



Botanik I

**Protokoll zum F2 Praktikum Plant Evolution - WS 2014/2015**

Betreut von: Dr. Thomas Horn

**Thema:**

**Der wahre Goji?**

Dieses Protokoll wurde verfasst von:

Stephanie Calin und Daniel Kuhn

# Inhalt

1. Einleitung .....	4
1.1. Genus <i>Lycium</i> .....	4
1.2. Die Goji-Beere von <i>Lycium barbarum</i> .....	5
1.3. Genetic Barcodeing .....	6
1.3.1. Sequenzierung von DNA Marker-Regionen und phylogenetische Analyse .....	6
1.3.2. Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) .....	8
1.3.3. Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) .....	9
1.4. Zielsetzung .....	9
2. Material und Methoden .....	11
2.1. <i>Lycium</i> -Akzessionen .....	11
2.2. Verwendete Primer .....	12
2.3. Verwendete Kits .....	13
2.4. DNA-Extraktion .....	13
2.5. PCR Ansätze .....	13
2.6. Elektrophorese .....	14
2.7. Sequenzierung von Marker-Regionen .....	14
2.8. Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) .....	16
2.9. Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) .....	17
2.10. Auszählung von <i>Lycium</i> -Samen .....	17
2.11. Bioinformatik .....	18
2.11.1. Verwendete Software und Webseiten .....	18
2.11.2. Sequenz Alignment .....	18
2.11.3. Erstellen eines phylogenetischen Stammbaums .....	18
3. Ergebnisse .....	19
3.1. Amplifizierung der Marker-Regionen .....	19
3.1.2 Ergebnis der PCR mit Bel 2/3-Primern .....	19
3.1.3 Ergebnis der PCR mit PsbA/trnH Primern .....	20
3.1.4 Ergebnis der PCR mit TrnH Zub/TrnK Zub Primern .....	21
3.2 Phylogenetische Stammbäume der Marker-Regionen .....	21
3.2.1 Stammbaum der ITS2-Sequenzen .....	22
3.2.2 Stammbaum der psbA-trnH-Sequenzen .....	23
3.1.1. Stammbaum der <i>trnH-trnK</i> -Sequenzen .....	24
3.2. Ergebnis der SRAP .....	25
3.3. Ergebnis der SCAR-Analyse .....	26
3.4. Ergebnis der Unterschiede in der Samenanzahl .....	27

4.	Diskussion.....	31
4.1.	Phylogenetische Analyse der drei Marker Regionen .....	31
4.1.1.	Amplifizierung der Sequenzen von <i>ITS2</i> , <i>psbA-trnH</i> und <i>trnH-trnK</i> .....	31
4.1.2.	Sequenzierung und Stammbaumerstellung anhand der Marker-Sequenzen .....	32
4.2.	SRAP-Analyse.....	33
4.3.	SCAR-Analyse.....	34
4.4.	Unterschiede in der Samenanzahl .....	35
5.	Literaturverzeichnis.....	36
5.1.	Publikationen.....	36
5.2.	Webquellen .....	36
5.3.	Sonstige Quellen.....	36

# 1. Einleitung

## 1.1. Genus *Lycium*

Das Genus *Lycium* gehört zu den Solanaceae, wie auch die Tomate oder der Tabak. *Lycium* umfasst etwa 70 Spezies von stacheligen Sträuchern und kleinen Bäumen. Ihre Vorkommen reichen von Südamerika, Nordamerika, Südafrika, in Teilen Eurasiens (Europa bis China und Japan), Australien und einigen Inseln des pazifischen Ozeans. [Abbildung 1] (Fukuda *et al.*; 2000) Zu ihrer Verbreitung gibt es zwei Theorien. Die erste Hypothese von Symon (1991) besagt, dass sie sich während des kontinentalen Drifts, nach dem Bruch von Gondwanaland, verbreitet haben kann. Die zweite Hypothese von Raven und Axelrod (1974) besagt, dass sich die *Lycium* Spezies vermutlich über Fernverbreitung, wie beispielsweise über Zugvögel verbreitet haben könnten. Keine dieser Hypothesen wurde bislang widerlegt. (Fukuda *et al.*; 2000) Ihr Ursprung liegt vermutlich im Amazonasgebiet, von dort aus hat sich *Lycium* über Südafrika und den Rest der Welt ausgebreitet. Die am nächsten miteinander verwandten *Lycium*-Spezies liegen immer geographisch beieinander. Somit sind beispielsweise die in Eurasien auftauchenden Spezies wie *Lycium chinense*, *Lycium europaeum*, *Lycium ruthenicum* und *Lycium barbarum* eine Gruppe des *Lycium* Genus, die sehr nah miteinander verwandt sind. [Abbildung 2] (Fukuda *et al.*; 2000)

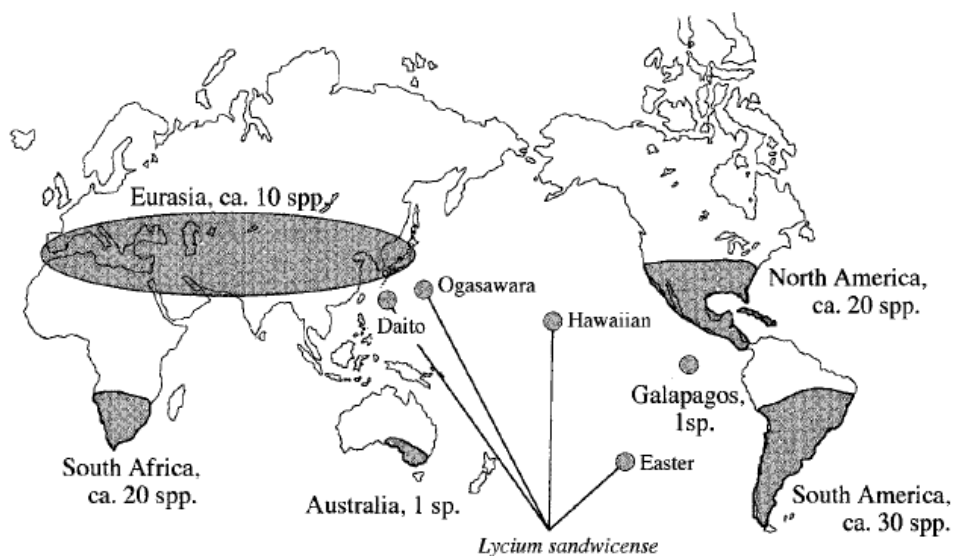


Abbildung 1: Verbreitung der etwa 70 *Lycium*-Spezies Weltweit. In grau dargestellt ist die geographische Verbreitung des *Lycium* Genus. Ihre Verbreitungsgebiete sind Südamerika mit ca. 30 Arten, Nordamerika mit ca. 20 Arten, Südafrika mit ca. 20 Arten, weite Teile Eurasiens, wie Europa, China und Japan, mit ca. 10 Arten, Australien und pazifische Inseln mit je 1 Art. (Fukuda *et al.*; 2000)

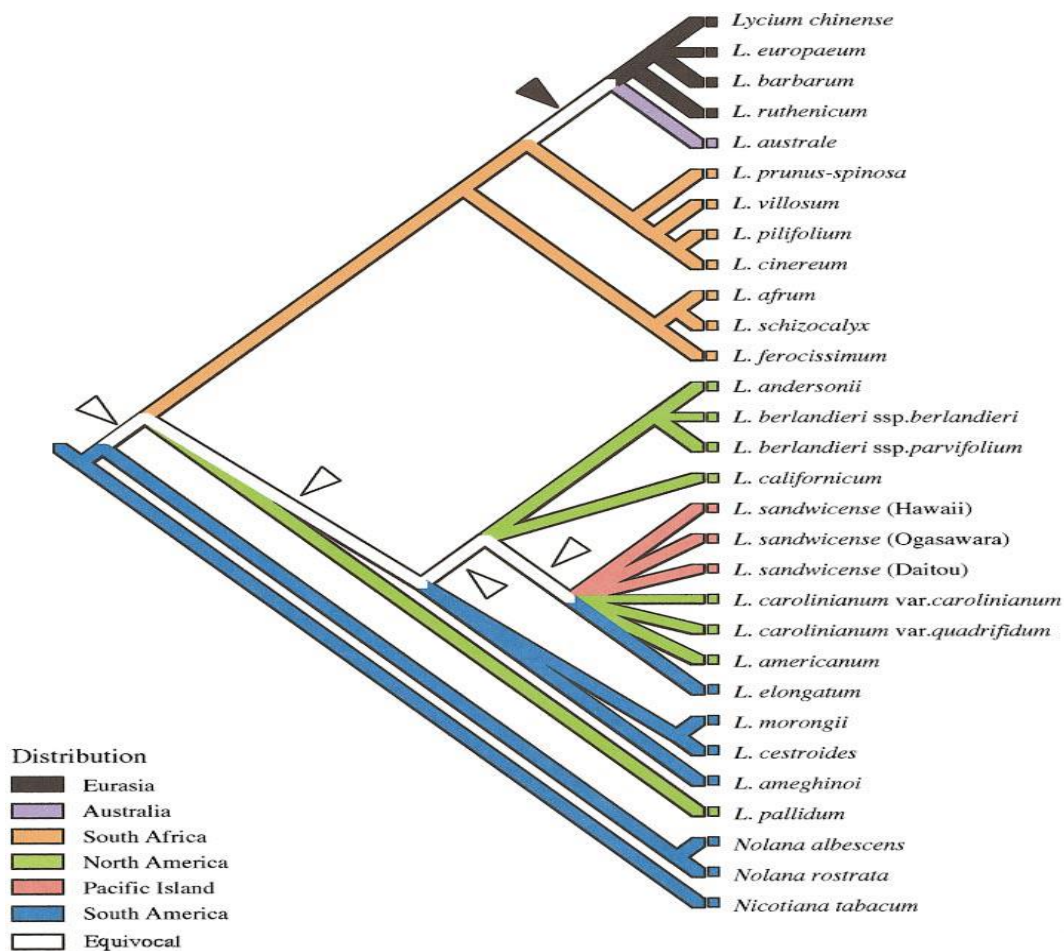


Abbildung 2: Zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der Verwandtschaftsverhältnisse unterschiedlicher *Lycium* Spezies aus den geographischen Regionen ihres Vorkommens. In der Legende des Stammbaums sind die farblich dargestellten Verbreitungsgebiete, der verwandten Arten aufgeführt. In Weiß sind die unsicheren Stellen, der Verzweigungen gezeigt. (Fukuda et al.; 2000)

### 1.2. Die Goji-Beere von *Lycium barbarum*

Die chinesische Wolfsbeere oder auch als Goji Beere bezeichnete Frucht der Pflanze *Lycium barbarum*, wird auf dem globalen Handelsmarkt als „Super-Food“ oder „Super-Fruit“ bezeichnet. Sie wird in Form von Getränken, Likören, als getrocknete Beere oder ähnlichem in spezialisierten Gesundheitsläden verkauft. Des Weiteren wird sie in der Republik China als traditionell chinesische Medizin eingesetzt. Im Jahr 2004 exportierte China Wolfsbeeren im Wert von 120 Millionen US Dollar. (Xin et al., 2013) Es wurde gezeigt, dass die Frucht von *L. barbarum* das aktive *Lycium barbarum* Polysaccharid (LBP) und weitere Substanzen wie Carotinoide, Flavanoide, Vitamine, Spurenelemente, Aminosäuren, Alkaloide und Fette enthält. (Xin et al., 2013) Sie soll die Leber und Niere unterstützen, das Sehvermögen verbessern und den Alterungsprozess verlangsamen. (Zhang et al, 2001) Außerdem wird der Beere nachgesagt die Nerven zu schützen, den Stoffwechsel anzuregen, die Regulierung von Diabetes zu unterstützen und sogar eine tumorhemmende Wirkung. (Xin et al., 2013) Das Problem ist, dass die Beeren verschiedener *Lycium*-Arten morphologisch schwer voneinander unterscheidbar sind. Dadurch

besteht die Gefahr, dass die verschiedenen *Lycium*-Arten miteinander vertauscht werden und es zu Verwechslungen kommt. Vor allem könnte die viel günstiger gehandelte *L. chinense* als teurere *L. barbarum* gehandelt werden oder seltene Spezies, wie *L. ruthenicum* werden, durch versehentliches Sammeln, immer begrenzter in ihrer Population und könnten komplett aus der Natur verschwinden. (Xin *et al.*, 2013)

Durch den globalen Handel wird die Kontrolle von Nahrungsmitteln immer schwerer. Trotz dem Beschluss der Europäischen Kommission im Jahr 2002, die besagt dass Lebensmittel in Hinsicht auf Herkunft und Inhalt ausreichend gekennzeichnet werden müssen, kam es im Jahr 2013 zu einem Pferdefleischskandal, der in den Medien kursierte. Kurz darauf war von einem Fischfleischskandal die Rede. Die Angst beim Erwerb von global gehandelten Nahrungsmitteln betrogen zu werden ist somit berechtigt. (Xin *et al.*, 2013) Um die Natur und den Verbraucher zu schützen ist es wichtig Verfahren zur eindeutigen Identifikation der chinesischen Wolfsbeere und ihren nah verwandten Arten zu entwickeln. Hierfür sollen verschiedene „Genetic Barcoding“ Methoden zum Einsatz kommen, um am Schluss die *Lycium*-Spezies eindeutig unterscheiden zu können ohne viel Geld für Produktprüfung ausgeben zu müssen. (Xin *et al.*, 2013)

