

Daniel Illmeier, BSc, BEd

Anwendung der Marker Assisted Selection (MAS) in Tomatenpflanzen:

**Selektion von resistenten Pflanzen gegenüber dem Tomato
Mosaic Virus (ToMV)**

MASTERARBEIT

Zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (MSc)

Masterstudium Pflanzenwissenschaften

Eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Betreuerinnen

Ao. Univ.-Prof. Dr. phil., Maria Müller

Institut für Pflanzenwissenschaften, Karl-Franzens-Universität Graz

Mag. Dr. rer. nat., Alexandra Jammer

Institut für Pflanzenwissenschaften, Karl-Franzens-Universität Graz

Graz, November 2017

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Diese Masterarbeit ist das Ergebnis eines fordernden aber auch erfüllenden Prozesses, der sich über mehrere Monate erstreckt hat. Ich möchte mich sehr herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Studienzeit begleitet und unterstützt haben. Besonderer Dank gilt insbesondere jenen Personen, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Betreuerinnen Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. phil. Maria Müller und Frau Mag. Dr. rer. nat. Alexandra Jammer, welche mich sowohl fachlich, als auch persönlich in jeder Situation unterstützt haben.

Recht herzlich möchte ich mich auch bei Herrn DI Philipp Lammer bedanken, welcher die unkomplizierte und für mich sehr spannende Zusammenarbeit mit dem Verein Arche Noah ermöglichte. Für zu Verfügung gestelltes Saatgut, Pflanzenmaterial und für Labormaterialien gilt auch dem Verein selbst ein Dankeschön.

Ich danke Frau DI Dr. Sabine Grausgruber-Gröger von der AGES Wien für die Betreuung des Inokulations-Versuches, sowie für das Anlernen zugehöriger Techniken.

Des Weiteren möchte ich mich bei unserem Labortechniker Herrn Peter Krbez bedanken, welcher mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Ruth, die mich ermutigte, unterstützte und durch Korrekturlesen wesentlich zur Fertigstellung dieser Masterarbeit beigetragen hat.

Schließlich danke ich meinen Freunden, Freundinnen und Studienkolleg*innen für die vielen wunderbaren Jahre meiner Studienzeit in Graz.

Letztendlich möchte ich erwähnen, dass diese Masterarbeit ohne die liebevolle Unterstützung zweier ganz besonderer Menschen nicht zustande gekommen wäre, weshalb ich auch ihnen besonders danken möchte. Danke Mama und Papa, dass ihr mir immer den Rücken gestärkt habt, mich finanziell und moralisch unterstützt habt und vor allem immer an mich geglaubt habt und mir so meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht habt!

Ich danke euch allen für eure Unterstützung!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Die Tomate	3
1.1.1 Die Herkunft, Geschichte und Bedeutung der Tomate	4
1.1.2 Domestikation, Züchtung und Sortenvielfalt der Tomate	5
1.1.3 Genom.....	5
1.1.4 Abwehrmechanismen der Pflanze und ToMV-Resistenzgene.....	6
1.2 Das Tomatenmosaikvirus - Tomato Mosaic Virus (ToMV)	9
1.2.1 Verbreitungsgebiet, Wirtsspezifität und Übertragung	9
1.2.2 Genom.....	10
1.2.3 Aufbau und Lebenszyklus	11
1.2.4 Krankheitssymptome	12
1.2.5 Bekannte ToMV-Stämme	12
1.3 Markergestützte Selektion (MAS – Marker Assisted Selection).....	13
1.3.1 Molekulare Marker	14
1.3.2 Häufig verwendete molekulare Marker	15
1.3.3 Auswahl molekularer Marker für die vorliegende Arbeit.....	18
1.4 Relevanz des Themas.....	19
1.5 Zielsetzungen der Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Pflanzenanzucht	22
2.2 Pflanzenmaterial.....	23
2.3 Inokulation der Pflanzen.....	25
2.4 Probenahme/Blatternte	26
2.5 Materialien, Chemikalien und Enzyme.....	26

2.6	DNA-Längenstandards	26
2.7	Oligonukleotide	27
2.8	Extraktion von gDNA (genomische DNA)	27
2.8.1	Extraktion von gDNA mittels CTAB-Methode	27
2.8.2	Extraktion von gDNA nach Murray & Thompson (1980)	28
2.8.3	Extraktion von gDNA mit dem DNeasy® Plant Mini Kit	29
2.8.4	Überprüfung des Extraktions-Erfolges – Extraktions-Kontrollgel.....	29
2.9	CAPS-Analyse	30
2.9.1	Allgemeines.....	30
2.9.2	Arbeitsschritte.....	30
2.9.3	Auswertung.....	33
2.10	Tetra-Primer-ARMS-PCR	34
2.10.1	Allgemeines	34
2.10.2	Arbeitsschritte	34
2.10.3	Auswertung	36
3	Ergebnisse und Diskussion	37
3.1	Methoden-Etablierung	38
3.1.1	Extraktionsmethoden	38
3.1.2	CAPS-Analyse	39
3.1.3	Tetra-Primer-ARMS-PCR	44
3.1.4	Fazit der Methoden-Etablierung.....	49
3.2	Sorten-Genotypisierung	50
3.2.1	Extraktionsmethoden	50
3.2.2	CAPS-Analyse	51
3.2.3	Tetra-Primer-ARMS-PCR	54
3.2.4	Fazit der Sorten-Genotypisierung.....	57
3.3	Inokulations-Versuch.....	58
3.3.1	Fazit des Inokulations-Versuchs.....	62
4	Zusammenfassung und Ausblick	63
	Literaturverzeichnis	64

Anhang - Rohdaten	1
A 1 Methoden-Etablierung	1
A 1.1 Extraktions-Kontrollgele: Extraktionserfolg der Extraktion von gDNA	1
A 1.1.1 CTAB-Methode	1
A 1.1.2 DNeasy® Plant Mini Kit	3
A 1.1.3 Extraktion nach Murray & Thompson (1980)	4
A 1.2 CAPS-Analyse.....	7
A 1.2.1 PCR-Kontrollgel - Überprüfung des Amplifikations-Erfolges.....	7
A 1.2.2 Restriktions-Gel (abschließende Auswertung).....	11
A 1.2.3 Ergebnisse der Methoden-Etablierung mittels CAPS-Analyse	13
A 1.3 Tetra-Primer-ARMS-PCR.....	14
A 1.3.1 Agarose-Gel (abschließende Auswertung).....	14
A 2 Sorten-Genotypisierung	18
A 2.1. Extraktions-Kontrollgele: Extraktionserfolg der Extraktion von gDNA	18
A 2.1.1 DNeasy® Plant Mini Kit	18
A 2.2. CAPS-Analyse.....	20
A 2.2.1 PCR-Kontrollgel - Überprüfung des Amplifikations-Erfolges.....	20
A 2.2.2 Restriktions-Gel (abschließende Auswertung).....	22
A 2.2.3 Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung mittels CAPS-Analyse	28
A 2.3. Tetra-Primer-ARMS-PCR.....	32
A 2.3.1 Agarose-Gel (abschließende Auswertung).....	32
A 2.3.2 Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung mittels Tetra-Primer-ARMS-PCR	34
A 3 Inokulations-Versuch	35
A 4 Sequenzanalysen	39

Abkürzungsverzeichnis

3'-	am Carboxy-Terminus einer Nukleinsäure
5'-	am Amino-Terminus einer Nukleinsäure
Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARMS	Amplification-Refractory Mutation System
bp	Basenpaare
BspTI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus sp.</i> RFL1265I
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CC	Coiled-Coil
CP	Capsid Protein (= Hüllprotein)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv.	Cultivar (= Kultivar)
Da	Dalton
DArT	Diversity Array Technology
ddH ₂ O	doppelt destilliertes bzw. voll-entionisiertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
D. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englischer Begriff
et al.	und andere

etc.	et cetera, und so weiter
ff.	fortfolgend
FLX	Flex Physical Simulation
Fwd.	Forward, in 5'-3'-Richtung
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GV-Pflanze	genetisch veränderte Pflanze
GVO	genetisch veränderter Organismus
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
ha	Hektar
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HpaI	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus parainfluenzae</i>
l	Liter
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
K	Kelvin
kb	Kilobasenpaare
L.	Nomenklatur nach Linné
LRR	Leucine Rich Repeat
Lux	SI-Einheit der Beleuchtungsstärke
M	molar
m	Meter
MAS	Markergestützte Selektion (engl. Marker Assisted Selection)
min.	Minute(n)
mol	Mol
MP	Movement Protein (= Transportprotein)

n	n steht für einen haploiden und 2n für einen diploiden Chromosomensatz, wobei n die Anzahl der Chromosomen darstellt
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NBS	Nuclear Binding Site
ORF	Open Reading Frame (= Offenes Leseraster)
Pfl.	Pflanze; Einzelpflanze eines Kultivars der Untersuchung gefolgt von ihrer Nummer
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
PCR	Polymerase Chain Reaction (= Polymerasekettenreaktion)
PPFD	Photosynthetically Active Photon Flux Density (Einheit: $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
QTL	Quantitative Trait Locus
R-Allel	R für engl.: resistant; ToMV-resistentes Allel (<i>Tm-2</i> , <i>Tm-2a</i>)
R-Gen	Resistenz-Gen
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
Rev.	Reverse, in 3'-5'-Richtung
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur, 20° C
S.	Seite
S-Allel	S für engl.: susceptible; ToMV-sensitives Allel (<i>tm-2</i>)
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region

SMART	Selection with Markers and Advanced Reproductive Technologies
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (= Einzelnukleotid-polymorphismus)
SOLiD	Small Oligonucleotide Ligation and Detection System
ss(+)-RNA	einzelsträngige (engl. Single Stranded), positiv orientierte Ribonukleinsäure
SSR	Simple Sequence Repeat, Mikrosatelliten
ssRNA	einsträngige (Single Stranded) RNA
STR	Short Tandem Repeat, Mikrosatelliten
STS	Sequence-Tagged Site
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TMV	Tabakmosaikvirus
<i>tm-2</i>	Wildtyp-Allel am <i>Tm-2</i> -Locus (verleiht keine Resistenz)
<i>Tm-2</i>	Resistenzgen am <i>Tm-2</i> -Locus (verleiht Resistenz gegen die ToMV-Stämme 0 und 1)
<i>Tm-2a</i>	Resistenzgen am <i>Tm-2</i> -Locus (verleiht Resistenz gegen die ToMV-Stämme 0, 1 und 2)
ToMV	Tomatenmosaikvirus
ToMV0	ToMV Wildtyp – bricht keine der bekannten Resistenzen
ToMV-1	<i>Tm-1</i> -Resistenz brechender ToMV-Stamm
ToMV-1.2	<i>Tm-1</i> - und <i>Tm-2</i> -Resistenz brechender ToMV-Stamm
ToMV-2	<i>Tm-2</i> -Resistenz brechender ToMV-Stamm
ToMV-2 ²	<i>Tm-2a</i> -Resistenz brechender ToMV-Stamm
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit („Units“), 1 U = 1/60 µkat

UMH	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Muchamiel
u. a.	unter anderem
V	Volt
vgl.	vergleiche
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
W	Watt
Wdh.	Wiederholung
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Gravitationskonstante (x-faches der Fallbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$)

Verwendete Größeneinheiten:

M	10^6 , Mega-
k	10^3 , kilo-
m	10^{-3} , milli-
μ	10^{-6} , micro-
n	10^{-9} , nano-

Zusammenfassung

In der Pflanzenzüchtung sind neben den Zuchtzielen Ertrag, Qualität, Geschmack und Samenproduktion auch Toleranzen gegenüber bestimmten abiotischen und biotischen Stressbedingungen von Interesse. Zu letzteren zählen auch Viruserkrankungen, wobei sich diese Arbeit insbesondere mit dem *Tm-2a*-Resistenzallel der Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) gegen das Tomatenmosaikvirus (ToMV) beschäftigt. Es handelt sich dabei um ein Tobamovirus, welches weltweit verbreitet ist, sehr virulent ist und unter anderem Grund für signifikante Ertragsverluste sein kann (Ullah et al., 2017). Infektionen können die Tomatenernte auch qualitativ beeinträchtigen (Hudcovicová et al., 2015). Aufgrund von ToMV-resistenten Sorten spielt das ToMV im Erwerbsanbau kaum mehr eine Rolle (Lammer, 2014). Der steigende Bedarf an alten Sorten und Raritätensorten am Markt hat aber zur Folge, dass das ToMV in Gebieten, in welchen alte Sorten und Raritätensorten angebaut werden, wieder in Erscheinung tritt (Hanssen et al., 2010; Brandstetter, 2016). Mittels markergestützter Selektion (MAS) können resistente Pflanzen ohne Anwendung gentechnischer Methoden gezüchtet werden, wobei es aber diagnostischer Methoden bedarf, welche das Vorhandensein von Resistenzgenen in einzelnen Individuen nachweisen können. In den durchgeführten Untersuchungen wurden zwei PCR-Markermethoden, die CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)-Analyse und die Tetra-Primer-ARMS(Amplification-Refractory Mutation System)-PCR, auf ihre Anwendbarkeit getestet. Beide Methoden arbeiten mit SNP(Single Nucleotide Polymorphism)-Markern, die sich als zuverlässige Methoden zur Genotypisierung des ToMV-Resistenz-Locus *Tm-2* eignen. Die Tetra-Primer-ARMS-PCR erwies sich als zu bevorzugende Methode. Anhand der im Inokulations-Versuch beobachteten Symptome konnte gezeigt werden, dass die Genotypen mit den Phänotypen korrelieren. Es wurde nachgewiesen, dass bereits das heterozygote Vorhandensein des *Tm-2a*-Allels Resistenz gegenüber ToMV verleiht. Gewonnene Erkenntnisse könnten mithilfe der MAS in der partizipativen Pflanzenzüchtung angewandt werden, um resistente Kultivare alter Sorten zu züchten, deren Anbau eine Ausbreitung des ToMV in Zukunft begrenzen könnte.

Abstract

In plant breeding, in addition to the breeding goals of yield, quality, taste and seed production, tolerances against certain abiotic and biotic stress conditions such as viral diseases are also of interest. The present work particularly focuses on the *Tm-2a*-resistance gene of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) against the tomato mosaic virus (ToMV). It is a very virulent Tobamovirus which is distributed worldwide and can cause serious yield losses (Ullah et al., 2017) and even affect tomato fruit quality (Hudcovicová et al., 2015). Due to ToMV-resistant varieties, ToMV plays a minor role in commercial tomato production (Lammer, 2014). However, market driven changes in tomato production towards “old” varieties and so-called “specialty” cultivars lead to the reemergence of ToMV in tomato production areas where these “old” cultivars are grown (Hanssen et al., 2010; Brandstetter, 2016). Through marker assisted selection (MAS) resistant cultivars can be bred without the use of genetic engineering, but diagnostic methods are required to detect resistance alleles in individual plants. In the present work, two PCR marker methods, the CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) analysis and the Tetra-Primer ARMS (Amplification-Refractory Mutation System)-PCR technique, were tested for their applicability. Both methods are based on SNPs (single nucleotide polymorphisms) markers and can be considered reliable for genotyping the ToMV resistance locus *Tm-2*. The Tetra-Primer ARMS-PCR technique proved to be the most efficient method of choice. The inoculation experiment showed that the observed phenotypes coincided with the phenotypes that were to be expected based on the results of the genotyping experiment. It could be shown that the heterozygous presence of the allele *Tm-2a* was sufficient to confer ToMV resistance. Based on the presented findings, MAS could be applied in participatory breeding approaches to obtain resistant cultivars of “old” tomato varieties, the cultivation of which could help to limit the future spread of ToMV.

1 Einleitung

Einleitend befasst sich dieser Teil mit der im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden Kulturpflanze, nämlich mit der kultivierten Tomate *Solanum lycopersicum* L. Eine gleichermaßen wichtige Rolle spielt das als Tomatenpathogen agierenden Tomatenmosaikvirus zu, auf das danach eingegangen wird. Hinleitend auf mögliche Methoden zur Sortenverbesserung werden im Anschluss molekulare Marker beschrieben. Marker-Analysen, wie sie auch im Zuge dieser Arbeit durchgeführt wurden (siehe Abschnitt 2.9 und Abschnitt 2.10), kommen auch in der markergestützten Selektion zur Anwendung und können die Züchtung krankheitsresistenter Pflanzen beschleunigen.

1.1 Die Tomate

Die im Zentrum dieser Arbeit stehende Kulturpflanze ist die Tomate, welche den wissenschaftlichen Namen *Solanum lycopersicum* L. trägt. Die botanisch veraltete, aber synonyme Bezeichnung *Lycopersicon esculentum* findet noch häufig Anwendung in der Landwirtschaft und in der Agronomie (Lammer, 2014; Kohlmann, 2016). Aufgrund der gelben Farbe, die die Früchte hatten als die Pflanze nach Europa gelangte, wurden die Früchte damals in Italien als „pomi d'oro“ (Goldäpfel) bezeichnet (Kohlmann, 2016). Die Tomate galt anfangs als giftig, was aber nur für die Blätter zutrifft (Miedaner, 2014). Aufgrund ihres verführerischen, süßen Geschmacks wurde sie als Aphrodisiakum vermutet. Die Franzosen nannten sie deshalb „Pommes d'amour“ (Liebesäpfel), in Österreich werden Tomaten nach wie vor Paradeiser (von Paradiesäpfel) genannt (Miedaner, 2014).

Die Tomate ist eine krautige, einjährige Pflanze aus der Familie der Solanaceae (Nachtschattengewächse). Sie ist nahe verwandt mit der Kartoffel, der Aubergine, der Tabakpflanze, dem Paprika, den Chilis und weiteren Nutzpflanzen aus den Solanaceae. Die Gattung *Solanum* ist mit 1250 bis 1700 Arten die größte Gattung der Solanaceae. Die nach der Lebensmitteldefinition zum Fruchtgemüse zählenden Früchte von Tomatenpflanzen (Slavin et al., 2012) sind botanisch gesehen Beeren und dementsprechend kein Gemüse, werden in der gemeinen Sprache aber als solches bezeichnet (Bergougnoux, 2014). Die Tomate besteht etwa zu 95 % aus Wasser. Der restliche Anteil setzt sich aus Kohlenhydraten (55 %) wie Glukose und Saccharose, unlöslichen Zellbestandteilen (21 %) wie Pektinen und Zellulose, organischen Säuren (12 %) und Mineralien (7 %) zusammen. Die übrigen 5 % der Trockenmasse bestehen aus

Pigmenten aus der Gruppe der Carotinoide (Betacarotin, Lycopin), aus Vitaminen (Vitamin C, B, K, und E) und aus volatilen Komponenten (Blancard, 2012).

1.1.1 Die Herkunft, Geschichte und Bedeutung der Tomate

In Europa war die Tomate *Solanum lycopersicum* L. vor der Entdeckung Amerikas durch Christoph Kolumbus noch unbekannt (Blancard, 2012), was sich im Zuge der als „Columbian Exchange“ genannten (ersten) Globalisierungsphase änderte (Miedaner, 2014). Die exakte Herkunft der Kulturtomate ist bis dato nicht eindeutig geklärt und Angaben dazu sind je nach Quelle sehr unterschiedlich. Da die nächsten wildlebenden Verwandten der Tomate entlang der Westküste von Zentral- und Südamerika beheimatet sind, liegen die Ursprünge der Domestikation der Tomate unterschiedlichen Hypothesen zufolge entweder in Peru oder in Mexiko (Kohlmann, 2016). In Europa breitete sich der Konsum der Tomate ausgehend von den mediterranen Regionen Europas ab dem späteren 18. Jahrhundert Richtung Nordeuropa aus. Bis ins 19. Jahrhundert fand die Tomate nur wenig Anwendung. Erst im 20. Jahrhundert gelang der Pflanze der Durchbruch als Kulturpflanze - sowohl in der kommerziellen, als auch in der privaten Kultivierung (Blancard, 2012; Lammer, 2014). Die Kulturtomate wurde durch Züchtung der Wildform *S. pimpinellifolium* domestiziert (Sahu et al., 2017). Die ursprüngliche Form der Tomate ist nicht bekannt (Kohlmann, 2016). Darstellungen aus dem 16. und 17. Jahrhundert deuten darauf hin, dass die ersten nach Europa eingeführten Tomatenpflanzen größtenteils flachrunde, gerippte und entweder gelbe oder rote Früchte hervorbrachten (Lammer, 2014). Beeren der ursprünglichen in Südamerika kultivierten Wildform brachten nur wenige Gramm auf die Waage. Die Früchte moderner Sorten können hingegen bis zu 1 kg wiegen (Graw, 2015). Während 1905 in der deutschen Warenstatistik Tomaten noch gar nicht aufschienen, wurden 1937 bereits auf 2000 ha Anbaufläche Tomaten kultiviert. In den vorangegangenen Jahrhunderten entstanden neue Typen oft weitgehend zufällig. Durch bewusste Tomatenzüchtung kam es in den 1930er und 1940er Jahren zu einer enormen Fülle an verschiedenen Tomatensorten (Lammer, 2014). Erst nach dem Ersten Weltkrieg erreichte die Tomate wirtschaftliche Bedeutung. 1961 wurden weltweit rund 28 Millionen Tonnen Tomaten produziert, 2014 waren es bereits knapp 171 Millionen Tonnen (Spelsberg et al., 2017). Während vor 20 Jahren Europa und Amerika die größten Tomatenproduzenten waren, zählen heute China, Indien, die USA, Türkei, Ägypten und der Iran zu den wichtigsten Anbauländern (Bergougnoux, 2014).

1.1.2 Domestikation, Züchtung und Sortenvielfalt der Tomate

Bei Pflanzen kann die Domestikation als Auswahl geeigneter Wildsorten entsprechend ihrer Phänotypen betrachtet werden. Diese wiederholte Selektion einiger Loci für bessere Ausbeute, Qualität und Anpassungsfähigkeit führte zur Diversifizierung, die in Sortenunterschieden resultierte (Sahu et al., 2017). Tomatenarten können selbstkompatibel oder selbstinkompatibel sein, während deren Befruchtungsmodi von allogam über fakultativ allogam bis hin zu autogam reichen können. Wie die meisten Tomaten ist auch die kultivierte Tomate *Solanum lycopersicum* L. selbstkompatibel und fakultativ autogam, weshalb die Keimung des selbst produzierten Pollens auf der eigenen Narbe nicht behindert wird und somit Selbstbefruchtung erfolgen kann (Bergougnoux, 2014). Die überwiegend auftretende Autogamie unter Tomatenarten trug zum Erhalt und zur Vermehrung interessanter Linien bei, wohingegen vereinzelt auftretende Fremdbefruchtung immer wieder zur Entstehung neuer Typen führte. Die Selektion von Pflanzen nach ihren Eigenschaften kann aber auch in genetischer Verarmung resultieren. Während der anfänglichen Domestikation in Süd- und Zentralamerika und später, auch in Europa kam es sogar zu genetischen Flaschenhals-Effekten (Lammer, 2014). Die häufigsten Merkmale, nach denen selektiert wird, sind mit der Fruchtform und mit der Fruchtgröße assoziiert. Es gibt aber auch Traits (engl. Merkmal), welche die Eigenschaften von Kultivaren beeinträchtigen, wie etwa Anfälligkeiten gegenüber Schädlingen und Krankheitserregern, weshalb zu den prominenten Zuchtzielen in der Tomatenzüchtung auch Resistenzen gegen biotischen Stress zählen. Vor 50 Jahren wurde das bewusste Einkreuzen von Resistenzgenen aus Wildtomaten erstmals beschrieben (Bergougnoux, 2014). Wildtomaten haben eine hohe genetische und phänotypische Diversität. Aufgrund der wiederholten Selektion nach agronomisch wichtigen Merkmalen kommt es aber nach wie vor zur Erosion genetischer Diversität in kultivierten Tomaten. In zukünftigen Züchtungsprogrammen könnte der Genpool durch die Introgression von Genen aus Wildtomatenarten oder aus Varietäten anderer Länder wieder vergrößert werden (Sahu et al., 2017), was nötig wäre, um eine nachhaltige Pflanzenproduktion aufrecht erhalten zu können (Liu et al., 2017).

1.1.3 Genom

Die kultivierte Tomate besitzt zwölf Chromosomen ($2n = 24$), ihr Genom umfasst in etwa 35.000 Gene (Chhakekar et al., 2016) und hat eine Gesamtgröße von ca. 900 Mbp (Graw, 2015). Das Genom der Tomate wurde vom „Tomato Genome Consortium“ vollständig sequenziert und 2012 veröffentlicht (Ohyama et al., 2016). Der Unterschied der Nukleotidsequenz der kultivierten Tomate zu jener der Wildtomatenart

S. pimpinellifolium beträgt nur 0,6 %. Zum Genom der ebenfalls zu den Nachtschattengewächsen gehörenden Kartoffel *S. tuberosum* beträgt der Unterschied 8 %. Im Genom der Tomate kommen, vorzugsweise in Gen-reichen Regionen, kleine RNA-Gene vor, welche vermutlich eine regulatorische Funktion besitzen. Zwei aufeinanderfolgende Verdreifachungen des Genoms sind vermutlich die Grundlage für „neue“ Funktionen vieler Gene der Solanum-Arten, welche Eigenschaften der Früchte (z. B. die Farbe oder den fleischigen Charakter) kontrollieren (Graw, 2015).

1.1.4 Abwehrmechanismen der Pflanze und ToMV-Resistenzgene

Bevor auf die pflanzlichen Abwehrmechanismen eingegangen werden kann, gilt es, einige Grundbegriffe zu erläutern. Eine Toleranz einer Pflanze gegenüber einem Pathogen liegt dann vor, wenn trotz eines nachweislichen Pathogenbefalls ein Leistungsabfall ausbleibt. Eine Toleranz richtet sich nicht direkt gegen einen Erreger. Letzterer kann sich mehr oder weniger ungestört in der Pflanze entwickeln. Bei einer Resistenz ist die Situation eine andere. Unter dem Begriff Resistenz ist die Widerstandsfähigkeit eines Wirts gegen einen biotischen Schaderreger (z. B. Bakterien, Pilze, Viren, Insekten) zu verstehen, welcher an seiner weiteren Ausbreitung auf oder in der Pflanze gehindert wird. Die genetischen Ursachen einer Resistenz können sehr vielfältig sein. Die Pflanzenwissenschaft entwickelt sich in diesem Bereich momentan sehr rasch, was sich in der Anzahl an verschiedenen Modellen, die die pflanzliche Pathogenabwehr zu erklären versuchen, widerspiegelt (Hanke et al., 2017).

Pflanzliche Abwehrmechanismen setzen sich aus der Kombination einiger Systeme zusammen (siehe Abb. 1). Die erste Barriere gegen einen Pathogenbefall bilden verschiedene präformierte Mechanismen, über die die Pflanze dauerhaft, also auch ohne Pathogenbefall, verfügt. Des Weiteren verfügen Pflanzen über ein System, das als Nichtwirtsresistenz bezeichnet wird. So kann etwa eine Pflanzenart von einem bestimmten Pathogen sehr effektiv infiziert werden, andere Pflanzenarten aber nicht (Hanke et al., 2017).

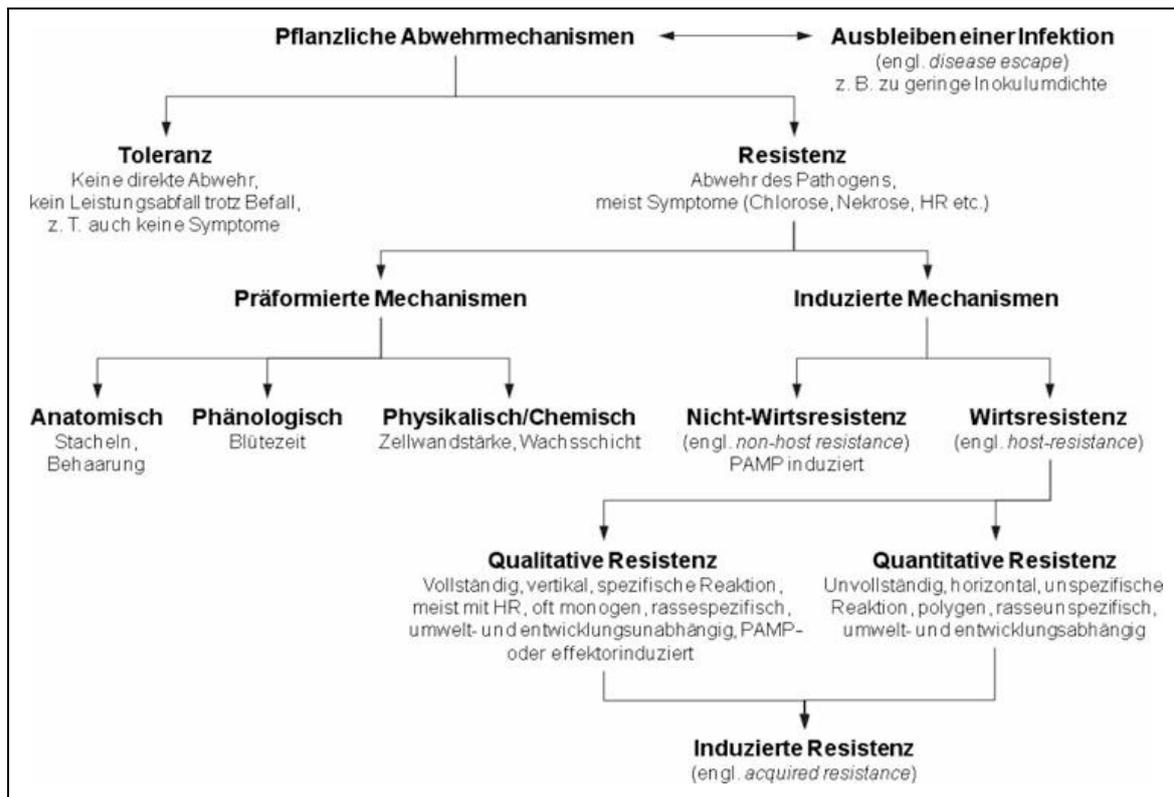


Abb. 1 – Verschiedene Formen und Ebenen der pflanzlichen Pathogenabwehr aus Hanke et al. (2017).

Ein weiteres System, nämlich jenes der Wirtsresistenz (siehe Abb. 1), kann in quantitative und qualitative Resistenzen unterteilt werden. Quantitative Resistenzen werden in der Regel polygen vererbt und sind daher genetisch sehr komplex. Diese Art von Resistenz ist dauerhaft und rassenunspezifisch, aber zumeist unvollständig, d. h. Genotypen mit einer quantitativen Resistenz können dennoch anfällig sein. Es handelt sich dabei um ein Merkmal, an dessen Ausprägung mehrere Regionen im Genom beteiligt sein können, die alle einen prozentuellen Beitrag zur Ausprägung des Traits leisten. Solche Regionen werden als QTLs (Quantitative Trait Loci) bezeichnet. In der Züchtung sind solche QTLs interessant, da sie einen Großteil der phänotypischen Ausprägung eines Merkmals erklären. Qualitative Resistenzen hingegen werden zumeist monogen vererbt und führen zu sehr starken und hochspezifischen Abwehrreaktionen, die oft mit dem programmierten Zelltod befallener Zellen einhergehen und als Hypersensitiver Response (HR) bezeichnet werden (Hanke et al., 2017).

Die Mechanismen der Virusinfektion bzw. deren Abwehr im Falle einer vorliegenden qualitativen Resistenz, können relativ einfach anhand der von Flor (1942) aufgestellten Gen-für-Gen-Hypothese (engl. Gene-for-Gene-Concept) erklärt werden. Es stehen die Resistenzgene auf der Seite der Wirtspflanze den Virulenzgenen auf der Seite des Pathogens gegenüber. Die Resistenzgene sind an der erfolgreichen Abwehr des Pathogens beteiligt, während die Virulenzgene für die erfolgreiche Überwindung der Wirtsresistenz notwendig sind (Hanke et al., 2017). Die Gen-für-Gen-Hypothese

beschreibt die gemeinsame Evolution eines Krankheitserregers und seiner Wirtspflanze und kann für die Tomate und das Tomatenmosaikvirus angewandt werden. Das Pathogen, (in diesem Fall das ToMV) besitzt wie zuvor beschrieben einerseits Virulenzgene zur möglichen Überwindung der Wirtsresistenz und andererseits Avirulenzgene. Letztere können eine Infektion unterbinden und für das Pathogen selbst hinderlich sein, wenn nämlich exprimierte Genprodukte des Pathogens eine Signalwirkung in der Wirtspflanze haben (Elicitoren). Es erfolgt eine Erkennung des Pathogens, wenn die Wirtspflanze (in diesem Fall *Solanum lycopersicum*) Resistenzgene besitzt und dadurch über spezifische Rezeptoren verfügt, welche die vom Pathogen gebildeten Elicitoren wahrnimmt. Die Pflanze kann das Pathogen dann erfolgreich abwehren (Hull, 2009; Hanke et al., 2017).

Die Antwort von Kultivaren der Tomatenpflanze auf eine ToMV-Infektion hängt von der Anwesenheit oder Abwesenheit von Resistenzgenen ab (Hudcovicová et al., 2015). Bisher wurden drei monogen vererbte und dominante ToMV-Resistenzgene in Wildtomatenarten gefunden und in kommerzielle Tomatenlinien eingekreuzt (Loebenstein et al., 2006). Die genannten Gene werden fortfolgend beschrieben.

Die am *Tm-2*-Locus auf Chromosom 9 (in der Nähe des Centromers) vorkommenden Allele *Tm-2* und *Tm-2a* (in der Literatur auch als *Tm-2²* bezeichnet) begründen das Resistenzgen *Tm-2*. Beide wurden aus der Wildtomatenart *Solanum peruvianum* L. eingekreuzt. Das *Tm-2*-Allel verleiht Resistenz gegenüber den ToMV-Stämmen 0 und 1, das *Tm-2a*-Allel gegenüber den ToMV-Stämmen 0, 1 und 2 (Arens et al., 2007a; Hudcovicová et al., 2015). Zwischen den Sequenzen der beiden Allele konnten sieben SNPs gefunden werden, wobei fünf dieser SNPs zu einer Variation von vier Aminosäuren führen (Arens et al., 2007a). In einer Tomate mit vorhandenem *Tm-2*- oder *Tm-2a*-Allel übernimmt die zuvor beschriebene Rezeptorfunktion das exprimierte R-Protein (Resistenz-Protein), welches der Klasse 2 der R-Proteine angehört und eine CC-NBS-LRR-Struktur (CC = Coiled-Coil; NBS = Nuclear Binding Site; LRR = Leucine Rich Repeat) besitzt (Hull, 2009; Lee et al., 2015). Dieses R-Protein wechselwirkt mit dem in der infizierten Wirtszelle transient exprimierten und als Avirulenz-Faktor dienendem ToMV-Transportprotein (Movement Protein, MP) (He et al., 2012). Es erfolgt eine Erkennung, d. h. das R-Protein wird aktiviert und löst sofort eine Reihe von spezifischen Abwehrmechanismen in der Zelle aus (Hanke et al., 2017). In der Folge kommt es zur Ausbildung einer Resistenzreaktion, welche als extreme Resistenz (ER) bezeichnet wird, da die Infektion auf die infizierte Zelle begrenzt wird (Hull, 2009). Zudem kann unter bestimmten Umständen ein hypersensitiver Response (HR) ausgelöst werden, welcher zum Zelltod führt und sich durch lokale chlorotische Läsionen und manchmal auch durch verbreitete Nekrosen bemerkbar macht. Die Ausbreitung des Virus auf die Nachbarzellen

wird dadurch begrenzt (Hull, 2009). Zudem kann ausgehend von der Infektionsstelle eine Salicylsäure-vermittelte Antwort für die systemisch erworbene Resistenz initiiert werden (Tanwir, 2011).

Das Resistenzgen *Tm-1* befindet sich auf Chromosom 2 von *Solanum lycopersicum*. Zur Entstehung dieses Gens dürften horizontaler Gentransfer und Genfusion beigetragen haben. Das so entstandene Gen, welches für einen direkten Inhibitor der ToMV-RNA-Replikation kodiert (Yang et al., 2016), wurde aus der Wildtomatenart *Solanum habrochaites* (syn. *Lycopersicon hirsutum*) eingekreuzt und verleiht Resistenz gegenüber den ToMV-Stämme 0 und 2. In einer Tomate mit vorhandenem *Tm-1* Gen übernimmt ein ca. 80 kDa großes R-Protein mit einer TIM-Barrel-Struktur, die zuvor beschriebene Rezeptorfunktion. Es inhibiert die als Avirulenz-Faktor dienende Replikase. Das Gen verleiht extreme Resistenz (ER) (Hull, 2009).

Das *Tm-2a*-Allel wurde bereits Jahrzehnte eingesetzt, um Tomatenpflanzen vor Infektionen zu schützen (Hu et al., 2015). Die Sequenzen am *Tm-2*-Locus vorkommenden Allele, sind unter den GenBank Accession-Nummern AF536199 (*tm-2*), AF536200 (*Tm-2*) und AF536201 (*Tm-2a*) abrufbar (Hudcovicová et al., 2015).

1.2 Das Tomatenmosaikvirus - Tomato Mosaic Virus (ToMV)

Bei dem Tomatenmosaikvirus (ToMV) handelt es sich um ein Virus aus der Gattung der Tobamoviren innerhalb der Familie der Virgaviridae (Lee et al., 2015), welches mit dem Tabakmosaikvirus (TMV) nahe verwandt ist (Foolad et al., 2012). Es wurde lange angenommen, dass ToMV nur ein Stamm des TMV ist. Erst später erfolgte die taxonomische Trennung in distinkte Viren mit nahem Verwandtschaftsverhältnis (He et al., 2012).

1.2.1 Verbreitungsgebiet, Wirtsspezifität und Übertragung

Das Auftreten des Tomatenmosaikvirus an Tomatenpflanzen wurde erstmals 1909 im Bundesstaat Connecticut in den USA beschrieben. ToMV wurde lange Zeit zum bereits ab 1886 in den Niederlanden erstmals aufgetretenen TMV gezählt. Durch umfangreiche Forschung zum Thema konnten Unterschiede hinsichtlich der Serologie, des Genoms und der Wirtsspezifität der Viren festgestellt und beschrieben werden. Das Virus tritt auf allen Kontinenten auf. Zum Wirtsspektrum zählen Pflanzen aus der Familie der

Nachtschattengewächse (Solanaceae). Bevorzugt befallen werden dabei Tomaten- und Paprikapflanzen (Blancard, 2012).

Das Virus lässt sich sehr leicht mechanisch (z. B. durch landwirtschaftliche Praktiken) über infizierte Samen, sowie in äußerst geringerem Ausmaß durch Fraßschäden (Insekten, Säugetiere und Vögel) verbreiten. Auch unter ungünstigen Bedingungen ist das Virus sehr stabil, kontaminiert den Boden und kann in abgestorbenen Pflanzenteilen und Wurzelresten im Boden bis zu zwei Jahren persistieren (Cerkauskas, 2004; Blancard, 2012). In feuchten Böden kann das Virus nur etwa ein Monat überdauern (Johnson et al., 2015).

1.2.2 Genom

ToMV ist ein ss(+)RNA-Virus mit einer Länge von etwa 6384 bp (Lee et al., 2015). Die nicht-segmentierte RNA kodiert für vier Proteine (siehe Abb. 2). Zwei davon sind an der Replikation beteiligt: Der ORF 1 (Open Reading Frame) kodiert für eine Methyltransferase/Helikase (126 kD). Das supprimierbare Stop-Codon von ORF 1 wird in 10 % aller Fälle überlesen und führt zur Translation von ORF 2, der für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (184 kD) kodiert, welche auch als Replikase bezeichnet wird. Beide Proteine sind an der Replikation beteiligt (Tanwir, 2011). Weiters kodiert ORF 3 für ein Transportprotein (Movement Protein, MP; 30 kD), das die Plasmodesmen vergrößert und so für den interzellulären Transport der Viruspartikel sorgt und mit der Replikase kooperiert. Für das Hüllprotein (Coat Protein, CP; 17,5 kD) kodiert der ORF 4 (He et al., 2012; Rabie et al., 2017). Das Transportprotein und das Hüllprotein werden von zwei subgenomischen RNAs translatiert (Gerhardts, 2008). Während des Self-Assembly-Prozesses werden die Hüllproteine helikal angeordnet, bis die RNA stäbchenförmig verpackt ist. Die Hüllproteine wirken zudem beim Langstreckentransport mit (Hull, 2009; He et al., 2012). Analysen der MP- und CP-Gene von Virusisolaten unterschiedlicher geographischer Herkunft zeigten hohe Homologien von 98 - 99 % auf Nukleotid- und 97 - 98 % auf Aminosäurelevel. Die Sequenzvariabilität hängt nicht mit dem geographischen Vorkommen eines Isolates zusammen (Rabie et al., 2017). Mischinfektionen von Tomaten mit ToMV und TMV sind keine Ausnahme, wobei reine ToMV-Infektionen überwiegen, da die Tomaten der bevorzugte Wirt von ToMV sind (Ullah et al., 2017). Viren verschiedener Gattungen innerhalb der Familie der Virgaviridae können miteinander rekombinieren. Die Rekombination trägt zur genetischen Diversität von ToMV und TMV bei und könnte damit eine potentielle Strategie der Viren sein, die Evolution voranzutreiben (He et al., 2012). Deshalb empfiehlt es sich, die Entwicklung von Viruskrankheiten und deren genetische Biodiversität zu beobachten (Rabie et al., 2017).

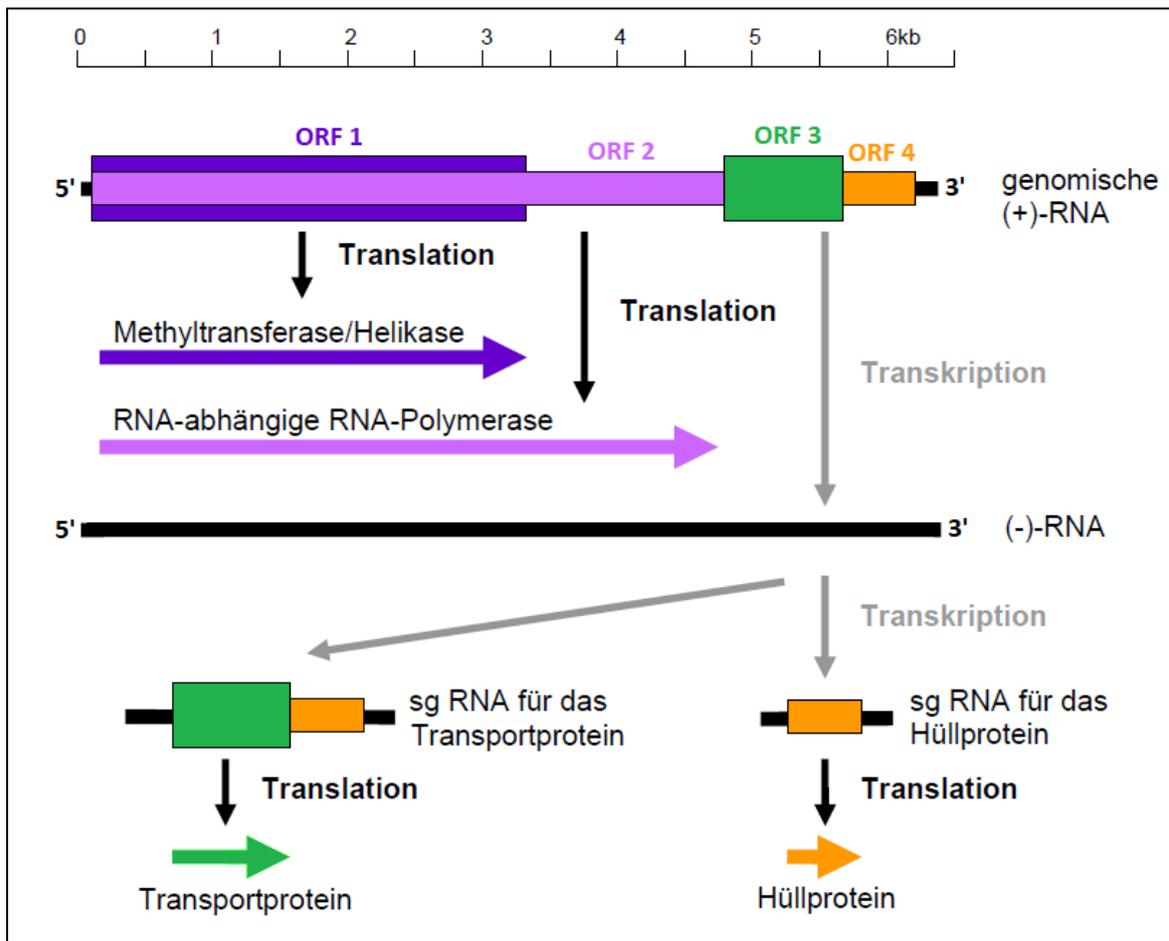


Abb. 2 - Genomorganisation und Expression der Proteine bei ToMV. Die genomische Plus-Strang-RNA, die Minus-Strang-RNA sowie subgenomische RNAs (sgRNAs) sind schwarz dargestellt, die ORFs und Peptidsequenzen farbig (Replikationsproteine in blau/violett, Transportprotein grün, Hüllprotein orange). Das Translations- und Transkriptionsschema ist durch schwarze und graue Pfeile angezeigt. Die Länge des ToMV-Genoms von 6384 bp wird durch einen Zahlenstrahl angegeben. Abgeändert nach Gerhardts (2008).

