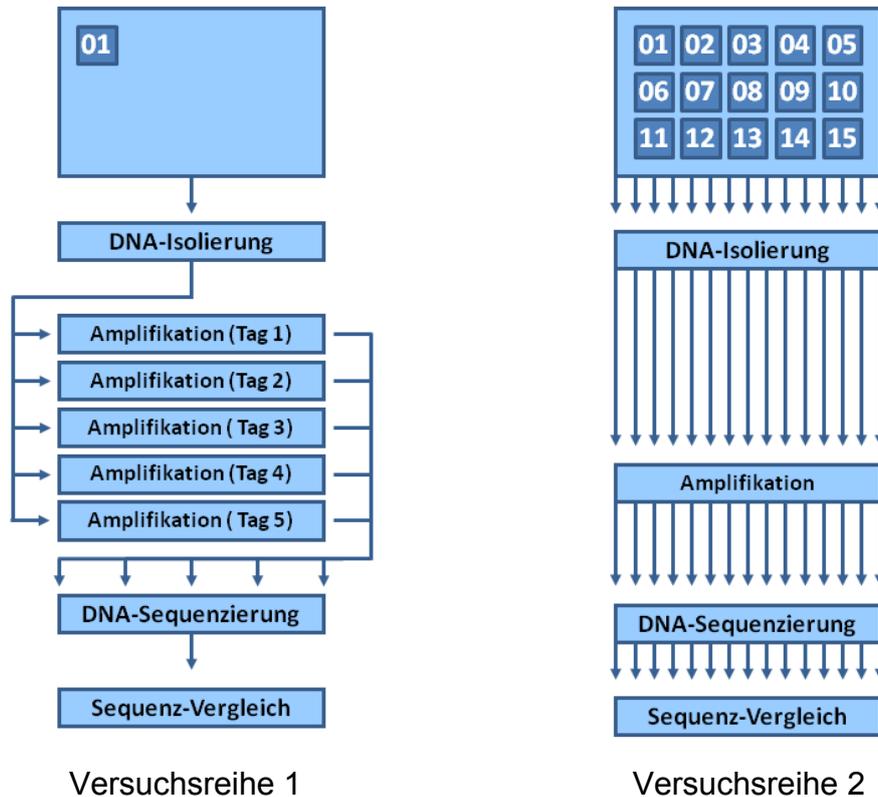


Abb. 3.11: Versuche zur Wiederholpräzision der PCR-Methode

Versuchsreihe 1: Amplifikation eines Templates an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Versuchsreihe 2: Parallele Amplifikation von 15 verschiedenen Templates

Die erste Versuchsreihe verlief über fünf aufeinanderfolgende Tage. An jedem Tag wurde eine PCR mit jeweils dem gleichen Template (ein zuvor willkürlich bestimmtes Eluat) durchgeführt. In der zweiten Versuchsreihe wurden die Reaktionen parallel mit den Eluaten von 15 Proben aus unterschiedlichen Herkünften gestartet.

Als Markerregion wurde in allen Ansätzen die nrITS-Region amplifiziert. Hierzu wurde die Primerkombination Ker005-F / Ker009-R verwendet. Sie hatte sich in den Vorversuchen als besonders zuverlässig bei *Matricariae flos* bewährt.

In sämtlichen PCRs wurden distinkte Amplifikate erhalten.

Bei der Sequenzauswertung der Amplifikate aus der ersten Versuchsreihe wurden hinsichtlich der Abfolge oder Anzahl der Nukleotide keinerlei Abweichungen festgestellt. Die Markerregion wurde in allen Versuchswiederholungen gleich amplifiziert. Demgegenüber unterschieden sich die Sequenzen der Amplifikate der zweiten Versuchsreihe an mehreren Positionen (Abb. 3.12). Bei den Unterschieden handelte es sich um Substitutionen und/oder Insertionen einzelner Basen. Diese betrafen grundsätzlich beide Spacer, allerdings traten sie mit etwas größerer Häufung im ITS2 auf. Im Bereich des 5.8S rRNA-Gens wurden keine variablen Positionen beobachtet.

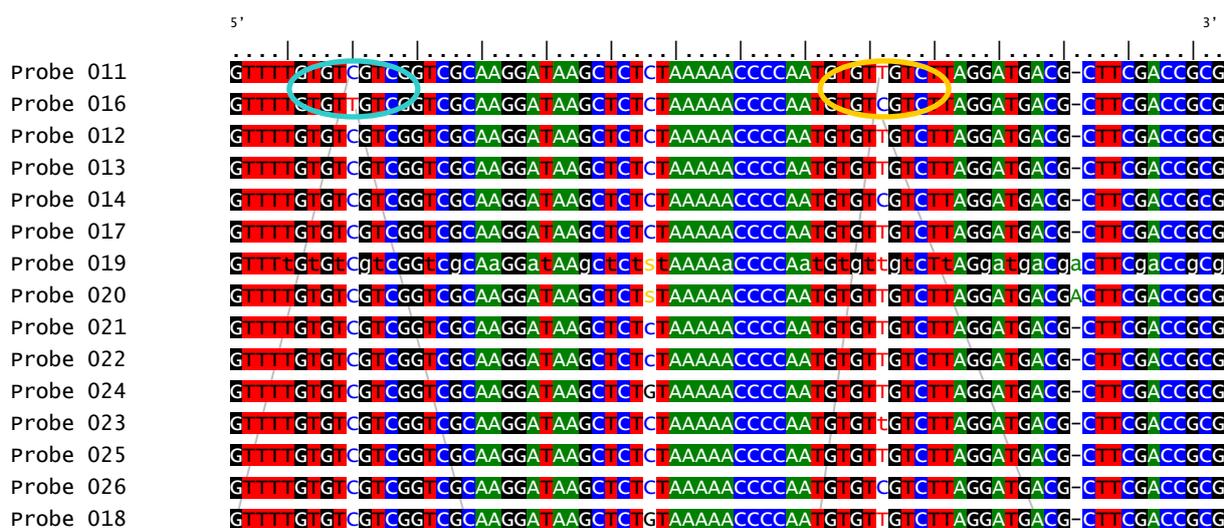


Abb. 3.12: intraspezifische Unterschiede im ITS2-Bereich verschiedener Proben von *M. recutita* L.

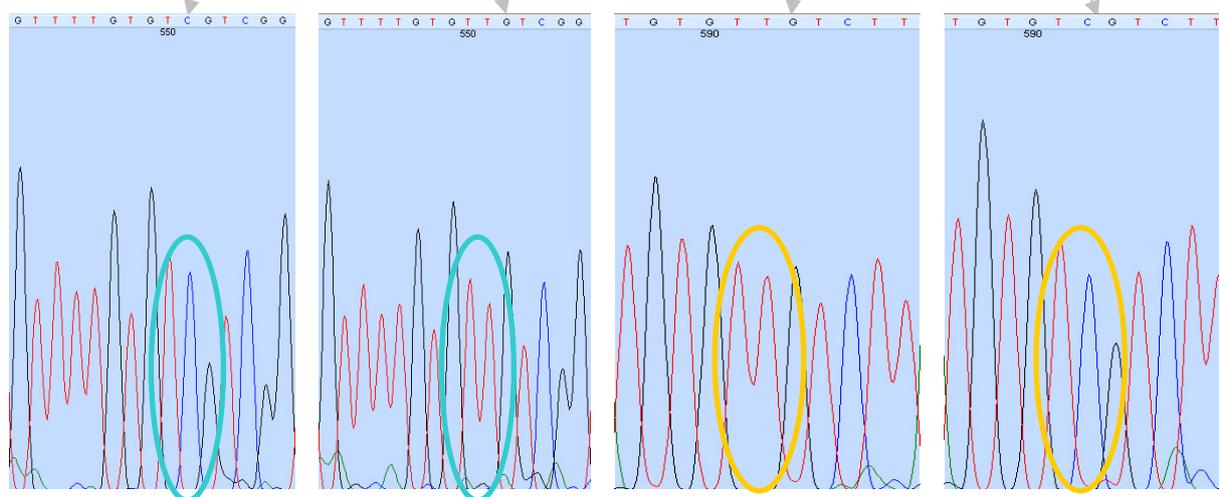


Abb. 3.13: Elektropherogramme der Proben 011 und 016 (siehe Abb. 3.12)

Die Signal-Peaks der Amplifikate von *Matricaria recutita* sind in den Elektropherogrammen deutlich ausgeprägt und gut voneinander zu unterscheiden (Abb. 3.13). Die Basislinie verläuft stabil und das Rauschen ist sehr gering. Weiterhin sind die hervorgehobenen Nukleotidpositionen mehr als 50 bp von den 3'- bzw. 5'-Enden der sequenzierten Fragmente entfernt. Plausible Anhaltspunkte dafür, dass die beobachteten Nukleotidunterschiede auf technische Unschärfen (Kap. 3.2.2.2) bei der Sequenzierung zurückzuführen sind bestehen insofern nicht. Die Substitutionen bzw. Insertionen sind stattdessen sehr viel eher auf intraspezifische Variationen der Proben des pflanzlichen Stoffes selbst zurückzuführen.

Unterstellt man das Vorhandensein von intraspezifischen Variationen auch in anderen pflanzlichen Stoffen bedeutet dies, dass die häufig nur anhand einer einzelnen Probe ermittelten Sequenzen nicht allein für die jeweilige Art maßgeblich sein müssen. Konsolidierte Sequenzdaten mehrerer Proben je Art sind in Datensammlungen wie GenBank, EMBL-Bank oder DDBJ jedoch kaum verfügbar. Die Notwendigkeit einer validen Datensammlung wird aufgrund dieser Einschränkung noch einmal verdeutlicht.

Intraspezifische Variabilitäten bedeuten aus einer anderen Blickrichtung natürlich auch, dass eine Hundert-Komma-Null prozentige Übereinstimmung mit der Referenzsequenz zum Beleg der Identität nicht erforderlich ist. Eine pauschale Definition bis zu welchem Prozentsatz zwei Sequenzen als identisch gelten, gibt es dabei jedoch nicht. Dies hängt nicht zuletzt von verschiedenen Faktoren (z. B. dem grundsätzlichen Auftreten von divergenten Markerbereichen innerhalb einer Arten-Gruppe) ab. In dieser Konsequenz ist die Bestimmung der Identität einer Probe über einen Sequenzabgleich umso unzuverlässiger, je kleiner die zur Verfügung stehenden amplifizierten Fragmente – also die Informationseinheiten – sind. Prozessierte pflanzliche Stoffe mit stark fragmentierter DNA, für die nur noch ein Teil des ursprünglichen Markerbereich vervielfältigt werden kann, können somit nicht im selben Maße zuverlässig identifiziert werden, als dies noch mit intakten Ausgangsmaterialien möglich ist.

Weitere Daten zur Reproduzierbarkeit der Methode wurden im Rahmen eines labor-internen Vergleiches erhoben. Hierzu wurden durch zwei Mitarbeiter die Sequenzen von verschiedenen pflanzlichen Stoffen (Proben 076-078) aus der Traditionellen Chinesischen Medizin ermittelt.

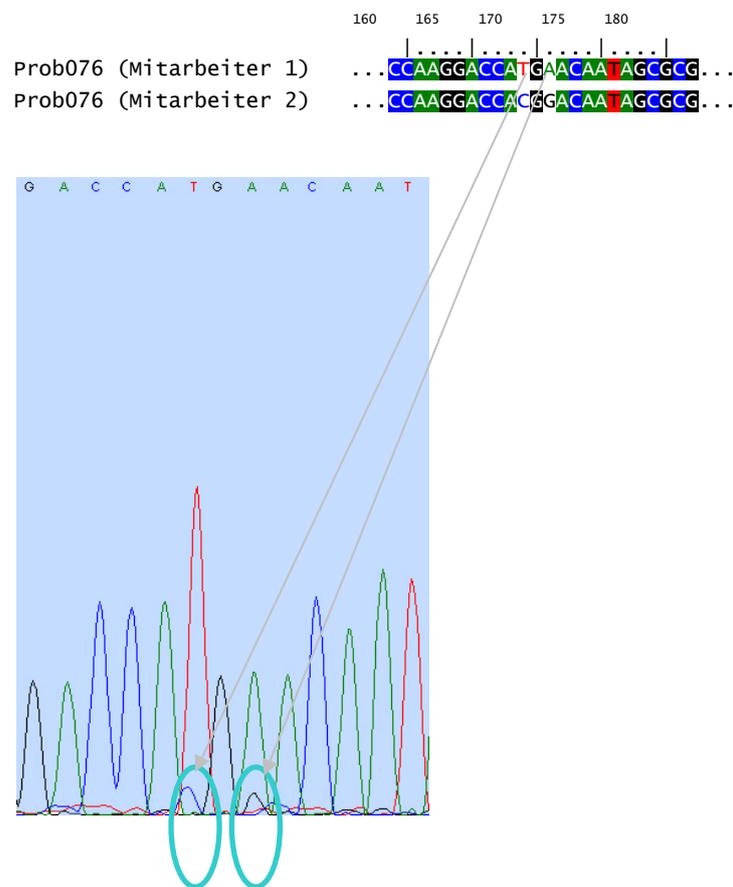


Abb. 3.14: Unterschiedlich interpretierte Nukleotid-Abfolgen im laborinternen Vergleich

Beim Vergleich der Sequenzen beider Mitarbeiter waren nur wenige Abweichungen zu erkennen. So unterscheiden sich die Sequenzen der Probe 076 in vier, die der Probe 078 in drei Nukleotidpositionen. Die Sequenzen der Probe 077 sind miteinander identisch.

Bei einer genaueren Betrachtung der Sequenzen der Probe 076 waren bei den vier variablen Nukleotidpositionen schwache Doppelsignale festzustellen (Abb. 3.14). Die Nukleotide wurden bei der automatischen und/oder manuellen Auswertung der elektrophoretischen Daten offensichtlich unterschiedlich interpretiert.

Die unterschiedlichen Sequenzen von Probe 078 sind auf Varianzen in den Endbereichen der Amplifikate zurückzuführen. Diese sind sehr wahrscheinlich methodisch bedingt und eine Folge der höheren Fehlerwahrscheinlichkeit in diesem Abschnitt der Amplifikate (Kap. 3.2.2.2). Mit letzter Sicherheit können allerdings auch mögliche Fehlpaarungen der Primer nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt betrachtet lassen sich die in den Vergleichen ermittelten Unterschiede am ehesten auf allgemein methodisch bedingte Probleme bei der Sequenzierung bzw. auf natürlich auftretende, genomische Differenzen zwischen den Proben zurückführen. Derartigen Faktoren, d. h. dem erhöhten Fehlerrisiko bei der Sequenzbestimmung in den Anfangs- und Endbereichen der Amplifikate bzw. den intraspezifischen Variationen und/oder divergenten Genclustern kann allerdings nur eingeschränkt begegnet werden. Grundlegend sind möglichst standardisierte Nachkontrollen der Sequenzdaten.

3.2.3.2 Spezifität der Primer

Daten zur Spezifität der in Kap. 3.2.2.3 aufgeführten Primer wurden retrospektiv anhand von BLAST-Suchen (MegaBLAST-Suchen) in GenBank ermittelt.

Es wurden dazu für jeden der Primer etwa 7000 Treffer (Sequenzübereinstimmungen in GenBank; ohne Eingrenzungen hinsichtlich der den Suchen zugrundeliegenden Nukleotid-Datenbank) in ein taxonomisches Übersichts-Format (Tax BLAST-Reporte) konvertiert. Die Tax BLAST-Reporte wurden anschließend ausgewertet. Basierend auf den taxonomischen Zuordnungen wurde das Verhältnis der Treffer unter den Organismen der Gruppe der *Viridiplantae* (Landpflanzen und Grünalgen) zur Anzahl der Treffer unter den eukaryotischen Organismen insgesamt bestimmt. Die jeweiligen Verhältnisse – d. h. die Wiederfindung der Primer-Motive in pflanzlichen Organismen – wurden letztlich als theoretisches Maß für die Disposition der Primer hauptsächlich pflanzliche Reaktionsprodukte zu bilden interpretiert (Tab. 3.02).

Tabelle 3.02: Wiederfindungen der neuen ITS-Primer in pflanzlicher DNA

Primer	Wiederfindung [absolut]				Wiederfindung [%]
	Eukaryoten (Organismen / Gesamttreffer)		davon Viridiplantae (Organismen / Gesamttreffer)		
Ker003-R	4035	(7324)	4031	(7316)	> 99,9
Ker004-F	4035	(7324)	4031	(7316)	> 99,9
Ker005-F	3494	(7156)	3448	(6969)	> 98,6
Ker006-R	3802	(7222)	3800	(7220)	> 99,9
Ker007-F	2637	(7226)	2563	(4613)	> 97,1
Ker009-R	3875	(7215)	3869	(7193)	> 99,8
Ker010-F	1847	(7065)	860	(1528)	> 46,5
Ker011-R	3401	(7157)	3396	(7150)	> 99,8
Ker012-R	3737	(7176)	3732	(7164)	> 99,8

Mit Blick auf die Auswahl an Daten, die den in Tab. 3.01 (Kap. 3.2.2.3) genannten Primern bei ihrer Ableitung zugrunde lagen, fallen die ermittelten Sequenz-Wiederfindungen (Tab. 3.02) in der Gruppe der pflanzlichen Organismen erwartungsgemäß hoch aus. Einzig für den Primer Ker010-F ist die Wiederfindung mit etwa 46,5% verhältnismäßig niedrig. Hier deutet eine Anzahl von Treffern in den Gruppen der *Fungi* (Pilze) ca. 41,1% oder *Metazoa* (vielzellige Tiere) ca. 5,4% darauf hin, dass der DNA-Bereich an dem dieser Primer bindet, offensichtlich auch in Organismen anderer eukaryotischer Gruppen relevant konserviert ist.

Ähnliche Wiederfindungen in mehreren eukaryotischen Gruppen wurden in späteren Analysen allerdings auch für die strangabwärts gelegenen Primer („ITS5“, „ITS-A“ oder N18L18; Tab. 3.03) ermittelt. Demnach sind die Möglichkeiten einen pflanzen-spezifischen Primer im als konserviert betrachteten Bereich des 18S nrRNA-Gens (Kap. 3.2.2.2) zu platzieren sehr limitiert.

Bei einem allgemeinen BLAST-Abgleich des weiter strangaufwärts bindenden Primers Ker005-F lag die Wiederfindung in den Organismen der Gruppe der *Viridiplantae* dennoch bei über 98,6% (Tab. 3.02). Damit dürfte es sich zumindest beim 3'-Ende des im Kap. 3.2.2.2 beschriebenen Sequenzmotives um eine für Pflanzen maßgeblich spezifische Region handeln.

Tabelle 3.03: Wiederfindungen literarisch beschriebener ITS-Primer in pflanzlicher DNA

Primer	Sequenzwiederfindung				Wiederfindung [%]
	Eukaryoten (Organismen / Gesamttreffer)		davon Viridiplantae (Organismen / Gesamttreffer)		
ITS1	2173	(7155)	947	(1620)	> 43,6
ITS2	3482	(7443)	395	(558)	> 11,3
ITS3	3482	(7443)	395	(558)	> 11,3
ITS4	2719	(7244)	764	(1279)	> 28,1
ITS5	2002	(7204)	85	(127)	> 4,2
ITS-A	1576	(7133)	1188	(2671)	>75,4
N18L18	1656	(7072)	632	(1214)	>38,1

Trotz der im BLAST-Abgleich (Tab. 3.02) ermittelten geringen Wiederfindung in der Gruppe der *Viridiplantae* wurden mit dem Primer Ker010-F keine nicht-pflanzlichen Amplifikate erhalten. Möglicherweise steht dies mit der offensichtlich hohen Affinität der in Kombination genutzten Primer Ker011-R und Ker012-R gegenüber pflanzlicher DNA im Zusammenhang. Es ist z. B. denkbar, dass eine Amplifikation nicht-pflanzlicher DNA eventuell infolge nicht komplementärer Basenpositionen bei den Rückwärtsprimern nicht möglich war. Andererseits stammten die untersuchten Probenmaterialien aus verlässlichen Herkünften, so dass eine Trocknung und Lagerung unter geeigneten d. h. mikrobiologischem Wachstum nicht förderlichen Bedingungen unterstellt werden kann. In keiner der Proben war ein sichtbarer Pilzbefall zu erkennen. Fungale DNA-Gehalte im Eluat dürften demnach kaum in relevanter Konkurrenz zur pflanzlichen DNA gestanden haben (Kap. 3.2.2.1).

Die Wiederfindungen der BLAST-Abgleiche müssen allerdings auch im Bezug auf die bei der Suche mit eingeschlossenen Organismen (mit und ohne Eingrenzung innerhalb der Nukleotid-Datenbank in GenBank) betrachtet werden. Prinzipiell kann anhand der taxonomischen Zuordnung bzw. Verteilung der Treffer auf eine Tendenz hinsichtlich des Vorkommens eines Sequenzmotives (Primer) in einer bzw. mehreren Gruppen von Organismen geschlossen werden. Eine verlässliche Aussage über die tatsächliche Eignung des Primers innerhalb einer dieser Gruppen erlauben diese Tendenzen allerdings nicht. So werden bei einer BLAST-Suche, die exemplarisch mit den Primern Ker005-F und Ker010-F sowie beschränkt auf die Nukleotid-Daten der *Viridiplantae* durchgeführt wird, sehr ähnliche Trefferzahlen erhalten (Tab. 3.04). Dieses Ergebnis stimmt auch mit den empirisch ermittelten Resultaten der beiden Primer in den durchgeführten Versuchen überein. Dennoch war keiner der Primer in allen getesteten pflanzlichen Stoffen einsetzbar (Kap. 3.2.2.3). Die Sequenzstruktur im Markerbereich ist offensichtlich nicht konserviert genug.

Tabelle 3.04: Exemplarische BLAST-Resultate Nukleotid-Datenbank der *Viridiplantae*

Primer	Sequenzwiederfindung	
	Viridiplantae (Organismen / Gesamttreffer)	
Ker010-F	3554	(7142)
Ker005-F	3492	(7175)

3.2.3.3 Robustheit der Methode

Der Einfluss variabler Versuchsbedingungen auf die Ergebnisse der PCR-Methode wurde mit besonderem Hinblick auf die Anlagerungstemperaturen der Primer untersucht. In Abb. 3.15 sind beispielhaft die DNA-Banden einer Probe von *Matricaria flos* (Probe 023) zu erkennen. Die Anlagerungstemperaturen wurden hier während der Amplifikation der nrITS-Region zwischen 59 und 63°C variiert.

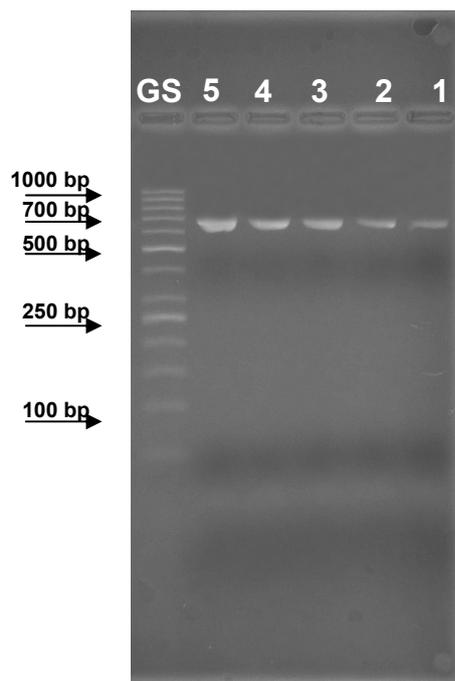


Abb. 3.15:
Einfluss verschiedener Primer-Anlagerungs-
temperaturen

Amplifikate der nrITS-Region *M. recutita* (Probe 023):

Spur1 - 59°C

Spur2 - 60°C

Spur3 - 61°C

Spur4 - 62°C

Spur5 - 63°C

GS: Größenstandard

verwendete Primer: Ker005-F / Ker009-R

Auffallend ist die unterschiedliche Intensität (Fluoreszenz) der Banden, die mit den Gehalten der Amplifikate korreliert.

Mit den Anlagerungstemperaturen von 59 bzw. 60°C wurden verglichen mit den Reaktionen mit entsprechend höheren Temperaturen geringere Mengen an Amplifikaten gebildet. Die Banden (Spur 1-2) sind vergleichsweise schwach ausgeprägt. Deutlich stärker ist dagegen die Fluoreszenzintensität der Bande in Spur 3 (61°C Primeranlagerungstemperatur). Eine weitere wesentliche Verstärkung der Fluoreszenzintensität ist in den Banden der PCR-Amplifikate mit Anlagerungstemperaturen von 62 bzw. 63°C (Spur 4-5) hingegen nicht zu erkennen.

Auch für die übrigen Primerkombinationen (Tab. 3.01, Kap. 3.2.2.3) wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet. Die Anlagerungstemperatur von 61°C sollte daher im Mittel um nicht mehr als ein Grad unter- bzw. überschritten werden um ausreichende Mengen an Amplifikaten zu gewährleisten.

Einen weiteren maßgeblichen Einfluß auf die Ergebnisse der PCR hatte das Alter der verwendeten Primerlösungen. Die Produktausbeuten mit den bei 4°C gelagerten Primerlösungen nahmen im Laufe der Zeit deutlich ab. Daher wurden die Primerlösungen maximal vier Wochen verwendet. Innerhalb dieses Zeitraumes wurden während der durchgeführten Versuche keine signifikanten Änderungen bei den Produktausbeuten beobachtet.

3.2.3.4 Sensitivität - Ermittlung der Nachweisgrenze

Zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze der PCR-Methode wurden exemplarisch Mischungen aus gepulvertem pflanzlichen Material (*Matricariae flos* - Probe 033) und Weizen- bzw. Maisstärke als Hilfsstoff untersucht. Das Pflanzenpulver wurde dazu mit jeweils beiden Stärketypen vermischt (Abb. 3.16).

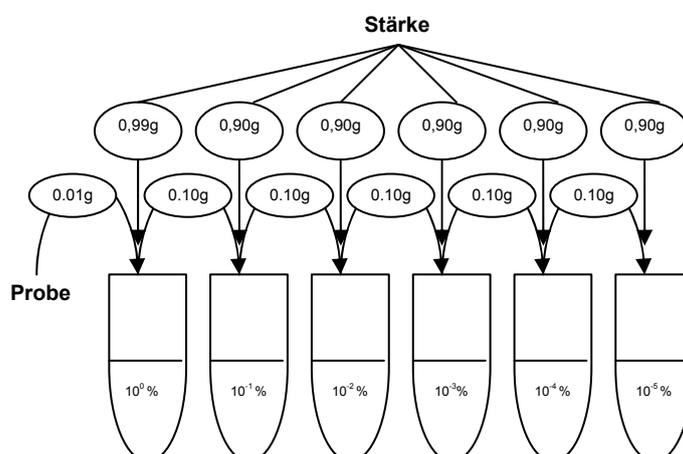


Abb. 3.16: Herstellung der Konzentrationsreihe

Anschließend wurde von jeder Mischung DNA isoliert und mit dieser ein Bereich des nrITS1 (theoretische Fragmentlänge ca. 220 bp) amplifiziert. Die Abb. 3.17 zeigt die erhaltenen Amplifikate (Banden) aus den Mischungen mit Weizenstärke.

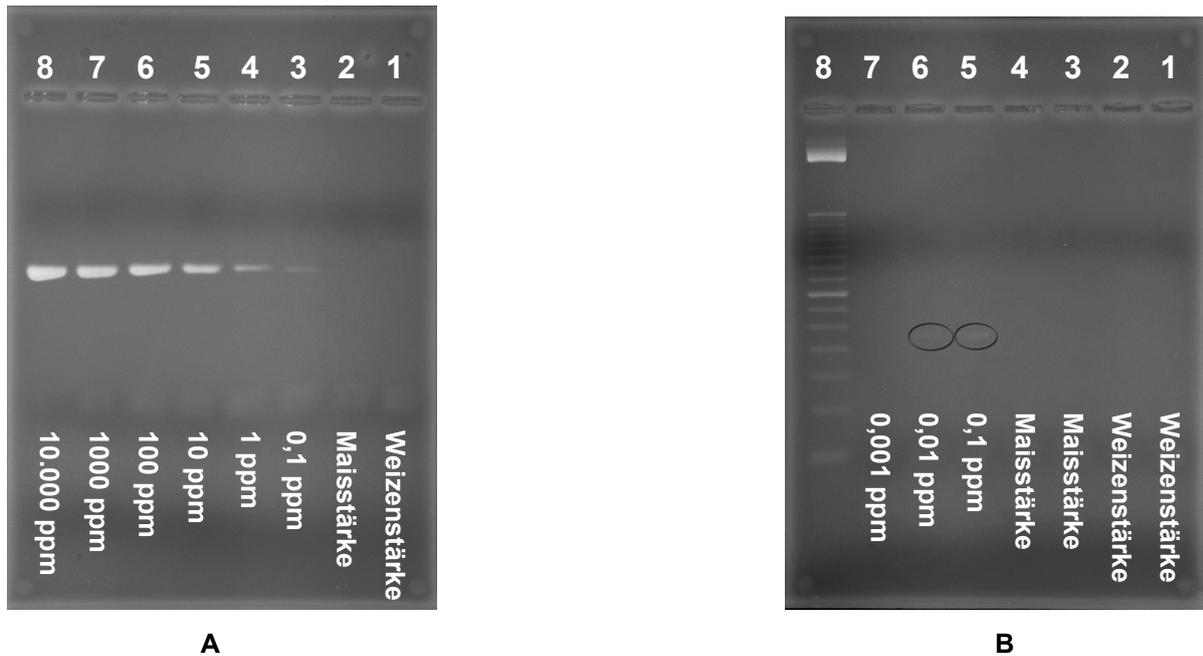


Abb. 3.17: Nachweisgrenze der PCR-Methode

„Konzentrationsreihe“ von *Matricariae flos* in Weizenstärke (benutzte Primer: Ker019-F / Ker-003R)

Gel A: Spur 1-2: Negativ-Kontrollen mit Weizen- und Maisstärke

Spur 3-8: Anteil des pflanzlichen Stoffes in der Mischung

Gel B: Spur 1-2: Negativ-Kontrollen mit Weizen- und Maisstärke

Spur 5-7: Anteil des pflanzlichen Stoffes in der Mischung

Spur 8: Größenmarker (50 bp-Marker)

Für die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte des pflanzlichen Stoffes sind Banden in den Spuren 3-8 der Abb. 3.17A zu erkennen. Ihre Fluoreszenzintensität, die mit der Menge der gebildeten Amplifikate korrespondiert, nimmt mit zunehmender Verdünnung des pflanzlichen Stoffes ab.

