

# Food Profiling - Molekularbiologische Methoden zur Differenzierung von Walnussorten (*Juglans regia*)

---



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades an der  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Chemie  
Hamburg School of Food Science - Institut für Lebensmittelchemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Doreen Lackner geborene Teske

Hamburg, 14.08.2023

Diese Arbeit wurde an dem Hamburg School of Food Science - Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Fischer und Dr. Anna Schulz angefertigt.

1. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Markus Fischer
2. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Bernward Bisping

Tag der Disputation: 28.04.2023

Tag der Druckfreigabe: 12.08.2023

Für meinen Ehemann und unseren kleinen Liebling.

## Danksagung

Ich danke,

meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Fischer für die ausgezeichnete Betreuung, sein Rat und seine Anregungen eröffneten mir wertvolle Einsichten und ermöglichten mir die Anfertigung dieser Dissertation.

meinen lieben Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis, besonders dem DNA-Team, für die vielfältigen wissenschaftlichen Diskussionen und gegenseitige Unterstützung. Besonderen Dank an Nils Neumann und Stefanie Schelm für die wunderbare Zusammenarbeit und ihre fachliche Kompetenz.

Tammy Tischer, für die gemeinsame Arbeit mit unserer Diplomandin Milena Günther und die daraus entstandene Freundschaft, es war die schönste Zeit mit euch und wir waren ein grandioses Team.

meinen eifrigen und fleißigen Diplomandinnen, Milena Günther, Alina Peters, Anne Timmann und Hannah Mietz, ohne euch wäre diese Forschungsarbeit nicht so erfolgreich gewesen wäre.

meine Kommilitoninnen Anna Tran, Denise Krüger und Jil Cain für unsere gemeinsamen Abenteuer und gegenseitige Motivation während des Studiums und die innige Freundschaft, die sich dadurch entwickelte. Unsere Mädels Abende sind immer wieder aufs Neue erheiternd und ich möchte sie nicht mehr missen.

Einen besonderen Dank gilt,

meiner Mutter Anke und meiner Oma Erika, die immer an mich geglaubt haben und mich unterstützen, so dass ich diesen Weg beschreiten konnte.

meinem Ehemann Patrick und Seelenverwandten, der meine abenteuerlichen Ideen unterstützt und meine Begeisterung für Schokolade teilt. Ich bin froh, mit dir die Höhen und Tiefen des Elternseins zu gemeinsam zu erleben.

## Publikationsliste

**Teske, Doreen;** Peters, Alina; Möller, Alexander; Fischer, Markus; *Genomic Profiling: The Strengths and Limitations of Chloroplast Genome-Based Plant Variety Authentication*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 68 (Special Issue: Food Profiling - Analytical Strategies for Food Authentication). 2020.

**Teske, Doreen;** Fischer Markus; *Ist drin, was draufsteht? Welchen Beitrag können modernste Sequenzierungsmethoden bei Lebensmitteln leisten?* Chrom & Food Forum - Moderne Methoden, aktuelle Trends 10. 2020.

## Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
GLOSSAR.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
EINHEITEN.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS.....	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XIII
ZUSAMMENFASSUNG.....	XVII
ABSTRACT.....	XIX
1. EINLEITUNG.....	1
2. GRUNDLAGEN.....	3
<b>2.1 Die Walnuss.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Evolutionäre Migration.....	3
2.1.2 Botanische Klassifizierung und Karyogamie.....	4
2.1.3 Anbauländer, Ernte und Welthandel.....	10
2.1.4 Charakteristika und Verwendung der Walnuss.....	11
<b>2.2 Die DNA.....</b>	<b>13</b>
2.2.1 DNA - Träger der Erbinformation.....	13
2.2.2 Zellaufbau einer Pflanzenzelle.....	13
2.2.3 Nukleäre DNA in Eukaryoten.....	14
2.2.4 Die Chloroplasten-DNA.....	15
2.2.5 Maternale und paternale Vererbung.....	17
2.2.6 Sequenzen von <i>J. regia</i> .....	18
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.3.1. Isolierung der Plastide.....	19
2.3.2 DNA-Isolierung.....	21
2.3.3. Spezifizierung der DNA.....	22
2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.3.5 Sequenzierungstechniken.....	26
2.3.6 Non-targeted DNA-Analysen.....	31
<b>2.4 Molekularbiologische Arbeiten zu <i>J. regia</i>.....</b>	<b>34</b>
3. ZIELSETZUNG.....	36

<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Probenvorbereitung.....</b>	<b>37</b>
4.1.1 Bakterielle Dekontaminierung.....	37
4.1.2 Probenvorbereitung für das Blatt- und Samenmaterial.....	39
<b>4.2 DNA-Isolierung aus Walnussmaterial.....</b>	<b>39</b>
4.2.1 Gesamt DNA-Isolierung aus Samen- und Blattmaterial der Walnuss.....	39
4.2.2 Gesamt DNA-Isolierung inklusive Probenvorbereitung aus dem Walnussperikarp.....	45
4.2.3 Isolierung der Chloroplasten-Plastiden aus Walnussamen und -blättern.....	51
<b>4.3 Next-Generation Sequencing des Chloroplasten-Genoms.....</b>	<b>61</b>
4.3.1 Ergebnisse der Sequenzierung der Chloroplasten-Genome.....	61
<b>4.4 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von Genabschnitten auf dem Karyom.....</b>	<b>70</b>
4.4.1 Auswertung der Optimierungsschritte für die PCR der Sanger-Sequenzierung.....	70
4.4.2 Auswertung der Sequenzierungsergebnisse hinsichtlich SNPs.....	75
<b>4.5 Entwicklung von Downstream-Methoden für die Routineanalytik.....</b>	<b>79</b>
4.5.1 Entwicklung einer RFLP-PCR für Walnussblätter und -perikarp.....	79
4.5.2 Entwicklung einer ARMS-PCR für Walnussblätter und -perikarp.....	84
<b>4.6 Entwicklung von non-targeted Methoden.....</b>	<b>87</b>
4.6.1 Etablierung einer RAPD-Analyse für Walnussblätter und -perikarp.....	87
4.6.2 Etablierung einer SSR-Analyse für Walnussblätter und -perikarp.....	95
<b>5. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>101</b>
<b>5.1 Probenvorbereitung.....</b>	<b>101</b>
5.1.1 Bakterielle Dekontaminierung.....	101
5.1.1 Gesamt DNA-Isolierung aus Walnussamen und -blättern.....	102
5.1.2 Methoden zum Zellaufschluss des Walnussperikarps.....	102
<b>5.2 DNA-Isolierung.....</b>	<b>103</b>
5.2.1 DNA-Isolierung aus dem Blatt- und Samenmaterial.....	103
5.2.2 DNA-Isolierung aus dem Walnussperikarp.....	109
5.2.3. Isolierung der Plastide aus Samen- und Blattmaterial.....	111
5.2.4 Isolierung der Plastiden-DNA.....	114
5.2.5 Aufreinigung der DNA-Isolate mit Hilfe des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit.....	118
<b>5.3 Polymerasekettenreaktion.....</b>	<b>119</b>
5.3.1 Überprüfung der Reinheit Chloroplasten-Isolate.....	119
5.3.2 Amplifizierung von spezifischen Genabschnitten auf dem Karyom.....	120
5.3.3 RFLP-PCR.....	124
5.3.4 ARMS-PCR.....	127
<b>5.4 Sequenzierungstechniken.....</b>	<b>128</b>
5.4.1 Sanger-Sequenzierung.....	128
5.4.2 Next Generation Sequencing (Bridge-Amplifikation von Illumina).....	128
<b>5.5 Non-targeted DNA-Analysen.....</b>	<b>129</b>
5.5.1 RAPD-PCR.....	129
5.5.2 Mikrosatelliten-Analyse.....	131
<b>5.6 Spezifizierung der DNA.....</b>	<b>134</b>
5.6.1 Visualisierung der DNA mittels Elektrophorese.....	134

5.6.2 Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA.....	135
5.6.3 Quantifizierung der DNA-Isolate .....	135
6. FAZIT .....	136
7. AUSBLICK.....	137
8. LITERATURVERZEICHNIS .....	138
9. ANHANG .....	155
<b>9.1 Verwendete Reagenzien .....</b>	<b>155</b>
<b>9.2 Verwendete Materialien, Geräte und Software .....</b>	<b>162</b>
<b>9.3 Probenvorbereitung.....</b>	<b>166</b>
9.3.1 Bakterielle Dekontaminierung.....	166
<b>9.4 DNA-Isolierung.....</b>	<b>168</b>
9.4.1 Gesamt-DNA-Isolierung aus Blatt- und Samenmaterial .....	168
9.4.2 Gesamt-DNA-Isolierung aus dem Walnussperikap.....	170
9.4.3 DNA-Isolierung der cpDNA .....	172
<b>9.5 Polymerasekettenreaktion.....</b>	<b>174</b>
9.5.1 Überprüfung der Chloroplasten-Isolate mittels PCR .....	174
9.5.2 Parameter zur Amplifizierung der spezifischen Genabschnitte auf dem Karyom .....	174
9.5.3 RFLP-PCR.....	176
9.5.4 ARMS-PCR.....	180
<b>9.6 Sequenzierungen .....</b>	<b>179</b>
9.6.1 Sanger-Sequenzierung.....	179
9.6.2 Next-Generation Sequenzierung .....	182
<b>9.7 Non-targeted DNA-Analysen.....</b>	<b>184</b>
9.7.1 RAPD-Analyse .....	184
9.7.2 Mikrosatelliten-Analyse.....	189
<b>9.8 Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>195</b>

## Glossar

<b>Allel</b>	Variation eines Gens auf einem identischen Chromosomenabschnitt
<b>Amplifizierung</b>	Vervielfältigung von DNA-Abschnitten
<b>Annealing</b>	Anlagerung eines Oligonukleotides an die DNA
<b>Authentizität</b>	Echtheit oder Glaubwürdigkeit
<b>Barcode</b>	Basenabfolge eines Genabschnittes, wird anhand eines Strichcodes visualisiert und wird zur Artendifferenzierung verwendet
<b>Coverage</b>	Abdeckung von DNA-Fragmenten mit einer Referenz-DNA
<b>Diploid</b>	Zellkern besitzt einen zweifachen Chromosomensatz
<b>Fingerprint</b>	DNA-Profil eines Individuums
<b>Heterozygotie</b>	Mischerbig, unterschiedliche Allele eines Gens
<b>Homozygotie</b>	Reinerbig, gleiche Allele eines Gens
<b>Karyom</b>	Kern-Genom
<b>Mapping</b>	Vergleich von DNA-Sequenzen hinsichtlich ihrer Divergenz
<b>Marker</b>	Bekannter Genabschnitt für Arten- und/order Sortendifferenzierung
<b>Maternal</b>	Mutterseitige Abstammungslinie
<b>Next-Generation Sequencing</b>	Verbesserte Technologie zur massiven, parallelen Sequenzierung
<b>Non-Targeted Methoden</b>	Keine zielgerichtete Analyseverfahren, das bedeutet, die Zielsequenz ist unbekannt
<b>Nukleus</b>	Zellkern zur Speicherung der genetischen Information auf den Chromosomen
<b>Paternal</b>	Vaterseitige Abstammungslinie
<b>Perikarp</b>	Fruchtgehäuse, bei der Walnuss die verholzte Schale
<b>Plastid</b>	Zellorganelle einer Pflanzenzelle, umgeben von einer Doppelmembran
<b>Plastom</b>	Plastideigene DNA
<b>Polymerase</b>	Enzym für den Einbau von Nukleotiden zur Komplettierung eines DNA-Einzelstrangs zum DNA-Doppelstrangs
<b>Polymorphismus</b>	Individuelle Unterschiede innerhalb einer Population
<b>Primer</b>	Oligonukleotid als Startpunkt für die DNA-Vervielfältigung
<b>Read</b>	Komplementäre Basensequenz zu einem DNA-Fragment, das bspw. bei der Sequenzierung gebildet wird
<b>SNP</b>	Punktmutation einer einzelnen Base auf der DNA-Sequenz
<b>Template</b>	DNA-Vorlage für die DNA-Vervielfältigung

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
26	Geisenheimer Nr. 26 (Walnussorte)
A	Adenin
ABI	Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer
ADH	Alkoholdehydrogenase
ARMS	refraktäres Amplifikations-Mutationssystem ( <i>amplification refractory mutation system</i> )
ATTO 565	Rhodaminfarbstoff, Fluoreszenzmarker
BP	Bindepuffer
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
BV	Broadview (Walnussorte)
c	Stoffmengenkonzentration
C	Cytosin
CE	Kapillarelektrophorese ( <i>capillary electrophoresis</i> )
CGE	Kapillargelelektrophorese ( <i>capillary gel electrophoresis</i> )
CH	Chandler (Walnussorte)
cp	Chloroplasten
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuclease
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Extraktionspuffer
FAD	Fettsäure-Desaturase ( <i>fatty acid desaturase</i> )
FAM	6-Carboxyfluorescein
FE	Fernor (Walnussorte)
FQ	Franquette (Walnussorte)

