

Lebensmittelauthentifizierung - Sortendifferenzierung von Haselnüssen mittels molekularbiologischer Verfahren

Christina Lang, Christine Felbinger, Markus Fischer

HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE - Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg,
Grindelallee 117, 20146 Hamburg

E-Mail: markus.fischer@uni-hamburg.de

Die Haselnuss – ein wichtiges Importgut

Der Haselnussstrauch gehört zu der Familie der Birkengewächse (*Betulaceae*) und der Gattung der Haselnussgewächse (*Coryloideae*). Für die Industrie relevant sind zwei verschiedene Arten: die Gemeine Hasel (*Corylus avellana*) und die Lambertshasel (*Corylus maxima*).¹ Traditionell wird die Haselnuss überwiegend in den Ländern rund um den 45. Breitengrad angebaut. In Europa wird sie dabei vor allem in Italien, Frankreich und Spanien kultiviert. Eine lange Tradition hat auch der Anbau in der Schwarzmeerregion der Türkei sowie dem Kaukasus und dort in Aserbaidschan und Georgien. Weitere relevante Anbauggebiete sind die USA, China und Iran. Im Jahr 2017 betrug die Weltproduktion an Haselnüssen über eine Million Tonnen.² Der führende Produzent ist hierbei die Türkei mit 675.000 t (2017) und damit 67 % der weltweiten Ernte.²

Die Preise sind sehr stark abhängig von dem jeweiligen Anbauland. Abbildung 1 stellt den zeitlichen Verlauf der Preise in USD/t relevanter Produzenten in den Jahren 2006 – 2017 dar.²

Italienische und türkische Haselnüsse bilden hierbei mit 3.000 bzw. 2.600 USD/t das obere Preissegment. Deutlich günstiger hingegen sind mit ca. 1.200 USD/t Haselnüsse aus Georgien bzw. Aserbaidschan zu erwerben. Im Jahr 2014 ist ein deutlicher Preisanstieg zu erkennen.² Dieser ist begründet durch große Ernteaussfälle in der Türkei aufgrund eines späten Kälteeinbruchs. Dieses Ereignis lies den Preis auf dem Weltmarkt enorm ansteigen. Um diese

Abhängigkeit von einem großen Produktionsland zu verringern, werden zunehmend auch neue Anbauflächen wie zum Beispiel Chile erschlossen.²

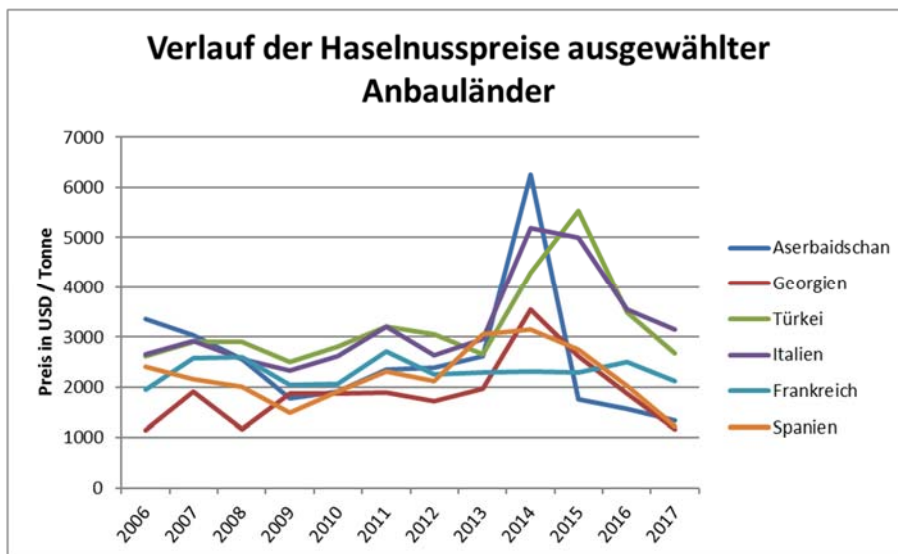


Abbildung 1: Verlauf der Haselnusspreise ausgewählter Anbauländer in den Jahren 2006-2017²