1.2.3 Aufbau und Lebenszyklus

Das aus etwa 2100 Einheiten aufgebaute Capsid des ToMV ist helikal um die RNA angeordnet (Hull, 2009). Die infektiösen Partikel haben die Form gerader Stäbchen einer Größe von 300 nm x 18 nm (Hollings et al., 1976) und bestehen zu ca. 95 % aus Hüllprotein und zu 5 % aus RNA (Gerhardts, 2008).

Das Tomatenmosaikvirus kann, wie bereits erwähnt, mechanisch übertragen werden. Als Eintrittspforte in die Pflanze dienen dabei verletzte Epidermiszellen (Gerhardts, 2008). Um eine Infektion hervorzurufen, müssen in der Wirtszelle die Hüllproteine im Zuge des Uncoating-Prozesses abgespalten werden. Die freiliegende RNA wird, da ToMV eine (+)ssRNA besitzt, direkt translatiert. Aufgrund der 5'-CAP-Struktur, welche auch bei Eukaryonten vorhanden ist, wird die RNA von den Ribosomen erkannt und es werden die Methyltransferase/Helikase und die Replikase (RNA-abhängige RNA-Polymerase) synthetisiert. Unter Vorlage des Plus-Stranges wird der Minus-Strang transkribiert,

welcher wiederum als Matrize für die Transkription der subgenomischen mRNAs fungiert. Letztere dienen der Translation des Hüllproteins und des Transportproteins. Später im Infektionszyklus wird, ausgehend vom Minus-Strang als Matrize, wieder gleich lange, komplementäre Plusstrang-RNA synthetisiert, die benachbarte Zellen infizieren kann oder mit Hüllproteinen wieder zu kompletten Virus-Partikel zusammengesetzt wird (Hull, 2009).

1.2.4 Krankheitssymptome

Symptome können in allen Wachstumsphasen und an allen Pflanzenteilen auftreten (Hollings et al., 1976). Die Unterscheidung zwischen ToMV und TMV alleine anhand der Symptome gilt als schwierig. TMV ist jedoch eher ein Tabak-Pathogen als ein Tomaten-Pathogen (Johnson et al., 2015). Insbesondere bei jungen Pflanzen ist die Unterscheidung zwischen Virusinfektionen und Nährstoffmangel aufgrund der ähnlichen Symptomatik oft nicht eindeutig möglich (Panthee et al., 2013). Neben verlangsamtem Wachstum oder Zwergwuchs können bei anfälligen (engl.: susceptible) Pflanzen Symptome wie Nekrosen, lokale Läsionen, hellgrüne bis dunkelgrüne Chlorosen, Mosaikmuster und Streifenmuster auftreten. Die Blätter können relativ klein bleiben, deformiert sein oder Blattrollen aufweisen. Es kann auch zum Absterben des Haupttriebes kommen. Die Früchte können chlorotische Ringe und Verbräunungen der Fruchtwand aufweisen. Die Ernte kann durch verminderte Fruchtzahlen, durch kleinere Fruchtgrößen und durch ungleichmäßige Reife beeinträchtigt werden (Hollings et al., 1976; Blancard, 2012; Johnson et al., 2015).

1.2.5 Bekannte ToMV-Stämme

Grundsätzlich wird zwischen den ToMV-Stämmen 0, 1, 2, 1.2 und 2² unterschieden. Die Stammklassifizierung wird nach der Virulenz der Stämme auf Tomatenpflanzen mit bestimmten Resistenzgenen vorgenommen. ToMV-Stämme, die kein Resistenz-Gen umgehen können, werden als ToMV-0 zusammengefasst. Können Stämme das *Tm-1*-Gen überwinden, so werden sie ToMV-1 genannt. Jene Stämme, die das *Tm-2*-Allel überwinden können werden als ToMV-2 bezeichnet und Stämme die sowohl *Tm-1*, als auch *Tm-2* brechen, werden als ToMV-1.2 zusammengefasst. Stämme, die das *Tm-2a*-Allel überwinden, werden ToMV-2² genannt (Hull, 2009; Zitter, 2012). Gegen die Stämme 0 bis 2 sind Resistenzgene bekannt (Arens et al., 2007a), welche in Abschnitt 1.1.4 genauer beschrieben werden.

1.3 Markergestützte Selektion (MAS – Marker Assisted Selection)

Die Pflanzenzüchtung ist eine der ältesten Wissenschaften der Menschheitsgeschichte. Sowohl klassische kreuzungsbasierte Züchtung, als auch Züchtung unter Einbezug unterschiedlicher biotechnologischer Methoden, zielen auf die Veränderung des genetischen Materials der Pflanze ab, um neues oder verbessertes Pflanzenmaterial zu erzeugen. Zur Kreuzung werden Elternpflanzen seit langem anhand phänotypischer Eigenschaften ausgewählt, um dann Nachkommen mit beiden wertvollen Eigenschaften zu züchten. Begrenzte Bodenressourcen, Wasserknappheit, die wachsende Bevölkerung der Erde und Bedrohungen durch den Klimawandel sind neue Herausforderungen für die Züchtung (Malysheva-Otto et al., 2009). Auch der Erhalt und die Weiterentwicklung von bestehenden alten Sorten und Raritätensorten zählen zu den züchterischen Aufgaben, mit welchen sich beispielsweise der Verein Arche Noah und deren Partner auseinandersetzen (Lammer, 2014). Eine möglichst rasche Anpassung an sich immer schneller ändernde Umwelteinflüsse ist wünschenswert bzw. wird in der Zukunft immer wichtiger werden. Dies kann nur dann in einem verkürzten Zeitrahmen geschehen, wenn der genetische Hintergrund relevanter Merkmale integriert wird. In den letzten Jahrzehnten haben Wissenschaftler*innen große Datenmengen über pflanzliche Genome gesammelt, welche als effiziente Basis für moderne Pflanzenzüchtung dienen (Malysheva-Otto et al., 2009). Auch zur Tomate *Solanum lycopersicon* wurden viele wissenschaftliche Daten generiert. So sind beispielsweise auf PubMed über 20.000 Artikel zur Tomate und seit 2010 auch die Genomsequenzen zweier Tomatensorten abrufbar (Malysheva-Otto, persönliche Kommunikation, 27.10.2017).

Die Marker Assisted Selection (MAS) nützt wissenschaftliche Erkenntnisse über den genetischen Hintergrund und verwendet unterschiedliche Techniken der Genetik und der Molekularbiologie zu diagnostischen Zwecken. Konventionelle Züchtungsprozesse können dadurch beschleunigt werden und gestalten sich in Folge kostengünstiger (Knoepffler et al., 2013). Die MAS basiert auf der Anwendung von molekularen Markern, welche in Abschnitt 1.3.1 näher beschrieben werden. Diese, mit einem bestimmten Locus assoziierten Marker sind an ein bestimmtes Merkmal gekoppelt. In der Resistenzzüchtung ist das assoziierte Gen ein Resistenz-Gen (ein R-Gen). Mithilfe molekularer Marker kann im Zuge der MAS der Genotyp für den betreffenden Locus einer Pflanze identifiziert werden, welcher wiederum für die Selektion relevant sein kann. Der Phänotyp spielt keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle (Pathania et al., 2017). Die Kreuzungseltern werden entsprechend der Ergebnisse der Marker-Analysen ausgewählt (Malysheva-Otto et al., 2009). In der Literatur sind für MAS auch die synonym verwendeten Bezeichnungen „Präzisionszüchtung“ und „SMART Breeding“ (engl.: Selection with Markers and Advanced Reproductive Technologies) zu finden. Manche Autor*innen ordnen „SMART Breeding“

jedoch den gentechnischen Verfahren zu (Knoepffler et al., 2013). Es ist anzumerken, dass die in dieser Arbeit beschriebene MAS-Methodik keine gentechnischen Veränderungen im Sinne des österreichischen Gentechnikgesetzes (GTG 1994, § 4 Abs. 3) an Pflanzen vorsieht, und somit auch nicht den gentechnischen Verfahren zuzuordnen ist.

MAS ersetzt die traditionelle Pflanzenzüchtung nicht, sondern macht sie effizienter und reduziert die notwendige Zeit für neue Sortenentwicklungen. Die MAS hat sich bei Pflanzenzüchtern bewährt, da sie Lösungen für Probleme (z. B. Pflanzenkrankheiten) bietet, welche bei der Anwendung herkömmlicher Kulturverbesserungsprogramme auftreten. Gegenwärtig wird MAS für die Introgression von Genen und von QTLs für die Krankheitsresistenz eingesetzt (Pathania et al., 2017).

1.3.1 Molekulare Marker

Genetische Marker können in klassische Marker und in DNA basierte Marker unterteilt werden. Bei klassischen Markern handelt es sich um morphologische, zytologische und biochemische Marker (Pathania et al., 2017). DNA basierte Marker, welche auch als molekulare Marker bezeichnet werden, sind kurze DNA-Abschnitte, die eindeutig identifizierbar sind und deren Ort im Genom bekannt ist (Küng, 2002, p. 58). Diese Marker basieren auf Sequenzvariationen der genomischen DNA der zu untersuchenden Individuen und sind mit dem entsprechenden Gen assoziiert, ohne dieses zu repräsentieren. Sie sind im Gen selbst oder in der näheren Umgebung lokalisiert und eskortieren oder flankieren dieses, ohne den Phänotyp des Merkmals am Locus zu beeinflussen. Die Assoziation eines molekularen Markers mit einem bestimmten Gen ist die Voraussetzung für dessen Anwendbarkeit in der MAS. Marker sind weitgehend akzeptierte und nützliche Werkzeuge in der Pflanzenzüchtung (Pathania et al., 2017).

Mithilfe von DNA-Markern wurden zwischen 1986 und 1988 die ersten genetischen Karten der Tomate und anderer Pflanzen erstellt. Ab den frühen 1990er Jahren wurden qualitative Traits (engl. Merkmal) identifiziert und in Karten eingezeichnet, wie beispielsweise der *Pto* Locus der Tomate, welcher Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* verleiht (Borém et al., 2014). Aufgrund der wirtschaftlichen und wissenschaftlichen Bedeutung der Tomate wurden die genetischen und molekularen Mechanismen von Krankheitsresistenzen gegen eine Vielzahl von Tomaten-Krankheiten intensiv untersucht. Derzeit sind molekulare Marker für Resistenzen gegen folgende wichtige Tomatenkrankheiten bekannt: TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus), TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus), *Verticillium*-Welke, *Fusarium*-Welke, Kraut- und Braunfäule (*Phytophthora infestans*), Samtfleckenkrankheit (*Cladosporium fulvum*), Wurzelgallen-

nematoden-Befall (*Meloidogyne sp.*), Bakterienfruchtflecken (*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*) und ToMV. Die bekannten Marker können zur MAS eingesetzt werden und Tomatenzüchtungsprogramme vorantreiben (Lee et al., 2015).

Eine der größten Herausforderungen ist die Wahl des richtigen Markers für eine vorgesehene Anwendung. In Abschnitt 1.3.2 wird ein Überblick über die derzeit am häufigsten verwendeten Marker-Typen gegeben.

1.3.2 Häufig verwendete molekulare Marker

Seit den 1980er-Jahren wurden weltweit unterschiedliche DNA-Marker entwickelt (Müntz et al., 2013). Molekulare Marker können kodominant und dominant sein. Kodominanz bedeutet, dass bei diesen Markern im Gegensatz zu dominant vererbten Markern auch zwischen Homozygotie und Heterozygotie am Locus unterschieden werden kann (Arens et al., 2009). Während kodominante Marker die Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Sequenzen erlauben, kann mit dominanten Markern nur das Fehlen oder Vorhandensein einer Sequenz festgestellt werden. DNA-Marker können in hybridisierungsbasierte, PCR-basierte und sequenzbasierte Marker eingeteilt werden, welche fortfolgend beschrieben werden (Pathania et al., 2017).

a) Hybridisierungsbasierte Marker

Detektiert wird bei hybridisierungsbasierten Markern durch eine Hybridisierung mit Komplementärsequenzen, welche eine Markierung tragen (Caixeta et al., 2014).

RFLP – Restriction Fragment-Length Polymorphism

RFLP-Marker wurden ab 1975 verwendet. Sie basieren auf dem Restriktionsverdau von zu vergleichenden Sequenzen mit denselben Restriktionsenzymen. Sequenzunterschiede führen zu unterschiedlich langen Fragmenten, welche in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran werden die Fragmente mit DNA-Sonden detektiert (Caixeta et al., 2014).

DART – Diversity Array Technology

Die ab 2001 verwendeten DART-Marker erlauben eine simultane Genotypisierung von hunderten von Polymorphismen. Nach dem Restriktionsverdau der Proben mehrerer Individuen derselben Spezies folgt die Adapter-Ligation, selektive Amplifikation und darauffolgend die Klonierung der Fragmente in einen Vektor. Die aufgereinigten Fragmente werden fluoreszenzmarkiert und im Zuge von Microarray-Diversitätsanalysen zur Hybridisierung herangezogen. Es wird bestimmt, welche Fragmente artspezifisch und

welche nur individualspezifisch sind. Für die Erstellung und Verwendung von DArT-Markern muss keine Sequenzinformation vorliegen (Caixeta et al., 2014).

b) Sequenzbasierte Marker

Marker, welche auf der Nukleotidabfolge der zu untersuchenden Nukleinsäure beruhen, werden als sequenzbasierte Marker bezeichnet (Ohyama et al., 2016). Für Sequenzierungen kann auf klassischen Anwendungen, wie beispielsweise auf die Sanger-Methode, oder auf Next Generation Sequencing Technologien zurückgegriffen werden. Letztere reicht von 454 FLX (Roche) über Solexa (Illumina) bis hin zu SOLiD System (Applied Biosystems) (Pathania et al., 2017). Auf Sequenzdaten beruhen auch SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (Ohyama et al., 2016).

SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms

Bei einem SNP handelt es sich um den Sequenzunterschied eines einzigen Nukleotids zwischen zwei Sequenzen. Solche Unterschiede entstehen durch Substitutionsreaktionen. Die Nukleotid-Base ist die kleinste Informationseinheit der DNA. Demnach sind SNPs die simpleste Form von molekularen Markern. Typische SNP-Frequenzen von Pflanzen liegen etwa bei einem SNP pro 100 - 300 bp. SNPs treten in kodierenden, in nicht-kodierenden und in intergenischen DNA-Regionen auf (Pathania et al., 2017). Für eine erfolgreiche Hybridisierung am SNPs sind die vorherrschenden Reaktionsbedingungen, die den SNP umgebende Sequenz und die Sekundärstruktur der Zielsequenz ausschlaggebend (Caixeta et al., 2014). Der Einsatz von SNP-Markern eignet sich für Anwendungen wie High-Density-Genotypisierungen, QTL-Detektionen, MAS und Genom-weite Markerselektionen (Ohyama et al., 2016).

c) PCR-basierte Marker

Molekulare Marker, deren Detektion auf PCR-Reaktionen aufbaut, werden PCR-basierte Marker genannt. PCR-Marker-Methoden können mit ortsspezifischen Primern (z. B.: CAPS, SCAR, STS) oder mit unspezifischen Primern zufälliger Sequenz (z. B.: RAPD, AFLP, ISSR) durchgeführt werden (Pathania et al., 2017).

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RAPD-Marker sind die gängigsten Marker dominanter Natur. Sie bestehen aus einem 10 bp DNA-Fragment, welches als Zufalls-Primer fungiert und zumeist bei 37 °C auf das DNA-Template hybridisiert wird (Pathania et al., 2017). Befindet sich eine Primerbindesequenz in 5'-3'-Richtung und eine zweite komplementär im Gegenstrang in räumlicher Nähe, so wird der Bereich dazwischen amplifiziert. Im Vergleich zu

kodominanten Markern lässt sich mit RAPD-Marker wenig Information gewinnen (Ohyama et al., 2016).

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphisms

Die selektive Amplifikation von durch Enzymverdau gewonnenen Fragmenten bildet die Basis für AFLP-Marker. Die Fragmente werden mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt, die ein charakteristisches Bandenmuster als Ergebnis liefert. Allelische Varianten können aufgrund der geringen Sensitivität der Methode nicht immer unterschieden werden (Caixeta et al., 2014).

SCAR – Sequence Characterized Amplified Regions

Bei SCAR-Markern handelt es sich um Locus-spezifische Marker. Bei dieser Technik werden bekannte Fragmente aus RAPD- oder AFLP-Assay mittels spezifischer Primer amplifiziert. Die Methode bietet den Vorteil, dass dominante Marker in kodominante Marker umgewandelt werden können (Caixeta et al., 2014; Pathania et al., 2017).

ISSR – Inter-Simple Sequence Repeats

Diese Marker basieren auf der Amplifikation von Fragmenten zwischen zwei entgegengesetzt angeordneten, identischen Mikrosatelliten-Regionen. Oligonukleotide, die zu den Sequenzwiederholungen der Mikrosatelliten komplementär sind, dienen dabei als Primer (Pathania et al., 2017).

STS – Sequence-Tagged Sites

Als STS wird eine kurze und einzigartige Sequenz eines Genoms bezeichnet. Die Sequenz muss in allen Individuen einer Spezies nachweisbar sein. STS-Marker sind kodominante Marker (Pathania et al., 2017).

Mikrosatelliten: SSR– Simple Sequence Repeats, STR – Short Tandem Repeats

Hypervariable Sequenzen wie SSRs und STRs werden auch Mikrosatelliten genannt. Sie sind eine Gruppe von sich wiederholenden Sequenzmotiven, welche in ihrer Länge von 1 bp bis 6 bp reichen können. Mikrosatelliten sind in Eukaryonten weit verbreitet und können sich in der Anzahl der Wiederholungen der repetitiven Einheiten voneinander unterscheiden. Mikrosatelliten sind kodominante Marker. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Mikrosatelliten flankierenden Regionen hochkonservativ sind. Diese Regionen eignen sich für das Designen von Primern, von welchen aus die Wiederholungsmotive amplifiziert werden können (Caixeta et al., 2014; Pathania et al., 2017).

CAPS – Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

Die Basis für die kodominanten CAPS-Marker ist das Fehlen oder Vorhandensein von Restriktionsstellen in den zu unterscheidenden Allelen (Pathania et al., 2017). Es wird ein DNA-Abschnitt amplifiziert, welcher den zur Detektion notwendigen SNP enthält (Ohyama

et al., 2016). Beim Restriktionsverdau mithilfe einer Restriktions-Endonuklease, welche aufgrund des im Allel vorkommenden SNPs eine Schnittstelle hat und im anderen nicht, entstehen je nach vorkommendem Allel unterschiedliche Muster aus charakteristischen DNA-Fragmenten am Agarosegel (Fischer et al., 2008) (siehe auch Abschnitt 2.9).

Tetra-Primer-ARMS-PCR – Amplification-Refractory Mutation System

Die Tetra-Primer-ARMS-PCR basiert auf zwei Techniken: Auf der Tetra-Primer-PCR und auf der ARMS-Technik (Amplification-Refractory Mutation System) (Medrano et al., 2014). Hierfür werden vier Primer entworfen, welche ebenso auf SNPs zwischen zu unterscheidenden Allelen basieren (Ye et al., 2001). Um den Genotyp zu bestimmen, werden dabei vier Primer in einer einzigen PCR angewandt. Zwei äußeren nicht-Allel-spezifische Primer (die Outer-Primer) amplifizieren die SNP-enthaltende Region. Das dadurch entstehende Fragment dient als Template für die zwei inneren Allel-spezifischen Primer (die Inner-Primer), wodurch in weiterer Folge die Allel-spezifischen PCR-Fragmente entstehen. Die Tetra-Primer-ARMS-PCR basiert auf der Mismatch-Strategie, was bedeutet, dass die Spezifität der Methode durch Mismatches am 3'-Ende der inneren Primer zustande kommt. Die letzte Base am 3'-Strang entspricht dem jeweiligen SNP (welcher den Polymorphismus zwischen Allelen begründet), die vorletzte Base ist häufig ein bewusst eingeführter Mismatch, welcher die unspezifische Bindung am konträren Allel verhindern sollte. Dadurch, dass die äußeren Primer so designt werden, dass sie unterschiedlich große Abstände zum SNP (und somit auch zu den inneren Primern) haben, können die entstehenden unterschiedlich großen Amplifikate (siehe Tabelle 7) am Agarosegel unterschieden werden (Medrano et al., 2014). Die in dieser Arbeit verwendete Tetra-Primer-ARMS-Methode (siehe Abschnitt 2.10) bedient sich zweier Assays (also zweier paralleler PCR-Reaktionen, welche jeweils vier Primer verwenden), um eine kodominante Unterscheidung zwischen drei Allelen zu ermöglichen (Lanfermeijer et al., 2005).

1.3.3 Auswahl molekularer Marker für die vorliegende Arbeit

Die Wahl eines molekularen Markers hängt vom Gegenstand der Anwendung ab (Pathania et al., 2017). In dieser Arbeit wurden molekulare Marker verwendet, um eine Genotypisierung von Tomatenpflanzen hinsichtlich ihres Allels am *Tm-2*-Locus durchführen zu können. Beide angewandten Methoden, sowohl die CAPS-Analyse, als auch die Analyse mittels Tetra-Primer-ARMS-PCR, basieren auf SNP-Markern (siehe Abschnitt 1.3.2), die die kodominante Unterscheidung zwischen den drei Allelen *tm-2* (sensitives Allel, S-Allel), *Tm-2* und *Tm-2a* (beides resistente Allele, R-Allele) erlauben. Die

Unterscheidung zwischen homo- oder heterozygoten Genotyps erfolgt in beiden Fällen durch Unterschiede in den ausgebildeten Bandenmustern auf einem Agarosegel (Arens et al., 2009). Im Zuge dieser Arbeit wurden Sequenzanalysen der Allele und deren Primerbindestellen für die verwendeten molekularen Marker der CAPS-Analyse und der Tetra-Primer-ARMS-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse und schematische Darstellungen der Sequenzen sind dem Anhang (siehe A 39 ff.) zu entnehmen.

1.4 Relevanz des Themas

Das Tomatenmosaikvirus wurde 1909 erstmals beschrieben (Blancard, 2012). Durch Züchtungsprogramme konnten Resistenzgene aus Wildtomatenarten in kultivierte Tomatenarten eingekreuzt werden (Tanwir, 2011; Lee et al., 2015).

Das Tomatenmosaikvirus ist einer der wichtigsten limitierenden Faktoren hinsichtlich der Tomatenproduktion weltweit, da es die Pflanze völlig zerstören kann. ToMV tritt in den meisten Ländern der Welt auf und kann in manchen Kulturpflanzen sogar Epidemien auslösen (Krezhova et al., 2010). So kann ToMV-Befall, sofern es sich um keine resistenten Pflanzen handelt, zu Ernteaussfällen führen, welche je nach Stärke des Befalls Verluste von etwa 30 % verursachen (Ullah et al. 2017; Grausgruber-Gröger, persönliche Kommunikation, 2017). Zudem werden auch qualitative Verluste beschrieben (Hudcovicová et al., 2015). Da es sich beim Tomatenmosaikvirus nicht um einen Quarantäne-Schaderreger handelt, gibt es in Österreich keine Datenaufzeichnungen über ToMV-Infektionen (Grausgruber-Gröger, persönliche Kommunikation, 2017). Im Erwerbsanbau spielt das ToMV kaum mehr eine Rolle, da meist resistente Sorten verwendet werden (Lammer, 2014). Im letzten Jahrzehnt stieg der Bedarf an alten Sorten und Raritätensorten am Markt an (Hanssen et al., 2010). Im Gegensatz zu konventionellen Kultivaren, besitzen Raritätensorten zumeist keine ToMV-Resistenz. Die Folge ist, dass das ToMV und das ebenso zu den Tobamoviren gehörende und verwandte Tabakmosaikvirus (TMV) in Gebieten, in welchen alte Sorten und Raritätensorten angebaut werden, wieder vorkommen (Hanssen et al., 2010; Brandstetter, 2016). Die jüngste Vermarktung von ToMV-anfälligen Tomatenpflanzen hat gezeigt, dass das Virus nach wie vor eine Gefahr darstellt (Blancard, 2012). Dieser Entwicklung kann entgegengewirkt werden, indem das Genom dieser anfälligen Kultivare um die ToMV-Resistenz erweitert wird. Diese genetische Veränderung kann mithilfe verschiedener Methoden umgesetzt werden. Unter Anwendung von Gentechnik lassen sich transgene Pflanzen erzeugen. Es wird dabei entweder auf Agrobakterium-vermittelte Gentransfermethoden, auf biolistische Transfers oder auf Protoplastentransformationen zurückgegriffen (Laimer et al., 2016). Auch

Methoden, welche unter Genome Editing-Techniken zusammengefasst werden, führen zu genetisch veränderten Organismen (GVO). Anders ist es bei der Pflanzenzüchtung. Traditionell werden hier genetische Veränderungen durch Mutations- oder Kreuzungszüchtungen erreicht (Ribarits, 2014), es kommt jedoch zu keinen gentechnischen Veränderungen im Sinne des österreichischen Gentechnikgesetzes (GTG 1994, § 4 Abs. 3). Erforderliche genetische Veränderungen, um eine ToMV-Resistenz zu erreichen, können auch mit der gentechnikfreien Anwendung der MAS erzielt werden (siehe Abschnitt 1.3).

Partizipative Züchtung zur Weiterentwicklung der Kulturtomate

Aufgrund neuer biotechnologischer Anwendungen wie beispielsweise dem DNA-Mapping eröffnen sich völlig neue Möglichkeiten für die Landwirtschaft. Mit Marker-Karten lassen sich komplexe Zusammenhänge von Phänotypen mit deren Genotypen herstellen. Die Anwendung moderner Entwicklungen ist aber kostenintensiv und benötigt einiges an Fachwissen. Die Pflanzenzüchtung birgt wirtschaftliche Risiken, insbesondere für Kleinbetriebe. Für industrielle Züchtungsbetriebe und multinationale Konzerne, welche nötige technische und finanzielle Mittel haben, fallen diese Risiken größtenteils weg. Die Anwendung neuer Züchtungsmethoden ist zwar Konzernen, nicht aber Kleinbetrieben möglich. Kleine Züchtungs-Kooperationen können sich aber bewähren, wenn sie in der Lage sind auf die Bedürfnisse der beteiligten Produzent*innen und Kund*innen einzugehen (Borgen et al., 2016). Zentralisierte Pflanzenzüchtung kann den Bedürfnissen der Verbraucher*innen aufgrund der unterschiedlichen vorherrschenden Umweltbedingungen oft nicht nachkommen (Lammer, 2014). Um die Erwartungen der Konsument*innen erfüllen zu können, müssen angepasste Genotypen verwendet werden. Partizipative Pflanzenzüchtung spielt hierfür eine zentrale Rolle (Spagnuolo et al., 2016).

In Österreich wurde auf Initiative einiger Gärtner*innen 2010 eine Arbeitsgruppe gegründet, welche es sich zum Ziel machte, Tomatensorten mit guter Eignung für den biologischen Anbau und mit vielfältigen Fruchtqualitäten zu erhalten und weiter zu entwickeln (Lammer, 2014). Die meisten beteiligten Produzent*innen sind BIO AUSTRIA-Landwirt*innen aus den Bundesländern Oberösterreich, Niederösterreich, Burgenland und der Steiermark. Für die fachliche Begleitung sorgen verschiedene Lehr- und Forschungseinrichtungen wie die Versuchsstation für Spezialkulturen Wies, der Verein Arche Noah, die Universität für Bodenkultur Wien, die Gartenbauschule Langenlois und das Lehr- und Forschungszentrum Schönbrunn. Diversität und Saatgutsouveränität sind zentrale Bestandteile der Motivation der Gruppe, um ein alternatives Angebot an Saatgut

gegenüber großer Saatgutfirmen anbieten zu können. Unter Beachtung der Standortbedingungen der einzelnen Produzent*innen wird so auch auf Kriterien wie Ertrag, Einheitlichkeit und Lagerfähigkeit der Früchte geachtet (Lammer, 2014; Arche Noah, k. A.).

Auf diese Art und Weise können ohne Anwendung gentechnischer Methoden gegen diverse Krankheiten resistente Raritätensorten und Saatgut produziert werden, welche zudem standortangepasst sind.

1.5 Zielsetzungen der Arbeit

Im Zuge dieser Arbeit soll die Durchführbarkeit der genotypischen Charakterisierung von Tomatenpflanzen in Bezug auf den *Tm-2*-Resistenz-Locus mittels der CAPS- und der Tetra-Primer-ARMS-Methode getestet werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, eine zeiteffiziente und kostengünstige Methode zu finden, welche in weiteren Kooperationsprojekten der Karl-Franzens-Universität Graz und des Vereins Arche Noah (Gesellschaft für die Erhaltung der Kulturpflanzenvielfalt & ihre Entwicklung, Schiltern, Österreich), sowie in partizipativen Züchtungsprojekten angewandt werden kann. Zudem sollen grundlegende Informationen zum Tomatenmosaikvirus zusammengefasst werden, um für Folgeversuche auf einem bestimmten Basiswissen aufbauen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

Im Zuge dieser Arbeit wurden unterschiedliche Kultivare der Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) kultiviert – einerseits für die Vorversuche zur Methoden-Etablierung (siehe Tabelle 1) und andererseits für die Sorten-Genotypisierung (siehe Tabelle 2).

Die Pflanzen für die Methoden-Etablierung wurden von April bis Mai 2016 im Tomatenanzucht-Gewächshaus der Karl-Franzens-Universität Graz am Institut für Pflanzen-wissenschaften kultiviert.

Die Pflanzensamen wurden auf Pflanzensubstrat (Naturalium; Gramoflor, Vechten, Deutschland) ausgesät und im Tomatenanzucht-Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkel) und im Falle von kühleren Außentemperaturen bei zusätzlicher Beheizung in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 24 °C angezogen. Die zusätzliche Beleuchtung wurde mit Wachstumslampen (Plug and Grow™ 200 W 6400 K fluorescent lamps; Trade Hydro, Cleckheaton, UK) umgesetzt. Messungen der Photonenstromdichte in Blatthöhe bei zusätzlicher Beleuchtung ergaben Messwerte der PPF (Photosynthetically Active Photon Flux Density) $\geq 75 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Die Pflanzen für die Sorten-Genotypisierung wurden von April bis Mai 2017 im Auftrag der Arche Noah von der AGES Wien (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wien) angezogen. Die Anzucht erfolgte unter der Leitung von Frau DI Dr. Sabine Grausgruber-Gröger (Institut für Nachhaltige Pflanzenproduktion – Abteilung für molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten), wobei Herr DI Martin Schwab (Institut für Nachhaltige Pflanzenproduktion – Abteilung für Versuchswesen und Technische Versuchseinrichtungen) für die technische Betreuung der Anzucht verantwortlich war.

Die Pflanzensamen wurden auf Beetpflanzensubstrat (Art. Nr. 4383; Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) ausgesät und im Gewächshaus bei zusätzlicher Beleuchtung unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkel) kultiviert. Die Temperatur betrug tagsüber 22 °C und nachts 18 °C. Es herrschte eine konstante Luftfeuchtigkeit von 65 %. Gegossen wurde nach Bedarf (etwa jeden zweiten Tag) und es erfolgte keine zusätzliche Düngung. Die Beleuchtung wurde mithilfe von drei 400 W Strahlern umgesetzt, welche bei Sonnenlichtstärken $< 10 \text{ kLux}$ automatisch zugeschaltet wurden. Bei Sonnenlicht-

stärken > 40 kLux wurde eine automatische Schattierung aktiviert. Eine Messung der Photonenstromdichte im Glashaus ergab bei bewölkten Bedingungen und ohne zusätzliche Beleuchtung in Blatthöhe einen Messwert von PPFd = 29 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Im Freien wurde unter denselben Bedingungen eine Lichtstärke von 10,3 kLux gemessen.

2.2 Pflanzenmaterial

Die unterschiedlichen Kultivare, sowie deren Genotyp am *Tm-2*-Allel und die Herkunft des Saatgutes sind in Tabelle 1 und in Tabelle 2 dargestellt.

Für die Methoden-Etablierung wurden vier verschiedene Kultivare (Sorten) ausgewählt und kultiviert (siehe Tabelle 1). Die Virus-Mutterpflanze 1 wurde bereits davor vom Verein Arche Noah kultiviert. Pro Kultivar wurden 15 Pflanzen kultiviert. Von dem Kultivar Moneymaker war vor der Analyse bekannt, dass er das sensitive *tm-2*-Allel homozygot trägt (Arens et al., 2007a). Ebenso war von dem Kultivar Muchamiel UMH 1200 vor der Analyse bekannt, dass er das resistenzvermittelnde *Tm-2a*-Allel homozygot trägt (García-Martínez et al., 2011). Deshalb dienten die Kultivare Moneymaker und Muchamiel UMH 1200 als Referenzmaterial.

Die im Zuge der Methoden-Etablierung kultivierte Virus-Mutterpflanze wurde ebenfalls genotypisiert.

Tabelle 1 - Verwendete Kultivare im Zuge der Methoden-Etablierung, zugehöriger Genotyp am *Tm-2*-Locus (falls bekannt) und die Herkunft des Saatgutes.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. Kultivar (cv.)	Genotyp am <i>Tm-2</i>-Locus	Herkunft des Saatguts
cv. Moneymaker	<i>tm-2/tm-2</i>	Austrosaat - Österreichische Samenzucht- u. Handels-Aktiengesellschaft, Wien, Österreich
cv. Tica	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Verein Arche Noah - Gesellschaft für die Erhaltung der Kulturpflanzenvielfalt & ihre Entwicklung, Schiltern, Österreich
cv. Guyana RZ F1 (72-609)	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Rijk Zwaan Welter GmbH - Gemüsezüchtung & Saatguthandel, Welter, Deutschland
cv. Muchamiel UMH 1200	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Department of Applied Biology, Miguel-Hernandez-Universität, Orihuela, Spanien (von Prof. Santiago Garcia-Martinez)
Virus-Mutterpflanze* 1 cv. unbekannt	Vermutung vor der Analyse: <i>tm-2/tm-2</i>	Verein Arche Noah - Gesellschaft für die Erhaltung der Kulturpflanzenvielfalt & ihre Entwicklung, Schiltern, Österreich

Abkürzungen: cv. = Kultivar; F1 = F1-Generation.

* Bei der angegebenen Virus-Mutterpflanze handelt es sich nicht um eine klassische Mutterpflanze (Pflanze, deren Samen oder Ableger zur Vermehrung verwendet wird), sondern um eine Virus-Mutterpflanze. Diese mit ToMV infizierten und aus dem Freiland isolierten Pflanzen wurden für Inokulations-Versuche verwendet.

Für die Sorten-Genotypisierung wurden 12 verschiedene Sorten ausgewählt und kultiviert (siehe Tabelle 2). Die Virus-Mutterpflanze 2 wurde bereits zuvor kultiviert (AGES). Pro Kultivar wurden 28 Pflanzen auf 24er-Multitopfplatten angezogen. Von den Kultivaren Moneymaker G421 (Arens et al., 2007a) und Primabella war vor der Analyse bekannt, dass sie das *tm-2*-Allel homozygot tragen (Lammer, persönliche Kommunikation, 08.04.2016). Von den Kultivaren Muchamiel UMH 916/UMH 972 war vor der Analyse bekannt, dass sie das *Tm-2a*-Allel homozygot tragen (García-Martínez et al., 2015). Die Kultivare Moneymaker und Muchamiel UMH 916 dienten als Referenzmaterial.

Die im Zuge der Sorten-Genotypisierungen kultivierte Virus-Mutterpflanze 2 wurde nicht genotypisiert. Sie wurde lediglich für den Inokulations-Versuch herangezogen.

Tabelle 2 - Teil 1 - Verwendete Kultivare im Zuge Sorten-Genotypisierung, zugehöriger Genotyp am *Tm-2*-Locus (falls bekannt) und die Herkunft des Saatgutes

<i>Solanum lycopersicum</i> L. Kultivar (cv.)	Genotyp am <i>Tm-2</i>-Locus	Herkunft des Saatgutes
cv. Moneymaker G421	<i>tm-2/tm-2</i>	Bingenheimer Saatgut AG, Echzell, Deutschland
cv. Primabella	<i>tm-2/tm-2</i>	Culinaris – Saatgut für Lebensmittel, Göttingen, Deutschland
cv. Muchamiel UMH 916	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Department of Applied Biology, Miguel-Hernandez-Universität, Orihuela; Spanien
cv. Muchamiel UMH 972	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Department of Applied Biology, Miguel-Hernandez-Universität, Orihuela, Spanien
cv. Pozzano F1	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Enza Zaden Deutschland GmbH & Co. KG, Dannstadt-Schauernheim, Deutschland
cv. Philovita F1	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Kiepenkerl (Monsanto/Bayer), Bruno Nebelung GmbH, Everswinkel, Deutschland
cv. Limetto F1	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Kiepenkerl (Monsanto/Bayer), Bruno Nebelung GmbH, Everswinkel, Deutschland
cv. Limetto F2	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Nachbau des Vereins Arche Noah bzw. der Arbeitsgruppe Bauernparadeiser, Ulrike Klein, St. Nikolai im Sausal, Österreich
cv. Rote Dattelwein	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Verein Arche Noah bzw. der Arbeitsgruppe Bauernparadeiser, Ulrike Klein, St. Nikolai im Sausal, Österreich
cv. Aroma Cocktail	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Verein Arche Noah bzw. der Arbeitsgruppe Bauernparadeiser, Peter Lassnig, GeLa Ochsenherz, Gänserndorf-Süd, Österreich
cv. Goldita EP1 (F5)	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Herkunft: Verein Arche Noah bzw. der Arbeitsgruppe Bauernparadeiser, Peter Lassnig, GeLa Ochsenherz, Gänserndorf-Süd, Österreich

Abkürzungen: cv. = Kultivar; F1/F2/F5 = F1-/F2-/F5-Generation; EP = Einzelpflanze.

Tabelle 2 - Teil 2 - Verwendete Kultivare im Zuge Sorten-Genotypisierung, zugehöriger Genotyp am *Tm-2*-Locus (falls bekannt) und die Herkunft des Saatgutes.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. Kultivar (cv.)	Genotyp am <i>Tm-2</i> -Locus	Herkunft des Saatgutes
cv. Goldita EP2 (F5)	Vermutung vor der Analyse: <i>Tm-2a</i> homo- oder heterozygot	Herkunft: Verein Arche Noah bzw. der Arbeitsgruppe Bauernparadeiser, Peter Lassnig, GeLa Ochsenherz, Gänserndorf-Süd, Österreich
Virus-Mutterpflanze* 2 cv. unbekannt	Vermutung: <i>tm-2/tm-2</i>	AGES – Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wien, Österreich

Abkürzungen: cv. = Kultivar; F5 = F5-Generation, EP = Einzelpflanze.

* Bei der angegebenen Virus-Mutterpflanze handelt es sich nicht um eine klassische Mutterpflanze (Pflanze, deren Samen oder Ableger zur Vermehrung verwendet wird), sondern um eine Virus-Mutterpflanze. Diese mit ToMV infizierten und aus dem Freiland isolierten Pflanzen wurden für Inokulations-Versuche verwendet.

2.3 Inokulation der Pflanzen

Zur Herstellung des Inokulums wurden 4 g Blattmaterial der infizierten Virus-Mutterpflanze 2 eingewogen. Das Blattmaterial wurde in Extraktionsbeutel (Bioreba, Reinach, Schweiz) überführt. Danach wurden 20 ml ddH₂O zugegeben. Die Beutel wurden verschlossen und mit dem Kugellager-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein Becherglas umgefüllt. Die Inokulation wurde direkt im Anschluss durchgeführt.

Die Pflanzen waren bei der Inokulation 17 Tage alt. Im Zuge der Inokulation wurde eine Spatelspitze Korund 800 (Kornwerkstoff) auf einem Keimblatt ausgebracht und am Blatt verteilt. Danach wurde ein Keimblatt mit einem von Inokulum durchtränkten Schwämmchen (zurechtgeschnittener Küchenschwamm) inokuliert. Um das Blatt bei diesem Vorgang nicht zu stark zu verletzen, galt es zu beachten, dass beim Auftragen des Inokulums zuerst mit der weichen und erst zuletzt mit der rauen Seite des Schwämmchens aufgetragen wurde. Eine zu starke Verletzung des Keimblattes kann zu einer außerordentlich starken Abwehrreaktion der Pflanze führen, welche die gewünschte Virusinfektion verhindern kann. Nach zehnminütigem Einwirken wurde das Blatt mit Leitungswasser abgespült.

Pro Kultivar wurden 24 Pflanzen in 24er-Multitopfplatten inokuliert. Es wurden jeweils vier weitere Kontrollpflanzen pro Kultivar einer Mock-Inokulation unterzogen (dieselbe Prozedur ohne Virus). Insgesamt standen im Glashaus 14 Multitopfplatten, 12 mit inokulierten Pflanzen und zwei mit den jeweiligen Kontrollpflanzen, welche im Glashaus 2 m von den inokulierten Pflanzen entfernt standen. Aus Gründen des Versuchsdesigns und des Budgets erfolgte keine Randomisierung. Es wäre dazu einerseits eine größere Individuenzahl und andererseits mehr Platz pro Individuum notwendig gewesen.

2.4 Probenahme/Blatternte

Für die genetischen Analysen wurde Blattmaterial verwendet, welches 19 Tage nach der Inokulation geerntet wurde. Die Probenahme erfolgte nach der Inokulation, um die Pflanzen vor der Inokulation nicht zu schwächen und um eventuelle Sekundärinfektionen zu vermeiden. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5 Materialien, Chemikalien und Enzyme

Alle Standardchemikalien wurden von den Firmen Applichem, Affymetrix, Sigma, Merck und Roth bezogen. Sofern verwendete Materialien oder Chemikalien nicht direkt im Text erwähnt und beschrieben wurden, sind die Details dazu fortfolgend aufgelistet.

Applichem (Darmstadt, Deutschland) - diverse Laborchemikalien

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) - diverse Laborchemikalien

Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich) - Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, etc.)

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) - Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, etc.)

Sigma-Aldrich (München, Deutschland) - diverse Laborchemikalien

Alle PCR-Reaktionen und Enzymverdau-Reaktionen wurden mit nukleasefreiem Wasser (BioScience-Grade, autoklaviert, DEPC-behandelt; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) angesetzt. Alle anderen Lösungen wurden mit ddH₂O angesetzt.

2.6 DNA-Längenstandards

Für die Agarosegele wurden verschiedene Standard-DNA-Marker als Größenstandard verwendet. Der vor allem bei den Extraktionen (Kontrollgele) verwendete λ -Marker (EcoRI/HindIII; siehe Abb. 3, S. 30) wurde aus λ -Phagen-DNA (#SM0191; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) selbst hergestellt. Als Größenstandards für die Agarose-Gele der Analysemethoden dienten die DNA-Leitern GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder und GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (#SM0241/#SM0321; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (siehe Abb. 4 und Abb. 5, S. 32).

2.7 Oligonukleotide

Die verwendeten PCR-Primer (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) sind in Tabelle 3 dargestellt. Zudem sind die Primersequenzen in 5'-3'-Richtung angegeben.

Tabelle 3 - PCR-Primer und ihre Sequenzen: Die Primer sind entsprechend der Analyse-Methoden gegliedert.

