

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Sortendifferenzierung von Sonnenblumen und Weinreben mittels
hochauflösender Schmelzkurvenanalyse

verfasst von | submitted by

Jakob Scheibelreiter BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 659

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Lebensmittelchemie

Betreut von | Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl

Danksagung

Ich möchte mich bei Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl für ihre herausragende und wertschätzende Betreuung bedanken. Ebenso möchte ich ihrem Team für seine Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft danken; im Besonderen Katharina Pühringer, die mich in den Umgang der Geräte eingeführt hat und stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Violeta Ivanova-Petropulos (Goce Delcev University of Štip, Republic of North Macedonia), Dr. Michael Gohn (Probstdorfer Saatzucht) und DI Andreas Ratzenböck (AGES) für die Bereitstellung der Proben und die Beantwortung von Fragen danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt meiner Kommilitonengruppe, den „Party People“, für den Zusammenhalt und die gegenseitige Unterstützung, die mein Studium erleichtert und bereichert haben, sowohl akademisch als auch persönlich.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Gewöhnliche Sonnenblume (<i>Helianthus annuus</i>).....	2
1.1.1	Geschichte, Kultivierung und Nutzung der Pflanzenart Sonnenblume	2
1.1.2	Zusammensetzung von Sonnenblumenkernen	2
1.1.3	Analysemethoden zur Unterscheidung von Sonnenblumensorten.....	3
1.2	Weinrebe (<i>Vitis vinifera</i>)	6
1.2.1	Geschichte, Kultivierung und Nutzung der Weinrebe	6
1.2.2	Analysemethoden für Weinrebsorten	6
1.2.3	Weinfälschung und Methoden für die Authentifizierung von Wein.....	7
1.3	Züchtung neuer Sorten	9
1.3.1	Klonzüchtung	9
1.3.2	Linienzüchtung.....	10
1.3.3	Populationszüchtung	11
1.3.4	Hybridzüchtung.....	12
2	Ziele	14
3	Theoretischer Hintergrund	15
3.1	DNA-Extraktion aus pflanzlichen Proben für die PCR	15
3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
3.3	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM)	19
3.4	Agarosegelelektrophorese	21
4	Experimenteller Teil.....	22
4.1	Sonnenblumenproben	22
4.1.1	DNA-Extraktion	24
4.1.2	Messung der DNA-Konzentration mit dem Qubit 4 Fluorometer.....	27
4.1.3	Primerspaare für Sonnenblumen	27
4.2	Weinproben	28
4.2.1	DNA-Extraktion und Messung der DNA-Konzentration	29
4.2.2	Primerpaare für Wein	29
4.3	PCR-HRM	29
4.4	Agarosegelelektrophorese	31
5	Ergebnisse und Diskussion.....	33
5.1	Sonnenblumenproben	33
5.1.1	Fluorometrische Bestimmungen der DNA-Konzentrationen	33
5.1.2	Optimierung der Annealingtemperatur der Primerpaare	35
5.1.3	Diskriminierung der Referenzsorten/Standardmuster	36

5.1.4	Diskriminierung von Sonnenblumensorten – unbehandelte Proben von der AGES	49
5.1.5	Diskriminierung von Sonnenblumensorten – behandelte/gebeizte Proben von der AGES	51
5.1.6	Diskriminierung von Sonnenblumensorten – Proben von Saatgut Austria	54
5.1.7	Vergleich der Ergebnisse für mehrere Proben von ein und derselben Sorte	58
5.2	Weinproben	64
5.2.1	Fluorometrische Bestimmungen der DNA-Konzentrationen	64
5.2.2	Optimierung der Annealingtemperatur der Primerpaare	66
5.2.3	Unterscheidung der nordmazedonischen Weinsorten mittels HRM	67
5.2.4	Einfluss des geografischen Anbaugebiets auf den Schmelzkurvenverlauf	72
5.2.5	Differenzierung der Rebsorte Vranec, des „Königs“ der mazedonischen Rebsorten, von anderen mazedonischen Rebsorten	76
6	Conclusio	79
7	Materialien	82
7.1	Verwendete Chemikalien	82
7.2	Verbrauchsmaterialien	83
7.3	Instrumente	83
7.4	Software	84
7.5	Webserver	84
8	Quellen	85
9	Anhang	90
9.1	Abstract	90
9.2	Zusammenfassung	91
9.3	Schmelzkurven der Sonnenblumensorten	92
9.3.1	Schmelzkurven (Sonnenblumen) der Referenzsorten in Doppelbestimmung	92
9.3.2	Schmelzkurven (Sonnenblumen) der unbehandelten Proben in Doppelbestimmung	94
9.3.3	Schmelzkurven (Sonnenblumen) der gebeizten Proben in Doppelbestimmung	95
9.3.4	Schmelzkurven (Sonnenblumen) von Saatgut Austria Proben in Doppelbestimmung ...	96
9.4	Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen Weinsorten mit Hilfe von den Primerpaaren VVS2, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 und VrZAG79	98
9.5	Abkürzungsverzeichnis	100
9.6	Tabellenverzeichnis	101
9.7	Abbildungsverzeichnis	102
9.8	Liste der Primerpaare für die Differenzierung der Sonnenblumensorten	106
9.9	Liste der Primerpaare für die Differenzierung der Weinsorten	107

1 Einleitung

Effiziente, geprüfte landwirtschaftliche Sorten bilden zusammen mit einwandfreiem Saat- und Pflanzengut sowie einer vielfältigen genetischen Ressourcenvielfalt die Grundlage für die Produktion hochwertiger Lebensmittel.¹ In der Pflanzenzüchtung bezeichnet der Begriff „Sorten“ erbefeste Varianten einer Pflanzenart. Um als Sorte anerkannt zu werden, muss sie sich durch verschiedene Merkmale, wie beispielsweise Inhaltsstoffe oder Größe von anderen Sorten derselben Art unterscheiden. Darüber hinaus müssen ihre charakteristischen Eigenschaften regelmäßig reproduzierbar sein. Für die Zulassung neuer Sorten existieren in den meisten Staaten Gesetze und Verfahren, welche die Registrierung neuer Sorten festlegen.² Für die Differenzierung von Sorten können sowohl phänotypische als auch genotypische Merkmale herangezogen werden. Für Sonnenblumen können das zum Beispiel agronomische Eigenschaften, Resistenzen, Ölzusammensetzung, Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) oder Mikrosatelliten (SSR) sein.^{2,3}

Die Polymerase-Kettenreaktion mit anschließender hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (PCR-HRM) ist ein vielversprechender Ansatz für eine Sortendifferenzierung. Sie ist ein preiswertes, spezifisches und schnelles Verfahren, das die Unterscheidung genetisch verwandter Pflanzen ermöglicht. Geringfügige Unterschiede der Basenabfolge haben ein unterschiedliches Schmelzverhalten der doppelsträngigen DNA zur Folge.^{4,5} Im ersten Teil dieser Masterarbeit sollte überprüft werden, ob sich die PCR-HRM für die Differenzierung von Sonnenblumensorten, die Sorten auf der österreichischen Sortenliste⁶ miteinbezogen, eignet.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Möglichkeit, mazedonische Weinsorten ebenfalls mit Hilfe der PCR-HRM zu differenzieren. Moore et al. untersuchten zwischen 1980 und 2010 Warengruppen auf deren Authentizität. Neben Olivenöl, Milch und Honig zählt auch Wein zu den am häufigsten verfälschten Lebensmitteln. Dabei wurde bei Herkunft, Reinheit, Jahrgang und Etikettierung betrogen oder Wasser, Zucker oder Ethylenglykol zugesetzt.⁷ Diese Arbeit zielte darauf ab festzustellen, ob die PCR-HRM für die Identifizierung verschiedener Rebsorten geeignet ist. Als Probe wurden jedoch Weinblätter und nicht der fertige Wein verwendet.

1.1 Gewöhnliche Sonnenblume (*Helianthus annuus*)

1.1.1 Geschichte, Kultivierung und Nutzung der Pflanzenart Sonnenblume

Archäologische Belege sprechen dafür, dass die domestizierte Sonnenblume ihren Ursprung in den zentralen und östlichen Staaten der USA hat. Sie entstand aus der wilden *H. annuus*, welche den amerikanischen Ureinwohnern als Nahrungsmittel diente und sich dadurch rasch ausbreiten konnte. Diese unkrautartige Sonnenblume wurde domestiziert und von vielen Stämmen im östlichen Nordamerika, im gesamten Mittleren Westen bis in den Süden Nordmexikos angebaut. Die ersten nachweisbaren Anpflanzungen dieser domestizierten Varianten reichen etwa 2850 Jahre zurück. Im frühen 16. Jahrhundert wurde die Sonnenblume durch spanische, englische und französische Entdecker nach Europa eingeführt. Sie verbreitete sich in ganz Europa, wobei sie zunächst als Zierpflanze angebaut wurde. Zu Beginn des 17. Jahrhunderts fand die Sonnenblume Verwendung als Nahrungsmittel, sowohl in Form von Sonnenblumenkernen als Snack als auch in Form des durch Pressen gewonnenen Öls. In den 1860er Jahren begann die aktive Selektion im Sonnenblumenanbau auf einen möglichst hohen Ölgehalt. Heute beschäftigen sich die Züchter neben der Steigerung des Ölgehalts und der Ölqualität mit Samenertrag, Zykluslänge und biotischen sowie abiotischen Resistenzen.⁸

1.1.2 Zusammensetzung von Sonnenblumenkernen

Die durchschnittlichen Nährwerte von 100 g getrockneten Sonnenblumensamen sind in Tabelle 1 aufgelistet.⁹

Tabelle 1: Durchschnittliche Zusammensetzung von 100 g getrockneten Sonnenblumensamen

Fett	49,0 g
Eiweiß	22,5 g
Kohlenhydrate	12,3 g
Wasser	6,6 g
Ballaststoffe	6,3 g

Der größte Teil des wirtschaftlichen Wertes der Sonnenblume stammt aus dem gewonnenen Öl. Sonnenblumenöl ist aufgrund seines hohen Gehalts an ungesättigten Linolsäuren, seines geringen Linolensäuregehalts, des Fehlens toxischer Verbindungen und seiner hervorragenden ernährungsphysiologischen Eigenschaften ein hochwertiges Öl. Linolsäure ist eine essenzielle Fettsäure, die vom Menschen nicht synthetisiert wird und die Vorstufe von Gamma-Linolensäure und Arachidonsäure ist. Herkömmliches Sonnenblumenöl besteht hauptsächlich aus gesättigten C16:0-Palmitinsäuren (7 g/100 g) und C18:0-Stearinsäuren (4 g/100 g), einfach ungesättigten

C18:1-Ölsäuren (20 g/100 g) und mehrfach ungesättigten C18:2-Linolsäuren (69 g/100 g), wobei Ölsäure und Linolsäure etwa 89 % der Gesamtmenge ausmachen.⁸

Durch den hohen Gehalt an Linolsäure ist herkömmliches Sonnenblumenöl oxidations- und hitzeempfindlich und deswegen beispielsweise als Bratöl und zum Frittieren ungeeignet. Durch Züchtung wurden Sorten entwickelt, bei denen der Anteil an Ölsäure zugunsten von Linolsäure reduziert wurde. So gibt es Hybride mit einem mittleren Ölsäuregehalt (Mid-Oleic) und einem hohen Ölsäuregehalt (High-Oleic). Letztere haben eine durchschnittliche Fettsäurezusammensetzung von 80 % Ölsäure, 6 % Palmitinsäure, 3 % Stearinsäure und nur rund 8 % Linolsäure. Solche Ölsorten werden in der Lebensmittelindustrie bevorzugt, da ein hoher Anteil an Ölsäure und gesättigten Fettsäuren die Stabilität und Frittierfähigkeit des Öls erhöht.^{8,10}

Mit einem Proteingehalt von 22,5 g pro 100 g sind Sonnenblumensamen für die menschliche und tierische Ernährung als pflanzliche Proteinquelle von Bedeutung. Eine Erhöhung des Proteingehalts und eine Verbesserung des Aminosäureprofils sind deswegen auch wichtige Zuchtziele. Die biologische Wertigkeit, ein Maß für die Effizienz, mit der der Körper die Nahrungsproteine in körpereigene umsetzen kann, beträgt für Sonnenblumenextraktionsschrot 68 (Vollei = 100).¹¹ Die Aminosäurezusammensetzung ist mit Ausnahme von Lysin ausgewogen (nach Empfehlung der WHO) und reich an schwefelhaltigen Aminosäuren, wodurch eine Kombination mit Hülsenfrüchteproteinen, welche reich an Lysin, aber arm an schwefelhaltigen Aminosäuren sind, zu empfehlen ist.¹² Die technologisch funktionellen Eigenschaften des Sonnenblumenproteins sind jedoch nicht so vielversprechend. Die emulgierenden Eigenschaften sind zwar vergleichbar mit Sojaprotein, die Geliereigenschaften und Schaumbildung überzeugen jedoch nicht.¹³

Für die menschliche Ernährung spielen Sonnenblumenmehl sowie Proteinkonzentrate und -isolate in Backwaren, Säuglingsnahrung, Nahrungsergänzungsmitteln, Fleischersatz und Fleischzusatzstoffen eine Rolle.^{8,14}

1.1.3 Analysemethoden zur Unterscheidung von Sonnenblumensorten

Die Sonnenblume wird zwar schon seit langem als Kulturpflanze angebaut, die genetische Forschung ist im Vergleich zu anderen landwirtschaftlichen Pflanzen jedoch weniger fortgeschritten. So wird oft die phänotypische Variabilität von Sonnenblumensorten zur Unterscheidung herangezogen. Das können unter anderem Wuchshöhe, Stängeldurchmesser, Zahl der Verzweigungen, Länge der Blätter, Korbdurchmesser oder Ölgehalt sein. Die Differenzierung anhand der Morphologie ist einfach und billig, hat aber Nachteile, da diese von Umwelteinflüssen und dem Wachstumsstadium der Pflanze beeinflusst wird. Zusätzlich zeigt die Sonnenblume eine geringe genetische Variabilität.^{11,15}

DNA-basierte Techniken eignen sich für den Nachweis von Polymorphismen und zeichnen sich durch ihre hohe Reproduzierbarkeit aus. Polymorphismen in der DNA sind unabhängig von Umwelteinflüssen oder dem Wachstumsstadium der Pflanze. Im folgenden Abschnitt werden kurz einige DNA-Marker Techniken und Strategien beschrieben, die für die Genomkartierung von Sonnenblumensorten eingesetzt wurden.^{15,16}

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

RFLP bezeichnet eine genetische Variabilität, die auf Unterschiede in den Längen von DNA-Fragmenten beruht, die durch Restriktionsenzyme verursacht werden. Dabei werden DNA-Proben mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend die entstandenen Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Genetische Unterschiede führen zu unterschiedlichen Restriktionsstellen, wodurch ein einzigartiges Muster von Fragmenten entsteht.¹⁷

Amplified fragment-length polymorphism (AFLP)

Die AFLP kombiniert die RFLP mit einer PCR. Dabei wird die DNA mittels Restriktionsenzymen verdaut und durch die Ligation Adaptermoleküle an den Enden der DNA-Fragmente angebracht. Mittels PCR werden nun die Fragmente vervielfältigt, wobei Primer eingesetzt werden, welche die Gegensequenzen der Adapter aufweisen. Im nächsten Schritt erfolgt eine weitere, gezielte Amplifikation der Restriktionsfragmente durch das Hinzufügen von ein bis drei spezifischen Nukleotiden an den 3'-Enden der Primer. Hierbei werden ausschließlich die Fragmente amplifiziert, deren Sequenzvariation mit den flankierenden Nukleotiden der Restriktionsstellen übereinstimmt. Abschließend erfolgt die Analyse der amplifizierten Fragmente mittels Elektrophorese.¹⁵

Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

SNP ist eine genetische Variation, die sich an einer einzigen Position in der DNA-Sequenz zwischen homozygoten Individuen, oder zwischen gepaarten Chromosomen eines heterozygoten Individuums, manifestiert. Es ist die häufigste Art der genetischen Variation und wird meist via DNA-Sequenzierung bestimmt. Theoretisch wäre es möglich, dass ein SNP vier Allele hat, da es vier mögliche Nukleotide an einer Nukleotidposition gibt. Praktisch haben jedoch fast alle SNPs nur zwei Allele und kommen sowohl in nicht-codierenden Genabschnitten als auch in codierenden Genabschnitten vor. In Pflanzengenomen liegt die übliche Häufigkeit von SNPs bei einem pro 100-300 bp. Bei der Sonnenblume wurde eine hohe Häufigkeit von SNPs festgestellt.¹⁵ Liu und Burke beschrieben und verglichen Nukleotid-Polymorphismen bei wilden und kultivierten Sonnenblumen. In ihrer Studie analysierten sie neun genomische Loci mit einer Gesamtlänge von 8207 Basenpaaren bei 32 Individuen. Die Ergebnisse zeigten im Durchschnitt einen SNP pro 16,8 Basenpaaren.¹⁸ Fusari et al. untersuchten 28 Gene, welche

mit biotischem und abiotischem Stress assoziiert sind, und fanden durchschnittlich alle 69 bp einen SNP.¹⁹

Simple Sequence Repeats/ Short tandem repeats/ Mikrosatelliten (SSR/STR)

Mikrosatelliten sind DNA-Abschnitte, die durch wiederholte di-, tri-, tetra-, oder penta-Nukleotidmotive gekennzeichnet und im gesamten Genom weit verbreitet sind. Beispiele für Mikrosatelliten sind CACACA... oder CATCATCAT... . Darüber hinaus unterscheidet man „perfect SSR“, bei denen die Wiederholungssequenz identisch und ohne Abweichungen vorkommt, und die „imperfect SSR“, bei denen leichte Variationen und Abweichungen in den Wiederholungseinheiten auftreten. Da sich die Anzahl der Wiederholungen bei verschiedenen Individuen einer Art unterscheidet, sind sie für eine Genanalyse zur Sortendiskriminierung geeignet. Für die Analyse werden DNA-Abschnitte, welche SSR enthalten, mit Hilfe der PCR vervielfältigt und danach die Länge der Amplicons mittels Elektrophoreseverfahren bestimmt oder durch DNA-Sequenzierung die Nukleotidabfolge bestimmt. Die hohe Polymorphie, die große Häufigkeit, die kodominante Vererbung und die einfache Analyse machen SSR zum bevorzugten Marker für genomische Studien.¹⁵ Es wurden bereits zahlreiche SSR-Marker für Sonnenblumen identifiziert, die zur Erstellung von Genkarten verwendet wurden. Außerdem wurden die Allelhäufigkeiten analysiert und die Heterozygotie berechnet.^{20–22} Liu et al. untersuchten die genetische Diversität von 32 Sonnenblumenlinien, indem sie 17 Mikrosatelliten mittels PCR vervielfältigten und anschließend eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse durchführten.²³

1.2 Weinrebe (*Vitis vinifera*)

1.2.1 Geschichte, Kultivierung und Nutzung der Weinrebe

Weintrauben werden seit Jahrhunderten als Nahrungsmittel sowie als Rohstoff für die Weinherstellung verwendet. Dem ersten Buch Mose folgend habe Noah nach der Flut einen Weinberg angelegt. In der griechischen Mythologie gibt es einen Gott des Weines, Dionysos, der unter anderem für die Weinherstellung und den Weinbau verantwortlich ist. Trotz der vielen geschichtlichen Erwähnungen sind die Geschichte, der Ursprung und die Domestizierung der Weinrebe nicht vollständig geklärt. Sowohl archäologische als auch genetische Untersuchungen legen nahe, dass bereits vor dem Aufkommen der Landwirtschaft der Mensch sich mit Weintrauben beschäftigt hat. Dieser Kontakt könnte bis vor 20000 Jahren in der Transkaukasusregion stattgefunden haben, welche als Zentrum für die Domestizierung der Weinrebe gilt und der Weinbau etwa 11000 Jahre v. Chr. begann.²⁴ Ein extensiver Anbau von Weintrauben wird während der Bronzezeit durch zahlreiche Pressen und Überreste von Lagedeinrichtungen belegt.²⁵ Auch noch heute sind Weintrauben eine, wenn nicht die wichtigste Gartenbaupflanze der Welt. Stand 2022 beträgt die Gesamtanbaufläche von Weinreben 7 254 512 ha, wobei die drei Hauptanbaugebiete Italien, Frankreich und Spanien sind.²⁶ Produkte sind neben dem Wein auch noch Traubensaft, Tafeltrauben, Rosinen, Brände, Extrakte sowie Öle.²⁴

1.2.2 Analysemethoden für Weinrebsorten

Die Phänotypisierung von Weinreben umfasst die Bewertung von Merkmalen wie zum Beispiel Wachstum, Entwicklung, Toleranz, Architektur, Physiologie, Chemie und Ertrag. Die Untersuchungen erfolgen durch Experten, die sich meistens an standardisierte Deskriptoren orientieren und welche die Basis für die Beschreibung von Rebsorten bilden. Die Deskriptor Liste, welche von der International Organisation of Vine and Wine (OIV) publiziert wird, umfasst eine Vielzahl von Informationen, darunter Aspekte wie Blattform, Traubenform, Traubenfarbe, Reifezeitpunkt, Samengewicht und viele andere Eigenschaften, die bei der Unterscheidung und Klassifikation von Rebsorten relevant sind.^{24,27}

Viele dieser Deskriptoren sind jedoch subjektiv und erfassen nicht die gesamten Merkmalvariationen. Genetische Methoden bieten hingegen Objektivität und Präzision und sind unabhängig von Umweltfaktoren. Darüber hinaus haben sie einen hohen Probendurchsatz im Gegensatz zu den morphologischen Methoden.

Die am häufigsten verwendeten DNA-Marker bei der Weinrebe sind RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), AFLP, SSR und SNP, wobei die letzten drei schon im Abschnitt 1.1.3. beschrieben worden sind.²⁴ In der Literatur lassen sich viele Studien finden, welche die Variabilität der Mikrosatelliten bei Rebsorten untersuchten, um Sorten und Herkunft zu beurteilen. Meist werden dabei nach der Amplifikation die PCR-Produkte sequenziert, wodurch auch die Zahl der Allele sowie die

Heterozygotie berechnet werden kann.^{28,29} Barrias et al. verglichen drei verschiedene Strategien, um 19 Weinrebsorten auf einem portugiesischen Weinberg zu identifizieren: SSR-Multiplex-PCR, SNP-Genotypisierung und HRM-Assays, bei denen Genfragmente mit mehreren SNPs untersucht worden sind. Die HRM erwies sich dabei als geeignet für die Identifizierung der Sorten durch den Vergleich von Schmelzkurvenprofilen, wenn Referenzmaterial verfügbar ist.³⁰

Der Vitis International Variety Catalogue (VIVC) ist eine Datenbank, welche Informationen wie Namen, Synonyme, Ursprung, morphologische Merkmale, geografische Verbreitung und genetische Eigenschaften sammelt und zur Verfügung stellt. Genetische Marker der Datenbank sind SNPs und neun Mikrosatelliten. Die Längen der Mikrosatelliten-Allele sind numerisch gelistet und ermöglichen einen Abgleich mit den in der Datenbank gespeicherten Sorten, was zur Identifikation der Rebsorten dient.³¹

1.2.3 Weinfälschung und Methoden für die Authentifizierung von Wein

Wein ist eines der am häufigsten verfälschten Lebensmittel. Im Jahr 2021 wurden über 1,7 Millionen Liter gefälschte Getränke, größtenteils Wein, vom Europäischen Amt für Betrugsbekämpfung (OLAF) beschlagnahmt.³² Die Möglichkeiten der Verfälschung reichen von der Verdünnung des Weins mit Wasser über die Zugabe von Alkohol bis hin zur Manipulation von Farbe und Geschmack durch Beimischung von Substanzen. Ebenfalls umfassen sie das Zuckern sowie die fehlerhafte Angabe von Herkunft, Rebsorte und Alter des Weins.^{33,34} Die Authentizitätsprüfung stellt ein bedeutendes Forschungsfeld dar, in dem Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler sowohl neue Methoden entwickeln als auch bestehende weiterentwickeln, um Weinfälschungen aufzudecken. Die folgenden Analysemethoden sind etabliert und dienen dazu, die Authentizität von Weinen zu überprüfen.

Mineralien-Analyse

Die quantitative Analyse von verschiedenen Elementen ist eine häufig angewandte Methode, um die geografische Herkunft des Weins zu bestimmen. Folgende Elemente wurden häufig in Studien zur Authentifizierung von Wein genannt: K, Na, Fe, Ca, Cu, Co, Sb, Cs, Cr, Mn, Al, Ba, Mg und Sr.³⁵ Die Arbeit von Rodrigues et al. (2020), welche 111 Schaumweine aus vier Ländern untersuchte, ergab, dass sogar nur die drei Elemente K, B und Na ausreichten, um die analysierten Proben den Herkunftsländern zuteilen zu können.³⁶ Als Analysenmethode werden fast ausschließlich die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS), die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) und die Atomemissionsspektrometrie (AES) eingesetzt.³⁵

Stabilisotopenanalytik

Das Verhältnis stabiler Isotope im Pflanzenmaterial wird durch klimatische und geografische Faktoren wie Region, Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Niederschlag, Höhenlage sowie Breiten- und Längengrad

beeinflusst. Diese wirken sich auf die Isotopenverhältnisse von $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ sowie mehrerer Bleisotope aus. Die Analyse zielt darauf ab, den Zusatz von exogenem Zucker und Wasser zu identifizieren und kann auch Rückschlüsse auf die geografische Herkunft des Weins liefern.^{37,38} Die Isotopenverhältnisse können mit Hilfe der Isotopenverhältnis Massenspektrometrie (IRMS) oder der Site-specific natural isotope fractionation nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR) analysiert werden.

Quantifizierung von geeigneten phenolischen Verbindungen

Sowohl in den Trauben als auch im Wein kommen eine Reihe phenolische Verbindungen vor, welche Einfluss auf die Farbe, das Aroma und den Geschmack haben. Dazu zählen unter anderem Tannine, Anthocyane, Flavonole, Stilbene und Säuren. Die Menge von diesen Verbindungen variiert stark von Wein zu Wein und kann deswegen für die Authentizitätsprüfung herangezogen werden. Die am häufigsten verwendete Technik ist die Flüssigkeitschromatografie in Verbindung mit Detektoren wie Diodenarray (DAD), UV/VIS und Massenspektrometer (MS).³⁵ Jaitz et al (2010) untersuchten das phenolische Profil von elf Verbindungen in 97 österreichischen Weinproben aus elf geografischen Regionen, darunter sechs verschiedene Weinproben und fünf Jahrgänge. Eine geografische Unterscheidung mehrerer Rebsorten, eine rebsortenbasierte Unterscheidung von vier Regionen und eine Differenzierung der fünf untersuchten Jahrgänge war das Ergebnis.³⁹

DNA-basierte Methoden

Ein Überblick über DNA-basierte Methoden wurde schon im Abschnitt 1.2.2 gegeben. Sie bestehen typischerweise aus den Schritten Extraktion, Amplifikation und Sequenzierung, um die Rebsorte identifizieren zu können. In dieser Arbeit wurde jedoch untersucht, ob anstelle einer aufwendigen Sequenzierung auch die HRM zur Sortenunterscheidung geeignet ist. Eine Herausforderung der DNA-basierten Methode besteht darin, dass aus Weinproben oft nicht ausreichend DNA extrahiert werden kann, da verschiedene Faktoren wie Klärung, Gärung und Lagerung den DNA-Abbau fördern. Zudem können während der Amplifikation Probleme durch Interferenzen mit der Matrix auftreten.^{35,40}

1.3 Züchtung neuer Sorten

Die Anfänge der Pflanzenzüchtung durch den Menschen lassen sich mit dem Aufkommen der Landwirtschaft in der Jungsteinzeit verbinden. In dieser Zeit war die wichtigste Eigenschaft die Samengröße, um einen möglichst hohen Ertrag zu erwirtschaften. Folglich wurden die ertragreichsten Pflanzen gezielt ausgewählt und vermehrt. Neben dieser Eigenschaft sind auch Merkmale wie die reduzierte natürliche Ausbreitung durch Ausbleiben der Spindelbrüchigkeit, die bis zur Reife geschlossenen Hülsen sowie das Ausbleiben der Keimruhe Ergebnisse der natürlichen Selektion ohne Anwendung der modernen Pflanzenzüchtung. Erst im 20. Jahrhundert mit dem Aufkommen der Genetik, welche ein besseres Verständnis für die Pflanzenzüchtung brachte, kamen neue Methoden für die Züchtung neuer Sorten zur Anwendung. Abhängig vom Vermehrungsprozess der Pflanze lassen sich Zuchtmethoden in vier Züchtungskategorien einordnen (Tabelle 2). Bei asexueller Vermehrung spricht man von Klonsorten, bei Selbstbefruchtung von Linien Sorten und bei Fremdbefruchtung von Populationssorten. Die vierte Kategorie ist die künstliche Kreuzung von Inzuchtlinien, welche zu den sogenannten Hybridsorten führt.²

Tabelle 2: Die vier Züchtungskategorien. Quelle in Anlehnung an Becker (2019)²

	Klonzüchtung	Linienzüchtung	Populationszüchtung	Hybridzüchtung
Vermehrung	asexuell	sexuell	sexuell	sexuell
Hetero/ Homozygotie	heterozygot	homozygot	heterozygot	heterozygot
Variation innerhalb der Sorten	homogen	homogen	heterogen	homogen
Nachbau möglich?	ja	ja	ja	nein

1.3.1 Klonzüchtung

Die Klonzüchtung beginnt mit einer geeigneten Auswahl von zwei Elternpflanzen, die die gewünschten Eigenschaften für die zukünftige Sorte aufweisen. Nach der Kreuzung erhält man eine Vielzahl von Sämlingen mit einer breiten genetischen Vielfalt. Von diesem Zeitpunkt an erfolgt ausschließlich eine vegetative, asexuelle Vermehrung, wodurch keine Veränderungen in der DNA auftreten. Die aussichtsreichsten Sämlinge werden vegetativ vermehrt, was zur Bildung von A-Klonen führt. Aus denen werden wiederum die besten Kandidaten vermehrt, um B-Klone zu erhalten. Dieses Prozedere wird wiederholt, bis man eine überschaubare Anzahl an Sorten erhält, welche nach mehreren Prüfungen für die Sortenzulassung angemeldet werden können. Das Ziel dieser Vorgehensweise besteht darin, die anfänglich große Anzahl möglicher neuer Sorten zu reduzieren. Die Klonzüchtung wird beispielsweise bei der Kartoffel (durch Knollen), Äpfeln (durch Pfropfreiser), Weinreben (durch

Rutenteile) und Erdbeeren (durch Ausläufer) angewendet. Diese vereinfachte Erklärung ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt und kann je nach Pflanze und auch den Züchtern stark variieren.²

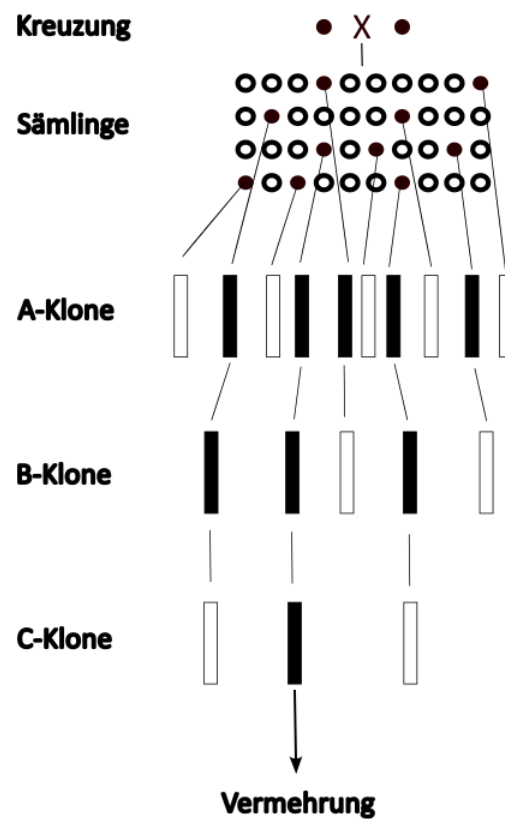


Abbildung 1: Schema der Klonzüchtung. In schwarz die selektierten erfolgsversprechenden Sorten. Quelle in Anlehnung an Becker (2019).²

1.3.2 Linienzüchtung

Die Linienzüchtung wird bei Selbstbefruchtern wie zum Beispiel Weizen, Gerste oder Erbsen angewandt. Sie startet in der Regel durch Kreuzung von zwei Zuchtlinien, die beide homozygot sind und sich in ihren Merkmalen ergänzen. Die F1-Generation ist nach der mendelschen Regel uniform, ab der F2-Generation werden dann 2 verschiedene Strategien angewendet:

1. **Stammbaummethode:** In der F2-Generation werden Pflanzen ausgewählt, welche in der nächsten Generation als Reihen angebaut werden. In der F3-Generation werden zunächst die aussichtsreichsten Reihen ausgewählt und anschließend die besten Einzelpflanzen innerhalb dieser Reihen identifiziert. Die Nachkommen dieser Pflanzen werden dann in der F4-Generation basierend auf ihrer Verwandtschaft angebaut.

2. **Ramschmethode:** Bei der Ramschmethode wird nicht in der F2 und F3 Generation selektiert, sondern es wird die gesamte Generation geerntet und eine zufällige Stichprobe ausgesät. Dadurch findet eine

natürliche Selektion statt. Die Selektion erfolgt erst, wenn die Kreuzungspopulation einen ausreichend hohen Homozygotiegrad erreicht hat.

In der Praxis werden jedoch verschiedene Modifikationen dieser beiden Strategien angewendet. Eine vereinfachte Darstellung der beiden Methoden ist in Abbildung 2 dargestellt.²

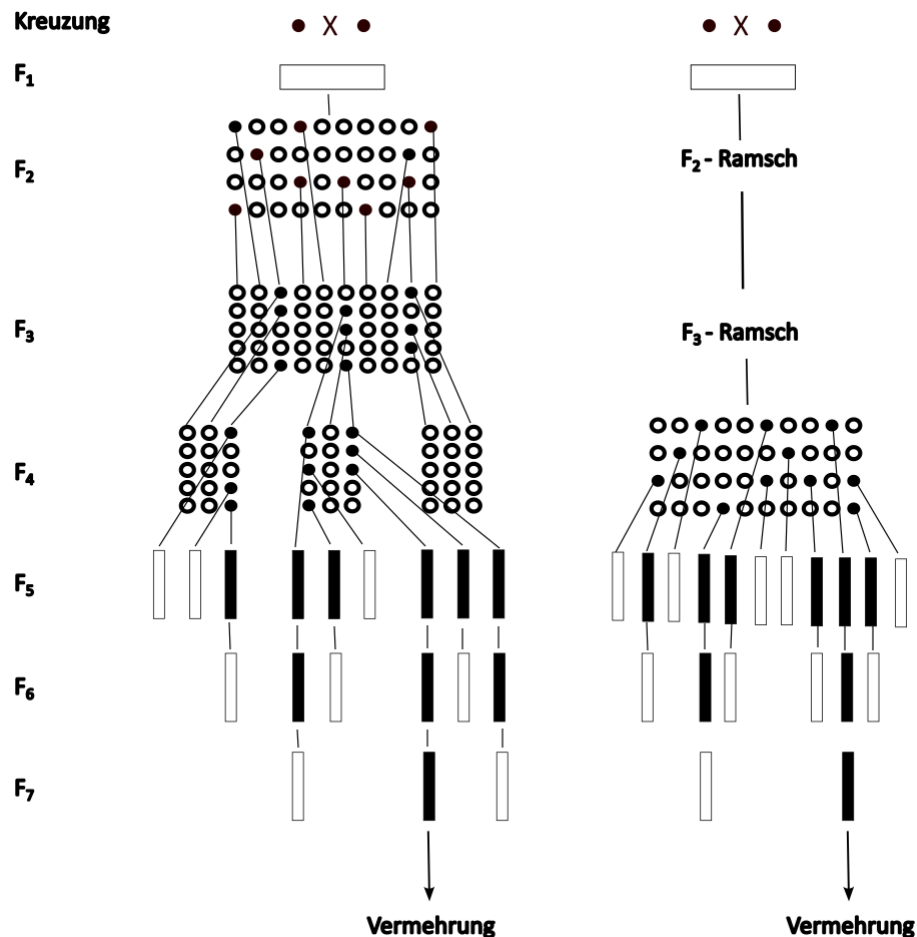


Abbildung 2: Schema der Linienzüchtung. Links die Stammbaummethode, in der ab der F₂-Generation selektiert wird. Rechts die Ramschmethode, bei der erst später selektiert wird. In schwarz die selektierten erfolgsversprechenden Sorten. Quelle in Anlehnung an Becker (2019).²

1.3.3 Populationszüchtung

Die Populationszüchtung umfasst mehrere verschiedene Methoden und wird bei Fremdbefruchtern angewendet. Eine der wichtigsten Methoden der Populationszüchtung ist die Massenauslese. Bei dieser Züchtungsmethode werden aus einer genetisch variablen Population geeignete Einzelpflanzen mit den gewünschten Eigenschaften ausgewählt. Das Saatgut dieser Pflanzen wird anschließend in der nächsten Generation als verbesserte Population gesät. Es kann entweder nur das Saatgut der ausgewählten Pflanzen geerntet werden (positive Auslese) oder alle unerwünschten Pflanzen entfernt werden (negative Auslese). Eine schematische Darstellung dieses Verfahrens ist in Abbildung 3 zu

sehen. Wichtig ist zu erwähnen, dass die Selektion vor der Blüte erfolgt, um eine Kreuzung zwischen den gewünschten und unerwünschten Pflanzen zu verhindern.²

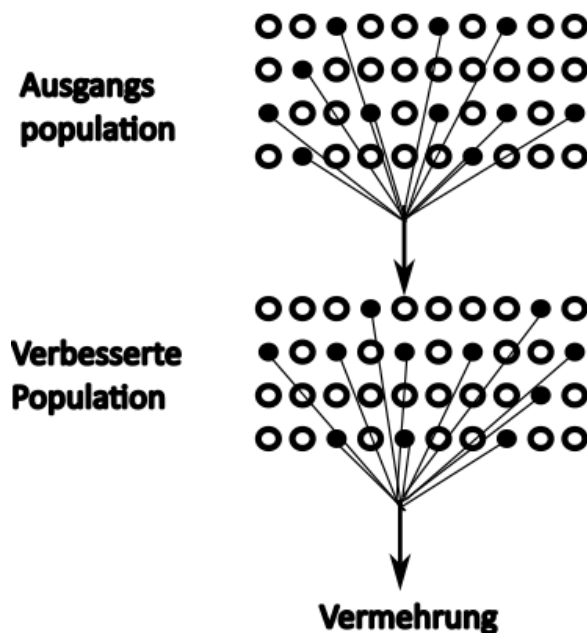


Abbildung 3: Schema der Massenauslese: In schwarz die selektierten erfolgsversprechenden Sorten. Quelle in Anlehnung an Becker (2019).²

1.3.4 Hybridzüchtung

In der Hybridzüchtung wird gezielt die sogenannte Heterosis für die Sortenentwicklung genutzt. Heterosis bezeichnet einen Effekt, bei der die Leistung der Hybride der F1-Generation höher ist, als der Durchschnitt der beiden Eltern. Die Eltern sind dabei zwei genetisch verschiedene homozygote Pflanzen. Der Heterosis Effekt ist umso größer, je stärker sich die Eltern genetisch unterscheiden. Dies führt zu einer erhöhten Heterozygotie und damit zu einer gesteigerten Leistungsfähigkeit der Sorte. Die genauen Gründe dafür sind jedoch nicht vollständig geklärt, wobei epistatische Wechselwirkungen zwischen Genen sowie die Dominanz des jeweils günstigsten Allels eine Rolle spielen können.