In den Ansätzen der Negativ-Kontrollen sind keine Banden sichtbar. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Amplifikate der Konzentrationsreihe nicht von Anteilen noch vorhandener Weizen- oder Mais-DNA in der Stärke stammen. Grundsätzlich wurde im Versuch allerdings ein für den pflanzlichen Stoff spezifischer Primer (Ker019F) eingesetzt. Beim Einsatz der universelleren Primer-Kombinationen (Kap. 3.2.2.3) bestand anderenfalls ein hohes Risiko für falsch-positive Ergebnisse durch co-amplifizierte DNA.

Der Einsatz der Primer in Proben mit Hilfs- oder Trägerstoffen pflanzlichen Ursprungs sollte deshalb stets durch Negativ-Kontrollen und ggf. eine Sequenzierung der Amplifikate abgesichert werden.

Der gepulverte pflanzliche Stoff wurde anhand der amplifizierten nrITS1- Fragmente mittels der Standard-PCR-Prozedur bis zu einer Konzentration von etwa 0,01 ppm nachgewiesen. Die betreffenden Banden sind im Gel noch schwach zu erkennen (Abb. 3.17B).

3.3 Ergänzende Marker zur Identifizierung

3.3.1 Amplifikation der nrETS-Region

Neben dem zum Ansatz der Identifizierung pflanzlicher Stoffe mittels nrITS-Daten wurde die Eignung der Sequenzen des ETS als komplementierende Markerstrategie untersucht. Der ETS ist der variabelste Bereich innerhalb der nrRNA-Transkriptionseinheit (Abb. 1.06, Kap 1.4.3). Er eignet sich damit prinzipiell zur Differenzierung sehr nah verwandter Pflanzen, die allein über nrITS-Daten oder andere Marker nicht hinreichend unterschieden werden können [72, 73].

Es wurden verschiedene Versuche an exemplarisch ausgewählten Proben durchgeführt.

3.3.1.1 Amplifikation von Kamillen-Arten

In der ersten Versuchsreihe wurden eine Probe von *Matricariae flos* (Echte Kamille / *Matricaria recutita* L.) sowie fünf ihrer häufigsten Verwechslungen / Verfälschungen [74] untersucht: *Matricaria discoidea* DC. (Strahlenlose Kamille), *Anthemis cotula* L. (Stinkende Hundskamille), *Anthemis arvensis* L. (Acker-Hundskamille) *Tripleurospermum maritimum* ssp. (Geruchlose Kamille) sowie *Chamaemelum nobile* (L.) All. (Römische Kamille / *Chamomillae romanae flos*).

Für ein Alignment der Markerdaten wurde der 3' Bereich des ETS mit den Primern Ker014-F / Ker013-R (Tab. 2.01b, Kap. 2.1.2) amplifiziert und sequenziert (Tab. 3.05).

Tabelle 3.05: Ergebnisse der ETS-Sequenzierungen ausgewählter Kamillen-Arten

Proben-Nr.	Spezies	Accession-Codes (GenBank)
011	<i>Matricaria recutita</i> L.	EU747086
027	<i>Matricaria discoidea</i> DC.	EU747087
028	<i>Anthemis cotula</i> L.	EU747090
029	<i>Anthemis arvensis</i> L.	EU747088
031	<i>Tripleurospermum maritimum</i> ssp.	EU747091
030	<i>Chamaemelum nobile</i> (L.) All.	EU747089

Beim Vergleich der Sequenzen wurde die erwartete hohe zwischenartliche Variabilität nicht bestätigt. Die Sequenzen der Amplifikate waren weitestgehend konserviert. Eine variable Zone wurde lediglich nahe des 5'-Bereiches der 18S-rDNA-Gene lokalisiert. Der betreffende Abschnitt wurden mit Hilfe der neu abgeleiteten Primer Ker016F und Ker015R (Tab. 2.01b, Kap. 2.1.2) auch separat amplifiziert. Die ungefähre Lage der Primer im nrDNA-Cluster ist in Abb. 3.18 dargestellt.

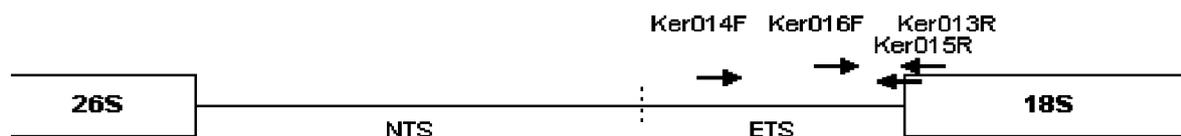


Abb. 3.18: Ungefähre Lage der verwendeten ETS-Primer im nrDNA-Cluster [75 mod.]

Die ermittelten ETS- und ITS-Sequenzen wurden zum Vergleich der intraspezifischen Merkmalsausprägungen miteinander verglichen. Beispielhaft sind besonders variable Bereiche beider Marker-Regionen in den Abb. 3.19 / 3.20 illustriert.

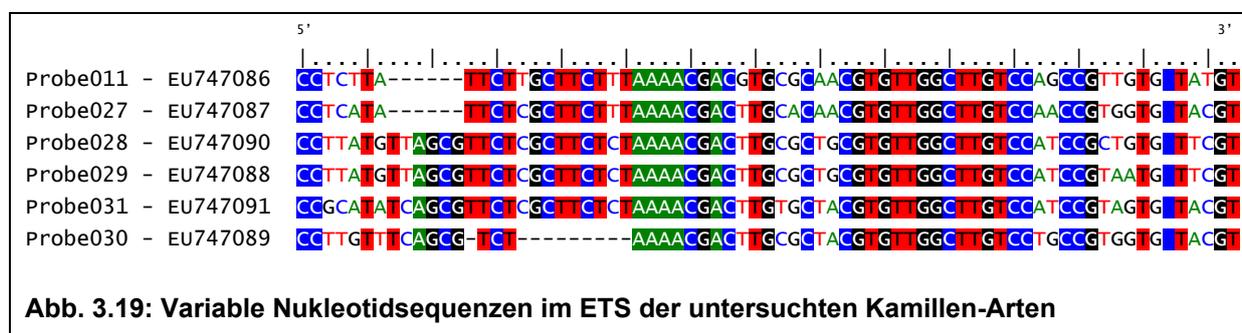


Abb. 3.19: Variable Nukleotidsequenzen im ETS der untersuchten Kamillen-Arten

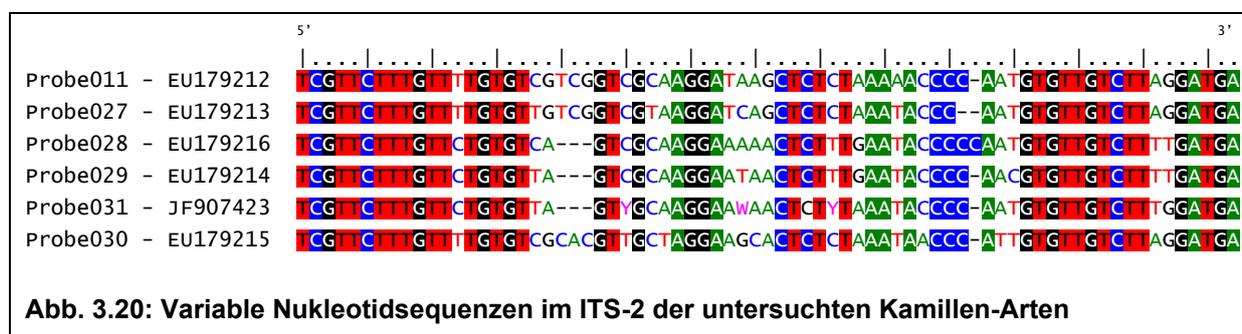


Abb. 3.20: Variable Nukleotidsequenzen im ITS-2 der untersuchten Kamillen-Arten

Proben: 011: *Matricaria recutita* L., 027: *Matricaria discoidea* DC., 028: *Anthemis cotula* L., 029: *Anthemis arvensis* L., 031: *Tripleurospermum maritimum* ssp., 030: *Chamaemelum nobile* (L.) All.

Wie in den Abbildungen 3.19 und 3.20 zu erkennen ist, sind die Variabilitäten in den ETS- und ITS-Sequenzen vergleichbar stark ausgeprägt. Ein relevanter zusätzlicher Informationsgewinn bei der Differenzierung der untersuchten Kamillenproben wird nur zusammen mit den ITS-Daten erzielt.

3.3.1.2 Amplifikation von pflanzlichen Stoffen der Gattung Echinacea

Eine weitere Versuchsreihe hatte zum Ziel die Proben von drei offizinell verwendeten pflanzlichen Stoffen der Gattung Echinacea [Proben 069 - 071] zu untersuchen. Die Identität der drei Stoffe kann mit den bislang zur Verfügung stehenden Nachweismethoden oftmals nicht eindeutig bestätigt werden.

Zunächst wurden auch bei diesen Proben die ETS-Primer Ker014-F und Ker013-R getestet. Es wurden hierbei allerdings keine Amplifikate gebildet. Literaturrecherchen nach alternativ verwendbaren Primern für die Pflanzengruppe blieben ergebnislos, daher wurde beschlossen eigene ETS-Primer abzuleiten. Zur Ableitung der neuen Primer sollten im ersten Schritt unter Einsatz einer JumpStart™-Polymerase und den von Baldwin et al. [75] beschriebenen Bedingungen die kompletten Intergenic spacer-Bereiche der Proben amplifiziert werden. Im Anschluss war eine schrittweise Sequenzierung der Amplifikate mittels der „Primer Walking-Methode“ [76] vorgesehen. In den PCR-Versuchen wurden allerdings nur unspezifische Amplifikate mit Fragmentlängen von etwa 1500 bp erhalten. Für eine Direktsequenzierung waren diese Produkte aufgrund ihres Charakters als Amplifikat-Gemische nicht geeignet. Die Amplifikate waren zudem deutlich kürzer als erwartet (ca. 3000 – 6000 bp).

Vermutlich sind die unspezifischen Amplifikate auf heterogene Abschnitte in den Intergenic spacern zurückzuführen. Die nicht-transkribierten Spacer-Bereiche unterliegen offensichtlich einer weniger umfassenden Homogenisierung im nrDNA-Cluster. Der Versuch spezifische ETS-Primer abzuleiten wurden aufgrund des verhältnismäßig hohen zeitlichen Aufwands schließlich nicht weiter verfolgt.

Zur Amplifizierung von ETS-Sequenzen sind in der Literatur nur wenige Primer beschrieben. Die Ableitung neuer Primer ist methodisch jedoch sehr anspruchsvoll. Da der ETS nur einseitig von den konservierteren Bereichen eines Gens (18S-rRNA-Gen) flankiert wird, muss der zweite Primer für die Amplifikation im Bereich des Spacers selbst (ggf. auch im Teil des NTS) platziert werden. Die Sequenzmuster sind dort ferner nur innerhalb kleinerer Gruppen von Pflanzen stabil, so dass sich die Eignung eines Primerpaares von vornherein auf eine limitierte Anzahl von Pflanzen beschränkt.

Obgleich in Kombination mit ITS-Sequenzen eine verbesserte Datengrundlage zur Differenzierung pflanzlicher Stoffe geschaffen werden kann, wird die Amplifizierung der ETS-Bereiche als in der Regel zu komplex eingestuft. Der ETS kommt im Fazit somit nicht als Marker für eine möglichst weit anwendbare PCR-Methode in Betracht.

3.3.2 Amplifikation des psbA-trnH-Spacers

Als weitere Markerregion wurde der psbA-trnH-Spacer hinsichtlich seiner Eignung zur Identifizierung von pflanzlichen Stoffen untersucht.

Der psbA-trnH-Spacer gilt als eines der variabelsten [41] und somit potentiell merkmalsreichsten Segmente des Plastoms bei den bedecktsamigen Pflanzen (Magnoliopsida). Zu ihnen gehört auch der mit Abstand größte Teil der in Europa heimischen Arzneipflanzen. Der psbA-trnH-Spacer kann ebenso wie die nrITS-Region aufgrund beidseitig flankierender Gene (Abb. 3.21) leicht durch universelle Primer amplifiziert werden. Aufgrund der durchschnittlichen Länge von etwa 450 bp [41] ist die Markerregion auch zur Vervielfältigung aus degradiertes DNA geeignet.



Abb. 3.21: Positionen der flankierenden Primer des psbA-trnH Spacers

Auch für diesen Marker wurde anhand von beispielhaften Proben untersucht, ob und inwiefern durch Sequenzanalysen zusätzlich gewonnene Informationen als Ergänzung zu den ITS-basierten Daten verwendet werden können.

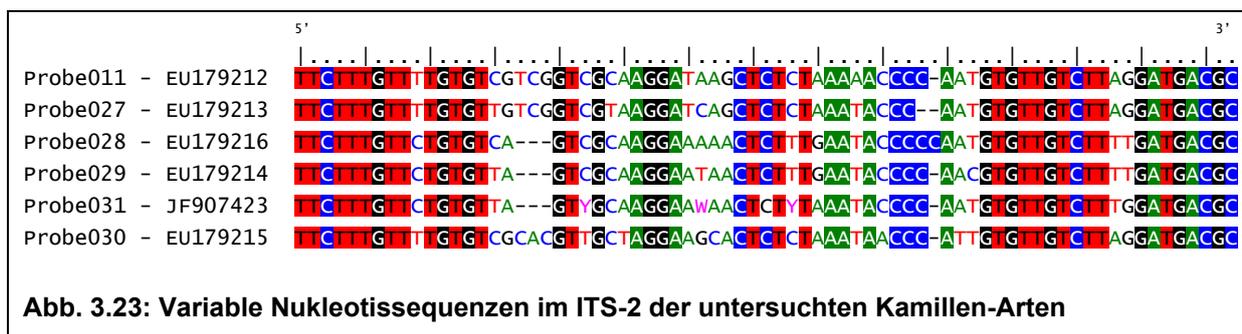
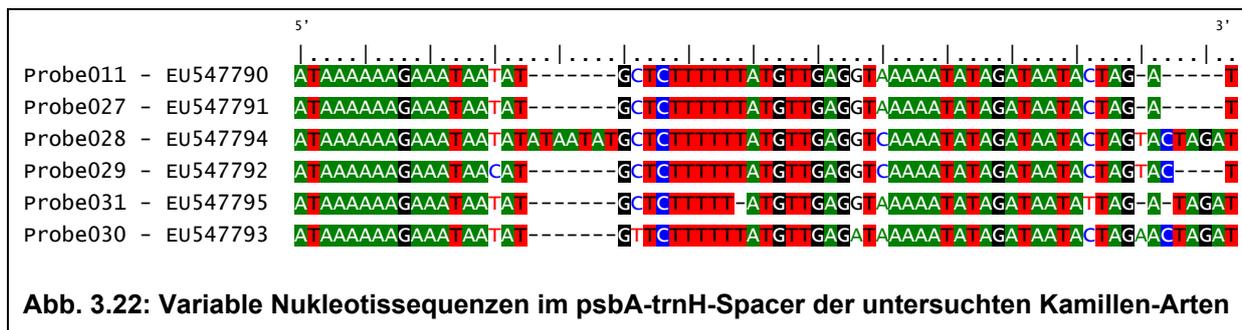
3.3.2.1 Amplifikation von Kamillen-Arten

In einer ersten Versuchsreihe wurden analog zur Überprüfung der ETS-Region (Kap. 3.3.1.1) eine Probe von *Matricariae flos* (Echte Kamille / *Matricaria recutita* L.) sowie Proben von fünf häufigen Verwechslungen / Verfälschungen des pflanzlichen Stoffes [74] untersucht. Der psbA-trnH-Spacer wurde jeweils mit den Primern Ker017-F und Ker018-R (Tab. 2.01b, Kap. 2.1.2) amplifiziert und sequenziert.

Die ermittelten psbA-trnH-Sequenzen (Tab. 3.06) wurden anschließend mit den ITS-Daten aus denselben Probenmaterialien (Kap. 3.4) bezüglich ihrer intraspezifischen Merkmalsausprägungen verglichen. In den Abb. 3.22 / 3.23 sind besonders variable Abschnitte beider Marker-Regionen dargestellt.

Tabelle 3.06: Ergebnisse der psbA-trnH-Spacer-Sequenzierungen ausgewählter Kamillen-Arten

Proben-Nr.	Spezies	Accession-Codes (GenBank)
011	<i>Matricaria recutita</i> L.	EU547790
027	<i>Matricaria discoidea</i> DC.	EU547791
028	<i>Anthemis cotula</i> L.	EU547794
029	<i>Anthemis arvensis</i> L.	EU547792
031	<i>Tripleurospermum maritimum</i> ssp.	EU547795
030	<i>Chamaemelum nobile</i> (L.) All.	EU547793



Proben: 011: *Matricaria recutita* L., 027: *Matricaria discoidea* DC., 028: *Anthemis cotula* L., 029: *Anthemis arvensis* L., 031: *Tripleurospermum maritimum* ssp., 030: *Chamaemelum nobile* (L.) All.

Der Vergleich der Sequenzen beider Markerbereiche zeigt, dass die untersuchten pflanzlichen Stoffe im psbA-trnH-Spacer untereinander deutlich weniger variable Nukleotid-Positionen aufweisen als in der nrITS-Region. Die Unterschiede zwischen den Sequenzen des psbA-trnH-Spacers sind hierbei hauptsächlich auf Insertionen bzw. Deletionen zurückzuführen.

Im Gegensatz zu den ITS-Sequenzen der Proben können nicht alle untersuchten Stoffe eindeutig voneinander unterschieden werden. So ist eine Differenzierung der Proben 011 und 027 nur auf Basis ihrer psbA-trnH-Daten nicht möglich. Der psbA-trnH-Spacer ist daher als alleiniger Marker zur Identifizierung von Stoffen bei dieser Gruppe von Proben ungeeignet. Die Anzahl der Merkmale für eine Unterscheidung der Arten wird jedoch durch die Kombination der Daten beider Marker deutlich erhöht. Hierdurch wird eine verlässlichere Differenzierung der Proben ermöglicht.

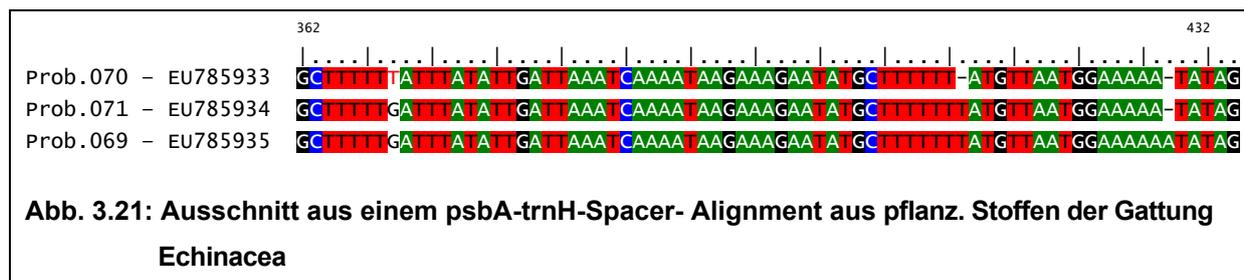
3.3.2.2 Amplifikation von pflanzlichen Stoffen der Gattung Echinacea

Die Eignung des psbA-trnH-Markes wurde in einer weiteren Versuchsreihe an drei offiziell verwendeten pflanzlichen Stoffen aus der Gattung Echinacea untersucht. Der Marker-Bereich wurde dazu mit denselben Primern amplifiziert und sequenziert wie die Kamillen-Arten (Kap. 3.3.2.1). Für alle Proben wurden Sequenzen ermittelt (Tab. 3.07).

Tabelle 3.07: Sequenzergebnisse des psbA-trnH-Spacers in pflanz. Stoffen der Gattung Echinacea

Proben Nr.	Spezies	Accession-Codes (GenBank)
070	<i>Echinacea angustifolia</i> DC.	EU785933
071	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	EU785934
069	<i>Echinacea pallida</i> (Nutt.) Nutt.	EU785935

Die drei pflanzlichen Stoffe unterscheiden sich in jeweils 4-5 Nukleotiden voneinander. Bei den Unterschieden handelt es sich überwiegend um Insertionen bzw. Deletionen. Sie treten stets nach einer Reihe von identischen Nukleotidfolgen (poly-A/T Bereichen) auf. Ein entsprechender Sequenzabschnitt ist in Abb. 3.21 dargestellt.



Proben: 070: *Echinacea angustifolia* DC, 071: *Echinacea purpurea* (L.) Moench, 069: *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.

Nukleotidvariationen im Anschluß eines repetitiven Motives können allerdings das Ergebnis einer fehlerhaften Kettenverlängerung sein. Standard-Polymerasen neigen bei der Amplifizierung von Gebieten mit identischer Sequenzfolge teilweise dazu zu „verrutschen“. Daher ist die Verlässlichkeit der Sequenzen für entsprechende Positionen (z .B. die genaue Anzahl der Nukleotide innerhalb der Folge) vermindert.

Eine zuverlässige Unterscheidung der drei pflanzlichen Stoffe ist folglich mit diesem Marker nicht garantiert.

Die geringen Sequenzunterschiede der drei Stoffe aus der Gattung *Echinacea* sind möglicherweise auf entwicklungsgerichtliche Zusammenhänge in dieser Pflanzen- gruppe zurückzuführen. Die Gruppe ist vergleichsweise jung und neigt zur häufigen Hybridisierung [77]. Eventuell kam es daher bislang nicht oder nur begrenzt zur Manifestierung von Mutationen im Genom.

Im Fazit der Versuche zur Nutzung von psbA-trnH-Sequenzen für die Identifizierung von pflanzlichen Stoffen ist festzustellen, dass der Marker eine geringere Sequenz-variabilität als die der nrITS-Region besitzt. Zur Differenzierung von Arten sind die vorhandenen Sequenzunterschiede oftmals nicht ausreichend. Damit können entsprechende Sequenzen nicht alternativ, wohl aber komplementär zur nrITS-Region genutzt werden. Prinzipiell kann der psbA-trnH-Spacer recht einfach mit universalen Primern amplifiziert werden. Auch die Effektivität bei der Sequenzierung ist verglichen mit der der nrITS-Region höher.

3.4 Praktische Anwendung der Methode

3.4.1 Erfassung von Sequenzdaten europäischer Arzneipflanzen

Neben der Analyse, Auswahl und Entwicklung einer geeigneten PCR-Strategie wurde auch eine Anzahl von nrITS-Sequenzen systematisch erfasst. Das Ziel dieser Erfassung war der Aufbau einer Referenzsammlung mit validen Daten. Für den Beginn wurden 50 typische pflanzliche Stoffe des europäischen Kulturkreises ausgewählt.

Nach der Amplifizierung und Sequenzierung konnten für insgesamt 31 der 50 Proben (Tab. 3.07) auswertbare nrITS-Daten abgeleitet werden. Diese wurden in GenBank publiziert. Aus den verbleibenden 19 Proben wurden dagegen keine bzw. nur stark überlagerte Sequenzen ermittelt. Sie konnten, wahrscheinlich aufgrund nicht passender Primer oder divergenter ITS-Cluster [43], nicht ausgewertet werden.

Tabelle 3.07: Ergebnisse der nrITS-Sequenzierungen

Proben Nr.	Spezies / Stammpflanze	Art des Stoffes	Accession-Codes (GenBank)
034	<i>Arnica montana</i> L.	Flos	HM032736
035	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Flos	EF437225
036	<i>Crataegus laevigata</i> (Poir.) DC.	Flos	EU785942
037	<i>Prunus spinosa</i> L.	Flos	EU796896
038	<i>Humulus lupulus</i> L.	Flos	-
011	<i>Matricaria recutita</i> L.	Flos	EU179212
027	<i>Matricaria discoidea</i> DC.	Flos	EU179213
028	<i>Anthemis cotula</i> L.	Flos	EU179216
029	<i>Anthemis arvensis</i> L.	Flos	EU179214
030	<i>Tripleurospermum maritimum</i> ssp.	Flos	JF907423
031	<i>Chamaemelum nobile</i> (L.) All.	Flos	EU179215
039	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	Folium	-
040	<i>Digitalis purpurea</i> L.	Folium	-
041	<i>Salvia fruticosa</i> Mill.	Folium	-
042	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Folium	-
043	<i>Tussilago farfara</i> L.	Folium	EU785941
044	<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Folium	EU796897
045	<i>Melissa officinalis</i> L.	Folium	EU796895
046	<i>Orthosiphon aristatus</i> (Blume) Miq.	Folium	EF421427
047	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Folium	EU796893
048	<i>Salvia officinalis</i> L.	Folium	-
049	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Folium	-
050	<i>Plantago major</i> L.	Folium	-
051	<i>Vitex agnus-castus</i> L.	Fructus	EU785943
051a	<i>Pimpinella anisum</i> L.	Fructus	EU785940
052	<i>Conium maculatum</i> L.	Fructus	EF437224

Ergebnisse und Diskussion

Proben Nr.	Spezies / Stammpflanze	Art des Stoffes	Accession-Codes (GenBank)
053	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. vulgare var. vulgare	Fructus	EU796894
054	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. subsp. vulgare var. dulce (Mill.) Batt.	Fructus	EF421428
055	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Fructus	-
056	<i>Marrubium vulgare</i> L.	Herba	-
057	<i>Leonurus cardiaca</i> L.	Herba	-
058	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Herba	EU796888
059	<i>Convallaria majalis</i> L.	Herba	-
060	<i>Viscum album</i> L.	Herba	EU796892
061	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Herba	-
062	<i>Achillea millefolium</i> L.	Herba	EU796891
063	<i>Chelidonium majus</i> L.	Herba	-
064	<i>Mentha x piperita</i> L.	Herba	-
065	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Herba	EU785939
066	<i>Thymus serpyllum</i> L.	Herba	EU796890
010	<i>Aristolochia clematitidis</i> L.	Folium	EF427950 / -51
067	<i>Actaea racemosa</i> L.	Herba	EU796898
068	<i>Valeriana officinalis</i> L.	Radix	EU796889
069	<i>Echinacea pallida</i> (Nutt.) Nutt.	Radix	EU785938
070	<i>Echinacea angustifolia</i> DC.	Herba	EU785936
071	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	Herba	EU785937
072	<i>Gentiana lutea</i> L.	Radix	-
073	<i>Veratrum album</i> L.	Radix	-
074	<i>Pelargonium sidoides</i> DC.	Radix	-
075	<i>Harpagophytum procumbens</i> (Burch.) DC. ex Meisn	Radix	-

3.4.2 Sequenzdatenerfassung von TCM-Referenzmaterialien des EDQM

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 10 Proben aus dem Bestand der TCM-Referenzmaterialiensammlung des EDQM untersucht. Es wurden sowohl die nrITS-Region als auch der psbA-trnH-Spacer amplifiziert und sequenziert (Tab. 3.08 / 3.09). Die Proben sind Teil einer Auswahl von in Europa besonders wichtigen pflanzlichen Stoffen / Zubereitungen des chinesischen Arzneibuchs, zu denen nach und nach Monographien für das Europäische Arzneibuch erarbeitet werden [15].

Nach dem Abschluss der Amplifizierung der nrITS-Region lagen für 6 der 10 pflanzlichen Stoffe auswertbare Sequenzen vor (Tab. 3.08). Die Sequenzen der Proben Nr. 078 und 079 (gleiche Stammpflanze, unterschiedliche Herkünfte) bzw. Nr. 080 und 081 (gleiche Stammpflanze, einmal nativ, einmal prozessiert) waren jeweils identisch.

Tabelle 3.08: Ermittelte nrITS-Sequenzen von TCM-Referenzmaterialien

Proben Nr.	Spezies / Stammpflanze	Art des Stoffes	Accession-Codes (GenBank)
076	<i>Fallopia japonica</i> (Houtt.) Ronse Decr Syn.: <i>Polygonum cuspidatum</i> Sieb. & Zucc.	Radix / Rhizoma	EU808015
077	<i>Fallopia multiflora</i> (Thunb.) Haraldson Syn.: <i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.	Herba	EU808016
078	<i>Stephania tetrandra</i> S. Moore	Radix	EU808017
079	<i>Stephania tetrandra</i> S. Moore	Radix	wie EU808017
080	<i>Dioscorea oppositifolia</i> L. Syn.: <i>Dioscorea opposita</i> Thunb.	Rhizoma	EU808018
081	<i>Dioscorea oppositifolia</i> L. Syn.: <i>Dioscorea opposita</i> Thunb.	Rhizoma	wie EU808018
082	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Wall. ex Nees	Herba	-
083	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	Rhizoma	-
084	<i>Asarum heterotropoides</i> F. Schmidt var. <i>mandshuricum</i> (Maxim.) Kitag. <i>Asarum sieboldii</i> Miq. var. <i>seoulense</i> Nakai <i>Asarum sieboldii</i> Miq.	Radix / Rhizoma	-
085	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Radix	-

Bei der Amplifizierung des psbA-trnH-Spacers wurden für 5 der 10 pflanzlichen Stoffe auswertbare Sequenzen ermittelt (Tab. 3.09).