Methoden	Primer-Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
CAPS-Analyse*	PrRuG086R	CTACTACACTCACGTTGCTGTGATGCAC
	PrRuG151F	GAGTTCTTCCGTTCAAATCCTAAGCTTGAGAAG
Tetra-Primer-ARMS-PCR**: Assay 1	SNP2493R Tm2	CTGCCAGTATATAACGGTCTACCG
	SNP2494F Tm2(2)	CTCATCAAGCTTACTCTAGCCTACTTTAGT
	TMV-2658R	CCGTGCACGTTACTTCAGACAA
	TMV-2286F	GGGTATACTGGGAGTGTCCAATTC
Tetra-Primer-ARMS-PCR**: Assay 2	TMV-R SNP901misR	GCAGGTTGTCCTCCAAATTTCCATC
	TMV-S SNP901misF	CAAATTGGACTGACGGAACAGAAAAGTT
	TMV-747F	CGGTCTGGGGAAAACAACCTCT
	TMV-1256R	CTAGCGGTATACCTCCACATCTCC

Die Primerbezeichnungen in dieser Arbeit weichen leicht von den Originalbezeichnungen ab.

* Die Primersequenzen der CAPS-Analyse entstammen der Publikation von Lanfermeijer et al. (2005).

** Die Primersequenzen der Tetra-Primer-ARMS-PCR entstammen der Publikation von Arens et al. (2007a).

2.8 Extraktion von gDNA (genomische DNA)

Da einzelne Extraktions-Methoden nicht zum gewünschten Erfolg führten (z. B. erfolgreiche Extraktion, aber keine erfolgreiche PCR mit den Extrakten), wurden im Zuge der Methoden-Etablierung unterschiedliche Methoden verwendet. Im Anschluss jeder Extraktion wurde der Extraktions-Erfolg mittels eines Kontrollgels überprüft (siehe Abschnitt 2.8.4). Für die Analysen der Sorten-Genotypisierung wurde ausschließlich mit dem DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gearbeitet (siehe Abschnitt 2.8.3).

2.8.1 Extraktion von gDNA mittels CTAB-Methode

Für die Extraktion mit dieser Methode musste das entsprechende Volumen CTAB-Extraktionspuffer (Cetyltrimethylammoniumbromid) hergestellt werden. Der Puffer enthält 1 % (w/v) Lauroylsarcosin, 0,8 M NaCl, 22 mM EDTA, 0,8 % (w/v) CTAB, 0,14 M Mannitol und 0,22 M Tris. Mittels HCl-Zugabe musste der pH-Wert auf pH = 7,8 eingestellt werden. Unmittelbar vor der Verwendung wurde der Puffer mit β -Mercaptoethanol versetzt (14 μ l pro 10 ml Puffer).

Vor der Extraktion wurde das geerntete und zur Lagerung bei -80°C eingefrorene Blattmaterial unter Stickstoffkühlung in einer Reibschale gemörsert. Es wurden pro Probe 100 bis 150 mg gemörsertes Blattmaterial eingewogen und direkt verwendet oder bis zur Weiterverarbeitung wieder bei -80°C eingefroren. Im Zuge der Extraktion wurden $750\ \mu\text{l}$ Extraktionspuffer und $750\ \mu\text{l}$ Chloroform hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden zehn Mal invertiert und unter dem Abzug 45 min. bei 65°C im Wasserbad inkubiert (zwischendurch wurde mehrmals invertiert). Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße 10 min. bei RT und $7500\times g$ zentrifugiert. $700\ \mu\text{l}$ der oberen (wässrigen) Phase wurden unter dem Abzug in vorbereitete $1,5\ \text{ml}$ Reaktionsgefäße mit $600\ \mu\text{l}$ (auf Eis) vorgekühltem Isopropanol überführt, zum Mischen zehnmal invertiert und für 5 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße 10 min. bei 4°C und $9500\times g$ zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Die Pellets wurden zweimal mit je $500\ \mu\text{l}$ 70 % Ethanol gewaschen – d. h. es wurde Ethanol zugegeben, kräftig gevortext, 5 min. bei 4°C und $9500\times g$ zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Ethanols wurde erneut für 1 min. bei 4°C und $9500\times g$ zentrifugiert. Die verbleibenden Überstände wurden ebenfalls verworfen. Die Pellets wurden bei 37°C vollständig getrocknet (etwa 15 bis 20 min.). Zuletzt wurden $30\ \mu\text{l}$ nukleasefreies H_2O mit RNase A ($0,4\ \text{mg/ml}$) hinzugefügt und 20 min. bei 37°C mit geschlossenem Deckel inkubiert, um die DNA-Pellets zu lösen. Der Erfolg der gDNA-Extraktion wurde mittels Extraktions-Kontrollgelen überprüft (siehe Abschnitt 2.8.4). Bei erfolgreicher Extraktion wurden die Proben entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.8.2 Extraktion von gDNA nach Murray & Thompson (1980)

Auch bei dieser Methode handelt es sich um eine CTAB-Extraktionsmethode, welche von Murray & Thompson (1980) adaptiert wurde. Für die Herstellung des zur Extraktion benötigten Mikrorep-Puffers war die Vorbereitung zweier Basispuffer notwendig. Der gDNA-Extraktionspuffer beinhaltete $350\ \text{mM}$ Sorbitol, $100\ \text{mM}$ Tris und $5\ \text{mM}$ EDTA und wurde mittels HCl-Zugabe auf einen pH-Wert von $\text{pH} = 7,5$ eingestellt. Der Zell-Lysis-Puffer beinhaltete $200\ \text{mM}$ Tris, $50\ \text{mM}$ EDTA, $2\ \text{M}$ NaCl und 2 % CTAB. Um aus diesen beiden Basispuffern den Mikrorep-Puffer herzustellen, wurden 2,5 Teile gDNA-Extraktionspuffer, 2,5 Teile Zell-Lysis-Puffer, 1 Teil 5 % (w/v) N-Lauroylsarkosin (= Sarkosyl) und $3\ \text{g/l}$ Natriumbisulfit vermengt. Der Mikrorep-Puffer wurde direkt vor Gebrauch hergestellt oder bei -20°C eingefroren und vor Gebrauch aufgetaut. Der für den letzten Schritt der Extraktion notwendige 1 x TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) enthielt $10\ \text{mM}$ Tris-HCl ($\text{pH} = 7,5$), $1\ \text{mM}$ EDTA ($\text{pH} = 8$) und $5\ \text{mg/ml}$ RNase A.

Im Zuge der Extraktion wurden je Probe 50 - 100 mg gemörsertes Blattmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Diesem wurden 750 µl Mikroprep-Puffer zugesetzt. Nach leichtem Vortexen für 30 bis 45 Minuten wurde bei 65 °C im Wasserbad unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Dem Reaktionsgefäß wurde 750 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und nach gutem Mischen für fünf Minuten bei 10000 ×g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an kaltem Isopropanol gemischt und solange invertiert, bis ein DNA-Präzipitat sichtbar war. Dann wurde sofort für fünf Minuten bei 10000 ×g und 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl 1 x TE-Puffer bei 65 °C für 15 min. resuspendiert. Der Erfolg der gDNA-Extraktion wurde mittels Agarose-Kontrollgelen überprüft (siehe Abschnitt 2.8.4). Bei erfolgreicher Extraktion konnten die Proben entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren werden.

2.8.3 Extraktion von gDNA mit dem DNeasy® Plant Mini Kit

Die Extraktion genomischer DNA mit dem DNeasy® Plant Mini Kit von QIAGEN (Hilden, Deutschland) wurde nach dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Die isolierte gDNA wurde in 200 µl Eluationspuffer (Buffer AE) eluiert.

2.8.4 Überprüfung des Extraktions-Erfolges – Extraktions-Kontrollgel

Der Erfolg der gDNA-Extraktion wurde mit Agarose-Kontrollgelen (1 % Agarose, 6,14 V/m, 20 min.) überprüft, wobei jeweils 6 µl gDNA-Extrakt (genomische DNA) mit 1 µl 10 x DNA Loading Dye aufgetragen wurden. Als Größenstandard diente ein λ-Marker (λ-DNA/EcoRI+HindIII Marker; siehe Abb. 3), von dem stets 10 µl aufgetragen wurden – das entspricht 0,5 µg λ-Phagen-DNA. Die oberste λ-Phagen-DNA-Bande enthielt daher immer 220 ng DNA, womit die Konzentrationen der einzelnen Extrakte abgeschätzt werden konnte. Dieses Wissen wurde bei der Durchführung der PCR (siehe Abschnitt 2.9.2 und 2.10.2) benötigt, da die zugegebene Menge an Template möglichst genau einzuhalten war.

Die Auswertung wurde mittels UV-Detektion (GelDoc-System) durchgeführt. Bei erfolgreicher Extraktion befand sich die gDNA-Bande über der obersten λ-Bande (d. h. die extrahierte DNA ist größer als 21 kb – vgl. Abschnitt 1.1.3).

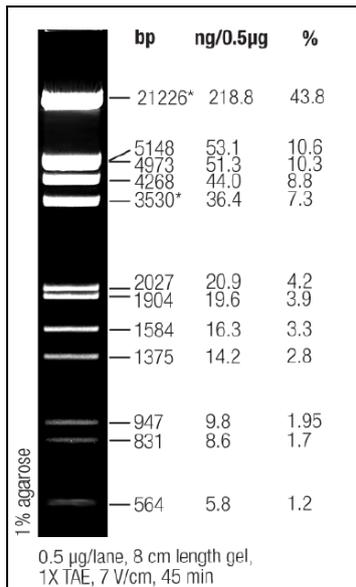


Abb. 3 – λ -DNA/EcoRI+HindIII Marker (Thermo Scientific, 2016c)

2.9 CAPS-Analyse

2.9.1 Allgemeines

Basierend auf den Unterschieden der DNA-Sequenz zwischen den Allelen *tm-2*, *Tm-2a* und *Tm-2* haben Lanfermeijer et al. (2005) CAPS-Marker (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) entwickelt, welche es erlauben, den Genotyp kodominant zu unterscheiden. Die hierfür entwickelten Primer PrRuG151F und PrRuG086R führen bei einer PCR zu einem amplifizierten 1085 bp-Fragment (siehe Anhang A 4). Die Primerbindestellen befinden sich in Bereichen des Gens, welche für alle drei Allele homolog sind. Der Forward-Primer liegt mitten im Open Reading Frame (ORF) des *Tm-2*-Gens, der Reverse-Primer liegt 46 Nukleotide downstream des ORFs.

2.9.2 Arbeitsschritte

a) Extraktion

Die gDNA wurde aus den Tomatenpflanzen extrahiert. Es wurden verschiedene Methoden (siehe Abschnitt 2.8) angewandt: Die CTAB-Methode, die Extraktion nach Murray & Thompson (1980) und letztendlich die Extraktion mittels DNeasy® Plant Mini Kit.

b) Konzentrationsbestimmung der gDNA

Da den PCR-Ansätzen eine bestimmte Menge an gDNA Template zugesetzt werden musste, war es notwendig die Konzentration der Extrakte zu ermitteln. Im Zuge der Methoden-Etablierung wurde dies mittels Vergleichen der Bandenintensitäten am Agarosegel durchgeführt (siehe Abschnitt 2.8.4). Für die PCR-Reaktionen der Sorten-Genotypisierung wurde die gDNA-Konzentration der Extrakte mithilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop One C; Thermofisher, Madison, WI, USA) ermittelt.

c) PCR

Nach der Extraktion erfolgte die Amplifikation der genomischen DNA mittels PCR, welche nach Arens et al. (2007a) durchgeführt wurde. Als Fwd.(Forward)-Primer diente der Primer PrRuG151F und als Rev.(Reverse)-Primer PrRuG086R (siehe Abschnitt 2.7). Alle Ansätze wurden entsprechend Tabelle 4 auf Eis in PCR-Tubes (8 x 0,2 ml) vorbereitet, bevor die Reaktion im programmierbaren PCR-Cycler mit dem unten beschriebenen Programm durchgeführt wurde. Die Taq DNA-Polymerase wurde von Segenetic (Borken, Deutschland) bestellt, die dNTPs stammten von Bioline (London, UK).

Tabelle 4 - PCR-Reaktionsansatz für die CAPS-Analyse

50 µl Reaktionsansatz:	
10 x PCR-Puffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Fwd.-Primer (10 µM): PrRuG151F	5 µl
Rev.-Primer (10 µM): PrRuG086R	5 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
DNA-Template (4 ng/µl) - insgesamt ≈ 40 ng gDNA	10 µl
H ₂ O nukleasefrei	24,1 µl
Total	50 µl

Das am PCR-Cycler (No. 5345 026837; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführte PCR-Programm beinhaltete ein einmaliges Aufschmelzen der DNA bei 94 °C für 3 Minuten. Darauf folgten 35 Zyklen, welche sich jeweils aus einer Minute Aufschmelzen bei 94 °C, einer Minute Primerhybridisierung (Annealing) bei 55 °C und zwei Minuten Elongation bei 72 °C zusammensetzten. Um nicht abgeschlossene Amplifikationsvorgänge abzuschließen, folgte zuletzt eine einmalige 10-minütige Elongationsphase bei 72 °C. Die PCR-Ansätze wurden nach Ablauf des Programms im PCR-Cycler bis zur Entnahme bei 5 °C gekühlt.

d) PCR-Kontrollgel - Überprüfung des Amplifikations-Erfolges

Die Durchführung erfolgte grundsätzlich wie in Abschnitt 2.8.4 beschrieben, nur, dass hier pro Probe jeweils 9 µl PCR-Produkt mit 1 µl 10 x DNA Loading Dye in die Slots aufgetragen wurde. Als Größenstandard diente ein λ-Marker (λ-DNA/EcoRI+HindIII Marker; siehe Abb. 3).

e) Restriktionsverdau

Bei erfolgreicher Amplifikation wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Es wurden pro Probe zwei unabhängige Restriktionsansätze mit unterschiedlichen Enzymen und den zugehörigen Reaktionspuffern angesetzt (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Ein Ansatz bestand aus 8 µl PCR-Produkt (der insgesamt 50 µl aus der PCR), 1 µl (= 10 U) des Restriktionsenzym HpaI und 1 µl (= 10 U) des HpaI-Reaktionspuffers. Der zweite Ansatz bestand aus 8 µl PCR-Produkt, 1 µl des Restriktionsenzym BspTI und 1 µl des BspTI-Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die je nach Genotyp zu erwartenden Schnittmuster sind dem Abschnitt 2.9.3 zu entnehmen.

f) Restriktions-Gel (für die abschließende Auswertung)

Jeweils das gesamte Volumen der Restriktionsansätze (10 µl) wurde mit 1 µl 10 x DNA Loading Dye auf einem Agarose-Gel (2 % Agarose, 6,14 V/m, 70 min.) aufgetrennt (Vorgehensweise: Vergleiche Abschnitt 2.8.4). Als Größenstandard dienten die DNA-Leitern GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder und GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (siehe Abb. 4 und Abb. 5).

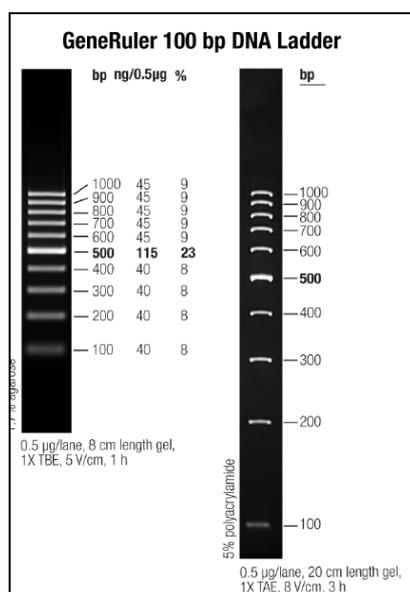


Abb. 4 – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Größenstandard (Thermo Scientific, 2016a)

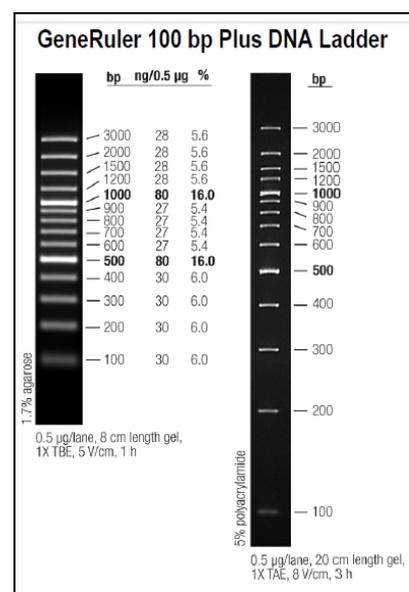


Abb. 5 – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder Größenstandard (Thermo Scientific, 2016b)

2.9.3 Auswertung

Die bei den entsprechenden Allelen entstehenden Schnittmuster sind in Tabelle 5 (siehe oben) angegeben. In der Praxis tritt bei der Untersuchung des Genotyps von Tomatenpflanzengewebe (diploider Organismus) Homo- oder Heterozygotie auf. Die jeweiligen Schnittmuster sind ebenfalls in Tabelle 5 (unten) angeführt. Zur Veranschaulichung siehe auch Abb. 86 bis Abb. 88 im Anhang. Basierend auf den vorliegenden Schnittmustern kann der Genotyp bestimmt werden.

Tabelle 5 - CAPS-Analyse: Mögliche Schnittmuster abhängig vom Allel bzw. vom Genotyp

Allel		HpaI	BspTI
Nur ein Allel	<i>tm-2</i>	1085 bp	757 bp + 328 bp
	<i>Tm-2</i>	660 bp + 425 bp	757 bp + 328 bp
	<i>Tm-2a</i>	660 bp + 425 bp	559 bp + 328 bp + 198 bp
Genotyp		HpaI	BspTI
Homozygotie	<i>tm-2/tm-2</i>	1085 bp	757 bp + 328 bp
	<i>Tm-2/Tm-2</i>	660 bp + 425 bp	757 bp + 328 bp
	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	660 bp + 425 bp	559 bp + 328 bp + 198 bp
Heterozygotie	<i>tm-2/Tm-2</i>	1085 bp + 660 bp + 425 bp	757 bp + 328 bp
	<i>tm-2/Tm-2a</i>	1085 bp + 660 bp + 425 bp	757 bp + 559 bp + 328 bp + 198 bp
	<i>Tm-2/Tm-2a</i>	660 bp + 425 bp	757 bp + 559 bp + 328 bp + 198 bp

2.10 Tetra-Primer-ARMS-PCR

2.10.1 Allgemeines

Die Genotypisierung mittels der Tetra-Primer-ARMS-PCR besteht aus zwei Assays. Mithilfe von Assay 2 erfolgt die Feststellung, ob im Genotyp das S-Allel (engl. susceptible, sensitiv; *tm-2*), das R-Allel (engl. resistant, resistent; *Tm-2* bzw. *Tm-2a*) oder beide Allele (heterozygot) enthalten sind. Ist am Agarosegel der Analyse nur ein S-Allel erkennbar, so handelt es sich um eine homozygote Pflanze des Genotyps *tm-2/tm-2* (sensitiv). Bei Vorhandensein des R-Allels ist es nur mittels Assay 1 möglich festzustellen, ob es sich um das *Tm-2*-Allel oder um das *Tm-2a*-Allel handelt. Mit der Kombination beider Assays können alle möglichen Genotypen hinsichtlich des *Tm-2*-Locus nachgewiesen werden.

Im Zuge der Methoden-Etablierung wurden beide Assays angewandt. Für die Analysen der Sorten-Genotypisierung wurde ausschließlich mit Assay 2 gearbeitet, da aus der vorangegangenen Untersuchung mithilfe der CAPS-Methode bekannt war, dass im zu untersuchenden Pflanzenmaterial keine Probe das *Tm-2*-Allel enthielt, womit Assay 1 hinfällig wurde.

Im Zuge der Laborarbeiten wurde eine Sequenzanalyse der drei Allele am *Tm-2*-Locus durchgeführt, welche in dieser Arbeit verbal am Ende des Abschnittes 3.1.3 diskutiert wird (zur Veranschaulichung siehe Abb. 83 bis Abb. 85, Anhang A 39 ff.).

2.10.2 Arbeitsschritte

a) *Extraktion*

Zur Extraktion wurden dieselben Methoden verwendet, die für die Analysen mithilfe der CAPS-Methode angewandt wurden. Die Methoden sind dem Abschnitt 2.9.2 zu entnehmen.

b) *Konzentrationsbestimmung der gDNA*

Da den PCR-Ansätzen eine bestimmte Menge an gDNA Template zugesetzt werden musste, war es notwendig die Konzentration der Extrakte zu ermitteln. Hier wurden dieselben Methoden wie in Abschnitt 2.9.2 angewandt.

c) PCR

Die Amplifikation der genomischen DNA erfolgte mittels PCR, welche nach Arens et al. (2007a) durchgeführt wurde. Die verwendeten Inner-Primer sind die SNP-enthaltenden Primer. Für Assay 1 wurden der Inner Fwd.-Primer SNP2494F Tm2(2), der Inner Rev.-Primer SNP2493R Tm2, der Outer Fwd.-Primer TMV-2286F und der Outer Rev.-Primer TMV-2658R verwendet. Für Assay 2 wurden der Inner Fwd.-Primer TMV-SNP901misF, der Inner Rev.-Primer TMV-R SNP901misR, der Outer Fwd.-Primer TMV-747F und der Outer Rev.-Primer TMV-1256R verwendet. Die Sequenzen der Primer sind dem Abschnitt 2.7 zu entnehmen. Schemata der Allel-Sequenzen und deren Primerbindestellen sind im Anhang A 39 ff. abgebildet. Alle Ansätze wurden entsprechend Tabelle 6 auf Eis in PCR-Tubes (8 x 0,2 ml) vorbereitet, bevor die Reaktion im programmierbaren PCR-Cycler mit dem unten beschriebenen Programm durchgeführt wurde. Die Taq DNA-Polymerase wurde von Segenetic (Borken, Deutschland) bestellt, die dNTPs stammten von Biorline (London, UK).

Tabelle 6 - PCR-Reaktionsansatz für die Tetra-Primer-ARMS-PCR

20 µl Reaktionsansatz:	
10 x PCR-Puffer	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
dNTPs (10 mM)	0,8 µl
Inner Fwd.-Primer (10 µM)	0,4 µl
Inner Rev.-Primer (10 µM)	0,4 µl
Outer Fwd.-Primer (10 µM)	0,1 µl
Outer Rev.-Primer (10 µM)	0,1 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DNA-Template (10 ng/µl) - insgesamt ≈ 20 ng gDNA	2 µl
H ₂ O nukleasefrei	12,8 µl
Total	20 µl

Das am PCR-Cycler (No. 5345 026837; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführte PCR-Programm beinhaltete ein einmaliges Aufschmelzen der DNA bei 94 °C für 3 Minuten. Darauf folgten 35 Zyklen, welche sich jeweils aus einer Minute Aufschmelzen bei 94 °C, einer Minute Primerhybridisierung (Annealing) bei 55 °C und zwei Minuten Elongation bei 72 °C zusammensetzten. Um nicht abgeschlossene Amplifikationsvorgänge abzuschließen folgte zuletzt eine einmalige 10-minütige Elongationsphase bei 72 °C. Die Amplifikate wurden im PCR-Cycler danach bei 5 °C gekühlt.

d) *Agarose-Gel (für die abschließende Auswertung)*

Jeweils das gesamte Volumen der PCR-Produkte (20 µl) wurde direkt in den PCR-Tubes mit 3 µl 10 x DNA Loading Dye versetzt und davon 10 bis 15 µl auf einem Agarose-Gel (2 % Agarose, 6,14 V/m, 70 min.) aufgetrennt (Vorgehensweise: Vergleiche Abschnitt 2.8.4). Als Größenstandard dienten die DNA-Leitern GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder und GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (siehe Abb. 4 und Abb. 5). Die möglichen Bandenmuster sind in Tabelle 7 angeführt.

2.10.3 Auswertung

Die bei den entsprechenden Allelen durch Amplifikation entstehenden Bandenmuster sind in Tabelle 7 (oben) angegeben. In der Praxis tritt bei der Untersuchung des Genotyps von Tomatenpflanzen Homo- oder Heterozygotie auf. Basierend auf den in Tabelle 7 (unten) abgebildeten Bandenmustern kann der Genotyp bestimmt werden.

Tabelle 7 - Tetra-Primer-ARMS-PCR: Mögliche Bandenmuster abhängig vom Allel bzw. vom Genotyp.

Allel		Assay 2	Assay 1
Nur ein Allel	<i>tm-2</i>	509 bp + 381 bp	416 bp
	<i>Tm-2</i>	509 bp + 185 bp	416 bp + 254 bp
	<i>Tm-2a</i>	509 bp + 185 bp	416 bp + 214 bp
Genotyp		Assay 2	Assay 1
Homozygotie	<i>tm-2/tm-2</i>	509 bp + 381 bp	416 bp
	<i>Tm-2/Tm-2</i>	509 bp + 185 bp	416 bp + 254 bp
	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	509 bp + 185 bp	416 bp + 214 bp
Heterozygotie	<i>tm-2/Tm-2</i>	509 bp + 381 bp + 185 bp	416 bp + 254 bp
	<i>tm-2/Tm-2a</i>	509 bp + 381 bp + 185 bp	416 bp + 214 bp
	<i>Tm-2/Tm-2a</i>	509 bp + 185 bp	416 bp + 254 bp + 214 bp

3 Ergebnisse und Diskussion

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Analysen dienten der genotypischen Charakterisierung von Tomatenpflanzen verschiedener Kultivare hinsichtlich des *Tm-2*-Locus. Es wurde mithilfe der CAPS-Methode und der Tetra-Primer-ARMS-PCR getestet, ob am *Tm-2*-Locus ein resistenzvermittelndes Allel vorhanden ist. Um die Sorten-Genotypisierung (siehe Abschnitt 3.2) durchführen zu können, wurden die beiden angewandten Methoden im Zuge der vorangegangenen Methoden-Etablierung (siehe Abschnitt 3.1) auf ihre Anwendbarkeit überprüft. Da die durchgeführten Arbeitsschritte häufig von den Ergebnissen der vorangegangenen Arbeitsschritte abhängig waren, werden die Ergebnisse und die Diskussion in dieser Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammengefasst. Zu beachten ist, dass in diesem Teil nur exemplarische bzw. zusammengefasste Daten dargestellt werden und diese zugleich interpretiert werden (Gelbilder und relevante Analyse-Ergebnisse). Alle im Zuge des Projektes erhobenen Daten wie Gelbilder, Analyse-Ergebnisse und schematische Darstellungen von Genen sind dem Anhang zu entnehmen.

Die Bezeichnung der einzelnen Kultivare erfolgt, wie in Abschnitt 2.2 angegeben. Einzelpflanzen der Untersuchung werden mit „Pfl.“ Abgekürzt. Der Abkürzung folgt die Nummer der Pflanze, welche bei der Anzucht der Pflanzen vergeben wurden. In Klammern nachgestellte Ziffern geben die Extraktionsreihe an, also wie oft die gDNA dieser Pflanze bereits neu isoliert wurde. So bedeutet „Pfl. 1(2)“ beispielsweise, dass es sich bei der Probe um die zweite Extraktion aus Pflanze 1 handelt. Pflanzennummern in Klammern nachgestellte Buchstaben kennzeichnen, dass es sich um Parallelproben derselben Pflanze handelt. Demnach wären „Pfl. 1(a)“ und „Pfl. 1(b)“ Proben desselben Pflanzenmaterials.

3.1 Methoden-Etablierung

3.1.1 Extraktionsmethoden

Da im Labor vor Ort die CTAB-Methode eine etablierte Standard-Methode ist, wurde diese zur Extraktion der gDNA herangezogen. Die Extraktion verlief in den meisten Fällen erfolgreich und lieferte DNA-Extrakte (siehe Abschnitt A 1.1.1 im Anhang). Es stellte sich aber heraus, dass die Extrakte der CTAB-Methode nicht für PCR-Reaktionen verwendbar waren, da die Methode gDNA-Extrakte produzierte, bei denen die PCR keine Amplifikate hervorbrachte. Pflanzengewebe kann abhängig von der Spezies und vom gewählten Gewebe Sekundärmetabolite enthalten, welche die Extraktion, aber auch fortfolgende PCR-Reaktionen beeinträchtigen können. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung dieser Metabolite kann es zu DNA-Interaktionen kommen, wie z. B. bei Polyphenolen, Harzen oder Saponinen (Rat et al., 2014). Weiters wurde daher versucht, die gDNA mittels DNeasy® Plant Mini Kit erneut zu extrahieren, um eventuell vorhandene Störfaktoren der PCR abzuscheiden. Auch diese Methode führte vorerst nicht zum gewünschten Erfolg, die darauffolgende PCR brachte keine Amplifikate hervor (siehe Abb. 24 und Abb. 35). Zunächst wurde daher die nach Murray & Thompson (1980) adaptierte CTAB-Extraktionsmethode angewandt. Diese Methode eignet sich laut den genannten Autoren für die Extraktion hochmolekularer pflanzlicher DNA (länger als 50 kbp) und wurde bereits erfolgreich im Zusammenhang mit Tomatenpflanzen eingesetzt (Gerhardts, 2008). Da diese Methode in den PCR-Reaktionen Amplifikate hervorbrachte, wurden alle Extraktionen mit dieser Methode wiederholt (siehe Abschnitt 2.8.2). Im weiteren Verlauf der Arbeiten stellte sich heraus, dass die gDNA Extrakte ganz bestimmter Pflanzenproben, nie zu einer erfolgreichen PCR-Reaktion führten. Für dieselben Proben wurde mehrere Male gDNA erneut extrahiert und die PCR (sowohl bei der CAPS-Analyse, als auch bei der Tetra-Primer-ARMS-PCR) erneut durchgeführt – immer erfolglos. Die Methodik (insbesondere die Extraktion) schien sehr sensibel zu sein. Für etwa zwei Drittel aller Pflanzenproben führte die Methode nach Murray & Thompson (1980) zu einem Ergebnis. Da diese Quote nicht zufriedenstellend war, wurde im späteren Verlauf der Untersuchungen die Extraktion mittels DNeasy® Plant Mini Kit erneut wiederholt. Obwohl die Extraktion mit dieser Methode zuvor nicht zum gewünschten Ergebnis führte (siehe Abb. 24), verlief die neuerliche Anwendung des Kits erfolgreich (siehe Abb. 25).

Aufgrund der geringen Zuverlässigkeit der Methode nach Murray & Thompson (1980) für die Extraktion von gDNA aus Tomaten-Pflanzenmaterial wurde letztendlich trotz

anfallender Mehrkosten die Extraktion mittels DNeasy® Plant Mini Kit als Mittel der Wahl bestimmt. Zudem führen Extraktionsmethoden mit einer höheren Ausfallsrate durch die anfallende Mehrarbeit zu erheblichen Mehrkosten, welche durch die Anwendung einer Kit-Extraktion vermieden werden können.

Als Alternative zur Extraktion mittels DNeasy® Plant Mini Kit könnte eine Optimierung der CTAB-Extraktion oder der Extraktion nach Murray & Thompson (1980) durchgeführt werden. Rat et al. (2014) haben die Modifizierung einer CTAB-Methode vorgenommen und konnten Störfaktoren (Polyphenole, Harze, Saponine, etc.) eliminieren, indem sie Phenol-Adsorbentien wie Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) und Aktivkohle beim Mörsern zugaben. Laut den genannten Autor*innen eignet sich die von ihnen beschriebene Modifizierung des Protokolls für diverse Pflanzenarten.

3.1.2 CAPS-Analyse

Die verwendeten CAPS-Marker erlauben es, den Genotyp von Tomatenpflanzen hinsichtlich des vorliegenden Allels am *Tm-2*-Locus kodominant zu unterscheiden. Die Differenzierung basiert auf den Unterschieden der DNA-Sequenz zwischen den Allelen *tm-2*, *Tm-2a* und *Tm-2* (siehe Abschnitt 2.9).

Zunächst wurde mit Proben bekannten Genotyps getestet, ob die Methode die zu erwartenden Ergebnisse, also das charakteristische Bandenmuster, liefert. Das ungeschnittene Amplifikat, welches unter der Anwendung der CAPS-Primer von Lanfermeijer et al. (2005) in der PCR-Reaktion hervorgebracht wird, besitzt eine Länge von 1085 bp. Der Kultivar Muchamiel UMH 1200 ist homozygot für das *Tm-2a*-Allel (García-Martínez et al., 2015). Es sollten beim Verdau mit HpaI zwei Fragmente in der Länge von 660 bp und 425 bp und beim Verdau mit BspTI drei Fragmente in der Länge von 757 bp, 559 bp und 328 bp entstehen. Der Kultivar Moneymaker ist homozygot für das *tm-2*-Allel (Arens et al., 2007a). Es sollte beim anschließenden Verdau mit HpaI ein unverdautes Fragment in der Länge von 1085 bp und beim Verdau mit BspTI zwei Fragmente in der Länge von 757 bp und 328 bp entstehen (siehe auch Anhang A 39 ff.).

Das Bandenmuster in Abb.6 basiert auf der Restriktion der PCR-Produkte der Amplifikation ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) und entspricht den Erwartungen (siehe Tabelle 5, S. 33). Die Reproduzierbarkeit der CAPS-Analyse nach Arens et al. (2007a) ist damit belegt. Zusätzlich sichtbare Banden auf dem Gel in Abb. 6, die nicht den Längen der erwarteten Fragmente entsprechen (grau eingefasst), lassen sich wie folgt diskutieren: Am Gel zum Teil sichtbare Banden auf der Höhe von 250 bp, zeigen sich bereits nach der PCR (siehe Abb. 36) und scheinen das Ergebnis einer unspezifischen

Amplifikation zu sein. Diese Banden sind auch im Restriktionsansatz vorhanden, da jeweils ein Aliquot des PCR-Ansatzes direkt für die Restriktion weiterverwendet wurde. Zusätzlich sind teilweise schwache Banden (u. a. auf der Höhe des unverdauten PCR-Produkts, also bei 1085 bp) infolge eines unvollständigen Verdaus erkennbar.

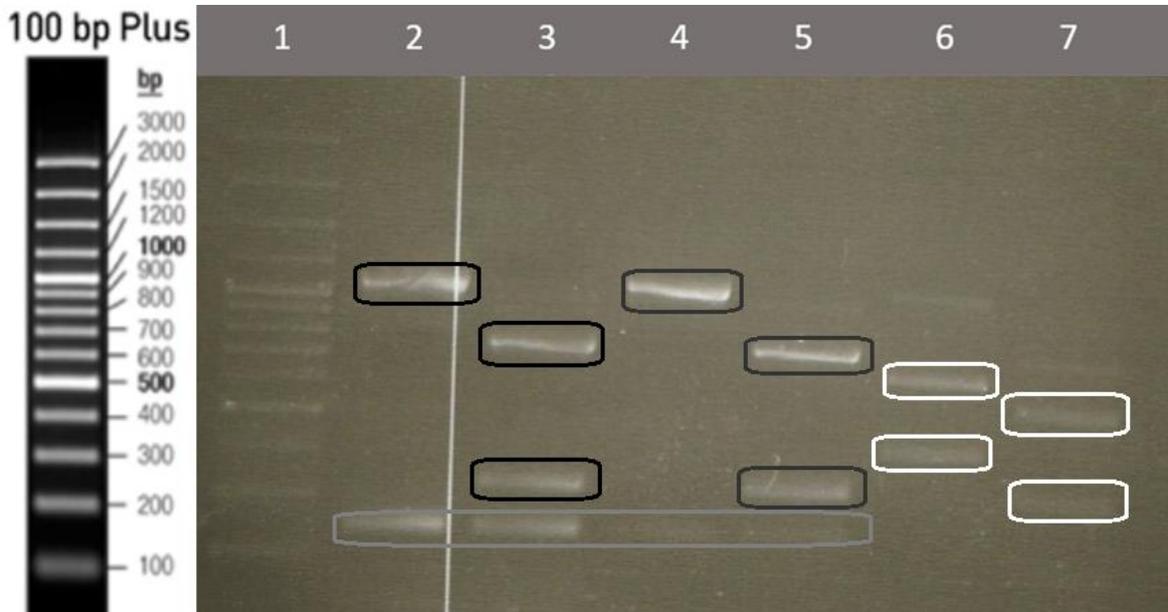


Abb. 6 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau. 1: 100 bp-Ladder; 2: MoneyMaker Pfl. 1(a) (HpaI); 3: MoneyMaker Pfl. 1(a) (BspTI); 4: MoneyMaker Pfl. 1(b) (HpaI); 5: MoneyMaker Pfl. 1(b) (BspTI); 6: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1 (HpaI); 7: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1 (BspTI). MoneyMaker Pfl. 1(a) und Pfl. 1(b) sind Parallelproben von MoneyMaker. MoneyMaker Pfl. 1: schwarz; MoneyMaker Pfl. 2: dunkelgrau; Muchamiel UMH 1200: weiß; Verschleppte unspezifische Banden: hellgrau.

Die erste Restriktionsanalyse (siehe Abb. 7) mit auszuwertenden Proben wurde ebenso ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) durchgeführt. Die Analyse wurde an einer Reihe von Einzelpflanzen der Kultivare Tica und Guyana RZ F1 durchgeführt. Von beiden Kultivaren wurde vermutet, dass sie das Gen *Tm-2a* homozygot tragen (Lammer, persönliche Kommunikation, 08.04.2016). Aus dem Gel in Abb. 7 lässt sich ablesen, dass sich die Vermutung (homozygoter Genotyp *Tm-2a/Tm-2a*) für die Pflanzen des Kultivars Tica bestätigt, für die Pflanzen des Kultivars Guyana RZ F1 aber der heterozygote Genotyp *Tm-2a/tm-2* festgestellt wurde, da der HpaI-Verdau drei Banden mit den Längen von 1085 bp, 660 bp und 425 bp hervorbrachte und der BspTI-Verdau vier Banden mit den Längen von 757 bp, 559 bp, 328 bp und 198 bp hervorbrachte. Aufgrund der Tatsache, dass der genaue Genotyp beider Kultivare vom Saatgutproduzenten nicht angegeben wurde (Lammer, persönliche Kommunikation, 08.04.2016), ist es ohne Weiteres möglich, dass der tatsächliche, bestimmte Genotyp vom vermuteten Genotyp abweicht. Am Gel in Abb. 7 lassen sich bei den Proben des Kultivars Tica unverdaute Reste des 1085 bp-Fragmentes erkennen. Beim BspTI-Verdau der Proben des Kultivars

Guyana RZ F1 ist die 198 bp-Bande sehr schwach. Es sind unspezifische Banden im Bereich von 250 bp zu erkennen (grau eingefasst).

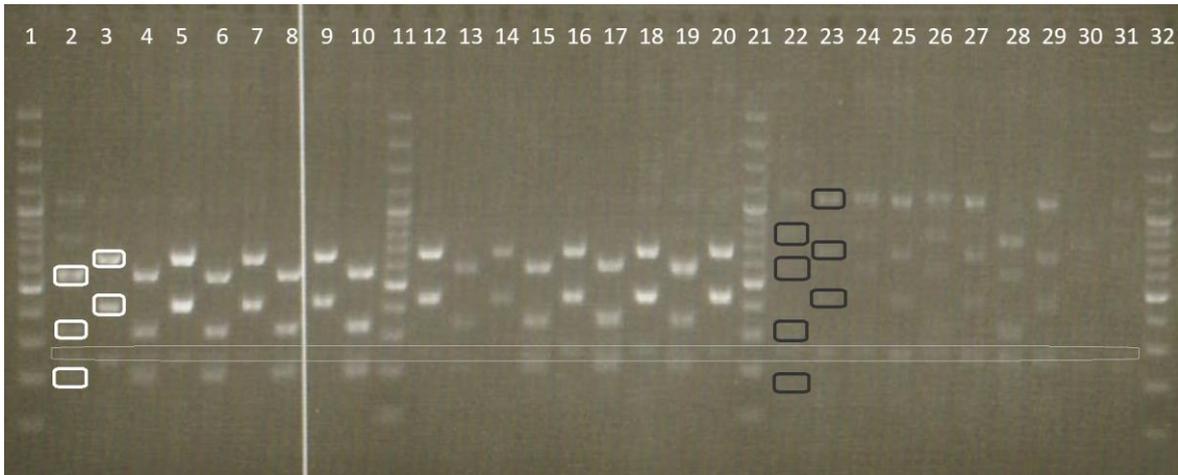


Abb. 7 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau. 1: 100 bp-Ladder; 2-10: Tica [2: Pfl. 1(3) (BspTI); 3: Pfl. 1(3) (Hpal); 4: Pfl. 2(3) (BspTI); 5: Pfl. 2(3) (Hpal); 6: Pfl. 3(3) (BspTI); 7: Pfl. 3(3) (Hpal); 8: Pfl. 4(3) (BspTI); 9: Pfl. 4(3) (Hpal); 10: Pfl. 5(3) (BspTI)]; 11: 100 bp-Ladder; 12-20: Tica [12: Pfl. 5(3) (Hpal); 13: Pfl. 6(3) (BspTI); 14: Pfl. 6(3) (Hpal); 15: Pfl. 7(3) (BspTI); 16: Pfl. 7(3) (Hpal); 17: Pfl. 9(3) (BspTI); 18: Pfl. 9(3) (Hpal); 19: Pfl. 10(3) (BspTI); 20: Pfl. 10(3) (Hpal)]; 21: 100 bp-Ladder; 22-31: Guyana RZ F1 [22: Pfl. 2(3) (BspTI); 23: Pfl. 2(3) (Hpal); 24: Pfl. 4(3) (BspTI); 25: Pfl. 4(3) (Hpal); 26: Pfl. 5(3) (BspTI); 27: Pfl. 5(3) (Hpal); 28: Pfl. 6(3) (BspTI); 29: Pfl. 6(3) (Hpal); 30: Pfl. 7(3) (BspTI); 31: Pfl. 7(3) (Hpal)]; 32: 100 bp-Ladder. Tica: weiß; Guyana: dunkelgrau; Verschleppte unspezifische Banden: Hellgrau (dünn eingefasst).

Das Bandenmuster am Gel in Abb. 8 basiert auf der Restriktion der PCR-Produkte der Amplifikation ausgehend von Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits. Es wurden Proben von Einzelpflanzen aller Kultivare (Moneymaker, Muchamiel UMH 1200, Tica, Guyana RZ F1), deren Genotyp bereits mithilfe der Gele in Abb. 6 und Abb. 7 bestimmt werden konnte und die bis dahin noch nicht erfolgreich genotypisierte Virus-Mutterpflanze 1, erneut untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob gewisse Störfaktoren für die PCR durch Anwendung der Kit-Extraktion minimiert werden können. Ein erster Versuch einer PCR mit Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits ist fehlgeschlagen (siehe Abb. 26 im Anhang A 4), bei einer weiteren Extraktion ist die PCR gelungen (siehe Abb. 41 im Anhang A 10) und die Restriktionsanalyse konnte durchgeführt werden.

Das Ergebnis der Analysen aus Abb. 8 bestätigt erneut, dass die Pflanzen des Kultivars Tica den homozygoten Genotyp *Tm-2a/Tm-2a* besitzen und jene des Kultivars Guyana RZ F1 den heterozygoten Genotyp *Tm-2a/tm-2* besitzen. Zudem gelang erstmals die Analyse der Virus-Mutterpflanze 1, welche wie vermutet den homozygoten Genotyp *tm-2/tm-2* besitzt.

Die Amplifikation der gDNA und damit die fortfolgende Bestimmung des Genotyps einiger Pflanzenproben (u. a. der Virus-Mutterpflanze) ist zuvor mehrere Male fehlgeschlagen und mit den Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits erstmals gelungen. D. h. die Kit-

Extraktion führt wie im Handbuch des DNeasy® Plant Mini Kits angegeben (QIAGEN, 2015, S. 10) zur Reduktion von im Pflanzenmaterial auftretenden sekundären Metaboliten, welche die PCR stören. Am Gel (siehe Abb. 8) sind unverdaute 1085 bp-Banden zu erkennen. Bei allen BspTI-Verdau-Reaktionen begründet sich das dadurch, dass das 1085 bp-Fragment in jedem Fall geschnitten wird und daher nur unvollständiger Verdau für das Vorkommen dieser Bande in Frage kommt. Beim HpaI-Verdau der Slots 6, 9 und 12 handelt es sich ebenso um nicht verdautes Template. Ein Indiz dafür ist, dass die nächsten darunterliegenden Banden kleinerer Fragmentgrößen deutlich stärker sind. Wären diese 1085 bp-Banden regulär entstanden, so würde die Bandenintensität von oben nach unten abnehmen, wie es in Slot 4 der Fall ist. Zudem sind am Gel unspezifische Banden zwischen 200 bp und 300 bp zu erkennen, welche auch im Fall der Kit-Extraktion mitgeschleppt wurden (siehe Abb. 42 im Anhang A 10).