Praktisch wird bei der Hybridzüchtung eine kontrollierte Kreuzung zwischen zwei homozygoten, genetisch unterschiedlichen Inzuchtlinien durchgeführt. Dabei müssen unbedingt die Selbstbestäubung und Kreuzbestäubung verhindert werden, um eine Inzuchtdepression, bei denen die Leistung der Hybride wieder abnimmt, zu verhindern. Dies wird entweder mechanisch durch manuelles Entfernen der männlichen Blüten der Mutterkomponente, chemisch mithilfe von Gametoziden, die die Produktion funktionsfähiger Pollen unterdrücken, oder genetisch erreicht, beispielsweise durch cytoplasmatisch-kerngenetische Pollensterilität (CMS). Ein CMS-System modifiziert die mitochondriale DNA, was zu Veränderungen im Cytoplasma führt und männliche Unfruchtbarkeit bewirkt, während bestimmte Gene, sogenannte Maintainer, die Sterilität aufrechterhalten. Die Hybridsorte selbst muss

jedoch fertil sein, da es bei vielen Pflanzen nur bei einer normalen Pollenfertilität zu einer normalen Samenbildung kommt. Daher muss der Vater auch Gene tragen, die die Wiederherstellung der männlichen Fruchtbarkeit bewirken (Restorer). Abbildung 4 veranschaulicht auf vereinfachte Art und Weise ein CMS-System für die Züchtung von Hybriden. Für die Anwendung werden drei Zuchtlinien benötigt: eine männliche sterile Linie A, die durch Kreuzung mit einer Erhaltungslinie (Maintainer) vermehrt wird. Diese Linie A wird dann mit einer Restorer-Linie gekreuzt, um fruchtbare Hybride zu erzeugen.²

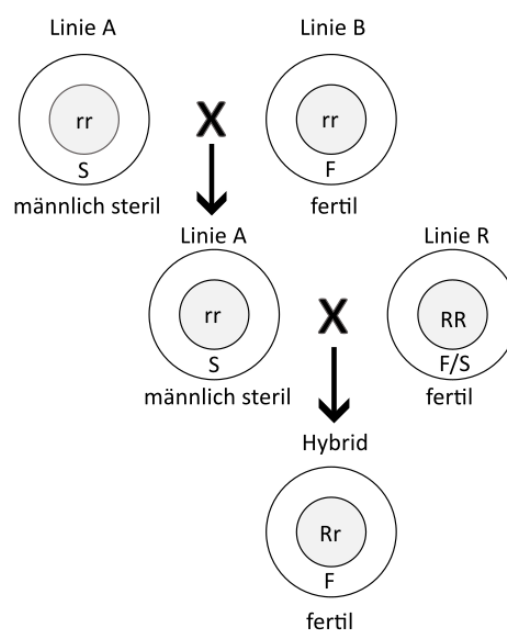


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung eines CMS-Systems. S = Cytoplasma, das männliche Sterilität induziert, F = normales fertiles Cytoplasma, Rr = homozygot für maintainer Gene, RR = homozygot für dominante restorer Gene, Rr = heterozygot für restorer Gene. Quelle in Anlehnung an Yusheng Xu et al. (2023).⁴¹

Neben Mais und der Zuckerrübe, bei denen fast ausschließlich Hybridsorten angebaut werden, kommen auch bei Raps, Roggen, Sonnenblumen, Reis, Baumwolle und Tomaten überwiegend Hybride zum Einsatz. Ein bedeutender Nachteil der Methode besteht darin, dass die Nachkommen der Hybride, die F_2 -Generation, einen Leistungsabfall erfahren und durch Selbstbefruchtung wieder auf das Niveau der Eltern zurückfallen.²

2 Ziele

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob sich die PCR-HRM zur Sortendifferenzierung von Sonnenblumen und Weinreben eignet. Es sollten geeignete Mikrosatelliten gefunden werden, welche eine hohe genetische Variabilität innerhalb einer Art aufweisen, um möglichst unterschiedliche Schmelzkurven zu erhalten. Darüber hinaus sollte auch die Möglichkeit einer Duplex-PCR getestet werden, um durch die Kombination von Primern komplexere Schmelzkurven und dadurch eine bessere Differenzierung der Sorten zu erzielen, aber auch um Zeit zu sparen.

Bei den Sonnenblumen lag das Hauptaugenmerk auf den Sorten, welche auf der österreichischen Sortenliste stehen. Zusätzlich wurden auch noch weitere Sorten, welche von der AGES zu Verfügung gestellt worden sind, miteinbezogen, sowie Sorten von Saatgut Austria.

Bei den mazedonischen Weinsorten lag der Fokus insbesondere darauf, eine deutliche Abgrenzung des "Königs der mazedonischen Weine" – Vranec – gegenüber den anderen Weinsorten zu erreichen. Außerdem sollte überprüft werden, ob das geografische Anbaugebiet Auswirkungen auf die verwendeten genetischen Marker innerhalb einer Sorte hat.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 DNA-Extraktion aus pflanzlichen Proben für die PCR

Für eine reproduzierbare PCR ist die Quantität sowie die Qualität der verwendeten DNA von großer Bedeutung. Darüber hinaus muss darauf geachtet werden, dass etwaige Inhibitoren, welche die PCR stören, während der Extraktion entfernt werden. Für pflanzliche Proben können das beispielsweise Polyphenole oder Polysaccharide sein. So existieren in der Literatur eine Vielzahl von Extraktionsmethoden, wobei diese je nach Probe verändert, beziehungsweise optimiert werden.^{42,43}

CTAB Methode

Die CTAB-Methode ist eine etablierte Methode für die Extraktion von DNA aus pflanzlichem Gewebe. CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) ist ein kationisches Detergens, welches die Zellwände durch Denaturierung und Ausfällung der Lipopolysaccharide und Proteine aufschließt und so die DNA freilegt.⁴⁴ Die zerkleinerte pflanzliche Probe wird mit einem Puffer, welcher CTAB und auch oft Polyvinylpyrrolidon (PVP) enthält, um störende Polyphenole zu binden, inkubiert. Durch Zugabe einer organischen Phase wird die DNA von Proteinen und anderen Kontaminanten getrennt. Nach einer Zentrifugation wird die in der oberen wässrigen Phase befindliche DNA durch mehrere Waschschrte gereinigt und durch Zugabe von Alkohol gefällt. Die als Pellet gefällte DNA wird gereinigt und in einem geeigneten Puffer gelöst.^{43,45}

Es gibt jedoch auch eine Vielzahl anderen Methoden, Modifikationen und Kombinationen. Beispielsweise wird statt CTAB oft auch SDS (Natriumdodecylsulfat) für den Zellaufschluss verwendet, mit oft auch höheren DNA-Ausbeuten.⁴⁶ Kommerziell sind auch Silicagel-säulen erhältlich, welche nach der Lyse in der Lage sind, die gelöste DNA spezifisch zu binden. Die an der Säule gebundene DNA kann von Verunreinigungen getrennt werden und schließlich mit einem geeigneten Puffer eluiert werden.^{47,48} Solche Säulen werden gemeinsam mit den benötigten Chemikalien als Kit von zahlreichen Anbietern vertrieben.

DNA-Quantifizierung via Fluorimetrie

Für viele molekulare Anwendungen, wie zum Beispiel für die PCR, ist eine zuverlässige Bestimmung der DNA-Konzentration nötig. Die traditionelle Standardmethode ist die UV-Spektroskopie, bei der die Extinktion der DNA in der Probe bei 260 nm gemessen wird. Die Nachteile dieser Methode sind einerseits, dass sie nicht zwischen dsDNA, ssDNA und RNA unterscheiden kann und andererseits, dass sie anfällig für Kontaminationen ist, die ein vergleichbares Absorptionsmaximum wie die DNA aufweisen.⁴⁹

Eine sensitivere Methode für die DNA-Quantifizierung ist die Fluorimetrie. Das Prinzip nutzt den Umstand, dass die DNA farblos ist und Farbstoffe spezifisch an Nukleinsäuren binden. Die Farbstoffe

werden bei einer Lichtwellenlänge angeregt und emittieren bei Rückkehr in ihren Grundzustand Licht mit einer längeren Wellenlänge. Die spektralen Eigenschaften der an den Nukleinsäuren gebundenen Fluorophore erlauben die Bestimmung von Probenkonzentrationen. Dafür werden zunächst Standardlösungen mit bekannten DNA-Konzentrationen hergestellt. Anhand der gemessenen Intensitätswerte wird eine Kalibrierkurve erstellt, welche die Abhängigkeit zwischen der Konzentration der DNA und der Fluoreszenzintensität beschreibt. Die DNA-Konzentration der Proben wird anhand dieser Kalibrierkurve berechnet, indem die gemessene Fluoreszenzintensität in die entsprechende Konzentration umgerechnet wird. So kann dsDNA von ssDNA in kleinsten Mengen und in Gegenwart von Verunreinigungen unterschieden und quantifiziert werden.^{49,50}

3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine enzymatische in-vitro-Reaktion zur Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Region. Für die Reaktion werden eine Target-DNA, eine Polymerase, zwei Primer, Mg^{2+} -Ionen und Desoxynukleotide benötigt. Der Ablauf ist in Abbildung 5 dargestellt:

- 1) Der erste Schritt ist die Denaturierung, bei der die DNA auf 94 °C erhitzt wird. Die Wasserstoffbrücken, welche die beiden Stränge zusammenhalten, werden dadurch gebrochen, wodurch 2 Einzelstränge entstehen.
- 2) Der zweite Schritt ist die Primerhybridisierung. Die Temperatur wird, je nach ausgewählten Primern, auf meist 50-60 °C abgesenkt, wodurch die Primer an ihre komplementären Sequenzen der Target-DNA binden.
- 3) Im letzten Schritt, der Elongation, wird auf das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase erhitzt (68-72 °C). Die Polymerase katalysiert den Einbau der jeweiligen Base vom 3' Ende des angelagerten Primer Richtung 5' des DNA-Strangs.

Dieser Zyklus wird wiederholt, wobei die Menge der Produkte in der Theorie exponentiell ansteigt (Verdoppelung in jedem Zyklus).⁴⁹

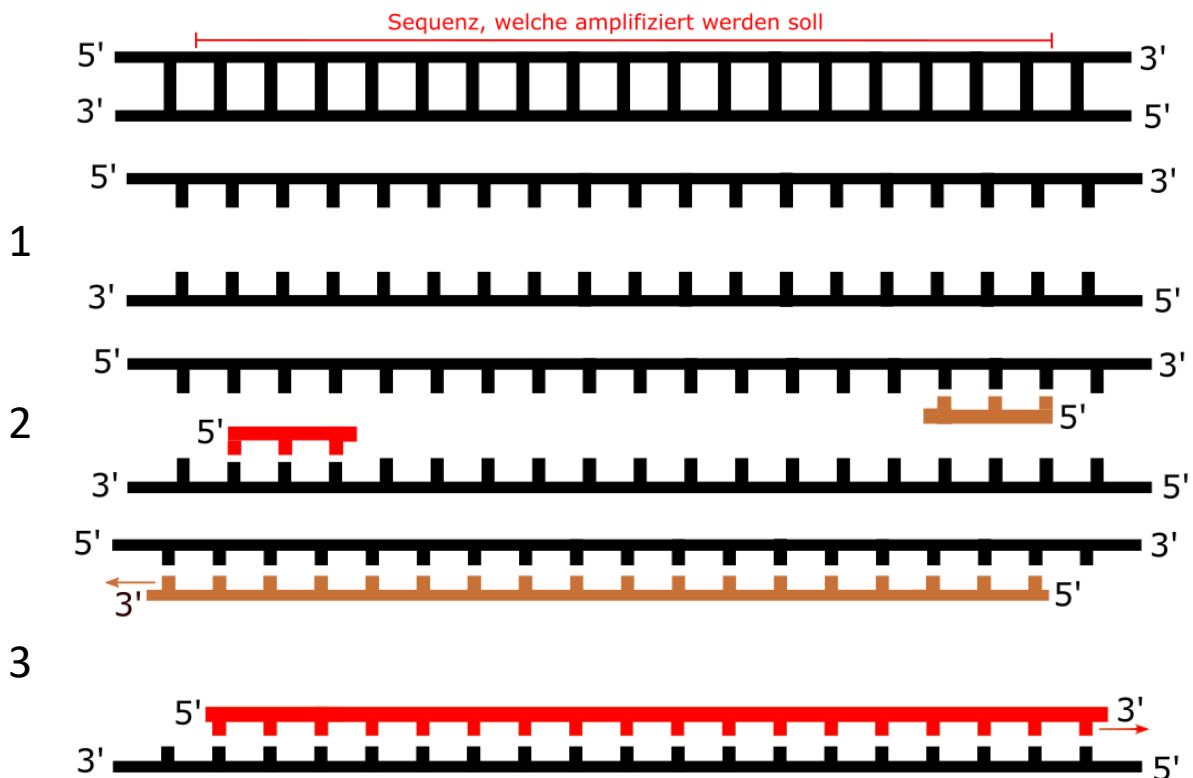


Abbildung 5: Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion.

Real-time PCR (qPCR)

Die qPCR hat den Vorteil gegenüber der herkömmlichen PCR, dass die DNA-Konzentration mit hoher Genauigkeit und Empfindlichkeit auch quantitativ gemessen werden kann. Der verwendete Thermocycler benötigt eine Anregungslichtquelle sowie ein Fluoreszenz-Detektionssystem. Zusätzlich werden fluoreszierende Farbstoffe der PCR-Reaktion zugesetzt, welche während der Amplifikation in die DNA interkalieren. Mit zunehmender Bildung der Amplicons steigt die Anzahl der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle, welche mit der DNA Komplexe bilden, wodurch die Lichtemission verstärkt wird. Die Messung dieser erfolgt während der Reaktion in „Real-time“. Zur Quantifizierung kann der Ct-Wert herangezogen werden. Dieser ist die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz einen entsprechenden Schwellenwert überschreitet. Die ursprüngliche Konzentration der Ziel-DNA lässt sich durch den Vergleich des Ct-Werts zwischen der Ziel-DNA und einer internen Kontrolle mit bekannter Kopienzahl bestimmen. Abbildung 6 zeigt einen typischen Verlauf einer qPCR.^{49,51}

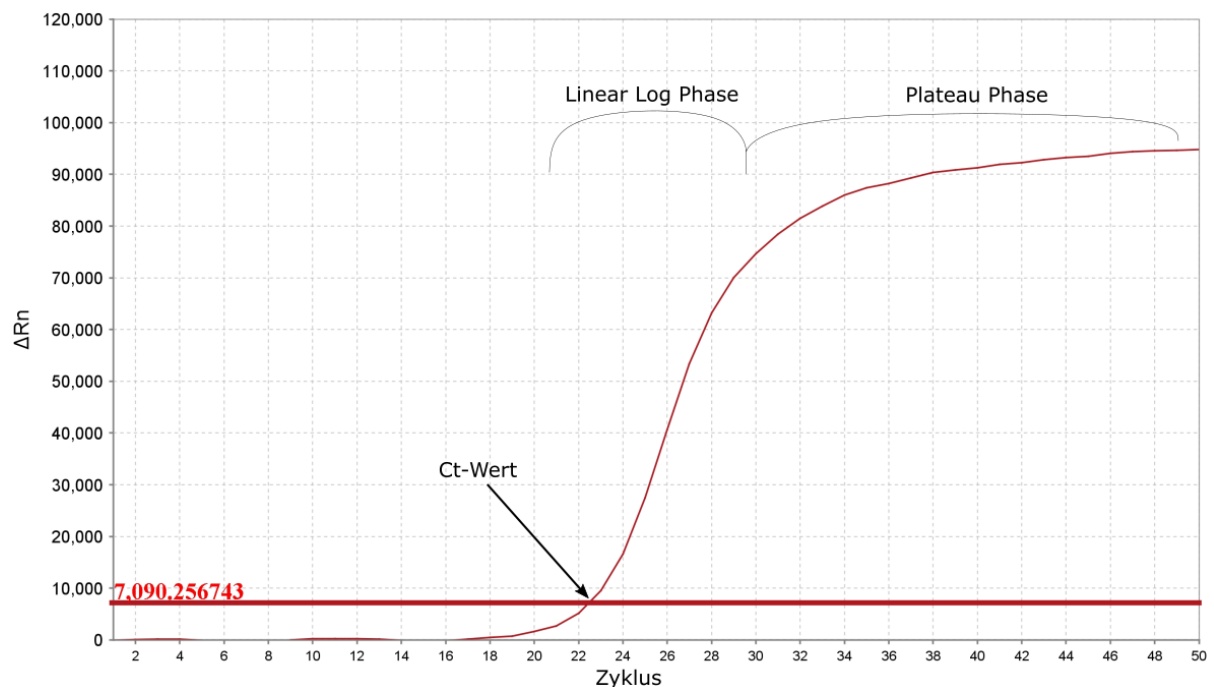


Abbildung 6: Verlauf einer qPCR. ΔRn entspricht dem Signal, das unter den gegebenen PCR-Bedingungen erzeugt wird.

Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR ist eine modifizierte Form der PCR, die es ermöglicht, gleichzeitig zwei oder mehr Ziel-DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Dies wird erreicht, indem mehr als ein Primerpaar in derselben Reaktion verwendet wird, um Amplicons zu erzeugen, die für verschiedene DNA-Sequenzen spezifisch sind. Ihre Verwendung kann zu erheblichen Zeit- und Arbeitersparnissen führen und hat sich erfolgreich in unterschiedlichen Bereichen der DNA-Analyse bewährt. Dazu gehören beispielsweise die Untersuchung von Infektionskrankheiten sowie Mutations- und Polymorphismusanalysen.⁵² Hayden et

al. setzten die Multiplex-PCR für die Analyse von Mikrosatelliten und SNPs ein, um eine fluoreszenzbasierte-Genotypisierung zu verwirklichen. Als Proben wurden dabei unterschiedliche Weizen-, Gersten-, Marillen- und Kirscharten verwendet, welche mit Quadruplex- und Hexaplex-PCRs analysiert worden sind.⁵³ Das Vervielfältigungszahlwort gibt dabei die Anzahl an verschiedenen Primerpaaren in einer PCR-Reaktion an.

Die Entwicklung einer effizienten Multiplex-PCR ist aufwendig und erfordert üblicherweise eine sorgfältige strategische Planung und mehrere Experimente zur Feinabstimmung der Reaktionsbedingungen. Um einen erfolgreichen Multiplex-PCR-Assay durchzuführen, spielen Faktoren wie die relative Konzentration der Primer, das Volumen des PCR-Puffers, das Gleichgewicht zwischen der Magnesiumchlorid- und Desoxynukleotidkonzentration, die Zyklastemperaturen, die Wechselwirkungen zwischen den Primern, sowie die Menge der Target-DNA und der Taq-DNA-Polymerase eine entscheidende Rolle. Insbesondere ist die optimale Kombination von Annealingtemperatur und Pufferkonzentration bei der Multiplex-PCR unerlässlich.^{52,53}

3.3 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM)

Die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse ist eine leistungsstarke Methode, um Unterschiede in doppelsträngigen DNA-Sequenzen anhand deren Schmelztemperaturprofilen zu detektieren. Sie erzeugt Schmelzkurven, die spezifisch sind, um DNA aufgrund kleiner Sequenzunterschiede, ihrer Länge, ihres GC-Gehalts und ihrer Strangkomplementarität zu unterscheiden. Ein Vorteil gegenüber anderen Genotypisierungsmethoden ist die Möglichkeit, die Analyse direkt im selben Reaktionsgefäß durchzuführen, in dem auch die DNA-Amplifikation stattfindet. Dadurch eignet sich die PCR gut für einen hohen Probendurchsatz. Weitere Vorzüge umfassen ihre Einfachheit, Flexibilität, niedrigen Kosten und die Möglichkeit einer zerstörungsfreien Analyse. Letzteres ermöglicht die Anwendung nachfolgender Methoden wie die Gelelektrophorese oder Sequenzierung.^{54,55}

Vor der HRM-Analyse wird die gewünschte DNA-Region mit einer qPCR amplifiziert und anschließend langsam die Amplicons von ca. 65°C auf 95°C erwärmt. Während dieses Prozesses wird die Schmelztemperatur des Amplicons bei einer bestimmten Temperatur erreicht und die beiden DNA-Stränge trennen sich in ihre Einzelstränge. Ein interkalierender Farbstoff bindet spezifisch an doppelsträngige DNA und erzeugt eine intensive Fluoreszenz, welche gemessen wird. Zu Beginn der HRM-Analyse ist das Signal aufgrund der hohen Anzahl an Kopien der Amplicons hoch. Durch das Erhitzen und die Denaturierung der DNA nimmt die Anwesenheit doppelsträngiger DNA ab, wodurch sich auch die Fluoreszenz verringert. Die Schmelzkurve entsteht, indem die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur als Diagramm dargestellt wird (Abbildung 7). Ein weit verbreiteter Farbstoff ist

SYBR Green. Dieser ist jedoch ungeeignet für eine HRM, da SYBR Green relativ instabil ist und inhibierend auf die PCR wirkt. Aus diesem Grund kann nur eine niedrige Konzentration in einer PCR-Reaktion verwendet werden. Aufgrund seiner geringeren Beeinträchtigung der PCR und seiner Anwendbarkeit unter Sättigungsbedingungen, was zu einer verstärkten Fluoreszenzsignalproduktion führt, erweist sich der Farbstoff EvaGreen als vorteilhafter.⁴⁹

Proben unterscheiden sich meist in der absoluten Fluoreszenzintensität aufgrund von Unterschieden in der Effizienz sowohl bei der Anregung als auch der Emission. Um die Schmelzkurven besser vergleichen zu können, werden die Werte normalisiert, indem diese auf relative Werte von 100 % bzw. 0 % normalisiert werden (Abbildung 8).⁵⁵ Des Weiteren ermöglicht die Kurvenform Rückschlüsse auf das Vorliegen von Homozygotie oder Heterozygotie. Homozygote Varianten zeigen eine ähnliche Schmelzkurve, die sich jedoch in der Schmelztemperatur unterscheidet. Heterozygote Proben zeigen zwei höherschmelzende Homoduplexe und zwei niedrigherschmelzende Heteroduplexe, die durch Basenfehlpaarungen entstehen und daher weniger stabil sind. Dies führt zu einer Schmelzkurve, die sich auch in ihrer Form von der Schmelzkurve homozygoter Proben unterscheidet.⁵

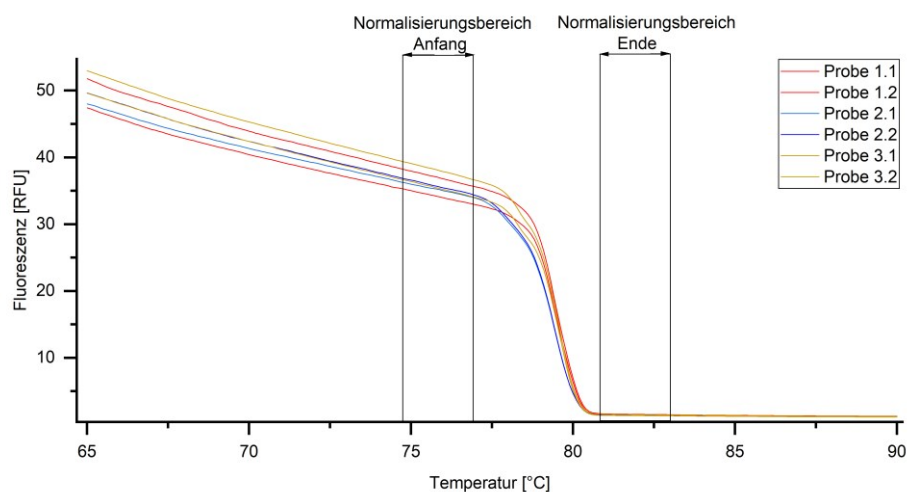


Abbildung 7: Schmelzkurven von 3 Proben in Doppelbestimmung und der Bereich, in dem die Normalisierung stattfindet.

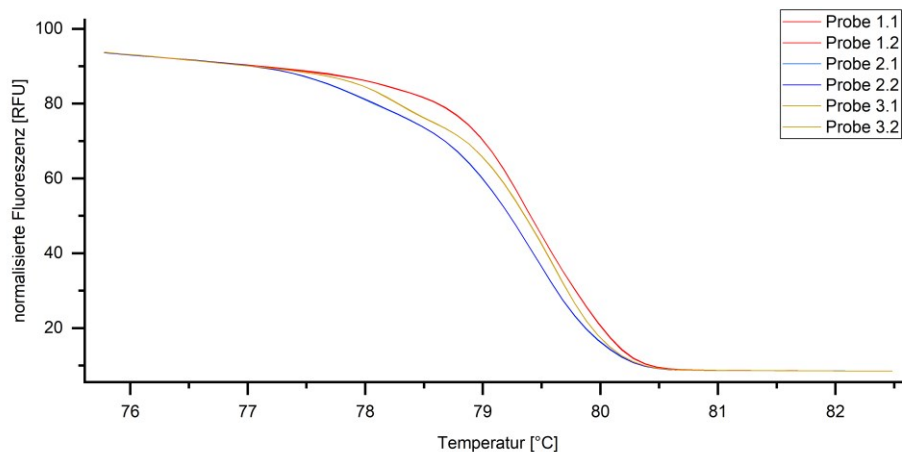


Abbildung 8: Normalisierte Schmelzkurven der 3 Proben. Die Doppelbestimmungen stimmen so sehr gut überein, wodurch die Schmelzkurven unterschiedlicher Sorten besser verglichen werden können.

3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Form der Elektrophorese, um DNA-Stränge nach ihrer Größe zu trennen und mit Hilfe von Standards mit bekannter Länge deren Länge zu bestimmen. Das Prinzip beruht auf der Wanderung von DNA-Molekülen unter Einfluss eines Gleichstromfeldes. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern Richtung Pluspol, wobei größere Moleküle durch die Agarosematrix stärker zurückgehalten werden.⁵⁶ Agarosegele werden durch die Verwendung von Agar hergestellt. Dabei handelt es sich um lineare Polysaccharide mit abwechselnden Resten von D-Galaktose- und 3,6-Anhydro-L-Galaktose-Einheiten. Die Gelieigenschaften der Agarose beruhen auf inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. Die Agarosegele sind hydrophil und nahezu vollständig frei von geladenen Gruppen.⁵⁷ Mittels eines DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs, wie beispielsweise Ethidiumbromid oder GelRed®, werden die DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge visualisiert. Das Gel zeigt charakteristische Banden, die den verschiedenen Nukleinsäuremolekülen mit unterschiedlichem Molekulargewicht entsprechen. Die Bestimmung der Fragmentgröße erfolgt durch den Vergleich mit DNA-Markern, die lineare DNA-Fragmente bekannter Länge beinhalten.^{56,57}

4 Experimenteller Teil

4.1 Sonnenblumenproben

Insgesamt wurden 61 Sonnenblumenproben, als Saatgut, untersucht. 47 Proben wurden von der AGES zu Verfügung gestellt, welche aus dem Saatgutverkehr/ der Saatgutvermehrung in Österreich stammen. Da Saatgut in der freien Natur verwendet wird und somit den Einflüssen der freien Natur ausgesetzt ist, wie etwa Fremdbestäubung, besteht die Möglichkeit von Abweichungen in genetischen Fragestellungen. Zudem ist die Mindestsortenreinheit für zertifiziertes Saatgut der ersten Generation nur mit 99,0 % geregelt. Aus diesem Grund gibt es für Sorten Standardmuster, welche als Referenz und Vergleich dienen. 17 solcher Standardmuster von Sonnenblumensorten, welche auch auf der österreichischen Sortenliste gelistet sind, wurden analysiert. Die anderen 30 von der AGES zu Verfügung gestellten Proben sind teilweise dieselben Sorten, wurden jedoch unterschiedlich behandelt (gebeizt/ungebeizt) oder stammen aus unterschiedlichen Anbaugebieten.

Die restlichen 14 Proben stammen von der Saatgut Austria, einer Vereinigung von Pflanzenzüchtern in Österreich.

Tabelle 3 enthält die Auflistung aller Proben von Sonnenblumen, einschließlich ihrer Herkunft und gegebenenfalls entsprechender Anmerkungen.

Tabelle 3: Sonnenblumenprobenliste

	Sorte	Herkunft	Anmerkung
1	ES Columbella	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
2	ES Willis CLP	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
3	P63LL06	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
4	P63LL124	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
5	P64HE118	AGES	Standardmuster, „Ölsäure-Sonnenblume“
6	P64HE133	AGES	Standardmuster, „Ölsäure-Sonnenblume“
7	P64LL155	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
8	PR64F50	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
9	RGT Wolff	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
10	Soblus	AGES	Standardmuster, „Konfektionssonnenblume“
11	Suman	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
12	Sumiko	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
13	Sureli	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
14	SY Bacardi CLP	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
15	SY Chronos	AGES	Standardmuster, „Öl-Sonnenblume“
16	SY Gracia CLP	AGES	Standardmuster, „Ölsäure-Sonnenblume“
17	Tutti	AGES	Standardmuster, „Ölsäure-Sonnenblume“
	Sorte/Probe	Herkunft	Anmerkung
18	Alvarez IR	AGES	Gebeizt
19	Carrera clp	AGES	Gebeizt
20	Clarasun SU	AGES	Gebeizt, „Öl-Sonnenblume“
21	Clarasun SU Sack 1	AGES	„Öl-Sonnenblume“

	Sorte/Probe	Herkunft	Anmerkung
22	Clarasun SU Sack 2	AGES	„Öl-Sonnenblume“
23	Clarasun SU Sack 3	AGES	„Öl-Sonnenblume“
24	Florasun	AGES	„Öl-Sonnenblume“
25	Florasun Sack 1	AGES	Gebeizt, „Öl-Sonnenblume“
26	Florasun Sack 2	AGES	Gebeizt, „Öl-Sonnenblume“
27	Ha-1A-SU	AGES	Gebeizt, „Öl-Sonnenblume“
28	Helesun Sack 1	AGES	Gebeizt, „Öl-Sonnenblume“
29	Helesun Sack 2	AGES	Gebeizt, „Öl-Sonnenblume“
30	Helesun Sack 3	AGES	Gebeizt, „Öl-Sonnenblume“
31	Helesun Sack 4	AGES	Gebeizt, „Öl-Sonnenblume“
32	Kirasun SU	AGES	Gebeizt
33	P63HH111	AGES	„Ölsäure-Sonnenblume“
34	P64HH150 Sack 1	AGES	„Ölsäure-Sonnenblume“
35	P64HH150 Sack 2	AGES	„Ölsäure-Sonnenblume“
36	P64LL129	AGES	Gebeizt
37	P64LL155	AGES	„Öl-Sonnenblume“
38	P64LP130 Sack 1	AGES	„Öl-Sonnenblume“
39	P64LP130 Sack 2	AGES	„Öl-Sonnenblume“
40	PR64F66	AGES	
41	Prosun	AGES	Gebeizt
42	QC Toledo Sack 1	AGES	Gebeizt
43	QC Toledo Sack 2	AGES	Gebeizt
44	QC Toledo Sack 1	AGES	
45	QC Toledo Sack 2	AGES	
46	SW1H63cl	AGES	Gebeizt, „Ölsäure-Sonnenblume“
47	SW1H63cl	AGES	„Ölsäure-Sonnenblume“
	Sorte	Herkunft	Anmerkung
48	DS-1 Sambasol	Saatgut Austria	
49	DS-3 Sigmasol	Saatgut Austria	
50	ES Columbella	Saatgut Austria	„Öl-Sonnenblume“
51	ES Nirvana	Saatgut Austria	
52	ES Regata	Saatgut Austria	„Öl-Sonnenblume“
53	ES Savana	Saatgut Austria	„Öl-Sonnenblume“
54	NK Delfi	Saatgut Austria	„Öl-Sonnenblume“
55	NK Stradi	Saatgut Austria	„Öl-Sonnenblume“
56	PR64 F50	Saatgut Austria	„Öl-Sonnenblume“
57	Sumiko	Saatgut Austria	„Öl-Sonnenblume“
58	SY Academic CLP	Saatgut Austria	
59	SY Bacardi	Saatgut Austria	„Öl-Sonnenblume“
60	SY Mariner	Saatgut Austria	
61	SY Neostar	Saatgut Austria	„Öl-Sonnenblume“

4.1.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin Plant II kit for DNA from plants“. Vor der Extraktion wurden alle verwendeten Arbeitsflächen mit DNA-Exitus gereinigt, um mögliche DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Die Sonnenblumensamen wurden in einem Abzug auf eine sterile Petrischale geleert und mit Hilfe eines Einmalskalpells und einer Einwegkanüle zerkleinert. In 2 mL FastPrep Lysing Matrix Tubes wurden jeweils ca. 150 mg von den zerkleinerten Sonnenblumensamen eingewogen sowie zwei 1/4 Ceramic Sphere Kugeln und 900 µL Lysis Buffer PL2 hinzugefügt. Genaue Einwaagen sind im Abschnitt 5 Ergebnisse und Diskussion, Tabelle 9 angeführt. Die Tubes wurden fest verschlossen und am FastPrep-24™ 5G bead beating grinder and lysis system gemäß dem Programm in Tabelle 4 zerkleinert.

Tabelle 4: Einstellungen des FastPrep-24™ 5G-Programms

Speed (m/s)	Adapter	Time (s)	Lysing Matrix	Quantity (mg)	Cycles	Pause time (s)
6,0	QuickPrep	40	M	150	3	300

Danach wurden mit Hilfe einer Einwegkanüle die Ceramic Sphere Kugeln vorsichtig entfernt, um möglichst wenig Probe zu verlieren. 30 µL RNase A-Lösung wurden jeweils in die Tubes pipettiert, diese verschlossen, mit einem Vortexer 15 s durchmischt und in einem Thermoschüttler bei 65°C und 600 rpm inkubiert. Die Inkubationszeit betrug in den ersten Ansätzen 2 h, in den folgenden nur noch 20 min. Dann wurden jeweils 225 µL Precipitation Buffer PL3 in die Tubes pipettiert, für 15 s durchmischt und für 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde bei 11000 rcf für 1 min zentrifugiert und das Lysat auf die „NucleoSpin®Plant Filters (violet rings) with Collection Tubes (2 mL)“ aufgetragen und erneut bei 11000 rcf für 2 min zentrifugiert. Der klare Durchfluss wurde in 5 mL Eppendorf-Tubes pipettiert, 1,350 mL Binding Buffer PC hinzugefügt und 15 s durchmischt. 700 µL der Lösungen wurde auf die „NucleoSpin®Plant II Columns (green rings) with Collection Tubes (2 mL)“ pipettiert, bei 11000 rcf zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis die ganze Lösung aufgegeben war.

400 µL Wash Buffer PW1 wurde auf die NucleoSpin®Plant II Column pipettiert, bei 11000 rcf für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde 700 µL Wash Buffer PW2 aufgetragen, wieder bei 11000 rcf für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der letzte Waschschrift erfolgte, indem 200 µL PW2 auf die Säule aufgetragen, und bei 11000 rcf für 2 min zentrifugiert wurde, um die Membran der Säule zu trocknen.

Die trockene NucleoSpin®Plant II Column, an der die DNA gebunden war, wurde in ein 1,5 mL Eppendorf-Tube gegeben und 50 µL, auf 65°C vorgewärmter, Elution Buffer PE mittig auf die Membran

pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 65°C wurde bei 11000 rcf zentrifugiert. Anschließend wurde die NucleoSpin®Plant II Column in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Tube gestellt und der Vorgang wiederholt. Die so erhaltenen DNA-Extrakte 1 und 2 (50 µL) wurden bei -20°C gelagert.

Eine schematische Übersicht der DNA-Extraktion ist in Abbildung 9 dargestellt.