Tabelle 3.09: Ermittelte psbA-trnH-Spacer-Sequenzen von TCM-Referenzmaterialien

Proben Nr.	Spezies / Stammpflanze	Art des Stoffes	Accession-Codes (GenBank)
076	<i>Fallopia japonica</i> (Houtt.) Ronse Decr Syn.: <i>Polygonum cuspidatum</i> Sieb. & Zucc.	Radix / Rhizoma	JF907424
077	<i>Fallopia multiflora</i> (Thunb.) Haraldson Syn.: <i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.	Herba	-
078	<i>Stephania tetrandra</i> S. Moore	Radix	-
079	<i>Stephania tetrandra</i> S. Moore	Radix	-
080	<i>Dioscorea oppositifolia</i> L. Syn.: <i>Dioscorea opposita</i> Thunb.	Rhizoma	JF907425
081	<i>Dioscorea oppositifolia</i> L. Syn.: <i>Dioscorea opposita</i> Thunb.	Rhizoma	JF907426
082	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Wall. ex Nees	Herba	JF907427
083	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	Rhizoma	-
084	<i>Asarum heterotropoides</i> F. Schmidt var. <i>mandshuricum</i> (Maxim.) Kitag. <i>Asarum sieboldii</i> Miq. var. <i>seoulense</i> Nakai <i>Asarum sieboldii</i> Miq.	Radix / Rhizoma	-
085	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Radix	JF907428

Beim Abgleich der ermittelten Sequenzen mit bereits in GenBank hinterlegten Daten wurde für die Sequenz der Probe Nr. 076 (*Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr) eine 120 bp lange Leerstelle/ Lücke entdeckt (Abb. 3.22). Sie war in der in GenBank hinterlegten Sequenz Nr. EU554048 nicht nachweisbar.

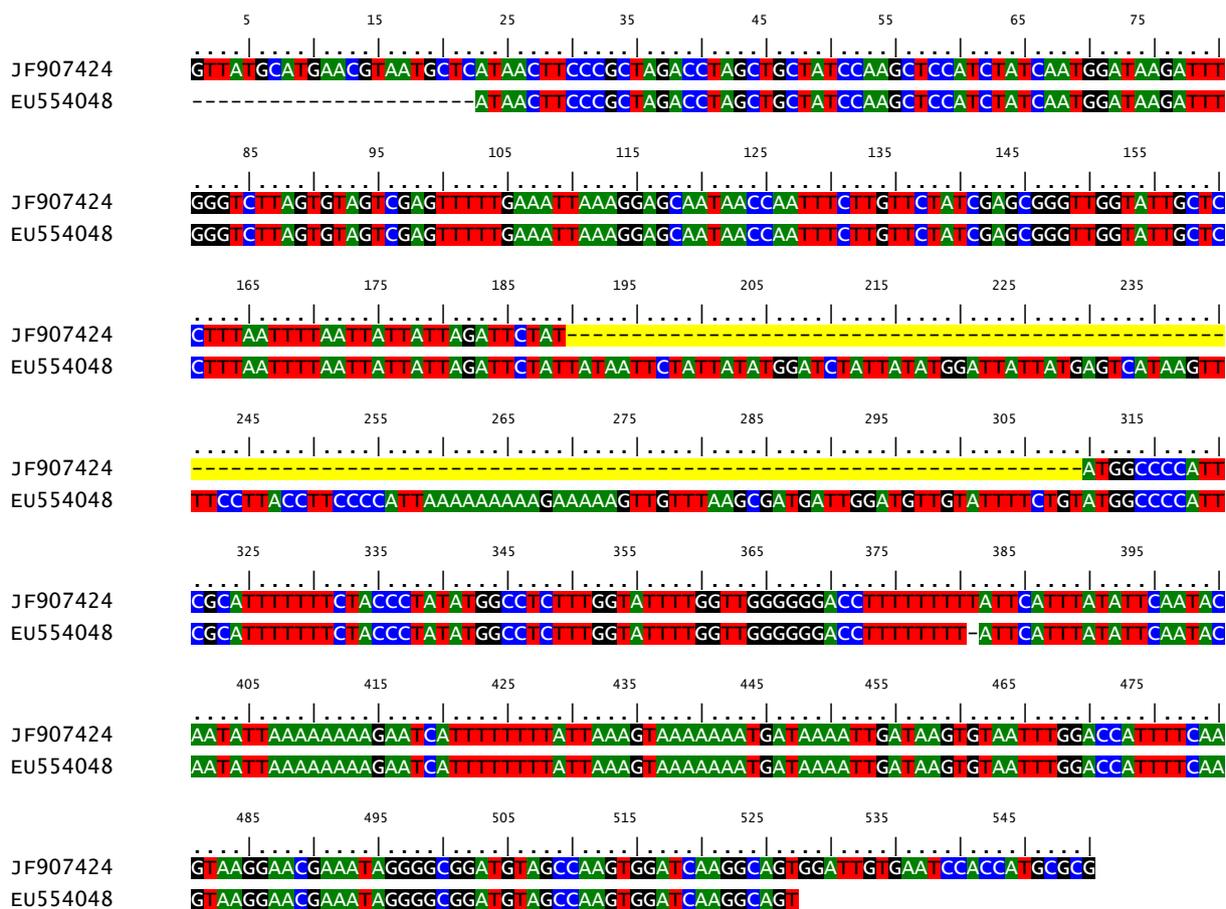


Abb. 3.22: fehlendes DNA-Segment im psbA-trnH-Spacer von Probe 076

3.4.3 Analyse von Zubereitungen pflanzlicher Stoffe

Die Eignung des ITS-Markers zur Rückverfolgung des eingesetzten Ausgangsmaterials in Zubereitungen pflanzlicher Stoffe (Extrakten) wurde anhand von 14 exemplarisch ausgewählten halbfesten- bzw. festen Darreichungsformen (Dick- und Trockenextrakte) untersucht. Für alle Proben wurden Amplifikate gebildet. Insgesamt 4 der Extrakte wiesen dabei hohe Übereinstimmungen (> 94%) mit den nrITS-Sequenzen der deklarierten pflanzlichen Ausgangsmaterialien auf (Tab. 3.10).

Ein Schlüsselschritt bei den Arbeiten war die reproduzierbare Isolierung geeigneter DNA aus der Extraktmatrix. Diese enthält zum Teil störende Trägermaterialien (wie getrockneten Glucosesirup, hochdisperses Siliciumdioxid oder Maltodextrin - Kap. 3.1.3). Die Isolierung der DNA gelang jedoch mit Hilfe des PSP Spin Stool DNA Kits. Die erzielten DNA-Gehalte in den Eluaten waren allerdings vergleichsweise niedrig. Zudem war die DNA stark degradiert. Daher konnte die nrITS-Region nicht direkt, sondern nur in Segmenten als einzelne Spacer amplifiziert werden. Für den Nachweis von Amplifikaten im Gel wurden grundsätzlich 40 – 50 Amplifikationszyklen benötigt.

Bei den Amplifikaten deren Sequenzen nicht mit denen der deklarierten pflanzlichen Ausgangsmaterialien übereinstimmten deuteten Ähnlichkeiten auf pflanzliche Ursprünge aus den Familien bzw. Gattungen der *Cucurbitaceae* (Kürbisgewächse), *Fraxinus* (Eschen), *Plantago* (Wegeriche), *Malus* (Äpfel), *Brassica* (Raps), *Triticum* (Weizen) und *Poa* (Rispengräser) hin. Es ist hierbei anzunehmen, dass über die Luft verbreitete Pollen verantwortlich für diese Sequenzergebnisse sind. So wäre es denkbar, dass die Pollen aufgrund ihrer widerstandsfähigen Außenwand die Verarbeitungsprozesse der pflanzlichen Stoffe zum Extrakt sehr gut überstehen können. Bei einer PCR mit hohen Amplifikationszyklen könnten dann auch geringe Spuren fremder DNA-Anteile vervielfältigt werden und das Ergebnis der Sequenzierung verfälschen. Weiterhin sind die Übergangsraten von der DNA des Ausgangsmaterials in den Extrakt vermutlich von verschiedenen Faktoren des Herstellungsprozesses abhängig.

Tabelle 3.10: Ergebnisse der Sequenzabgleiche von Amplifikaten aus Extrakten

Proben Nr.	Extraktbezeichnung/ Stammpflanze der pflanz. Zubereitung	Sequenzübereinstimmung (BLAST-Ergebnis)
086	Extr. Agni casti e fruct. spir. sicc. (<i>Vitex agnus-castus</i> L.)	<i>Cucurbita</i> sp.
087	Black Cohosh powdered extract (<i>Actaea racemosa</i> L.)	<i>Fraxinus excelsior</i> L.
088	Extr. Cardui mariae fruct. sicc. (<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.)	<i>Plantago</i> sp.
089	Extr. Mate e fol. aquos. sicc. (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.)	<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. [EU796897, FJ394705]
090	Extr. Millefolii e herb. aquos. sicc. (<i>Achillea millefolium</i> L.)	<i>Malus</i> sp.
091	Extr. Orthosiphonis e fol. sicc. (<i>Orthosiphon aristatus</i> (Blume) Miq.)	<i>Orthosiphon aristatus</i> (Blume) Miq. [EF421427]
092	Extr. Plantaginis e fol. spir. sicc. (<i>Plantago lanceolata</i> L.)	<i>Triticum</i> sp.
093	Extr. Salicis e cort. spir. sicc. (<i>Salix</i> sp.)	<i>Cucurbita</i> sp.
094	Extr. Thymi e herb. spir. sicc. (<i>Thymus vulgaris</i> L. / <i>Thymus zygis</i> L.)	<i>Cucurbita</i> sp.
095	Extr. Taraxaci e herb. cum rad. spir. sicc. (<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg.)	<i>Poa pratensis</i> spp.
096	Chamomile e herb. with flower powdered extract (<i>Matricaria recutita</i> L.)	<i>Brassica napus</i> L.
097	Extr. Chamomillae e flor. spiss. (<i>Matricaria recutita</i> L.)	<i>Triticum</i> sp.
098	Extr. Matricariae fld. Ph. Eur. (<i>Matricaria recutita</i> L.)	<i>Matricaria recutita</i> L. [EU179212]
099	Extr. Maricariae e flor. sicc. (<i>Matricaria recutita</i> L.)	<i>Matricaria recutita</i> L. [EU179212]

3.4.4 Analyse von Fertigarzneimitteln

Die Eignung von ITS-Sequenzen zur Rückverfolgung pflanzlicher Ausgangsmaterialien in Fertigarzneimitteln wurde anhand von 10 im Handel erhältlichen Produkten untersucht. Es wurden hierzu Präparate mit unterschiedlichen galenischen Formulierungen (Lösungen, Salbe, Hartkapseln, überzogene Tabletten) ausgewählt. Im Schritt der Isolierung der DNA sollte dadurch ein möglichst breites Spektrum an üblichen Fertigarzneimittel-Matrizes abgedeckt werden.

Für 7 der 10 Proben wurden Amplifikate gebildet, von denen 2 hohe Übereinstimmungen (> 98%) mit den nrITS-Sequenzen der deklarierten pflanzlichen Ausgangsmaterialien aufwiesen (Tab. 3.11).

Für die Isolierung der DNA wurde vergleichbar den Versuchen an den Extrakten ausschließlich das PSP Spin Stool DNA Kit benutzt. Zum Nachweis von Amplifikaten wurden in fast allen Ansätzen 50 Amplifikationszyklen benötigt. Versuche mit höheren Amplifikationszyklen wurden aufgrund der potentiell zunehmend unspezifischer werdenden Amplifikate nicht durchgeführt.

Bei den Amplifikaten ohne Sequenzübereinstimmung mit den deklarierten pflanzlichen Ausgangsmaterialien deuteten die höchsten Ähnlichkeiten auf pflanzliche Ursprünge aus den Familien bzw. Gattungen der *Cucurbitaceae* (Kürbisgewächse), *Hibiscus* (Eibisch), *Zea* (Mais), *Urtica* (Brennnesseln) und *Poa* (Rispengräser) hin. Ebenso wie bei den Zubereitungen der pflanzlichen Stoffe sind die ermittelten Sequenzen nicht durch Verwechslungen/ Verunreinigungen bei den eingesetzten pflanzlichen Stoffen plausibel zu erklären. Wahrscheinlich handelt es sich auch hier um Einträge durch Pollen.

Die zur Etablierung von Amplifikaten durchschnittlich benötigten 50 Zyklen weisen darauf hin, dass mit der Entfernung der Hilfsstoffmatrizes weitere Verluste im DNA-Gehalt einhergehen. Die Zuverlässigkeit des Spezies-Nachweises im Fertigarzneimittel nimmt daher deutlich ab.

Tabelle 3.11: Ergebnisse der Sequenzabgleiche von Amplifikaten aus Fertigarzneimitteln

Proben Nr.	Arzneimittelbezeichnung/ Wirkstoff des Arzneimittels	Sequenzübereinstimmung (BLAST-Ergebnis)
100	Matmille Extrakt Kamillenblüten-Fluidextrakt	<i>Chamaemelum nobile</i> (L.) All. [EU179215]
101	Kamillosan Konzentrat Auszug aus Kamillenzungenblüten	<i>Poa pratensis</i> spp.
102	Kamillin Konzentrat Robugen Auszug aus Kamillenblüten	<i>Matricaria recutita</i> L. [EU179212]
103	Matmille N Salbe Fluidextrakt aus Kamillenblüten	<i>Hibiscus</i> sp.
104	Proaktiv Hartkapseln Weidenrinden-Trockenextrakt	-
105	Optovit actiFLEX Tabl. überzogen Weidenrinden- Trockenextrakt	-
106	Agnus Sanol Hartkapseln Keuschlammfrüchte- Trockenextrakt	<i>Zea mays</i> L.
107	Feminon C Hartkapseln Cimicifugawurzelstock- Trockenextrakt	<i>Cucurbita</i> sp.
108	Cefakliman mono Tropfen Cimicifugawurzelstock- Trockenextrakt	<i>Urtica</i> sp.
109	Nephronorm med Tabl. überzogen Orthosiphonblätter- Trockenextrakt	-

4. Zusammenfassende Diskussion

4.1 Wissenschaftlicher und regulatorischer Hintergrund der Arbeit

Die Nutzung pflanzenheilkundlicher Therapien und der Markt für pflanzliche Arzneimittel verzeichnen weltweit steigende Zuwachsraten. Zugleich spielen aber auch die Qualitätsaspekte entsprechender Produkte eine immer wichtiger werdende Rolle, denn die Qualität hat direkte Auswirkungen auf die Sicherheit und Wirksamkeit der Arzneimittel [78]. Pflanzliche Arzneimittel von konsistenter Qualität erfordern Wirkstoffe mit reproduzierbarer inhaltsstofflicher Zusammensetzung. Letztere wiederum wird maßgeblich durch valide Herstellungsverfahren gewährleistet, in denen eindeutig definierte und geprüfte Ausgangsmaterialien verwendet werden [07]. Eine genaue und zuverlässige Identitätsbestimmung der eingesetzten pflanzlichen Stoffe ist demzufolge von grundlegender Bedeutung.

Die im Europäischen Arzneibuch beschriebenen und etablierten Methoden zur Identitätsbestimmung pflanzlicher Stoffe basieren bislang auf der Kontrolle spezifischer mikroskopischer und makroskopischer Merkmale sowie auf einer Analyse des phytochemischen Profils. Dennoch lassen sich Aussagen zur Identität in verschiedenen Fällen, etwa wenn die Gewebsstruktur durch Prozessierung (z. B. durch Kochen, Rösten oder Pulverisieren) weitgehend verändert wurde, nicht eindeutig treffen. Gleiches gilt, wenn die Inhaltsstoffmuster zwischen den Chargen derselben pflanzlichen Stoffe starken Schwankungen unterliegen oder mit denen anderer Stoffe (z. B. von sehr nah verwandter Pflanzenarten) weitgehend identisch sind.

Eine weitere Problematik besteht bei pflanzlichen Stoffen, für die keine ausreichenden Daten und Merkmale zur Differenzierung gegenüber möglichen, teilweise bedenklichen Verfälschungen und Verwechslungen bekannt oder verfügbar sind. Viele dieser Stoffe stammen aus fremden Kulturkreisen und werden in der Regel wild gesammelt [79]. Auch für sie (und ihre Zubereitungen) können in der EU seit mehreren Jahren Anträge auf Registrierung als „Traditionelle Pflanzliche Arzneimittel“ gestellt werden [80].

Aus diesen Gründen besteht ein zunehmender Bedarf an geeigneten, zuverlässigen Nachweisverfahren.

Ein sinnvoller Ansatz zur allgemeinen oder spezifischen Ergänzung, der bislang von den Arzneibüchern verwendeten Methoden zur Untersuchung der Identität und Reinheit, liegt in der Nutzung von Nachweistechiken aus der Molekularbiologie (Abb. 4.01). Derartige DNA-basierte Methoden werden bereits seit Jahren erfolgreich in weiten Bereichen der molekularen Phylogenie, Forensik oder Pflanzenzucht eingesetzt [18]. Ihr wesentlicher Vorteil besteht darin, dass diese unabhängig vom Verarbeitungszustand und der Art des verwendeten Pflanzenteils eingesetzt werden können. Da nur geringste Probemengen benötigt werden, sind solche Methoden sowohl zur Identifizierung von pflanzlichen Stoffen (als Ausgangsmaterialien), sowie prinzipiell auch von deren Zubereitungen (vom Extrakt bis hin zum Fertigarzneimittel) geeignet.

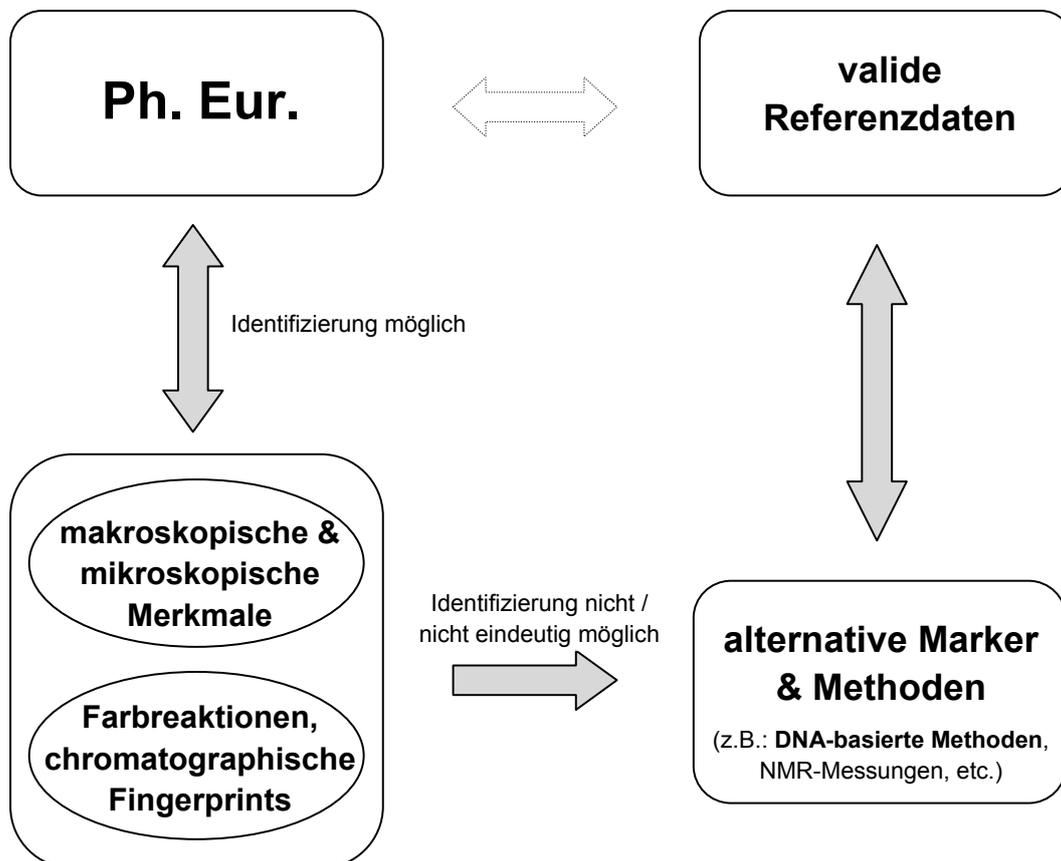


Abb. 4.01: Bestimmung der Identität pflanzlicher Stoffe mittels Arzneibuchmethoden und möglichen ergänzenden Verfahren

Die Nutzung von DNA-analytischen Methoden hat nicht zuletzt durch die rasanten Fortschritte und Entwicklungen auf dem Gebiet der molekularbiologischen Forschung eine stetig steigende Bedeutung erfahren. So z. B. versuchen Wissenschaftler in einem der Grundidee dieser Arbeit verwandten Teilprojekt, einer weltweiten taxonomischen Initiative, etwa seit 2005 die Artenvielfalt der Pflanzen anhand ihres genetischen Fingerabdrucks (DNA-Barcodes) zu erfassen. Mittlerweile resultiert aus diesem Forschungsprogramm eine Reihe von Bibliotheken mit Barcode-Sequenzen [31], die potentiell auch in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle einsetzbar sind.

Neben den taxonomisch motivierten Arbeiten der Barcoding-Initiative wurden inzwischen auch verschiedene molekularbiologische Ansätze eigens zur Identifizierung von arzneilich verwendeten pflanzlichen Stoffen publiziert. Bei den bisherigen Arbeiten handelte es sich schwerpunktmäßig jedoch um eher spezifische Methodenentwicklungen, die anhand einzelner Fallbeispiele - hauptsächlich aus dem Bereich pflanzlicher Stoffe der Traditionellen Chinesischen Medizin - durchgeführt wurden [18, 81].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus dagegen auf eine breit anwendbare, möglichst günstige und einfach durchzuführende PCR-basierte Methode gelegt. Das Konzept ähnelt damit eher dem Leitgedanken der Barcoding-Initiative, wenngleich die hervorzubringende Methode allerdings nicht nur zur Charakterisierung von (Arznei-) Pflanzen geeignet sein sollte, sondern auch für deren Rückverfolgbarkeit in prozessierten Proben. Als Grundlagenprojekt wurde die Auswahl der Proben zunächst auf pflanzliche Stoffe aus dem europäischen Kulturkreises beschränkt. Für diese standen zu Beginn der Arbeiten ausreichend geeignete Referenzmaterialien zur Verfügung. Die im Ziel dieser Arbeit stehende Untersuchungsmethode war dabei stets als Kombinationselement konzipiert, da allein auf der Basis von DNA-Merkmalen keine verlässlichen Rückschlüsse auf den tatsächlich verwendeten (relevanten) Pflanzenteil der Ausgangs- bzw. Stammpflanze gezogen werden können. In einem Schwesterprojekt wurde deshalb die Eignung, der auf charakteristische Inhaltsstoffe ausgerichteten Metabolom-Analytik, als potentiell komplementierende Nachweismethode untersucht. In Anbetracht aktueller Techniken, Durchsatzraten und Preise bei der Sequenzierung von DNA-Proben bestehen inzwischen verbesserte Rahmenbedingungen für einen eher spe-zies-spezifischen Methodenansatz. Auch dieser wurde in Nachfolgeprojekten angegan-gen. Der wesentliche Vorteil eines solchen Ansatzes liegt in der Verwendbarkeit von Mischungen, da die Amplifikate nicht mehr aufwendig separiert werden müssen.

4.2 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

DNA-Isolierung:

Die Isolierung von DNA ist der erste und zugleich kritischste Schritt bei der Vorbereitung der Proben für die DNA-Sequenz- und Fragmentanalyse, denn die Resultate derartiger Analysen werden maßgeblich vom Ausgangszustand der DNA, sowie der Methode zur DNA-Isolierung beeinflusst. Bei der Isolierung von DNA aus pflanzlichen Materialien bereiten die divergenten Spektren an Sekundärstoffen häufig eine Reihe von Schwierigkeiten. Eine Universalmethode steht hier nicht zur Verfügung [84]. Auch die in den zahlreichen kommerziellen Kits zur Anwendung kommenden Prozeduren - oftmals Kombinationen verschiedener Methoden - sind diesbzgl. nur Kompromisslösungen [85].

Mit dem DNeasy Plant Mini Kit wurden unter den analysierten pflanzlichen Stoffen deutlich reinere und in der Regel direkt amplifizierbare DNA isoliert als mit Hilfe der klassischen CTAB-Methode. Die Aufarbeitung der Proben war zudem in weniger als der Hälfte der für das CTAB-Protokoll benötigten Zeit möglich. Der Einsatz des Kits wurde deshalb klar favorisiert. Geling es nicht, die Restgehalte an Sekundärstoffen auch durch eine erneute Aufreinigung ausreichend zu reduzieren, wurde ein alternatives Isolierungs-Kit eingesetzt. Aus ökonomischen Beweggründen wurde hierzu das PSP Spin Stool DNA Kit verwendet. Die Isolierung amplifizierbarer genomischer DNA aus Extrakten und Fertigarzneimitteln war komplex. Die Aufarbeitungen zeigten, infolge starker unerwünschter Wechselwirkungen zwischen den zur Isolierung benötigten Reagenzien und verschiedenen Hilfsstoffen, häufig keinen Erfolg. Unter den getesteten Methoden und Kits war es lediglich mit Hilfe des PSP Spin Stool DNA Kits möglich, amplifizierbare DNA zu isolieren. Inzwischen sind weitere vergleichbar geeignete Kits beschrieben worden [82, 86].

Die Konzentration der in den Proben verfügbaren DNA war äußerst gering. Ihr Nachweis gelang nur indirekt über die entstandenen Amplifikate. Mit den eingesetzten Primern wurden keine Amplifikate mit mehr als 400 bp Fragmentlänge erhalten. Vermutlich ging ein wesentlicher Anteil der kleineren DNA-Fragmente aufgrund der ladungsbedingt geringeren Adsorptionskräfte bei der Aufreinigung verloren. DNA-Isolate aus stark prozessierten Materialien sollten daher höchstens einmal neu aufgereinigt werden.

Evaluierung der Markermethoden:

Zur Identifizierung von pflanzlichen Stoffen und deren Zubereitungen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Markermethoden untersucht. Als erste Methode wurde die vergleichende DNA-Sequenzierung des nrITS-Bereichs evaluiert. Der Marker, ein im Nukleus lokalisiertes Gencluster, das für drei ribosomale RNAs kodiert, wurde bei 50 pflanzlichen Stoffen zunächst mit Hilfe von publizierten Standard-Primern [51] amplifiziert. Nach anschließender Sequenzierung und Datenanalyse wurden hierbei 40% der Proben identifiziert. Die niedrige Erfolgsquote in diesem Versuch wurde maßgeblich auf die eingesetzten Primer zurückgeführt. Möglicherweise sind die Bindungsstellen dieser Primer (ursprünglich für Studien an fungalen Sequenzen konzipiert [87]) im Erbgut pflanzlicher Organismen nur teilweise komplementär. Es wurde daher nach pflanzenspezifischeren Primern recherchiert und schließlich eigene universelle Primer abgeleitet. In den anschließenden Versuchsreihen mit den neu abgeleiteten Primern lag die Erfolgsquote der Identifizierung um den Faktor 1,5 höher. Ursächlich war die gesteigerte Effizienz aber auch auf die verbesserten Ergebnisse bei der Direktsequenzierung der PCR-Amplifikate zurückzuführen. Der Anteil an nicht verwendbaren PCR-Produkten (keine oder Mehrfachbanden bei ca. 1/3 der Probengesamtmenge) kann insofern nicht nur auf die in der Literatur [18, 48] bei diesem Marker als problematischen angesehenen divergenten nrRNA-Cluster zurückgeführt werden. Eventuell sind die von Alvarez et al. [43] erwähnten Sekundärstrukturen der Markerregion verantwortlich für die Ergebnisse der PCR. Ein wahrscheinlicherer Grund für die nicht spezifischen oder ausgebliebenen Amplifikate liegt vermutlich in den Abschnitten der Gene, in denen die neuen Primer abgeleitet wurden. Bei der Ableitung der im 26S-nrDNA-Gen lokalisierten Primern mussten aufgrund der zu erwartenden Fragmentlängen der Amplifikate bewusst Kompromisse in Kauf genommen werden. Potentiell geeignetere, d. h. konserviertere DNA-Bereiche in vom Anfang des Genes weiter entfernten Positionen [31], wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Zur detaillierteren Charakterisierung der PCR-Methode mit den neu abgeleiteten Primern wurden weiterhin die Parameter Spezifität, Robustheit, Sensitivität und Präzision untersucht.

Bei den Tests zur Spezifität der Primer wurden ausschließlich pflanzen-spezifische Amplifikate erhalten. Aus keiner der PCR gingen Produkte hervor, die nach Sequenzierung und BLAST-Abgleich als mögliche Pilz-DNA identifiziert wurden.

