



Karlsruher Institut für Technologie

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Botanisches Institut Lehrstuhl 1

Molekulare Zellbiologie

Kaiserstr. 2,

Gebäude. 10.40

D-76128 Karlsruhe

Morphologische Verifizierung genetischer Ressourcen von Goji – *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* sowie verwandter Arten – und Entwicklung DNA-basierter Differenzierungsmethoden

Morphological verification of genetic resources of Goji - *Lycium barbarum* and *Lycium chinense* and congeneric species - and development of DNA-based differentiation methods

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Master of Science
(M.Sc.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
vorgelegte

Master-Thesis

von

Sascha Wetters

Karlsruhe, Dezember 2015

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Peter Nick

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Horst Taraschewski

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Alle Fotografien und Abbildungen, bei denen nicht ausdrücklich die Quellen angegeben wurden, sind von mir selbst im Untersuchungszeitraum erstellt worden.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke...

... Herrn Prof. Dr. Peter Nick und dem Botanischen Institut 1 am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) für die Möglichkeit diese Arbeit verfassen und in deren Rahmen meinen Abschluss als Master of Science (M.Sc.) erlangen zu können.

... insbesondere meinem direkten Betreuer Dr. Thomas Horn für die unermüdliche, intensive Unterstützung, sowie die schnellen und ausführlichen Antworten bei aufkommenden Schwierigkeiten und der scheinbar unerschöpflichen Quelle von neuen Informationen und Anregungen.

... Herrn Prof. Dr. Horst Taraschewski für das Übernehmen der Zweitkorrektur.

... den Menschen meines familiären und sozialen Umfeldes, die mich die vergangenen fünf Jahre durch das Leben während des Studiums begleitet haben. Ohne jeden Einzelnen wäre mir dies alles nicht möglich gewesen.

Zusammenfassung

Produkte der Traditionellen chinesischen Medizin (TCM) erfreuen sich in Europa einer immer größeren Beliebtheit. Viele Artikel finden den Weg in die Supermärkte und die Haushalte.

Die kleinen süß bis säuerlich schmeckenden Goji-Beeren sind hierbei besonders populär, was auch auf die immer wieder postulierten Wunderkräfte dieser Beere zurückzuführen ist. Hinter der Kulisse der öffentlichen Beliebtheit findet ein Streit zur Identität des wahren Gojis statt. Zwei verschiedene Arten sind als Goji kommerzialisiert: *Lycium barbarum* und *Lycium chinense*. Für den europäischen Markt versprechen Anbieter, dass nur Früchte der Art *Lycium barbarum* in den als Goji verkauften Produkten vorliegen.

Für den Verbraucherschutz ist es wichtig zu wissen, ob in den in Europa vertriebenen Produkten tatsächlich nur Früchte von *Lycium barbarum* enthalten sind, oder ob mit den wesentlich günstigeren, aber zum Verwechseln ähnlichen, Früchten der Art *Lycium chinense* gepanscht wird.

Eine Echtheitsprüfung ist also notwendig, wofür Referenzpflanzen benötigt werden. Im botanischen Garten des KIT ist eine Sammlung verschiedener Goji-Pflanzen vorhanden, deren Identität nicht vollkommen klar ist.

Über eine morphologische Analyse, die sowohl vegetative als auch generative Merkmale umfasst, wurden die Pflanzen unter Zuhilfenahme von Bestimmungsliteratur bestimmt und den beiden verschiedenen Goji-Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* zugeordnet. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Blüten-, als auch Blatt- **und besonders Samenmerkmale** für die Unterscheidung der beiden Arten verwendet werden können.

Mit diesem gesicherten Referenzmaterial konnten DNA-basierte Unterscheidungsmethoden getestet werden. Zusätzlich zu den Referenzpflanzen aus dem botanischen Garten wurden Goji-Produkte und weitere *Lycium*-Arten in die Untersuchung eingegliedert.

Sowohl mit diversen Fingerprints, wobei der 5S-Spacerregion Fingerprint sich besonders effektiv zeigte, als auch mit einer Fragmentanalyse der Introns der β -Tubulin-Genfamilie konnten die beiden Arten voneinander unterschieden und ausnahmslos alle getesteten Goji-Produkte der Art *Lycium barbarum* zugeordnet werden.

Über die Verwendung von genetic barcodes wie die klassischen psbA-trnH oder ITS Markerregionen, aber auch neuerer Marker wie Cos16 oder ycf1b konnten Stammbäume zur Betrachtung der Verwandtschaftsbeziehung zwischen den verschiedenen Arten sowie den

Produkten erstellt werden. Dieser Ansatz führte zu dem Ergebnis, dass die Goji-Produkte bis auf eine Ausnahme der Art *Lycium barbarum* angehören, was sowohl eine Bestätigung der morphologischen Resultate als auch der Fingerprintanalysen darstellt.

Die eher unübliche Kombination aus Morphologischen und Molekularen Methoden sowie deren einheitliches Ergebnis führt zu einem Höchstmaß an Verlässlichkeit der Daten.

Neben dem Test der Goji-Beeren ging es um die Evaluierung von allgemeinen Methoden zur Unterscheidung nah verwandter Arten, die auf ähnliche Problematiken angewandt werden könnten. Besonders der Tubulin-basierte Polymorphismus als auch die Markerregion Cos16 erwiesen sich als äußerst vielversprechend.

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
ITS	internal transcribed Spacer
PCR	Polymerase Ketten Reaktion / Polymerase Chain Reaction
TBP	Tubulin-basierter Polymorphismus / Tubulin-based polymorphism
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
SRAP	Sequence related amplified polymorphism
SCAR	Sequence characterized amplified region
ARMS	Amplified refractory mutation system
COS	conserved ortholog set
BGK	Botanischer Garten des KIT
FAM	6-FAM (6-Carboxyfluorescein)
YY	Yakima yellow
nf-H ₂ O	Nuklease freies Wasser
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Danksagung	II
Zusammenfassung	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Inhaltsverzeichnis	V

1. Einleitung	Seite 1
1.1. Goji als Beispiel für neues Ernährungsbewusstsein	Seite 1
1.2. Das Artkonzept	Seite 3
1.3. Die Gattung <i>Lycium</i> als globalisierter Vertreter der Nachtschattengewächse	Seite 5
1.4. Morphologie von <i>Lycium barbarum</i> und <i>Lycium chinense</i>	Seite 7
1.5. Fragestellung	Seite 8
1.6. DNA-Fingerprinting	Seite 9
1.6.1. RAPD (Random amplified polymorphic DNA)	
1.6.2. SRAP (Sequence related amplified polymorphism)	
1.6.3. 5S-Spacerregion Fingerprint	
1.7. SCAR und ARMS	Seite 11
1.8. Fragmentanalyse mittels Tubulin based Polymorphism (TBP)	Seite 12
1.9. Genetic barcoding	Seite 13
1.9.1. Die plastidäre psbA-trnH Markerregion	
1.9.2. Die alternative plastidäre Region ycf1b: „the most promising plastid DNA barcode of land plants“	
1.9.3. Kerngenom lokalisierte ITS-Region	
1.9.4. Alternative Kerngenom Markerregion COSII (conserved ortholog set II)	
1.10. Molekulare Phylogenie	Seite 17
1.10.1. Aussagekraft von Stammbäumen	
1.10.2. Grenzen von Stammbäumen	

2. Zielsetzung	Seite 19
3. Material	Seite 20
3.1. Verwendetes Pflanzenmaterial	Seite 20
3.2. Geräte	Seite 22
3.3. Verbrauchsmaterialien	Seite 22
3.4. Puffer	Seite 22
3.5. Enzyme	Seite 22
3.6. Chemikalien	Seite 23
3.7. Primer	Seite 23
3.8. Kits	Seite 24
3.9. Software	Seite 24
4. Methoden	Seite 25
4.1. Blütenanalyse	Seite 25
4.2. Blattanalyse	Seite 25
4.3. Samenanalyse	Seite 26
4.4. DNA-Extraktion	Seite 27
4.5. PCR	Seite 28
4.6. Gelelektrophorese	Seite 31
4.7. DNA Aufreinigung für Sequenzierung	Seite 31
4.8. Auswertung von Sequenzen	Seite 32
4.9. Darstellung von Stammbäumen	Seite 32
4.10. Design von SCAR- und ARMS-Primern	Seite 33
4.11. Fragmentanalyse mittels des FSAnalyzers	Seite 34
5. Ergebnisse	Seite 36
5.1. Morphologie	Seite 36

5.1.1.	Artbestimmung über Blütenanalyse	Seite 36
5.1.2.	Vermessungsanalyse von Blätter	Seite 41
5.1.3.	Vermessungsanalyse von Samen	Seite 42
5.1.4.	Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse der Morphologischen Analyse	Seite 43
5.2.	Ergebnisse der DNA-basierten Methoden	Seite 44
5.2.1.	Random amplified polymorphic DNA (RAPD)	Seite 45
5.2.2.	RAPD-basierter SCAR-Ansatz	Seite 46
5.2.3.	Sequence related amplified region (SRAP)	Seite 47
5.2.4.	Tubulin based polymorphism (TBP) Intron I	Seite 48
5.2.4.1.	Stammbaum TBP Intron I	Seite 49
5.2.5.	Tubulin based polymorphism (TBP) Intron II	Seite 50
5.2.5.1.	Stammbaum TBP Intron II	Seite 51
5.2.6.	5S-Spacerregion Fingerprint	Seite 52
5.2.7.	5S-Spacerregion basierter SCAR-Ansatz	Seite 53
5.2.8.	ITS2 basierter ARMS-Ansatz	Seite 54
5.2.9.	Phylogenie der plastidären ycf1b Markerregion	Seite 55
5.2.10.	Phylogenie der plastidären psbA-trnH Markerregion	Seite 56
5.2.10.1.	Erweiterung der psbA-trnH Analyse	Seite 58
5.2.11.	Kerngenomische Cos16 Analyse	Seite 60
5.2.12.	Kerngenomische ITS2 Phylogenie	Seite 62
5.2.13.	Vergleich der getesteten Markerregionen	Seite 63
5.2.14.	Kurze Zusammenfassung der DNA-basierten Ergebnisse	Seite 64
6.	Diskussion	Seite 65
6.1.	Morphologie	Seite 65
6.1.1.	Blüten	Seite 65
6.1.2.	Blätter	Seite 67
6.1.3.	Samen	Seite 67

6.2.	Fingerprints	Seite 68
6.2.1.	RAPD	Seite 68
6.2.2.	SRAP	Seite 70
6.2.3.	5S-Spacerregion Fingerprint	Seite 71
6.3.	SCAR	Seite 71
6.3.1.	RAPD-basierter SCAR-Ansatz	Seite 71
6.3.2.	5S-basierter SCAR-Ansatz	Seite 72
6.4.	ARMS-Ansatz	Seite 73
6.5.	TBP / Fragmentanalyse	Seite 74
6.6.	Barcoding / Stammbäume	Seite 76
6.6.1.	„the most promising plastid DNA barcode of land plant“ - ycf1b	Seite 76
6.6.2.	psbA-trnH	Seite 77
6.6.3.	ITS2	Seite 79
6.6.4.	CosII	Seite 80
6.7.	Zusammenfassung & Ausblick	Seite 81
7.	Literaturverzeichnis	Seite 83
8.	Abbildungsverzeichnis	Seite 87

1. Einleitung

1.1. Goji als Beispiel für neues Ernährungsbewusstsein

Auf sich und seine Ernährung zu achten nimmt in der heutigen Zeit einen immer größeren Stellenwert ein. Das Bewusstsein der Menschen für Nahrungsmittel wird mehr und mehr geschärft, was sich in der immer größer werdenden Anzahl an verschiedenen Ernährungsweisen widerspiegelt. Als Beispiel seien die Vertreter des Veganismus genannt, die im Jahr 2013 im Rahmen einer Studie der Universitäten Hohenheim und Göttingen auf etwa 400 000 Personen geschätzt wurden [1]. Der Vegetarierbund Deutschland geht aktuell von etwa 900 000 Veganern in Deutschland im Jahr 2015 aus, was eine Verdopplung in den letzten beiden Jahren bedeuten würde [2].

Durch technologischen Fortschritt und Globalisierung haben wir jederzeit Zugriff auf Nahrungsmittel, die auf der anderen Seite der Welt angebaut werden. Aufgrund des neuen Bewusstseins für Ernährung ist es von Bedeutung zu wissen, woher die Nahrung, die wir zu uns nehmen, kommt und ob es sich bei dem Produkt auf unseren Tellern auch um das handelt, als was es gekennzeichnet ist.

Ereignisse wie der Pferdefleischskandal im Jahr 2013 in Europa, wo in 10 von 27 getesteten Rindfleischprodukten Spuren von Pferdefleisch nachgewiesen wurden [3] oder auch der als fish fraud bezeichnete Vorfall in den Vereinigten Staaten im selben Jahr, bei dem sich herausstellte, dass von 1215 getesteten Fischprodukten etwa 33% falsch etikettiert wurden [4], zeigen die Aktualität der Problematik und wie wichtig eine Kontrolle und eine korrekte Authentifizierung unserer Nahrungsmittel ist.

In den letzten Jahren ist eine erhöhte Popularität der Traditionellen chinesischen Medizin (TCM) in Europa zu verzeichnen und so ist es nicht verwunderlich, dass auch mehr und mehr TCM Produkte ihren Weg nach Europa finden.

Zu diesen Produkten gehört auch die chinesische Wolfsbeere, welche laut dem Vizedirektor der China Chamber of Commerce for Import and Export of Medicines and Health Products (dem einflussreichsten Handelsverband in China) das populärste TCM Produkt auf ausländischen Märkten ist [5].

Die Früchte des gewöhnlichen Bocksdorns (*Lycium barbarum*) und des chinesischen Bocksdorns (*Lycium chinense*) werden beide als chinesische Wolfsbeere bezeichnet und als Goji-Beeren

vertrieben. Goji-Beeren beinhalten sehr viele Inhaltsstoffe, weswegen die Frucht in den Medien oft reißerisch als „Superfrucht“ oder „Superfruit“ bezeichnet wird, beispielsweise in einem Bericht in der Los Angeles Times aus dem Jahr 2008 [6]. Da besonders der Internethandel mit der Beere floriert, wird dort inflationär vom Begriff Superfrucht Gebrauch gemacht. Eine ernsthafte Auseinandersetzung mit der Wirkstoffen führt zu dem Resultat, dass die Früchte eine große Anzahl an Polysacchariden (sogenannte LBP, *Lycium barbarum* polysaccharids) mit antioxidativer Wirkung sowie verschiedene Vitamine, welche in der vorkommender Menge mit Zitrusfrüchten vergleichbar sind, enthalten [7].

Die zunehmende Popularität der chinesischen Wolfsbeere zeigt sich in den steigenden Erntezahlen in der zentral gelegenen chinesischen Region Ningxia Hui, welches neben der Xinjiang Uyghur Region in Westchina eines der Hauptanbaugebiete von Goji darstellt [7].



Abb. 1: Getrocknete Goji-Beeren (links), das Hauptanbaugebiet Ningxia in Zentralchina (in rot markiert, Mitte) und Ernte der Goji-Beeren in der Ningxia-Region (rechts).

Eine Quelle gibt für das Jahr 2013 den Gesamtwert der Exporte aus der Ningxia Region mit 36 Millionen US-Dollar [8] und für das Jahr 2014 einen Exportwert von knapp 52 Millionen US-Dollar [9] an. Andere Quellen gehen für dieselbe Region im Jahr 2014 sogar von einem Exportwert von über 70 Millionen US-Dollar aus [10]. Das Problem bei all diesen Quellen ist die allgemeine Bezeichnung der geernteten Produkte als „chinesische Wolfsbeere“. Da es sich bei diesem Namen um die umgangssprachliche Bezeichnung von zwei verschiedene Arten handelt, wird dieser Begriff im weiteren Verlauf dieser Arbeit so gut es geht vermieden und stets die wissenschaftlichen Artnamen verwendet.

Die als Goji-Beeren verkauften Produkte sind meist mit keinem wissenschaftlichen Artnamen gekennzeichnet, aber Anbieter dieser Produkte geben an, dass außerhalb Asiens vertriebene Goji-Beeren ausschließlich Früchte von Pflanzen der Art *Lycium barbarum* enthalten sollen [7]. Aber wenn man sich vergegenwärtigt, wie schwer die Unterscheidung der Wolfsbeeren ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass, auch aus wirtschaftlichen Gründen, die weitaus günstigere *L. chinense* einen stark vermehrten Weg in die exportierten Goji-Produkte findet [11]. Eine Unterscheidung von *Lycium barbarum* und der am weitesten verbreiteten „Pansch“-Art *Lycium chinense* ist von elementarer Wichtigkeit für den Verbraucherschutz und sollte eine größere Aufmerksamkeit erhalten [11].

1.2. Das Artkonzept

Im Hinblick auf die beiden nah verwandten Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* scheint es sinnvoll zunächst die Definition(en) des Begriffs „Art“ kurz zum umreißen, da dies den wissenschaftlichen Hintergrund der vorliegenden Arbeit darstellt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten den Begriff Art zu definieren und deswegen auch mehrere unterschiedliche Artkonzepte.

Das Naheliegende ist die Betrachtung von morphologischen Merkmalen, was als **morphologisches Artkonzept** bezeichnet wird und bereits von Linné eingesetzt wurde.

Bei diesem Konzept werden verschiedene Merkmale von Individuen betrachtet und aus der Übereinstimmungen bei hochspezifischen Merkmalen auf die Zusammengehörigkeit verschiedener Individuen zu einer Art geschlossen. Diese sogenannten Morphospezies besitzen in der Gesamtheit ihrer Individuen eine Kontinuität der Merkmale und grenzen sich durch eine Diskontinuität der Merkmale von anderen Morphospezies ab [12]. Für die korrekte Auftrennung von morphologisch sehr ähnlichen Arten muss eine ausreichende Anzahl von Merkmalen betrachtet werden. Man könnte eine Art daher als einen Punkt in einem n-dimensionalen System aus n unterschiedlichen beschreibbaren Merkmalen bezeichnen.

Die Unterscheidung über solche Merkmale spielen in der systematischen Praxis eine große Rolle und sind die Grundlage von Bestimmungsschlüsseln und Taxonomie [12].

Bei dieser Betrachtungsweise gibt es jedoch einige Schwierigkeiten, denn die Natur ist ständiger Veränderung ausgesetzt, sodass Merkmalsunterschiede nicht vollständig determiniert, sondern

ebenso wie die gesamte Natur stets im Fluss sind. Des Weiteren ist der betrachtete Phänotyp nicht komplett über den Genotyp bestimmt, da abiotische Faktoren zu einer phänotypischen Plastizität führen können, was unterschiedliche Morphologie bei identischem Genotyp bedeutet. Außerdem ist die morphologische Bestimmung oftmals von Subjektivität geprägt, weil bei der Beschreibung von Arten zwangsläufig Vokabeln wie „häufig“ oder „leicht größer“ auftauchen, die jeder Taxonom anders auslegen kann.

Das **populationsgenetische Artkonzept** beschreibt Arten als „Gruppen von natürlichen Populationen, die sich tatsächlich oder potentiell untereinander vermehren und fortpflanzungsmäßig von anderen derartigen Gruppen getrennt sind“ [13]. Die dabei gebildeten Isolationsmechanismen, welche genetisch verankert sind, sollen diese Biospezies von artfremden Individuen trennen [12]. Die beiden wichtigsten Wege zur Artbildung bei diesem Konzept sind die allopatrische und sympatrische Artbildung. Bei ersterer findet eine geographische Trennung einer Population über ein natürliches Ereignis wie Kontinentalverschiebung oder Gebirgserhebung mit anschließender Bildung einer Fortpflanzungsbarriere statt. Die sympatrische Artbildung beschreibt die Entwicklung einer kleinen Teilpopulation zu einer neuen Art über die Bildung einer Fortpflanzungsbarriere ohne vorherige geographische Trennung, was äußerst selten ist, aber dennoch in der Praxis geschehen kann [14].

Problematisch bei dieser Artdefinition ist erneut die Tatsache, dass die Natur kein starres Objekt ist. Geographisch getrennte Population derselben Art sind nach dem allopatrischen Artbildungsvorgang als Arten im Entstehungsprozess anzusehen. Außerdem wird dieses Konzept dadurch begrenzt, dass es sich nur auf sexuell fortpflanzende Arten beschränkt und asexuell vermehrende Arten nicht erfasst.

Der Begriff „evolutionäre Art“ ist Teil des **phylogenetischen oder evolutionären Artkonzepts**. Eine Art ist in diesem Fall eine ununterbrochene Linie sich fortpflanzender Individuen, die zu Lebenszeit nicht aussterben oder sich in andere Arten aufspalten [29].

Da auf diese Weise definierte Arten zunächst nach dem morphologischen oder populationsgenetischen Artkonzept bestimmt werden müssen, treten die schon erwähnten Schwierigkeiten auch bei dieser Definition auf.

Egal, welches Konzept man sich anschaut, keines beantwortet die Frage „Was ist eine Art?“ auf einer allgemeinen Ebene zufriedenstellend. Die Komplexität eines Organismus scheint in Hinblick

auf seine Morphologie, den Umwelteinflüssen, den Populationsdynamiken sowie seinem evolutionären Hintergrund zu groß zu sein, als dass nur eine Antwort auf diese Frage gibt.

Der britischen Paläoanthropologe Chris Stringer beschreibt diese Problematik sehr treffend mit der Aussage, dass alle Art-Konzepte „von Menschen erdachte Annäherungen an die Realität der Natur“ sind [15].

Bei jedweder morphologischer oder phylogenetischer Betrachtung von nahe verwandten Arten muss daher beachtet werden, dass nur Annäherungsweise ein momentaner Zustand betrachtet wird.

1.3. Die Gattung *Lycium* als globalisierter Vertreter der Nachtschattengewächse

Die Gattung *Lycium* gehört zu der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae), zu der unter anderem auch einige der wichtigsten Nahrungspflanzen, wie die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) oder die Tomate (*Solanum lycopersicum*) gehören.

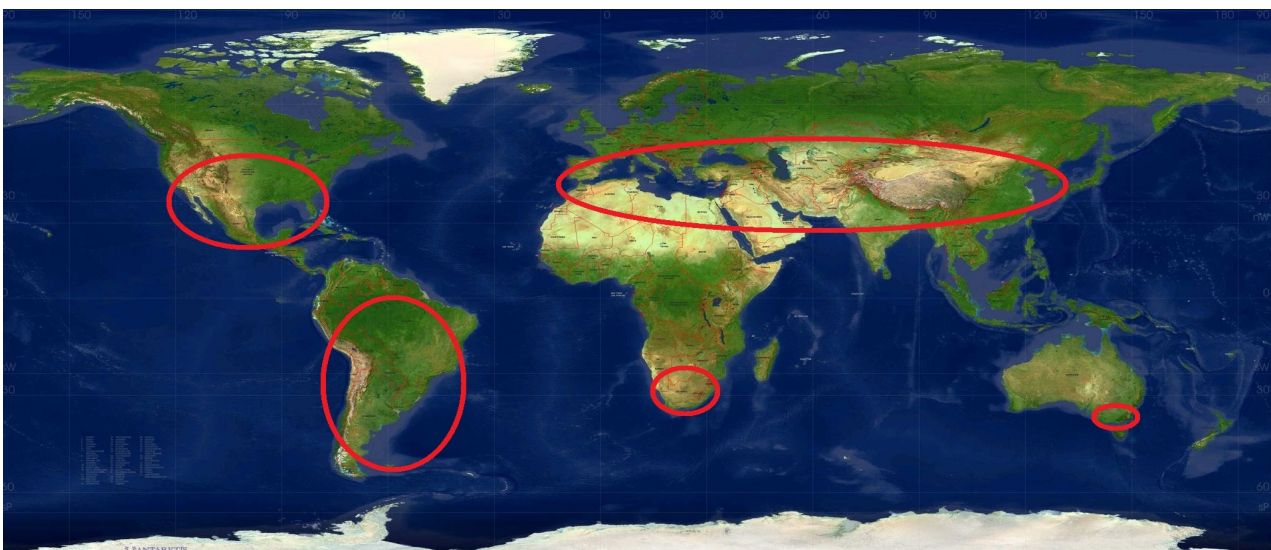


Abb. 2: Ungefähre Verbreitung von *Lycium* laut Fukuda *et al.* (2000)[16]. Beispiele der verschiedenen Regionen sind *Lycium chilense* (Südamerika), *Lycium oxycarpum* (Südafrika), *Lycium barbarum*, *Lycium chinense*, *Lycium europaeum* (Eurasien), *Lycium californicum* (Nordamerika) und *Lycium australe* (Australien).

Etwa 80 verschiedene Arten, welche sich auf beinahe allen Kontinenten verteilen [17], zählen zu der Gattung *Lycium*, die damit neben *Solanum* und *Physalis* zu den einzigen kosmopolitisch verbreiteten Nachtschattengewächsen gehört [18]. Die Gattung kommt getrennt auf der Nord- und der Südhalbkugel vor, da *Lycium* nicht in tropischen Gegenden wächst [19]. Die größte *Lycium*-Vielfalt ist in Südamerika mit etwa 30 verschiedenen Arten zu finden. Danach folgen Südafrika mit

etwa 20, Nordamerika mit ebenfalls etwa 20, Eurasien mit ungefähr zehn Arten, einer Art in Australien und zuletzt zwei verschiedenen Arten im Pazifischen Raum [16]. Beispiele für die jeweiligen Regionen sind in der Abbildungserläuterung der Abbildung 2 zu finden.

Aufgrund der weltweiten Verbreitung der Gattung *Lycium* kommt die Frage nach ihrer biogeographischen Verbreitungsgeschichte auf. Viele Untersuchungen kommen zu dem einstimmigen Resultat, dass die Gattung *Lycium* ihren Ursprung in Südamerika hat, da nah verwandte Gattungen (z.B. *Nolana*) dort endemisch sind und die Artenvielfalt von *Lycium* in Südamerika am höchsten ist [18]. Die von Fukuda *et al.* postulierte Verbreitung von *Lycium*, welche auf der Auswertung von matK-Sequenzdaten beruht, zeigt eine Ausbreitung der Gattung von Südamerika nach Südafrika und von dort in den Rest der alten Welt (Abb. 3) [16].

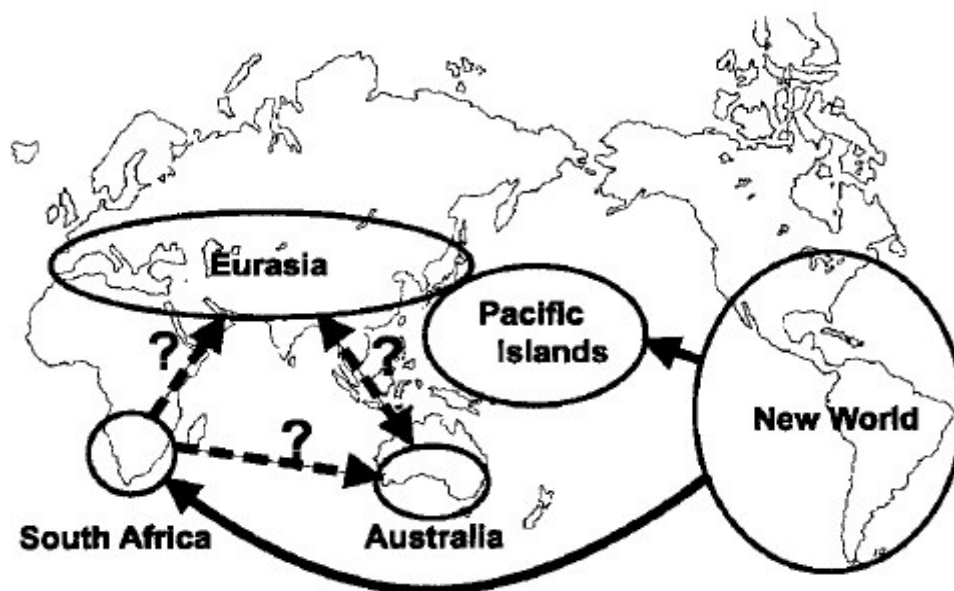


Abb. 3: Mögliche Verbreitung der Gattung *Lycium*

Anhand der Betrachtung von Sequenzdaten der plastidären Markerregion trnT-trnF kam die Untersuchung von Levin *et al.* aus dem Jahr 2005 zu dem Resultat, dass die Altweltarten eine monophyletische Gruppe bilden, die sich von den amerikanischen Arten trennen (Abb. 4) [20], was für ein einmaliges Verbreitungsereignis von der Neuen in die Alte Welt spricht.

Weder die nordamerikanischen noch die südamerikanischen Arten bilden eine monophyletische Gruppe, was über die von Zugvögeln verbreiteten roten Früchte und die damit permanente Verteilung von Samen erklärt werden kann [20].

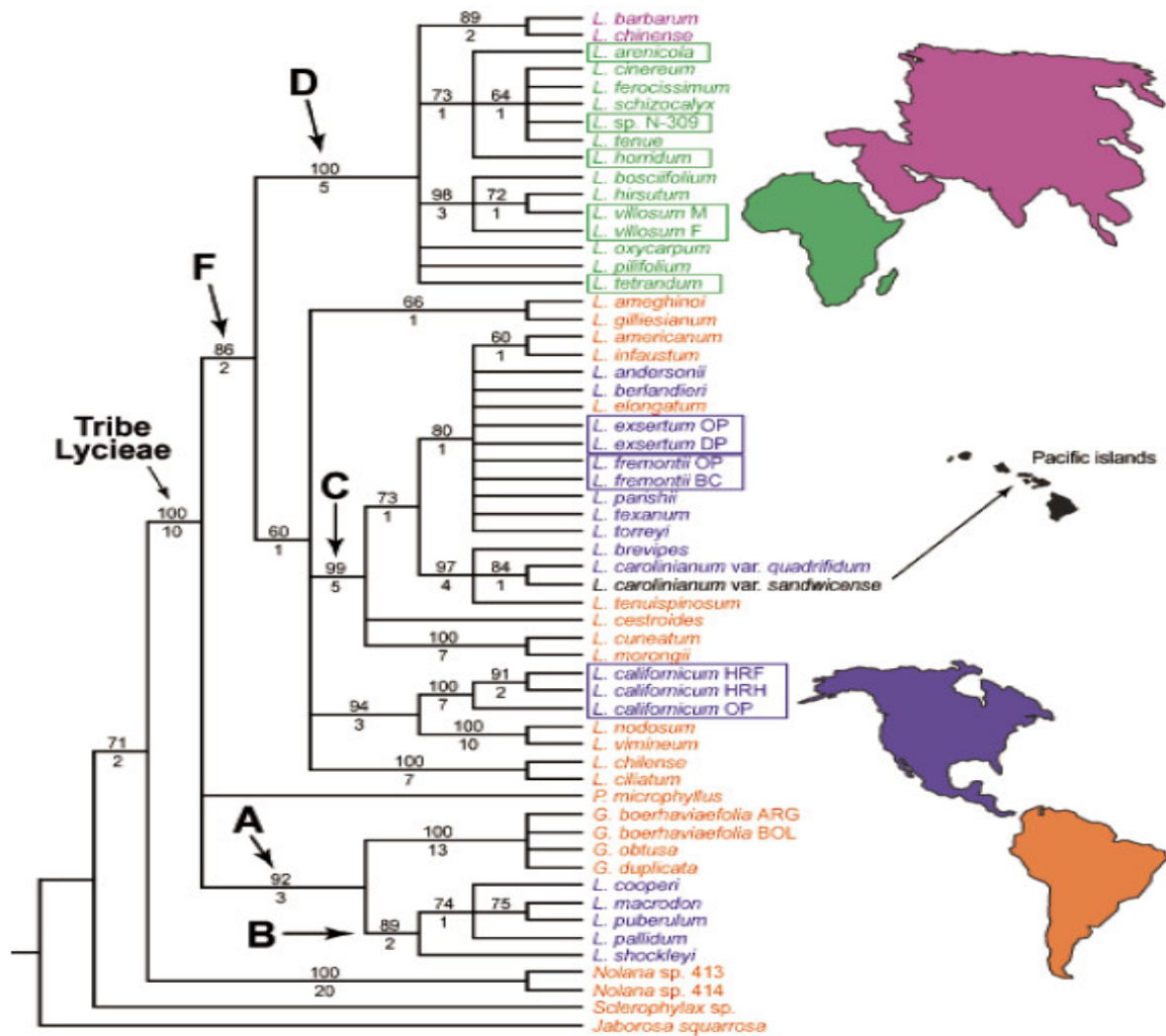


Abb. 4: trnT-trnF basierter Maximum Parsimony Stammbaum von Neuwelt- und Altweltarten der Gattung *Lycium*. Die Altweltarten bilden ein Monophylum und trennen sich klar von den Neuweltarten.

1.4. Morphologie von *Lycium barbarum* und *Lycium chinense*

Die Pflanzen der Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* sind dornige Sträucher mit einer Wuchshöhe von bis zu vier Metern. Ihre Blätter sind in Bündeln angeordnet und variieren in ihrer Erscheinung von lanzett- bis eiförmig. Die Pflanzen sind zwittrig (erkennbar in Abb. 5a) und die charakteristischen purpurfarbenen Blüten haben eine Breite von etwa zwei Zentimetern.

Die Bestäubung erfolgt durch Bienen (siehe Abb. 5). Andere Bocksdorne werden durch weitere Hautflügler, Zweiflügler oder Schmetterlingen bestäubt. Die orange-roten Früchte sind oval, ungefähr zwei Zentimeter lang und beinhalten zahlreiche Samen. Die Verbreitung der im Durchmesser etwa 2-3 mm großen Samen findet unter anderem über Ornithochorie, also über Vögel, statt.