Die Türkei ist mit durchschnittlich 120.000-160.000 t in den Jahren 2000-2016 der weltweit führende Exporteur. Deutschland ist im Gegensatz dazu vor Italien und Frankreich der größte Importeur von Haselnüssen. 2016 bezog die deutsche Wirtschaft rund 62.000 t geschälte Haselnusskerne mit einem Wert von 551 Mio. USD. Dies entspricht 8,3 % der Weltproduktion.²

Schwerpunkt der Verarbeitung liegt bei der Süßwarenindustrie, welche die Haselnüsse für die Produktion von Schokoladenprodukten, Keksen, Süßigkeiten oder Feingebäck einsetzt.⁴

Bedeutung der Herkunft und Sorte

Von den weltweit rund 400 verschiedenen Haselnussorten sind lediglich 20 für die Wirtschaft von Bedeutung. Hierbei liegen die Qualitätsunterschiede u.a. bei den ökologischen Ansprüchen und Krankheitsresistenzen der Pflanzen oder Verwendungsmöglichkeiten und Aromaprofilen der Nüsse. So ist die Sorte *Tonda di Giffoni* bekannt für ihre gute Verarbeitungsqualität sowie konstante Erträge und eine hohe Resistenz gegenüber Krankheitserregern und Schädlingen.⁵

Auch die Sorte *Tonda Gentile Romana* wird von der Süßwarenindustrie aufgrund ihres Aromaprofils bevorzugt, welches von grün, fruchtig und erdig bis fettig reicht und nach der Röstung deutliche Popcorn- und Kaffee-ähnliche Aromen aufweist.⁶

Häufig korreliert die Sorte mit dem Anbauland, d.h. bestimmte Sorten werden überwiegend nur in einem Land angebaut. Dieser Zusammenhang tritt v.a. in den östlichen Anbaugebieten auf. Dort werden die Sorten oft auch nach der entsprechenden Region benannt. So kommen beispielsweise georgische Haselnüsse mit der Sortenangabe *Guria* aus der Region Gurien und die Sorte *Migrelien* aus dem Anbaugebiet Mingrelien. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Sortenbenennung beachtet werden muss, ist der sehr traditionelle Haselnussanbau z.B. in der Türkei. Häufig handelt es sich bei den anbauenden Betrieben um Familienbetriebe, in welchen Informationen zu den angebauten Sorten von Generation zu Generation weitergegeben werden. Daher sind die Bezeichnungen der unterschiedlichen Sorten oft traditionell geprägt und auf morphologische Merkmale zurückzuführen. Sie spiegeln damit nicht unbedingt die genetische Ausstattung, welche normalerweise für die Sortenbezeichnung ausschlaggebend ist, wider. Zwei Beispiele hierfür sind die Sorten *Sivri* und *Tombul* aus der Türkei. Es handelt sich hierbei um Haselnüsse, welche u.a. aufgrund ihrer morphologischen Merkmale unterschiedlichen Qualitätsklassen zugeordnet werden. *Sivri* bedeutet übersetzt „spitz“ und *Tombul* „mollig“. Die Sorte *Sivri* ist im Gegensatz zu der qualitativ hochwertigen *Tombul* aufgrund ihrer spitzen und länglichen Form weniger nachgefragt.⁷ Insgesamt ist daher zu beachten, dass sowohl unterschiedliche Sorten genetisch identisch sein können als auch innerhalb einer Sorte genetische Unterschiede vorliegen können.

Food Fraud – Problem für Wirtschaft und Verbraucher

Der Begriff *Food Fraud* bezeichnet Verstöße gegen das Lebensmittelgesetz im Bereich der Verbrauchertäuschung, welche schädlich für die gesamte Lebensmittelbranche sind, da sie zu einem wachsenden Misstrauen der Verbraucher gegenüber der Lebensmittelindustrie führen.

Auf EU-Ebene gibt es seit 2011 die von Europol und Interpol ins Leben gerufenen OPSON-Operationen, bei welchen länderübergreifend gegen Lebensmittelbetrug vorgegangen wird.