Als Kennzeichen der Spezifität der Primer wurde der Grad ihrer Sequenzhomologie zu pflanzlichen Organismen betrachtet. Für die neu abgeleiteten Primer wurden hierbei Übereinstimmungen von >99% ermittelt. Diese Werte lagen um den Faktor zwei höher, als bei den Standard-Primern. Als geringster noch nachweisbarer Massenanteil eines pflanzlichen Stoffes wurde in Modellmischungen mit *Matricariae flos* eine Konzentration von 0,01 ppm bestimmt. Ferner wurden mit der Methode auch bei variierenden Reaktionsbedingungen sowie in Versuchswiederholungen zuverlässige Ergebnisse erhalten. Bei den Tests zur Reproduzierbarkeit wurden in den Sequenzen zwar verschiedentlich Variationen in der Nukleotidabfolge detektiert, diese waren jedoch eher auf Divergenzen zwischen den Proben zurückzuführen als auf technisch bedingte Umstände bei der Amplifikation und Sequenzierung. Eine gewissenhafte nachträgliche Kontrolle der zumeist automatisiert interpretierten Sequenzsignale, ist daher sehr wichtig. Vieldeutigkeiten in den Nukleotid-Signalen sollten im Zweifel mittels der entsprechenden Ambiguity-Codes gekennzeichnet werden.

In Ergänzung zur nrITS-Region wurden als weitere Marker der ETS (im Nukleus lokalisiert), sowie der psbA-trnH-Spacer (im Chloroplastengenom lokalisiert) getestet. Für sie wurden potentiell ähnlich hohe Informationsgehalte (Sequenzunterschiede) erwartet. Zur Amplifikation des ETS standen in der Literatur allerdings kaum geeignete Primer zur Verfügung. De novo waren diese nur äußerst aufwändig abzuleiten.

Im Ergebnis einer Versuchsreihe mit bekannten Asteraceen-spezifischen Primern an verschiedenen Kamillenproben wurden kaum variable Basenpositionen ermittelt. Zwischen dem potentiellen Nutzen und dem technischen Aufwand (insbesondere bei der Ableitung der Primer, die nur spezifisch für kleine Probengruppen verwendet werden können [72]), bestand somit ein ungünstiges Verhältnis. Der Marker wurde deshalb als nicht für die Projektziele dieser Arbeit geeignet bewertet.

Bei den Sequenzierungen wurde mit den psbA-trnH-Primern eine höhere Erfolgsquote als mit den nrITS-Primern erreicht. Der psbA-trnH-Bereich war der nrITS-Region im Hinblick auf ihren Informationsgehalt jedoch klar unterlegen. Dies ist eventuell auf die geringeren Evolutionsraten der Plastiden DNA zurückzuführen [88].

Durch Kombination mit ITS Daten kann dennoch ein zusätzlicher Informationsgewinn erzielt werden. Der psbA-trnH-Marker könnte z. B. im Rahmen einer Zweitkontrolle von Sequenzen eingesetzt werden.

Neben den Versuchen an pflanzlichen Stoffen wurden auch pflanzliche Zubereitungen (Extrakte und Fertigarzneimittel) untersucht. Die bei der Identifizierung der eingesetzten Ausgangsmaterialien erzielten Erfolgsquoten, lagen mit 30% (bei den Extraktproben) bzw. 20% (bei den Fertigarzneimitteln) allerdings deutlich unter denen der pflanzlichen Stoffe. Damit können derartige Proben mittels des nrITS-Markers nicht ausreichend identifiziert werden.

Grundsätzlich problematisch war der schlechte Zustand der isolierten DNA in der Gruppe der Extrakte und Fertigarzneimittel. Als Folge der geringen DNA-Gehalte in den Eluat bedurfte es höherer Zyklenzahlen in den PCR. Damit einhergehend erhöhte sich naturgemäß die Wahrscheinlichkeit für unspezifisch gebildete Amplifikate. Möglicherweise können bei der Isolierung mit anderen Kits höhere DNA-Gehalte erzielt werden [82]. Weitere Optimierungsmöglichkeiten betreffen die verwendeten Primer und PCR-Systeme. So werden z. B. in den Arbeiten von Li et al. [81], Chen et al. [31] und Yao et al. [83] höhere Erfolgsraten bei der Sequenzierung der ITS2-Region beschrieben.

Als zweite zu evaluierende Marker-Methode wurde die fragment-basierte RAPD-Technik ausgewählt. Sie wird in der Literatur als einfache, schnelle und gut diskriminierende Markermethode beschrieben. Die RAPD-Technik gehörte in den vergangenen beiden Jahrzehnten zu einer der am häufigsten verwendeten Fingerprint-Methoden in pflanzlich-molekulargenetischen Studien [20].

Im Rahmen der Versuche wurden zunächst die RAPD-Fingerprints von verschiedenen pflanzlichen Stoffen erfasst. Anschließend wurde auch das DNA-Eluat einer pflanzlichen Zubereitung getestet. Bei letzterem wurden allerdings keine Amplifikate gebildet. Eine zu hohe Konzentration von PCR-inhibierenden Stoffen kam als Ursache für die abwesenden Amplifikate nicht in Betracht, da mit demselben DNA-Eluat in Versuchsansätzen mit spezifischen Primern eindeutige Produkte amplifiziert wurden. Der Verlauf der RAPD-PCR war stattdessen sehr wahrscheinlich auf die degradierte DNA in der Probe der pflanzlichen Zubereitung zurückzuführen. Denkbar ist, dass z. B. die für

die RAPD-Amplifikation erforderlichen gegenläufigen Bindungsstellen der Primer, nicht mehr bzw. nicht mehr in ausreichender Anzahl enthalten waren.

Mit sicherer Bestimmtheit ließe sich ein aus einer pflanzlichen Zubereitung erhaltener DNA-Fingerprint vermutlich aber auch mit anderen unspezifischen, fragment-basierten Methoden nicht auf das entsprechende pflanzliche Referenzmaterial (Stammpflanze) zurückführen. Bedingt durch die in den Zubereitungen stark degradiert vorliegende DNA werden allenfalls Teile des Bandenmusters reproduzierbar amplifiziert. Ferner ist das Auflösungsvermögen für sehr ähnlich lange PCR-Fragmente im Agarosegel matrixbedingt limitiert. Außerdem wurden zwischen den Ausgangsmaterialien pflanzlicher Stoffe, die der derselben Art angehörten, unterschiedliche DNA-Fingerprints beobachtet. Die eindeutige Zuordnung der Stammpflanze des pflanzlichen Stoffes ist demnach bereits auf der Ebene der Ausgangsmaterialien mit einem nicht unerheblichen Fehlerrisiko behaftet. Dieses steigt mit zunehmender Fragmentierung der DNA in pflanzlichen Zubereitungen.

Unspezifische DNA-Fingerprint-Methoden sind deshalb für die Identifizierung, der in pflanzlichen Zubereitungen verarbeiteten pflanzlichen Ausgangsmaterialien, nicht geeignet.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen dar, dass sich die vergleichende Sequenzanalyse prinzipiell als ergänzende Methode zur Identitätskontrolle von pflanzlichen Stoffen eignet. Die als Marker ausgewählte nrITS-Region weist jedoch Schwachstellen auf. Eine bedeutsame Schwachstelle waren intraspezifische Variationen, die im Rahmen der Überprüfung der Zuverlässigkeit der Marker-Methode in einer Probenserie festgestellt wurden. Die Variationen können insofern interpretiert werden, dass identische Spezies nicht notwendigerweise völlig identische Marker-Sequenzen besitzen müssen. Dies wiederum führt zwangsläufig zu Schwierigkeiten bei der Abgrenzung von besonders nah miteinander verwandten Spezies. Zudem wird die Ergebnisunsicherheit erhöht, insbesondere, wenn nur Teile der nrITS-Region für eine Sequenzauswertung zur Verfügung stehen. Eine Reihe von Schwierigkeiten bereiteten außerdem die Überlagerungen von Sequenzen. Sie sind höchstwahrscheinlich eine Folge von divergenten Kopien der Markerregion, die in zahlreichen Proben aufgrund unvollständiger Homogenisierung auftreten, z. B. als Folge von Hybridisierungen [34].

Die PCR-Methode eignet sich ohne zusätzliche Arbeitsschritte ebenfalls nicht zur Analyse von Mischungen pflanzlicher Stoffe, da aufgrund des universellen Charakters der Primer mehrere Stoffe gleichzeitig amplifiziert werden.

Trotz all dieser Schwierigkeiten wurden auf der Stufe von pflanzlichen Stoffen ca. 60% der Proben über ihre Sequenzen erfolgreich identifiziert. Auf der Stufe von Zubereitungen der Stoffe (Extrakte) reduzierte sich die Erfolgsquote allerdings um die Hälfte auf 30% und auf der Stufe von Fertigarzneimitteln abermals auf 20%.

Für Rückverfolgbarkeits-Studien sind diese Effizienzen nicht ausreichend.

Möglicherweise lässt sich die Erfolgsquote durch den Bezug auf einen weiteren Marker verbessern [89]. Auch durch eine Kombination von Markern werden eventuell bessere Ergebnisse erhalten. In einem fortführenden Projekt sollte daher z. B. der nukleäre ITS2-Spacer noch einmal genauer eruiert werden (vergl. die Publikationen von Yao et al. [83] und Chen et al. [31]).

Alternativ eröffnen inzwischen verfügbare neue Sequenzierverfahren wie das Next Generation Sequencing [91] die Möglichkeit, weitere bislang nicht berücksichtigte DNA-Regionen als Marker zu bestimmen. Hiermit wären auch gezielt Untermischungen festzustellen.

5. Zusammenfassung

Pflanzliche Arzneimittel von konsistenter Qualität bedingen klar definierte und zuverlässig geprüfte Ausgangsmaterialien. Mit den bislang in der Ph. Eur. etablierten Methoden zum Nachweis der Identität pflanzlicher Stoffe (und deren Zubereitungen) werden allerdings nicht immer eindeutige Ergebnisse erzielt. Einen zusätzlichen Informationsgewinn verspricht hier der Einsatz von PCR-basierten Markermethoden. Derartige Methoden werden bereits seit Jahren erfolgreich in weiten Bereichen der molekularen Phylogenie, Forensik oder Pflanzenzucht eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden deshalb die Anwendbarkeit und der Nutzen verschiedener molekularbiologischer Nachweismethoden für den Bereich der pharmazeutischen Qualitätssicherung untersucht.

In dieser Arbeit wurde unter Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte ein Verfahren entwickelt, mit dem sowohl aus pflanzlichen Ausgangsmaterialien wie auch aus deren Verarbeitungen (z. B. Extrakten und Fertigarzneimitteln) verlässlich amplifizierbare DNA erhalten wird. Als DNA-analytische Untersuchungsmethoden wurden die vergleichende Sequenzierung des nrITS-Bereiches (ein Barcoding-Verfahren) sowie die RAPD-Technik (ein Fingerprinting-Verfahren) evaluiert. Beide Methoden wurden zuvor aus einer Reihe von häufig bei pflanzlichen Stoffen eingesetzten Nachweisverfahren ausgewählt. Die wesentlichen Kriterien während der Entwicklung waren eine möglichst einfache, kostengünstige, robuste und weithin anwendbare Handhabung.

Zur Beurteilung des Barcoding-Verfahrens wurde die DNA aus 50 pflanzlichen Stoffen in einer Anwendungsprüfung sowohl mit Standard-(nrITS)-Primern aus der Literatur als auch mit neu abgeleiteten nrITS-Primern analysiert. Mittels der neu abgeleiteten Primer wurden dabei etwa 60% der Proben identifiziert. Die Erfolgsquote in den Versuchsreihen mit den publizierten Standard-Primern lag um den Faktor 1,5 niedriger.

Die Barcoding-Methode wurde, vor allem mit *Matricariae flos* und möglichen Verfälschungen als Probenmaterial, bezüglich der Parameter Spezifität, Robustheit, Sensitivität und Präzision charakterisiert. Auch bei diesen Versuchen wurden mit den neu abgeleiteten Primern bessere Resultate erzielt. So z. B. wurden hinsichtlich der Sequenzhomologien zu pflanzlichen Organismen mehr als doppelt so hohe Übereinstimmungen (> 99%) für die Amplifikate der neu abgeleiteten Primer ermittelt als für jene der Standard-Primer.

Probleme durch co-amplifizierte Pilz-DNA, über die häufig in der Literatur berichtet wird, wurden in keinem der Versuche beobachtet. Die PCR-Methode war in Bezug auf Variationen der Reaktionsbedingungen vergleichsweise robust. Als geringster noch nachweisbarer Massenanteil eines pflanzlichen Stoffes wurde in Modellmischungen mit *Matricariae flos* eine Konzentration von 0,01 ppm bestimmt. Für die nrITS-Marker-Region wurden im Rahmen der Tests zur Genauigkeit der PCR-Methode allerdings mehrere intra-spezifisch variable Sequenzpositionen festgestellt.

Ergänzend zur nrITS-Region wurden zwei weitere DNA-Marker (der nrETS und der psbA-trnH-Spacer) untersucht. Als potentiell komplementär nutzbarer DNA-Bereich erwies sich dabei nur der psbA-trnH-Spacer.

Neben der Identifizierung von pflanzlichen Stoffen (ganze, geschnittene und gepulverte Pflanzenteile) gelang mit dem Barcoding-Verfahren der Nachweis der verwendeten Ausgangspflanzen auch in pflanzlichen Zubereitungen (Trockenextrakten, Tinkturen) und in Fertigarzneimitteln. Die Anzahl der charakteristischen Merkmalsvariationen in den amplifizierten DNA-Fragmenten dieser Proben war aufgrund der ausgeprägten DNA-Degradierung jedoch stark reduziert. Zugleich erhöhte sich infolge der intra-spezifischen Variabilitäten im nrITS-Marker die Wahrscheinlichkeit für unzutreffende Sequenzentsprechungen bei Abgleich mit den Referenzdaten. Die Zuverlässigkeit der Methode nahm daher bei dieser Gruppe von Proben deutlich ab. Das eingesetzte Pflanzenmaterial wurde auf der Stufe der pflanzlichen Zubereitungen dennoch in 30% der Fälle sowie auf der Stufe von Fertigarzneimitteln in 20% der Fälle identifiziert.

Mit dem Fingerprint-Verfahren wurden ebenfalls verschiedene pflanzliche Stoffe analysiert. Die Bandenmuster von gleichen Spezies aus verschiedenen Herkünften wichen jedoch teilweise signifikant voneinander ab. Im Unterschied zur Barcoding-Methode wurden mit der DNA aus pflanzlichen Zubereitungen keinerlei Amplifikate gebildet. Die noch vorhandene DNA war eventuell bereits zu stark fragmentiert. Die RAPD-Technik und damit höchstwahrscheinlich auch weitere unspezifische fragment-basierte Markerverfahren sind demnach als ergänzende Instrumente zur Überprüfung der Produktidentität von prozessierten Materialien nicht geeignet.

Spezifische PCR-Methoden, die auf möglichst kurze DNA-Fragmente abzielen, sind infolge der mit der Verarbeitung von pflanzlichen Stoffen einhergehenden DNA-

Degradation zweckdienlicher. Dabei können die Ergebnissicherheit sowie die Erfolgsraten, zudem durch Kombinationen mehrerer Marker-Daten, deutlich erhöht werden.

Da publizierte Sequenzdaten kaum einer vereinheitlichten Nachkontrolle unterliegen und somit verschiedene Fehler ausweisen, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Aufbau einer validen Sequenzsammlung begonnen. Die ermittelten Daten von 50 verschiedenen pflanzlichen Stoffen aus dem Europäischen Kulturkreis wurden in GenBank hinterlegt.

Mit der Arbeit wurden verschiedene Aspekte eines DNA-basierten Identitätsnachweises beleuchtet. Es wurde damit ein maßgeblicher Beitrag zur progressiven Erweiterung des wissenschaftlichen Kenntnistandes bei der regulatorischen Bewertung entsprechender Nachweisverfahren geleistet.

6. Literaturverzeichnis

1. AESGP (1998) - Pflanzliche Arzneimittel in der Europäischen Union, Studie im Auftrag der Europäischen Kommission.
Online im Internet: http://www.aesgp.eu/media/cms_page_media/68/Herbal_Medicines_DE.pdf [abgerufen am 01.11.2012]
2. Keller, K., W. Knöss, et al. (2003). "Phytopharmaka." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 46(12): 1036-1039.
3. BAH: „Phytopharmaka in Europa“
Online im Internet: <http://www.bah-bonn.de/index.php?id=182> [abgerufen am 01.11.2012]
4. Vlietinck, A. J. (2009). Are Ph. Eur. and ESCOP monographs useful for developing new traditional herbal medicinal products (THMP)? [Powerpoint Folien]. Vortrag präsentiert auf der Conference on Traditional Herbal Medicines der Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 6. März 2009, London.
5. Europäisches Parlament & Europäischer Rat (2001): Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel - Richtlinie 2001/83/EG.
Online im Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2001L0083:20070126:de:PDF> [abgerufen am 01.11.2012]
6. European Medicines Agency (2010): Reflection paper on the level of purification of extracts to be considered as herbal preparations - EMA/HMPC/186645/2008.
Online im Internet: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/01/WC500100375.pdf [abgerufen am 01.11.2012]
7. European Medicines Agency (2011): Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products - EMA/CPMP/QWP/2819/00 Rev. 2.
Online im Internet: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113209.pdf [abgerufen am 01.11.2012]
8. Harnischfeger G., H. H. Flämig, et al. (1983). "Vorschläge zu Rahmenanforderungen für die Prüfung und Standardisierung von Drogen und Extrakten im industriellen Bereich." Pharm. Ind. 45(8): 793-795.
9. Knöss, W., F. Stolte, et al. (2008). "Europäische Gesetzgebung zu besonderen Therapierichtungen." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 51(7): 771-778.
10. Gaedcke, F. (2000). "Phytopharmaka: Wissenschaftliche und rechtliche Grundlagen für die Entwicklung, Standardisierung und Zulassung in Deutschland und Europa." Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

11. Knöss, W., D. Schnädelbach, et al. (2003). "Probleme der Qualitätsbeurteilung und rechtliche Aspekte bei pflanzlichen Arzneimitteln." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 46(12): 1040-1045.
12. European Medicines Agency (2011): Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products - EMA/CPMP/QWP/2820/00 Rev. 2.
Online im Internet: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/09/WC500113210.pdf [abgerufen am 31.03.2012]
13. Harnischfeger, G. (1985). "Qualitätskontrolle von Phytopharmaka." Stuttgart; New York: Thieme Verlag.
14. Bauer, R. (2001). "Traditionelle Chinesische Medizin". In: Reichling, R., Müller-Jahncke, W. D., Borchardt, A. (Hrsg.), Arzneimittel der komplementären Medizin (S. 184-210). Eschborn: Govi-Verlag.
15. Bauer, R. and G. Franz (2010). "Modern European Monographs for Quality Control of Chinese Herbs." Planta Med. 76(17): 2004-2011.
16. Yip, P., C. Chau, et al. (2007). "DNA methods for identification of Chinese medicinal materials." Chin. Med. 2(1): 9.
17. Kersten, T., C. Daniel, et al. (2008). "Das Potenzial PCR-basierter Markermethoden zur Identifizierung von Arzneipflanzen." Z. Phytother. 29 (03): 122-128.
18. Heubl, G. (2010). "New Aspects of DNA-based Authentication of Chinese Medicinal Plants by Molecular Biological Techniques." Planta Med. 76(17): 1963-1974.
19. Gebhard, C. (2005). "Neue Methoden der Pflanzengenetik: DNA-Marker als Instrumente für die Analyse von Genom-Organisation und -Evolution, und für die Pflanzenzüchtung", Vorlesungsskript. MPIZ, Köln-Vogelsang.
20. Weising, K. et al. (2005): "DNA Fingerprinting in Plants - Principles, Methods, and Applications." (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.
21. Koch, G. (1998): "Effizienzvergleich biochemischer und molekularer Markermethoden zur Beschreibung genetischer Diversität." In: F. Begemann, (Hrsg.), Schriften zu Genetischen Ressourcen (Bd. 8, S. 49-58). Bonn: ZADI.
22. Smith, D. R. (1998): "Gel Electrophoresis of DNA." In: Rapley R. and Walker J.M. (Eds.): Molecular Biomethods Handbook (pp 17-33). Humana Press.
23. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, et al. (1994). "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification." Genomics 20(2): 176-183.

24. Williams, J. G., A. R. Kubelik, et al. (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic Acids Res.* 18(22): 6531-6535.
25. Vos, P., R. Hogers, et al. (1995). "AFLP - a New Technique for DNA-Fingerprinting." *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4407-4414.
26. Botstein, D., R.L. White, et al. (1980). "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism." *Am. J. Hum. Genet.* 32(3): 314-331.
27. Weber, J. L. and P. E. May (1989). "Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction." *Am. J. Hum. Genet.* 44(3): 388-396.
28. Konieczny, A. and F.M. Ausbel (1993) "A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers." *Plant J.* 4(2): 403-410.
29. Paran, I. and R. W. Michelmore (1993). "Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce." *Theor. Appl. Genet.*, 85(8): 985-993.
30. Storch, V., U. Welsch, et al. (2007). "Molekulare Evolutionsforschung." In: Storch, V., U. Welsch, et al. (Hrsg.), *Evolutionsbiologie* (S. 295-402). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
31. Chen, S., H. Yao, et al. (2010). "Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species." *PLoS ONE* 5(1): e8613.
32. Schmitz-Linneweber, C. (2002): "Genetische Determinanten von kompartimenteller Inkompatibilität in Genom/Plastom-Artbastarden", Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie.
33. Homann, A. (2002): "Molekulargenetische Analyse der plastidären Transkription: Sigmafaktoren und ihre Gene", Dissertation, Universität Bochum: Fakultät für Biologie.
34. Small, R. L., R. C. Cronn, et al. (2004). "L. A. S. Johnson Review No. 2. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants." *Aust. Syst. Bot.* 17(2): 145-170.
35. Storch, V., U. Welsch, et al. (2007). "Mechanismen und molekulare Ursachen der Evolution." In: Storch, V., U. Welsch, et al. (Hrsg.), *Evolutionsbiologie* (S. 211-294). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
36. Cowan, R. S., M. W. Chase, et al. (2006). "300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants." *Taxon* 55(3): 611-616.

37. Loos, H. (2004): "Transformation der Plastiden und Mitochondrien bei höheren Pflanzen - Selektive Marker und Einsatzmöglichkeiten", Dissertation, Universität München: Fakultät für Biologie.
38. Pyke, K. (2007). "Plastid biogenesis and differentiation." In: R. Bock (Ed.), *Cell and Molecular Biology of Plastids* (Vol. 19, pp. 1-28). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
39. Bock, R. (2007). Structure, function, and inheritance of plastid genomes. *Cell and Molecular Biology of Plastids*. R. Bock, Springer Berlin / Heidelberg. 19: 29-63.
40. Small, R. L., J. A. Ryburn, et al. (1998). "The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group." *Am. J. Bot.* 85(9): 1301-1315.
41. Vijayan, K. and C. H. Tsou (2010). "DNA barcoding in plants: Taxonomy in a new perspective." *Curr. Sci. India* 99(11): 1530-1541.
42. Zetzsche, H. (2004). "Die Phylogeographie des Artkomplexes *Pulsatilla alpina* (Ranunculaceae)." Dissertation, Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät
43. Alvarez, I. and J. F. Wendel (2003). "Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference." *Mol. Phylogenet. Evol.* 29(3): 417-434.
44. Kress, W. J., K. J. Wurdack, et al. (2005). "Use of DNA barcodes to identify flowering plants." *P. Natl. Acad. Sci. USA* 102(23): 8369-8374.
45. Taberlet, P., E. Coissac, et al. (2007). "Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding." *Nucleic Acids Res.* 35(3): e14.
46. Saar, D., N. Polans, et al. (2001). "Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance." *Plant. Mol. Biol. Rep.* 19(3): 249-260.
47. Rogers, S. O. and A. J. Bendich (1987). "Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer." *Plant Mol. Biol.* 9(5): 509-520.
48. Chase, M. W., R. S. Cowan, et al. (2007). "A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants." *Taxon* 56(2): 295-299.
49. Pennisi, E. (2007). "Taxonomy - Wanted: A barcode for plants." *Science* 318(5848): 190-191.
50. Shaw, J., E. B. Lickey, et al. (2005). "The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis." *Am. J. Bot.* 92(1): 142-166.

51. White, T. J., T. D. Bruns, et al. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics." In: Innis, N., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. (Eds.): PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual (pp. 315-322). New York: Academic Press.
52. Maggini, F., R. Marrocco, et al. (1998). "Lengths and nucleotide sequences of the internal spacers of nuclear ribosomal DNA in gymnosperms and pteridophytes." *Plant Syst. Evol.* 213(3): 199-205.
53. Blattner, F. R. (1999). "Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR." *Biotechniques* 27(6): 1180-1186.
54. Lee, J., B. G. Baldwin, et al. (2002). "Phylogeny of *Stephanomeria* and related genera (compositae-lactuceae) based on analysis of 18S-26S nuclear rDNA ITS and ETS sequences." *Am. J. Bot.* 89(1): 160-168.
55. Markos, S. and B. G. Baldwin (2001). "Higher-level relationships and major lineages of *Lessingia* (Compositae, Astereae) based on nuclear rDNA internal and external transcribed spacer (ITS and ETS) sequences." *Syst. Bot.* 26(1): 168-183.
56. Sang, T., D. Crawford, et al. (1997). "Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae)." *Am. J. Bot.* 84(8): 1120.
57. Tate, J., Simpson, B., 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot.* 28(4): 723–737.
58. Murray, M. G. and W. F. Thompson (1980). "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA." *Nucleic Acids Res.* 8(19): 4321-4326.
59. Borsch, T., K. W. Hilu, et al. (2003). "Noncoding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms." *J. Evol. Biol.* 16(4): 558-576.
60. Wolf, H.-T. (1999). "Genomanalysen an Heil- und Giftpflanzen: Identitätsprüfung und Verwandtschaftsbestimmung." Dissertation, Johann Wolfgang von Goethe-Universität, Frankfurt.
61. Bänfer, G. (2008). "Molekulare Studien zur Evolution der Myrmekophytie in der Gattung *Macaranga* (Euphorbiaceae)." Dissertation, Universität Kassel, Kassel.
62. Brema, S. (2004). "Entwicklung eines indirekten ELISA zum Nachweis von Infektionen mit potenziell onkogenen Gammaherpesviren beim Schwein als Beitrag zur Virussicherheit in der Xenotransplantation." Dissertation, Freie Universität, Berlin.
63. Hänsel, R. and E. Spiess (2007). "Pflanzliche Arzneidrogen und einfache Arzneizubereitungen." In: R. Hänsel and O. Sticher (Hrsg.), *Pharmakognosie - Phytopharmazie* (S. 189-223). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

64. Daniel, C. (2009). "Identifizierung und Nachweis pflanzlicher Substanzen über ITS-Sequenzen und Fingerprint-Analyse des Metaboloms." Dissertation, Universität Bonn, Naturwissenschaftliche Fakultät.
65. Baldwin, B. G. (1992). "Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae." *Mol. Phylogenet. Evol.* 1(1): 3-16.
66. Linder, C. R., L. A. Moore, et al. (2000). "A universal molecular method for identifying underground plant parts to species." *Mol. Ecol.* 9(10): 1549-1559.
67. Bidartondo, M.I. et al. (2008). "Preserving accuracy in GenBank." *Science* 319(5870): 1616.
68. Hershkovitz, M. A. and E. A. Zimmer (1996). "Conservation Patterns in Angiosperm rDNA ITS2 Sequences." *Nucleic Acids Res.* 24(15): 2857-2867.
69. Kuzoff, R. K., J. A. Sweere, et al. (1998). "The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants." *Mol. Biol. Evol.* 15(3): 251-263.
70. Gonzalez, M. A., C. Baraloto, et al. (2009). "Identification of Amazonian Trees with DNA Barcodes." *PLoS ONE* 4(10): e7483.
71. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - ICH Guideline Q2(R1).
Online im Internet http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf [abgerufen am 01.11.2012]
72. Linder, C. R., L. R. Goertzen, et al. (2000). "The Complete External Transcribed Spacer of 18S-26S rDNA: Amplification and Phylogenetic Utility at Low Taxonomic Levels in Asteraceae and Closely Allied Families." *Mol. Phylogenet. Evol.* 14(2): 285-303.
73. Poczai, P. and J. Hyvönen (2010). "Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects." *Mol. Biol. Rep.* 37(4): 1897-1912.
74. Meyer, A. (2003). "Isolierung und Analytik von Anthecotulid aus *Anthemis cotula* L." Diplomarbeit, Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät.
75. Baldwin, B. G. and S. Markos (1998). "Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS Trees of Calycadenia (Compositae)." *Mol. Phylogenet. Evol.* 10(3): 449-463.
76. Strauss, E. C., J. A. Kober, et al. (1986). "Specific-primer-directed DNA sequencing." *Anal. Biochem.* 154(1): 353-360.