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
FT	Fernette (Walnussorte)
Fw-Primer	<i>Forward-Primer</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung von 9,81 m/s <sup>2</sup>
G	Guanin
GP	Glasperlen
GuSCN	Guanidiniumthiocyanat
He	Heterozygot
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescin
Ho	Homozygot
HW	Howard (Walnussorte)
HA	Hartley (Walnussorte)
Hz	Hertz
I	<i>Inner</i>
I	Stromstärke
IND	Independence
INRA	<i>Institute National de la Recherche Agronomique</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KBE	koloniebildende Einheiten
LA	Lara (Walnussorte)
LPA	ligationsabhängige Sondenamplifizierung ( <i>ligation-depend probe amplification</i> )
MiSeq	Sequenzierungsplattform von Illumina
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
Mt	Mitochondrien-DANN
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
O	<i>Outer</i>
P	Pedro (Walnussorte)

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PA	Parisiene (Walnussorte)
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pH	<i>Pondus hydrogenii</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q	Q-Score
QLT	Regionen eines quantitativen Merkmals ( <i>quantitative trait loci</i> )
qPCR	quantitative PCR
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
RNA	Ribonucleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
Rv-Primer	<i>Reverse-Primer</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SNP	Einzelbasenaustausch ( <i>single nucleotid polymorphism</i> )
S	Serr (Walnussorte)
ssDNA	einzelsträngige DNA ( <i>single stranded DNA</i> )
SSRs	<i>Simple Sequence Repeats</i>
T	Thymin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethane (basisch), Trizma® Base
unk	Unbekannt ( <i>unknown</i> )
U	Spannung
V	Vina (Walnussorte)

## Einheiten

---

Abkürzung	Bedeutung
WP	Waschpuffer
WRKY	Spezifisches Sequenzmotiv (TTGACC/T)

## Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Micro
bp	Basenpaar
c	Zenti
c	Konzentration
cps	<i>counts per second</i>
g	Gramm
h	Stunde
ha	Hektar
Hz	Hertz
k	Kilo
L	Liter
M	Mega
m	Milli
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
min	Minuten
mio	Millionen
mm	Millimeter
mol	Stoffmenge
n	Nano
ppm	<i>parts per million</i>
psi	<i>pound-force per square inch</i>
s	Sekunde
USD	US-Dollar
t	Tonnen
V	Volt
v/v	Volumenanteile

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der Zusammensetzung und Kopienzahl des Chloroplasten-Genoms und dessen Verhältnis zum Gesamt-Genom von <i>J. regia</i> auf hypothetischer Basis.....	16
Tab. 2: Zusammenhang zwischen Q-Score, Genauigkeit und Fehlerwahrscheinlichkeit (Illumina 2019). .....	30
Tab. 3: Zusammenfassung der derzeitigen molekularbiologischen Forschungsergebnisse bezüglich <i>J. regia</i> .....	34
Tab. 4: Auflistung der Ergebnisse der DNA-Isolierung bezüglich der DNA-Konzentration (Fluorometrie) und Qualität (Photometrie) nach der vorherigen Desinfektion des Walnussperikarps. ....	38
Tab. 5: Auflistung des verwendeten Probenmaterials (Sorte unbekannt) von zwei unterschiedlichen Walnussamenproben in einer Doppelbestimmung und die dazugehörigen Einwaagen für die DNA-Isolierung, die qualitativen Parameter und die DNA-Konzentration. ....	40
Tab. 6: Auflistung des verwendeten Probenmaterials (Sorte unbekannt) von zwei unterschiedlichen Walnussblattproben in einer Doppelbestimmung und die dazugehörigen Einwaagen für die DNA-Isolierung, die qualitativen Parameter und die DNA-Konzentration. ....	41
Tab. 7: Auflistung der vier Methoden und deren normierte Konzentration auf 100 mg Probeneinwaage von jeweils vier Proben pro Experiment. ....	44
Tab. 8: Darstellung der angewandten Methoden und die verwendete DNA-Isolierungsmethode mit den erhaltenen Ergebnissen aus zwei Probenmessungen, Ausnahme Programm 2 mit Methode 1 mit 4 Probenmessungen, bezüglich der Qualität und Quantität der DNA. Die Programmparameter befinden sich im Kapitel 5.1.2. Hierbei markiert ein „-“, keine Messung und ein „/“ kein Ergebnis. Hierbei wurden 150 mg Probenmaterial für die DNA-Isolierung eingesetzt. ....	46
Tab. 9: Die angewendeten Methodenkombinationen zur DNA-Aufreinigung wurden zusammen mit dem entsprechenden Probenmaterial, den Reinheitsparametern und der finalen DNA-Konzentration aufgelistet.....	52
Tab. 10: Zusammenfassung der Genabschnitte der Vorwärts (FW)- und Rückwärtssequenzierung (RV) und die detektierten SNPS sowie deren Polymorphismus und Einteilung hinsichtlich Hetero- und Homozygotie. Die grünen Sorten liegen in Doppelbestimmung vor, die roten Sorten nur in Einfachbestimmung.....	76
Tab. 11: Zusammenfassung der Genabschnitte auf dem Karyom mit ihrer jeweiligen Schnittstelle und dem dazugehörigen Enzym sowie die optimale Inkubationstemperatur und die Kategorisierung nach homo- oder heterozygot. Die Sorten Broadview (BV), Chandler (CH), Fernor (FE) wiesen nur einen homozygoten SNP auf. ....	80
Tab. 12: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und ARMS-PCR an dem SNP Nr. 12 mit dem Allel C (Mutante). Hierbei markiert ein x die Abwesenheit eines DNA-Fragment, wohingegen ein ✓ die Anwesenheit eines entsprechenden DNA-Fragmentes symbolisiert. ....	85
Tab. 13: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und ARMS-PCR an dem SNP Nr. 12 mit dem Allel A (Wildtyp). Hierbei markiert ein x die Abwesenheit eines DNA-Fragment, wohingegen ein ✓ die Anwesenheit eines entsprechenden DNA-Fragmentes symbolisiert. ....	86
Tab. 14: Verwendete Reagenzien und ihre Zusammensetzung sowie die Inkubationsdauer. ....	101
Tab. 15: Programmparameter des <i>Bead Ruptors</i> <sub>24</sub> für den Zellaufschluss des Walnussperikarps. ....	102
Tab. 16: Programmparameter der Messermühle für den Zellaufschluss des Walnussperikarps.....	103
Tab. 17: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions-, Binde- und Waschpuffers nach Brüning <i>et al.</i> (2011). ....	104
Tab. 18: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Akkak <i>et al.</i> (2008). .....	106
Tab. 19: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Doyle (1991). ....	108
Tab. 20: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Asif und Cannon (2005). ....	109
Tab. 21: Zusammensetzung des verwendeten Extraktionspuffers nach Jiao <i>et al.</i> (2012). ....	110

Tab. 22: Zusammensetzung des verwendeten Extraktionspuffers nach Murray und Thompson (1980). .....	111
Tab. 23: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Vieira <i>et al.</i> (2014). .....	112
Tab. 24: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Vieira <i>et al.</i> (2014) und Jansen <i>et al.</i> (2005).....	113
Tab. 25: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Lang <i>et al.</i> (2011). .....	114
Tab. 26: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Vieira <i>et al.</i> (2014). .....	115
Tab. 27: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Chaudhary <i>et al.</i> (2015).....	116
Tab. 28: Zusammensetzung des verwendeten Lösungen nach Palmer (1986) und Sandbrink <i>et al.</i> (1989). .....	118
Tab. 29: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen zur DNA-Amplifizierung. .....	119
Tab. 30: Programmparameter des Thermocyclers für die DNA-Amplifizierung. ....	120
Tab. 31: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die Gradienten-PCR. .....	121
Tab. 32: Programmparameter des Thermocyclers für die Gradienten-PCR.....	121
Tab. 33: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die Amplifikation der nukleären Genabschnitte für die erste Sanger-Sequenzierung. ....	122
Tab. 34: Programmparameter des Thermocyclers für die nukleären Genabschnitte. ....	122
Tab. 35: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die Amplifikation der nukleären Genabschnitte für die zweite Sanger-Sequenzierung. ....	123
Tab. 36: Programmparameter des Thermocyclers für den Genabschnitt FAD <sub>22</sub> für die zweite Sequenzierung.....	123
Tab. 37: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die nukleären Genabschnitte für die dritte Sequenzierung. ....	124
Tab. 38: Programmparameter des Thermocyclers für die Genabschnitt ADH1 und ADH2 für die dritte Sequenzierung.....	124
Tab. 39: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die jeweiligen nukleären Genabschnitte der RFLP-PCR. ....	125
Tab. 40: Programmparameter des Thermocyclers für die RFLP-PCR.....	126
Tab. 41: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für den enzymatischen Verdau. ....	126
Tab. 42: Programmparameter des Thermocyclers für den enzymatischen Verdau. ....	126
Tab. 43: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für den SNP der Mutante und Wildtyp der ARMS-PCR. ....	127
Tab. 44: Programmparameter des Thermocyclers für die ARMS-PCR von der Mutante und des Wildtypes.....	128
Tab. 45: Zusammensetzung und Ausgangskonzentration für die RAPD-Gradienten-PCR anhand von Blattmaterial.....	130
Tab. 46: Parameter des Thermocyclers für die RAPD-PCR. ....	130
Tab. 47: Zusammensetzung und Ausgangskonzentration für die RAPD-Gradienten-PCR anhand des Walnussperikarps. ....	131
Tab. 48: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die Gradienten-PCR. .....	132
Tab. 49: Programmparameter des Thermocyclers für die Gradienten-PCR. ....	132
Tab. 50: Auflistung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und ihr jeweiliges Absorptions- und Emissionsmaximum.....	133
Tab. 51: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die PCR.....	133
Tab. 52: Verwendete Reagenzien mit ihrem Hersteller und Spezifikationen. ....	155

Tab. 53: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Einstufung ihrer Sicherheitsmerkmale sowie ihre Entsorgung nach der GESTIS.Stoffdatenbank (2020).....	157
Tab. 54: Entsorgungsschlüssel für die in Tabelle 64 angegebene Entsorgung. ....	158
Tab. 55: GHS-Symbole und die zugehörige Ziffer für Codierung der Tabelle 64. ....	158
Tab. 56: Verwendete Lösungen sowie ihr Hersteller und Spezifikation. ....	159
Tab. 57: Verwendete Kits sowie ihr Hersteller und Spezifikation.....	161
Tab. 58: Verwendete Materialien sowie ihr Hersteller und Spezifikation. ....	162
Tab. 59: Verwendete Geräte sowie ihr Hersteller und Spezifikation.....	163
Tab. 60: Verwendete Software für die jeweilige Anwendung. ....	165
Tab. 61: Auflistung der Walnussproben für die Isolierung der Gesamt-DNA unter Angabe der Sorte, des Barcodes, der LAB-ID, des Ursprungslandes und die DNA-Ausbeute. Die Proben wurden im Jahr 2017 geerntet, mit Ausnahme von Broadview-00 und -01. ....	168
Tab. 62: Auflistung der Walnussproben für die Isolierung der Gesamt-DNA aus dem Walnussperikarp unter Angabe der Sorte, des Barcodes, der LAB-ID und des Ursprungslandes.....	170
Tab. 63: <i>Ergebnisse der Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen vor und nach der Aufreinigung der Isolate der authentischen Walnusschalenproben Bestimmung 1 mit dem Monarch®Kit.</i> ....	171
Tab. 64: <i>Ergebnisse der Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen vor und nach der Aufreinigung der Isolate der authentischen Walnusschalenproben Bestimmung 2 mit dem Monarch®Kit.</i> ....	171
Tab. 65: Auflistung der Walnussproben für die Isolierung der Gesamt-DNA unter Angabe der Sorte, des Barcodes, des Ausgangsmaterials und der LAB-ID.....	172
Tab. 66: <i>Ergebnisse der Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen vor und nach der Aufreinigung der Isolate der authentischen Sequenzierproben.</i> ....	173
Tab. 67: Eigenständig entwickelte Primer für die qualitative PCR mit entsprechender Annealing-Temperatur und Länge des Amplifikationsproduktes. ....	174
Tab. 68: Eigenständig entwickelte Primer der nukleären Genabschnitte mit entsprechender Annealing-Temperatur und Länge des Amplifikationsproduktes. ....	174
Tab. 69: Temperaturintervall des Thermocyclers der Gradienten-PCR. ....	175
Tab. 70: Pipettierschema mit den variierten Parametern der einzelnen Komponenten für die erste Sequenzierung.....	175
Tab. 71: Pipettierschema mit den variierten Parametern der einzelnen Komponenten für die zweite Sequenzierung.....	175
Tab. 72: Pipettierschema mit den variierten Parametern der einzelnen Komponenten für die dritte Sequenzierung.....	175
Tab. 73: Pipettierschema mit den variierten Parametern der einzelnen Komponenten der dritten Sequenzierung für die <i>BiozymTaq-DNA-Polymerase (BT)</i> und der <i>OneTaq-Hottart-DNA-Polymerase (OT)</i> . ....	176
Tab. 74: Eigens konzipierte Primer für die RFLP-PCR, für den ausgewählten SNP, die Sequenz und die Länge des Amplifikates und die DNA-Teilfragmente des enzymatischen Verdau. ....	176
Tab. 75: Schlüssel der verwendeten Abkürzungen zur Beschriftung der Auftragung der folgenden Abbildungen.....	177
Tab. 76: Eigens konzipierte Primer für die ARMS-PCR.....	180
Tab. 77: Konzentrationen der PCR-Produkte für die einzelnen Genabschnitte der jeweiligen Sorten für die erste Sequenzierung. Hierbei steht X für keine Produktbildung. ....	179
Tab. 78: Konzentrationen der PCR-Produkte für die einzelnen Genabschnitte der jeweiligen Sorten für die zweite Sequenzierung. Hierbei steht X für keine Produktbildung. ....	180
Tab. 79: Konzentrationen der PCR-Produkte für die einzelnen Genabschnitte der jeweiligen Sorten für die dritte Sequenzierung. ....	181
Tab. 80: Auswahl der Adapterkombinationen der jeweiligen Proben für die <i>Next-Generation</i> Sequenzierung.....	182
Tab. 81: Fragmentlängen der jeweiligen <i>Libraries</i> nach dem Restriktionsverdau, die anhand des Bioanalyzers ermittelt wurden und die daraus abgeleitete Konzentration.....	183