Abb. 8 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau. 1: 100 bp-Ladder; 2: MP1 Pfl. 1(a) (HpaI); 3: MP1 Pfl. 1(a) (BspTI); 4: Guyana RZ F1 Pfl. 1(a) (HpaI); 5: Guyana RZ F1 Pfl. 1(a) (BspTI); 6: Tica Pfl. 1(a) (HpaI); 7: Tica Pfl. 1(a) (BspTI); 8: 100 bp-Ladder; 9: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a) (HpaI); 10: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a) (BspTI); 11: Moneymaker Pfl. 1(a); 12: Moneymaker Pfl. 1(a) (BspTI); 13: 100 bp-Ladder. MP1 = Virus-Mutterpflanze 1. Virus-Mutterpflanze & Moneymaker (tm-2/tm-2): schwarz; Guyana RZ F1 (Tm-2a/tm-2): dunkelgrau; Tica & Muchamiel UMH 1200 (Tm-2a/Tm-2a): weiß; Verschleppte unspezifische Banden: hellgrau.

Die Durchführung der CAPS-Analyse nach Arens et al. (2007b) lieferte – nach dem Finden der geeigneten Extraktionsmethode – robuste Ergebnisse. Die Methode war auch in anderen Labors gut reproduzierbar (Arens et al., 2007b), wobei auch dort die gDNA-Extraktion mittels DNeasy® Plant Mini Kit durchgeführt wurde.

Alle gewonnenen Ergebnisse (bestimmte Genotypen der Einzelpflanzen) der CAPS-Analyse sind in Tabelle 13 (siehe Anhang A 13) zusammengefasst. Da genügend Individuen aller Kultivare untersucht wurden, wurden fehlgeschlagene Untersuchungen nicht mehr mit der Kit-Extraktion wiederholt. Die kompakte Darstellung der Ergebnisse (bestimmte Genotypen der Kultivare) ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8 - Ergebnisse der Genotyp-Bestimmung der einzelnen Kultivare mittels CAPS-Analyse (Methoden-Etablierung); Auftretende Fragmente werden mit „x“ markiert; Unspezifische und nicht vollständig abverdaute Banden sind nicht angeführt.

Kultivar	HpaI-Verd.			BspTI-Verdau				Abbildungen	Bestimmter Genotyp
	425 bp	660 bp	1085 bp	198 bp	328 bp	559 bp	757 bp		
Moneymaker			x		x		x	(Abb. 43 & Abb. 46)	<i>tm-2/tm-2</i>
Muchamiel UMH 1200	x	x		x	x	x		(Abb. 43 & Abb. 46)	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Tica	x	x		x	x	x		(Abb. 44 bis Abb. 46)	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Guyana	x	x	x	x	x	x	x	(Abb. 44 bis Abb. 46)	<i>tm-2/Tm-2a</i>
Virus- Mutterpflanze 1			x		x		x	(Abb. 46)	<i>tm-2/tm-2</i>

3.1.3 Tetra-Primer-ARMS-PCR

In der Tetra-Primer-ARMS-PCR werden zwei Assays angewandt, welche je vier Primer in einer einzigen PCR verwenden. Die zwei äußeren nicht-Allel-spezifischen Primer (die Outer Primer) amplifizieren die SNP-enhaltende Region. Das in der PCR-Reaktion entstehende Amplifikat dient als Template für die zwei inneren Allel-spezifischen Primer (die Inner Primer), wodurch in den nächsten PCR-Zyklen die Allel-spezifischen PCR-Produkte amplifiziert werden. Durch die Durchführung beider Assays lässt sich zwischen den Allelen *tm-2*, *Tm-2a* und *Tm-2* unterscheiden (siehe Abschnitt 2.10 und Abschnitt 1.3.2). Da aus den Ergebnissen der CAPS-Analyse bekannt war, dass keine Pflanze das *Tm-2*-Allel enthielt (siehe Tabelle 8), wurde die Durchführung von Assay 1, welcher eine in diesem Fall nicht notwendige Differenzierung zwischen den Allelen *Tm-2a* und *Tm-2* erlaubt, hinfällig. Zur Genotypisierung wurde daher nur Assay 2 angewandt. Assay 1 wurde nur kontrollweise (siehe Abb. 9 und Abb. 12) durchgeführt.

Um zu testen, ob die Methode charakteristische Bandenmuster für den jeweiligen Genotyp liefert, wurde die Analyse zuerst mit Proben von Kultivaren durchgeführt, deren Genotyp bekannt war (siehe Abb. 9). Der Kultivar Moneymaker ist homozygot für das *tm-2*-Allel (Arens et al., 2007a). Es sollte in Assay 1 nur ein PCR-Produkt mit einer Länge von 416 bp entstehen und in Assay 2 zwei PCR-Produkte mit einer Länge von 509 bp und 381 bp entstehen. Der Kultivar Muchamiel UMH 1200 ist homozygot für das *Tm-2a*-Allel (García-Martínez et al., 2015). Es sollten in Assay 1 zwei PCR-Produkte mit einer Länge von 416 bp und 214 bp und in Assay 2 zwei PCR-Produkte mit einer Länge von 509 bp und 185 bp entstehen (siehe auch Anhang A 39).

Das Bandenmuster der PCR-Produkte (siehe Abb. 9) entspricht teilweise den Erwartungen und lässt sich den bei der Tetra-Primer-ARMS-PCR entstehenden Banden in Tabelle 7 (siehe S. 36) zuordnen. Zudem treten aber Banden auf, welche sich nicht immer nur aufgrund ihrer Intensität von den zu erwartenden Banden unterscheiden lassen. Diese zusätzlichen Banden entsprechen exakt den jeweils anderen möglichen Bandengrößen aus Tabelle 7 (siehe S. 36) und führen zu großen Problemen bei der Auswertung. Die Spezifität der Tetra-Primer-ARMS-PCR beruht auf Mismatches am 3'-Ende der inneren Primer. Das gleichzeitige Auftreten beider Allel-spezifischer PCR-Produkte weist auf geringe Spezifität der PCR-Reaktion hin (vgl. auch mit der Beschreibung der Tetra-Primer-ARMS-PCR in Abschnitt 1.3.2).

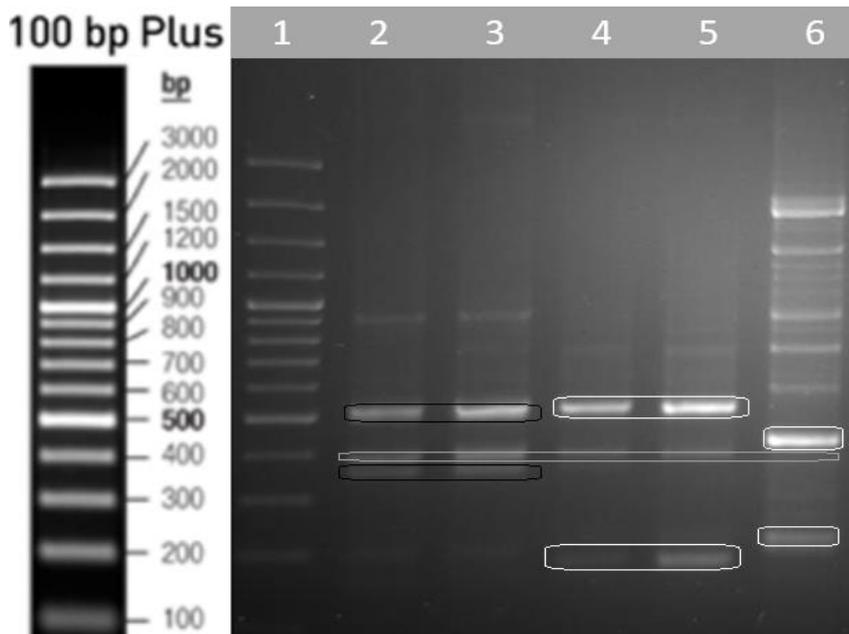


Abb. 9 - Tetra-Primer-ARMS-PCR. 1: 100 bp-Ladder; 2-3: Moneymaker Assay 2 [2: Pfl. 1(a); 3: Pfl. 2(a)]; 4-5: Muchamiel UMH 1200 Assay 2 [4: Pfl. 1(a); 5: Pfl. 2(a)], 6: Muchamiel UMH 1200 Assay 1 Pfl. 1(a); Assay 1 wurde nur mit Muchamiel UMH 1200 durchgeführt, da Moneymaker kein R-Allel besitzt. Moneymaker (schwarz) = *tm-2* homozygot, Muchamiel UMH 1200 (weiß) = *Tm-2a* homozygot. Unspezifische verschleppte Banden: hellgrau.

Um zu überprüfen, ob die Tetra-Primer-ARMS-PCR bei Proben der Kultivare Tica und Guyana RZ F1 zu denselben Ergebnissen wie die CAPS-Analyse kommt, wurden Einzelpflanzenproben ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) mittels Tetra-Primer-ARMS-Methode untersucht. Assay 1 (siehe Abb. 10) führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die Amplifikate, welche entweder auf das Vorhandensein des *Tm-2*-Allels (254 bp) oder des *Tm-2a*-Allels (214 bp) hinweisen, kamen parallel vor. Die parallele Existenz beider Allele ist in Tomatenpflanzen nur beim Genotyp *Tm-2/Tm-2a* möglich. Dieser Genotyp ist jedoch laut der parallel durchgeführten CAPS-Analyse bei keiner der zu untersuchenden Pflanzen vorhanden (siehe Tabelle 8).

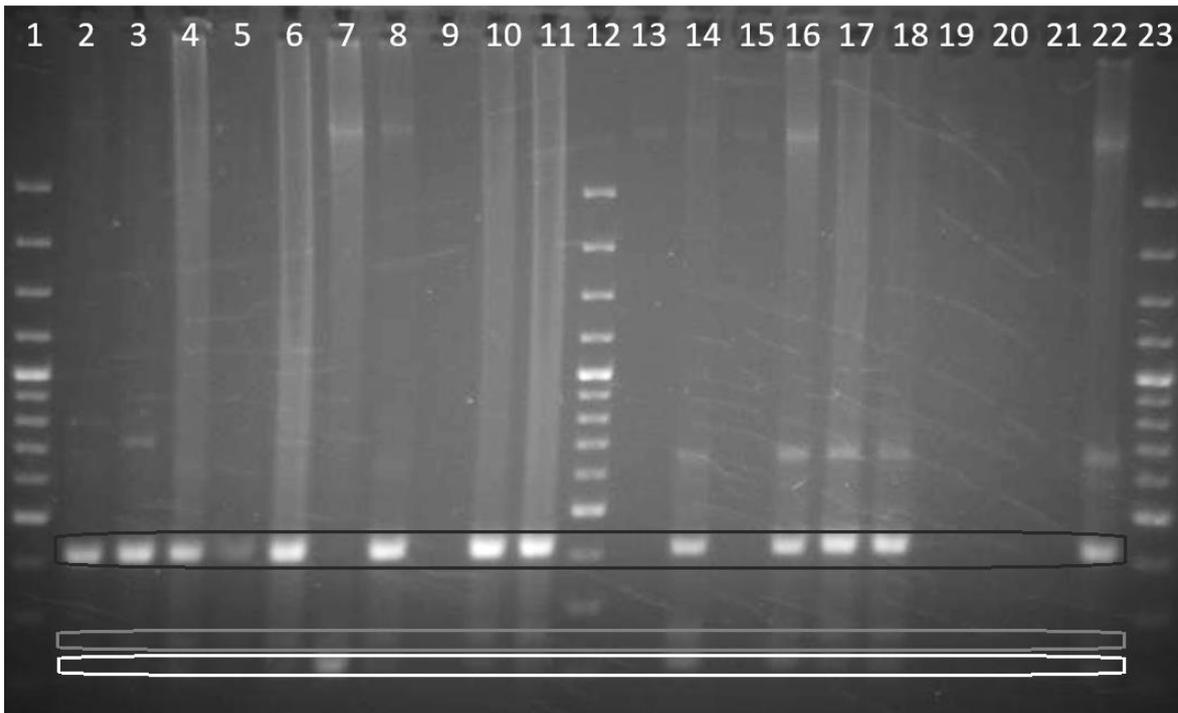


Abb. 10 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Assay 1. 1: 100 bp-Ladder; 2-11: Tica [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10]; 12: 100 bp-Ladder; 13-22: Guyana RZ F1 [13: Pfl. 1; 14: Pfl. 2; 15: Pfl. 3; 16: Pfl. 4; 17: Pfl. 5; 18: Pfl. 7; 19: Pfl. 8; 20: Pfl. 9; 21: Pfl. 10; 22: Pfl. 6]; 23: 100 bp-Ladder. Kontrollbande (416 bp): dunkelgrau; Tm-2-Allel (254 bp): hellgrau; Tm-2a-Allel (214 bp): weiß.

Der zugehörige Assay 2 der Analyse mittels Tetra-Primer-ARMS-Methode wurde mit denselben Proben von Einzelpflanzen der Kultivare Tica und Guyana RZ F1 ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) durchgeführt (siehe Abb. 11). Einige PCR-Reaktionen sind gänzlich fehlgeschlagen (siehe Slots 9, 13, 15 und 19 bis 21). Beim Rest treten die Kontrollbanden auf (509 bp – weiß eingezeichnet). Auch in diesem Assay führte die Analyse zu widersprüchlichen Ergebnissen. Es kommen am Gel die R-Allel-Banden (185 bp) immer zusammen mit den S-Allel-Banden (381 bp) vor.

Das Auftreten von S-Allel und R-Allel (siehe Abb. 11) – bzw. beider R-Allele (siehe Abb. 10) – ist widersprüchlich. Wie sich herausstellte, ist die Tetra-Primer-ARMS-PCR eine sehr sensible Methode und dürfte trotz Vorgehen nach dem Protokoll von Arens et al. (2007a) nicht die erwarteten Ergebnisse liefern. Da bei den verwendeten Primern stets nur ein bis zwei Mismatches darüber entscheiden, ob ein innerer Primer binden kann oder nicht, kommt es offensichtlich zu unspezifischen Primerbindungen, welche auch zur Amplifikation der betreffenden DNA-Abschnitte führen, wenn das nachzuweisende Allel gar nicht vorhanden ist.

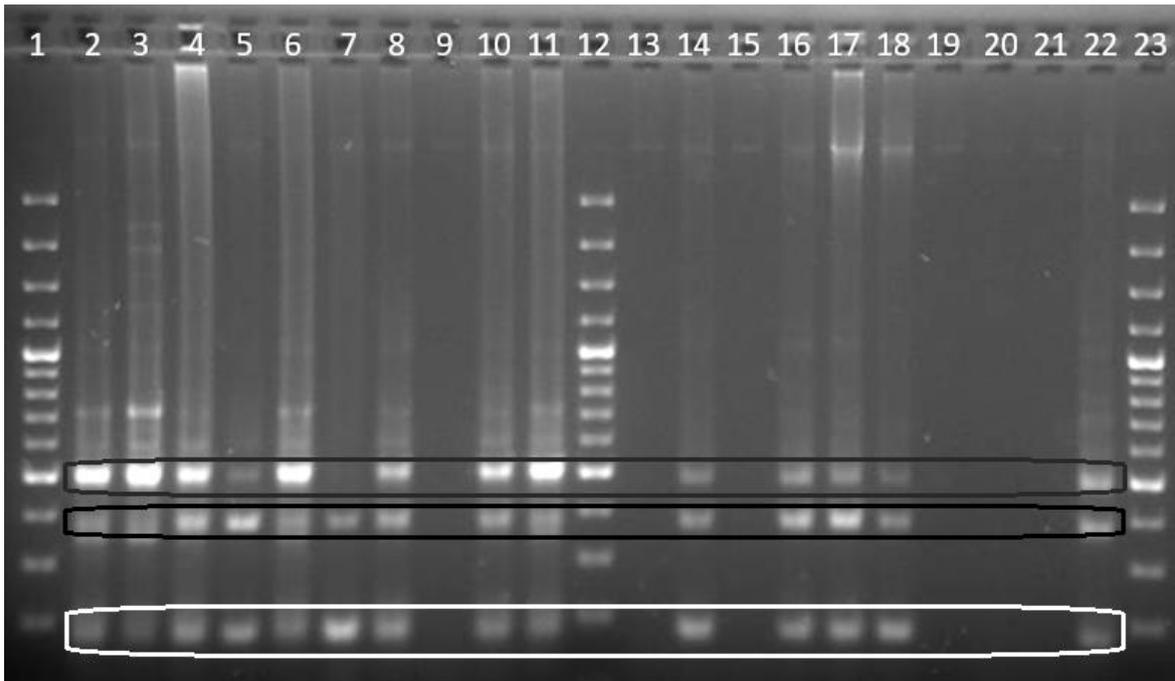


Abb. 11 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Assay 2. 1: 100 bp-Ladder; 2-11: Tica [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10]; 12: 100 bp-Ladder; 13-22: Guyana RZ F1 [13: Pfl. 1; 14: Pfl. 2; 15: Pfl. 3; 16: Pfl. 4; 17: Pfl. 5; 18: Pfl. 7; 19: Pfl. 8; 20: Pfl. 9; 21: Pfl. 10; 22: Pfl. 6]; 23: 100 bp-Ladder. Kontrollbande (509 bp): dunkelgrau; S-Allel (381 bp), schwarz; R-Allel (185 bp): weiß.

Um feststellen zu können, ob die Minimierung von Störfaktoren mittels der Extraktion des DNeasy® Plant Mini Kits Auswirkungen auf die gebildeten Amplifikate der Tetra-Primer-ARMS-PCR hat, wurde die Analyse mit den Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits wiederholt. Es wurden Proben von Einzelpflanzen aller Kultivare (Moneymaker, Muchamiel UMH 1200, Tica, Guyana RZ F1 und der Virus-Mutterpflanze), deren Genotypen schon bekannt waren, erneut mittels Assay 1 und Assay 2 untersucht (siehe Abb. 12).

Alle PCR-Reaktionen brachten Amplifikate hervor – die PCRs mit den Extrakten nach Murray & Thompson (1980) führten meistens zu einigen Ausfällen. Die wiederholten Assays lieferten jedoch keine aussagekräftigeren Resultate. Es waren nach wie vor viele unspezifische Banden erkennbar. Besonders auffällig ist die 381 bp-Bande in Assay 2, welche in jeder Probe deutlich vorkommt.

Dass es keine PCR-Ausfälle gab, bestätigt, dass die Kit-Extraktion grundsätzlich zu reineren, an Störfaktoren ärmeren Extrakten führt. Die Spezifität der Untersuchung konnte damit aber nicht beeinflusst werden.

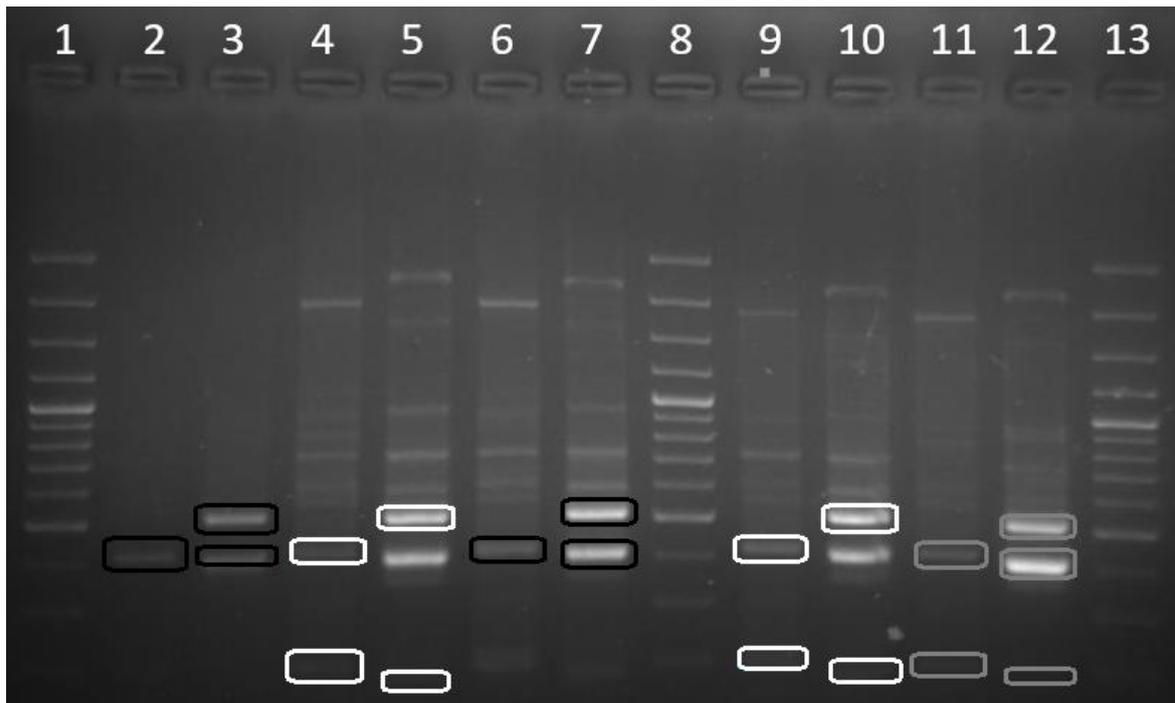


Abb. 12 - Tetra-Primer-ARMS-PCR (mit Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits); 1: 100 bp-Ladder; 2: MP1 Pfl. 1(a) (Assay 1); 3: MP1 Pfl. 1(a) (Assay 2); 4: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a) (Assay 1); 5: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a) (Assay 2); 6: Moneymaker Pfl. 1(a) (Assay 1); 7: Moneymaker Pfl. 1(a) (Assay 2); 9: Tica Pfl. 1(a) (Assay 1); 10: Tica Pfl. 1(a) (Assay 2); 11: Guyana RZ F1 Pfl. 1(a) (Assay 1); 12: Guyana RZ F1 Pfl. 1(a) (Assay 2); 13: 100 bp-Ladder. MP1 = Virus-Mutterpflanze 1. Virus-Mutterpflanze & Moneymaker: schwarz; Muchamiel UMH 1200, Tica: weiß; Guyana: grau.

Für die Tetra-Primer-ARMS-Methode gestaltete sich das Arbeiten nach Arens et al. (2007b) schwierig. Die Ergebnisse sind durchwegs gegensätzlich, weshalb an dieser Stelle auch keine tabellarische Aufstellung der Daten erfolgt. Unspezifische Banden machten eine exakte Bestimmung des Genotyps mit dieser Methode unter diesen Bedingungen unmöglich. Die Tetra-Primer-ARMS-PCR basiert, wie einführend in Abschnitt 2.10.1 beschrieben, auf der Mismatch-Strategie (Medrano et al., 2014). Die mit Vector NTI® durchgeführten Sequenzanalysen (siehe Abb. 83 bis Abb. 88 im Anhang A 39 ff.) der einzelnen Allele des *Tm-2*-Gens zeigten, dass, wie Medrano et al. (2014) angaben, die Spezifität der Bindungen der inneren Primer nur von einzelnen Basenpaaren abhängt. Ob die Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte stattfindet, oder nicht, ist ausschließlich von den ein bis zwei Mismatches zwischen den verschiedenen inneren Primern und dem Template abhängig. Deshalb lässt sich darauf schließen, dass die Rahmenbedingungen der PCR großen Einfluss auf die Amplifikation oder deren Ausbleiben haben. Bereits minimale Abweichungen der Optimalbedingungen (z. B.: geringste Temperaturabweichungen oder Abweichung in der Ionenkonzentration) führen dazu, dass der jeweils andere innere Primer unspezifisch binden kann und bei der Analyse jeweils Amplifikate für R-Allel und S-Allel auftreten, auch wenn nur eines von beiden vorhanden ist.

Auch die Literatur besagt, dass die Spezifität der der Tetra-Primer-ARMS-PCR insbesondere durch die Annealingtemperatur (welche an die Schmelztemperaturen der Primer angepasst werden sollte) beeinflusst wird. Eine durch eine Aufreinigung verbesserte DNA-Qualität, die richtige Konzentration der PCR-Reagenzien (insbesondere jene der MgCl₂-Konzentration) und die richtigen Primerkonzentrationen führen ebenso zu Verbesserungen hinsichtlich der Spezifität (Medrano et al., 2014). Da andere von Arens et al. (2007a) genannte Labors auch Probleme mit zusätzlich auftretenden unspezifischen Banden oder mit fehlenden Banden für das S-Allel und Kontrollbanden hatten, mussten auch dort Optimierungen durchgeführt werden, um mit der Tetra-Primer-ARMS-PCR verwertbare Ergebnisse erzielen zu können (Arens et al., 2007a).

Der Blick auf die im Zuge der Methoden-Etablierung gewonnenen Ergebnisse, sowie die Angaben anderer Labors ließ darauf schließen, dass für einen reibungslosen Ablauf in weiteren Untersuchungen die PCR-Bedingungen adaptiert werden müssen. Dafür werden insbesondere die Optimierungen mittels Anpassung der Annealing-Temperatur (Arens et al., 2007a) und gegebenenfalls der Magnesiumionen-Konzentration (Medrano et al., 2014) empfohlen.

3.1.4 Fazit der Methoden-Etablierung

Die Methoden-Etablierung wurde mit der Feststellung abgeschlossen, dass eine der verwendeten Methoden, nämlich die CAPS-Analyse, von Beginn an die zu erwartenden Ergebnisse hervorbrachte, womit eines der Ziele erreicht wurde. Ursprünglich sollte die genomische DNA aus finanziellen Gründen mit selbst angesetzten Reagentien anstelle eines Kits durchgeführt werden. Da sich zeigte, dass sowohl die CTAB-Extraktion, sowie die Extraktion nach Murray & Thompson (1980) immer wieder zu Problemen bei der PCR führten, wurde fortan jedoch mit dem DNeasy® Plant Mini Kit gearbeitet.

Die CAPS-Analyse lieferte aussagekräftige Ergebnisse (siehe Tabelle 8 auf S. 43 und Tabelle 13 im Anhang A 13) und wurde deshalb für die weiteren Untersuchungen der Sorten-Genotypisierung angewandt (siehe Abschnitt 3.1.2, S. 39 ff.). Um auch die Tetra-Primer-ARMS-PCR anwenden zu können, wurde die empfohlene Optimierung der Annealing-Temperatur im Rahmen der Sorten-Genotypisierung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.3, S. 44 ff.).

3.2 Sorten-Genotypisierung

Dieser Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Genotypisierung der untersuchten Tomatenpflanzen hinsichtlich deren Genotyp am *Tm-2*-Locus. Dazu wurden die im Zuge der Methoden-Etablierung (siehe Abschnitt 3.1) getesteten Methoden angewandt.

Die untersuchten Kultivare (siehe Tabelle 2, S. 23) wurden aus Saatgut angezogen, das teilweise von Saatgutunternehmen stammte und teilweise durch Züchtung des Vereins Arche Noah oder dessen Partnern erzeugt wurde. Bei Saatgut von Saatgutunternehmen wird angegeben, ob es sich um Saatgut stabiler Linien oder um Hybridsaatgut handelt. Zu selbst gezüchtetem Saatgut sind häufig weniger Informationen bekannt – es lässt sich nicht immer nachvollziehen, welcher Generation einer Zuchtlinie das vorliegende Saatgut angehört bzw. welche eingekreuzten Eigenschaften enthalten sein könnten. Zur Herstellung von ToMV-resistentem Saatgut, welches für dieses Merkmal stabil sein sollte, müssen *Tm-2a*-homozygote Linien gezüchtet werden (*Tm-2a/Tm-2a*). Eine Möglichkeit, um sicherzugehen, dass dieser Züchtungserfolg erreicht werden kann, ist die Anwendung der markergestützte Selektion (siehe Abschnitt 1.3) umgesetzt durch den Einsatz der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden zur Genotypisierung. So können mithilfe der Ergebnisse der Marker-Analysen die Kreuzungseltern ausgewählt werden, um mit diesen in weiterer Folge „Präzisionszüchtung“ zu betreiben.

3.2.1 Extraktionsmethoden

Im Zuge der Methoden-Etablierung wurde festgestellt, dass die zuverlässigste Methode zur Extraktion von gDNA das DNeasy® Plant Mini Kit ist (siehe Abschnitt 3.1.1). Für die Analysen der Sorten-Genotypisierung wurde ausschließlich mit dem Kit gDNA isoliert. Die Extraktion lieferte die zu erwartenden Ergebnisse – es gab kaum Ausfälle. Gelbilder zu den Extraktionen sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Abb. 54 bis Abb. 60, Anhang A 18 ff.).

3.2.2 CAPS-Analyse

Die CAPS-Analyse konnte erfolgreich etabliert werden (siehe Abschnitt 3.1.2) und wurde in den Analysen der Sorten-Genotypisierung als Hauptwerkzeug eingesetzt. Von den 24 inokulierten Pflanzen der zwölf unterschiedlichen Kultivare wurden je vier zufällig ausgewählte Pflanzen analysiert. Abweichend davon wurden von den Kultivaren Goldita EP1 und Pozzano F1 alle 24 Pflanzen, sowie vom Kultivar EP2 neun Pflanzen untersucht.

Von allen Pflanzenproben wurde gDNA isoliert und damit eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die anschließende Restriktion der Amplifikate brachte Fragmente in den zu erwartenden Größen hervor (siehe Abb. 68 bis Abb. 76 im Anhang A 22 bis A 26). Vorhandene unspezifische Banden am Gel beeinträchtigten die Auswertung nicht. Die unspezifischen Banden zwischen 250 bp und 300 bp wurden aus der Extraktion mitgeschleppt. Andere unspezifische Banden traten insbesondere dann auf, wenn die Restriktionsansätze sehr hohe DNA-Konzentration enthielten. Als weitere mögliche Ursache für unspezifische Banden konnte die erst nachträglich festgestellte und fälschlicherweise zu hoch eingesetzte $MgCl_2$ -Konzentration in den PCR-Reaktionen nicht ausgeschlossen werden, welche sich durch die Verwendung eines 10 x PCR-Puffers mit bereits zugesetztem und nicht berücksichtigtem $MgCl_2$ ergab. Dieser Fehler führte dazu, dass alle PCR-Ansätze der CAPS-Analyse (siehe Abb. 34 bis Abb. 42 und Abb. 61 bis Abb. 66 im Anhang A 7 ff. bzw. A 20 ff.) 1,5 mM $MgCl_2$ enthielten (vorgesehen: 0 mM $MgCl_2$). Als Ursache für unspezifische Banden konnte die zu hoch eingesetzte $MgCl_2$ -Konzentration durch die Restriktion (siehe Abb. 78 und Abb. 79 im Anhang A 27) der Amplifikate der erneut durchgeführten PCR-Reaktion ohne zusätzliches $MgCl_2$ (siehe Abb. 67 im Anhang A 22) jedoch ausgeschlossen werden.

Fortfolgend werden die Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung beispielhaft anhand der Gelbilder des Restriktionsverdaus der Pflanzen des segregierenden Kultivars Goldita EP1 (siehe Abb. 13 und Abb. 14) gezeigt. Ergebnisse weiterer durchgeführter Restriktionsanalysen sind dem Abschnitt A 2.2.2 im Anhang zu entnehmen.

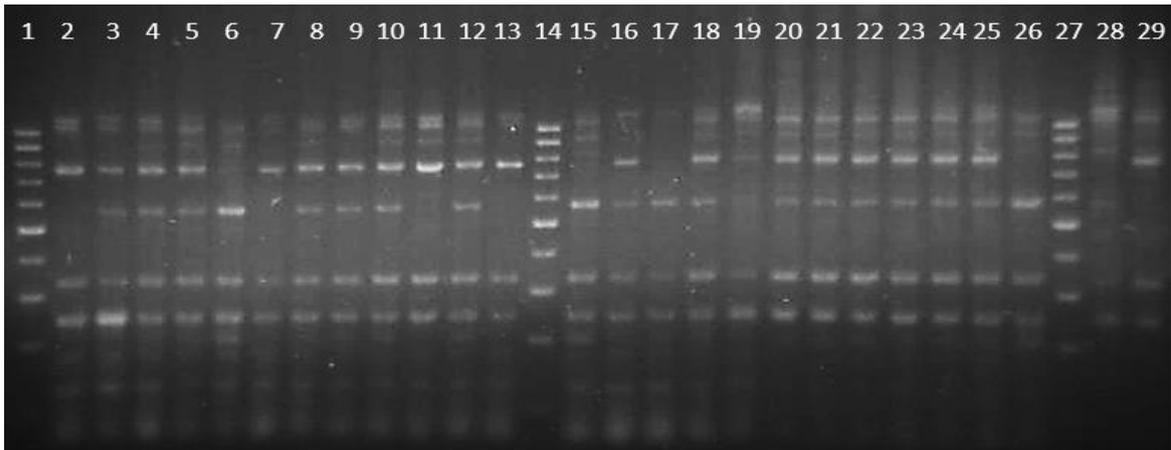


Abb. 13 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau (II) mit *Bsp*TI, ohne $MgCl_2$. 1: 100 bp-Ladder; 2-13: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10; 12: Pfl. 11; 13: Pfl. 12]; 14: 100 bp-Ladder; 15-26: Goldita EP1 [15: Pfl. 13; 16: Pfl. 14; 17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16; 19: Pfl. 17; 20: Pfl. 18; 21: Pfl. 19; 22: Pfl. 20; 23: Pfl. 21; 24: Pfl. 22; 25: Pfl. 23; 26: Pfl. 24]; 27: 100 bp-Ladder; 28: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz); 29: Moneymaker G421 Pfl. 1 (tm-2/tm-2-Referenz).

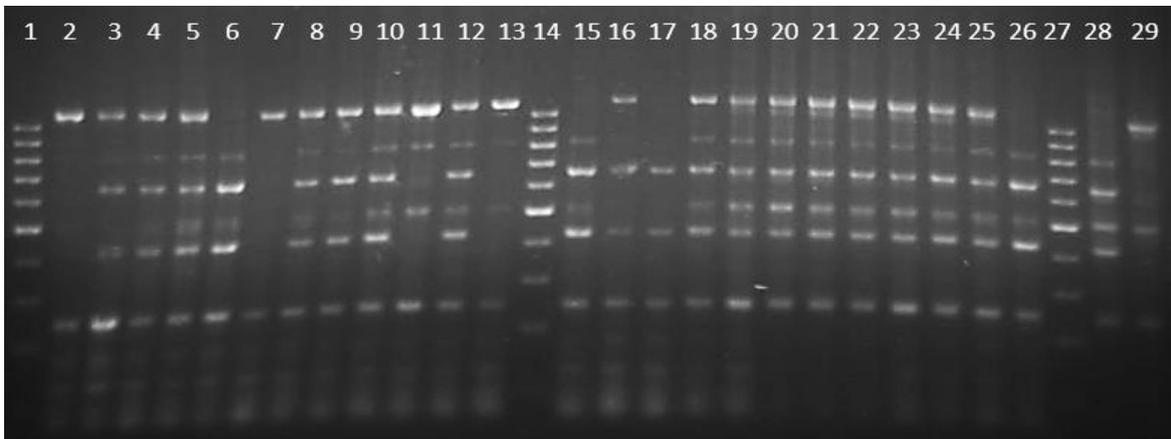


Abb. 14 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau (II) mit *Hpa*I, ohne $MgCl_2$. 1: 100 bp-Ladder; 2-13: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10; 12: Pfl. 11; 13: Pfl. 12]; 14: 100 bp-Ladder; 15-26: Goldita EP1 [15: Pfl. 13; 16: Pfl. 14; 17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16; 19: Pfl. 17; 20: Pfl. 18; 21: Pfl. 19; 22: Pfl. 20; 23: Pfl. 21; 24: Pfl. 22; 25: Pfl. 23; 26: Pfl. 24]; 27: 100 bp-Ladder; 28: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz); 29: Moneymaker G421 Pfl. 1 (tm-2/tm-2-Referenz).

Für die Pflanzen 5, 6 und 7 des Kultivars Goldita EP1 wurde nach der erfolgreichen Genotypisierung (siehe Abb. 14 und Abb. 15) die gesamte Analyse wiederholt, da für diese drei Proben ausgehend von den Ergebnissen des Inokulations-Versuchs andere Genotypen zu erwarten waren (siehe Tabelle 12, S. 61). Die Vermutung des Vertauschens dieser Proben im Labor konnte widerlegt werden, da die Genotypisierung für die drei Proben von Beginn an wiederholt wurde und zum selben Ergebnis führte (siehe Abb. 77 im Anhang A 26). Am ehesten ist von einer Verwechslung der drei Proben zum Zeitpunkt der Probennahme auszugehen.

Alle gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 14 (siehe Anhang A 28 ff.) aufgelistet. Die kompakte Darstellung der Ergebnisse ist Tabelle 9 zu entnehmen, in welcher diese zusammengefasst wurden, sofern die Ergebnisse aller Einzelpflanzen eines Kultivars einheitlich sind.

Tabelle 9 - Ergebnisse der Genotyp-Bestimmung der einzelnen Kultivare mittels CAPS-Analyse (Sorten-Genotypisierung); Auftretende Fragmente werden mit „x“ markiert; Unspezifische und nicht vollständig abverdaute Banden sind nicht angeführt.

Kultivar	HpaI-Verd.			BspTI-Verdau				Abbildungen	Bestimmter Genotyp
	425 bp	660 bp	1085 bp	198 bp	328 bp	559 bp	757 bp		
Moneymaker G421			x		x		x	Abb. 68, Abb. 69, Abb. 73 & Abb. 74	<i>tm-2/tm-2</i>
Primabella			x		x		x	Abb. 71 & Abb. 72	<i>tm-2/tm-2</i>
Muchamiel UMH 916	x	x		x	x	x		Abb. 68, Abb. 69, Abb. 73 & Abb. 74	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Muchamiel UMH 972	x	x		x	x	x		Abb. 68 & Abb. 69	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Goldita EP1								Abb. 71 & Abb. 72	<i>segregierend (siehe unten)</i>
Goldita EP2			x		x		x	Abb. 73 & Abb. 74	<i>tm-2/tm-2</i>
Philovita F1	x	x	x	x	x	x	x	Abb. 73 & Abb. 74	<i>tm-2/Tm-2a</i>
Limetto F1	x	x		x	x	x		Abb. 73 & Abb. 74	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Limetto F2	x	x		x	x	x		Abb. 73 & Abb. 74	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Rote Dattelwein	x	x		x	x	x		Abb. 73 & Abb. 74	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Aroma Cocktail	x	x		x	x	x		Abb. 75 & Abb. 76	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Pozzano F1	x	x	x	x	x	x	x	Abb. 75 & Abb. 76	<i>tm-2/Tm-2a</i>
Goldita EP1									
1			x		x		x	Abb. 71 & Abb. 72	<i>tm-2/tm-2</i>
2	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/tm-2a</i>
3	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
4	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
5	x	x		x	x	x			<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
6			x		x		x		<i>tm-2/tm-2</i>
7	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
8	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
9	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
10			x		x		x		<i>tm-2/tm-2</i>
11	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
12			x		x		x		<i>tm-2/tm-2</i>
13	x	x		x	x	x			<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
14	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
15	x	x		x	x	x			<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
16	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
17	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
18	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
19	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
20	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
21	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
22	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
23	x	x	x	x	x	x	x		<i>tm-2/Tm-2a</i>
24	x	x		x	x	x			<i>Tm-2a/Tm-2a</i>

3.2.3 Tetra-Primer-ARMS-PCR

Die Tetra-Primer-ARMS-PCR konnte im Zuge der Methoden-Etablierung, wie in Abschnitt 3.1.3 erwähnt, nicht erfolgreich etabliert werden. Die Genotypen von Pflanzenproben konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Um die Methode für die Sorten-Genotypisierung anwenden zu können, wurden in diesem Teil der Arbeit weitere Optimierungen durchgeführt.

Eine Möglichkeit, die Tetra-Primer-ARMS-PCR zu optimieren ist die Anpassung der Annealing-Temperatur, welche auf der temperaturabhängigen Spezifität der Primerbindungen beruht (Arens et al. 2008). Es wurden dazu PCR-Reaktionen (Assay 2) ausgehend von gDNA der Pflanze 1 des Kultivars Moneymaker G421 (*tm-2/tm-2*) bzw. von gDNA der Pflanze 2 des Kultivars Muchamiel UMH 916 (*Tm-2a/Tm-2a*) unter Anwendung eines Temperaturgradienten durchgeführt. Dabei wurden idente PCR-Ansätze zwölf verschiedenen Annealing-Temperaturen (54,1 °C bis 59,8 °C) ausgesetzt (siehe Abb. 15). Die Ansätze enthielten in diesem Assay jeweils 3 mM MgCl₂. In den PCR-Reaktionen des Kultivars Muchamiel UMH 916 wurden keine unspezifischen Banden amplifiziert. In den PCR-Reaktionen des Kultivars Moneymaker G421 wurden unspezifische Banden amplifiziert (185 bp), welche mit steigender Annealing-Temperatur abnahmen. Bei der höchsten Temperatur entstanden für diesen Kultivar gar keine Amplifikate mehr. Es zeigt sich, dass die Annealing-Temperatur wie erwartet einen starken Einfluss auf die Spezifität der Primerbindungen hat. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass für die ideale Annealing-Temperatur von einer Temperatur von 59,6 °C (siehe Abb. 15, Slot 25) ausgegangen werden kann, da hier so gut wie keine unspezifische 185 bp-Bande mehr zu erkennen ist, die beiden spezifischen Banden aber noch vorhanden sind.



Abb. 15 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Temperaturgradient. 1: 100 bp-Ladder; 2-13: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (*Tm-2a/Tm-2a*-Referenz) [3 mM MgCl₂; 2: 54,1 °C; 3: 54,2 °C; 4: 54,5 °C; 5: 55,0 °C; 6: 55,7 °C; 7: 56,4 °C; 8: 57,2 °C; 9: 57,9 °C; 10: 58,6 °C; 11: 59,2 °C; 12: 59,6 °C; 13: 59,8 °C]; 14: 100 bp-Ladder; 15-26: Moneymaker G421 Pfl. 1 (*tm-2/tm-2*-Referenz) [3 mM MgCl₂; 15: 54,1 °C; 16: 54,2 °C; 17: 54,5 °C; 18: 55,0 °C; 19: 55,7 °C; 20: 56,4 °C; 21: 57,2 °C; 22: 57,9 °C; 23: 58,6 °C; 24: 59,2 °C; 25: 59,6 °C; 26: 59,8 °C]; 27: 100 bp-Ladder; 28: Negativkontrolle (H₂O).

Bereits die Optimierung der Annealing-Temperatur führte zum Erfolg, weshalb die Anpassung der MgCl₂-Konzentration zur Steigerung Spezifität der Tetra-Primer-ARMS-PCR

nach Medrano et al. (2014) nicht durchgeführt werden musste. Grundsätzlich wird die Spezifität der Taq-Polymerase durch eine zu hohe $MgCl_2$ -Konzentration vermindert, wodurch es zu unspezifischen Synthesen kommen kann (Müller et al., 2016).

Das Gelbild in Abb. 16 zeigt die Ergebnisse einer Tetra-Primer-ARMS-PCR ausgehend von gDNA unterschiedlicher Genotypen (bekannt aus der CAPS-Analyse) mit optimal eingestellten Parametern. Letztere wurden mithilfe der oben beschriebenen Optimierung bestimmt (siehe Abb. 15). Abgesehen von den bekannten unspezifischen Banden zwischen 200 bp und 300 bp entsprechen alle Amplifikate dem zu erwartenden Bandenmuster (siehe Abschnitt 2.10.3), d. h. die Optimierung war erfolgreich.



Abb. 16 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Annealing-T.: 59,6°C, 1,5 mM $MgCl_2$. 1: 100 bp-Ladder; 2: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz); 3: Moneymaker G421 Pfl. 1 (tm-2/tm-2-Referenz); 4: Goldita EP1 Pfl. 9 (tm-2/Tm-2a); 5: Goldita EP1 Pfl. 5 (Tm-2a/Tm-2a); 6: Goldita EP1 Pfl. 1 (tm-2/tm-2); 7: Negativkontrolle (H_2O); 8: 100 bp-Ladder.

Um die Zuverlässigkeit der Tetra-Primer-ARMS-PCR abschließend zu überprüfen, wurde der mit der CAPS-Analyse bereits untersuchte Kultivar Goldita EP1 (siehe Tabelle 9) mit der Tetra-Primer-ARMS-PCR erneut untersucht (siehe Abb. 17). Die Ergebnisse entsprechen jenen der CAPS-Analyse und sind in Tabelle 10 zusammengefasst.