### 1.3. Genetic Barcoding

Bei der klassischen Bestimmung von Pflanzenspezies werden in der Regel vorerst ihre morphologischen Merkmale herangezogen. Allerdings ist diese Unterscheidungsmethode nicht immer eindeutig möglich und oft auch sehr ungenau. Um die Arten eindeutig zuordnen zu können, werden verschiedene „Genetic Barcoding“ Methoden verwendet. Diese Methoden sind unabhängig von der Morphologie eines Organismus und beziehen sich, wie der Name schon sagt, auf den genetischen Code. Der Einsatz mehrerer „Barcoding“ Methoden soll zu dem Ziel führen eine Art spezifisch zu erkennen und diese phylogenetisch mit ihren Verwandten in einen Zusammenhang zu bringen. (Xin *et al.*, 2013) Die Erkenntnisse, die sich aus einem „Genetic Barcoding“ ergeben, dient nicht nur dem Verbraucherschutz, sondern spielt auch eine große Rolle bei der Erhaltung von Biodiversität und gibt Aufschluss über die evolutionäre Entwicklung der Spezies und ihrer Biographie. (Fukuda *et al.*; 2000) Genutzt werden zum einen sogenannte Marker Regionen, um phylogenetische Stammbäume zu erstellen (Fukuda *et al.*; 2000), die Generierung von genetischen Fingerabdrücken, wie es auch bei einem Vaterschaftstest der Fall ist (Li and Quiros *et al.*; 2001) und die letztendliche Entwicklung von charakteristisch amplifizierten Regionen. (Cho-Wing Sze *et al.*; 2008)

#### 1.3.1. Sequenzierung von DNA Marker-Regionen und phylogenetische Analyse

Die DNA besteht aus konservierten und variablen Regionen. Konservierte Region bedeutet, dass diese Basenabfolge in sehr vielen Organismen enthalten ist, da sie für essentielle Bausteine wie beispielsweise die Untereinheit eines Ribosoms codiert. Ribosomen sind wichtig für die

Proteinsynthese und somit lebensnotwendig für alle Organismen. Aufgrund ihrer Wichtigkeit kam es im Laufe der Evolution kaum zu Veränderungen dieser Regionen. Anders verhält es sich mit den variablen Regionen. Sie verändern sich im Laufe der evolutionären Entwicklung sehr schnell durch Mutationen, Rekombination, kleine RNAs oder durch transposonale Elemente. Oft unterscheiden sich die variablen Regionen unterhalb verschiedener Arten, was eine Einordnung dieser ermöglichen kann. (Wicke and Quandt; 2009, Sonstige Quellen 1) Bei der Unterscheidung von Pflanzenspezies werden meist sogenannte Spacer Regionen (variable Regionen) gesucht, die von konservierten Regionen flankiert werden. Sehr gut eignen sich hierfür Exon (codierend) und Intron (Spacer) Strukturen im Genom. Der Grund hierfür ist, dass die Regionen mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Setzt man nun den Primer für die Amplifikation des Spacers in flankierende, hoch konservierte Regionen, können diese universell für jeden Organismus verwendet werden, der ebenfalls dieselbe konservierte Region besitzt. Diese universellen Regionen treten sowohl im Kerngenom, als auch im Mitochondrium und Chloroplastengenom auf. (Wicke and Quandt; 2009, Sonstige Quellen 2) Eine sehr beliebte Spacer Region des Kerngenoms, die sowohl bei Pilzen, Tieren als auch bei Pflanzen zum Einsatz kommt, sind die internal transcribed spacer (nr-its), welche zwischen den konservierten rRNA kodierenden Regionen 18S, 5.8S und 28S liegen. (Sonstige Quellen 2)

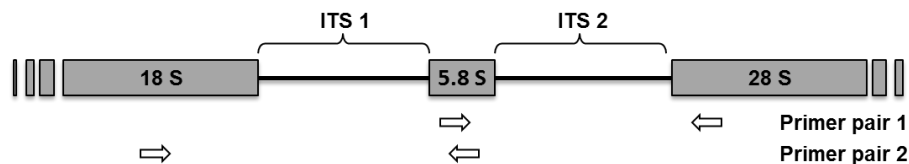


Abbildung 3: Dargestellt sind die internal transcribed spacer 1 und 2 und die flankierenden, konservierten Elemente der rRNA kodierenden Regionen 18S, 5.8S und 28S. Die weißen Pfeile geben die Lage und Amplifikationsrichtung der universellen Primerpaare 1 und 2 an. Das Amplifikationsprodukt ist, je nach Wahl der Primer Kombination, die variable Spacer Region ITS1 oder ITS2 (Webquelle 1)

Eine weitere beliebte Region für Pflanzen ist trnK/matK, welche im Chloroplasten Genom lokalisiert ist. Die flankierende Exon-Region kodiert für die Lysin Transfer DNA und kann sehr gut universell zur Unterscheidung von Angiospermen eingesetzt werden. (Wicke and Quandt; 2009)

Die amplifizierten Marker-Regionen werden sequenziert und anschließend zur phylogenetischen Analyse herangezogen. Hierfür werden die Sequenzergebnisse der zu untersuchenden Spezies (mit demensprechender Computersoftware) alignt und verglichen. Für eine gute Analyse empfiehlt es sich diese Ergebnisse auch mit bekannten Sequenzen aus Genbanken zu vergleichen, um Sequenzierungsfehler auszuschließen. Für eine taxonomische Einordnung wird aus dem Sequenzalignment ein phylogenetischer Stammbaum ermittelt. (Auch hierfür wird eine Computersoftware eingesetzt.) Durch das Generieren von Ähnlichkeitsmatrizen werden

Sequenzunterschiede erhoben und der Abstand der Verzweigungen des Stammbaums errechnet, beispielsweise über das Distanz basierte Neighbor joining Verfahren. Über sogenanntes „Bootstrapping“ werden die wahrscheinlichsten Verzweigungen eines Stammbaums ermittelt und das Frequency termed *bootstrap value* (FTBV) erhoben, welches bei >70% signifikant ist. Für die Wurzel des Stammbaums wird eine geeignete Randgruppe gewählt. Die Wahl der Randgruppe ist sehr wichtig für die Gruppenbildung innerhalb eines Stammbaums. Beispielsweise gehört *Lycium* zu den Solanaceae, weshalb sich in diesem Fall Solanaceae, die nicht dem Genus *Lycium* angehören, als Randgruppe für die Wurzel des Stammbaums eignet. Vergleicht man nun die Stammbäume verschiedener Marker-Regionen, kann man auf die Verwandtschaftsverhältnisse von verschiedenen Spezies schließen und diese taxonomisch einordnen. (Sonstige Quellen 3)

### 1.3.2. Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP)

Zur Erzeugung von genetischen Fingerabdrücken werden verschiedene Primer-Kombinationen eingesetzt, die spezifisch und unspezifisch an unbekannte Regionen des Genoms binden. Dabei werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe mittels PCR amplifiziert. Auch die sogenannte SRAP-Methode (Sequence related amplified polymorphism) verwendet solche Primer-Kombinationen. Genauer werden Primer-Kombinationen mit hohem und niedrigem GC-Gehalt eingesetzt. Diese binden an mehreren unbekanntem Stellen des Genoms. Um die Bindungsaffinität der Primer zu erhöhen wird ein spezielles PCR Programm, bestehend aus zwei Zyklen, gewählt. Einige Zyklen haben eine niedrigere und einige Zyklen eine höhere Annealingtemperatur, aufgrund des unterschiedlichem GC-Gehalts der Primer. [Abbildung 4] Der Vorteil, im Gegensatz zu ähnlichen Verfahren besteht darin, dass durch gesteigerte unspezifische und spezifische Bindung (zwei Zyklen, statt einem) mehr Banden erzeugt werden können. Somit ist die Effizienz der Beurteilung einer SRAP sehr hoch, da dadurch auch die Wahrscheinlichkeit gesteigert ist, dass mehr artspezifische Fragmente amplifiziert werden. Für die Beurteilung der Ergebnisse werden die Bandenmuster der Proben miteinander verglichen und diese in Gruppen eingeteilt. Spezifische Banden die nur in einer Gruppe auftreten können durch Sequenzierung genauer untersucht werden und als Vorlage für die Entwicklung spezifischerer Primer dienen. (Li and Quiros *et al.*; 2001)



## SRAP mechanism

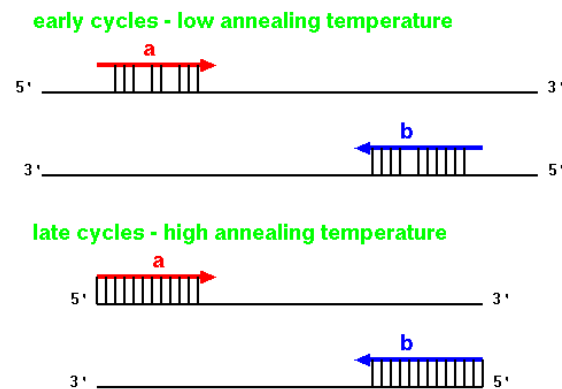


Abbildung 4: Dargestellt sind die zwei Zyklen einer SRAP. In den ersten Zyklen werden die Primer a und b unspezifisch an die DNA gebunden. Primer b bindet besser als Primer a, da er einen niedrigeren GC Gehalt hat. Bei den darauffolgenden Zyklen, mit höherer Annealing Temperatur lagern sich die Primer a und b spezifisch an die DNA an. Die Regionen an die die Primer binden sind unbekannt, aber zum Teil sehr Artspezifisch. (Webquelle 2)

### 1.3.3. Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR)

Bei der SCAR (Sequence characterized amplified region) kommen speziell entwickelte Primer zum Einsatz, welche bei einer PCR ein artspezifisches DNA Fragment amplifizieren. Das Fragment hat immer die gleiche Basenlänge und die Region taucht nur bei dieser Art auf. Bei nah verwandten Arten amplifizieren die Primer kein Fragment oder ein Fragment das nicht derselben Basenlänge entspricht. Möchte man beispielsweise eine *Lycium barbarum* von einer anderen *Lycium* Art, wie *Lycium chinense* unterscheiden, dann ist es möglich SCAR Primer einzusetzen für *Lycium barbarum*. Nur bei dieser wird das charakteristische Fragment amplifiziert. Somit könnte man schnell und effizient ein Produkt prüfen, welches unbekannte Wolfsbeeren enthält. Solche Primer können mithilfe von genetischen Fingerabdrücken gefunden werden, indem Banden sequenziert werden, die immer nur bei derselben Art auftauchen und für diese Primer designen. (Cho-Wing Sze *et al.*; 2008)

### 1.4. Zielsetzung

In diesem Praktikum sollten 19 verschiedene *Lycium* Akzessionen untersucht werden. Zunächst sollten die Marker-Regionen *ITS2* (lokalisiert im Kerngenom), *trnH/trnK* und *psbA/trnH* (lokalisiert im Chloroplasten Genom) sequenziert werden, phylogenetisch analysiert und ein phylogenetischer Stammbaum für jede Region erstellt werden. Des Weiteren sollten Akzessionen untersucht werden, welche als *Lycium barbarum*, *Lycium chinense* oder *Lycium europaeum* gekennzeichnet waren, was insgesamt 11 Akzessionen der 19 entspricht. Hierfür sollten über eine SRAP verschiedene Primer Kombinationen zum Einsatz kommen, welche verschiedene genetische Fingerabdrücke erzeugen. Es sollte überprüft werden, ob die Arten je eine Gruppe bilden oder ob beispielsweise eine als *Lycium chinense* bezeichnete Art in einer *Lycium barbarum* Gruppe angesiedelt ist. In einem weiteren Versuch

sollten die *Lycium barbarum* SCAR Primer aus Cho-Wing Sze *et al.*; 2008 auf ihre Funktion geprüft werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, ob bei *Lycium barbarum* ein 650bp oder ein 700bp langes DNA Fragment erzeugt wird. Dann sollten aus den vorhandenen Wolfsbeeren der Akzessionen aus dem Jahr 2013 und 2014, die Samen gezählt werden und anschließend ein Boxplot für jedes Jahr und Akzession errechnet werden. Zum Schluss sollten alle Ergebnisse gemeinsam betrachtet werden und überprüft ob diese miteinander übereinstimmen. Zudem sollte beurteilt werden, welche der Methoden am besten geeignet ist um eine *Lycium barbarum* von ihren nah verwandten Arten zu unterscheiden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. *Lycium*-Akzessionen

Probennummer	ID	Taxon	DNA Konzentration nach Extraktion in ng/ $\mu$ l
1	8211	<i>L. ameghinoi</i>	22,33
2	<b>1470</b>	<b><i>L. barbarum</i></b>	492,43
3	<b>5549</b>	<b><i>L. barbarum</i></b>	169,95
4	<b>5550</b>	<b><i>L. barbarum</i></b>	114,56
5	<b>5548</b>	<b><i>L. barbarum</i></b>	122,51
6	7067	<i>L. chilense</i>	535
7	<b>5552</b>	<b><i>L. chinense</i></b>	312,55
8	<b>5551</b>	<b><i>L. chinense</i></b>	642,02
9	<b>6815</b>	<b><i>L. chinense</i></b>	340,8
10	<b>6967</b>	<b><i>L. chinense</i></b>	790,37
11	8213	<i>L. europaeum</i>	33,3
12	7064	<i>L. europaeum</i>	63,59
13	5553	<i>L. europaeum</i>	482,57
14	8212	<i>L. gilliesianum</i>	14,24
15	8352	<i>L. oxycarpum</i>	34,58

Tabelle 1: Dargestellt sind die verschiedenen *Lycium*-Akzessionen. ID ist die Nummer für die einzelnen *Lycium*-Akzessionen. Das Taxon ist die angegebene Spezies der Akzessionen, die überprüft werden sollen.

