

Protokoll  
F2 Praktikum: Plant Evolution

**Der wahre Goji?**



Verfasser: Leonie Hacker & Laura Feller

Betreuer: Dr. Thomas Horn

12. Juni 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Zielsetzung.....	3
<b>2. Material</b> .....	4
2.1 Geräte.....	4
2.2 Softwares und Datenbanken.....	4
2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	5
2.4 Puffer.....	5
2.5 Kits.....	5
2.6 Primer.....	5
2.7 Goji-Früchte.....	6
<b>3. Methoden</b> .....	8
3.1 Keimungsversuch.....	8
3.2 Morphologische Unterscheidung von Früchten und Samen.....	8
3.3 Ermittlung des Trockengewichts der Früchte.....	9
3.4 Ermittlung der Samenanzahl pro Frucht.....	9
3.5 ARMS-PCR.....	9
3.6 PCR für die Sequenzierung von Art-spezifischen Bereichen.....	11
3.7 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	11
3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	11
<b>4. Ergebnisse</b> .....	13
4.1 Ergebnis des Keimungsversuchs.....	13
4.2 Morphologische Unterscheidung der Früchte.....	14
4.3 Morphologische Unterscheidung der Samen.....	15
4.4 Ermittlung des Fruchtgewichts.....	17
4.5 Ermittlung der Samenanzahl pro Frucht.....	18
4.6 ARMS-PCR.....	20
4.7 PCR für die Sequenzierung.....	24
<b>5. Diskussion</b> .....	26
5.1 Keimungsversuch.....	26
5.2 Morphologische Unterscheidung verschiedener <i>Lycium</i> -Arten.....	26
5.3 Ermittlung des Fruchtgewichts und der Samenanzahl.....	27
5.4 ARMS-PCR.....	28
5.5 Fazit und Ausblick.....	29
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	30

# 1. Einleitung

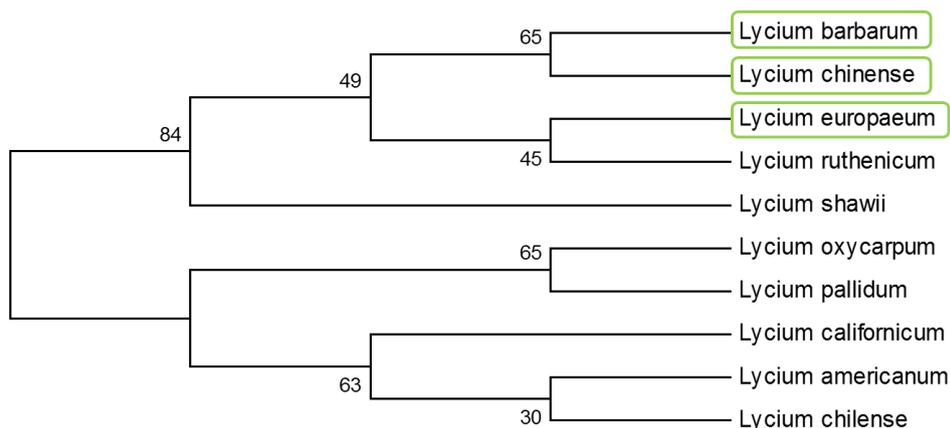
Goji-Beeren sind die Früchte von *Lycium barbarum* (gewöhnlicher Bocksdorn), der häufig auch Chinesische Wolfsbeere oder Teufelzwirn genannt wird (Amagase, 2011). Die Bezeichnung leitet sich von dem chinesischen Namen „gouqi“ ab. Die zu den Nachtschattengewächsen gehörende Pflanze wächst als Strauch und kann ein bis drei Meter hoch werden. Die bogenförmig herabhängenden Äste besitzen lanzettförmige Blätter und violett gefärbte Blüten (Potterat 2010). Die Blütezeit ist von Juni bis September und die Früchte reifen von August bis Oktober (Roth *et al.*, 2008). *L. barbarum* stammt ursprünglich aus Ostasien, wobei die genaue Herkunft unbekannt ist (Bryan *et al.*, 2008). Von dort hat er sich ausgebreitet und ist nun in den gemäßigten bis subtropischen Regionen vorzufinden (Fukuda 2001).

Die Verbreitung der Goji-Samen erfolgt unter anderem durch Vögel (Hitchcock, 1932; D'Arcy, 1979; Hunziker, 1979). Bei der sogenannten Ornithochorie werden die Beeren von Vögeln gegessen und alle oder einige Samen wieder ausgeschieden (Ridley, 1930). Für einige Pflanzenarten, darunter auch Vertreter der Solanaceae, konnte durch diesen Prozess eine verbesserte Keimungsfähigkeit der Samen nachgewiesen werden (Barnea *et al.*, 1990). Grund dafür könnte die Trennung der Samen vom Fruchtfleisch sein, in welchem Keimungsinhibitoren enthalten sind (Evenari, 1949). Zudem wurde eine Skarifizierung der Samenoberfläche, durch das saure Milieu im Magen der Vögel beobachtet. Durch den Abrieb der Samenschale und teilweise Zerstörung der Zellwand, wird den Samen die Aufnahme von Wasser und Sauerstoff ermöglicht und die Keimung induziert (Barnea *et al.*, 1990; Agami & Waisel, 1988).

Ursprünglich war die Goji-Beere ein traditionelles pflanzliches Heilmittel in asiatischen Ländern, mit dem Ruf die Leber und die Niere zu stärken und die Augen zu erleuchten. Für diese heilende Wirkung sind vor allem die speziellen Polysaccharide der Goji-Beere, auch LBPs (*Lycium barbarum* Polysaccharide) genannt, sowie die reichlich enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe, wie Carotinoide, Alkaloide, Vitamine, Lipide, Aminosäuren und Spurenelemente, verantwortlich.

Die Goji-Beere gewinnt nun auch zusehends an Bekanntheit in europäischen Breitengraden. Seit Beginn des 21. Jahrhunderts werden Goji-Beeren und deren

Produkte auch in westlichen Ländern verkauft und sie gilt als die neue „Superfrucht“. (Karp, 2009; McLaughlin, 2006; Sohn, 2008). Ihr wird nachgesagt eine Wirkung als Immunmodulator zu haben, die Hautalterung zu verringern, Glaukome vorzubeugen, als Antioxidanz zu wirken und für ein generelles Wohlbefinden zu sorgen. Diese positiven Wirkungen wurden bereits in Studien getestet und nachgewiesen (Amagase & Farnsworth, 2011; Amagase & Nance, 2008; Chen *et al.*, 2012). Um diese sogenannte Wunderbeere nun für die breite Bevölkerung zugänglich zu machen, wird sie in allen möglichen Formen, vor allem in Internetläden, für einen hohen Preis zum Verkauf angeboten. *L. barbarum* ist sehr nah verwandt mit *Lycium chinense* und *L. europaeum* (Abb. 1). Das Problem ist jedoch, dass *L. barbarum*, normalerweise um einiges teurer als seine nahe Verwandten ist. Morphologisch sind diese Arten jedoch nur sehr schwer auseinanderzuhalten.



**Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum einiger *Lycium*-Arten.**

Die Topologie ist basierend auf Sequenzdaten von psbA/ trnH. Die nahe Verwandtschaft von *L. barbarum*, *L. chinense* und *L. europaeum* ist zu erkennen.

Zum Schutz der Konsumenten, müssen deshalb andere Techniken gefunden werden um die Arten genau identifizieren zu können. Im Fall der Goji-Beere, wurden bisher schon einige Methoden versucht sie auf molekularbiologischer Ebene unterscheiden zu können. Bereits 2001 wurde eine RAPD (Random amplified polymorphic DNA) gemacht. Mithilfe von Zufallsprimern entstanden artspezifische Banden (Cheng *et al.* 2001). 2004 fand eine FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) statt. Hierbei wurde mittels Spektroskopie die artspezifische Menge an Inhaltsstoffen untersucht

(Peng *et al.*, 2004). Auf Basis der RAPD, wurde 2008 eine SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) durchgeführt. Nach Sequenzierung der artspezifischen Bande, wurden hier artspezifische Primer angefertigt (Sze *et al.*, 2008). 2013 wurden die Arten schließlich mittels ITS2 (Internal Transcribed Spacer) Barcoding unterschieden (Xin *et al.*, 2013). Die ITS2 Region, ist eine variable Region zwischen der großen und der kleinen ribosomalen Untereinheit. Durch Sequenzierung dieses Bereichs können verschiedene Arten molekular unterschieden werden (Li *et al.*, 2011). Eine weitere Methode ist die ARMS (Amplification Refractory Mutation System) PCR. Hierfür werden Marker-Primern zur Amplifizierung der ITS2 Region und ein diagnostisches Primerpaar, das an einer Stelle bindet, die in den verschiedenen Arten unterschiedlich ist (z.B. durch eine Mutation) verwendet. Durch die Marker-Primer wird bestätigt, dass die PCR erfolgreich war. Die diagnostischen Primer dienen der Unterscheidung der verschiedenen Arten, da nur dann ein zweiter DNA-Abschnitt amplifiziert wird, wenn diese Primer an der spezifischen mutierten Region binden können.

## **1.1 Zielsetzung**

Ziel des Versuchs ist es zum einen, die verschiedenen *Lycium*-Arten auf morphologische Unterschiede, hinsichtlich Fruchtgewicht, Samenanzahl und des Aussehens von Frucht und Samen zu untersuchen. Zum anderen, sollen ARMS-PCRs mit verschiedenen diagnostischen Primern durchgeführt werden, um *L. barbarum* von seinen nahe Verwandten zu unterscheiden. Zusätzlich wird die Auswirkung von Salzsäure auf die Samenkeimung getestet.

## 2. Material

### 2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammern	Mupid-One	Advance Co. LTD (Tokyo, JP)
Gel Scanner	Safe Imager	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Inkubator	Percival Intellus Control System, Model E-30B	CLF PlantClimatics GmbH, Wertingen Germany
Mikroskope und Kameras	Kamera Coolpix L840 Leica Stereolupe m420	Nikon GmbH Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler	TPersonal	Biometra
Vortexer	Vortex Genie	Bender & Hobein AG, Schweiz
Waage	Analytical Plus	Ohaus Corporation, USA
Zentrifuge	Haraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific

### 2.2 Softwares und Datenbanken

Tabelle 2: Hinzugezogene Softwares und Datenbanken

Programm oder Datenbank	Verwendung	Referenz
NCBI	Informationen über DNA-Sequenzen	National Center for Biotechnology (USA)
MEGA6	Sequenzalignment und Stammbaumanalyse	Center for Evolutionary Medicine and Informatics (USA)
Eurofins Genomics	Informationen über Primer	Eurofins Genomics, Germany

## 2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden über die Firmen Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Eppendorf AG (Hamburg), Grade Invitrogen GmbH (Karlsruhe) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) bezogen.

## 2.4 Puffer

**50x TAE Puffer** (für 4 Liter; pH 8,3)

2 M Tris-Acetate (Trishydroxymethylaminomethan Acetat)

0,05 M EDTA

Der Puffer wurde in 0,5x Konzentration eingesetzt.