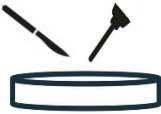
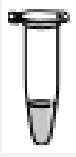
1) Probenzerkleinerung		ca. 150 mg
2) Zellyse		900 μ L PL2 + 30 μ L RNase A, 65°C, 2 h/20 min 225 μ L PL3, 5 min auf Eis, 11000 rcf, 1 min
3) Filtration		11000 rcf, 2 min
4) Einstellung der DNA-Bindungsbedingungen		1,350 mL PC
5) Bindung der DNA an die Säule		11000 rcf, 1 min
6) Waschen und Trocknen der Membran		1) 400 μ L PW1, 11000 rcf, 1 min 2) 700 μ L PW2, 11000 rcf, 1 min 3) 200 μ L PW2, 11000 rcf, 2 min
7) Elution der DNA		50 μ L PE, 65°C, 5 min, 11000 rcf, 1 min

Abbildung 9: Schematische Darstellung der DNA-Extraktion.

4.1.2 Messung der DNA-Konzentration mit dem Qubit 4 Fluorometer

Die Konzentrationsbestimmung der hergestellten DNA-Extrakte erfolgte fluorimetrisch mit dem Qubit 4 Fluorometer. Es wurde das Qubit 1x dsDNA BR Assay Kit verwendet und der im Kit enthaltene Puffer und der Farbstoff nach Anleitung im Verhältnis 1:200 gemischt, um die Working Solution herzustellen. Für die Standards wurden 190 µL Working Solution in QubitTM Assay Tubes vorgelegt und mit jeweils 10 µL Standardlösung vermischt. Für die DNA-Extrakte wurden 2 µL der Extrakte mit 198 µL Working Solution gemischt. Die Ansätze wurden mit einem Vortexer 3 s vermischt und nach einer 2-minütigen Wartezeit gemessen. Die Konzentrationen sind im Abschnitt Ergebnisse und Diskussion Tabelle 9 aufgelistet.

4.1.3 Primerpaare für Sonnenblumen

Es wurden in der Literatur Mikrosatelliten-Loci gesucht, welche eine hohe Anzahl an Allelen sowie ein hohes Maß an Heterozygotie besitzen.^{20–23} Die entsprechenden flankierenden Primer, welche ebenso aus der Literatur stammen, wurden in-silico getestet. Dabei wurde der Schmelzpunkt des forward- und reverse Primers bestimmt (oligocalc), die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Sekundärstrukturen (RNA-Fold) und die Wahrscheinlichkeit der Dimerbildung (dimeranalyze). Bei schlechten Ergebnissen dieser in-silico Tests wurden Primer, welche den gewünschten Mikrosatellit flankieren, mit Hilfe von NCBI Primer Blast designt. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Anlagerungstemperatur gelegt, die ca. 60 °C betragen sollte.

Die ausgewählten Primer wurden bei Sigma-Aldrich bestellt und gemäß den Herstellerangaben in einer PCR-Workstation gelöst. Hierbei wurde RNA-freies Wasser hinzugefügt, um eine Konzentration von 100 µM zu erhalten. Nachfolgend wurden die aufgelösten Primer für 20 Minuten im Intervall von 5 Minuten mit einem Vortexer durchmischt und gekippt, um eine vollständige Lösung sicherzustellen. Von dieser 100 µM-Lösung wurden Aliquote von 10 µL hergestellt und bei -20 °C gelagert.

Die verwendeten Primer und deren Eigenschaften sind im Anhang 9.8 aufgelistet.

4.2 Weinproben

Die Weinproben, bestehend aus Blättern von 11 Rebsorten von je 2 verschiedenen Anbaugebieten, wurden im Zeitraum August und September 2022 in den Weinbergen der Region Povardarie in Nordmazedonien gesammelt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Weinprobenliste

Sorte	Verwendung	Traubenfarbe	Anbaugebiete
Vranec	Wein	Rot	Kičevo Goligas
Prokupec	Wein	Rot	Begnishte Resava
Stanušina	Wein	Rose	Resava Begnishte
Plovdina	Wein	Rose	Probištip Resava
Temjanika	Wein	Weiß	Korija Sopot
Smederevka	Wein	Weiß	Begnishte Resava
R'kaciteli	Wein	Weiß	Begnishte Sivkova
Kardinal	Tafeltraube	Rot	Ljubash Resava
Muscat Hamburg	Tafeltraube	Rot	Rosoman Sopot
Afus Ali	Tafeltraube	Weiß	Goligas Rosoman
Muscat Italia	Tafeltraube	Weiß	Palikura Rosoman

4.2.1 DNA-Extraktion und Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Extraktion wurde mit kleinen Abweichungen wie in Abschnitt 4.1.1 durchgeführt. Eine 0,5-prozentige Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Lösung wurde hergestellt, indem PVP in PL2-Puffer gelöst wurde. Diese Lösung wurde dann für die Zellyse verwendet. Die Inkubationszeit betrug 2 h, wobei nach jeder halben Stunde die Proben für 15 s mit einem Vortexer gemischt worden sind.

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.2. Die Konzentrationen sind im Abschnitt 5 Ergebnisse und Diskussion Tabelle 9 zu finden.

4.2.2 Primerpaare für Wein

Es wurden jene 9 SSR-Marker verwendet, welche auch die Vitis International Variety Catalogue VIVC zur Differenzierung von Weinsorten nutzt. Diese stammen aus unterschiedlicher Literatur^{28,29,58,59} und sind im Anhang 9.9 aufgelistet. Die Primer wurden bei Sigma-Aldrich bestellt und wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben gelöst und aliquotiert.

4.3 PCR-HRM

Für die Durchführung der PCR-HRM wurden 2 unterschiedliche Thermocycler verwendet. Der QuantStudio diente dabei für die Testung der Primer und der Optimierung deren Anlagerungstemperatur. Als Probenextrakt für die Optimierung wurde für Sonnenblumen die Sorte DS-1 Sambasol verwendet. Es wurden die Schmelzpunkte der Primer in-silico getestet und anschließend die Annealingtemperatur auf -1°C der Schmelztemperatur (T_m) sowie -3°C der T_m eingestellt. Außerdem wurden sowohl die Primerkonzentrationen $0,2\ \mu\text{M}$ als auch $0,4\ \mu\text{M}$ getestet. Anhand der Amplifikationskurve wurden dann die optimale Temperatur und Konzentration bestimmt und diese für die Messungen am 2. Thermocycler (Rotor-Gene) übernommen. Bei den Weinproben wurde in der Literatur die Annealingtemperatur der 9 Primerpaare überprüft. Diese lag, abhängig vom Primerpaar, zwischen 50°C und 57°C .^{29,30,58,59} Aus diesem Grund wurden für alle Primerpaare die Temperaturen 52°C , 55°C und 60°C getestet, auch in Hinblick eines möglichen Duplex PCR Assays. Die Primerkonzentration betrug in allen Fällen $0,2\ \mu\text{M}$. Als Probe diente die Sorte Muscat Italia.

Praktisch erfolgten die Messungen im Doppelansatz nach der Anleitung des kommerziellen erhältlichen Kits Type-it® HRM™ PCR von QIAGEN. Der verwendete Mastermix „2xHRM PCR Master Mix“ enthält: HotStarTaq®Plus DNA Polymerase, Type-it HRM Buffer mit EvaGreen®, Q-Solution® und einen dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP). Die Zusammensetzung des Reaktionsmix ist in Tabelle 6 aufgelistet, das Gesamtvolumen betrug $20\ \mu\text{L}$. Bei Duplex PCR-Assays wurde das Volumen von dem zusätzlich verwendeten Primerpaar von dem Volumen des RNase freien Wassers abgezogen. Die

Konzentration des DNA-Extrakts der Sonnenblumenproben wurde durch Verdünnen mit nukleasefreiem Wasser auf 2,5 ng/μL eingestellt. Die erhaltenen DNA-Extrakte der Weinproben wurden in einem Verhältnis von mindestens 1:50 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt, was dazu führte, dass einige Proben eine Konzentration von weniger als 2,5 ng/μL aufwiesen.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsmix

Reaktionsmix	Volumen (μL)
2xHRM PCR Master Mix	10
RNase freies Wasser	7,2
Primer 10 μM forward (fw)	0,4
Primer 10 μM reverse (rev)	0,4
Mastermix pro Tube	18
DNA-Extrakt	2
Gesamt	20

Die praktische Arbeit erfolgte in 3 unterschiedlichen Laborräumen. Als erstes wurden die Primer, das nukleasefreie Wasser, der 2xHRM PCR Master Mix und die DNA-Extrakte aufgetaut und mit einem Vortexer kurz durchmischt. Dann wurden die Reagenzien mit Ausnahme der Extrakte in einer gekühlten Styroborbox in den 2. Laborraum gebracht. Die dort aufgestellte PCR-Workstation wurde mit DNA-Exitus gereinigt und die Reagenzien in die Workstation gestellt. Als erstes wurden die Primer (100 μM) durch Zufügen von 90 μL verdünnt. Anschließend wurde in 1,5 mL Eppendorf-Tube das erforderliche nukleasefreie Wasser zugegeben, für die spätere Verdünnung der DNA-Extrakte. Bei Analysen mit dem QuantStudio wurde der Mastermix in PCR-Gefäße pipettiert, im Falle des Rotor-Genes, in Strip-Tubes mit Deckel.

Die Reaktionsgefäße mit dem Mastermix, die 1,5 mL Eppendorf-Tube mit dem vorgelegten nukleasefreien Wasser und die DNA-Extrakte wurden gekühlt in einer Styroporbox in den 3. Laborraum gebracht. Die dort befindliche PCR-Workstation wurde vor der Benutzung ebenfalls mit DNA-Exitus gereinigt. Dann erfolgte die Verdünnung der DNA-Extrakte, indem ein festgelegtes Volumen des Extrakts in die entsprechenden 1,5 mL Eppendorf-Tube pipettiert und anschließend mit einem Vortexer durchmischt wurde. Anschließend wurde je 2 μL der verdünnten Extrakte zu dem Mastermix zugegeben. Zusätzlich wurden pro Mastermix 2 No Template Controls /NTC hergestellt, indem statt Probenextrakt nukleasefreies Wasser beigefügt wurde. Die Strip-Tubes konnten dann direkt in den Rotor-Gene gestellt werden und die PCR-Reaktion gestartet werden. Die PCR-Gefäße des QuantStudio mussten vor der Messung noch zentrifugiert werden. Tabelle 7 zeigt die Temperaturprogramme des Quantstudios bzw. des Rotor-Genes.

Tabelle 7: Temperaturprogramm der beiden Thermocycler

Schritt		Zeit	Temperatur	
Hold 1	Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	5 min	95°C	
Cycling 1	Denaturierung	15 s	94°C	
	Annealing	30 s	Variabel	Wiederholung Zyklen: 50
	Elongation	30 s	72°C	
Hold 2	Finale Elongation	10 min	72°C	
Hold 3	Denaturierung	1 min	95°C	
Hold 4	Strang Hybridisierung	1 min	40°C	
HRM	HRM	-	65-95°C	0,05°C/s (QuantStudio) 0,1°C/s (Rotor-Gene)

4.4 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 50 mL 10xTRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) in einen 100 mL Messzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt, um einen 0,5xTBE-Puffer herzustellen. 3 g Agarose wurden in einem Becherglas mit Rührkern eingewogen, 100 mL 0,5xTBE-Puffer hinzugefügt und so lange zugedeckt unter Rühren auf einer Heizplatte erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Währenddessen wurde ein Gelcaster zusammengebaut, justiert und ein Kamm eingesetzt. Das noch heiße flüssige Gel wurde zügig in die Kammer geleert und der Rührkern entfernt. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Gelkammer überführt. Die Kammer wurde mit 0,5xTBE-Puffer befüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Die Taschen wurden mit den Probelösungen sowie einer DNA-Leiterlösung befüllt. Dafür wurde der 6X Loading Dye Roti-Load DNA-orange 1 (mit Glycerin) (6X LD) mit nukleasefreiem Wasser im Verhältnis 1:3 verdünnt, um einen 2X LD herzustellen (Tabelle 8). Die Gelkammer wurde verschlossen, die Elektroden angeschlossen und auf 80 Volt eingestellt. Sobald die Färbefront ca. 0,5 cm vor dem Gelende angelangt war, wurde das Gerät ausgeschaltet, das Gel in eine Tupperdose überführt und mit Färbelösung (150 mL destilliertes Wasser + 45 µL 1000XGelRed NucleicStain) bedeckt. Die Tupperdose wurde verschlossen und lichtgeschützt für 30 min in einen Kasten gestellt. Danach wurde die Färbelösung weggeleert und stattdessen das Gel mit destilliertem Wasser bedeckt. Nach 30 Minuten wurde das Gel mit Handschuhen aus dem Wasser genommen und auf den Herolab Transilluminator gelegt. Durch Einschalten des UV-Lichts wurden die gefärbten DNA-Stränge sichtbar, welche

anschließend fotografiert wurden. Die Gele wurden nachträglich mit Bildbearbeitungsprogrammen aus den Fotos ausgeschnitten und beschriftet.

Tabelle 8: Herstellung der Probelösung sowie der Standardlösung für die Agarosegelelektrophorese

Probenverdünnung	V (µL)	Probenvolumen = 2 µL
PCR-Produkt	1,50	
2X LD	1,50	
M (Leiter)		Standard (DNA-Leiter) = 6 µL
Leiter	1,10	
Nuklease freies H ₂ O	20,90	
6X LD	4,40	

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Sonnenblumenproben

Die PCR-HRM wurde insgesamt mit 19 verschiedenen Primerpaaren (Anhang 9.9) durchgeführt. Außerdem wurden einige Duplex Assays, bei denen zwei Primerpaare miteinander kombiniert wurden, getestet.

5.1.1 Fluorometrische Bestimmungen der DNA-Konzentrationen

Die fluorometrischen Bestimmungen wurden gemäß den Angaben im Abschnitt 4.1.2 durchgeführt. In Tabelle 9 sind die Probeneinwaagen sowie die mittels Fluorometrie ermittelten Konzentrationen der Extrakte aufgelistet. Die Ausbeute an DNA war für alle Proben sehr hoch, wodurch eine 2. Elution nicht mehr notwendig war und auch meistens nicht mehr durchgeführt wurde.

Tabelle 9: Einwaagen und DNA-Konzentration der DNA Extrakte aus den Sonnenblumenproben

Sorte	Einwaage (g)	c Eluat 1 (ng/μL)	c Eluat 2 (ng/μL)	Datum
Bacardi	0,1510	55	12,6	01.06.2023
Sumiko	0,1540	60	14,1	01.06.2023
Neostar	0,1515	296	14,9	02.06.2023
DS-1 Sambasol	0,1505	430	20,8	02.06.2023
DS-1 Sambasol	0,1500	356	22,8	05.06.2023
ES Columbella	0,1530	176	31,3	05.06.2023
PR64F50**	0,1524		127	19.06.2023
ES Nirvana**	0,1511		105	19.06.2023
ES Regata**	0,1520		102	19.06.2023
ES Savana**	0,1508		128	19.06.2023
SY Academic CLP**	0,1526		108	19.06.2023
NK Stradi**	0,1511		94,2	19.06.2023
DS3-Sigmasol**	0,1499		107	19.06.2023
NK Delfi**	0,1515		112	19.06.2023
SY Mariner**	0,1539		125	19.06.2023
Prosun*	0,1570	421	-	02.08.2023
Clarasun SU*	0,1510	384	-	02.08.2023
Kirasun SU*	0,1542	447	-	02.08.2023
Carrera clp*	0,1518	352	-	02.08.2023
Alvarez IR*	0,1497	294	-	02.08.2023
P64LL129*	0,1521	304	-	02.08.2023
SW1H63cl*	0,1585	274	-	02.08.2023
Ha-1A-SU*	0,1499	144	-	02.08.2023
QC Toledo 1*	0,1561	341	-	03.08.2023
QC Toledo 2*	0,1517	143	-	03.08.2023
Helesun SU 1*	0,1557	285	-	03.08.2023
Helesun SU 2*	0,1522	364	-	03.08.2023
Helesun SU 3*	0,1564	303	-	03.08.2023
Helesun SU 4*	0,1516	269	-	03.08.2023
Florasun 1*	0,1567	264	-	03.08.2023

Sorte	Einwaage (g)	c Eluat 1 (ng/μL)	c Eluat 2 (ng/μL)	Datum
Florasun 2*	0,1528	580	-	03.08.2023
Clarasun SU 1	0,1566	408	-	31.08.2023
Clarasun SU 2	0,1524	343	-	31.08.2023
Clarasun SU 3	0,1495	337	-	31.08.2023
QC Toledo 1	0,1576	218	-	31.08.2023
QC Toledo 2	0,1571	225	-	31.08.2023
P64LP130 1	0,1530	283	-	31.08.2023
P64LP130 2	0,1531	293	-	31.08.2023
SW1H63cl	0,1590	322	-	31.08.2023
P64HH150 1	0,1551	312	-	01.09.2023
P64HH150 2	0,1590	260	-	01.09.2023
PR64F66	0,1519	229	-	01.09.2023
P64LL155	0,1570	236	-	01.09.2023
P63HH111	0,1517	292	-	01.09.2023
Florasun	0,1567	284	-	01.09.2023
P63LL124	0,1565	305	-	06.09.2023
ES Columbella	0,1536	236	-	06.09.2023
P64HE133	0,1544	321	-	06.09.2023
P64HE118	0,1548	319	-	06.09.2023
P64LL155	0,1550	326	-	06.09.2023
Suman	0,1550	312	-	06.09.2023
SY Chronos	0,1612	320	-	06.09.2023
P63LL06	0,1577	329	-	06.09.2023
SY Gracia CLP	0,1550	368	-	11.09.2023
Tutti	0,1533	323	-	11.09.2023
RGT Wollf	0,1562	231	-	11.09.2023
Sureli	0,1528	300	-	11.09.2023
Soblus	0,1528	288	-	11.09.2023
ES Willis CLP	0,1515	273	-	11.09.2023
Sumiko	0,1548	295	-	11.09.2023
SY Bacardi CLP	0,1548	259	-	11.09.2023
PR64F50	0,1571	321	-	11.09.2023

* Proben, stammen von behandeltem, gebeiztem Saatgut.

** aus Platzgründen wurden Eluat 1 und Eluat 2 vereinigt

5.1.2 Optimierung der Annealingtemperatur der Primerpaare

Die Annealingtemperatur wurde nur für die ersten vier Primerpaare optimiert, da unter den getesteten Bedingungen weder die Annealingtemperatur noch die Primerkonzentration einen starken Unterschied auf den Ct-Wert hatte. Als Probe diente dabei die Sorte DS-1 Sambasol. Anhand der Ergebnisse von in silico Tests wurden Primerpaare ausgewählt, deren Annealingtemperatur im Bereich von 60 °C lag. Daher konnte diese für die PCR-Reaktionen auf 60 °C festgelegt werden. Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen den Einfluss der Temperatur und der Primerkonzentration auf die Amplifikationskurve. Als Primerpaare dienten SF01 und SF02. Einer Erhöhung der Primerkonzentration führte dabei immer zu einer Verringerung des Ct-Werts (doppelte Konzentration führte zu einer Verringerung des Ct-Werts um ca. 2). Es wurde trotzdem in den meisten Fällen eine Konzentration von 0,2 µM verwendet, da dabei die Wahrscheinlichkeit von einer Primerdimerbildung verringert wird und die Amplifikation trotzdem ausreichend war.

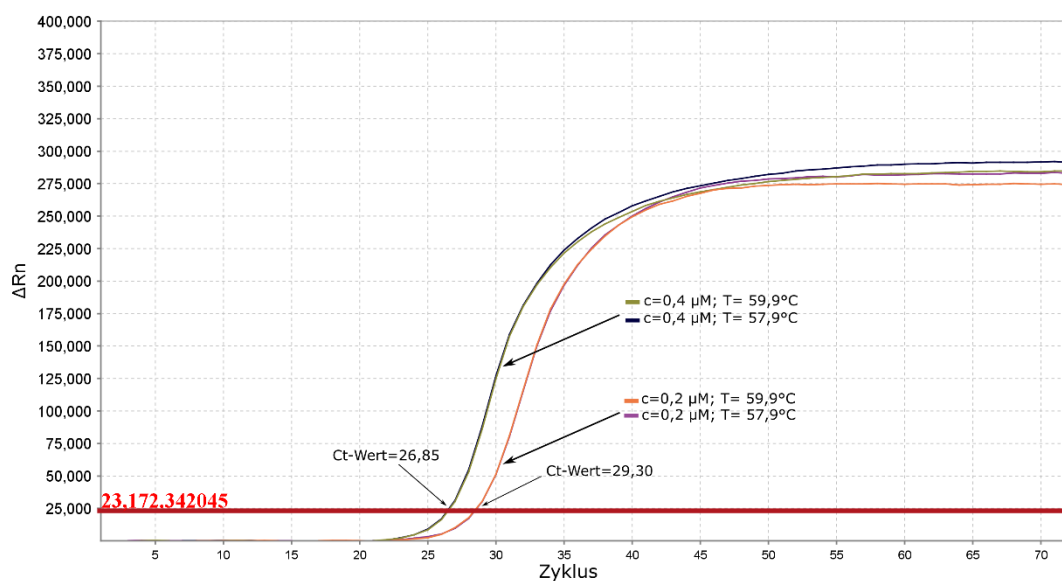


Abbildung 10: Einfluss der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur auf die Amplifikation. Primerpaare SF01 (dunkelgelb, orange) und SF02 (schwarz, lila). Sorte: DS-1-Sambasol.

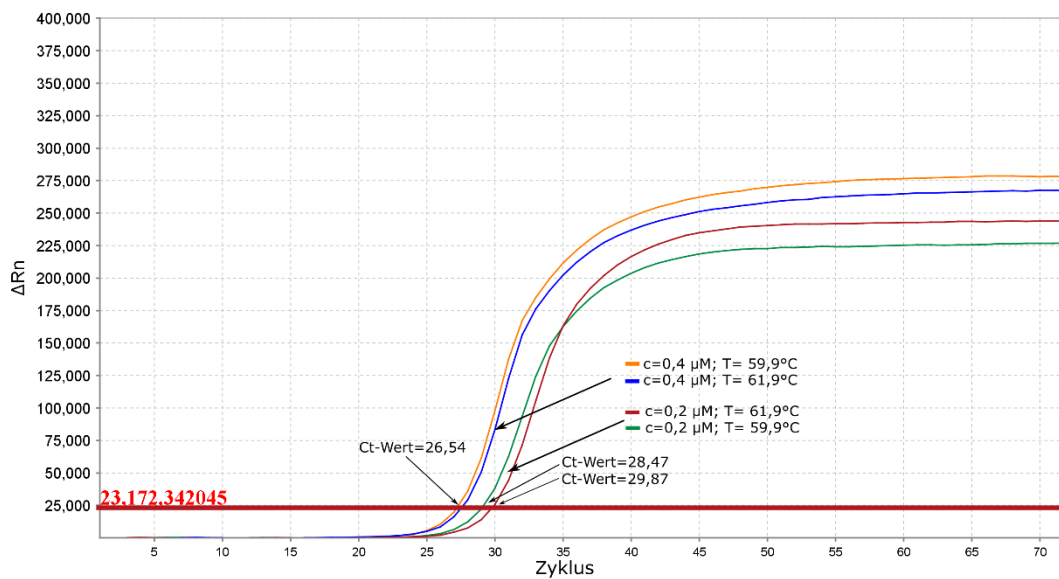


Abbildung 11: Einfluss der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur auf die Amplifikation. Primerpaare SF03 (orange, grün) und SF04 (blau, rot). Sorte: DS-1-Sambosol.

5.1.3 Diskriminierung der Referenzsorten/Standardmuster

Im Abschnitt 4.1 wurde bereits die Bedeutung von Standardmustern einer Sorte erläutert. Zur Erhaltung einer Sorte und um sicherzustellen, dass sich das Vermehrungsmaterial im Saatgutverkehr nicht ändert, existieren Standardmuster, die als Referenz für die jeweilige Sorte dienen. Im Falle von Zweifeln an der Sortenreinheit werden Proben mit diesen Standardmustern abgeglichen, und die Zulassung der Sorte wird gegebenenfalls widerrufen.

Die 17 Referenzsorten wurden mit den Primerpaaren SF01, SF02, SF03, SF04, SF05, SF09, SF10, SF11, SF12 und SF19 getestet. Die Primerpaare SF06-SF08 und SF13-SF18 wurden schon bei den Proben, welche von Saatgut Austria zu Verfügung gestellt worden sind, getestet, wobei sich herausstellte, dass diese nicht für die Sortendiskriminierung geeignet sind. Es gab Probleme bei der Amplifikation und/oder die Schmelzkurven der getesteten Sorten ähnelten sich zu stark.

Die Primerpaare SF04, SF09, SF10 und SF12 brachten die besten Ergebnisse, während die anderen verwendeten Primerpaare weniger gute Ergebnisse lieferten. Da die Schmelztemperatur der Amplicons der vier Primerpaare verschieden war, wurde versucht, Primerpaare in einem Duplex PCR Assay zu kombinieren. Die Kombination SF04 und SF12 funktionierte dabei am vielversprechendsten und eignete sich für die Sortendiskriminierung am besten. Ein Großteil der Sorten konnte mit dieser

Primerkombination unterschieden werden. Für die restlichen Sorten wurde auf die anderen getesteten Primerpaare zurückgegriffen, wobei die Anzahl der Primerpaare für die vollständige Sortendiskriminierung möglichst gering gehalten werden sollte.

Für die vollständige Unterscheidung der 17 Referenzsorten werden die Primerkombination SF04xSF12 und die Primerpaare SF02, SF03 sowie SF10 benötigt. Der Großteil der Sorten lässt sich schon mit der Kombination SF04xSF12 unterscheiden, wobei die Konzentration der beiden Primerpaare angepasst wurde. Da der Ct-Wert bei der Amplifikation mit dem Primerpaar SF04 im Vergleich zum Primerpaar SF12 geringer war (Abbildung 12), bei Einsetzen identer DNA-Template Menge, kann davon ausgegangen werden, dass das Primerpaar SF04 bevorzugt an das DNA-Template bindet, wodurch bei der Primerkombination auch dessen PCR-Produkt verstärkt gebildet wird. Da für die Diskriminierung wichtig ist, dass die Produkte von beiden Primerpaaren im selben Ausmaß gebildet werden, wurde die Konzentration von SF12 erhöht. Ausgangspunkt war die in Tabelle 6 angegebene Zusammensetzung des Reaktionsmix. Die Zusammensetzung wurde, wie in Tabelle 10 angegeben, modifiziert.

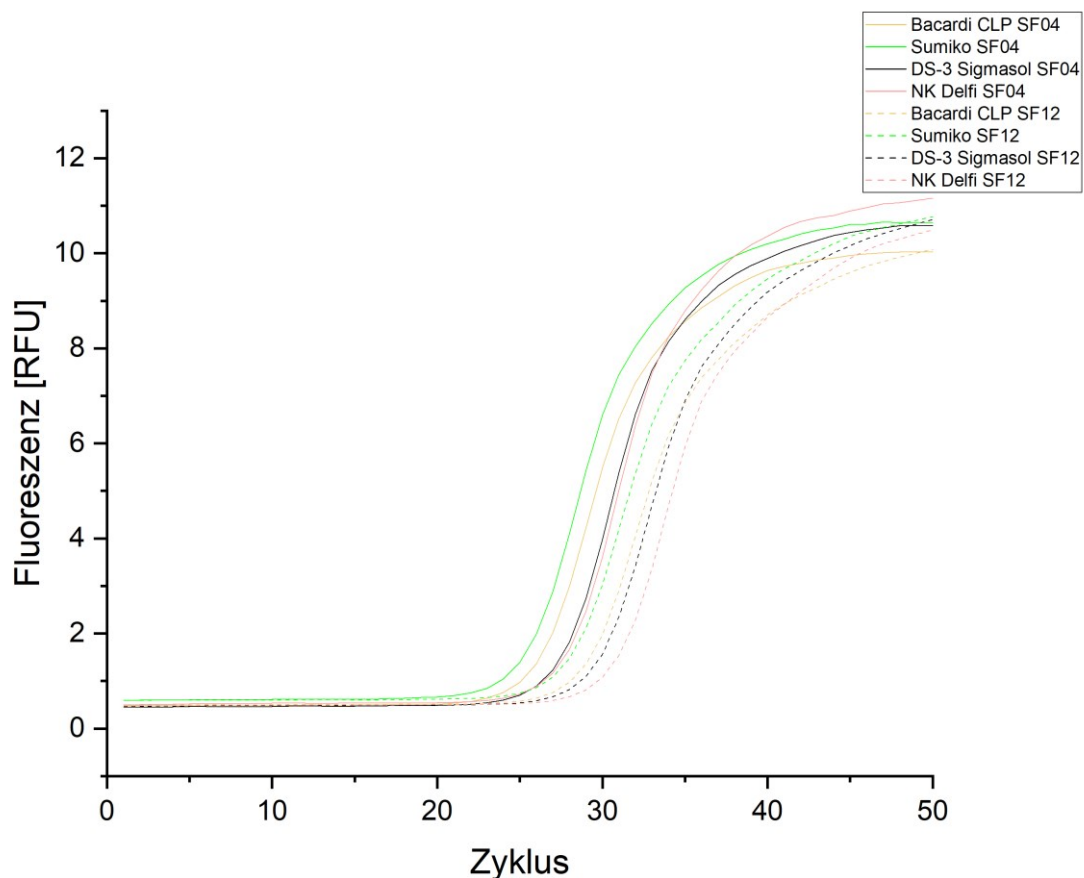


Abbildung 12: Amplifikationskurve der mit den Primerpaaren SF04 bzw. SF12 erhaltenen Amplifikationskurven der Sorten SY Bacardi CLP, Sumiko, DS-3 Sigmasol und NK Delfi. Konzentration von SF04 bzw. SF12: 0,2 µM.

Tabelle 10: Zusammensetzungen der Reaktionsmische für die Duplexreaktion

	0,2 μ M x 0,2 μ M	0,2 μ M x 0,4 μ M	0,2 μ M x 0,6 μ M	0,2 μ M x 0,8 μ M
Reaktionsmix	Volumen (μ L)	Volumen (μ L)	Volumen (μ L)	Volumen (μ L)
2xHRM PCR Master Mix	10	10	10	10
RNase freies Wasser	6,4	5,6	4,8	4
Primer SF04, 10 μ M forward (fw)	0,4	0,4	0,4	0,4
Primer SF04, 10 μ M reverse (rev)	0,4	0,4	0,4	0,4
Primer SF12, 10 μ M forward (fw)	0,4	0,8	1,2	1,6
Primer SF12, 10 μ M reverse (rev)	0,4	0,8	1,2	1,6
Mastermix pro Tube	18	18	18	18
DNA-Extrakt	2	2	2	2
Gesamt	20	20	20	20

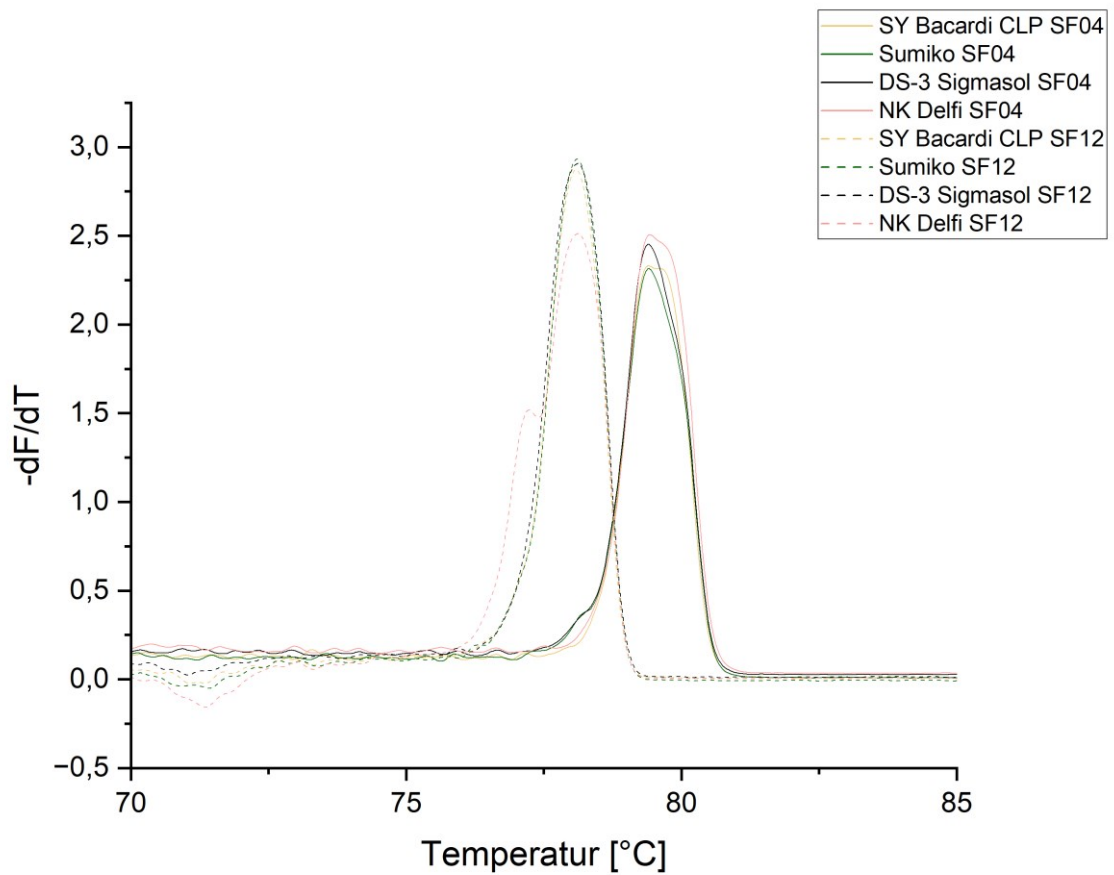


Abbildung 13 und Abbildung 14 zeigen die negativen 1. Ableitungen der mit den Primerpaaren SF04, SF12 und SF04xSF12 erhaltenen Schmelzkurven, wobei die Primerpaare in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden. Während das Amplicon, welches mit dem Primerpaar SF04 gebildet wurde, sein Peakmaximum bei 79,4 °C hat, befand sich das Maximum des SF12 Amplicons bei 78,1 °C. Abbildung 14 zeigt außerdem die Erhöhung des Einflusses von SF12 auf die Schmelzkurve bei Erhöhung dessen Konzentration.

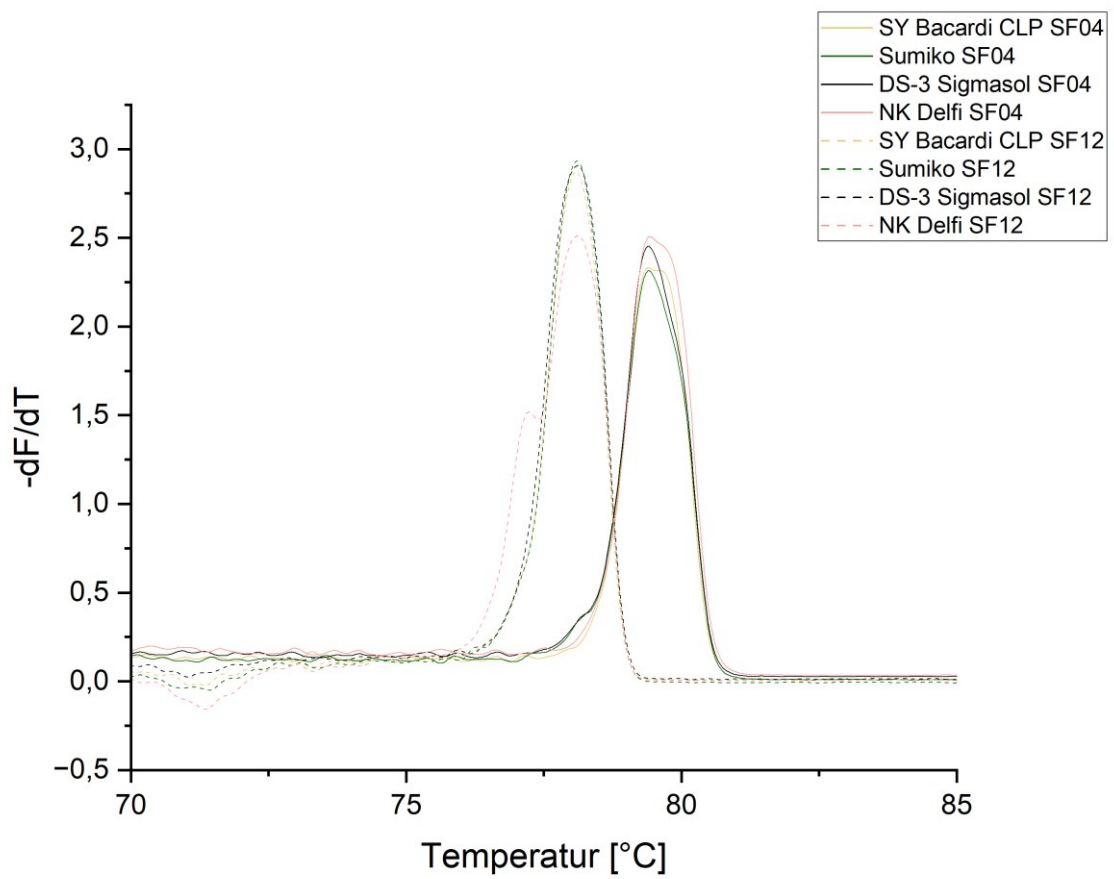


Abbildung 13: Negative 1. Ableitungen der mit den Primerpaaren SF04 bzw. SF12 erhaltenen Schmelzkurven der Sorten SY Bacardi CLP, Sumiko, DS-3 Sigmasol und NK Delfi. Konzentration von SF04 bzw. F12: 0,2 μ M.