Im Normalfall ist die Zahl der Kron- und Staubblätter fünf, wobei hier Variationen möglich sind. Die Krone ist röhren- oder trichterförmig und variiert zwischen den beiden Arten in der Länge. Der Kelch ist glockenförmig und dient aufgrund seines Aufbau als weiteres Unterscheidungsmerkmal, da Pflanzen der Art *Lycium barbarum* einen zweigelappten Kelch besitzen, wohingegen die Lappung des Kelches bei *Lycium chinense* 3-5 beträgt [21].

Auch die Behaarung der Kronblätter kann für die Unterscheidung verwendet werden, denn *Lycium barbarum* ist kahl und *Lycium chinense* weist einen leichten Flaum am Rand der Kronblätter auf, jedoch ist dieses Merkmal nur mikroskopisch zu erkennen.



Abb. 5: Erscheinung einer Blüte von *Lycium chinense*. Die fünf Kronblätter sind deutlich zu erkennen, außerdem die fünf Staubblätter, sowie das Fruchtblatt (links). Eine grade erst geöffnete Blüte von *Lycium chinense* wird von einem Bestäuber (*Apis mellifera*) besucht (rechts).

1.5. Fragestellung

Die nah verwandten und morphologisch sehr ähnlichen Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* sind die Kernpunkte dieser Arbeit. Beide werden als Goji vertrieben und die Frage nach dem „wahren“ Goji wird kontrovers diskutiert. Wichtig ist also eine Unterscheidung zwischen den beiden Arten treffen zu können. Daher stellt sich die Frage, ob dies auf der morphologischen und der genetischen Ebene möglich ist und ob sich die Ergebnisse dieser beiden verschiedenen Herangehensweisen decken. Die morphologischen Unterschiede wurden im vorherigen Kapitel kurz erläutert. Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DNA-basierten Methoden umrissen werden.

1.6. DNA-Fingerprinting

1.6.1. RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

Die Idee der Fingerprinting Methode mit dem Namen random amplified polymorphic DNA (RAPD) entstand zum Ende des letzten Jahrtausends. Erstmals wurde die Methode mit der Verwendung zufälliger Primer zum Erstellen von Mustern aus DNA-Fragmenten eines Genoms im Jahr 1990 von Williams *et al.* eingesetzt und der Name RAPD etabliert [22]. Die Gruppe unterschied mit diesem Ansatz die kultivierte Form der Sojabohne (*Glycine max*) von einer Wildform (*Glycine soja*) und schlägt diese Methode zur Unterscheidung von nahe verwandten Arten vor [22].

Die Idee ist das Einsetzen von extrem kurzen Primer Oligonukleotiden mit einer Länge von um die zehn Basenpaaren im Rahmen einer Polymerasen Ketten Reaktion (PCR). Aufgrund der Kürze steigt die Wahrscheinlichkeit einer Bindung innerhalb des Genoms und damit dem Amplifizieren von unterschiedlich langen Fragmenten, die anschließend über Gelelektrophorese und dem damit entstehenden Bandenmuster ausgewertet werden können. Dieses Muster kann dazu verwendet werden, um nahe verwandten Arten zu unterscheiden, da auch einzelne Basenunterschiede und damit kleine Veränderungen im Genom detektiert werden können [22].

Zehn Jahre später wurde dieser Ansatz erstmals für die Unterscheidung von *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* eingesetzt. Mit einigen Primern konnten unterschiedliche Fingerprints für die nahe verwandten Arten erstellt werden [23]. Trotz dieser relativ alten Methode findet sie heute noch Erwähnung in Publikationen und Reviews zum Thema Fingerprint. Ein Review aus dem Jahr 2012 zu den Entwicklungen bei der Identifikation von Pflanzengenomen ergab, dass 89% der Studien, die verschiedene molekulare Marker verwendeten, sich auf den Einsatz von arbitrary amplified (zufällig vervielfältigter) DNA Methoden verließen, zu denen auch RAPD gehört [24]. Dies unterstreicht die bleibende Aktualität dieser Methode einerseits und der Notwendigkeit der Etablierung neuerer Ansätze andererseits.

Die Bedeutung von Alternativen wird bei dem größten Problem der Verwendung des RAPD-Ansatzes deutlich. Denn neben den bereits erwähnten Vorteilen ist der mit Abstand größte Nachteil dieser Methode, dass keine vollständige Reproduzierbarkeit gegeben ist. Zwar werden beinahe immer die gleichen Fragmente amplifiziert, aber die exakte Reproduktion von Resultaten ist nahezu unmöglich [25], da genomunabhängige Parameter wie die Verwendung unterschiedlicher Thermocycler zu anderen Ergebnissen führen können.

1.6.2. SRAP (Sequence related amplified polymorphism)

Die SRAP Methode wurde 2001 von Li und Quiros etabliert [26]. Die Primer sind bei dieser Methode länger, in der Regel 17-21 Nukleotide [24], und zusätzlich weist das PCR Programm eine Besonderheit auf, denn dieses gliedert sich in zwei unterschiedliche Schritte, die sich in der Annealing Temperatur unterscheiden. Zunächst werden bei einer niedrigen Annealing-Temperatur (um die 35°C) gezielt Primer-Template-Mismatches erzeugt, um sicher zu stellen, dass die deutlich längeren Primer (verglichen mit den RAPD-Primern) überhaupt irgendwo im Genom binden. Damit wird gewisser Grundstock an Amplifikaten erzeugt, die bei einer erhöhten Annealing Temperatur (um die 50°C) in den folgenden Schritten bevorzugt vor den Templates vervielfältigt werden. Dabei finden dann nur exakte Bindungen statt, was zu einer großen Verlässlichkeit, Effizienz und Reproduzierbarkeit führt [24].

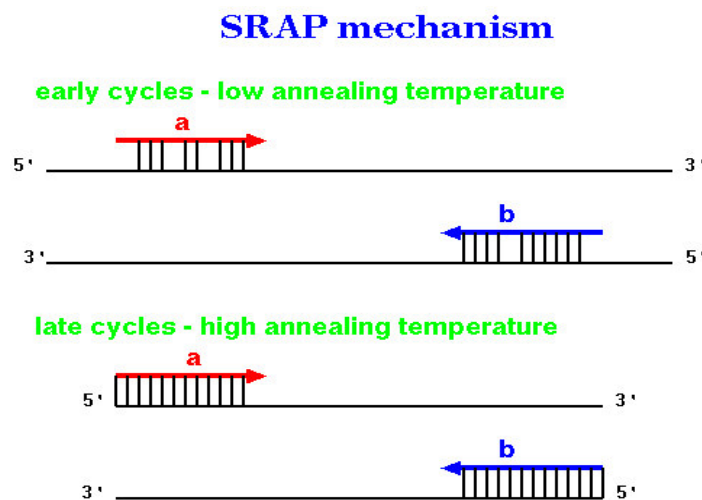


Abb. 6: Dargestellt sind die zwei Zyklen einer SRAP. In den ersten Zyklen werden die Primer unspezifisch an die DNA gebunden. Die damit amplifizierte Sequenzen werden in den darauffolgenden Zyklen mit der exakten Bindung der Primer vervielfältigt.

Da eine große Anzahl von Fragmenten vervielfältigt werden kann, keine Sequenzinformationen vonnöten sind, die Primer für jede Art eingesetzt werden können, das Verfahren recht einfach durchführbar und günstig ist und weil eine im Gegensatz zu RAPD erhöhte Reproduktion der Ergebnisse möglich ist, erfreut sich diese Methode immer größerer Beliebtheit.

Sie wurde beispielsweise zur Unterscheidung verschiedener Rasengräserarten [27], verschiedener Arten innerhalb der Gattung der Zitrusfrüchte (*Citrus*) [28], und auch schon für die Untersuchung unterschiedlicher Population von *Lycium ruthenicum* erfolgreich eingesetzt [29].

1.6.3. 5S-Spacerregion Fingerprint

Die 5S rRNA Region ist ein Teil der großen Untereinheit der Ribosomen und kommt in allen Lebensformen vor [30]. Trotz der offensichtlichen Bedeutung dieser Region ist deren genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt [31]. Inzwischen geht man davon aus, dass die 5S-rRNA die Aktivitäten in den funktionalen Zentren des Ribosoms synchronisiert und zusammen mit anderen Proteinen eine Rolle bei der Bindung der tRNA spielt [31].

Genfamilien sind eine Gruppe von zwei oder mehr identischen oder sehr ähnlichen Genen, welche im Laufe der Evolution durch Genduplikation einer ehemals nur einmal vorkommenden Sequenz entstanden sind [12]. Die 5S rRNA Region gehört zu den homogenen Genfamilien [12] und liegt im eukaryotischen Kerngenom in zahlreichen Kopien vor, die in tandemartigen Wiederholungen angeordnet sind, welche durch Non-Transcribed Spacer (NTS) voneinander getrennt werden. Diese Wiederholungen variieren in Anzahl und Länge von Art zu Art [32], was die Betrachtung dieser Region zu einer brauchbaren Möglichkeit macht, nah verwandte Arten voneinander zu unterscheiden. Aufgrund der elementaren Bedeutung für das Überleben eines Organismus ist die etwa 120 Nukleotid lange 5S-rRNA Region stark konserviert, weswegen universelle Primer als Angriffspunkt für die Bindung in dieser Region und der anschließenden Amplifizierung der variablen Spacerregion dazwischen eingesetzt werden können.

Dies wurde bereits bei der Unterscheidung von 25 Arten und Kultivaren der Gattung *Fritillaria* [33] oder auch bei der Bestimmung verschiedener Arten aus der Gattung *Angelica* [34], die beide eine wichtige Rolle in der traditionellen chinesischen Medizin spielen, erfolgreich eingesetzt.

1.7. SCAR und ARMS

Die Grundlage für eine **SCAR**-Analyse (Sequence related amplified region) ist ein DNA-Fingerprint. Wenn in einem Fingerprint eine spezifische Bande für eine bestimmte Art detektiert worden ist, kann die Sequenz dieser Bande für das Design von SCAR-Primern verwendet werden, die das im Fingerprint amplifizierte Fragment gezielt vervielfältigen sollen [35]. Das Ziel ist die Amplifikation des aus dem Fingerprint resultierenden spezifischen Fragments bei einer der zu unterscheidenden Arten. Damit kann eine klare Trennung (Bande / keine Bande) zwischen zwei Arten erzeugt werden.

Bei der **ARMS** (Amplification refractory mutation system) Methode wird ein (dritter) diagnostischer

Primer in die PCR-Reaktion gebracht. Dieser Primer beruht auf einem Sequenzunterschied von einem Nukleotid in einem Sequenzalignment von zwei verschiedenen Arten [35]. Der Primer wird so designt, dass seine 3' Region an der Stelle liegt an der sich die Sequenzen von zwei Arten in einem Nukleotid unterscheiden. Das 3'-Ende ist beim Primer von entscheidender Bedeutung, da die DNA-Polymerase eine Hydroxygruppe als Startpunkt für die Reaktion benötigt, welche am 3'-Ende des Primers lokalisiert ist. So soll aufgrund einer Punktmutation eine Bindung des Primers bei einer der zu vergleichenden Arten stattfinden.

Auch hier ist das Ziel eine schnelle Unterscheidung zwischen zwei Arten treffen zu können. Der Unterschied wird über eine zusätzliche Bande in einem Agarosegel sichtbar.

1.8. Fragmentanalyse mittels TBP (Tubulin based polymorphism)

Mikrotubuli sind Bestandteile des Zytoskeletts, die aus Tubulinen aufgebaut sind. Von besonderer Bedeutung sind die α - und β -Tubuline, die in Form von Heterodimeren der Hauptbestandteil der Mikrotubuli sind.

Mikrotubuli kommen in allen eukaryotischen Zellen vor und sorgen dort einerseits für mechanische Stabilität und sind des weiteren molekulare Schienen für Motorproteine (wie z.B. Kinesin und Dynein), über die Vesikel durch die Zelle transportiert werden [36].

Diese fundamentalen Funktionen und Mechanismen werden in jedem eukaryotischen Organismus benötigt, was bedeutet, dass die Gene, welche für die Tubuline kodieren, hochkonserviert sein müssen. Diese Sequenzen können dafür verwendet werden um universelle Primer zu erstellen, und damit die nicht-codierende Bereiche innerhalb der Gene, sogenannte Introns, für Analysezwecke zu verwenden.

Die Introns sind im Vergleich zu den hochkonservierten kodierenden Regionen variabler, da sie vor der Proteinbiosynthese aus der prä-mRNA entfernt werden. Aus diesem Vorgang (Splicing genannt) entsteht die mRNA, welche in der kleinen Untereinheit der Ribosomen erkannt wird. In der großen Untereinheit des Ribosoms findet die Proteinbiosynthese über Verknüpfung der Aminosäuren zu einer Kette statt [36].

Da die meisten Mutationen in diesen nicht-kodierenden Regionen stattfinden, können hier große Längen- und Sequenzunterschiede auftreten.

Auf dieser Idee basiert auch TBP. Diese Methode macht sich die Variabilität der Introns innerhalb

der Tubulin Genfamilien zunutze. Die Tubulin-Genfamilie gehört zu den heterogenen Genfamilien, was bedeutet, dass sich die Sequenzen der einzelnen Gene aufgrund von Mutationen in gewissem Umfang unterscheiden. Die daraus resultierenden schwach unterschiedlichen Genprodukte können in verschiedenen Entwicklungsstadien oder Zelltypen bereitgestellt werden [12]. Die Kopien der β -Tubuline-Genfamilie besitzen Variationen in der Länge ihrer Introns.

Dass sich diese Längenunterschiede der Introns eignen zwischen verschiedenen nah verwandten Arten zu differenzieren, wurde erstmals 2004 von Bardini *et al.* gezeigt [37]. Damals wurde ein Primerpaar für die Amplifikation vom Intron I der Kopien des β -Tubulins-Gens designt. Die über PCR vervielfältigten Intronfragmente konnten zur Erzeugung von Mustern verwendet werden, die zur artspezifischen Differenzierung nah verwandter Spezies von Kaffee, Raps und Lotus geeignet waren [37]. Der Erfolg dieses Ansatzes ermutigte andere Gruppen dies für weitere Fälle zu etablieren und zu verbessern. Im Jahr 2007 wurde von Breviaro *et al.* im Rahmen einer Untersuchung von Hirse das Primerpaar für das Intron I der β -Tubulin-Genfamilie modifiziert und außerdem ein weiteres Primerpaar designt, welches das Intron II der β -Tubulin-Genfamilie vervielfältigt [38].

Für die Gattung *Lycium* wird beschriebener Ansatz im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal eingesetzt.

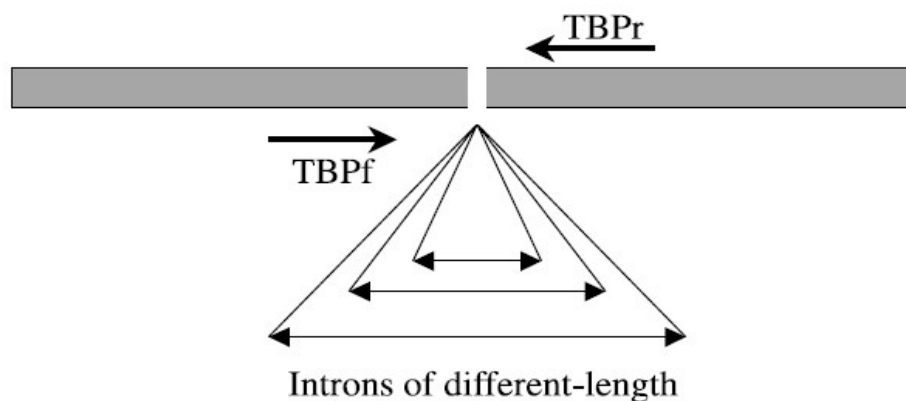


Abb. 7: Schematische Darstellung des Prinzips des Tubulin-basierten Polymorphismus. Die beiden Primer binden in der hochkonservierten Regionen der β -Tubulin-Gene und amplifizieren die dazwischen liegenden Introns.

1.9. Genetic barcoding

Ein DNA Barcode ist ein DNA-Fragment, welches dazu eingesetzt wird, um Arten zu identifizieren [39]. Die korrekte Identifizierung einer Art ist von großer Bedeutung, sei es für das bloße Wissen

über die Beziehung zwischen Arten und deren Geschichte, oder aber für die Erhaltung natürlicher Ressourcen, der Identifizierung invasiver als auch gefährdeter Arten und zu guter Letzt die Qualitätskontrolle pharmazeutischer und Lebensmittelpflanzen [40].

DNA barcoding basiert auf Sequenzunterschieden in einem kurzen DNA-Fragment eines bekannten Bereichs innerhalb des Genoms [40]. Im Optimalfall ist ein Barcode variabel genug um nah verwandte Arten voneinander zu unterscheiden und kurz genug für eine einfache praktische Durchführung bei niedrigen Kosten. Ein guter barcoding Marker muss universell, also auf alle Pflanzengruppen einsetzbar sein [39].

Viele verschiedene DNA Regionen wurden bereits als allgemeiner Barcode für Pflanzen vorgeschlagen, jedoch weist bisher keine Region die geeigneten Charakteristika für einen universellen Code in Pflanzen auf, wie es zum Beispiel beim CO1 Gen in Tieren der Fall ist [41].

Die Kombination aus den Markern matK und rbcL wurde von dem Konsortium für den Barcode of Life als Standard Markerkombination für die Identifikation von Pflanzen vorgeschlagen [42], wobei auch über den Mangel an Unterscheidungsmöglichkeiten (discriminative Power) in vereinzelt Pflanzenfamilien sowie die fehlende Universalität des matK-Primers berichtet wurde [43].

Auch wenn schon viele verschiedene Regionen als die universelle Markerregion angepriesen wurden, so muss der universelle Barcode, falls es ihn denn für Pflanzen gibt, noch gefunden werden. Diese Problematik und deren offenes Ende wurde gut durch ein Zitat in einer Veröffentlichung von 2008 ausgedrückt: „regardless of the region(s) ultimately adopted for plant barcoding, there will always be some species that would be better resolved by some other region“ [44].

Im Folgenden werden die am häufigsten eingesetzten und vielversprechendsten Barcoding Marker, die auch im Rahmen dieser Arbeit behandelt wurden, in Kürze vorgestellt.

1.9.1. Die plastidäre psbA-trnH Markerregion

psbA-trnH ist ein plastidärer Marker und gehört zu den am häufigsten eingesetzten Barcodes. Dabei wird die Spacerregion zwischen dem psbA- und dem trnH-Gen betrachtet. Die Länge des psbA-trnH Spacerfragments variiert in Eudikotyliiden zwischen 152 und 851 Basenpaaren, mit einer durchschnittlichen Länge von 357 Basenpaaren [40]. Eine Überprüfung mit der BLAST Distanzmethode zeigte, dass die psbA-trnH Region bei einer Untersuchung von 13727 Eudikotyliiden eine korrekte Identifikation von 64,5% der Arten lieferte. Im Vergleich mit den am

häufigsten verwendeten Markern (ITS2, matK, rbcL) schneidet psbA-trnH überdurchschnittlich ab, mit der höchsten Identifikationsrate bei 36 von 71 Gattungen [40]. Aus diesem Grund ist psbA-trnH weithin akzeptiert als zufriedenstellender Barcode, da eine große Varianz, die zum Unterscheiden auch nah verwandter Arten verwendet werden kann, vorhanden ist. Besonders in der Gattung *Solanum* ist der Einsatz von psbA-trnH mit einer Identifikationsquote einzelner Arten von 96,5% erfolgreich [40]. Problematisch bei psbA-trnH ist das häufige Auftreten von Inversionen in den Sequenzen, die zur fehlerhaften Einordnung verschiedener Arten in unterschiedliche Taxa führen können [40]. Des Weiteren ist die relativ kurze Länge dieser Sequenz ein limitierender Faktor, weil damit auch die Anzahl variabler und für die Unterscheidung von verschiedener Arten aussagekräftiger Stellen begrenzt ist [40].

1.9.2. Die alternative plastidäre Region ycf1b: „the most promising plastid DNA barcode of land plants“

Im Jahr 2015 wurden die plastidären Regionen ycf1a und ycf1b als die variabelsten plastidären Marker postuliert, welche als Standardbarcode für Landpflanzen etabliert werden könnten [39].

Das ycf1-Gen codiert für ein Protein mit der Länge von 1800 Aminosäuren und ist damit das zweitgrößte Gen im Chloroplasten [39]. Das kodierte Protein heißt Tic214 und ist essentiell für die Pflanze, da es Bestandteil des TIC-Komplexes (translocon on the inner chloroplast membrane) ist, welcher für den Transfer von Proteinen durch die Chloroplastenmembran verantwortlich ist [45].

Aufgrund seiner großen Länge (5709 Basenpaare in *Nicotiana tabacum*) wurde die Region bisher als Barcode ignoriert, da aufgrund der Länge und der Variabilität kein universeller Primer designet werden konnte [46]. Jedoch besitzen Angiospermen zwei sehr variable Regionen im ycf1 Gen, ycf1a und ycf1b. Für diese Regionen wurden universelle Primer designet und getestet.

Die Region ist in den meisten Taxa variabler als die matK Region. Ycf1 hat auch gegenüber psbA-trnH einen Vorteil, da psbA-trnH aufgrund seiner kurzen Länge eine limitierte Anzahl von informativen Stellen besitzt [40]. Es wird angenommen, dass die beiden Regionen ycf1a und ycf1b den Größten Gehalt an Nukleotid Diversity (π) innerhalb des Plastidgenoms in Angiospermen besitzen [46]. Besonders die Primer für die ycf1b Region können als universell bezeichnet werden, da sie in Angiospermen bei 98,17% der getesteten Pflanzen zu einem PCR-Erfolg führten. Auch die richtige Zuordnung von Arten ist beim Einsatz von ycf1b mit 71,87% am höchsten (verglichen mit 54,99% bei matK und 55,5% bei rbcLb) bei 391 getesteten Proben [39].

1.9.3. Nukleär lokalisierte ITS-Region

Die internal transcribed spacer (ITS) liegen zwischen den hochkonservierten rRNA kodierenden Regionen 18S, 5.8S und 28S. Diese bilden eine Transkriptionseinheit für die große Untereinheit (5.8S und 28S) und die kleine Untereinheit (18S) der Ribosomen.

Der rDNA Locus besteht aus einer großen Zahl von Kopien vieler einzelnen rDNA-Einheiten. Diese wiederum sind immer gleich aufgebaut und bestehen aus dem externen Spacer (ETS), der konservierten 18S, 5.8S und 28S Regionen und den variablen ITS-Regionen dazwischen. Der Bereich zwischen 18S und 5.8S wird ITS1 und der zwischen 5.8S und 28S ITS2 genannt (siehe Abb. 8) [47].

ITS2 wurde von unterschiedlichen Gruppen als Standard DNA Barcode für die Authentifizierung von Heilpflanzen vorgeschlagen (z.B. Chen *et al.*, 2010 [48]). Außerdem legen Studien der Chinese Plant Barcode of Life Group [49] nahe, dass die gesamte ITS Region genug Variationen aufweist, um als Standardmarker des Kerngenoms zur Unterscheidung von nah verwandten Arten verwendet werden zu können [11]. Bei der Amplifikation der kompletten ITS-Region (ITS1, 5.8S und ITS2) können oftmals Schwierigkeiten auftreten, aber auch die bloße Betrachtung des ITS2-Fragment kann als verlässliche Quelle zur Authentifizierung herangezogen werden [11].

Dieser Ansatz wurde bereits auf die Brauchbarkeit hinsichtlich der Differenzierung von *Lycium barbarum*, *Lycium chinense* und *Lycium ruthenicum* angewandt und zeichnete sich durch positive Resultate respektive einer möglichen Unterscheidung der verschiedenen Arten beim Einsetzen der ITS2 Markerregion aus [11].

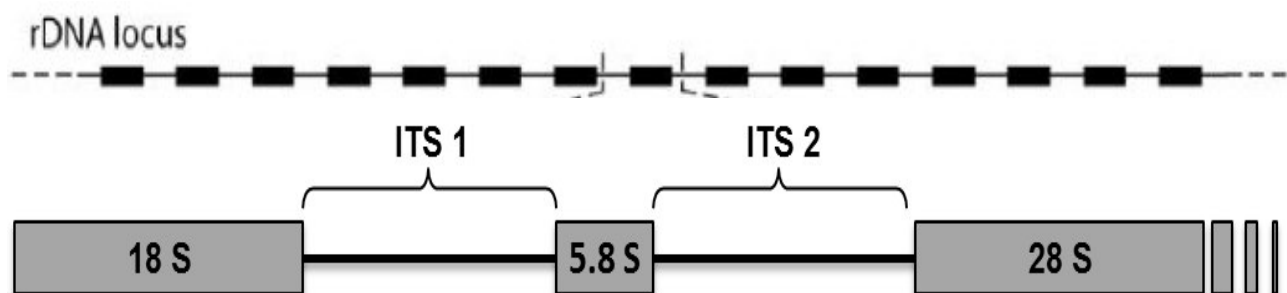


Abb. 8: Darstellung des kompletten rDNA Locus, welcher aus vielen tandemartigen Wiederholungen aufgebaut ist (oben). Schematische Darstellung einer einzelnen rDNA Einheit (der vor der 18S Region befindliche intergenic Spacer (IGS) und der externe Spacer (ETS) sind nicht dargestellt). Die Bereiche von Interesse sind die variablen ITS1 und ITS2 Regionen, die zwischen den konservierten 18S und 5.8S bzw. 5.8 und 28S rDNA Regionen liegen (unten)

1.9.4. Alternative nukleäre Markerregion CosII (conserved ortholog set II)

Orthologe Gene werden homologe Gene in verschiedenen Arten genannt, die auf ein Gen im letzten gemeinsamen Vorfahren dieser beiden Arten zurückgehen [50].

Die CosII-Regionen befinden sich im Kerngenom und wurden erstmals 2006 beschrieben [51]. Für die große Anzahl dieser Regionen wurden Primer zum Einsatz in der Familie der Solanaceae entwickelt, ihre Verwendbarkeit auch in dieser Familie gezeigt und für systematische Studien in dieser und nah verwandter taxonomischer Gruppen vorgeschlagen [52].

Für eine Untersuchung der Gattung *Lycium* mittels der CosII Gene wurden im Jahr 2009 von Levin *et al.* 44 CosII Regionen amplifiziert und auf ihre Brauchbarkeit für phylogenetische Analysen geprüft. Das Ergebnis waren fünf orthologe Gene, die die Kriterien (1) Einzelbanden nach einer PCR und damit einer einzigen Kopie im Genom, (2) Zufriedenstellende Amplifikation nach der PCR und (3) ein hoher Intron-Gehalt (> 60%) erfüllten [52]. Für diese Regionen wurden universelle Primer designt, die in den entsprechenden CosII Regionen aller Solanaceae amplifizieren und für eine phylogenetische Analyse geeignet sein sollen [52].

Besonders die Cos16 Region soll hervorgehoben werden, diese befindet sich in Solanaceae auf dem zweiten Chromosom [53] und hat Ähnlichkeiten zu den Enzymen der Acyltransferase [50].

Information über diese und weitere Gene aus der Reihe des conserved ortholog set II können auf den Seiten des Sol Genomic Network abgerufen werden [54].

1.10. Molekulare Phylogenie

1.10.1. Aussagekraft von Stammbäumen

Mithilfe von Stammbäumen können Aussagen über die Verwandtschaft zwischen verschiedenen Arten getroffen werden. Bei der Verwendung von bestimmten DNA-Markern können Sequenzen über PCR amplifiziert werden, die anschließend zur Bildung von Stammbäumen eingesetzt werden können. Zuvor muss die entsprechende DNA sequenziert und nach erfolgreicher Sequenzierung über bestimmte Programme ausgewertet werden (siehe auch Methodenteil Kapitel 4.8.)

Der verwendete Marker entscheidet über die Aussagekraft eines phylogenetischen Stammbaums. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten innerhalb der gleichen Art, sollte diese von anderen Arten klar zu trennen und in einer anderen Klade innerhalb des Stammbaums zu finden sein.

Es gibt verschiedene Methoden um die erhobenen Daten durch einen phylogenetischen Baum

auszudrücken. Bei der Wahl der maximum parsimony (MP) wird ein Baum aufgrund des Kriteriums erstellt, dass Sequenzunterschiede auf der geringst möglichen Anzahl evolutionärer Schritte beruhen.

Die UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) ist eine distanzbasierte Methode, die auf der Annahme einer molekularen Uhr beruht, welche davon ausgeht, dass alle Taxa mit derselben konstanten Rate evolvieren [35].

1.10.2. Die Grenzen von Stammbäumen

Stammbäume sind über die Daten mit denen sie gespeist werden limitiert. Ein Sequenzalignment eines Markers mit vielen diagnostischen Stellen wird zu einer größeren Differenzierung im Stammbaum führen, als Markersequenzen, die keine Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Sequenzen aufweisen. Daraus resultiert das Problem, dass es irgendwann nicht mehr möglich ist „tiefer“ zu gehen und der Informations- und Differenzierungsgehalt von Markersequenzen erschöpft ist. Das kann dazu führen, dass unterschiedliche Arten in der gleiche Klade landen können, weil die Markersequenzen nicht ausreichend Unterschiede aufweisen, um diese Arten voneinander zu trennen. Aufgrund der fehlenden Feinheit wären diese unterschiedlichen Arten laut diesem Marker die gleiche Art. Dazu kommt, dass plastidäre Marker (wie z.B. psbA-trnH oder ycf1b) Phänomene wie Hybridisierung oder Introgression, die in Pflanzen häufig vorkommen, ignorieren. Daher ist es trotz der immer wieder beschriebenen Eignung der plastidären Marker zur Differenzierung von Arten ratsam, in den Untersuchungen zusätzlich Daten zu erheben, die aus dem Kerngenom gewonnen werden.

Bei der Betrachtung von Stammbäumen sollte man sich stets bewusst sein, dass es sich bei diesen immer nur um ein Konstrukt handelt. Ein Konstrukt mit dem die Wahrheit so gut es geht dargestellt werden soll. Diese Betrachtung ist oft nur eine Momentaufnahme, denn Arten sind keine Fixen Punkte, sondern vermutlich ständig im Fluss. So könnten geographisch getrennte Populationen der gleichen Art, welche sich aufgrund ihrer Trennung nicht kreuzen können, als neue Arten im Entstehungsprozess betrachtet werden (siehe auch Einleitung Kapitel 1.2.).

2. Zielsetzung

Viele einzelne Punkte des Verhältnisses der nahe verwandten Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense*, die als Goji kommerzialisiert sind, wurden bereits im Rahmen vieler Arbeit eruiert.

Diese Masterarbeit soll einen Überblick über die in der aktuellen Forschung angewandten Methoden zur Differenzierung verschiedener Arten (im Speziellen innerhalb der Gattung *Lycium*) geben.

Dabei wird erstmals der Ansatz des Tubulin-basierten Polymorphismus (TBP) auf die strittige Taxonomie von Goji (*Lycium barbarum* und *Lycium chinense*), der als Goji vertriebenen Produkte sowie weiterer *Lycium*-Arten angewandt. Des weiteren ist die Kombination aus der klassischen morphologischen Bestimmung, der Anwendung von bewährten Barcoding Methoden und dem Einschluss neuer Ansätze, wie dem Tubulin-basierten Polymorphismus im Kontext der Goji-Beere eine bisherige einmalige Gesamtbetrachtung.

Das Ziel dieser Arbeit ist die morphologische Unterscheidung zwischen *L. barbarum* und *L.chinense*, sowie diese Unterschiede auf der genetischen Ebene (seien es Fingerprints oder Barcoding) bestätigen zu können und dabei noch nicht auf diese Problematik angewandte Ansätze miteinzubeziehen.

Ein Erfolg in dieser Untersuchung könnte für eine Etablierung der Kombination aus den verwendeten Methoden auf ähnliche Probleme genutzt werden.

3. Material

3.1. Verwendetes Pflanzenmaterial

Von den letztendlich insgesamt 38 *Lycium* Akzessionen standen zunächst 15 aus dem BGK zur Verfügung. In der folgenden Tabelle sind die IDs, die lateinischen Namen der Akzessionen, deren Herkunft sowie der im Rahmen dieser Arbeit erhobene Datensatz angegeben (siehe Tab. 1). „Blüten“ bezieht sich auf die morphologische Bestimmung der Pflanzen über Blütenmerkmale. Für die Blatt- und Samenanalyse wurde ein Vermessungsansatz angewandt und mit „DNA“ ist die Erstellung von Fingerprints, sowie die Amplifikation von Markerregionen und deren Auswertung gemeint.

ID	Lateinischer Name laut botanischem Garten des KIT	Herkunft	Analyse			
			Blüten?	Blatt?	Samen?	DNA?
1470	<i>Lycium barbarum</i>	Taiwan	Ja	Ja	Ja	Ja
5548	<i>Lycium barbarum</i>	BGK	Ja	Ja	Ja	Ja
5549	<i>Lycium barbarum</i>	-	Ja	Ja	Ja	Ja
5550	<i>Lycium barbarum</i>	BG Hohenheim	Ja	Ja	Ja	Ja
5551	<i>Lycium chinense</i>	Munhung, bei Pjôngjang	Ja	Ja	Ja	Ja
5552	<i>Lycium chinense</i>	BG Shanghai	Ja	Nein	Ja	Ja
5553	<i>Lycium europaeum</i>	-	Ja	Ja	Ja	Ja
6815	<i>Lycium chinense</i>	FBG Göttingen	Ja	Ja	Ja	Ja
6967	<i>Lycium chinense</i>	-	Ja	Ja	Ja	Ja
7064	<i>Lycium europaeum</i>	Marokko	Nein	Nein	Nein	Ja
7067	<i>Lycium chilense</i>	Argentinien	Ja	Nein	Nein	Ja
8211	<i>Lycium ameghinoi</i>	-	Nein	Nein	Nein	Ja
8212	<i>Lycium gilliesianum</i>	Argentinien	Nein	Nein	Nein	Ja
8213	<i>Lycium europaeum</i>	Marokko	Nein	Nein	Nein	Ja
8352	<i>Lycium oxycarpum</i>	Karoo-Wüste	Nein	Nein	Nein	Ja

Tab. 1: Aus dem botanischen Garten des KIT verfügbare Akzessionen.