Auch Haselnusserzeugnisse, speziell aus der Türkei, Georgien und Italien, standen bereits im Rahmen der Operation OPSON VI (2016/2017) im Visier der Lebensmittelüberwachung, da der Verdacht auf Beimischung von Erdnüssen, Mandeln und Cashewkernen bestand.⁸

Für den Nachweis solcher Vermischungen gibt es bereits verschiedene analytische Methoden, welche auf ELISA- (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) oder PCR-basierten (*polymerase chain reaction*)

Ansätzen beruhen. Ebenso wurden bereits LC-MS- und NMR-Methoden für den Herkunftsnachweis von Haselnüssen auf der Basis des Metaboloms entwickelt.⁹⁻¹¹

Vermischungen von Haselnüssen unterschiedlicher Herkunft oder Sorte können jedoch mit den bisher entwickelten Methoden nicht erfasst und quantifiziert werden.

Die enormen Preisdifferenzen z.B. zwischen italienischen und georgischen Haselnüssen mit einer Größenordnung von bis zu 2.000 USD/t stellen ein starkes Motiv für die Streckung dar. Des Weiteren ist es notwendig, verlässliche Methoden für die Überprüfung von Auslobungen bzw.

Kennzeichnungen bzgl. geschützter Herkunftsangaben zu etablieren, da diese bisher lediglich aufgrund von Frachtpapieren geprüft werden können. In der DOOR (*Database of Origin and Registration*) der EU sind derzeit zwei geschützte Ursprungsbezeichnungen (g.U.) und drei

geschützte geografische Angaben (g.g.A.) für Haselnüsse eingetragen. Hierbei spielen sowohl die Herkunft und spezielle Anbauggebiete, als auch definierte Sorten eine entscheidende Rolle. So ist beispielsweise die g.g.A. „*Nocciola del Piemonte*“ bzw. „*Nocciola Piemonte*“ der Sorte *Tonda Gentile Trilobata* aus der Region Piemont in Italien vorbehalten.¹²

Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen an der Hamburg School of Food Science (HSFS) beschäftigen sich seit einigen Jahren mit der Entwicklung von Methoden zur Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln und deren Rohstoffen. So auch bei dem durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (BMWi) geförderten FEI-Projekt AiF 18751 N mit dem Titel „Sortenbestimmung von Haselnüssen mittels Next-Generation-Sequenzierungstechnologie und bioinformatischer Auswertung“. Ziel dieses Projektes war die Entwicklung molekularbiologischer Methoden für die Sortendifferenzierung von Haselnüssen auf Basis identifizierter Unterschiede zwischen den Chloroplastengenomen der verschiedenen Sorten.

Die DNA als Grundlage für die Analyse

Nach der *Omics*-Kaskade (siehe Abbildung 2) gibt es komplementäre Ansatzmöglichkeiten für die Untersuchung von Lebensmitteln und die Entwicklung von Methoden zur Authentizitätsbestimmung. Im Mittelpunkt der Analyse können das Genom, das Proteom, das Metabolom und das Isotopolom stehen. Das bedeutet, man kann sich auf die Gesamtheit der DNA, der Proteine, der Metabolite/Stoffwechselprodukte und Isotope beziehen und damit einen Fingerabdruck (*Food Profile*) eines Lebensmittels erstellen. Wie in Abbildung 2 zu sehen, sinkt die Stabilität der Analyten mit zunehmendem Einfluss anthropogener und natürlicher exogener Einflussfaktoren. Bei anthropogenen Faktoren handelt es sich um den menschlichen Einfluss wie z.B. die Düngung von Pflanzen. Natürliche exogene Einflüsse beschreiben allgemein die Umweltfaktoren wie klimatische Bedingungen oder Bodenbeschaffenheiten. Diese Faktoren können den Phänotyp beeinflussen. Das Genom (Genotyp) hingegen ist gegenüber diesen weitestgehend stabil und zeigt auch über längere Zeiträume nur geringe Veränderungen.³