Tab. 82: Ergebnisse der Sequenzierungen unter Angabe der Acession Number, Paired-End Reads, Mapped Reads, die durchschnittliche Coverage und die prozentuale Abdeckung des Chloroplasten-Genoms. ....	184
Tab. 83: Temperaturintervall des Thermocyclers der Gradienten-PCR.....	184
Tab. 84: Auflistung der verwendeten Primer mit den Sequenzen, Annealing-Temperatur und der Literaturquelle. ....	185
Tab. 85: Auflistung der positiv getesteten Primer in Abhängigkeit ihres optimalen Reaktionsansatzes für Walnussblätter. ....	185
Tab. 86: Auflistung der positiv getesteten Primer in Abhängigkeit ihres optimalen Reaktionsansatzes für Walnussperikarp. ....	186
Tab. 87: Volumina des Farbstoffes für die Gelelektrophorese. ....	186
Tab. 88: Auflistung der verwendeten Primer und die dazugehörige Literaturquelle. ....	189
Tab. 89: Temperaturintervall für die Gradienten-PCR. ....	189
Tab. 90: Primer an der jeweiligen Position in den Abbildungen 86 und 87. ....	190
Tab. 91: Zusammenfassung der Primergruppen für die simultane Analyse bei der Kapillargelelektrophorese. ....	191
Tab. 92: Methodenparameter des Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers.....	191
Tab. 93: Zusammenfassung der Primergruppen für die simultane Analyse bei der Kapillargelelektrophorese. ....	192
Tab. 94: Einteilung der Proben und die Verwendung des jeweiligen Mastermix bei den entsprechenden Primern. ....	192
Tab. 95: Auswertung der Ergebnisse der SSR-Analyse anhand einer 0/1-Matrix.....	193
Tab. 96: Auswertung der Ergebnisse der SSR-Analyse anhand einer 0/1-Matrix. ....	194

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: (a) Männliche Kätzchen mit weiblichen Blüten, (b) Reifende Walnussfrucht (Roloff 2008).....	4
Abb. 2: Samen mit Schale (Lieberei und Reisdorff 2012).....	5
Abb. 3: Differenzierung der einzelnen Bestandteile der Walnussfrucht (Jahanban-Esfahlan et al. 2019). .....	5
Abb. 4: Stammbaum der französischen Sorte Franquette als Basis für die Entwicklung weiterer französischer (blau) und kalifornischer (orange) Sorten, basierend auf züchterische Kreuzungen. Die grüne Färbung repräsentiert Sorten aus unterschiedlichen Ländern. Die Jahreszahl entspricht der offiziellen Veröffentlichung. Bei der Sorte Lara ist diese unbekannt (unk) (Bernard et al. 2018b; Goodell 1983; Szalatnay et al. 2011; Tulecke und McGranaham 1994). .....	8
Abb. 5: Stammbaum der kalifornischen Sorte Payne als Basis für die Entwicklung weiterer kalifornischer (orange) Sorten, basierend auf züchterische Kreuzungen. Die Sorte PI 159568 (grün) stellt hierbei eine afghanische Sorte dar. Die Jahreszahl entspricht der offiziellen Veröffentlichung (Bernard et al. 2018b; Goodell 1983; Szalatnay et al. 2011; Tulecke und McGranaham 1994). .....	9
Abb. 6: Darstellung der verwendeten Walnussorten im Querschnitt von dem Samen und der Schale. .....	10
Abb. 7: Die weltweiten Anbauggebiete der Walnuss <i>J. regia</i> im Jahr 2017. Dabei repräsentieren die unterschiedlichen Farbvarianten die geerntete Walnussmenge in Tonnen (FAOSTAT 2018). .....	11
Abb. 8: Schematischer Aufbau einer Pflanzenzelle mit dem Zellkern sowie den Chloroplasten und Mitochondrien.....	13
Abb. 9: Genkarte des Chloroplasten-Genoms der Gattung <i>Juglans</i> (Dong et al. 2017).....	17
Abb. 10: Schema der Differential-Zentrifugation modifiziert nach Eichenberger (1971).....	20
Abb. 11: Schema der Isopyknischen-Zentrifugation modifiziert nach Eichenberger (1971).....	20
Abb. 12: Schematischer Absorptionsverlauf bestimmter Biomoleküle und anorganische Komponenten (Armbrecht 2013).....	23
Abb. 13: Schema der Polymerasekettenreaktion modifiziert nach Matissek (2018).....	24
Abb. 14: Schematische Darstellung des Prinzips einer RFLP-PCR modifiziert nach (Berg Rasmussen 2012). Rot eingekreist ist die Stelle des SNPs, welchen einige Sorten besitzen und einige nicht. Das rot markierte Nukleotid ist die Stelle des SNPs in der Erkennungssequenz des Enzyms. ....	25
Abb. 15: Schematische Darstellung der ARMS-PCR.....	26
Abb. 16: Hybridisierung der DNA an die <i>Flow Cell</i> mit anschließender <i>Bridge Amplification</i> und Cluster-Bildung.....	28
Abb. 17: Aufsteigend ist die zunehmende Cluster Density zu sehen, a) Unterclusterung der <i>Flow Cell</i> , b) und c) optimale <i>Cluster Density</i> , d) Überclusterung der <i>Flow Cell</i> (Illumina 2019). .....	28
Abb. 18: a) Optimales Verhältnis aus <i>Cluster Density</i> und <i>Cluster Passing Filter</i> , b) leichte Überclusterung ersichtlich durch die verringerte <i>Cluster Passing Filter</i> , c) extreme Überclusterung verhindert jegliche Detektion von Cluster Signalen (Illumina 2019). .....	29
Abb. 19: Auslastung einer <i>Flow Cell</i> eines MiSeq (Sequenzierplattform von Illumina). Die orangen Felder symbolisieren hohe <i>Cluster Densities</i> und die blauen Felder weisen oftmals auf eine fehlgeschlagene Cluster-Ausbildung hin (Illumina 2019). .....	30
Abb. 20: Schematische Darstellung einer RAPD-PCR mit zwei verschiedenen DNA-Proben als Matrize modifiziert nach Kassim und Barceló (2009).....	31
Abb. 21: Einteilung der genomischen DNA modifiziert nach Gassert (2005). .....	32
Abb. 22: Durchschnittliche Zusammensetzung (links) eines Pflanzenblattes der Spezies <i>Piper betle</i> (Guha 2017), (rechts) eines Walnussamens (Sze-Tao et al. 2001; Ros 2010). Es wurden keine verfügbaren Daten zur Zusammensetzung eines Walnussblattes in der Literatur gefunden. Daher wurde die Pflanze <i>Piper betle</i> als Modellorganismus herangezogen.....	44
Abb. 23: Grafische Abbildung der einzelnen Zellkomponenten mit ihren jeweiligen Dichten und Sedimentationsgeschwindigkeiten (Follmann 2001).....	54
Abb. 24: a) Zelluläre Blattbestandteile im Saccharose-Gradienten nach Zentrifugation bei 111.200 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 1), b) Zelluläre Blattbestandteile im Saccharose-	

Gradienten nach Zentrifugation bei 111.200 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 3), c) Zelluläre Blattbestandteile im Saccharose-Gradienten nach Zentrifugation bei 111.200 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 5), d) Zelluläre Blattbestandteile im Saccharose-Gradienten nach Zentrifugation bei 111.200 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 6).....	55
Abb. 25: a) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach der Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 8), b) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach der Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 10).....	57
Abb. 26: a) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 2), b) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 4), c) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 7), d) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 9).....	58
Abb. 27: Zelluläre Samenbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 11).....	58
Abb. 28: a) Bildung einer Plasmid-Bande im unterem Drittel des Gradienten (V Ti 65.1, Beckman Coulter) nach einer Zentrifugation für 24 h bei 20 °C für 53.000 g und b) Bildung einer Bande im unterem Drittel des Gradienten (V Ti 65.1, Beckman Coulter) nach einer Zentrifugation für 24 h bei 20 °C für 53.000 g. Zusätzlich Ausbildung eines Niederschlages, der sich von der Wand des Zentrifugenröhrchens ablöst (schwarzer Streifen).....	60
Abb. 29: Elektropherogramm der ersten Sequenzierung der Probe Franquette 01 mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 2.196 bp. Beinhaltet zwei Größenmarker mit 35 bp (grün) und 10380 bp (lila).....	62
Abb. 30: Elektropherogramm der ersten Sequenzierung der Probe Franquette 02 mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 587bp. Beinhaltet zwei Größenmarker mit 35 bp (grün) und 10380 bp (lila).....	62
Abb. 31: a) <i>Cluster Density</i> der Sequenzierung, b) Auslastung der <i>Flow Cell</i> wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis <i>Cluster Density</i> und <i>Cluster Passing Filter</i> .....	63
Abb. 32: : a) <i>Cluster Density</i> der Sequenzierung, b) Auslastung der <i>Flow Cell</i> wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis <i>Cluster Density</i> und <i>Cluster Passing Filter</i> .....	64
Abb. 33:a) <i>Cluster Density</i> der Sequenzierung, b) Auslastung der <i>Flow Cell</i> wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis <i>Cluster Density</i> und <i>Cluster Passing Filter</i> .....	65
Abb. 34: a) <i>Cluster Density</i> der Sequenzierung, b) Auslastung der <i>Flow Cell</i> wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis <i>Cluster Density</i> und <i>Cluster Passing Filter</i> .....	65
Abb. 35: a) <i>Cluster Density</i> der Sequenzierung, b) Auslastung der <i>Flow Cell</i> wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis <i>Cluster Density</i> und <i>Cluster Passing Filter</i> .....	66
Abb. 36: Schematischer Ablauf der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse.....	68
Abb. 37: a) Genabschnitt WRKY (100 bp) mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben mit der optimierten Annealing-Temperatur.....	71
Abb. 38: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes WRKY mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung.....	72
Abb. 39: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes ADH1 (1.600 bp) mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung.....	72
Abb. 40: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes ADH2 (1.300 bp) mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung.....	72