Probennummer	ID	DNA Konzentration nach Extraktion in ng/μl	Name	Vendor
16	LP1/8603	106	Goji	HANOJU Deutschland GmbH
17	LP2/8604	55,86	Bio Goji	Kräuterhaus Sanct Bernhard KG
18	LP3/8605	27,61	Goji-Acai	Grubauer's Gewürze & Teeversand
19	LP4.1/8606	116,82	Goji	? (Fang Zhang)
19	LP4.2/8606	84,09	Goji	? (Fang Zhang)

Tabelle 2: Zeigt verschiedene Proben aus speziellen Gesundheitsläden, die zusätzlich mit den *Lycium*-Akzessionen untersucht werden sollen. ID zeigt die Proben Nummer und zugeteilte Akzessionsnummer. Name zeigt die Bezeichnung der Beeren und Vendor die Herkunft der Proben.

## 2.2. Verwendete Primer

Name		5'-3' Sequenz	Lokus	Referenz
Bel2	f	GATGCGGAGATTGGCCCCCGTGC	ITS2	Chiou 2007
Bel3	r	GACGCTTCTCCAGACTACAAT		
psbA	f	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	psbA-trnH	psbAF, Sang et al. 1997 trnH2, Tate et al. 2003
trnH	r	CGCGCATGGTGGATTCAATCC		
trnH-Zub	f	CGGGAATTGAACCCGCG	trnH-trnK	Zuber et al. 2009
trnK-Zub	r	CGTAATGCTCATAACTTTCCTCTAGAC		
LB.SC700.F	f	GTCCCGACGATGGTAGCGGATG	SCAR	Cho-Wing Sze 2008
LB.SC700.B	r	GTCCCGACGACACZGACCTGG		
LB.SC650.F	f	GTCCCGACGAGTAAATCAGATTGAG	SCAR	
LB.SC650.B	r	GTCCCGACGACGAGCTGATATG		
HP1	f	TGTATTCGAGCCTGAGAG	SRAP	
HP2	f	TCTTAGTACGGTCCATGC		
HP3	f	TCTGTTACAACCTGGTCG		
HP4	f	TGTAAGTGTAAAGCTGCTGG		
HP5	f	TGTGTTACACAGTCGGAG		
LP1	r	CTGGTCGACACTGTACAT	SRAP	
LP2	r	TGTACCTGGGTCAATCAA		
LP3	r	TGTACCTGGGACATTAGA		
LP4	r	TCTCCAGTGGACATTTCA		
LP5	r	TCTCGCATGGTCAATTAC		

Tabelle 3: Dargestellt sind alle Verwendeten Primer. Der Name des Primers, die 5'-3' Sequenz, welcher Lokus Amplifiziert wird bei dem dementsprechenden Primerpaar bzw. die Verwendung der Primer und die Referenz der Primersequenz.

### 2.3. Verwendete Kits

Name	Hersteller	Webseite	Verwendung
innuPREP Plant DNA Kit	Analytik Jena	<a href="http://www.analytik-jena.de">www.analytik-jena.de</a>	DNA-Extraktion
Gel und PCR Clean up	Macherey-Nagel	<a href="http://www.mn-net.com">www.mn-net.com</a>	DNA-Aufreinigung

Tabelle 4: Zeigt die Namen der verwendeten Kits, wer die Hersteller des Kits sind und wofür sie verwendet wurden. Das Protokoll der Kits ist auf der Webseite der Hersteller erhältlich.

### 2.4. DNA-Extraktion

Bei einer DNA-Extraktion mit einem Kit von Analytik Jena, wird zuerst Probenmaterial gewogen. Hier wurden etwa 30-70 mg Beeren bzw. Blattmaterial der *Lycium*-Akzessionen eingewogen. Danach wurde die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend schnell gemörsert. Danach wurde den Anweisungen des Extraktions-Kits gefolgt. Das Kit basiert auf einer Säulenaffinitätsreaktion, bei der das DNA-Rückgrat an eine Membran in der Säule fest gebunden wird, die DNA gereinigt und anschließend wieder von der Säule gelöst.

### 2.5. PCR Ansätze

10 µl Ansatz			
Komponenten	Stock	µl/10 µl Ansatz	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O		6,8	
BSA	10 mg/ml	1	1 mg/µl
Puffer	10x	1	1x
dNTPs	10 mM	0,2	200 µM
Primer fw	10 µM	0,2	0,2 µM
Primer rw	10 µM	0,2	0,2 µM
Templet	50 ng/µl	0,5	2,5 ng/µl
Polymerase	5 U/ µl	0,1	0,05 U/µl
<b>Gesamt</b>		<b>10 µl</b>	

Tabelle 5: Zeigt einen 10 µl Ansatz für die durchgeführten PCR-Techniken. Aufgeführt sind die Komponenten, die Konzentration ihrer Stock Lösungen, die pipettierte Menge in µl und die Endkonzentration einer 10 µl Probe.

30 µl Ansatz			
Komponenten	Stock	µl/10 µl Ansatz	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O		20,5	
BSA	10 mg/ml	3	1 mg/µl
Puffer	10x	3	1x
dNTPs	10 mM	0,6	200 µM
Primer fw	10 µM	0,6	0,2 µM
Primer rw	10 µM	0,6	0,2 µM
Template	50 ng/µl	1,5	2,5 ng/µl
Polymerase	5 U/ µl	0,2	0,05 U/µl
<b>Gesamt</b>		<b>30 µl</b>	

Tabelle 6: Zeigt einen 30 µl Ansatz für die durchgeführten PCR-Techniken. Aufgeführt sind die Komponenten, die Konzentration ihrer Stock Lösungen, die pipettierte Menge in µl und die Endkonzentration einer 30 µl Probe.

## 2.6. Elektrophorese

Für die Auftrennung der Banden wurde ein 1,5% Agarose-Gel verwendet. Die Gele sind bei 100 V für 25-35 min (je nach PCR-Technik) in 10x TAE Puffer gelaufen. Zum Auflösen der Banden wurde SYBR® Safe DNA Gel Stain von Invitrogen für 10x TAE-Puffer verwendet, welches bereits dem flüssigen Agarose-Gel zugefügt wurde. In die Gel-Taschen wurden 2 µl pro Probe für die Sequenzierung und 10 µl für die SRAP und SCAR geladen. Die Belichtungszeit wurde an die Stärke der Banden angepasst. Für alle PCR-Produkte konnte ein 100 bp Marker eingesetzt werden. Zum Beladen der Gele wurde ein 6x Lade-Puffer zum Beschweren der DNA-Proben verwendet.

## 2.7. Sequenzierung von Marker-Regionen

Zur Sequenzierung der verschiedenen Marker-Regionen wurden diese zunächst mittels PCR amplifiziert. Untersucht wurden die Regionen ITS2 (Bel2/3), *psbA-trnH* (*psbA/trnH*) und *trnH-trnK* (*trnH-Zub/trnK-Zub*). Die dementsprechenden Primer sind Tabelle 3 zu entnehmen. Hierfür wurden alle Pflanzenakzessionen aus Tabelle 1 und die zusätzlichen Proben aus Tabelle 2 verwendet. Der verwendete PCR-Ansatz war ein 30 µl Ansatz (Tabelle 6), die anschließend mit einem Kit für DNA-Aufreinigung (Tabelle 4) auf gereinigt wurden und zur Sequenzierung versandt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden wie in den später aufgeführten bioinformatischen Analysen verarbeitet.

Die hierfür verwendeten PCR-Programme waren folgende:

**Bel2/3:**

95°C	2 min		
94°C	1 min	}	40x
56°C	30 sec		
68°C	45 sec		
68°C	5 min		
10°C	∞		

**psbA-trnH:**

95°C	2 min		
94°C	1 min	}	33x
56°C	30 sec		
68°C	45 sec		
68°C	5 min		
10°C	∞		

**trnH(Zub)-trnK(Zub):**

95°C	2 min		
94°C	1 min	}	33x
57 °C	30 sec		
68°C	45 sec		
68°C	5 min		
10°C	∞		

## 2.8. Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP)

Für die SRAP wurden acht verschiedene Primer-Kombinationen der HP/LP Primer aus Tabelle 3. Die Kombinationen waren folgende:

- HP1/LP1
- HP2/LP2
- HP3/LP3
- HP4/LP4
- HP5/LP5
- HP2/LP1
- HP3/LP2
- HP4/LP3

Verwendet wurden alle *L. barbarum*, *L. chinense* und *L. europaeum* aus Tabelle 1. Der hierfür verwendete PCR-Ansatz war ein 10 µl Ansatz, wie es in Tabelle 5 aufgeführt ist. Das hierfür verwendete PCR-Programm war folgendes:

### F2SRAP-1:

95°C	2 min	} 40x
94°C	1 min	
50°C	1 min	
68°C	1 min	
68°C	5 min	
12°C	∞	

Anschließend wurde die gesamte Probe mittels Elektrophorese für 35 min aufgetrennt.



## 2.9. Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR)

Für die SCAR wurden die Primer aus Tabelle 3 verwendet. Hierbei sollte das SC700 Primerpaar eine 700bp Bande bei *L. barbarum* erzeugen und das Primerpaar SC650 bei 650 bp. Verwendet wurden alle *L. barbarum*, *L. chinense* und *L. europaeum* aus Tabelle 1. Als PCR-Ansatz wurde ein 10 µl PCR Ansatz wie in Tabelle 5 beschrieben verwendet. Das PCR-Programm für beide Primer-Kombinationen war folgendes:

94°C	2 min	} 36x
94°C	1 min	
65°C	1 min	
68°C	1 min	
68°C	5 min	
10°C	∞	

Anschließend wurde die gesamte Probe mittels Elektrophorese für 25 min aufgetrennt.

## 2.10. Auszählung von *Lycium*-Samen

Zur Auszählung von *Lycium*-Samen wurden folgende Pflanzenakzessionen untersucht:

ID	Taxon	2013	2014
5550	<i>L. barbarum</i>	x	x
6815	<i>L. chinense</i>	x	x
5549	<i>L. barbarum</i>	x	x
5552	<i>L. chinense</i>	x	x
5551	<i>L. chinense</i>	x	x
6967	<i>L. chinense</i>	x	x
5548	<i>L. barbarum</i>	-	x
5553	<i>L. europaeum</i>	-	x

Tabelle 7: Zeigt die ID der verwendeten Akzessionen, das zu überprüfende Taxon und aus welchem Jahr die Beere stammt. Untersucht wurden Beeren aus den Jahren 2013 und 2014. Ein Kreuz bedeutet, dass die Probe vorhanden war und ein – das sie nicht vorhanden war.

Zunächst wurden 10 Beeren aus jeder Akzession für 2 Tage in Wasser aufgeweicht. Anschließend wurden die Beeren auf 3 Lagen Zewa und mit Hilfe einer Pinzette und einem Zahnstocher gepulvt. Die Samen wurden ausgezählt und die Anzahl der Samen pro Beere notiert. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde mit der Computer Software R-Studio ein Box-Plot für jede Akzession erstellt.

## 2.11. Bioinformatik

### 2.11.1. Verwendete Software und Webseiten

Name	Webseite	Verwendung
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Sequenz BLAST
Jalview	<a href="http://www.jalview.org/">http://www.jalview.org/</a>	Alignment
MEGA6	<a href="http://www.megasoftware.net/">http://www.megasoftware.net/</a>	Alignment und Stammbäume
R-Studio	<a href="http://www.rstudio.com/">http://www.rstudio.com/</a>	Erstellung Boxplot

Tabelle 8: Dargestellt sind alle verwendete Software Programme und Genbanken für die Auswertung der Ergebnisse.