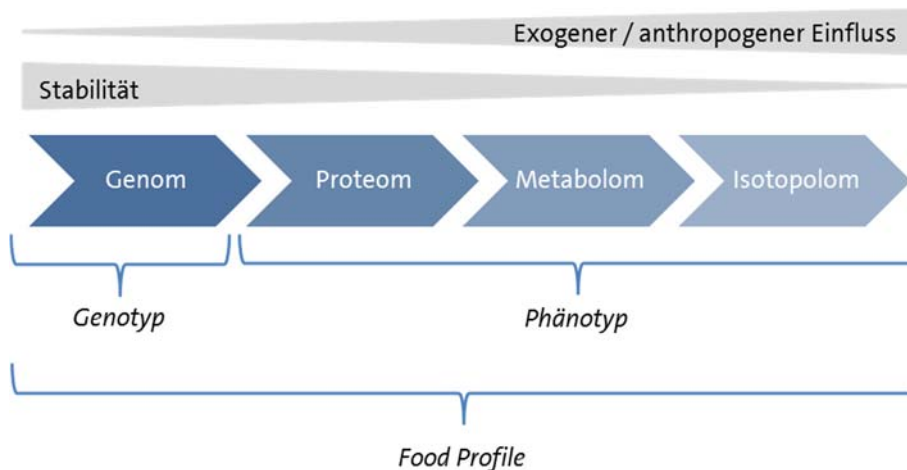


Abbildung 2: Omics-Kaskade (modifiziert nach³)

Das Genom stellt die Gesamtheit aller genetischen Informationen dar und ist an verschiedenen Orten einer Zelle lokalisiert. So liegen zusätzlich zu dem Kerngenom im Zellkern das Mitochondrien- und Chloroplastengenom in den entsprechenden Organellen vor. Bei dem vorliegenden Projekt wurde der Fokus auf das Chloroplastengenom gelegt, da dieses mit ca. 160.000 bp im Vergleich zu dem Kerngenom (ca. 400 Mbp) deutlich kürzer ist und daher der Sequenzierungsaufwand gering sowie die bioinformatische Auswertung der Sequenzierungsdaten einfacher zu realisieren ist.^{13,14} Des Weiteren wird es überwiegend maternal vererbt und ist dadurch unabhängig von der Bestäuberpflanze. Das Chloroplastengenom ist im Stroma der Chloroplasten, welche sowohl in den Blättern des Haselnussstrauchs, als auch in den Haselnusskernen vorliegen, lokalisiert und da es ursprünglich wahrscheinlich von Bakterien aufgenommen wurde (vgl. Endosymbiontentheorie) zirkulär aufgebaut.¹³

RAPD-PCR – ein nicht-zielgerichteter (*non-targeted*) Ansatz zur Sortendifferenzierung

Für die Sortendifferenzierung können sowohl *non targeted*- als auch *targeted*-Methoden herangezogen werden. Bei *non-targeted*-Methoden handelt es sich um nicht-zielgerichtete

Verfahren. Sie können also ohne bekannte Sequenzinformation durchgeführt werden. Klassische Beispiele hierfür sind die RAPD-PCR (*randomly amplified polymorphic DNA-PCR*) sowie die Mikrosatellitenanalyse.^{15–19} Bei der RAPD-PCR handelt es sich um ein *Fingerprinting*-Verfahren. Es wird also für jede Sorte ein spezifischer Fingerabdruck erzeugt. Hierfür wird eine PCR mit kurzen Oligonukleotiden (Primern) bei niedriger Annealingtemperatur (30-45 °C) durchgeführt. Bei dem Annealing handelt es sich um den PCR-Schritt, bei dem sich die Primer an den DNA-Einzelstrang anlagern. Die verringerte Temperatur führt dazu, dass die Primer sich auch bei nicht vollständiger Übereinstimmung der Sequenz an den DNA-Strang anlagern. Bindet der Primer in räumlicher Nähe auf beiden Strängen eines DNA-Doppelstrangs, so wird ein PCR-Produkt erzeugt. So entsteht bei der PCR eine Vielzahl an Amplifikaten unterschiedlicher Länge. Diese können anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden (siehe Abbildung 3). Dadurch erhält man für jede Sorte ein spezifisches Bandenmuster vergleichbar zu einem Fingerabdruck. Aufgrund von Unterschieden in den Bandenmustern können anschließend die Sorten voneinander unterschieden werden.