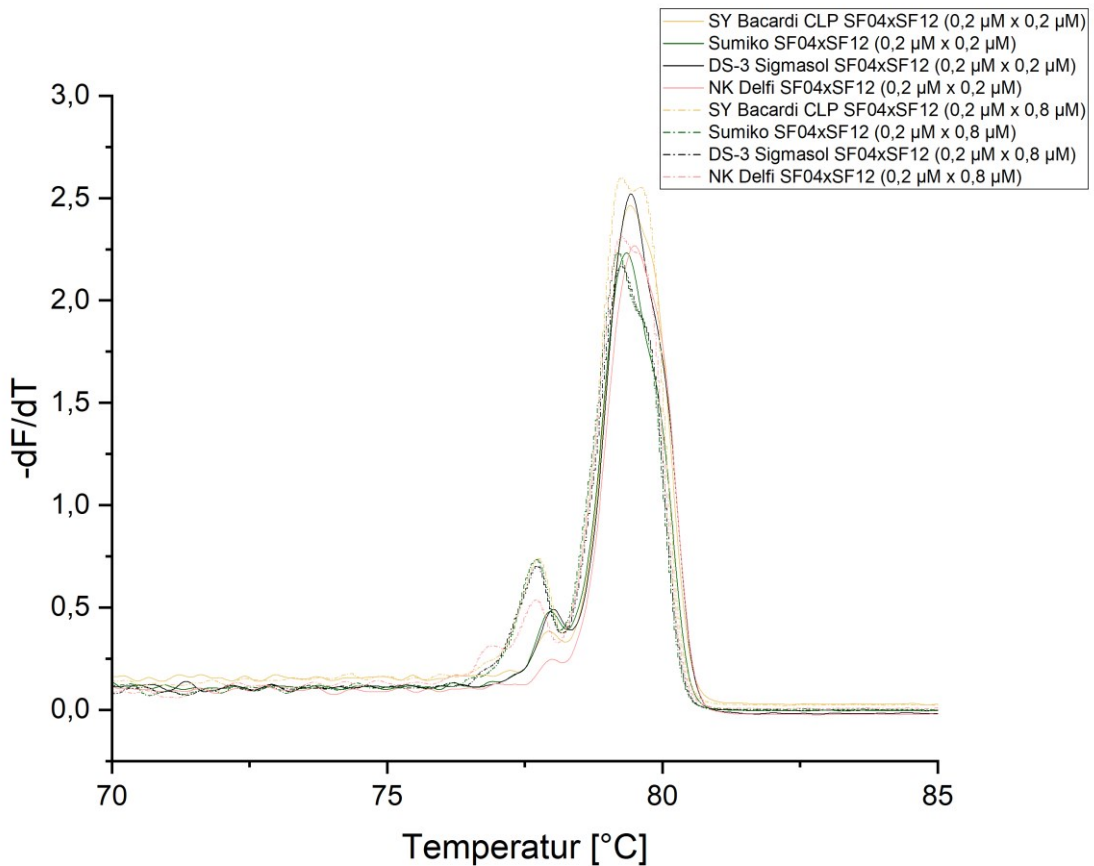


Abbildung 14: Negative 1. Ableitungen der mit der Primerkombination SF04xSF12 erhaltenen Schmelzkurven der Sorten SY Bacardi CLP, Sumiko, DS-3 Sigmasol und NK Delfi. Konzentrationen von SF04xSF12: 0,2 µM x 0,2 µM bzw. 0,2 µM x 0,8 µM.

Zusätzlich erfolgte auch eine Gelelektrophorese zur Überprüfung der gebildeten Amplicons. Dabei wurden verschiedene Primerpaare und Primerpaarkombinationen unterschiedlicher Konzentrationen getestet und die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, wodurch ein Bandenmuster erhalten wurde. Jede Bande repräsentiert eine bestimmte DNA-Fragmentgröße. Am Agarosegel (Abbildung 15) sind die Lanes der Produkte der Primerpaare SF04 (Lane 8 und 9) und SF12 (Lane 20 und 21) sowie deren Kombination (Lane 26 und 27) hervorgehoben. Die Konzentration der Primerpaare betrug 0,2 µM. Die Produkte, welche durch die Verwendung des Primerpaars SF04 erhalten worden sind, haben eine Länge von ca. 250 bp (Basenpaare) und 275 bp, während die Produkte des Primerpaars SF12 eine Länge von 350 bp und 425 bp aufweisen. Wurden SF04 und SF12 kombiniert und beide in einer Konzentration von 0,2 µM eingesetzt (Lane 26 und 27), waren die Banden, die von SF04 resultieren, gleich stark ausgeprägt, während die Banden, die auf SF12 zurückzuführen sind, deutlich schwächer zu sehen waren.

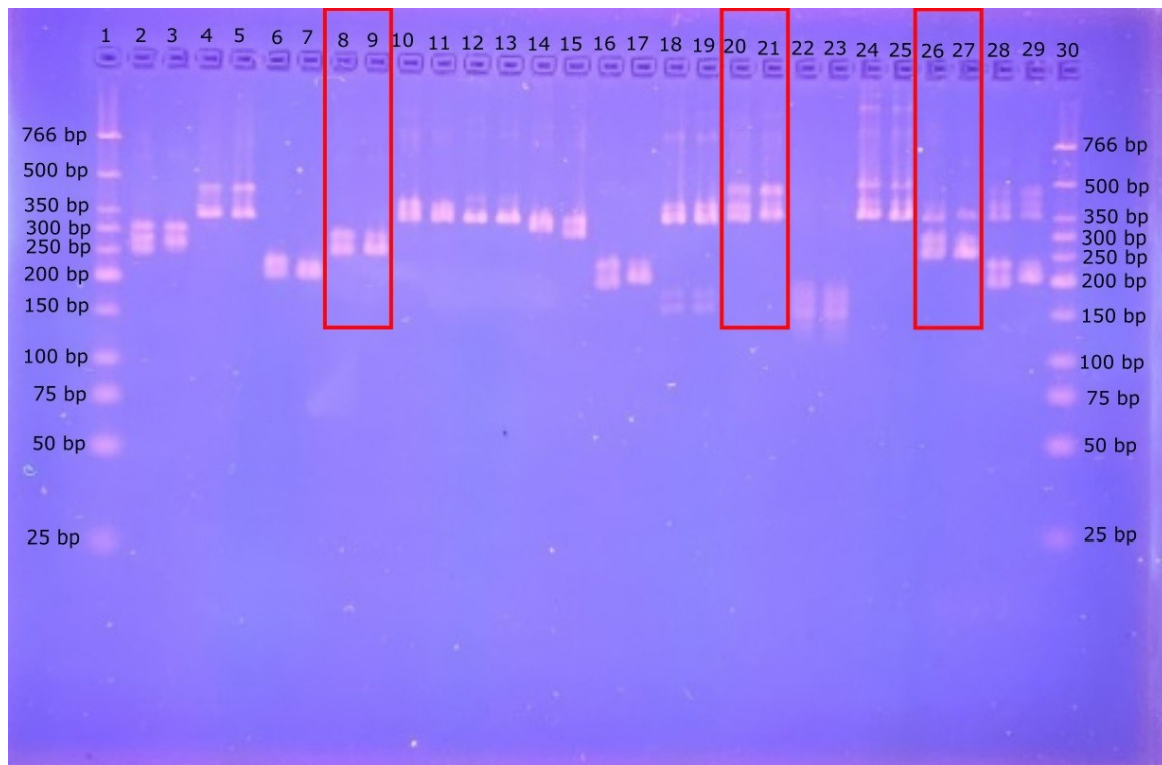


Abbildung 15: Foto von Agarosegel 1. Überprüfung der mit den Primerpaaren SF01-SF05, SF08-SF12, SF04xSF12, SF09xSF12 und SF10xSF12 gebildeten PCR-Produkte.

Beladungsschema: 8: SY Bacardi CLP, SF04 Primerpaar (0,2 μ M)
 9: Sumiko, SF04 Primerpaar (0,2 μ M)
 20: SY Bacardi CLP, SF12 Primerpaar (0,2 μ M)
 21: Sumiko, SF12 Primerpaar (0,2 μ M)
 26: SY Bacardi CLP, SF04xSF12 Duplex (0,2 μ M x 0,2 μ M)
 27: Sumiko, SF04xSF12 Duplex (0,2 μ M x 0,2 μ M)

Am Agarosegel 2 (Abbildung 16) sind die Amplicons, welche durch die Verwendung des Primerpaars SF12 (0,2 μ M) sowie der Primerkombination SF04xSF12 (0,2 μ M x 0,8 μ M) erhalten wurden, zu sehen. Durch Erhöhung der Konzentration des Primerpaars SF12 in der Duplexreaktion auf 0,8 μ M, wurden die Banden, welche bei der Verwendung der Primerkombination mit der Konzentration 0,2 μ M x 0,2 μ M fehlten, (Abbildung 15, Lane 26 und 27) sichtbar (Abbildung 16, Lane 16 und 17). Diese optimierte Zusammensetzung des Reaktionsmix ist in Tabelle 11 zu sehen und wurde für die Differenzierung der Sorten verwendet.

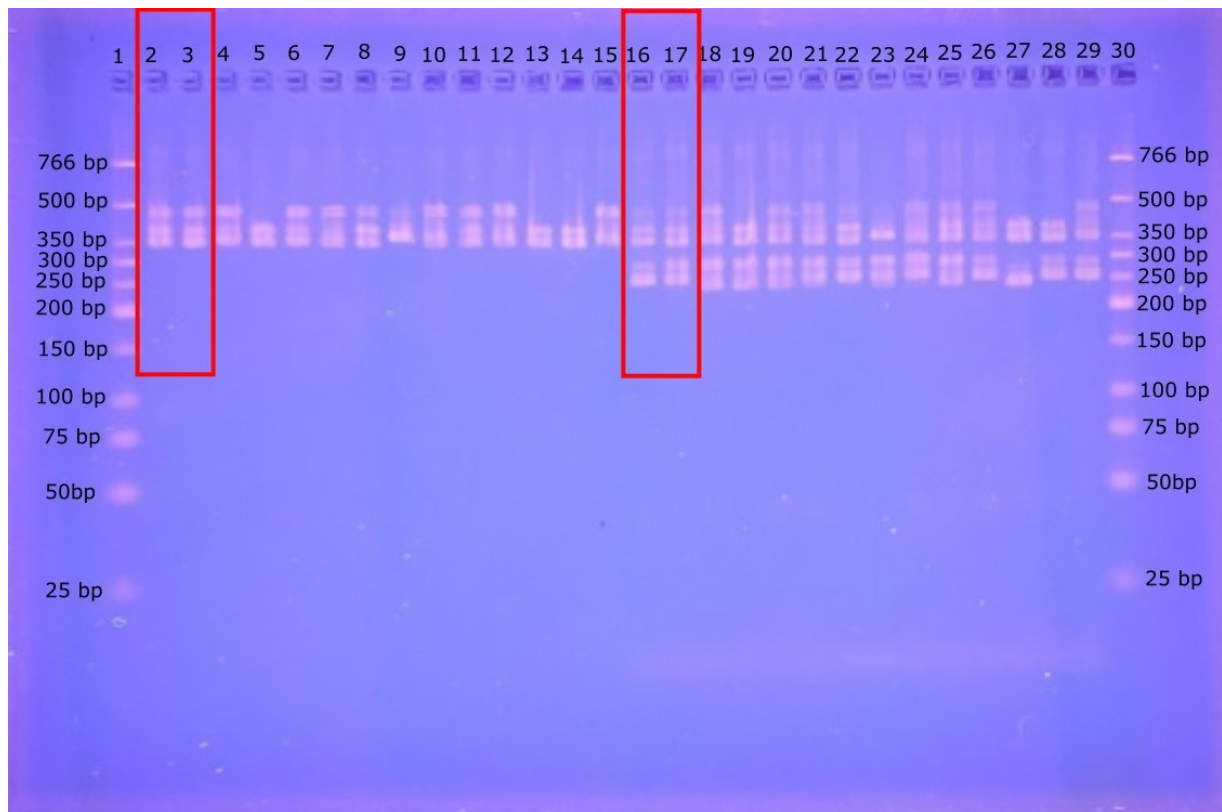


Abbildung 16: Foto von Agarosegel 2. Überprüfung der mit den Primerpaaren SF12 und der Primerkombination SF04xSF12 gebildeten PCR-Produkte.

Beladungsschema: 2: SY Bacardi CLP, SF12 Primerpaar (0,2 μ M)
 3: Sumiko, SF12 Primerpaar (0,2 μ M)
 16: SY Bacardi CLP, SF04xSF12 Duplex (0,2 μ M x 0,8 μ M)
 17: Sumiko, SF04xSF12 Duplex (0,2 μ M x 0,8 μ M)

Tabelle 11: Optimierte Zusammensetzung des Reaktionsmix für die Duplexreaktion

Reaktionsmix	Volumen (μ L)
2xHRM PCR Master Mix	10
RNase freies Wasser	4
Primer SF04, 10 μ M forward (fw)	0,4
Primer SF04, 10 μ M reverse (rev)	0,4
Primer SF12, 10 μ M forward (fw)	1,6
Primer SF12, 10 μ M reverse (rev)	1,6
Mastermix pro Tube	18
DNA-Extrakt	2
Gesamt	20

Abbildung 17 zeigt die normalisierten Schmelzkurven aller Referenzsorten der Duplexreaktion SF04xSF12. Zur besseren Übersicht wurde nur eine Bestimmung des Doppelansatzes abgebildet. Die Schmelzkurve der Sorte ES Willis CLP (braun) weicht sehr stark von allen anderen Kurven ab und ist so auch in dieser Darstellung leicht von den anderen Sorten unterscheidbar - wie auch die Sorten P64HE133 (blau), P64LL155 (magenta) und ES Columbella (grün). Aus den beigefügten Abbildung 51-Abbildung 53 (Anhang 9.3.1) wird deutlich, dass die Schmelzkurven zahlreicher andere Sorten ebenfalls ausreichende Unterschiede aufweisen, wenn sie paarweise miteinander verglichen werden.

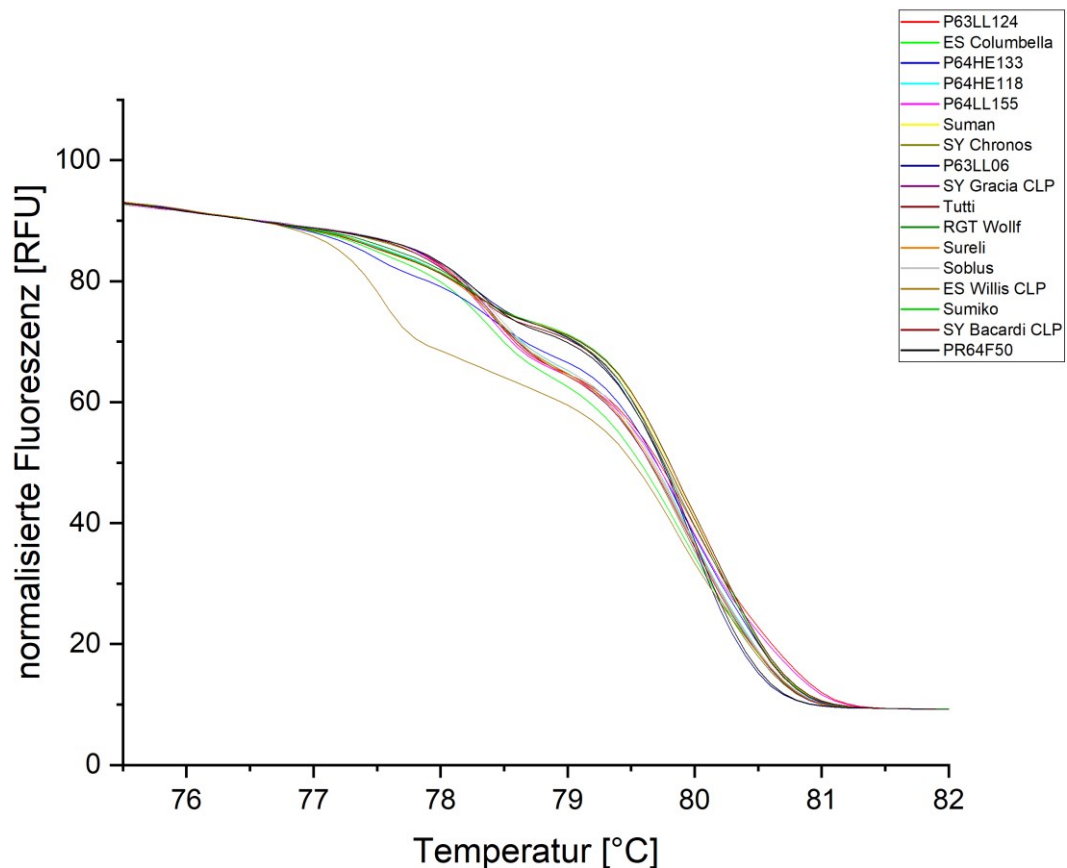


Abbildung 17: Normalisierte Schmelzkurven von allen 17 Referenzsorten unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12.

Mit Hilfe des Primerpaars SF10 konnten 14 weitere Sorten unterschieden werden, welche mit der Primerkombination SF04xSF12 nicht getrennt werden konnten (Abbildung 18). Die beiden Sorten P64HE133 (blau) und Tutti (braun) ließen sich so von allen anderen Sorten unterscheiden. In Bezug auf die anderen Sorten bildeten sich Gruppen, innerhalb dieser die Sorten eine ähnliche Schmelzkurve aufwiesen: Soblus (grau), SY Chronos (dunkelgelb) und P64HE 118 (cyan); RGT Wollf (olive), SY Gracia (lila), P63LL06 (marineblau) und ES Columbella (hellgrün); sowie die Sorten P63LL124 (rot), P64LL155

(magenta), Suman (gelb), SY Chronos (dunkelgelb), Sureli (orange), ES Willis CLP (hellbraun), Sumiko (hellgrün), SY Bacardi (dunkelrot) und PR64F50 (schwarz).

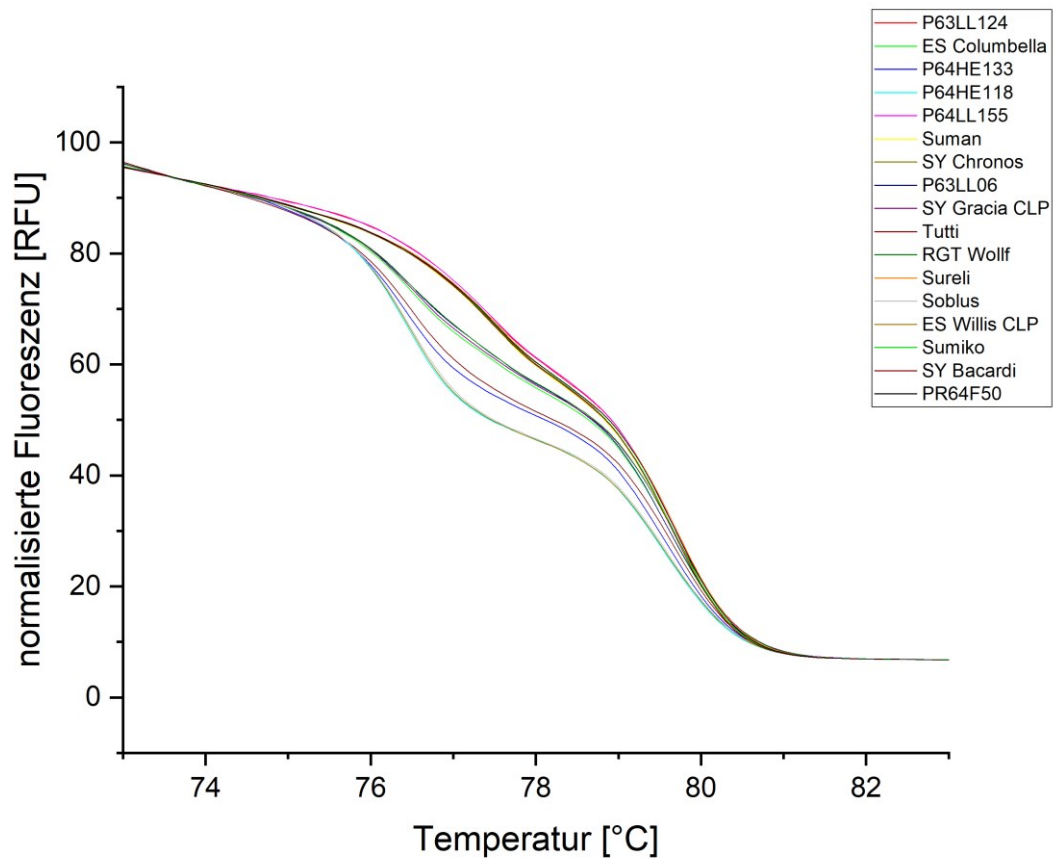


Abbildung 18: Normalisierte Schmelzkurven von allen 17 Referenzproben unter Verwendung des Primerpaars SF10.

Die Sonnenblumensorten, die weder durch die Kombination SF04xSF12 noch durch das Primerpaar SF10 voneinander unterschieden werden konnten, ließen sich mittels Primerpaar SF02 bzw. SF03 unterscheiden.

Abbildung 19 bzw. Abbildung 20 zeigen die Schmelzkurven dieser Sorten, die große Unterschiede aufweisen.

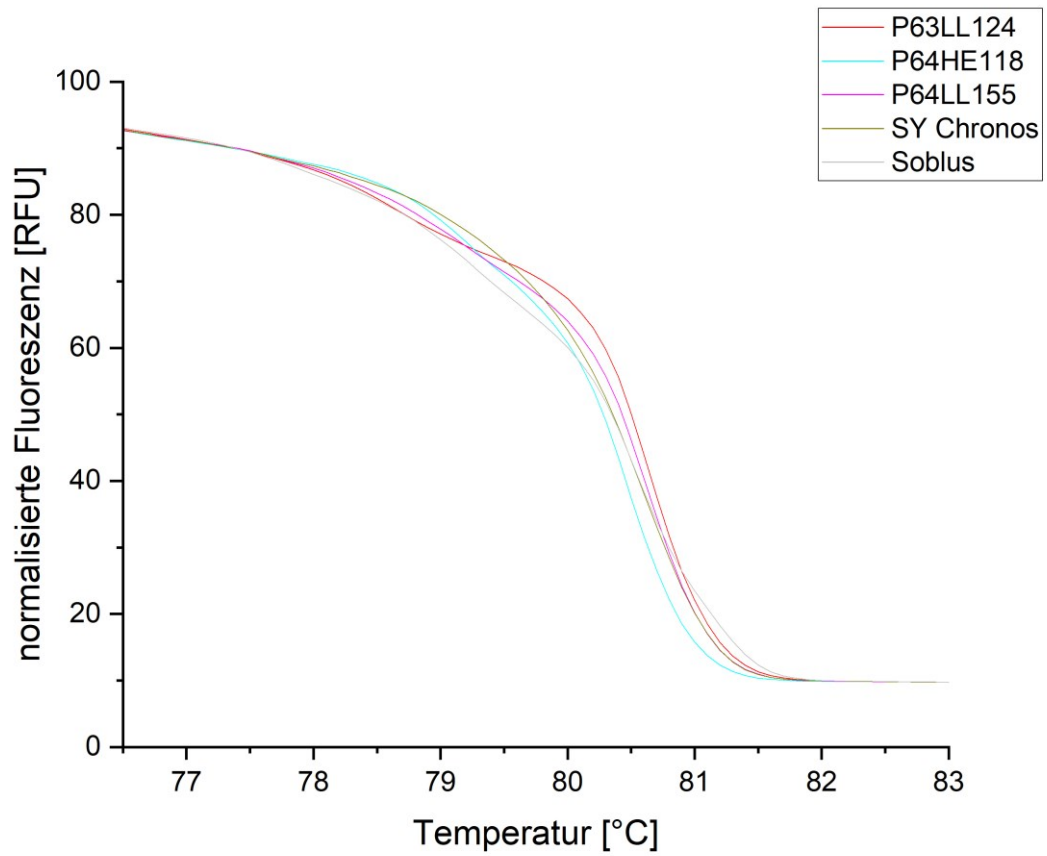


Abbildung 19: Normalisierte Schmelzkurven von den Proben P63LL124 (orange), P64HE118 (cyan), 64LL155 (magenta), SY Chronos (dunkelgelb) und Soblus (hellgrau) unter Verwendung des Primerpaars SF02.

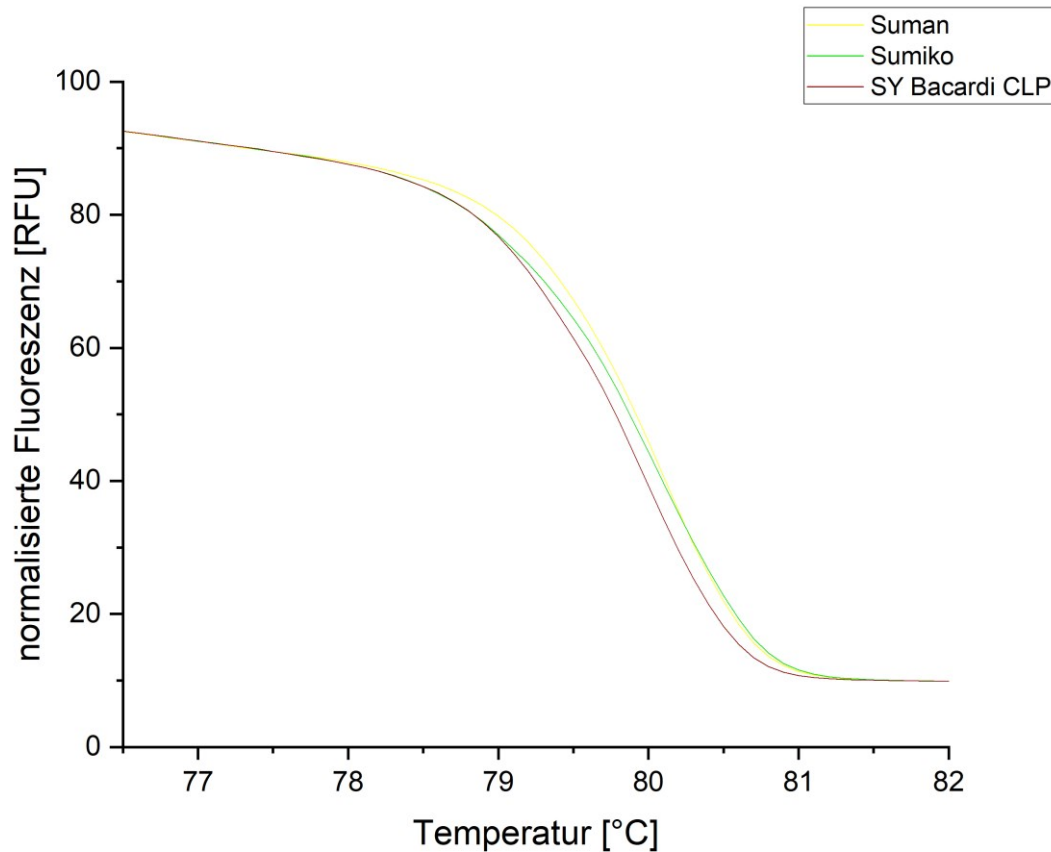


Abbildung 20: Normalisierte Schmelzkurven von den Proben Suman (gelb), Sumiko (grün) und SY Bacardi CLP (dunkelrot) unter Verwendung des Primerpaars SF03.

Es lassen sich somit alle Referenzsorten mit Hilfe von SF04xSF12, SF10, SF02 und SF03 differenzieren. In Tabelle 12 ist zusammengefasst, welche Paare von Sorten mit welchen Primerpaaren unterschieden werden konnten. Die Primerpaare SF02, SF03 und SF10 sind allerdings nur angegeben, wenn es nicht möglich war, die Sortenpaare mit Hilfe der Primerkombination SF04xSF12 zu unterscheiden. Die HRM-Kurven aller Sorten im Doppelansatz sind im Anhang 9.3.1 Abbildung 51-Abbildung 58 zu finden. Eine besondere Herausforderung war die Trennung von P63LL124 und P64LL155 sowie von Suman und Sumiko. Suman und Sumiko stammen von derselben Mutterlinie, ebenso die Sorten P63LL124 und P64LL155, was die große Ähnlichkeit erklärt.

Tabelle 12: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen Referenzsorten mit Hilfe von bestimmten Primerpaaren/Primerpaarkombinationen

Referenzproben	P63LL124	ES Columbella	P64HE133	P64HE118	P64LL155	Suman	SY Chronos	P63LL06	SY Gracia CLP	Tutti	RGT Wolff	Sureli	Soblus	ES Willis CLP	Sumiko	SY Bacardi	PR64F50
P63LL124		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF02	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
ES Columbella	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
P64HE133	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
P64HE118	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF02	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
P64LL155	SF02	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Suman	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF03	SF03	SF04xSF12
SY Chronos	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF02	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF02	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
P63LL06	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10
SY Gracia CLP	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Tutti	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF 10	SF04xSF12
RGT Wolff	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF 10	SF04xSF12
Sureli	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Soblus	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF02	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
ES Willis CLP	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Sumiko	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF03	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF03	SF04xSF12
SY Bacardi	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF03	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF03		SF04xSF12
PR64F50	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	

5.1.4 Diskriminierung von Sonnenblumensorten – unbehandelte Proben von der AGES

Für die Unterscheidung von neun Sonnenblumensorten, für die von der AGES unbebeizte Proben zur Verfügung gestellt wurden, genügt die Primerkombination SF04xSF12. Abbildung 21 zeigt die HRM-Kurven der einzelnen Sorten – zur besseren Übersicht wieder in Einfachbestimmung. Im Anhang 9.3.2 (Abbildung 59 Abbildung 60) sind alle Messungen in Doppelbestimmung der einzelnen Sorten zu finden. Bei den Sorten Clarasun SU, QC Toledo, P64LP130 und P64HH150 wurden Erntegüter von unterschiedlichen Anbaugebieten analysiert. Für die Proben QC Toledo_1 und QC Toledo_2, P64LP130_1 und P64LP130_2 sowie P64HH150_1 und P64HH150_2 wurden idente Schmelzkurven erhalten. Clarasun SU_1 weist hingegen Unterschiede im Vergleich zu Clarasun SU_2 und 3 auf (Anhang Abbildung 59 und Abbildung 60). Unterschiedliche Proben derselben Sorte sollten sich nicht unterscheiden, was bei den Sorten QC Toledo, P64LP130 und P64HH150 auch der Fall ist. Die Unterschiede von Clarasun SU_1 zu Clarasun SU_2 und Clarasun SU_3 können, wie schon im Abschnitt 4 erwähnt, auf Umwelteinflüsse wie Fremdbestäubung erklärt werden. In Tabelle 13 ist zusammengefasst, welche Paare von Sorten mit der Primerpaarkombination SF04xSF12 unterschieden werden konnten.

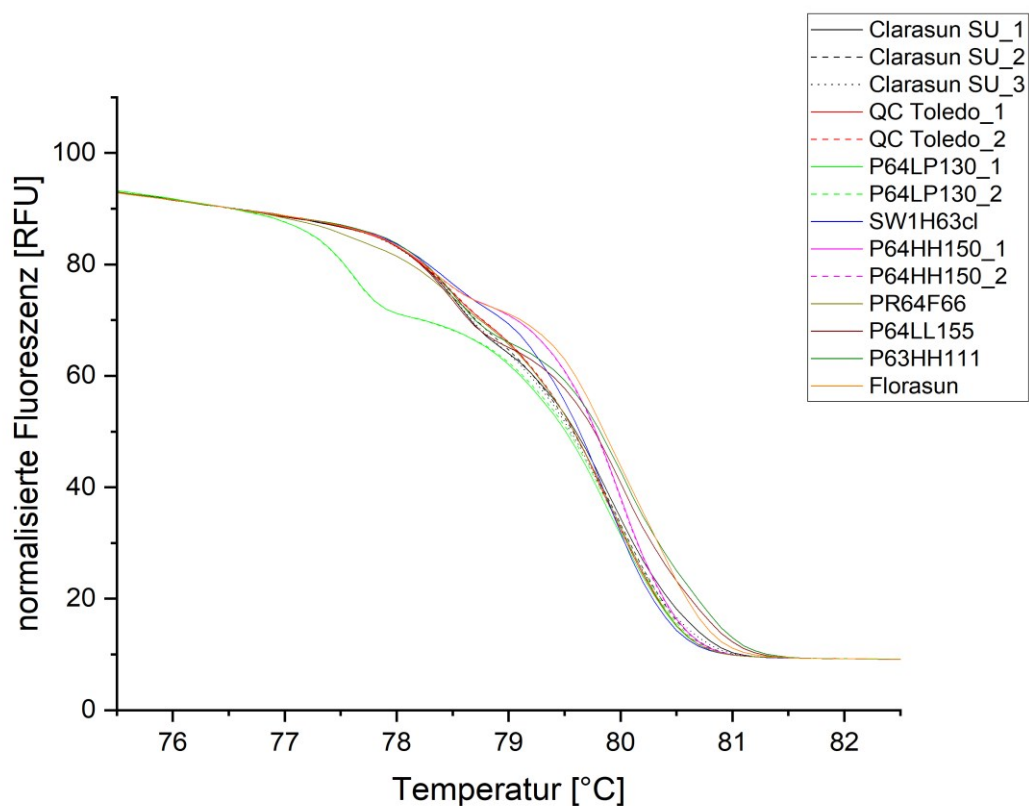


Abbildung 21: Normalisierte Schmelzkurven von den unbehandelten AGES-Proben unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12.

Tabelle 13: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen unbehandelten AGES-Proben mit Hilfe der Primerpaarkombination SF04xSF12. Die weiß markierten Felder zeigen Paare gleicher Sorte an, die aus diesem Grund nicht differenziert werden konnten.

unbehandelte Sorten	Clarasun SU Sack 1	Clarasun SU Sack 2	Clarasun SU Sack 3	QC Toledo Sack 1	QC Toledo Sack 2	P64LP130 Sack 1	P64LP130 Sack 2	SW1H63cl	P64HH150 Sack 1	P64HH150 Sack 2	PR64F66	P64LL155	P63HH111	Florasun
Clarasun SU Sack 1		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Clarasun SU Sack 2	SF04xSF12		-	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Clarasun SU Sack 3	SF04xSF12	-		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
QC Toledo Sack 1	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		-	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
QC Toledo Sack 2	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	-		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
P64LP130 Sack 1	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		-	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
P64LP130 Sack 2	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	-		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
SW1H63cl	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
P64HH150 Sack 1	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		-	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
P64HH150 Sack 2	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	-		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
PR64F66	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
P64LL155	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12
P63HH111	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12
Florasun	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	

5.1.5 Diskriminierung von Sonnenblumensorten – behandelte/gebeizte Proben von der AGES

Für die Unterscheidung von Sonnenblumensorten, für die von der AGES gebeizte Proben zur Verfügung gestellt wurden, wurden neben der Primerkombination SF04xSF12 die Primerpaare SF04, SF09, SF17 und SF19 verwendet, wobei die Sorten Prosun und Florasun_1 sowie die Sorten P64CL129 und Florasun_1 mit keinem der angeführten Primerpaare unterschieden werden konnten. Die besten Ergebnisse wurden mit der Primerkombination SF04xSF12 und dem Primerpaar SF09 erhalten. Darüber hinaus standen von den Sorten QC Toledo, Helesun und Florasun mehrere Proben zur Verfügung. Die beiden Proben der Sorte Florasun haben sich jedoch unterschieden, ebenso die Proben Helesun_1 und 4 von Helesun_2 und 3. Mögliche Gründe hierfür wurden bereits im Abschnitt 5.1.4 erläutert. Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen die HRM-Kurven der einzelnen Sorten in Einfachbestimmung und Tabelle 14 die Übersicht zur Diskriminierung der Sorten. Im Anhang 9.3.2 (Abbildung 61 und Abbildung 64) sind alle Ergebnisse in Doppelbestimmung der einzelnen Sorten zu finden.