Abb. 41: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes FAD <sub>2.1</sub> (700 bp) mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung. ....	72
Abb. 42: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes FAD <sub>2.2</sub> (700 bp) mit M (Marker) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung. ....	73
Abb. 43: Übertragung der Parameter des Genabschnittes FAD <sub>2.2</sub> mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben auf das Walnussperikarp. ....	74
Abb. 44: Differenzierung der authentischen Walnussorten anhand der detektierten SNPs. ....	79
Abb. 45: Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung, mit Absicherung der Coverage in einem Ampelfarben-Code, a) Die Sorte Fernor an der signifikanten Stelle mit der Base Adenin, b) Die Sorte Vina an der entsprechenden Stelle mit einem Guanin. ....	82
Abb. 46: Variation der Bandenmuster in Abhängigkeit des gewählten Primers a) S 32 und b) OPA 08. In beiden Abbildungen befindet sich auf der linken Spur der Marker. ....	88
Abb. 47: a) Der Primer ROTH-A16 mit einer zu hohen Spezifität, b) Der Primer OPF 10 mit einer zu niedrigen Spezifität. In beiden Abbildungen befindet sich auf der linken Spur der Marker. ....	88
Abb. 48: Vergleich verschiedener Primer-Volumina: a) 0,7 µL und b) 0,5 µL. ....	89
Abb. 49: Vergleich verschiedener Polymerase-Volumina: a) 0,1 µL und b) 0,05 µL. ....	90
Abb. 50: Vergleich verschiedener Template-Volumina: a) 1 µL und b) 0,5 µL. ....	91
Abb. 51: Vergleich der RAPD-PCR mit ROTH-A01 (Primer): a) Blatt-DNA und b) Perikarp-DNA. ....	93
Abb. 52: Elektropherogramm mit den Farbstoffen HEX (grün), FAM-6 (blau) und ATTO 565 (rot), welche jeweils eine separate Probe darstellen. Hierbei zeigt sich eine ausreichende Abtrennung, da keine Signalüberlagerung zwischen den einzelnen Proben auftrat. ....	95
Abb. 53: Darstellung von Stotterbanden und die Plus-A-Veränderung nach dem intensivsten Peak in einem Elektropherogramm. ....	97
Abb. 54: Fließschema zur Differenzierung der authentischen Walnussorten anhand von Blattmaterial und Walnussperikarp mit Hilfe der SSR-Analyse. ....	98
Abb. 55: Schematischer Ablauf der DNA-Isolierung mittels VWR peqGold Plant DNA Mini-Kit. ....	104
Abb. 56: Schematischer Ablauf der DNA-Isolierung nach der Methode von Brüning <i>et al.</i> (2011). ....	105
Abb. 57: Schematischer Ablauf der DNA-Isolierung nach der Methode von Akkak <i>et al.</i> (2008). ....	107
Abb. 58: Schematischer Ablauf der DNA-Isolierung nach Doyle (1991). ....	108
Abb. 59: Schematische Durchführung der DNA-Isolierung nach Asif und Cannon (2005). ....	110
Abb. 60: Schematische Durchführung der DNA-Isolierung nach Jiao <i>et al.</i> (2012). ....	111
Abb. 61: Schematische Durchführung der DNA-Isolierung nach Vieira <i>et al.</i> (2014). ....	116
Abb. 62: Schematische Durchführung der DNA-Isolierung nach Chaudhary <i>et al.</i> (2015). ....	117
Abb. 63: a) Mikrobielle Besiedlung der ungereinigten Walnusschale, b) Mikrobielle Besiedlung der gereinigten Walnusschale mit 70 %igem Ethanol. ....	166
Abb. 64: a) Luftkeimgehalt im Labor nach 60 min. b) Luftkeimgehalt im Labor nach 120 min. ....	166
Abb. 65: a) Mikrobielle Besiedlung des Reinstwassers, b) Mikrobielle Besiedlung der ungereinigten Arbeitsfläche im Aufarbeitungsraum nach 3 Tagen Inkubation (Beschriftung inkorrekt). ....	167
Abb. 66: Größenstandard des peqGOLD DNA Ladders für die Agarosegelelektrophorese. ....	177
Abb. 67: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 1 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial. ....	177
Abb. 68: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 3 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial. ....	178
Abb. 69: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 3 mit den optimierten Parametern für das Walnussperikarp. ....	178
Abb. 70: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 5 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial. ....	178
Abb. 71: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 9 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial, mit a und b für die erste und c und d für die zweite Analyse. ....	179
Abb. 72: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 11 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial. ....	179
Abb. 73: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 11 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial. ....	179

Abb. 74: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 11 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial. ....	180
Abb. 75: Visualisierung der ARMS-PCR der ersten authentischen Blattproben der Mutante, die Beschriftung befindet sich im Kapitel 10.5.3 in Tabelle 91. ....	180
Abb. 76: Visualisierung der ARMS-PCR der zweiten authentischen Blattproben der Mutante. ....	180
Abb. 77: Wiederholung der ARMS-PCR zur besseren Differenzierung der Sorten Vina, Chandler, Fernette, Serr und Broadview. ....	180
Abb. 78: Wiederholung der ARMS-PCR Wiederholung zur besseren Differenzierung der Sorten Fernette und Serr. ....	180
Abb. 79: Visualisierung der ARMS-PCR des authentischen Walnussperikarps der Mutante.....	181
Abb. 80: Wiederholung der ARMS-PCR Wiederholung zur besseren Differenzierung der Sorten Fernette und Serr. ....	181
Abb. 81: Visualisierung der ARMS-PCR der ersten authentischen Blattproben des Wildtypes, die Beschriftung befindet sich im Kapitel 10.5.3 in Tabelle 91. ....	181
Abb. 82: Visualisierung der ARMS-PCR der zweiten authentischen Blattproben des Wildtypes. ....	181
Abb. 83: Wiederholung der ARMS-PCR Wiederholung zur besseren Differenzierung der Sorten Fernette und Serr. ....	181
Abb. 84: Visualisierung der ARMS-PCR des authentischen Walnussperikarps der Mutante.....	181
Abb. 85: Wiederholung der ARMS-PCR Wiederholung zur besseren Differenzierung der Sorten Serr, Fernette und Lara.....	181
Abb. 86: Fließschema zur Bestimmung der authentischen Sorten anhand des Blattmaterials. ....	187
Abb. 87: Fließschema zur Bestimmung der authentischen Sorten anhand des Walnussperikarps.....	188
Abb. 88: Agarosegel Fernor Blattprobe FE-01-02082017 (Positionen siehe Tabelle 106). ....	190
Abb. 89: Agarosegel Fernor Samenprobe 17-FR-027-FE-WG (Positionen siehe Tabelle 106).....	190

## Zusammenfassung

Im Zuge dieser Forschungsarbeit sollte zur Authentizitätsbestimmung von 12 Sorten der Spezies *Juglans regia* molekularbiologische Methoden entwickelt werden, die entweder sequenzbasiert waren oder auf *non-targeted* Strategien beruhten. Da der Same aus dem maternalen Erbgut der Mutter (der ortsdefinierte Walnussbaum) und dem paternalen Erbgut des Pollens (Vater, von verschiedenen anderen, variablen Walnussbäumen) gebildet wird, lässt sich auf Basis der darin enthaltenen Kern-DNA keine Sortendifferenzierung abbilden. Als Alternative wurden rein maternales Gewebe bzw. ausschließlich von der Mutter stammende DNA ausgewählt. Hierzu zählen Blätter, das Perikarp sowie die Chloroplasten und ihre darin enthaltene plastidäre DNA.

Zu Beginn wurden DNA-Isolierungsmethoden entwickelt, um eine angemessene DNA-Qualität und -Quantität zu ermöglichen. Hierbei wurde erfolgreich für das Blatt- und Perikarpmaterial eine DNA-Isolierungsmethode etabliert. Auch eine Anreicherung der Chloroplasten und damit einhergehend eine Erhöhung der plastidären DNA-Konzentration im Vergleich zur ebenfalls vorhandenen Kern-DNA wurde im Zuge der Methodenentwicklung versucht. Hierfür wurden unterschiedliche isopyknische Zentrifugationen und Gradienten, bspw. ein Cäsiumchlorid-Gradient zur Aufreinigung der plastidären DNA aus den Chloroplasten, getestet. Die gewählten Verfahren waren allerdings für die vorliegende Problemstellung zu ineffizient, d.h. eine Anreicherung der Chloroplasten und damit der plastidären DNA konnte damit nicht erzielt werden. Am Ende des Optimierungsprozesses konnte jedoch für eine Sequenzierung qualitativ und quantitativ geeignete plastidäre DNA isoliert werden. Aus den mittels NGS erhaltenen Datensätzen konnten die vollständigen Plastidengenome von insgesamt 12 unterschiedlichen Walnussorten assembliert werden. Überraschenderweise wiesen alle untersuchten Genome mit einer Länge von ca. 160 kbp die identische Sequenz auf, was auf ein sehr enges Verwandtschaftsverhältnis zurückzuführen ist. Erklärbar ist dieser Befund dadurch, dass alle untersuchten Sorten offensichtlich von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen.

Nachdem eine Differenzierung von nahverwandten Sorten auf Basis der Plastidengenome nicht möglich ist und damit auch eine Sortendifferenzierung bei ausschließlichem Vorliegen der Walnusskerne (da biparental) ausscheidet, konzentrierte sich die weitere Arbeit auf Walnüsse, die in der Schale vermarktet werden. Im Fall der Walnuss stammt die Schale ursprünglich aus dem Blütengewebe, welches einen diploiden Chromosomensatz ausschließlich der Mutter enthält. In diesem Fall kann das Kerngenom zur Unterscheidung von Walnuss-Sorten herangezogen werden. Es wurden vier Genabschnitten des maternalen, nukleären Genoms sequenziert, verglichen und Unterschiede (SNPs) identifiziert. Daraus resultierten sequenzbasierte Methoden, in Form einer ARMS- und RFLP-PCR.

Ebenso wurden *non-targeted Fingerprinting*-Strategien entwickelt, wozu die Mikrosatelliten-Analyse und die RAPD-PCR gehörten. Dadurch stehen der Routineanalytik mehrere Methoden zur Sortendifferenzierung von Walnüssen in der Schale zur Verfügung.

## Abstract

The present research work includes molecular biological methods, which were developed to determine the authenticity of 12 varieties of the species *Juglans regia*, which were sequence-based or non-targeted strategies. Since the seed is formed from the maternal genome of the mother (the location-defined walnut tree) and the paternal genome of the pollen (father, from various other variable walnut trees), no variety differentiation can be done based on the nuclear DNA it contains. As an alternative, pure maternal tissue or DNA derived exclusively from the mother was selected. These include leaves, the pericarp, and the chloroplasts and their plastidary DNA contained therein.

At the beginning, appropriate DNA isolation methods had to be developed to allow adequate DNA quality and quantity. Furthermore, a chloroplast enrichment and associated increase in plastidary DNA concentration relative to the also present nuclear DNA was attempted during method development. For this purpose, different isopycnic centrifugations and gradients, e.g. a cesium chloride gradient for the purification of plastidary DNA from chloroplasts, were tested. However, the chosen methods were inefficient for the problem at hand, i.e. enrichment of chloroplasts and their plastidary DNA could not be achieved with them. However, at the end of the optimization process, plastidary DNA suitable for sequencing could be isolated qualitatively and quantitatively. From the datasets obtained by NGS, the complete plastid genomes of a total of 12 different walnut cultivars could be assembled. Surprisingly, all the studied genomes had the identical sequence with a length of about 160 kbp, which can be attributed to a very close relationship. This finding can be explained by the fact that all the studied varieties obviously descended from a common ancestor.

Since a differentiation of closely related cultivars based on plastid genomes is not possible and thus a cultivar differentiation in the exclusive walnut kernels (since biparental) is ruled out, further work focused on walnuts market in the shell. In the case of the walnut, the shell originates from the floral tissue, which contains a diploid set of chromosomes exclusively from the mother. Therefore, the nuclear genome can be used to differentiate walnut varieties. Four gene segments of the maternal, nuclear genome were sequenced, compared and differences (SNPs) identified. This resulted in sequence-based methods, in the form of ARMS- and RFLP-PCR.

Non-targeted fingerprinting strategies were also developed, including microsatellite analysis and RAPD-PCR. This allows the routine analysis to use several methods for variety differentiation and authentication for walnuts in the shell.

## 1. Einleitung

Die Sicherstellung der Authentizität von Lebensmitteln ist aus Verbrauchersicht von außerordentlicher Bedeutung. Das Bewusstsein der Verbraucher für die klimatischen und ökonomischen Auswirkungen hat einen signifikanten Einfluss auf ihr Kaufverhalten. Dadurch sind sie bereit, einen höheren Preis für Produkte zu zahlen, die bestimmte Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise eine spezifische Herkunft, Sorte oder Bio-Qualität. Zusätzlich sind Verbraucher bereit, den Mehrwert von Produkten anzuerkennen, die eine nachhaltige Herkunft, umweltfreundliche Produktionsverfahren oder soziale Verantwortung verkörpern. Zudem ist es im Sinne der produzierenden und verarbeitenden Unternehmen Qualitätseigenschaften zu sichern, um ihren Ruf zu wahren. Aufgrund der globalen Rohstoffbeschaffungsketten wächst allerdings die berechtigte Sorge vor Produktfälschung (*Food Fraud*). Dabei umfasst *Food Fraud* eine vorsätzliche Falschetikettierung von Billig- zu Premiumprodukten oder der Zusatz von anderen Rohstoffen, die im negativsten Fall eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers bewirken. Gerade vor diesem Hintergrund ist es wichtig, leistungsfähige Methoden zum Nachweis der ausgelobten Spezifikation zur Verfügung zu haben (Felbinger et al. 2015). Durch die Medien und die wiederkehrenden Lebensmittelskandale wurde das Vertrauen der Verbraucher oftmals erschüttert. Eines der größten Verfälschungen erfolgte 1985 bei der Streckung von Wein mit Glykol, um die Süße nachträglich zu maximieren und zeigte die Notwendigkeit der Einführung einer staatlichen Überwachungsbehörde.