77. Flagel, L. E., R. A. Rapp, et al. (2008). "Phylogenetic, morphological, and chemotaxonomic incongruence in the North American endemic genus *Echinacea*." *Am. J. Bot.* 95(6): 756-765.
78. Solimene, U., A. Alkofahi, et al. (2007). "WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues."
Online im Internet: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js14878e/>
[abgerufen am 24.04.2013]
79. Liu, C., H. Yu, et al. (2011). "Framework for Sustainable Use of Medicinal Plants in China." *Plant. Divers. Resour.* 33(1): 65-68.
80. Europäisches Parlament & Europäischer Rat (2004): Änderung der Richtlinie 2001/83/EG zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel hinsichtlich traditioneller pflanzlicher Arzneimittel - Richtlinie 2004/24/EG.
Online im Internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:136:0085:0090:de:PDF> [abgerufen am 01.11.2012]
81. Li, M., H. Cao, et al. (2011). "Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes." *J. Syst. Evol.* 49(3): 271-283.
82. Cimino, M. T. (2010). "Successful Isolation and PCR Amplification of DNA from National Institute of Standards and Technology Herbal Dietary Supplement Standard Reference Material Powders and Extracts." *Planta Med.* 76(5): 495-497.
83. Yao, H., J. Song, et al. (2010). "Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals." *PLoS ONE* 5(10): e13102.
84. Loomis, W. D. (1974). "Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles." In: S. Fleischer and L. Packer (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 31, pp. 528-544). New York: Academic Press.
85. Varma, A., H. Padh, et al. (2007). "Plant genomic DNA isolation: An art or a science." *Biotechnol. J.* 2(3): 386-392.
86. Llongueras, J., S. Nair, et al. (2012). "Comparing DNA Extraction Methods for Analysis of Botanical Materials Found in Anti-Diabetic Supplements." *Mol. Biotechnol.* 53(3): 249-256.
87. Miranda, V. F. O. d., V. G. Martins, et al. (2010). "Plant or fungal sequences? An alternative optimized PCR protocol to avoid ITS (nrDNA) misamplification." *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53(1): 141-152.
88. Wolfe, K. H., W.-H. Li, et al. (1987). "Rates of Nucleotide Substitution Vary Greatly among Plant Mitochondrial, Chloroplast, and Nuclear DNAs." *P. Natl. Acad. Sci. USA* 84(24): 9054-9058.
89. Pang, X., H. Luo, et al. (2012). "Assessing the potential of candidate DNA barcodes for identifying non-flowering seed plants." *Plant Biol.* 14(5): 839-844.

90. Hollingsworth, P. M., S. W. Graham, et al. (2011). "Choosing and Using a Plant DNA Barcode." PLoS ONE 6(5): e19254.
91. Sucher, N. J., J. R. Hennell, et al. (2012): "DNA Fingerprinting, DNA Barcoding, and Next Generation Sequencing Technology in Plants." In: N. J. Sucher, J. R. Hennell and C. M. Carles (Eds.), Plant DNA Fingerprinting and Barcoding - Methods and Protocols (Vol. 862, pp. 13-22). New York: Humana Press.
92. Bräutigam, A. and U. Gowik (2010). "What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research." Plant Biol. 12(6): 831-841.

7. Anhang

7.1 Probenmaterialien

Frischpflanzen(-teile) wurden vor der Lagerung gründlich mit demineralisiertem Wasser gesäubert, anschließend mit Papierhandtüchern abgetupft und dann in wiederverschließbaren Plastiktüten über Silikagel getrocknet. Hierdurch wurde ein schneller Entzug der Feuchtigkeit gewährleistet. Bereits getrocknete Ausgangsmaterialien wurden in gleicher Weise verpackt. Gelagert wurden die Proben vor Licht geschützt in Pappkartons.

Tab. 6.01: Liste der verwendeten pflanzlichen Materialien

Nr.	Herkunft	Beschreibung	Charge
001	Bot. Inst. Dresden	<i>Aristolochia esperanzae</i> Kuntze 01.08.03; Univ. of Florida (über Neinh.)	-
002	Bot. Inst. Dresden	<i>Aristolochia gigantea</i> Mart.; 15951 Bonn	-
003	Bot. Inst. Dresden	<i>Aristolochia cymbifera</i> Mart.; Brasilien 08.03.04 – 03 BG Göttingen 176	-
004	Bot. Inst. Dresden	<i>Aristolochia debilis</i> Siebold & Zucc.; BG Shanghai 0173	-
005	Bot. Inst. Dresden	<i>Aristolochia ringens</i> Vahl QSB6 07.07.04; 04 Chiang Mai Thailand	-
006	Bot. Inst. Dresden	<i>Aristolochia tomentosa</i> Sims 10.03.04; Regensburg 66	-
007	Bot. Inst. Dresden	<i>Aristolochia westlandii</i> Hemsl.; Oh / Edinburgh 19696197	-
008	Bot. Inst. Dresden	<i>Aristolochia elegans</i> Mast.; nachbestimmt	-
009	Bot. Inst. Dresden	<i>Aristolochia triangularis</i> Cham. 10.04.03 – 2003 L. Barabino / Turin	-
010	Garten Ph. Bio. Bonn	<i>Aristolochia clematits</i> L.	-
011	Bot. Garten Berlin-D.	<i>Matricaria recutita</i> L. DE-0-B-0790289: Sachsen-Anhalt, Burgenlandkreis, Flemmingen (Bot. Garten Leipzig)	-

012	Caelo	<i>Flores Chamomillae</i> ägyptisch	62165386
013	Caelo	<i>Flores Chamomillae romanae</i> extra	52927316
014	Caelo	<i>Flores Chamomillae</i> böhmisch	61279196
015	Caelo	<i>Flores Chamomillae</i> german.	62495396
016	Caelo	<i>Flores Chamomillae</i>	67-3-05
017	Caelo	<i>Flores Chamomillae pro balneo</i>	51093175
018	Bot. Garten Tübingen	<i>Matricaria recutita</i> L.	-
019	Pharmasaat	<i>Matricaria recutita</i> L. "Bodegold"	MrBkg630041
020	Pharmasaat	<i>Matricaria recutita</i> L. "Bona"	MrB630/294
021	Pharmasaat	<i>Matricaria recutita</i> L. "Goral"	MrG631/310
022	Pharmasaat	<i>Matricaria recutita</i> L. "Lutea"	MrLu631345
023	Bot. Garten Stuttgart	<i>Matricaria recutita</i> L.	-
024	Bot. Garten Berlin-D.	<i>Matricaria recutita</i> L. DE-0-B-1593400: Berlin-Spandau, Staaken, Hahneberg, Silikat, leg. Royl 6926	-
025	Bot. Garten Oldenburg	<i>Matricaria recutita</i> L. (04) KÜ 04-089-91-10	-
026	Bot. Garten Osnabrück	<i>Matricaria recutita</i> L. DE-0-OSN-2005-089 DE, NI, OS, Bissendorf, Uphausen, Aller- brinksweg, N 52°14'13, E 08°09'04, 90 m, Mutt. 32	-
027	Bot. Garten Berlin- D.	<i>Matricaria discoidea</i> DC. DE-0-B-1593500: Berlin-Spandau, Staaken, Hahneberg, Silikat, leg. Royl 6927	-
028	Bot. Garten Frankfurt	<i>Anthemis cotula</i> L. – Ernte 1985 ab 05.03.1986 -20°C (Fr. Lenk)	-
029	Bot. Garten Berlin-D.	<i>Anthemis arvensis</i> L. DE-0-B-2381103: Bayern, Kreis Ansbach, Arberg, leg. Weber s.n.	-
030	Bot. Garten Berlin-D.	<i>Chamaemelum nobile</i> (L.) All. FR-0-B- 0190595: Bretagne, Cap Frénel (Bot. Garten Göttingen)	-

031	Bot. Garten Osnabrück	<i>Tripleurospermum perforatum</i> (MÉRAT) DE-0-OSN-2005-169: DE, NI, HE, Königslutter, Sunstedt, Berliner Str., N 52°14'00, E 10°50'54, 145 m, Mutt. 30	-
032	Salus Haus	Kamille-Kräutertabletten (Zul.-Nr.: 6292772.00.00)	T95141-1-1
033	Bionorica	<i>Matricariae flos</i> . pulv.	E-063720
034	Alfred Galke	<i>Arnicae flos</i>	0000010985
035	Alfred Galke	<i>Lavendulae flos</i>	11025
036	Alfred Galke	<i>Crataegi flos</i> [DAC 2005]	0000010969
037	Alfred Galke	<i>Pruni spinosae flos</i> [DAC 2005]	1498
038	Alfred Galke	<i>Lupuli flos</i>	0000010966
039	Alfred Galke	<i>Uvae ursi folium</i>	9796
040	Alfred Galke	<i>Digitalis purpureae folium</i>	8936
041	Alfred Galke	<i>Salviae trilobae folium</i>	7468
042	Alfred Galke	<i>Ginkgo folium</i>	0000010760
043	Alfred Galke	<i>Farfarae folium</i>	40923276
044	Alfred Galke	<i>Mate folium viride</i> [DAC 2004]	9473
045	Alfred Galke	<i>Melissae folium</i>	0000010861
046	Alfred Galke	<i>Orthosiphonis folium</i>	8694
047	Alfred Galke	<i>Rosmarini folium</i>	7043
048	Alfred Galke	<i>Salviae officinalis folium</i>	0000011051
049	Alfred Galke	<i>Plantaginis lanceolatae folium</i>	9809
050	Alfred Galke	<i>Plantago major</i> [HAB 2004]	6582
051	Alfred Galke	<i>Agni casti fructus</i>	8828
051a	Alfred Galke	<i>Anisi fructus</i>	0000010777
052	Alfred Galke	<i>Conium maculatum</i> [HAB 2008]	2492

053	Alfred Galke	<i>Foeniculi amari fructus</i>	10272
054	Alfred Galke	<i>Foeniculi dulcis fructus</i>	10669
055	Alfred Galke	<i>Silybi mariani fructus</i>	8263
056	Alfred Galke	<i>Marrubii herba</i> [DAC 2003]	5856
057	Alfred Galke	<i>Leonuri cardiaca herba</i>	10477
058	Alfred Galke	<i>Hyperici herba</i>	9587
059	Alfred Galke	<i>Convallariae herba</i> [DAB 1999]	10087
060	Klenk	<i>Visci herba</i> [DAB 1999]	4691A06032801
061	Alfred Galke	<i>Passiflorae herba</i>	10027
062	Alfred Galke	<i>Millefolii herba</i>	0000011079
063	Alfred Galke	<i>Chelidonii herba</i>	8502
064	Alfred Galke	<i>Menthae piperitae folium</i>	10157
065	Alfred Galke	<i>Thymi herba</i>	0000010874
066	Alfred Galke	<i>Serpylli herba</i>	10188
067	Alfred Galke	<i>Cimicifuga racemosa</i> [HAB 2000]	7809
068	Alfred Galke	<i>Valerianae radix</i>	7845
069	Prof. Rudolf Bauer	<i>Echinacea pallidae</i> / Heilpflanzen Sandfort GmbH & Co. KG	-
070	Prof. Rudolf Bauer	<i>Echinacea angustifoliae</i> / Heilpflanzen Sandfort GmbH & Co. KG, 2001	2030817
071	Prof. Rudolf Bauer	<i>Echinacea purpurea</i> / Dodson & Horrell	-
072	Alfred Galke	<i>Gentianae radix</i>	7049
073	Alfred Galke	<i>Rhizoma Veratri</i> [DAB 6]	977
074	Alfred Galke	<i>Pelargonii radix</i>	10046
075	Alfred Galke	<i>Harpagophyti radix</i>	0000010735
076	EDQM	<i>Polygoni crispidati radix et rhizoma</i> (Huzhang)	32980

077	EDQM	<i>Polygoni multiflori caulis</i> (Shouwuteng)	33057
078	EDQM	<i>Stephania tetrandrae radix</i> (Fangji)	31412
079	EDQM	<i>Stephania tetrandrae radix</i> (Fangji)	29239
080	EDQM	<i>Dioscoreae rhizoma</i> (Shanyao)	32497
081	EDQM	<i>Dioscoreae rhizoma prep.</i> (Chaoshanyao)	32991
082	EDQM	<i>Andrographitis herba</i> (Chuanxinlian)	25820
083	EDQM	<i>Anemarrhenae rhizoma</i> (Zhimu)	32483
084	EDQM	<i>Asari radix et rhizoma</i> (Xixin)	31922
085	EDQM	<i>Scutellariae radix</i> (Huangqin)	30009
086	Finzelberg	<i>Extr. Agni casti e fruct. spir. sicc.</i>	07015255
087	Finzelberg	<i>Black Cohosh powdered extract</i>	07000485
088	Finzelberg	<i>Extr. Cardui mariae fruct. sicc.</i>	06016117
089	Finzelberg	<i>Extr. Mate e fol. aquos. sicc.</i>	07000952
090	Finzelberg	<i>Extr. Millefolii e herb. aquos. sicc.</i>	07001818
091	Finzelberg	<i>Extr. Orthosiphonis e fol. sicc.</i>	07002590
092	Finzelberg	<i>Extr. Plantaginis e fol. spir. sicc.</i>	07006345
093	Finzelberg	<i>Extr. Salicis e cort. spir. sicc.</i>	07001523
094	Finzelberg	<i>Extr. Thymi e herb. spir. sicc.</i>	07004383
095	Finzelberg	<i>Extr. Taraxaci e herb. cum rad. spir. sicc.</i>	07007852
096	Finzelberg	Chamomile e herb. with flower powdered extract	06022326
097	Finzelberg	<i>Extr. Chamomillae e flor. spiss.</i>	07000223
098	Finzelberg	<i>Extr. Matricariae fld.</i> Ph. Eur.	03130051
099	Finzelberg	<i>Extr. Maricariae e flor. sicc.</i>	03110484

100	EU- Apotheke	Matmille Extrakt - 20g Kamillenblüten- Fluidextrakt (EtOH 96% : H ₂ O : NH ₃ -Lsg. 10% [50:47,5:2,5]) in 100g Flüssigkeit)	50716
101	EU- Apotheke	Kamillosan Konzentrat - Auszug (1:4,0-4,5) aus Zungenblüten [Manzana] (EtOH 38,5% [4,7:1] etc.)	7B0090
102	EU- Apotheke	Kamillin Konzentrat Robugen – Auszug (1:1,7-2,6) aus Kamillenblüten (EtOH 48% etc)	027072
103	EU- Apotheke	Matmille N Salbe - 5g Fluidextrakt aus Kamil- lenblüten (EtOH 96% : H ₂ O : NH ₃ -Lsg. 10% [50:47,5:2,5]) in 100g Salbe	50903
104	EU- Apotheke	Proaktiv Hartkapseln - Trockenextrakt aus Weidenrinden (16–23 : 1) (H ₂ O) 480mg	760061
105	EU- Apotheke	Optovit actiFLEX Tabl. überzogen - Weiden- rinden-Trockenextrakt (8–14 : 1) (EtOH 70%) 393mg	7031061
106	EU- Apotheke	Agnus Sanol Hartkapseln - Trockenextrakt aus Keuschlammfrüchten (7–13 : 1) (EtOH 60%) 4mg	2561903
107	EU- Apotheke	Feminon C Hartkapseln - Trockenextrakt aus Cimicifugawurzelstock (4,5–8,5 : 1) (EtOH 60%) 6,5mg	6649
108	EU- Apotheke	Cefakliman mono Tropfen - Tinktur aus Cimicifugawurzelstock (1:10) (EtOH 69,7%)	62053
109	EU- Apotheke	Nephronorm med Tabl. überzogen - Trockenextrakt aus Orthosiphonblättern (8–12 :1) (EtOH 60%) 100mg	704055A
110	Merck (BfArM)	Stärke (aus Weizen) für biochem. Zwecke	K34400385509
111	Fluka (BfArM)	Stärke aus Mais	454263/1

7.2 GenBank-Sequenzen

Anhang

LOCUS **EU747086** 439 bp DNA linear PLN 24-JUN-2008
DEFINITION *Matricaria recutita* external transcribed spacer and 18S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU747086
VERSION EU747086.1 GI:190692235
SOURCE *Matricaria chamomilla* var. *recutita*
ORGANISM [Matricaria chamomilla var. recutita](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
Anthemideae; Matricariinae; Matricaria.
REFERENCE 1 (bases 1 to 439)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 439)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (23-MAY-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..439
/organism="Matricaria chamomilla var. recutita"
/mol_type="genomic DNA"
/variety="recutita"
/specimen_voucher="Berlin-Dahlem Botanical Garden 2005
DE-0-B-0790289"
/db_xref="taxon:127986"
misc_RNA <1..418
/product="external transcribed spacer"
rRNA 419..>439
/product="18S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 cgtaaagggt catgagtggg gtttggtttg ttacgtgtgg ttggctgcgg cgtttgcaac
61 aacttccatg ctttcagacc ttttcagtat tgcggcaagg cttgtatcgc cttgatcgtg
121 ttgtggggtt actgtgttga atacctaacc aatggtatcg gttggctaga tcagagtttc
181 atttcgtctt gcgttgctct tgcgacgtga ggtgaacat gatgcggtct ctttgatcca
241 ccttggtgag gcaaatgttt tgacattgtg gcacattgag cattgcttgg tctcctgtat
301 acggaacata tagtgggcat ggatctaacg attcctgttt gccctcttat tcttgcttct
361 ttaaaacgac gtgcgcaacg tgttggcttg tccagccgtt gtgctatgtc gaagaggaat
421 gctacctggt tgatcctgc
//

LOCUS **EU747087** 439 bp DNA linear PLN 24-JUN-2008
 DEFINITION *Matricaria matricarioides* external transcribed spacer and 18S
 ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU747087
 VERSION EU747087.1 GI:190692236
 SOURCE *Matricaria matricarioides*
 ORGANISM [Matricaria matricarioides](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
 asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
 Anthemideae; Matricariinae; Matricaria.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 439)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for
 identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
 preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 439)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-MAY-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
 Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..439
 /organism="Matricaria matricarioides"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Berlin-Dahlem Botanical Garden 2005
 DE-0-B-1593500"
 /db_xref="taxon:56017"
 misc_RNA <1..418
 /product="external transcribed spacer"
 rRNA 419..>439
 /product="18S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 cgtaaagggt catgagtggg gtttggtttg ttacgtgtgg ttggctgctg cgcttgcaac
 61 aacttccatg ctttcatacc tcttcagtat tgcggcaagg cttgtaatgc cttgatcgtg
 121 ttgtggggtt actgtgttga atacctaacc aatggtatcg gatggattga tcaaattttc
 181 atttcgtcct gcgttgctct tgcgatgtga ggtgaacat gatgcggtct ctttgatcca
 241 ccttgttgag gcacatgctt tgacattgtg gcacattgag cattgcttgg tctccttgat
 301 acggaacata tagtgggcat ggatctaattg attcctgttt gccctcataat tctcgcttct
 361 ttaaaacgac ttgcacaacg tggttgcttg tccaaccgtg gtgctacgtc gaagaggaat
 421 gctacctggt tgatcctgc
 //

Anhang

LOCUS **EU747090** 444 bp DNA linear PLN 24-JUN-2008
DEFINITION *Anthemis cotula* external transcribed spacer and 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU747090
VERSION EU747090.1 GI:190692239
SOURCE *Anthemis cotula*
ORGANISM [Anthemis cotula](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Anthemidinae; Anthemis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 444)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 444)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (23-MAY-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..444
/organism="Anthemis cotula"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Frankfurt-Main Botanical Garden referee Ms. Anna-Maria Lenk"
/db_xref="taxon:158220"
/collection_date="1986"
misc_RNA <1..423
/product="external transcribed spacer"
rRNA 424..>444
/product="18S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 cgtaaagggt catgagtggt gtttggttg ttacgtgtgg ttggctgcg cgcttgcaac
61 aacttccatg ctttcatacc tcttcagtta tgcgkcaagg cttgtatcgc cttgagcgtg
121 ttgtggggtt sctgtgttga atacctgatc aatggatcgc gttggataga tgaaagtttc
181 atttcgtcct gcgttgctt tgcggcgtga gatgaacct gacgcggtct ctttgatcca
241 ccttggtgaa ggaatgttc aacattgtgg ctcacgagc attgcttgg ctcttgcata
301 cggaacatat agtgggcatg gatctaacga ttcttggttg cccttatggt agcgttctcg
361 cttctctaaa acgacttgcg ctgcgtgttg gcttgccat ccgctgtgct tcgtcgaaga
421 ggaatgctac ctggttgatc ctgc
//

LOCUS **EU747088** 444 bp DNA linear PLN 24-JUN-2008
DEFINITION *Anthemis arvensis* external transcribed spacer and 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence.
ACCESSION EU747088
VERSION EU747088.1 GI:190692237
SOURCE *Anthemis arvensis*
ORGANISM [Anthemis arvensis](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
Anthemideae; Anthemidinae; Anthemis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 444)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 444)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (23-MAY-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..444
/organism="Anthemis arvensis"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Berlin-Dahlem Botanical Garden 2005
DE-0-B-2381103"
/db_xref="taxon:[127977](#)"
misc_RNA <1..423
/product="external transcribed spacer"
rRNA 424..>444
/product="18S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 cgtaaagggt catgagtggg gtttggtttg ttacgtgtgg ttggctgcgg cgcttgcaac
61 aacttccatg ctttcatacc ttttcagtta tgcggcaagg cttgtatcgc cttgagcgtt
121 ttgtggggtt gctgtgttga ataccagatc gacggatcgc gttggataga tcaaagtttc
181 atttcgtctg gcgttgcggt tgcggcgatg gatgaacat gacgcggtct ctttgatcca
241 cttgtttgaa ggaatgttc aacattgtgg ctcatcgagc attgcttggc ctcttgcata
301 cggaacatat agtgggcatg gatctaacga ttcttgttg cccttatggt agcgttctcg
361 cttctctaaa acgacttgcg ctgcgtgttg gcttgccat ccgtaatgct tcgtcgaaga
421 ggaatgctac ctggttgatc ctgc
//

Anhang

LOCUS **EU747091** 549 bp DNA linear PLN 24-JUN-2008
DEFINITION Tripleurospermum perforatum external transcribed spacer and 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU747091
VERSION EU747091.1 GI:190692240
SOURCE Tripleurospermum maritimum subsp. inodorum
ORGANISM [Tripleurospermum maritimum subsp. inodorum](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Anthemidinae; Tripleurospermum.
REFERENCE 1 (bases 1 to 549)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 549)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (23-MAY-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..549
/organism="Tripleurospermum maritimum subsp. inodorum"
/mol_type="genomic DNA"
/sub_species="inodorum"
/specimen_voucher="Frankfurt-Main Botanical Garden 2005 DE-0-OSN-2005-169"
/db_xref="taxon:99108"
misc_RNA <1..528
/product="external transcribed spacer"
rRNA 529..>549
/product="18S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 cgtaaagggt catgagtggg gtttggtttg ttacgtgtgg ttggctgcgg cgcttgcaac
61 aacttccatg ctttcatacc tcttcagtta tgcggcaagg cttgtatcgt cttgatcgtg
121 ttgtggggtt actgtggttg ttacctgatc aacggatcgt gttggataga tcaaagtttc
181 attttgcctt gatccacctt gttaaaggaa tgttttaaca ttgtggcwtg aggtgaaccc
241 tgatgcgaga tctcaaagtc ccatttcgcc ttgatccacc ttgttaaaat gaattttttt
301 aacattgtgg cgtgaggtga accatgatgc tgtctctttg atccaccttg ttaaataaat
361 tttttaacat tgtggcacat cgagcattgc ttggtctctt gcatacggaa catatagtgg
421 gcatggatct aacgattctt gtttgccgcg atatcagcgt tctcgcttct ctaaaacgac
481 ttgtgctacg tgttggtttg tccatccgta gtgctacgtc gaagaggaat gctacctggt
541 tgatcctg

//

LOCUS **EU747089** 436 bp DNA linear PLN 24-JUN-2008
 DEFINITION Chamaemelum nobile external transcribed spacer and 18S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU747089
 VERSION EU747089.1 GI:190692238
 SOURCE Chamaemelum nobile
 ORGANISM [Chamaemelum nobile](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
 asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
 Anthemideae; Mediterranean clade; Santolininae; Chamaemelum.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 436)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for
 identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
 preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 436)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-MAY-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
 Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..436
 /organism="Chamaemelum nobile"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Berlin-Dahlem Botanical Garden 2005
 FR-0-B-0190595"
 /db_xref="taxon:99037"
 misc_RNA <1..415
 /product="external transcribed spacer"
 rRNA 416..>436
 /product="18S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 cgtaaagggtg catgagtggg gtttggtttg ttacgtgtgg ttggctgctg cgcttgcaac
 61 aacttccatg ctctcatacc tcttcagtag tgcgacaagg cttgtatcgc cttgagcgtc
 121 acgtggggtt tctgtgttga atacctaac aacggatcgc gttggataga tcaaaagttt
 181 tttttcgcct tgcggttgc tgcgacgtg aggtgaacct gaatgcgttc tctttgatcc
 241 actttgtcgg agcacaagct tgcacattgt ggcacattga gtattgcttg gtttctcgta
 301 taccgaacat aacgtgggct tggatctaac gattcctgtt tgcccttgtt tcagcgtcta
 361 aaacgacttg cgctacgtgt tggcttgtcc tgccgtggtg ctacgtcgaa gaggaatgct
 421 acctggttga tctctgc
 //

Anhang

LOCUS **EU547790** 505 bp DNA linear PLN 02-APR-2008
DEFINITION *Matricaria recutita* PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
ACCESSION EU547790
VERSION EU547790.1 GI:171190833
SOURCE chloroplast *Matricaria chamomilla* var. *recutita*
ORGANISM [Matricaria chamomilla var. recutita](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Matricariinae; *Matricaria*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 505)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations, and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 505)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-MAR-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..505
/organism="Matricaria chamomilla var. recutita"
/organelle="plastid:chloroplast"
/mol_type="genomic DNA"
/variety="recutita"
/specimen_voucher="B:Index Seminum 2005 DE-0-B-0790289"
/db_xref="taxon:[127986](#)"
gene <1..75
/gene="psbA"
CDS <1..75
/gene="psbA"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="PsbA"
/protein_id="[ACB44978.1](#)"
/db_xref="GI:171190834"
/translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPSTNG"
misc_feature 76..452
/note="psbA-trnH intergenic spacer"
gene 453..>505
/gene="trnH"
tRNA 453..>505
/gene="trnH"
/product="tRNA-His"
ORIGIN
1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataatttc cctctagact tagctgctat tgaagctcca
61 tctacaaatg gataagactt ttgtctgatt gtataggagt ttttgaacta aaaaaggagc
121 aatagctttc ctcttgTTTT atcaagaggg cgttattgct ccttttttta ttagtacta
181 tttgccttag acagtttctt taaaaataat aaggactttt tatagtttg ttcgattcgc
241 gtgttttcgc tttgtattca tttatattat aggtttttat attctattcc aaatttttta
301 tgaagtttta ttttcaattc aatttcaaac caaaatctat aaaaataaaa tttttgctat
361 tacttttgatt tcataaataa aaaagaaata atatgctctt ttttatgttg aggtaaaaat
421 atagataata ctagatagat atatagtaga ggggCGGatg tagccaagtG gatcaaggca
481 gtggattgtg aatccaccat gcgcg
//

LOCUS **EU547791** 505 bp DNA linear PLN 02-APR-2008
 DEFINITION *Matricaria matricarioides* PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
 ACCESSION EU547791
 VERSION EU547791.1 GI:171190835
 SOURCE chloroplast *Matricaria matricarioides*
 ORGANISM [Matricaria matricarioides](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Matricariinae; Matricaria.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 505)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations, and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 505)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-MAR-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..505
 /organism="Matricaria matricarioides"
 /organelle="plastid:chloroplast"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="B:Index Seminum 2005 DE-0-B-1593500"
 /db_xref="taxon:56017"
 gene <1..75
 /gene="psbA"
 CDS <1..75
 /gene="psbA"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="PsbA"
 /protein_id="ACB44979.1"
 /db_xref="GI:171190836"
 /translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPSTNG"
 misc_feature 76..452
 /note="psbA-trnH intergenic spacer"
 gene 453..>505
 /gene="trnH"
 tRNA 453..>505
 /gene="trnH"
 /product="tRNA-His"
 ORIGIN
 1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataatttc cctctagact tagctgctat tgaagctcca
 61 tctacaaatg gataagactt ttgtctgatt gtataggagt ttttgaacta aaaaaggagc
 121 aatagctttc ctcttgTTTT atcaagaggg cgttattgct ccttttttta tttagtacta
 181 tttgccttag acagtttctt taaaaataat aaggactttt tatagtttgg ttcgattcgc
 241 gtgttttcgc tttgtattca tttatattat aggtttttat attctattcc aaatttttta
 301 tgaagtttta ttttcaattc aatttcaaac caaaatctat aaaaataaaa tttttgctat
 361 tacttttgatt tcataaataa aaaagaaata atatgctctt ttttatgttg aggtaaaaat
 421 atagataata ctagatagat atatagtaga ggggcggatg tagccaagtg gatcaaggca
 481 gtggattgtg aatccacat gcgcg
 //

LOCUS **EU547794** 519 bp DNA linear PLN 02-APR-2008
DEFINITION *Anthemis cotula* PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
ACCESSION EU547794
VERSION EU547794.1 GI:171190841
SOURCE chloroplast *Anthemis cotula*
ORGANISM [Anthemis cotula](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Anthemidinae; Anthemis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 519)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations, and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 519)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-MAR-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..519
/organism="Anthemis cotula"
/organelle="plastid:chloroplast"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="FR:harvested in 1986 [storage at -20degC; referee Ms. Anna-Maria Lenk]"
/db_xref="taxon:[158220](#)"
gene <1..75
/gene="psbA"
CDS <1..75
/gene="psbA"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="PsbA"
/protein_id="[ACB44982.1](#)"
/db_xref="GI:171190842"
/translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPSTNG"
misc_feature 76..466
/note="psbA-trnH intergenic spacer"
gene 467..>519
/gene="trnH"
tRNA 467..>519
/gene="trnH"
/product="tRNA-His"
ORIGIN
1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataatttc cctctagact tagctgctat tgaagctcca
61 tctacaaatg gataagactt tggctctgatt gtatacgagt ttttgaacta aaaaaggagc
121 aatagctttc ctcttgTTTT atcaagaggg cgttattgct cctttttttt atttagtact
181 atttgcctta cacagtttct ttaaaaataa taaggacttt ttatagtttg gttcgattcg
241 cgtgTTTTct ctttgatttc atttatatta taggtttgta tattgtattc caaatttttt
301 atgaagtttg atttccaatt caatttcaaa ccaaaatcta taaaattca atttttccta
361 ttacttttat ttcataaata aaaaagaaat aatatataat atgctctttt ttatgttgag
421 gtcaaaatat agataatact agtactagat agatatatag tagaggggcg gatgtagcca
481 agtggatcaa ggcagtggat tgtgaatcca ccatgctgag
//