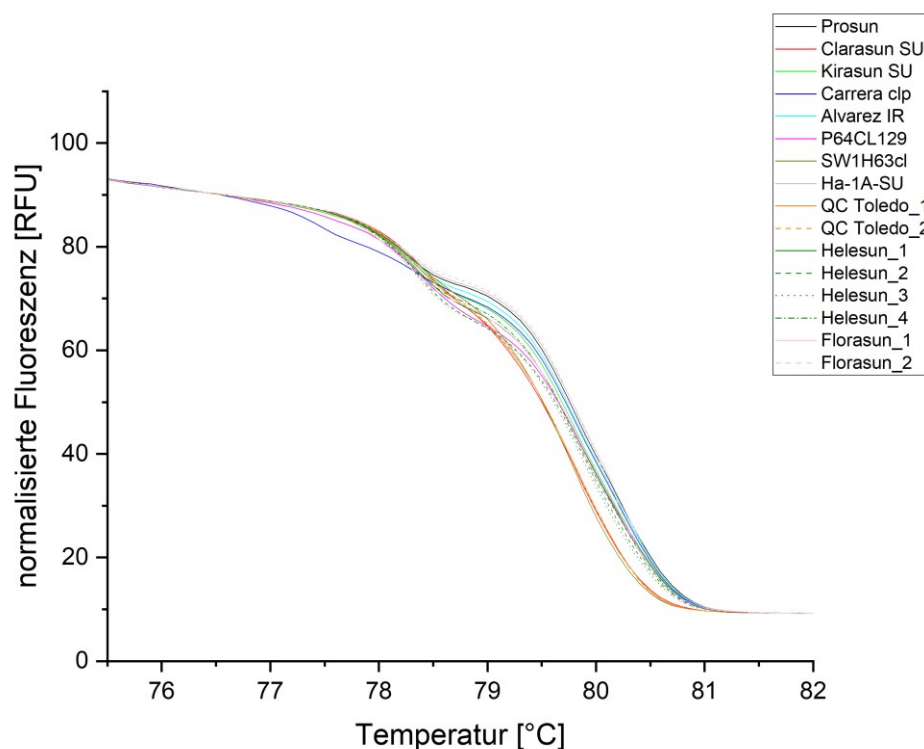


Abbildung 22: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12

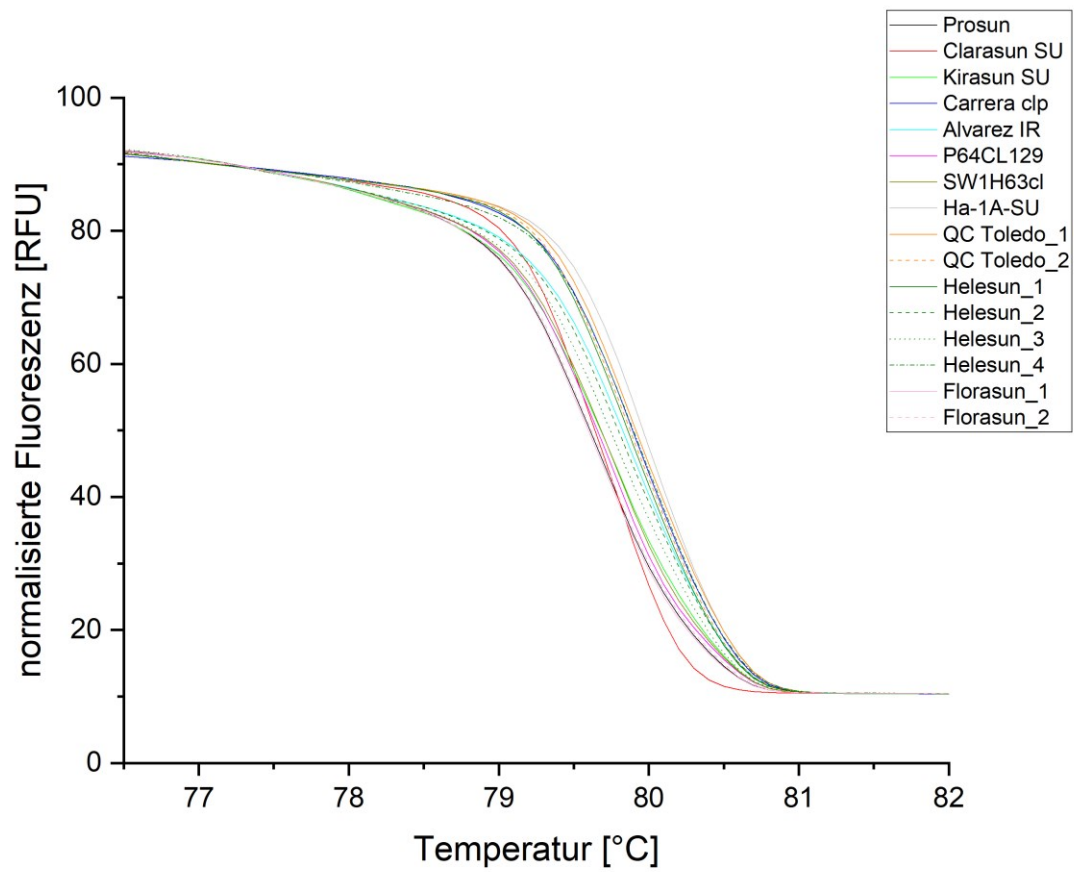


Abbildung 23: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben unter Verwendung des Primersets SF09.

Tabelle 14: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen gebeizten AGES-Proben mit Hilfe der Primerkombination SF04xSF12 und des Primerpaars SF09. Die rot markierten Sortenpaare ließen sich mit keiner der getesteten Primerkombinationen unterscheiden. Ebenso konnten die Paare gleicher Sorten, die weiß markiert sind, nicht unterschieden werden.

behandelte Sorten	Prosun	Clarasun SU	Kirasun SU	Carrera clp	Alvarez IR	P64CL129	SW1H63cl	Ha-1A-SU	QC Toledo 1	QC Toledo 2	Helesun 1	Helesun 2	Helesun 3	Helesun 4	Florasun 1	Florasun 2
Prosun		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	/
Clarasun SU	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF09	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Kirasun SU	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF09	SF04xSF12
Carrera clp	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Alvarez IR	SF09	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09
P64CL129	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF09	SF09	SF04xSF12	/	SF04xSF12
SW1H63cl	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF09	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Ha-1A-SU	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09
QC Toledo 1	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12		-	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
QC Toledo 2	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	-		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Helesun 1	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	-	SF09	SF04xSF12
Helesun 2	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		-	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Helesun 3	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	-		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Helesun 4	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	-	SF04xSF12	SF04xSF12		SF09	SF04xSF12
Florasun 1	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	/	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09		SF04xSF12
Florasun 2	/	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	

5.1.6 Diskriminierung von Sonnenblumensorten – Proben von Saatgut Austria

14 Proben von Saatgut Austria konnten mit der Primerkombination SF04xSF12 und den Primerpaaren SF09 und SF 10 unterschieden werden. Zur besseren Übersicht sind die HRM-Kurven der Sorten in einfacher Bestimmung dargestellt; alle Ergebnisse in Doppelbestimmung der einzelnen Sorten finden sich im Anhang 9.3.4 Abbildung 65-Abbildung 70.

Abbildung 24 zeigt die Schmelzkurven mit der Primerkombination SF04xSF12. Anhand dieser Methode lassen sich die Sorten Savanna (lila), Neostar (grün), PR64F50 (grau), SY Academic CL (magenta), ES Regata (olive), DS1-Sambasol (blau) und ES Columbella (cyan) deutlich von sämtlichen anderen Sorten unterscheiden. Die Sorten NK Stradi (rosa), NK Delfi (orange) und Bacardi (schwarz) weisen ähnliche Schmelzkurven auf und bilden eine Gruppe. Ebenso verhält es sich mit den Sorten Sumiko (rot), DS 3 Sigmasol (dunkelgelb), Nirvana (braun) und SY Mariner (gelb).

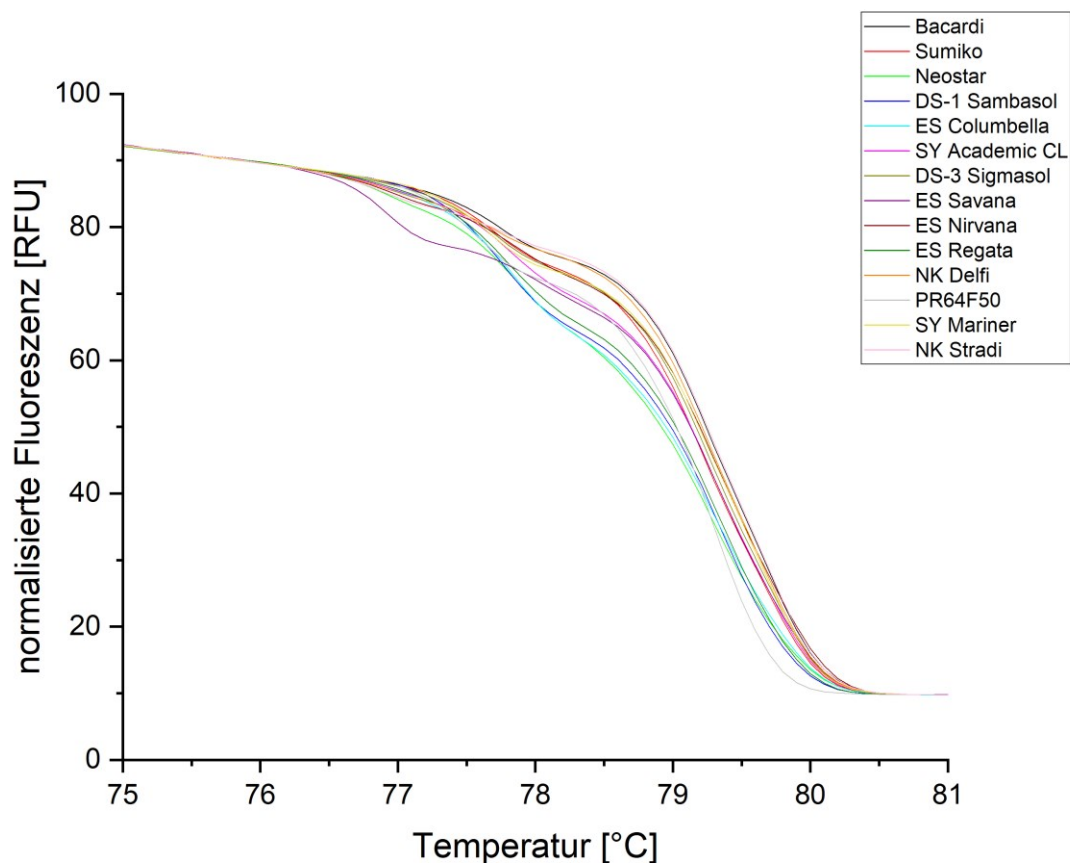


Abbildung 24: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria-Proben unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12.

Für die Unterscheidung der Sorten, welche nicht ausreichend mit der Primerpaarkombination SF04xSF12 differenziert werden konnten, wurden die Primerpaare SF09 und SF10 benötigt. Die HRM-Kurven aller Sorten sind in den Abbildung 25 und Abbildung 26 dargestellt, die Versuche wurden unter Verwendung der Primerpaare SF09 bzw. SF10 in einfacher Bestimmung durchgeführt. Die Zusammenfassung der Ergebnisse zur Sortendiskriminierung findet sich in Tabelle 15.

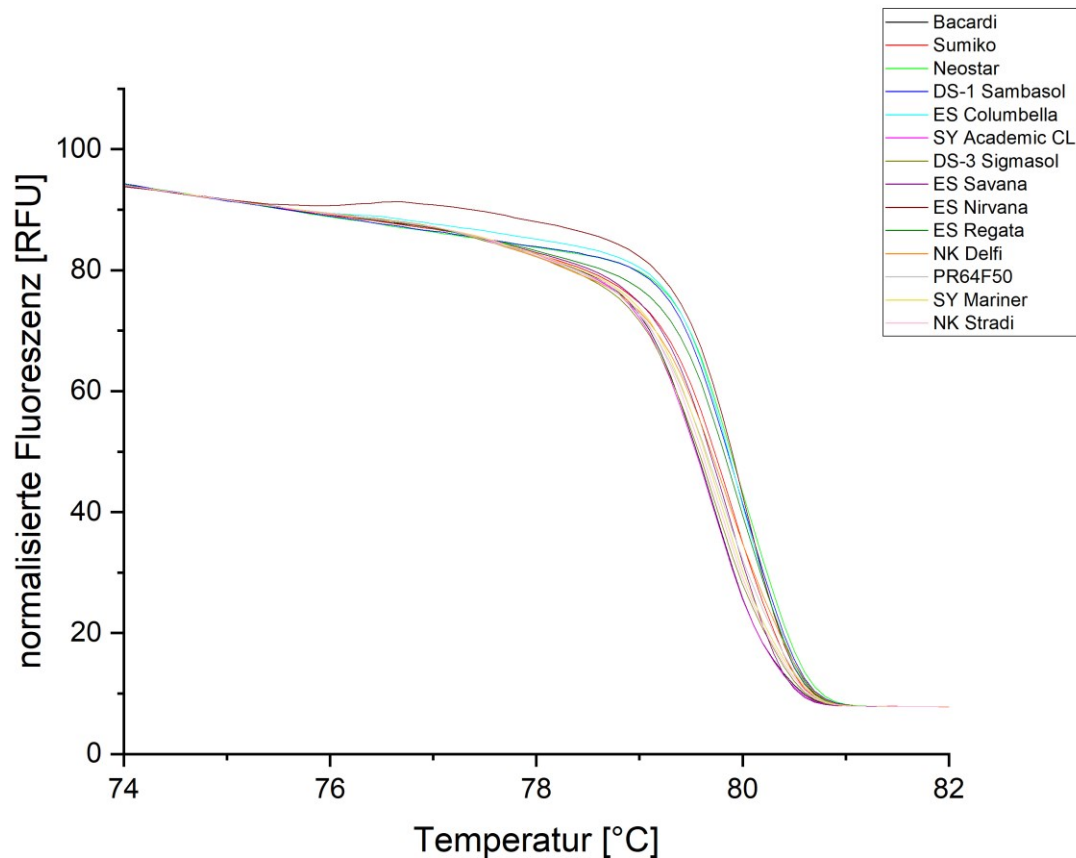


Abbildung 25: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria-Proben unter Verwendung des Primerpaars SF09.

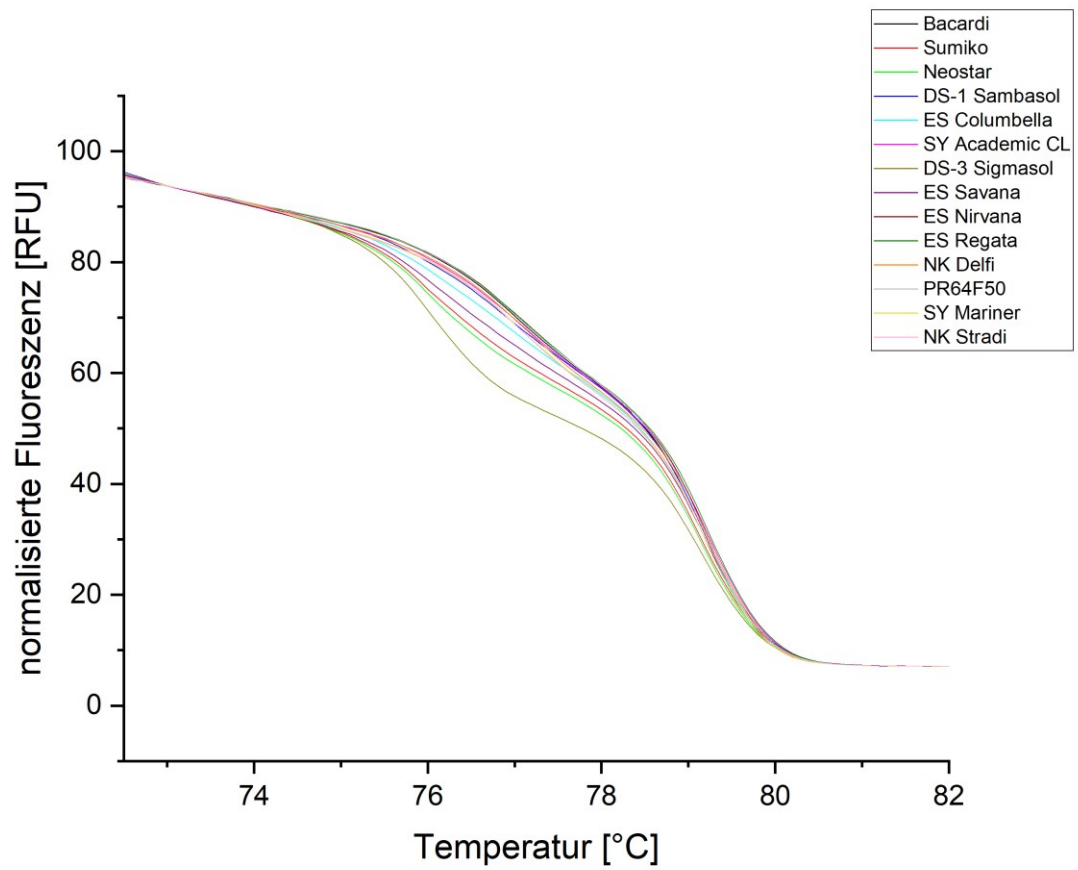


Abbildung 26: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria-Proben unter Verwendung des Primerpaars SF10.

Tabelle 15: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen Saatgut Austria-Proben mit Hilfe von bestimmten Primerpaaren/Primerkombinationen

Saatgut Austria	Bacardi	Sumiko	Neostar	DS-1 Sambasol	ES Columbella	SY Academic CL	DS-3 Sigmasol	ES Savana	ES Nirvana	ES Regata	NK Delfi	PR64F50	SY Mariner	NK Stradi
Bacardi		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Sumiko	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
Neostar	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
DS-1 Sambasol	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
ES Columbella	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
SY Academic CL	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
DS-3 Sigmasol	SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12
ES Savana	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
ES Nirvana	SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
ES Regata	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 09	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12
NK Delfi	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12	SF 09
PR64F50	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12	SF04xSF12
SY Mariner	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 10	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12		SF04xSF12
NK Str	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF04xSF12	SF 09	SF04xSF12	SF04xSF12	

5.1.7 Vergleich der Ergebnisse für mehrere Proben von ein und derselben Sorte

Da für manche Sorten Proben sowohl von der AGES als auch von Saatgut Austria zur Verfügung gestellt wurden, war es möglich, die Wiederholbarkeit der Methode zu überprüfen. Darüber hinaus konnte untersucht werden, ob die Beizung einer Sorte Einfluss auf die PCR-HRM hat oder nicht. Es soll jedoch angemerkt werden, dass bezüglich der Sortenbezeichnung auf die Angabe der Probenlieferanten vertraut wurde. Tabelle 16 zeigt, welche Proben verglichen worden sind.

Tabelle 16: Vergleich mehrerer Proben von ein und derselben Sorte

Sorte	Herkunft	Anmerkung
Bacardi bzw. SY Bacardi CLP	Saatgut Austria bzw. AGES	Primerpaar SF09
Sumiko	Saatgut Austria und AGES	Primerpaar SF09
ES Columbella	Saatgut Austria und AGES	Primerpaar SF09
PR64F50	Saatgut Austria und AGES	Primerpaar SF09
QC Toledo	AGES	Gebeizt und unbehandelt, Primerkombination SF04xSF12
SW1H63cl	AGES	Gebeizt und unbehandelt, Primerkombination SF04xSF12
P64LL155	AGES	Standardmuster und unbehandelte Probe, Primerkombination SF04xSF12

In Abbildung 27 sind die Schmelzkurven in Doppelbestimmung mit dem Primerpaar SF09 für die Sorten Bacardi und ES Columbella dargestellt, die von Saatgut Austria bzw. von der AGES bereitgestellt wurden. Es ist festzustellen, dass die Schmelzkurven beider Sorten aus den verschiedenen Quellen sehr gut miteinander übereinstimmen. Die Sorten Sumiko und PR64F50 hingegen zeigen deutliche Unterschiede in den Schmelzkurven (Abbildung 28). Wenn für die Produktion dieser Hybride dieselben Eltern verwendet wurden, sollte es keine genetischen Unterschiede geben und somit auch keine Unterschiede in der Schmelzkurve. Die Recherche ergab, dass es wahrscheinlich zu einer Sortenverwechslung gekommen ist. Zur Überprüfung müsste das Saatgut erneut bezogen und die Analysen wiederholt werden, um sie anschließend mit den Referenzsorten zu vergleichen.

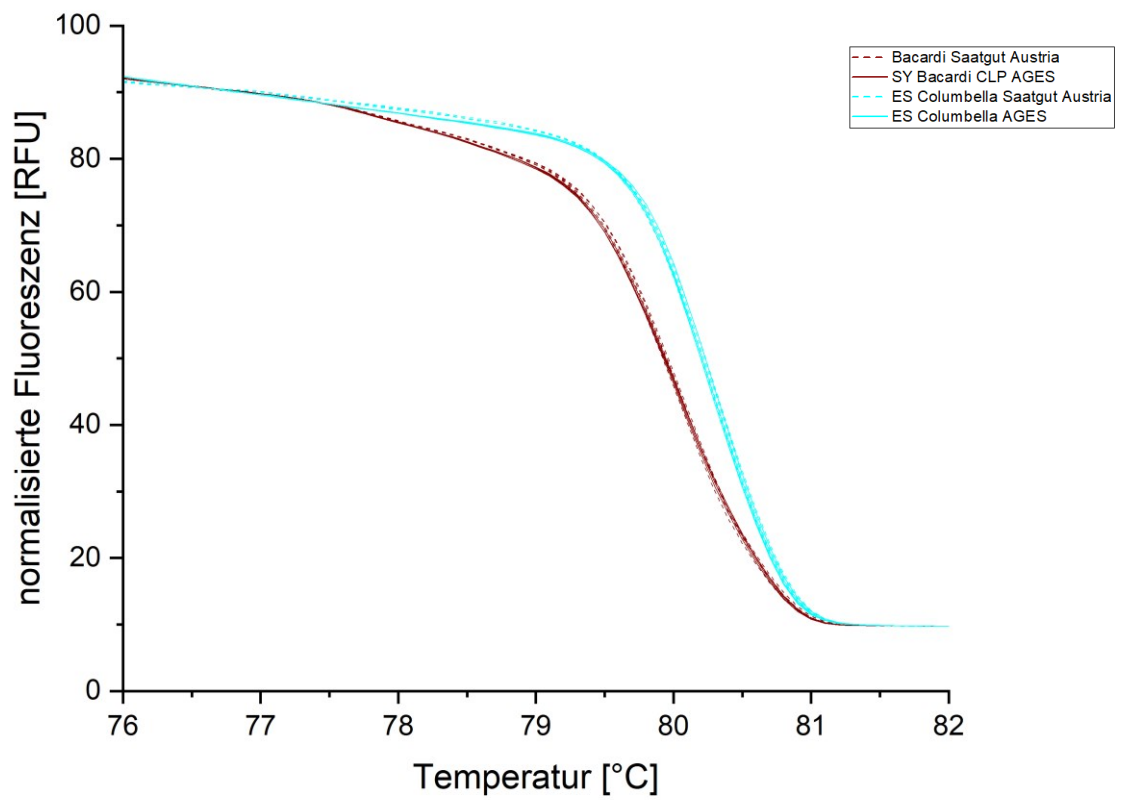


Abbildung 27: Vergleich der normalisierten Schmelzkurven von den Sorten Bacardi und ES Columbella unterschiedlicher Hersteller unter Verwendung des Primerpaars SF09.

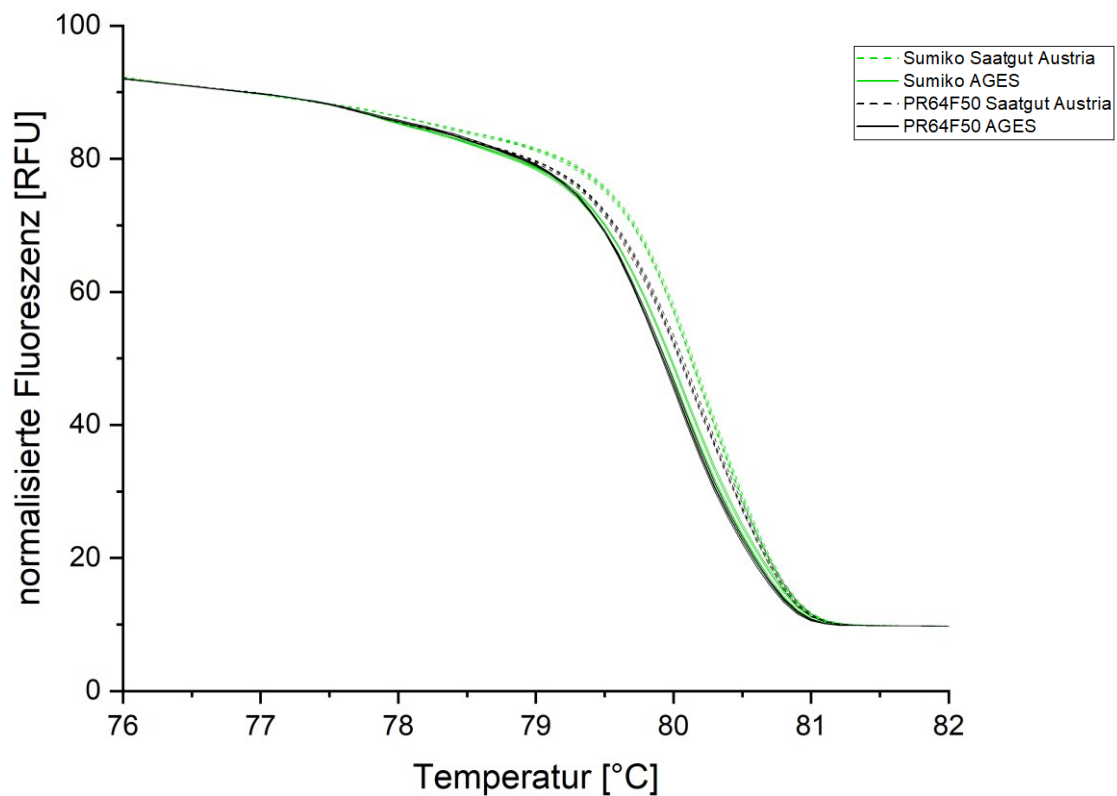


Abbildung 28: Vergleich der normalisierten Schmelzkurven von den Sorten Sumiko und PR64F50 unterschiedlicher Hersteller unter Verwendung des Primerpaars SF09.

Die Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigen die Schmelzkurven der zwei behandelten und unbehandelten Proben der Sorte QC-Toledo_1 und 2 sowie von SW1H63cl mit der Primerkombination SF04xSF12. Obwohl es zwischen QC-Toledo_1 und 2 geringe Unterschiede in der geographischen Herkunft und der Saatgutbehandlung gab, wurden überlappende Schmelzkurven erhalten. Diese Ergebnisse zeigen, dass weder die geographische Herkunft noch das Beizen einen Einfluss auf das Schmelzverhalten der Amplicons hatte.

Bei der Sorte SW1H63cl ist der Unterschied größer (Abbildung 30). Die Form der Schmelzkurve ist zwar sehr ähnlich, die Schmelzkurve der unbehandelten Proben ist jedoch leicht in Richtung höherer Schmelztemperatur verschoben. Dieser Trend ist auch, wenn auch in einem deutlich geringeren Ausmaß, bei QC-Toledo zu sehen. Ob dieser Umstand durch Bestandteile der Beize hervorgerufen wird oder auf eine andere Ursache zurückzuführen ist, kann nicht beantwortet werden. Dazu müssten von mehreren Sorten sowohl gebeizte als auch ungebeizte Proben analysiert werden,

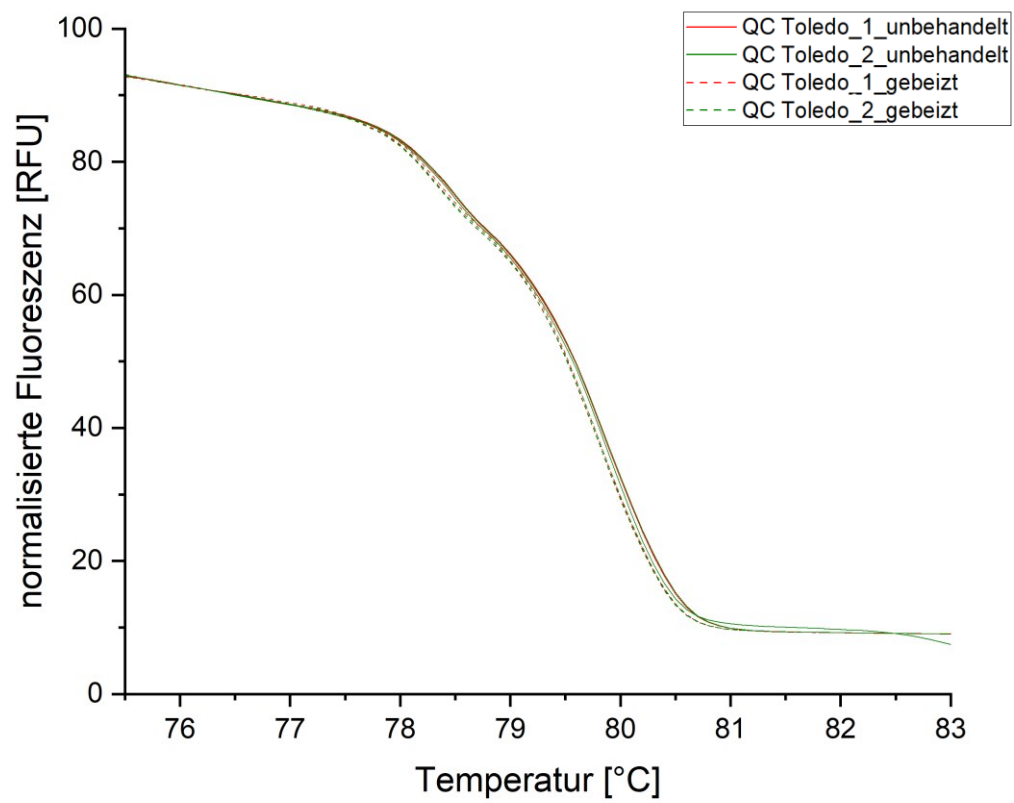


Abbildung 29: Vergleich der normalisierten Schmelzkurven von ungebeizten und gebeizten Proben der Sorte QC Toledo.

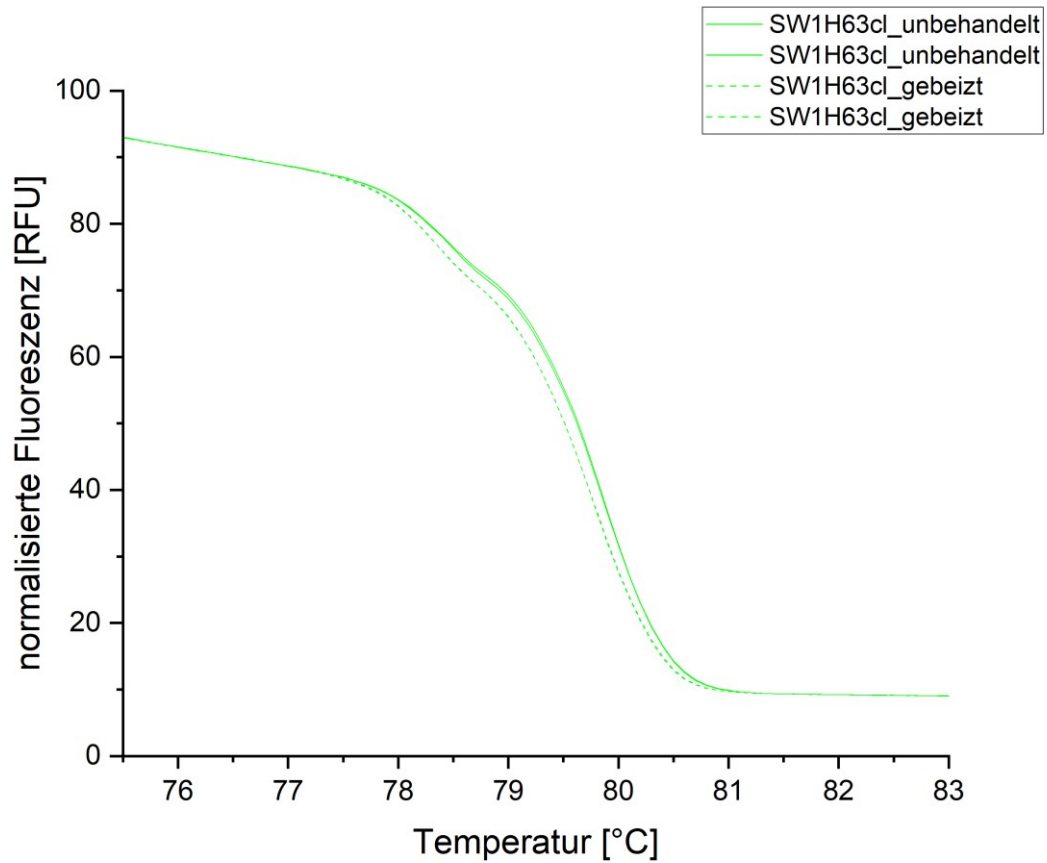


Abbildung 30: Vergleich der normalisierten Schmelzkurven von ungebeizten und gebeizten Proben der Sorte SW1H63cl.

Die AGES stellte mehrere Probenpakete für die Analyse zur Verfügung. Die Sorte P64LL155 war sowohl Teil der Referenzsorten/Standardmuster als auch des Probenpakets der unbehandelten Sorten. Abbildung 31 zeigt beide Schmelzkurven der Proben mit der Primerkombination SF04xSF12. Die Kurvenformen ähneln sich sehr stark, was dafür spricht, dass es sich um dieselbe Sorte handelt.

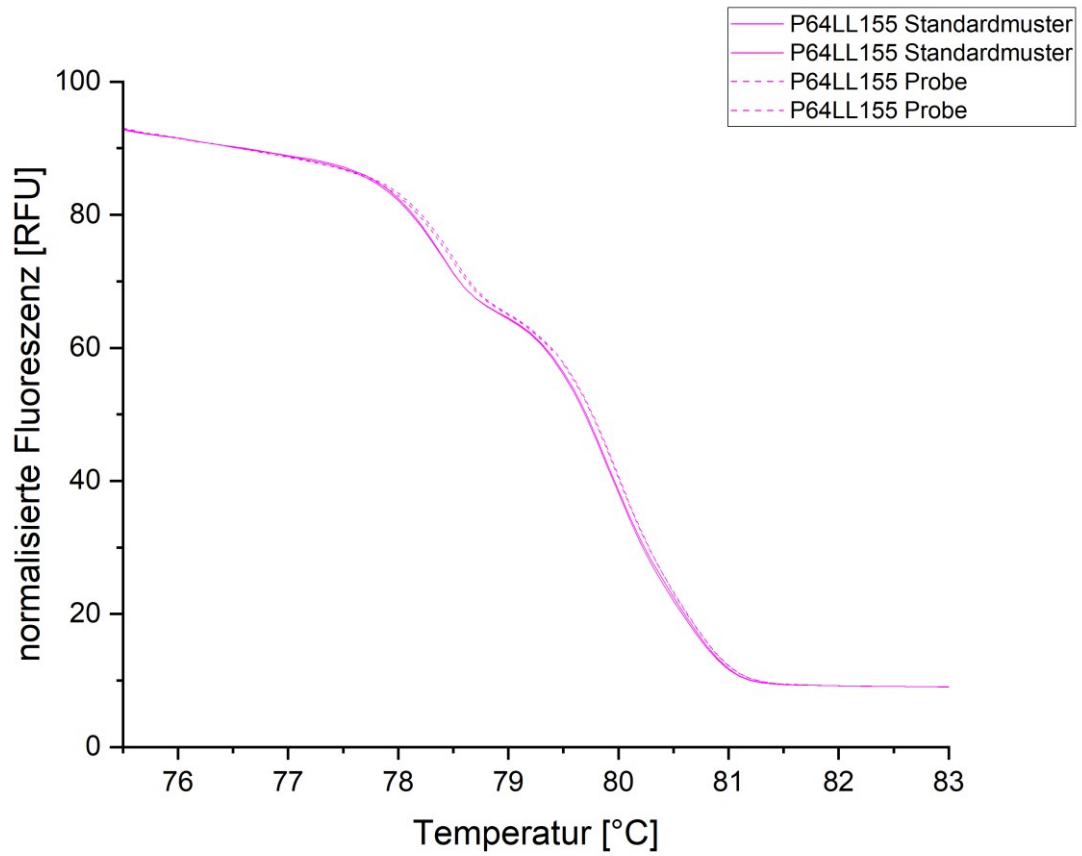


Abbildung 31: Vergleich der normalisierten Schmelzkurven zwischen der Referenzprobe P64LL155 und der Probe P64LL155, die Teil des Pakets der unbehandelten Proben war.

5.2 Weinproben

Die PCR-HRM wurde mit 9 verschiedenen Primerpaaren (Anhang 9.9) durchgeführt. Wie im experimentellen Teil 4.2 bereits erwähnt, dienten als Proben Blätter von 11 Rebsorten von je 2 verschiedenen Anbaugebieten. Deshalb sollte neben der Diskriminierung der 11 Sorten auch überprüft werden, ob die unterschiedliche geografische Lage derselben Sorte einen Einfluss auf die Ergebnisse hat.

5.2.1 Fluorometrische Bestimmungen der DNA-Konzentrationen

In Tabelle 17 sind die Probeneinwaagen, deren Ursprung sowie die mittels Fluorometrie ermittelten Konzentrationen aufgelistet. Es erfolgte ausschließlich die Messung des ersten Eluats. Eluate mit einer DNA-Konzentration unter der Bestimmungsgrenze sind durch ein Minuszeichen (-) gekennzeichnet. Die DNA-Konzentrationen schwanken sehr stark, da die Qualität der Proben sehr unterschiedlich war. Insbesondere Blätter aus der Region Resava waren sehr bröselig und es machte den Anschein, als hätte die Zersetzung bereits begonnen. Bei der Zersetzung der Blätter könnte auch die DNA abgebaut worden sein, sodass sie nicht mehr extrahierbar wäre.