Die Walnuss, auch unter den Namen königliche Nuss bekannt, gehört zu den am meisten verzehrten Nüssen in Deutschland. In den letzten Jahren stieg der Konsum stetig an. Dies begründet sich unter anderem mit der positiven Verbrauchersicht auf die enthaltenen essenziellen Fettsäuren. Die Walnuss wird mit einer Verbesserung des Gedächtnisses und einer Senkung des LDL-Wertes assoziiert (Bamberger et al. 2017; Muthaiyah et al. 2014). Hierbei existieren diverse Sorten, die unterschiedliche Ansprüche an Umweltbedingungen besitzen, sodass eine geeignete Auswahl durch den Plantagenbesitzer getroffen werden muss. Zudem blühen die männlichen und weiblichen Blüten zeitversetzt, weshalb andere Bestäubersorten eingesetzt werden, um den Ertrag zu maximieren. Darüber hinaus werden Walnüsse nicht in Billig- oder Premiumsorten eingeteilt, sondern es werden wirtschaftlich relevante Eigenschaften berücksichtigt, wie zum Beispiel die Schalendicke, die Kernfarbe oder der Geschmack. Diese Merkmale spielen eine wichtige Rolle bei der Bestimmung des wirtschaftlichen Werts und der Vermarktung von Walnüssen. Durch Identifikation der dafür zugrundeliegenden Gene können gezielte Züchtungen vorgenommen werden ohne jahrelange Kreuzungsversuche durchführen zu müssen. Aus den genannten Gründen liegt der Fokus dieser Forschungsarbeit auf der Entwicklung von molekularbiologischen Methoden zur Sortendifferenzierung und Authentizitätsverifizierung. Zusätzlich wird das Chloroplasten-Genom sequenziert und eine genetische Analyse hinsichtlich Mutationen zwischen den einzelnen Sorten

vorgenommen. Die Entschlüsselung der genetischen Vielfalt und Struktur der Gene kann zu einer Effizienzsteigerung in der Walnusszucht führen.

## 2. Grundlagen

Die Echte oder auch Persische Walnuss *Juglans regia* L. gehört zur Familie der Juglandaceae und zur Gattung *Juglans*, die 21 Arten umfasst (Topcu et al. 2015; Ebrahimi et al. 2019). Das Interesse der Lebensmittelindustrie konzentriert sich allerdings auf die Art *J. regia*, die anderen Spezies sind lediglich für ihr qualitativ hochwertiges Holz von Interesse (Chen et al. 2014; Bernard et al. 2018b).

### 2.1 Die Walnuss

#### 2.1.1 Evolutionäre Migration

Der Vorfahre der Gattung *Juglans* befindet sich in Nord-Amerika und wird auf 48 bis 38 Millionen Jahre datiert. Über die Beringstraße erfolgte die Migration nach Asien und Europa, wo die Ansiedlung vor 12 bis 5 Millionen Jahre stattfand (Bernard et al. 2018b). Die Entwicklung der Arten begann vor ca. 40 Millionen Jahren, beginnend mit den Hauptgruppen *Rhysocaryon*, *Cardiocaryon* und *Disocaryon*, wobei letztere die Art *J. regia* hervorbrachte (Aradhya et al. 2005; Bernard et al. 2018a; Ipek et al. 2019). Diese war in Europa und Asien beheimatet, allerdings dezimierte die letzte glaziale Periode (vor ca. 50.000 Jahren) einen Großteil der Population (Küster 2008; Wang et al. 2015). Es wird davon ausgegangen, dass in Zentralasien vereinzelt Populationen überlebten und von da aus eine Expansion stattfand. Jüngste Studien berichten jedoch von der Existenz europäischer Populationen, die die Eiszeit überdauerten und daraufhin eine genetische Neukombination mit asiatischen Populationen eingingen (Aas 2008). Hierbei erfolgte die Expansion in Europa durch bestehende isolierte Populationen in Verbindung mit der Verbreitung von asiatischen Populationen über die alten Handelsrouten der Menschen (Pollegioni 2017). Dies wurde durch die Domestikation des Menschen beschleunigt (Roor et al. 2017; Martínez-García et al. 2016). Dabei gelang die Walnuss durch die Perser nach Griechenland, wo die Römer sie unter Alexander dem Großen weiter in Europa verbreiteten (Bernard et al. 2018b; Goodell 1983; Küster 2008). Nach Entdeckung von Nord-Amerika und der anschließenden Besiedlung im 16. Jahrhundert wurde die Persische Walnuss auf diesem Kontinent etabliert. In Europa wurde der Anbau von Walnussbäumen durch Kaiserin Maria Theresa im 18. Jahrhundert gefördert. Sie gab die Order, an jedem Hof einen Nussbaum anzupflanzen (Roloff 2008). Somit ist eine Rekonstruktion der Evolutionsgeschichte noch nicht vollständig abgeschlossen.

### 2.1.2 Botanische Klassifizierung und Karyogamie

#### 2.1.2.1 Der Walnussbaum

Der Walnussbaum wächst hauptsächlich in der gemäßigten Klimazone und kann eine Höhe von bis zu 30 m erreichen. Allerdings wird die Wuchshöhe auf Plantagen auf 4 bis 5 m begrenzt, um die Ernte zu erleichtern und den Ertrag zu maximieren (Lieberei und Reisdorff 2012; Aas 2008; Zhao et al. 2018). Die Pflanze ist monözisch, wobei die männlichen Kätzchen zeitlich vor den weiblichen Blüten (s. Abbildung 1) blühen (Dichogamie), sodass auf den Plantagen andere Walnussorten als Bestäuberpflanze eingesetzt werden (Jacob 2008; Zhang et al. 2013; Bernard et al. 2018a). Hierbei erfolgt eine Anemophilie der Megasporophylle der weiblichen Blüte (Bernard et al. 2018b; Goodell 1983). Die Ernte der Walnüsse findet von September bis November statt. Dabei variiert die Blüte- und Erntezeit je nach eingesetzter Sorte (Bernard et al. 2018b).

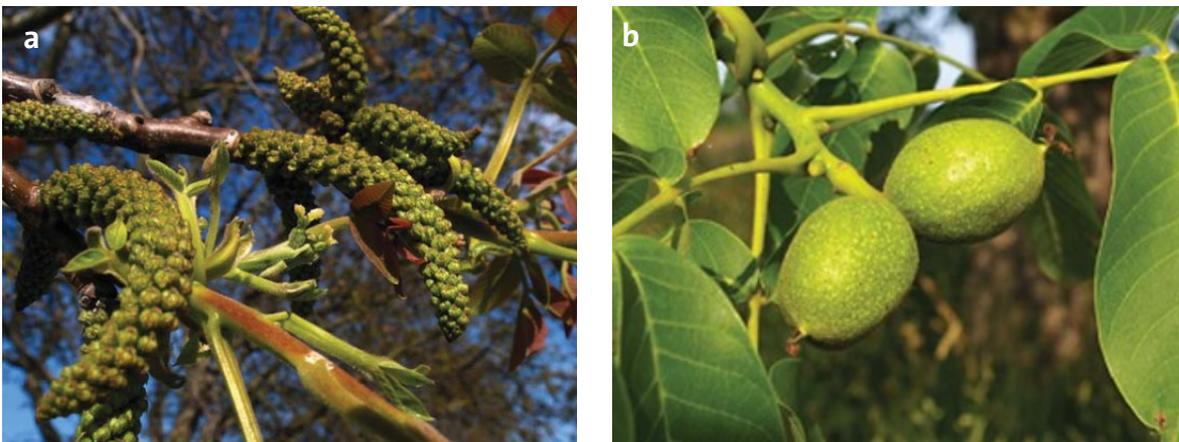


Abb. 1: (a) Männliche Kätzchen mit weiblichen Blüten, (b) Reifende Walnussfrucht (Roloff 2008).

Nur veredelte, gepfropfte Walnüsse tragen ab dem fünften Lebensjahr bereits Früchte, bei Sämlingen/Wildtypen kann sich die erste Ernte um bis zu 10 Jahre verzögern (Goodell 1983). Für die Veredlung wird als Unterlage *J. regia* oder *Juglans nigra* verwendet. Hierbei wird ein Zweig vom Mutterbaum (Edelreiser) von der gewünschten Sorte entfernt und mit der Unterlage verbunden. Somit bleibt die Sortenreinheit gewahrt und es entstehen genetische Klone des Mutterbaums (Gandev 2007).

#### 2.1.2.2 Definition der Nuss und die doppelte Befruchtung

Bei der Walnuss handelt es sich um eine echte Nuss, bis vor einigen Jahren wurde sie vermeintlich als Steinfrucht klassifiziert. Der Begriff „Nuss“ wird verwendet, wenn alle drei Schichten der früheren Fruchtwand (Perikarp), verholzt sind. Bei einer Steinfrucht ist nur die innerste Schicht verholzt (Endokarp), die mittlere Schicht (Mesokarp) ist fleischig, umgeben von einer ledernen Haut (Exokarp). Durch wissenschaftliche Analysen konnte belegt werden, dass es sich bei dem grünen Hüllorgan um eine Blattmorphologie und keinen unterständigen Fruchtknoten der Blüte handelt. Somit besteht die

Walnuss aus einem vollständig verholzten Perikarp (siehe Abbildung 2) und zählt damit zu den echten Nüssen (Roloff 2008; Lieberei und Reisdorff 2012; Aas 2008).

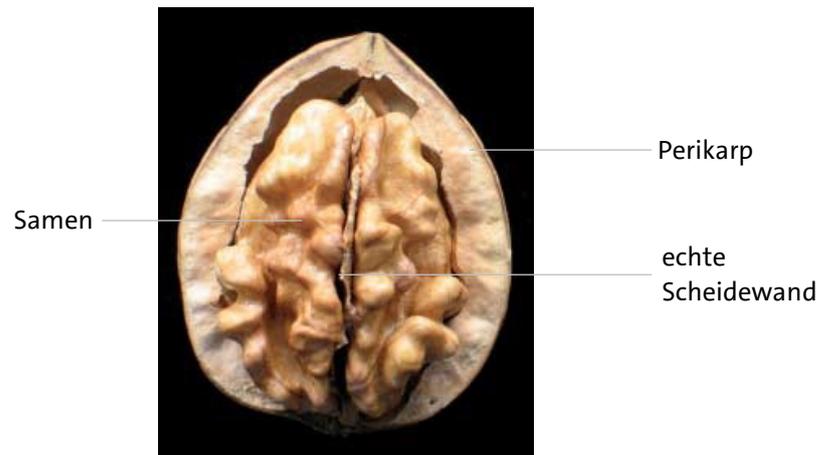


Abb. 2: Samen mit Schale (Lieberei und Reisdorff 2012).

*J. regia* gehört zu den Angiospermen und durchläuft eine doppelte Befruchtung für die Entwicklung der Nuss. Dabei gelangen die Pollen auf die Narbe des Fruchtknotens. Es bildet sich ein Pollenschlauch aus, der bis zum Embryosack wächst und beide Spermazellen freigibt. Die Befruchtung der Eizelle erfolgt durch eine der beiden Spermazellen und bildet die Zygote, sodass eine Neukombination des paternalen und maternalen Erbgutes stattfindet. Die zweite Spermazelle befruchtet die zwei Synergiden (Hilfzellen des Embryosacks aus dem weiblichen Gametophyten), woraus sich das triploide, sekundäre Endosperm (Nährgewebe) entwickelt. Somit besitzt der essbare Teil der Walnuss (Samen) einen diploiden Kern (32 Chromosomen) aus maternalen und paternalen Merkmalen. Die Walnussschale (Perikarp) entwickelt sich hingegen aus der Fruchtwand der Blüte und der diploide Chromosomensatz enthält nur das maternale Erbgut (s. Abbildung 3) (Lieberei und Reisdorff 2012; Russell 1992; Raghavan 2003).

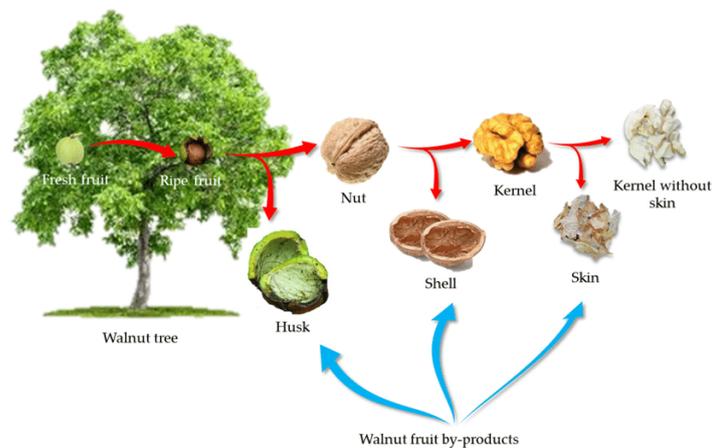


Abb. 3: Differenzierung der einzelnen Bestandteile der Walnussfrucht (Jahanban-Esfahlan et al. 2019).