LOCUS **EU547792** 519 bp DNA linear PLN 02-APR-2008
 DEFINITION *Anthemis arvensis* PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
 ACCESSION EU547792
 VERSION EU547792.1 GI:171190837
 SOURCE chloroplast *Anthemis arvensis*
 ORGANISM [Anthemis arvensis](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Anthemidinae; Anthemis.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 519)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations, and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 519)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-MAR-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..519
 /organism="Anthemis arvensis"
 /organelle="plastid:chloroplast"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="B:Index Seminum 2005 DE-0-B-2381103"
 /db_xref="taxon:[127977](#)"
 gene <1..75
 /gene="psbA"
 CDS <1..75
 /gene="psbA"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="PsbA"
 /protein_id="[ACB44980.1](#)"
 /db_xref="GI:171190838"
 /translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPSTNG"
 misc_feature 76..466
 /note="psbA-trnH intergenic spacer"
 gene 467..>519
 /gene="trnH"
 tRNA 467..>519
 /gene="trnH"
 /product="tRNA-His"
 ORIGIN
 1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataatttc cctctagact tagctgctat tgaagctcca
 61 tctacaaatg gataagactt tggctctgatt gtatacgagt ttttgaacta aaaaaggagc
 121 aatagctttc ctcttgTTTT atcaagaggg cgttattgct ccttttttta ttagtacta
 181 tttgccttac acagtttctt taaaaataat aaggactttt tatagtttag ttcgattcgc
 241 gtgttttctc tttgtattca tttatattat aggtttgtat ttgtatttgt atattctatt
 301 ccaaattttt tatgaagttt gatttmcaat tcaatttcaa accaaaatct ataaaaattc
 361 aatttttctc attactttta tttaataaat aaaaaagaaa taacatgctc ttttttatgt
 421 tgagggtcaa atatagataa tactagtact agatatatag tagaggggcg gatgtagcca
 481 agtggatcaa ggcagtggat tgtgaatcca ccatgctcgc
 //

LOCUS **EU547795** 514 bp DNA linear PLN 02-APR-2008
 DEFINITION Tripleurospermum perforatum PsbA (psbA) gene, partial cds;
 psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH)
 gene, partial sequence; chloroplast.
 ACCESSION EU547795
 VERSION EU547795.1 GI:171190843
 SOURCE chloroplast Tripleurospermum maritimum subsp. inodorum
 ORGANISM [Tripleurospermum maritimum subsp. inodorum](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
 asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
 Anthemideae; Anthemidinae; Tripleurospermum.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 514)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for
 identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
 preparations, and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 514)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-MAR-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
 Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..514
 /organism="Tripleurospermum maritimum subsp. inodorum"
 /organelle="plastid:chloroplast"
 /mol_type="genomic DNA"
 /sub_species="inodorum"
 /specimen_voucher="FR:Index Seminum 2005
 DE-0-OSN-2005-169"
 /db_xref="taxon:[99108](#)"
 gene <1..75
 /gene="psbA"
 CDS <1..75
 /gene="psbA"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="PsbA"
 /protein_id="[ACB44983.1](#)"
 /db_xref="GI:171190844"
 /translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPSTNG"
 misc_feature 76..461
 /note="psbA-trnH intergenic spacer"
 gene 462..>514
 /gene="trnH"
 tRNA 462..>514
 /gene="trnH"
 /product="tRNA-His"
 ORIGIN
 1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataatttc cctctagact tagctgctat tgaagctcca
 61 tctacaaatg gataagactt tggctctgatt gtataggagt ttttgaacta aaaaaggagc
 121 aatagctttc ctcttgtttt atcaagaggg cgttattgct ccttttttta ttagtacta
 181 tttgccttac acagtttctt taaaaataat aaggactttt ttatagtttg gttcgattcg
 241 cgtgttttct ctttgatttc atttatatta taggtttttt ttgtatattc tattccaaat
 301 tttttatgaa gttttatttt caattcaatt tcaaaccaa atctataaaa attcaatttt
 361 tctattact ttgatttcat aaataaaaaa gaaataatat gctcttttta tgttgagta
 421 aaaatataga taatattaga tagatagata tatagtagag gggcggatgt agccaagtgg
 481 atcaaggcag tggattgtga atccaccatg cgcg //

LOCUS **EU547793** 548 bp DNA linear PLN 02-APR-2008

DEFINITION *Chamaemelum nobile* PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.

ACCESSION EU547793

VERSION EU547793.1 GI:171190839

SOURCE chloroplast *Chamaemelum nobile*

ORGANISM [Chamaemelum nobile](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Mediterranean clade; Santolininae; *Chamaemelum*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 548)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations, and finished products
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 548)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (06-MAR-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany

FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..548
/organism="Chamaemelum nobile"
/organelle="plastid:chloroplast"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="B:Index Seminum 2005 FR-0-B-0190595"
/db_xref="taxon:99037"

gene <1..75
/gene="psbA"

CDS <1..75
/gene="psbA"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="PsbA"
/protein_id="ACB44981.1"
/db_xref="GI:171190840"
/translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPSTNG"

misc_feature 76..495
/note="psbA-trnH intergenic spacer"

gene 496..>548
/gene="trnH"

tRNA 496..>548
/gene="trnH"
/product="tRNA-His"

ORIGIN
1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataatttc cctctagact tagctgctat tgaagctcca
61 tctacaaatg gataagactt tcgtctaatt gattgtatag gagtttttga actaaaaaag
121 gagcaatagc tttcctcttg ttttagcaag agggcggtat tgctcctttt tttatttagt
181 actatgttgc ttacacagtt tctttaaaaa taataaggac tttttatttt tattttatag
241 tttggttcga ttgcggtgtt ttatctttgt attcatttat attatatata ggtttgattt
301 gtatatttcta ttccaaattt tttatgaagt tttatttcga agtcaatttc aaacccaaat
361 atataaaaaat ttcatttttg ttattacttt gatttcatac ttttatttca taaataaaaa
421 agaaataata tgttcttttt tatgttgaga taaaaatata gataatacta gaactagata
481 gatatatagt agaggggvcg atgtagccaa gtggatcaag gcagtggatt gtgaatccac
541 catgvcgcg

//

LOCUS **EU785933** 506 bp DNA linear PLN 01-JUL-2008
DEFINITION Echinacea angustifolia PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
ACCESSION EU785933
VERSION EU785933.1 GI:193075632
SOURCE chloroplast Echinacea angustifolia
ORGANISM [Echinacea angustifolia](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
REFERENCE 1 (bases 1 to 506)
AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 506)
AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (02-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..506
/organism="Echinacea angustifolia"
/organelle="plastid:chloroplast"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Prof. Rudolf Bauer; Graz (Austria); [Sandfort GmbH & Co. KG, batch-no. 2030817]"
/db_xref="taxon:[308558](#)"
gene <1..75
/gene="psbA"
CDS <1..75
/gene="psbA"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="PsbA"
/protein_id="[ACF08714.1](#)"
/db_xref="GI:193075633"
/translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPSTNG"
misc_feature 76..452
/note="psbA-trnH intergenic spacer"
gene 453..>506
/gene="trnH"
tRNA 453..>506
/gene="trnH"
/product="tRNA-His"
ORIGIN
1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataatttc cctctagact tagctgctat tgaagctcca
61 tctacaaatg gataagcctt tgggtctgatt gtataggagt ttttgaacta aaaaaggagc
121 aataacgccc tcttgataaa acaagagga agctattgct ccttttttta ttagtacta
181 tttgccttac atagtttctt taaaaataac aagtactttt tatagtttg ttcgatttgc
241 gtgttttttc tttgtattca tttatattat aggtttctat atcatatatt tttcccaatc
301 ttttatgaag ttttatttac aatttaattt caatcgaaaa tagagaaaa tgacaatttt
361 gcttttttat ttatattgat taaatcaaaa taagaaagaa tatgcttttt tatgttaatg
421 gaaaaatata gtaatactag ataatcgtag aggggcgat gtagccaagt ggatcaaggc
481 agtggattgt gaatccacca tgcgcg
//

LOCUS **EU785934** 508 bp DNA linear PLN 01-JUL-2008
 DEFINITION *Echinacea purpurea* PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
 ACCESSION EU785934
 VERSION EU785934.1 GI:193075634
 SOURCE chloroplast *Echinacea purpurea*
 ORGANISM [Echinacea purpurea](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 508)
 AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 508)
 AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..508
 /organism="Echinacea purpurea"
 /organelle="plastid:chloroplast"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Prof. Rudolf Bauer; Graz (Austria); [Dodson & Horrell]"
 /db_xref="taxon:53751"
 gene <1..75
 /gene="psbA"
 CDS <1..75
 /gene="psbA"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="PsbA"
 /protein_id="ACF08715.1"
 /db_xref="GI:193075635"
 /translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPYTNG"
 misc_feature 76..454
 /note="psbA-trnH intergenic spacer"
 gene 455..>508
 /gene="trnH"
 tRNA 455..>508
 /gene="trnH"
 /product="tRNA-His"
 ORIGIN
 1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataatttc cctctagact tagctgctat tgaagctcca
 61 tatacaaagt gataagcctt tgggtctgatt gtataggagt ttttgaacta aaaaaggagc
 121 aataacgccc tcttgataaa acaagagga agctattgct cctttttttt atttagtact
 181 atttgcctta catagtttct ttaaaaataa caagtacttt ttatagtttg gttcgatttg
 241 cgtgtttttt ctttgatttc atttatatta taggttttcta tatcatatat ttttcccaat
 301 cttttatgaa gttttattta caatttaatt tcaatcgaaa atagagaaaa atgacaattt
 361 tgctttttga tttatattga ttaaatcaaa ataagaaaga atatgctttt tttatgtaa
 421 tggaaaaata tagtaatact agataatcgt agaggggvcg atgtagccaa gtggatcaag
 481 gcagtgatt gtgaatccac catgvcgcg
 //

LOCUS **EU785935** 508 bp DNA linear PLN 01-JUL-2008
DEFINITION *Echinacea pallida* PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
ACCESSION EU785935
VERSION EU785935.1 GI:193075636
SOURCE chloroplast *Echinacea pallida*
ORGANISM [Echinacea pallida](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
REFERENCE 1 (bases 1 to 508)
AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 508)
AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (02-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..508
/organism="Echinacea pallida"
/organelle="plastid:chloroplast"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Prof. Rudolf Bauer; Graz (Austria); [Sandfort GmbH & Co. KG]"
/db_xref="taxon:53749"
gene <1..75
/gene="psbA"
CDS <1..75
/gene="psbA"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="PsbA"
/protein_id="ACF08716.1"
/db_xref="GI:193075637"
/translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPSTNG"
misc_feature 76..454
/note="psbA-trnH intergenic spacer"
gene 455..>508
/gene="trnH"
tRNA 455..>508
/gene="trnH"
/product="tRNA-His"
ORIGIN
1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataatttc cctctagact tagctgctat tgaagctcca
61 tctacaaatg gataagcctt tgggtctgatt gtataggagt ttttgaacta aaaaaggagc
121 aataacgccc tcttgataaa acaagagga agctattgct ccttttttta ttagtacta
181 tttgccttac atagtttctt taaaaataac aagtactttt tatagtttg ttcgatttgc
241 gtgttttttc tttgtattca tttatattat aggtttctat atcatttatt tttcccaatc
301 ttttatgaag ttttatttac aatttaattt caatcgaaaa tagagaaaa tgacaatttt
361 gctttttgat ttatattgat taaatcaaaa taagaaagaa tatgcttttt ttatgttaat
421 ggaaaaaata tagtaatact agataatcgt agaggggcg agtagccaa gtggatcaag
481 gcagtgatt gtgaatccac catgcgac
//

LOCUS **HM032736** 666 bp DNA linear PLN 04-MAY-2010
 DEFINITION *Arnica montana* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION HM032736
 VERSION HM032736.1 GI:295413450
 SOURCE *Arnica montana*
 ORGANISM [Arnica montana](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Heliantheae alliance; Madieae; Arnicinae; Arnica.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 666)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 666)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-MAR-2010) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..666
 /organism="Arnica montana"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Alfred Galke batch no. 0000010985"
 /db_xref="taxon:[436207](#)"
 /note="authority: *Arnica montana* L."
 rRNA <1..7
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 8..267
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 268..427
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 428..650
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 651..>666
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 atcattgtcg aatcctgcat agcagaacga cccgtgaaca cgtacaaca catggcttaa
 61 agaggaccga tccatttgtt tcgggcctcg ttaagccccg ycgacattgt gtttatgatac
 121 tcctcttttag gactcatgga catcatgcyg gcacaacaac aacccccggc acaacatgtg
 181 ccaaggaaaa ccaaacttaa gaaggcctgt gccatgacac cctktttctg gtgggtgtca
 241 ttgtgtgtgg cttctttcaa atcttaaactg actctcggca acggatatct cggctcacgc
 301 atcgatgaag aacgtagcaa aatgcgatac ttgggtgtgaa ttgcagaatc ccgtgaacca
 361 tcgagttttt gaacgcaagt tgcgcccga gccttctggt tgagggcacg tctgcctggg
 421 cgtcacgcat caygtcgccc ccaccaatca tccttgctag gatacgttg atgtggggcg
 481 agattggcct cccgtgttaa tgacgcggtt ggcctaaata tgagtcccaw caagagggac
 541 gcacgactag tgggtggtga ttacacagtc gtctcgtgcc gtgcgtcttg attcttgagg
 601 ggtaaggctc ttaaaatacc ctgatgtgtt gtcttmtgat ggtgcttcga tcgcgacccc
 661 aggtca
 //

Anhang

LOCUS **EF437225** 645 bp DNA linear PLN 19-MAR-2007
DEFINITION *Lavandula angustifolia* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EF437225
VERSION EF437225.1 GI:130917349
SOURCE *Lavandula angustifolia*
ORGANISM [Lavandula angustifolia](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Nepetoideae; Lavanduleae;
Lavandula.
REFERENCE 1 (bases 1 to 645)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 645)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (14-FEB-2007) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..645
/organism="Lavandula angustifolia"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:39329"
rRNA <1..7
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 8..239
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 240..399
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 400..629
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 630..>645
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 atcattgtcg aaacctgcaa ggcagaccgc gaacacgtgt ttaactccgc gggaccgttg
61 tgcggcgcgga gccccacgcc gatccccgctc ccgtcggtgc acgcgcaccc gtgcgccgca
121 gcgttcgggc ttaactcacc ccggcgcgga atgcgccaag gaaaacaaaa tgaagcgtcg
181 gccctccgca tcccgttcgc ggggcrtgcy ggggcagcgg gcgtctatcg aatgtcataa
241 cgactctcgg caacggatat ctccggtctc gcatcgatga agaacgtagc gaaatgcgat
301 acttgggtgtg aattgcagaa tcccgtgaac catcgagtct ttgaacgcaa gttgcgccc
361 aggccattcg gctgagggca cgtctgcctg ggcgtcacgc atcgcgtcgc cccctccacc
421 cgcgcaactgc gctcgtagag ggggcggata ttggccccc gtgtgctccg gcacgcggtc
481 ggcccaaatg cgatccccg gcgactcatg tcgcgggccag tgggtggtga acatatcaat
541 ctcggtctct gccgcgtcgt tgagccgtcg gacgtgatct cgttaacgac ccaacggtgt
601 gagcgcaccc cgtgcgcgcy cgccctcgac cgcgacccca ggtca
//

LOCUS **EU785942** 642 bp DNA linear PLN 02-JUL-2008
 DEFINITION *Crataegus laevigata* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU785942
 VERSION EU785942.1 GI:193084969
 SOURCE *Crataegus laevigata*
 ORGANISM [Crataegus laevigata](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; rosids; fabids; Rosales; Rosaceae; Maloideae; Maleae; *Crataegus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 642)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 642)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..642
 /organism="Crataegus laevigata"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Alfred Galke [batch-no. 0000010969]"
 /db_xref="taxon:298643"
 rRNA <1..33
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 34..254
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 255..414
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 415..626
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 627..>642
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgaacc tgcgcagcag aacgaccgca
 61 gaaccagttt caacgccggg gccccggcgg gccttcgggc tcggcgtccc ctgcgctccc
 121 gggagcccgc tcccgggcgc acaaaacgaa caccggcgcg ttttgcgcca aggaacctga
 181 acgaaagacc gcgctcccga cgccccgga acggtgcgcg cgcgggcgcg tcgtcgtctt
 241 cgatatatgt caaaacgact ctgggcaacg gatatctcgg ctctcgcac gatgaagaac
 301 gtagcgaaat gcgatacttg gtgtgaattg cagaatcccg tgaaccatcg agtctttgaa
 361 cgcaagttgc gcccgagcc tctaggccga gggcacgcct gcctgggctg cagcgccgt
 421 tgccccccct cgcctcctc gggagcgtcg gcgggcggac gatggcctcc cgtgcgccac
 481 ccgcgcgggt tggcccaaat gtcgagtcgc cggcgacgaa cgccacgaca atcggtggtt
 541 gtcaaacctc ggttgctgt tgtgcgctt cgcgcgctg cgggcggctc gcgaccatcg
 601 cggctctgct tcggcggagc ttttcaacgc gacccaggt ca
 //

Anhang

LOCUS **EU796896** 660 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
DEFINITION *Prunus spinosa* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU796896
VERSION EU796896.1 GI:193735353
SOURCE *Prunus spinosa*
ORGANISM [Prunus spinosa](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; rosids; fabids; Rosales; Rosaceae; Maloideae; Amygdaleae; *Prunus*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 660)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 660)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..660
/organism="Prunus spinosa"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Alfred Galke, batch-no. 1498"
/db_xref="taxon:[114937](#)"
rRNA <1..33
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 34..277
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 278..437
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 438..644
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 645..>660
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgaaac ctgcctagca gaacgaccg
61 agaactagtt tcaaagcggg ggacgagggg ccgtctcggc gtgctcctcg tccctttatc
121 tcgggggggt tgcgttgccg tcgcgagcc ggccccttc gagcgtacaa acgaacaccg
181 gcgcgaattg cgccaaggaa cttgaacgag agagcgcgtc cccatcgccc cggaaacggt
241 gtgcgcgggc ggcgtcgtca ttttcaaata tgtcaaaacg actctcgga acggatatct
301 cggctctcgc atcgatgaag aacgtagcga aatgcgatac ttgggtgtgaa ttgcagaatc
361 ccgtgaacca tcgagtcctt gaacgcaagt tgcgcccga gccattaggc cgagggcacg
421 cctgcctggg cgtcacacrt cgttgcccc ccatcaactc cttcgggatt gcggggggcg
481 gatgatggc tcccgtgccc ctcgtcggc ggttgccata aatgccaagt cctcggcgac
541 gcacgccacg acaatcggtg gttgcgaaac ctcggttgc cgtcgtgtgc ggtcgtcgcg
601 catcgagggc tcgaaaaaat tgccgggctc cggctcggct ttcaacgcga ccccaggta
//

LOCUS **EU179212** 669 bp DNA linear PLN 20-OCT-2007
 DEFINITION *Matricaria recutita* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU179212
 VERSION EU179212.1 GI:158266467
 SOURCE *Matricaria chamomilla* var. *recutita*
 ORGANISM [Matricaria chamomilla](#) var. [recutita](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Matricariinae; *Matricaria*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 669)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 669)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (26-SEP-2007) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..669
 /organism="Matricaria chamomilla var. recutita"
 /mol_type="genomic DNA"
 /variety="recutita"
 /specimen_voucher="Berlin-Dahlem Botanical Garden (Index Seminum 2005:DE-0-B-0790289) "
 /db_xref="taxon:[127986](#)"
 rRNA <1..7
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 8..264
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 265..424
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 425..627
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 628..>669
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 atcattgtcg aaccctgcaa agcagaacga cccgtgaaca cgtaaaaaca accgagtgtc
 61 gagtggggtg agcacttggt tgatcctctc gatgctttgt cgatgtgcat ttgcttgtgt
 121 tcttttgac atggtgaatg tttcattggc gcaataaaa cccccggcac aatgtgtgcc
 181 aaggaaaact aaacttgaga aggcttgttt catgttgccc cgttcgcgt gtgctcatgg
 241 gatgtggctt cttataatt acaaacgact ctcggaacg gatatctcg ctcacgcatc
 301 gatgaagaac gtagcaaat gcgatacttg gtgtgaattg cagaatccc tgaaccatcg
 361 agtttttgaa cgcaagttgc gccgaagcc ttttgccga gggcacgtct gcctgggct
 421 cacgcatcgc gtcgccccca acaactatg ttggggcg atattggtct cccgtgctta
 481 tggcgtggtt ggccaaaata ggagtcctt cgatggacgc acgaactagt ggtggtcgta
 541 aaaaccctcg ttctttgttt tgtgtcgtc gtcgcaagga taagctctct aaaaaccca
 601 atgtgttgc ttaggatgac gcttcgaccg cgaccccagg tcaggcggga ctaccgctg
 661 agttaaagc
 //

Anhang

LOCUS **EU179213** 668 bp DNA linear PLN 20-OCT-2007
DEFINITION *Matricaria matricarioides* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU179213
VERSION EU179213.1 GI:158266468
SOURCE *Matricaria discoidea*
ORGANISM [Matricaria discoidea](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Matricariinae; *Matricaria*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 668)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 668)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (26-SEP-2007) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..668
/organism="Matricaria discoidea"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Berlin-Dahlem Botanical Garden (Index Seminum 2005:DE-0-B-1593500)"
/db_xref="taxon:883867"
rRNA <1..7
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 8..264
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 265..424
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 425..626
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 627..>668
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 atcattgtcg aaccctgcaa agcagaacga cccgtgaaca cgtaaaaaca accgagcgtc
61 aagtgggtta agcacttgtt tgatcctctt gatgctttgt caatgtgcat ttgcttgtgt
121 tcttttggac ctggtgatg tttcattggc gactaaciaa cccccggcac aatgtgtgcc
181 aaggaaaact aaacttgaga aggcttgttt catgttgccc cgttcgcggt gtgctcatgg
241 gatgtggctt ctttataatt acaaacgact ctggcaacg gatatctcgg ctcacgcatc
301 gatgaagaac gtagcaaaat gcgatacttg gtgtgaattg cagaatcccg tgaaccatcg
361 agtttttgaa cgcaagttgc gcccaagcc ttttggccga gggcacgtct gcctgggcgt
421 cacgcatcgc gtcgccctca acaaactatg ttgggggcg atattggtct cccgtgctta
481 tgggtgtggt ggccaaaata ggagtcctct cgatggacgc acgaactagt ggtggtcgta
541 aaaaccctcg ttctttgttt tgtgtgtcgc gtcgtaagga tcagctctct aaatacccaa
601 tgtgtgtgct taggatgacg cttcgaccgc gacccaggt caggcgggac tacccgctga
661 gtttaagc
//

LOCUS **EU179216** 666 bp DNA linear PLN 20-OCT-2007
 DEFINITION *Anthemis cotula* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU179216
 VERSION EU179216.1 GI:158266471
 SOURCE *Anthemis cotula*
 ORGANISM [Anthemis cotula](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Anthemidinae; Anthemis.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 666)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 666)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (26-SEP-2007) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..666
 /organism="Anthemis cotula"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Frankfurt-Main Botanical Garden (harvest in 1986 [storage at -20degC; referee Ms. Anna-Maria Lenk])"
 /db_xref="taxon:158220"
 rRNA <1..7
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 8..262
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 263..422
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 423..624
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 625..>666
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 atcattgtcg aaccctgcaa agcagaacga cccgccaaca cgtaaaacaa ccgagcgtcg
 61 attgaattaa ggtttgtttg atacactcga tgctctgtcg atgtgcattt gcttttgttc
 121 ttttgacat ggtgaatgtg tcattcgcgc aataacaacc cccggcaca tgtgtgcaa
 181 ggaaaactaa acttaagaag gcttgtttta tgggccccg ttcgcggtgt gctcatgaga
 241 cgtggcttct ttataattac taacgactct cggcaacgga tatctcggct cacgcatcga
 301 tgaagaacgt agcaaaatgc gatacttggg gtgaattgca gaatcccgtg aaccatcgag
 361 tttttgaacg caagttgcgc ccgaagcctt ttggccgagg gcacgtctgc ctgggcgtca
 421 cgcacgcgct cgcccccaac aaatcattgt tggggcgga tattggtctc ccgtgctcat
 481 ggtgtggttg gccaaaatag gagtccttc gatggacgca cgaactagtg gtggatgtaa
 541 aaaccctcgt tctttgttct gtgtcagtcg caaggaaaa ctctttgaat accccaatg
 601 tgttgctctt tgatgacgct tcgaccgcga cccaggtca ggcgggacta cccgctgagt
 661 ttaagc
 //

Anhang

LOCUS **EU179214** 667 bp DNA linear PLN 20-OCT-2007
DEFINITION *Anthemis arvensis* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU179214
VERSION EU179214.1 GI:158266469
SOURCE *Anthemis arvensis*
ORGANISM [Anthemis arvensis](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
Anthemideae; Anthemidinae; Anthemis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 667)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 667)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (26-SEP-2007) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..667
/organism="Anthemis arvensis"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Berlin-Dahlem Botanical Garden (Index
Seminum 2005:DE-0-B-2381103)"
/db_xref="taxon:127977"
rRNA <1..7
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 8..264
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 265..424
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 425..625
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 626..>667
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 atcattgtcg aaccctgcaa agcagaacga cccgtgaaca cgtaaaaaca actgagcgtc
61 gagtgaattg aggaatgttt gattacaactc gatgctctgt cgatgtgcat tcaacttttgt
121 tcttttggac atggcgaatg tgtcgttggc gcaataacaa accccggcac aatgtgtgcc
181 aaggaaaact aaacttaaga aggcttgttt tatgttgccc cgttcgcggt gtgctcatga
241 gacgtggcct ctttataatt acaaacgact ctccgcaacg gatatctcgg ctcacgcac
301 gatgaagaac gtagcaaaat gcgatacttg gtgtgaattg cagaatcccg tgaaccatcg
361 agtttttgaa cgcaagttgc gcccaagcc ttttggctga gggcacgtct gcctgggcgt
421 cacgcacgc gtcgccccct gcaaatcatt gtttggggcg gatattggtc tcccgtgctc
481 atggcgtggt tggccaaaat aggagtccct tcgatggacg cacgaactag tgggtgatgt
541 aaaaaccctc gttctttgtt ctgtgttagt cgcaaggaat aactctttga ataccccaac
601 gtgttgctct ttgatgacgc ttcgaccgac accccaggtc aggcgggact acccgctgag
661 ttttaagc
//

LOCUS **JF907423** 683 bp DNA linear PLN 17-JUL-2011
 DEFINITION *Tripleurospermum maritimum* subsp. *inodorum* voucher OSBU:2005 DE-0-OSN-2005-169 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION JF907423
 VERSION JF907423.1 GI:339787697
 SOURCE *Tripleurospermum maritimum* subsp. *inodorum*
 ORGANISM [Tripleurospermum maritimum subsp. inodorum](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Anthemideae; Anthemidinae; *Tripleurospermum*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 683)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 683)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-APR-2011) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..683
 /organism="Tripleurospermum maritimum subsp. inodorum"
 /mol_type="genomic DNA"
 /sub_species="inodorum"
 /specimen_voucher="OSBU:2005 DE-0-OSN-2005-169; Osnabrueck Botanical Garden"
 /db_xref="taxon:99108"
 rRNA <1..21
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 22..280
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 281..440
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 441..641
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 642..>683
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gaacctgctg aaggatcatt gtcgaaccct gcaaagcaga acgaccctgt aacacgtaaa
 61 aacaactgag cgtcgagagt ggaccaagga atttttgaat aactcgtatg ctttgtcgat
 121 gygcatttac ctttgttctt ttggacttgg tgaatgtgtc attggcgcaa taacaacccc
 181 cggcacaatg tgtgccaagg aaaactaac ttaagaaggc ttgttttatg ttgcccgtt
 241 tgcggtgtgc tcatggaacg tggcttcttt ataattaca acgactctcg gcaacggata
 301 tctcggctca cgcacgatg aagaacgtag caaatgcga tacttggtgt gaattgcaga
 361 atcccgtgaa ccatcgagt tttgaacgca agttgcgccc gaagcctttt ggccgagggc
 421 acgtctgctt gggcgctcac catcgctcgc cctccaacaa atatwtgttg ggggaggata
 481 ttggtctccc gtgctcatgg tgtggttggc caaataaga gtcccttcca tggacgcacg
 541 aactagtggt ggtcgtaaaa accctcgttc tttgttctgt gttagtygca aggaawaact
 601 ctytaaatac cccaatgtgt tgtctttgga tgacgcttcg accgcgaccc caggtcaggc
 661 gggactaccc gctgagtta agc
 //