Tabelle 17: Weinprobenliste

Sorte	Ursprung	Einwaage (g)	c Eluat 1 (ng/μL)	Datum
Temjanika	Korija	0,1542	2,76	27.09.2023
Muscat Hamburg	Rosoman	0,1492	70	27.09.2023
Vranec	Chichevo	0,1500	70,8	27.09.2023
Afus Ali	Rosoman	0,1576	3,61	27.09.2023
Stanusina	Resava	0,1519	1,95	27.09.2023
Muscat Italia	Rosoman	0,1518	136	27.09.2023
Smederevka	Resava	0,1566	-	27.09.2023
Plovdina	Probistip	0,1598	108	27.09.2023
Afus Ali	Goligas	0,2462	73,6	29.09.2023
Plovdina	Resava	0,1865	1,93	29.09.2023
Smederevka	Resava	0,2200	-	29.09.2023
Smederevka	Begnishte	0,2292	157	29.09.2023
Kardinal	Resava	0,2463	10,8	29.09.2023
Kardinal	Ljubash	0,1815	95	29.09.2023
R'Kaciteli	Sivkova	0,1660	149	29.09.2023
R'Kaciteli	Begnishte	0,1945	164	29.09.2023
Prokupec	Begnishte	0,2583	80,9	02.10.2023
Prokupec	Resava	0,1966	1,49	02.10.2023
Stanusina	Begnishte	0,2366	52,5	02.10.2023
Muscat Italia	Palikura	0,2546	133	02.10.2023
Vranec	Goligas	0,2854	102	02.10.2023
Temjanika	Sopot	0,2728	-	02.10.2023
Afus Ali	Goligas	0,2435	192	02.10.2023
Smederevka	Resava	0,2200	-	02.10.2023
Muscat Hamburg	Sopot	0,2549	216	04.10.2023
Afus Ali	Rosoman	0,3676	65,3	04.10.2023
Temjanika	Korija	0,2638	43,8	04.10.2023

Sorte	Ursprung	Einwaage (g)	c Eluat 1 (ng/μL)	Datum
Temjanika	Sopot	0,3279	1,55	04.10.2023
Kardinal Blatt 1	Resava	0,1629	3,9	24.10.2023
Kardinal Blatt 2	Resava	0,1721	1,22	24.10.2023
Kardinal Blatt 3	Resava	0,1637	183	24.10.2023
Kardinal Blatt 1	Ljubash	0,1758	1,8	24.10.2023
Kardinal Blatt 2	Ljubash	0,1730	170	24.10.2023
Kardinal Blatt 3	Ljubash	0,1225	146	24.10.2023
Plovdina Blatt 1	Probistip	0,2166	38,1	24.10.2023
Plovdina Blatt 2	Probistip	0,1512	402	24.10.2023
Plovdina Blatt 3	Probistip	0,1515	36	24.10.2023
Plovdina Blatt 1	Resava	0,1781	2,93	24.10.2023
Plovdina Blatt 2	Resava	0,1705	2,28	24.10.2023
Plovdina Blatt 3	Resava	0,1605	51,7	24.10.2023
Smederevka Blatt 1	Begnishte	0,1907	182	03.11.2023
Smederevka Blatt 2	Begnishte	0,1796	171	03.11.2023
Smederevka Blatt 3	Begnishte	0,1904	14,2	03.11.2023
Smedervka	Resava	0,1850	-	03.11.2023

5.2.2 Optimierung der Annealingtemperatur der Primerpaare

Das Vorgehen der Optimierung der Annealingtemperatur wurde im Abschnitt 4.3 erläutert. Die Annealingtemperatur der Primerpaare wurde, bei drei verschiedenen Temperaturen, für alle 9 Primerpaare überprüft. Die Primerkonzentration wurde unverändert bei 0,2 µM belassen. Als Probe diente dabei die Sorte Muscat Italia. Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen die Amplifikationskurven der jeweiligen PCR-Reaktion mit den 9 unterschiedlichen Primerpaaren. Da die Amplifikation bei 55°C in allen Fällen gut funktionierte, wurde für die nachfolgenden Analysen diese Annealingtemperatur festgelegt sowie keine weiteren Versuche mit anderen Konzentrationen durchgeführt.

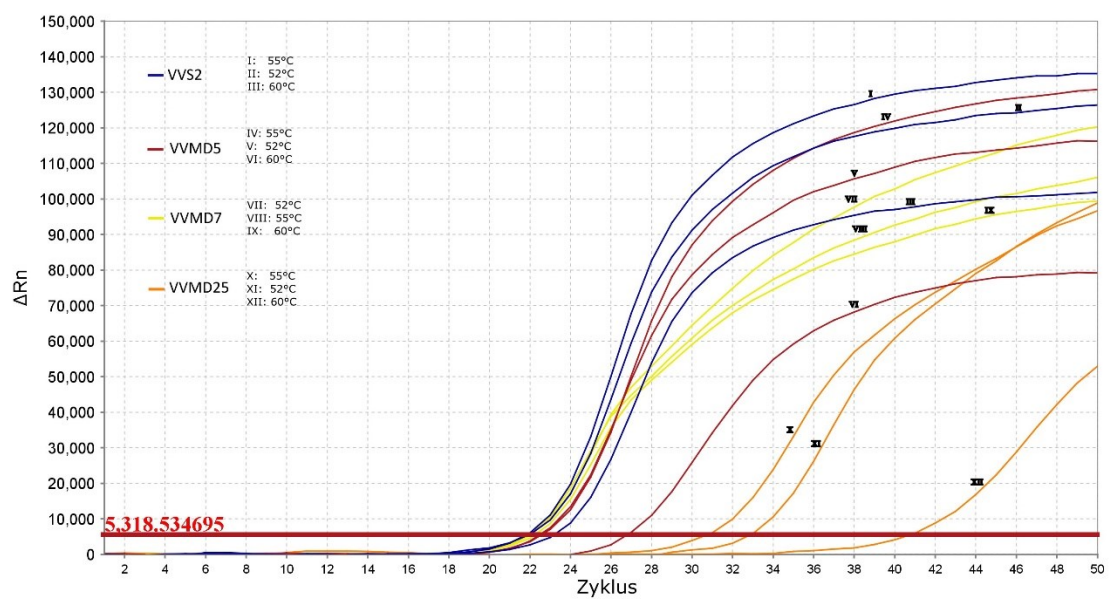


Abbildung 32: Amplifikationskurven der Sorte Muscat Italia mit den Primerpaaren VVS2, VVMD5, VVMD7 und VVMD25.

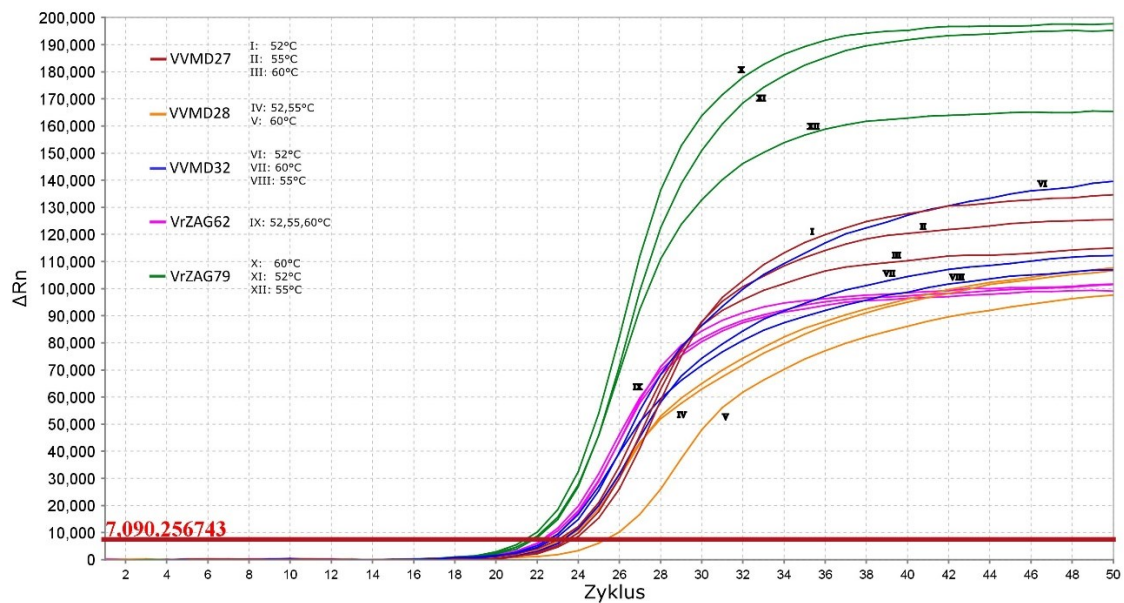


Abbildung 33: Amplifikationskurven der Sorte Muscat Italia mit den Primerpaaren VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 und VrZAG79.

5.2.3 Unterscheidung der nordmazedonischen Weinsorten mittels HRM

Die Weinsorten wurden mit den Primerpaaren VVS2, VVMD5, VVMD7 VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 und VrZAG79 getestet. Alle Primerpaare mit Ausnahme von VVMD5 lieferten gute Ergebnisse für die Diskriminierung der einzelnen Sorten. Die Tabelle 20 im Anhang 9.4 listet alle Sorten auf sowie die entsprechenden Primerpaare, die in der Lage waren, die jeweiligen Sortenpaare zu unterscheiden. Bei VVMD5 gab es Probleme bei der Amplifikation und es kam zur Bildung von mehreren Produkten und komplexen Schmelzkurven.

Das Primerpaar VrZAG79 brachte das beste Ergebnis. Mit diesem ließen sich alle Sorten voneinander unterscheiden außer Temjanika von Prokupec und Afus Ali von Plovdiva. Diese 2 Paare ließen sich aber mit den Primerpaaren VVS2, VVMD7, VVMD27, VVMD28 und VrZAG62 unterscheiden. Um eine vollständige Diskriminierung aller Sorten in einer PCR-HRM Reaktion zu ermöglichen, wurde versucht, das Primerpaar VrZAG79 mit einem der 5 Primerpaare zu kombinieren. Da das PCR-Produkt, welches mit dem Primerpaar VVS2 erhalten wurde, mit rund 76 °C den größten Schmelzpunktunterschied zu dem PCR-Produkt des VrZAG79 Primers aufwies (Tabelle 18), wurde diese Kombination getestet. Dieser

Umstand ist deshalb wichtig, da in der Reaktion zwei PCR-Produkte gebildet werden und diese bei ähnlicher Schmelztemperatur wechselwirken können.

Tabelle 18: Schmelztemperatur des PCR-Produkts der verschiedenen Primerpaare

Primerpaar	Ungefähre Schmelztemperatur des PCR-Produkts (°C)
VVS2	76
VVMD7	84
VVMD27	82
VVMD28	78,5
VrZAG62	80,5
VrZAG79	80

In Abbildung 34 sind die ersten negativen Ableitungen der beiden Schmelzkurven, bei der Verwendung des Primerpaars VVS2 beziehungsweise des Primerpaars VrZAG79, dargestellt. Die beiden Primerpaare ergänzten sich sehr gut, da es zu keiner Überlagerung der Schmelzkurven ihrer PCR-Produkte kam und keine Primerdimere gebildet wurden.

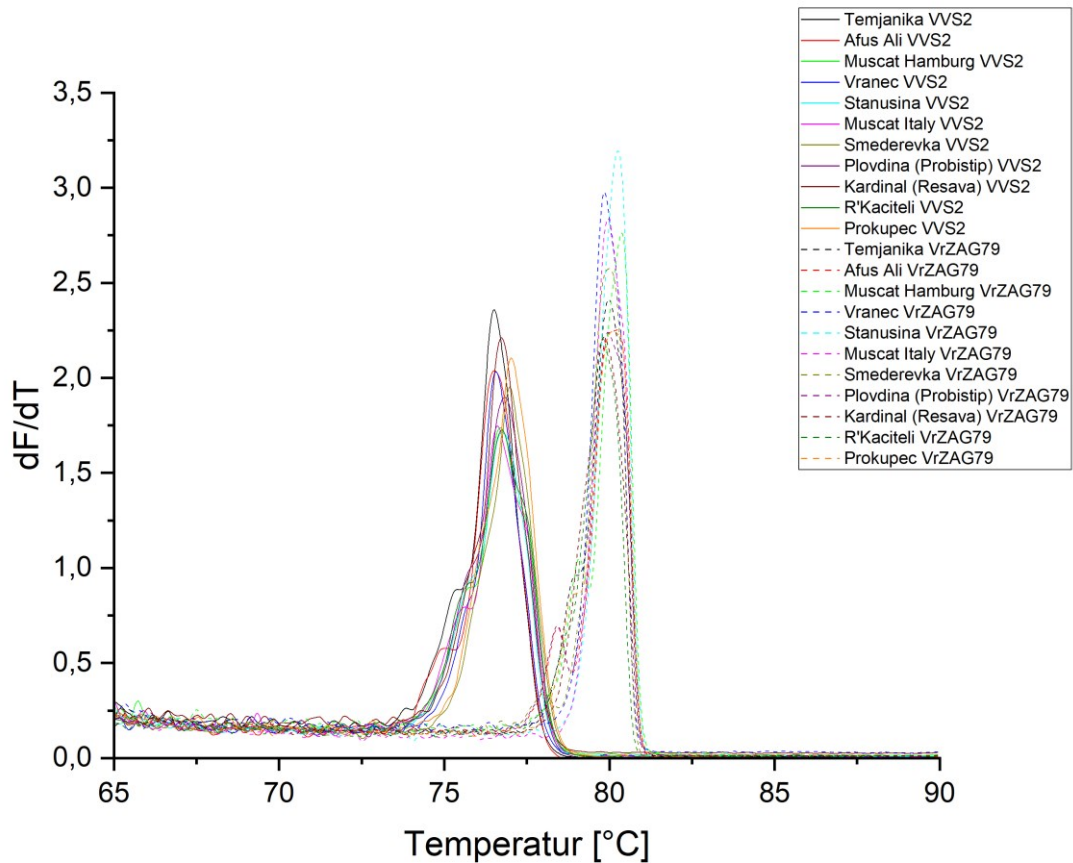


Abbildung 34: 1. negative Ableitungen der Schmelzkurven von den Weinproben mit den Primerpaaren VVS2 sowie VrZAG79.

Abbildung 35 zeigt die 1. negativen Ableitungen der Schmelzkurven, die mit der Kombination der beiden Primerpaare in einer Duplex-Reaktion erhalten wurden. Der Peak des Produkts des Primerpaares VVS2 hat sein Maximum bei ca. 76 °C, der des Produkts von VrZAG79 bei 80 °C. Beim Vergleich von Abbildung 34 und Abbildung 35 wird deutlich, dass sich die Höhe des Peaks des Produkts des Primerpaares VVS2 bei der Duplex-Reaktion verringerte, während der Peak des mit dem Primerpaar VrZAG79 erhaltenen Produkts nur gering an Höhe verliert. Die Zusammensetzung des Reaktionsmix der Duplex-Reaktion ist in Tabelle 19 zu sehen.

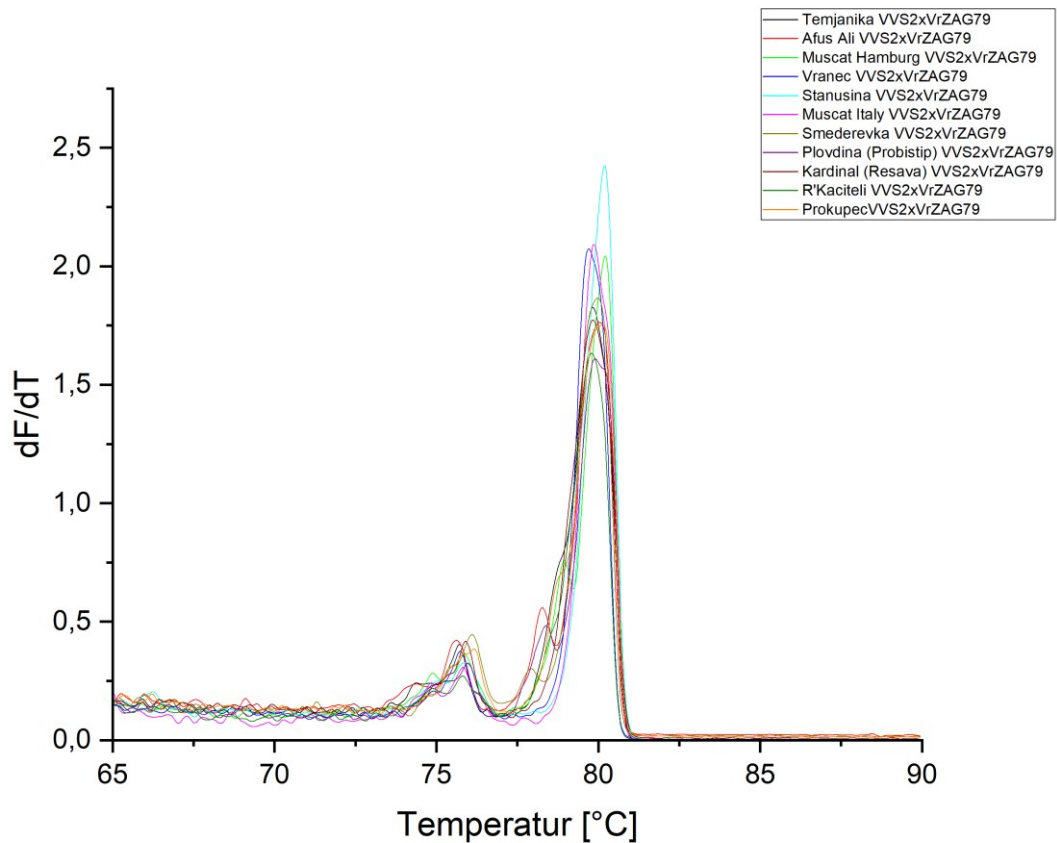


Abbildung 35: 1. negative Ableitungen der Schmelzkurven von den Weinproben mit der Primerkombination VVS2xVrZAG79.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die Duplexreaktion VVS2xVrZAG79

Reaktionsmix	Volumen (µL)
2xHRM PCR Master Mix	10
RNase freies Wasser	6,4
Primer VVS2, 10 µM forward (fw)	0,4
Primer VVS2, 10 µM reverse (rev)	0,4
Primer VrZAG79, 10 µM forward (fw)	0,4
Primer VrZAG79, 10 µM reverse (rev)	0,4
Mastermix pro Tube	18
DNA-Extrakt	2
Gesamt	20

In den Abbildung 36-Abbildung 38 sind die normalisierten Schmelzkurven der Weinproben mit den Primerpaaren VVS2, VrZAG79 sowie der Primerkombination VVS2xVrZAG79 zu sehen. In Abbildung 38 ist auch gut der Einfluss von VVS2 bei 76°C zu sehen und der Schmelzbeginn bei 78°C von dem PCRProdukt des VrZAG79-Primers.

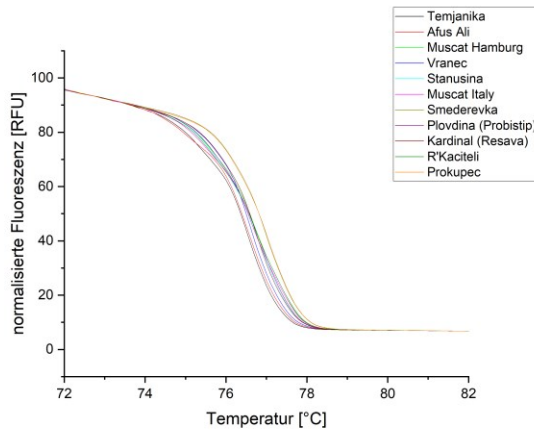


Abbildung 36: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VVS2.

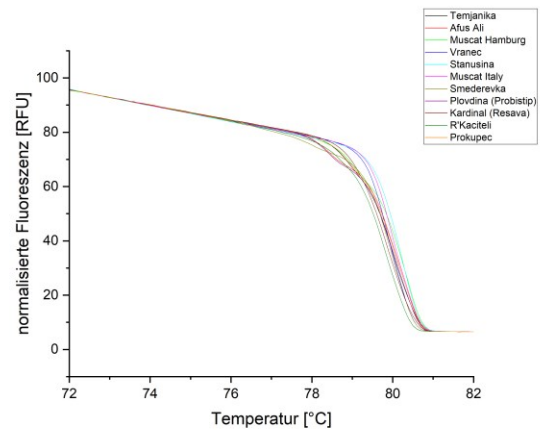


Abbildung 37: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VrZAG79.

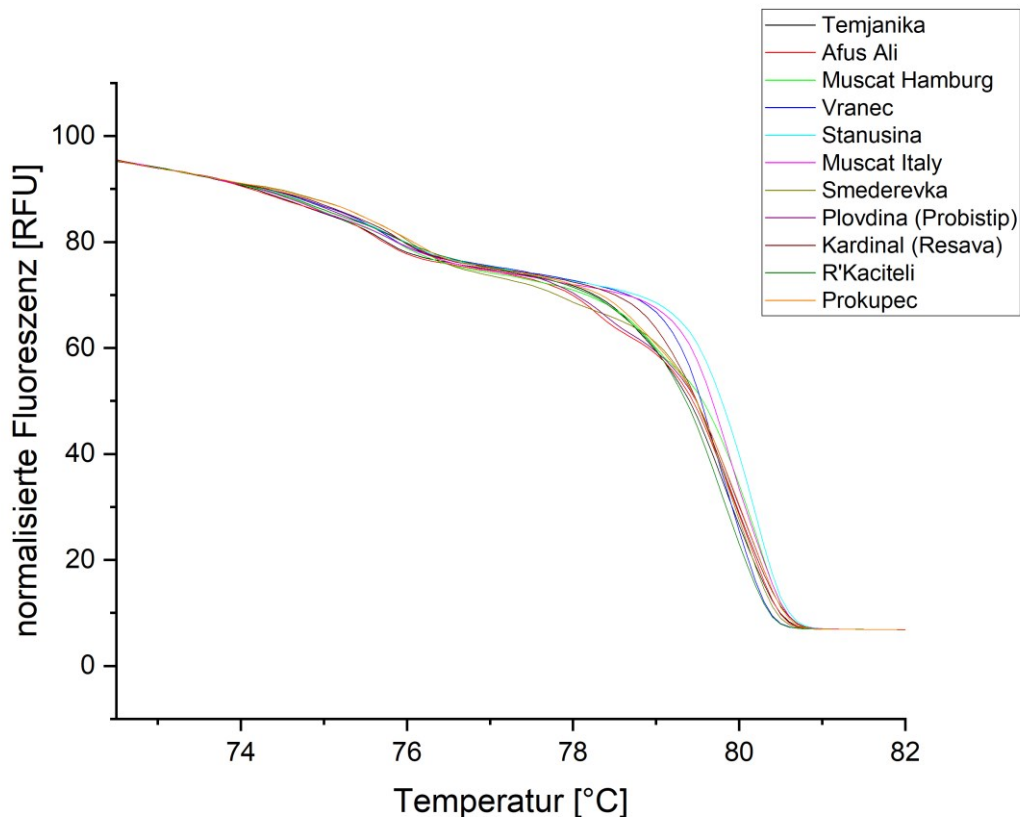


Abbildung 38: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung der Primerkombination VVS2xVrZAG79.

5.2.4 Einfluss des geografischen Anbaugebiets auf den Schmelzkurvenverlauf

Von jeder Weinsorten wurden Proben von zwei unterschiedlichen Anbaugebieten untersucht. Mittels PCR-HRM Analyse konnten bei 9 der 11 Sorten keine Unterschiede gefunden werden (Abbildung 39).

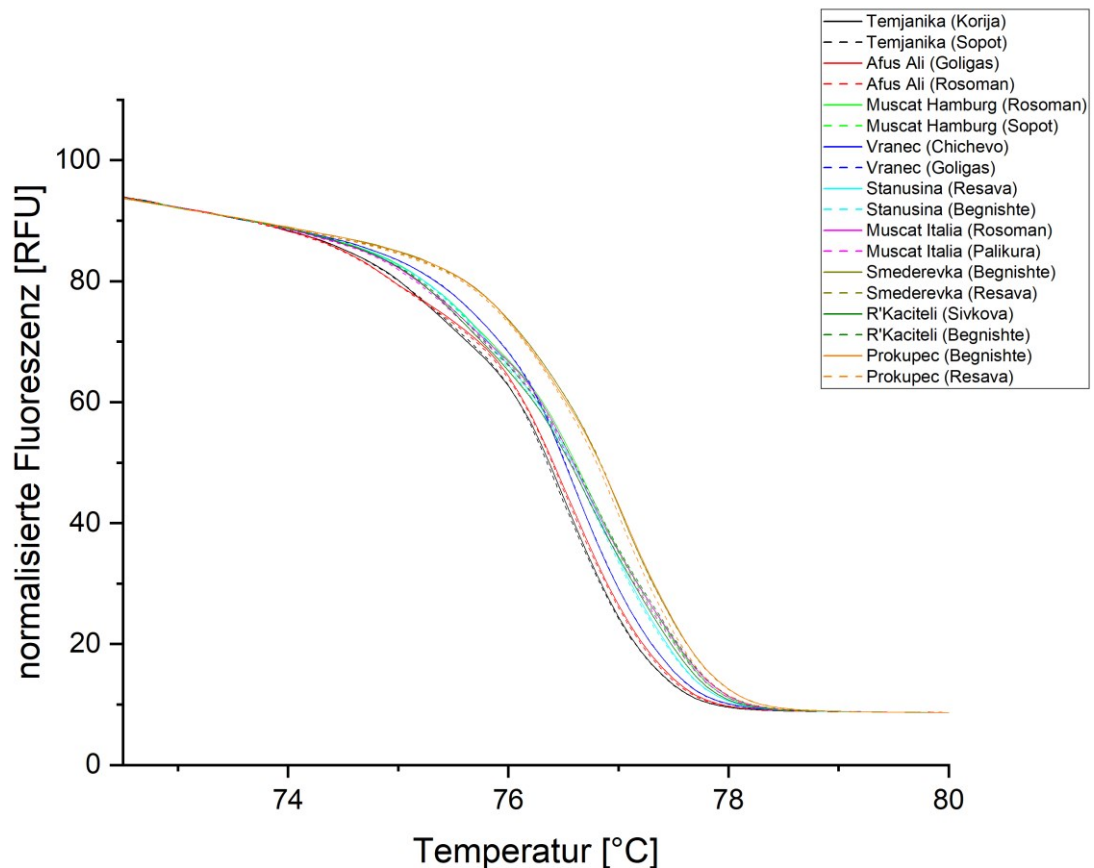


Abbildung 39: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaars VrZAG62.

Trotz wiederholter Extraktionsversuche war es nicht möglich, DNA aus Blättern der Sorte Smederevka von dem Anbaugebiet Resava zu isolieren. Die DNA-Konzentration der Extrakte lag immer unter der Bestimmungsgrenze. Bei der PCR wurden diese Extrakte unverdünnt eingesetzt. Entweder kam es zu keinem Anstieg des Fluoreszenzsignals oder der Ct-Wert war deutlich höher als die Ct-Werte der anderen Proben. Abbildung 40 zeigt, dass bei einer Bestimmung der Doppelbestimmung die normalisierte Schmelzkurve von Smederevka (Resava) sehr gut mit Smederevka (Begniste) übereinstimmt. Daraus kann geschlossen werden, dass bei ausreichender Amplifikationseffizienz auch bei der Sorte Smederevka (Resava) die geografische Lage des Anbaugebiets keinen Einfluss auf den Schmelzkurvenverlauf hatte.

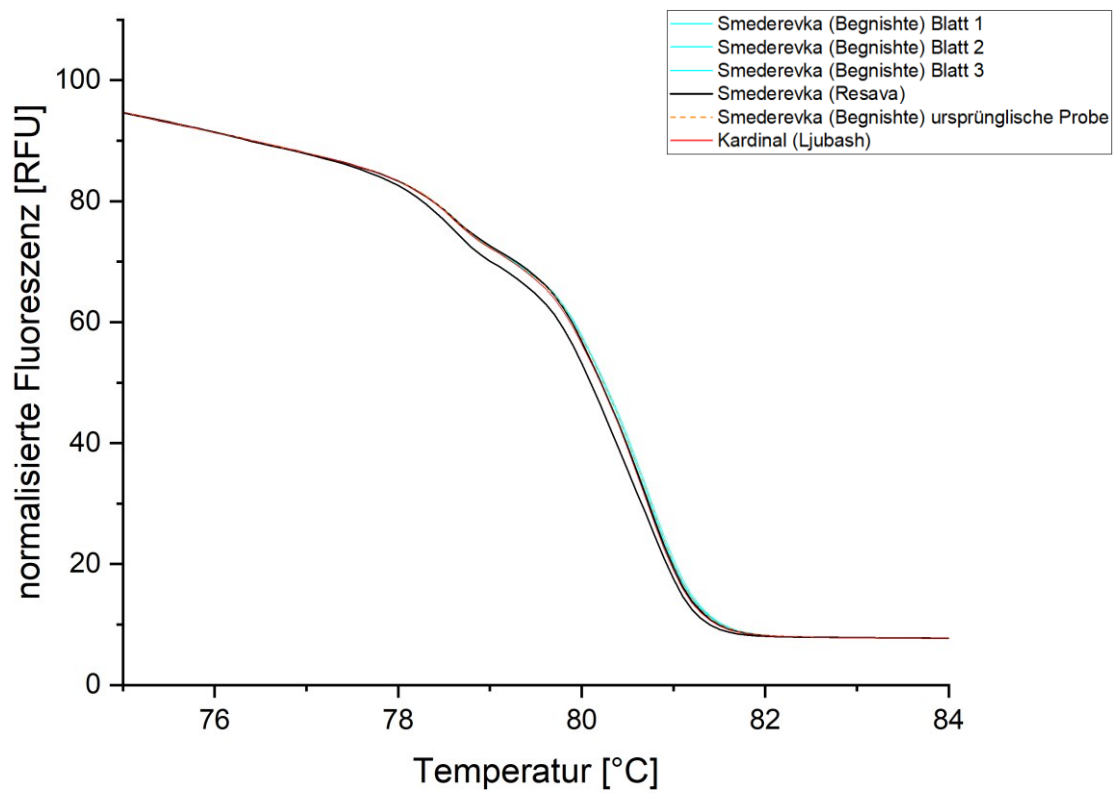


Abbildung 40: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben Smederevka aus Begnishte und Resava sowie von Kardinal aus Ljubash unter Verwendung des Primerpaars VrZAG62.

Die Schmelzkurven der beiden Proben Plovdiva (Probistip) und Plovdiva (Resava) sowie der Proben Kardinal (Resava) und Kardinal (Ljubash) unterschieden sich jedoch sehr stark (Abbildung 41). Die Schmelzkurve der Probe Smederevka (Begniste) stimmt außerdem sehr gut mit der Schmelzkurve der Probe Kardinal (Ljubash) überein.

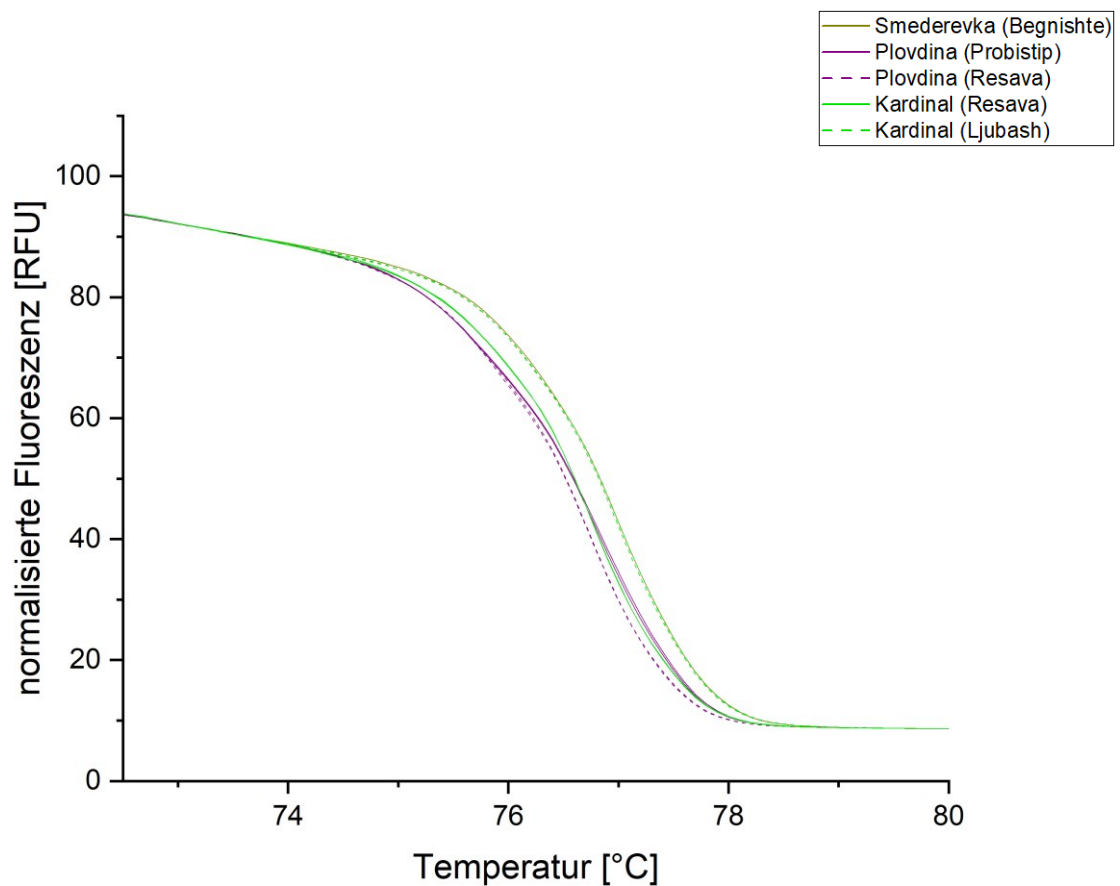


Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben Plovdiva aus Probistip und Resava sowie von Kardinal aus Ljubash und Resava unter Verwendung des Primerpaares VrZAG62.

Da von jeder Probe 3 Weinblätter vorhanden waren, wurde aus jedem Blatt von den Sorten Plovdiva und Kardinal DNA extrahiert und mit dem Primerpaar VrZAG62 eine PCR-HRM durchgeführt, um zu prüfen, ob es bei der Probenvorbereitung zu Verwechslungen gekommen war. Abbildung 42 zeigt, dass für Kardinal (Resava) und Kardinal (Ljubash) unterschiedliche Schmelzkurven erhalten wurden. Außerdem ist zu erkennen, dass die Schmelzkurve von Blatt 2, Kardinal (Resava) von den Schmelzkurven von Blatt 1 und 3 abwich. Dieses Blatt unterschied sich von den anderen beiden in der Größe und Ausprägung des Blattrandes. Es könnte daher sein, dass es sich dabei um ein anderes Blatt handelt und bei der Probennahme Fehler passierten. Die Schmelzkurven von Plovdiva (Probistip) und Plovdiva (Resava) unterscheiden sich auch, bei dieser Sorte wurde aber kein Unterschied zwischen den

Blättern beobachtet. Die Ähnlichkeit der Schmelzkurven von DNA-Extrakten aus verschiedenen Blättern ein und derselben Sorte lässt auf eine gute Wiederholbarkeit der Methode schließen.

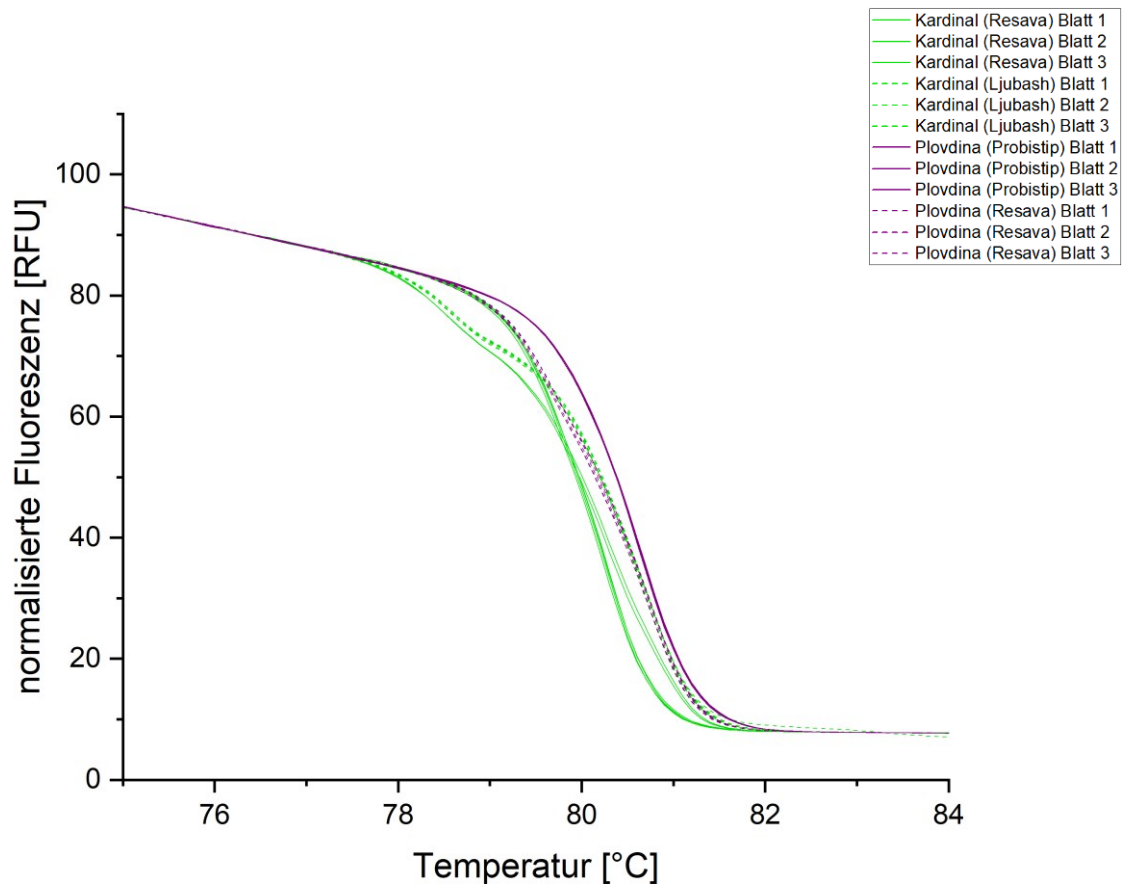


Abbildung 42: Normalisierte Schmelzkurven von den 3 Weinprobenblättern Kardinal und Plovdiva unter Verwendung des Primerpaares VrZAG62.