## 2.5 Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren Germany
InnuPREP Plant DNA Kit	Analytik Jena AG, Germany

## 2.6 Primer

Tabelle 4: Verwendete Marker Primer

Name		5'-3' Sequenz	Lokus	Referenz
BEL-2	f	GATGCGGAGATTGGCCCCCGTGC	ITS 2	Chiou 2007
BEL-3	r	GACGCTTCTCCAGACTACAAT		
trnH	r	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	psbA- trnH	trnH2, Tate et al. 2003
psbA	f	GTTATGCATGAACGTAATGCTC		psbAF, Sang et al. 1997
trnH- Zub	f	CGGGAATTGAACCCGCG	trnH- trnK	Zuber et al. 2009

**Tabelle 5: Verwendete diagnostische Primer**

Name	5'-3' Sequenz	
GojiBEL-117C-fw	CTCGAAGTGTCGTGTCC	Thomas, Lycium Goji ITS2 ARMS
GojiBEL-144G-rv1	CTAAGCGCAAGAAGGGACC	Thomas, Lycium Goji ITS2 ARMS
GojiBEL-144G-rv2	CTAAGCGCAAGAAGGGTAC	Thomas, Lycium Goji ITS2 ARMS
GojiBEL-144G-fw	GCGCGTTTGGCCTCTCG	Thomas, Lycium Goji ITS2 ARMS

## 2.7 Goji-Früchte

**Tabelle 6: Verwendete *Lycium* Akzessionen des Botanischen Gartens Karlsruhe**

Nr.	Id	Taxon
1	8211	<i>L. ameghinoi</i>
2	1470	<i>L. barbarum</i>
3	5549	<i>L. barbarum</i>
4	5550	<i>L. barbarum</i>
5	5548	<i>L. barbarum</i>
6	7067	<i>L. chilense</i>
7	5552	<i>L. chinense</i>
8	5551	<i>L. chinense</i>
9	6815	<i>L. chinense</i>
10	6967	<i>L. chinense</i>
11	8213	<i>L. europaeum</i>
12	7064	<i>L. europaeum</i>
13	5553	<i>L. europaeum</i>
14	8212	<i>L. gilliesianum</i>
15	8352	<i>L. oxycarpum</i>

**Tabelle 7: Verwendete Goji-Produkte**

Nr.	Id	Taxon/Produktbezeichnung	Herkunft	Deklaration
16	LP1/ 8603	Hanoju Goji Beeren	HANOJU Deutschland GmbH	<i>L. barbarum</i>
17	LP2/ 8604	Bio-Goji-Beeren	Kräuterhaus Sanct Bernhard KG	<i>L. barbarum</i>
18	LP3/ 8605	Goji-Acai	Grubauer's Gewürze & Teeversand	Gojibeeren
19	LP4/ 8606	Goji-Beeren	Unkown (Fan Zhang?)	?

20	LP5	Goji	Ning Xia	?
21	LP6	Goji	Yun nan	?
22	LP7	Goji	Guang Xi	?
23	LP8	Goji	Xin jiang	?
24	LP9	Goji	Gansu, Jing Yuan	?

### 3. Methoden

#### 3.1 Keimungsversuch

Für den Keimungsversuch wurden je 16 Samen von den Akzessionen *L. barbarum* (5548, 5549), *L. chinense* (5552, 6967) und *L. europaeum* (5553) in unterschiedlich konzentrierter, wässriger Salzsäurelösung inkubiert. Verwendet wurden 0 M (negativ Kontrolle), 10 mM, 100 mM und 1 M Salzsäurekonzentrationen.

**Tabelle 8: Eingesetztes Volumen an HCl zur Herstellung der verschiedenen Salzsäurelösungen**

Konzentration $c(\text{dHCl})$ in mol $\times \text{l}^{-1}$	Volumen $V$ (36 %iger) HCl in ml	Volumen $V$ dH <sub>2</sub> O
0,01	0,04	49,96
0,10	0,4	49,6
1,00	4,0	46

Die Inkubation erfolgte für 30 Min in Falcons auf dem Schütteltisch. Anschließend wurden die behandelten Samen mit dH<sub>2</sub>O auf Filterpapieren in Trichtern 2x gewaschen und in vorbereitete Gerdaboxen (Filterpapiere auf Netzen) ausgebracht. Die Boxen wurden mit dH<sub>2</sub>O gefüllt, bis die Netze schwammen und mit einem luftdurchlässigen Deckel verschlossen. Die Inkubation erfolgte zunächst im Inkubator bei einem 17°C-15°C Tag-/Nachtrhythmus. Nach ca. 10 Tagen wurde die Temperatur um 2°C erhöht.

#### 3.2 Morphologische Unterscheidung von Früchten und Samen

Die Früchte der verschiedenen Akzessionen wurden mit einer Nikon-Kamera möglichst im gleichen Abstand fotografiert, um die Aufnahmen später miteinander vergleichen zu können. Ausgewählt wurden dafür Früchte, die in ihrer Morphologie dem Durchschnitt der jeweiligen Akzession entsprachen. Die zur Ermittlung der Samenanzahl isolierten Samen wurden mit 25-facher Vergrößerung mit der Stereolupe fotografiert. Jeweils 2 Samen pro Akzession wurden aufgenommen.

### 3.3 Ermittlung des Trockengewichts der Früchte

Um das Trockengewicht der verschiedenen Akzessionen aus den Jahren 2013/ 2014 zu ermitteln, wurden 5x je 10 Früchte gewogen. Bereits gewogene Früchte wurden in die entsprechende Packung zurückgelegt, gemischt und erneut 10 Früchte gezogen, da von vielen Akzessionen nur noch wenige vorhanden waren.

### 3.4 Ermittlung der Samenanzahl pro Frucht

Über Nacht wurden jeweils 10 Früchte der verschiedenen Akzessionen zum Quellen in Falcons mit ausreichend dH<sub>2</sub>O gelegt. Die Beeren wurden am nächsten Tag zerdrückt, die Samen isoliert und die Anzahl pro Frucht ermittelt.

### 3.5 ARMS-PCR

Zur Identifizierung der *Lycium*-Arten auf molekularer Ebene, wurde die ARMS-PCR (Amplification refractory mutation system-Polymerase chain reaction) angewendet. Für diese PCR werden 3 verschiedene Primer verwendet. Die ersten beiden Primer sind ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer (BEL2 und BEL3), die für die Transkription des variablen ITS2 Bereichs, zwischen der großen und der kleinen ribosomalen Untereinheit, verantwortlich sind. Die Amplifizierung dieses Bereiches dient als Bestätigung, dass die PCR erfolgreich war. Der dritte Primer (117 fw, 144 fw, 144 rv1, 144 rv2) bindet an einer Stelle innerhalb der variablen ITS2 Region, in der eine Art-spezifische Mutation vorliegt. Die erfolgreiche Amplifizierung dieses Bereichs ist am Ende die diagnostische Bande, die zur Identifizierung der Art dient.



Abbildung 2: Bindstellen für die BEL2/3 Primer.

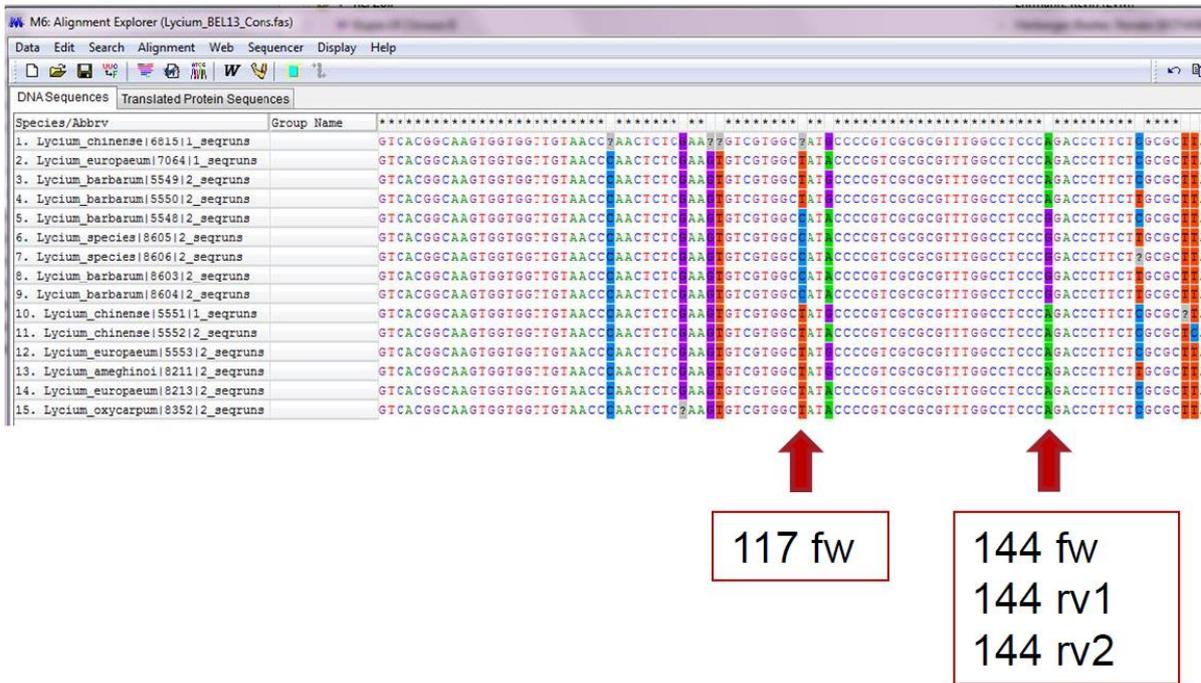


Abbildung 3: Bindestellen für die ARMS-Primer in der ITS2 Region.

Das Gesamtvolumen eines ARMS-PCR Ansatzes betrug 10 µl pro Probe. Dieser setzte sich zusammen aus je 6,6 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl Puffer (10x), 1 µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl dNTPS (10 mM), 0,2 µl BEL2-Primer (10 µM), 0,2 µl BEL 3 Primer (10 µM), 0,2 µl diagnostischen Primer (117 fw, 144 fw, 144 rv1 oder 144 rv2, je 10 µM), 0,5 µl *Lycium* DNA (50 ng/µl) und 0,1 µl Polymerase (5 U/µl). Die Komponenten wurden in absteigendem Volumen auf Eis pipettiert, anschließend gevortext und dann in einen PCR-Cycler gestellt, in welchem dann die Amplifizierung erfolgte.

Tabelle 9: Thermocycler Programm für die ITS2 Amplifizierung

°C	95	95	56	68	68	12
Zeit	2 min	30 s	30 s	45 s	5 min	Pause
Vorgang	Initiale Denaturierung	Amplifikation: 1. Denaturierung 2. Primer Annealing 3. Elongation → Wiederholung 40x			Finale Elongation	Lagerung

### **3.6 PCR für die Sequenzierung von Art-spezifischen Bereichen**

Für die Sequenzierung Art-spezifischer Bereiche in den *Lycium*-Produkten LP5-LP9, wurden 2 verschiedene Primerpaare verwendet, zum einen BEL2 und BEL3 und zum anderen psbA und trnH. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes für die Sequenzierungen betrug 30 µl. Dieser setzte sich zusammen aus je 20,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 3 µl Puffer (10x), 3 µl BSA (10 mg/ml), 0,6 µl dNTPS (10 mM), 0,6 µl psbA-Primer (10 µM), 0,6 µl trnH 3 Primer (10 µM), 1,5 µl *Lycium* DNA (50 ng/µl) und 0,2 µl Polymerase (5 U/µl). Auch hier wurden die Komponenten in absteigendem Volumen auf Eis pipettiert, anschließend gevortext und dann in einen PCR-Cycler für die Amplifizierung gestellt. Verwendet wurde das Thermocycler Programm aus Tabelle 9. Anschließend wurde die DNA-Quantität und Qualität mit Hilfe des Spektrophotometers ermittelt und die Proben für die Sequenzierung vorbereitet. Für die Sequenzierung mit dem Primerpaar BEL2/3 wurden 6 µl PCR-Produkt, 2 µl H<sub>2</sub>O und jeweils 3 µl von den Primern BEL2 und BEL 3 zusammen pipettiert. Für die andere Sequenzierung 5 µl PCR-Produkt, 4 µl H<sub>2</sub>O und je 3 µl der beiden Primer psbA und trnH.

### **3.7 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung des Erfolgs einer PCR und zur Auftrennung der DNA-Fragmente, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden je 2 µl *Lycium*-Proben DNA nach der PCR mit je 0,5 µl Loading Dye versetzt, dann auf ein 1,5%iges Agarosegel geladen und anschließend in einem Gelelektrophoresesystem für 28 min bei 100 V laufen gelassen. Die Agarose wurde zuvor in 0,5x TAE-Puffer für ca. 2 min in der Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem sie etwas abgekühlt war, wurden 0,05 µl SYBR-Green pro ml Agarosegel, zur späteren Sichtbarmachung der Banden, dazu pipettiert. Zur Bestimmung der Bandengröße wurden zusätzlich in eine Geltasche noch 1,5 µl 50- oder 100 kb Marker, geladen. Anschließend konnten die Nukleinsäuren in einer Geldokumentationsstation detektiert werden.