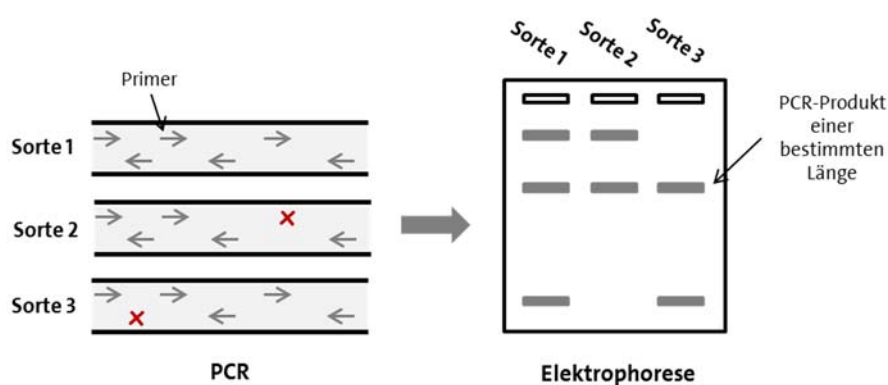


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer RAPD-PCR.

Im Rahmen des genannten Projektes wurden insgesamt 13 verschiedene Haselnussorten aus fünf Ländern mit 20 RAPD-Primern analysiert. Vier der Primer konnten für die Auswertung nicht herangezogen werden, da sie entweder keine Amplifikate bildeten oder keine Unterschiede in

den Bandenmustern der Sorten zu erkennen waren. Die verbliebenen 16 Primer zeigten überwiegend reproduzierbare Ergebnisse innerhalb der Sorten. Mit lediglich sieben ausgewählten Primern ist eine Sortendifferenzierung möglich. Dies zeigt der Entscheidungsbaum in Abbildung 4.²⁰ Für eine Unterscheidung wird die Analyse mit Primer 8 begonnen. Zeigt das Agarosegel der PCR nur zwei Banden der Längen 300 und 600 bp, so handelt es sich um die Sorten *Corabel*, *Butler* oder *Ennis*. Wurden mehr als zwei Amplifikate detektiert, so liegt eine der anderen Sorten vor. Im nächsten Schritt können die zuerst genannten Sorten mit Hilfe des Primers 16 weiter differenziert werden. Ist die Bande bei 1750 bp nicht zu detektieren, so handelt es sich um die Sorte *Corabel*. Nach diesem Schema können alle 13 analysierten Haselnussorten voneinander differenziert werden.

Dem Baum ist also einfach und schnell zu entnehmen wie viele PCRs und welche Primer für die Verifizierung einer Sorte notwendig sind. Für die Überprüfung einer Sorte sind mindestens zwei und maximal fünf Reaktionen notwendig.

Die RAPD-PCR ist damit eine kostengünstige und zeitlich effektive Methode, welche zur Sortendifferenzierung herangezogen werden kann.