Anhang

LOCUS **EU179215** 669 bp DNA linear PLN 20-OCT-2007
DEFINITION Chamaemelum nobile 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU179215
VERSION EU179215.1 GI:158266470
SOURCE Chamaemelum nobile
ORGANISM [Chamaemelum nobile](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
Anthemideae; Mediterranean clade; Santolininae; Chamaemelum.
REFERENCE 1 (bases 1 to 669)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 669)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (26-SEP-2007) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..669
/organism="Chamaemelum nobile"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Berlin-Dahlem Botanical Garden (Index
Seminum 2005:FR-0-B-0190595)"
/db_xref="taxon:99037"
rRNA <1..7
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 8..263
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 264..423
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 424..627
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 628..>669
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 atcattgtcg aaccctgcaa agcagaacga cccgtgaaca cgtaaaaata acgagcgtcg
61 agtggattaa gcgcttgttt gatcctctcg atgctttgtc gatgtgcatt cacttgagtc
121 ctttggggtc atgtgagtgt gtcattggcg caataacaac ccccggcaca acgtgtgcca
181 aggaatacta aacgtaagaa ggcttgtttc atgttgcccc gttcgcggtg tgctcatggg
241 atgtggcttc tttataatca caaacgactc tcggcaacgg atatctcggc tcacgcatcg
301 atgaagaac tagcaaaatg cgatacttgg tgtgaattgc agaatcccgt gaaccatcga
361 gtttttgaac gcaagttgcg cccgaagcct tttggctgag ggcacgtctg cctgggcgtc
421 acgcatcgcg tcgccccctg caaatcttgg ttgggggcg atattggtct cccgtgctaa
481 tggcgtggtt ggccaaaata ggagtcctct cgatggggcg acaaactagt ggtggtcgta
541 aaaaccctcg ttctttgttt tgtgtcgcac gttgctagga agcactctct aaataacca
601 ttgtgttgc ttaggatgac gcttcgaccg cgaccccagg tcaggcggga ctaccgctg
661 agttaaagc
//

```

LOCUS      EU785941                684 bp    DNA        linear    PLN 02-JUL-2008
DEFINITION Tussilago farfara 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
            internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
            internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  EU785941
VERSION    EU785941.1  GI:193084968
SOURCE     Tussilago farfara
ORGANISM   Tussilago farfara
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
            asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
            Senecioneae; Tussilagininae; Tussilago.
REFERENCE  1 (bases 1 to 684)
AUTHORS    Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE      Development and validation of molecular biological methods for
            identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
            preparations and finished products
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 684)
AUTHORS    Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (03-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
            Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
            source                1..684
                                   /organism="Tussilago farfara"
                                   /mol_type="genomic DNA"
                                   /specimen_voucher="Caesar & Loretz [batch-no. 40923276]"
                                   /db_xref="taxon:118778"
            rRNA                  <1..33
                                   /product="18S ribosomal RNA"
            misc_RNA              34..292
                                   /product="internal transcribed spacer 1"
            rRNA                  293..442
                                   /product="5.8S ribosomal RNA"
            misc_RNA              443..668
                                   /product="internal transcribed spacer 2"
            rRNA                  669..>684
                                   /product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1  gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgaaac ctgcatagca aaacgacctg
61  tgaacatggt acaacaatct tgtctcctta gagttgggct cttgttcgat tctttggatt
121 ccttgatgat gtgcatcttt ggttagccta tccggttcta aagatgttat gttggcctaa
181 taacaacccc cggcacggca tgtgccaaag aaaatcaaac ttaagaaggg ctcgatatcaa
241 gtcccccgtt ttgctggggt ttgcatggga cgtggcttct ttgtaataat aaacgactct
301 cggcaacgga tatctcggct cagcatcgga tgaagaacgt agcaaaatgc gatacttggg
361 gtgaattgca gaatcccgtg aaccatcgag tttttgaacg caagttgctg ccaaagcctt
421 ttggctgagg gcacgtctgc ctgggcgtca catatcgcgt cgcccctacc atgccttctt
481 gatagggatg cttggattgg ggcggagatt ggtctcccgt tcctatgggt cggttggcta
541 aaactggagt cctcttcaac ggacgcatga ttagtggtgg ttgagaagac cctcttatca
601 agttgtgtgt tccaaggagc agggaatata tctttaatga cccttgctgt ttttagacga
661 tgatttgacc gcgacccag gtca
//

```

Anhang

LOCUS **EU796897** 417 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
DEFINITION *Ilex paraguariensis* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU796897
VERSION EU796897.1 GI:193735354
SOURCE *Ilex paraguariensis*
ORGANISM [Ilex paraguariensis](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; campanulids; Aquifoliales; Aquifoliaceae; *Ilex*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 417)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 417)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..417
/organism="Ilex paraguariensis"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Finzelberg, batch-no. 07000952"
/db_xref="taxon:[185542](#)"
rRNA <1..160
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 161..400
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 401..>417
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 acgactctcg gcaacggata tctcggtct cgcacgatg aagaacgtag cgaaatgcga
61 tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt tttgaacgca agttgcgccc
121 aaagccatta ggctaagggc acgtctgcct gggcgtcacg catcacgtcg cccccaacc
181 caatgcccg atgttgctgg ggagttggg gcggaaattg gcctcccgtc cacaygaycg
241 tgagcggttg gcccaaaaag tgagttcctg acgacggacg tcacgacaag tgggtggtga
301 aagacctct gcatcatgtc gtgaggcgcc tagtctgtag cgagctctaa ccgtggacc
361 tgcgcaccta attcgttcga gaagagcgac ggtgcttcga ccgcgacccc aggtcag
//

```

LOCUS      EU796895                666 bp    DNA        linear    PLN 07-JUL-2008
DEFINITION Melissa officinalis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
            internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
            internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  EU796895
VERSION    EU796895.1  GI:193735352
SOURCE     Melissa officinalis (common balm)
            ORGANISM Melissa officinalis
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
            asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Nepetoideae; Mentheae;
            Melissa.
REFERENCE  1 (bases 1 to 666)
            AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
            TITLE    Development and validation of molecular biological methods for
            identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
            preparations and finished products
            JOURNAL   Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 666)
            AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
            TITLE    Direct Submission
            JOURNAL   Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
            Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..666
                               /organism="Melissa officinalis"
                               /mol_type="genomic DNA"
                               /specimen_voucher="Alfred Galke, batch-no. 0000010861"
                               /db_xref="taxon:39338"
            rRNA            <1..33
                               /product="18S ribosomal RNA"
            misc_RNA        34..262
                               /product="internal transcribed spacer 1"
            rRNA            263..421
                               /product="5.8S ribosomal RNA"
            misc_RNA        422..650
                               /product="internal transcribed spacer 2"
            misc_RNA        651..>666
                               /product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1  gtttccgtag  gtgaacctgc  ggaaggatca  ttgtcgaaac  ctgcaaagca  gaccgcgaac
61  acgtgtttaa  caccacgggg  cacgacgtgg  gggcatgctc  cccgtcgtgt  ctccgttcct
121  gccggcgtgc  tccctcgggt  cacgtcgtgc  ggactaacga  accccggcgc  ggaatgcgcc
181  aaggaaaact  aaacgaagcg  accgcctcct  gcatcccgtt  cgcgagtggt  gtgggaggat
241  tgggcgtcta  tcaaattgca  taacgactct  cggcaacgga  tatctcggct  ctcgcatcga
301  tgaagaacgt  agcgaaatgc  gatacttggt  gtgaattgca  gaatcccgtg  aaccatcgag
361  tctttgaacg  caagttgctc  ccgaagccac  taggccgagg  gcacgtctgc  ctgggcgtca
421  cgcacgcgtc  cgccccctt  cccgcgcac  cgcgctggtt  atggggcgcg  atattggcct
481  cccgtgtgct  tcggcacgcy  gctggcccaa  atcgatccc  tcggcgactc  atgtcacgac
541  aagtgggtgt  tgaacactca  atctcgcgcy  tcgtcgtgct  actgagtcgt  cagtatgggc
601  atccatgaac  gaccctatgg  tgctcgggtc  tcacagcacc  tcactttcga  ccgcgacccc
661  aggtca
//

```

Anhang

LOCUS **EF421427** 600 bp DNA linear PLN 03-MAR-2007
DEFINITION Orthosiphon aristatus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EF421427
VERSION EF421427.1 GI:126211544
SOURCE Orthosiphon aristatus
ORGANISM Orthosiphon aristatus
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Nepetoideae; Ocimeae;
Orthosiphon.
REFERENCE 1 (bases 1 to 600)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 600)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (02-FEB-2007) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..600
/organism="Orthosiphon aristatus"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:204151"
rRNA <1..7
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 8..201
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 202..358
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 359..583
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 584..>600
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 atcattgtcg aaacctgcaa agcagaccgc gaacacgttt ctaactcacw ctcccgccgg
61 cgcgggcgca cccgtgcty gcgtcgtgcg ggctaacgaa ccccggcgcg gaatgcgcca
121 aggaaaaccg aacrtagcgt cggccccct tgccccgttc gcgggtcgtg cggggggcgc
181 ggacgtctat cgaatgtcaa aacgactctc ggcaacggat atctcggctc tcgcatcgat
241 gaagaacgta gcgaaatgcg atacttggtg tgaattgcag aatcccgtga accatcgagt
301 ctttgaacgc aagttgcgcc cgaagccatt aggccgaggg cacgtctgcc tgggcgtcac
361 gcatcgcgtc gccccctyc ccgcgwctg cgctcgggac gggggacgga tattggcctc
421 ccgtgygcc cgctcgtgcg ccggcccaaa tgcgatcccc cggcgactcg cgctcgcgaca
481 agtgggtggt gaacatctca atctcgcgtc tcgtcgcgcc gccgaatcgt ccgtrcgggc
541 atcgaaatcg acccaaagc gtggcccccg agccrcgctc tcgaccgca cccaggtca
//

LOCUS **EU796893** 668 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
 DEFINITION *Rosmarinus officinalis* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796893
 VERSION EU796893.1 GI:193735350
 SOURCE *Rosmarinus officinalis* (rosemary)
 ORGANISM [Rosmarinus officinalis](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
 asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Nepetoideae; Mentheae;
Rosmarinus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 668)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for
 identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
 preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 668)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
 Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..668
 /organism="Rosmarinus officinalis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Alfred Galke, batch-no. 7043"
 /db_xref="taxon:39367"
 rRNA <1..33
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 34..265
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 266..425
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 426..652
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 653..>668
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgaaac ctgcaaagca gaccgcaaac
 61 acgtgtttta cgccatcggg ggcacgacgt gggggcaacc cccatcgtgc caccggcccc
 121 ccgcccggca tgttccctcg ggccatgtck tgcgggctaa cgaaccccg cgcggaatgc
 181 gccaaggaaa actaaacgaa gcgtcygcct cccgcacccc gttcgcggaa cgtgctgtggg
 241 gatcggatgt ctgtcaa atg tcaaaacgac tctcggcaac ggatatctcg gctctcgc at
 301 cgatgaagaa cgtagc gaaa tgcgatactt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc
 361 gagtctttga acgcaagttg cgcccgaagc cattaggccg agggcacgtc tgctggggc
 421 tcacgcatcg cgtcgc cccc catcccagcg taaagcagcg gttgtggggc ggayattggc
 481 ctcccgtgcg tctcgatg cggttgccc aaatgcgac cctcggcgac tcgtgtcacg
 541 ataagtggtg gttgaacaac tcaatctcgc gcgcccgcgt gccactgctg cgtccgcatg
 601 ggcattccatc aatgacccaa tggatgggtg ccttagggcg ctctaccttc gaccgcaacc
 661 ccaggtca
 //

Anhang

LOCUS **EU785943** 663 bp DNA linear PLN 02-JUL-2008
DEFINITION *Vitex agnus-castus* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU785943
VERSION EU785943.1 GI:193084970
SOURCE *Vitex agnus-castus*
ORGANISM [Vitex agnus-castus](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Viticoideae; Vitex.
REFERENCE 1 (bases 1 to 663)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 663)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (03-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..663
/organism="Vitex agnus-castus"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Alfred Galke [batch-no. 8828]"
/db_xref="taxon:[54477](#)"
rRNA <1..33
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 34..276
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 277..436
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 437..647
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 648..>663
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgaaac ctgcaaagca gaccgcaaac
61 acgtgtttta ccgcaacggg gacgcggcgc gggggcgagc gtgcctccct cccgtcgcgt
121 tcccaccccc gtcggcacgg gcgccatgca ctcgtgtcgt gcgggctaac gaacccccgc
181 gcggcatgca ccaaggaaaa caaaaatgaa gcgttcgccg cccgacgccc cgttcgcgga
241 gcgcgcgggc ggacgggtgc cttttctaata gtcaaaacga ctctcggcaa cggatatctc
301 ggctctcgca tcgatgaaga acgtagcgaa atgacgatact tgggtgtgaat tgcagaatcc
361 cgtgaacat cgagtctttg aacgcaagtt gcgcccgaag ccattaggcc gagggcacgt
421 ctgcctgggc gtcacgcata gcgtcgcccc ccctcctgca catcgcgctc gcgatggggg
481 ggcgagact ggcctcccgt gccctcggc gcggctggcc caaatgcgat ccctcggcga
541 cgcacgtcac gaccagtgt ggttgatctc aactcgcgtg ctgtcgtgca gcgcggcgtc
601 gtccgcagtg gagtcaacga tgaccaaacg gcgcattgca ccttcgaccg cgacccaag
661 tca

//

```

LOCUS      EU785940                666 bp    DNA        linear    PLN 02-JUL-2008
DEFINITION Pimpinella anisum 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
            internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
            internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
            RNA gene, partial sequence.
ACCESSION  EU785940
VERSION    EU785940.1  GI:193084967
SOURCE     Pimpinella anisum
            ORGANISM Pimpinella anisum
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
            asterids; campanulids; Apiales; Apiaceae; Apioideae; apioid
            superclade; Pimpinella clade; Pimpinella.
REFERENCE  1 (bases 1 to 666)
            AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
            TITLE   Development and validation of molecular biological methods for
            identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
            preparations and finished products
            JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 666)
            AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
            TITLE   Direct Submission
            JOURNAL  Submitted (03-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
            Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..666
                               /organism="Pimpinella anisum"
                               /mol_type="genomic DNA"
                               /specimen_voucher="Alfred Galke [batch-no. 0000010777]"
                               /db_xref="taxon:271192"
            rRNA            <1..21
                               /product="18S ribosomal RNA"
            misc_RNA       22..243
                               /product="internal transcribed spacer 1"
            rRNA            244..403
                               /product="5.8S ribosomal RNA"
            misc_RNA       404..624
                               /product="internal transcribed spacer 2"
            rRNA            625..>666
                               /product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gaacctgcfg aaggatcatt gtcgaatcct gcgatagcag aacgaccgg taactcgtaa
61 acacatcggg cttagcgtcat tgggcttcgg tcccttgctc gcgaaaccca ggtaggtgct
121 cgcttagatt ctaagggggc accggcggac gaaatcatcc gggcgcgga tgcgccaagg
181 aacttaaaat cgaattgtat gtcgcttcc cgtagcggg cagcggcgtc aatccaaaac
241 acaacgactc tcgacaacgg atatccggc tctcgcacg atgaagaac tagcgaaatg
301 cgatacttgg tgtgaattgc agaatcccg gaaccatcga gtctttgac gcaagttgcg
361 ccgaagcca ttaggccgag ggcacgtctg cctgggtgtc acgcatcgac atgccccaa
421 ccacgcacc ttagaggagc gtgatgactt gggggcgga gttggcctc cgtgcctac
481 ggcgcggtg gcgcaaatga gactctctg cgacgaacg cgtgacatt gtggttgtaa
541 aagaacctct ttccttgctg cgcgatccg tcatcttta gagctctag accctctg
601 cggcacacat tctgtgctct ccgactgtga ccccaggta ggcgggacta cccgctgagt
661 ttaagc
//

```

Anhang

LOCUS **EF437224** 625 bp DNA linear PLN 19-MAR-2007
DEFINITION *Conium maculatum* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EF437224
VERSION EF437224.1 GI:130917297
SOURCE *Conium maculatum* (poison hemlock)
ORGANISM [Conium maculatum](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Apiales; Apiaceae; Apioideae; apioid superclade; apioid superclade incertae sedis; *Conium*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 625)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 625)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (14-FEB-2007) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..625
/organism="Conium maculatum"
/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:[13447](#)"
rRNA <1..7
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 8..223
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 224..383
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 384..609
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 610..>625
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 atcattgtcg aatcctgcga tggcagaatg acccgctaac acgtatacac atcggacaag
61 cgtcaggggg cttttgtccc ctgtagcgga atccctggta ggtggccctc tcgggtggcc
121 actggcctgc aaaatcattt gggcgcgga tgtgccaagg aacataaac tgaattgtac
181 gcccgcttcc cgtaaacggg cagcgcgctc attccaaaac acaacgactc tcgacaacgg
241 atatctcggc tctcgcatcg atgaagaacg tagcgaaatg cgatacttgg tgtgaattgc
301 agaatcccgt gaaccatcga gtctttgaac gcaagttgcg cccgaagcca ttaggccgag
361 ggcacgtctg cctgggtgtc acgcattgtc ttgcccaaa acacagacac tcctcaagga
421 tttgtgcctg gtttgggggc ggaaattggc ctcccgtgac ttgttgcgcg gttggcaaaa
481 aatgagtct ccggcgacgg acgtcgtgac aacggtggtt gtaaaagacc ctcttgaatt
541 gttgcgcgaa tccggtcat cttagcgagc ttaggaccc ttaggcggca cacactctgt
601 gcgcttcgac tgtgacccca ggtca
//

LOCUS **EU796894** 663 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
 DEFINITION *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796894
 VERSION EU796894.1 GI:193735351
 SOURCE *Foeniculum vulgare* var. *vulgare*
 ORGANISM [Foeniculum vulgare var. vulgare](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Apiales; Apiaceae; Apioideae; apioid superclade; Apieae; *Foeniculum*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 663)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 663)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..663
 /organism="Foeniculum vulgare var. vulgare"
 /mol_type="genomic DNA"
 /variety="vulgare"
 /specimen_voucher="Alfred Galke, batch-no. 10272"
 /db_xref="taxon:[545238](#)"
 rRNA <1..21
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 22..239
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 240..399
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 400..621
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 622..>663
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gaacctgcgg aaggatcatt gtggaatcct gcgatagcag aatgaccgcg taacacgtaa
 61 acacatcggg caagcgtcag agggcttcgg tcccctgatt gcaaaccctt ggtaggtgtc
 121 ccctctatgg tggccaccgg cctacgaaat catccgggcg cggaatgcgc caaggaactt
 181 gaaattgaat tgtacgttcg catcccgtaa ggggcatcg aacgtcattc caaaacacaa
 241 cgactctcga caacggatat ctgggctctc gcatcgatga agaacgtagc gaaatgcgat
 301 acttgggtgtg aattgcagaa tcccgtgaa catcgagtct ttgaacgcaa gttgcgcccg
 361 aagccaatag gccgagggca cgtctgcctg ggtgtcacac atttgcttgc cccaccact
 421 cactccttga tgagatgtgc tggtttttgg gcggaattg gcctcccgtg ccttggtgtg
 481 cggctggtgc aaaagcgagt ctccggcggg ggacgtcgtg acatcgggtg ttgtaaaata
 541 ccctcttgac ttgtcgcacg aatccgcgtc atcttagtga gctctaggac ccttgggcgc
 601 tacacaatct gttcgcctta actgtgacc caggtcaggc gggactacc gctgagttta
 661 agc
 //

Anhang

LOCUS **EF421428** 646 bp DNA linear PLN 03-MAR-2007
DEFINITION *Foeniculum vulgare* var. *dulce* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EF421428
VERSION EF421428.1 GI:126211545
SOURCE *Foeniculum vulgare* var. *dulce*
ORGANISM [Foeniculum vulgare var. dulce](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Apiales; Apiaceae; Apioideae; apioid superclade; Apieae; *Foeniculum*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 646)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 646)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (02-FEB-2007) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..646
/organism="Foeniculum vulgare var. dulce"
/mol_type="genomic DNA"
/variety="dulce"
/db_xref="taxon:427764"
/note="authority: *Foeniculum vulgare* var. *dulce* (Mill.) Batt."
rRNA <1..7
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 8..225
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 226..382
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 383..604
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 605..>646
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 atcattgtcg aatcctgcga tagcagaatg acccgctaac acgtaaacac atcgggcaag
61 cgtcagaggg cttcgggtccc ctgattgcaa acccttggtta ggtgtcccct ctatggtggc
121 caccggccta cgaaatcatc cgggcgcgga atgcccgaag gaacttgaaa ttgaattgta
181 cgttcgcac cgttagcgg gcattgaacg tcattccaaa acacaacgac tctcgacaac
241 ggatatctcg gctctcgcat cgatgaagaa cgtagcgaaa tgcgatactt ggtgtgaatt
301 gcagaatccc gtgaaccatc gagtctttga acgcaagtgt cgcccgaagc caataggccg
361 agggcacgtc tgcctgggtg tcacacattt gcttgcccc accactcact ccttgatgag
421 atgtgctggt ttttgggcgg aaattggcct cccgtgcctt gtgcggtggt tgcaaaagcg
481 agtctccggc ggtggacgtc gtgacatcgg tggttgtaaa atacctcctt gacttgctgc
541 acgaatccgc gtcactcttag tgagctctag gacccttggg cgctacacaa tctgttcgcc
601 ctaactgtga ccccagggtca ggcgggacta cccgctgagt ttaagc
//

LOCUS **EU796888** 707 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
 DEFINITION *Hypericum perforatum* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796888
 VERSION EU796888.1 GI:193735345
 SOURCE *Hypericum perforatum*
 ORGANISM [Hypericum perforatum](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
 rosids; fabids; Malpighiales; Hypericaceae; Hypericeae; *Hypericum*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 707)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for
 identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
 preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 707)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
 Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..707
 /organism="Hypericum perforatum"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Alfred Galke, batch-no. 9587"
 /db_xref="taxon:65561"
 rRNA <1..21
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 22..274
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 275..434
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 435..664
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 665..>707
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gaacctgctg aaggatcatt gtcgaaacct ccaaatgacc cgcgaaactag ttatccacaa
 61 gtcgggggtg tcgtgggctt ctgtcccggc gcccccgagg cgggtggtggc caggcgcgcc
 121 aagctcttgg cacggctggc ccatcacctg cccaacaaac aaaccccgcc gcggcacgcg
 181 ccaaggaact tttgcatcat aagaagtgta aggctcccgg ctgtgccgga aatcggacaa
 241 cacggctcgg ggctccttc tgttcataac aataacgact ctgggcaacg gatattctagg
 301 ctcttgcatc gatgaagaac gtagcgaaat gcgatacttg gtgtgaattg cagaatcccg
 361 tgaaccatcg agtctttgaa cgcaagttgc gcccgagcc ttctggccga gggcacgcct
 421 gcctgggtgt cacacatcgt cgcccccaa aatcccgata tctygcaaga gacaatcggg
 481 aataggatgg gcggaagtgt gctcccgtg cgctcccgtt cgcggttggc ccaaaaatga
 541 gttcctggca aagcaaagc acgaccagcg gtggtttaa gaccctcgtt acaagtcgtg
 601 agccttgcat tgctcgtagg gacatgttga ccctgaacgt gatcgagtaa catcgaacac
 661 tcacaaagtg accccaggtc aggcgggact acccgctgag ttaagc

//

Anhang

LOCUS **EU796892** 726 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
DEFINITION *Viscum album* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU796892
VERSION EU796892.1 GI:193735349
SOURCE *Viscum album* (European mistletoe)
ORGANISM [Viscum album](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; Santalales; Viscaceae; *Viscum*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 726)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 726)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..726
/organism="Viscum album"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Heinrich Klenk, batch-no. 4691A06032801"
/db_xref="taxon:3972"
rRNA <1..21
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 22..288
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 289..451
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 452..684
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 685..>726
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gaacctgcgg aaggatcatt gtcggatgct agtagaatgc cgatggacat gtggattggt
61 tggatcatac gcagcgggggt gcacggggat cgaccccccc gtgtgacccc ttgtggtcga
121 tggcggcatg cctcgaaggg catgagaact tcgatctacc tcttacaccg gcacgggatg
181 tgccaaghta aagaccatat tggaagatcc cctcgtggcc ctctgcggtg tgcattgtgtg
241 cgcggcgcac agggatatcca tggaggtgac tttagaaata ttgatacaac gactctcggc
301 aatggatatc tcggctctcg tgtcgatgaa gaacgcagcg aaatgcgata catgggtgtga
361 attgcagaat ctctgtaatc attgagtttt tgaacgcaag ttgctcctga ggccgttttt
421 tggctcgagg cagcctgccc tgggcgtcat gcatggtgta gccctcggac ctccccagat
481 aggagaccgg ctaatcgggt tgattttcaa tgggaaggga tttggggtag atgggtggcct
541 cccgttccct attgtgcggc tggcttaata tcatggtccc tggcgacatg cgggtgcgacg
601 ggttgtggca gactgcgttt tccccatgac ggtgcgggaa gcctgcggtc ccgtggcttc
661 atcgacactt agatggagca acacttccga ccccagggtca ggtgggacta cccgctgagt
721 ttaagc
//

LOCUS **EU796891** 669 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
 DEFINITION *Achillea millefolium* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796891
 VERSION EU796891.1 GI:193735348
 SOURCE *Achillea millefolium*
 ORGANISM [Achillea millefolium](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
 asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
 Anthemideae; Matricariinae; Achillea.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 669)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for
 identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
 preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 669)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
 Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..669
 /organism="Achillea millefolium"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Alfred Galke, batch-no. 0000011079"
 /db_xref="taxon:13329"
 rRNA <1..33
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 34..292
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 293..452
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 453..653
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 654..>669
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgaacc ctgcaaagca gaacgacccg
 61 tgaacacgta aaaacaactg agcgtcgagt ggattaagca tttgtttgat cctctcgatg
 121 ctttgtcgat gtgcatttac ttgtgttctt ttttgacacg ggtraatgtg tcattgacgc
 181 aataacaacc cccggcaca tgtgtgcca ggaaaactaa acttgagaag gcttgtttca
 241 tgttgccccg ttcgcggtgc gtcctatgaa tgtggcttct ttttaattac aaacgactct
 301 cggcaacgga tatctcggct cagcatcgaa tgaagaacgt agcaaatgc gatacttggg
 361 gtgaattgca gaatcccgtg aaccatcgag tttttgaacg caagttgcgc ccgaagcctt
 421 ttggcygagg gcacgtctgc ctgggcgtca cgcacgcgct ccccccaac aaatatctgt
 481 tgggggcgga tattggtctc ccgtgcycat ggtgtggttg gccaaaataa gagtcccttc
 541 gatggacaca cgaactagtg gtggctgtaa aaaccctcgt tctttgttct gtgttagtgc
 601 caaggaataa ctcttcaaat accccaacgc gttgtcttag gatgacgctt cgaccgac
 661 cccaggtca
 //

Anhang

LOCUS **EU785939** 671 bp DNA linear PLN 02-JUL-2008
DEFINITION *Thymus vulgaris* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU785939
VERSION EU785939.1 GI:193084966
SOURCE *Thymus vulgaris*
ORGANISM [Thymus vulgaris](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Nepetoideae; Mentheae; *Thymus*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 671)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 671)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (03-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..671
/organism="Thymus vulgaris"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Alfred Galke [batch-no. 0000010874]"
/db_xref="taxon:49992"
rRNA <1..33
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 34..262
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 263..422
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 423..655
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 656..>671
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgaacc tttaaaaaca gaccgcaaac
61 acgtgtttaa caccgttggg gacggtgcgg ggggtaacc ttttccgtgt cccatctcct
121 gccggcgtgt atcttcgggt cacgtcgtgc gggctaacga accccggcgc ggaatgcgcc
181 aaggaaaaca aaacgaagcg tttccccctg gcatcccgtt cgcggagtgt gctgggggag
241 cagacgtcta tcaaatgtct aaacgactct cggcaacgga tatctcggct ctgcgcatcga
301 tgaagaacgt agcgaaatgc gatacttggg gtgaattgca gaatcccgtg aaccatcgag
361 tctttgaacg caagttgcgc ccgaagccat taggcccagg gcacgtctgc ctgggcgtca
421 cgcacgcgtc cgccccctt cccgcgctg aatgccggc ggtcgggggc ggacattggc
481 ctcccgtgca cctccatgcy cggctggccc aatgacgatc cccgggcgac tggcgtcacg
541 acaagtgggt gttgaacatc tcaatctctc ycgctcgtct gccgtcctgt cgtcattacg
601 ggaatagtca taaacgacct aacggtgccg gtgcttaact gcacctcacc ttcgaccgcy
661 accccaggtc a
//

LOCUS **EU796890** 671 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
 DEFINITION *Thymus serpyllum* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU796890
 VERSION EU796890.1 GI:193735347
 SOURCE *Thymus serpyllum*
 ORGANISM [Thymus serpyllum](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Nepetoideae; Mentheae; *Thymus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 671)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 671)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..671
 /organism="Thymus serpyllum"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Alfred Galke, batch-no. 10188"
 /db_xref="taxon:204219"
 rRNA <1..33
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 34..262
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 263..422
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 423..655
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 656..>671
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgaacc tttaaaaaya gaccgcaaac
 61 acgtgtttaa caccgttggg gacggtgcgg ggggtaacc tctgccgtgt cccatctcct
 121 gccggcgtgt atcttcgggt cacgtcgtgc gggctaacga acccggcgc ggaatgcgcc
 181 aaggaaaaca aaaygaagcg tttccccctg gcatcccgtt cgcggagtgt gctgggggag
 241 cagacgtcta tcaaatgtca aaacgactct cggcaacgga tatctcggct ctgcgacgca
 301 tgaagaacgt agcgaaatgc gatacttggg gtgaattgca gaatcccgtg aaccatcgag
 361 tctttgaacg caagttgcg ccgaagccat taggcccagg gcacgtctgc ctgggcgtca
 421 cgcacgcgt cgccccctt cccgtgctg aatgccggc ggtcgggggc ggacattggc
 481 ctcccgtgca cctccgtgcg cggctggccc aatgacgat cccgggcgac tggcgtcacg
 541 acaagtgggt gttgaacatc tcaatctctc tcgtcgtcgt gccgtcctgt cgtcattacg
 601 ggaatagtca taaacgacct aacggtgccg gtgcttaact gyacctcacc ttcgaccgcg
 661 accccaggtc a
 //