### **3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte an einem Spektrophotometer von Nanodrop. Hierbei wurden jeweils 2 µl Probe auf das Photometer geladen, welches

dann die Menge in ng/μl im Vergleich zum Blindwert, dem Puffer in dem die DNA gelöst war, angab. Die Konzentration wurde bei 240, 260 und 280 nm über die Absorption der Basen bestimmt.

Die Formel zur Bestimmung der Konzentration setzt sich folgendermaßen zusammen:

$$C [\mu\text{g/ml}] = A_{230/260/280} \times V \times F$$

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnis des Keimungsversuchs

Je 16 Samen der Akzessionen von *L. barbarum* (5548, 5549), *L. chinense* (5552, 6967) und *L. europaeum* (5553) wurden mit verschiedenen Salzsäurekonzentrationen behandelt und in Gerdaboxen ausgebracht, um den Effekt auf die Keimung zu untersuchen. Ca. 10 Tage nach Inkubation begannen viele der behandelten Samen zu schimmeln, woraufhin die Inkubationstemperatur um 2°C erhöht wurde. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 3 Wochen haben jedoch nur 7 der insgesamt 320 Samen in 4 verschiedenen Gerdaboxen gekeimt. In den meisten Boxen war keine Keimung zu beobachten. Tabelle 10 zeigt das Ergebnis des Keimungsversuchs.

Bei einer Behandlung der Samen mit 10 mM Salzsäurelösung (HCl) keimte nur 1 Samen von *L. barbarum* (5548). 2 Samen dieser Akzession keimten nach einer Behandlung mit einer Konzentration von 100 mM HCl. Von *L. chinense* (6967) keimte nur 1 mit 100 mM behandelte Samen und von *L. europaeum* (5553) war eine Keimung von 3 Samen nach 1 M HCl-Konzentration erkennbar. In allen weiteren Boxen konnte keine Keimung beobachtet werden. Obwohl einige Samen länger in Salzsäure inkubiert wurden als andere, infolge des langwierigen Waschschrilles, hatte dies vermutlich keine Auswirkung auf die Keimung.

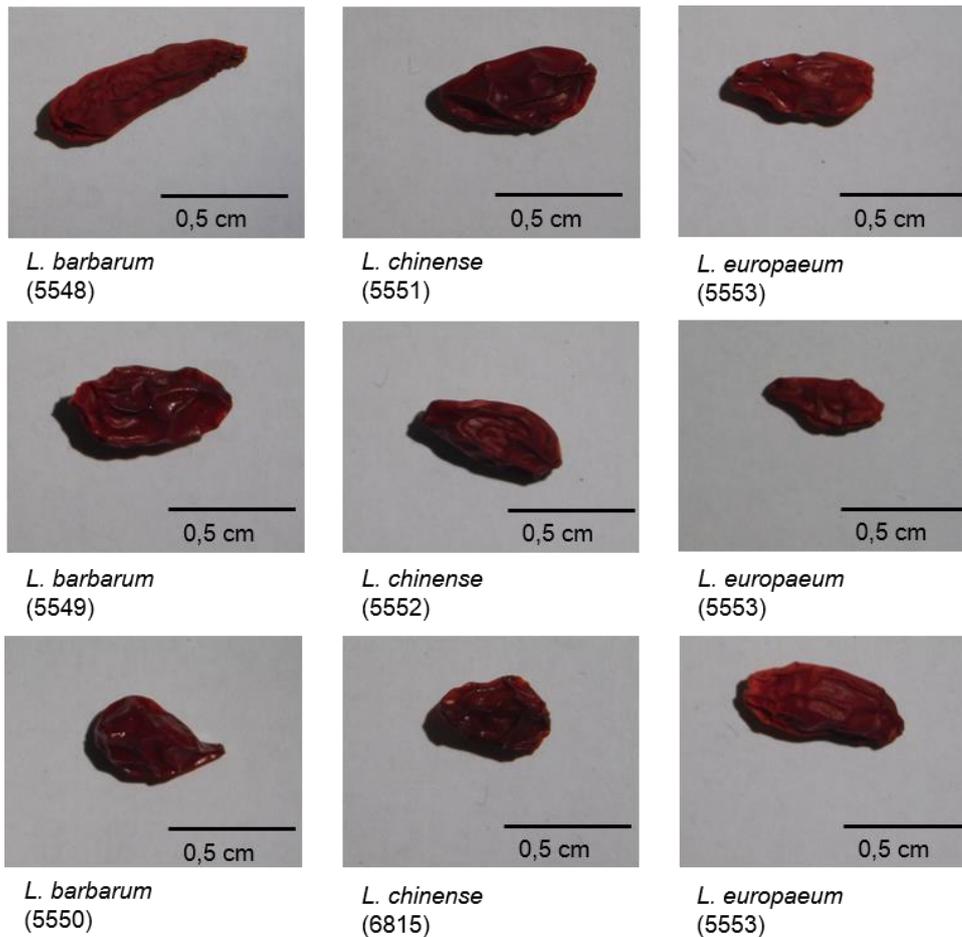
Aufgrund der sehr niedrigen Keimungsrate der Samen, ist das Ergebnis wenig aussagekräftig und es kann kein Rückschluss daraus gezogen werden, ob eine Säurebehandlung der Samen wirklich die Keimung beeinflusst.

**Tabelle 10: Ergebnis des Keimungsversuchs 3 Wochen nach der Salzsäurebehandlung**

HCl-Konzentration	<i>L. barbarum</i> (5548)	<i>L. barbarum</i> (5549)	<i>L. chinense</i> (5552)	<i>L. chinense</i> (6967)	<i>L. europaeum</i> (5553)
0 M	-	-	-	-	-
10 mM	1 Samen	-	-	-	-
100 mM	2 Samen	-	-	1 Samen	-
1 M	-	-	-	-	3 Samen

## 4.2 Morphologische Unterscheidung der Früchte

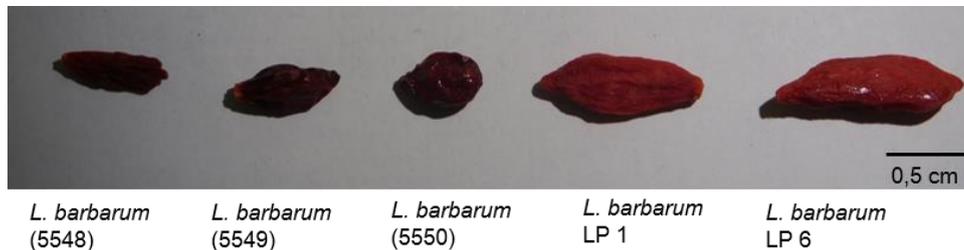
Früchte verschiedener Akzessionen von *L. barbarum*, *L. chinense* und *L. europaeum* wurden genauer betrachtet, um morphologische Unterschiede zwischen den Arten zu identifizieren (Abb. 2). Ausgewählt wurden dafür Früchte, die der durchschnittlichen Morphologie der jeweiligen Akzession entsprachen.



**Abbildung 2: Aufnahmen von Früchten verschiedener Lycium-Arten.** Sie dienen dem Vergleich von Früchten verschiedener Akzessionen der *Lycium*-Arten *L. barbarum*, *L. chinense* und *L. europaeum*. Signifikante Unterschiede der Morphologie, zur eindeutigen Unterscheidung der verschiedenen Arten konnten nicht festgestellt werden, da die Früchte auch innerhalb einer Art starke Abweichungen zeigten.

Zwischen den Arten gab es Unterschiede bei der Fruchtgröße und Form. Jedoch konnten auch starke Abweichungen innerhalb einer Art zwischen verschiedenen Akzessionen beobachtet werden (Abb. 3). Die Früchte waren im Durchschnitt 0,4 cm-1,0 cm lang und zwischen 0,2 cm und 0,4 cm breit. Wobei die *Lycium*-Produkte immer am Größten und häufig auch am Hellsten waren.

Eine morphologische Identifizierung der Früchte von den verschiedenen *Lycium*-Arten war aufgrund der starken Unterschiede auch innerhalb derselben Art nicht möglich.

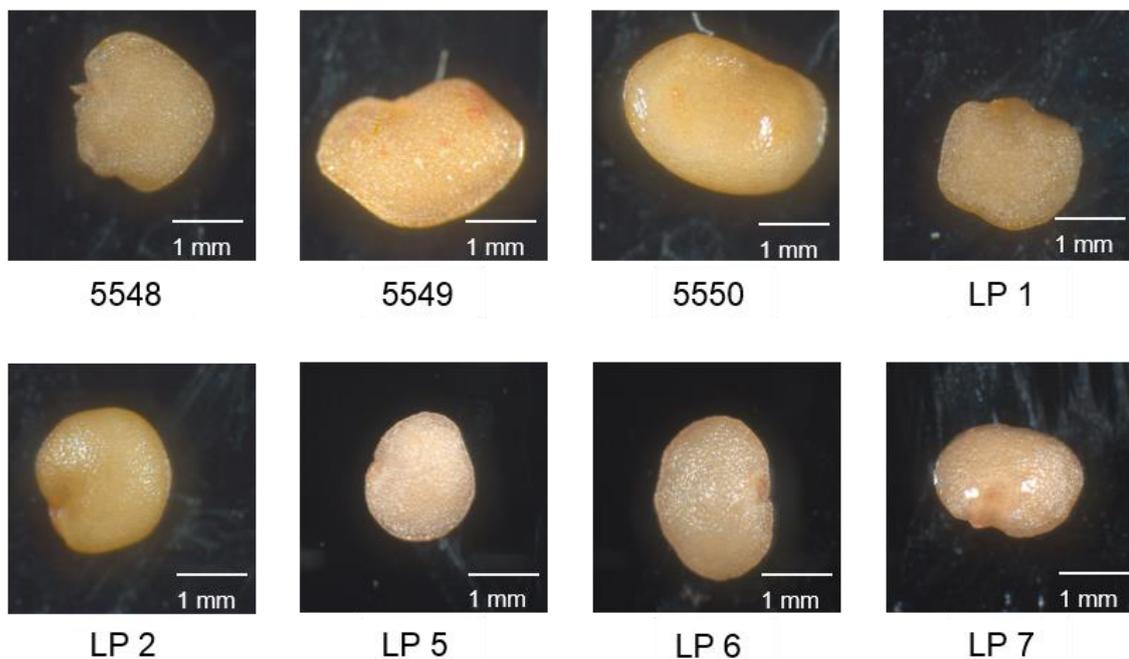


**Abbildung 3: Früchte verschiedener *L. barbarum* Akzessionen.** Zwischen den verschiedenen Akzessionen sind Unterschiede in Größe und Farbe der Früchte zu erkennen. Bei LP 1 und LP 6 handelt es sich um *Lycium*-Produkte. Die Beeren aller Produkte (LP 1- LP 9, nicht alle hier dargestellt) waren im Allgemeinen größer und heller als die anderen Akzessionen.

#### 4.3 Morphologische Unterscheidung der Samen

Die Samen verschiedener Akzessionen von *L. barbarum* (Abb. 4) und *L. chinense* (Abb. 5) wurden isoliert und miteinander verglichen, um mögliche Unterschiede zwischen den beiden Arten zu untersuchen.