Abb. 17 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Annealing-T.: 59,6°C, 1,5 mM $MgCl_2$. 1: 100 bp-Ladder; 2-9: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8]; 10: 100 bp-Ladder; 11-18: Goldita EP1 [11: Pfl. 9; 12: Pfl. 10; 13: Pfl. 11; 14: Pfl. 12; 15: Pfl. 13; 16: Pfl. 14; 17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16]; 19: 100 bp-Ladder; 20-27: Goldita EP1 [20: Pfl. 17; 21: Pfl. 18; 22: Pfl. 19; 23: Pfl. 20; 24: Pfl. 21; 25: Pfl. 22; 26: Pfl. 23; 27: Pfl. 24]; 28-30: Ergänzung [28: 100 bp-Ladder; 29: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz); 30: Moneymaker G421 Pfl. 1 (tm-2/tm-2-Referenz)];

Nach der erfolgreichen Optimierung führte die Tetra-Primer-ARMS-PCR zu denselben Ergebnissen für den segregierenden Kultivar Goldita EP1 (siehe Tabelle 10) wie die CAPS-Analyse (siehe Tabelle 9, S. 53). Die Methode konnte etabliert werden. Abgesehen von dem segregierenden Kultivar Goldita EP1 wurden keine weiteren redundanten Genotypisierungen mit der Tetra-Primer-ARMS-PCR durchgeführt.

Tabelle 10 - Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung des Kultivars Goldita EP1 mittels Tetra-Primer-ARMS-PCR, Assay 2; Auftretende Amplifikate werden mit „x“ markiert; Unspezifische Banden sind nicht angeführt.

Kultivar Goldita EP1	Assay 2			Bestimmter Genotyp
Pflanze	185 bp	381 bp	509 bp	(siehe Abb. 82)
1		x	x	<i>tm-2/tm-2</i>
2	x	x	x	<i>tm-2/tm-2a</i>
3	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
4	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
5	x		x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
6		x	x	<i>tm-2/tm-2</i>
7	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
8	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
9	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
10		x	x	<i>tm-2/tm-2</i>
11	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
12		x	x	<i>tm-2/tm-2</i>
13	x		x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
14	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
15	x		x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
16	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
17	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
18	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
19	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
20	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
21	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
22	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
23	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
24	x		x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>

3.2.4 Fazit der Sorten-Genotypisierung

Durch die in der Sorten-Genotypisierung durchgeführten Analysen konnten alle Einzelpflanzen der zu untersuchenden Kultivare genotypisiert werden. Am unkomplizierten Ablauf der Analysen ist auch die Extraktion der gDNA mittels DNeasy® Plant Mini Kit mitbeteiligt. Im Vergleich zu den Analysen der Methoden-Etablierung, welche mit anderen Extraktionsmethoden durchgeführt wurden und von welchen nur etwa ein Drittel zum Erfolg führten (siehe Abschnitt 3.1.1), lag die Ausfallrate der Kit-Extraktionen unter 5 % (93 extrahierte gDNA-Proben brachten in 89 Fällen genügend Amplifikate bei der PCR-Reaktion hervor; siehe Abschnitt A 2.2 im Anhang A 20). Da Extraktionsausfälle zu einem enormen zusätzlichen Arbeitsaufwand und zur Verschwendung von Labormaterial führen, ist eine gDNA-Extraktion mithilfe eines Kits zu empfehlen.

Als Hauptwerkzeug für die Bestimmung der Genotypen wurde die CAPS-Analyse angewandt, welche aussagekräftige Ergebnisse lieferte (siehe Tabelle 9 auf S. 53 und Tabelle 15 im Anhang A 13). Um auch die Tetra-Primer-ARMS-PCR für die Sorten-Genotypisierung anwenden zu können, wurde eine Optimierung der Annealing-Temperatur (siehe Abb. 15) durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.3, S. 44 ff.). Nach erfolgreicher Anpassung der PCR-Parameter lieferte auch die Tetra-Primer-ARMS-PCR aussagekräftige Ergebnisse (siehe Tabelle 10 auf S. 56 und Tabelle 15 im Anhang A 34).

Die Tetra-Primer-ARMS-PCR konnte, wenn auch etwas später, erfolgreich etabliert werden und kann problemlos für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Gegenüber der CAPS-Analyse bietet die Tetra-Primer-ARMS-PCR einige Vorteile: Die Genotypisierung beruht lediglich auf der spezifischen Amplifikation im Zuge der PCR-Reaktion, weshalb der Schritt der Restriktion und der damit verbundene Arbeitsaufwand wegfällt. Auch finanziell fällt die Bilanz der Tetra-Primer-ARMS-PCR um einiges günstiger aus, da die Primererstellung relativ kostengünstig ist, keine teuren Restriktionsenzyme benötigt werden und durch das Wegfallen einiger zeitintensiver Schritte im Vergleich zur CAPS-Analyse weniger Arbeitszeit anfällt.

Die Tetra-Primer-ARMS-PCR benötigt in einem anderen Labor (mit einem anderen Thermocycler) zwar möglicherweise erneut eine Optimierung der Annealing-Temperatur, ist aber dennoch die Methode der Wahl – insbesondere, wenn eine große zu untersuchende Probenzahl vorliegt.

3.3 Inokulations-Versuch

Alle Pflanzen, deren Genotyp im Zuge der Sorten-Genotypisierung bestimmt wurde, wurden auch einer Inokulation mit ToMV unterzogen. Die methodische Vorgehensweise zu diesem Versuch ist dem Abschnitt 2.3 zu entnehmen. In der Tabelle 11 sind die unterschiedlichen Kultivare, Informationen über deren Genotyp und über die Symptomausprägung nach erfolgter Inokulation angegeben (relative Anteile der symptomtragenden Pflanzen aus der jeweiligen Stichprobe). Pro Kultivar wurden 24 Pflanzen inokuliert und vier Kontrollpflanzen einer Mock-Inokulation (Inokulation ohne Virus) unterzogen (siehe Abschnitt 2.3). Aus den 24 inokulierten Pflanzen jedes Kultivars wurde eine zufällige Stichprobe von vier Pflanzen ausgewählt, welche im Zuge der Sorten-Genotypisierung untersucht wurden. Abweichend davon wurden von den Kultivaren Goldita EP1 und Pozzano F1 aufgrund deren segregierender Symptomausprägung (siehe Tabelle 11) alle 24 Pflanzen, sowie vom Kultivar Goldita EP2 aufgrund der Verwandtschaft mit dem segregierenden Kultivar Goldita EP1 neun Pflanzen untersucht.

Da alle Kontrollpflanzen symptomlos blieben, ist davon auszugehen, dass im Gewächshaus sauber gearbeitet wurde bzw. dass keine anderen Mechanismen zur Verbreitung des Virus beitrugen (z. B.: im Zuge der Pflanzenpflege oder durch Fraß).

Tabelle 11 - Ergebnisse des Inokulations-Versuchs. Die während den Bonituren ermittelten Symptome werden dem vermuteten bzw. dem bestimmten Genotyp gegenübergestellt. Die Ergebnisse der Kultivare Philovita F1 und Goldita EP2 sind detailliert in Tabelle 17 und in Tabelle 12 (vgl. Tabelle 18 im Anhang A 37) dargestellt. Bei dem Kultivar Pozzano F1 traten Symptome erst bei der zweiten Bonitur auf, bei allen anderen Kultivaren waren Symptome bereits bei der ersten Bonitur erkennbar.

Kultivar	Relativer Anteil der symptomzeigenden Pflanzen aus der jeweiligen Stichprobe	Vor der Untersuchung bekannter oder vermuteter Genotyp	Bestimmter Genotyp
Moneymaker G421	100 %	<i>tm-2/tm-2</i>	<i>tm-2/tm-2</i>
Primabella	100 %	<i>tm-2/tm-2</i>	<i>tm-2/tm-2</i>
Muchamiel UMH 916	0 %	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Muchamiel UMH 972	0 %	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Goldita EP1	25 %	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>segregierend (Tabelle 12)</i>
Goldita EP2	100 %	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>tm-2/tm-2</i>
Philovita F1	0 %	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>tm-2/Tm-2a</i>
Limetto F1	0 %	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Limetto F2	0 %	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Rote Dattelwein	0 %	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Aroma Cocktail	0 %	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Pozzano F1	33 %*/25 %*/**	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>tm-2/Tm-2a</i>

* Dunkle Flecken am Stängel, braune Blattränder bzw. Blattspitzen

** Haupttrieb verkümmert

Die Pflanzen des Kultivars Pozzano F1 zeigten untypischerweise erst nach der zweiten Bonitur Krankheitssymptome. Bei acht Pflanzen (33 %) traten dunkle Flecken am Stängel und braune Blattränder bzw. Blattspitzen auf. Zusätzlich zu den genannten Symptomen verkümmerten bei sechs Pflanzen (24 %) die Haupttriebe (siehe Tabelle 11 und Tabelle 17 im Anhang A 36). Obwohl durch das untypische spätere Auftreten dieser Symptome eine andere Ursache als ToMV für die Erkrankung vermutet wurde, konnte eine ToMV-Infektion und damit das Segregieren des Kultivars hinsichtlich der Genotypen nicht ausgeschlossen werden. Es wurden daher alle 24 Pflanzen genotypisiert. Die Ergebnisse in Tabelle 17 (siehe Anhang A 36) zeigen allerdings, dass alle Pflanzen des Kultivars Pozzano F1 genetisch uniform sind und das Resistenz-Allel *Tm-2a* heterozygot tragen (*tm-2/Tm-2a*). Bei den Erkrankungen muss es sich daher um eine Sekundärinfektion anderer Erreger handeln. Auch die Tatsache, dass Symptome erst bei der zweiten Bonitur festzustellen waren (bei allen ToMV-Infektionen bereits bei der ersten Bonitur), weist darauf hin.

Bei den Goldita-Kultivaren handelt es sich um Kultivare derselben Abstammung - beide entstammen einer Zuchtlinie in F5. Goldita EP1 und EP2 sind unterschiedliche Einzelpflanzen der Folgegeneration (Lammer, persönliche Kommunikation, 08.04.2016). Da vom Kultivar Goldita EP1 aber nur 25 % der Pflanzen und vom Kultivar Goldita EP2 100 % der Pflanzen eindeutige Virus-Symptome zeigten, wurden von dem Kultivar Goldita EP1 aufgrund der naheliegenden genotypischen Segregation alle 24 Pflanzen genetisch untersucht (siehe Tabelle 12) und von dem Kultivar Goldita EP2 neun Pflanzen untersucht (Uniformität wurde für diesen Kultivar zwar vermutet, aber um eine mögliche Aufspaltung eher zu entdecken, wurden mehr als vier Pflanzen ausgewählt).

Im Fall des Kultivars Goldita EP1 galt es herauszufinden, ob die zugrundeliegende Aufspaltung der phänotypischen Merkmale im Verhältnis von 1:3 (25 % befallene Pflanzen und 75 % gesunde Pflanzen) mit der Aufspaltung der Genotypen einhergeht. Laut der mendelschen Spaltungsregel (Graw, 2015) müssten (ausgehend von heterozygoten Elternpflanzen) 25 % der Pflanzen den Genotyp *Tm-2a/Tm-2a*, 50 % den Genotyp *tm-2/Tm-2a* und 25 % den Genotyp *tm-2/tm-2* tragen - das zu erwartende Verhältnis der Genotypen-Verteilung ist demnach 1:2:1. Tatsächlich stehen die Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung in einem Verhältnis von 1:4:1 (siehe Tabelle 12). Von den insgesamt 24 Pflanzen stimmt der zugrundeliegende Phänotyp (erkrankt/nicht erkrankt) mit dem bestimmten Genotyp in 21 Fällen überein (87,5 %). Für die Pflanzen der drei anderen Fälle (siehe Tabelle 12; Pflanzen 5, 6 und 7) wurde die Analyse im Labor von

Beginn an neu durchgeführt (ausgehend von den tiefgekühlten Pflanzenproben). Das Ergebnis der wiederholten Analysen war ident (siehe Abb. 77).

Die Eltern des Kultivars Goldita EP1 waren höchstwahrscheinlich *Tm-2a*-heterozygot. Die Abweichung der idealen Genotypen-Verteilung nach der Spaltungsregel ist unter anderem von der Größe der Stichprobe abhängig. Bei der relativ kleinen Stichprobe (nur 24 Einzelpflanzen), kann das tatsächliche Verhältnis vom erwarteten Verhältnis abweichen (Graw, 2015). Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests lässt sich statistisch überprüfen, ob die vorliegende Stichprobe trotz der beobachteten Abweichungen die erwartete Verteilung aufweisen kann (Griffiths et al., 2000). Die aufgestellte Nullhypothese zu dem in Tabelle 19 (siehe Anhang A 38) durchgeführten Chi-Quadrat-Test geht davon aus, dass die beobachtete Abweichung der Verteilung der Genotypen in der Stichprobe (1:4:1) tatsächlich der erwarteten Verteilung (1:2:1) in der Grundmenge entspricht. Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests weist darauf hin, dass die beschriebene Abweichung beider Verteilungen in mehr als 5 % aller Fälle zu erwarten ist: $\chi^2(2, N=24)=2,67, p \geq 0,05$. Die Nullhypothese ist daher nicht zu verwerfen.

Tabelle 12 - Ergebnisse des Inokulations-Versuchs des segregierenden Kultivars Goldita EP1. Die ermittelten Genotypen (siehe Schattierung) sind den Ergebnissen der Bonituren gegenübergestellt. Die Verteilung der Genotypen der Stichprobe sind dem unteren Teil der Tabelle zu entnehmen.

Goldita EP 1		Symptome	
Pflanze	Bestimmter Genotyp	Bonitur 1, 05.04.2017	Bonitur 2, 09.05.2017
1	<i>tm-2/tm-2</i>	Ja	Ja
2	<i>tm-2/tm-2a</i>	Nein*	Nein*
3	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
4	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
5 ^x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Ja	Ja
6 ^x	<i>tm-2/tm-2</i>	Nein	Nein
7 ^x	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Ja	Ja
8	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
9	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
10	<i>tm-2/tm-2</i>	Ja	Ja
11	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein*	Nein**
12	<i>tm-2/tm-2</i>	Ja	Ja
13	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Nein	Nein
14	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
15	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Nein	Nein
16	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
17	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
18	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
19	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
20	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
21	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein*	Nein**
22	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
23	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
24	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Nein	Nein
* Schwaches Erscheinungsbild			
** Schwaches Erscheinungsbild und Flecken			
^x Für die Pflanzen 5, 6 und 7 wurden andere Genotypen bestimmt, als aufgrund der gezeigten Symptome zu erwarten war.			
Verteilung der Genotypen		Absolut	Relativ
<i>tm-2/tm-2</i>		4	16,67 %
<i>tm-2/Tm-2a</i>		16	66,67 %
<i>Tm-2a/Tm-2a</i>		4	16,67 %

Für die Abweichungen zwischen den phänotypischen und den genotypischen Ergebnissen der Pflanzen 5, 6 und 7 kann nur das Vertauschen des Blattmaterials bei der Blatternte, sowie das Auftreten einer Sekundärinfektion in Kombination verantwortlich sein. Es gibt zwei mögliche Konstellationen, von denen wahrscheinlich eine eingetreten ist: Einerseits könnte Pflanze 5 an einer Sekundärinfektion erkrankt sein während Pflanzenmaterial von Pflanze 6 und 7 vertauscht wurde. Andererseits könnte Pflanze 7 an einer Sekundärinfektion erkrankt sein während Pflanzenmaterial von Pflanze 5 und 6 vertauscht wurde. Das Vertauschen von Pflanzenmaterial bei der Ernte ist nicht immer

vermeidbar, insbesondere bei einer großen Anzahl von Pflanzenproben bzw. bei der Beteiligung mehrerer Personen an der Probenahme. Das Auftreten einer zusätzlichen unspezifischen Infektion ist sehr wahrscheinlich und konnte unter anderem auch bei Pflanzen des Genotyps Pozzano F1 beobachtet werden (siehe Abb. 24).

3.3.1 Fazit des Inokulations-Versuchs

Der Inokulations-Versuch, welcher im Auftrag des Vereins Arche Noah auf den Versuchsfeldern der AGES Wien in Zusammenarbeit durchgeführt und von dieser betreut wurde, verlief erfolgreich. Nachdem die Versuchspflanzen aller Kultivare inokuliert und fortfolgend bonitiert wurden, konnten die Ergebnisse des Inokulations-Versuchs jenen der Sorten-Genotypisierung gegenübergestellt werden (siehe Tabelle 11). Besonderes Interesse weckten die Ergebnisse des Kultivars Goldita EP1, da die Symptome dieser Versuchspflanzen phänotypisch durch die eindeutige Segregation der Merkmale auf eine Segregation der Genotypen hinwiesen. Der Vergleich der phänotypischen und der genotypischen Ergebnisse konnte dies – trotz einiger Interpretationsschwierigkeiten – bestätigen (siehe Tabelle 12).

Der Versuch zeigte, dass bereits ein heterozygoten Vorhandensein des *Tm-2a*-Allels Resistenz gegenüber ToMV verleiht. Das bedeutet, dass nur der Genotyp *tm-2/tm-2* sensitiv ist und die Genotypen *Tm-2a/Tm-2a* und *tm-2/Tm-2a* resistenzvermittelnd agieren.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Zuge der in dieser Arbeit durchgeführten Methoden-Etablierung, konnten die CAPS-Analyse und die Tetra-Primer-ARMS-PCR, zwei Marker-Analysemethoden, zum Nachweis von Allelen des ToMV-Resistenz-Locus *Tm-2* etabliert werden. Mithilfe dieser Methoden konnte der Genotyp aller Einzelpflanzen der zwölf verschiedenen zu untersuchenden Kultivare bestimmt werden. Der parallel dazu durchgeführte Inokulations-Versuch konnte zeigen, dass die bestimmten Genotypen mit den im Inokulations-Versuch beobachteten Phänotypen korrelieren. Es wurde indes nachgewiesen, dass bereits das heterozygote Vorhandensein des *Tm-2a*-Allels Resistenz gegenüber ToMV verleiht.

Die etablierten Methoden und alle gewonnenen Erkenntnisse können Anwendung in weiterführenden Untersuchungen finden bzw. können direkt zur markergestützten Selektion (MAS) von Tomatenpflanzen bezüglich der ToMV-Resistenz über das *Tm-2a*-Allel eingesetzt werden. Am Thema anknüpfende Kooperations-Projekte zwischen dem Verein Arche Noah und der Karl-Franzens-Universität Graz sind denkbar, insbesondere in Form von Bachelorarbeiten oder Projektlaborarbeiten. Die Anwendung der aufbereiteten Methoden für züchterische Anwendungen (z. B. „SMART Breeding“) von Mitarbeiter*innen des Vereins Arche Noah und diverser Partner in partizipativen Pflanzenzüchtungsprojekte ist geplant.

Literaturverzeichnis

- Arche Noah. (k. A.). Das Bauernparadeiser-Projekt: Arbeitsgruppe Bauernparadeiser Bäuerliche Saatgutzuchtung. Gemeinsame Sortenverbesserung. Online verfügbar unter <https://www.arche-noah.at/sortenerhaltung/sorten-entwickeln/das-bauernparadeiser-projekt>
- Arens, P., Cavellini, L., Rolland, S., Moretti, A., van der Schoot, H., & Mansilla, C. (2007a). Final report: Development and evaluation of molecular markers linked to disease resistance genes for tomato DUS testing (option 1a). Wageningen, Niederlande. Online verfügbar unter http://cpvo.europa.eu/sites/default/files/documents/techreports/Final_report_CPVO_tomato_project.pdf
- Arens, P., Cavellini, L., Rolland, S., Moretti, A., van der Schoot, H., & Mansilla, C. (2007). Apendices final report CPVO tomato project, Version 2: Development and evaluation of molecular markers linked to disease resistance genes for tomato DUS testing. Wageningen, Niederlande. Online verfügbar unter http://cpvo.europa.eu/sites/default/files/documents/techreports/Apendices_final_report_CPVO_tomato_project.pdf
- Arens, P., Mansilla, C., Deinum, D., Cavellini, L., Moretti, A., Rolland, S., . . . Vosman, B. (2009). Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(3), 655–664. doi:10.1007/s00122-009-1183-2
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*. (32), 170–189. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.003
- Blancard, D. (2012). *Tomato Diseases: Identification, Biology and Control* (2nd ed.). London: Academic Press (Elsevier).
- Borém, A., & Fritsche-Neto, R. (Eds.). (2014). *Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. London: Academic Press (Elsevier).
- Borgen, S. O., & Aarset, B. (2016). Participatory Innovation: Lessons from breeding cooperatives. *Agricultural Systems*. (145), 99–105. doi:10.1016/j.agsy.2016.03.002
- Brandstetter, T. (2016). Wirksamkeit ausgewählter Behandlungsmethoden zur Dezimierung des Tomatenmosaikvirus an Saatgut von *Solanum lycopersicum* (Masterarbeit). Universität für Bodenkultur, Wien.
- BGBl. Nr. 510/1994. sterreichisches Bundesgesetz, mit dem Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, das Freisetzen und Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Organismen und die Anwendung von Genanalysen und Gentherapie am Menschen geregelt werden (Gentechnikgesetz – GTG) und das Produkthaftungsgesetz geändert wird., sterreichische Bundesbehore 1994.

- Caixeta, E. T., Ferrão, L. F. V., Maciel-Zambolim, E., & Zambolim, L. (2014). Molecular Markers: Chapter 2. In A. Borém & R. Fritsche-Neto (Eds.), *Biotechnology and Plant Breeding. Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars* (S. 19–45). London: Academic Press (Elsevier).
- Cerkauskas, R. (2004). Fact Sheet: Tomato Diseases - Tomato Mosaic Virus on Tomato. AVRDC Publication. (04), 609. Online verfügbar unter http://203.64.245.61/web_crops/tomato/ToMV.pdf
- Chhapekar, S. S., Gaur, R., Kumar, A., & Ramchiary, N. (2016). Reaping the Benefits of Next-generation Sequencing Technologies for Crop Improvement - Solanaceae. In J. K. Kulski (Ed.), *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. doi:10.5772/61656
- Fischer, D., Geistlinger, J., & Schulz, H. (2008). SNP und CAPS Marker: Entwicklung mit LabChip 90-Mikrofluidik und Anwendung der HTS-Genotypisierung mit Array-On MIA Chips. *BIOforum*. (1), 2–3.
- Flor, H. H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*. (32), 653–669.
- Foolad, M. R., & Panthee, D. R. (2012). Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding. (31), 93–123. doi:10.1080/07352689.2011.616057
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Carbonell, P., & Ruiz, J. J. (2015). UMH 916, UMH 972, UMH 1093, UMH 1127, and UMH 1139: Four Fresh-market Breeding Lines Resistant to Viruses Within the Muchamiel Tomato Type. (50), 927–929.
- García-Martínez, S., Grau, A., Alonso, A., Rubio, F., Valero, M., & Ruiz, J. J. (2011). UMH 1200, a Breeding Line within the Muchamiel Tomato Type Resistant to Three Viruses. (46), 1054–1055.
- Gerhardts, A. (2008). Analyse von Pathogenresistenzmechanismen in Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Dissertation). Universität Hohenheim, Stuttgart.
- Graw, J. (2015). *Genetik* (6th ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R., & Gelbart, W. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis* (7th ed.). New York: W. H. Freeman. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21907/>
- Hanke, M.-V., & Flachowsky, H. (2017). *Obstzüchtung und wissenschaftliche Grundlagen*. Heidelberg: Springer Spektrum.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*. (23), 539–548. doi:10.1094/MPMI-23-5-0539
- He, M., He, C.-Q., & Ding, N.-Z. (2012). Natural recombination between tobacco and tomato mosaic viruses. *Virus Research*. (163), 374–379. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.006

- Hollings, M., & Huttinga, H. (1976). Descriptions of plant viruses: Tomato mosaic virus. Online verfügbar unter <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=156>
- Hu, Z., Liu, G., Gao, J., Zhang, C., Wu, X., Xie, Q., & Chen, G. (2015). Tomato Tm-2 2 gene confers multiple resistances to TMV, ToMV, PVX, and PVY to cultivated potato. *Russian Journal of Plant Physiology*. (62), 101–108. doi:10.1134/S1021443715010070
- Hudcovicová, M., Korbelová, E., Šliková, S., Klčová, L., Mihálik, D., & Kraic, J. (2015). Molecular selection of tomato and pepper breeding lines possessing resistance alleles against tobamoviruses. *Agriculture (Polnohospodárstvo)*. (61), 33–37. doi:10.1515/agri-2015-0008
- Hull, R. (2009). *Comparative Plant Virology: Fundamentals of Plant Virology* (2nd ed.). Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10378793>
- Johnson, A., Grabowski, M., & Orshinsky, A. (2015). Tomato mosaic virus and tobacco mosaic virus. Online verfügbar unter <http://www.extension.umn.edu/garden/fruit-vegetable/plant-diseases/tomato-mosaic-virus-tobacco-mosaic-virus/index.html>
- Knoepffler, N., Odparlik, S., Achatz, J., & O'Malley, M. (2013). *Grüne Gentechnik und Synthetische Biologie - keine Sonderfälle*. Freiburg / München: Karl Alber Verlag.
- Kohlmann, M. (2016). *Die Tomate (Solanum lycopersicum). Ihre Inhaltsstoffe und der Einfluss auf die menschliche Gesundheit* (Diplomarbeit). Karl-Franzens-Universität Graz. Online verfügbar unter <http://unipub.uni-graz.at/obvuhrhs/download/pdf/1367339?originalFilename=true>
- Krezhova, D., Hristova, D., Iliev, I., & Yanev, T. (2010). Remote sensing and serological analysis of the resistance of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L.) to tomato mosaic virus (ToMV). 38th COSPAR Scientific Assembly. Held 18-15 July 2010, in Bremen, Deutschland, S. 5. Online verfügbar unter <http://adsabs.harvard.edu/abs/2010cosp...38.378K>
- Küng, V. (2002). Molekulare Marker in gentechnisch veränderten Organismen. *Schriftenreihe Umwelt*. (337), 62–69.
- Laimer, M., & Maghuly, F. (2016). Molekulare Pflanzenzüchtung: Gezielte Veränderung einzelner Merkmale. *Journal für Ernährungsmedizin*. (18), 18–21. Online verfügbar unter <http://www.kup.at/kup/pdf/13568.pdf>
- Lammer, P. (2014). Resistenz ausgewählter Tomaten-Liniensorten gegenüber der Samtfleckenkrankheit (*Passalora fulva*, syn. *Cladosporium fulvum*) unter biologischen Anbaubedingungen (Masterarbeit). Universität für Bodenkultur, Wien.
- Lanfermeijer, F. C., Warmink, J., & Hille, J. (2005). The products of the broken Tm-2 and the durable Tm-2(2) resistance genes from tomato differ in four amino acids. *Journal of Experimental Botany*. (421), 2925–2933. doi:10.1093/jxb/eri288

- Lee, J. M., Oh, C.-S., & Yeam, I. (2015). Molecular Markers for Selecting Diverse Disease Resistances in Tomato Breeding Programs. *Plant Breeding and Biotechnology*. (4), 308–322. doi:10.9787/PBB.2015.3.4.308
- Liu, X., Wang, L., Zhang, H., Li, Y., & Yang, W. (2017). Genetic and fruit trait differences between Chinese elite lines/varieties and American varieties of processing tomato. *Scientia Horticulturae*. (224), 251–257. doi:10.1016/j.scienta.2017.06.023
- Loebenstein, G., & Carr, J. P. (Eds.). (2006). *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses: Resistance to Tobacco Mosaic Virus and Tomato Mosaic Virus in Tomato*. Dordrecht, Niederlande: Springer.
- Malysheva-Otto, L. V., Gerstenberg, F., & Otto, L. G. (2009). Vereinfachung der markergestützten Selektion in der Pflanzenzüchtung durch die Datenbanken des Unternehmens IT-Breeding GmbH. In A. Brandstetter & M. Geppner (Eds.), *Tagungsband der 60. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. Züchtung und Genressourcen gegen abiotische und biotische Stressfaktoren. Markergestützte Selektion in der Praxis* (S. 105–107). Irdning: HBLFA Raumberg-Gumpenstein.
- Medrano, R. F. V., & de Oliveira, C. A. (2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Molecular Biotechnology*. (56), 599–608. doi:10.1007/s12033-014-9734-4
- Miedaner, T. (2014). *Kulturpflanzen: Botanik - Geschichte - Perspektiven*. Berlin / Heidelberg: Springer Spektrum.
- Müller, H.-J., & Prange, D. R. (2016). *PCR - Polymerase-Kettenreaktion* (2nd ed.). Berlin / Heidelberg: Springer Spektrum.
- Müntz, K., & Wobus, U. (2013). *Das Institut Gatersleben und seine Geschichte: Genetik und Kulturpflanzenforschung in drei politischen Systemen*. Berlin: Springer Spektrum.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. (19), 4321–4325.
- Ohyama, A., & Hayashi, T. (2016). DNA markers, experimental populations and Qualitative Trait Locus (QTL) mapping in tomatoes. In T. Higashide (Ed.), *Solanum lycopersicum. Production, Biochemistry and Health Benefits* (S. 49–78). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Panthee, D. R., Brown, A. F., Yousef, G. G., Ibrahim, R., Anderson, C., & Havey, M. (2013). Novel molecular marker associated with Tm2a gene conferring resistance to tomato mosaic virus in tomato. *Plant Breeding*. (132), 413–416. doi:10.1111/pbr.12076
- Pathania, A., Rialch, N., & Sharma, P. N. (2017). Marker-Assisted Selection in Disease Resistance Breeding. In A. Pandey, C. Larroche, & C. Socol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (S. 187–213). Amsterdam / Oxford (GB) / Cambridge (US): Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-63661-4.00009-8

- QIAGEN. (2015). DNeasy® Plant Handbook: DNeasy Plant Mini Kit & DNeasy Plant Maxi Kit. For purification of total cellular DNA from plant cells. Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/at/resources/download.aspx?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en>
- Rabie, M., Ratti, C., Calassanzio, M., Aleem, E. A., & Fattouh, F. A. (2017). Phylogeny of Egyptian isolates of Cucumber mosaic virus (CMV) and Tomato mosaic virus (ToMV) infecting *Solanum lycopersicum*. *European Journal of Plant Pathology*. (149), 219–225. doi:10.1007/s10658-017-1164-2
- Rat, M., Jovanović, Ž., Stanisavljević, N., Radak, B., & Bokić, B. (2014). A simple and efficient DNA isolation method for *Ornithogalum* L. species (Hyacinthaceae, Asparagales). *Botanica Serbica*. (38), 185–189.
- Ribarits, A. (2014). Neue Techniken für die Pflanzenzüchtung und die Folgen ihrer Anwendung in der Praxis. In A. Brandstetter & M. Geppner (Eds.), Tagungsband der 65. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 25.-26. November 2014, Raumberg-Gumpenstein. Zukünftiges Saatgut - Produktion, Vermarktung, Nutzung und Konservierung (S. 71–75). Irdning: HBLFA Raumberg-Gumpenstein.
- Sahu, K. K., & Chattopadhyay, D. (2017). Genome-wide sequence variations between wild and cultivated tomato species revisited by whole genome sequence mapping. *BMC Genomics*. (18), 430–440. doi:10.1186/s12864-017-3822-3
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*. (3), 506–516. doi:10.3945/an.112.002154
- Spagnuolo, F. A., Gonçalves, L. S. A., Freitas, F. M., Ventura, M. U., La Miguel, A., Souza, N. V., & Hata, F. T. (2016). Melhoramento participativo do tomateiro sob manejo orgânico (Participatory breeding of tomato under organic management). *Horticultura Brasileira*. (34), 183–188. doi:10.1590/S0102-053620160000200006
- Spelsberg, G., & Fuhrmann, S. (2017). Tomate: Gentechnik-Datenbank: Pflanzen. Online verfügbar unter <http://www.transgen.de/datenbank/pflanzen/1987.tomate.html>
- Tanwir, F. (2011). Analysis of the structure of Tomato mosaic virus movement protein based on virus host interactions (Dissertation). Universität Hohenheim, Stuttgart. Online verfügbar unter https://opus.uni-hohenheim.de/volltexte/2012/689/pdf/PhD_thesis_Fariha_Tanwir.pdf
- Thermo Scientific. (2016a). Product Information: GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Pub. No. MAN0012995. Waltham, MA, USA. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0241?SID=srch-srp-SM0241>
- Thermo Scientific. (2016b). Product Information: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. Pub. No. MAN0013008. Waltham, MA, USA. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0321?SID=srch-srp-SM0321>

- Thermo Scientific. (2016c). Product Information: Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3. Pub. No. MAN0012989. Waltham, MA, USA. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0191?SID=srch-srp-SM0191>
- Ullah, N., Ali, A., Ahmad, M., Faham, M., Din., N., & Ahmad, F. (2017). Evaluation of tomato genotypes against Tomato mosaic virus (ToMV) and its effect on Yield contributing parameters. *Pakistan Journal of Botany*. (49), 1585–1592.
- Yang, Z., Liu, L., Fang, H., Li, P., Xu, S., Cao, W.,. . . Zhou, Y. (2016). Origin of the plant Tm-1-like gene via two independent horizontal transfer events and one gene fusion event. *Scientific Reports*. (6). doi:10.1038/srep33691
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R., & Day, I. N. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acid Research*. (29). Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55900/>
- Zitter, T. (2012). Tobacco Mosaic Virus (TMV) Control: Prepared for TMV (ToMV) Outbreak Meeting. Online verfügbar unter https://cuaes.cals.cornell.edu/sites/cuaes.cals.cornell.edu/files/shared/documents/TMV_ToMV_CALS_TomZitter.pdf

Anhang - Rohdaten

Dieser Abschnitt beinhaltet alle erhobenen Rohdaten, welche in Form von Gelbildern dargestellt sind. Die Ergebnisse sind entsprechend ihrer Methode gegliedert. Die Diskussion der relevanten Ergebnisse erfolgt in Abschnitt 3 (S. 37 ff.). Sollte die Diskussion nur anhand einer zugrundeliegenden Abbildung möglich sein, werden die entsprechenden Inhalte auch in diesem Abschnitt diskutiert.

A 1 Methoden-Etablierung

A 1.1 Extraktions-Kontrollgele: Extraktionserfolg der Extraktion von gDNA

Bei den Extrakten handelt es sich um isolierte gDNA, welche aufgrund ihrer Länge nicht weit am Gel laufen kann und zu Banden, wie sie in Abb. 18 abgebildet und grau eingefasst sind, führen können. Starke Banden am Gel auf der Höhe der Lauffront, welche bei Anwendung des DNeasy® Plant Mini Kit nicht auftreten sollten (QIAGEN, 2015, S. 46), beinhalten vermutlich von der RNase A degradierte RNA (vgl. z. B. Abb. 25 und Abb. 26).

A 1.1.1 CTAB-Methode

Diese Extraktionsmethode für pflanzliche gDNA wird routinemäßig am Institut für Pflanzenwissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz angewandt und wurde für Pflanzenmaterial von *Arabidopsis thaliana* optimiert. Das Protokoll dieser Methode ist dem Abschnitt 2.8.1 zu entnehmen.

In Abb. 18 bis Abb. 23 wurde die gDNA von Einzelpflanzen mittels CTAB-Extraktion isoliert. Die Extraktionen waren erfolgreich. Fehlgeschlagene Extraktionen wurden wiederholt, sodass letztendlich gDNA jeder Pflanzenprobe isoliert wurde.

Trotz erfolgreicher gDNA-Extraktionen konnte kein Erfolg bei den fortführenden PCR-Reaktionen erzielt werden.



Abb. 18 - gDNA-Extraktion (CTAB). 1: λ -Marker; 2: Moneymaker Pfl. 1(1); 3: Moneymaker Pfl. 1(2). Grau eingefasst: gDNA-Banden der Extrakte. Auf der Höhe der Lauffront erkennbare Banden bestehen vermutlich aus degradierter RNA.

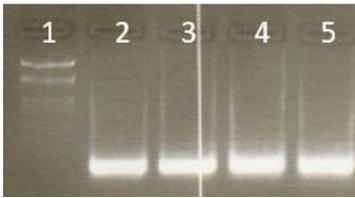


Abb. 19 - gDNA-Extraktion (CTAB). 1: λ -Marker; 2: MoneyMaker Pfl. 1(1); 3: MoneyMaker Pfl. 1(2); 4: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(1); 5: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(2).

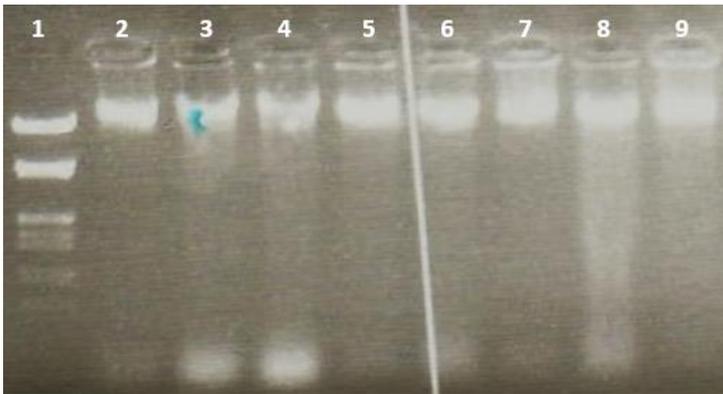


Abb. 20 - gDNA-Extraktion (CTAB). 1: λ -Marker; 2: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(3); 3: MoneyMaker Pfl. 1(3); 4: MoneyMaker Pfl. 2(3); 5-9: Tica [2: Pfl. 1(1); 3: Pfl. 2(1); 4: Pfl. 3(1); 5: Pfl. 4(1); 6: Pfl. 5(1)].

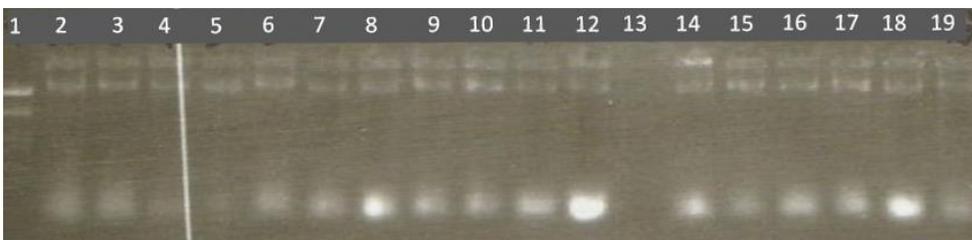


Abb. 21 - gDNA-Extraktion (CTAB). 1: λ -Marker; 2-14: Tica [2: Pfl. 1(2); 3: Pfl. 2(2); 4: Pfl. 3(2); 5: Pfl. 4(2); 6: Pfl. 5(1); 7: Pfl. 6(1); 8: Pfl. 6(2); 9: Pfl. 7(1); 10: Pfl. 7(2); 11: Pfl. 8(1); 12: Pfl. 8(2); 13: Pfl. 9(1); 14: Pfl. 9(2)]; 15-19: Guyana RZ F1 [15: Pfl. 1(2); 16: Pfl. 2(2); 17: Pfl. 3(2); 18: Pfl. 4(2); 19: Pfl. 5(2)].

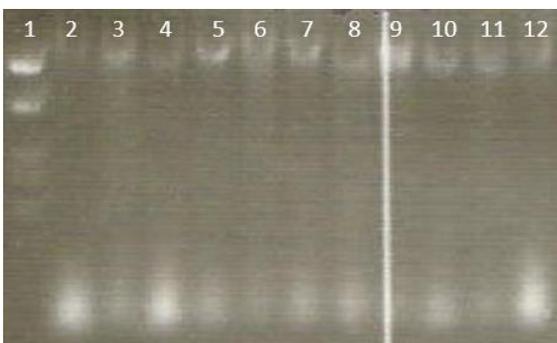


Abb. 22 - gDNA-Extraktion (CTAB). 1: λ -Marker; 2: Guyana RZ F1 [2: Pfl. 1(1); 3: Pfl. 2(1); 4: Pfl. 3(1); 5: Pfl. 4(1); 6: Pfl. 5(1); 7: Pfl. 6(1); 8: Pfl. 7(1); 9: Pfl. 8(1); 10: Pfl. 9(1); 11: Pfl. 10(1)]; 12: Tica Pfl. 10(2).

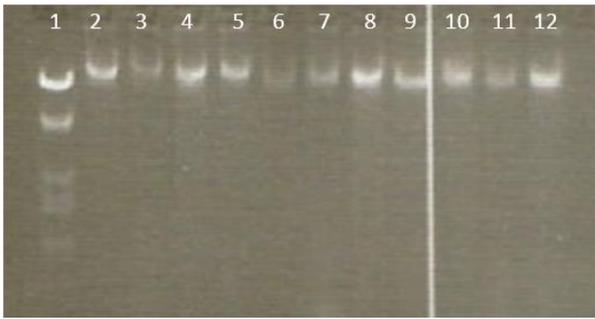


Abb. 23 - gDNA-Extraktion (CTAB). 1: λ -Marker; 2-3: Guyana RZ F1 [2: Pfl. 1(2)a; 3: Pfl. 2(2)a]; 4-5: Muchamiel UMH 1200 [4: Pfl. 1(1)a; 5: Pfl. 1(2)a]; 6: Virus-Mutterpflanze 1(1); 7: Tica Pfl. 9(1); 8-12: Guyana RZ F1 [8: Pfl. 6(2); 9: Pfl. 7(2); 10: Pfl. 8(2); 11: Pfl. 9(2); 12: Pfl. 10(2)].

A 1.1.2 DNeasy® Plant Mini Kit

Am Gelbild in Abb. 24 wurde gDNA mittels DNeasy® Plant Mini Kit (siehe Abschnitt 2.8.3) aus Parallelproben des Kultivars Moneymaker und aus einer Einzelprobe des Kultivars Muchamiel UMH 1200, extrahiert. Es lässt sich erkennen, dass gDNA erfolgreich extrahiert wurde. Die darauffolgende CAPS-PCR ist fehlgeschlagen (siehe Abb. 26). Mit dem DNeasy® Plant Mini Kit wurde deshalb vorerst nicht weitergearbeitet. Fortfolgend wurde mit der Extraktion nach Murray & Thompson (1980) gearbeitet (siehe Abschnitt 2.8.2) und erst später wieder auf die Kit-Extraktion zurückgegriffen (siehe Abb. 25).

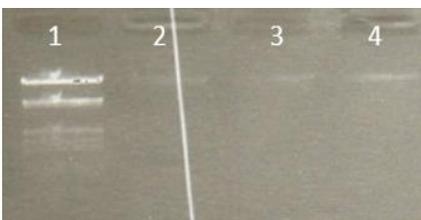


Abb. 24 - Extraktion (DNeasy® Plant Mini Kit). 1: λ -Marker; 2-3: Moneymaker [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2]; 4: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1.

Am Gel in Abb. 25 wurde gDNA von Einzelpflanzen aller Kultivare mittels DNeasy® Plant Mini Kit extrahiert. Die Extraktion war erfolgreich und die darauffolgende PCR brachte PCR-Produkte hervor (siehe Abb. 41).

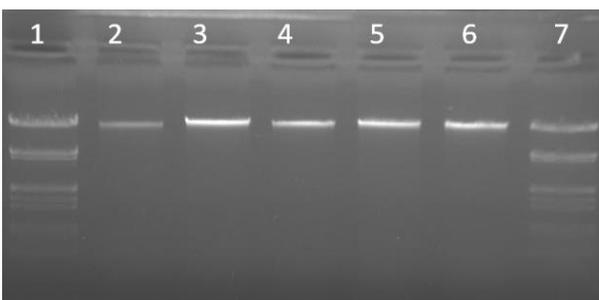


Abb. 25 - gDNA-Extraktion (DNeasy® Plant Mini Kit). 1: λ -Marker; 2: MP1 (Virus-Mutterpflanze 1) Pfl. 1; 3: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1; 4: Moneymaker Pfl. 1; 5: Tica Pfl. 1; 6: Guyana RZ F1 Pfl.1. MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

A 1.1.3 Extraktion nach Murray & Thompson (1980)

Extrakte der CTAB-Extraktion brachten in den PCR-Reaktionen häufig Amplifikate hervor. Mit dieser Methode wurde gearbeitet, bis sich herausstellte, dass die PCR-Reaktion für manche Proben auch nach mehrmaliger Extraktion keine Amplifikate hervorbringen konnte. Das Protokoll dieser Methode ist Abschnitt 2.8.2 zu entnehmen.

Die erste Extraktion nach Murray & Thompson (1980) aus Parallelproben des Kultivars Moneymaker und aus einer Einzelprobe des Kultivars Muchamiel UMH 1200, brachte kein bzw. nur sehr wenig Signal am Kontrollgel hervor (siehe Abb. 26). Die Extraktion wurde wiederholt.