Weitere Akzessionen liegen in Form von Goji-Produkten vor, die aus unterschiedlichen Quellen bezogen wurden. Diese konnten für eine Samenanalyse, sowie für eine DNA-Extraktion mit anschließenden Fingerprint- und Sequenzierungsanalysen verwendet werden (siehe Tab. 2).

ID	Bezeichnung	Herkunft	Analyse	
			Samen?	DNA?
8603	<i>Lycium Product 1</i>	HANOJU Deutschland GmbH	Ja	Ja
8604	<i>Lycium Product 2</i>	Kräuterhaus Sanct Bernhard KG	Ja	Ja
8605	<i>Lycium Product 3</i>	Grubauer's Gewürze & Teeversand	Ja	Ja
8606	<i>Lycium Product 4</i>	China	Ja	Ja
8619	<i>Lycium Product 5</i>	Ningxia	Ja	Ja
8620	<i>Lycium Product 6</i>	Yun nan	Ja	Ja
8621	<i>Lycium Product 7</i>	Guang Xi	Ja	Ja
8622	<i>Lycium Product 8</i>	Xin jiang	Ja	Ja
8623	<i>Lycium Product 9</i>	Gansu, Jing Yuan	Ja	Ja
8691	<i>Lycium Product 10</i>	Edeka	Nein	Ja
8692	<i>Lycium Product 11</i>	Alnatura	Nein	Ja
8693	<i>Lycium Product 12</i>	Edeka, Dragon Superfoods	Nein	Ja
8694	<i>Lycium Product 13</i>	Taiwan	Nein	Ja
8695	<i>Lycium Product 14</i>	Taiwan	Nein	Ja
8696	<i>Lycium Product 15</i>	VitFrisch	Nein	Ja

Tab. 2: Erworbene als Goji bezeichneten Produkte.

Im Laufe der Arbeit wurde noch weiteres getrocknetes Pflanzenmaterial aus dem Herbarium Freiburg bezogen. Dieses diente aber nur zur Verwendung für die genetischen Untersuchungen wie Fingerprints oder Markerregion Sequenzierungen.

ID	Lateinischer Name	Herkunft	Analyse DNA
8683	<i>Lycium shawii</i>	Biskra (Algerien)	Ja
8684	<i>Lycium barbarum</i>	Neusiedl am See (Österreich)	Ja
8685	<i>Lycium barbarum</i>	Sidi Yahia Aarab (Marokko)	Ja
8686	<i>Lycium barbarum</i>	Martil (Marokko)	Ja
8687	<i>Lycium europaeum</i>	Sidi Kaouki (Marokko)	Ja
8688	<i>Lycium europaeum</i>	Provinz Khenifra (Marokko)	Ja
8689	<i>Lycium intricatum</i>	Larache (Marokko)	Ja
8690	<i>Lycium intricatum</i>	Al Hoceima (Marokko)	Ja

Tab. 3: Vom Herbarium Freiburg bereitgestellte Akzessionen.

3.2. Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammern	Mupid-One	Advance Co. LTD (Tokyo, JP)
Gel Scanner	Safe Imager	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Inkubater (DNA-Extraktion)	Thermomixer 5436	Eppendorf
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler	T100™ Thermal Cycler	Biorad
Waage	Analytical Plus	Ohaus Corporation, USA
Vortexer	Vortex Genie	Bender & Hobein AG, Schweiz
Zentrifugen	Haraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific
	Micro Star 17	VWR
Makroskop	Leica Stereolupe 420	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Kamera	Leica DFC 500	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
TissueLyser	TissueLyser	Qiagen

Tab. 4: Verwendete Geräte

3.3. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen	VWR
Einmalhandschuhe	VWR
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf AG
PCR-Tubes	Biozym Scientific GmbH
96-well Platte	Peqlab

Tab. 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.4. Puffer

Bezeichnung	Hersteller
Thermopol-Puffer	New England Biolabs
TAE-Puffer 50x	Eppendorf AG

Tab. 6: Verwendete Puffer

3.5. Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Taq-Polymerase	New England Biolabs

Tab. 7: Verwendete Enzyme

3.6. Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Nuklease-freies Wasser	Biozym Scientific GmbH
dNTPs	New England Biolabs
BSA	Roth
SYBRsafe	Life Technologies
Agarose	Roth
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs
6-FAM (6-Carboxyfluorescein)	Eurofins
Yakima Yellow	Eurofins

Tab. 8: Verwendete Chemikalien

3.7. Primer

Name		5' – 3' Sequenz	Lokus	Referenz
RAPD OPC-2	-	GTGAGGCGTC	-	Zhang <i>et al.</i> (2000) [23]
LB.SC700.F	fw	GTCCCGACGATGGTAGCGGATG	-	Cho-Wing Sze <i>et al.</i> (2008) [55]
LB.SC700.B	rv	GTCCCGACGACACZGACCTGG	-	
SRAP HP1	fw	TGTATTCGAGCCTGAGAG	-	Horn (unveröffentlicht)
SRAP HP2	fw	TCTTAGTACGGTCCATGC	-	
SRAP LP1	rv	CTGGTCGACACTGTACAT	-	
SRAP LP2	rv	TGTACCTGGGTCAATCAA	-	
TBPfex1 (β I.2)	fw	AACTGGGCBAARGGNCAITAYAC	β -Tubulin Intron I	Breviario <i>et al.</i> (2007) [38]
TBPrex1 (β I.2)	rv	ACCATRCAYTCRTCDGCRTTYTC		
TBPfin2 (β II)	fw	GARAAYGCHGAYGARTGYATG	β -Tubulin Intron II	Breviario <i>et al.</i> (2007) [38]
TBPrin2 (β II)	rv	CRAAVCCBACCATGAARAARTG		
5S-P1	fw	GGATTCGTGCTTGGGCGAGAGTAGTA	5S-rRNA-Region	Zhao <i>et al.</i> (2003) [34]
5S-P1	rv	ACGCTAGTATGGTCGTGATTCTAGG		
5S-SCAR55-fw1	fw	TTTTTCGAAAATCGGCTCGGC		
5S-SCAR117-fw2	fw	AGATGAATGAAAATTGTGCACCA		
5S-SCAR-rv	rv	GATCTAGCCGCCAAACTGC		
Cos14	fw	TCCGGTTGTTATTGTCACTGGAGC	CosII	Levin <i>et al.</i> (2009) [52]
Cos14	rv	TGGAAACTTCTTCTGCCTCCTTTG		
Cos16	fw	TCCAGAAGGGAAGGTCTGTCAAGAAG		
Cos16	rv	AGTCATGTACAGACATTTTTGTGCTGC		

Cos27	fw	ATGGTACTGCCGGTGCAAATCAG		
Cos27	rv	TCGGTAACACCTGTCATCTGGAATG		
Cos30	fw	ATGGGATTCAAAAAGGATGCTTAGC		
Cos30	rv	AGCCTAACACCAGTAGCATCATAATTAC		
Cos40	fw	TTGCTTACTCTTGGTGGAACATTC		
Cos40	rv	TGTCTGTGATATCCTCTCTTCTTC		
psbA	fw	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	psbA-trnH	Sang <i>et al.</i> (1997) [56]
trnH	rv	CGCGCATGGTGGATTACAATCC		Tate <i>et al.</i> (2003) [57]
ycf1b	fw	TCTCGACGAAAATCAGATTGTTGTGAAT	ycf1b	Dong, W. <i>et al.</i> (2015) [39]
ycf1b	rv	ATACATGTCAAAGTGATGGAAAA		
BEL-2	fw	GATGCGGAGATTGGCCCCCGTGC	ITS2	Chiou <i>et al.</i> (2007) [58]
BEL-3	rv	GACGCTTCTCCAGACTACAAT		
GojiBEL-144G-fw	fw	GCGCGTTTGGCCTCTCG	ITS2	

Tab. 9: Liste der in dieser Untersuchung relevanter Primer.

3.8. Kits

Bezeichnung	Hersteller
PCR clean-up / Gel extraction	Macherey-Nagel
PCR clean-up	strattec
InnuPREP Plant DNA Kit	Analytik Jena AG

Tab. 10: Verwendete Kits

3.9. Software

Programm	Verwendung	Referenz
SmartGrain	Vermessung Samen	Tanabata, T. <i>et al.</i> (2012) [59]
LAMINA	Vermessung Blätter	Bylesjö, M. <i>et al.</i> (2008) [60]
R Studio	Darstellung der Vermessungen	[61]
MEGA6	Bearbeitung von DNA-Sequenzen	Tamura, K. <i>et al.</i> (2013) [62]
FinchTV	DNA Chromatogramme	[63]
Archaeopteryx	Bearbeitung von Stammbäumen	Zmasek and Eddy (2001) [64]
GraPhlAn	Darstellung von Stammbäumen	Asnicar, F. <i>et al.</i> (2015) [65]
FSAnalyzer	Fragmentanalyse	Bachelorarbeit Patrick Thimm (2015)

Tab. 11: Verwendete Software

4. Methoden

4.1. Blütenanalyse

Ein Teil der Akzessionen im BGK begannen ab Mai 2015 nach und nach zu blühen, sodass eine Bestimmung der Blüten bei diesen Akzessionen durchgeführt werden konnte (siehe auch Materialteil, Tab. 1).

Von jeder blühenden Pflanze wurden 30 Blüten von verschiedenen Teilen der Pflanze gesammelt und unter Zuhilfenahme von Bestimmungsliteratur bestimmt. Der hierfür verwendete Bestimmungsschlüssel war die Flora of China [21]. Für die kleinen Details der Blüten, welche nicht mit dem Auge zu erfassen waren, sowie die Dokumentation sämtlicher Unterscheidungsmerkmale wurde ein Makroskop benutzt. Die Ergebnisse wurden mithilfe der Leica DFC 500 Kamera festgehalten.

Die wichtigsten Unterscheidungskriterien der Blüten waren die Behaarung der Kronblätter, die Lappung des Kelches sowie die Länge der Kronröhre (siehe Einleitung Kapitel 1.4. für Details und den Ergebnisteil Kapitel 5.1.1. für die ausführlichere Dokumentation dieser Unterschiede).

4.2. Blattanalyse

Von jeder Pflanze aus dem BGK wurden 20 – 30 ausgewachsene grüne Blätter gesammelt, eingescannt und die Blattlänge sowie Blattbreite vermessen. Für die Vermessung wurde das Programm LAMINA verwendet. Anhand eines Maßstabs auf den Scannbildern der Blätter konnte innerhalb des Programms LAMINA der Pixel / mm Wert zur korrekten Vermessung der Blätter eingestellt werden.

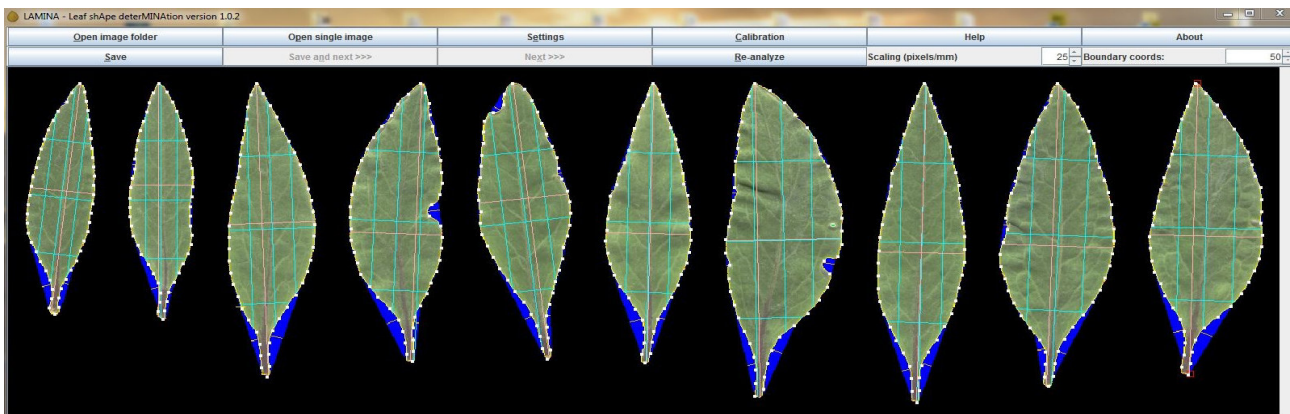


Abb. 9: Benutzeroberfläche des Programms LAMINA mit Blättern der Akzession 5548.

4.3. Samenanalyse

Von neun der Pflanzen aus dem BGK waren Früchte und damit Samen für eine Untersuchung der Samenmorphologie vorhanden. Zusätzlich lagen zu Beginn der Arbeit neun Goji-Produkte in Form von Früchten vor, die ebenfalls für eine Samenanalyse verwendet werden konnten. Die restlichen sechs *Lycium*-Produkte konnten in Form von DNA-Analysen noch in die Untersuchung eingebunden werden, für eine morphologische Betrachtung wurden diese Akzessionen jedoch nicht mehr berücksichtigt.

Von den vorhandenen Akzessionen wurde **jeweils 30 Samen** mit dem Makroskop fotografiert. Dabei wurde aufgrund der Größe der Samen immer nur 15 auf einmal dokumentiert. Die entstandenen Bilder wurden mit dem Programm SmartGrain ausgewertet. SmartGrain ist ein Programm zur Vermessung von Samen oder sonstigen kleinen Objekten. Das Programm erkennt Umrisse von Formen und ist in der Lage, die Länge und Breite von diesen Objekten zu vermessen. Als Ergebnis erhält der Nutzer Länge, Breite, deren Verhältnis, sowie Umfang und Fläche der eingegebenen Formen.

Auf den Makroskopaufnahmen der Samen befindet sich ein Maßstabsbalken, der im Programm SmartGrain über die Funktion „set scale“ als Skalierung und damit für die Exakte Vermessung der Samen verwendet werden kann.

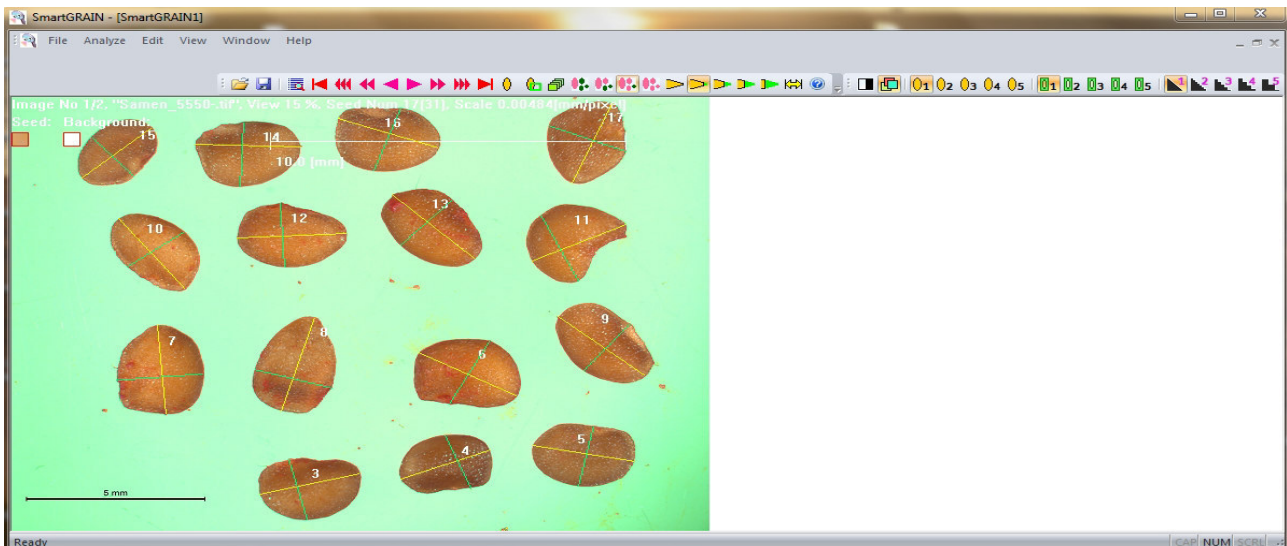


Abb. 10: Oberfläche des Programms SmartGrain. Alle Einstellungen wie der Maßstab oder die Feinheit der Samenerkennung können hier eingestellt werden. Die Erfassung der Länge bzw. der Breite der Samen ist über gelbe bzw. grüne Linien markiert.

Als Ergebnis erhält der Nutzer unterschiedliche Vermessungswerte der einzelnen Samen. Diese Daten werden in einem Text-Dokument festgehalten und können mit weiteren Programmen wie R Studio ausgewertet und in Form von Boxplots dargestellt werden.

4.4. DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion der Pflanzen aus dem BGK wurde Blattmaterial verwendet. Hierfür wurden ungefähr 60 mg eines grünen Blattes abgewogen und nach 5-minütigem Schockfrost in flüssigem Stickstoff mithilfe des TissueLyzers pulverisiert. Aus diesem „Blattpulver“ wurde nach Anleitung des jeweiligen Kits (siehe Materialteil Kapitel 3.8.) die DNA extrahiert. Die Kits basieren auf einer Säulenaffinitätsreaktion, bei der das DNA-Rückgrat an eine Membran in der Säule fest gebunden, die DNA gereinigt, anschließend wieder von der Säule gelöst und in Elutionspuffer oder $\text{nf-H}_2\text{O}$ eluiert wird. Der im Protokoll der Kits vorgeschlagene Optimierungsschritt der doppelten Elution der DNA, mit dem die Ausbeute der eluierten DNA größer ist, wurde ebenfalls durchgeführt. Für alle Akzessionen wurden insgesamt 100 μl eluiert.

Für die DNA-Extraktion aus den Früchten der Goji-Produkte war das Verfahren zu Beginn leicht anders. Eine eingefrorene Frucht wurde in eine Mörserschale gelegt, eine kleine Menge flüssiger Stickstoff darauf gegossen und die Frucht mit einem Mörser pulverisiert. Mit dem daraus entstehenden Pulver wurde ebenso verfahren wie mit dem Blattpulver.

Die Qualitätskontrolle der extrahierten DNA fand über eine spektrophotometrische Analyse statt. Das Nano-Drop Gerät wird zunächst durch das Auftragen von 1,5 μl $\text{nf-H}_2\text{O}$ initialisiert. Im folgenden „Blank“-Schritt wird 1,5 μl der Flüssigkeit aufgetragen in der die zuvor extrahierte DNA eluiert wurde. Anschließend wird 1,5 μl der zu kontrollierenden DNA-Probe pipettiert. Die ausgegebenen Werte geben die Konzentration der DNA (in $\text{ng} / \mu\text{l}$) sowie deren Reinheit an. Die Reinheit wird über den A_{260}/A_{280} -Wert (der Verunreinigungen durch Proteine angibt) und den A_{260}/A_{230} Wert (der die Verunreinigungen durch Polysaccharide angibt) dargestellt. Ein A_{260}/A_{280} -Wert von 1,8 bedeutet das reine DNA vorliegt. Höhere Werte bedeuten die Anwesenheit von RNA, wohingegen niedrigere Werte auf die Anwesenheit von Proteinen hindeuten. Der A_{260}/A_{230} Wert sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Je nach ermittelter DNA-Konzentration muss die Probe noch verdünnt werden, damit sie die optimale Konzentration von 50 $\text{ng} / \mu\text{l}$ für die PCR hat.

4.5. PCR

Um die extrahierte DNA untersuchen zu können, wird sie über eine PCR vervielfältigt.

Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes ist immer dieselbe, jedoch können einzelne Komponenten wie die Primer in ihrer Menge variieren. Zunächst wird je nach Anzahl der Proben ein Mastermix aus $\text{nf-H}_2\text{O}$, TB Buffer (10x), BSA (10 mg / ml), dNTPs (10mM), dem Primerpaar (10 μM) und der Taq-Polymerase (5 U/ μl) hergestellt. Das Pipettieren dieses Mastermix findet auf Eis statt und die Polymerase wird als letztes dazugeben. Der Mastermix wird anschließend gevortext um die Komponenten gut zu durchmischen. Je nach gewünschtem PCR Volumen werden entweder 9,5 μl (bei einem 10 μl Ansatz) oder 28,5 μl (bei einem 30 μl Ansatz) des Mastermixes in vorbereitete und beschriftete PCR-Tubes vorgelegt. Als letzter Schritt wird die zu amplifizierende DNA (0,5 μl (bei einem 10 μl Ansatz) bzw. 1,5 μl (bei einem 30 μl Ansatz) mit einer Konzentration von 50 ng / μl) hinzugefügt.

Komponente	Menge (für eine Reaktion)				Endkonzentration
	RAPD	SRAP	TBP	5S	
Nuclease-free H ₂ O	5,95 μl	5,2 μl	4,7 μl	6,7 μl	
TB Buffer	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1x
BSA	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1mg / ml
dNTPs	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl	0,2 μl	200 μM
Forward Primer	1,25 μl	1 μl	1,25 μl	0,25 μl	variiert
Reverse Primer	-	1 μl	1,25 μl	0,25 μl	
Taq Polymerase	0,1 μl	0,1 μl	0,1 μl	0,1 μl	0,05 U / μl
DNA-Template	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	2,5 ng / μl
Gesamt	10 μl				

Tab. 12: Verschiedene Pipettierschemata für die eingesetzten Fingerprint-Methoden. Der RAPD Ansatz stellt eine Ausnahme dar, denn für diesen wird kein Primerpaar (fw und rv) benötigt, sondern es kommt nur ein Primer in die Reaktion, der aufgrund seiner kurzen Länge als forward und reverse Primer fungiert.

Da die unterschiedlichen eingesetzten Primer andere Längen und eine andere Zusammensetzung besitzen, müssen auch die Abläufe der verwendeten PCR-Programme an die Optimaltemperatur des Primer einerseits und die verfolgte Strategie (z.B. bei der zunächst gezielten Mismatch-Bildung des SRAP-Ansatz) bei der Amplifikation andererseits angepasst werden. Daraus ergeben sich verschiedene PCR-Programme für die unterschiedlichen Methoden, welche in den folgenden

Tabellen gezeigt sind. Der für die Amplifikation verwendete Thermocycler war der T100™ Thermal Cycler der Firma Biorad.

Schritt		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		94°C	3:00 min
Denaturierung	x45	94°C	1:00 min
Annealing		35°C	1:00 min
Elongation		68°C	2:00 min
Finale Elongation		68°C	5:00 min
Lagerung		12°C	

Tab. 13: PCR Protokoll für die RAPD-PCR

Schritt		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		94°C	3:00 min
Denaturierung	x5	94°C	1:00 min
Annealing		35°C	1:00 min
Elongation		68°C	1:00 min
Denaturierung	x35	94°C	1:00 min
Annealing		50°C	1:00 min
Elongation		68°C	1:00 min
Finale Elongation		68°C	3:00 min
Lagerung		12°C	

Tab. 14: PCR Protokoll für die SRAP-PCR

Schritt		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		94°C	3:00 min
Denaturierung	x14	94°C	0:30 min
Annealing		65°C (-0,7°C / Zyklus)	0:45 min
Elongation		68°C	2:00 min
Denaturierung	x21	94°C	0:30 min
Annealing		55°C	0:45 min
Elongation		68°C	2:00 min
Finale Elongation		68°C	8:00 min
Lagerung		12°C	

Tab. 15: PCR Protokoll für die TBP-PCR.

Schritt		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		94°C	3:00 min
Denaturierung	x32	94°C	1:00 min
Annealing		53°C	1:00 min
Elongation		68°C	1:30 min
Finale Elongation		68°C	10:00 min
Lagerung		12°C	

Tab. 16: PCR Protokoll für die 5S-Spacerregion-PCR

Die PCR-Reaktionen zum Amplifizieren von DNA-Fragmenten, die zum Sequenzieren geschickt werden sollten, hatten ein größeres Volumen, damit für die anschließende Aufreinigung genug Material vorhanden ist. Daher betrug das Endvolumen dieser Ansätze 30 µl.

Komponente	Menge			Endkonzentration
	Cos16	ycf1b	psbA-trnH	
Nuclease-free H ₂ O	20,4 µl	20,1 µl	20,4 µl	
TB Buffer	3 µl	3 µl	3 µl	1x
BSA	3 µl	3 µl	3 µl	1mg / ml
dNTPs	0,6 µl	0,6 µl	0,6 µl	200 µM
Forward Primer	0,6 µl	0,75 µl	0,6 µl	0,2 µM
Reverse Primer	0,6 µl	0,75 µl	0,6 µl	0,2 µM
Taq Polymerase	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,05 U / µl
DNA-Template	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	2,5 ng / µl
Gesamt	30 µl			

Tab. 17: Verschiedene Pipettierschemata für die Amplifizierung der Markerregionen.

Schritt	Temperatur			Dauer			
	CosII	ycf1b	psbA-trnH	CosII	ycf1b	psbA-trnH	
Initiale Denaturierung	94°C			3:00 min	4:00 min	2:00 min	
Denaturierung	x35	94°C		0:30 min	0:30 min	1:00 min	
Annealing		55°C	52°C	56°C	0:30 min	0:40 min	0:30 min
Elongation		68°C			1:00 min	1:00 min	0:45 min
Finale Elongation	68°C			7:00 min	10:00 min	5:00 min	
Lagerung	12°C						

Tab. 18: PCR Protokolle für die unterschiedlichen Markerregionen.

4.6. Gelelektrophorese

Nach Amplifizierung der DNA werden die entstandenen Fragmente zur Bestimmung von Qualität und Größe mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dafür wurde entsprechend der gewünschten Prozentzahl des Gels Agarose mit der Feinwaage abgewogen und in 0,5x TAE-Puffer aufgekocht. Im Laufe dieser Arbeit wurden wahlweise 1,5%ige oder 2%ige Gele angesetzt, was im Ergebnisteil in den Abbildungsverzeichnissen angegeben ist. Nach dem Aufkochen wurde SYBRsafe im Verhältnis 1 zu 20000 zur Menge an 0,5x TAE-Puffer dazu pipettiert (z.B. 2 µl SYBRsafe zu 40ml 0,5x TAE-Puffer). Durch Interkalation mit der DNA macht SYBRsafe diese später im Gel sichtbar.

Nach Aushärten der Gele können diese mit den PCR Produkten beladen werden. Davor muss das Produkt mit 5x Ladepuffer, welcher Glycerin zum Beschweren der Probe enthält, im Verhältnis 1 zu 5 vermischt werden. Abhängig von der gewählten Methode werden unterschiedliche Mengen (bei Fingerprintansätzen 5µl und bei den Markeransätzen 2µl) auf das Gel aufgetragen. Damit die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente bestimmt werden kann, wird zusätzlich eine DNA Leiter mit definierten Fragmentgrößen mit auf das Gel geladen.

Die DNA-Fragmente werden durch Anlegen einer Spannung von 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Abhängig von Gel und aufzutrennenden Proben variiert die Auftrennzeit von 30 – 45 Minuten. Auch dies ist den Abbildungsbeschreibungen der Ergebnisse beschrieben. Das Gel wird anschließend unter UV-Licht betrachtet und mittels einer Kamera dokumentiert. Die Belichtungszeit bei allen in dieser Arbeit gezeigten Gelbilder liegt bei 2,0 Sekunden.

4.7. DNA Aufreinigung für Sequenzierung

Bevor PCR-Produkte zum Sequenzieren geschickt werden, muss die DNA aufgereinigt werden. Hierfür kommt ein Kit zum Einsatz, welches alle in den PCR-Produkten noch störenden Bestandteile herauswäscht. Die aufgereinigte DNA wird in 30 µl nf-H₂O eluiert und steht nach der spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung zur Sequenzierung bereit.

Abhängig davon zu welcher Firma die Proben zum Sequenzieren geschickt werden, Bedarf es einer unterschiedlichen Vorbereitung. Für eine Sequenzierung durch die Firma GATC müssen 20 µl der aufgereinigten DNA auf eine Konzentration von 10 – 50 ng / µl gebracht werden, was bedeutet, dass abhängig von der spektrophotometrischen bestimmten Konzentration eventuell noch eine

Verdünnung angefertigt werden muss. Außerdem müssen in einem separaten Eppendorfgefäß 20 µl des verwendeten forward oder reverse Primer (Konzentration 10µM) mitgeschickt werden.

Eine Sequenzierung durch die Firma macrogen erfordert eine leicht abgeänderte Präparation der aufgereinigten DNA. Macrogen verlangt 10 µl eines Gemisches aus 5 µl aufgereinigter DNA mit der Konzentration von 50 ng / µl und 5 µl des forward oder reverse Primers (Konzentration 5µM). Erneut muss ausgehend von der gemessenen Konzentration eine entsprechende Verdünnung hergestellt werden.

4.8. Auswertung von Sequenzen

Für die Auswertung der Sequenzen können verschiedene Programme herangezogen werden.

Mithilfe des Programms FinchTV kann man sich das Chromatogramm der Sequenzierung anzeigen lassen und anhand dessen die Qualität der sequenzierten Proben überprüfen, indem zum Beispiel auf die Höhe der gemessenen Peaks der einzelnen Basen und das eventuelle Auftreten von Hintergrundrauschen geachtet wird.

Für die weiteren Schritte wurde das Programm MEGA6 herangezogen, mit dem als *.fas-Dateien gespeicherte Sequenzen geöffnet und bearbeitet werden.

Die aus den amplifizierten Markerregionen resultierenden Sequenzen wurden mit diesem Programm über die „Alignment by Muscle“ Funktion align. Dadurch können Unterschiede zwischen den Sequenzen der verschiedenen Akzessionen sichtbar gemacht werden. Über die Funktion „Phylogenetic Analysis“ wird das erstellte Sequenzalignment zur Bildung von Stammbäumen exportiert. Im Hauptmenü von MEGA6 wurden über die „Phylogeny“ Funktion UPGMA Stammbäume mit einem Bootstrap value von 1000 erstellt.

Über den ebenfalls in MEGA6 integrierten Tree Explorer werden die Bäume dargestellt und können noch bearbeitet werden. Als Außengruppe der Stammbäume wurde für die Markerregionen psbA-trnH, Cos16 und ITS2 die Art *Nolana werdermannii* gewählt, da die Gattung *Nolana* ein Schwestertaxa des Stammes Lycieae darstellt [17].

4.9. Darstellung von Stammbäumen

Für eine erweiterte Darstellung von Bäumen wurden die Programme Archäopteryx und GraPhlAn verwendet. Der mit MEGA6 erstellte Stammbaum muss im *.nwk-Format gespeichert werden,

damit er im Programm Archäopteryx geöffnet werden kann.

Innerhalb dieses Programms wurden Knotenpunkte, an denen sich zum Beispiel zwei Arten oder geographische Regionen trennen, im Stammbaum markiert.

Dieser markierte Stammbaum wird als *xml-Format exportiert, was eine erweiterte graphische Darstellung mit dem Python-basierten Programm GraPhIAn ermöglicht. GraPhIAn ist gut dafür geeignet Stammbäume mit einer großen Anzahl von Arten zu strukturieren.

Die topologischen Stammbäume der Markersequenzen von psbA-trnH und Cos16 wurden über GraPhIAn dargestellt.

4.10. Design von SCAR- und ARMS-Primern

Der Ablauf eines **ARMS-Primerdesigns** gliedert sich grob in folgende Schritte.

Zunächst werden die voneinander zu unterscheidenden Sequenzen mit MEGA6 aligned. Die Sequenzen werden auf Unterschiede in der Basenabfolge untersucht. Werden Sequenzunterschiede zwischen *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* gefunden, können anhand dieser diagnostischen Stellen mit einem weiteren Programm, Primer3Plus, diagnostische Primer erstellt werden. Für dieselbe diagnostische Stelle können verschiedene Primer, die sich beispielsweise in der Nukleotidlänge oder der Ausrichtung (forward oder reverse) unterscheiden, designed werden. Primer3Plus gibt über einen Penalty-Wert die Brauchbarkeit des Primerpaares in einer PCR an, wobei der niedrigste Wert den größten Erfolg verspricht.

Der in dieser Arbeit eingesetzte auf einer diagnostischen Stelle in der ITS2 Sequenz basierende ARMS-Primer wurde im Rahmen eines dieser Arbeit vorangegangenes Praktikums designt.

Auch für das **Design eines SCAR-Primers** sind Sequenzinformationen vonnöten. Der auf der Basis von RAPD-Ergebnissen basierende LB.SC700 Primerpaar wurde nicht selbst designt, sondern stammt aus einer Untersuchung aus dem Jahr 2007 [55].

Auf der Basis eines 5S-Spacerregion-Fingerprints wurde ein weiterer SCAR-Primer designt. Dafür wurde das im Agarose-Gel auftretende diagnostische ungefähr 400 Basenpaar große Fragment von *Lycium barbarum* isoliert und die darin vorhandene DNA aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde zu GATC zu Sequenzieren geschickt.

Anhand des erhaltenen Sequenzierungsergebnisses sollte ein SCAR-Primer designt werden. Jedoch

traten bei der Sequenzierung Probleme auf, sodass von dem ursprünglich 400 Basenpaar großen Fragment nur etwa 150 Basen sequenziert werden konnten. Dennoch wurde versucht für zumindest dieses Fragment ein Primerpaar zu designen. Mithilfe des Programms Primer3Plus konnten Primer für das Amplifizierte Fragment mit zufriedenstellende Penalty-Wert designet und für eine PCR eingesetzt werden.