##### *L. barbarum*

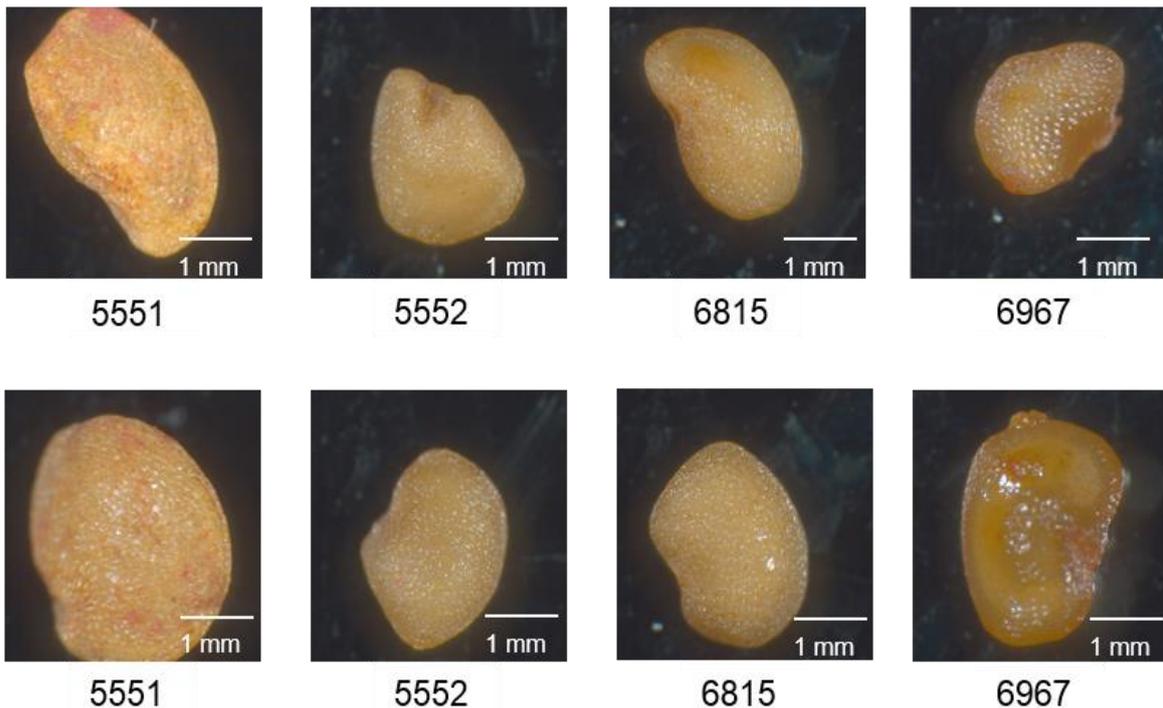


**Abbildung 4: Aufnahmen von Samen verschiedener *L. barbarum* Akzessionen.** Es sind Unterschiede in Form und Größe zwischen einzelnen Samen verschiedener *L. barbarum* Akzessionen bzw. der *Lycium*-Produkte zu erkennen. Aufgenommen mit 25-facher Vergrößerung.

Die Samen beider Arten waren durchschnittlich etwa 2 mm lang und ca. 1 mm breit, wobei *L. chinense* Samen manchmal minimal größer waren. Zudem ist auf den Bildern zu erkennen, dass Samen von *L. barbarum* ab und zu etwas rundlicher und nierenförmiger waren und *L. chinense* im Vergleich etwas kantiger. Es wurden aber nicht genug Samen untersucht und verglichen, um diese Unterschiede zu verallgemeinern. Die Farbe der Samen variierte und auf einigen waren rötliche Flecken zu erkennen. Einige Samen waren nicht so stark getrocknet wie andere und glänzten aus diesem Grund mehr.

Da wie bereits bei den Früchten die Samen einer Art, aber verschiedener Akzessionen morphologisch stark voneinander abwichen, kann auch hier anhand der Samen-Morphologie keine eindeutige Unterscheidung der beiden Arten festgestellt werden.

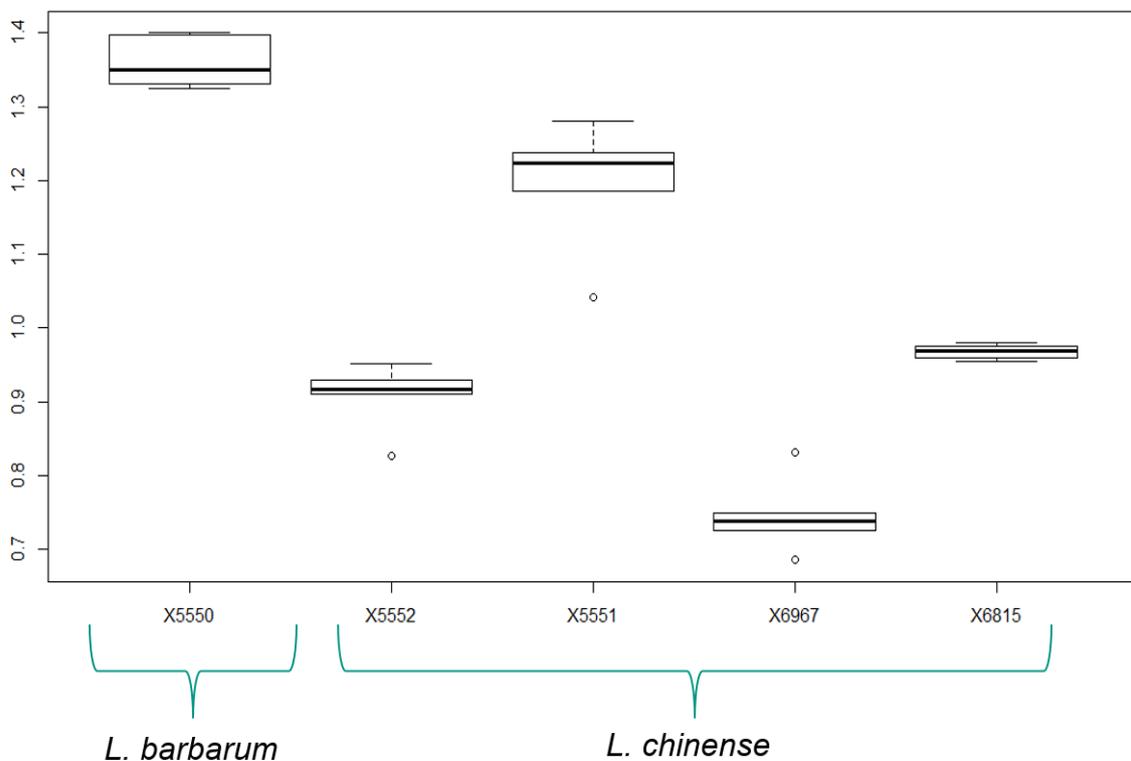
### ***L. chinense***



**Abbildung 5: Aufnahmen von Samen verschiedener *L. chinense* Akzessionen.** Abgebildet sind je 2 Samen pro Akzession, mit 25-facher Vergrößerung. Unterschiede in der Farbe sind deutlich zu erkennen.

#### 4.4 Ermittlung des Fruchtgewichts

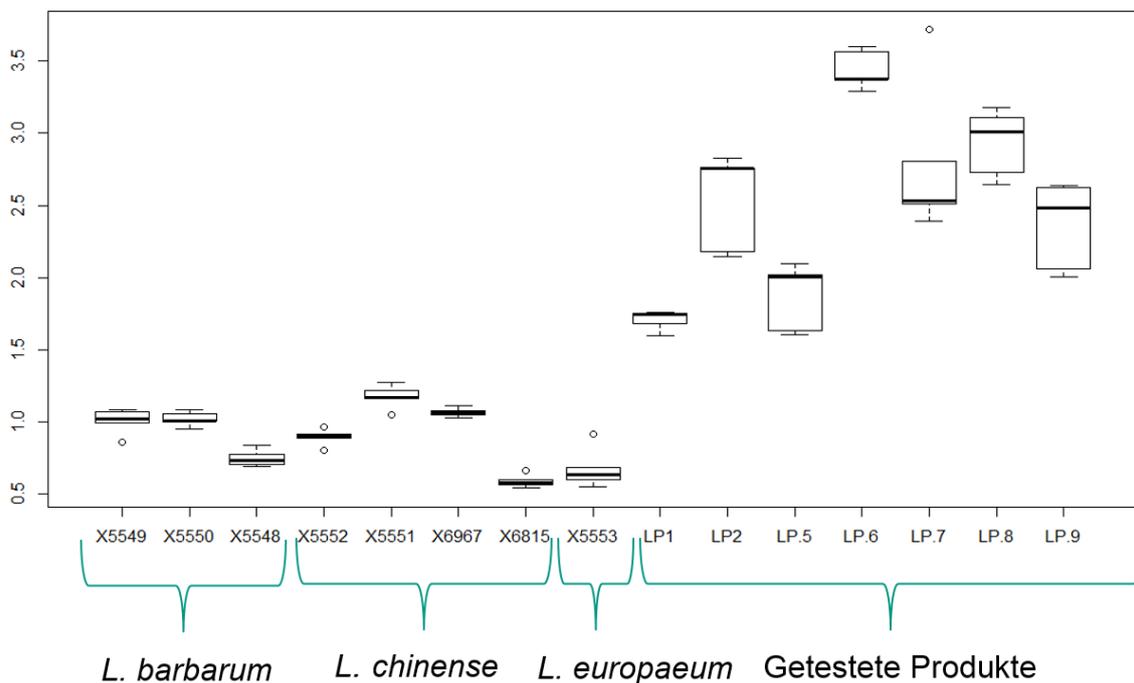
Von getrockneten Früchten aus den Jahren 2013 und 2014 sowie den Goji-Produkten wurde das durchschnittliche Fruchtgewicht bestimmt. Jeweils 5x 10 Früchte wurden hierfür gewogen. Zur besseren Veranschaulichung wurden Box-Plots erstellt (Abb. 6 und 7). Das Fruchtgewicht der verschiedenen Arten und Akzessionen lag zwischen 0,59 g und 3,44 g, wobei die Früchte der Goji-Produkte am Schwersten waren. Früchte von *L. barbarum* aus dem Jahr 2013 waren zwar schwerer, als Früchte von *L. chinense*, jedoch wurde hierfür nur eine *L. barbarum* Akzession hinzugezogen. Starke Ausreiser konnten bei *L. chinense* beobachtet werden.



**Abbildung 6: Fruchtgewicht in Gramm von je 5x10 Früchten aus der Ernte 2013.** Starke Ausreiser wurden als Punkt dargestellt und dickere Linien innerhalb der Box-Plots stellen den Mittelwert dar. Die Akzession 5550 von *L. barbarum* war deutlich am Schwersten. Innerhalb der Art von *L. chinense* gibt es starke Gewichtsunterschiede zwischen den verschiedenen Akzessionen.

Von 2014 standen mehrere Akzessionen und Arten zum Wiegen zur Verfügung. Es sind nicht nur Gewichtsunterschiede zwischen der Arten, sondern auch zwischen verschiedenen Akzessionen einer Art zu erkennen. Die Goji-Produkte waren deutlich am Schwersten. Eine Unterscheidung der verschiedenen Goji-Arten anhand ihres

Fruchtgewichts war jedoch nicht möglich. Lediglich die Produkte konnten von anderen Akzessionen differenziert werden.