### 2.1.2.3 Sorten der Art *J. regia*

*J. regia* ist die einzige Art der Gattung *Juglans* aus der Familie der Juglandaceae, die ökonomisch Verwendung findet und auch als königliche Nuss bezeichnet wird (lat. *regia* = königlich). Weltweit existieren über 200 verschiedene Walnussorten dieser Art (Bernard et al. 2018b). Die ältesten Sorten stammen aus Frankreich, unter anderem Franquette, die 1786 als Zufallssämling im Department Isère entstand. Sie besitzt einen aromatischen Geschmack und die Blatt- und Blütenbildung setzt im Vergleich zu anderen Walnussorten relativ spät ein, sodass Spätfröste nicht zu Erntenausfällen führen (Szalatnay et al. 2011; Brägger 1992). Zudem weist Franquette eine hohe Krankheitsresistenz auf, sodass sie für viele Sorten als Züchtungsgrundlage verwendet wurde (Tulecke und McGranaham 1994). Des Weiteren werden Mayette und Parisienne zu den ursprünglichen Züchtungen rubriziert (Brägger 1992). Die weltweit anerkannte Forschungseinrichtung *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA, engl.: *National Institute of Agricultural Research*) beschäftigt sich intensiv mit der Zucht von neuen Walnussorten (Bernard et al. 2018a). Zu den entwickelten Sorten (1978) gehören Fernor und Fernette, die beide eine Kreuzung zwischen Franquette und Lara darstellen (Szalatnay et al. 2011). Hierbei wurde die Sorte Lara in Frankreich aus einer Kreuzung zwischen [Hartley x Payne] mit [PI 18256 x Conway Mayette] gezüchtet, sodass verschiedene Herkünfte kombiniert wurden. Das wichtigste Züchtungsprogramm für Walnussorten wurde allerdings nicht in Frankreich durchgeführt, sondern in Kalifornien unter der Leitung von Eugene F. Serr und Harold I. Forde (Tulecke und McGranaham 1994). Als wichtigste Kreuzungsvorlage diente hierbei die Sorte Payne, diese wurde 1898 von George Payne in Santa Clara in Kalifornien domestiziert, wahrscheinlich mit einer französischen Abstammung. Das Besondere an dieser Sorte ist die Ausbildung von lateralen Blüten, wohingegen die meisten anderen Sorten eine terminale Blütenausbildung besitzen. Durch diese Eigenschaft wird der Ertrag signifikant maximiert, weshalb Payne als Grundlage für viele weitere Züchtungen diente (Bernard et al. 2018b; Tulecke und McGranaham 1994). Während des Zeitraums von 1948 bis 1978 entstanden zahlreiche, wichtige Walnussorten. Unter anderem die Sorte Chandler (1979), die heutzutage am häufigsten angebaute Sorte in Kalifornien, eine Kreuzung zwischen Pedro und 56-224, einer Walnussorte aus Afghanistan (Martínez-García et al. 2016; Tulecke und McGranaham 1994; Bernard et al. 2018b). Die Besonderheit liegt in dem hohen Ertrag, dabei entwickeln sich aus 90 % der Blüten erfolgreich Walnussfrüchte. Zudem können bereits nach 3 Jahren Walnüsse geerntet werden. Zusätzlich besitzt Chandler eine relativ große Nuss, mit einer dünnen Schale und einem hellen Kern, sodass der Verbraucher die Nüsse leichter knacken kann (Roloff 2008; Ipek et al. 2019; McGranahan und Leslie 1991). Des Weiteren entstammte aus dieser Züchtung die Zwillingssorte Howard. Dabei wurde die Mutterpflanze Pedro 1968 vorgestellt als eine Kreuzung zwischen Payne und Conway Mayette, ein kalifornischer Hybrid der französischen Sorte Mayette. Die beiden Sorten Hartley und Vina wurden in diesem Zuchtprogramm aus französischen Sorten kultiviert. Dabei entstand Hartley (1925) aus einer Kreuzung zwischen Franquette und Mayette und Vina (1968) aus einer Kreuzung zwischen Franquette

und Payne (Bernard et al. 2018b; Tulecke und McGranaham 1994). Zudem wurde als Teil dieser Doktorarbeit eine deutsche Walnusssorte in die Analysen integriert. Bei der Geisenheim 26 handelt es sich um einen Zufallssämling aus Rüdesheim am Rhein (Küster 2008; Szalatnay et al. 2011; Brägger 1992). Zusätzlich wurde die kanadische Sorte Broadview in das Sortenspektrum aufgenommen (Goodell 1983).

Für eine übersichtliche Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse wurden zwei Abstammungsbäume erstellt, die ihren Ursprung in den Sorten Franquette und Payne aufweisen (Abb. 4 und 5).

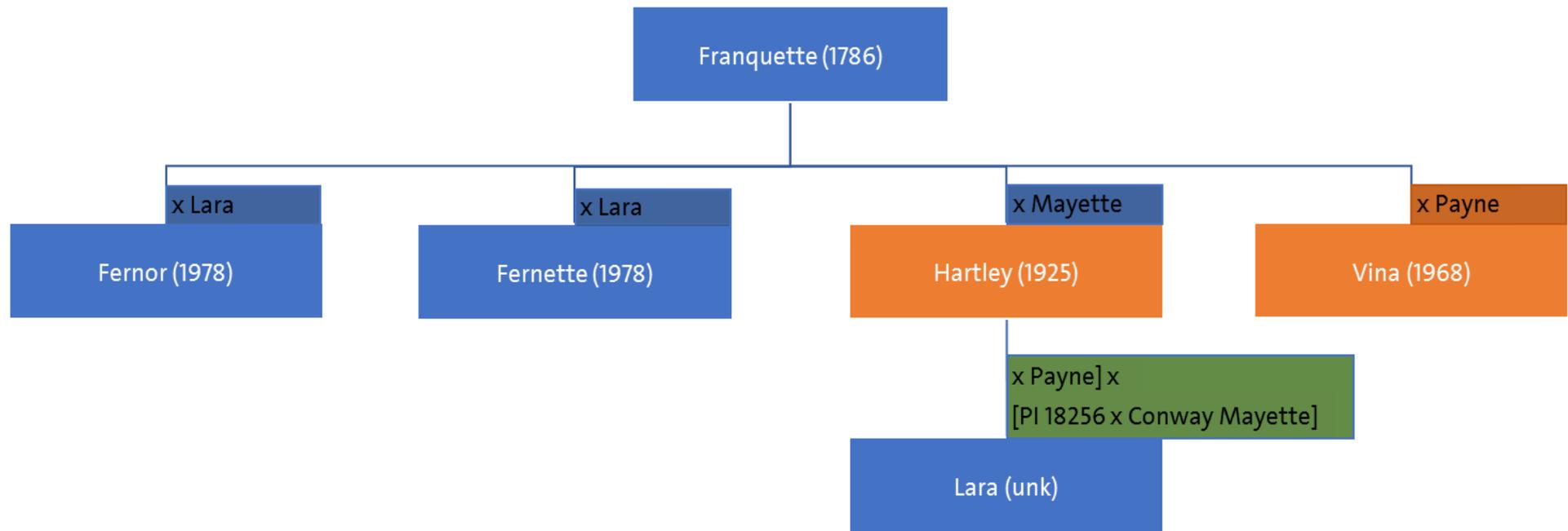


Abb. 4: Stammbaum der französischen Sorte Franquette als Basis für die Entwicklung weiterer französischer (blau) und kalifornischer (orange) Sorten, basierend auf züchterischen Kreuzungen. Die grüne Färbung repräsentiert Sorten aus unterschiedlichen Ländern. Die Jahreszahl entspricht der offiziellen Veröffentlichung. Bei der Sorte Lara ist diese unbekannt (unk) (Bernard et al. 2018b; Goodell 1983; Szalatnay et al. 2011; Tulecke und McGranaham 1994).

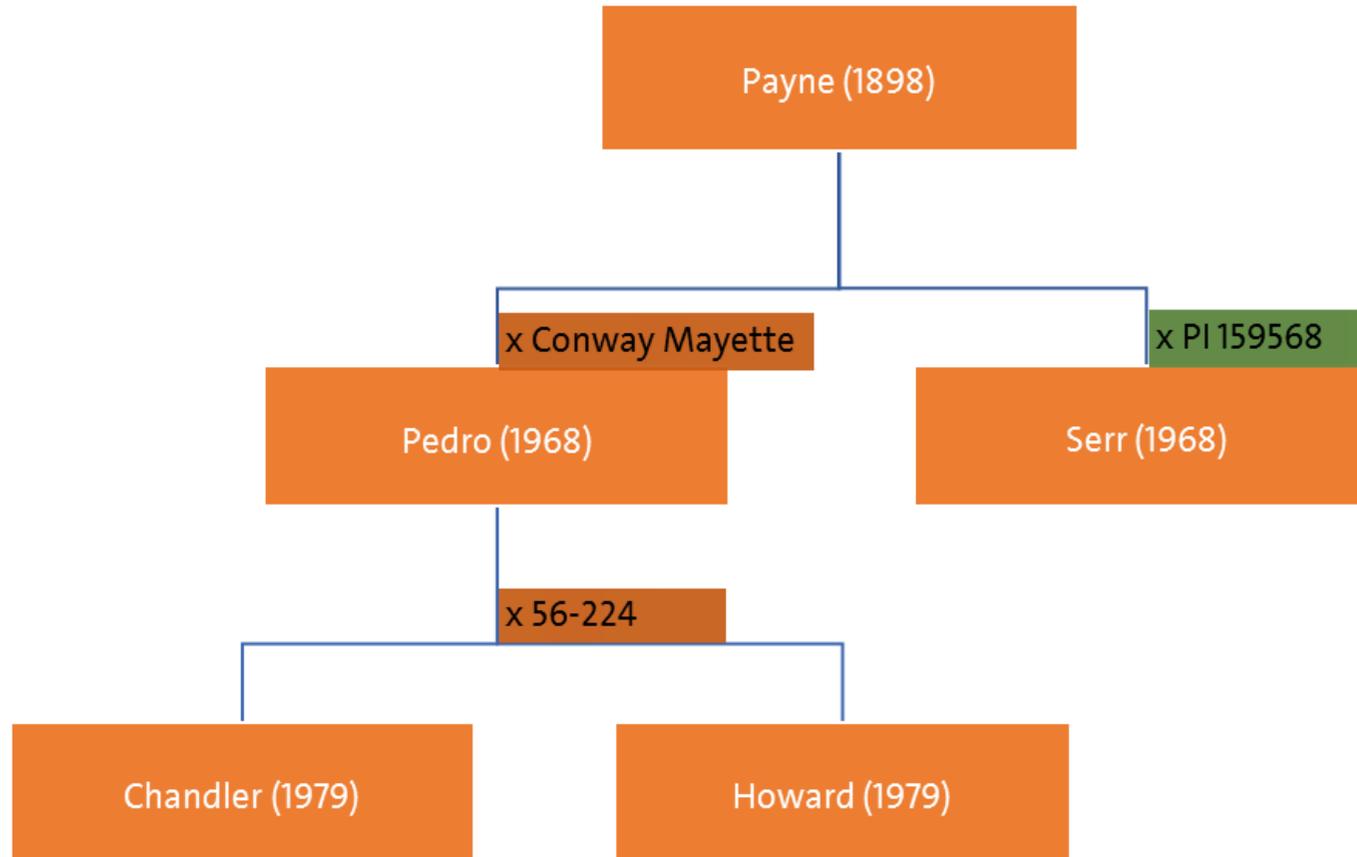


Abb. 5: Stammbaum der kalifornischen Sorte Payne als Basis für die Entwicklung weiterer kalifornischer (orange) Sorten, basierend auf züchterische Kreuzungen. Die Sorte PI 159568 (grün) stellt hierbei eine afghanische Sorte dar. Die Jahreszahl entspricht der offiziellen Veröffentlichung (Bernard et al. 2018b; Goodell 1983; Szalatnay et al. 2011; Tulecke und McGranaham 1994).

Um einen Einblick in die morphologische Gestalt der divergenten Walnussamen- und schalen zu erhalten, sind in der folgenden Abbildung die ausgewählten Walnussorten dieser Arbeit dargestellt.