### 2.11.2. Sequenz Alignment

Die von der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen wurden in der Genbank (gb) NCBI geblastet und ähnliche Sequenzen ermittelt. Anschließend wurden die Sequenzierungsergebnisse in MEGA6 an den Primerstellen zugeschnitten, die BLAST Ergebnisse aus der gb dazu geladen und gemeinsam aligniert. Diese wurden ebenfalls zugeschnitten und das Alignment abgespeichert. Danach wurde das Alignment in Jalview geladen und die gleichen Sequenzen entfernt. Zu stark abweichende Außengruppen wurden ebenfalls entfernt. Das Alignment wurde abermals gespeichert und zuletzt in eine MEGA6 Datei umgewandelt.

### 2.11.3. Erstellen eines phylogenetischen Stammbaums

In MEGA6 wurden die als MEGA Datei abgespeicherten Alignments hochgeladen und ein Neighbour Joining (NJ) Baum mit den Einstellungen Bootstrap 500 und pairwise deletion erstellt. Danach wurde die Wurzel des Stammbaums bestimmt, durch Verwendung einer *Solanum* Außengruppe. Die *Solanum* Außengruppe wurde zusammengefasst und die Sequenzierungsergebnisse farblich gekennzeichnet. Das Hide value/FTBV wurde auf eine Signifikanz über 70 eingestellt. Gruppen, die keine Sequenzierten Proben enthalten, wurden zum Teil zusammengefasst und anschließend wurde der Stammbaum abgespeichert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Amplifizierung der Marker-Regionen

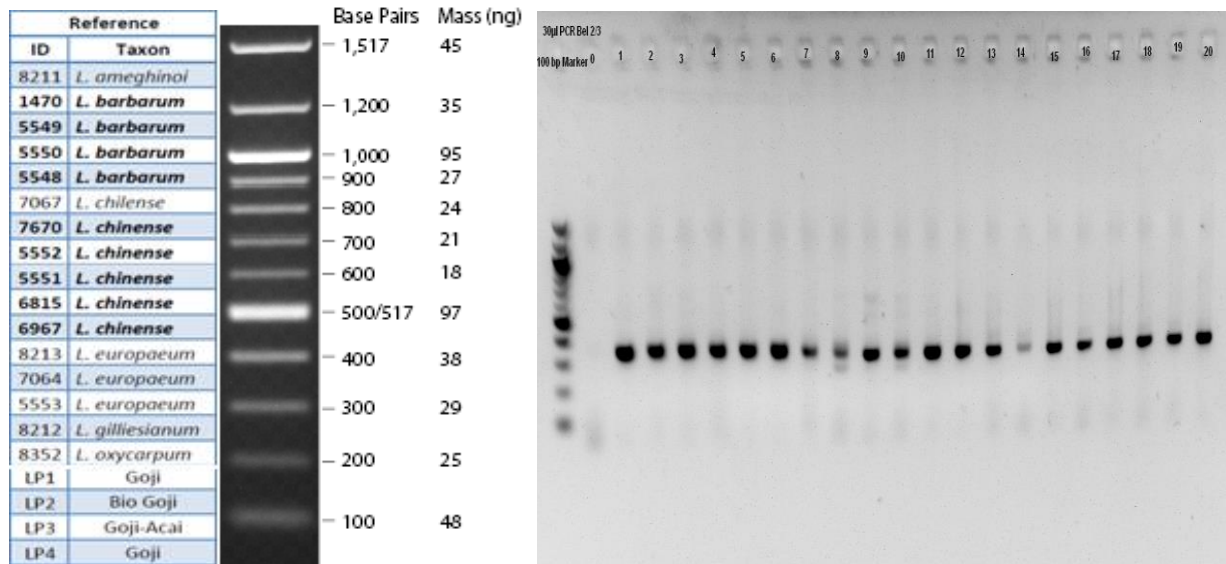
Die Marker Regionen wurden mittels eines 30 µl PCR Ansatzes amplifiziert und anschließend über eine Elektrophorese, wie es in Methoden beschrieben ist, auf ihre Funktion überprüft. Amplifiziert wurden die drei Marker-Regionen *ITS2*, *psbA-trnH* und *trnH-trnK*. Anschließend wurden alle Proben sequenziert mit Ausnahme der folgenden Proben aus Tabelle 9. Der Grund hierfür war, dass diese Proben bereits vom Botanischen Institut I sequenziert wurden. Die Probe 8212, welche mit den Primern Bel 2/3 amplifiziert wurde (in Tabelle 9 rot markiert) wurde nicht sequenziert, da die Bande zu schwach war [Abbildung 5].

Bel2	Bel3	trnH
5551	5548	1470
8212	5552	5549
	5551	5550
	6967	5548
	5553	5551
	8212	6967
		5553
		8252

**Tabelle 9:** Zeigt die nicht Sequenzierten Proben, der Primer Bel2, Bel3 und trnH. Die rot Markierte Probe wurde nicht sequenziert, da die Bande sehr schwach zu sehen war [Abbildung 5]. Die Bezeichnung der Akzessionsnummern ist Tabelle 1 zu entnehmen.

#### 3.1.2 Ergebnis der PCR mit Bel 2/3-Primern

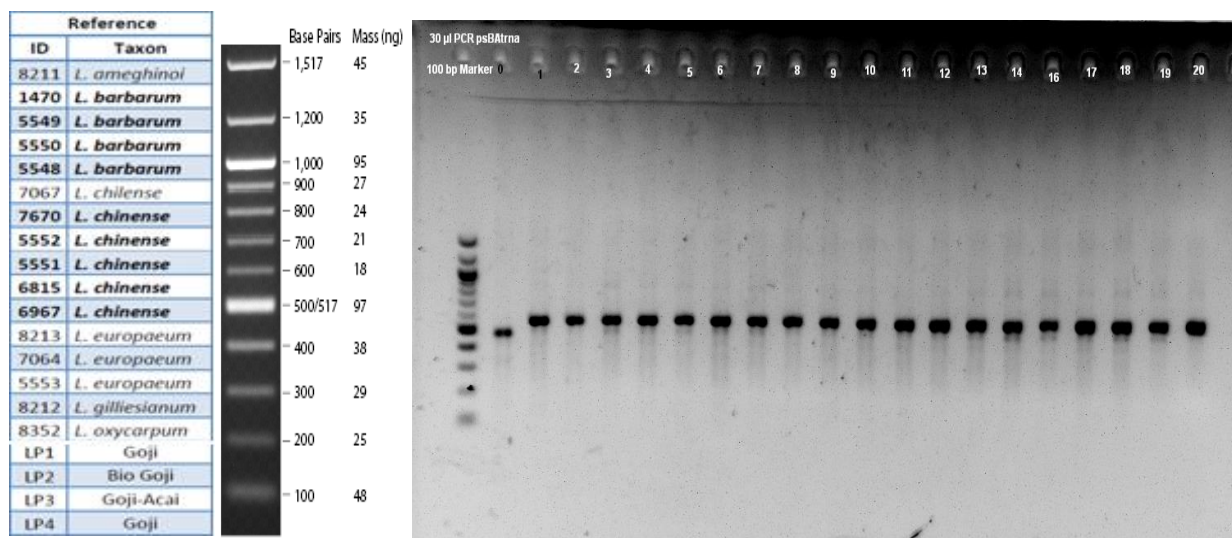
Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, ist in jeder Spur eine Bande zwischen 300 und 400 Basenpaaren zu erkennen. In der Negativkontrolle ist am Ende der Spur ein diffuser Fleck zu sehen. In der Spur 14 Akzession (8212) ist nur eine sehr schwache Bande zu erkennen. Spur 8 (Akzession 5551) weist zwei Banden auf.



**Abbildung 5:** Ergebnis der PCR zur Amplifikation eines Barcoding-Fragments durch Bel2/3-Primer; zu sehen sind die amplifizierte Fragmente der Akzessionen aus Tabelle 1 mit den Probennummern 1-20.

### 3.1.3 Ergebnis der PCR mit PsbA/trnH Primern

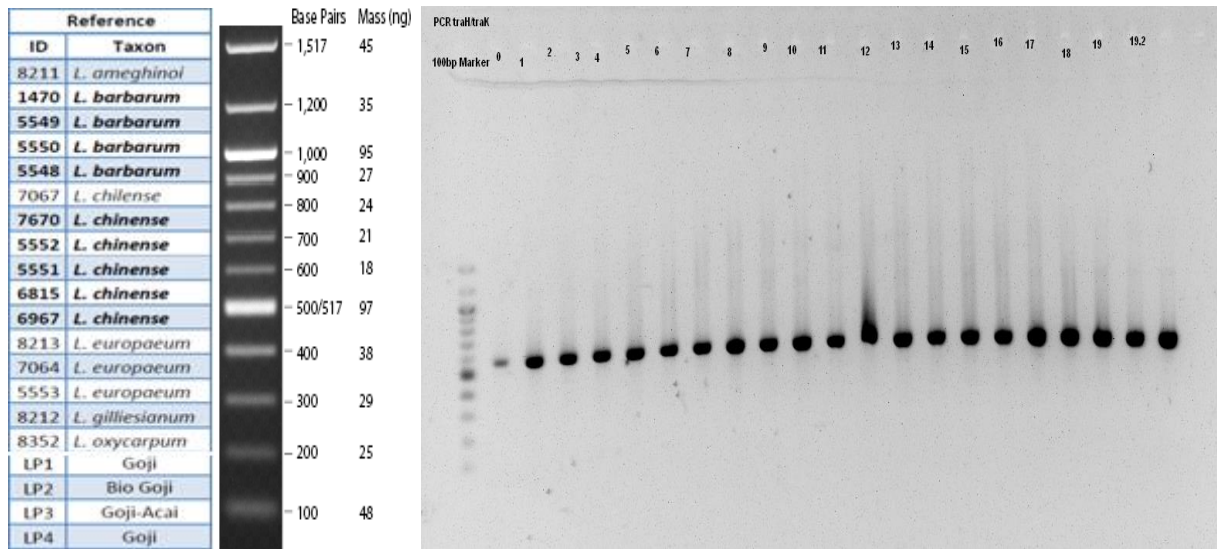
In Abbildung 6 ist zu sehen, dass in jeder Spur für jede Akzession eine deutliche Bande bei etwa 600 Basenpaaren sichtbar ist. In der Negativkontrolle ist eine Bande bei etwa 500 Basenpaaren sichtbar. Es sind in jeder Spur Schlieren zu erkennen.



**Abbildung 6:** Ergebnis der PCR zur Amplifikation eines Barcoding-Fragments durch psbA/trnH-Primer; zu sehen sind die amplifizierte Fragmente der Akzessionen aus Tabelle 1 mit den Probennummern 1-20.

### 3.1.4 Ergebnis der PCR mit TrnH Zub/TrnK Zub Primern

Es ist in jeder Spur eine Bande bei etwa 600 Basenpaaren zu sehen. In der Negativkontrolle ist ebenfalls eine Bande bei 600 Basenpaaren sichtbar, die jedoch schwächer ausgeprägt ist als die Banden in den anderen Spuren. In Spur 12 (Akzession 8213) ist eine sehr diffuse, verschmierte Bande zu erkennen. In jeder Spur sind Schlieren zu erkennen.



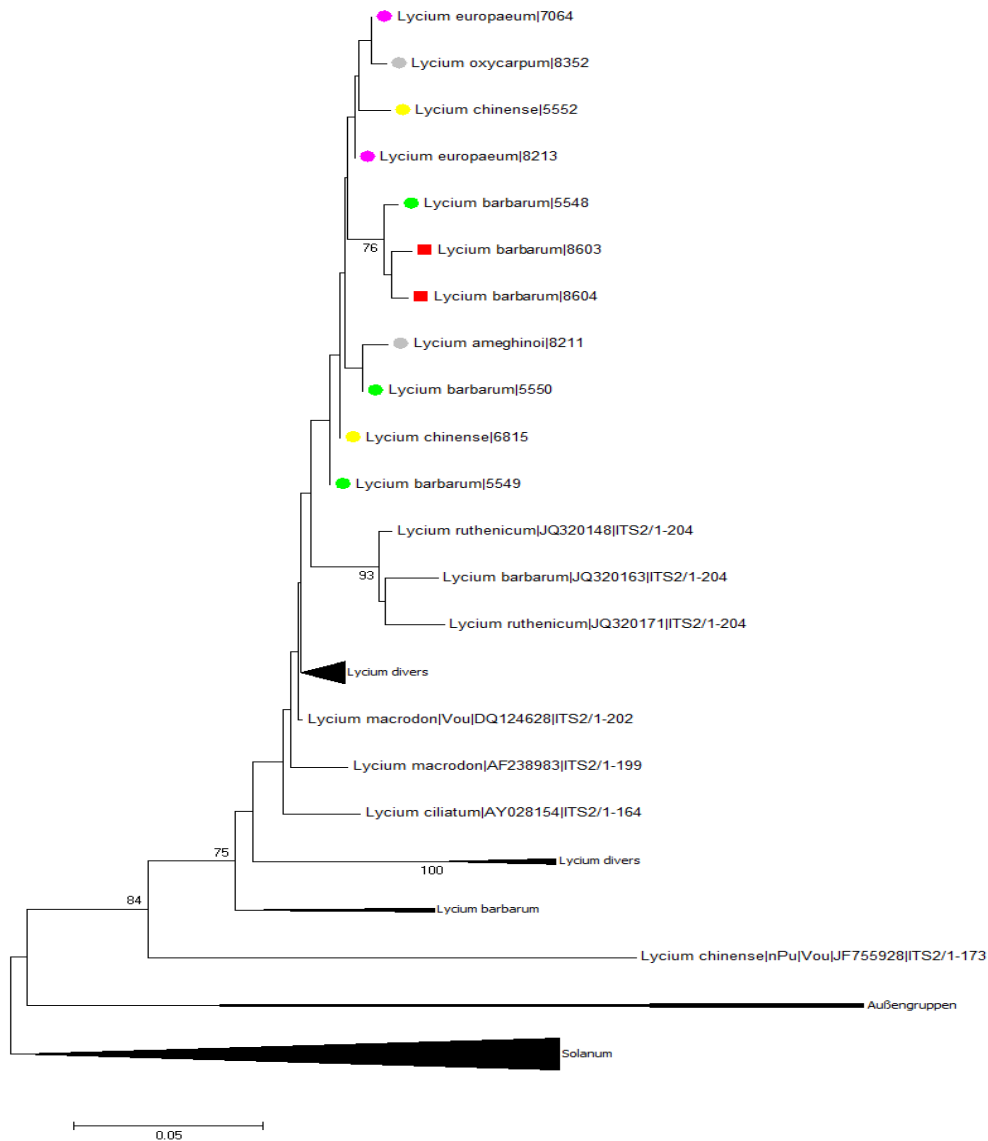
**Abbildung 7:** Ergebnis der PCR zur Amplifikation eines Barcoding-Fragments durch trnH Zub/trnK Zub Primer; zu sehen sind die amplifizierten Fragmente der Akzessionen aus Tabelle 1 mit den Probennummern 1-20.