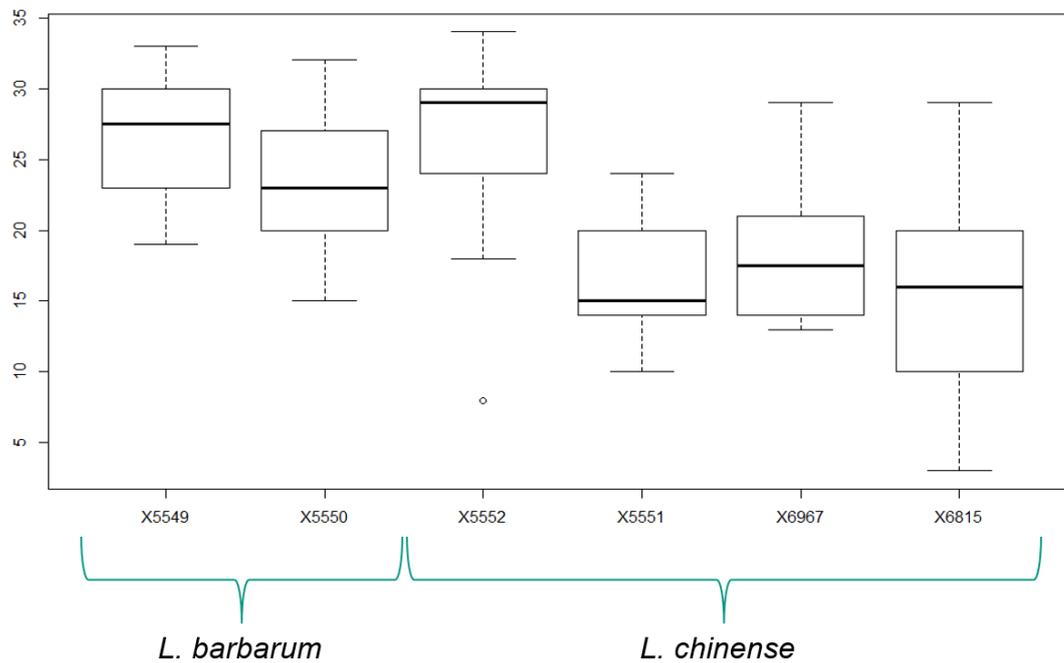
**Abbildung 7: Fruchtgewicht in Gramm von je 5x10 Früchten aus der Ernte 2014.** Es ist deutlich zu erkennen, dass die Produkte deutlich schwerer waren als andere *L. barbarum* Akzessionen oder *L. chinense* und *L. europaeum*. Starke Ausreiser wurden als Punkt dargestellt. Dickere Linien innerhalb der Box-Plots stellen den Mittelwert dar.

#### 4.5 Ermittlung der Samenanzahl pro Frucht

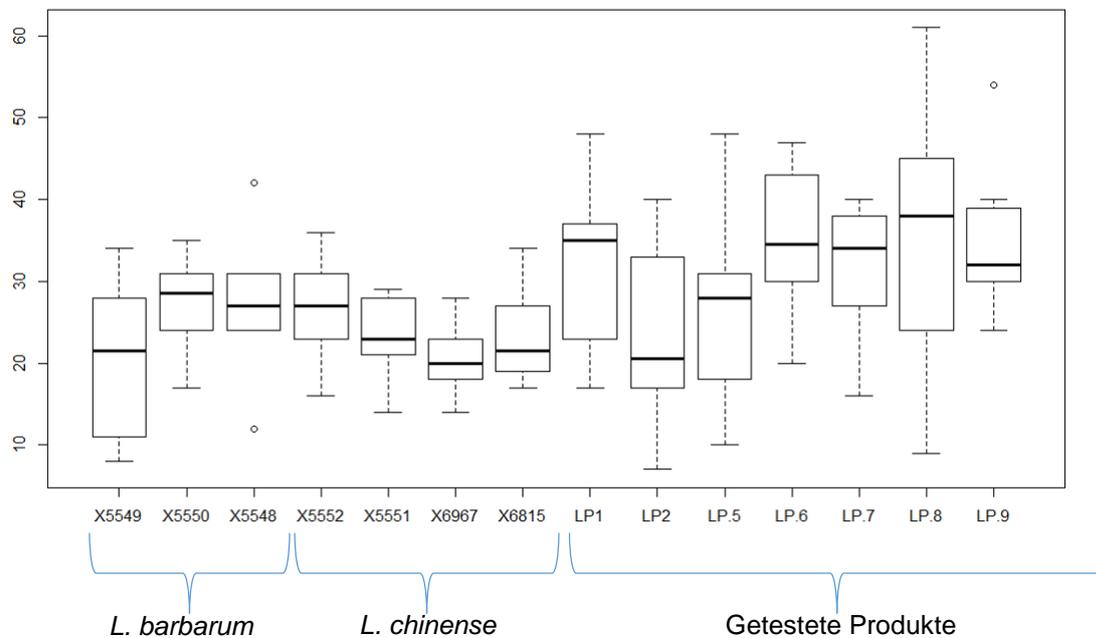
Die Samen von je 10 Früchten aus den Jahren 2013 und 2014 sowie den Goji-Produkten wurden isoliert und die Anzahl pro Frucht ermittelt. Es gab starke Unterschiede der Samenanzahl auch innerhalb derselben Akzessionen, wobei es nur wenige Ausreiser innerhalb der gemessenen Werte gab. Die meisten Samen konnten bei den Goji-Produkten gezählt werden. Früchte von *L. barbarum* besaßen häufig mehr Samen, als *L. chinense*. Dies konnte für beide Jahre festgestellt werden. Eine Unterscheidung der verschiedenen *Lycium*-Arten anhand der Samenanzahl ihrer Früchte stellt sich dennoch als sehr schwierig dar, da es sich um minimale Unterschiede in der Samenanzahl handelt.

Früchte von *L. chinense* aus dem Jahr 2014 besaßen mehr Samen als Früchte derselben Art von 2013. Für *L. barbarum* konnten keine großen Unterschiede festgestellt werden. Lediglich die Akzession 5549 von 2014 zeigte größere

Unterschiede in der Samenanzahl zwischen verschiedenen Früchten innerhalb dieser Akzession.



**Abbildung 9: Samenanzahl von je 10 Früchten aus der Ernte 2013.** Es ist nur ein Ausreiser (Kreis) bei den Werten der Akzession 5552 zu erkennen. Früchte von *L. chinense* besaßen häufig weniger Samen als *L. barbarum*. Der ermittelte Mittelwert der Samenanzahl pro Frucht ist als dickere Linie innerhalb der Box-Plots dargestellt.

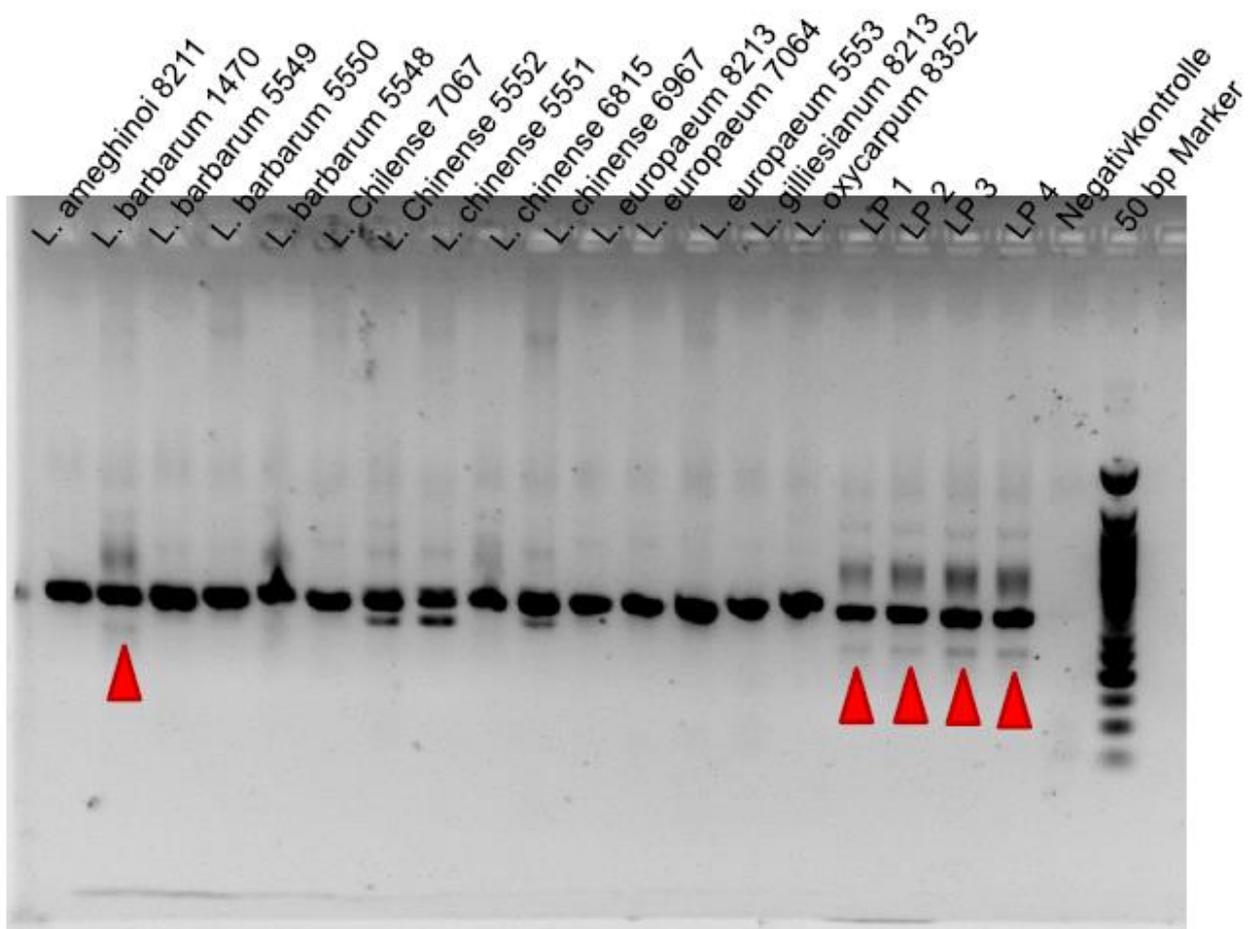


**Abbildung 10: Samenanzahl von je 10 Früchten aus der Ernte 2014.** Die Anzahl der Samen pro Frucht variierte stärker innerhalb der verschiedenen Produkte. Sie besaßen zudem häufig mehr Samen als die anderen Akzessionen. Starke Ausreiser bei der Samenanzahl sind nur bei Akzession 5548 und LP 9 zu erkennen.

## 4.6 ARMS-PCR

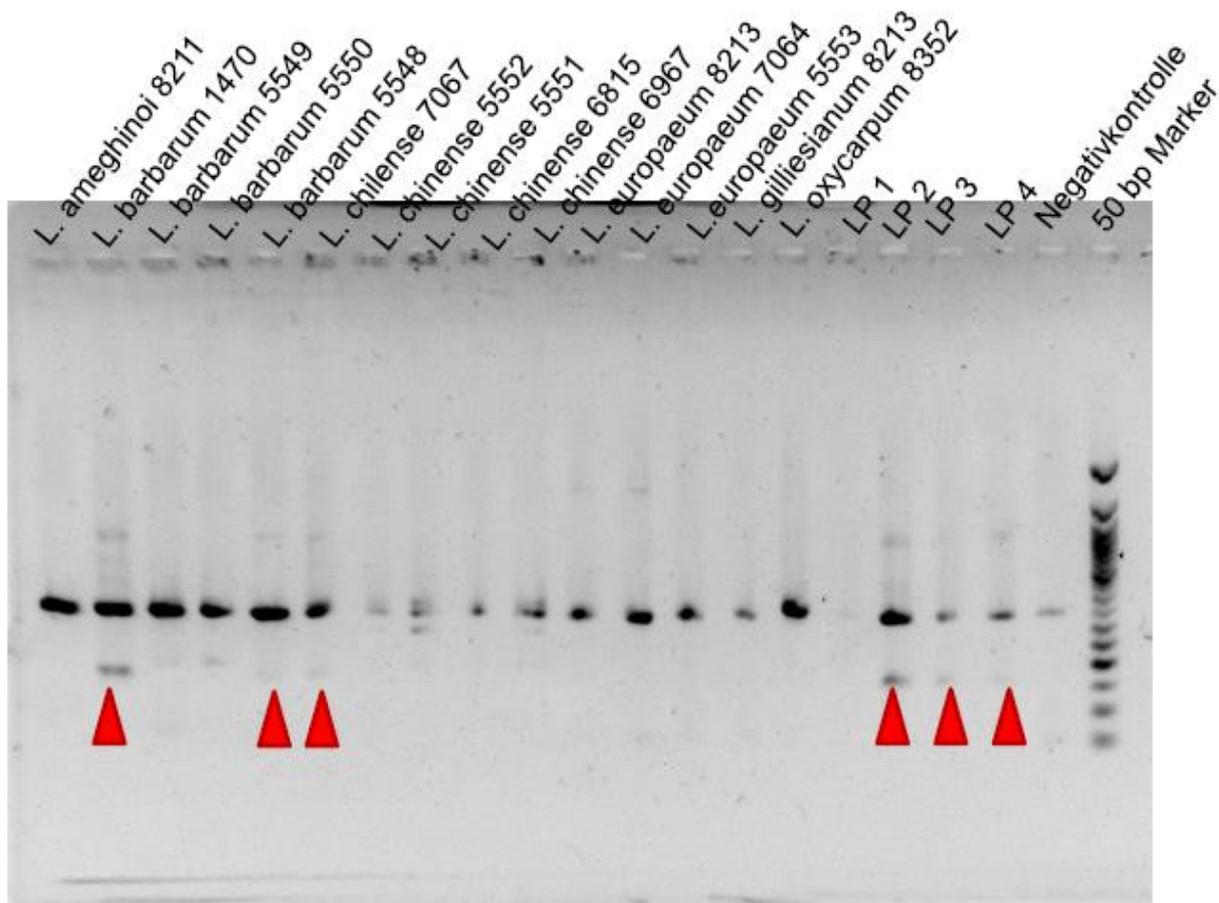
Zur Identifizierung verschiedener *Lycium*-Arten, wurden 4 unterschiedliche ARMS-PCRs mit dem Marker-Primerpaar BEL2/3 und je einem anderen ARMS-Primer, wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, durchgeführt. Es zeigte sich, dass nicht alle ARMS-Primer gleich gut funktionierten.