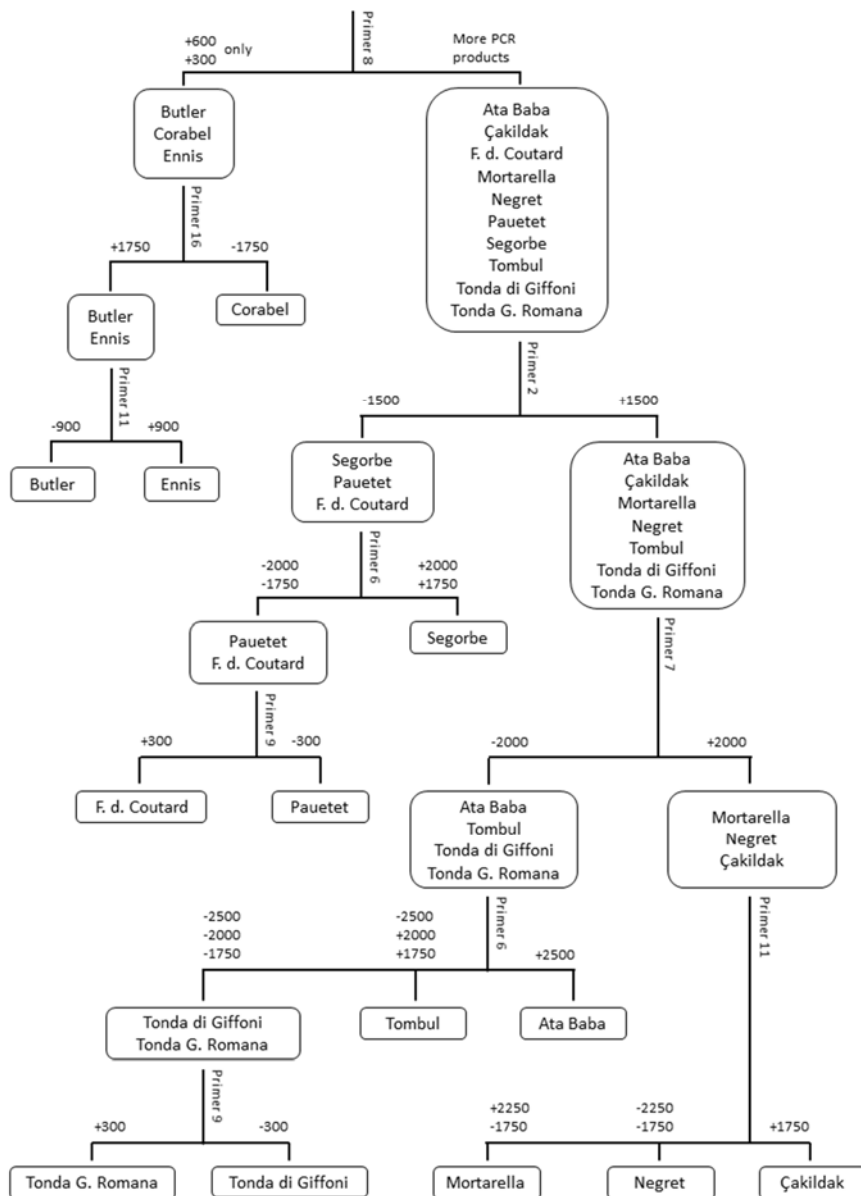


Abbildung 4: Entscheidungsbaum zur Differenzierung von 13 Haselnussorten mit Hilfe von sieben Primerpaaren. Die Nummern auf den horizontalen Linien zeigen die Fragmentlänge in bp an. (+) PCR-Fragment vorhanden und (-) PCR-Fragment nicht vorhanden.²¹

Genomsequenzierungen – die Basis für die Entwicklung gerichteter (*targeted*) Methoden

Für die Entwicklung einer *targeted*-Methode muss die Sequenz der untersuchten Matrix bekannt sein. Im Rahmen des genannten Projektes wurden daher zwölf verschiedene Haselnussorten aus drei Ländern mittels NGS (*next generation sequencing*) sequenziert. Hierbei wurde die Herangehensweise der *low coverage whole genome shotgun sequencing*-Strategie gewählt.^{21,22}

Das bedeutet, dass vor dem Sequenzierungsvorgang keine Isolierung oder Anreicherung der Chloroplasten erfolgte, sondern ein Gesamt-DNA-Isolat, welches neben der Chloroplasten- auch Mitochondrien- und Kern-DNA enthält, analysiert wurde. In einer diploiden Zelle liegt nur ein Zellkern mit zwei Chromosomensätzen vor. Zusätzlich liegen in einer Pflanzenzelle mehrere Chloroplasten (50-150) vor, welche wiederum eine mehrfache Kopie (10-100, *high copy*) ihres Genoms aufweisen.²³⁻²⁵ Die Werte variieren und sind abhängig von der Spezies sowie dem Alter der Pflanze.^{23,25} Damit liegt das Chloroplastengenom bei einem Gesamt-DNA-Isolat und damit ebenfalls bei der Sequenzierung als *high copy*-Fraktion vor. Entsprechende *Reads* (kurze abgelesene Fragmente bei der Sequenzierung) liegen dadurch redundant vor und können so relativ gut dem Chloroplastengenom zugeordnet werden. Für die anschließende Assemblierung der *Reads* wird in der vorliegenden Studie das 2016 veröffentlichte Chloroplastengenom einer nicht weiter definierten Sorte *Corylus avellana* (NCBI, Accession No. KX822768.2) als Matrize herangezogen. Zuletzt werden die assemblierten Sequenzen miteinander verglichen und Sequenzunterschiede identifiziert. Auf Basis identifizierter und validierter Sequenzunterschiede können schließlich PCR-basierte *targeted*-Methoden wie die RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) oder die HRMA (*high resolution melt analysis*) entwickelt werden. Das Ziel ist es, Verfahren zu etablieren, mit welchen auch Mischungen verschiedener Haselnussorten untersucht werden können. Denn sowohl die Quantifizierung als auch bereits die Identifizierung solcher Beimengungen kann mit den derzeitig vorhandenen Methoden nicht analysiert werden. Ergebnisse entwickelter *targeted*-Methoden auf Basis identifizierter Sequenzunterschiede auf dem Chloroplastengenom werden in Kürze veröffentlicht.