### 3.2 Phylogenetische Stammbäume der Marker-Regionen

Die phylogenetischen Stammbäume der Marker Regionen wurden mittels der Sequenzierungsergebnisse der Primeramplifikationen Bel2, Bel3, psbA, trnH, trnH Zub und trnK Zub ermittelt. Vor dem Sequenzalignment der Marker Regionen wurde die forward (f) Sequenz (siehe f Primer aus Tabelle 3) und die reverse (r) Sequenz zusammengefügt und an den Stellen der Primer aufeinander zugeschnitten. Das Alignment und der Stammbaum wurden, wie in Methoden beschrieben erstellt.

### 3.2.1 Stammbaum der ITS2-Sequenzen

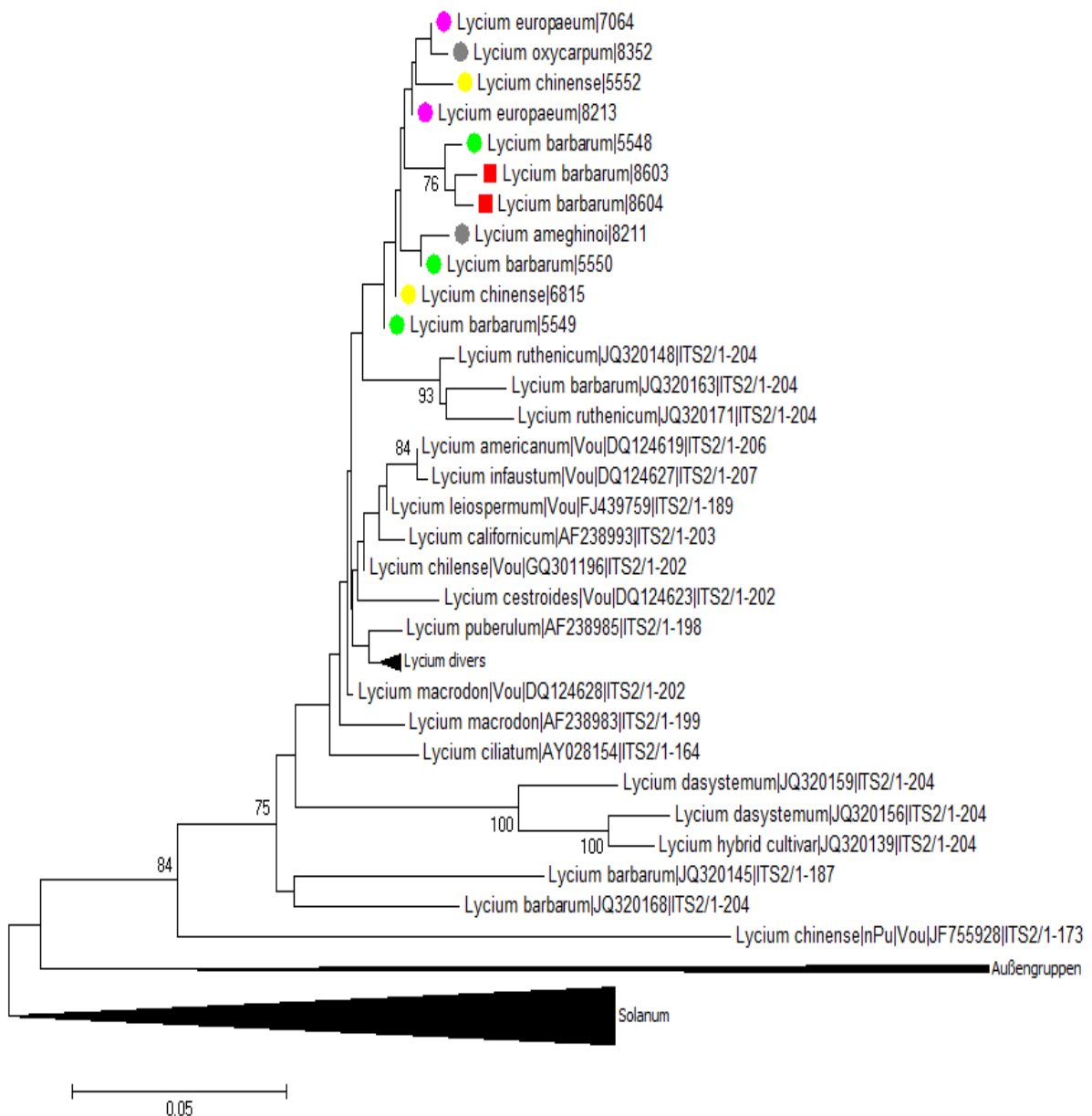
In Abbildung 8 ist der Neighbor Joining Stammbaum der *ITS2* Marker Region. Die untersuchten Akzessionen, welche in grün (Tabelle 1), für Proben mit Bezeichnung, markiert sind und in Rot (Tabelle 2), für die Proben mit unbekannter Art. Zudem sind Sequenzen der *ITS2* Region aus NCBI hinzugefügt wurden. Zu sehen ist, dass die Proben sehr dicht bei den eurasischen *Lycium*-Arten aus der Genbank angesiedelt sind und gemeinsam eine Gruppe bilden. Der Stammbaum zeigt nur an einigen Stellen eine Signifikanz. Es konnten nicht alle Sequenzierungsergebnisse dargestellt werden.



**Abbildung 8:** Auf dem ITS2 Marker basierender Neighbour Joining Stammbaum sind die sequenzierten Proben in Grün für die Akzessionen mit Bezeichnung und Rot für die Proben mit unbekannter Art gezeigt. Zudem sind die ITS2 Sequenzen des Genus *Lycium* aus der Genbank NCBI abgebildet. Die Außengruppe und somit auch die Wurzel des Baums stellen einige Solanaceae dar, die hier zusammengefasst wurden. Zudem wurden noch weitere Gruppen zusammengefasst, die keine Sequenzierungsergebnisse enthalten. Die Zahlen an den Verzweigungen zeigt das FTBV >70%.

## 2.2 Stammbaum der *psbA-trnH*-Sequenzen

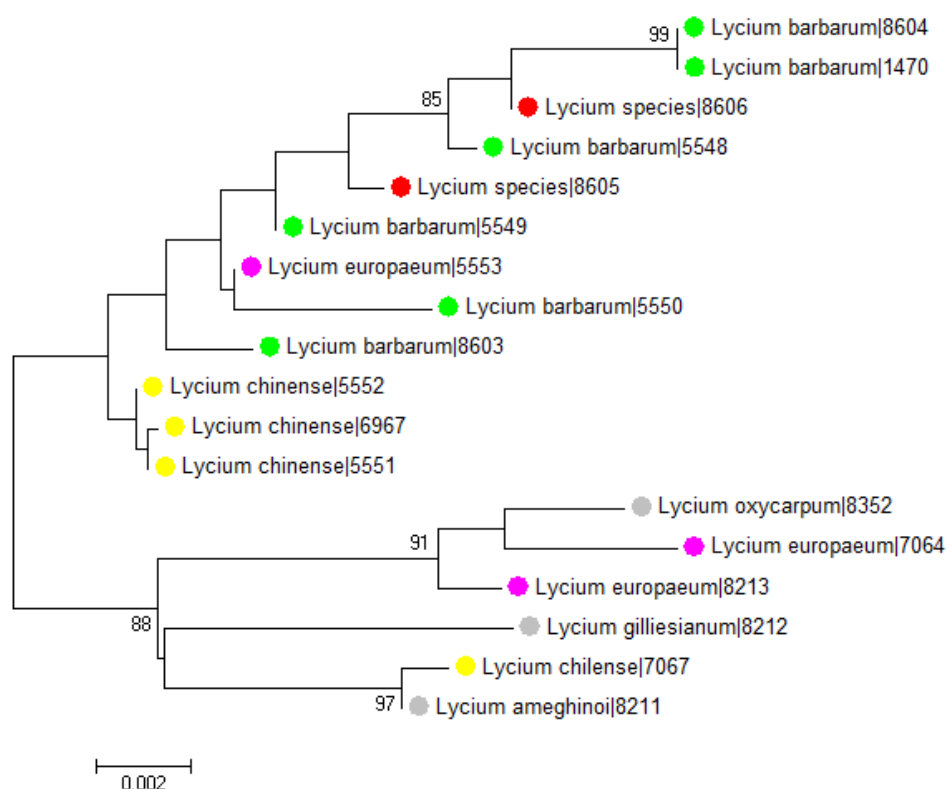
In Abbildung 9 ist der Neighbour Joining Baum der Marker Region *psbA-trnH* zu sehen. Es sind mehr Sequenzierungsergebnisse dargestellt als bei dem vorherigen Stammbaum der *ITS2* Region. Auch hier stellen die grünen Markierungen die Akzessionen mit Artbezeichnung dar (Tabelle 1) und die roten (Tabelle 2) die Artbezeichnungen ohne bekannte Art. Die Außengruppe besteht aus einer Zusammenfassung der *psbA-trnH* Region von Solanaceae. An den Verzweigungen ist wieder das FTBV dargestellt. In diesem Baum liegen die Akzessionen 5553, 5550, 6967 und 5551 sehr nahe beisammen. Ebenfalls nah verwandt sind in diesem Baum die Akzessionen 6815 und 5552, 5548 und 1470 sowie 8213 und 7064. Zwischen diesen einzelnen Stellen, bei denen die Akzessionen konglomerieren, sind einige andere Unterarten sowie weitere, nicht untersuchte Akzessionen zu finden. Als phylogenetische Außengruppe wurde die Gattung *Solanum* gewählt.



**Abbildung 9:** Auf dem *pabA-trnH* Marker basierender Neighbour Joining Stammbaum sind die sequenzierten Proben in Grün für die Akzessionen mit Bezeichnung (Tabelle 1) und Rot für die Proben mit unbekannter Art (Tabelle 2) gezeigt. Zudem sind *psbA-trnH* Sequenzen des Genus *Lycium* aus der Genbank NCBI dargestellt. Die Außengruppe und somit auch die Wurzel des Baums stellen einige *Solanaceae* dar, die hier zusammengefasst wurden. Auch wurde eine weitere Gruppe zusammengefasst, die keine Sequenzierungsergebnisse enthält. Die Zahlen an den Verzweigungen zeigt das FTBV >70%.

### 3.1.1. Stammbaum der *trnH-trnK*-Sequenzen

In Abbildung 10 ist der Neighbour Joining Baum der Marker Region *trnH-trnK* dargestellt. Zu sehen sind lediglich die Sequenzierungsergebnisse, da für diese Region aus Zuber et al., 2009 kaum Sequenzen in der Genbank NCBI vorhanden sind. Der Stammbaum besitzt auch keine Wurzel, da keine geeignete Außengruppe zu finden war. Die grüne Markierung sind alle als *L. barbarum* gekennzeichneten Arten, lila alle als *L. europaeum*, gelb alle *L. chinense* (Tabelle 1) und in Rot alle unbekannt bezeichnete Akzessionen (Tabelle 2). In grau sind alle weiteren Arten aufgeführt (Tabelle 1). In diesem Stammbaum liegen die beiden Akzessionen 8604 und 1470 zusammen. Es fällt auf, dass alle Akzessionen der Art *Lycium chinense* phylogenetisch zusammenliegen.