Der ARMS-Primer 117 fw, zeigte z.B. nur mittelmäßig gute Ergebnisse. Es sind zwar diagnostische Banden bei *L. barbarum* 1470 und den 4 getesteten Produkten sichtbar, jedoch sind diese, im Vergleich zu den BEL2/3-Banden, nur sehr schwach. Zudem ist bei den Akzessionen *L. chinense* 5552, 5551 und 6967 auch eine weitere Bande sichtbar, die nur etwas länger als die diagnostische Bande ist.



**Abbildung 11: Gelbild der ARMS PCR mit BEL2/3 und dem diagnostischen Primer 117 fw.** Die roten Pfeile, zeigen die diagnostischen Banden bei *L. barbarum* und den getesteten Produkten. Nicht alle *L. barbarum* Akzessionen weisen diagnostische Banden auf. Die vorhandenen diagnostischen Banden sind nur sehr schwach.

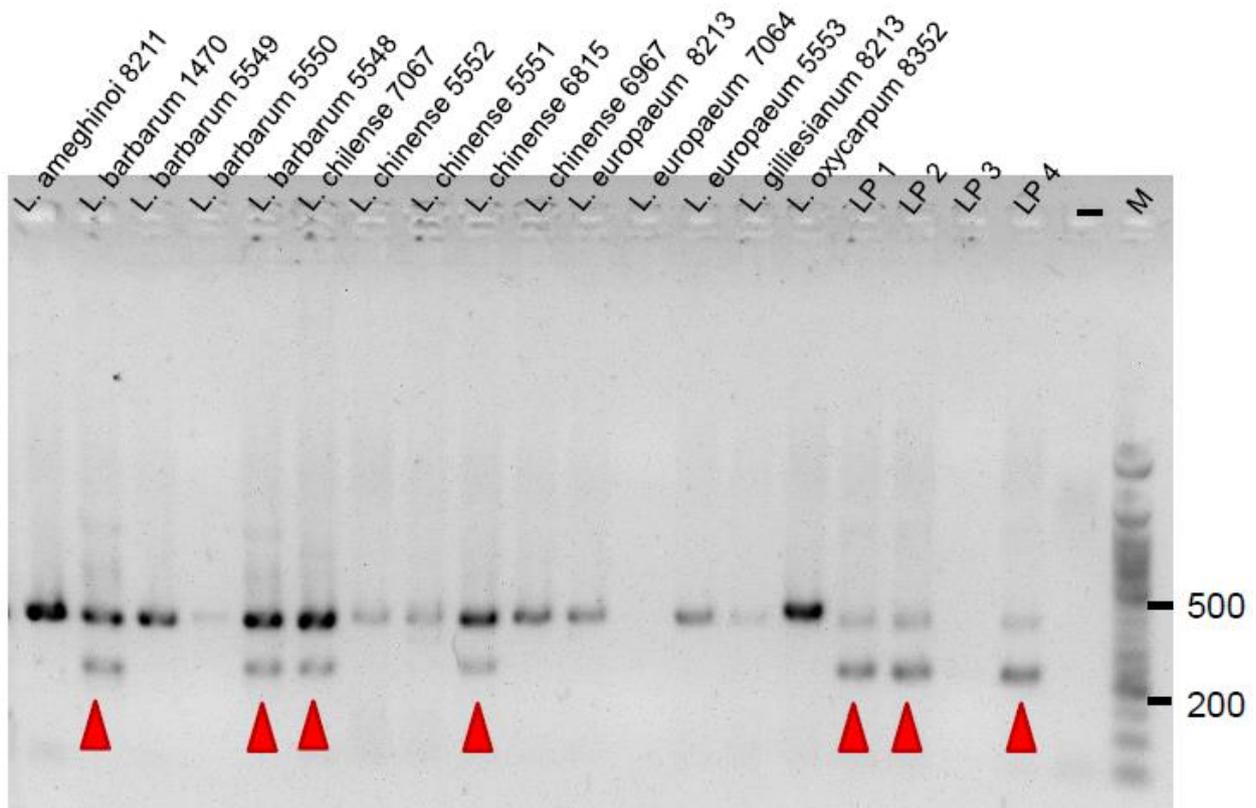
Auch die PCR mit dem ARMS Primer 144 rev2 hat nur mäßig gut funktioniert. Diagnostische Banden sind zwar bei *L. barbarum* 1470, 5548 und LP 2- LP4 sichtbar, jedoch sind auch diese nur sehr schwach. Auch *L. chilense* 7067 weist eine diagnostische Bande auf. Zudem sind selbst die BEL2/3 Banden bei *L. chinense* und *L. europaeum* kaum sichtbar. Dafür weist die Negativkontrolle, bei der eigentlich keine Bande entstehen sollte, eine Bande auf.



**Abbildung 12: Gelbild der PCR mit BEL2/3 und dem diagnostischen Primer 144 rev2.** Die roten Pfeile weisen auf diagnostische Banden bei *L. barbarum* 1470, 5548, *L. chilense* und den Produkten LP2-LP4, hin. Die BEL2/3 Banden sind bei den *L. europaeum* und *L. chinense* Akzessionen nur sehr schwach sichtbar. Die Negativkontrolle weist auch eine Bande auf.

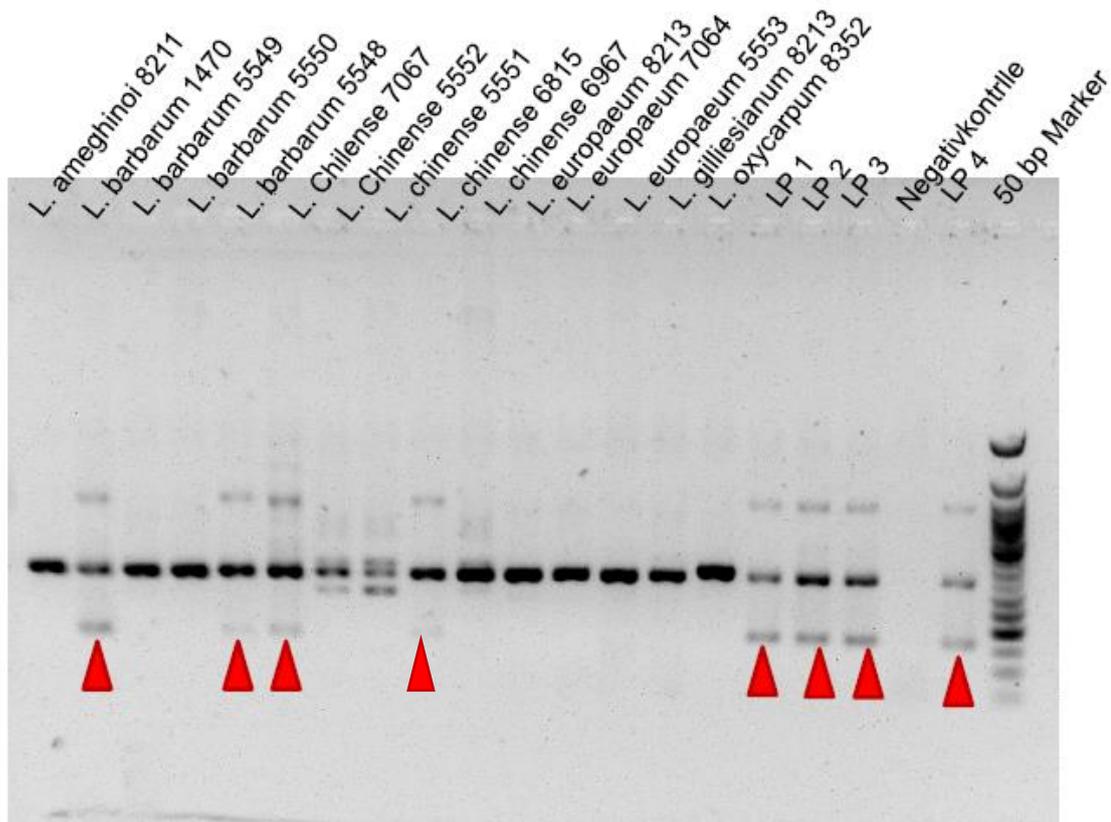
Die PCR mit dem ARMS-Primer Goji-BEL-144 fw verlief dagegen recht gut. Diagnostische Banden sind bei den Akzessionen *L. barbarum* 1470, 5548, *L. chilense* 7067, *L. chinense* 6967 und den Produkten LP 1, LP 2 und LP 4, klar zu erkennen. Bei *L. europaeum* 7064 und bei LP 3 hat die PCR nicht funktioniert. Die Bel2/3-Marker

Banden sind bei *L. barbarum* 5550, *L. chinense* 5552, 5551, *L. gilliesianum* und bei den Produkten jedoch nur sehr schwach ausgeprägt.