4.11. Fragmentanalyse mittels des FSAnalyzers

Für die TBP basierte Fragmentanalyse wurden der Primer TBP_{prex1} mit dem Farbstoff FAM und der Primer TBP_{fin2} mit Yakima Yellow markiert. Nach der PCR und der Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese für die Fragmentanalyse vorbereitet. Die Akzessionen aus dem BGK sowie die Goji-Produkte 1 – 9 waren Teil dieser Fragmentanalyse.

Dafür wird zunächst ein Mastermix aus 16,6 µl Hi-Di Formamid und 0,4 µl Size Standard (pro Probe) hergestellt und auf die Wells der zum Sequenzieren wegzuschickenden 96er-Platte verteilt. Anschließend wurden noch 5µl aufgereinigtes PCR-Produkt zum Mastermix pipettiert, dabei muss die Aufreinigung zuvor so verdünnt werden, dass letztendlich eine Konzentration von 5-10 ng / µl erreicht wird.

Die auf diese Weise vorbereiteten Proben wurden zur Analyse an die Firma macrogen geschickt. Als Ergebnis erhält man *fsa-(fragment size analysis)Dateien, die mit dem FSAnalyzer ausgewertet werden können. Innerhalb des Programms wählt man über „Select Data“ zunächst den benutzten SizeStandard, dann ein Textdokument, welches die Namen der verwendeten Akzessionen mit IDs enthält, und schließlich die erhaltenen *fsa-Dateien aus.

Über die Einstellung „Minimum Threshold“ kann man bestimmen, ab welchem Fluoreszenzschwellenwert Hochpunkte als solche erkannt oder einem Hintergrundrauschen zugeordnet werden. Da zwei verschiedene Farbstoffe (FAM und YY) eingesetzt wurden, kann über die Funktion „Dye No. of Interest“ zwischen den Beiden unterschieden werden.

Wählt man die Einstellung „Analysis“ aus, werden für alle ausgewählten Dateien aus deren Hochpunkten Binärmatrizen erstellt, die für die Berechnung der Fragmentlänge über eine Interpolation mit den Hochpunkten des SizeStandards verwendet wird, was schließlich als geplottetes virtuelles Gel angezeigt wird. In einem weiteren Analyseschritt werden anhand der Binärmatrizen die Jaccard-Distanzen der Fragmentmuster aller ausgewählter Proben zueinander

berechnet. Die Jaccard-Distanz gibt die Ähnlichkeit von Mengen an, und je näher dieser Wert bei 1 liegt, desto größer ist die Ähnlichkeit der Mengen. Aus dieser Berechnung resultiert ein Stammbaum, der die Verwandtschaftsverhältnisse der ausgewählten Proben aufgrund der Unterschiede der Introns in den β -Tubulin-Genen aufzeigt.

5. Ergebnisse

5.1. Morphologie

Wie schon im Methodenteil angedeutet, teilt sich der Ergebnisteil der Morphologie in drei Gruppen. Der Bestimmung der Akzessionen im BGK anhand von Blüten wurde die meiste Gewichtung beigemessen und anschließend wurde versucht die Ergebnisse der Blatt- und Samenvermessung auf die Ergebnisse der Blütenbestimmung zu beziehen. Zum besseren Verständnis sind die Bestimmungsmerkmale für die verschiedenen Arten farblich markiert. Grün für die in der Flora of China auf *Lycium barbarum* bezogenen Erkennungskriterien einerseits und rot für *Lycium chinense* andererseits. Entsprechend sind auch die Ergebnisse farblich gekennzeichnet.

5.1.1. Artbestimmung über Blüten

<i>Lycium chinense</i>	<i>Lycium barbarum</i>
Behaarte Kronblätter	Kahle Kronblätter
Kronröhre kürzer oder gleichlang wie Kronblätter	Kronröhre länger als Kronblätter
3- bis 5-gelappter Kelch	2-gelappter Kelch

Tab. 19: Unterscheidungskriterien der beiden Arten *Lycium chinense* (rot) und *Lycium barbarum* (grün).

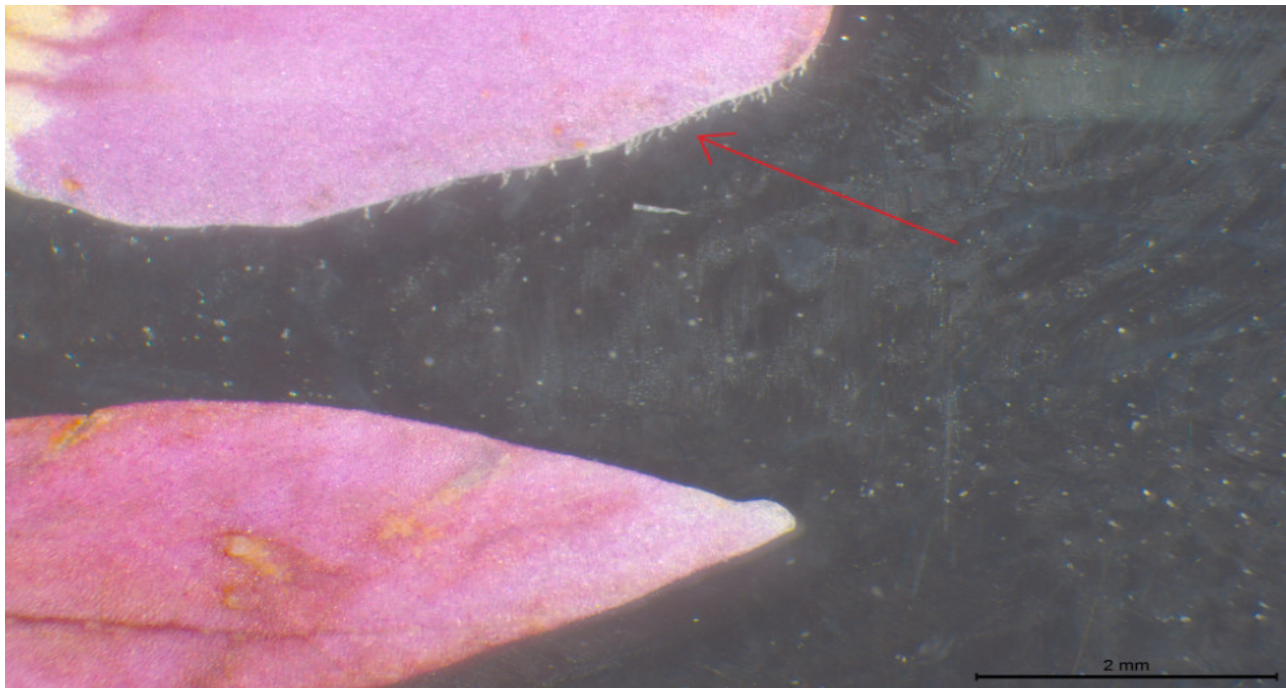


Abb. 11: Oben behaartes Kronblatt (Merkmal von *L. chinense*) der Akzession 5549, unten kahles Kronblatt (Merkmal von *L. barbarum*) der Akzession 1470.



Abb. 12: Beispiele für das Unterscheidungskriterium Kronröhrenlänge. Links die kürzere Kronröhre und den damit im Vergleich längeren Kronblättern (Merkmal von *L. chinense*) bei der Akzession 5551. Rechts die längere Kronröhre und den damit vergleichsweise kürzeren Kronblättern (Merkmal von *L. barbarum*) bei der Akzession 1470.



Abb. 13: Beispiele für die Unterscheidung über die unterschiedliche Beschaffenheit des Kelches. Auf der linken Seite ist ein 4-gelappter Kelch (Merkmal von *L. chinense*) der Akzession 5549 abgebildet. Das rechte Bild zeigt einen 2-gelappten Kelch (Merkmal von *L. barbarum*) der Akzession 5548. Die Kelche wurden mit einem Skalpell an einer Seite aufgeschnitten und in eine Ebene gebracht.

Übersichtstabelle der Artbestimmung über Blütenmerkmale.

ID	Blütenmerkmal		
	Kelchlappung	Behaarung Kronblätter	Kronröhre länger als Kronblätter?
1470	2-gelappt: 100%	Nicht vorhanden	Länger: 83,3%
			Gleichlang: 16,7%
5548	1-gelappt: 23,3%	Nicht vorhanden	Länger: 80%
	2-gelappt: 76,7%		Gleichlang: 20%
5549	2-gelappt: 10%	Vorhanden	Gleichlang: 6,7%
	3-gelappt: 50%		
	4-gelappt: 30%		Kürzer: 93,3%
	5-gelappt: 10%		
5550	2-gelappt: 23,3%	Vorhanden	Gleichlang: 36,7%
	3-gelappt: 76,7%		Kürzer: 63,3%
5551	2-gelappt: 6,7%	Vorhanden	Gleichlang: 3,3%
	3-gelappt: 56,7%		
	4-gelappt: 33,3%		Kürzer: 96,7%
	5-gelappt: 13,3%		
5552	3-gelappt: 53,3%	Vorhanden	Kürzer: 100%
	4-gelappt: 33,3%		
	5-gelappt: 13,3%		
5553	2-gelappt: 16,7%	Vorhanden	Länger: 3,3%
	3-gelappt: 70%		Gleichlang: 60,3%
	4-gelappt: 13,3%		Kürzer: 36,3%
6815	2-gelappt: 6,7%	Vorhanden	Gleichlang: 43,3%
	3-gelappt: 86,7%		Kürzer: 56,7%
	4-gelappt: 6,7%		
6967	2-gelappt: 10%	Vorhanden	Kürzer: 46,6 %
	3-gelappt: 90%		Gleichlang: 16,6%
			Kürzer: 36,6%

Tab. 20: Die Ergebnisse der Bestimmung von 30 Blüten pro Akzession sind in folgender Tabelle dargestellt. Die Akzessions-ID der Pflanzen aus dem BGK kann der ersten Spalte entnommen werden. In den folgenden Spalten sind die zuvor dargestellten entscheidenden Blütenmerkmale aufgeführt. Die Merkmale die für *L. barbarum* sprechen sind grün, die für *L. chinense* sprechen rot eingefärbt. Der prozentuale Anteil der beobachteten Merkmale an den Blüten der jeweiligen Akzession kann der Tabelle entnommen werden.

Die Tabelle zeigt, dass die beiden Akzessionen 1470 und 5548 mit ziemlicher Sicherheit der Art *L. barbarum* angehören, da sowohl die Kelchlappung und auch die Behaarung der Krone deutlich dafür sprechen. Laut Literatur ist ein 2-gelappter Kelch ein deutliches Zeichen für *L. barbarum* und dies war mit Ausnahme der acht von 30 Blüten bei 5548 immer der Fall. Die acht Blüten zeigten einen Kelch mit nur einem Lappen, welcher zwar eine Ausnahme darstellt, aber dennoch eher zu *L. barbarum* zählen sollte. Auch bei der Länge der Kronröhre zeigte bei etwa 80% der bestimmten Blüten eine deutlich längere Kronröhre, die restliche 20% waren nicht deutlich länger, sondern eher gleichlang. Mit der Kombination der drei Merkmale lässt sich sagen, dass diese beiden Akzession zu *L. barbarum* gehören.

Umgekehrt verhält es sich mit den restlichen anhand der über Blüten bestimmten Akzessionen. Auch hier führt eine Kombination der drei Merkmale zu dem Schluss, dass es sich um *L. chinense* handeln muss und auch hier gibt es einige Ausreißer. Als die Gravierendsten seien die Betrachtung der Kronröhrenlänge bei der Akzession 6967, oder die Lappung des Kelches bei der Akzession 5550 genannt. Als konstantestes Merkmal stellte sich die Behaarung der Kronblätter heraus, da es hier überhaupt keine Abweichung gab, denn diese war entweder deutlich vorhanden oder nicht vorhanden.

Auch die Art *Lycium chilense* (7067) konnte anhand der charakteristischen Blüten bestimmt werden. Die beiden *Lycium europaeum* Akzessionen 7064 und 8213 trugen keine Blüten für eine Bestimmung, aber aufgrund der sukkulenten Blätter, was ein Merkmal von *Lycium europaeum* darstellt, konnte darauf geschlossen werden, dass es sich tatsächlich um diese Art handelt.



Abb. 14: Blüte der Art *Lycium chilense*. Im Gegensatz zu den Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* ist die Farbe der Blüte weiß.

Da es im BGK bereits eine Benennung gab, wird in der folgenden Tabelle ein Vergleich zwischen dieser Benennung und dem Resultat der Blütenanalyse gezeigt.

ID	Benennung Botanischer Garten KIT	Ergebnis der Artbestimmung über Blüten
1470	<i>Lycium barbarum</i>	<i>Lycium barbarum</i>
5548	<i>Lycium barbarum</i>	<i>Lycium barbarum</i>
5549	<i>Lycium barbarum</i>	<i>Lycium chinense</i>
5550	<i>Lycium barbarum</i>	<i>Lycium chinense</i>
5551	<i>Lycium chinense</i>	<i>Lycium chinense</i>
5552	<i>Lycium chinense</i>	<i>Lycium chinense</i>
5553	<i>Lycium europaeum</i>	<i>Lycium chinense</i>
6815	<i>Lycium chinense</i> Mill. var. <i>chinense</i>	<i>Lycium chinense</i>
6967	<i>Lycium chinense</i> Mill. var. <i>chinense</i>	<i>Lycium chinense</i>
7064	<i>Lycium europaeum</i> *	<i>Lycium europaeum</i> *
7067	<i>Lycium chilense</i>	<i>Lycium chilense</i>
8213	<i>Lycium europaeum</i> *	<i>Lycium europaeum</i> *

Tab. 21: Vergleich der Benennung der *Lycium*-Akzessionen im BGK und dem Ergebnis der Bestimmung. Mit (*) markierte Akzessionen konnten nicht anhand der Blüten bestimmt werden, da die Pflanzen keine Blüten trugen. Die Aussage verlässt sich auf die vegetativen Merkmale.

Die Blütenbestimmung zeigt auf, dass im BGK möglicherweise eine fehlerhafte Kennzeichnung mancher *Lycium*-Arten vorlag. Erst die weitere Analyse wird die Artbestimmung über die Blüten stützen oder wieder entkräften.

5.1.2. Blätter

Die Blätter wurden mit dem Programm LAMINA vermessen und die Ergebnisse in Form von Boxplots dargestellt. In diesem Experiment sollten die unterschiedlichen Blattformen statistisch dargestellt und eine statistisch untermauerte Unterscheidung zwischen den als *L. barbarum* und *L. chinense* bestimmten Pflanzen getroffen werden.



Abb. 15: Auf der linken Seite ein Blatt von einer als *L. barbarum* bestimmten Akzession (5548) und rechts ein Blatt von einer als *L. chinense* bestimmten Akzession (6815).

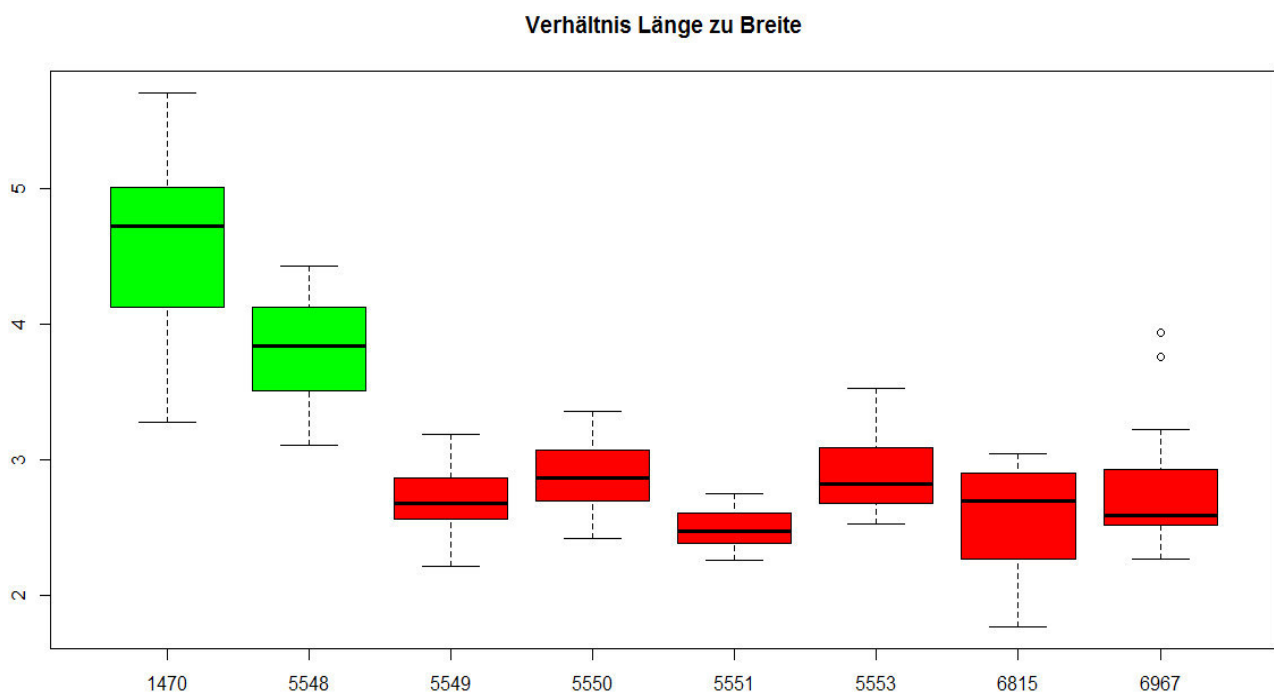


Abb. 16: Boxplots des Verhältnis von Länge zu Breite der Blätter verschiedener *Lycium*-Akzessionen aus dem BGK. Auf der X-Achse sind die IDs der Akzessionen aufgetragen, während die Y-Achse den Quotient aus Länge und Breite der vermessenen Blätter angibt.

Die bei der Analyse der Blüten als *Lycium barbarum* bestimmte Akzessionen sind grün eingefärbt, die *Lycium chinense* Akzessionen in rot. Die beiden *L. barbarum* Akzessionen sind im Gegensatz zu den *L. chinense* Akzessionen im Verhältnis länger als breit. Die Akzessionen von *L. chinense* zeigen durchgängig Boxplots auf ähnlicher Höhe mit einem Median des Länge/Breite Quotient von etwa 2,75. Die Akzession 5548 hat mit einem Median-Wert von 3,8 einen deutlich anderes Verhältnis und bei 1470 ist der Quotient noch etwas höher und der Median liegt bei etwa 4,6.

5.1.3. Samen

Neben den Pflanzen im BGK die Früchte tragen und damit Samen zum Auswerten besitzen, wurden auch noch sieben verschiedene Produkte in die Samenanalyse miteinbezogen. Damit kann ein Vergleich und eine Stütze der Blütenbestimmung einerseits und ein erster Versuch den Produkten Arten zuzuordnen andererseits stattfinden.

Mithilfe des Programms SmartGrain wurden jeweils 30 Samen vermessen, anschließend mit R Studio ausgewertet und die Ergebnisse in Form von Boxplots dargestellt.

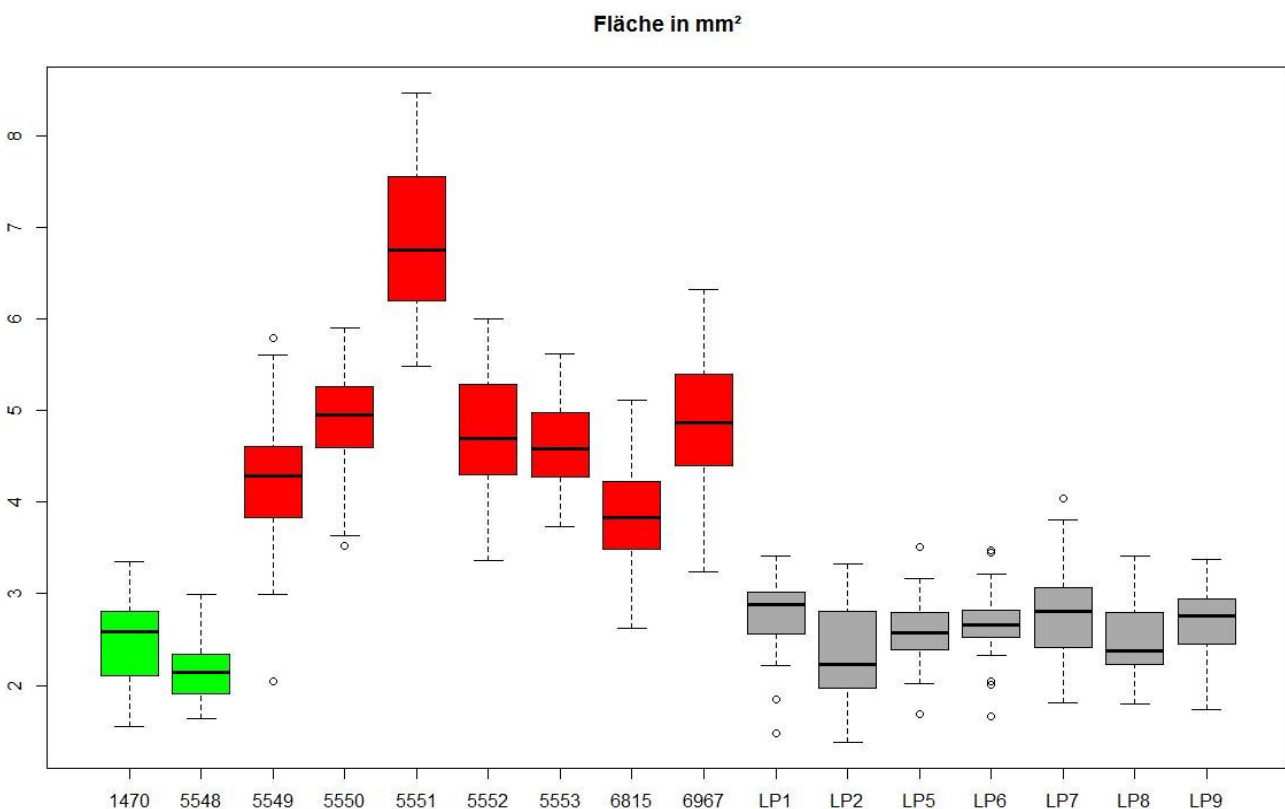


Abb. 17: Boxplots der Fläche von Samen verschiedener *Lycium*-Akzessionen aus dem BGK, sowie einem Teil der erworbenen Goji-Produkte. Auf der X-Achse sind die IDs der Akzessionen und der Produktbezeichnungen aufgetragen, während die Y-Achse die Fläche in mm² der vermessenen Samen angibt.

Die Farben des Ergebnisses der Blütenanalyse wurde auch für die Darstellung dieser Ergebnisse gewählt. Die noch unbekanntes Goji-Produkte sind in hellgrau eingefärbt. Es ist sofort ersichtlich, dass die *Lycium barbarum* Samen (1470 und 5548) und die *Lycium chinense* Samen (5549- 6967) sich in der Größe unterscheiden. Die Fläche der *L. chinense* Samen ist beinahe doppelt so groß wie die der *L. barbarum* Samen. Die Akzession 5551 sticht hierbei noch mal deutlich hervor, die ihrerseits wieder beinahe 2 mm² größer ist, als die restlichen *L. chinense* Akzessionen. Die Produkte hingegen sind wieder deutlich kleiner und haben eine ähnliche Fläche wie die beiden *L. barbarum* Akzessionen.

5.1.4. Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse der Morphologischen Analysen

- Eine Unterscheidung der beiden Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* anhand von Blütenmerkmalen (Kelchlappung, Kronröhrenlänge und Kronblattbehaarung) ist bei der Betrachtung einer angemessenen Menge von Blüten möglich.
- Das konstanteste (nur mikroskopisch erkennbare) Merkmal ist hierbei die Behaarung am Rand der Kronblätter.
- Die erhobenen Statistiken der Blatt- und Samenanalyse stützen die über die Blütenbestimmung getroffenen Aussagen, wobei besonders die Unterschiede in der Samengröße signifikant sind.
- Die aus Früchten von verschiedenen Goji-Produkten stammenden analysierten Samen sprechen aufgrund ähnlicher Samenfläche deutlich für die Art *Lycium barbarum*.

5.2. Ergebnisse der DNA-basierten Methoden

Um die große Menge an Akzessionen angemessen darstellen zu können, wurde neben der Tabelle mit den Akzessions-IDs im Materialteil Kapitel 3.1. eine weitere Orientierung in Form von farblichen Markierungen, die sich durch den kompletten Ergebnisteil zieht, angelegt.

Da, wie im Morphologie Ergebnisteil gezeigt, im BGK einige falsch bezeichnete Akzessionen vorlagen, beziehen sich die nun folgenden farblichen Markierungen auf die Ergebnisse der morphologischen Bestimmungen (siehe Kapitel 5.1.1, Tab. 21). Daher werden die im BGK als *Lycium barbarum* gekennzeichneten Akzessionen 5549 und 5550, sowie die als *Lycium europaeum* benannte Akzession 5553, aufgrund der morphologischen Bestimmung nun als *Lycium chinense* markiert. Die restlichen Akzessionen, die nicht morphologisch bestimmt werden konnten, werden entsprechend der vorhandenen Bezeichnung markiert.

Es bleibt zu bemerken, dass nicht alle 38 Akzessionen vom Anfang der Arbeit zur Verfügung standen und erst nach und nach in die Untersuchung eingegliedert wurden. Daher sind besonders Versuche, die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführt wurden in ihrem Probensatz nicht komplett vollständig.

Gruppe	Farbliche Darstellung
Akzessionen der Art <i>Lycium barbarum</i>	
Akzessionen der Art <i>Lycium chinense</i>	
Akzessionen der Art <i>Lycium europaeum</i>	
Akzessionen die anderen <i>Lycium</i> -Arten angehören	
Akzessionen der Goji-Produkte	

Tab. 22: Orientierungshilfe für die Ergebnisse

Bei frühen Fingerprintanalysen (im Ergebnisteil nicht dargestellt) der neun Goji-Produkte LP1 – LP9 zeigte sich, dass diese immer die gleichen Muster im Agarosegel bildeten. Daher sind in den nun folgenden Gelen nur beispielhaft das Goji-Produkt 2 und / oder das Goji-Produkt 5 aufgetragen, um mehr Akzessionen auf einmal vergleichen zu können.

5.2.1. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Durch die Verwendung von Randomprimer sollen für verschiedene Arten spezifische Muster im Agarosegel entstehen.

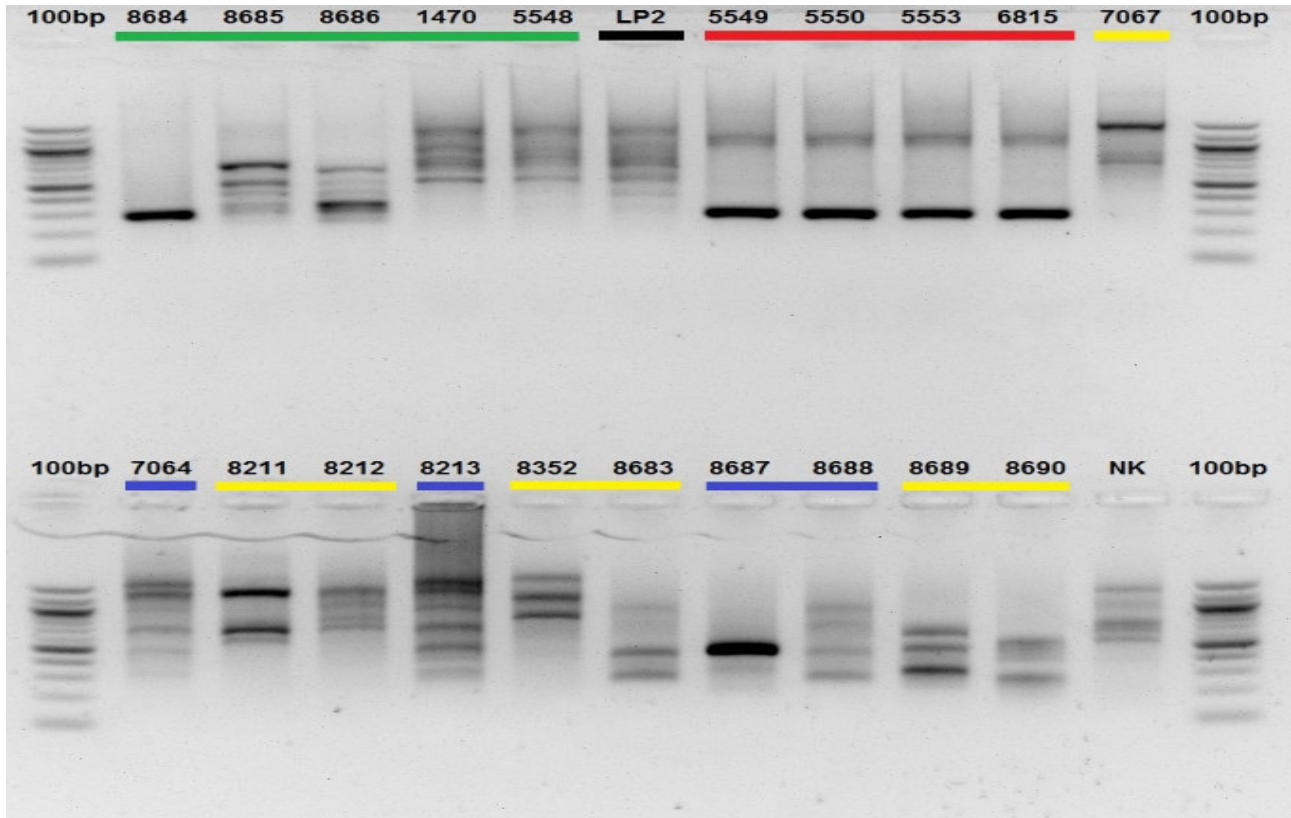


Abb. 18: Gelelektrophoresebild eines random amplified polymorphic DNA (RAPD) Fingerprints. 5 µl der PCR-Produkte wurden auf das 1,5%ige Agarosegel aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug 30 Minuten bei 100 Volt. Der für die PCR eingesetzte Primer trägt den Namen OPC-2 und dessen Sequenz kann der Tab. 9 im Materialteil entnommen werden. Verwendet wurden *L. barbarum* Akzessionen aus dem BGK (1470 und 5548) sowie aus Freiburg erhaltene *L. barbarum* Proben (8684, 8685 und 8686), jeweils durch einen grünen Balken markiert. Die restlichen Proben sind Akzessionen der Art *L. chinense* (rot) (5549, 5550, 5553 und 6815) aus dem BGK, außerdem *L. europaeum* (blau) ebenfalls aus dem BGK (7064, 8213) und aus dem Herbarium Freiburg (8687, 8688). Zu guter Letzt Akzessionen, die den sogenannten Außengruppen (*L. chilense* (7067), *L. ameghinoi* (8211), *L. gilliesianum* (8212), *L. oxycarpum* (8352), *L. shawii* (8683) und *L. intricatum* (8689 und 8690)) angehören, welche alle gelb markiert sind. Das einzige Goji-Produkt (LP 2) wird durch einen schwarzen Streifen hervorgehoben.

Es ist ersichtlich, dass die *L. barbarum* Arten kein einheitliches Fingerprint Muster zeigen. Die beiden Akzessionen aus dem BGK zeigen identische Muster, wohingegen bei den drei Akzessionen aus Freiburg jeweils unterschiedliche Muster zu sehen sind. Das Goji-Produkt zeigt ein ähnliches Muster wie die beiden *L. barbarum* Akzessionen aus dem BGK. Die vier *L. chinense* Akzessionen zeigen ein einheitliches Fingerprintmuster mit einer sehr deutlichen Bande bei etwa 300 Basenpaaren und einer etwas schwächeren Bande über 1000 Basenpaaren. Die „gelben“ Außengruppen zeigen alle jeweils einen anderen Fingerprint, was sowohl Fragmentgröße, als auch die Intensität der amplifizierten Produkte betrifft. Die beiden *L. europaeum* Akzessionen aus dem BGK (7064 und 8213) zeigen ein annähernd ähnliches Fingerprintmuster, sieht man mal davon ab, dass die Amplifikation bei 8213 stärker gewesen zu sein scheint. Die beiden *L. europaeum* Arten aus dem Herbarium Freiburg zeigen dagegen wieder unterschiedliche Muster, sowohl im Vergleich zu den Karlsruher Arten, als auch zueinander. Die Negativkontrolle sollte hier nicht unerwähnt bleiben, denn es sind deutliche Banden zu sehen.

5.2.2. RAPD-basierter SCAR-Ansatz

Ein weiterer Ansatz zur Unterscheidung von *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* ist die SCAR (Sequence characterised amplified region)-Methode. Die dafür benötigte Fingerprintsequenz stammt aus der Amplifikation mit dem OPC-7-Primer [23] und die SCAR-Primer wurden von Cho-Wing Sze, S. *et al.* designt [55]. Da dieses Primerpaar bei dieser Gruppe erfolgreich zu einer Differenzierung der beiden Arten führte, wurden diese Primer auch auf die Proben aus dem BGK angewandt.