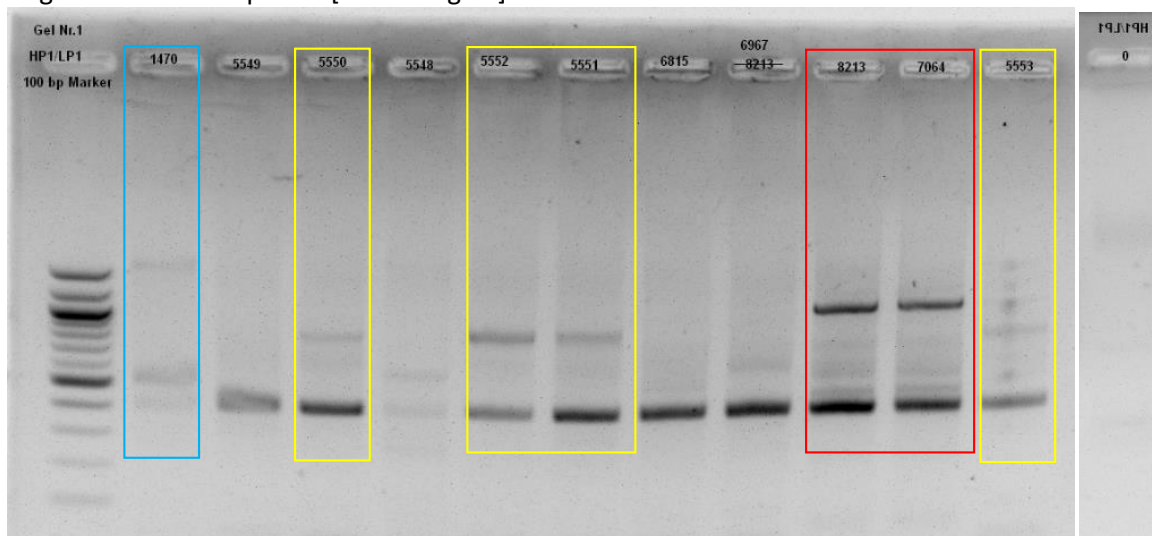
**Abbildung 10:** Auf dem *trnH-trnK* Marker basierenden Neighbour Joining Stammbaum sind die sequenzierten Proben der verschiedenen Akzessionen aus Tabelle 1 und 2 zu sehen. In grün sind alle *L. barbarum* gekennzeichnete Arten, lila alle als *L. europaeum*, gelb alle *L. chinense* und in rot alle



unbekannten bezeichneten Akzessionen aus Tabelle 2. In grau sind alle weiteren Arten aus Tabelle 1 aufgeführt. Zudem ist das FTBV für die Signifikanz der Verzweigungen dargestellt.

### 3.2. Ergebnis der SRAP

Die SRAP wurde für jede Primerkombination wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Muster der Fingerabdrücke wurden pro Primerkombination miteinander verglichen und gleiche Muster bildeten eine Gruppe. Undeutliche Bandenmuster wurden verworfen. Alle acht Primerkombinationen ergaben insgesamt sechs Gruppen, was sechs verschiedenen Mustern der Fingerabdrücke entspricht. [Abbildung 11]



**Abbildung 11:** Zeigt beispielhaft die Einteilung der Gruppen, anhand der Primerkombination HP1/LP1. Die gelben Kästen stellen eine der Gruppen dar, welche die Akzessionen 5550 (als *L. barbarum* bezeichnet), 5553 (als *L. europaeum* bezeichnet), 5552 und 5551 (als *L. chinense* bezeichnet) enthält. Der rote Kasten zeigt eine weitere Gruppe, welche die Akzessionen 8213 und 7064 (als *L. europaeum* bezeichnet) enthält. Der blaue Kasten zeigt ein undeutliches Bandenmuster, das verworfen wurde.

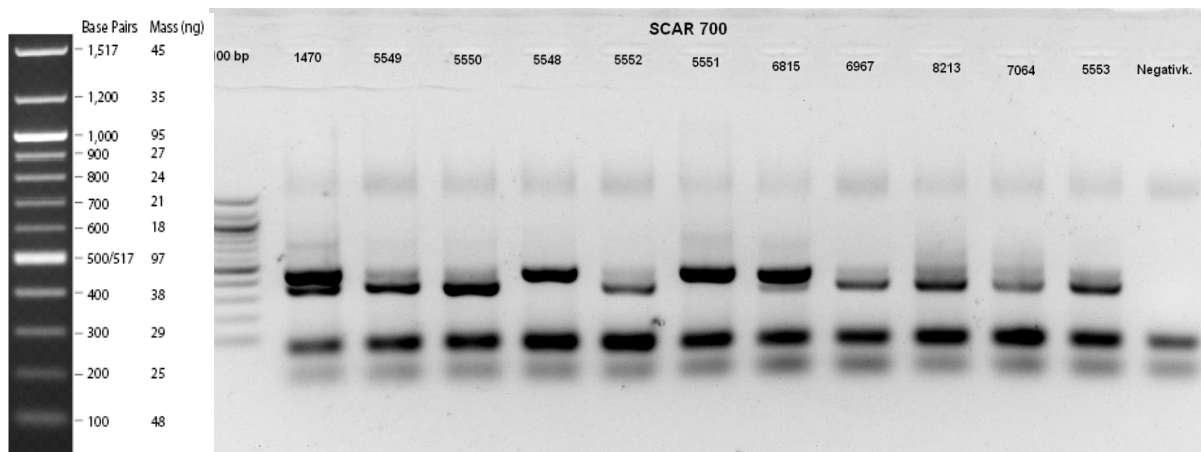
Anschließend wurde eine Ähnlichkeitsmatrix erstellt [Abbildung 12], indem verglichen wurde in wie vielen Gruppen einzelne Akzessionen paarweise gemeinsam auftreten. Die höchste Ähnlichkeit wird zwischen den Akzessionen 8213 und 7064 sowie zwischen 5551 und 6815 (jeweils 6 Ähnlichkeiten) erreicht. Weiterhin besteht eine relativ große Ähnlichkeit zwischen folgenden Akzessionen: 5551 und 5552 (5 Ähnlichkeiten), 6815 und 6967 (5 Ähnlichkeiten), 5553 und 5552 (5 Ähnlichkeiten), 5553 und 5551 (5 Ähnlichkeiten) und 5551 und 5550 (5 Ähnlichkeiten). Weiterhin gibt es viele Akzessionen mit 4 Ähnlichkeiten zueinander, wie 5549 und 5550, 5550 und 5552, 5550 und 6815, 5550 und 5553, 5552 und 6815, 5552 und 6815, 5553 und 6815, 5551 und 6967 und 5553 und 6967.

Spezies	Akzession	5549	5550	5548	5552	5551	6815	6967	8213	7064	5553	1470
L. barbarum	5549	X	4	1	1	1	1	1	0	0	1	2
L. barbarum	5550	4	X	0	4	5	4	2	0	0	4	1
L. barbarum	5548	1	0	X	1	0	0	1	2	1	0	2
L. chinense	5552	1	4	1	X	5	4	3	0	0	5	0
L. chinense	5551	1	5	0	5	X	6	4	0	0	5	0
L. chinense	6815	1	4	0	4	6	X	5	0	0	4	0
L. chinense	6967	1	2	1	3	4	5	X	1	1	4	1
L. europaeum	8213	0	0	2	0	0	0	1	X	6	0	2
L. europaeum	7064	0	0	1	0	0	0	1	6	X	0	1
L. europaeum	5553	1	4	0	5	5	4	4	0	0	X	0
L. barbarum	1470	2	1	2	0	0	0	1	2	1	0	X

**Abbildung 12:** Zeigt die erstellte Ähnlichkeit Matrix der paarweise verglichenen Akzessionen. Die farbliche Markierung zeigt die Ähnlichkeit von 0 gemeinsamen Gruppen (gelb) bis 6 gemeinsamen Gruppen (dunkelgrün).

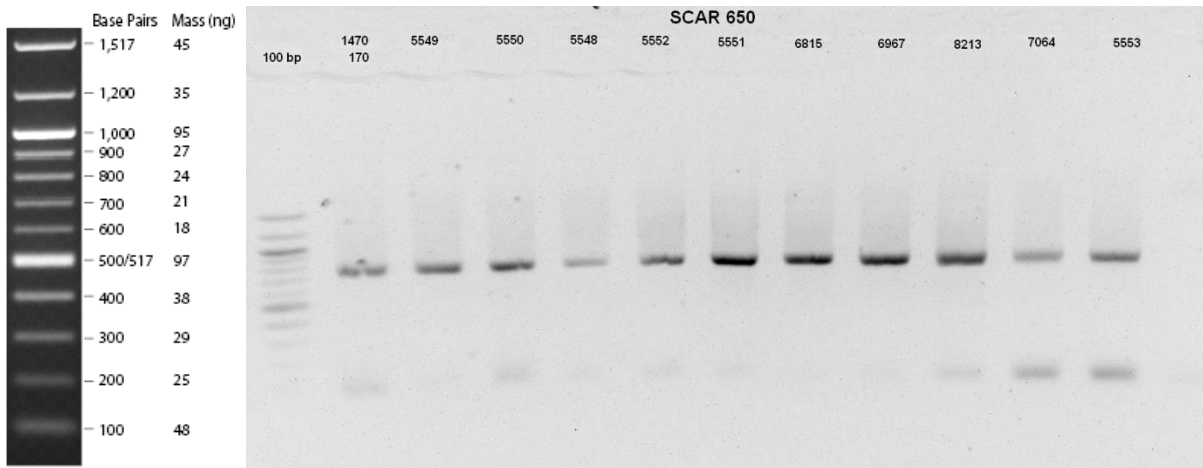
### 3.3. Ergebnis der SCAR-Analyse

Die SCAR Analyse wurde mit den SCAR Primern LB.SC700.F, LB.SC700.B, LB.SC650.F und LB.SC650.B [Tabelle 1] aus Cho-Wing Sze 2008 durchgeführt. Die PCRs wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. In Abbildung 13 ist für jede Akzession ein Muster an Banden zu erkennen. Für keine der Akzessionen ist eine 700 bp-Bande erkennbar. Für einige Akzessionen ist eine Bande bei etwa 400 Basenpaaren in unterschiedlicher Intensität erkennbar. Auch bei 300 Basenpaaren liegt bei einigen Akzessionen eine mehr oder weniger starke Bande. Auffällig sind in jeder Spur zwei untere Banden am Ende jeder Spur.



**Abbildung 13:** Dargestellt ist die SCAR mit den Primern LB.SC700.F und LB.SC700.B aus Tabelle 3.

In Abbildung 14 ist für jede Spur der Akzession eine Bande zu erkennen. Das Produkt dieser Bande hat eine Größe zwischen 700 und 800 Basenpaaren.



**Abbildung 14:** Dargestellt ist die SCAR mit den Primern LB.SC700.F und LB.SC700.B aus Tabelle 3.

### 3.4. Ergebnis der Unterschiede in der Samenanzahl

Die Samen der Wolfsbeeren wurden für die in Tabelle 10 und 11 aufgeführten Akzessionen ausgezählt und notiert. Insgesamt wurden für die Stichprobenzählung 10 Beeren pro Akzession und Erntejahr (2013 oder 2014) ausgezählt. Anschließend wurde für diese je Stichprobe ein Boxplot ermittelt. [Abbildung 15 und 16]

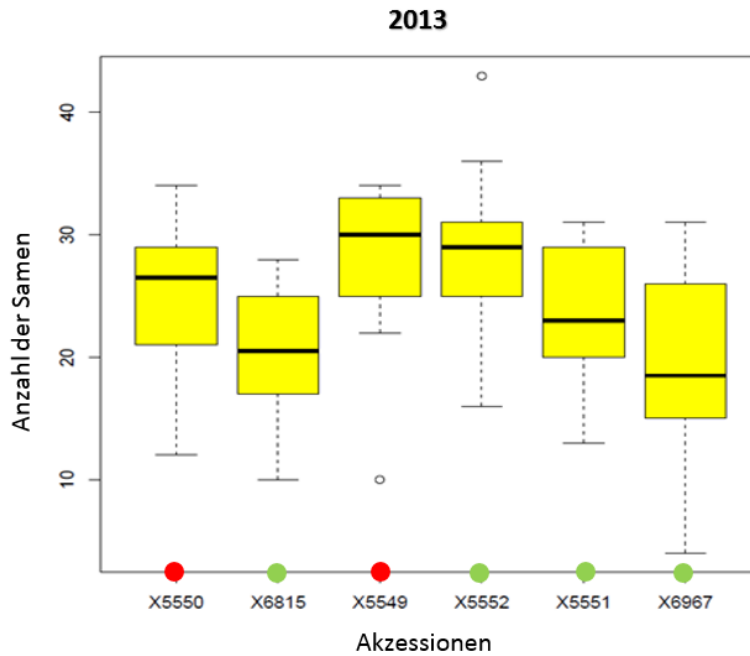
2013	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5550	12	28	21	30	29	14	21	27	34	26
6815	28	18	24	17	23	11	27	17	25	10
5549	22	26	33	30	30	34	30	33	25	10
5552	31	25	31	43	28	30	16	19	25	36
5551	30	29	21	27	23	31	20	15	23	13
6967	27	26	31	19	15	18	18	4	25	15