Auffällig war, dass für die Proben Kardinal (Ljubash) und Smederevka (Begnishte) mit allen 9 Primerpaaren idente Schmelzkurven erhalten wurden. Da es sehr unwahrscheinlich ist, dass die beiden Proben mit allen 9 Primerpaaren idente Ergebnisse liefern, und bei der Sorte Smederevka für beide Anbauggebiete überlappende Schmelzkurven erhalten wurden, kann davon ausgegangen werden, dass bei der Probenahme von Kardinal (Ljubash) ein Fehler passiert ist. Aus diesem Grund wurden die für die Probe Kardinal (Resava) erhaltenen Schmelzkurven herangezogen, um das Potenzial der Primerpaare zur Diskriminierung der Sorten zu beurteilen. Im Fall der Sorte Plovdiva wurden die Ergebnisse für die Probe aus Probistip herangezogen, da die DNA Extraktion aus der Blättern aus dem Anbaugbiet Resava zu deutlich niedrigeren DNA-Konzentrationen führte.

5.2.5 Differenzierung der Rebsorte Vranec, des „Königs“ der mazedonischen Rebsorten, von anderen mazedonischen Rebsorten

Die Rebsorte Vranec zeichnet sich durch ihre komplexe Aromenvielfalt von Waldfrüchten, Pflaumen, Kaffee, Kakao und verschiedenen Gewürzen aus, was sie besonders hochwertig macht.^{60,61} Vier der neun getesteten Primer sind geeignet, die Sorte Vranec von den anderen Weinsorten zu unterscheiden (Anhang 9.4). Abbildung 43 bis Abbildung 50 zeigen die normalisierten Schmelzkurven der jeweiligen PCR-Produkte in Doppelbestimmung, wobei die Schmelzkurven der Vranec-Proben in Blau dargestellt sind.

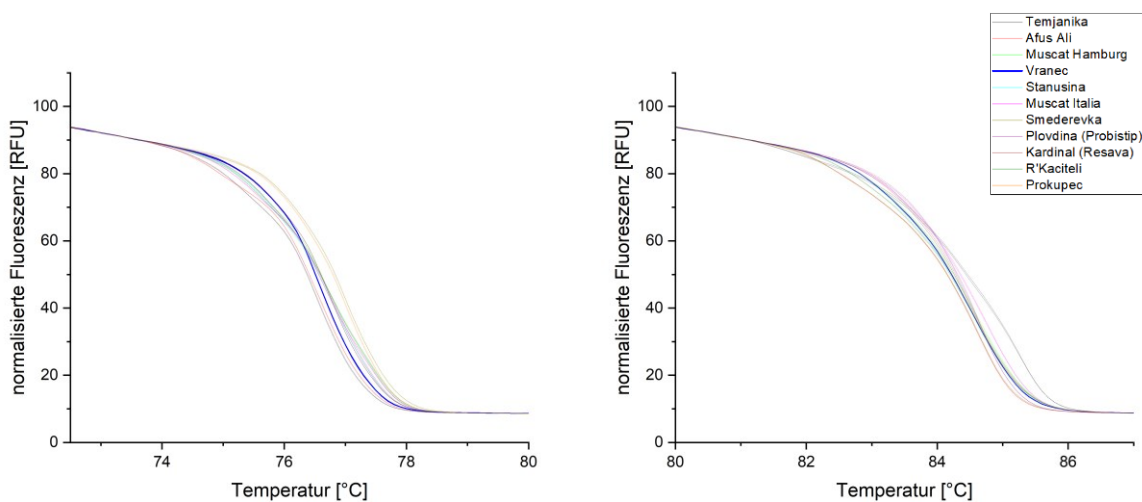


Abbildung 43: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VVS2.

Abbildung 44: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VVMD7.

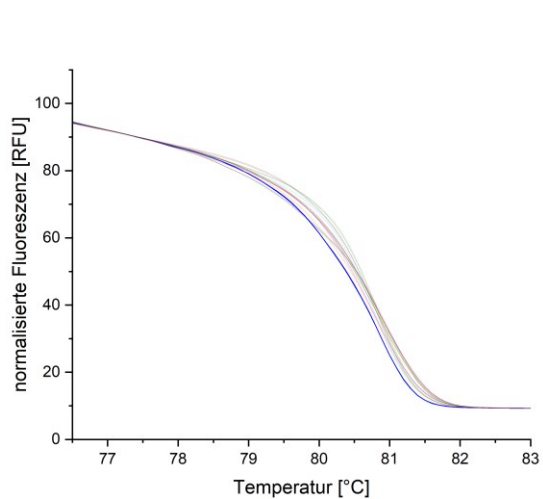


Abbildung 45: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VVMD25.

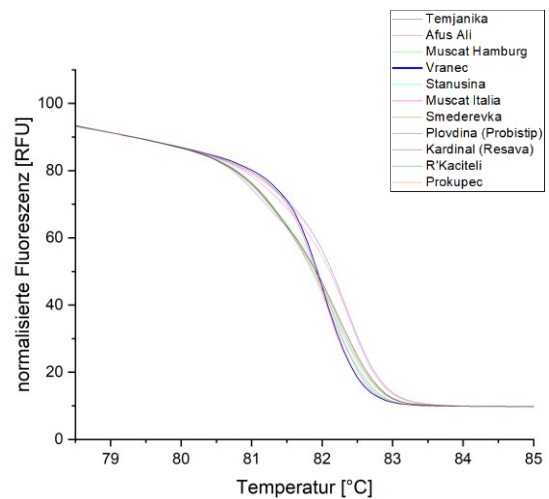


Abbildung 46: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VVMD27.

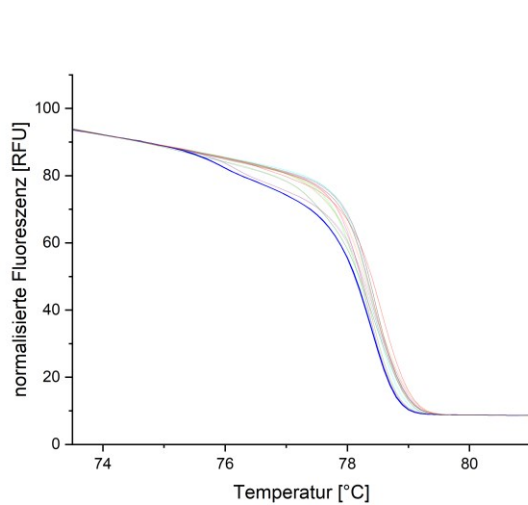


Abbildung 47: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VVMD28.

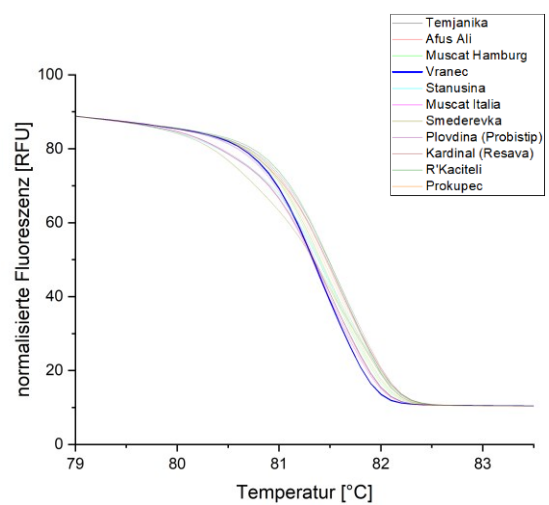


Abbildung 48: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VVMD32.

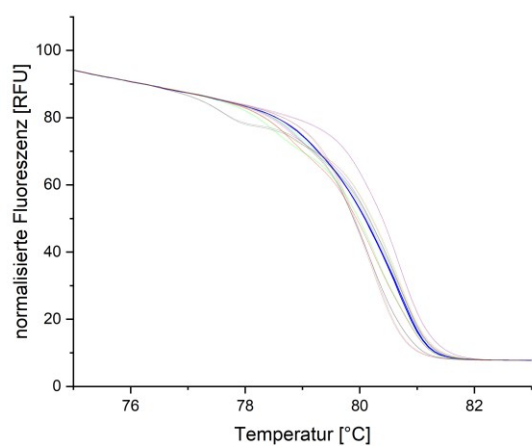


Abbildung 49: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VrZAG62.

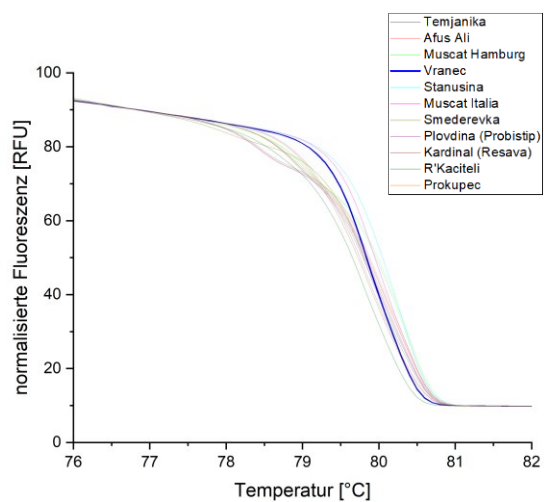


Abbildung 50: Normalisierte Schmelzkurven von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VrZAG79.

6 Conclusio

Das Ziel dieser Masterarbeit bestand darin zu untersuchen, ob die PCR-HRM-Methode geeignet ist, verschiedene Sorten von Sonnenblumensamen bzw. mazedonische Rebsorten voneinander zu unterscheiden. In diesem Zusammenhang erfolgte die Amplifikation spezifischer Mikrosatelliten, gefolgt von der Denaturierung der Amplicons unter Verwendung eines Temperaturgradienten. Dies führte zu unterschiedlichen Schmelzkurven aufgrund der variierenden Basenabfolge, was eine Unterscheidung ermöglichte. Als Proben wurden einerseits Sonnenblumensamen von unterschiedlichen Quellen – einschließlich der Sorten, welche auf der österreichischen Sortenliste stehen untersucht und andererseits mazedonische Weinsorten.

Differenzierung der Sonnenblumensorten

Der Fokus bei der Unterscheidung der Sonnenblumensorten lag auf der möglichst effizienten Differenzierung von 17 Referenzsorten, welche von der AGES zu Verfügung gestellt worden sind und auf der österreichischen Sortenliste gelistet sind. Die Analyse wurde mit ausgewählten 19 Primerpaaren durchgeführt, sowie mit Kombinationen mehrerer Primerpaare (Duplex-Reaktionen). Die Primerkombination, bestehend aus SF4 und SF12 erwies sich als besonders effektiv bei der Unterscheidung der Sorten. Für die eindeutige Diskriminierung der Sorten war nicht nur die Primerkombination SF04xSF12, sondern auch die Primerpaare SF02, SF03 und SF10 erforderlich. Die Unterscheidung von eng verwandten Sorten, wie zum Beispiel Hybriden mit einer identen Mutterlinie, gestaltete sich anspruchsvoller. Nur eines der getesteten Primerpaare ermöglichte die Differenzierung dieser Sorten.

Zusätzlich wurden weitere Sonnenblumensorten, bereitgestellt sowohl von der AGES als auch von Saatgut Austria, mithilfe derselben Primer durch PCR-HRM Analysen mit denselben Primerpaaren unterzogen. Die Primerkombination SF04xSF12 erwies sich auch bei diesen Proben am effizientesten. Auch die Primerpaare SF09 und SF10 ermöglichten die paarweise Unterscheidung einer größeren Zahl von Sorten. Für mehrere Proben von ein und derselben Sorte, die sich u.a. in ihrer Herkunft unterschieden, wurden generell sehr ähnliche Schmelzkurven erhalten, was auf die hohe Wiederholbarkeit der Assays schließen lässt. Bei Saatgut-Proben ist es durchaus möglich, dass Umwelteinflüsse zu genetischen Unterschieden und in der Folge zu Unterschieden im Schmelzkurvenverlauf führten. Um den Einfluss dieser Faktoren bei dieser Probe zu bewerten, wären detailliertere Informationen zur Herkunft und den Anbaubedingungen erforderlich.

Des Weiteren wurde geprüft, ob das Beizen der Sonnenblumen einen Einfluss auf das Schmelzverhalten der PCR Produkte hatte. Bei der Sorte QC Toledo zeigten sich minimale Unterschiede zwischen gebeizten und ungebeizten Proben. Es ist wahrscheinlich, dass es sich dabei um zufällige Abweichungen

handelt. Die gebeizte Sorte SW1H63cl zeigt hingegen eine deutlichere Unterscheidung von der ungebeizten Variante. Hierfür bedarf es weiterer Experimente, bei denen identische Sorten miteinander verglichen werden, sowohl in behandelter als auch in unbehandelter Form.

Differenzierung der mazedonischen Weinsorten

Neben der eindeutigen Unterscheidung der 11 Weinsorten wurde auch untersucht, ob die geografische Herkunft derselben Sorte zu Unterschieden in ihren Schmelzkurven führt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Sorte Vranec.

Alle 11 Weinsorten lassen sich mit einer PCR-HRM-Reaktion differenzieren, wenn die Primerpaarkombination VVS2xVVMD79 verwendet wird. Bei neun Sorten wurde für Proben aus unterschiedlichen Anbaugebieten kein Unterschied in den Schmelzkurven beobachtet. Bei den anderen beiden Sorten wurden Unterschiede beobachtet. Es ist anzunehmen, dass diese Unterschiede auf Fehler bei der Probenahme zurückzuführen sind. Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse war sehr gut und wurde durch mehrere DNA-Extraktionen von verschiedenen Blättern derselben Sorte bestätigt. Die Unterscheidung der Sorte Vranec, dem König der mazedonischen Weinsorten, von den anderen 10 Sorten, konnte mit 4 der 9 verwendeten Primerpaaren erfolgreich durchgeführt werden, wobei das Primerpaar VVMD28 besonders gut geeignet ist.

Die Resultate sowohl der Sonnenblumen- als auch der Weinproben unterstreichen das große Potenzial der PCR-HRM-Methode für Authentizitätsprüfungen. Erfolgreiche und aussagekräftige Analysen hängen dabei von entscheidenden Faktoren ab, u.a. von der DNA-Extraktion, die ausreichend intakte DNA liefern muss, von der Auswahl geeigneter Mikrosatelliten mit hoher genetischer Diversität sowie der Verwendung von geeigneten Primerpaaren, die diese Mikrosatelliten flankieren und eine effiziente Amplifikation ermöglichen.

Die DNA-Extraktion spielte in dieser Masterarbeit jedoch eine untergeordnete Rolle, da sowohl bei Sonnenblumensamen als auch bei Weinblättern in der Regel ausreichend intakte DNA extrahiert werden kann. In verarbeiteten Sonnenblumensamen oder fermentierten Weinprodukten kann die DNA fragmentiert und in niedrigeren Konzentrationen vorliegen, wodurch es zu Problemen bei der anschließenden Amplifikation kommen könnte. Bei der Auswahl der Mikrosatelliten und ihrer flankierenden Primer wurden vielversprechende Primer aus der Literatur gewählt, die eine hohe Anzahl an Allelen pro Locus sowie einen hohen Grad an Heterozygotie aufweisen. Dennoch erwiesen sich mehrere Primerpaare als ungeeignet, was die Notwendigkeit einer praktischen Testung zeigt.

In dieser Arbeit ist besonders die Effektivität der Primerkombination hervorzuheben. Sowohl bei den Sonnenblumen- als auch bei den Weinproben konnten die zwei vielversprechendsten Primerpaare

erfolgreich kombiniert werden, um eine Duplexreaktion durchzuführen, was eine Kosten- und Zeitersparnis mit sich bringt.

Der Routineeinsatz der PCR-HRM erfordert zwar beträchtlichen Arbeitsaufwand, um Sorten innerhalb einer Pflanzenart zu diskriminieren. Neben der Isolation einer qualitativ hochwertigen DNA muss eine Vielzahl an geeigneten Primerpaaren verwendet werden, um tatsächlich alle Sorten einer Art unterscheiden zu können. Nach erfolgreicher Optimierung der Methode und Verfügbarkeit geeigneter, getesteter Primerpaare stellt die PCR-HRM jedoch eine schnelle, einfache und kostengünstige DNA-basierte Methode dar, um verschiedene Sorten zu unterscheiden.

7 Materialien

7.1 Verwendete Chemikalien

Agarose High Resolution	Carl Roth GmbH + Co. KG
Borsäure	Merck
CoralLoad Concentrate 10x	Qiagen
DNA-ExitusPlus™	IF PanReac AppliChem ITW Reagents
EDTA Dinatrium, Dihydrat	Merck
EvaGreen Dye 20x	Qiagen
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium
Low Molecular Weight DNA Ladder	New England BioLabs GmbH
2x Type-It® HRM PCR Kit	Qiagen
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich
Primer	Merck, Sigma-Aldrich
2x PyroMark PCR Master Mix	Qiagen
Nucleo Spin Plant II Kit	Macherey-Nagel
RNase A (Ribonuclease A)	Macherey-Nagel
ROTI®Load DNA-orange 1 (with Glycerol)	Carl Roth GmbH + Co. KG
RNase freies Wasser	Qiagen
Qubit™ Protein and Protein Broad Range (BR) Assay Kit	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific
Trizma-Base (T1503)	Sigma-Aldrich

7.2 Verbrauchsmaterialien

Biosphere® Filter Tips	0,5-20 µL	Sarstedt
	2,0-20 µL	
	20-200 µL	
	100-1000 µL	
Ceramic Spheres, 6.35 mm (1/4"), bulk		MP Biomedicals™
Einwegkanülen		B. Braun SE
Einwegskalpell 0,90 x 40 mm		B. Braun SE
Eppendorf-Tubes	1,5 mL	
	2,0 mL	
	5,0 mL	
Falcon Tube mit Verschluss	15 mL	Sarstedt
FastPrep Lysing Matrix Tubes	2 mL	MP Biomedicals, LLC
MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip für QuantStudio	0,2 mL	Applied Biosystems™
Qubit™ Assay Tubes	500 µL	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific
Strip Tubes und Caps für Rotor-Gene	0,1 mL	Qiagen

7.3 Instrumente

Analysenwaage	Talent TE214S	Sartorius
Fluorimeter	Qubit™ 4.0 Fluorimeter	Thermo Fisher Scientific
Gel Caster	Sub-Cell GT Gel Caster	Bio-Rad Laboratories
Gel Kamm	Sub-Cell® GT MP comb, 30-well	Bio-Rad Laboratories
Kolbenhubpipetten	0,5-10 µL	Eppendorf
	2,0-20 µL	
	20-200 µL	
	100-1000 µL	
Homogenisator	MP Biomedicals™ FastPrep-24™ 5G	MP Biomedicals™
PCR Working Station	PCR Workstation	VWR
Netzgerät	PowerPac HV Power Supply	Bio-Rad Laboratories
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf

Thermocycler	Rotor-Gene Q Series	Qiagen
Thermocycler	QuantStudio 5	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific
Transilluminator	UVT-20 M	Herolab
Vortex Mixer	Classic Advanced	VELP Scientifica
	VF2	Janke & Kunkel GmbH & Co KG
	VV3	VWR
	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge	Centrifuge 5425	Eppendorf
Zentrifuge	Galaxy Mini Centrifuge	VWR
Zentrifuge	Mini Star silverline	VWR

7.4 Software

OriginPro 2023b (64-bit) SR1	OriginLab Corporation
Microsoft 365 Apps for Enterprise	Microsoft
QuantStudio Design & Analysis Software 1.3.1	Thermo Fisher Scientific
Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1	Qiagen
Inkscape 1.3.2 (091e20e, 2023-11-25, custom)	Inkscape-Entwicklerteam

7.5 Webserver

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
OligoAnalyzer™ Tool	https://eu.idtdna.com
RNAfold WebServer	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi

8 Quellen

- (1) Informationen zu Sorten - AGES. <https://www.ages.at/pflanze/sorte/sorte-informationen#c4975> (accessed 2023-11-23).
- (2) Becker, H. *Pflanzenzüchtung*, 3., vollständig überarbeitete Auflage.; UTB Agrarwissenschaften; Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart, 2019, 34-40, 255,259, 268-314.
- (3) McAssey, E. V.; Corbi, J.; Burke, J. M. Range-Wide Phenotypic and Genetic Differentiation in Wild Sunflower. *BMC Plant Biology* **2016**, 16 (1), 249. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0937-7>.
- (4) Grazina, L.; Costa, J.; Amaral, J. S.; Mafra, I. High-Resolution Melting Analysis as a Tool for Plant Species Authentication. *Methods in Molecular Biology* **2021**, 2264, 55–73. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1201-9_5.
- (5) Druml, B.; Cichna-Markl, M. High Resolution Melting (HRM) Analysis of DNA – Its Role and Potential in Food Analysis. *Food Chemistry* **2014**, 158, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>.
- (6) AGES (Hrsg.), 2023: Österreichische Beschreibende Sortenliste 2023 Landwirtschaftliche Pflanzenarten. Schriftenreihe 21/2023, ISSN 1560-635X
- (7) Moore, J. C.; Spink, J.; Lipp, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science* **2012**, 77 (4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x>.
- (8) Seiler, G.; Jan, C.C. Basic Information. In Hu, J.; Seiler, G.J.; Kole, C.; Eds. Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower, (1-50). Science Publishers; Marketed and distributed by CRC Press: Enfield, N.H.: Boca Raton, FL, 2010
- (9) *Der kleine Souci-Fachmann-Kraut: Lebensmitteltabelle für die Praxis*, 4., [unveränd.] Aufl.; Senser, F., Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H., Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Eds.; Wiss. Verl.-Ges: Stuttgart, 2009.
- (10) Turgut Dunford, N. Oxidative Stability of Sunflower Seed Oil. In *Sunflower*; Elsevier, 2015; pp 465–489. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-94-3.50021-0>.
- (11) Schuster, D. W. H.; Marquard, D. R. A. Die Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.), 22-38, 72,74. <http://dx.doi.org/10.22029/jlupub-17497>
- (12) Beaubier, S.; Albe-Slabi, S.; Aymes, A.; Bianeis, M.; Galet, O.; Kapel, R. A Rational Approach for the Production of Highly Soluble and Functional Sunflower Protein Hydrolysates. *Foods* **2021**, 10 (3), 664. <https://doi.org/10.3390/foods10030664>.
- (13) González-Pérez, S.; Vereijken, J. M. Sunflower Proteins: Overview of Their Physicochemical, Structural and Functional Properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2007**, 87 (12), 2173–2191. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2971>.
- (14) Petraru, A.; Ursachi, F.; Amariei, S. Nutritional Characteristics Assessment of Sunflower Seeds, Oil and Cake. Perspective of Using Sunflower Oilcakes as a Functional Ingredient. *Plants* **2021**, 10 (11), 2487. <https://doi.org/10.3390/plants10112487>.
- (15) Hu, J. Genetic Linkage Maps: Strategies, Resources and 79 Achievements. In Hu, J.; Seiler, G.J.; Kole, C.; Eds. Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower, (79-103). Science Publishers; Marketed and distributed by CRC Press: Enfield, N.H.: Boca Raton, FL, 2010

- (16) Nadeem, M. A.; Nawaz, M. A.; Shahid, M. Q.; Doğan, Y.; Comertpay, G.; Yıldız, M.; Hatipoğlu, R.; Ahmad, F.; Alsaleh, A.; Labhane, N.; Özkan, H.; Chung, G.; Baloch, F. S. DNA Molecular Markers in Plant Breeding: Current Status and Recent Advancements in Genomic Selection and Genome Editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2018**, 32 (2), 261–285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>.
- (17) Gentzbittel, L.; Zhang, Y.-X.; Vear, F.; Griveau, B.; Nicolas, P. RFLP Studies of Genetic Relationships among Inbred Lines of the Cultivated Sunflower, *Helianthus Annuus* L.: Evidence for Distinct Restorer and Maintainer Germplasm Pools. *Theoretical and Applied Genetics* **1994**, 89 (4), 419–425. <https://doi.org/10.1007/BF00225376>.
- (18) Liu, A.; Burke, J. M. Patterns of Nucleotide Diversity in Wild and Cultivated Sunflower. *Genetics* **2006**, 173 (1), 321–330. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.051110>.
- (19) Fusari, C. M.; Lia, V. V.; Hopp, H. E.; Heinz, R. A.; Paniego, N. B. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms and Analysis of Linkage Disequilibrium in Sunflower Elite Inbred Lines Using the Candidate Gene Approach. *BMC Plant Biology* **2008**, 8 (1), 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-7>.
- (20) Tang, S.; Yu, J.-K.; Slabaugh, M. B.; Shintani, D. K.; Knapp, S. J. Simple Sequence Repeat Map of the Sunflower Genome. *Theoretical and Applied Genetics* **2002**, 105 (8), 1124–1136. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0989-y>.
- (21) Hvarleva, Tz.; Bakalova, A.; Chepinski, I.; Hristova-Cherbadji, M.; Hristov, M.; Atanasov, A. Characterization of Bulgarian Sunflower Cultivars and Inbred Lines with Microsatellite Markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2007**, 21 (4), 408–412. <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817484>.
- (22) Heesacker, A.; Kishore, V. K.; Gao, W.; Tang, S.; Kolkman, J. M.; Gingle, A.; Matvienko, M.; Kozik, A.; Michelmore, R. M.; Lai, Z.; Rieseberg, L. H.; Knapp, S. J. SSRs and INDELs Mined from the Sunflower EST Database: Abundance, Polymorphisms, and Cross-Taxa Utility. *Theoretical and Applied Genetics* **2008**, 117 (7), 1021–1029.
- (23) Liu, Yi-han and Mou, Qing-shan and Chen, Shan-yu and Ruan, Guan-hai and Hu, Jin and Guan, Ya-jing. Establishment of DNA fingerprint for sunflower by SSR-HRM technique. *Hangzhou, Acta Agriculturae Zhejiangensis* (2022), (678–686). doi:10.3969/j.issn.1004-1524.2022.04.03, 1004-1524, 34, (4)
- (24) Vezzulli, S; Doligez, A; Bellin, D. Molecular Mapping of Grapevine Genes. In Cantu, D; Walker, M.A.; Eds. *The Grape Genome* (103-136). Springer International Publishing: Cham, 2019
- (25) Weiss, Ehud & Zohary, Daniel & Hopf, Maria. (2012). Domestication of Plants in the Old World - The Origin and Spread of Domesticated Plants in South-west Asia, Europe, and the Mediterranean Basin. 10.1093/acprof:osobl/9780199549061.001.0001.
- (26) *World Statistics* / OIV. <https://www.oiv.int/what-we-do/global-report?oiv> (accessed 2023-12-02).
- (27) *Publication of the 3rd edition of “OIV Descriptor list of grape vine varieties and Vitis species”* / OIV. <https://www.oiv.int/node/3028> (accessed 2023-12-02).
- (28) Sefc, K. M.; Lopes, M. S.; Lefort, F.; Botta, R.; Roubelakis-Angelakis, K. A.; Ibáñez, J.; Pejić, I.; Wagner, H. W.; Glössl, J.; Steinkellner, H. Microsatellite Variability in Grapevine Cultivars from Different European Regions and Evaluation of Assignment Testing to Assess the Geographic Origin of

Cultivars: *Theoretical and Applied Genetics* **2000**, *100* (3–4), 498–505.
<https://doi.org/10.1007/s001220050065>.

(29) Stajner, N.; Angelova, E.; Bozinovic, Z.; Petkov, M.; Javornik, B. Microsatellite Marker Analysis of Macedonian Grapevines (*Vitis Vinifera* L.) Compared to Bulgarian and Greek Cultivars. *OENO One* **2009**, *43* (1), 29. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2009.43.1.805>.

(30) Barrias, S.; Pereira, L.; Rocha, S.; De Sousa, T. A.; Ibáñez, J.; Martins-Lopes, P. Identification of Portuguese Traditional Grapevines Using Molecular Marker-Based Strategies. *Scientia Horticulturae* **2023**, *311*, 111826. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.111826>.

(31) VIVC. <https://www.vivc.de/index.php?r=site%2Findex> (accessed 2023-12-03).

(32) Over 1 million litres of wine and alcoholic beverages seized under OLAF-led operation - European Commission. https://anti-fraud.ec.europa.eu/media-corner/news/over-1-million-litres-wine-and-alcoholic-beverages-seized-under-olaf-led-operation-2021-07-22_en (accessed 2024-02-16).

(33) Holmberg, Lars. (2010). Wine fraud. *International Journal of Wine Research*. 2. 10.2147/IJWR.S14102. doi:10.2147/IJWR.S14102

(34) Cuadros-Inostroza, A.; Giavalisco, P.; Hummel, J.; Eckardt, A.; Willmitzer, L.; Peña-Cortés, H. Discrimination of Wine Attributes by Metabolome Analysis. *Analytical Chemistry*. **2010**, *82* (9), 3573–3580. <https://doi.org/10.1021/ac902678t>.

(35) Popîrdă, A.; Luchian, C. E.; Cotea, V. V.; Colibaba, L. C.; Scutarașu, E. C.; Toader, A. M. A Review of Representative Methods Used in Wine Authentication. *Agriculture* **2021**, *11* (3), 225. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030225>.

(36) Rodrigues, N. P.; Rodrigues, E.; Celso, P. G.; Kahmann, A.; Yamashita, G. H.; Anzanello, M. J.; Manfroio, V.; Hertz, P. F. Discrimination of Sparkling Wines Samples According to the Country of Origin by ICP-OES Coupled with Multivariate Analysis. *Food Science and Technology* **2020**, *131*, 109760. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109760>.

(37) Scheidegger, Y.; Saurer, M.; Bahn, M.; Siegwolf, R. Linking Stable Oxygen and Carbon Isotopes with Stomatal Conductance and Photosynthetic Capacity: A Conceptual Model. *Oecologia* **2000**, *125* (3), 350–357. <https://doi.org/10.1007/s004420000466>.

(38) Costinel, D.; Tudorache, A.; Ionete, R. E.; Vremera, R. The Impact of Grape Varieties to Wine Isotopic Characterization. *Analytical Letters* **2011**, *44* (18), 2856–2864. <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.582546>.

(39) Jaitz, L.; Siegl, K.; Eder, R.; Rak, G.; Abranko, L.; Koellensperger, G.; Hann, S. LC–MS/MS Analysis of Phenols for Classification of Red Wine According to Geographic Origin, Grape Variety and Vintage. *Food Chemistry* **2010**, *122* (1), 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.053>.

(40) An, R.; Jia, Y.; Wan, B.; Zhang, Y.; Dong, P.; Li, J.; Liang, X. Non-Enzymatic Depurination of Nucleic Acids: Factors and Mechanisms. *PLOS ONE* **2014**, *9* (12), e115950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115950>.

(41) Xu, Y.; Yu, D.; Chen, J.; Duan, M. A Review of Rice Male Sterility Types and Their Sterility Mechanisms. *Heliyon* **2023**, *9* (7), e18204. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18204>.

- (42) Ahmed, I.; Islam, M.; Arshad, W.; Mannan, A.; Ahmad, W.; Mirza, B. High-Quality Plant DNA Extraction for PCR: An Easy Approach. *Journal of Applied Genetics* **2009**, *50* (2), 105–107. <https://doi.org/10.1007/BF03195661>.
- (43) Rezadoost, M. H.; Kordrostami, M.; Kumleh, H. H. An Efficient Protocol for Isolation of Inhibitor-Free Nucleic Acids Even from Recalcitrant Plants. *3 Biotech* **2016**, *6* (1), 61. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0375-0>.
- (44) Bioanalytic GmbH - CTAB Lysis Buffer. <https://www.bioanalytic.de/en/product/article/ctab-lysis-buffer-193.html> (accessed 2023-12-05).
- (45) Dey, Tulsi & Saha, Soumen & Dhar, T.N. & Adhikari, Sinchan & Ghosh, Parthadeb. (2010). Optimization and comparison of efficiency between two DNA isolation protocols in Cymbopogon species. *General and Applied Plant Physiology*. 36. 232-238.
- (46) Xia, Y.; Chen, F.; Du, Y.; Liu, C.; Bu, G.; Xin, Y.; Liu, B. A Modified SDS-Based DNA Extraction Method from Raw Soybean. *Bioscience Reports* **2019**, *39* (2), BSR20182271. <https://doi.org/10.1042/BSR20182271>.
- (47) Abdel-Latif, A.; Osman, G. Comparison of Three Genomic DNA Extraction Methods to Obtain High DNA Quality from Maize. *Plant Methods* **2017**, *13* (1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>.
- (48) Habibi, N.; Al Salameen, F.; Rahman, M.; Shajan, A.; Zakir, F.; Abdulrazzak, N. Comparison and Optimization of DNA Isolation Protocols for High Throughput Genomic Studies of Acacia Pachyceras Schwartz. *MethodsX* **2022**, *9*, 101799. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101799>.
- (49) Shen, C.-H. *Diagnostic Molecular Biology*; Elsevier/Academic Press: London, 2019, 167-170, 215-218, 224-226.
- (50) Qubit Fluorometric Quantification | Thermo Fisher Scientific - AT. <https://www.thermofisher.com/at/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html> (accessed 2023-12-05).
- (51) Essentials of Real-Time PCR | Thermo Fisher Scientific - AT. <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html> (accessed 2023-12-05).
- (52) Markoulatos, P.; Siafakas, N.; Moncany, M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Clinical Laboratory Analysis* **2002**, *16* (1), 47–51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>.
- (53) Hayden, M. J.; Nguyen, T. M.; Waterman, A.; Chalmers, K. J. Multiplex-Ready PCR: A New Method for Multiplexed SSR and SNP Genotyping. *BMC Genomics* **2008**, *9* (1), 80. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-80>.
- (54) Vossen, R. H. A. M.; Aten, E.; Roos, A.; Den Dunnen, J. T. High-Resolution Melting Analysis (HRMA)-More than Just Sequence Variant Screening. *Human Mutation*. **2009**, *30* (6), 860–866. <https://doi.org/10.1002/humu.21019>.
- (55) What is High Resolution Melting (HRM)? | Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/de-at/applications-technologies/what-high-resolution-melting-hrm?ID=LUSOIH97Q> (accessed 2023-12-05).

- (56) Gey, M. H. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*; Springer-Lehrbuch; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46255-3>, 209-211, 234,235.
- (57) Upadhyay, A.; Upadhyay, K.; Nath, N. *Biophysical Chemistry: (Principles and Techniques)*, Rev. ed.; Himalaya Pub. House: Mumbai, 2009, 380, 422-426.
- (58) Bowers, J. E.; Dangl, G. S.; Vignani, R.; Meredith, C. P. Isolation and Characterization of New Polymorphic Simple Sequence Repeat Loci in Grape (*Vitis Vinifera* L.). *Genome* **1996**, 39 (4), 628–633. <https://doi.org/10.1139/g96-080>.
- (59) Thomas, M. R.; Scott, N. S. Microsatellite Repeats in Grapevine Reveal DNA Polymorphisms When Analysed as Sequence-Tagged Sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* **1993**, 86 (8), 985–990. <https://doi.org/10.1007/BF00211051>.
- (60) *Venec Vranec 2017 - Ein kraftvoller Wein - Drinkrituals.de*. <https://drinkrituals.de/venec-vranec-2017/> (accessed 2024-04-29).
- (61) *TIKVEŠ Vranec 1L 2021 - 1L | SUNNY TASTE*. <https://sunny-taste.de/produkt/tikves-vranec/> (accessed 2024-04-29).

9 Anhang

9.1 Abstract

Food fraud, which involves deliberate deception to gain a financial or economic advantage by providing false information about the origin, quality and composition of food, is a global problem. This master thesis investigated whether selected simple sequence repeats (SSR) are suitable to differentiate sunflower varieties, including those listed in the Austrian variety list, as well as Macedonian wine varieties. The method used involves a polymerase chain reaction (PCR) in which the SSRs were amplified. This is followed by high-resolution melting curve analysis (HRM), in which the amplicons are denatured using a temperature gradient. This enables the generation of different melting curves based on the base sequence and thus the differentiation of the varieties.

For the differentiation of sunflower varieties, 19 primer pairs from the literature were tested in practice and, if necessary, the annealing temperature was optimized. Sunflower seeds of 44 different varieties, provided by AGES and Saatgut Austria, were used as samples. DNA extraction was carried out using a commercial kit. A duplex reaction of 2 primer pairs provided the best discrimination of the varieties. For the complete discrimination of the listed reference varieties, however, 3 additional primer pairs had to be used.

For the differentiation of Macedonian wine varieties, 9 primer pairs, which are also used in the database of Vitis International Variety Catalogue (VIVC), were tested and the PCR conditions were optimized. Grape leaves from 11 different Macedonian wine varieties were used as samples and DNA was extracted from them. All 11 varieties could be discriminated with the primer combination VVS2xVrZAG79. In particular, Vranec, which is considered the king of Macedonian wines, could be reliably distinguished from the other varieties by 4 of the 9 primer pairs tested.

9.2 Zusammenfassung

Lebensmittelbetrug, bei dem durch absichtliche Täuschung ein finanzieller oder wirtschaftlicher Vorteil durch die Bereitstellung falscher Informationen über die Herkunft, Qualität und Zusammensetzung von Lebensmitteln erlangt werden soll, stellt ein globales Problem dar. Diese Masterarbeit untersuchte, ob ausgewählte Mikrosatelliten (SSR) geeignet sind, um Sonnenblumensorten zu differenzieren, einschließlich der in der österreichischen Sortenliste angeführten Sorten, sowie mazedonische Weinsorten. Die angewandte Methode umfasst eine Polymerasekettenreaktion (PCR), bei der die Mikrosatelliten amplifiziert wurden. Anschließend erfolgt eine Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM), bei der die Amplicons mittels eines Temperaturgradienten denaturiert werden. Dies ermöglicht die Erzeugung unterschiedlicher Schmelzkurven basierend auf der Basenabfolge und somit die Unterscheidung der Sorten.