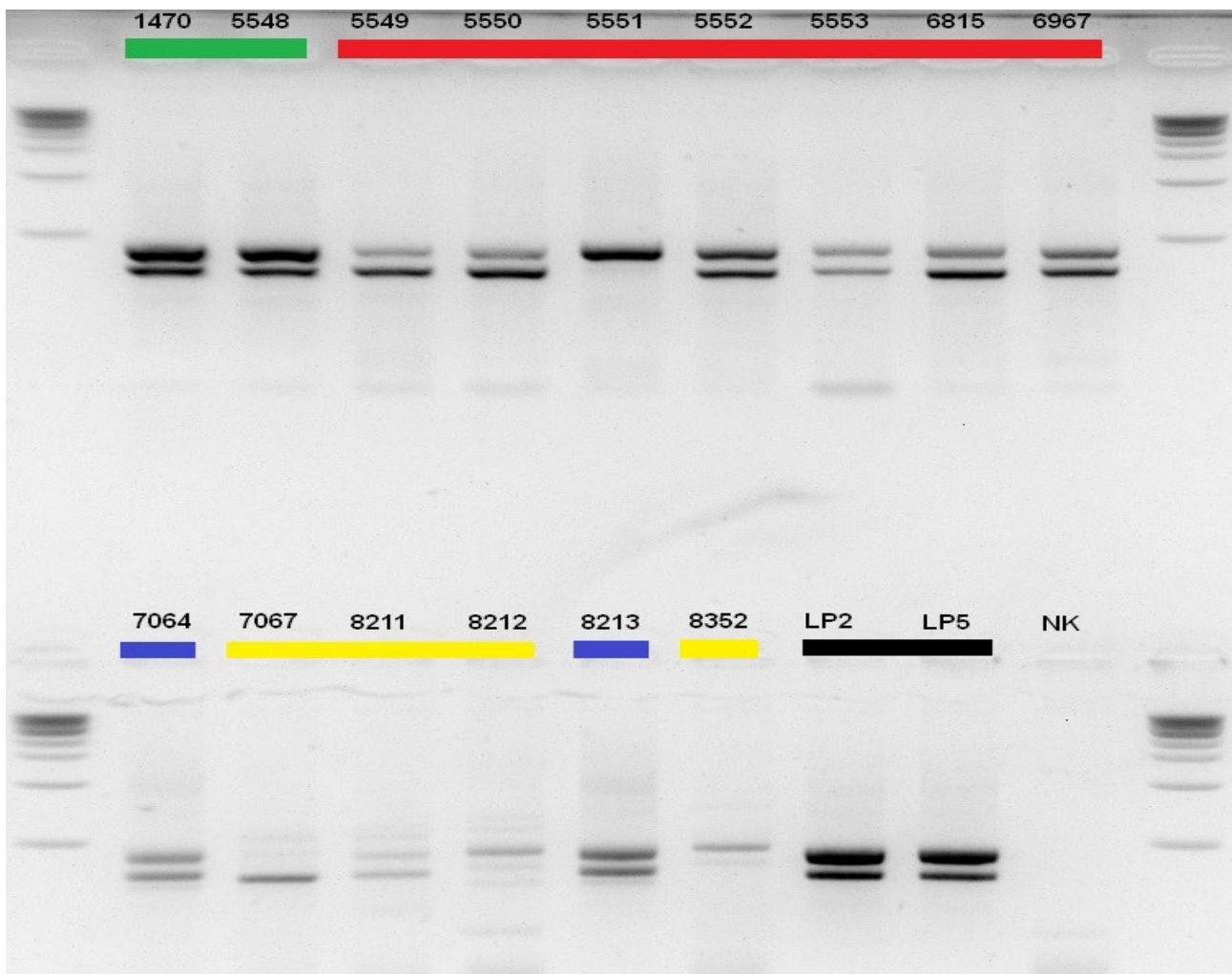


Abb. 19: Gelelektrophoresebild der SCAR-PCR mit dem Primer LB700. 5 µl der PCR-Produkte wurden auf das 2%ige Agarosegel aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug 40 Minuten bei 100 Volt.

Die verschiedene Arten sind wie bisher farblich markiert. Es ist zu erkennen, dass bei allen Akzessionen mit Ausnahme von 5551, 7067, 8212 und 8352 deutlich zwei Fragmente amplifiziert wurden. Das eigentliche Ziel der Amplifikation von nur einer Bande bei *Lycium barbarum* hat also offensichtlich nicht funktioniert. Die Amplifikation bei den beiden *L. barbarum* Akzessionen sowie den beiden Beispielpunkten ist stärker gewesen, als bei den restlichen Akzessionen, was sich durch intensivere Banden zeigt. Es sollte noch erwähnt werden, dass irrtümlich die 1kb Leiter anstatt der üblichen 100bp Leiter pipettiert wurde.

5.2.3. Sequence related amplified region (SRAP)

Auch mit der SRAP-Methode sollten spezifische Fingerprints für die verschiedenen Arten und identische Fingerprints für gleiche Arten angefertigt werden.

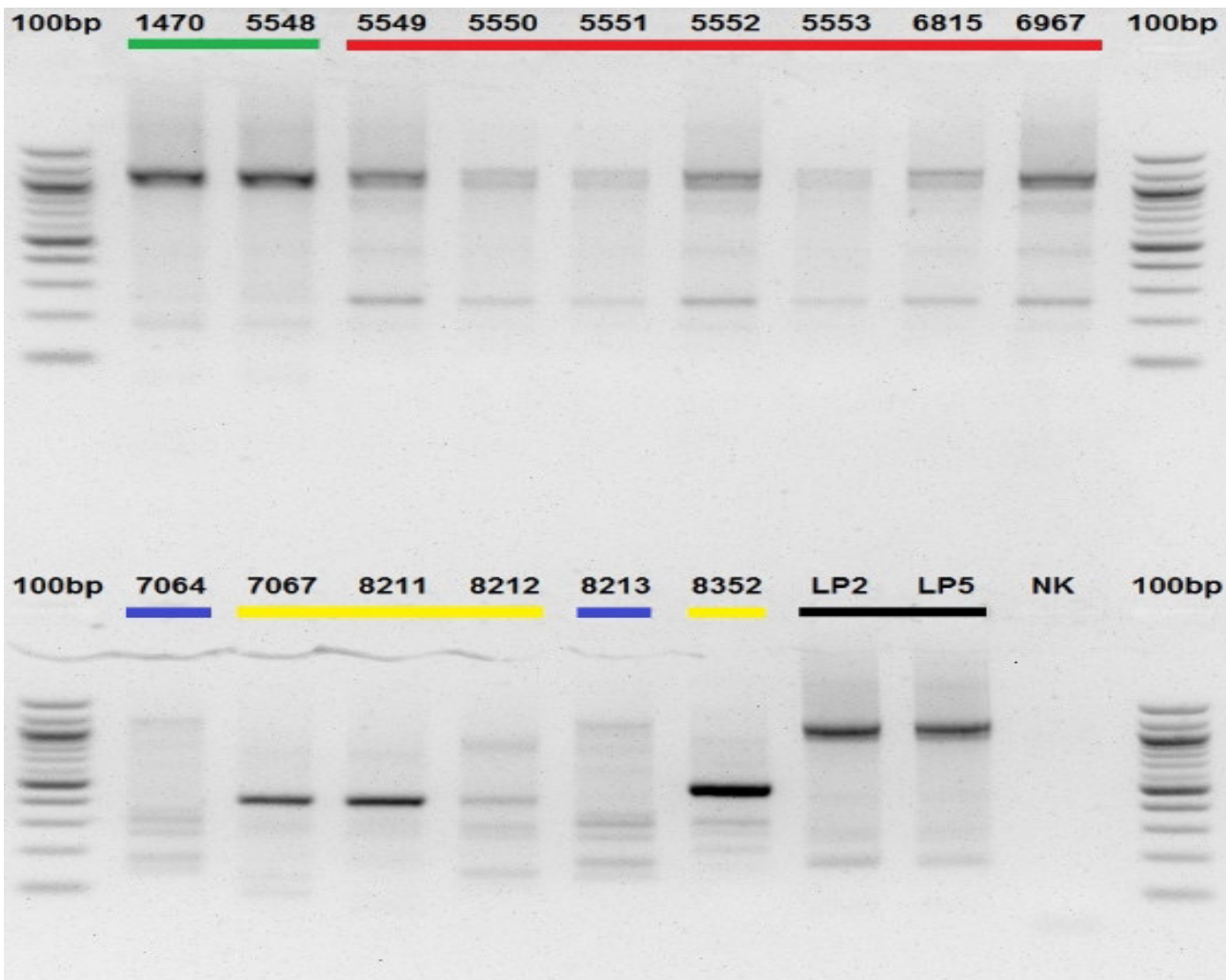


Abb. 20: Gelelektrophoresebild einer SRAP-Analyse der vorhandenen Akzessionen aus Karlsruhe und einem kleinen Teil der *Lycium*-Produkte. Verwendet wurde die SRAP-Primer Kombination HP1/LP2. 5 µl der PCR-Produkte wurden auf das 1,5%ige Agarosegel aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug 30 Minuten bei 100 Volt. Die beiden *L. barbarum* Akzessionen (1470 und 5548) als auch die *L. chinense* Akzessionen zeigen ein in sich homogenes Fingerprintmuster. Beide Arten zeigen eine intensivere Bande bei etwa 1100 Basenpaaren, die sich jedoch besonders bei den *L. chinense* Akzessionen als zwei Banden zu entpuppen scheinen. Zusätzlich zeigt sich bei *L. chinense* eine weitere deutliche Bande bei etwa 250 Basenpaaren, welche bei *L. barbarum* nicht zu sehen ist.

Innerhalb der gleichen Art treten bei *L. chinense* jedoch auch Unterschiede in der Intensität der Banden auf.

Die beiden *L. europaeum* Akzessionen (7064 und 8213) zeigen einen ähnlichen wenngleich schwachen Fingerprint, wobei hauptsächlich kleinere Fragmente amplifiziert wurden. Die vier Außengruppen weisen verschiedene Fingerprints auf, wobei bei den Arten *Lycium chilense* (7067) und *Lycium ameghinoi* (8211) eine intensive Banden mit einer ungefähren Fragmentgröße von 400 Basenpaaren zu sehen ist.

Die beiden Goji-Produkte LP2 und LP5 weisen mit ihren Banden bei etwa 1100 Basenpaaren und Fragmenten leicht unter 200 Basenpaaren eine frappierende Ähnlichkeit zu den beiden *L. barbarum* Akzessionen auf.

5.2.4. Tubulin based polymorphism (TBP) Intron I

Die hier eingesetzten Primer wurden mit dem Farbstoff FAM markiert und sollten das Intron I des in zahlreichen Kopien vorliegenden β -Tubulin-Gens amplifizieren. Aus dem virtuellen Gelbild sollten Verwandtschaftsverhältnisse eruiert werden. Die Signale vom Goji-Produkt 9 waren zu schwach, sodass dieses aus der Auswertung entfernt wurde.

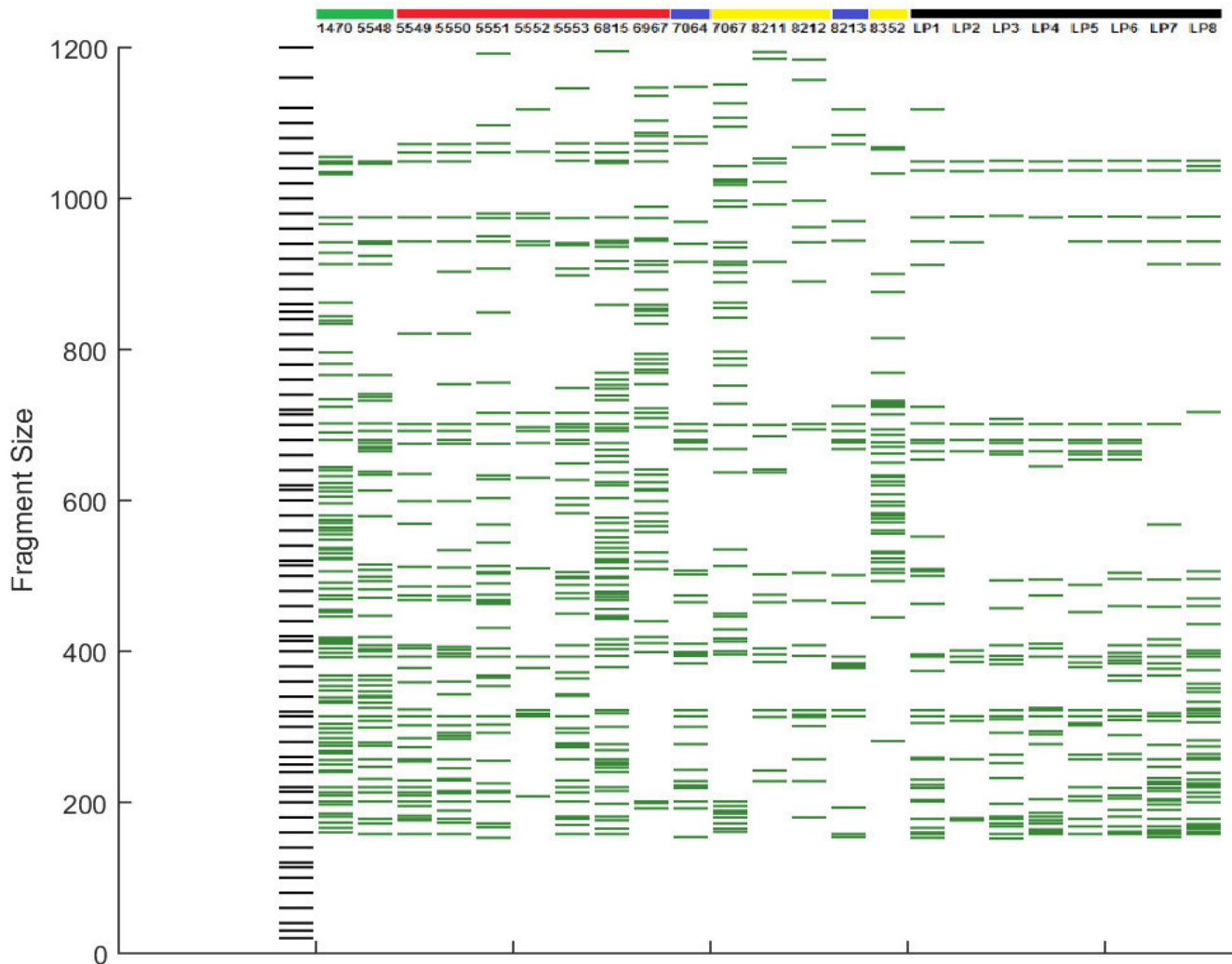


Abb. 21: Das virtuelle Gelbild der amplifizierten Banden vom Intron I der β -Tubulin-Genfamilie.

Auf der Y-Achse ist die Zuordnung der Fragmentgrößen aufgetragen. Die erste Bahn auf der X-Achse stellt den Größenmarker dar. Danach folgen die eingesetzten Akzessionen. Erneut sind zusammengehörende Arten / Gruppen farblich markiert.

Mit dem Einsatz gelabelter Primer und virtueller Auswertung sind bei jeder Akzession eine große Menge von verschiedenen Fragmente zu sehen, mit einem Spitzenwert von 87 Banden bei der Akzession 1470. Dieser Wert stellt jedoch eine Ausnahme dar, denn die durchschnittliche Anzahl von Banden beträgt etwa 38.

Durch die große Menge an Informationen kommen andere Auswertungsmöglichkeiten zustande, welche im folgenden Ergebnisteil und auch in der Diskussion noch ausgeführt werden.

5.2.4.1. Stammbaum TBP Intron I

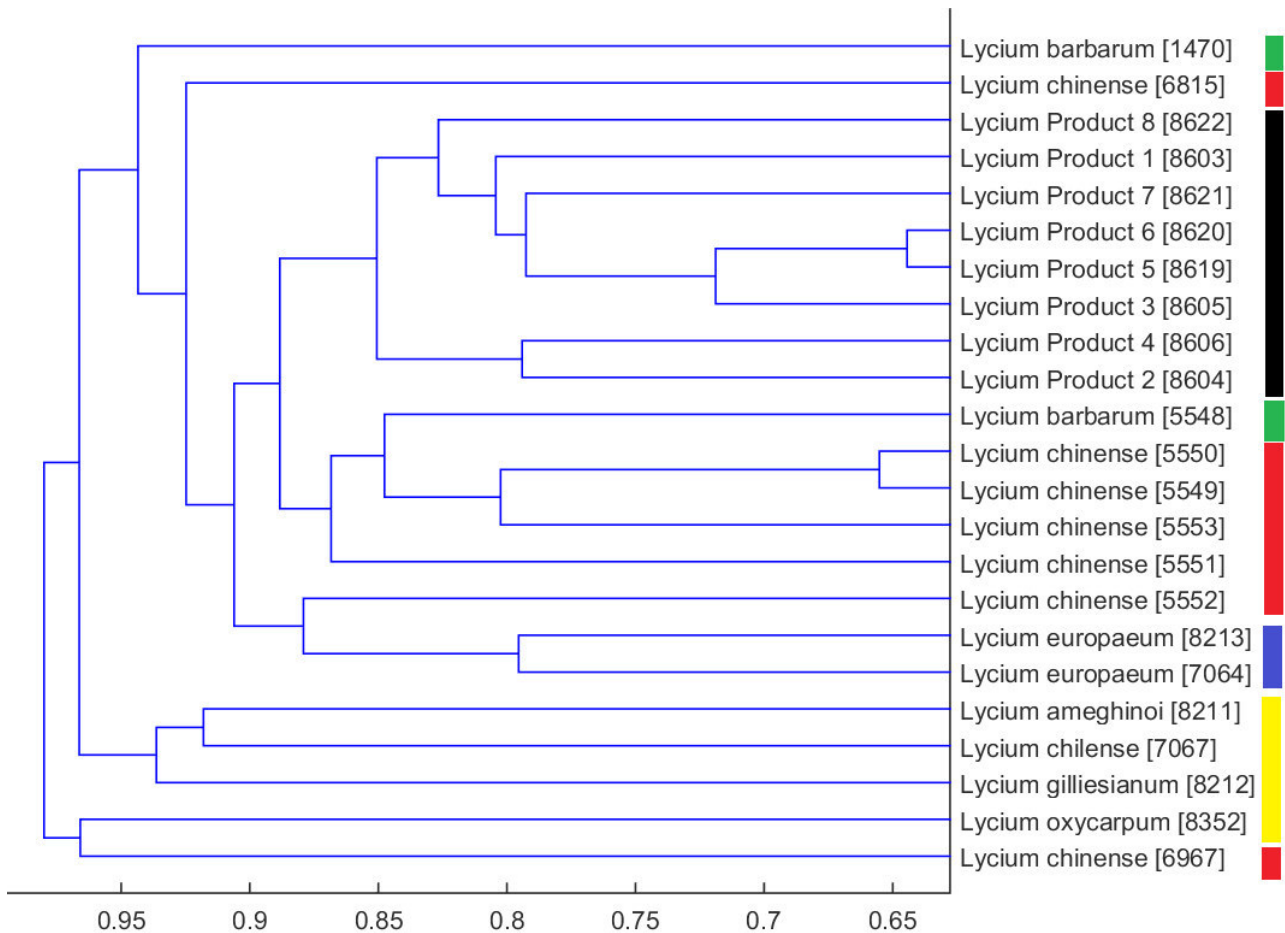


Abb. 22: Dendrogramm der phylogenetischen Analyse verschiedener *Lycium*-Arten basierend auf der Fragmentanalyse des Intron I der β -Tubulin-Genfamilie. Anhand der zuvor erhobenen Binärmatrizen wurden die Jaccard-Distanzen der Fragmentmuster aller ausgewählter Proben zueinander berechnet. Auf der X-Achse ist der Jaccard-Index verzeichnet.

Die beiden Arten *Lycium chinense* (Akzession 6967) und *Lycium oxycarpum* (8352) landen als Außengruppe zusammen in einem Cluster. Des Weiteren ist eine Trennung zwischen den *Lycium*-Arten aus Südamerika (*Lycium ameghinoi*, *Lycium chilense* und *Lycium gilliesianum*) und den Eurasischen Arten sowie den Produkten (*Lycium barbarum*, *Lycium chinense*, *Lycium europaeum* und Goji-Produkt 1-8) zu sehen. Die beiden Akzessionen der Art *Lycium europaeum* sind gemeinsam in einem Cluster zu finden. Auch die acht Produkte bilden eine monophyletische Gruppe. Bei den Akzessionen der Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* gibt es keine einheitlichen Cluster, so zeigt zum Beispiel die *Lycium chinense* Akzession 5552 eine nähere Verwandtschaft zu den *Lycium europaeum* Akzessionen.

5.2.5. Tubulin based polymorphism (TBP) Intron II

Die hier eingesetzten Primer wurden mit dem Farbstoff YY markiert und sollten das Intron II des in zahlreichen Kopien vorliegenden β -Tubulin-Gens amplifizieren. Auch bei diesem Experiment waren die Signale vom Goji-Produkt 9 zu schwach, sodass dieses aus der Auswertung entfernt wurde.

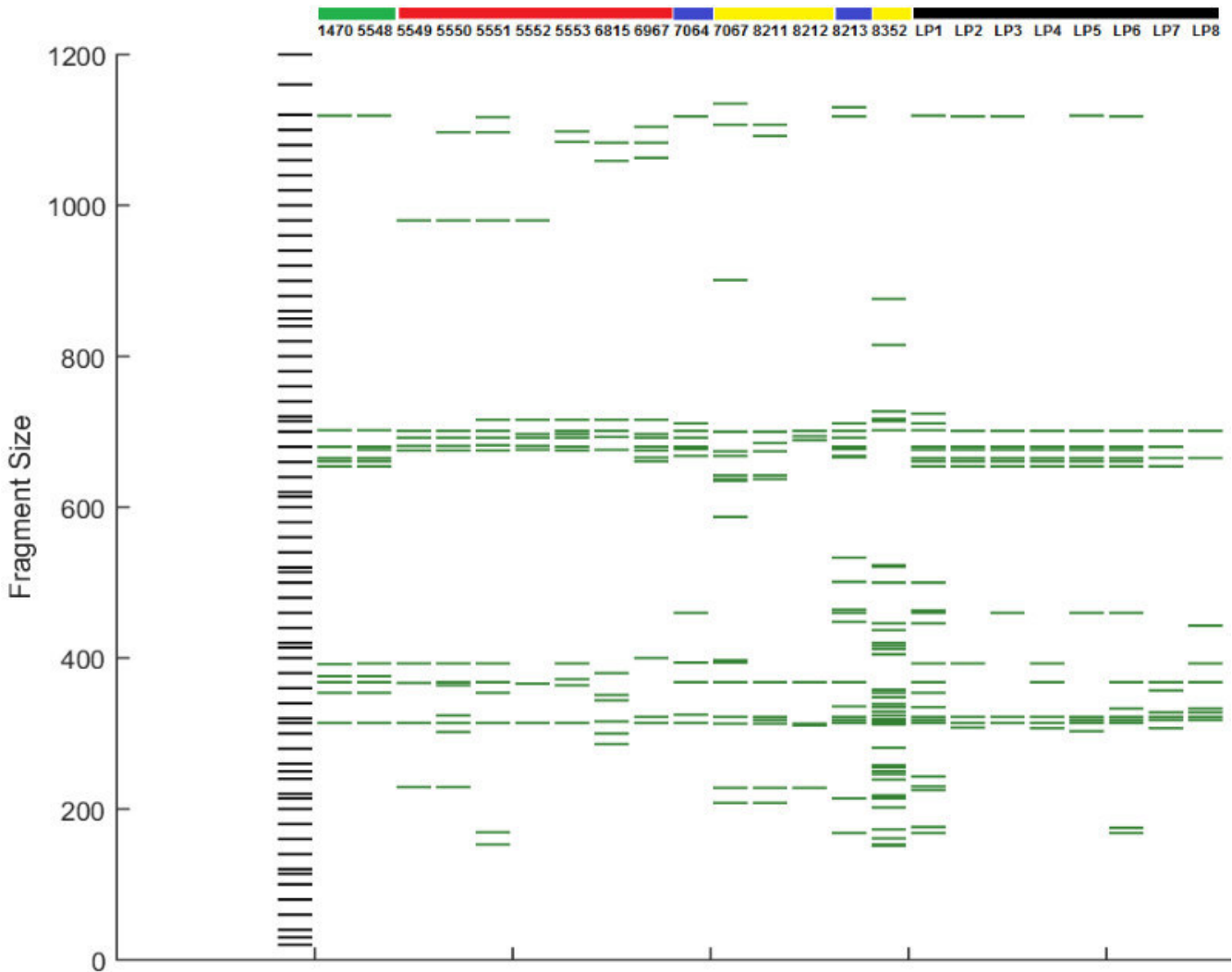


Abb. 23: Das virtuelle Gelbild der amplifizierten Banden vom Intron II der β -Tubulin-Genfamilie.

Auf der Y-Achse ist die Zuordnung der Fragmentgrößen aufgetragen. Die erste Bahn auf der X-Achse stellt den Größenmarker dar. Danach folgen die eingesetzten Akzessionen. Erneut sind zusammengehörende Arten / Gruppen farblich markiert.

Auch bei der Amplifikation der Intron II Fragmente zeigen sich einige Banden, wobei es im Vergleich zum Intron I deutlich weniger sind. Der Spitzenwert bildet hier die Akzession 8352 mit 42 amplifizierten Fragmenten. Die durchschnittliche Anzahl der Fragmente beträgt etwa 14. Die über Farben markierten zusammengehörenden Gruppen zeigen bei der Betrachtung des Intron II eine erhöhte Einheitlichkeit. So ist beispielsweise das Bandenmuster bei den beiden *Lycium barbarum* Akzessionen (1470 und 5548) beinahe komplett identisch.

5.2.5.1. Stammbaum TBP Intron II

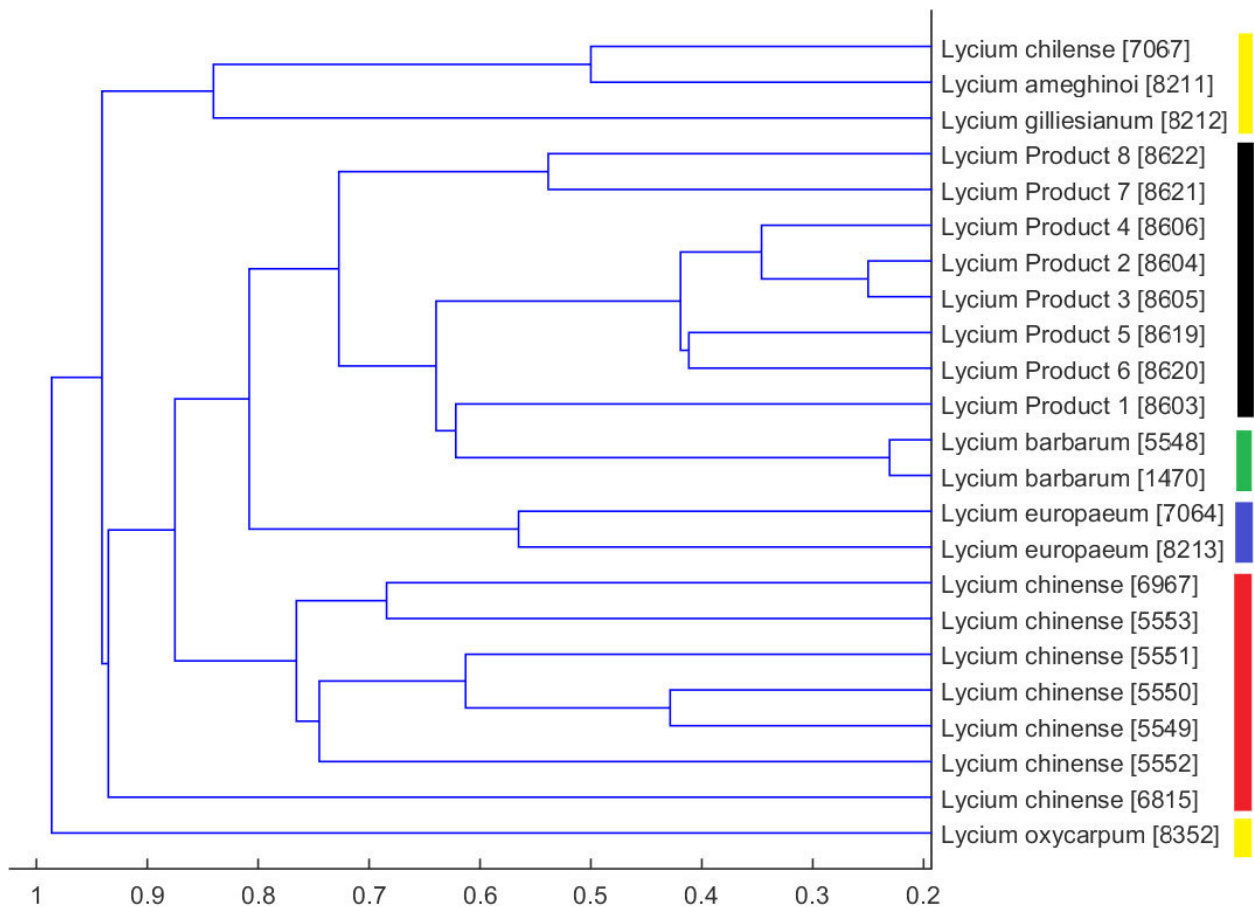


Abb. 24: Dendrogramm der phylogenetischen Analyse verschiedener *Lycium*-Arten basierend auf der Fragmentanalyse des Intron II der β -Tubulin-Genfamilie. Anhand der zuvor erhobenen Binärmatrizen wurden die Jaccard-Distanzen der Fragmentmuster aller ausgewählter Proben zueinander berechnet. Auf der X-Achse ist der Jaccard-Index verzeichnet. Das aus den Fragmenten des Intron II errechnete Dendrogramm weist eine deutlich übersichtlichere Clusterung als das des Introns I auf. Aber wie beim Intron I trennt sich *L. oxycarpum* von allen anderen Akzessionen. Die südamerikanischen *Lycium*-Arten (*Lycium chilense*, *Lycium ameghinoi* und *Lycium gilliesianum*) trennen sich im nächsten Cluster von den *Lycium barbarum*, *Lycium chinense* und *Lycium europaeum* Akzessionen sowie den *Lycium*-Produkten.

Es findet eine deutliche Trennung der Arten voneinander statt, so landen alle *L. chinense* Arten mit der Ausnahme von 6815 in einem Cluster. Auch die beiden *L. europaeum* Akzessionen (7064 und 8213) und die *L. barbarum* Akzessionen (1470 und 5548) landen jeweils in einem Cluster. Die Goji-Produkte zeigen die nächste Verwandtschaft zu den beiden *Lycium barbarum* Akzessionen.

5.2.6. 5S-Spacerregion Fingerprinting

Neben der Betrachtung der Introns der β -Tubulin-Genfamilie sollte eine weitere bekannte Region auf die Brauchbarkeit für eine Fingerprintanalyse getestet werden. Jedoch wurde hierfür wieder der klassische Ansatz ohne markierte Primer eingesetzt.

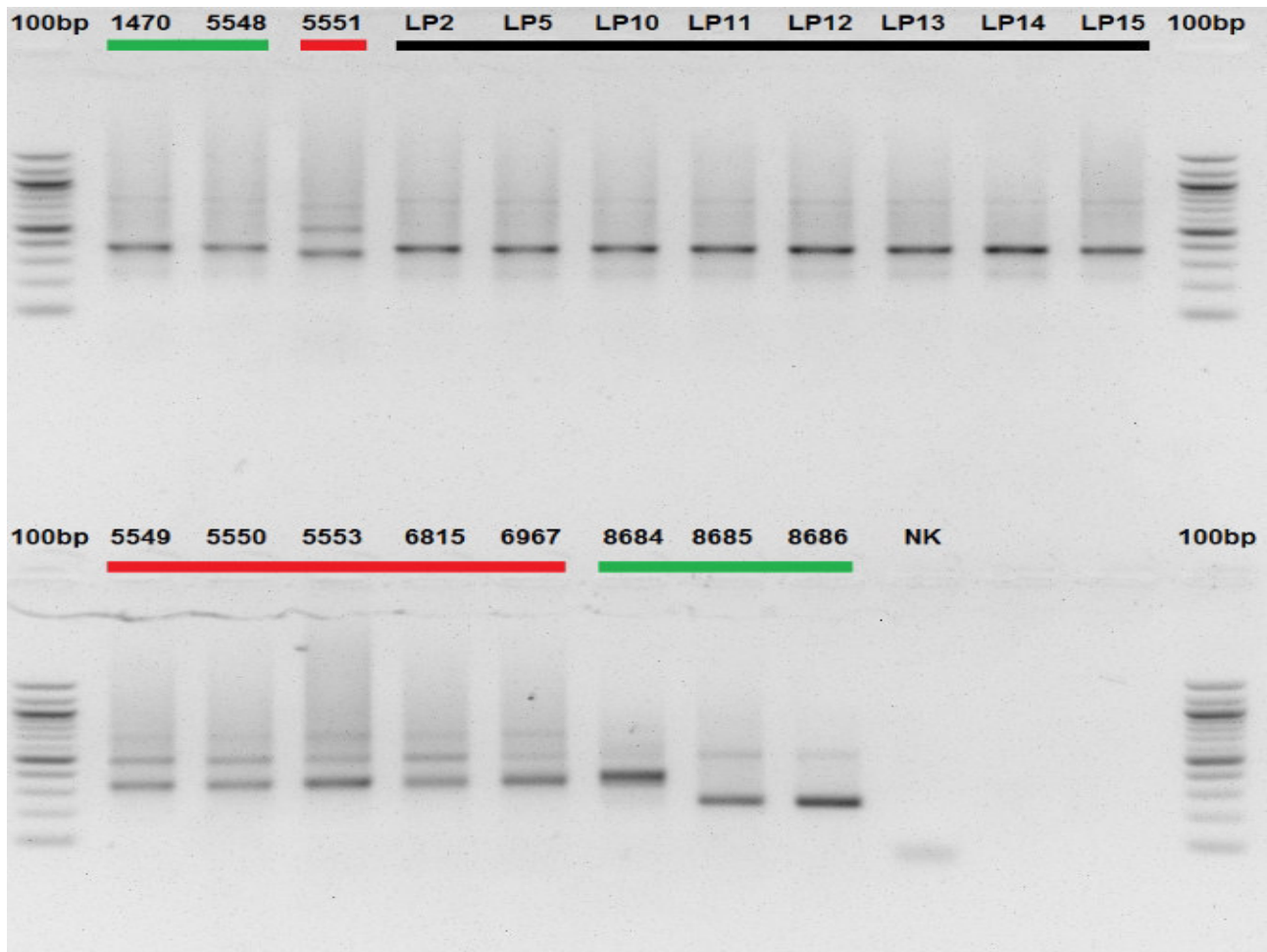


Abb. 25: Fingerprint mit Primern für die rDNA 5S-Spacerregion. 5 μ l der PCR-Produkte wurden auf das 1,5%ige Agarosegel aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug 35 Minuten bei 100 Volt. Für diesen Fingerprint wurden nur die Akzessionen verwendet, die als *L. barbarum* (grün) oder *L. chinense* (rot) bezeichnet sind. Des Weiteren sind erstmals die neuen Goji-Produkte (LP10 – LP15, in schwarz) Teil eines Fingerprints. Bei den beiden *L. barbarum* Akzessionen aus dem BGK und allen Produkten ist das gleiche Bandenmuster zu sehen. Es ist eine deutliche Bande bei etwa 350 Basenpaaren und eine sehr viel schwächere zwischen 700 und 800 Basenpaaren zu sehen. Zum Vergleich wurde auch beispielhaft eine *L. chinense* Akzession (5551) in die erste Reihe pipettiert. Diese zeigt einen Unterschied zu den *L. barbarum* Akzessionen und den Goji-Produkten, denn es sind drei Banden zu sehen, mit Fragmentgrößen von 300 Basenpaaren, 500 Basenpaaren und etwa 700 Basenpaaren. Die restlichen *L. chinense* (5549, 5550, 5553, 6815 und 6967) Akzessionen zeigen das gleiche Muster. Die drei *L. barbarum* aus dem Herbarium in Freiburg zeigen andere Muster als die *L. barbarum* Akzessionen aus dem BGK. Die Akzessionen 8685 und 8686 und zeigen das gleiche Bild mit einer Bande zwischen 200 und 300 Basenpaaren und einer weiteren schwächeren Bande bei etwa 600 Basenpaaren. Die Akzession 8684 zeigt eine deutliche Bande bei 400 Basenpaaren und unterscheidet sich damit von allen anderen Akzessionen, weist aber Ähnlichkeiten zu den *L. chinense* Akzessionen auf.