**Tabelle 10:** Anzahlen der gezählten Samen pro Frucht von Früchten aus dem Jahrgang 2013; pro Akzession wurden die Samen von 10 Früchten ausgezählt

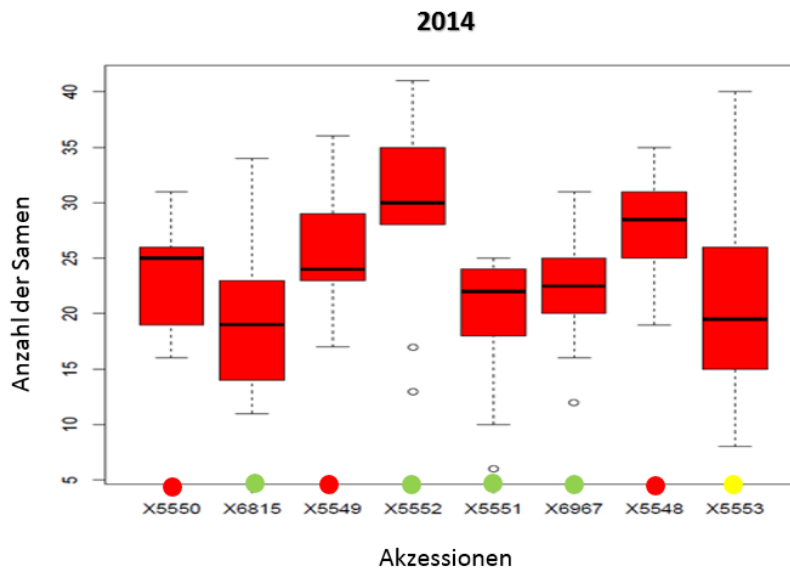
2014	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5550	23	31	25	29	16	25	19	26	19	25
6815	16	17	21	34	21	23	29	11	14	13
5549	24	22	23	17	29	24	28	36	29	23
5552	32	35	41	30	17	29	28	30	13	35
5551	23	22	25	21	10	25	6	22	24	
6967	22	16	29	25	20	31	21	12	23	24
5548	31	23	30	25	30	27	35	31	25	19
5553	17	40	19	20	23	35	26	13	15	8

**Tabelle 11:** Anzahlen der gezählten Samen pro Frucht von Früchten aus dem Jahrgang 2013; pro Akzession wurden die Samen von 10 Früchten ausgezählt

Die Abbildung 15 zeigt den Boxplot aus dem Jahr 2013 in Gelb und Abbildung 16 zeigt den Boxplot der Samenausählung des Jahres 2014. Dargestellt ist eine Stichprobe aus 10 Beeren. Mit einem roten Punkt sind die Spezies *L. barbarum* gekennzeichnet, mit einem grünen Punkt die Art *L. chinense* und mit einem gelben Punkt die Art *L. europaeum*. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Samen und die X-Achse zeigt die Akzessionsnummern. Der Median der Boxplots zeigt die durchschnittliche Anzahl der Samen aus den Früchten. Der obere und untere Teil in Gelb bzw. Rot zeigt das obere und untere Quantil des Median an. Die weißen Punkte sind die Ausreißer der Stichprobenzählung und somit eine extrem kleine bzw. große Beobachtung. Die Striche zeigen die kleinste normale bzw. größte normale Beobachtung. Bei einigen Auszählungen kam es zu kleinen Ausreißern. Zudem fällt auf, dass der Median unterschiedlichste Samenzahlen aufweist, bei den unterschiedlichen Auszählungen der Samen. Vergleicht man die gleichen Akzessionen vom selben Jahr, sind keine Auffälligkeiten zu beobachten.



**Abbildung 15:** Verteilung der Samenanzahlen der im Jahr 2013 geernteten Früchte als Boxplots dargestellt. Die roten Punkte bezeichnen die Akzessionen von *Lycium barbarum* und die grünen Punkte die Akzessionen von *Lycium chinense*. Auf der x-Achse sind die Akzessionsnummern aufgetragen, auf der y-Achse die Anzahl der Samen pro Frucht. Der Dicke schwarze Strich in der Mitte stellt den Median dar und der gelb gekennzeichnete Bereich umfasst das obere und untere Quantil des Median. Die dünnen Linien am Ende der Gestrichelten Linien sind die kleinste und die größte normale Beobachtung der Stichprobenzählung aus 10 *Lycium*-Früchten. Die weißen Kreise, mit schwarzer Umrandung sind die extrem kleinsten bzw. extrem größten Beobachtungen.



**Abbildung 16:** Verteilung der Samenanzahlen der im Jahr 2014 geernteten Früchte als Boxplots dargestellt. Die roten Punkte bezeichnen die Akzessionen von *Lycium barbarum*, die grünen Punkte die Akzessionen von *Lycium chinense* und der gelbe Punkt eine *L. europeum*. Auf der x-Achse sind die Akzessionsnummern aufgetragen, auf der y-Achse die Anzahl der Samen pro Frucht. Der Dicke schwarze Strich in der Mitte stellt den Median dar und der rot gekennzeichnete Bereich umfasst das obere und untere Quantil des Median. Die dünnen Linien am Ende der Gestrichelten Linien sind die kleinste und die größte normale Beobachtung der Stichprobenzählung aus 10 *Lycium*-Früchten. Die weißen Kreise, mit schwarzer Umrandung sind die extrem kleinsten bzw. extrem größten Beobachtungen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Phylogenetische Analyse der drei Marker Regionen

#### 4.1.1. Amplifizierung der Sequenzen von *ITS2*, *psbA-trnH* und *trnH-trnK*

Die Amplifizierung der diagnostischen Sequenzen konnte im Wesentlichen erfolgreich durchgeführt werden. Für *ITS2* waren für alle Akzessionen, in einer Höhe zwischen 300 und 400 Basenpaaren, eine Bande zu erkennen, mit Ausnahme der Probennummer 14 (Tabelle 1). Die schwache Bande der Probennummer 14 (siehe Abbildung 5) ist darauf zurückzuführen, dass die DNA-Konzentration in dieser Probe sehr niedrig ausgefallen ist. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Tasche des Gels an dieser Stelle ein Loch aufwies und Teile der Probe verloren gingen. Trotz allem wurde diese Probe zunächst nicht mitsequenziert, da eine zu geringe DNA-Konzentration keine gute Sequenzierung dieser ergibt. Es bietet sich an in einem solchen Fall die Probe bei Gelegenheit nochmals über ein Agarose-Gel laufen zu lassen. Sollte dies zu demselben Ergebnis führen, so ist es ratsam nochmals die PCR zu wiederholen und die Anzahl der Zyklen zu erhöhen. Auch hilfreich ist es das Template nochmals zu überprüfen, denn möglicherweise wurde zu wenig DNA aus der Probe extrahiert und es ist eine neue Extraktion nötig.

Für *psbA-trnH* ist ebenfalls wie zu erwarten jeweils eine Bande pro Akzession sichtbar. Die Banden zeichnen sich sehr deutlich ab (Abbildung 6). In der Negativkontrolle ist ebenfalls eine deutliche Bande zu erkennen, die jedoch auf einer anderen Höhe liegt als die Bande der Akzessionen. Somit handelt es sich nicht um das gleiche Produkt. Trotz allem könnte dies auf eine Kontamination durch Mikroorganismen hinweisen, wo der Primer unspezifisch band und ein unbekanntes Produkt amplifizierte. Ebenfalls könnte die Bande eine amplifizierte *ITS2* Region von einer Pilzkontamination darstellen, was bei einer Sequenzierung zu Problemen führen könnte, da evtl. zwei Sequenzen sequenziert werden. In der Regel sollte überprüft werden, welche der PCR Agenzien kontaminiert ist, diese entsorgen und den Versuch wiederholen.

Für die mit den Primern *trnH-trnK* durchgeführte PCR war ebenfalls für jede Bande ein Produkt zu erkennen. Es war jedoch auch in dieser Negativkontrolle ein Produkt zu erkennen, das in diesem Fall auf der gleichen Höhe lag wie die Banden der Akzessionen in den anderen Spuren. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass ein Bestandteil des Mastermixes mit Fremd-DNA kontaminiert war, die den Abschnitt, der amplifiziert werden sollte enthielt, wodurch eine Amplifikation stattfand. In diesem Fall liegt sehr nahe, dass es sich um dieselbe Kontamination handelt, wie sie bereits bei der Negativkontrolle der *trnH-trnK* Amplifikation vorlag. Da sich die Bande jedoch auf derselben Höhe befindet, wie die Banden der anderen Spuren könnte auch ein Teil der Nachbarprobe hinübergeflossen sein, als das Gel befüllt wurde. Die Amplifikation derselben Region durch eine

Pilzkontamination kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, da die Region auf dem Chloroplasten Genom lokalisiert ist und Pilze ein solches Organell nicht besitzen. Allerdings schließt dies keine Pilzkontamination aus, da Primer auch unspezifisch binden können. Viel näher liegt jedoch die Vermutung, dass die Kontamination pflanzlicher Herkunft ist. Auch in diesem Fall sollten die Agenzien erneuert und der Versuch wiederholt werden.

#### 4.1.2. Sequenzierung und Stammbaumerstellung anhand der Marker-Sequenzen

Nicht alle Sequenzierungsergebnisse konnten für eine phylogenetische Analyse verwendet werden, weshalb in den Stammbäumen auch keine 19 Akzessionen aufgeführt sind. Diese Sequenzierungen sollten zur Vervollständigung nochmals wiederholt werden, damit die Verwandtschaftsverhältnisse klar werden. Betrachtet man die Stammbäume, dann wäre zu erwarten, dass die Akzessionen, die der gleichen Art angehören, im Stammbaum als eine Einheit auftreten oder sich in phylogenetischer Nähe zueinander befinden. Im ITS2-basierten Stammbaum fällt auf, dass alle untersuchten Akzessionen mehr oder weniger beisammen liegen, was darauf zurückzuführen ist, dass die Akzessionen alle aus Eurasien stammen. Vergleicht man den ITS2 Stammbaum (Abbildung 8) mit dem aus Fukuda *et al.*; 2000 (Abbildung 2), dann sieht man auch hier deutliche Gruppeneinteilungen nach der geografischen Lage der dargestellten *Lycium*-Spezies. So bilden die eurasischen Spezies eine Gruppe, mit unseren Proben. Auch die aus Nord Amerika stammenden Spezies bilden in diesem Stammbaum eine deutliche Gruppe. Alle weiteren Arten (ganz unten im Stammbaum angesiedelt), welche hauptsächlich aus Südamerika stammen, bilden zwar eine eher undeutliche, aber auch leicht erkennbare Gruppe. Dennoch ist eine deutliche Ähnlichkeit zu dem Stammbaum aus Fukuda *et al.*; 2000 zu erkennen. Die Wahl der Außengruppe, hat in diesem Fall zu einem sehr schönen Ergebnis geführt. Es konnte gezeigt werden, dass mit der ITS2-Region eine gute biographische Analyse möglich ist.

Ähnlich wie bei dem ITS2-Stammbaum ist auch bei dem psbA-trnH Stammbaum eine geographische Einteilung der *Lycium*-Spezies erkennbar (Abbildung 9). Allerdings sind die Arten zum Teil nicht ganz eindeutig geographisch eingeteilt. Dies könnte daran liegen, dass nicht sehr viele Nordamerikanische und Südamerikanische Arten zur Analyse verwendet wurden. Zudem ist deutlich, dass zwei als *Lycium europaeum* bezeichnete Arten 8213 und 7064 eine Außengruppe mit Amerikanischen Arten bilden und somit vermutlich keine Eurasische Art sind. Dieses Phänomen sollte zur genaueren Einordnung untersucht werden. Eine solche Analyse könne auch nochmals mit ITS2 durchgeführt werden, da diese schöne geographische Einordnungen ermöglicht und genug Sequenzen in der Genbank als Referenz dienen können.

Bei dem Stammbaum von trnH-trnK wurden keine Außengruppen oder Sequenzen anderer *Lycium*-Spezies verwendet. Der Grund hierfür ist, dass es für diese Region nicht ausreichend Referenzen in der Genbank gibt. Aber auch in diesem Stammbaum sind wieder zwei deutliche Gruppierungen zu sehen.