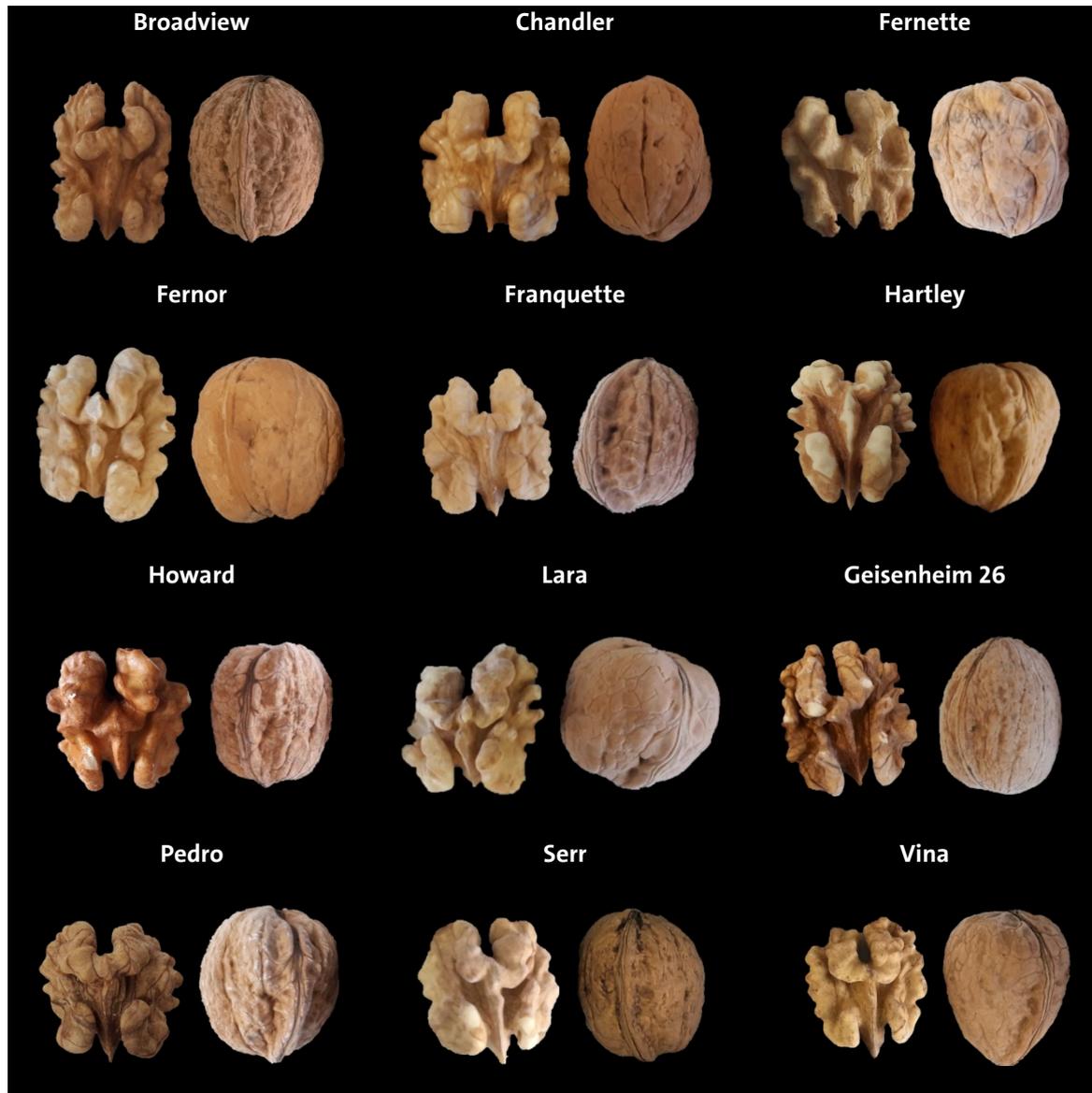


Abb. 6: Darstellung der verwendeten Walnussorten im Querschnitt von dem Samen und der Schale.

### 2.1.3 Anbauländer, Ernte und Welthandel

#### 2.1.3.1 Walnussanbau und Welthandel

Heutzutage wird die Walnuss hauptsächlich auf der Nordhalbkugel in der gemäßigten Klimazone angebaut. Hierbei sind die fünf größten Hauptanbauländer China, USA, Iran, Türkei und Ukraine (siehe Abb. 7) (Bernard et al. 2018a; Zhang et al. 2013). In den USA findet der Anbau hauptsächlich in Kalifornien statt, die Universität Davis ist führend in der Walnusszucht und der Veröffentlichung neuer Sorten. Zudem entwickelte sich Chile in den letzten Jahren als weiteres wichtiges Anbauland (Lemus

2010). In den letzten fünf Jahren lag die Preis Spanne bei 3 bis 6 USD (TRIDGE 2019). Die Preise variieren je nach Herkunftsland nicht signifikant, dabei scheint auch die Sorte keinen Einfluss zu haben.

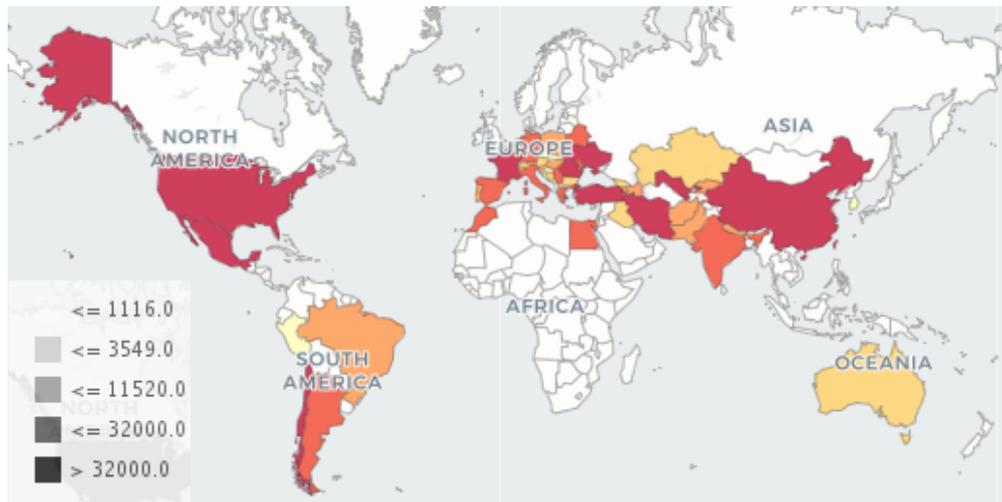


Abb. 7: Die weltweiten Anbauggebiete der Walnuss *J. regia* im Jahr 2017. Dabei repräsentieren die unterschiedlichen Farbvarianten die geerntete Walnussmenge in Tonnen (FAOSTAT 2018).

Der gesamte Weltimport lag bei 243 kt geknackten und 278 kt Walnüssen in Schale für das Jahr 2018. Deutschland ist ein Hauptimporteur für Walnüsse mit und ohne Schale. Dabei betrug die Menge an geknackten Walnüssen 41 kt und für Walnüsse mit Schale 10 kt im Jahr 2018, wobei die Tendenz in den letzten 10 Jahren steigend war. Hierbei werden besonders zur Weihnachtszeit Walnüsse in Schale angeboten, mit einem entsprechenden Hinweis auf die Sorte (FAOSTAT 2018).

### 2.1.4 Charakteristika und Verwendung der Walnuss

Die Walnuss besteht zu 60 bis 70 % aus Lipiden, wobei der Gehalt an essentieller Linolsäure 65 % beträgt und sie somit führend im Vergleich zu anderen Früchten (Haselnüsse, Mandel, Macadamia, Pistazie) führend ist (Pereira et al. 2008; Mexis et al. 2009). Als weitere wichtige essentielle Fettsäure tritt die Linolensäure mit 13 % auf, gefolgt von der Ölsäure mit 12 % (Schlörmann et al. 2016). Anhand dieser Zusammensetzung wird deutlich, dass die Walnuss ein ausgezeichnetes Fettsäureprofil besitzt. Der Proteinanteil schwankt zwischen 13 bis 19 %, der Ballaststoffgehalt zwischen 4 bis 5 % und der Gehalt an Kohlenhydraten liegt bei 3 % (Savage 2001; Stommel 2018). Durch dieses besondere Nährwertprofil empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) einen täglichen Verzehr von 25 g Nüssen (Schlörmann et al. 2016). Zudem konnte eine Vielzahl von gesundheitsfördernden Effekten bei einer walnussreichen Ernährung festgestellt werden. So wurde in tierischen Studien bereits nachgewiesen, dass Brust-, Prostata- und Dickdarmkrebs durch einen erhöhten Walnusskonsum präventiv vorgebeugt werden konnte und das Wachstum von Krebszellen reduziert wurde (Reiter et al. 2013; Tsoukas et al. 2015; Hardman und Ion 2008). Des Weiteren wurde bemerkt, dass der Gehalt an *Low Density Lipoprotein* (LDL) bei einer walnussreichen Ernährung abnahm und der Gehalt an *High*

*Density Lipoprotein* (HDL) stagnierte. Dadurch ist möglicherweise eine Verringerung des Risikos eine Herz-Kreislauf-Erkrankung zu erleiden zu erwarten (Bamberger et al. 2017). Außerdem wurde in einer weiteren Studie der Einfluss von Walnüssen auf die Alzheimer-Erkrankung untersucht. Hierbei wurde diagnostiziert, dass die Mäuse mit einer walnussreichen Ernährung ein besseres Gedächtnis, eine erhöhte Lernfähigkeit und eine feinere Bewegungskoordination besaßen. Dadurch wird die Möglichkeit abgeleitet, dass die Risiken minimiert und das Voranschreiten der Alzheimer-Erkrankung verlangsamt werden könnten (Muthaiyah et al. 2014).

Walnüsse werden in der Lebensmittelindustrie bevorzugt in Süß- und Backwaren eingesetzt (Martínez et al. 2010; Mexis et al. 2009). Zusätzlich wird ihr wertvolles Öl extrahiert, wobei 5 kg Nüsse 1 Liter Öl ergeben. Teilweise wurden in Krisenzeiten die Blätter des Walnussbaums als Tabakersatz verwendet (Roloff 2008).

## 2.2 Die DNA

### 2.2.1 DNA - Träger der Erbinformation

Die DNA ist einzigartig für jeden Organismus und Träger der genetischen Information (Heinrich et al. 2014). Hierbei befindet sich die DNA in eukaryotischen Zellen in einem separaten Nukleus umgeben von einer Doppelmembran. Sie wird auch als nukleäre DNA (ncDNA) definiert (Tamura und Hara-Nishimura 2014; Palmer 1986). Zusätzlich besitzen Eukaryotenzellen semiautonome Organellen, die Mitochondrien und Chloroplasten, die ein eigenes Genom aufweisen (Lutz et al. 2011).

Durch Mutation der DNA können sich Organismen auf veränderte Umwelteinflüsse oder bewusst durch Züchtung einstellen oder ein neuer Phänotyp ausgebildet werden. Hierbei entstanden, durch eine geänderte Subsistenzwirtschaft (sedentäre Lebensweise und Ackerbau) und ein veränderter Umgang des Menschen mit seiner Nahrung und die damit verbundene Domestikation von Pflanzen, viele neue Sorten (Peng et al. 1999). Diese weisen spezifische Eigenschaften auf, die eine optimale Anpassung an die vorherrschenden Standortbedingungen ermöglichen oder Resistenz gegen Krankheiten bieten. (Dixon 2001; Powles und Preston 2006). Damit eine eindeutige Sortendifferenzierung für die Authentizitätsbestimmung erfolgen kann, werden in der heutigen Zeit molekularbiologische Methoden herangezogen (Lockley und Bardsley 2000; Bernard et al. 2018b).

### 2.2.2 Zellaufbau einer Pflanzenzelle

Die Pflanzenzelle besteht aus spezifischen Bestandteilen, dazu gehört unter anderem der Nukleus, der von einer Doppelmembran umgeben ist und die Mitochondrien sowie Chloroplasten mit ihren Doppelmembranen (s. Abbildung 8).



Abb. 8: Schematischer Aufbau einer Pflanzenzelle mit dem Zellkern sowie den Chloroplasten und Mitochondrien. Mit Hilfe der Endosymbiontentheorie kann das Vorhandensein von Organellen mit eigenem Genom erklärt werden. Hierbei wurden phototrophe Endosymbionten von einer heterotrophen Wirtszelle aufgenommen. Als Vorläufer der Chloroplasten werden nahe Verwandte der Cyanobakterien angesehen und Mitochondrien stammen wahrscheinlich von Proteobakterien ab. Dadurch kann das

enthaltene Genom und die Doppelmembran begründet werden, weil bei der Phagocytose die äußere Membran der Wirtszelle bestehen blieb und die innere Membran aus der ursprünglichen Membran gebildet wurde. Diese These wird zusätzlich durch prokaryotische Eigenschaften der inneren Membran unterstützt sowie dem Vorhandensein von 70S- Ribosomen.

Die Mitochondrien sind für die Zellatmung verantwortlich und werden häufig als „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet. Hauptsächlich erfolgt in diesen Organellen die Synthese von ATP und NADH zur Energiegewinnung. Die Quantifizierung der Mitochondrien ist statistisch nicht determiniert, da sie auf Grund variierender Entwicklungsprozesse innerhalb von Zellen, Organen und Arten unterschiedlich ist. Diese Unterschiede resultieren aus der Exposition der Pflanze gegenüber verschiedenen Stressfaktoren. So konnte in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* bei jungen Blättern 300 Mitochondrien per Zelle identifiziert werden, wohingegen bei älteren Blättern 450 Mitochondrien pro Zelle auftraten (Preuten et al. 2010). Zudem belegten weitere Studien, dass die Anzahl der Mitochondrien eine dynamische Population darstellt und keine konkreten Aussagen dazu getroffen werden kann (Logan 2010).

In den Chloroplasten erfolgt die Photosynthese, hierbei werden aus anorganischen Molekülen organische, energiereiche Verbindungen hergestellt. Durch ihre plastidäre DNA eignen sie sich zur Sequenzanalyse, wobei im Kapitel 2.2.4 eine ausführliche Betrachtung vorgenommen wird.

### 2.2.3 Nukleäre DNA in Eukaryoten

Die DNA des Nukleus ist in Chromosomen strukturiert, bestehend aus DNA und Proteinen (Flavell 1986; Nebel 1939). Die Größe differiert zwischen 100 und 750 Mb bei den Angiospermen (Bennetzen et al. 2005), dabei dominieren repetitive Sequenzen (Flavell 1986). Somit sind die extremen Variationen der Kerngenomgröße zu erklären. Hierbei ist das Walnuss-Genom im oberen Bereich einzuordnen, durch seine Größe von 667 Mb und seinen diploiden Chromosomensatz mit 32 Chromosomen (Bernard et al. 2018a).