Resümee

Die Erfassung der biologischen Identität oder die Beantwortung welches Spezies oder welche Sorte wurde verwendet, gewinnt zunehmend an Bedeutung. Entsprechende qualitativen

Unterschiede können verkaufsfördernd ausgelobt sowie ein höherer Preis erzielt werden. Vorteile ergeben sich dabei sowohl für die Wirtschaft, als auch für die Verbraucher. Allerdings muss auch drin sein, was draufsteht! Bei den komplexen Beschaffungswegen reicht meist eine dokumentenbasierte Überprüfung nicht aus, es müssen Methoden zur experimentellen Kontrolle der Deklaration sowohl auf Seiten der innerbetrieblichen Qualitätskontrolle als auch auf Seiten der Überwachungsbehörden vorgehalten werden. Während spektroskopische Methoden hervorragend geeignet sind die geografische Herkunft über den Phänotyp zu bestimmen, ist die DNA, welche bei dem vorgestellten Projekt als Ausgangspunkt gewählt wurde, ein geeigneter Marker für den Nachweis des Genotyps also der biologischen Identität.

Förderhinweis

Das IGF-Vorhaben AiF 18751 N der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Fotos und Lebensläufe

Christina Lang



Lebensmittelchemikerin, Doktorandin (AK Prof. Dr. Markus Fischer); Schwerpunkt: Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln.

Christine Felbinger



Lebensmittelchemikerin, Doktorandin (AK Prof. Dr. Markus Fischer); Schwerpunkt: Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln.

Prof. Dr. Markus Fischer



Staatl. gepr. Lebensmittelchemiker, seit 2006 Direktor des Instituts für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg und Gründer/Direktor der HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE.

Literaturverzeichnis

- (1) Janick, J.; Paull, R. E., Eds. *The Encyclopedia of Fruit & Nuts*; CABI: Oxfordshire, UK, 2008.
- (2) FAO. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Friday, June 07, 2019.
- (3) Baumann, F.; Buschhausen-Denker, G.; Butschke, A.; Fischer, M.; Fritsche, J.; Holle, M.; Holleben, K. von; Krause, I.; van der Meulen, B.; Riehn, K.; Althoff, G. S.; Waalwijk, C. Lebensmittelsicherheit & Verpackung. *Food Profiling - Strategien zur Überprüfung der Authentizität von Rohstoffen, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. **2014**, *9*, S. 391–420.
- (4) Oddone, M.; Aceto, M.; Baldizzone, M.; Musso, D.; Osella, D. Authentication and traceability study of hazelnuts from Piedmont, Italy, *Journal of agricultural and food chemistry*. **2009**, *57*, S. 3404–3408.
- (5) Petriccione, M.; Ciarmiello, L. F.; Boccacci, P.; Luca, A. de; Piccirillo, P. Evaluation of ‘Tonda di Giffoni’ hazelnut (*Corylus avellana* L.) clones, *Scientia Horticulturae*. **2010**, *124*, S. 153–158.
- (6) Burdack-Freitag, A.; Schieberle, P. Characterization of the key odorants in raw Italian hazelnuts (*Corylus avellana* L. var. Tonda Romana) and roasted hazelnut paste by means of molecular sensory science, *Journal of agricultural and food chemistry*. **2012**, *60*, S. 5057–5064.
- (7) Özdemir, M.; Devres, O. Turkish hazelnuts: Properties and effect of microbiological and chemical changes on quality, *Food Reviews International*. **1999**, *15*, S. 309–333.
- (8) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit OPSON VI (2016/2017) - Haselnusserzeugnisse aus der Türkei, Georgien und Italien.
https://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/03_Verbraucher/16_Food_Fraud/06_OPSON_Operationen/OpsonVI/OPSON_Operationen_node.html. Sunday, June 09, 2019.
- (9) Klockmann, S.; Reiner, E.; Bachmann, R.; Hackl, T.; Fischer, M. Food Fingerprinting: Metabolomic Approaches for Geographical Origin Discrimination of Hazelnuts (*Corylus avellana*) by UPLC-QTOF-MS, *Journal of agricultural and food chemistry*. **2016**, *64*, S. 9253–9262.