5.2.7. Auf der 5S-Spacerregion basierter SCAR-Ansatz

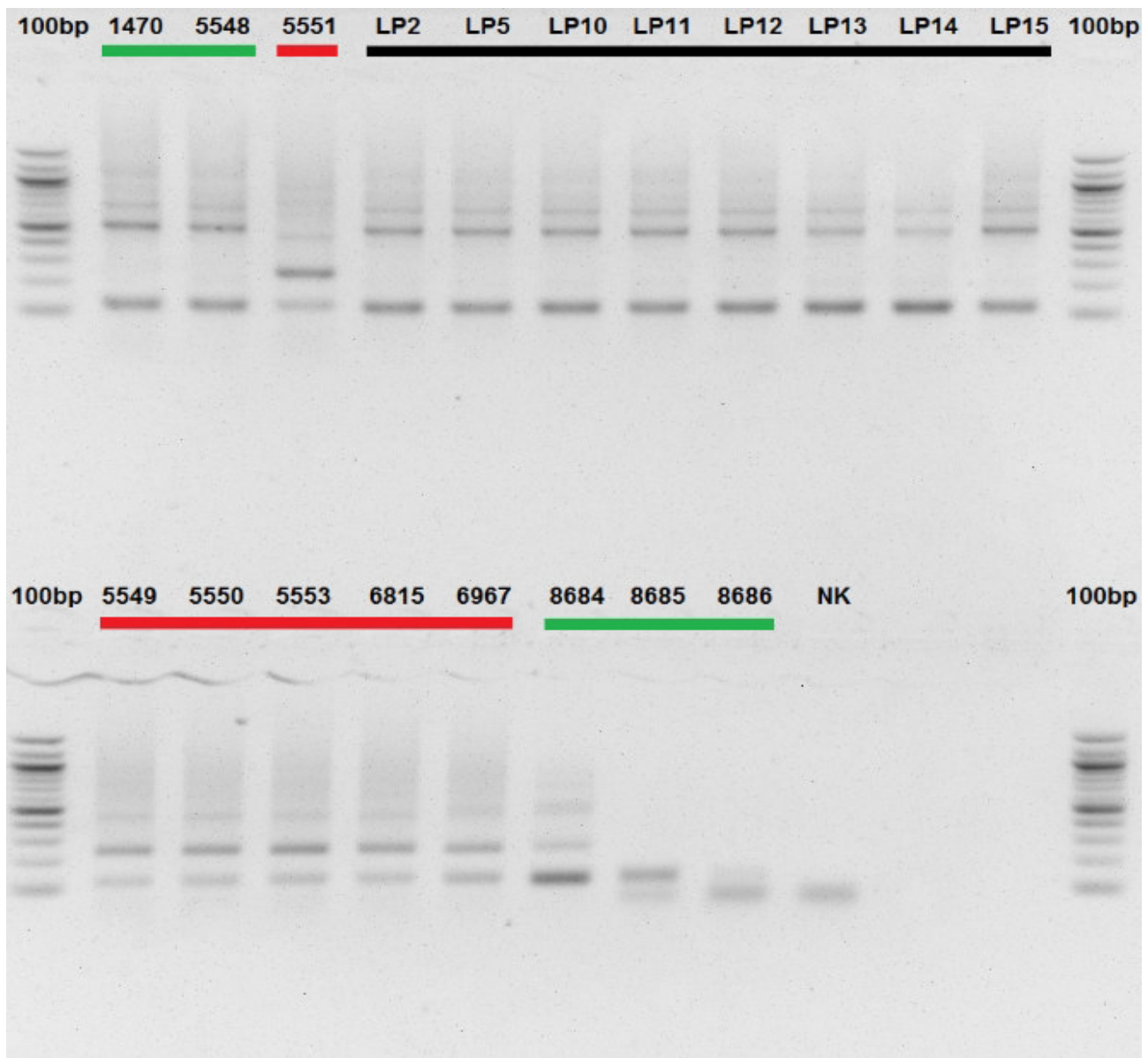


Abb. 26: Gelelektrophoresebild von PCR-Produkten nach Verwendung der neu designten 5S-SCAR-Primer. 5 μ l der PCR-Produkte wurden auf das 1,5%ige Agarosegel aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug 35 Minuten bei 100 Volt.

Die *L. barbarum* Akzessionen 1470 und 5548, sowie die *Lycium*-Produkte zeigen Fragmente mit einer Größe von 150, 500 und etwa 700 Basenpaaren.

Die *L. chinense* Akzessionen zeigen Amplifikation von Fragmenten mit einer Größe von etwa 150 Basenpaaren, 250 Basenpaaren und schwach bei etwa 400 Basenpaaren.

Die drei *L. barbarum* Akzessionen aus dem Herbarium Freiburg weisen dagegen wieder drei unterschiedliche Muster auf, wobei bei 8686 wohl nur die Primer als Bande zu sehen sind, da die Negativkontrolle das gleiche Muster aufweist. Die Akzession 8684 zeigt auch bei diesem Fingerprint Ähnlichkeiten zu den *L. chinense* Akzessionen.

5.2.8. ITS2 basierter ARMS-Ansatz

Basierend auf den Sequenzunterschieden zwischen *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* in der ITS2 Region, die mit dem BEL2/3 Primerpaar amplifiziert wurde, konnten ARMS Primer designiert werden. Diese sollten zu einer deutlichen Unterscheidung von *L. barbarum* (zwei Fragmente, ITS2-Fragment und diagnostische Bande) und *L. chinense* (nur das ITS2-Fragment) führen.

Die Amplifikation des diagnostischen Fragment war erfolgreich, jedoch besteht das Problem, dass die diagnostische Bande nicht nur bei *L. barbarum*, sondern auch bei weiteren Arten auftritt.

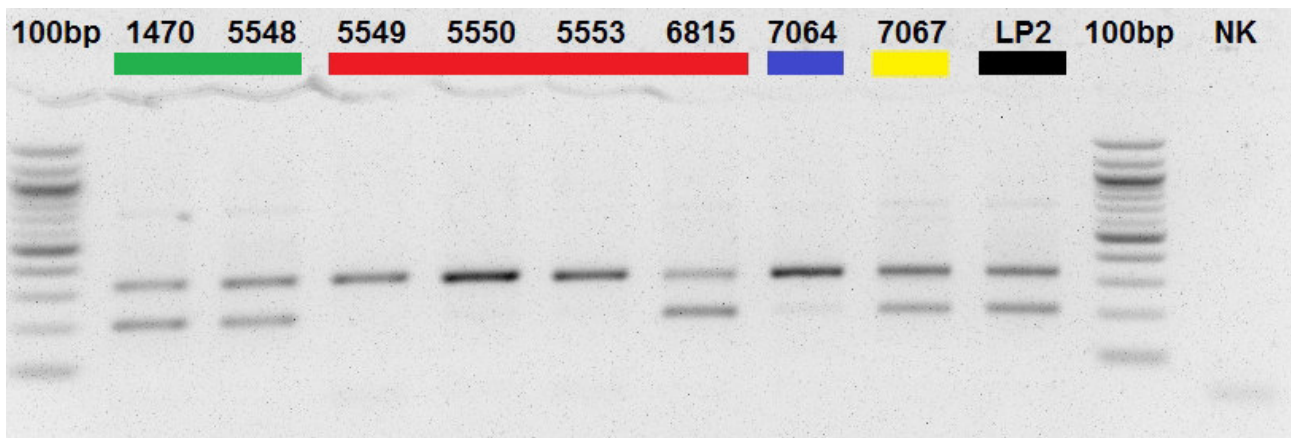


Abb. 27: Gelelektrophoresebild der Amplifikation von der ITS2-Region mit zusätzlichem Einbringen des GojiBEL-144G-fw ARMS-Primers in die Reaktion. 2 µl der PCR-Produkte wurde auf das 2%ige Agarosegel aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug 35 Minuten bei 100 Volt.

Die (kleinere) diagnostische Bande ist bei den *Lycium barbarum* Akzessionen 1470 und 5548 und auch dem Beispielprodukt LP2 deutlich zu sehen. Aber auch bei der *Lycium chinense* Akzession 6815 und auch bei der Art *Lycium chilense* (7067) ist sie sichtbar.

5.2.9. Phylogenie der plastidären *ycf1b* Markerregion

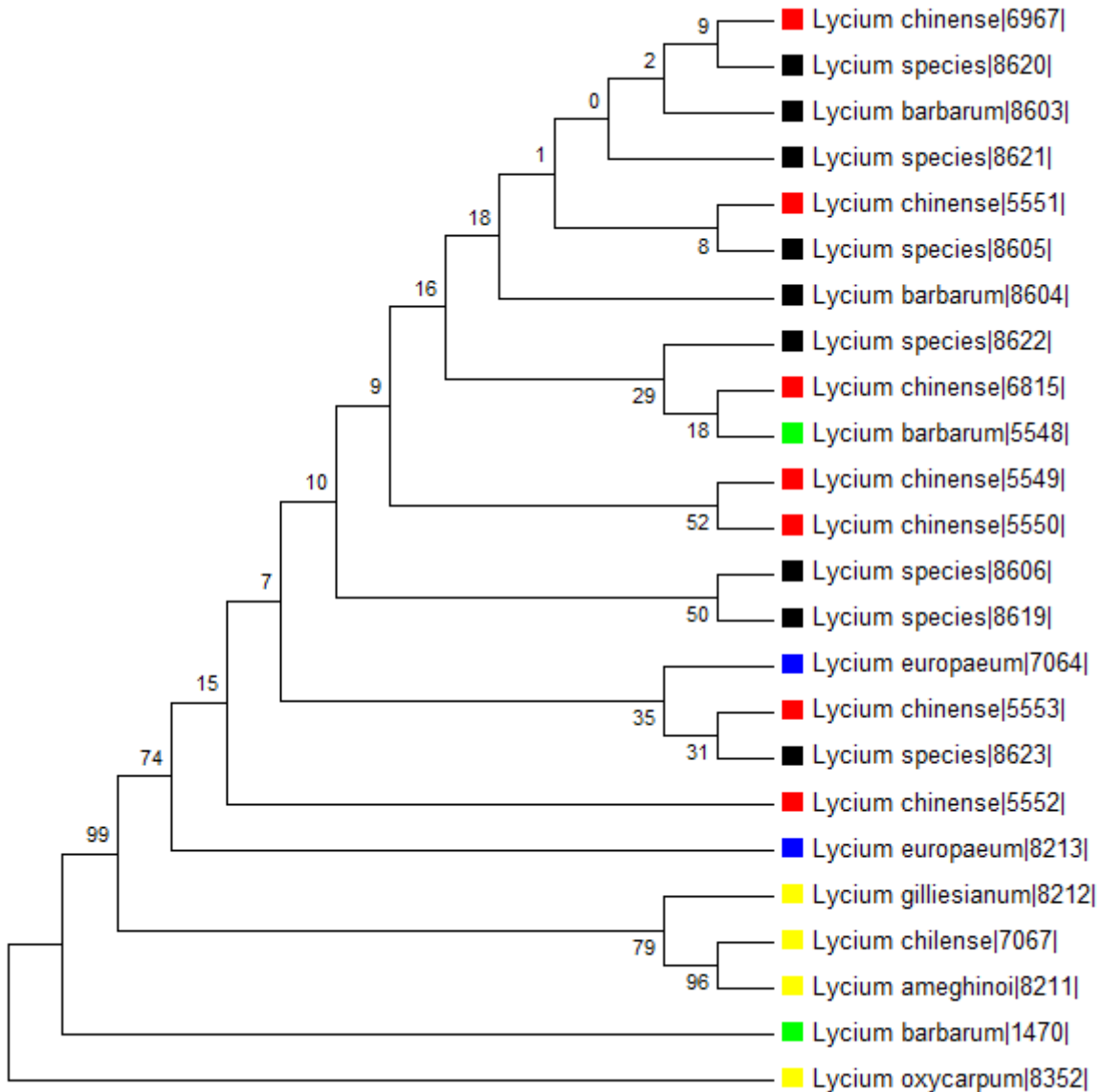


Abb. 28: Zur Erstellung dieses topologischen Baumes auf Basis der *ycf1b* Sequenzen wurde die UPGMA Methode verwendet. Der Anzahl der Bootstrap Replikate lag bei 1000 und die Prozentzahl der reproduzierten Bäume ist an den Knotenpunkten aufgetragen.

Der Baum beinhaltet 24 verschiedene Sequenzen, die entsprechend ihrer zugehörigen Gruppen wieder farblich gekennzeichnet sind. Im endgültigen Datensatz der Sequenzen waren 902 Positionen enthalten.

Die Art *Lycium oxycarpum* stellt die Außengruppe dar und trennt sich von allen anderen *Lycium*-Arten. Mit Ausnahme der Akzession 1470 findet eine Trennung von Neuwelt-Arten (*L. gilliesianum*, *L. chilense*, *L. ameghinoi*) und Altwelt-Arten statt. Diese Trennung ist mit einem Bootstrap-Wert von 79% signifikant.

Im Altwelt-Cluster ist keine Trennung der verschiedenen Arten zu erkennen, sodass *L. chinense*, *L. europaeum* und die Goji-Produkte polyphyletische Gruppen bilden. Es ist anhand dieser Markerregion keine Trennung der beiden Goji-Arten *L. barbarum* und *L. chinense* möglich, außerdem kann nicht gesagt werden, zu welcher Art die Goji-Produkte gehören.

wieder farblich gekennzeichnet sind. Im endgültigen Datensatz der Sequenzen waren 520 Positionen enthalten. Die *Lycium barbarum* Akzessionen 1470 und 5548 sowie alle Produkte mit der Ausnahme von LP14 (8694) bilden eine monophyletische Gruppe. Auch die *Lycium chinense* Akzessionen sind eine geschlossene Gruppe. Eine Ausnahme stellt die Akzession 8684 dar, denn diese war als *L. barbarum* deklariert, ist aber laut dieser phylogenetischen Analyse eher eine *L. chinense* Akzession. Weiterhin clustern geographisch nah verwandte Arten zusammen, wie die nordafrikanischen Arten wie *Lycium intricatum* oder *Lycium shawii* mit den *Lycium europaeum* Akzessionen. Die Letztere bildet jedoch keine einheitliche Gruppe, denn die *L. europaeum* Akzessionen (7064, 8213, 8687 und 8688) sind alle in verschiedenen Clustern zu finden. Auch die beiden restlichen *L. barbarum* Akzessionen 8685 und 8686 tauchen in Gruppen zusammen mit *L. europaeum* und afrikanischen Arten auf. Die südamerikanischen Arten *Lycium chilense* und *Lycium ameghinoi* sind zusammen in einer Klade zu finden und *Lycium gilliesianum* landet in einer eigenen Klade. *Nolana werdermannii* stellt die Außengruppe dar.

5.2.10.1. Erweiterung der psbA-trnH Analyse

Die Analyse der psbA-trnH Markerregion wurde noch erweitert und zusätzlich zu den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten noch Sequenzen weiterer *Lycium*-Arten aus der ncbi-Datenbank in die schon vorhandene Analyse eingegliedert. Alle zugänglichen Sequenzen von *Lycium*-Arten wurden verwendet, sodass der Datensatz von 38 auf 78 Sequenzen anstieg. Dabei machten Arten aus der Neuen Welt den größten Anteil der hinzugefügten Sequenzen aus. Aber auch weitere Arten aus Afrika und auch die einzige australische Art fanden den Weg in diesen erweiterten Datensatz. Das Ziel war die Betrachtung der in dieser Arbeit erhobenen Daten in einem größeren Kontext.

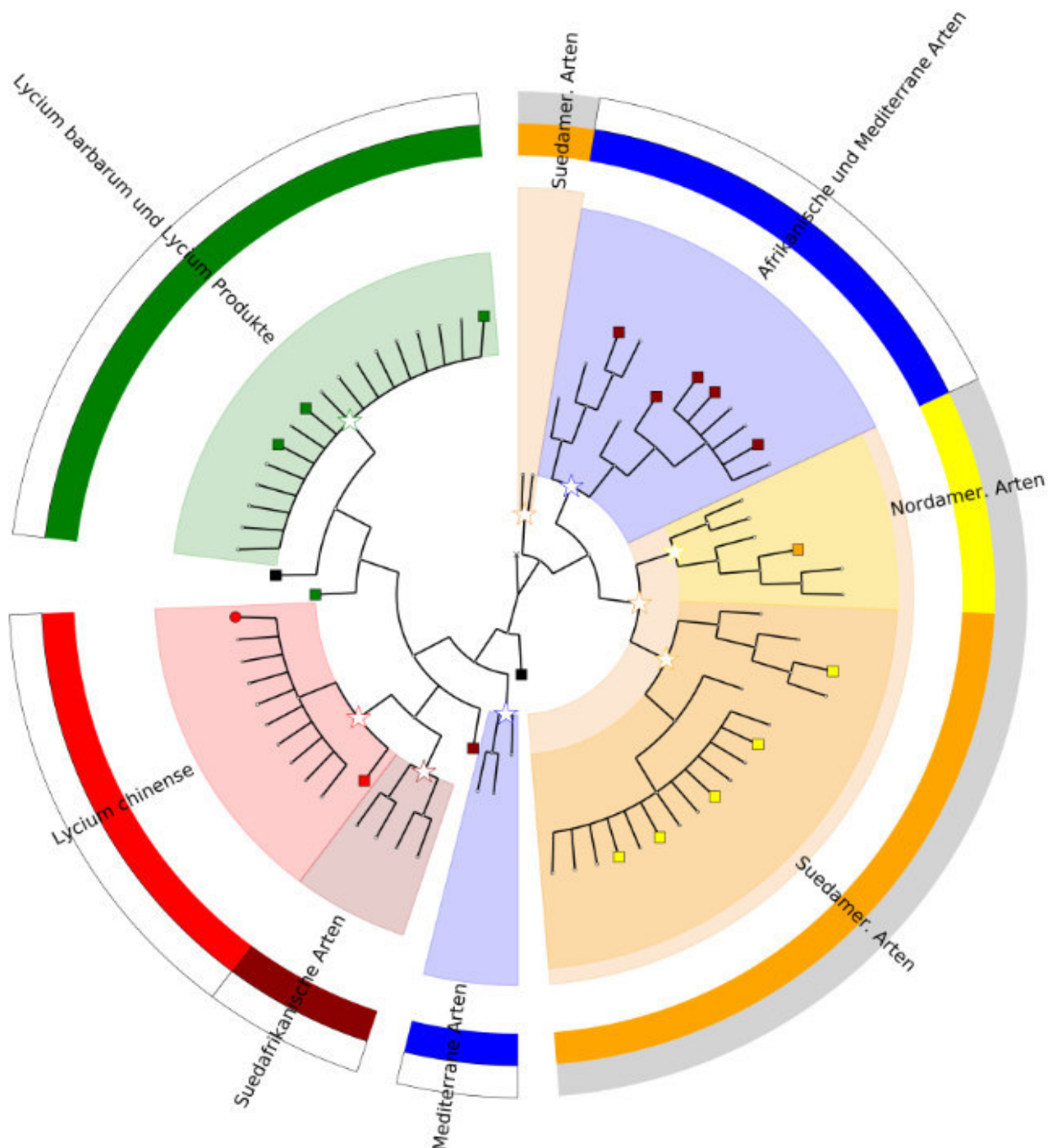


Abb. 30: Zirkuläre Darstellung der Verwandtschaftsbeziehung zwischen den *Lycium*-Arten aufgrund der psbA-trnH Daten dieser Untersuchung und der ncbi Datenbank. Das Programm GraPhlAn wurde zur Erstellung des Baumes verwendet. Das Hauptaugenmerk liegt auf der geographischen Verteilung. Es ist zu erkennen dass die Neue Welt Arten (markiert durch den äußeren grauen Ring) bis auf zwei Ausnahmen (*Lycium gilliesianum* und *Lycium fuscum*; (orange, oben)) in einem Phylum liegen, wobei auch eine grobe Aufteilung von nordamerikanischen Arten (gelber innerer Ring) und südamerikanischen Arten (orangener innerer Ring) zu sehen ist. Jedoch bilden beiden Regionen keine monophyletischen Gruppen, da auch im Südamerika-Cluster nordamerikanische Arten (über gelbe Quadrate markiert) zu finden sind. Umgekehrt ist auch im kleineren Nordamerika-Cluster eine südamerikanische Art (orangenes Quadrat) zu finden.

Die mit blauen Ringen markierten Cluster beinhalten alle Arten aus Afrika und dem mediterranen Gebiet. Bei der Betrachtung des größeren Afrika-Cluster (blau, oben) ist keine deutliche Trennung zwischen nordafrikanischen und südafrikanischen *Lycium*-Arten zu erkennen. Die südafrikanischen Arten sind über dunkelrote Quadrate gekennzeichnet.

Eine kleine Gruppe von vier Arten aus Südafrika (*Lycium arenicola*, *Lycium bosciifolium*, *Lycium hirsutum*, *Lycium pomilum*) sind in einem gemeinsamen Cluster (dunkelrot, unten) zu finden. Auch die im Mittelmeerraum beheimateten *Lycium europaeum* (2x) und *Lycium shawii* bilden ein eigenes Cluster (blau, unten). Die rot markierte *Lycium chinense* Gruppe beinhaltet zwei Arten, die nicht *L. chinense*, aber auch in China beheimatet sind (*Lycium dasystemum* (als rotes Quadrat gekennzeichnet) und *Lycium yunnanense* (als roter Kreis gekennzeichnet)). Die südafrikanische Art *Lycium villosum* befindet sich außerhalb der bereits erwähnten Südafrikan-Klade und ist daher mit einem dunkelroten Quadrat markiert. Die *Lycium barbarum* Akzessionen und die Goji-Produkte bilden eine geschlossene Gruppe (grün markiert). Die nah verwandten Arten *Lycium truncatum* (dargestellt durch ein grünes Quadrat) und das Goji-Produkt 14 (schwarzes Quadrat) befinden sich außerhalb der *L. barbarum* Gruppe. Die Art *Lycium ruthenicum* steht in der Gruppe der Altwelt-Arten alleine da und wurde durch ein schwarzes Quadrat (Mitte) dargestellt.

Die Art *Nolana werdermannii* ist auch hier die Außengruppe.

5.2.11. Cos16 Analyse

Die fünf verschiedenen CosII Primer wurden aufgrund der Tatsache ausgewählt, dass sie nur eine Kopie im Genom besitzen und daher im Gel nur zu einer Bande bzw. zu einem DNA-Fragment führen sollten, welches für eine Sequenzierung eingesetzt werden kann. Im Rahmen des Versuchs und dem Austesten der unterschiedlichen Primer zeigte sich, dass nur das Cos16 Primerpaar zu einzelnen Banden führte. Die restlichen Primerpaare ergaben entweder nur schwache Amplifikationen oder auch mehrere Banden (wie z.B. bei Cos30, siehe Abb. 31), was darauf hindeutet, dass hier mehrere Kopien der orthologen Region vorliegen. Für die Sequenzierung und der damit verbundenen Erstellung eines Stammbaums, wurde also nur die Cos16 Region ausgewählt. Und auch hier gab es Probleme bei der Sequenzierung, die nicht bei allen Arten optimal verlief. Aus diesem Grund wurden einige Sequenzen für die Erstellung des Stammbaums ausgeschlossen. Erfreulicherweise war von den wichtigsten Arten dieser Untersuchung (*L. barbarum* und *L. chinense*) mindestens eine brauchbare Sequenz vorhanden, sodass mit dem Programm MEGA6 ein UPGMA Stammbaum generiert werden konnte.

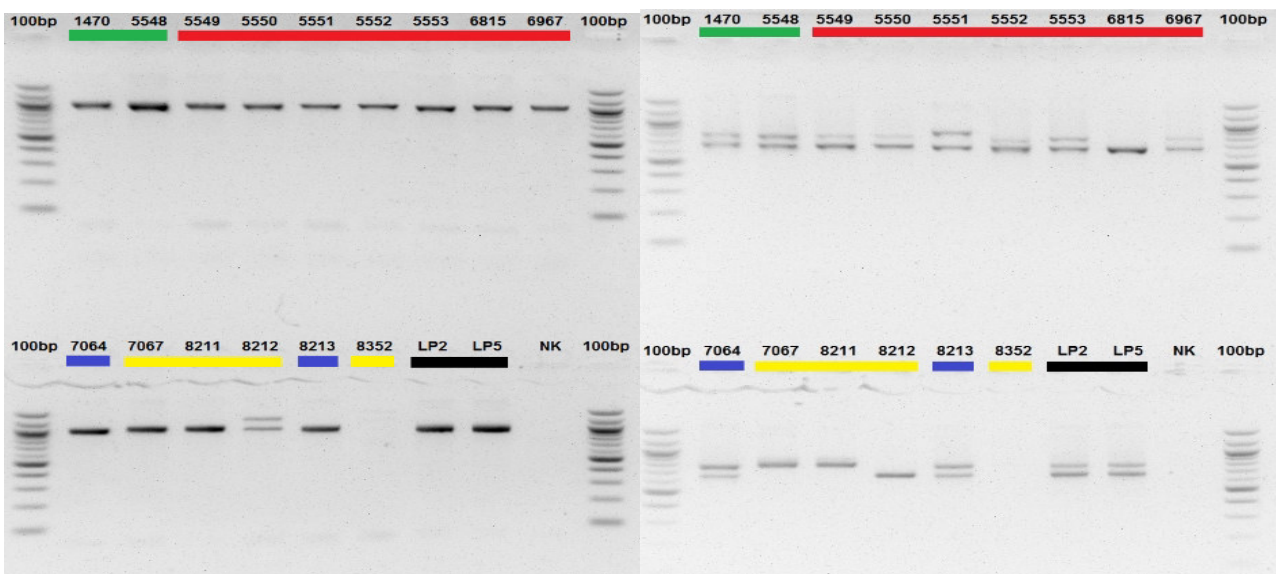


Abb. 31: Bilder der Gelelektrophorese der PCR-Produkte von Cos16 (links) und Cos30 (rechts). Man kann im linken Bild sehen, dass mit Ausnahme der Akzessionen 8212 und 8352 nur ein Fragment amplifiziert wurde. Die beiden Akzessionen 8212 und 8352 wurden von der Sequenzierung ausgeschlossen. Bei der Verwendung des Cos30 Primerpaares kam es bei einigen Akzessionen zur Amplifikation von zwei Fragmenten.

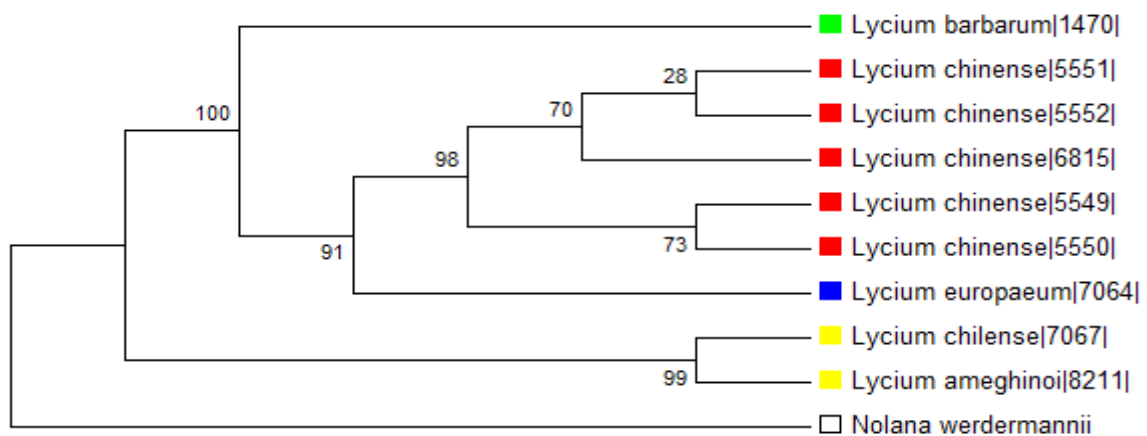


Abb. 32: Zur Erstellung dieses topologischen Baumes auf Basis der Cos16 Sequenzen wurde die UPGMA Methode verwendet. Der Anzahl der Bootstrap Replikate lag bei 1000 und die Prozentzahl der reproduzierten Bäume ist an den Knotenpunkten aufgetragen.

Der Baum beinhaltet zehn verschiedene Sequenzen, die entsprechend ihrer zugehörigen Gruppen wieder farblich gekennzeichnet sind. Im endgültigen Datensatz der Sequenzen waren 1026 Positionen enthalten.

Die fünf *L. chinense* Arten clustern zusammen und auch die Arten *L. barbarum* (1470) und *L. europaeum* (7064) landen in einer einzelnen Klade. Die südamerikanischen *Lycium*-Arten *L. chilense* und *L. ameghinoi* clustern in einer separaten Gruppe zusammen. Sämtliche Auftrennungen sind mit Bootstrap-Werten von über 70% signifikant. *Nolana werdermannii* wurde als Außengruppe gewählt.

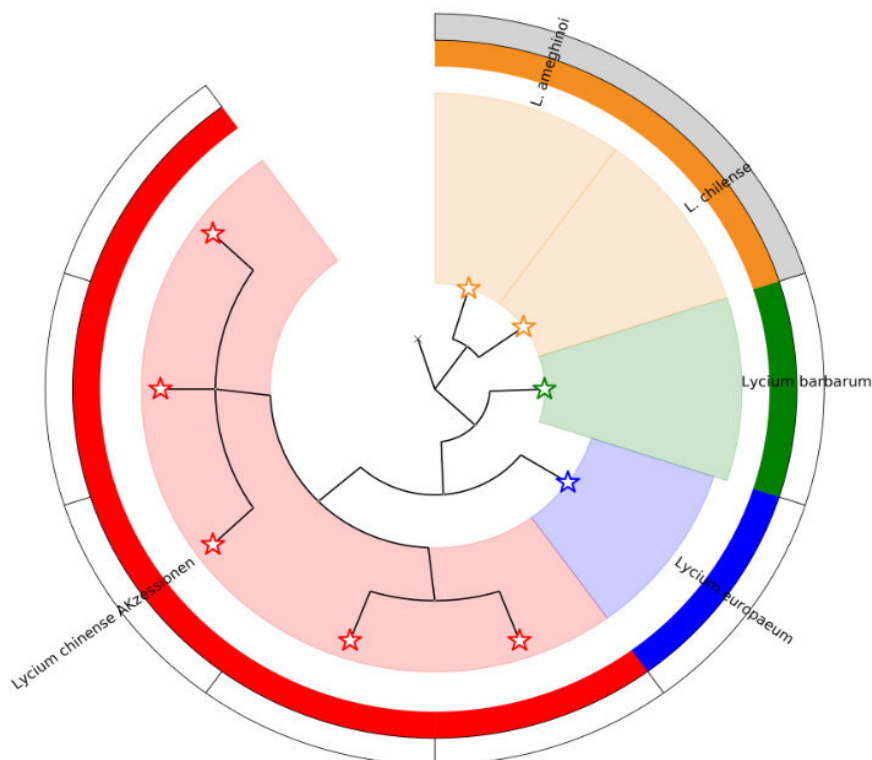


Abb. 33: Zirkuläre Darstellung der Verwandtschaftsbeziehung zwischen den *Lycium*-Arten aufgrund der Cos16 Daten. Das Programm GraPhlAn wurde zur Erstellung dieses Baumes verwendet. Die verschiedenen *Lycium*-Arten sind farblich markiert. Zusätzlich zeigt der äußere Ring den geographischen Ursprung der Arten an, wobei grau für die Neue Welt und weiß für die Alte Welt steht.