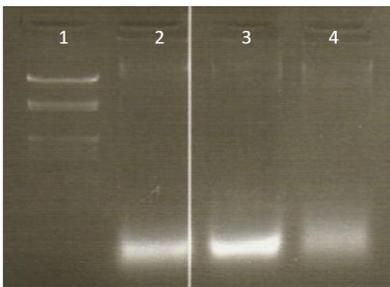


Abb. 26 - gDNA-Extraktion nach Murray & Thompson (1980). 1: λ -Marker; 2-3: Moneymaker [2: Pfl. 1; 3: Pfl 2]; 4: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1.

Die Wiederholung der Extraktion nach Murray & Thompson (1980) aus Parallelproben des Kultivars Moneymaker und aus einer Einzelprobe des Kultivars Muchamiel UMH 1200 (siehe Abb. 27) brachte Extrakte mit hohem DNA-Gehalt hervor. Es wurde eine CAPS-PCR durchgeführt (siehe Abb. 36). Die PCR und der darauffolgende Restriktionsverdau (siehe Abb. 43) waren erfolgreich.

Da sich herausstellte, dass alle zuvor gewonnenen Extrakte der CTAB-Methode für weitere Untersuchungen unbrauchbar waren, musste das gesamte Pflanzenmaterial (alle Einzelproben) mit der Methode nach Murray & Thompson (1980) wiederholt extrahiert werden (siehe Abb. 27 bis Abb. 33). Falls die darauffolgende PCR keine Amplifikate hervorbrachte, wurde erneut extrahiert, da die mögliche Fehlerursache in der Extraktion vermutet wurde. Bei gewissen Pflanzenproben führte auch die mehrmalige Wiederholung der Extraktion zu keinen erfolgreichen PCR-Reaktionen, weshalb manchen Pflanzenproben kein Untersuchungsergebnis zugeordnet werden konnte (siehe Tabelle 13 im Anhang A 13).

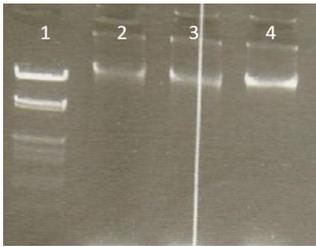


Abb. 27 - gDNA-Extraktion nach Murray & Thompson (1980). – Wdh. (vgl. Abb. 26). 1: λ -Marker; 2-3: Moneymaker [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2]; 4: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1.

In Slot 1 des Gels aus Abb. 28 wurde anstatt λ -Marker versehentlich 10 x DNA Loading Dye aufgetragen. Beim Vergleich dieses Gels mit Markerbanden anderer Gele, lässt sich erkennen, dass es sich bei den Banden am Gel um gDNA handelt.

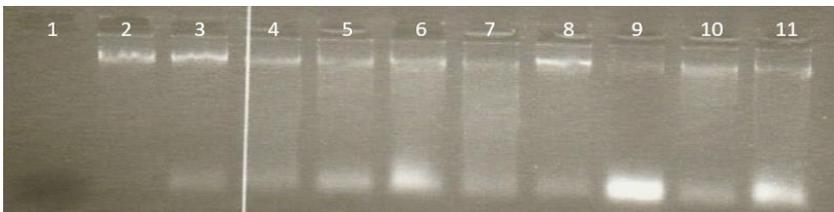


Abb. 28 - gDNA-Extraktion nach Murray & Thompson (1980). 1: λ -Marker; 2-11: Tica [2: Pfl. 1(3); 3: Pfl. 2(3); 4: Pfl. 3(3); 5: Pfl. 4(3); 6: Pfl. 5(3); 7: Pfl. 6(3); 8: Pfl. 7(3); (9); Pfl. 8(3); 10: Pfl. 9(3); 11: Pfl. 10(3)].

Für die Proben der Einzelpflanzen, deren PCR-Reaktion fehlschlug (siehe Abb. 37), wurde gDNA neu extrahiert. Die Extraktion war erneut erfolgreich (siehe Abb. 29).



Abb. 29 - gDNA-Extraktion nach Murray & Thompson (1980). 1: λ -Marker; 2-12: Guyana RZ F1 [2: Pfl. 1(3); 3: Pfl. 2(3); 4: Pfl. 3(3); 5: Pfl. 4(3); 6: Pfl. 5(3); 7: Pfl. 6(3); 8: Pfl. 7(3); (9); Pfl. 8(3); 10: Pfl. 9(3); 11: Pfl. 10(3)]; 12: Virus-Mutterpflanze 1(2).

Für die Proben der Einzelpflanzen, deren PCR-Reaktion erneut fehlschlug (siehe Abb. 38), wurde gDNA neu extrahiert. Die Extraktion war erfolgreich (siehe Abb. 30).

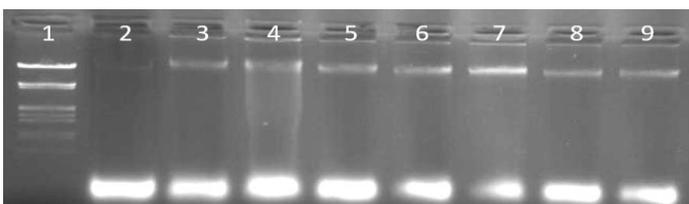


Abb. 30 - gDNA-Extraktion nach Murray & Thompson (1980). 1: λ -Marker; 2: Virus-Mutterpflanze 1(3); 3-4: Tica [3: Pfl. 8(4)a; 4: Pfl. 8(4)b]; 5-9: Guyana RZ F1 [5: Pfl. 1(4); 6: Pfl. 3(4); 7: Pfl. 8(4); 8: Pfl. 9(4); 9: Pfl. 10(4)].

Für die Proben der Einzelpflanzen, deren PCR-Reaktion zum dritten Mal fehlschlug (siehe Abb. 48 und Abb. 49), wurde gDNA neu extrahiert. Die Extraktion war erneut erfolgreich (siehe Abb. 31).

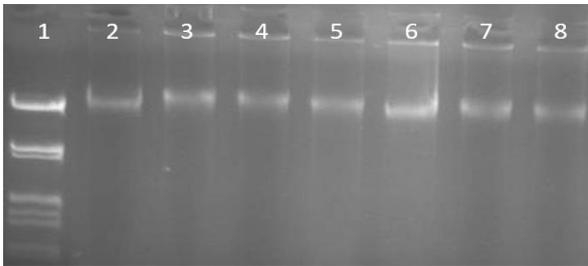


Abb. 31 - gDNA-Extraktion nach Murray & Thompson (1980). 1: λ -Marker; 2: Virus-Mutterpflanze 1(4); 3: Tica Pfl. 8(5); 4-8: Guyana RZ F1 [4: Pfl. 1(5); 5: Pfl. 3(5); 6: Pfl. 8(5); 7: Pfl. 9(5); 8: Pfl. 10(5)].

Für die Proben der Einzelpflanzen, deren PCR-Reaktion zum vierten Mal fehlschlug (siehe Abb. 39), wurde gDNA neu extrahiert. Die Extraktion war erneut erfolgreich (siehe Abb. 32).

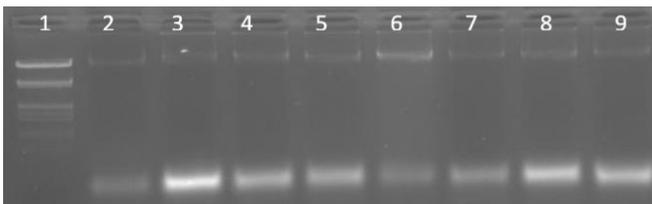


Abb. 32 - gDNA-Extraktion nach Murray & Thompson (1980). 1: λ -Marker; 2: Virus-Mutterpflanze 1(5); 3: Tica Pfl. 8(6); 4-8: Guyana RZ F1 [4: Pfl. 1(6); 5: Pfl. 3(6); 6: Pfl. 8(6); 7: Pfl. 9(6); 8: Pfl. 10(6)]; 9: Tica Pfl. 6(6) (Kontrolle).

Mit der Extraktion, deren Kontrollgel in Abb. 33 abgebildet ist, sollte genügend Template (Referenzmaterial) für weitere Analysen hergestellt werden. Um Ausfällen vorzubeugen wurden pro Probe mindestens zwei Extraktionen (Parallelproben) durchgeführt. Tatsächlich kam es zu vielen Ausfällen, aber es konnte zumindest ein gDNA-Extrakt pro Probe isoliert werden. Parallel zu dieser Extraktion wurden Proben mittels DNeasy® Plant Mini Kit extrahiert (siehe Abb. 25).

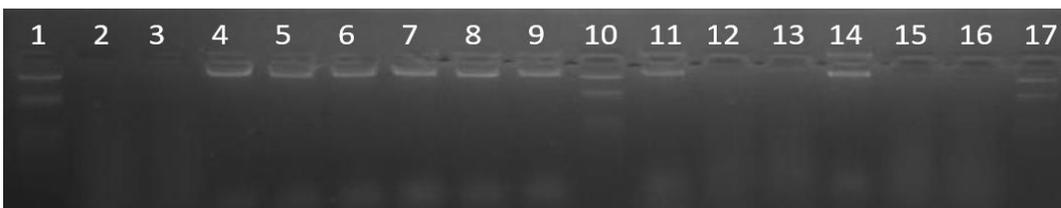


Abb. 33 - gDNA-Extraktion nach Murray & Thompson (1980). 1: λ -Marker; 2: Virus-Mutterpflanze 1(a); 3: Virus-Mutterpflanze 1(b); 4-6: Muchamiel UMH 1200 [4: Pfl. 1(a); 5: Pfl. 2(b); 6: Pfl. 3(c)]; 7-9: Moneymaker [7: Pfl. 1(a); 8: Pfl. 2(b); 9: Pfl. 3(c)]; 10: λ -Marker; 11-13: Tica [11: Pfl. 1(a); 12: Pfl. 2(b); 13: Pfl. 3(c)]; 14-16: Guyana RZ F1 [14: Pfl. 1(a); 15: Pfl. 2(b); 16: Pfl. 3(c)]; 17: λ -Marker. Um Verwechslungen durch die vielen Untersuchungen an denselben Proben vorzubeugen, wurden diese ab hier mit Buchstaben kodiert (anstatt wie zuvor mit Ziffern).

A 1.2 CAPS-Analyse

A 1.2.1 PCR-Kontrollgel - Überprüfung des Amplifikations-Erfolges

In der ersten PCR-Reaktion (siehe Abb. 34) wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von CTAB-Extrakten untersucht. Die PCR brachte keine Amplifikate hervor.

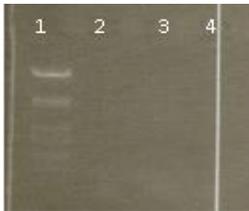


Abb. 34 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; 2: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(3); 3: Moneymaker Pfl. 1(3); 4: Negativkontrolle (H_2O)

In der PCR-Reaktion, deren Kontrollgel in Abb. 35 abgebildet ist, wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits und von CTAB-Extrakten untersucht. Auch hier brachte die PCR keine Amplifikate hervor.

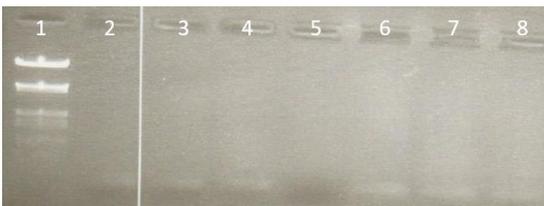


Abb. 35 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; 2-3: Moneymaker (Kit) [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2]; 4: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1 (Kit); 5-6: Moneymaker (CTAB) [5: Pfl. 1; 6: Pfl. 2]; 7: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1 (CTAB); 8: Negativkontrolle (H_2O).

In der PCR-Reaktion, deren Ergebnisse in Abb. 36 abgebildet sind, wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) untersucht. Einige PCR-Reaktionen brachten Amplifikate (1085 bp-Fragmente) hervor, welche am Gelbild zwischen den Markerbanden 947 bp und 1375 bp zu erkennen sind. Bei den untersten erkennbaren Banden am Gelbild, welche in jeder Spur zu erkennen sind, handelt es sich um unspezifische Banden, die sich in Folge auch in weitere Untersuchungen verschleppen (siehe z. B. Abb. 43).

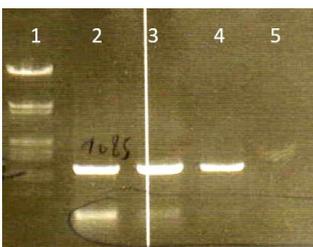
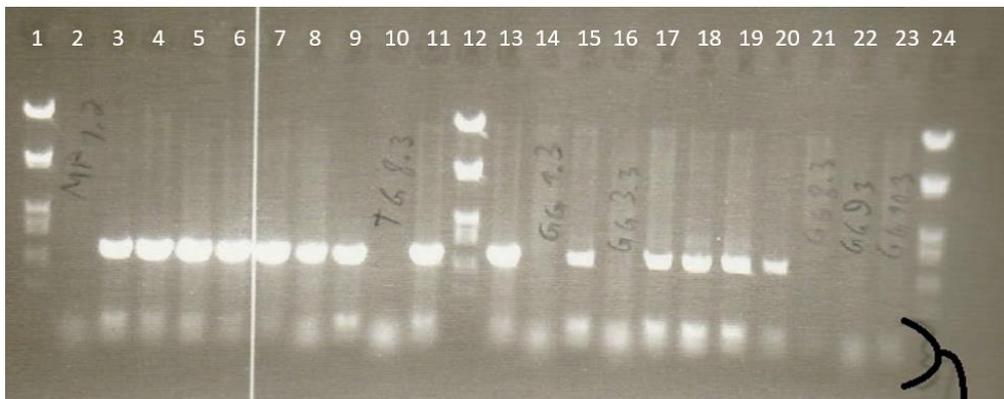


Abb. 36 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; 2-3: Moneymaker [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2]; 4: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1; 5: Negativkontrolle (H_2O).

In der PCR-Reaktion, deren Ergebnisse in Abb. 37 abgebildet sind, wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) untersucht. Es gab einige Ausfälle, die meisten PCR-Reaktionen brachten genügend PCR-Produkt hervor. Die unspezifischen Banden, die am Gel zu erkennen sind, setzen sich in der fortfolgenden Analyse fort (siehe z. B. Restriktionsgel in Abb. 44).



Unspezifische Banden setzen sich in den Gelen der weiteren Analyseschritte fort.

Abb. 37 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; 2: MP1 Pfl. 1(2); 3-11: Tica [3: Pfl. 1(3); 4: Pfl. 2(3); 5: Pfl. 3(3); 6: Pfl. 4(3); 7: Pfl. 5(3); 8: Pfl. 6(3); 9: Pfl. 7(3); 10: Pfl. 8(3); 11: Pfl. 9(3)]; 12: λ -Marker; 13: Tica Pfl. 10(3); 14-23: Guyana RZ F1 [14: Pfl. 1(3); 15: Pfl. 2(3); 16: Pfl. 3(3); 17: Pfl. 4(3); 18: Pfl. 5(3); 19: Pfl. 6(3); 20: Pfl. 7(3); (21); Pfl. 8(3); 22: Pfl. 9(3); 23: Pfl. 10(3)]; 24: λ -Marker. MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

Für alle Proben, bei denen die PCR in Abb. 37 fehlschlug, wurde die PCR-Reaktion wiederholt (siehe Abb. 38). Da diese erneut fehlschlagen, wurde das Pflanzenmaterial für die betreffenden Proben neu extrahiert. Am Gel sind nur unspezifische Banden erkennbar, welche bei allen Extraktionen nach Murray & Thompson (1980) beobachtet werden können.

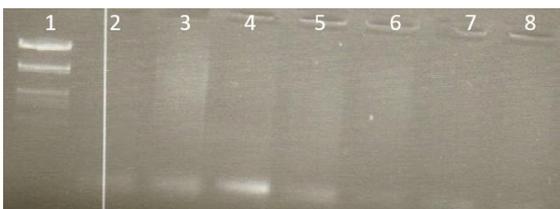


Abb. 38 - CAPS-Assay, PCR. Wiederholung (I) fehlgeschlagener Proben. 1: λ -Marker; 2: MP1 Pfl. 1(2); 3: Tica Pfl. 8(3); 4-8: Guyana RZ F1 [4: Pfl. 1(3); 5: Pfl. 3(3); 6: Pfl. 8(3); 7: Pfl. 9(3); 8: Pfl. 10(3)]. MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

In der PCR-Reaktion, deren Ergebnisse in Abb. 39 abgebildet sind, wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) untersucht. Die PCR brachte nur für bereits zuvor erfolgreich analysierte Proben Amplifikate hervor (vgl. Abb. 50, Abb. 51 und Abb. 37).

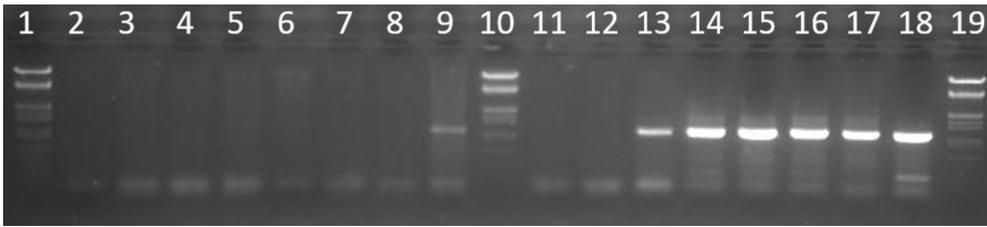


Abb. 39 - CAPS-Assay, PCR. Wiederholung (IV) fehlgeschlagener Proben. 1: 100 bp-Ladder; 2: MP1 Pfl. 1(4); 3: Tica Pfl. 8(5); 4-8: Guyana RZ F1 [4: Pfl. 1(5); 5: Pfl. 3(5); 6: Pfl. 8(5); 7: Pfl. 9(5); 8: Pfl. 10(5)]; 9: Tica Pfl. 6(3) (Kontrolle); 10: 100 bp-Ladder; 11: MP1 Pfl. 1(3); 12: Tica Pfl. 8(4); 13-18: Wiederholung bereits gelungener Guyana-Proben: (Kontrolle). 19: 100 bp-Ladder. MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

In der PCR-Reaktion, deren Ergebnisse in Abb. 40 abgebildet sind, wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) untersucht. Diese PCR ist gänzlich fehlgeschlagen (auch die Kontrollen). Die Fehlerquelle ist unbekannt und kann verschiedene Gründe haben (z. B. degradierte PCR-Komponenten, Fehler beim Erstellen des Mastermixes, etc.).

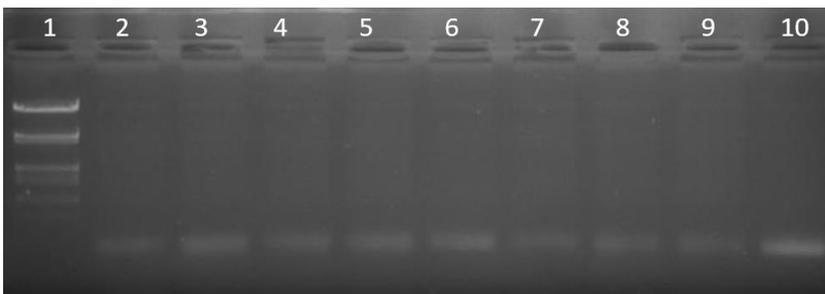


Abb. 40 - CAPS-Assay, PCR. Wiederholung (V) fehlgeschlagener Proben. 1: 100 bp-Ladder; 2: MP1 Pfl. 1(5); 3: Tica Pfl. 8(6); 4-8: Guyana RZ F1 [4: Pfl. 1(6); 5: Pfl. 3(6); 6: Pfl. 8(6); 7: Pfl. 9(6); (8): Pfl. 10(6)]; 9: Tica Pfl. 6(6); 10: Guyana RZ F1 Pfl. 2(3); (Die letzten beiden dienen der Kontrolle). MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

In der PCR-Reaktion, deren Ergebnisse in Abb. 40 abgebildet sind, wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits untersucht. Die PCR-Reaktion brachte PCR-Produkte hervor - erstmals auch für die Probe der Virus-Mutterpflanze. Es ist davon auszugehen, dass störende Sekundärstoffe im Zuge der Extraktion mittels DNeasy® Plant Mini Kit abgeschieden werden (QIAGEN, 2015, S. 10). Beim Auftragen der Proben auf das Gel in Abb. 41 waren die Geltaschen nicht vollkommen ausgehärtet, weshalb es zu Probenverlust beim Auftragen in die Slots gekommen ist.

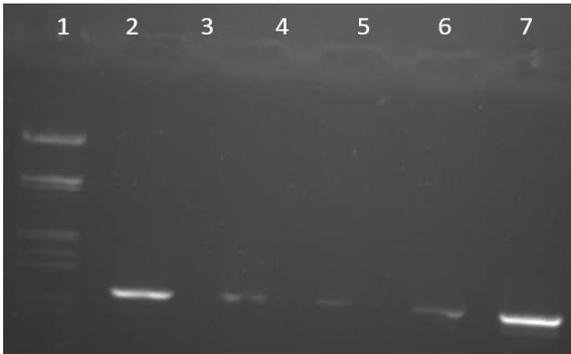


Abb. 41 - CAPS-Assay, PCR (Extrakte des DNeasy® Plant Mini Kits). 1: 100 bp-Ladder; 2: MP1 Pfl. 1(a); 3: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a); 4: Moneymaker Pfl. 1(a); 5: Tica Pfl. 1(a); 6: Guyana RZ F1 Pfl. 1(a). MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

In der PCR-Reaktion, deren Ergebnisse in Abb. 42 abgebildet sind, wurden Sammelproben von gepoolten, also zusammengeführten Parallelproben, ausgehend von Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits untersucht. Für die Sammelproben wurden für beide Kultivare die PCR-Produkte der PCR-Reaktionen von sieben Parallelproben gepoolt, um als *tm-2/tm-2*-Referenzmaterial (Moneymaker) oder als *Tm-2a/Tm-2a*-Referenzmaterial (Muchamiel UMH 1200) für weitere Untersuchungen zu fungieren. Der größte Teil wurde eingefroren und ein Aliquot wurde auf das Agarosegel aufgetragen. Die PCR brachte Amplifikate hervor. Zwischen 200 und 300 bp sind unspezifische Banden zu erkennen, welche aus vorigen Extraktionen bekannt sind und sich auch in Abb. 46 fortsetzen.

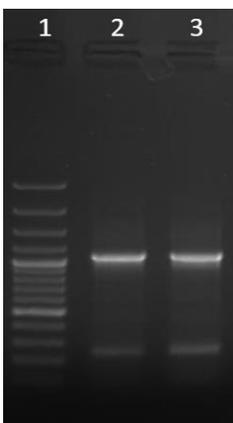


Abb. 42 - CAPS-Assay, PCR (Template-Amplifikation). 1: 100 bp-Ladder; 2: Moneymaker Pfl. 1(a) (gepoolt); 3: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a) (gepoolt).

A 1.2.2 Restriktions-Gel (abschließende Auswertung)

Der Restriktionsverdau wurde mit den Restriktionsenzymen HpaI und BspTI durchgeführt. Die Durchführung der Methode wird in Abschnitt 2.9.2 beschrieben.

Das in Abb. 43 abgebildete Ergebnis des Restriktionsverdus wird in Abschnitt 3.1.2 (siehe Abb. 6) genau beschrieben und diskutiert.

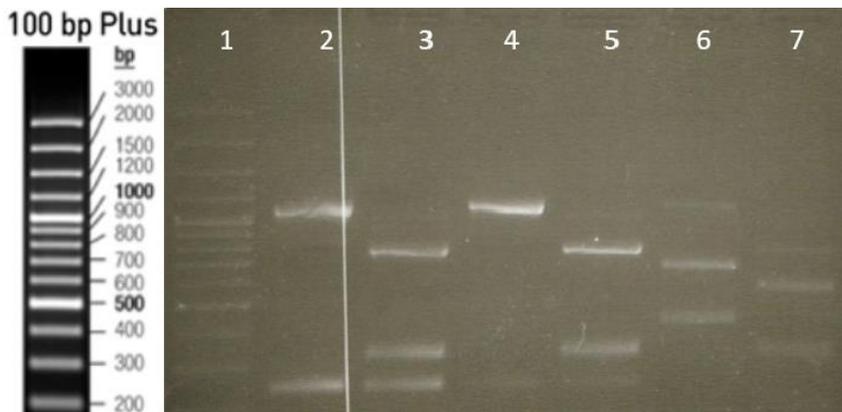


Abb. 43 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau. 1: 100 bp-Ladder; 2: Moneymaker Pfl. 1 (HpaI); 3: Moneymaker Pfl. 1 (BspTI); 4: Moneymaker Pfl. 2 (HpaI); 5: Moneymaker Pfl. 2 (BspTI); 6: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1 (HpaI); 7: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1 (BspTI).

Das in Abb. 44 abgebildete Ergebnis des Restriktionsverdus wird in Abschnitt 3.1.2 (siehe Abb. 7) genau beschrieben und diskutiert.



Abb. 44 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau. 1: 100 bp-Ladder; 2-10: Tica [2: Pfl. 1(3) (BspTI); 3: Pfl. 1(3) (HpaI); 4: Pfl. 2(3) (BspTI); 5: Pfl. 2(3) (HpaI); 6: Pfl. 3(3) (BspTI); 7: Pfl. 3(3) (HpaI); 8: Pfl. 4(3) (BspTI); 9: Pfl. 4(3) (HpaI); 10: Pfl. 5(3) (BspTI)]; 11: 100 bp-Ladder; 12-20: Tica [12: Pfl. 5(3) (HpaI); 13: Pfl. 6(3) (BspTI); 14: Pfl. 6(3) (HpaI); 15: Pfl. 7(3) (BspTI); 16: Pfl. 7(3) (HpaI); 17: Pfl. 9(3) (BspTI); 18: Pfl. 9(3) (HpaI); 19: Pfl. 10(3) (BspTI); 20: Pfl. 10(3) (HpaI)]; 21: 100 bp-Ladder; 22-31: Guyana RZ F1 [22: Pfl. 2(3) (BspTI); 23: Pfl. 2(3) (HpaI); 24: Pfl. 4(3) (BspTI); 25: Pfl. 4(3) (HpaI); 26: Pfl. 5(3) (BspTI); 27: Pfl. 5(3) (HpaI); 28: Pfl. 6(3) (BspTI); 29: Pfl. 6(3) (HpaI); 30: Pfl. 7(3) (BspTI); 31: Pfl. 7(3) (HpaI)]; 32: 100 bp-Ladder.

In Abb. 45 ist das Ergebnis des Restriktionsverdus von bereits untersuchten Proben abgebildet.

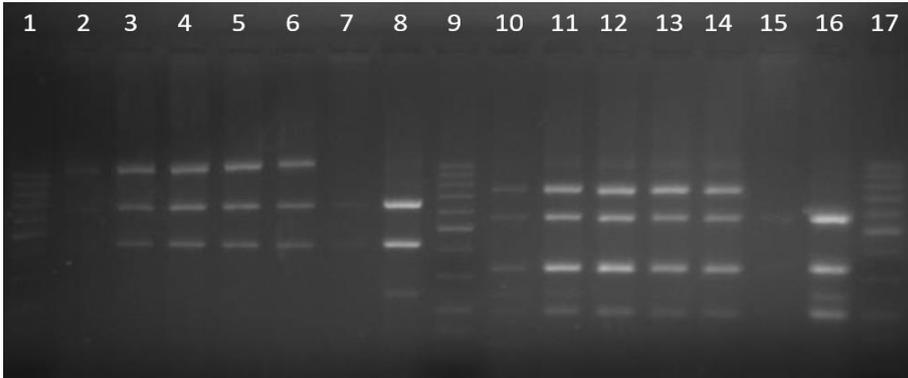


Abb. 45 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau. 1: 100 bp-Ladder; 2-8: Restriktionsverdau mit *HpaI* [Guyana RZ F1: 2: Pfl. 2(3); 3: Pfl. 7(3); 4: Pfl. 4(3); 5: Pfl. 6(3); 6: Pfl. 5(3)], [Tica: 7: Pfl. 6(3)a; 8: Pfl. 6(3)b]; 9: 100 bp-Ladder; 10-16: Restriktionsverdau mit *BspTI* [Guyana RZ F1: 10: Pfl. 2(3); 11: Pfl. 7(3); 12: Pfl. 4(3); 13: Pfl. 6(3); 14: Pfl. 5(3)], [Tica: 15: Pfl. 6(3)a; 16: Pfl. 6(3)b]; 17: 100 bp-Ladder.

Das in Abb. 49 abgebildete Ergebnis des Restriktionsverdus wird in Abschnitt 3.1.2 (siehe Abb. 8) genau beschrieben und diskutiert.

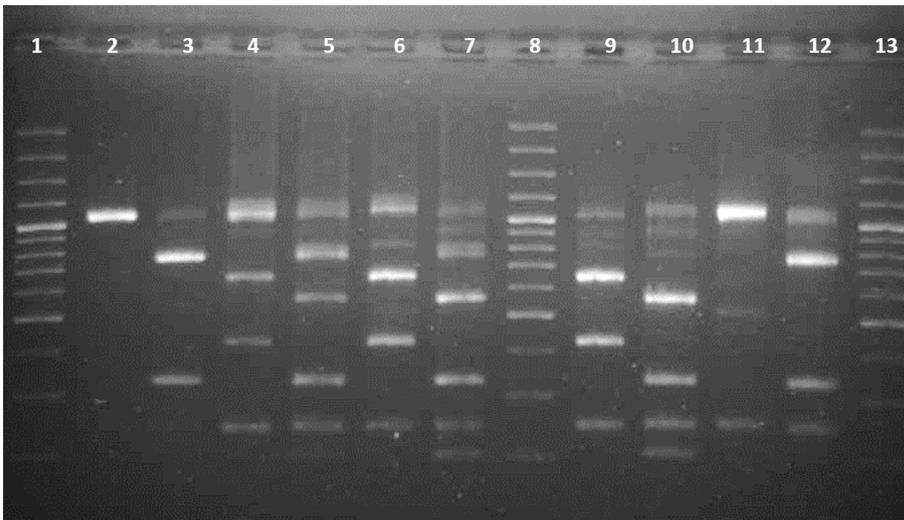


Abb. 46 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau. 1: 100 bp-Ladder; 2: MP1 Pfl. 1(a) (*HpaI*); 3: MP1 Pfl. 1(a) (*BspTI*); 4: Guyana RZ F1 Pfl. 1(a) (*HpaI*); 5: Guyana RZ F1 Pfl. 1(a) (*BspTI*); 6: Tica Pfl. 1(a) (*HpaI*); 7: Tica Pfl. 1(a) (*BspTI*); 8: 100 bp-Ladder; 9: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a) (*HpaI*); 10: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a) (*BspTI*); 11: Moneymaker Pfl. 1(a); 12: Moneymaker Pfl. 1(a) (*BspTI*); 13: 100 bp-Ladder. MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

A 1.2.3 Ergebnisse der Methoden-Etablierung mittels CAPS-Analyse

In Tabelle 13 sind alle gewonnenen Ergebnisse der CAPS-Analyse zusammengefasst. Der Genotyp einiger Pflanzenproben konnte nicht bestimmt werden, da die PCR-Reaktionen dieser Proben trotz mehrmaliger Wiederholungen keine Amplifikate hervorbrachten.

Tabelle 13 - Ergebnisse der Genotyp-Bestimmung mittels CAPS-Analyse (Methoden-Etablierung); Vorkommende Banden werden mit „x“ gekennzeichnet; Unspezifische und nicht vollständig abverdaute Banden sind nicht angeführt; Durchgestrichenen Feldern liegt kein Ergebnis zugrunde, weshalb für diese Probe keine Angabe zum bestimmten Genotyp erfolgen kann.

Kultivar	HpaI-Verdau			BspTI-Verdau				Bestimmter Genotyp
	425 bp	660 bp	1085 bp	198 bp	328 bp	559 bp	757 bp	
Moneymaker			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
Muchamiel UMH 1200	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Tica (siehe Abb. 44 bis Abb. 46)								
1	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
2	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
3	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
4	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
5	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
6	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
7	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
8	/	/	/	/	/	/	/	Keine Angabe möglich
9	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
10	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Guyana RZ F1 (siehe Abb. 44 bis Abb. 46)								
1	/	/	/	/	/	/	/	Keine Angabe möglich
2	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
3	/	/	/	/	/	/	/	Keine Angabe möglich
4	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
5	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
6	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
7	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
8	/	/	/	/	/	/	/	Keine Angabe möglich
9	/	/	/	/	/	/	/	Keine Angabe möglich
10	/	/	/	/	/	/	/	Keine Angabe möglich
Virus-Mutterpflanze 1 (siehe Abb. 46)								
1			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>

A 1.3 Tetra-Primer-ARMS-PCR

A 1.3.1 Agarose-Gel (abschließende Auswertung)

Das Ergebnis der Tetra-Primer-ARMS-PCR aus Abb. 47 wird in Abschnitt 3.1.3 (siehe Abb. 9) genau beschrieben und diskutiert.

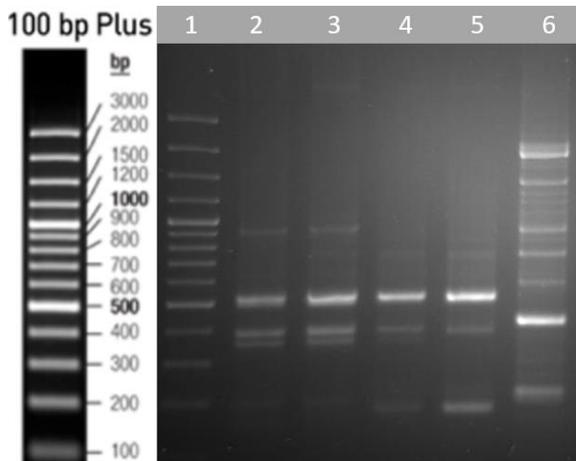


Abb. 47 - Tetra-Primer-ARMS-PCR. 1: 100 bp-Ladder; 2-3: MoneyMaker Assay 2 [2: Pfl. 1(a); 3: Pfl. 2(a)]; 4-5: Muchamiel UMH 1200 Assay 2 [4: Pfl. 1(a); 5: Pfl. 2(a)], 6: Muchamiel UMH 1200 Assay 1 Pfl. 1(a); Assay 1 wurde nur mit Muchamiel UMH 1200 durchgeführt, da MoneyMaker kein R-Allel besitzt. MoneyMaker = *tm-2* homozygot, Muchamiel UMH 1200 = *Tm-2a* homozygot.

In Abb. 48 wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) mittels Assay 1 der Tetra-Primer-ARMS-Methode untersucht, welche die Unterscheidung zwischen dem *Tm-2*-Allel und dem *Tm-2a*-Allel erlaubt. Bei den meisten Proben in Assay 1 scheint es, als wären beide Resistenz-Allele (254 bp- und 214 bp-Amplifikat) vorhanden (Kontrollbande: 416 bp). Dieses Ergebnis ist widersprüchlich. Bei etlichen Pflanzenproben ist die PCR fehlgeschlagen.

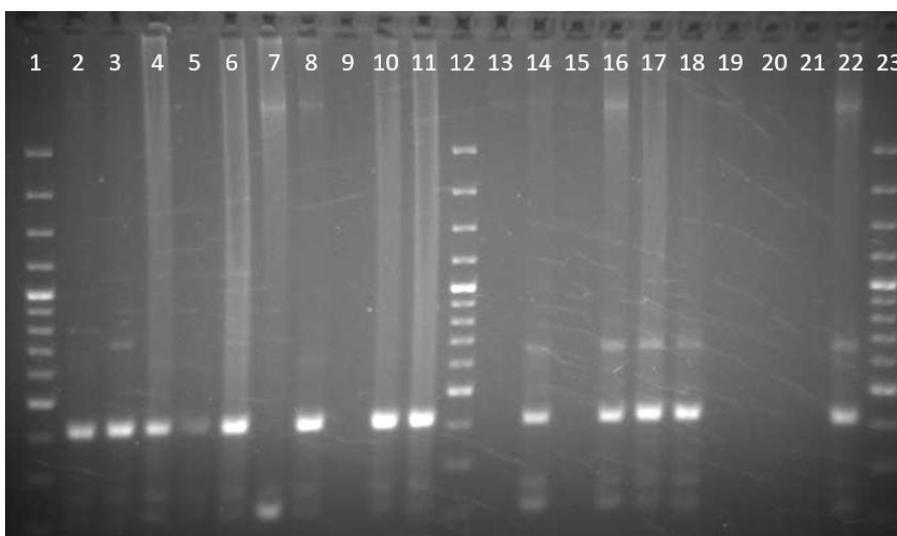


Abb. 48 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Assay 1. 1: 100 bp-Ladder; 2-11: Tica [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10]; 12: 100 bp-Ladder; 13-22: Guyana RZ F1 [13: Pfl. 1; 14: Pfl. 2; 15: Pfl. 3; 16: Pfl. 4; 17: Pfl. 5; 18: Pfl. 7; 19: Pfl. 8; 20: Pfl. 9; 21: Pfl. 10; 22: Pfl. 6]; 23: 100 bp-Ladder.

Am Gel in Abb. 49 wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) mittels Assay 2 der Tetra-Primer-ARMS-Methode untersucht, welche die Unterscheidung zwischen dem *tm-2*-Allel und dem *Tm-2a-* bzw. dem *Tm-2*-Allel erlaubt. Die meisten Proben scheinen zudem neben der Kontrollbande (509 bp) das R-Allel (185 bp) und das S-Allel (381 bp) zu besitzen, als wären beide Resistenz-Allele vorhanden. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu jenem aus Assay 1 (siehe Abb. 48): Es können nicht beide R-Allele und ein S-Allel gemeinsam vorhanden sein. Das Bandenmuster des ersten ARMS-Gels (siehe Abb. 47) zeigt dieselben Schwierigkeiten. Die PCR-Reaktion ist hier bei eben denselben Proben wie in Assay 1 misslungen. All jene Proben wurden bereits zum zweiten Mal mittels ARMS-PCR untersucht (auch mit Neuextrakten) - die parallel durchgeführten CAPS-PCRs waren ebenso erfolglos. Die ARMS-PCR wurde wiederholt.

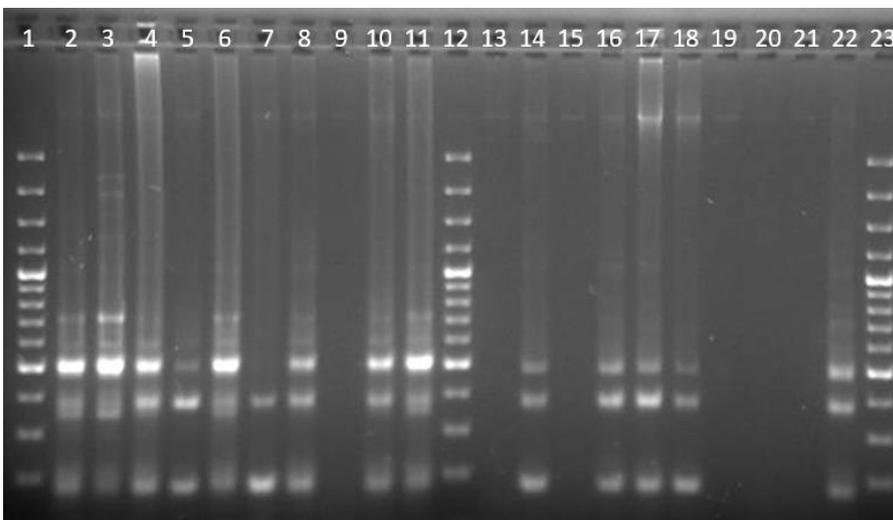


Abb. 49 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Assay 2. 1: 100 bp-Ladder; 2-11: Tica [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10]; 12: 100 bp-Ladder; 13-22: Guyana RZ F1 [13: Pfl. 1; 14: Pfl. 2; 15: Pfl. 3; 16: Pfl. 4; 17: Pfl. 5; 18: Pfl. 7; 19: Pfl. 8; 20: Pfl. 9; 21: Pfl. 10; 22: Pfl. 6]; 23: 100 bp-Ladder.

Das Gel in Abb. 50 wird mit Abb. 51 gemeinsam beschrieben (siehe nächste Seite).

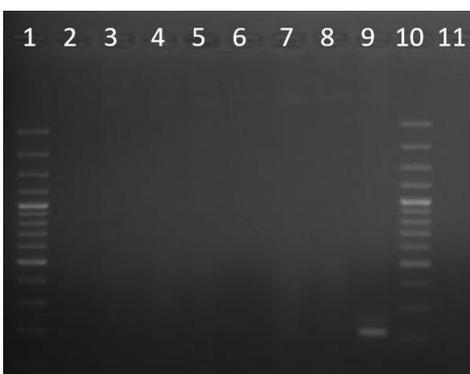


Abb. 50 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Assay 1, Wiederholung (I) fehlgeschlagener Proben. 1: 100 bp-Ladder; 2: MP1 Pfl. 1(4); 3: Tica Pfl. 8(5); 4-8: Guyana RZ F1 [4: Pfl. 1(5); 5: Pfl. 3(5); 6: Pfl. 8(5); 7: 9(5); 8: Pfl. 10(5)]; 9: Tica Pfl. 6(3) (Kontrolle); 10: 100 bp-Ladder; 11: MP1 Pfl. 1(3). MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

Abb. 50 und Abb. 51 zeigen Gelbilder, auf welchen Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) mittels der Tetra-Primer-ARMS-Methode untersucht wurden. Die erneute Wiederholung der ARMS-PCR brachte keine PCR-Produkte für die interessierenden Proben hervor, lediglich für Proben, bei denen die PCR bereits zuvor erfolgreich verlief. Das Ergebnis, der bereits untersuchten Proben ist erneut konträr: Es scheint ein S-Allel und ein R-Allel vorhanden zu sein.

Die Probe der Pflanze 6 des Kultivars Guyana RZ F1 konnte bereits analysiert werden und diente in diesen Gelen der Kontrolle.

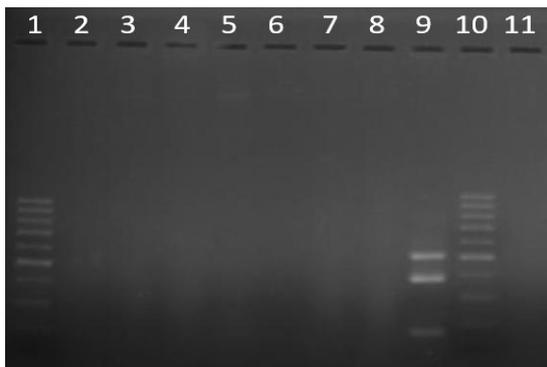


Abb. 51 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Assay 2, Wiederholung (I) fehlgeschlagener Proben. 1: 100 bp-Ladder; 2: MP1 Pfl. 1(4); 3: Tica Pfl. 8(5); 4-8: Guyana RZ F1 [4: Pfl. 1(5); 5: Pfl. 3(5); 6: Pfl. 8(5); 7: 9(5); 8: Pfl. 10(5)]; 9: Tica Pfl. 6(3) (Kontrolle); 10: 100 bp-Ladder; 11: MP1 Pfl. 1(3). MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

Am Gel in Abb. 52 wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten nach Murray & Thompson (1980) mittels der Tetra-Primer-ARMS-Methode untersucht. Die PCR mit den neuen Extrakten ist erneut fehlgeschlagen.