LOCUS **EF427950** 367 bp DNA linear PLN 11-MAR-2007
 DEFINITION *Aristolochia clematitis* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S
 ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EF427950
 VERSION EF427950.1 GI:126570787
 SOURCE *Aristolochia clematitis*
 ORGANISM [Aristolochia clematitis](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; magnoliids; Piperales;
 Aristolochiaceae; Aristolochia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 367)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for
 identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
 preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 367)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-FEB-2007) Federal Institute for Drugs and Medical
 Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..367
 /organism="Aristolochia clematitis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:[158538](#)"
 /country="Germany: Bonn, Garden of the Department of
 Pharmaceutical Biology, University of Bonn"
 /collection_date="Jun-2004"
 rRNA <1..44
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 45..272
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 273..>367
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaaccta cagaaggatc attgtcaaat ccgcaagaag
 61 cgcacaaccc acgtgaacta gctgtacacg acaccctgtg gtgacgggga cgtggccggg
 121 ggcgctatgc cgcctccacg cccccctc ggcgccacaa cctcgaactg atagatgaac
 181 agacactcgg tgcaacctgc gctaagcgaa atgcaaagca tggacgacca ttgcggccca
 241 gccacggcgt ccgcttccaa agataaccaa acacgactct cgaaaacaga tatcttggct
 301 ctacatcaa tggagaacat agcaaaatat gatacttggg gtgaattgca gaatcccgcg
 361 aaccatc
 //

LOCUS **EF427951** 429 bp DNA linear PLN 11-MAR-2007
 DEFINITION *Aristolochia clematitis* 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
 RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EF427951
 VERSION EF427951.1 GI:126570788
 SOURCE *Aristolochia clematitis*
 ORGANISM [Aristolochia clematitis](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; magnoliids; Piperales;
 Aristolochiaceae; Aristolochia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 429)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for
 identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
 preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 429)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-FEB-2007) Federal Institute for Drugs and Medical
 Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..429
 /organism="Aristolochia clematitis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:158538"
 /country="Germany: Bonn, Garden of the Department of
 Pharmaceutical Biology, University of Bonn"
 /collection_date="Jun-2004"
 rRNA <1..83
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 84..337
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 338..>429
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 agaatcccg c gaaccatcga gtctttgac gcaagttgca cccgaggcca ctaggccgag
 61 ggtacacctg cctgggcgtc acgcccga cccccctccc ccggccccgc gcttccgcgc
 121 gtcgccggg gcgagcagct ggccgtccct gccccccggg gcgaggtcg cggaaaatcc
 181 agggccccctc gggctcgcg cgcgacaact ggtggctcca agctcccagg cctctttgcc
 241 tggctcgaag tcgtgccgc gacccccctc tgcgaggccg cgaggacccc cgccggccgc
 301 cccgccctcc gtggtctcgg aggcgcgcg gatcggaatg cgaccccagg tcaggtggga
 361 tcaccgctg agtttaagca tatcaataag cggaggagaa gaaacttaca aggattcccc
 421 tagtaacgg

//

Anhang

LOCUS **EU796898** 300 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
DEFINITION *Cimicifuga racemosa* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S
ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU796898
VERSION EU796898.1 GI:193735355
SOURCE *Actaea racemosa*
ORGANISM [Actaea racemosa](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Ranunculales;
Ranunculaceae; Actaea.
REFERENCE 1 (bases 1 to 300)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 300)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..300
/organism="Actaea racemosa"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Alfred Galke, batch-no. 7809"
/db_xref="taxon:64040"
rRNA <1..21
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 22..249
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 250..>300
/product="5.8S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gaacctgcfg aaggatcatt gtcgaaacct gctttgcaga acgacccgtg aacacgtaa
61 aaaacattat gtggatcgat gaggagtgtg agctcttaat catccattgt cgggcatgg
121 gattgaccac ggttgatcct atgctcttgt acaaacacaa aaccggcgc aattagcgtc
181 aaggaaatct taacggaac agagtgtcac catttatag ttgggygatg cttcgaatcc
241 gatacttaaa cgactctcgg caacggatat ctcggctctt gcacgatga agaacgcagc
//

LOCUS **EU796889** 661 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
DEFINITION *Valeriana officinalis* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU796889
VERSION EU796889.1 GI:193735346
SOURCE *Valeriana officinalis*
ORGANISM *Valeriana officinalis*
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; campanulids; Dipsacales; Caprifoliaceae; *Valeriana*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 661)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 661)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..661
/organism="Valeriana officinalis"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Alfred Galke, batch-no. 7845"
/db_xref="taxon:[19953](#)"
rRNA <1..21
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 22..250
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 251..410
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 411..644
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 645..>661
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gaacctgcgg aaggatcatt gtcgatgcct gcacgcgcag aacgacccgc gaacacgttc
61 aaaaccgcgg agccccggac cctcgggccg tgactccgaa ggacgcggga ccgtaaggac
121 cccgcggccg caaacacaac cccggcgcaa accgcgtcaa ggaacattat aacggaaggg
181 gcgtgttggc ccgatcggcc cgttcgcggg gccggccggg cgagcgccaa cccctctgag
241 aaaaacataa acgactctcg gcaacggata tctcggctct cgcacgatg aagaacgtag
301 cgaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtc tttgaacgca
361 agttgcgccc gaagccatta ggccgagggc acgcctgcct gggcgtcacg catcgcgtcg
421 cccccctcc ccgcctccc ctcatcgggg cgcggcgtgc ggcggggggc gcggacgatg
481 gcttcccggc cctcatcggg gcgcggtgg cctaaaacac ggtccccgg cggcggacgt
541 cacggcgagt ggtggtcgaa aagtcctctg ttcgcgccgt ggccctccc gtcttccggg
601 tggcgaatcg acccatacgc gccgtccacg agactgcgct ccgaccgcga cccaggtca
661 g

//

Anhang

LOCUS **EU785938** 700 bp DNA linear PLN 02-JUL-2008
DEFINITION *Echinacea pallida* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU785938
VERSION EU785938.1 GI:193084965
SOURCE *Echinacea pallida*
ORGANISM [Echinacea pallida](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
REFERENCE 1 (bases 1 to 700)
AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 700)
AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (02-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..700
/organism="Echinacea pallida"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Prof. Rudolf Bauer; Graz (Austria);
[Sandfort GmbH & Co. KG]"
/db_xref="taxon:53749"
rRNA <1..21
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 22..281
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 282..441
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 442..658
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 659..>700
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gaacctgcgg aaggatcatt gtgcaatcct gcatagcaga acgaccctg aacatgtawa
61 aactactggc ctttcgggga ccgaagcatt tgtttcgagc cttgtgaggc cttgttgacg
121 agcattcatg cttgccteta cggggcatca tggttgtctg gttgacacac taacaacccc
181 cggcacaama tgtgccaagg aaaacaaaac ttaaagggct tgtgctgta tgccccgtca
241 ttggtgtgca tactgtgctg tgcttctttt gtaacttta aacgactctc ggcaacggat
301 atctcggctc acgcatcgat gaagaacgta gcaaaatgcg atacttggtg tgaattgcag
361 aatcccgtga accatcgagt ttttgaacgc aagttgcgcc cgaagccatc cggttgaggg
421 cacgtctgcc tgggcgtcac gcatcacgtt gccccc aaa catctatta gatgttctg
481 ttggggcgga gattggtctc ccgtgccact tgcattggtg acctaaatat gagtctcctc
541 acgagagacg cacggctagt ggtggtgat aacacagtcg tctcgtgccg tacgtttatg
601 tttgtgagtg tctagacttg tgaaaaacct gacgcgtcgt cttcagatga tgcttcgatc
661 gcgaccccag gtcaggcggg actaccgctc gagtttaagc
//

LOCUS **EU785936** 700 bp DNA linear PLN 02-JUL-2008
 DEFINITION *Echinacea angustifolia* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU785936
 VERSION EU785936.1 GI:193084963
 SOURCE *Echinacea angustifolia*
 ORGANISM [Echinacea angustifolia](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 700)
 AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 700)
 AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..700
 /organism="Echinacea angustifolia"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="Prof. Rudolf Bauer; Graz (Austria); [Sandfort GmbH & Co. KG, batch-no. 2030817]"
 /db_xref="taxon:308558"
 rRNA <1..21
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 22..281
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 282..441
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 442..658
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 659..>700
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gaacctgcgg aaggatcatt gtgcaatcct gcatagcaga acgacccgtg aacatgtawa
 61 aactactggc ctttcgggga ccgaagcatt tgtttcgagc cttgtgagc cttgttgacg
 121 agcattcatg cttgccteta cggggcatca tggttgtctg gttgacacac taacaacccc
 181 cggcacaama tgtgccaagg aaaacaaaac ttaaagggct tgtgctgtta tgccccgtca
 241 ttggtgtgca tactgtgctg tgcttctttt gtaacttta aacgactctc ggcaacggat
 301 atctcggctc acgcatcgat gaagaacgta gcaaaatgcg atacttggtg tgaattgcag
 361 aatcccgtga accatcgagt ttttgaacgc aagttgcgcc cgaagccatc cggttgaggg
 421 cacgtctgcc tgggcgtcac gcatcacgtt gccccc aaa catctatta gatgttctgg
 481 ttggggcgga gattggtctc ccgtgccact tgcattggtg acctaaatat gagtctcctc
 541 acgagagacg cacggctagt ggtggttgat aacacagtcg tctcgtgccg tacgtttatg
 601 tttgtgagtg tctagacttg tgaaaaacct gacgcgtcgt cttcagatga tgcttcgatc
 661 gcgacccag gtcaggcggg actaccgct gaggtttaagc
 //

Anhang

LOCUS **EU785937** 700 bp DNA linear PLN 02-JUL-2008
DEFINITION *Echinacea purpurea* 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and
internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal
RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU785937
VERSION EU785937.1 GI:193084964
SOURCE *Echinacea purpurea*
ORGANISM [Echinacea purpurea](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
REFERENCE 1 (bases 1 to 700)
AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 700)
AUTHORS Kersten,T., Knoess,W. and Bauer,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (02-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..700
/organism="Echinacea purpurea"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="Prof. Rudolf Bauer; Graz (Austria);
[Dodson & Horrell]"
/db_xref="taxon:53751"
rRNA <1..21
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 22..281
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 282..441
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 442..658
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 659..>700
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gaacctgcgg aaggatcatt gtgcaatcct gcatagcaga acgaccctg aacatgtawa
61 aactactggc ctttcgggga ccgaagcatt tgtttcgagc cttgtgaggc cttgttgacg
121 agcattcatg cttgcctcta cggggcatca tggttgtctg gttgacacac taacaacccc
181 cggcacaama tgtgccaagg aaaacaaaac ttaaagggct tgtgctgtta tgccccgtca
241 ttggtgtgca tactgtgcgt tgcttctttt gtaacttta aacgactctc ggcaacggat
301 atctcggctc acgcatcgat gaagaacgta gcaaaatgcg atacttggtg tgaattgcag
361 aatcccgtga accatcgagt ttttgaacgc aagttgcgcc cgaagccatc cggttgaggg
421 cacgtctgcc tgggcgtcac gcatcacgtt gccccc aaa catctatta gatgttctgg
481 ttggggcgga gattggtctc ccgtgccact tgcattggtg acctaaatat gagtctcctc
541 acgagagacg cacggctagt ggtggttgat aacacagtcg tctcgtgccg tacgtttatg
601 tttgtgagtg tctagacttg tgaaaaacct gacgcgtcgt cttcagatga tgcttcgatc
661 gcgaccccag gtcaggcggg actaccgctc gaggtttaagc
//

LOCUS **EU808015** 630 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
 DEFINITION Fallopia japonica voucher EDQM 32980 18S ribosomal RNA gene,
 partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA
 gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S
 ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU808015
 VERSION EU808015.1 GI:193735472
 SOURCE Fallopia japonica
 ORGANISM [Fallopia japonica](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
 Caryophyllales; Polygonaceae; Polygonoideae; Polygoneae; Fallopia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 630)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for
 identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
 preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 630)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (09-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical
 Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..630
 /organism="Fallopia japonica"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="EDQM 32980"
 /db_xref="taxon:488216"
 /note="Hu Zhang (rhizoma & radix)"
 rRNA <1..21
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 22..240
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 241..400
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 401..588
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 589..>630
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gaacctgcgg aaggatcatt gtcgaaacct gcgagagcag aaagaccgcg gaaccgcttc
 61 acaacacacc ggggggcgcg gcgccagcct cgcgcccggct ccgcgcccc cagccccggg
 121 cccgtcccgg caccaacaca accccggcgc ggattgcgcc aaggaccatg aacaatagcg
 181 cgccccgccc cgccggcctc cggcgcgggc ggcgggcgtcg tgtcgtttct acttaacaaa
 241 acgactctcg gcaacggata tctcggtctc cgcacgatg aagaacgtag cgaaatgcga
 301 tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgatc tttgaacgca agttgcgccc
 361 gaagccctcg tggccagggc acgtctgtct gggcgtcag caccgcgtcg cccctcccc
 421 ctccgggggg ccggggcgga gactggcccc ccgtgcgctc ccgcgcgcg cggcctaata
 481 cgaaggcccc gcgaccgcaa agcggcgcga cgattggtg tgtggccctg cgcacgcgt
 541 cgcgccccga gcggcccacg gcggccacg acggccccga tcaaaccgtt gcgacccccg
 601 atcaggcggg actaccgct gagtttaagc

//

Anhang

LOCUS **EU808016** 609 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
DEFINITION *Fallopia multiflora* voucher EDQM 33057 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU808016
VERSION EU808016.1 GI:193735473
SOURCE *Fallopia multiflora*
ORGANISM [Fallopia multiflora](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; Caryophyllales; Polygonaceae; Polygonoideae; Polygoneae; Fallopia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 609)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 609)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (09-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..609
/organism="Fallopia multiflora"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="EDQM 33057"
/db_xref="taxon:76025"
/note="Shou Wu Teng (caulis)"
rRNA <1..21
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 22..219
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 220..379
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 380..567
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 568..>609
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gaacctgcgg aaggatcatt gtcgaaacct gcgagagcag aaagaccgcg gaaccggttc
61 acaaaacacc ggggggcccc ggcgcccccg agcccgggct cgtcccggca ccaacaaaac
121 cccggcgcgg attgcgcaa ggaccacgga cagcagcgcg ccccgccccg ccggcccccc
181 ggcgcgggcg gcggcgctgc gtcgtttctc cttaacagaa cgactctcgg caacggatat
241 ctcggtcttc gcatcgatga agaacgtagc gaaatgcgat acttggtgtg aattgcagaa
301 tcccgtgaac catcgagtct ttgaacgcaa gttgcgcccg aagccctcgt ggccagggca
361 cgtctgtctg ggcgtcacgc accgcgtcgc cccaccccc tccgggggat cggggcggag
421 actggcccc cgtgcgcccc cgcgcgcggc cggcctaaac gcagaccccc cggccgcgaa
481 acggcgcgac gaccgggtgt gtagccctgc gcatcgctc gcgccccgag cgggtccccg
541 cggccacggc cgacccccca cgaaccgttg cgacccccaga tcaggcggga ctaccgcgtg
601 agttaaagc

//

LOCUS **EU808017** 598 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
 DEFINITION *Stephania tetrandra* voucher EDQM 31412 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION EU808017
 VERSION EU808017.1 GI:193735474
 SOURCE *Stephania tetrandra*
 ORGANISM [Stephania tetrandra](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Ranunculales; Menispermaceae; *Stephania*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 598)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 598)
 AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (09-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..598
 /organism="Stephania tetrandra"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="EDQM 31412"
 /db_xref="taxon:425106"
 /note="Han Fang Ji (radix)"
 rRNA <1..21
 /product="18S ribosomal RNA"
 misc_RNA 22..207
 /product="internal transcribed spacer 1"
 rRNA 208..365
 /product="5.8S ribosomal RNA"
 misc_RNA 366..555
 /product="internal transcribed spacer 2"
 rRNA 556..>598
 /product="26S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gaacctgcgg aaggatcatt gtcgatgcct gcagaacgac ccgccaacca ttgacatcgc
 61 acaacgagcg acgcgggcg cccgctcggc cctcgccgtc gatcaacaaa acccggcgcg
 121 gcatgcgcca aggaaatgca aatcaaaaacg gaaacgacac gtctggtggc cggcccacgc
 181 ggcgatgttg gattttcgaa tacttgaayg actctcggca acggatatct cggctctcgc
 241 atcgatgaag aacgtagcga aatgcgatac ttggtgtgaa ttgcagaatc ccgtgaacca
 301 tcgagtcttt gaacgcaagt tgcgcccag acttcggtcg agggcacgcc tgctggggcg
 361 tcacgtgacg caccacaacc caccctgtgc ggggaggag tggagattgg cctcccgcga
 421 cgaaagcacg gctggctgaa atcgtagccc cggcgccag acgacgcgat cagtgggtgtg
 481 tgacgagaat cttgtcaag caagtgcgc ggtcggagcg gcacgcacg gggcggagca
 541 ccatttctt ataccttgcg accccagtc aggcgggact acccgctgag ttttaagc
 //

Anhang

LOCUS **EU808018** 649 bp DNA linear PLN 07-JUL-2008
DEFINITION *Dioscorea polystachya* voucher EDQM 32497 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EU808018
VERSION EU808018.1 GI:193735475
SOURCE *Dioscorea oppositifolia*
ORGANISM [Dioscorea oppositifolia](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Dioscoreales; Dioscoreaceae; Dioscorea.
REFERENCE 1 (bases 1 to 649)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 649)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (09-JUN-2008) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn D 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..649
/organism="Dioscorea oppositifolia"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="EDQM 32497"
/db_xref="taxon:569628"
/note="Shan Yao (rhizoma)"
rRNA <1..21
/product="18S ribosomal RNA"
misc_RNA 22..231
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 232..391
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc_RNA 392..607
/product="internal transcribed spacer 2"
rRNA 608..>649
/product="26S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gaacctgcgg aaggatcatt gtcgtgacc ttaaacaag cagaccgca acccgtctct
61 cgtgccatcg ggcttcggcc cggccgaagg cccccgagct ccgtcccggg gcggaggggc
121 cgcaacagaa cccacggcgc cttagggctc aaggaacct aatgctgcct tgctcggcgg
181 agcgggtcggc ctgccttcgc ctccccgcgc agcgatgata tcttaataca cagactctc
241 ggcaacggat atctcggctc tgcgatgat gaagaacgta gcaaaatgcg atacctggtg
301 tgaattgcag aatcccgcga accatcgagt ttttgaacgc aagttgcgcc cgaggccttc
361 tggccaaggg caggtctgcc tgggcgtcac gccaaaagac actccaacc cccccggg
421 gagggacgtg gtgtctggcc cccgcgcgc caaggcgcgg tgggcccgaag ttggggctgc
481 cggcgaatcg tgcgggcac agcacgtggt gggcgacacc tagttgttct cggtcagcgc
541 ccccgacag cagccagcac atcggcccta aggatccatc gggcaccgca gcgcaccgctc
601 gctcggaccg cgaccccagg tcagtcggga ctaccgctg agtttaagc

//

```

LOCUS      JF907424                430 bp    DNA        linear    PLN 17-JUL-2011
DEFINITION Fallopia japonica voucher EDQM 32980 PsbA (psbA) gene, partial cds;
           psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH)
           gene, partial sequence; chloroplast.
ACCESSION  JF907424
VERSION    JF907424.1  GI:339787698
SOURCE     chloroplast Fallopia japonica
ORGANISM   Fallopia japonica
           Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
           Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
           Caryophyllales; Polygonaceae; Polygonoideae; Polygoneae; Fallopia.
REFERENCE  1 (bases 1 to 430)
AUTHORS    Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE      Development and validation of molecular biological methods for
           identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
           preparations and finished products
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 430)
AUTHORS    Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (30-APR-2011) Federal Institute for Drugs and Medical
           Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
           source                1..430
                                   /organism="Fallopia japonica"
                                   /organelle="plastid:chloroplast"
                                   /mol_type="genomic DNA"
                                   /specimen_voucher="EDQM 32980"
                                   /db_xref="taxon:488216"
                                   /note="Hu Zhang (rhizoma & radix)"
           gene                  <1..75
                                   /gene="psbA"
           CDS                   <1..75
                                   /gene="psbA"
                                   /codon_start=1
                                   /transl_table=11
                                   /product="PsbA"
                                   /protein_id="AEK11917.1"
                                   /db_xref="GI:339787699"
                                   /translation="VMHERNAHNFPLDLAAIQAPSING"
           misc_feature          76..377
                                   /note="psbA-trnH intergenic spacer"
           gene                  378..>430
                                   /gene="trnH"
           tRNA                  378..>430
                                   /gene="trnH"
                                   /product="tRNA-His"
ORIGIN
1  gttatgcatg aacgtaatgc tcataacttc ccgctagacc tagctgctat ccaagctcca
61  tctatcaatg gataagattt gggcttagt gtagtcgagt ttttgaaatt aaaggagcaa
121 taaccaatct cttgttctat cgagcgggtt ggtattgctc ctttaatttt aattattatt
181 agattctata tggccccatt cgcatttttt tctaccctat atggcctctt tggatttttg
241 gttgggggga cttttttttt tattcattta tattcaatac aatattaaaa aaaagaatca
301 ttttttttat taaagtaaaa aaatgataaa attgataagt gtaatttgga ccattttcaa
361 gtaaggaacg aaataggggc ggatgtagcc aagtggatca aggcagtgga ttgtgaatcc
421 accatgcgcg
//

```

Anhang

LOCUS **JF907425** 220 bp DNA linear PLN 17-JUL-2011
DEFINITION *Dioscorea oppositifolia* voucher EDQM 32497 PsbA (psbA) gene,
partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and
trRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
ACCESSION JF907425
VERSION JF907425.1 GI:339787700
SOURCE chloroplast *Dioscorea oppositifolia*
ORGANISM [Dioscorea oppositifolia](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Dioscoreales;
Dioscoreaceae; Dioscorea.
REFERENCE 1 (bases 1 to 220)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for
identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 220)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-APR-2011) Federal Institute for Drugs and Medical
Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..220
/organism="Dioscorea oppositifolia"
/organelle="plastid:chloroplast"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="EDQM 32497"
/db_xref="taxon:[569628](#)"
/note="Shan Yao (rhizoma)"
gene <1..75
/gene="psbA"
CDS <1..75
/gene="psbA"
/codon_start=1
/transl_table=[11](#)
/product="PsbA"
/protein_id="[AEK11918.1](#)"
/db_xref="GI:339787701"
/translation="VMHERNAHNFPLDLAAVEAPSTNG"
misc_feature 76..167
/note="psbA-trnH intergenic spacer"
gene 168..>220
/gene="trnH"
trRNA 168..>220
/gene="trnH"
/product="trRNA-His"
ORIGIN
1 gttatgcatg aacgtaatgc tcacaacttc cctctagacc tagccgctgt tgaagctcca
61 tctacaaatg gataagactt ttgtcttaat gtatatgaat ctcagaataa taaatacaat
121 aaataatgat gaatggaaaa aagataaaat cctttagcta gataaggggc ggatgtagcc
181 aagtggatca aggcagtgga ttgtgaatcc accatgcgcg
//

```

LOCUS      JF907426                220 bp    DNA        linear    PLN 17-JUL-2011
DEFINITION  Dioscorea oppositifolia voucher EDQM 32991 PsbA (psbA) gene,
            partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and
            tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
ACCESSION  JF907426
VERSION    JF907426.1  GI:339787702
SOURCE     chloroplast Dioscorea oppositifolia
ORGANISM   Dioscorea oppositifolia
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Dioscoreales;
            Dioscoreaceae; Dioscorea.
REFERENCE  1 (bases 1 to 220)
AUTHORS    Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE      Development and validation of molecular biological methods for
            identification of medicinal plants in herbal substances, herbal
            preparations and finished products
JOURNAL     Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 220)
AUTHORS    Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL     Submitted (30-APR-2011) Federal Institute for Drugs and Medical
            Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
FEATURES   Location/Qualifiers
            source                1..220
                                   /organism="Dioscorea oppositifolia"
                                   /organelle="plastid:chloroplast"
                                   /mol_type="genomic DNA"
                                   /specimen_voucher="EDQM 32991"
                                   /db_xref="taxon:569628"
                                   /note="Chao Shan Yao (rhizoma)"
            gene                  <1..75
                                   /gene="psbA"
            CDS                   <1..75
                                   /gene="psbA"
                                   /codon_start=1
                                   /transl_table=11
                                   /product="PsbA"
                                   /protein_id="AEK11919.1"
                                   /db_xref="GI:339787703"
                                   /translation="VMHERNAHNFPLDLAAVEAPSTNG"
            misc_feature          76..167
                                   /note="psbA-trnH intergenic spacer"
            gene                  168..>220
                                   /gene="trnH"
            tRNA                  168..>220
                                   /gene="trnH"
                                   /product="tRNA-His"
ORIGIN
1  gttatgcatg aacgtaatgc tcacaacttc cctctagacc tagccgctgt tgaagctcca
61  tctacaaatg gataagactt ttgtcttaat gtatatgaat ctcagaataa taaatacaat
121 aaataatgat gaatggaaaa aagagaaaat cctttagcta gataaggggc ggatgtagcc
181 aagtggatca aggcagtgga ttgtgaatcc accatgcgcg
//

```

Anhang

LOCUS **JF907427** 383 bp DNA linear PLN 17-JUL-2011
DEFINITION *Andrographis paniculata* voucher EDQM 25820 PsbA (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His (trnH) gene, partial sequence; chloroplast.
ACCESSION JF907427
VERSION JF907427.1 GI:339787704
SOURCE chloroplast *Andrographis paniculata*
ORGANISM [Andrographis paniculata](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Acanthaceae; Acanthoideae; Ruellieae; Andrographinae; *Andrographis*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 383)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 383)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-APR-2011) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..383
/organism="Andrographis paniculata"
/organelle="plastid:chloroplast"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="EDQM 25820"
/db_xref="taxon:175694"
/note="Chuan Xin Lian (herba) "
gene <1..72
/gene="psbA"
CDS <1..72
/gene="psbA"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="PsbA"
/protein_id="AEK11920.1"
/db_xref="GI:339787705"
/translation="VMHERNAHNFPLDLAAVEAPTNG"
misc_feature 73..330
/note="psbA-trnH intergenic spacer"
gene 331..>383
/gene="trnH"
tRNA 331..>383
/gene="trnH"
/product="tRNA-His"
ORIGIN
1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataacttt cctttagatc tagctgctgt cgaagctcca
61 acaaatggat aagacttgct cttagtgtct aggagttttt gaacatagaa tcccataagg
121 agcaataaat tttcttgata gaacaagaaa tagtttattg ctccttggtt ttcttttcat
181 ttagtattgt tttttattaa tattctgctt acctaaactt tttttctttt catttttagat
241 aaagaagtgt aagaccttct aatcttaggg attgattaat gattgagtag tattctcaat
301 gaatttttcta tctaataatt tatatatagg ggcggtatgta gcccaagtga tcaaggcagt
361 ggattgtgaa tccacatgc gcg
//

LOCUS **JF907428** 426 bp DNA linear PLN 17-JUL-2011
DEFINITION *Scutellaria baicalensis* voucher EDQM 30009 *psbA* (*psbA*) gene, partial cds; *psbA-trnH* intergenic spacer, complete sequence; and *tRNA-His* (*trnH*) gene, partial sequence; chloroplast.
ACCESSION JF907428
VERSION JF907428.1 GI:339787706
SOURCE chloroplast *Scutellaria baicalensis*
ORGANISM [Scutellaria baicalensis](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Scutellarioideae; *Scutellaria*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 426)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Development and validation of molecular biological methods for identification of medicinal plants in herbal substances, herbal preparations and finished products
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 426)
AUTHORS Kersten,T. and Knoess,W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-APR-2011) Federal Institute for Drugs and Medical Devices, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, Bonn 53175, Germany
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..426
/organism="Scutellaria baicalensis"
/organelle="plastid:chloroplast"
/mol_type="genomic DNA"
/specimen_voucher="EDQM 30009"
/db_xref="taxon:65409"
/note="Huang Qin (*radix*)"
gene <1..72
/gene="psbA"
CDS <1..72
/gene="psbA"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="PsbA"
/protein_id="AEK11921.1"
/db_xref="GI:339787707"
/translation="VMHERNAHNFPLDLAAIEAPTNG"
misc_feature 73..373
/note="psbA-trnH intergenic spacer"
gene 374..>426
/gene="trnH"
tRNA 374..>426
/gene="trnH"
/product="tRNA-His"
ORIGIN
1 gttatgcatg aacgtaatgc tcataacttc cctctagact tagctgctat cgaagctcca
61 acaaatggat aagacttggt cttagtgctg aggagttttt gaatagataa atagaaggag
121 caataaactc tttcttggtc tatcaagagg ggttattgct cctttatttt cttttcaatt
181 agtagtcttt cctagactta tttctttcca ttaagaataa ataaagagga taaaaaatga
241 ttgaaattcc atttttttatc ttattttatc ttacaagttc taaaaaatta aaattgaaaa
301 atcgaattcg taaatgtaaa ttcaatattc acatcaaaaa aaatatttaa ttttaaagta
361 attctagtag aggggcggat gtagccaagt ggatcaaggc agtggattgt gaatccacca
421 tgcgcg

//