5.2.12. ITS2 Phylogenie

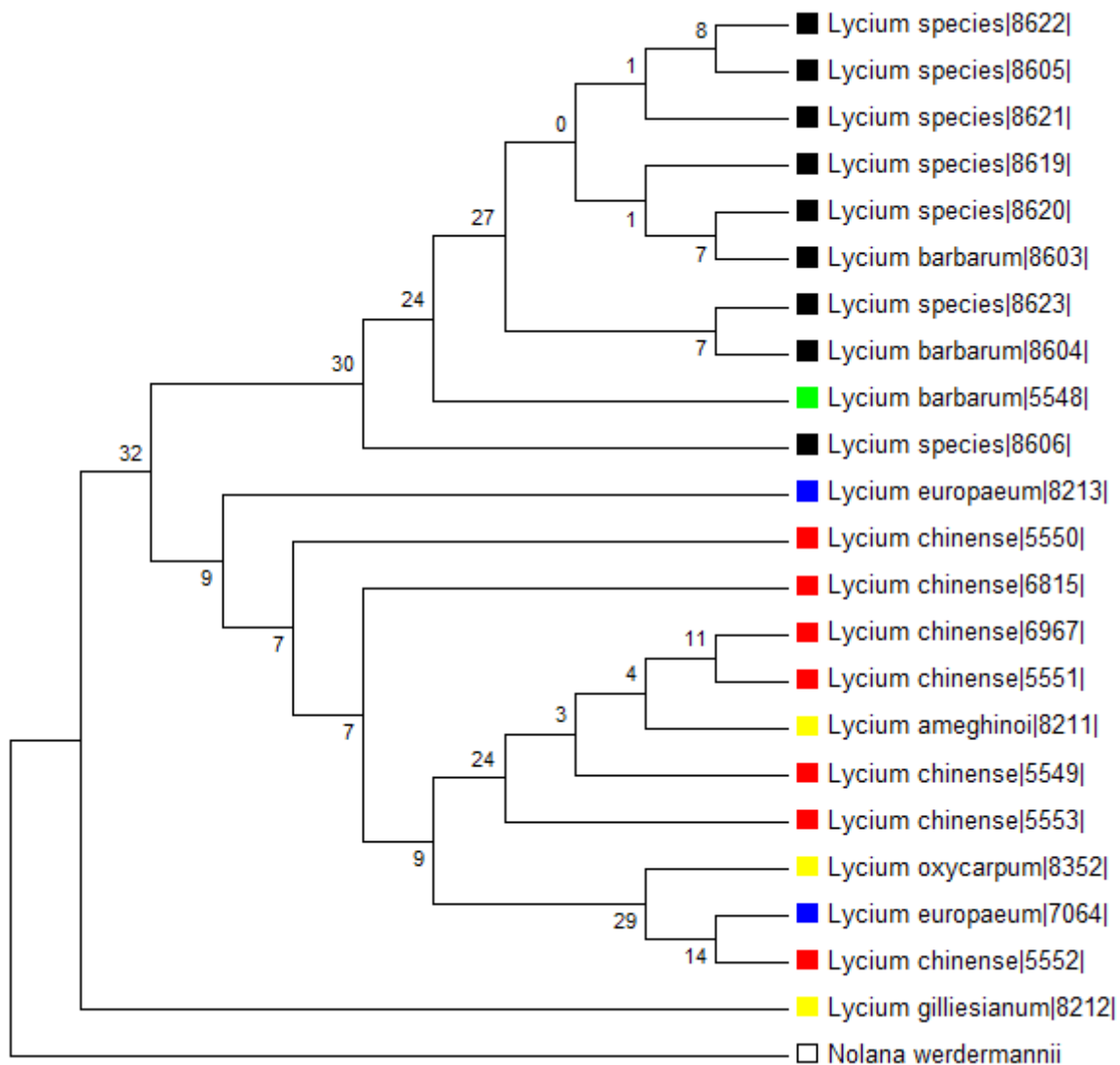


Abb. 34: Zur Erstellung dieses topologischen Baumes auf Basis der ITS2 Sequenzen wurde die UPGMA Methode verwendet. Der Anzahl der Bootstrap Replikate lag bei 1000 und die Prozentzahl der reproduzierten Bäume ist an den Knotenpunkten aufgetragen.

Zunächst trennt sich *Lycium gilliesianum* von den restlichen *Lycium*-Arten. Im nächsten Ast findet eine Aufteilung in eine Gruppe, welche die Goji-Produkte sowie eine *Lycium barbarum* Akzession enthält, und eine Gruppe die sowohl *Lycium chinense* und *Lycium europaeum* Akzessionen sowie die Arten *Lycium ameghinoi* und *Lycium oxycarpum* enthält.

Abgesehen von der Trennung von *Lycium barbarum* und den Goji-Produkten von den restlichen Arten, ist keine eindeutige Trennung zwischen den verschiedenen Arten zu erkennen. Denn sowohl südafrikanische als auch südamerikanischen und eurasische Arten sind verteilt in einem Phylum zu finden.

5.2.13. Vergleich der getesteten Markerregion

Um die vier verwendeten Markerregionen zu vergleichen, werden in Tabelle 23 die Länge der Sequenzen, sowie die variablen Stellen aufgelistet. Außerdem sind die innerhalb der gleichen Arten auftretenden Variationen gelistet.

Dabei wurden die Sequenzen von 21 Akzessionen verglichen. Eine Ausnahme bildet die COS16-Region, denn bei dieser traten wie bereits angesprochen Sequenzierungsprobleme auf, sodass für die Erstellung der Statistik für diese Region nur neun Sequenzen berücksichtigt werden und auch nur ein Vergleich der Variabilität der *Lycium chinense* Akzession angestellt werden konnte.

Die Cos16 Region ist mit einer Länge von 1026 Nukleotiden die Längste der hier verglichenen Markersequenzen. Die Anzahl der variablen Stellen in der Gesamtsequenz beträgt trotz der nur neun betrachteten Sequenzen 104 Nukleotide, was einem Prozentsatz von 10,14% entspricht. Beim Vergleich der fünf *L. chinense* Akzessionen sind einige Variationen der Sequenzen innerhalb der Art zu verzeichnen.

Die ycf1b Region ist mit 902 Basen die zweitlängste Region, weist aber mit einer Prozentsatz von 2,44% variabler Stellen den geringsten Wert auf. Des weiteren sind bei allen Arten zwischen den verschiedenen Akzessionen Variationen vorhanden.

Die 502 Basenpaar lange psbA-trnH Region weist 2,59% Variabilität zwischen den getesteten Sequenzen auf, dafür sind innerartlich kaum Variationen in der Nukleotidsequenz vorhanden.

Mit einer Länge von 293 Basen ist die ITS2-Region die deutlich kürzeste, jedoch auch die Region mit der prozentual größten Anzahl an variablen Stellen. Aber auch hier treten innerartlich deutliche Unterschiede in den Sequenzen auf.

	ycf1b	psbA-trnH	ITS2	Cos16
Lokalisierung	Plastidär		Nukleär	
Länge der Sequenz	902	502	293	1026
Variable Stellen	22 / 902	13 / 502	34 / 293	104 / 1026
Variable Stellen in %	2,44%	2,59%	11,6%	10,14%
Variation in <i>L. barbarum</i>	28 / 902	0 / 502	-	-
Variation in <i>L. chinense</i>	6 / 902	0 / 502	11 / 293	20 / 1026
Variation in <i>L. europaeum</i>	3 / 902	1 / 502	7 / 293	-
Variation bei Goji-Produkte	9 / 902	1 / 502	6 / 293	-

Tab. 23: Vergleich der vier getesteten Markerregionen

5.2.14. Kurze Zusammenfassung der DNA-basierten Ergebnisse

- Die auf zufälligen Primern basierenden Fingerprint-Methoden RAPD und SRAP liefern erkennbare Unterschiede zwischen den beiden Goji-Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense*.
- Die Fingerprint-Methoden legen den Schluss nahe, dass es sich bei den Goji-Produkten um Früchte von *Lycium barbarum* handelt.
- Der auf Basis von Fragmenten des Intron II der β -Tubulin-Genfamilie kreierte Stammbaum zeigt eine deutliche Unterscheidung von *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* und ordnet die Goji-Produkte der Art *Lycium barbarum* zu.
- Die aus vier verschiedenen Markerregionen (Chloroplastengenom sowie Kerngenom) entstandenen Stammbäume zeigen, dass Barcoding-Methoden zur Differenzierung von *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* sowie für eine Zuordnung der Goji-Produkte zu *Lycium barbarum* einsetzbar sind, wobei der Erfolg und die Aussagekraft bei den verschiedenen Regionen variiert.
- Verwendete SCAR- und ARMS-Primer zeigen nicht den gewünschten Erfolg einer simplen Unterscheidung der beiden Goji-Arten.

6. Diskussion

6.1. Morphologie

6.1.1. Blüten

In der Pflanzensystematik wurde die Blütenmorphologie schon sehr früh, z.B. von Linné, als taxonomisches Merkmal für die Unterscheidung nah verwandter Arten angewandt. Für die Gattung *Lycium* liegen verschiedene Bestimmungsschlüssel vor, beispielsweise die „Flora of China“ [21], die „Flora of Andalusia“ [66] und auch „Die Flora von Deutschland“ [67] nennt Unterscheidungsmerkmale für die beiden nah verwandten Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense*. Das Problem bei allen Schlüsseln ist die Verwendung von Worten mit einem geringen Maß an Sicherheit wie „etwa“ oder im Englischen „usually“. Das drückt eine gewisse Unsicherheit für die deutliche Trennung dieser beiden Arten aus. Dennoch gibt es, wie im Ergebnisteil beschrieben und mit Bilder gezeigt (siehe Ergebnisteil Kapitel 5.1.1.), drei Merkmale, welche zur Unterscheidung eingesetzt werden konnten.

Den Ergebnissen kann jedoch auch entnommen werden, dass nur eines der Merkmale bei den beiden als *L. barbarum* bestimmten Akzessionen konstant ist. Eine gleichmäßige Behaarung am Rand der Kronblätter ist bei den Akzession 1470 und 5548 bei allen 30 geprüften Blüten nicht vorhanden gewesen, wohingegen diese Behaarung bei allen anderen Akzessionen (5549 – 5553, 6815 und 6967) deutlich zu sehen war.

Pflanzenhaare bzw. Trichome sind Auswüchse der Epidermis mit verschiedenen Funktionen [12]. Zwar ist die Behaarung stark von Umweltbedingungen (z.B. Temperatur) abhängig, aber dennoch ist das Auftreten von Trichomen ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal für die Pflanzentaxonomie [68].

Die *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* Akzessionen wachsen am selben Standort und sind damit denselben Umwelteinflüssen ausgesetzt, was bedeutet, dass äußere Einflüsse in diesem Fall nicht für das Auftreten oder nicht-Auftreten der Trichome an den Kronblätter verantwortlich sind. Da sie bei *L. chinense* trotz der gleichen abiotischen Faktoren mit einer solchen Konsequenz vorkommen, kann dies als sicheres Unterscheidungsmerkmal für die im BGK wachsenden Akzessionen gesehen werden.

Die Lappung des Kelches ist bei den Akzessionen 1470 und 5548 nie größer als zwei, es trat nur bei

der Akzession 5548 bei acht von 30 der Blüten das Phänomen auf, dass keine Lappung, sondern nur ein Einschnitt im Kelchblatt zu sehen war (was im Ergebnisteil als 1-gelappt beschrieben ist). Da dieser Fall in der Literatur nicht zu finden ist oder womöglich auch unter die bereits beschriebene Unschärfe des Wortes „usually“ fällt, kann davon ausgegangen werden, dass auch dieses Merkmal für *L. barbarum* spricht. Auf die Entwicklung der Blüten (dass sich die Lappung im Laufe der Zeit entwickelt) kann diese Beobachtung nicht zurückgeführt werden, da auch ältere Blüten, deren Staubblätter bereits vertrocknet waren, mit einem 1-gelappten Kelch dokumentiert wurden.

Auch das letzte Merkmal (die längere Kronröhre), welches für *Lycium barbarum* spricht, zeigt sich bei den Akzessionen 1470 und 5548 mit einem hohen Prozentsatz (> 80%) der betrachteten Blüten. Die fünf der 30 Blüten bei 1470 und sechs der 30 Blüten von 5548 bei denen die Länge der Kronblätter gleich lang war, fallen wohl auch unter die Unsicherheit bei der Unterscheidung dieser Arten. Daher sollte eine angemessene Anzahl an Blüten betrachtet werden, um Fehlbestimmungen aufgrund auftretender Anomalien auszuschließen. Eine Kombination der drei Merkmale und die Bestimmung von 30 Blüten führt zu dem Ergebnis, dass 1470 und 5548 als *L. barbarum* bezeichnet werden können.

Die restlichen Akzessionen zeigen deutliche Haare am Rand der Kronblätter und auch die beiden anderen Merkmale sprechen deutlich für die Art *L. chinense*.

Verlässliches Referenzmaterial bildet die Grundlage für weitere Schritte wie DNA-basierte Unterscheidungsmethoden und unterstreicht die Wichtigkeit von Taxonomen, die in der Lage sind das vorhandene Material trotz Schwierigkeiten bei der morphologischen Bestimmung korrekt zuordnen können. Denn nur dann können verlässliche Aussage bei späteren genetischen Untersuchungen getroffen werden.

Die morphologische Bestimmung und der damit vorgenommene Bezug auf das morphologische Artkonzept ist also entscheidend, um die sich anschließende genetische Untersuchung in einen Kontext zu setzen. Daher sollten auch in der Zukunft der relativ klassische Ansatz der morphologischen Bestimmung mit den DNA-basierten Methoden Hand in Hand gehen, um eine rundum fundierte Aussage treffen zu können.

6.1.2. Blätter

Der Unterschied zwischen den Blättern von Pflanzen der Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* besteht in der Blattform, die bei *L. barbarum* als eher lanzettförmig und bei *L. chinense* als eher eiförmig beschrieben wird [21, 67]. Auch bei diesem Merkmal ist die Vokabel „eher“ ein Charakteristikum für die teilweise verschwimmenden Unterschiede. Bei der Betrachtung der Blätter kommt man zu der subjektiven Auffassung, dass diese bei den Akzessionen 1470 und 5548 deutlich schmaler sind, als die der *Lycium chinense* Akzessionen sind (siehe Ergebnisteil Kapitel 5.1.2. Abb. 15). Die Subjektivität ist ein großes Problem bei der morphologischen Artbestimmung und sollte so gut es geht durch quantifizierbare Maßzahlen ersetzt werden.

Die mit dem Programm LAMINA vermessene Länge und Breite der Blätter sowie deren Verhältnis zueinander hatte das Ziel die Subjektivität von lanzett- und eiförmig zu entschärfen und diese Bezeichnungen statistisch zu untermauern. Ein lanzettförmiges Blatt weist im Gegensatz zu einem eiförmigen Blatt ein erhöhtes Verhältnis von Länge zu Breite auf. Dem Schaubild Abb. 16 im Ergebnisteil 5.1.2. ist zu entnehmen, dass die beiden über die Blüten als *L. barbarum* bestimmten Pflanzen bei ihren Blättern ein deutlich höheres Verhältnis von Länge zu Breite aufweisen als die restlichen Akzessionen. Damit ist ein laut Bestimmungsliteratur weiteres Kriterium für die Art *L. barbarum* erfüllt und die auf die Blütenbestimmung gestützte Annahme bestätigt sich mit der Betrachtung und statistischen Auswertung der Blätter.

Es wurde gezeigt, dass die eher dehnbaren Begriffe wie lanzett- oder eiförmig statistisch darstellbar sind und dass dies bei *Lycium* für eine Unterscheidung von *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* einsetzbar ist.

6.1.3. Samen

Die Analyse der Samen zeigt ein eindeutiges Bild, welches die bisherigen Ergebnisse stützt und gleichzeitig einen ersten Einblick in die Identität der Goji-Produkte gewährt.

Die Fläche in mm² der als *Lycium barbarum* bestimmten Akzessionen 1470 und 5548 ist mit etwa 2,5 mm² deutlich geringer als die der *Lycium chinense* Akzessionen bei denen der Median der Boxplots bei etwa 5 mm² liegt. Die Größe der Samen scheint also ein deutliches Unterscheidungskriterium der beiden Goji-Arten zu sein. Jedoch muss auch hier (wie bei den Blüten) eine große Menge an Material verwendet werden, da bei beinahe allen Akzessionen

Ausreißer nach oben und unten vorhanden sind. Die für die Untersuchung gewählte Menge von 30 verschiedenen Samen scheint jedoch ausreichend zu sein, um die Aussage zur Unterscheidung treffen zu können. Alle getesteten Goji-Produkte zeigen Boxplots auf ähnlicher Höhe wie die beiden *L. barbarum* Akzessionen 1470 und 5548, sodass nach der morphologischen Betrachtung der Samen davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei diesen Goji-Produkten um Früchte von *L. barbarum* handelt.

6.2. Fingerprints

6.2.1. RAPD

Die RAPD Methode wird schon seit über 20 Jahren eingesetzt um die Verwandtschaft zwischen Arten aufzuklären. Viele Veröffentlichung zeigen positive Resultate bei der Verwendung dieser auf Zufallsprimer basierten Methode.

Beim Einsetzen des OPC-2 Primers ist eine Homogenität in den Bandenmustern verschiedener Akzessionen gleicher Arten aus dem BGK festzustellen. Die als *Lycium barbarum* bestimmten Akzessionen 1470 und 5548 weisen einen identischen Fingerprint auf. Auch das beispielhaft verwendete Goji-Produkt 2 zeigt ein annähernd identisches Muster, wobei schwach eine zusätzliche Bande mit einer ungefähren Fragmentgröße von 400 Basenpaaren auszumachen ist. Trotz dieser Bande ist davon auszugehen, dass die Früchte des Produktes 2 von einer Pflanze der Art *L. barbarum* stammen, was eine Bestätigung der Samenanalyse darstellen würde. Die *Lycium chinense* Akzessionen aus Karlsruhe (5549 - 6815) zeigen ein in sich identisches Fingerprintmuster, sodass auch hier sicher davon ausgegangen werden kann, dass es sich immer um die gleiche Art handelt, was sich ebenfalls mit den morphologischen Daten deckt. Auch die beiden *Lycium europaeum* Akzessionen (7064 und 8213) zeigen, wenn auch mit unterschiedlichen Intensitäten, das gleiche Bandenmuster. Diese Unterschiede können damit erklärt werden, dass die für die PCR eingesetzte DNA-Konzentrationen nicht komplett übereinstimmte, aber die Banden auf gleicher Höhe sprechen deutlich für die gleiche Art.

Problematisch wird es erst, wenn man die als *L. barbarum* bezeichneten Pflanzen aus dem Herbarium Freiburg mit denen aus dem BGK vergleicht, denn einerseits gleicht keine der drei *L. barbarum* (8684, 8685, 8686) Akzessionen einer *L. barbarum* aus Karlsruhe, außerdem sind die drei *L. barbarum* in sich auch noch verschieden, sodass man bei der Betrachtung dieses

Fingerprints folgern könnte, dass es sich um drei verschiedene Arten handelt. Die Akzession 8684 hat ein sehr stark amplifiziertes Fragment mit einer Größe von 300 Basenpaaren, welches auch bei den Karlsruher *L. chinense* Akzessionen zu sehen ist. Zwar ist das zweite Fragment der *L. chinense* Akzessionen (mit der Größe von 1000bp) bei 8684 nicht zu sehen, dennoch ist ein möglich, dass es sich bei dieser Akzession anstatt einer *L. barbarum* (wie sie gekennzeichnet war) um eine *L. chinense* Art handeln könnte.

Es soll jedoch in aller Deutlichkeit gesagt werden, dass ein eklatantes Problem bei der Verwendung des RAPD-Ansatzes die fehlende Reproduzierbarkeit ist, denn es werden zwar beinahe immer die gleichen Fragmente amplifiziert, aber eine exakte Reproduktion von Ergebnissen ist nahezu unmöglich [25], sodass bei der Verwendung dieser Methode letztendlich jeder Fingerprint einzigartig ist und die Amplifikation nicht allein vom eingesetzten DNA-Template abhängt, sondern dass weitere Parameter wie die Verwendung unterschiedlicher Cycler oder kleinste Unterschiede in den PCR-Ansatzvolumina noch eine Rolle spielen. Vor diesem Hintergrund sollten die erhaltenen Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden.

Es soll noch kurz auf die Negativkontrolle, welche etliche Banden aufweist, eingegangen werden. Eine Untersuchung zeigte, dass viele kommerzielle Taq-Polymerasen mit bakterieller DNA kontaminiert sind [69]. Diese Spuren von bakterieller DNA sind bei „normalen“ PCR-Bedingungen mit um die 30 Zyklen nicht zu sehen, können aber bei einer sehr hohen Anzahl von PCR-Zyklen (wie bei RAPD) mit amplifiziert und später im Gel sichtbar werden, was einen weiteren Nachteil dieses Ansatzes darstellt.

So gut diese Methode für eine schnelle Identifikation verschiedener Arten ist, so offenbaren sich ebenso schnell die offensichtlichen Schwächen eines solchen Ansatzes. Einerseits die fehlende Reproduzierbarkeit und andererseits die über fehlende Sequenzinformation resultierende limitierte Aussagekraft. Es kann also gesagt werden, dass die RAPD-Methode für eine grundlegende Überprüfung sicherlich geeignet ist, aber für tiefer gehende Analysen liefert dieser Ansatz nicht die nötigen Informationen. Bezogen auf die vorliegende Arbeit bedeutet dies eine erste vorsichtige Bestätigung der morphologischen Ergebnisse, denn die als *Lycium barbarum* sowie die als *Lycium chinense* bestimmten Akzessionen aus dem BGK zeigen jeweils ein identisches Fingerprintmuster. Außerdem ist die aufgrund der Samengröße aufgestellte Vermutung, dass es sich bei den Produkten um Früchte von *Lycium barbarum* handelt ebenfalls gestärkt, da das

beispielhaft eingesetzte Goji-Produkt 2, ein beinahe identisches Muster wie die beiden *Lycium barbarum* Akzessionen 1470 und 5548 bildet.

6.2.2. SRAP

Ein Blick auf das Ergebnis der SRAP-PCR (siehe Ergebnisteil Kapitel 5.2.3, Abb. 20) zeigt, dass sich diese Methode für eine Unterscheidung zwischen den nah verwandten Arten *L. barbarum* und *L. chinense* eignet. Die Unterscheidung findet über die Bande mit der Fragmentgröße von knapp 300 Basenpaaren statt, die bei *L. chinense* vorhanden ist und bei *L. barbarum* nicht. Außerdem zeigen die *L. barbarum* Akzessionen eine leichte Bande mit einer Größe von 200 Basenpaaren, die bei *L. chinense* nicht vorhanden ist.

Auch in diesem Fingerprint zeigt sich eine Homogenität innerhalb der *L. barbarum* Akzessionen sowie der *L. chinense* Akzessionen. Was beides, sowohl die morphologische Bestimmung der Pflanzen, als auch den Fingerprint, welcher aus der RAPD-Methode resultierte, stützt. Die Goji-Produkte zeigen wie bei der RAPD das gleiche Muster wie die *L. barbarum* Akzessionen, was auch die zuvor aufgestellte Behauptung, dass die Produkte von *L. barbarum* Pflanzen stammen, stärkt. Auch die restlichen Arten weisen innerartlich (z.B. bei *L. europaeum*) ein festes Muster und interartlich Variationen auf. Eine Ausnahme bilden die Arten *Lycium chilense* (7067) und *Lycium ameghinoi* (8211), welche das gleiche Muster zeigen. Für die Unterscheidung nah verwandter *Lycium*-Arten aus Südamerika scheint dieses Primerpaar nicht geeignet zu sein, wobei andererseits die Art *L. gilliesianum* (8212), welche ebenfalls aus Südamerika stammt, ein komplett anderes Muster ausweist.

Bedauerlicherweise stammt dieses Gelbild von einem frühen Zeitpunkt der Untersuchung, sodass die später hingekommenen *L. barbarum* (8684 – 8686) und *L. europaeum* (8687 und 8688) Akzessionen aus Zeitgründen nicht mehr in diesen Datensatz eingegliedert werden konnten. Es wäre interessant zu sehen, wie die sich laut RAPD Fingerprint abweichenden *Lycium* Akzessionen bei einem SRAP-Ansatz verhalten. Die in der Einleitung beschriebenen Vorteile von SRAP wie die nicht benötigten Sequenzinformation bei gleichzeitiger Gewährleistung der Reproduzierbarkeit sowie der Verlässlichkeit zum Trennen nah verwandter Arten machen diesen Ansatz zu einer Methode, die vor einer RAPD präferiert werden sollte, wobei der Vergleich von denselben Arten mit unterschiedlichen Herkunftsorten noch aussteht.

6.2.3. 5S-Spacerregion Fingerprint

Die 5S-Region ist aus tandemartigen Wiederholungen aufgebaut und die Amplifikation der Spacerregionen zwischen den einzelnen 5S-Einheiten sollte zu einem charakteristischen Muster führen.

Die Verwendung der 5S-Primer, welche für den chinesischen Engelwurz (*Angelica*) designt wurden [34], führte bei den betrachteten *Lycium*-Arten zu einem Fingerprint mit dem *L. barbarum* Akzessionen und *L. chinense* Akzessionen aus dem BGK zwar unterschieden werden können, jedoch beruht diese Differenzierung auf einem nur sehr kleinen Größenunterschied einer Bande, sowie dem schwachen Auftreten einer zusätzlichen Bande bei *L. chinense*. Dennoch reicht diese Aussage zur erneuten Bestätigung der Ergebnisse der beiden anderen Fingerprints RAPD und SRAP. Die drei *L. barbarum* Akzessionen 8684, 8685 und 8686 zeigen wie auch beim RAPD-Fingerprint verschiedene Muster, die sich nicht mit den anderen *L. barbarum* Akzessionen decken. Es bleibt bei der Verwendung dieser Methode zunächst offen, ob diese Unterscheide auf die sich unterscheidenden Standorte zurückzuführen sind oder ob es sich doch um andere Arten handeln könnte.

Erstmals sind die bisher nicht betrachteten Goji-Produkte 10 – 15 Teil einer Untersuchung und es zeigt sich bei der Betrachtung dieses Fingerprints, dass auch diese Produkte wohl ausnahmslos als *L. barbarum* bezeichnet werden können.

Ein wenig überrascht diese Tatsache, denn aufgrund der schwierigen Unterscheidung der Früchte einerseits und der wirtschaftliche Vorteil bei der Verwendung günstigerer *L. chinense* Früchte andererseits, könnte man erwarten, dass nicht alle Produkte *L. barbarum* enthalten. Am Ende des Diskussionsteils findet dazu eine abschließende noch kritischere Betrachtung statt.

6.3. SCAR

6.3.1. RAPD-basierter SCAR-Ansatz

Das Ergebnis der SCAR-PCR (siehe Ergebnisteil 5.2.2., Abb. 19) auf der Basis eines RAPD-Fragments zeigt deutlich, dass die gesuchte Bande nicht amplifiziert werden konnte, da im Gelelektrophoresebild keine Bande mit der Größe von 700 Basenpaaren zu sehen ist, sondern bei fast allen Arten zwei Banden mit einer ungefähren Größe von etwa 300 bzw. 400 Basenpaaren zu sehen sind.

Grund dafür könnte das bereits diskutierte Problem mit den amplifizierten RAPD Regionen und die fehlende Reproduzierbarkeit einer solchen Untersuchung sein. Eine auf Basis von RAPD Primern amplifizierte Bande für die Primer designt werden, führt nur die eigentliche Problematik der RAPD-Methode an sich fort.

Es sieht so aus, als wäre ein SCAR-Ansatz auf der Basis von einem RAPD Fingerprint nicht gebietsübergreifend zur Identifikation von gleichen Arten, in diesem Fall für die Authentifikation von Goji, geeignet.

6.3.2. 5S-basierter SCAR-Ansatz

Die auf einem RAPD-Ansatz basierten SCAR-Primer boten nicht den gewünschten Erfolg, was auf die fehlende Reproduzierbarkeit der RAPD-Ergebnisse zurückgeführt wurde. Der SCAR-Ansatz sollte daher auf der Basis der mittels 5S-Primer amplifizierten Bande, die nur bei *L. barbarum* auftrat, wiederholt werden. Die neu designten SCAR-Primer waren ursprünglich dazu gedacht spezifisch bei *L. barbarum* eine Amplifikation von einem etwa 150 Basenpaar langen Fragment zu erreichen.

Diese Amplifikation sollte bei den *L. chinense* Arten nicht stattfinden um damit eine klare Unterscheidung zu erreichen (Bande bei *L. barbarum* / keine Bande bei *L. chinense*).

Wie im Ergebnisteil beschrieben (Kapitel 5.2.7., Abb. 26) entsprach das Resultat jedoch nicht den Erwartungen, da die gesuchte Bande zwar amplifiziert werden konnte, aber diese sowohl bei *L. chinense* und *L. barbarum* auftrat. Zusätzlich wurden weitere Fragmente amplifiziert. Das zeigt zunächst mal den Anspruch des Designs eines funktionstüchtigen SCAR-Primers. Des weiteren sind die Spacersequenzen zwischen den 5S-Einheiten abgesehen von ihrer teilweise variierenden Länge wohl doch zu ähnlich, als dass man einen Primer für eine spezielle Spacersequenz designen könnte.

Dennoch war dieser Ansatz kein kompletter Misserfolg, da der aus der PCR ungewollt entstandene Fingerprint noch etwas deutlicher ist, als mit den ursprünglich verwendeten 5S-Spacerregion-Primern. Die *L. chinense* Akzessionen zeigen ein deutliches Fragment bei 250 Basenpaaren, welches bei *L. barbarum* Akzessionen und auch den Produkten eindeutig nicht zu sehen ist. Des weiteren sind weitere Fragmente von Spacerregionen noch mehr zu erahnen, als beim zuvor verwendeten 5S-Ansatz.

Daher wäre der Einsatz dieser Primer (mit vorangehender Behandlung mit Farbstoffen) für eine Fragmentanalyse wie beim Tubuin-basierten Polymorphismus in der Zukunft vorstellbar. Damit könnte ein Vergleich von Fragmentanalysen von Introns auf der einen und Spacern auf der anderen Seite angestellt werden.

6.4. ARMS-Ansatz

Die ARMS-Methode soll durch eine diagnostische Bande in einem Agarosegel nah verwandte Arten voneinander unterscheiden. Eine Unterscheidung der beiden als Goji-Beeren vertriebenen Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* war jedoch nicht erfolgreich, da sowohl die Versuche auf der Basis von Sequenzunterschieden in der ITS2 Markerregion als auch in der psbA-trnH Markerregion (im Ergebnisteil nicht gezeigt) keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten.

Bei dem ITS2 basierten ARMS-Ansatz glückte zwar die Amplifikation der diagnostischen Bande, jedoch ist diese auch bei der *L. chinense* Akzession 6815 und *L. chilense* (7067) zu sehen. Der Grund dafür waren unzureichende Sequenzinformationen, denn für die *L. chinense* Akzession 6815 lag an dieser diagnostischen Stelle keine Information vor, weil das Signal der Sequenzierung zu schwach gewesen ist. Wirft man einen Blick auf das Chromatogramm der Sequenzierung stellt man fest, dass an dieser Stelle bei der Akzession 6815 vermutlich eine Thymin-Base vorliegt, was zu keiner Bindung des ARMS-Primer hätte führen dürfen. Jedoch ist auch ein leichter Peak, der für Cytosin spricht, im Chromatogramm zu sehen, welcher durch die Bindung des ARMS-Primers eine Bestätigung findet. Damit kann diese Stelle nicht als diagnostisch für die Unterscheidung von *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* gesehen werden.

Die plastidäre ycf1b Markerregion wies keine diagnostischen Stellen zur Unterscheidung von *L. barbarum* und *L. chinense* auf, weswegen diese Region für einen ARMS Ansatz im Bezug auf die beiden Goji-Arten ungeeignet ist.

Die Problematiken bei der Cos16 Sequenzierung führten dazu, dass für diese Region noch kein ARMS-Ansatz ausgetestet werden konnte, jedoch zeigen die geglückten Sequenzierungen, dass Potenzial für das Design von ARMS-Primern besteht. Ein Versuch, der auf jeden Fall noch durchgeführt werden sollte.

6.5. TBP / Fragmentanalyse

Die Methode der Amplifikation von Introns der β -Tubulin-Genfamilie wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals für die Unterscheidung der beiden Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense*, weiterer *Lycium*-Arten sowie dem Test von verschiedenen Goji-Produkte angewandt.

Von entscheidender Bedeutung ist die adäquate Auswertung der erhaltenen Ergebnisse. Denn die virtuelle Darstellung der in der PCR amplifizierten Fragmente sieht aufgrund der hohen Anzahl der Banden zunächst eher verwirrend als aufschlussreich aus.

Dies ist insbesondere bei der Betrachtung des virtuellen Gelbilds des Intron I der β -Tubulin-Genfamilie der Fall (siehe Ergebnisteil 5.2.4., Abb. 21), so sind bei der *Lycium barbarum* Akzession 1470 87 monomorphe Banden detektiert worden, die restlichen Akzessionen weisen etwa 20-70 Banden auf. Bei der Verwendung des FSAnalyzers kann dem entgegengewirkt werden, indem der Fluoreszenzschwellenwert (über die Threshold-Funktion) erhöht wird, was zu einer niedrigeren Anzahl an detektierten Fragment führt. Jedoch würde dies bedeuten, dass man die Feinheit der erhobenen Daten trübt, was letztendlich zu einem unschärferen Ergebnis führt. Aus diesem Grund wurde die default Funktion (mit einem Threshold von 150) für die Auswertung beibehalten.