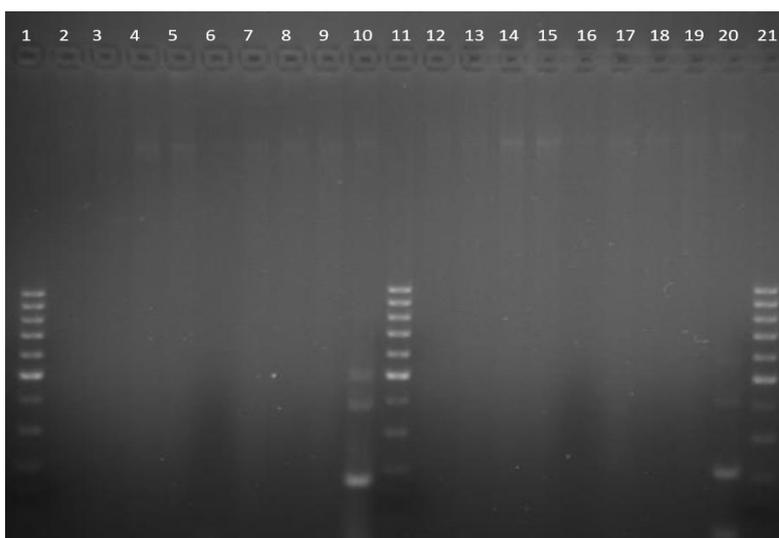


Abb. 52 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Wiederholung (II) fehlgeschlagener Proben. 1: 100 bp-Ladder; 2-10: Assay 1 [2: MP1 Pfl. 1(5); 3: Tica Pfl. 8(6)], [Guyana RZ F1: 4: Pfl. 1(6); 5: Pfl. 3(6); 6: Pfl. 8(6); 7: Pfl. 9(6); 8: Pfl. 10(6)], [9: Tica Pfl. 6(6); 10: Guyana RZ F1 Pfl. 2(3)]; 11: 100 bp-Ladder; Assay 2: [12: MP1 Pfl. 1(5); 13: Tica Pfl. 8(6)], [Guyana RZ F1: 14: Pfl. 1(6); 15: Pfl. 3(6); 16: Pfl. 8(6); 17: Pfl. 9(6); 18: Pfl. 10(6)], [19: Tica Pfl. 6(6); 20: Guyana RZ F1 Pfl. 2(3)]; 21: 100 bp-Ladder. MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

Für die Guyana- und Tica-Pflanzen, welche bisher nicht analysiert werden konnten, wurde bis zu diesem Zeitpunkt viermal mittels der Methode von Murray & Thompson (1980) gDNA extrahiert und fortfolgend amplifiziert. Die Probe MP1 der Virus-Mutterpflanze wurde bereits mehrmals extrahiert und kam in keiner einzigen PCR-Reaktion zu einem Signal. Die Methodik scheint sehr sensibel zu sein. Deshalb wurde in weiterer Folge mit dem DNeasy® Plant Mini Kit extrahiert.

Am Gelbild der Abb. 53 wurden Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits untersucht. Auch diese Extrakte führten hier zu keinen klareren Resultaten. Die Reinheit des genomischen DNA-Templates für die PCR mag zwar grundsätzlich PCR-störende Faktoren minimieren, die Spezifität der Tetra-Primer-ARMS-PCR wird dadurch jedoch nicht beeinflusst.

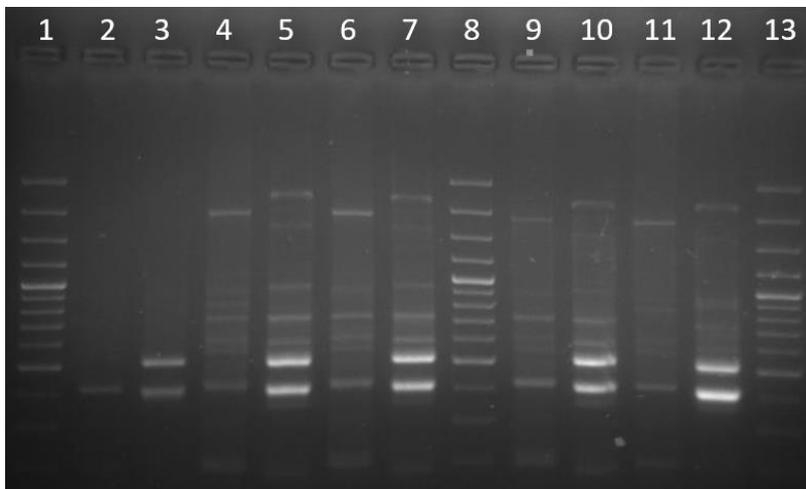


Abb. 53 - Tetra-Primer-ARMS-PCR (mit Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits); 1: 100 bp-Ladder; 2: MP1 Pfl. 1(a) (Assay 1); 3: MP1 Pfl. 1(a) (Assay 2); 4: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a) (Assay 1); 5: Muchamiel UMH 1200 Pfl. 1(a) (Assay 2); 6: Moneymaker Pfl. 1(a) (Assay 1); 7: Moneymaker Pfl. 1(a) (Assay 2); 9: Tica Pfl. 1(a) (Assay 1); 10: Tica Pfl. 1(a) (Assay 2); 11: Guyana RZ F1 Pfl. 1(a) (Assay 1); 12: Guyana RZ F1 Pfl. 1(a) (Assay 2); 13: 100 bp-Ladder. MP1 = Virus-Mutterpflanze 1.

Da die Ergebnisse der Tetra-Primer-ARMS-PCR durchwegs gegensätzlich sind und die Genotypen der Versuchspflanzen mit dieser Methode im Zuge der Methoden-Etablierung nicht eindeutig bestimmt werden konnten, erfolgt an dieser Stelle auch keine tabellarische Aufstellung der Daten.

A 2 Sorten-Genotypisierung

A 2.1. Extraktions-Kontrollgele: Extraktionserfolg der Extraktion von gDNA

Zur Extraktion von gDNA wurde in den Analysen der Sorten-Genotypisierung ausschließlich mit dem DNeasy® Plant Mini Kit gearbeitet.

A 2.1.1 DNeasy® Plant Mini Kit

In Abb. 54 bis Abb. 60 sind die Kontrollgele zur Extraktion der gDNA aus Pflanzenmaterial dargestellt.

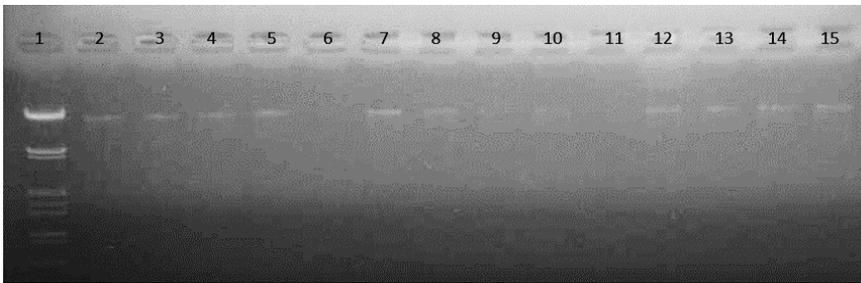


Abb. 54 - gDNA-Extraktion (DNeasy® Plant Mini Kit). 1: λ -Marker; 2-5: Moneymaker G421 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4]; 6: leer; 7-10: Muchamiel UMH 916 [7: Pfl. 1; 8: Pfl. 2; 9: Pfl. 3; 10: Pfl. 4]; 11: leer; 12-15: Muchamiel UMH 972 [12: Pfl. 1; 13: Pfl. 2; 14: Pfl. 3; 15: Pfl. 4].

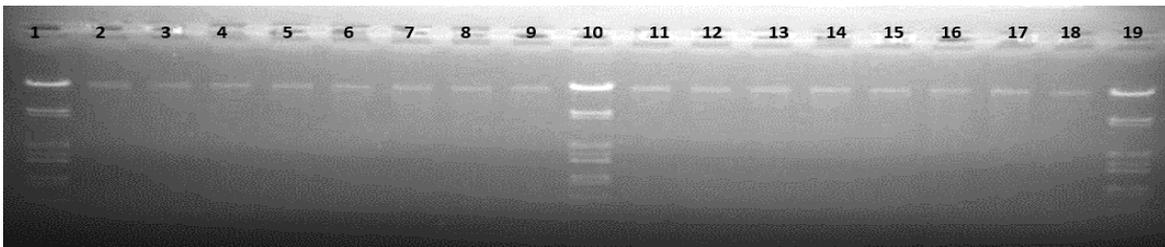


Abb. 55 - gDNA-Extraktion (DNeasy® Plant Mini Kit). 1: λ -Marker; 2-5: Primabella [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4]; 6-9: Philovita F1 [6: Pfl. 1; 7: Pfl. 2; 8: Pfl. 3; 9: Pfl. 4]; 10: λ -Marker; 11-14: Limetto F1 [11: Pfl. 1; 12: Pfl. 2; 13: Pfl. 3; 14: Pfl. 4]; 15-18: Limetto F2 [15: Pfl. 1; 16: Pfl. 2; 17: Pfl. 3; 18: Pfl. 4]; 19: λ -Marker.

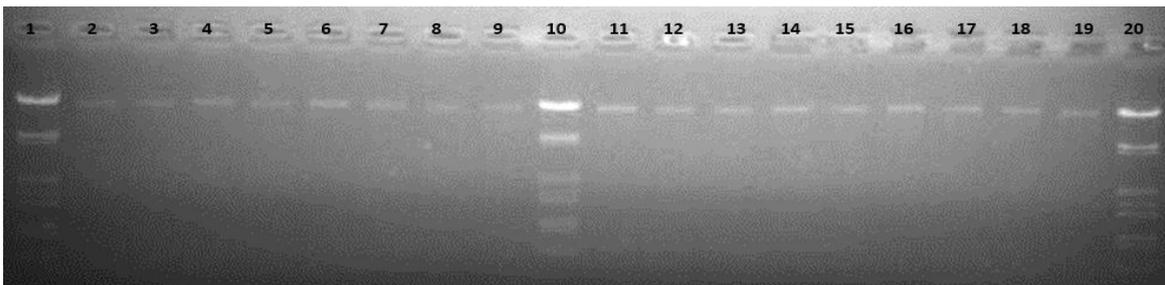


Abb. 56 - gDNA-Extraktion (DNeasy® Plant Mini Kit). 1: λ -Marker; 2-5: Rote Dattelwein [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4]; 6-9: Aroma Cocktail [6: Pfl. 1; 7: Pfl. 2; 8: Pfl. 3; 9: Pfl. 4]; 10: λ -Marker; 11-20: Goldita EP2 [11: Pfl. 1; 12: Pfl. 2; 13: Pfl. 3; 14: Pfl. 4; 15: Pfl. 5; 16: Pfl. 6; 17: Pfl. 7; 18: Pfl. 8; 19: Pfl. 9]; 20: λ -Marker.

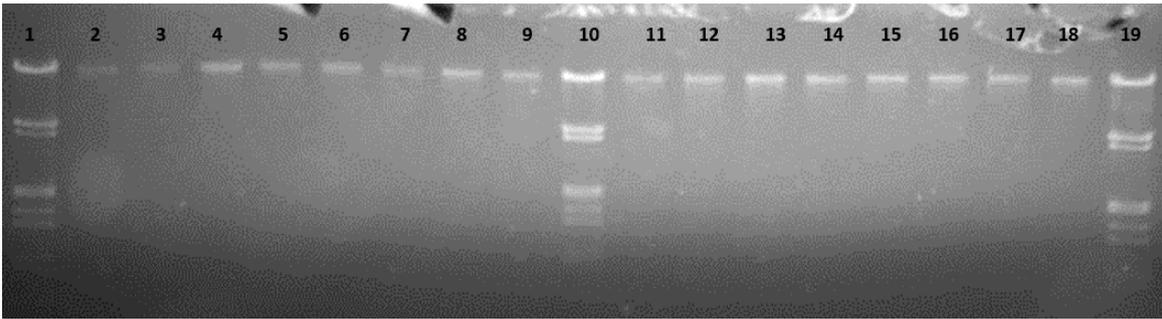


Abb. 57 - gDNA-Extraktion (DNeasy® Plant Mini Kit). 1: λ -Marker; 2-9: Pozzano F1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8]; 10: λ -Marker; 11-18: Pozzano F1 [11: Pfl. 9; 12: Pfl. 10; 13: Pfl. 11; 14: Pfl. 12; 15: Pfl. 13; 16: Pfl. 14; 17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16]; 19: λ -Marker.

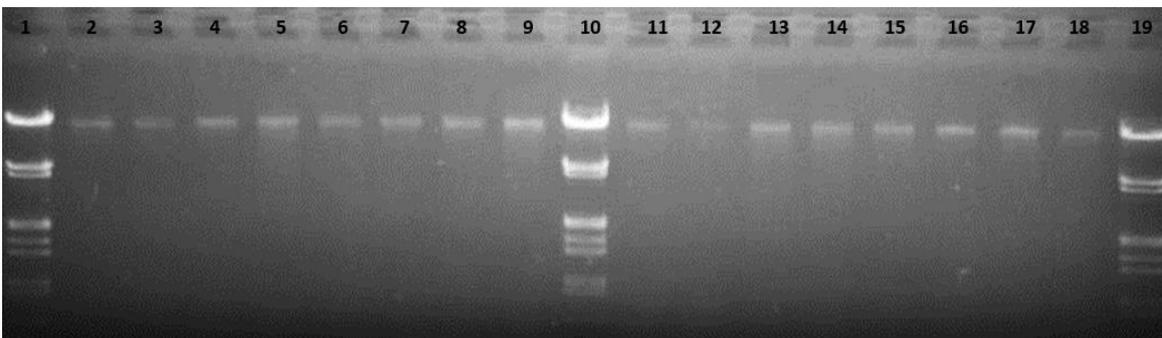


Abb. 58 - gDNA-Extraktion (DNeasy® Plant Mini Kit). 1: λ -Marker; 2-9: Pozzano F1 [2: Pfl. 17; 3: Pfl. 18; 4: Pfl. 19; 5: Pfl. 20; 6: Pfl. 21; 7: Pfl. 22; 8: Pfl. 23; 9: Pfl. 24]; 10: λ -Marker; 11-18: Goldita EP1 [11: Pfl. 1; 12: Pfl. 2; 13: Pfl. 3; 14: Pfl. 4; 15: Pfl. 5; 16: Pfl. 6; 17: Pfl. 7; 18: Pfl. 8]; 19: λ -Marker.

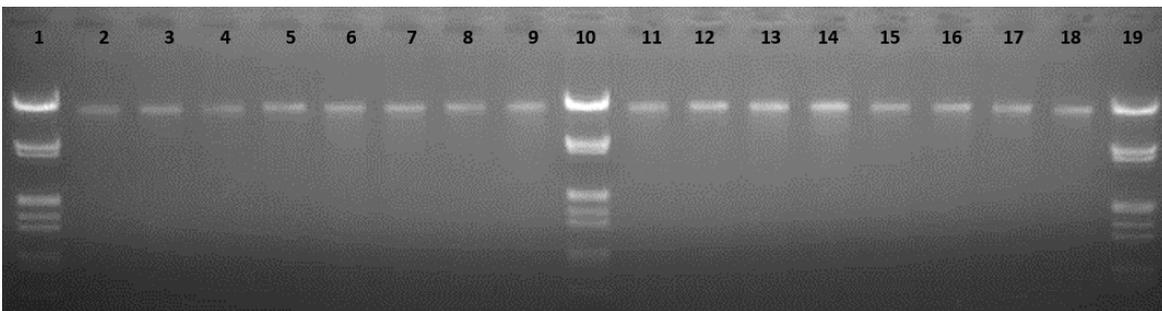


Abb. 59 - gDNA-Extraktion (DNeasy® Plant Mini Kit). 1: λ -Marker; 2-9: Goldita EP1 [2: Pfl. 9; 3: Pfl. 10; 4: Pfl. 11; 5: Pfl. 12; 6: Pfl. 13; 7: Pfl. 14; 8: Pfl. 15; 9: Pfl. 16]; 10: λ -Marker; 11-18: Goldita EP1 [11: Pfl. 17; 12: Pfl. 18; 13: Pfl. 19; 14: Pfl. 20; 15: Pfl. 21; 16: Pfl. 22; 17: Pfl. 23; 18: Pfl. 24]; 19: λ -Marker.



Abb. 60 - gDNA-Extraktion (DNeasy® Plant Mini Kit). 1: λ -Marker; 2: Goldita EP1 Pfl. 5(2); 3: Goldita EP1 Pfl. 6(2); 4: leer (Geltasche zerstört); 5: Goldita EP1 Pfl. 7(2).

A 2.2. CAPS-Analyse

A 2.2.1 PCR-Kontrollgel - Überprüfung des Amplifikations-Erfolges

In den PCR-Reaktion (siehe Abb. 61 bis Abb. 67) wurden stets Proben von Einzelpflanzen ausgehend von Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits untersucht.

Die PCR-Reaktionen der insgesamt 93 extrahierten gDNA-Proben brachten in 89 Fällen ausreichende Mengen an Amplifikat hervor. Eine Wiederholung der PCR mit der gDNA von schwachen bzw. ausständigen Proben (Moneymaker G421 Pfl. 4 und Muchamiel UMH 916 Pfl. 3, Abb. 61; Pozzano F1 Pfl. 24, Abb. 62; Goldita EP1 Pfl. 9, Abb. 63) brachte Amplifikate hervor (siehe Abb. 64 und Abb. 65).

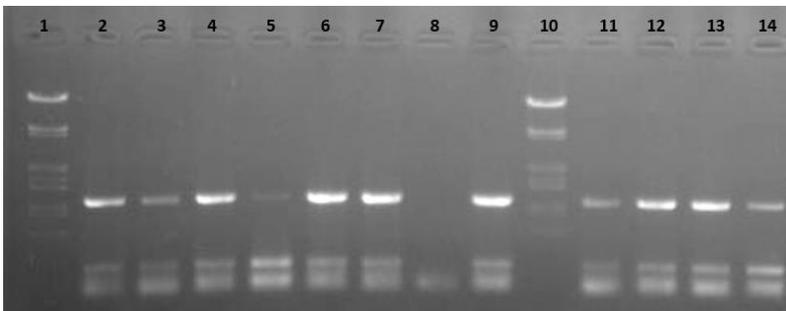


Abb. 61 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; 2-5: Moneymaker G421 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4]; 6-9: Muchamiel UMH 916 [6: Pfl. 1; 7: Pfl. 2; 8: Pfl. 3; 9: Pfl. 4]; 10: λ -Marker; 11-14: Muchamiel UMH 972 [11: Pfl. 1; 12: Pfl. 2; 13: Pfl. 3; 14: Pfl. 4].

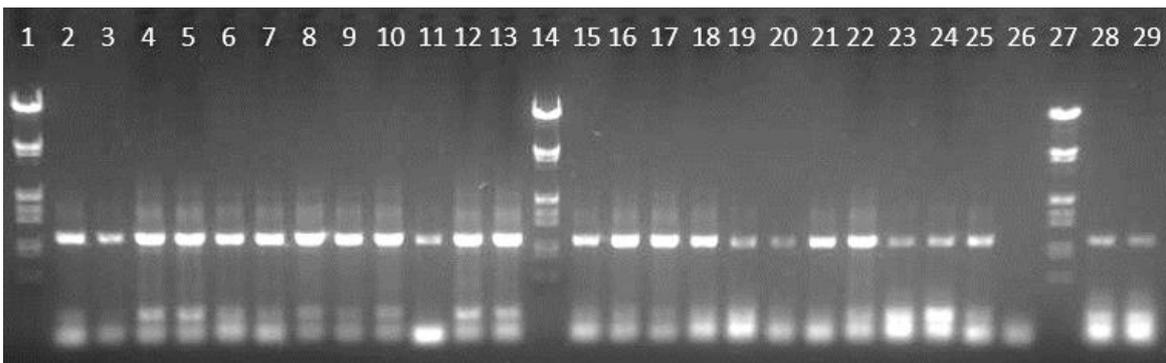


Abb. 62 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; 2-13: Pozzano F1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10; 12: Pfl. 11; 13: Pfl. 12]; 14: λ -Marker; 15-26: Pozzano F1 [15: Pfl. 13; 16: Pfl. 14; 17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16; 19: Pfl. 17; 20: Pfl. 18; 21: Pfl. 19; 22: Pfl. 20; 23: Pfl. 21; 24: Pfl. 22; 25: Pfl. 23; 26: Pfl. 24]; 27: λ -Marker; 28: Moneymaker G421 Pfl. 1 (tm-2/tm-2-Referenz); 29: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz).

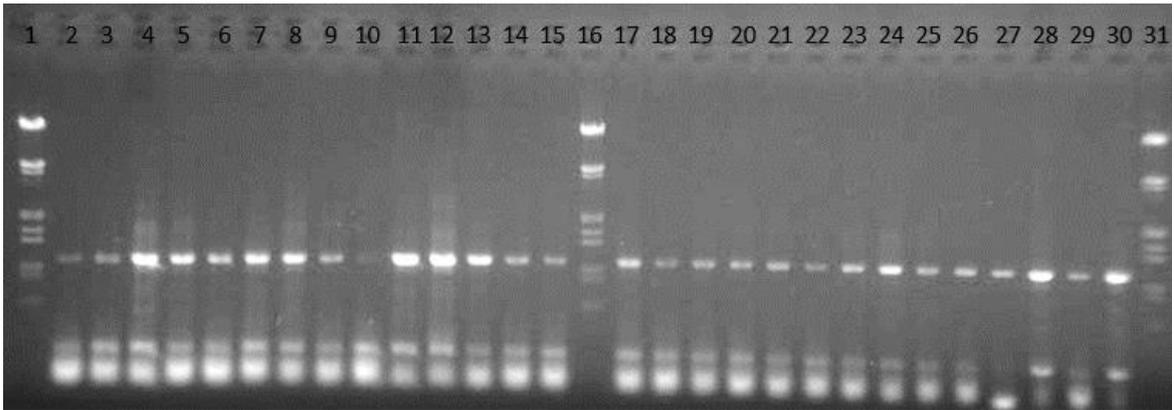


Abb. 63 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; 2-15: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10; 12: Pfl. 11; 13: Pfl. 12; 14: Pfl. 13; 15: Pfl. 14]; 16: λ -Marker; 17-26: Goldita EP1 [17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16; 19: Pfl. 17; 20: Pfl. 18; 21: Pfl. 19; 22: Pfl. 20; 23: Pfl. 21; 24: Pfl. 22; 25: Pfl. 23; 26: Pfl. 24]; 27-30: Primabella [27: Pfl. 1; 28: Pfl. 2; 29: Pfl. 3; 30: Pfl. 4]; 31: λ -Marker.



Abb. 64 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; Philovita F1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4]; 6-9: Limetto F1 [6: Pfl. 1; 7: Pfl. 2; 8: Pfl. 3; 9: Pfl. 4]; 10-13: Limetto F2 [10: Pfl. 1; 11: Pfl. 2; 12: Pfl. 3; 13: Pfl. 4]; 14-17: Rote Dattelwein [14: Pfl. 1; 15: Pfl. 2; 16: Pfl. 3; 17: Pfl. 4]; 18: λ -Marker; 19-22: Aroma Cocktail [19: Pfl. 1; 20: Pfl. 2; 21: Pfl. 3; 22: Pfl. 4]; 23-31: Goldita EP2 [23: Pfl. 1; 24: Pfl. 2; 25: Pfl. 3; 26: Pfl. 4; 27: Pfl. 5; 28: Pfl. 6; 29: Pfl. 7; 30: Pfl. 8; 31: Pfl. 9]; 32: Moneymaker G421 Pfl. 4(2); 33: Muchamiel UMH 916 Pfl. 3(2); 34: Pozzano F1 Pfl. 24(2); 35: λ -Marker.



Abb. 65 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; 2: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz); 3: Goldita EP2 Pfl. 9(2).



Abb. 66 - CAPS-Assay, PCR. 1: λ -Marker; 2: Goldita EP1 Pfl. 5(2); 3: Goldita EP1 Pfl. 6(2); 4: Goldita EP1 Pfl. 7(2).

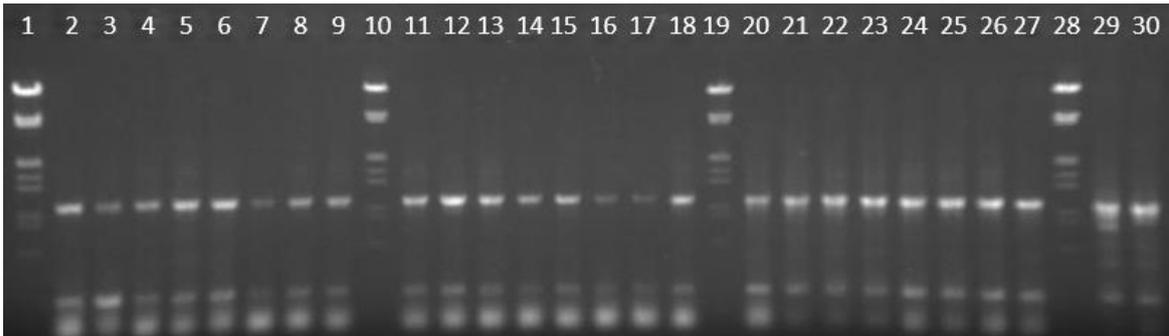


Abb. 67 - CAPS-Assay, PCR, ohne $MgCl_2$. 1: λ -Marker; 2-9: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8]; 10: λ -Marker; 11-18: Goldita EP1 [11: Pfl. 9; 12: Pfl. 10; 13: Pfl. 11; 14: Pfl. 12; 15: Pfl. 13; 16: Pfl. 14; 17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16]; 19: λ -Marker; 20-27: Goldita EP1 [20: Pfl. 17; 21: Pfl. 18; 22: Pfl. 19; 23: Pfl. 20; 24: Pfl. 21; 25: Pfl. 22; 26: Pfl. 23; 27: Pfl. 24]; 28: λ -Marker; 29: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz); 30: Moneymaker G421 Pfl. 1 (tm-2/tm-2-Referenz).

A 2.2.2 Restriktions-Gel (abschließende Auswertung)

Der Restriktionsverdau der folgenden Gelbilder (siehe Abb. 68 bis Abb. 79) wurde mit den Restriktionsenzymen HpaI und BspTI durchgeführt. Die Durchführung der Methode wird in Abschnitt 2.9.2 beschrieben.

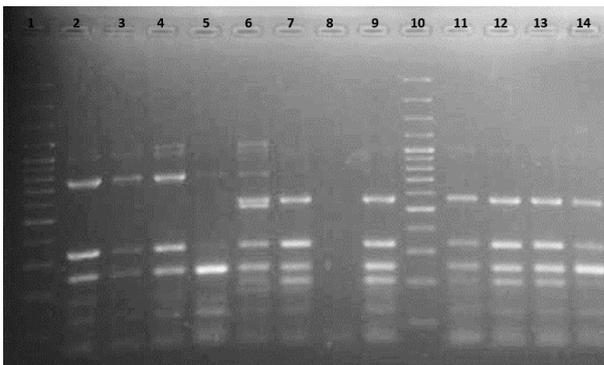


Abb. 68 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau mit HpaI. 1: 100 bp-Ladder; 2-5: Moneymaker G421 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4]; 6-9: Muchamiel UMH 916 [6: Pfl. 1; 7: Pfl. 2; 8: Pfl. 3; 9: Pfl. 4]; 10: 100 bp-Ladder; 11-14: Muchamiel UMH 972 [11: Pfl. 1; 12: Pfl. 2; 13: Pfl. 3; 14: Pfl. 4].

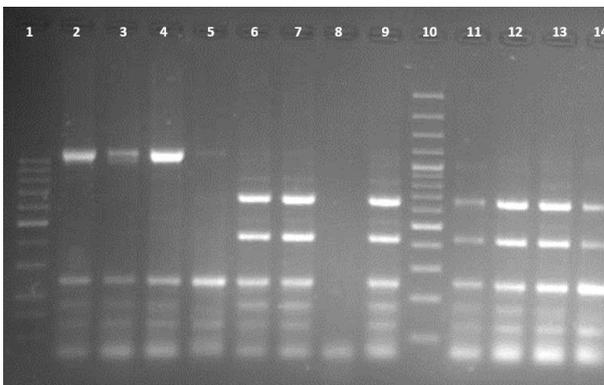


Abb. 69 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau mit BspTI. 1: 100 bp-Ladder; 2-5: Moneymaker G421 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4]; 6-9: Muchamiel UMH 916 [6: Pfl. 1; 7: Pfl. 2; 8: Pfl. 3; 9: Pfl. 4]; 10: 100 bp-Ladder; 11-14: Muchamiel UMH 972 [11: Pfl. 1; 12: Pfl. 2; 13: Pfl. 3; 14: Pfl. 4].



Abb. 70 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau. 1: 100 bp-Ladder; 2-3: Restriktionsverdau mit BspTI [2: Tm-2a/Tm-2a-Referenz; 3: tm-2/tm-2-Referenz]; 4-5: Restriktionsverdau mit HpaI [4: Tm-2a/Tm-2a-Referenz; 5: tm-2/tm-2-Referenz].

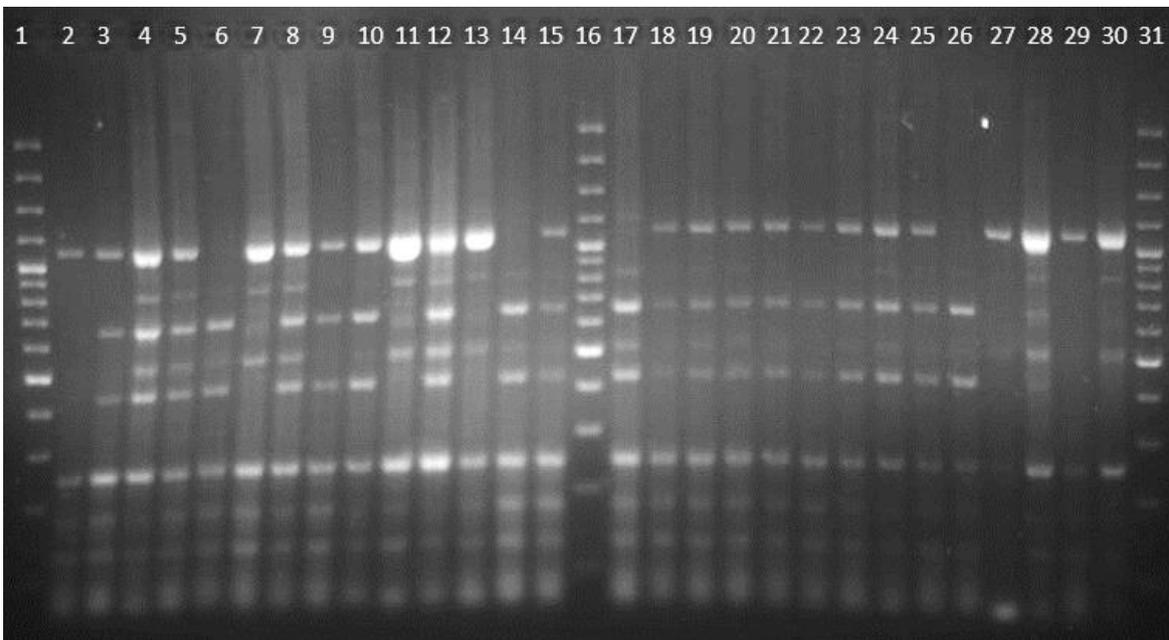


Abb. 71 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau mit HpaI. 1: 100 bp-Ladder; 2-15: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10; 12: Pfl. 11; 13: Pfl. 12; 14: Pfl. 13; 15: Pfl. 14]; 16: 100 bp-Ladder; 17-26: Goldita EP1 [17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16; 19: Pfl. 17; 20: Pfl. 18; 21: Pfl. 19; 22: Pfl. 20; 23: Pfl. 21; 24: Pfl. 22; 25: Pfl. 23; 26: Pfl. 24]; 27-30: Primabella [27: Pfl. 1; 28: Pfl. 2; 29: Pfl. 3; 30: Pfl. 4]; 31: 100 bp-Ladder.

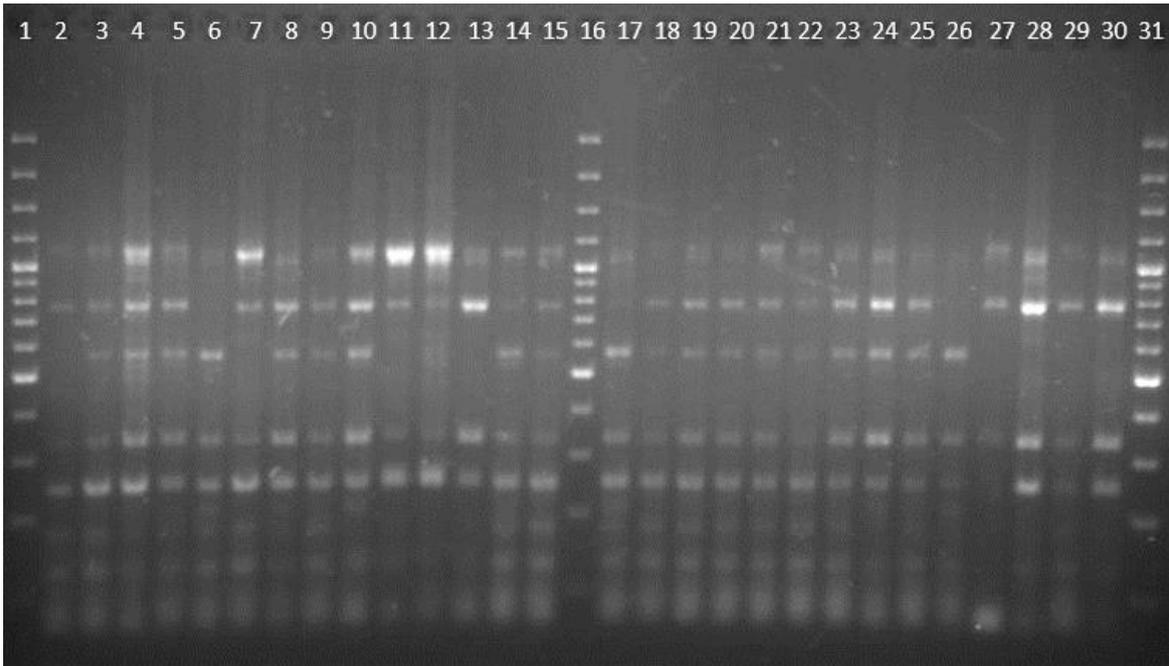


Abb. 72 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau mit BspTI. 1: 100 bp-Ladder; 2-15: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10; 12: Pfl. 11; 13: Pfl. 12; 14: Pfl. 13; 15: Pfl. 14]; 16: 100 bp-Ladder; 17-26: Goldita EP1 [17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16; 19: Pfl. 17; 20: Pfl. 18; 21: Pfl. 19; 22: Pfl. 20; 23: Pfl. 21; 24: Pfl. 22; 25: Pfl. 23; 26: Pfl. 24]; 27-30: Primabella [27: Pfl. 1; 28: Pfl. 2; 29: Pfl. 3; 30: Pfl. 4]; 31: 100 bp-Ladder.

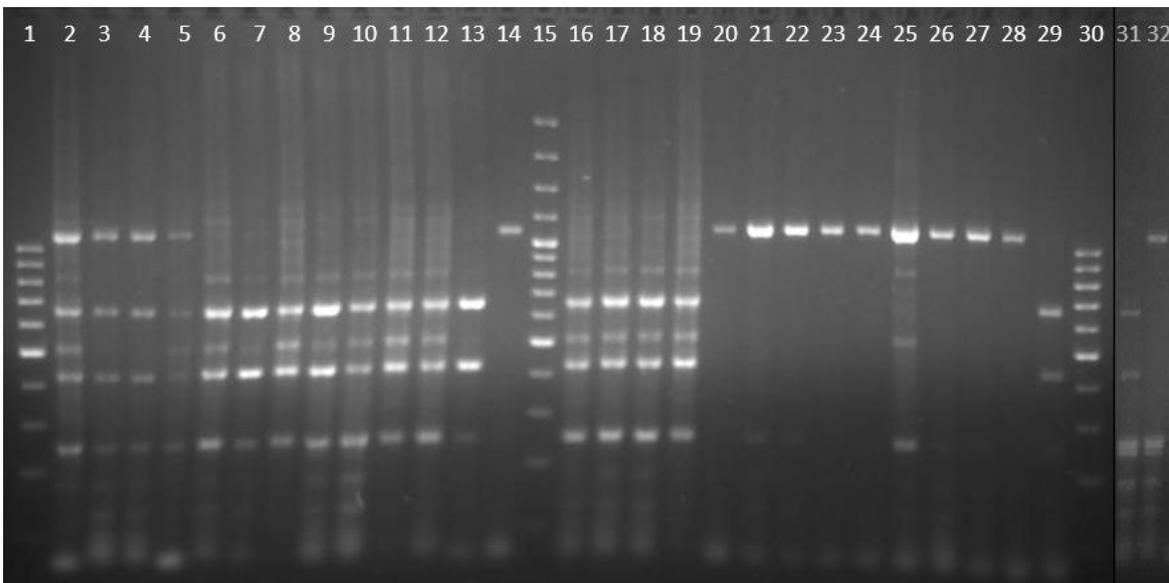


Abb. 73 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau mit HpaI. 1: 100 bp-Ladder; 2-5: Philovita F1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4]; 6-9: Limetto F1 [6: Pfl. 1; 7: Pfl. 2; 8: Pfl. 3; 9: Pfl. 4]; 10-13: Limetto F2 [10: Pfl. 1; 11: Pfl. 2; 12: Pfl. 3; 13: Pfl. 4]; 14: Moneymaker G421 Pfl. 4(2); 15: 100 bp+ ladder; 16-19: Rote Dattelwein [16: Pfl. 1; 17: Pfl. 2; 18: Pfl. 3; 19: Pfl. 4]; 20-28: Goldita EP2 [20: Pfl. 1; 21: Pfl. 2; 22: Pfl. 3; 23: Pfl. 4; 24: Pfl. 5; 25: Pfl. 6; 26: Pfl. 7; 27: Pfl. 8; 28: Pfl. 9]; 29: Muchamiel UMH 916 Pfl. 3(2); 30: 100 bp-Ladder. 31-32: Ergänzung [31: Tm-2a/Tm-2a-Referenz; 32: tm-2/tm-2-Referenz].

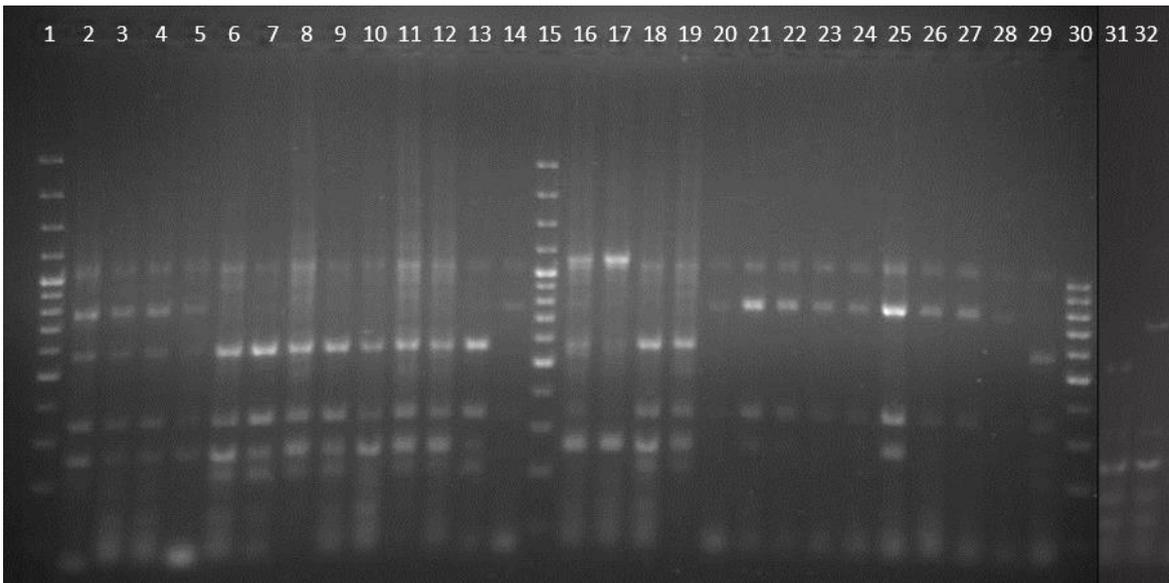


Abb. 74 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau mit BspTI. 1: 100 bp-Ladder; 2-5: Philovita F1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4]; 6-9: Limetto F1 [6: Pfl. 1; 7: Pfl. 2; 8: Pfl. 3; 9: Pfl. 4]; 10-13: Limetto F2 [10: Pfl. 1; 11: Pfl. 2; 12: Pfl. 3; 13: Pfl. 4]; 14: MoneyMaker G421 Pfl. 4(2); 15: 100 bp+ ladder; 16-19: Rote Dattelwein [16: Pfl. 1; 17: Pfl. 2; 18: Pfl. 3; 19: Pfl. 4]; 20-28: Goldita EP2 [20: Pfl. 1; 21: Pfl. 2; 22: Pfl. 3; 23: Pfl. 4; 24: Pfl. 5; 25: Pfl. 6; 26: Pfl. 7; 27: Pfl. 8; 28: Pfl. 9]; 29: Muchamiel UMH 916 Pfl. 3(2); 30: 100 bp-Ladder; 31-32: Ergänzung [31: Tm-2a/Tm-2a-Referenz; 32: tm-2/tm-2-Referenz].

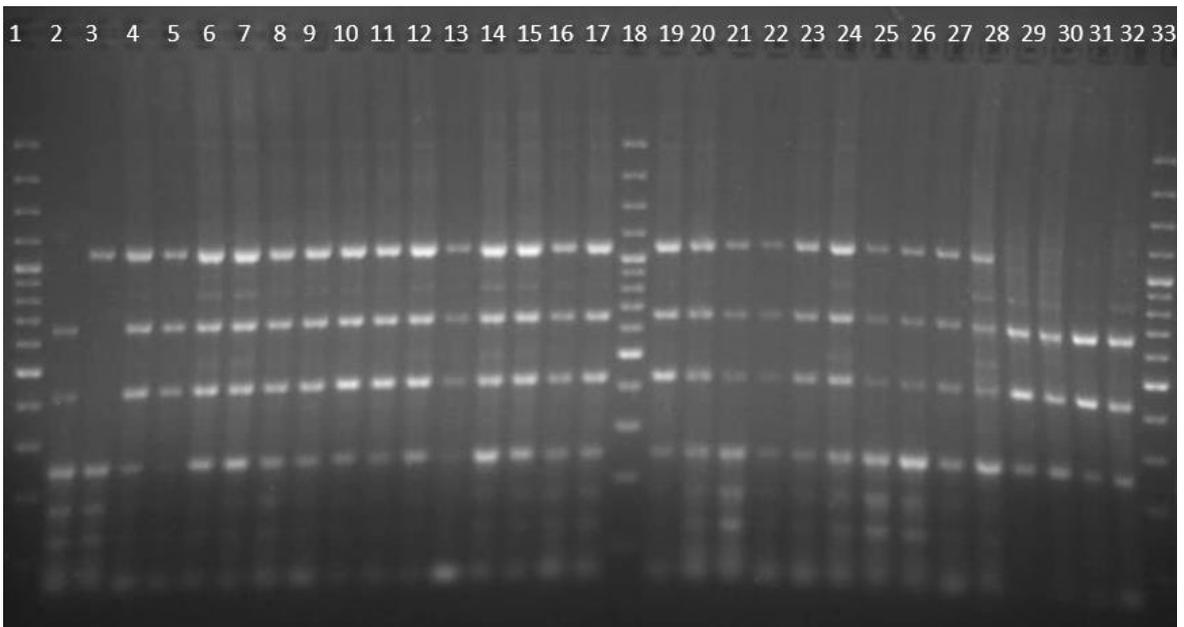


Abb. 75 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau mit HpaI. 1: 100 bp-Ladder; 2: Tm-2a/Tm-2a-Referenz; 3: tm-2/tm-2-Referenz; 4-17: Pozzano F1 [4: Pfl. 1; 5: Pfl. 2; 6: Pfl. 3; 7: Pfl. 4; 8: Pfl. 5; 9: Pfl. 6; 10: Pfl. 7; 11: Pfl. 8; 12: Pfl. 9; 13: Pfl. 10; 14: Pfl. 11; 15: Pfl. 12; 16: Pfl. 13; 17: Pfl. 14]; 18: 100 bp-Ladder; 19-28: Pozzano F1 [19: Pfl. 15; 20: Pfl. 16; 21: Pfl. 17; 22: Pfl. 18; 23: Pfl. 19; 24: Pfl. 20; 25: Pfl. 21; 26: Pfl. 22; 27: Pfl. 23; 28: Pfl. 24]; 29-32: Aroma Cocktail [29: Pfl. 1; 30: Pfl. 2; 31: Pfl. 3; 32: Pfl. 4]; 33: 100 bp-Ladder.