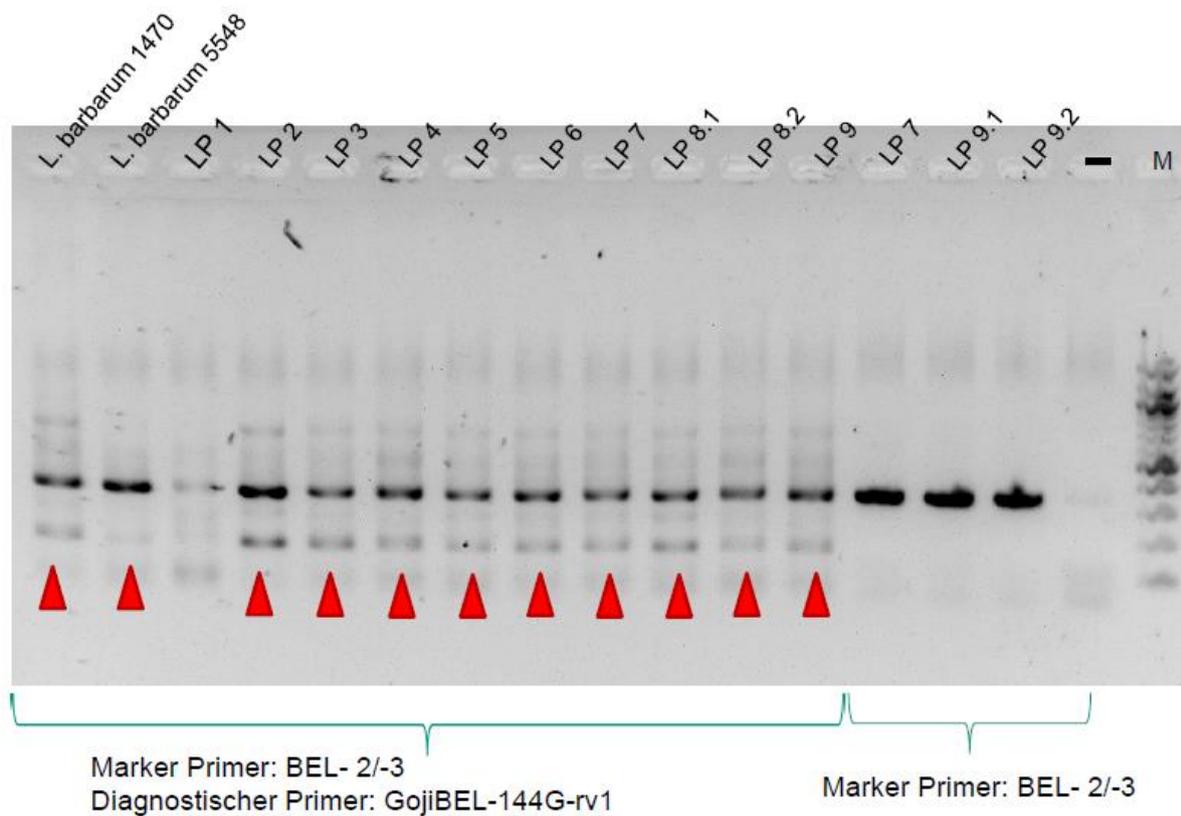
**Abbildung 13: Gelbild der PCR mit BEL2/3 und dem diagnostischen Primer Goji-BEL- 144 fw.** Die roten Pfeile weisen auf die diagnostischen Banden bei *L. barbarum* 1470, 5548, *L. chilense*, *L. chinense* 6815 und bei den Produkten hin. Die PCR bei *L. europaeum* 7064 und LP3 hat nicht funktioniert. Die BEL2/3-Marker Banden sind teilweise nur sehr schwach ausgeprägt.

Die PCR mit dem diagnostische Primer Goji-BEL-144 rev1 verlief am Besten. Alle Proben wurden erfolgreich amplifiziert und die BEL2/3-Marker-Banden sind bei allen Akzessionen stark ausgeprägt. Diagnostische Banden sind an den gleichen Stellen, wie bei der PCR mit Goji-BEL-144 fw. sichtbar, also bei *L. barbarum* 1470, 5548, *L. chilense*, *L. chinense* 6815 und den 4 Produkten. Bei *L. barbarum* 1470 und den Produkten sind sie jedoch stärker ausgeprägt als bei den anderen Akzessionen. Die Akzessionen *L. chinense* 5551 und 5552 weisen zusätzlich zur BEL2/3 Marker Bande noch etwas kleinere Banden auf. Dies konnte auch schon bei der PCR mit Goji-BEL-117 fw beobachtet werden.



**Abbildung 11: Gelbild der PCR mit BEL2/3 und dem diagnostischen Primer 144 rev1.** Die roten Pfeile weisen auf die diagnostischen Banden der Akzessionen *L. barbarum* 1470, 5548, *L. chilense*, *L. chinense* 6815 und den 4 Produkten hin. Die BEL2/3-Marker-Banden sind größtenteils stark ausgeprägt. Die Akzessionen *L. chinense* 5551 und 5552 weisen zusätzlich zu der BEL2/3-Marker-Bande eine weitere Bande auf.

Da die PCR mit dem diagnostischen Primer Goji-BEL-144 rev1 so gut verlief, wurden weitere, später erhaltene *Lycium*-Produkte mit diesem Primer in einer weiteren PCR identifiziert. Hierbei wurden jedoch als Vergleich nur die beiden *L. barbarum* Akzessionen 1470 und 5548, die bereits in vorherigen PCRs eine diagnostische Bande aufwiesen, genommen. Zudem wurden auf das gleiche Gel eine PCR der Produkte aufgetragen, die nur mit BEL2/3 und mit keinem diagnostischen Primer amplifiziert wurden. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die zusätzlichen Banden tatsächlich diagnostische Banden sind und kein Nebenprodukt der BEL2/3 Primer. Die PCR von LP1 verlief nicht wirklich erfolgreich. Hier ist keine diagnostische Bande zu sehen, obwohl bei vorherigen Versuchen eindeutig eine vorhanden war. Alle anderen Produkte weisen jedoch gut sichtbare diagnostische und BEL2/3-Marker Banden auf. Bei der PCR mit nur den Marker-Primern BEL2/3, ist jeweils nur eine dicke Bande sichtbar.

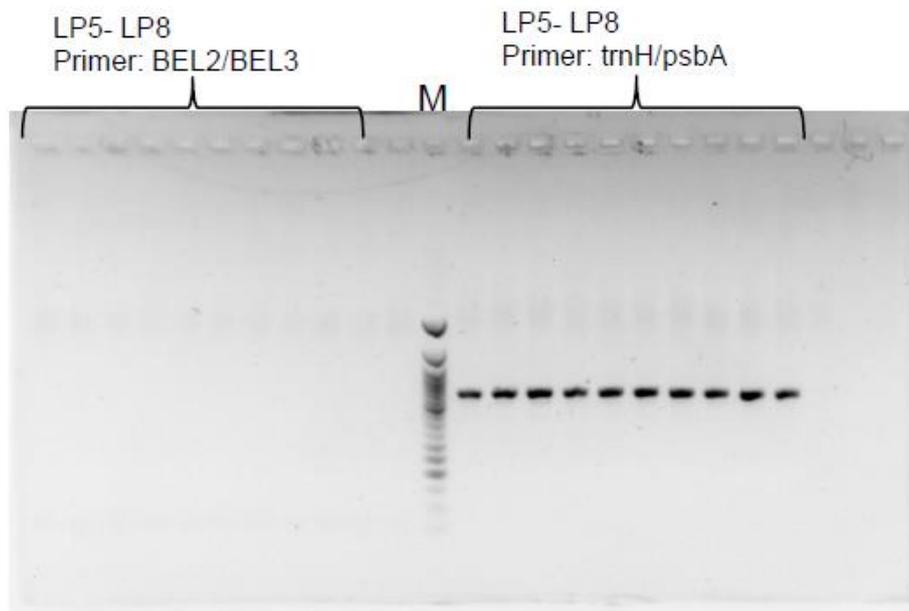


**Abbildung 12: Gelbild der PCR mit BEL2/3 allein und mit BEL2/3 gemischt mit dem diagnostischen Primer Goji-BEL-144rev1.** Die roten Pfeile weisen auf die diagnostischen Banden der beiden *L. barbarum* Akzessionen und den Produkten hin. Bei LP1 hat die PCR nicht gut funktioniert. Bei der PCR mit nur den Marker-Primern BEL2/3 ist nur eine dicke Bande sichtbar.

#### 4.7 PCR für die Sequenzierung

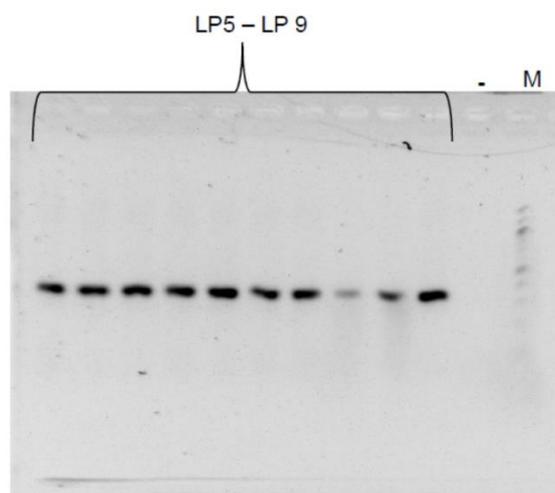
Um die neu erhaltenen Produkte auf Basenunterschiede hinsichtlich ihres Herkunftsortes zu untersuchen, wurde eine PCR durchgeführt, damit die Produkte anschließend sequenziert werden können. Hierfür wurde zunächst die DNA der *Lycium*-Produkte isoliert. Anschließend wurde zwei verschiedene PCRs gemacht: Einmal mit dem Primerpaar psbA/trnH, das im Chloroplastengenom bindet und einmal mit dem Primerpaar BEL2/3, das in der ITS2-Region bindet.

Beim ersten Mal waren nur bei der PCR mit dem Primerpaar psbA/trnH Banden sichtbar. Die PCR mit dem Primerpaar BEL2/3 war nicht erfolgreich.



**Abbildung 13: Gelbild der PCR der Produkte LP5-LP9 mit psbA/trnH und BEL2/3 für die Sequenzierung.** Es ist zu sehen, dass nur die PCR mit dem Primerpaar psbA/trnH erfolgreich war. Hier ist bei allen Produkten eine dicke Bande sichtbar. Bei der PCR mit dem Primerpaar BEL2/3 sind keine Banden sichtbar.

Aus diesem Grund wurde die PCR mit dem Primerpaar BEL2/3 ein zweites Mal mit einem anderen Puffer durchgeführt und dann erneut in einem Gelelektrophoresesystem laufen gelassen. Das anschließende Bild aus der Geldokumentationsstation zeigte, dass die PCR erfolgreich war. Alle Produkte wiesen eine dicke Bande auf.



**Abbildung 14: Zweite PCR für die Sequenzierung der Produkte LP 5-LP 9 mit dem Primerpaar BEL2/3.** Es ist zu sehen, dass alle Produkte eine Bande aufweisen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Keimungsversuch

Die Verbreitung der Goji-Samen erfolgt in der Natur unter anderem durch Vögel (Ornithochorie). Diese Art der Verbreitung könnte einen Einfluss auf das Keimungsverhalten der Samen haben, was bereits für andere Pflanzen der Familie Solanaceae gezeigt wurde (Barnea *et al.*, 1990). In der Natur sind die Samen für einige Zeit dem sauren Milieu im Magen der Vögel ausgesetzt, wodurch es zu einer Skarifizierung der Samenoberfläche kommt (Barnea *et al.*, 1990; Agami & Waisel, 1988). In dieser Arbeit wurden daher die Samen mit verschiedenen konzentrierter Salzsäurelösung behandelt und die Auswirkung auf die Keimung genauer untersucht. Aufgrund der zu geringen Keimungsrate und vieler verschimmelter Samen, war das Ergebnis des Versuchs jedoch wenig aussagekräftig. Vermutet wurde eine erhöhte Keimungsrate der Samen, da diese vom Fruchtfleisch der Beeren und der darin enthaltenen Keimungsinhibitoren isoliert wurden (Evenari, 1949) und die zusätzliche Säurebehandlung die Samenoberfläche skarifiziert, die folglich durchlässig für Wasser und Sauerstoff wird (Barnea *et al.*, 1990; Agami & Waisel, 1988). Die Vermutung konnte jedoch nicht eindeutig bestätigt werden. Um genauere Aussagen treffen zu können, sollte der Versuch modifiziert und noch einmal wiederholt werden. Es wäre ratsam die Temperatur der Inkubation zu erhöhen, damit das Keimen der Samen beschleunigt wird, bevor diese zu sehr schimmeln. Zudem sollte unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden, um Schimmelpilze am Befall der Samen zu hindern. Möglich wäre ein Ausbringen der Samen unter der Sterilbank in Petrischalen (z.B. auf H<sub>2</sub>O-Agar), die anschließend luftundurchlässig verschlossen werden können.