Damit die große Menge an Fragmenten in einen besseren Kontext gesetzt werden, besitzt der FSAnaylzer die Möglichkeit die Informationen der entstandenen Fragmente in einem distanzbasierten Dendrogramm darzustellen (zur Entstehung siehe auch Methodenteil Kapitel 4.11.).

Die Art *Lycium oxycarpum* sowie eine Akzession von *Lycium chinense* (6967) sind Teil einer Außengruppe. Die Trennung zwischen *L. oxycarpum* und den restlichen *Lycium*-Arten macht Sinn, denn diese Art stammt als einzige aus Südafrika, was bedeutet dass die geographische Trennung verschiedener *Lycium*-Arten sich auch auf die Monomorphismen der β -Tubulin-Genfamilie niederschlägt. Der Ausreißer der *L.chinense* Akzession 6967 bei der Betrachtung des Intron I kann nicht vollständig geklärt werden. Jedoch sollte die von Fukuda *et al.* (2001) vorgeschlagene Verbreitungsgeschichte der Gattung *Lycium* nicht unerwähnt bleiben, nach der sich die Arten aus der Alten Welt zunächst nach Südafrika und den pazifischen Inseln ausgebreitet haben. Von Südafrika ist die Verbindung von *Lycium* nicht klar, aber es wurde auch erwägt, dass *Lycium* von Südafrika in den eurasischen Raum gelangte. Die Fragmentanalyse des Intron I der β -Tubulin-Genfamilie zeigt eine deutliche Verwandtschaft einer südafrikanischen Art und einer Akzession der

eurasischen Art *L. chinense* Art, was als ein Indiz zur Stützung der Verbreitung von *Lycium* gewertet werden könnte.

Die drei südamerikanischen Arten *Lycium chilense*, *Lycium ameghinoi* und *Lycium gilliesianum* bilden eine monophyletische Gruppe und trennen sich von den drei eurasischen Arten sowie den Produkten, sodass gesagt werden kann, dass die Betrachtung des Intron I sich für die Unterscheidung von Altwelt- und Neuweltarten der Gattung *Lycium* eignet. Auch die beiden *L. europaeum* Akzessionen bilden ein Monophylum. Jedoch ist die Interpretation im Hinblick auf die Goji-Arten und der Produkte schwierig, da die beiden *L. barbarum* Akzessionen nicht zusammenclustern und auch bei *L. chinense* treten Unregelmäßigkeiten auf. So ist laut diesem Ergebnis die Akzession 5552 näher mit den *L. europaeum* Akzessionen verwandt, als mit den restlichen *L. chinense* Akzessionen. Auch die *L. chinense* Akzession 6815 befindet sich in diesem Stammbaum nicht mit den restlichen *L. chinense* Akzessionen in einem Cluster, sodass *L. barbarum* und *L. chinense* bei der Betrachtung des Intron I der β -Tubulin-Genfamilie polyphyletische Gruppen darstellen. Die Goji-Produkte hingegen bilden eine monophyletische Gruppe, es kann jedoch nicht geschlussfolgert werden, ob sie näher verwandt zu den *L. barbarum* oder *L. chinense* Akzessionen sind.

Das Dendrogramm des Intron II der Beta-Tubulin-Genfamilie zeigt eine sehr zufriedenstellende Auftrennung der Arten. Die südafrikanische Art *L. oxycarpum* ist erneut die Außengruppe und sowohl die südamerikanischen als auch die eurasischen Arten bilden monophyletische Gruppen. Bei der Betrachtung der eurasischen Gruppe fällt auf, dass die Art *L. europaeum* näher mit der Art *L. barbarum* verwandt ist als mit *L. chinense*. Alle drei Arten bilden jeweils ein Monophylum. Die einzige Ausnahme ist die Akzession 6815 der Art *L. chinense*, welche sich von den restlichen eurasischen Akzessionen trennt. Die Goji-Produkte und die Art *L. barbarum* zeigen in diesem Baum eine sehr nahe Verwandtschaft, sodass anhand der Betrachtung des Intron II davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den getesteten Produkten um Früchte von *L. barbarum* handelt.

Die Anwendung des Tubulin-basierte Polymorphismus auf die Fragestellung des echten Goji zeigte sich erfolgreich, denn es konnte mit den Monomorphismen des Intron II und des daraus resultierenden distanzbasiertem phylogenetischen Stammbaums einerseits eine klare Trennung zwischen den beiden nah verwandten *L. barbarum* und *L. chinense* Arten bewerkstelligt werden, außerdem wurde gezeigt, dass es sich bei den Goji-Produkten 1 – 8 um Früchte der Art *L.*

barbarum handelt.

Die Anwendung des Tubulin-basierten-Polymorphismus kann also auf die Übertragung ähnlicher Probleme empfohlen werden, wobei auch das Evaluieren von beiden Introns nahegelegt wird. Im Fall vom *Lycium* führte die Betrachtung des Intron II zu den besseren Ergebnissen. Des weiteren scheint die Betrachtung der β -Tubulin-Genfamilie auch für die Biogeographie der Gattung *Lycium* einsetzbar zu sein, da eine klare Trennung zwischen der eurasischen, der einen afrikanischen Art sowie den südamerikanischen Arten auszumachen ist. Im Hinblick auf die immer noch nicht vollständig aufgeklärte Verbreitungsgeschichte von *Lycium* scheint der Ansatz des Tubulin-basierte Polymorphismus eine vielversprechende Methode zu sein.

6.6. Barcoding / Stammbäume

6.6.1. „the most promising plastid DNA barcode of land plants“ - ycf1b

Die Amplifikation der ycf1b Region gelang ohne Probleme und auch die anschließende Sequenzierung lieferte auf Anhieb vergleichbare Sequenzen für alle eingesandten Akzessionen. Dem daraus resultierenden UPGMA Stammbaum ist jedoch zu entnehmen, dass keine zufriedenstellende Auftrennung der nah verwandten als Goji vertriebenen Arten *Lycium barbarum* und *Lycium chinense* stattfindet.

Die Art *L. oxycarpum* stellt die Außengruppe dar, denn es wurde zwar eine Solanaceae Art, die nicht der Gattung *Lycium* angehört, als Außengruppe in den Stammbaum integriert, jedoch war diese (*Solanum triflorum*) näher mit den *Lycium*-Arten verwandt als *Lycium oxycarpum*. In der südafrikanischen Art scheinen also eine Reihe von Mutationen im ycf1b-Gen stattgefunden zu haben, sodass eine sehr deutliche Trennung von den restlichen *Lycium*-Arten vorliegt.

Was bewirkt hat, dass die *L. barbarum* Akzession 1470 sich so weit von anderen nah verwandten Arten trennt, bleibt offen. Eine Möglichkeit sind Fehler bei der Sequenzierung, da sowohl Morphologie als auch die Fingerprints zeigen, dass die Akzession 1470 eine *Lycium barbarum* Pflanze ist. Auch das Einbringen einer ycf1b Sequenz von *Lycium barbarum* aus der ncbi-Datenbank führte zu einer gemeinsamen Einordnung in den Cluster der auch die *L. barbarum* Akzession 5548 enthält. Daher kann man das Ergebnis der ycf1b Sequenzierung von 1470 in Frage stellen.

Abgesehen von *L. oxycarpum* und der fraglichen *L. barbarum* Akzession 1470 ist eine deutliche Trennung von Altwelt und Neuwelt-Arten zu verzeichnen, die sich bei 99% der 1000 Bootstrap

Replikate voneinander trennen. Jedoch findet keine feinere Auftrennung statt, da bei den eurasischen Arten keine monophyletischen Gruppen gebildet werden. Für die Klärung von engen Verwandtschaftsverhältnissen scheint diese Markerregion nicht geeignet zu sein, auch kann nicht gesagt werden, welcher Art die Goji-Produkte angehören, da diese sowohl mit *L. barbarum*, *L. chinense* als auch *L. europaeum* clustern.

Aber es deutet sich in dieser Untersuchung an, dass der plastidäre Marker *ycf1b* für die Verbreitungsgeschichte der Gattung *Lycium* eingesetzt werden könnte, da sowohl die südafrikanische Art *L. oxycarpum*, als auch die südamerikanischen Arten mit stark signifikanten Bootstrap-Werten von den eurasischen Arten getrennt wurden. Diese Markerregion wurde erst in diesem Jahr etabliert, weswegen noch keine umfangreichen Datensätze vorliegen. Von der Gattung *Lycium* ist in der ncbi Datenbank bisher nur die Art *Lycium barbarum* eingetragen. Eine Erweiterung des Datensatzes und dem Sequenzieren weiterer verfügbarer *Lycium*-Arten könnte also für eine „grobere“ Betrachtung der Gattung *Lycium* im Hinblick auf die Biogeographie eingesetzt werden. Für eine sensible Betrachtung von nah verwandten Arten ist diese Markerregion, zumindest in *Lycium*, nicht geeignet. Die Suche nach dem perfekten Barcode für alle Landpflanzen geht damit weiter.

6.6.2. psbA-trnH

Der psbA-trnH Datensatz beinhaltet 37 Akzessionen und ist daher vollständig, was die in Karlsruhe verfügbaren Proben betrifft. Die Akzessionen der Art *Lycium barbarum* aus dem BGK und die Goji-Produkte bilden eine monophyletische Gruppe, was bedeutet, dass auch mit der Betrachtung einer Markerregion, neben den Fingerprints und der Fragmentanalyse, gezeigt wurde, dass fast alle Produkte Früchte der Art *L. barbarum* enthalten. Die einzige Ausnahme ist das Produkt mit der ID 8694, welches außerhalb des *L. barbarum*, *Lycium chinense* und Goji-Produkte Clusters landet. Hier liegt eine Widersprüchlichkeit vor, denn die beiden 5S-Spacerregion-Fingerprints implizieren, dass auch dieses Produkt der Art *L. barbarum* angehört. Die Betrachtung der Markerregion psbA-trnH widerspricht dieser Tatsache, in dem es dieses Produkt im phylogenetischen Stammbaum außerhalb von *L. chinense* und *L. barbarum* einordnet. Daher ist aufgrund der Betrachtung der psbA-trnH Markerregion nicht möglich zu sagen, welcher Art dieses Produkt angehört.

Die als *L. barbarum* gekennzeichnete Akzession 8684, welche bei diversen Fingerprints Ähnlichkeiten mit *L. chinense* aufwies, landet in diesem psbA-trnH basierten UPGMA Stammbaum

in der monophyletischen Gruppe der *L. chinense* Arten, sodass neben den Fingerprints auch die Betrachtung der Markerregion dafür spricht, dass es sich bei dieser Akzession eher um *L. chinense* als um *L. barbarum* handelt. Die beiden anderen als *L. barbarum* bezeichneten Akzessionen 8685 und 8686 aus dem Herbarium Freiburg sind nicht in der monophyletischen Gruppe der Karlsruher *L. barbarum* Akzession zu finden. Beide tauchen in einem Cluster auf, der mit Ausnahme der südafrikanischen Art *Lycium oxycarpum* nur Pflanzen (z.B. *Lycium europaeum* und *Lycium intricatum*) enthält, die in Marokko gesammelt wurden.

Auch die beiden *L. barbarum* Akzessionen 8685 und 8686 wurden in Marokko gesammelt, sodass viele unterschiedliche Arten des gleichen Standpunkts in einem Cluster zu finden sind. Dieser Punkt könnte ganz einfach auf fehlerhafte morphologische Bestimmung zurückführbar sein. Aber die Tatsache, dass die beiden *L. barbarum* Pflanzen von einem ähnlichen Standorts kommen, spricht eher dafür, dass aufgrund der ähnlichen Umweltfaktoren in der psbA-trnH Region Mutationen stattgefunden haben, die den anderen heimischen und dort gesammelten Arten *L. europaeum* oder *L. intricatum* entsprechen. Eine dritte Möglichkeit gründet auf der Annahme das Arten ständig im Fluss und keine fixen Punkte sind, was bedeutet das geographisch isolierte Population derselben Art aufgrund anderer abiotischer Faktoren langsam auseinander evolvieren und als eigene Arten im Entstehungsprozess zu betrachten wären (allopatrische Artbildung).

Es muss auch gesagt werden, dass die beiden zu untersuchenden Arten *L. barbarum* und *L. chinense* in diesem UPGMA Stammbaum zwar monophyletische Gruppen bilden, jedoch liegt der Prozentsatz der Repliken dieses Baumes bei nur 32%, was keine Signifikanz bedeutet, sodass dieses Ergebnis mit Vorsicht zu genießen sein sollte.

Für eine erweiterte Analyse der psbA-trnH Markerregion wurden weitere Sequenzen aus der ncbi-Datenbank in den bisher erhobenen Datensatz eingegliedert.

Die Auftrennung zwischen Altwelt- und Neuwelt-Arten, welche sich schon bei der Betrachtung des Stammbaums, der nur die Akzessionen aus Karlsruhe beinhaltet, andeutete, wird unter Zuhilfenahme zusätzlicher externer psbA-trnH Sequenzinformation bestätigt.

Die Neuwelt-Arten bilden mit Ausnahme von *Lycium gilliesianum* und *Lycium fuscus* eine monophyletische Gruppe. Eine klare Auftrennung von nordamerikanischen und südamerikanischen Arten findet jedoch nicht statt, da sowohl in dem Cluster der einen Großteil der

südamerikanischen Arten enthält, Arten aus Nordamerika auftauchen, als auch umgekehrt. Da keiner der beiden Kontinente ein Monophylum aufweist, kann man von mehreren Verbreitungsereignisse der Gattung *Lycium* auf diesen Kontinenten ausgehen, was sich mit einer Reihe anderer Untersuchungen, die sich mit der Verbreitung der Gattung *Lycium* beschäftigen, deckt [19].

Die nähere Verwandtschaft einiger südafrikanischer (z.B. *Lycium hirsutum*) sowie mediterraner (*Lycium europaeum*) Arten zu den eurasischen Arten *L. barbarum* und *L. chinense* spricht für eine Verbreitung der Gattung *Lycium* von ihrem Ursprungskontinent Südamerika [16] über Südafrika auf den Eurasischen Kontinent. Des weiteren clustern auch einige nordafrikanische und südafrikanische Arten zusammen, sodass hieraus auf eine Verbindung geschlossen werden kann.

Mit einem maximalen Alter der Gattung *Lycium* von etwa 40 Millionen Jahre [16] kann eine Verbreitung von *Lycium* über die Landfläche von Gondwana ausgeschlossen werden, da dieser Urkontinent vor etwa 100 Millionen Jahre auseinanderbrach. Daher ist die Art und Weise der Verbreitung von Südamerika nach Afrika nicht bekannt, es wurden „intercontinental dispersal events“ als Verbreitung vom *Lycium* vorgeschlagen [70].

Auch die Altwelt-Arten bilden bei der Betrachtung der psbA-trnH Markerregion keine monophyletische Gruppe, was ebenfalls auf mehrmalige Verbreitungsereignisse hindeutet.

6.6.3. ITS2

Der auf dem ITS2 Datensatz basierende UPGMA Stammbaum zeigt die Goji-Produkte mit der *Lycium barbarum* Akzession 5548 in einer monophyletischen Gruppe. Diese trennt sich von einem Cluster, welcher sowohl *Lycium chinense* Akzessionen, *Lycium europaeum* Akzessionen sowie südamerikanische als auch südafrikanische Arten enthält.

Das bestätigt auch mit dieser im Kerngenom lokalisierten Region, dass die Goji-Produkte Früchte von *Lycium barbarum* enthalten und dass diese von anderen Arten abgegrenzt werden können.

Jedoch liegt auch bei diesem Stammbaum, ähnlich wie bei psbA-trnH, die Prozentzahl der Bootstrap Replikate bei lediglich 32% und damit weit entfernt vom signifikanten 70%-Wert.

Für eine Detektion von *Lycium barbarum* scheint dieser Marker geeignet, betrachtet man aber den zweiten großen Cluster in diesem Stammbaum, so erkennt man keine deutliche Auftrennung der restlichen Arten. Die *Lycium chinense* und *Lycium europaeum* Akzessionen bilden jeweils polyphyletische Gruppen. Dies ist auf die relativ große innerartliche Varianz dieser Sequenzen

zurückführbar, denn bei einer Gesamtlänge der Sequenz von 293 Basenpaaren gibt es bei den sieben verschiedenen *L. chinense* Akzessionen Unterschiede bei elf Basen, was eine hohe innerartliche Varianz von etwa 2,6% bedeutet. Ähnlich ist es bei *L. europaeum* mit einer IAV von 2,1%. Die höheren Werte, verglichen mit beispielsweise *psbA-trnH* (0% bzw. 0,2%), deuten an, dass die Mutationsrate in der ITS2-Region höher als bei der plastidären Markerregion ist. Bedauerlicherweise ist dieser Wert für *L. barbarum* nicht verfügbar, da nur die ITS2 Sequenz von einer *L. barbarum* Akzession verfügbar ist.

6.6.4. CosII

Die fünf getesteten CosII Regionen wurden ausgewählt, weil bei den in der Veröffentlichung von Levin *et al.* (2009) getesteten *Lycium*-Arten keine Kopien dieser CosII Gene im Genom vorlagen, was nach einer PCR zu einzelnen Banden führte, die anschließend sequenziert werden konnten [52]. Bei der Verwendung der Primer für die in dieser Untersuchung relevanter Arten kam es nur zu schwachen Amplifikation (z.B. mit Cos14, Cos27 und Cos40). Das Cos30 Gen scheint in einigen Akzessionen dupliziert worden zu sein, sodass bei den *Lycium barbarum* Akzessionen, den *Lycium europaeum* Akzessionen, den *Lycium*-Produkten und vereinzelt *Lycium chinense* Akzessionen deutlich zwei Banden zu sehen sind (siehe Ergebnisteil Kapitel 5.2.11., Abb. 31). Einzig das Cos16 Gen scheint für eine direkte Sequenzierung geeignet zu sein, wobei auch bei *Lycium gilliesianum* (8212) eine Doppelbande entstand und bei *Lycium oxycarpum* (8352) keine Amplifikation stattfand. Für die *Lycium*-Art aus Südamerika (8212) zeigt dies, dass auch in diesem Gen eine Duplizierung stattgefunden haben muss. Die Fehlen einer Bande bei der Art aus Südafrika (8352) deutet auf einen kompletten Verlust dieses Gens hin, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das codierte Protein der Acyltransferase in dieser Art einen Ersatz gefunden haben muss.

Zwar ist die Aussagekraft des UPGMA Stammbaums bei nur einer *L. barbarum* und nur einer *L. europaeum* Akzession nicht ganz so stark, aber dennoch kann gesagt werden, dass die CosII-basierte Unterscheidung von *L. barbarum* und *L. chinense* erfolgreich gewesen ist. Verglichen mit den bisher getesteten Markerregionen weisen die Prozentzahlen der Bootstrap Replikate deutlich höhere Werte auf und sind mit 100% am Knotenpunkt von *Lycium barbarum* und den Schwestertaxa *Lycium chinense* und *Lycium europaeum* deutlich signifikant. Somit besteht bei der Betrachtung dieser Markerregion auch eine nähere Verwandtschaft zwischen *L. chinense* und *L.*

europaeum.

Die aus dem Kerngenom stammenden CosII-Regionen bieten vielversprechende Analysemöglichkeiten an. Die Cos16 Region zeigte sich für die Unterscheidung von eurasischen Arten wirksam. Neben der Erstellung von Stammbäumen, bieten die Sequenzunterschiede beispielsweise noch die Möglichkeit zur Erstellung von ARMS-Primern, was bei zukünftigen Untersuchungen unbedingt berücksichtigt werden sollte.

Ein Nachteil dieser Markerregion stellt die fehlende Universalität dar, da es bereits in der gleichen Gattung (*Lycium*) zu Genduplikationen kommen kann. Das erschwert einen unkomplizierten allgemeinen Einsatz, da für die jeweils zu untersuchende Art zunächst verschiedene funktionierende CosII Regionen ausgetestet werden müssen, die keine Duplikationen aufweisen und für eine Sequenzierung geeignet sind. Alternativ müsste eine relativ aufwändige Klonierung der Fragmente durchgeführt werden.

6.7. Zusammenfassung & Ausblick

Das Besondere dieser Arbeit war die Kombination eines morphologischen Ansatzes und einem DNA-basierten Ansatz. Die Verifizierung des bestimmbar Referenzmaterials aus dem BGK über morphologische Merkmale deckt sich mit den unterschiedlich eingesetzten DNA-basierten Methoden, was eine doppelte Bestätigung der Ergebnisse mit einem Höchstmaß an Sicherheit der erhobenen Daten bedeutet.

Mit einer Komplettierung des *Lycium*-Datensatzes bei den Markerregionen (Cos16, ITS2 und *ycf1b*), sowie der Fragmentanalyse über TBP von allen nun 37 vorhandenen Akzessionen in Karlsruhe könnten sicher weitere interessante Aussagen getroffen werden. Ein Hauptaugenmerk sollte hierbei auf die TBP-Fragmentanalyse geworfen werden, da die bisherigen Ergebnisse sehr erfolgreich im Hinblick auf die Trennung verschiedener Arten sowie die Zuordnung der Goji-Produkte gewesen sind. Für die Verbreitungsgeschichte der Gattung *Lycium* im biogeographischen Kontext könnte die Weiterverfolgung dieses Ansatzes ebenfalls interessant sein.

Auch die CosII Regionen zeigen eine deutliche Auftrennung der vorhandenen Akzessionen. Leider gestaltete sich die Sequenzierung schwierig, sodass aufgrund der Cos16 Daten keine Zuordnung der Produkte stattfinden konnte. Der vorhandene Datensatz zeigt sich jedoch sehr ergiebig, sodass eine erneute Evaluierung zu aufschlussreichen Ergebnissen führen könnte. Auch im Hinblick auf die

Gestaltung von ARMS-Primern ist die Cos16-Region sehr vielversprechend.

Die relativ überraschende Erkenntnis, dass beinahe alle (abgesehen von 8694) getesteten Goji-Produkte sicher der Art *Lycium barbarum* entsprachen (sowohl morphologisch als auch genetisch nachgewiesen), stützt die Aussage der Anbieter, dass nur Früchte von *Lycium barbarum* außerhalb des asiatischen Raums vertrieben werden und spricht weiterhin für einen zufriedenstellenden Verbraucherschutz bei diesem Produkt. Jedoch muss einschränkend gesagt werden, dass von jedem getesteten Goji-Produkt für die DNA-Extraktion eine Frucht ausreichte, was bedeutet, dass nur eine Frucht aus der Ganzen meist 100 Gramm Packung der Goji-Beeren für die Extraktion und die anschließende Untersuchung gewählt wurde. Da von einer Frucht auf das gesamte Produkt geschlossen wurde, ist nicht auszuschließen, dass unter den Früchten in den Produkten auch welche von der Art *L. chinense* zu finden sind.

Um in dieser Beziehung eine angemessene Aussagen zu treffen, müsste von einer statistisch signifikanten Anzahl an Früchten eines Produktes die DNA extrahiert werden und mit einer der hier vorgestellten erfolgreichen Methoden getestet werden. Bei einem beispielhaften Test von 100 Früchten könnte dann die Reinheit des jeweiligen Produktes von 1 – 100% angegeben werden.

7. Literaturverzeichnis

- [1] https://www.uni-hohenheim.de/uploads/media/Artikel_FleischWirtschaft_07_2013.pdf aufgerufen am 22.11.2015
- [2] <https://vebu.de/themen/lifestyle/anzahl-der-vegetarierinnen> aufgerufen am 22.11.2015
- [3] https://www.fsai.ie/news_centre/press_releases/horseDNA15012013.html aufgerufen am 22.11.2015
- [4] <http://oceana.org/reports/oceana-study-reveals-seafood-fraud-nationwide> aufgerufen am 22.11.2015
- [5] http://www.chinadaily.com.cn/business/2015-10/20/content_22228738.htm aufgerufen am 22.11.2015
- [6] <http://www.latimes.com/health/la-hew-superfruit-story.html> aufgerufen am 22.11.2015
- [7] Potterat, O. (2010): Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta Med* 76:7–19.
- [8] http://china.org.cn/travel/Ningxia/2014-04/10/content_32056725_3.htm aufgerufen am 22.11.2015
- [9] http://china.org.cn/travel/Ningxia/2014-10/30/content_33916691.htm aufgerufen am 22.11.2015
- [10] http://www.ifocusfood.com/m_content.aspx?id=258 aufgerufen am 22.11.2015
- [11] Xin, T. *et al.* (2013): Super food *Lycium barbarum* (Solanaceae) traceability via internal transcribed spacer 2 barcode. *Food Research International* 54, 1699-1704
- [12] Lexikon der Biologie (1999), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [13] Ernst Mayr: Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York 1942. S. 120.
- [14] https://www.biologie.kit.edu/downloads/Folien/Nick_Plant_Evolution_2015_01_Mechanisms.pdf
- [15] Zitiert aus Chris Stringer (2011): The Origin of Our Species. Penguin / Allen Lane, S. 245, ISBN 978-1-84614-140-9
- [16] Fukuda, T. *et al.* (2000). Phylogeny and Biogeography of the Genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from Chloroplast DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 19, 246–258
- [17] Rachel A. Levin *et al.* (2007): Evolutionary Relationships in Tribe Lycieae (Solanaceae). *ISHS Acta Horticulturae* 745
- [18] Hunziker, A. T. (2001): Genera solanacearum. A.R.G. Gantner Verlag K.-G., Germany
- [19] Levin, R.A. and Miller, J.S. (2005): Relationships within tribe Lycieae (Solanaceae): Paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism. *American Journal of Botany* 92(12): 2044–2053. 2005.
- [20] Levin, R.A. and Miller, J.S. (2005): Relationships within tribe Lycieae (Solanaceae): Paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism. *American Journal of Botany* 92(12): 2044–2053. 2005.
- [21] Flora of China, abrufbar auf http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=119146
- [22] Williams, J.G.K. *et al.* (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22

- [23] Zhang, K.Y.B. *et al.* (2001). Differentiation of *Lycium barbarum* from its Related *Lycium* Species using Random Amplified Polymeric DNA. *Plant Med* 67, 379-381
- [24] Poczai, P. *et al.* (2013): Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods* 9:6.
- [25] Jones, C.J. *et al.* (1997a). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3, 381-390.
- [26] Li G. and 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* 2001, 103:455-461.
- [27] Budak, H. *et al.* (2004): Application of Sequence-related Amplified Polymorphism Markers for Characterization of Turfgrass Species. *HortScience* August 2004 vol. 39 no. 5 955-958
- [28] Uzun, A. *et al.* (2009): Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Scientia Horticulturae* 121 (2009) 306-312
- [29] Liu, Z. *et al.* (2012): Genetic diversity of the endangered and medically important *Lycium ruthenicum* Murr. revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Biochemical Systematics and Ecology* Volume 45, December 2012, Pages 86-97
- [30] Szymanski M, *et al.* (2002): 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res.* 30 (1): 176-8.
- [31] Gongadze, G. M. (2012): 5S rRNA and ribosome. *Biochemistry (Moscow)* 76(13): 1450-1464.
- [32] Ciganda, M. and Williams, N. (2011). Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2011; 2(4): 523-533.
- [33] Cai, Z. H. *et al.* (1999): Molecular diversity of 5S-rRNA spacer domain in *Fritillaria* species revealed by PCR analysis. *Planta Med.* 1999, 65, 360-364.
- [34] Zhao *et al.* (2003): Molecular Genetic and Chemical Assessment of *Radix Angelica* (Danggui) in China. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2576-2583
- [35]
https://www.biologie.kit.edu/downloads/Folien/Nick_Plant_Evolution_2015_03_Molecular_Phylogeny.pdf
- [36] Neil A. Campbell *et al.* (2009): *Biologie*, 8. Auflage S.450, Pearson Deutschland GmbH
- [37] Bardini, M. *et al.* (2004): Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome* 47: 281.291 (2004)
- [38] Breviaro, D. *et al.* (2007): High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined b-tubulin introns. *Mol Breeding* (2007) 20:249-259
- [39] Dong, W. *et al.* (2015): *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Sci. Rep.* 5, 8348

- [40] Pang, X. *et al.* (2012): Utility of the trnH-psbA intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis. PLoS ONE 7(11): e48833
- [41] Hebert, P.D. *et al.* (2003): Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 2003 Feb 7;270(1512):313-21.
- [42] Hollingsworth, P.M. *et al.* (2009): A DNA barcode for land plants. Proc Natl Acad Sci (PNAS) vol. 106: 12794–12797.
- [43] Hollingsworth, P.M. *et al.* (2011): Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS ONE 6(5): e19254
- [44] Fazekas, A.J. *et al.* (2008): Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. PLoS ONE 3: e2802.
- [45] Kikuchi, S. *et al.* (2013): Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane. Science 339, 571–574
- [46] Dong, W. *et al.* (2012): Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. PLOS ONE 7, e35071
- [47] rRNA markers – a source for inferring evolution (Horn 2014, unveröffentlicht)
- [48] Chen, S. *et al.* (2010): Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PloS One, 5(1), e8613.
- [49] Li, D. *et al.* (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 108(49), 19641–19646.
- [50] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/orthologe-gene/48295>
- [51] Wu, F. *et al.* (2006): Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: a test case in the euasterid plant clade. Genetics 174, 1407–1420
- [52] Levin *et al.* (2009): The utility of nuclear conserved ortholog set II (COSII) genomic regions for species-level phylogenetic inference in Lycium (Solanaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 53 (2009) 881–890
- [53] <https://www.sgn.cornell.edu/marker/SGN-M7099/details>, Verweis aus [52]
- [54] https://www.sgn.cornell.edu/markers/cosii_markers.pl
- [55] Cho-Wing Sze, S *et al.* (2008). Application of SCAR (Sequence characterized amplified region) analysis to authenticate Lycium barbarum (wolfberry) and its adulterants. Biotechnol. Appl. Biochem. 51, 15-21
- [56] Sang, T. *et al.* (1997): Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). American journal of botany, 84(9), p.1120.

- [57] Tate, J.A. and Simpson, B.B. (2003): Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, 28(4), pp.723–737
- [58] Chiou, S.J. *et al.* (2007): Authentication of Medicinal Herbs using PCR-Amplified ITS2 with Specific Primers. *Planta Medica* 73(13):1421–1426.
- [59] Tanabata, T. *et al.*, (2012): SmartGrain: High-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. *Plant Physiology*, 160(December), pp.1871–1880.
- [60] Bylesjö, M. *et al.* (2008): LAMINA: a tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters. *BMC Plant Biology*, 8(1), p.82.
- [61] available at <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/>
- [62] Tamura, K. *et al.* (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013 Dec; 30(12): 2725–2729
- [63] available at <http://www.geospiza.com/ftvdlinfo.html>
- [64] Zmasek, C.M. and Eddy, S.R. (2001): ATV: display and manipulation of annotated phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(4), pp.383–384.
- [65] Asnicar, F. *et al.* (2015): Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. *PeerJ*, 3, p.e1029.
- [66] Flora vascular. Tomo 3 - Junta de Andalucía; abrufbar auf http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/1_consejeria_de_medio_ambiente/dg_gestion_medio_natural/biodiversidad/static_files/flora_y_hongos/libro_flora_vascular/flora_vascular_tomo_3.pdf
- [67] Schmeil / Fitschen (2011): *Die Flora Deutschlands und der angrenzenden Länder*, 95. Auflage, Quelle & Meyer Verlag, Wiebelsheim
- [68] Davis, P.H. and Heywood, V.H. (1963). *Principles of angiosperm taxonomy*. Princeton, New Jersey: Van Nostrandpage. p. 154.
- [69] Iulia, L. *et al.* (2013): The evidence of contaminant bacterial DNA in several commercial Taq polymerases. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 18, No. 1, 2013
- [70] Raven, P.H. and Axelrod, D.I. (1974): Angiosperm biogeography and past continental movements. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 61: 539–673.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: http://www.botanik.kit.edu/garten/img/Lycium_berry_rdax_1200x800.jpg

Abb. 1: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c6/Map_of_PRC_Ningxia.svg

Abb. 1: http://china.org.cn/travel/Ningxia/2014-04/10/content_32056725_3.htm

Abb. 2:

<http://www.antarktisverlag.de/WebRoot/Store16/Shops/63414225/4F7A/5C76/5A1C/19A9/5714/C0A8/29BA/0965/21-010b.jpg>

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

Abb. 3: aus Fukuda, T. *et al.* (2000). Phylogeny and Biogeography of the Genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from Chloroplast DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 19, 246–258

Abb. 4: aus Levin, R.A. and Miller, J.S. (2005): Relationships within tribe Lycieae (Solanaceae): Paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism. *American Journal of Botany* 92(12): 2044–2053. 2005.

Abb. 5: Fotografie von Sophie Engert im BGK

Abb. 6: <http://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT7690/lec08/SRAP.mechanism.gif>

Abb. 7: aus Bardini, M. *et al.* (2004): Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome* 47: 281.291 (2004)

Abb. 8: aus Eickbush, T. H. & Eickbush, D.G. (2007): Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes. *Genetics* 175(2):477–485.

Abb. 8: http://www.gatc-biotech.com/fileadmin/Kundendaten/Upload_8.0/Bilder/ITS%20region%20Analysis.png

Abb. 14: Fotografie von Sophie Engert im BGK

Alle weiteren nicht aufgezählten Abbildungen wie Gelelektrophoresebilder, Stammbäume, Pflanzenaufnahmen oder Schaubilder sind Laufe der Arbeit entstanden.