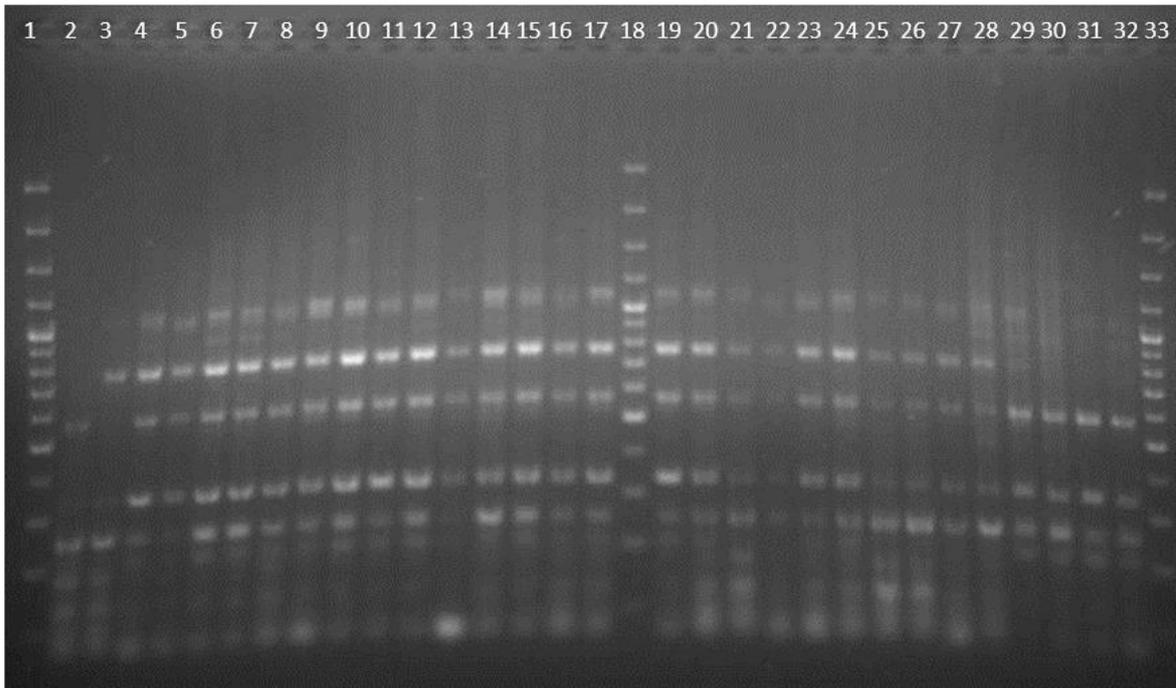


Abb. 76 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau mit BspTI. 1: 100 bp-Ladder; 2: Tm-2a/Tm-2a-Referenz; 3: tm-2/tm-2-Referenz; 4-17: Pozzano F1 [4: Pfl. 1; 5: Pfl. 2; 6: Pfl. 3; 7: Pfl. 4; 8: Pfl. 5; 9: Pfl. 6; 10: Pfl. 7; 11: Pfl. 8; 12: Pfl. 9; 13: Pfl. 10; 14: Pfl. 11; 15: Pfl. 12; 16: Pfl. 13; 17: Pfl. 14]; 18: 100 bp-Ladder; 19-28: Pozzano F1 [19: Pfl. 15; 20: Pfl. 16; 21: Pfl. 17; 22: Pfl. 18; 23: Pfl. 19; 24: Pfl. 20; 25: Pfl. 21; 26: Pfl. 22; 27: Pfl. 23; 28: Pfl. 24]; 29-32: Aroma Cocktail [29: Pfl. 1; 30: Pfl. 2; 31: Pfl. 3; 32: Pfl. 4]; 33 100 bp-Ladder.

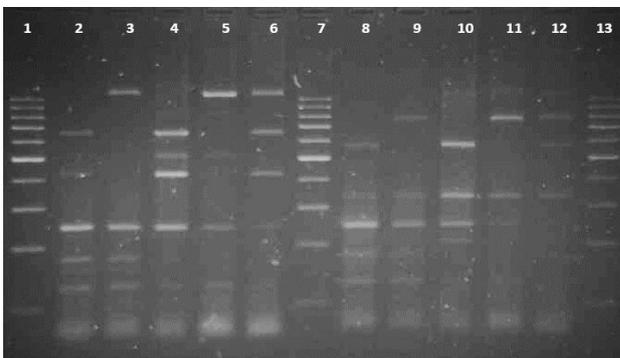


Abb. 77 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau. 1: 100 bp-Ladder; 2-3: Restriktionsverdau mit BspTI [2: Tm-2a/Tm-2a-Referenz; 3: tm-2/tm-2-Referenz; 4: Goldita EP1 Pfl. 5(2); 5: Goldita EP1 Pfl. 6(2); 6: Goldita EP1 Pfl. 7(2)]; 7: 100 bp-Ladder; 8-12: Restriktionsverdau mit BspTI [8: Tm-2a/Tm-2a -Referenz; 9: tm-2/tm-2-Referenz; 10: Goldita EP1 Pfl. 5(2); 11: Goldita EP1 Pfl. 6(2); 12: Goldita EP1 Pfl. 7(2)]; 13: 100 bp-Ladder.

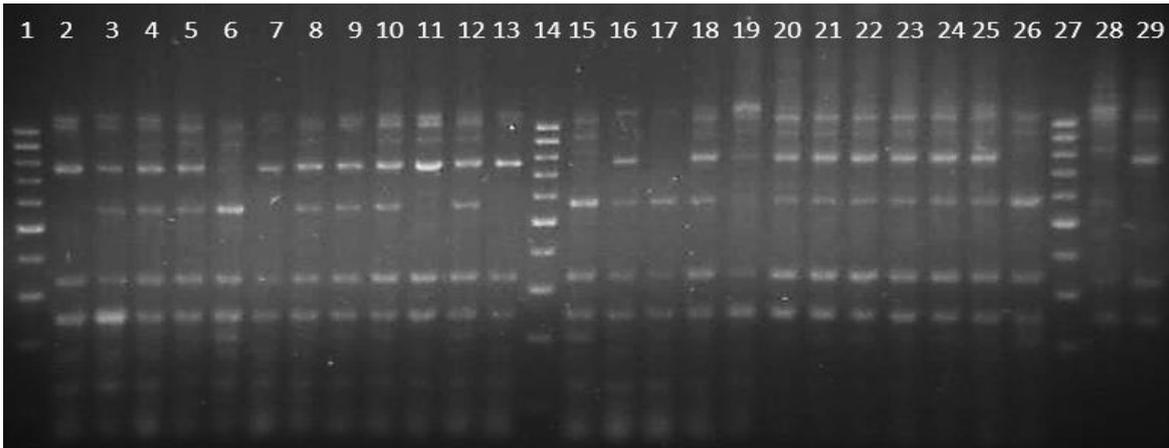


Abb. 78 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau (II) mit *Bsp*TI, ohne $MgCl_2$. 1: 100 bp-Ladder; 2-13: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10; 12: Pfl. 11; 13: Pfl. 12]; 14: 100 bp-Ladder; 15-26: Goldita EP1 [15: Pfl. 13; 16: Pfl. 14; 17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16; 19: Pfl. 17; 20: Pfl. 18; 21: Pfl. 19; 22: Pfl. 20; 23: Pfl. 21; 24: Pfl. 22; 25: Pfl. 23; 26: Pfl. 24]; 27: 100 bp-Ladder; 28: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz); 29: Moneymaker G421 Pfl. 1 (tm-2/tm-2-Referenz).

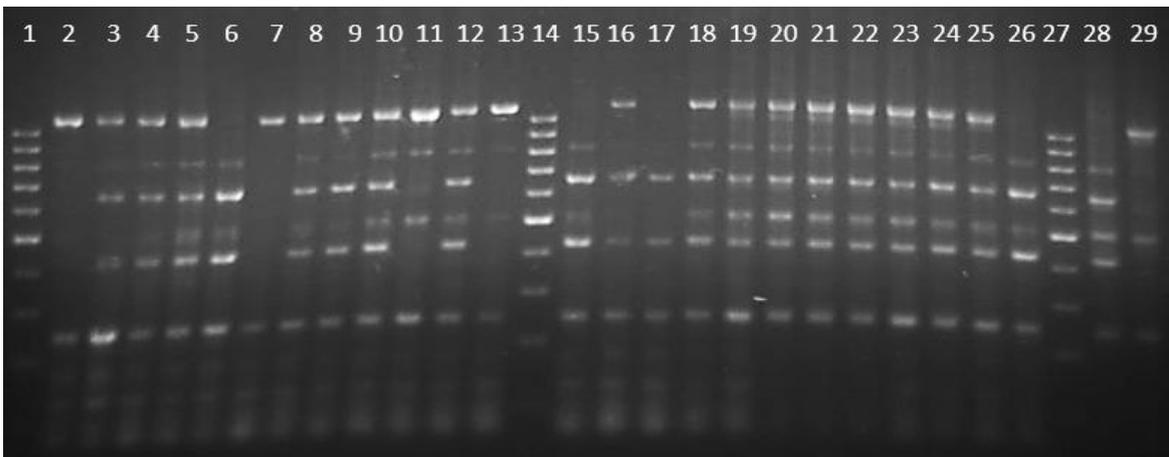


Abb. 79 - CAPS-Assay, Restriktionsverdau (II) mit *Hpa*I, ohne $MgCl_2$. 1: 100 bp-Ladder; 2-13: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8; 10: Pfl. 9; 11: Pfl. 10; 12: Pfl. 11; 13: Pfl. 12]; 14: 100 bp-Ladder; 15-26: Goldita EP1 [15: Pfl. 13; 16: Pfl. 14; 17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16; 19: Pfl. 17; 20: Pfl. 18; 21: Pfl. 19; 22: Pfl. 20; 23: Pfl. 21; 24: Pfl. 22; 25: Pfl. 23; 26: Pfl. 24]; 27: 100 bp-Ladder; 28: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz); 29: Moneymaker G421 Pfl. 1 (tm-2/tm-2-Referenz).

A 2.2.3 Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung mittels CAPS-Analyse

In Tabelle 14 sind alle gewonnenen Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung, welche mithilfe der CAPS-Analyse gewonnen wurden, zusammengefasst. Neben dem entstandenen Schnittmuster der beiden Enzymverdau-Reaktionen ist der bestimmte Genotyp angeführt. Zudem wird in der Tabelle auf relevante Abbildungen verwiesen. Es konnte von jeder Pflanzenprobe der zugehörige Genotyp bestimmt werden. Die Genotypisierung mithilfe der CAPS-Methode ausgehend von Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits lieferte sehr zuverlässig und unkompliziert auswertbare Ergebnisse.

Tabelle 14 - Teil 1 - Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung nach den einzelnen Kultivaren mittels CAPS-Analyse; Auftretende Fragmente werden mit „x“ markiert; Unspezifische und nicht vollständig abverdaute Banden sind nicht angeführt.

Kultivar	HpaI-Verdau			BspTI-Verdau				Bestimmter Genotyp
	425 bp	660 bp	1085 bp	198 bp	328 bp	559 bp	757 bp	
MoneyMaker G421 (siehe Abb. 68, Abb. 69, Abb. 73 & Abb. 74)								
1			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
2			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
3			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
4			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
Primabella (siehe Abb. 71 & Abb. 72)								
1			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
2			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
3			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
4			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
Muchamiel UMH 916 (siehe Abb. 68, Abb. 69, Abb. 73 & Abb. 74)								
1	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
2	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
3	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
4	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Muchamiel UMH 972 (siehe Abb. 68 & Abb. 69)								
1	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
2	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
3	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
4	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>

Tabelle 14 - Teil 2 - Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung nach den einzelnen Kultivaren mittels CAPS-Analyse; Auftretende Fragmente werden mit „x“ markiert; Unspezifische und nicht vollständig abverdaute Banden sind nicht angeführt.

Kultivar	HpaI-Verdau			BspTI-Verdau				Bestimmter Genotyp
	425 bp	660 bp	1085 bp	198 bp	328 bp	559 bp	757 bp	
Goldita EP1 (siehe Abb. 71 & Abb. 72)								
1			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
2	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/tm-2a</i>
3	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
4	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
5	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
6			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
7	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
8	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
9	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
10			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
11	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
12			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
13	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
14	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
15	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
16	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
17	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
18	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
19	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
20	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
21	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
22	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
23	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
24	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Philovita F1 (siehe Abb. 73 & Abb. 74)								
1	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
2	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
3	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
4	x	x	x	x	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
Limetto F1 (siehe Abb. 73 & Abb. 74)								
1	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
2	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
3	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
4	x	x		x	x	x		<i>Tm-2a/Tm-2a</i>

Tabelle 14 - Teil 3 - Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung nach den einzelnen Kultivaren mittels CAPS-Analyse; Auftretende Fragmente werden mit „x“ markiert; Unspezifische und nicht vollständig abverdaute Banden sind nicht angeführt.

Kultivar	HpaI-Verdau			BspTI-Verdau				Bestimmter Genotyp
	425 bp	660 bp	1085 bp	198 bp	328 bp	559 bp	757 bp	
Limetto F2 (siehe Abb. 73 & Abb. 74)								
1	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
2	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
3	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
4	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
Rote Dattelwein (siehe Abb. 73 & Abb. 74)								
1	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
2	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
3	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
4	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
Aroma Cocktail (siehe Abb. 75 & Abb. 76)								
1	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
2	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
3	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
4	x	x		x	x	x		Tm-2a/Tm-2a
Pozzano F1 (siehe Abb. 75 & Abb. 76)								
1	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
2	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
3	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
4	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
5	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
6	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
7	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
8	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
9	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
10	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
11	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
12	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
13	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
14	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
15	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
16	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
17	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
18	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
19	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
20	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
21	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
22	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
23	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a
24	x	x	x	x	x	x	x	tm-2/Tm-2a

Tabelle 14 - Teil 4 - Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung nach den einzelnen Kultivaren mittels CAPS-Analyse; Auftretende Fragmente werden mit „x“ markiert; Unspezifische und nicht vollständig abverdaute Banden sind nicht angeführt.

Kultivar	HpaI-Verdau			BspTI-Verdau				Bestimmter Genotyp
	425 bp	660 bp	1085 bp	198 bp	328 bp	559 bp	757 bp	
Pflanze								
Goldita EP2	(siehe Abb. 73 & Abb. 74)							
1			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
2			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
3			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
4			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
5			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
6			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
7			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
8			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>
9			x		x		x	<i>tm-2/tm-2</i>

A 2.3. Tetra-Primer-ARMS-PCR

A 2.3.1 Agarose-Gel (abschließende Auswertung)

Das Ergebnis der Temperaturgradienten-PCR aus Abb. 80 wird in Abschnitt 3.2.3 (siehe Abb. 15) beschrieben und diskutiert.



Abb. 80 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Temperaturgradient. 1: 100 bp-Ladder; 2-13: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (*Tm-2a/Tm-2a-Referenz*) [3 mM MgCl₂; 2: 54,1 °C; 3: 54,2 °C; 4: 54,5 °C; 5: 55,0 °C; 6: 55,7 °C; 7: 56,4 °C; 8: 57,2 °C; 9: 57,9 °C; 10: 58,6 °C; 11: 59,2 °C; 12: 59,6 °C; 13: 59,8 °C]; 14: 100 bp-Ladder; 15-26: Moneymaker G421 Pfl. 1 (*tm-2/tm-2-Referenz*) [3 mM MgCl₂; 15: 54,1 °C; 16: 54,2 °C; 17: 54,5 °C; 18: 55,0 °C; 19: 55,7 °C; 20: 56,4 °C; 21: 57,2 °C; 22: 57,9 °C; 23: 58,6 °C; 24: 59,2 °C; 25: 59,6 °C; 26: 59,8 °C]; 27: 100 bp-Ladder; 28: Negativkontrolle (H₂O).

Das Ergebnis des Gelbildes in Abb. 81 wird in Abschnitt 3.2.3 (siehe Abb. 16) beschrieben und diskutiert.



Abb. 81 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Annealing-T: 59,6°C, 1,5 mM MgCl₂. 1: 100 bp-Ladder; 2: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (*Tm-2a/Tm-2a-Referenz*); 3: Moneymaker G421 Pfl. 1 (*tm-2/tm-2-Referenz*); 4: Goldita EP1 Pfl. 9 (*tm-2/Tm-2a*); 5: Goldita EP1 Pfl. 5 (*Tm-2a/Tm-2a*); 6: Goldita EP1 Pfl. 1 (*tm-2/tm-2*); 7: Negativkontrolle (H₂O); 8: 100 bp-Ladder.

Das in Abb. 82 abgebildete Ergebnis der Tetra-Primer-ARMS-PCR wird in Abschnitt 3.2.3 (siehe Abb. 17) genau beschrieben und diskutiert.



Abb. 82 - Tetra-Primer-ARMS-PCR, Annealing-T.: 59,6°C, 1,5 mM MgCl₂. 1: 100 bp-Ladder; 2-9: Goldita EP1 [2: Pfl. 1; 3: Pfl. 2; 4: Pfl. 3; 5: Pfl. 4; 6: Pfl. 5; 7: Pfl. 6; 8: Pfl. 7; 9: Pfl. 8]; 10: 100 bp-Ladder; 11-18: Goldita EP1 [11: Pfl. 9; 12: Pfl. 10; 13: Pfl. 11; 14: Pfl. 12; 15: Pfl. 13; 16: Pfl. 14; 17: Pfl. 15; 18: Pfl. 16]; 19: 100 bp-Ladder; 20-27: Goldita EP1 [20: Pfl. 17; 21: Pfl. 18; 22: Pfl. 19; 23: Pfl. 20; 24: Pfl. 21; 25: Pfl. 22; 26: Pfl. 23; 27: Pfl. 24]; 28-30: Ergänzung [28: 100 bp-Ladder; 29: Muchamiel UMH 916 Pfl. 2 (Tm-2a/Tm-2a-Referenz); 30: Moneymaker G421 Pfl. 1 (tm-2/tm-2-Referenz)];

A 2.3.2 Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung mittels Tetra-Primer-ARMS-PCR

In Tabelle 15 sind alle gewonnenen Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung, welche mithilfe der Analysen der Tetra-Primer-ARMS-PCR gewonnen wurden, zusammengefasst. Neben dem aufgrund spezifischer Amplifikation entstandenen Bandenmustern ist der bestimmte Genotyp angeführt. Zudem wird in der Tabelle auf relevante Abbildungen verwiesen. Es konnte von jeder Pflanzenprobe des Kultivars Goldita EP1 der zugehörige Genotyp bestimmt werden. Die Genotypisierung mithilfe der Tetra-Primer-ARMS-PCR ausgehend von Extrakten des DNeasy® Plant Mini Kits lieferte nach der durchgeführten Optimierung (siehe Abb. 80) sehr zuverlässig auswertbare Ergebnisse.

Tabelle 15 - Ergebnisse der Sorten-Genotypisierung des Kultivars Goldita EP1 mittels Tetra-Primer-ARMS-PCR, Assay 2; Auftretende Amplifikate werden mit „x“ markiert; Unspezifische Banden sind nicht angeführt.

Kultivar Goldita EP1	Assay 2			Bestimmter Genotyp
Pflanze	185 bp	381 bp	509 bp	(siehe Abb. 82)
1		x	x	<i>tm-2/tm-2</i>
2	x	x	x	<i>tm-2/tm-2a</i>
3	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
4	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
5	x		x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
6		x	x	<i>tm-2/tm-2</i>
7	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
8	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
9	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
10		x	x	<i>tm-2/tm-2</i>
11	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
12		x	x	<i>tm-2/tm-2</i>
13	x		x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
14	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
15	x		x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
16	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
17	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
18	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
19	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
20	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
21	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
22	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
23	x	x	x	<i>tm-2/Tm-2a</i>
24	x		x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>

A 3 Inokulations-Versuch

Die methodische Vorgehensweise zu diesem Versuch ist im Abschnitt 2.3 ausführlich beschrieben. In der Tabelle 16 sind die unterschiedlichen Kultivare, Informationen über deren Genotyp und der Symptomausprägung nach erfolgter Inokulation angegeben (absolute Anteile der symptomzeigenden Pflanzen aus der jeweiligen Stichprobe). Die Daten werden in Abschnitt 3.3 beschrieben und diskutiert (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 16 - Ergebnisse des Inokulations-Versuchs. Die während der Bonituren ermittelten Symptome werden dem vermuteten bzw. dem bestimmten Genotyp gegenübergestellt. Die Ergebnisse der Kultivare Philovita F1 und Goldita EP2 sind detailliert in Tabelle 17 und in Tabelle 18 dargestellt. Bei dem Kultivar Pozzano F1 traten Symptome erst bei der zweiten Bonitur auf, bei allen anderen Kultivaren waren Symptome bereits bei der ersten Bonitur erkennbar.

Kultivar	Absoluter Anteil der symptomzeigenden Pflanzen aus der jeweiligen Stichprobe	Vor der Untersuchung bekannter oder vermuteter Genotyp	Bestimmter Genotyp
Moneymaker G421	24	<i>tm-2/tm-2</i>	<i>tm-2/tm-2</i>
Primabella	24	<i>tm-2/tm-2</i>	<i>tm-2/tm-2</i>
Muchamiel UMH 916	0	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Muchamiel UMH 972	0	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Goldita EP1	6	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>segregierend (Tabelle 17)</i>
Goldita EP2	24	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>tm-2/tm-2</i>
Philovita F1	0	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>tm-2/Tm-2a</i>
Limetto F1	0	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Limetto F2	0	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Rote Dattelwein	0	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Aroma Cocktail	0	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>
Pozzano F1	8*/6**/**	<i>Vermutlich Tm-2a homo- o. heterozygot</i>	<i>tm-2/Tm-2a</i>

* Dunkle Flecken am Stängel, braune Blattränder bzw. Blattspitzen

** Haupttrieb verkümmert

Mit * gekennzeichnete Symptome treten bei 8 Pflanzen auf (33%). Bei 6 Pflanzen (24 %) treten mit * und mit ** gekennzeichnete Symptome auf.

Für die Pflanzen des Kultivars Pozzano F1 waren untypischerweise erst bei der zweiten Bonitur Krankheitssymptome erkennbar. Eine ToMV-Infektion konnte nicht ausgeschlossen werden. Es wurden daher alle 24 Pflanzen genotypisch untersucht. Die Daten dazu sind in Tabelle 17 dargestellt und werden in Abschnitt 3.3 beschrieben und diskutiert.

Tabelle 17 - Ergebnisse des Inokulations-Versuchs des Kultivars Pozzano F1. Die ermittelten Genotypen (Schattierung beachten) sind den Ergebnissen der Bonituren gegenübergestellt. Die Verteilung der Genotypen der Stichprobe sind dem unteren Teil der Tabelle zu entnehmen.

Pozzano F1		Symptome	
Pflanze	Bestimmter Genotyp	Bonitur 1, 05.04.2017	Bonitur 2, 09.05.2017
1	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
2	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
3	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Ja ^{*/**}
4	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
5	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
6	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Ja ^{*/**}
7	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Ja [*]
8	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
9	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
10	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
11	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
12	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Ja ^{*/**}
13	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
14	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
15	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
16	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Ja ^{*/**}
17	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Ja [*]
18	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
19	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Ja ^{*/**}
20	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Ja ^{*/**}
21	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
22	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
23	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
24	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
* Dunkle Flecken am Stängel, braune Blattränder bzw. Blattspitzen			
** Haupttrieb verkümmert			
Mit * gekennzeichnete Symptome treten bei 8 Pflanzen auf (33%). Bei 6 Pflanzen (24 %) treten mit * und mit ** gekennzeichnete Symptome auf.			
Verteilung der Genotypen		Absolut	Relativ
<i>tm-2/tm-2</i>		0	0 %
<i>tm-2/Tm-2a</i>		24	100 %
<i>Tm-2a/Tm-2a</i>		0	0 %

Aufgrund der eindeutig erkennbaren Segregation der Symptome der Pflanzen des Kultivars Goldita EP 1 wurden alle 24 Pflanzen genotypisch untersucht. Die Daten dazu sind in Tabelle 18 dargestellt und werden in Abschnitt 3.3 beschrieben und diskutiert (vgl. Tabelle 12, S. 61).

Tabelle 18 - Ergebnisse des Inokulations-Versuchs des segregierenden Kultivars Goldita EP1. Die ermittelten Genotypen (siehe Schattierung) sind den Ergebnissen der Bonituren gegenübergestellt. Die Verteilung der Genotypen der Stichprobe sind dem unteren Teil der Tabelle zu entnehmen.

Goldita EP 1		Symptome	
Pflanze	Bestimmter Genotyp	Bonitur 1, 05.04.2017	Bonitur 2, 09.05.2017
1	<i>tm-2/tm-2</i>	Ja	Ja
2	<i>tm-2/tm-2a</i>	Nein*	Nein*
3	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
4	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
5 ^x	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Ja ^x	Ja ^x
6 ^x	<i>tm-2/tm-2</i>	Nein ^x	Nein ^x
7 ^x	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Ja ^x	Ja ^x
8	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
9	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
10	<i>tm-2/tm-2</i>	Ja	Ja
11	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein*	Nein**
12	<i>tm-2/tm-2</i>	Ja	Ja
13	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Nein	Nein
14	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
15	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Nein	Nein
16	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
17	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
18	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
19	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
20	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
21	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein*	Nein**
22	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
23	<i>tm-2/Tm-2a</i>	Nein	Nein
24	<i>Tm-2a/Tm-2a</i>	Nein	Nein
* Schwaches Erscheinungsbild			
** Schwaches Erscheinungsbild und Flecken			
^x Für die Pflanzen 5, 6 und 7 wurden andere Genotypen bestimmt, als aufgrund der gezeigten Symptome zu erwarten war.			
Verteilung der Genotypen		Absolut	Relativ
<i>tm-2/tm-2</i>		4	16,67 %
<i>tm-2/Tm-2a</i>		16	66,67 %
<i>Tm-2a/Tm-2a</i>		4	16,67 %

Mittels eines Chi-Quadrat-Tests wurde überprüft, ob die Abweichung der tatsächlichen Genotypen-Verteilung (Analysen-Ergebnisse) von der nach der mendelschen Spaltungsregel zu erwartenden Genotypen-Verteilung von 1:2:1 (Graw, 2015) des Kultivars Goldita EP1 im zulässigen Bereich ist. Die aufgestellte Nullhypothese geht davon aus, dass die beobachtete Abweichung der Verteilung der Genotypen in der Stichprobe (1:4:1) tatsächlich der erwarteten Verteilung (1:2:1) in der Grundmenge entspricht. Die Berechnung von Chi-Quadrat wurde nach Griffiths et al. (2000) durchgeführt (siehe Tabelle 19). Der χ^2 -Wert wurde für zwei Freiheitsgrade (2dF) errechnet: $\chi^2(2, N=24)=2,67$, $p \geq 0,05$. Die Nullhypothese ist daher gültig. Das Ergebnis wird in Abschnitt 3.3 diskutiert.

Tabelle 19 - Chi-Quadrat-Test nach Griffiths et al. (2000). Der im oberen Teil der Tabelle errechnete χ^2 -Wert, weist auf den im unteren Teil der Tabelle (Kritische Werte der χ^2 -Verteilung) grau schattierten p-Wert von $\leq 0,5$ hin.

Genotypen	Observed (O): Bestimmte Genotypen-Verteilung	Expected (E): Erwartete Genotypen-Verteilung	(O-E) ²	((O-E) ²)/E					
tm-2/tm-2	4	6	4	0,67					
tm-2/Tm-2a	16	12	16	1,33					
Tm-2a/Tm-2a	4	6	4	0,67					
χ^2 -Wert: 2,67									
Kritische Werte der χ^2 -Verteilung, 2 Freiheitsgrade									
2 dF	p-Wert								
	0.995	0.975	0.9	0.5	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
χ^2 -Wert:	0.010	0.051	0.211	1.386	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597

A 4 Sequenzanalysen

Im Anschluss sind schematische Darstellungen der mit Vector NTI® durchgeführten Sequenzanalysen der einzelnen Allele des *Tm-2*-Gens dargestellt. Die Sequenzanalysen wurden von Mag. Dr. rer. nat. Alexandra Jammer durchgeführt.

CAPS-Analyse

Die schematischen Darstellungen der Abb. 83 bis Abb. 85 geben Aufschluss über die durch den Enzymverdau der CAPS-Analyse entstehenden Fragmente. Die Fragmentgrößen hängen vom Vorhandensein oder von der Abwesenheit der Restriktionsschnittstellen ab. Die Primer PrRuG151F und PrRuG086R führen bei einer PCR zu einem amplifizierten 1085 bp-Fragment. Die Primerbindestellen befinden sich in Bereichen des Gens, welche für alle drei Allele homolog sind. Der Forward-Primer liegt mitten im ORF des *Tm-2*-Gens, der Reverse-Primer liegt 46 Nukleotide downstream des ORFs. Bei der CAPS-Analyse entsteht für jedes der Allele *tm-2*, *Tm-2* und *Tm-2a*, sowie für alle heterozygoten Kombinationen ein charakteristisches Schnittmuster (siehe Abschn. 2.9.3).

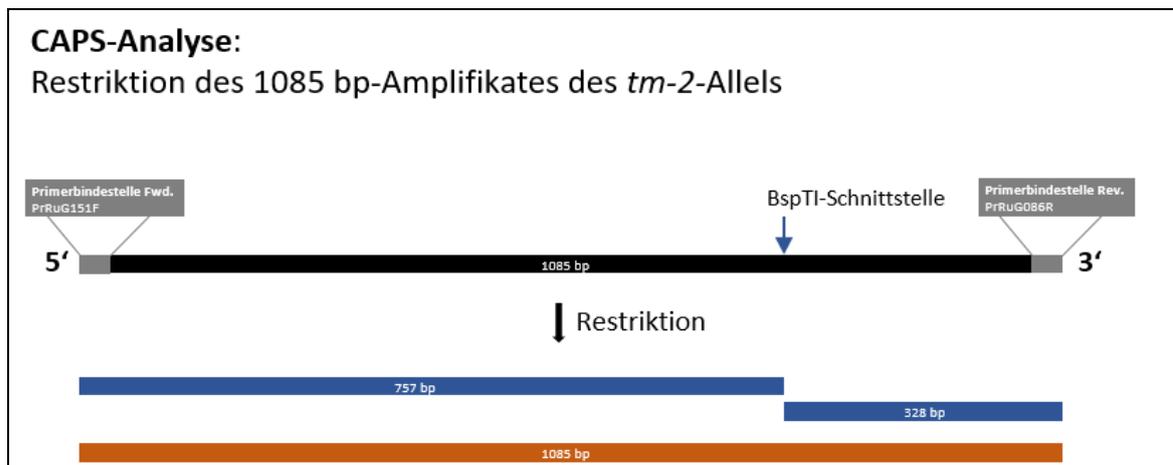


Abb. 83 - CAPS-Analyse: Schematische Darstellung des *tm-2*-Allels (S-Allel) und der Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym *BspTI*. Für das Restriktionsenzym *HpaI* ist in diesem Allel keine Restriktionsschnittstelle vorhanden. Die entsprechenden Fragmente der Restriktion sind für *HpaI* orange und für *BspTI* blau dargestellt.

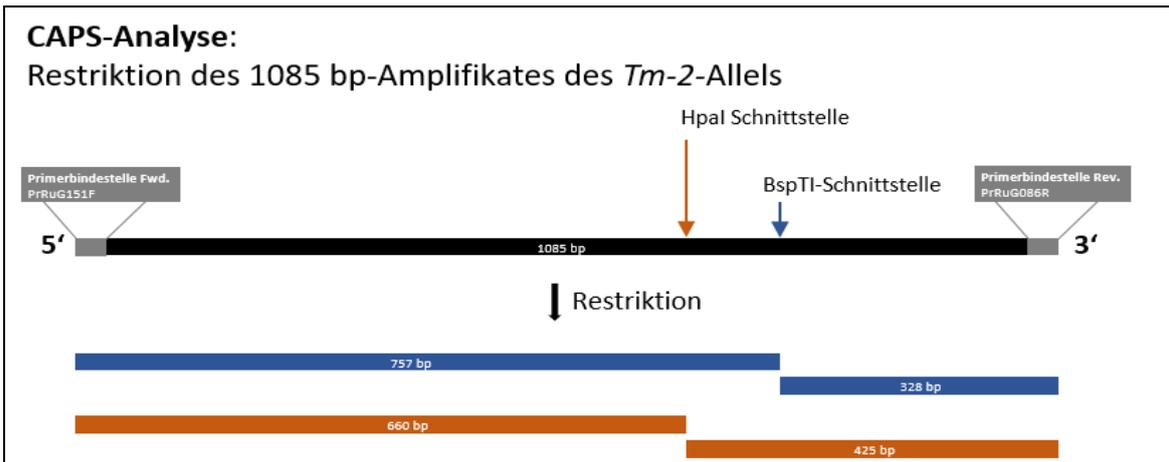


Abb. 84 - CAPS-Analyse: Schematische Darstellung des *Tm-2*-Allels (R-Allel) und der Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme *HpaI* und *BspTI*. Die entsprechenden Fragmente der Restriktion sind für *HpaI* orange und für *BspTI* blau dargestellt.

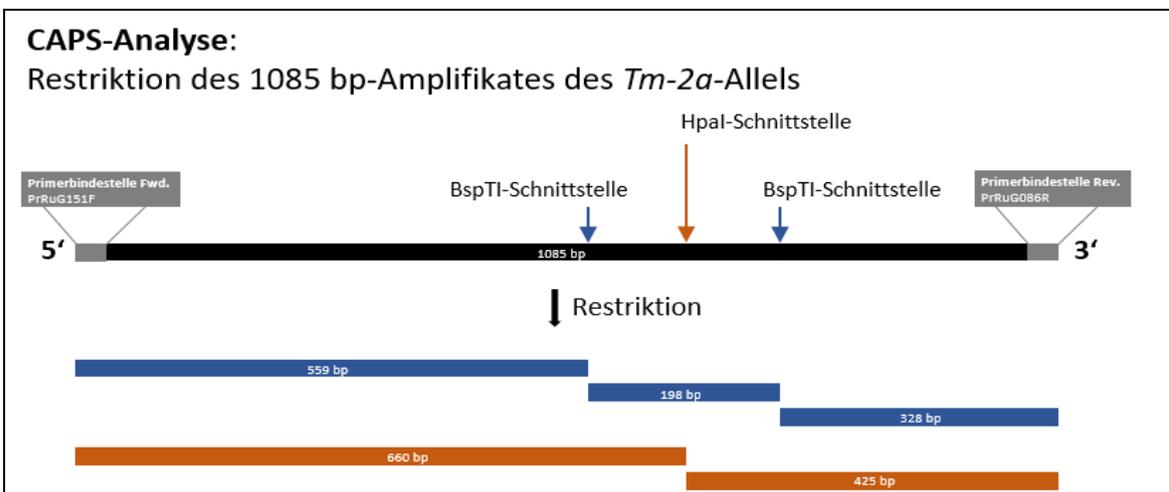


Abb. 85 - CAPS-Analyse: Schematische Darstellung des *Tm-2a*-Allels (R-Allel) und der Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme *HpaI* und *BspTI*. Die entsprechenden Fragmente der Restriktion sind für *HpaI* orange und für *BspTI* blau dargestellt.

Tetra-Primer-ARMS-PCR

Die Tetra-Primer-ARMS-PCR basiert auf der Mismatch-Strategie (siehe Abschnitt 1.3.2 und Abschnitt 2.10.1). Wann es zur Amplifikation und damit zur Ausbildung einer Bande am Agarosegel kommt, hängt hier von den Primerbindungen ab. In Abb. 86 bis Abb. 88 sind die Bandengrößen entstehender PCR-Produkte der Tetra-Primer-ARMS-PCR und deren Mismatches dargestellt. Im Anschluss wird erläutert, wie durch spezifische Amplifikation der drei beschriebenen Resistenz-Allele unterscheidbare Amplifikate unterschiedlicher Größe hervorgebracht werden.

Das *tm-2*-Allel bringt bei Durchführung von Assay 1 (siehe Abb. 86) das 416 bp-Kontrollamplifikat hervor, da der Outer Rev.-Primer trotz eines Mismatches

binden kann. Weil es sich beim *tm-2*-Allel nicht um ein Resistenz-Allel handelt, weisen die Inner-Primer wenig Homologie mit der Allel-Sequenz auf. Drei Mismatches im Inner Rev.-Primer und sieben Mismatches im Inner Fwd.-Primer verhindern die Primerbindungen, sodass kein weiteres Amplifikat hervorgebracht wird. Die Outer-Primer von Assay 2 (siehe Abb. 86) bringen das 509 bp-Kontrollamplifikat hervor. Während der Inner Rev.-Primer aufgrund zweier Mismatches nicht binden kann, erfolgt trotz eines einzelnen Mismatches die Bindung des Inner Fwd.-Primer und es wird das 381 bp-Amplifikat hervorgebracht.

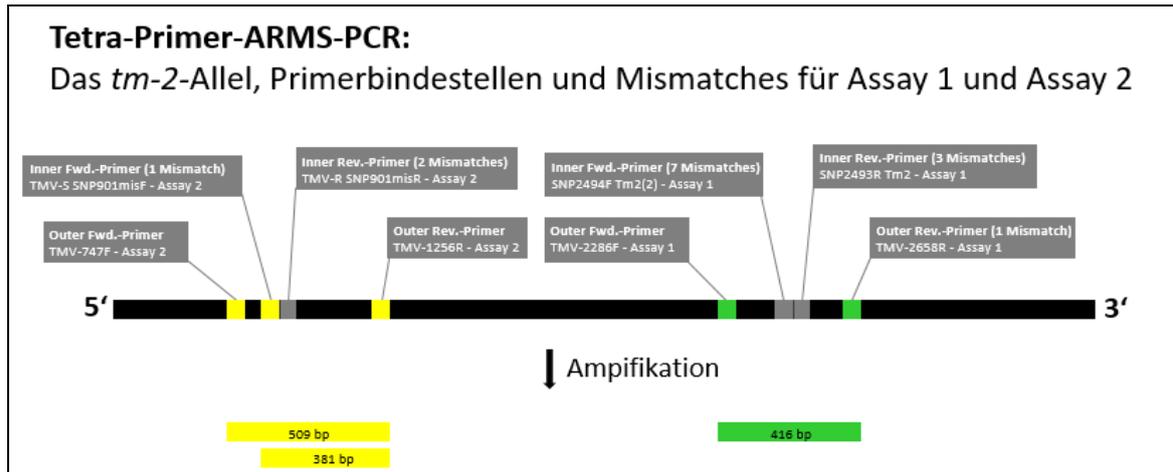


Abb. 86 - Tetra-Primer-ARMS-PCR: Schematische Darstellung des *tm-2*-Allels (S-Allel) und dessen Primerbindestellen (inkl. Mismatches) für Assay 1 und Assay 2. Die Primerbindestellen sind für Assay 2 gelb und für Assay 1 grün dargestellt. Grau markierte Primerbindestellen führen in diesem Allel zu keinem Amplifikat.

Assay 1 des *Tm-2*-Allels (siehe Abb. 87) bringt das 416 bp-Kontrollamplifikat und das 254 bp-Amplifikat hervor. Letzteres kann aufgrund der Primerbindungen des Outer Fwd.-Primers und des Inner Rev.-Primer amplifiziert werden (der Inner Rev.-Primer besitzt keinen Mismatch). Der Inner Fwd.-Primer besitzt hingegen drei Mismatches, kann daher nicht binden und bringt kein PCR-Produkt hervor. Assay 2 des *Tm-2*-Allels (siehe Abb. 87) bringt das 509 bp-Kontrollamplifikat hervor. Des Weiteren wird durch die Primerbindungen des Outer Fwd.-Primers und des Inner Rev.-Primers (1 Mismatch) das 185 bp-Amplifikat hervorgebracht. Der Inner Fwd.-Primer kann aufgrund zweier Mismatches nicht binden.

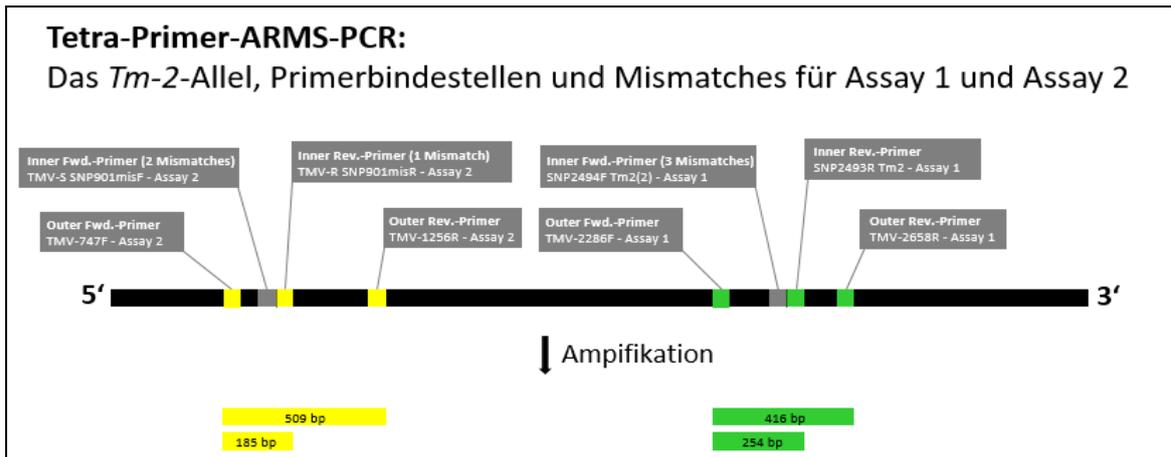


Abb. 87 - Tetra-Primer-ARMS-PCR: Schematische Darstellung des *Tm-2*-Allels (R-Allel) und dessen Primerbindestellen (inkl. Mismatches) für Assay 1 und Assay 2. Die Primerbindestellen sind für Assay 2 gelb und für Assay 1 grün dargestellt. Grau markierte Primerbindestellen führen in diesem Allel zu keinem Amplifikat.

Das *Tm-2a*-Allel bringt in Assay 1 (siehe Abb. 88) neben dem 416 bp-Kontrollamplifikat durch die Primerbindungen des Inner Fwd.- Primers (1 Mismatch) und des Outer Rev.-Primers auch das 214 bp-Amplifikat hervor. Der Inner Rev.-Primer kann aufgrund zweier Mismatches nicht binden und bringt kein Amplifikat hervor. Assay 2 des *Tm-2a*-Allels (siehe Abb. 88) bringt das 509 bp-Kontrollamplifikat hervor. Der Inner Rev.-Primer kann trotz eines einzelnen Mismatches binden, sodass durch das Binden des Outer Fwd.-Primers und des Inner Rev.-Primers das 185 bp-Amplifikat hervorgebracht wird. Der Inner Fwd.-Primer kann aufgrund zweier Mismatches nicht binden und bringt kein Amplifikat hervor.

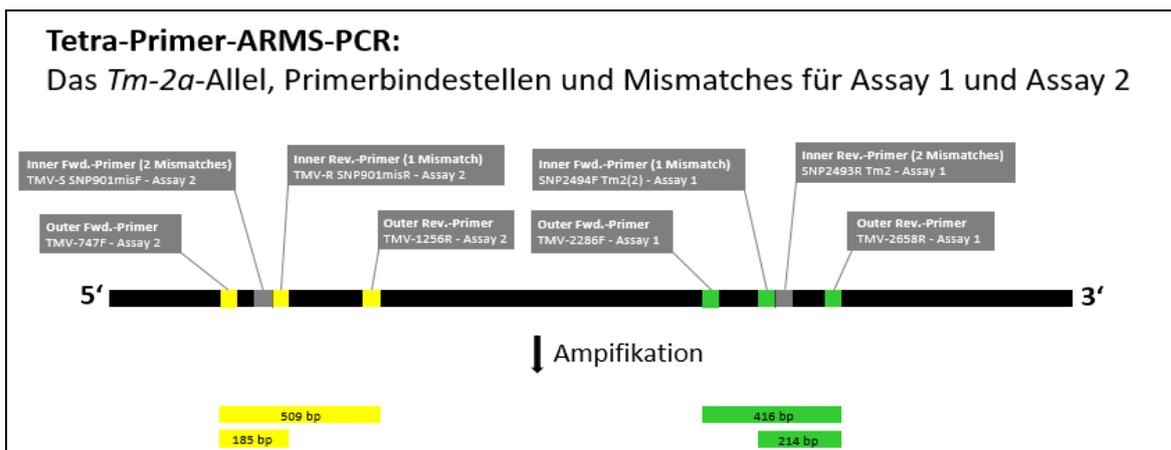


Abb. 88 - Tetra-Primer-ARMS-PCR: Schematische Darstellung des *Tm-2a*-Allels (R-Allel) und dessen Primerbindestellen (inkl. Mismatches) für Assay 1 und Assay 2. Die Primerbindestellen sind für Assay 2 gelb und für Assay 1 grün dargestellt. Grau markierte Primerbindestellen führen in diesem Allel zu keinem Amplifikat.

Bei der Tatra-Primer-ARMS-PCR entsteht für jedes der Allele *tm-2*, *Tm-2* und *Tm-2a*, sowie für alle heterozygoten Kombinationen ein charakteristisches Bandenmuster (siehe Abschnitt 2.10.3).