### 5.2 Morphologische Unterscheidung verschiedener *Lycium*-Arten

Eine morphologische Unterscheidung der Früchte verschiedener *Lycium*-Arten stellte sich als sehr schwierig dar. Auch innerhalb derselben Art konnten starke Unterschiede in Form und Größe der Beeren beobachtet werden, wobei die *Lycium*-Produkte (LP 1- LP 9) immer am Größten und häufig auch von der Farbe am Hellsten waren. Um signifikante Unterschiede der Morphologie zwischen den verschiedenen Arten zu identifizieren, müsste eine größere Anzahl an Früchten miteinander verglichen werden. Auch eine Unterscheidung der einzelnen Samen verschiedener Arten war

nicht möglich. Sie heben sich zwar war in ihrer Größe und auch in Form und Farbe voneinander ab, jedoch konnten auch hier zu große Abweichungen innerhalb einer Art bei verschiedenen Akzessionen festgestellt werden. Zur genauen Unterscheidung der Arten sollten daher molekularbiologische Methoden wie RAPD (Random amplified polymorphic DNA; Cheng *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2001), SCAR (Sequence characterized amplified region, Sze *et al.*, 2008) oder SSR (Simple sequence repeat, Kwon *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010) durchgeführt werden.

### **5.3 Ermittlung des Fruchtgewichts und der Samenanzahl**

Zur weiteren morphologischen Unterscheidung wurden verschiedene *Lycium*-Arten auf ihr Gewicht und ihre Samenanzahl pro Frucht untersucht. Hierzu wurden Früchte aus den Ernten von 2013 und 2014 verwendet und auf mögliche Unterschiede in Fruchtgewicht und Samenanzahl bezüglich des Erntejahrs untersucht. Im Gegensatz zum F2-Praktikum Plant Evolution I konnte jedoch keine Korrelation zwischen den beiden Erntejahren festgestellt werden. Es kann also nicht gesagt werden, dass in einem Jahr die Bedingungen besser und im anderen Jahr schlechter waren.

Auch die Differenzierung der Arten mittels des Fruchtgewichts erwies sich als schwierig. *L. barbarum* war teilweise zwar etwas schwerer als *L. chinense*, jedoch kann eine eindeutige Identifizierung der Art so nicht gewährleistet werden. Das Fruchtgewicht der gekauften Produkte war jedoch eindeutig höher, als das der Akzessionen aus dem botanischen Garten. Dies könnte aber auch auf eine kürzere Trocknungszeit zurückzuführen sein.

Die Anzahl der Samen aus den aufgeweichten Früchten, war pro Art dagegen etwas spezifischer. *L. barbarum* hatte durchgängig einen höheren Mittelwert an Samen pro Frucht im Vergleich zu *L. chinense*. Die Produkte enthielten die meisten Samen. Dennoch ist auch hier eine Unterscheidung der Arten schwierig, da die Unterschiede nicht prägnant genug sind und sich die Samenanzahl der Arten trotzdem in einem ähnlichen Rahmen bewegt.

## 5.4 ARMS-PCR

Zur Unterscheidung von *L. barbarum* von seinen nahe verwandten Arten, wurden 4 verschiedene ARMS-PCRs durchgeführt. Es zeigten jedoch nicht alle 4 PCRs gleich gute Ergebnissen. Die diagnostischen Banden bei den ARMS-Primern 117 fw und 144 rev2, waren nur sehr schwach zu sehen. Für eine Optimierung müssten die PCR-Bedingungen, hinsichtlich Annealing-Temperatur und Elongationszeit, besser auf die beiden ARMS-Primer angepasst werden. Eine Untersuchung der Primer mit dem Oligoanalyzer ergab, dass die beiden Primer 144 fw und 144 rev1 beide eine höhere Schmelztemperatur, als die anderen zwei Primer, haben. Eventuell funktioniert die PCR mit 117 fw und 144 rev2 besser, wenn die Annealing-Temperatur um 2 °C gesenkt wird. Dadurch könnten sich die Primer besser an der DNA anlagern und ein eindeutigeres Ergebnis erzielen.

Die ARMS-PCRs bei 144 rev1 und 144 fw, lieferten dagegen bessere Ergebnisse mit stärker sichtbaren diagnostischen Banden. Bei allen getesteten Produkten war eine diagnostische Bande sichtbar. Es sollte sich also auch bei allen Produkten um *L. barbarum* handeln. Es zeigte sich jedoch, dass auch *L. chinense* 6815 und *L. chilense* eine diagnostische Bande aufwiesen. Da diese beiden Arten aber in der Sequenzierung keine Mutation wie *L. barbarum* aufwiesen, sollte bei ihnen unter keinen Umständen eine diagnostische Bande auftreten. Aus diesem Grund kann es gut sein, dass es sich bei diesen beiden Proben, anders als angegeben, eigentlich um *L. barbarum* Akzessionen handelt. Auch bei *L. chinense* 5552 und 5551 waren zusätzliche Banden unterhalb der Marker Bande sichtbar. Doch auch bei diesen beiden Akzessionen kann der ARMS-Primer an keiner Stelle binden. Das Vorhandensein dieser Banden könnte deshalb nur durch eine Pilzkontamination erklärt werden. Da nicht alle *L. barbarum* Akzessionen die artspezifische Mutation aufweisen, war auch nicht bei allen eine diagnostische Bande vorhanden. Bei *L. barbarum* 5549 und 5550 war nie eine zusätzliche Bande zu sehen. Dies stimmt allerdings auch mit den Sequenzierungsergebnissen der ITS2 Region überein, da diese beiden Akzessionen auch keine artspezifische Mutation an dieser Stelle aufweisen. Aus diesem Grund kann die ARMS-PCR in der ITS2-Region zwar gewährleisten, dass es sich um *L. barbarum* handelt sobald eine diagnostische Bande vorhanden ist, aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich nicht um *L. barbarum* handelt, wenn keine diagnostische Bande vorhanden ist. Diese ARMS-PCR ist also noch nicht ideal,

da *L. barbarum* nicht ganz eindeutig und ohne Ausnahmen identifiziert werden kann. Deshalb wäre eine ARMS-PCR in einem anderen variablen Bereich, in welchem wirklich alle *L. barbarum* Akzessionen eine artspezifische Mutation aufweisen, besser. Hierfür könnte z.B. im Chloroplastengenom der *psbA/trnH*- Bereich auf solche Mutationen untersucht werden (Sang *et al.* 1997, Tate *et al.*, 2003)

## **5.5 Fazit und Ausblick**

Die Identifizierung und Verifizierung verschiedener verwandter Pflanzenarten die zum Verkauf angeboten werden, ist ein wichtiges Aufgabenfeld zum Schutz der Konsumenten. In diesem Versuch sollte *L. barbarum* von seinen nahe Verwandten Arten morphologisch sowie molekularbiologisch unterschieden werden. Morphologisch war fast keine Unterscheidung möglich. Die molekularbiologische Differenzierung mittels der ARMS-PCR funktionierte größtenteils gut, jedoch sollte das pflanzliche Genom noch auf weitere Stellen untersucht werden, die artenspezifischere Mutationen tragen. Weitere Möglichkeiten des genetischen Barcodings bestehen in der Optimierung einer Gradienten-PCR mit SCAR- Primern oder im DNA-Fingerprinting mit TBP (Tubulin based polymorphism) oder SRAP (Sequence related amplified polymorphism). Vielleicht kann *L. barbarum* mit diesen Methoden noch besser und leichter identifiziert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

**Agami, M. & Waisel, Y. (1988).** The role of fish in distribution and germination of seeds of the submerged macrophytes *Najas marina* L. and *Rupia maritima* L. *Oecologia*, **76**, 83-88.

**Amagase, H. & Farnsworth, N. R. (2011).** A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International* vol. **44** iss. 7: 1702-1717.

**Amagase, H., & Nance, D.M. (2008).** A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study of the general effects of a standardized *Lycium barbarum* (Goji) juice, GoChi™. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **14**(4), 403–412.

**Barnea, A., Yom-Tov, Y., Friedman, J. (1990).** Differential germination of two closely related species of *Solanum* in response to bird ingestion. *Oikos* **57**: 222-228.

**Chen, J., Li, E., Dai, C., Yu, B., Wu, X., Huang, C., et al. (2012).** The inducible effect of LBP on maturation of dendritic cells and the related immune signaling pathways in hepatocellular carcinoma (HCC). *Current Drug Delivery*, **9**(4), 414–420.

**Cheng, K., Chang, H., Huang, H., Lin, C. (2000).** RAPD analysis of *Lycium barbarum* medicine in Taiwan market. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **41**(1): 11-14.

**S.-J. Chiou, et al. (2007).** 'Authentication of Medicinal Herbs using PCR-Amplified ITS2 with Specific Primers'. *Planta Medica* **73**(13):1421–1426.

**D'Arcy, W. G. (1979).** Classification of Solanaceae. In „The Biology and Taxonomy of Solanaceae“ (Hawkes, G. J., Lester, R. N., Skelding, A. D., Eds.), pp. 3-47. Academic Press, London.

**Evenari, M. (1949)** Germination inhibitors. *Botanical Review* **15**, 143.

**Fukuda, T. (2001).** Phylogeny and Biogeography of the Genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from Chloroplast DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**(2):246–258.

**Hitchcock, C. L. (1932).** A monographic study of the genus *Lycium* of the western hemisphere. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **19**: 179-374.

**Hunziker, A. T. (1979).** South American Solanaceae: A synoptic survey. In „The Biology and Taxonomy of Solanaceae“ (Hawkes, G. J., Lester, R. N., Skelding, A. D., Eds.), pp. 49-85. Academic Press, London.

**Karp, D. (2009).** Goji taunts North American farmers—The berry, cultivated in China and said to convey health benefits, is eagerly sought in the West. Growers here are trying but are discovering they have much to learn. *Los Angeles Times*, August 05.

**Kwon, S., Lee, G., Lee, S., Park, Y., Gwag, J., Kim, T., et al. (2009).** Isolation and characterization of 21 microsatellite loci in *Lycium chinense* and cross-amplification in *Lycium barbarum*. *Conservation Genetics.* **10** (5): 1557-1560.

**McLaughlin, L. (2006).** Food: A taste of the future. *TIME* magazine Sunday, July 16.

**Y. Peng, S.Q. Sun, Z.Z. Zhao, H.W. Leung (2004).** A rapid method for identification of genus *Lycium* by FTIR spectroscopy. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* (Spectroscopy and Spectral Analysis), **24** (6) (2004, Jun), pp. 679–681

**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.

**Roth, Dauderer, Kormann (2008).** Giftpflanzen & Pflanzengifte. *Nikol-Verlag Hamburg* Vol. **5**: 475.

**Sang et al. (1997).** ‘Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae)’. *American Journal of Botany* **84.8**: 1120-1120.

**Sohn, E. (2008).** Superfruits, super powers?. *Los Angeles Times*, march 10. <http://www.latimes.com/health/la-hew-superfruit-story.html#page=1>

**Stuart, G. A. & Smith, F. P. (1911).** Chinese materia medica. Shanghai; *American Presbyterian Mission Press* 250.

**Sze, S. C. W., Song, J. X., Wong, R. N. S., Feng, Y. B., Ng, T. B., Tong, Y., et al. (2008).** Application of SCAR (sequence characterized amplified region) analysis to authenticate *Lycium barbarum* (wolfberry) and its adulterants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 51(1): 15-21.

**Tate et al. (2003).** 'Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species.' *Systematic Botany* 28.4: 723-737.

**Xin T., et al. (2013).** 'Super food *Lycium barbarum* (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode'. *Food Research International* 54(2):1699–1704.

**Yin, X. L., Fang, K. T., Liang, Y. Z., Wong, R. N., Wyha, A. (2005).** Assessing phylogenetic relationships of *Lycium* samples using RAPD and entropy theory. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26 (10): 1217-1224.

**Zhang, K. Y. B., Leung, H. W., Yeung, H. W., Wong, R. N. S. (2001).** Differentiation of *Lycium barbarum* from its related *Lycium* species using random amplified polymorphic DNA. *Planta Medica*, 67 (4): 379-381.

**Zhao, W. G., Chung, J. W., Cho, Y. I., Rha, W. H., Lee, G. A., Ma, K. H., et al. (2010).** Molecular genetic diversity and population structure in *Lycium* accessions using SSR markers. *Comptes Rendus Biologies*, 333 (11): 793-800.