Für die Unterscheidung der Sonnenblumensorten wurden 19 Primerpaare aus der Literatur praktisch getestet und gegebenenfalls die Anlagerungstemperatur optimiert. Als Proben dienten Sonnenblumensamen von 44 verschiedenen Sorten, bereitgestellt von der AGES und der Saatgut Austria. Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits. Eine Duplex-Reaktion aus 2 Primerpaaren lieferte die beste Diskriminierung der Sorten. Für die vollständige Unterscheidung der gelisteten Referenzsorten mussten zusätzlich jedoch noch 3 weitere Primerpaare eingesetzt werden.

Für die Unterscheidung der mazedonischen Weinsorten wurden 9 Primerpaare, welche auch in der Datenbank von Vitis International Variety Catalogue (VIVC) verwendet werden, getestet und die PCR-Bedingungen optimiert. Weinblätter von 11 verschiedenen mazedonischen Weinsorten wurden als Proben verwendet, und aus diesen die DNA extrahiert. Alle 11 Sorten konnten mit der Primerkombination VVS2xVrZAG79 diskriminiert werden. Insbesondere konnte Vranec, der als König der mazedonischen Weine gilt, zuverlässig von den anderen Sorten mit 4 der 9 getesteten Primerpaare unterschieden werden.

9.3 Schmelzkurven der Sonnenblumensorten

9.3.1 Schmelzkurven (Sonnenblumen) der Referenzsorten in Doppelbestimmung

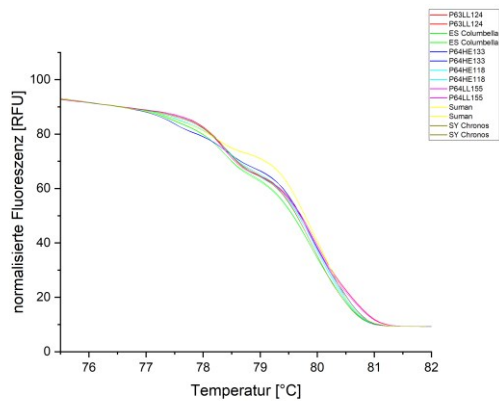


Abbildung 51: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL124, ES Columbella, P64HE133, P64HE118, P64LL155, Suman und SY Chronos) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung

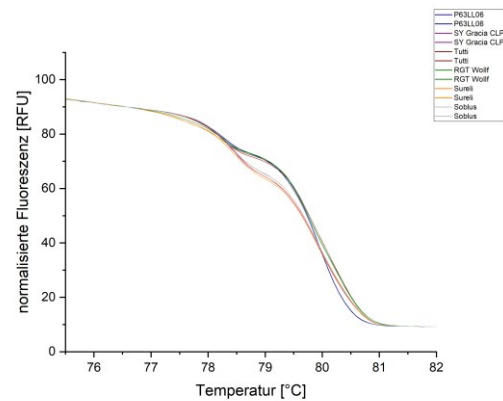


Abbildung 52: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL06, SY Gracia CLP, Tutti, RGT Wolf, Sureli und Soblus) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung

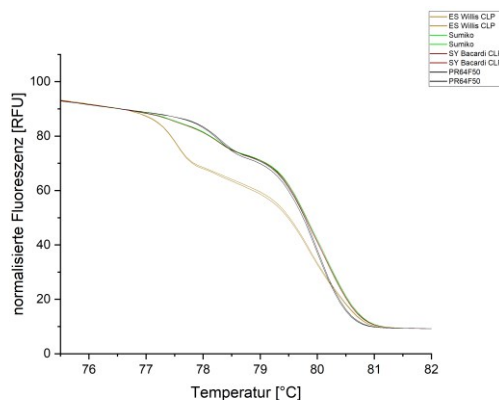


Abbildung 53: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (ES Willis CLP, Sumiko, SY Bacardi CLP und PR64F50) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung

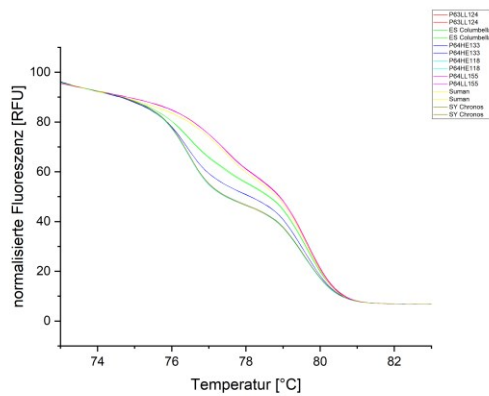


Abbildung 54: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL124, ES Columbella, P64HE133, P64HE118, P64LL155, Suman und SY Chronos) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung

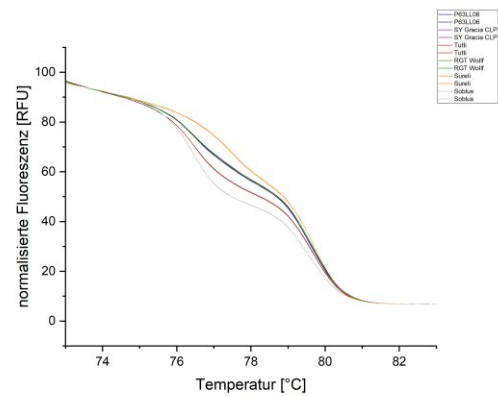


Abbildung 55: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL06, SY Gracia CLP, Tutti, RGT Wolff, Sureli und Soblus) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung

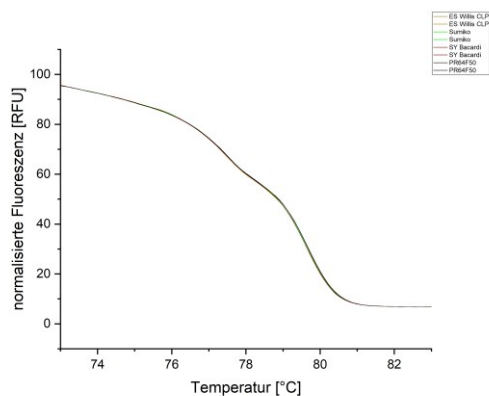


Abbildung 56: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (ES Willis CLP, Sumiko, SY Bacardi CLP und PR64F50) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung

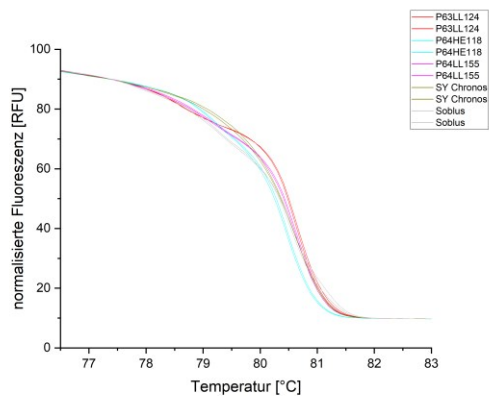


Abbildung 57: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL124, P64HE118, P64LL155, SY Chronos und Soblus) unter Verwendung des Primerpaars SF02 in Doppelbestimmung

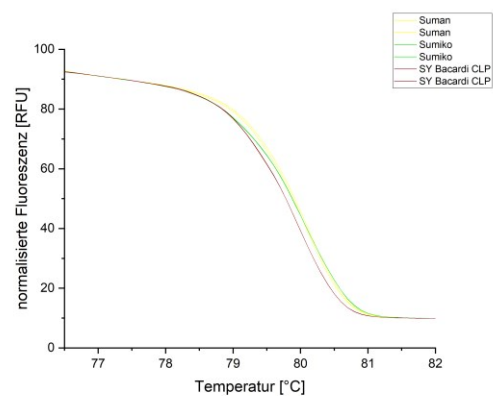


Abbildung 58: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (Suman, Sumiko und SY Bacardi CLP) unter Verwendung des Primerpaars SF03 in Doppelbestimmung

9.3.2 Schmelzkurven (Sonnenblumen) der unbehandelten Proben in Doppelbestimmung

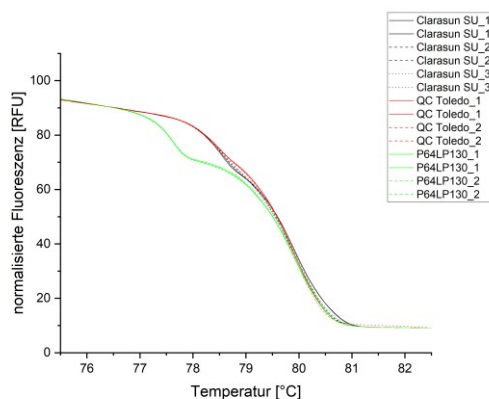


Abbildung 59: Normalisierte Schmelzkurven von den unbehandelten AGES-Proben (Clarasun, QC Toledo und P64LP130) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung

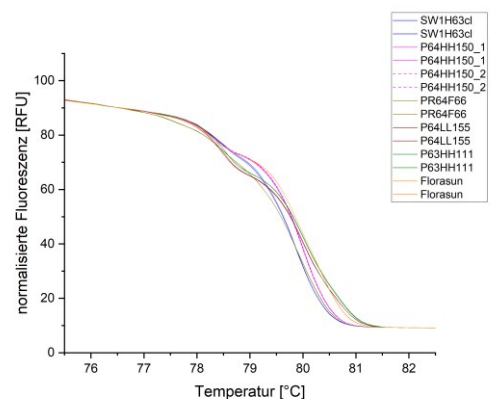


Abbildung 60: Normalisierte Schmelzkurven von den unbehandelten AGES-Proben (SW1H63cl, P64HH150, PR64F66, P64LL155, P63HH111 und Florasun) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung

9.3.3 Schmelzkurven (Sonnenblumen) der gebeizten Proben in Doppelbestimmung

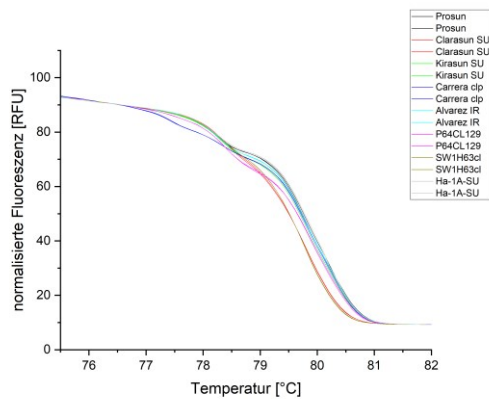


Abbildung 61: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben (Prosun, Clarasun SU, Kirasun SU, Carrera clp, Alvarez IR, P64CL129, SW1H63cl und Ha-1A-SU) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung

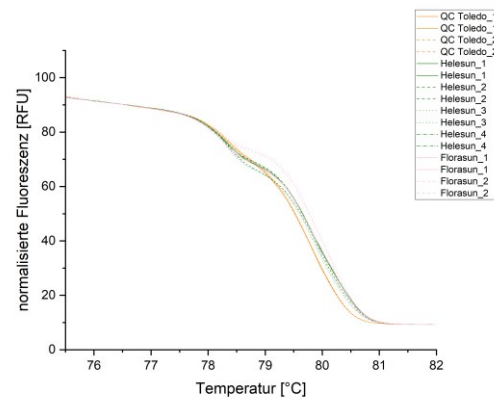


Abbildung 62: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben (QC Toledo, Helesun und Florasun) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung

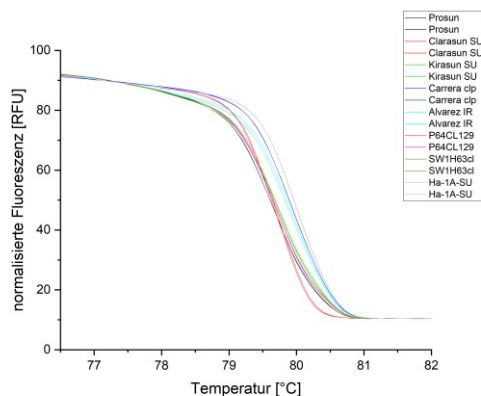


Abbildung 63: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben (Prosun, Clarasun SU, Kirasun SU, Carrera clp, Alvarez IR, P64CL129, SW1H63cl und Ha-1A-SU) unter Verwendung des Primerpaares SF09 in Doppelbestimmung

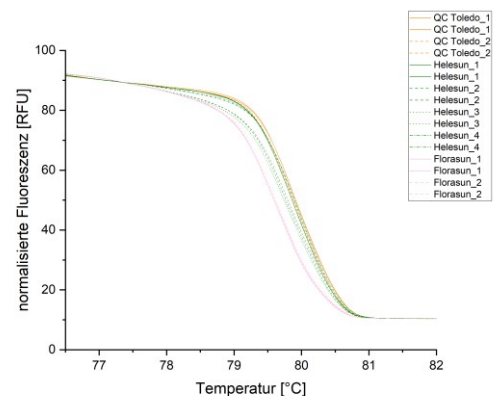


Abbildung 64: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben (QC Toledo, Helesun und Florasun) unter Verwendung des Primerpaares SF09 in Doppelbestimmung

9.3.4 Schmelzkurven (Sonnenblumen) von Saatgut Austria Proben in Doppelbestimmung

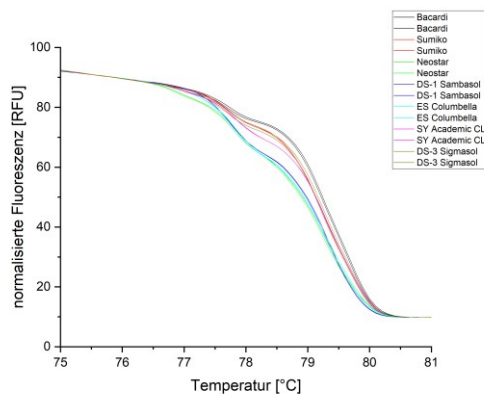


Abbildung 65: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (Bacardi, Sumiko, Neostar, DS-1 Sambasol, ES Columbella, SY Academic CL und DS-3 Sigmasol) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung

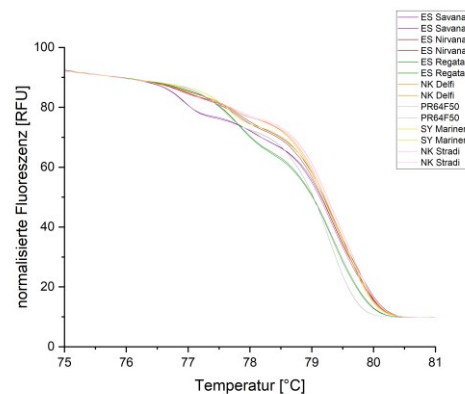


Abbildung 66: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (ES Savana, ES Nirvana, ES Regata, NK Delfi, PR64F50, SY Mariner und NK Stradi) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung

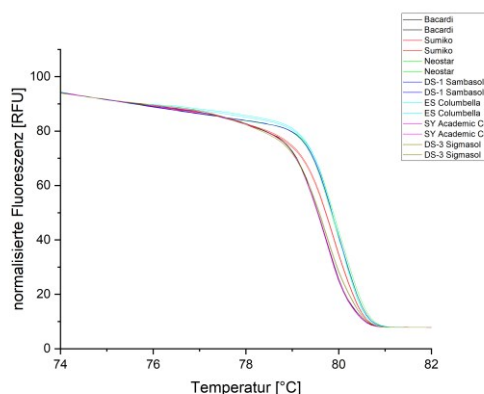


Abbildung 67: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (Bacardi, Sumiko, Neostar, DS-1 Sambasol, ES Columbella, SY Academic CL und DS-3 Sigmasol) unter Verwendung des Primerpaars SF09 in Doppelbestimmung

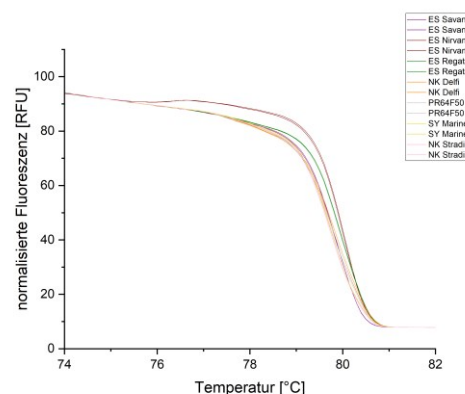


Abbildung 68: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (ES Savana, ES Nirvana, ES Regata, NK Delfi, PR64F50, SY Mariner und NK Stradi) unter Verwendung des Primerpaars SF09 in Doppelbestimmung

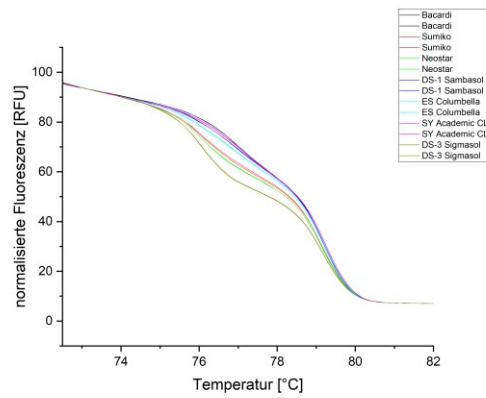


Abbildung 69: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (Bacardi, Sumiko, Neostar, DS-1 Sambasol, ES Columbella, SY Academic CL und DS-3 Sigmasol) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung

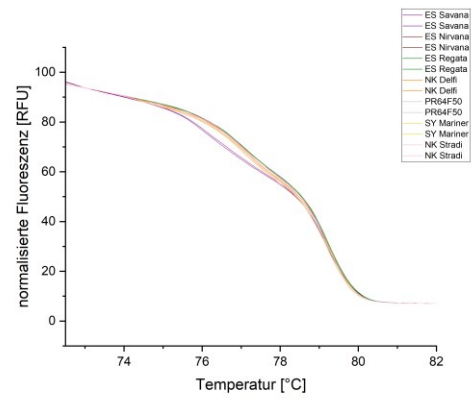


Abbildung 70: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (ES Savana, ES Nirvana, ES Regata, NK Delfi, PR64F50, SY Mariner und NK Stradi) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung

9.4 Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen Weinsorten mit Hilfe von den Primerpaaren VVS2, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 und VrZAG79

Tabelle 20: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen Weinsorten mit Hilfe von den Primerpaaren VVS2, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 und VrZAG79

	Temjanika	Afus Ali	Muscat Hamburg	Vranec	Stanusina	Muscat Italia	Smederevka	Plovdiva (Probistip)	Kardinal (Resava)	R'Kaciteli	Prokupec
Temjanika		VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 -
Afus Ali	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79		VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 -	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79
Muscat Hamburg	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79		VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 - VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - - - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 - VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79
Vranec	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79		VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - - - VVMD28 VVMD32 - VrZAG79
Stanusina	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG79		- VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- - - VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG79	VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG79

Muscat Italia	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 - VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG79		VVS2 VVMD7 - VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79
Smederevka	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - - - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79		VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79
Plovdiva (Probitip)	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 -	- VVMD7 - VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79		VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79
Kardinal (Resava)	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79		VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79
R'Kaciteli	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	- - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- - - VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG79	- VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79		VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79
Prokupec	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 -	VVS2 VVMD7 VVMD25 - VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	VVS2 - - - VVMD28 VVMD32 - VrZAG79	VVS2 - VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 - VZAG79	VVS2 VVMD7 - VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	- VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 - VVMD32 VrZAG62 VrZAG79	VVS2 VVMD7 VVMD25 VVMD27 VVMD28 - VrZAG62 VrZAG79	

9.5 Abkürzungsverzeichnis

µL.....	Mikroliter
µM.....	Mikromolar
AAS.....	Atomabsorptionsspektrometrie
AES.....	Atomemissionsspektrometrie
AFLP.....	Amplified fragment length polymorphism
bp.....	Basenpaare
Ct.....	Cycle threshold
CTAB.....	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA.....	doppelsträngige DNA
fw.....	forward
g.....	Gramm
h.....	Stunden
HRM.....	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
ICP-MS.....	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasma
IRMS.....	Isotopenverhältnis Massenspektrometrie
LD.....	Loading Dye Roti-Load DNA-orange 1
m/s.....	Meter pro Sekunde
mg.....	Milligramm
min.....	Minuten
mL.....	Milliliter
NCBI.....	National Center for Biotechnology Information
ng.....	Nanogramm
nm.....	Nanometer
NTC.....	No template control
OIV.....	Organisation of Vine and Wine
OLAF.....	Europäisches Amt für Betrugsbekämpfung
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PVP.....	Polyvinylpyrrolidon
qPCR.....	Real-time PCR
RAPD.....	Randomly amplified polymorphic DNA
rcf.....	relative Zentrifugalbeschleunigung
rev.....	reverse
RFLP.....	Restriction fragment length polymorphism
RNA.....	Ribonukleinsäure
s.....	Sekunden
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
SNIF-NMR.....	Site-specific natural isotope fractionation nuclear magnetic resonance
SNP.....	Einzelnukleotidpolymorphismus, Single nucleotide polymorphism
ssDNA.....	einzelsträngige DNA
SSR.....	Mikrosatelliten
TBE.....	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tm.....	Schmelztemperatur
VIVC.....	Vitis International Variety Catalogue

9.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchschnittliche Zusammensetzung von 100 g getrockneten Sonnenblumensamen	2
Tabelle 2: Die vier Züchtungskategorien. Quelle in Anlehnung an Becker (2019) ²	9
Tabelle 3: Sonnenblumenprobenliste.....	22
Tabelle 4: Einstellungen des FastPrep-24™ 5G-Programms	24
Tabelle 5: Weinprobenliste	28
Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsmix	30
Tabelle 7: Temperaturprogramm der beiden Thermocycler	31
Tabelle 8: Herstellung der Probelösung sowie der Standardlösung für die Agarosegelelektrophorese	32
Tabelle 9: Einwaagen und DNA-Konzentration der Sonnenblumenproben	33
Tabelle 10: Zusammensetzungen der Reaktionsmixe für die Duplexreaktion	38
Tabelle 11: Optimierte Zusammensetzung des Reaktionsmix für die Duplexreaktion.....	43
Tabelle 12: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen Referenzsorten mit Hilfe von bestimmten Primerpaaren/Primerpaarkombinationen	48
Tabelle 13: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen unbehandelten AGES-Proben mit Hilfe der Primerpaarkombination SF04xSF12. Die weiß markierten Felder zeigen Paare gleicher Sorte an, die aus diesem Grund nicht differenziert werden konnten.....	50
Tabelle 14: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen gebeizten AGES-Proben mit Hilfe der Primerkombination SF04xSF12 und des Primerpaars SF09. Die rot markierten Sortenpaare ließen sich mit keiner der getesteten Primerkombinationen unterscheiden. Ebenso konnten die Paare gleicher Sorten, die weiß markiert sind, nicht unterschieden werden.	53
Tabelle 15: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen gebeizten Saatgut Austria-Proben mit Hilfe von bestimmten Primerpaaren/Primerkombinationen	57
Tabelle 16: Vergleich der Sorten verschiedener Hersteller	58
Tabelle 17: Weinprobenliste	64
Tabelle 18: Schmelztemperatur des PCR-Produkts der verschiedenen Primerpaare	68
Tabelle 19: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die Duplexreaktion VVS2xVrZAG79	70
Tabelle 20: Übersichtstabelle zur Differenzierung der einzelnen Weinsorten mit Hilfe von den Primerpaaren VVS2, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 und VrZAG79	98

9.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Klonzüchtung. In schwarz die selektierten erfolgsversprechenden Sorten. Quelle in Anlehnung an Becker (2019) ²	10
Abbildung 2: Schema der Linienzüchtung. Links die Stammbaummethode, in der ab der F2-Generation selektiert wird. Rechts die Ramschmethode, bei der erst später selektiert wird. In schwarz die selektierten erfolgsversprechenden Sorten. Quelle in Anlehnung an Becker (2019) ²	11
Abbildung 3: Schema der Massenauslese: In schwarz die selektierten erfolgsversprechenden Sorten. Quelle in Anlehnung an Becker (2019) ²	12
Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung eines CMS-Systems. S= Cytoplasma, das männliche Sterilität induziert, F= normales fertiles Cytoplasma, Rr= homozygot für maintainer Gene, RR= homozygot für dominante restorer Gene, Rr= heterozygot für restorer Gene. Quelle in Anlehnung an Yusheng Xu et al. (2023) ⁴⁰	13
Abbildung 5: Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion	17
Abbildung 6: Verlauf einer qPCR. ΔR_n entspricht dem Signal, das unter den gegebenen PCR-Bedingungen erzeugt wird.	18
Abbildung 7: Schmelzkurven von 3 Proben in Doppelbestimmung und der Bereich, in dem die Normalisierung stattfindet.	20
Abbildung 8: Normalisierte Schmelzkurven der 3 Proben. Die Doppelbestimmungen stimmen so sehr gut überein, wodurch die Schmelzkurven unterschiedlicher Sorten besser verglichen werden können.	21
Abbildung 9: Schamtsche Darstellung der DNA-Extraktion.....	26
Abbildung 10: Einfluss der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur auf die Amplifikation. Primerpaare SF01 (dunkelgelb, orange) und SF02 (schwarz, lila). Sorte: DS-1-Sambosol.	35
Abbildung 11: Einfluss der Primerkonzentration und der Annealingtemperatur auf die Amplifikation. Primerpaare SF03 (orange, grün) und SF04 (blau, rot). Sorte: DS-1-Sambosol.....	36
Abbildung 12: Amplifikationskurve der mit den Primerpaaren SF04 bzw. SF12 erhaltenen Amplifikationskurven der Sorten SY Bacardi CLP, Sumiko, DS-3 Sigmasol und NK Delfi. Als Konzentration wurde 0,2 μ M eingesetzt.	37
Abbildung 13: Negative 1. Ableitungen der mit den Primerpaaren SF04 bzw. SF12 erhaltenen Schmelzkurven der Sorten SY Bacardi CLP, Sumiko, DS-3 Sigmasol und NK Delfi . Als Konzentration wurde 0,2 μ M eingesetzt.....	40
Abbildung 14: Negative 1. Ableitungen der mit der Primerkombination SF04xSF12 erhaltenen Schmelzkurven der Sorten SY Bacardi CLP, Sumiko, DS-3 Sigmasol und NK Delfi mit den Konzentrationsverhältnissen 0,2 μ M x 0,2 μ M und 0,2 μ M x 0,8 μ M.	41
Abbildung 15: Foto von Agarosegel 1. Überprüfung der mit den Primerpaaren xxx gebildeten PCR-Produkten.	42
Abbildung 16: Foto von Agarosegel 2. Überprüfung der mit den Primerpaaren SF12 und der Primerkombination SF04xSF12 gebildeten PCR-Produkten.	43
Abbildung 17: Normalisierte Schmelzkurven von allen 17 Referenzsorten unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12.....	44
Abbildung 18: Normalisierte Schmelzkurven von allen 17 Referenzproben unter Verwendung des Primerpaars SF10.....	45
Abbildung 19: Normalisierte Schmelzkurve von den Proben P63LL124 (orange), P64HE118 (cyan), P64LL155 (magenta), SY Chronos (dunkelgelb) und Soblus (hellgrau) unter Verwendung des Primerpaars SF02.....	46
Abbildung 20: Normalisierte Schmelzkurve von den Proben Suman (gelb), Sumiko (grün) und SY Bacardi CLP (dunkelrot) unter Verwendung des Primerpaars SF03	47

Abbildung 21: Normalisierte Schmelzkurve von den unbehandelten AGES-Proben unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12	49
Abbildung 22: Normalisierte Schmelzkurve von den gebeizten AGES-Proben unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12.....	51
Abbildung 23: Normalisierte Schmelzkurve von den gebeizten AGES-Proben unter Verwendung des Primersets SF09	52
Abbildung 24: Normalisierte Schmelzkurve von den Saatgut Austria-Proben unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12.....	54
Abbildung 25: Normalisierte Schmelzkurve von den Saatgut Austria-Proben unter Verwendung des Primersets SF09	55
Abbildung 26: Normalisierte Schmelzkurve von den Saatgut Austria-Proben unter Verwendung des Primersets SF10	56
Abbildung 27: Vergleich der normalisierten Schmelzkurve von den Sorten Bacardi und ES Columbella unterschiedlicher Hersteller unter Verwendung des Primerpaars SF09	59
Abbildung 28: Vergleich der normalisierten Schmelzkurve von den Sorten Sumiko und PR64F50 unterschiedlicher Hersteller unter Verwendung des Primerpaars SF09	60
Abbildung 29: Vergleich der normalisierten Schmelzkurve von den ungebeizten und gebeizten Sorten QC Toledo 1 und 2.	61
Abbildung 30: Vergleich der normalisierten Schmelzkurve von der ungebeizten und gebeizten Sorte SW1H63cl.	62
Abbildung 31: Vergleich der normalisierten Schmelzkurve zwischen der Referenzprobe P64LL155 und der Probe P64LL155, der Teil des unbehandelten Probenpakets war.	63
Abbildung 32: Amplifikationskurven der Sorte Muscat Italia mit den Primerpaaren VVS2, VVMD5, VVMD7 und VVMD25.	66
Abbildung 33: Amplifikationskurven der Sorte Muscat Italia mit den Primerpaaren VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 und VrZAG79.....	67
Abbildung 34: 1. negativen Ableitungen der Schmelzkurven von den Weinproben mit den Primerpaars VVS2 sowie VrZAG79	69
Abbildung 35: 1. Ableitungen der Schmelzkurven von den Weinproben mit der Primerkombination VVS2xVrZAG79.....	70
Abbildung 36: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VVS2.....	71
Abbildung 37: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primerpaares VrZAG79.....	71
Abbildung 38: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung der Primerkombination VVS2xVrZAG79	71
Abbildung 39: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primersets VrZAG62.....	72
Abbildung 40: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben Smederevka aus Begnishte und Resava sowie von Kardinal aus Ljubash unter Verwendung des Primersets VrZAG62.....	73
Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben Plovdiva aus Probistip und Resava sowie von Kardinal aus Ljubash und Resava unter Verwendung des Primersets VrZAG62.....	74
Abbildung 42: Normalisierte Schmelzkurve von den 3 Weinprobenblättern Kardinal und Plovdiva unter Verwendung des Primersets VrZAG62.....	75
Abbildung 43: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primersets VVS2.....	76
Abbildung 44: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primersets VVMD7	76

Abbildung 45: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primersets VVMD25	77
Abbildung 46: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primersets VVMD27	77
Abbildung 47: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primersets VVMD28	77
Abbildung 48: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primersets VVMD32	77
Abbildung 49: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primersets VrZAG62.....	78
Abbildung 50: Normalisierte Schmelzkurve von den Weinproben unter Verwendung des Primersets VrZAG79.....	78
Abbildung 51: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL124, ES Columbella, P64HE133, P64HE118, P64LL155, Suman und SY Chronos) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung	92
Abbildung 52: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL06, SY Gracia CLP, Tutti, RGT Wollf, Sureli und Soblus) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung	92
Abbildung 53: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (ES Willis CLP, Sumiko, SY Bacardi CLP und PR64F50) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung	92
Abbildung 54: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL124, ES Columbella, P64HE133, P64HE118, P64LL155, Suman und SY Chronos) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung	93
Abbildung 55: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL06, SY Gracia CLP, Tutti, RGT Wollf, Sureli und Soblus) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung.....	93
Abbildung 56: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (ES Willis CLP, Sumiko, SY Bacardi CLP und PR64F50) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung	93
Abbildung 57: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (P63LL124, P64HE118, P64LL155, SY Chronos und Soblus) unter Verwendung des Primerpaars SF02 in Doppelbestimmung	94
Abbildung 58: Normalisierte Schmelzkurven von den Referenzproben (Suman, Sumiko und SY Bacardi CLP) unter Verwendung des Primerpaars SF03 in Doppelbestimmung	94
Abbildung 59: Normalisierte Schmelzkurven von den unbehandelten AGES-Proben (Clarasun, QC Toledo und P64LP130) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung	94
Abbildung 60: Normalisierte Schmelzkurven von den unbehandelten AGES-Proben (SW1H63cl, P64HH150, PR64F66, P64LL155, P63HH111 und Florasun) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung	94
Abbildung 61: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben (Prosun, Clarasun SU, Kirasun SU, Carrera clp, Alvarez IR, P64CL129, SW1H63cl und Ha-1A-SU) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung	95
Abbildung 62: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben (QC Toledo, Helesun und Florasun) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung	95
Abbildung 63: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben (Prosun, Clarasun SU, Kirasun SU, Carrera clp, Alvarez IR, P64CL129, SW1H63cl und Ha-1A-SU) unter Verwendung des Primerpaars SF09 in Doppelbestimmung	95
Abbildung 64: Normalisierte Schmelzkurven von den gebeizten AGES-Proben (QC Toledo, Helesun und Florasun) unter Verwendung des Primerpaars SF09 in Doppelbestimmung	95

Abbildung 65: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (Bacardi, Sumiko, Neostar, DS-1 Sambasol, ES Columbella, SY Academic CL und DS-3 Sigmasol) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung	96
Abbildung 66: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (ES Savana, ES Nirvana, ES Regata, NK Delfi, PR64F50, SY Mariner und NK Stradi) unter Verwendung der Primerkombination SF04xSF12 in Doppelbestimmung	96
Abbildung 67: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (Bacardi, Sumiko, Neostar, DS-1 Sambasol, ES Columbella, SY Academic CL und DS-3 Sigmasol) unter Verwendung des Primerpaars SF09 in Doppelbestimmung	96
Abbildung 68: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (ES Savana, ES Nirvana, ES Regata, NK Delfi, PR64F50, SY Mariner und NK Stradi) unter Verwendung des Primerpaars SF09 in Doppelbestimmung	96
Abbildung 69: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (Bacardi, Sumiko, Neostar, DS-1 Sambasol, ES Columbella, SY Academic CL und DS-3 Sigmasol) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung	97
Abbildung 70: Normalisierte Schmelzkurven von den Saatgut Austria Proben (ES Savana, ES Nirvana, ES Regata, NK Delfi, PR64F50, SY Mariner und NK Stradi) unter Verwendung des Primerpaars SF10 in Doppelbestimmung	97

9.8 Liste der Primerpaare für die Differenzierung der Sonnenblumensorten

Primer Name	Sequenz 5'→ 3'	Interne Primerbezeichnung	Anlagerungs-temperatur (°C)
ORS 543 fw	CCAAGTTTCAGTTACAATCCATGA	SF01	60
rev	GGTCATTAGGAGTTTGGGATCA		
ORS 342 fw	CACCAGCATAGCCATTTCAAA	SF02	60
rev	TGTTTCATCAGGTTTGTCTCCA		
ORS 925 fw	ATGATTCTAAGTTGCGGTAGTGC	SF03	60
rev	GTTGGGTTTAAGTTGTTGCTTCC		
ORS 1114 fw	AGATGGTGGCAGGAGAGTTAAAG	SF04	60
rev	GCAGAAACAGATCAGGAGGGTAT		
ORS 166 fw	CAGCCACATGCCCTCTGAC	SF05	60
rev	TGTTAAGAACCGCGACAACCTGC		
ORS 595* fw	TCGCCTAATATGGATGGACCC	SF06	60
rev	GCTTGTTTGGTTCCAATGTGTA		
ORS 630 fw	TGTGCTGAGGATGATATGCAG	SF07	60
rev	GCACGACCCGGATATGTAAC		
ORS 694* fw	GGTGTGCGTAAAGAGTGGTG	SF08	60
rev	TGCCGTGAAACAGAGAGAGG		
ORS 716 fw	CCCCACAACCCATAGCCTAA	SF09	60
rev	GAACTAACCGCCATCCAAGA		
ORS 878 fw	TGCAAGGTATCCATATTCCACAA	SF10	60
rev	TATACGCACCGGAAAGAAAGTC		
ORS 949* fw	GGATGATTTGACACCCCGCA	SF11	60
rev	CACTGTCTTCAACCCGGCA		
ORS 1178* fw	TGCATACGGTCCTTTCACTT	SF12	60
rev	CCTACCACCGGATTGTTGAG		
ORS 1227* fw	GACCATCACCAACCTGCAAC	SF13	60
rev	CACACCATTACGATCGCAG		

ORS 1265	fw	AGACACAACACACCTCTTTACCA	SF14	60
	rev	GCCTTGGGTGCCCTATTTC		
ORS 1199	fw	AAGGTAGTGCTGGTGGTTCAGAT	SF15	60
	rev	TTAAATCTTGTCATGTGCCTTGC		
ORS 1201	fw	AGATGAACGACGAAACCAGAAC	SF16	60
	rev	TCGAATCAGTAACCAATCTATCTCG		
ORS 1232	fw	CGCATACAAATATGAAGCCAGAG	SF17	60
	rev	CTCTCTCCAAACCTCTTCCCTCT		
ORS 1196	fw	AACGATCCTCTCTCTAAACCCTA	SF18	60
	rev	CGTCCAGTTGCTTCCAAAGAG		
ORS 1155	fw	CACCATTATCAACAACCGAACAT	SF19	60
	rev	CCCACCCTCTCGTTTCTACTC		

*die Primersequenzen wurden modifiziert

9.9 Liste der Primerpaare für die Differenzierung der Weinsorten

Primernamen	Sequenz 5'→ 3'	Anlagerungstemperatur (°C)
VVS2 fw rev	CAGCCCGTAAATGTATCCATC AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	55
VVMD5 fw rev	CTAGAGCTACGCCAATCCAA TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	55
VVMD7 fw rev	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT CGAACCTTCACACGCTTGAT	55
VVMD25 fw rev	TTCCGTTAAAGCAAAAGAAAAGG TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG	55
VVMD27 fw rev	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	55
VVMD28 fw rev	AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGA TCATCAATTTCTGATCTCTATTTGCTG	55
VVMD32 fw rev	TATGATTTTTAGGGGGGTGAGG GGAAAGATGGGATGACTCGC	55
VrZAG62 fw rev	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	55
VrZAG79 fw rev	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG TGCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	55