- (10) Klockmann, S.; Reiner, E.; Cain, N.; Fischer, M. Food Targeting: Geographical Origin Determination of Hazelnuts (*Corylus avellana*) by LC-QqQ-MS/MS-Based Targeted Metabolomics Application, *Journal of agricultural and food chemistry*. **2017**, *65*, S. 1456–1465.
- (11) Bachmann, R.; Klockmann, S.; Haerdter, J.; Fischer, M.; Hackl, T. ¹H NMR Spectroscopy for Determination of the Geographical Origin of Hazelnuts, *Journal of agricultural and food chemistry*. **2018**, *66*, S. 11873–11879.
- (12) European Commission DOOR (Database of Origin and Registration).
<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html?locale=de>. Sunday, March 03, 2019.
- (13) Hu, G.; Cheng, L.; Lan, Y.; Cao, Q.; Huang, W. The complete chloroplast genome sequence of *Corylus chinensis* Franch, *Conservation Genetics Resources*. **2016**.
- (14) Öztürk, S. C.; Göktay, M.; Allmer, J.; Doğanlar, S.; Frary, A. Development of Simple Sequence Repeat Markers in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) by Next-Generation Sequencing and Discrimination of Turkish Hazelnut Cultivars, *Plant Molecular Biology Reporter*. **2018**, *36*, S. 800–811.
- (15) Galderisi, U.; Cipollaro, M.; Di Bernardo, G.; Masi, L. de; Galano, G.; Cascino, A. Identification of hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis, *Plant cell reports*. **1999**, *18*, S. 652–655.
- (16) Mehlenbacher, S. A.; Brown, R. N.; Nouhra, E. R.; Gokirmak, T.; Bassil, N. V.; Kubisiak, T. L. A genetic linkage map for hazelnut (*Corylus avellana* L.) based on RAPD and SSR markers, *Genome*. **2006**, *49*, S. 122–133.
- (17) Bassil, N. V.; Botta, R.; Mehlenbacher, S. A. Microsatellite Markers in Hazelnut - Isolation, Characterization, and Cross-species Amplification, *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **2005**, *130*, S. 543–549.
- (18) Gökirmak, T.; Mehlenbacher, S. A.; Bassil, N. V. Characterization of European hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars using SSR markers, *Genetic Resources and Crop Evolution*. **2009**, *56*, S. 147–172.

- (19) Gürcan, K.; Mehlenbacher, S. A.; Botta, R.; Boccacci, P. Development, characterization, segregation, and mapping of microsatellite markers for European hazelnut (*Corylus avellana* L.) from enriched genomic libraries and usefulness in genetic diversity studies, *Tree Genetics & Genomes*. **2010**, *6*, S. 513–531.
- (20) Felbinger C., Kutzsche F., Mönkediek S., Fischer M. Genetic Profiling: Differentiation and identification of hazelnut cultivars (*Corylus avellana* L.) using RAPD-PCR. (*Food Control*, in press).
- (21) Nock, C. J.; Waters, D. L. E.; Edwards, M. A.; Bowen, S. G.; Rice, N.; Cordeiro, G. M.; Henry, R. J. Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification, *Plant biotechnology journal*. **2011**, *9*, S. 328–333.
- (22) Kane, N.; Sveinsson, S.; Dempewolf, H.; Yang, J. Y.; Zhang, D.; Engels, J. M. M.; Cronk, Q. Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA, *American journal of botany*. **2012**, *99*, S. 320–329.
- (23) Liere, K.; Börner T. Development-Dependent Changes in the Amount and Structural Organization of Plastid DNA, *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence*. **2013**, *36*.
- (24) Powikrowska, M.; Oetke, S.; Jensen, P. E.; Krupinska, K. Dynamic composition, shaping and organization of plastid nucleoids, *Frontiers in plant science*. **2014**, *5*, S. 424.
- (25) Boffey, S. A.; Leech, R. M. Chloroplast DNA Levels and the Control of Chloroplast Division in Light-Grown Wheat Leaves, *Plant Physiology*. **1982**, *69*, S. 1387–1391.