Zum Einen eine große Gruppe der Eurasischen Arten und die zweite Gruppe mit den Amerikanischen Arten. Auch hier sind die zwei *L. europaeum* 8213 und 7064 Arten bei den Amerikanischen Arten in einer Gruppe angesiedelt. Aufgrund dessen verstärkt sich der Verdacht, dass diese keine aus Eurasien stammende *Lycium*-Spezies sind. Die *L. chinense* bilden in diesem Stammbaum ebenfalls eine abgegrenzte Gruppe innerhalb der eurasischen Arten. Auch eine deutliche *L. barbarum* Gruppe zeichnet sich ab. Diese beinhaltet auch eine der *L. europaeum* Akzessionen 5553. Dies könnte entweder darin begründet liegen, dass diese sehr ähnlich ist zu *L. barbarum* in Bezug auf diese Marker Region oder es handelt sich um *L. barbarum*. Nicht auszuschließen ist, dass es sich auch um ein Hybrid aus den beiden Spezies handelt. Diese Ausfälligkeit ist auch in dem Stammbaum für *trnH-trnK* zu sehen. Allerdings sind die *L. europaeum* Spezies 8213 und 7064 bei der Untersuchung von *ITS2* alle in der Nähe von *L. barbarum* angesiedelt, in diesem Fall jedoch auch die Amerikanische Spezies *L. oxycarpum*. Auch dies sollte genauer betrachtet werden und dabei beachtet werden, dass *trn* Regionen im Chloroplasten lokalisiert sind und *ITS* Regionen im Kerngenom. Was auch zu einem unterschiedlichen Verwandtschaftsverhältnis führen könnte. Je nach Wahl der Marker Region und der vorhandenen Referenzen aus der Genbank ist eine phylogenetische Analyse im Fall *Lycium* sehr gut möglich. Vor allem in Bezug auf die biographische Verbreitung dieser Art. Zur eindeutigen Unterscheidung von *L. chinense* und *L. barbarum* sollten allerdings aussagekräftigere Methoden herangezogen werden.

#### 4.2. SRAP-Analyse

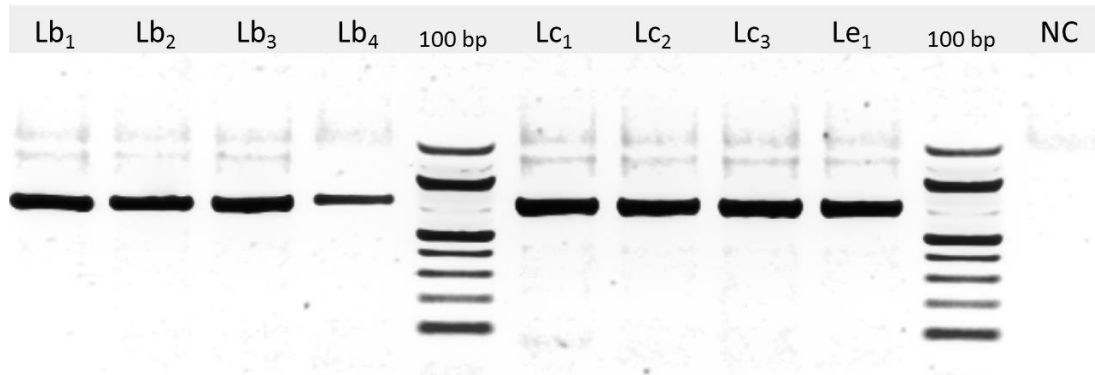
In der SRAP-Analyse wurden ausgehend von unterschiedlichen Primerkombinationen genetische Fingerprints erstellt, wodurch für jede Primerkombination für jede Akzession ein spezifisches Bandenmuster erhalten wurde. Ausgehend von diesen Bandenmustern wurden für jede Primerkombination die Akzessionen in Gruppen eingeteilt. Die Auswertung der SRAP erfolgte, indem für jede Akzession bestimmt wurde, in wie vielen Gruppen sie mit jeder anderen Akzession übereinstimmt, es wurde eine Ähnlichkeitsmatrix erstellt (*Abbildung 12*). Es fällt auf, dass die zwei Akzessionenpaare, die in dieser Gruppenauswertung die höchste Ähnlichkeit zueinander erzielten, nämlich 8213 und 7064 (beide *Lycium europaeum*) sowie 6815 und 5551 (beide *Lycium chinense*) beide zu der gleichen Art gehören. Es ist allerdings nicht klar, ob es sich dabei nicht um einen Zufall handelt, denn von den fünf Paaren, die untereinander 5 Ähnlichkeiten zeigten, waren drei zueinander artunterschiedlich. Vergleicht man die Ergebnisse der SRAP mit den Ergebnissen der Stammbäume, so fällt auf, dass auch in allen drei Stammbäumen die Akzessionen 8213 und 7064 relativ nahe beieinander liegen. Die Akzessionen 6815 und 5551, die ebenfalls in der SRAP 6 Ähnlichkeiten aufweisen, liegen jedoch in allen drei Bäumen relativ weit auseinander. Viele Akzessionspaare, die in der SRAP viele Ähnlichkeiten zueinander aufweisen, zeigen in den Stammbäumen keinen eindeutigen Verwandtschaftstrend. Es ist deshalb fraglich, ob die Art der Auswertung bei der SRAP eine geeignete

war und ob 8 Primerkombinationen überhaupt ausreichend sind für eine eindeutige Aussage. Was jedoch auffällt ist, dass die SRAP eindeutig alle Akzessionen der Art *Lycium chinense* als zueinander verwandt zuordnet. Das wird auch durch den *trnH-trnK*-basierten Stammbaum bestätigt, der alle Akzessionen von *Lycium chinense* ebenfalls als nah verwandt einordnet. Zudem ist auch hier wieder die Ausfälligkeit aufgetreten, dass die *Lycium europaeum*-Akzessionen 8212 und 7064 sehr ähnlich zueinander sind und das 5553 eher eine Ähnlichkeit zu *L. barbarum* zeigt. Wenn die Auswertung noch etwas angepasst würde, indem jede Bande einzeln untersucht wird und mehr Primerkombinationen eingesetzt werden, dann eignet sich diese Methode sehr gut zur Unterscheidung von nah verwandten *Lycium*-Spezies.

### 4.3. SCAR-Analyse

Ausgehend von einer RAPD-Analyse wurden diagnostische Banden ermittelt, mit deren Hilfe eine Unterscheidung der einzelnen *Lycium*-Akzessionen möglich ist. Die Sequenz der die Banden bildenden DNA-Produkte wird ermittelt und dazu Primer entwickelt, die diese DNA-Produkte amplifizieren können. Aufgrund des Erscheinens dieser Banden kann ermittelt werden, ob es sich bei einer *Lycium*-Akzession um *Lycium barbarum* oder *Lycium chinense* handelt (Cho-Wing Sze et al., 2008) Ziel dieses Versuchs war, mittels speziell dafür konzipierter Primer durch eine PCR Banden zu amplifizieren, die eine Unterscheidung zwischen *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* ermöglichen sollen. Dazu wurden zwei Primerpaare verwendet. Eines der Primerpaare amplifiziert ein DNA-Produkt von 700 Basenpaaren Länge, das andere Primerpaar ein DNA-Produkt von 650 Basenpaaren Länge. Als Ergebnis sollte somit für die PCR mit den Primern für das 700 Basenpaare lange Fragment eine Bande in der Höhe von 700 Basenpaaren und für die PCR mit den Primern für das 650 Basenpaare lange Fragment eine Bande in 650 Basenpaaren Höhe zu erkennen sein. Für die PCR mit den Primern des 700 bp-Fragments ist ein diffuses Bandenmuster zu erkennen, jedoch für keine der Akzessionen eine Bande in 700 Basenpaaren Höhe. Im Gel sind sehr starke untere Banden zu erkennen, welche die Primerdimere zeigen. Die Stärke der unteren Banden zeigt dass die Primer kaum aufgebraucht wurden, was zeigt, dass die PCR nicht wirklich funktionierte. Das Ergebnis der PCR mit den Primern für das 650 Basenpaare lange Fragment zeigt für jede Akzession eine Bande in 700-800 Basenpaaren Höhe. Insgesamt kann das Ergebnis damit erklärt werden, dass die Primer unspezifisch banden und deshalb viele unterschiedliche Banden erzeugt wurden. Der Versuch wich in der Durchführung stark von der Durchführung des Versuchs in Cho-Wing Sze et al. ab. Da die Früchte in diesem Paper in diversen Regionen Chinas gesucht wurden, handelt es sich dabei sicherlich um andere Unterarten als in den im Versuch verwendeten. Es könnte durchaus sein, dass das 700 bp-Fragment in den untersuchten Akzessionen nicht existiert und deshalb keine Bande erkennbar ist.

Derselbe Versuch wurde bereits einmal im Botanischen Institut I, KIT durchgeführt, jedoch im Gegensatz zu dem hier durchgeführten Versuch mit einer Annealingtemperatur von 63°C. Wie es in Abbildung 17 zu sehen ist, konnte das gewünschte Produkt in diesem früheren Versuch amplifiziert werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der Grund für die fehlerhafte Amplifikation die veränderte Annealing-Temperatur sein könnte, oder aber auch ein anderes PCR-Programm



Lycium SCAR evaluation with LB-SC650 primer – annealing 63° C

23.03.12

Abbildung 17: Zeigt verschiedene *L. barbarum* (Lb), *L. chinense* (Lc) und *L. europaeum* (Le) Akzessionen, die geprüft wurden. Die Annealingtemperatur der PCR betrug 63°C und es wurde für alle Arten ein 650 bp Fragment mit den Primern LB.SC650.F und LB.SC650.B erzeugt.

Sowohl der Versuch bei 65°C und bei 63°C führte zu keiner Unterscheidung der unterschiedlichen Arten. Dies schließt nicht aus, dass SCAR keine geeignete Methode ist, sondern dass sich in diesem Fall die SCAR Primer aus Cho-Wing Sze et al. nicht eignen oder kein geeignetes PCR-Programm für diese vorliegt. Die Entwicklung eines besseren SCAR Primer, würde mit Sicherheit auch zu guten Ergebnissen führen und eine geeignete Methode zur genauen und spezifischen Artunterscheidung darstellen.

#### 4.4. Unterschiede in der Samenanzahl

Betrachtet man die Verteilung der Samenanzahl in den untersuchten Goji-Akzessionen, so ist aufgrund der bisherigen Ergebnisse keine eindeutige Unterscheidung der Goji-Akzessionen anhand der Samenanzahl in den Beeren möglich. Die Anzahl der Samen in den verschiedenen Goji-Akzessionen variiert stark, wodurch es zu häufigen Überschneidungen in der Samenanzahl in den Goji-Akzessionen kommt. Es ist die leichte Tendenz erkennbar, dass die Verteilung der Anzahl der Samen in den Beeren von *Lycium barbarum* höher liegt als die Anzahl der Samen in *Lycium chinense*. Insgesamt kann hier jedoch noch keine klare Aussage getroffen werden. Es könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass jede Lycium-Akzession Samenanzahlen in einem bestimmten Zahlenbereich enthält, wodurch bei der Bestimmung eines Goji-Produktes durch eine Auszählung der Samen bestimmte Arten als unwahrscheinlich eingestuft oder ausgeschlossen werden können. Ob es wirklich ein bestimmtes Muster gibt, nach dem sich die Samenanzahl in den Früchten von Goji-Beeren von Art zu Art unterscheidet, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

## 5. Literaturverzeichnis

### 5.1. Publikationen

**Cho-Wing Sze, S (2008).** Application of SCAR (Sequence characterized amplified region) analysis to authenticate *Lycium barbarum* (wolfberry) and its adulterants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 51, 15-21

**Fukuda, T. (2000).** Phylogeny and Biogeography of the Genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from Chloroplast DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 19, 246–258

**Li, G. Quiros, C. F. (2001).** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 103, 455-461

**Wicke, S. Quandt, D. (2009).** Universal primers for the amplification of the plastid *trnK/matK* region in land plants. *Anales Jard. Bot. Madrid* Vol. 66(2), 285-288

**Xin, T. (2013).** Super food *Lycium barbarum* (Solanaceae) traceability via internal transcribed spacer 2 barcode. *Food Research International* 54, 1699-1704

**Zhang, K.Y.B. (2001).** Differentiation of *Lycium barbarum* from its Related *Lycium* Species using Random Amplified Polymeric DNA. *Plant Med* 67, 379-381

### 5.2. Webquellen

#### Webquelle 1:

[http://www.gatc-biotech.com/fileadmin/Kundendaten/Upload\\_8.0/Bilder/ITS%20region%20Analysis.png](http://www.gatc-biotech.com/fileadmin/Kundendaten/Upload_8.0/Bilder/ITS%20region%20Analysis.png)

#### Webquelle 2:

<http://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT7690/lec08/SRAP.mechanism.gif>

### 5.3. Sonstige Quellen

#### Sonstige Quellen 1:

KIT, Botanisches Institut I, Nick, Plant Evolution 2015, Vorlesung 1: Mechanisms of Plant Evolution. Folie 2-6

#### Sonstige Quellen 2:

KIT, Botanisches Institut I, Nick, Plant Evolution 2015, Vorlesung 3: Molecular Phylogenie. Folie 8-10

#### Sonstige Quellen 3:

KIT, Botanisches Institut I, Nick, Plant Evolution 2015, Vorlesung 3: Molecular Phylogenie. Folie 15-27