Die meisten Gene sind einzigartig auf dem Genom, allerdings existieren Ausnahmen. So besitzen Gene für die Ausbildung der ribosomalen DNA mehrere hunderte bis zu tausenden Kopien, die von nicht-codierenden Bereichen unterbrochen werden, den *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Diese Bereiche werden oft für DNA-Barcoding-Methoden verwendet (Hillis und Dixon 1991; Kress et al. 2005), um in den meisten Fällen für die Differenzierung auf Spezies-Ebene eingesetzt zu werden (Kress et al. 2005; Hollingsworth et al. 2009). Zu den repetitiven Sequenzen werden auch die Mikrosatelliten gezählt, nichtcodierende DNA-Sequenzen mit einer Basenlänge von zwei bis sechs Basen, diese können 10- bis 100-mal wiederholt auftreten. Die Anzahl der Wiederholungen können zwischen einzelnen Individuen variieren, sodass DNA-basierte Methoden zur Arten- oder Sortenunterscheidung etabliert werden können (Bernard et al. 2018a; Topcu et al. 2015; Ebrahimi et al. 2019).

Im Zuge dieser Forschungsarbeit wurden spezifische Genabschnitte auf mögliche Einzelbasenaustausche (SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) analysiert, die im folgenden Abschnitt definiert werden (Cronn et al. 2012).

Ein Genabschnitt repräsentiert die Alkoholdehydrogenase (ADH), dabei handelt es sich um eine zinkhaltige Oxidoreduktase. Diese ADH-Genfamilie weist mehrere Loci auf dem nukleären Genom auf, die je nach Pflanzenart eine Variabilität in ihrer Basenstruktur besitzen. Aktuell ist auf dem Karyom von *J. regia* nur ein Locus bekannt (Harry und Kimmerer 1991; Morton et al. 1996; Cronn et al. 2012).

Als weiteres Gen wurde eine Fettsäure-Desaturase (FAD) analysiert. Die spezifische Desaturase FAD<sub>2</sub> synthetisiert eine Doppelbindung zwischen dem 12. und 13. Kohlenstoff-Atom und fällt damit in die Kategorie der Acyl-CoA-Desaturasen. Auf Grund des hohen Fettanteils der Walnuss, spielen diese Enzyme eine signifikante Rolle bei der Bildung der essentiellen Fettsäuren (Dar et al. 2017; Cronn et al. 2012).

Als letztes Gen wird ein Abschnitt der pflanzenspezifischen WRKY-Transkriptionsfaktoren untersucht. Diese regulieren das Pflanzenwachstum und biotische/abiotische Stressreaktionen. Somit steigt die Mutationsrate auf Grund der notwendigen Anpassungen an variierende Klimaschwankungen und einem Selektionsdruck, der entscheidet, ob eine Mutation/Substitution erhalten bleibt. Die Proteine dieser Gen-Familie besitzen alle ein spezifisches Sequenzmotiv, die W-Box, bestehend aus den Basen TTGAC(C/T) (Yang et al. 2017; Borrone et al. 2004).

### 2.2.4 Die Chloroplasten-DNA

Chloroplasten treten nur in pflanzlichen Zellen auf und sind essenziell für die photosynthetische Lichtreaktion (Cyanobakterien besitzen einen ähnlichen Photosyntheseapparat, allerdings ist dieser nicht von einer Doppelmembran umgeben und enthält nur das Chlorophyll a). Besonders häufig treten sie in Spross- oder Blattzellen auf und entwickeln sich hierbei aus den unpigmentierten Proplastiden (Mullet 1988). Diese sind auch in dem Samen der Walnuss enthalten (Hashimoto 2003). Optisch betrachtet weisen Chloroplasten eine plankonvexe Form mit einem Durchmesser von 5 bis 10 µm auf. Dabei schwankt ihre Kopienanzahl nach Blattalter und Pflanzenspezies zwischen 10 und 100 Kopien, wobei jede einzelne ein eigenes Plastom besitzt (Baumgartner et al. 1989). Die Anzahl variiert dabei je nach Entwicklungszustand des Pflanzengewebes (Zoschke et al. 2007). Jedes Plastid enthält zwischen 10 bis 100 Kopien an doppelsträngiger DNA, sodass die Gesamtlänge bei den meisten höheren Landpflanzen zwischen 120 und 160 kb beträgt (Powikrowska et al. 2014; Mittag 2017; Sugiura 1992). In der Literatur wird häufig von einer zirkulären Form ausgegangen, allerdings beweisen neuere Forschungen, dass ein größerer Teil der Chloroplasten-DNA in linearer Form existiert und nur ein geringer Anteil zirkulär auftritt (Lilly et al. 2001). Zudem kann das Chloroplasten-Genom in 4 Abschnitte gegliedert werden (s. Abbildung 9). Die größte Region wird als *Large Single-Copy Region* (LSC)

bezeichnet, der kleinere Bereich als *Small Single-Copy Region* (SSC) und zusätzlich existieren zwei *Inverted Repeat Regions* (IR a und IR b), die zueinander umgekehrt wiederholt vorliegen. Die größten Variationen bezüglich des Chloroplasten-Genoms treten auf Grund der unterschiedlichen Länge der IR-Region auf (Sugiura 1992; Wolfe et al. 1987). Des Weiteren zeigen diese Regionen eine erhöhte Anzahl an SNPs, sodass diese besonders für molekularbasierte Methoden geeignet sind. Diese Methoden beruhen auf speziellen Markern, zum Beispiel das *matK* oder *ycfI* Gen zur Unterscheidung von Pflanzenspezies (Dong et al. 2012). Allerdings muss bei der Sortendifferenzierung die geringe Mutationsrate von  $1,0-3,0 \times 10^{-9}$  Basen/Jahr berücksichtigt werden, sodass eine Analyse auf Intraspezies-Ebene eine zu geringe Variabilität aufzeigen kann (Wolfe et al. 1987). Außerdem weisen Pflanzen ein anderes Mutationsverhältnis als tierische Organismen auf, so besitzt das Mitochondrien-Genom nur 1/300 der Variabilität im Vergleich zum tierischen Mitochondrien-Genom, welches häufig als Grundlage für molekularbiologische Methoden herangezogen wird (Whittall et al. 2010; Drouin et al. 2008). Wird das allgemeine Mutationsverhältnis der einzelnen DNA-Arten in der Pflanzenzelle berücksichtigt, so ergibt sich folgendes Verhältnis: 1:3:16 (mitochondriale:chloroplasten:nukleäre DNA) (Drouin et al. 2008).

Anhand der Tabelle 1 wird das Verhältnis von dem prozentualen Anteil des Chloroplasten-Genoms zum Gesamtgenom dargestellt, um die Notwendigkeit einer Anreicherung darzulegen.

Tab. 1: Auflistung der Zusammensetzung und Kopienzahl des Chloroplasten-Genoms und dessen Verhältnis zum Gesamt-Genom von *J. regia* auf hypothetischer Basis.

	Geringster geschätzter Anteil des Cp-Genomes	Höchster geschätzter Anteil des Cp-Genomes
Chloroplasten pro Zelle	10	100
Kopien des Cp-Genomes in einer Cp-Zelle	10	100
Größe des Cp-Genoms	160.000	160.000
Gesamte Cp-DNA in einer Zelle	16.000.000	1.600.000.000
Größe des Gesamtgenoms	667.000.000	667.000.000
Prozentualer Anteil der Cp-DNA zum Gesamtgenom	2,4 %	240 %

Durch ein analoges Forschungsprojekt bezüglich der Haselnuss, ist ein Verhältnis von 2 bis 10 % wahrscheinlich, da oftmals keine jungen, frischen Blätter zur Verfügung standen.

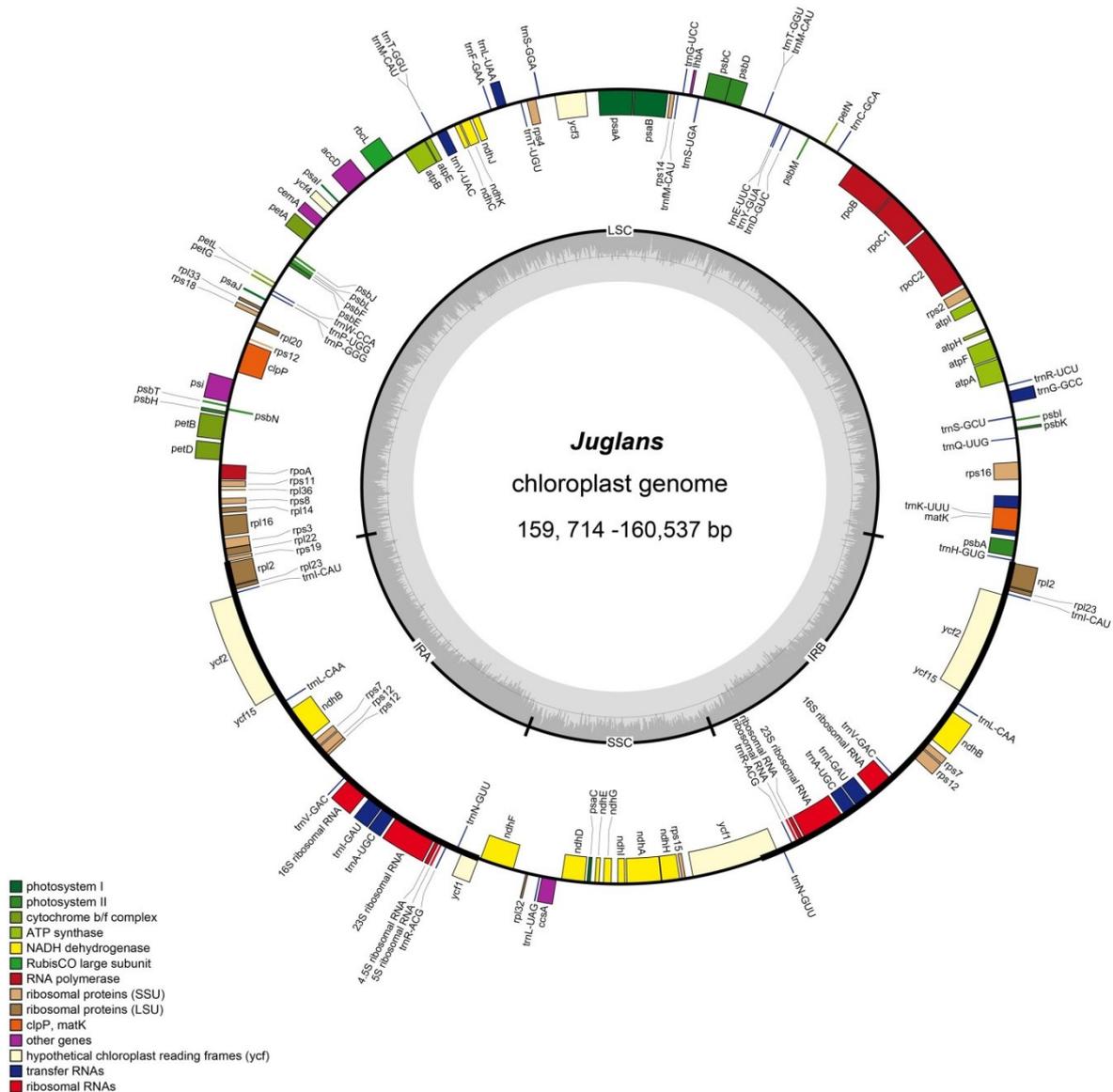


Abb. 9: Genkarte des Chloroplasten-Genoms der Gattung *Juglans* (Dong et al. 2017).

### 2.2.5 Maternale und paternale Vererbung

Die nukleäre DNA des Samens der Walnuss stellt immer eine Kombination aus paternaler und maternaler DNA dar, durch die Verschmelzung von Ei- und Spermazelle (s. Abschnitt 2.1.2.2). Zudem befinden sich im Samen Chloroplasten-Anlagen (Proplastide) und Mitochondrien. Bei den Angiospermen werden 80 % der Chloroplasten maternal vererbt, der restliche Anteil wird entweder rein paternal vererbt oder es kommt zu einer Aufteilung von maternalen und paternalen Chloroplasten in der Pflanze, dies tritt zum Beispiel bei *Pelargonium zonale* auf (Birky 2008; Dong et al. 2012). Die Ursache liegt in dem Aufbau der Pollen-DNA, je nach Pflanzenart besitzen diese neben der nukleären DNA auch Chloroplasten-DNA, die bei der Fertilisation vererbt werden kann. Mitochondrien werden in den Angiospermen fast ausschließlich maternal vererbt. Aus diesem Grund ist der Samen für die

molekularbiologischen Analysen zur Sortendifferenzierung nicht nutzbar. Lediglich die mutmaßlichen maternalen Chloroplasten können für diese Fragestellung analysiert werden.

Die nukleäre DNA der Walnussblätter und der Nussschale sind rein maternal, da die Schale aus dem maternalen Fruchtknoten gebildet wird und eignen sich somit für molekularbiologische Methoden zur Sortendifferenzierung.

### 2.2.6 Sequenzen von *J. regia*

Das nukleäre Genom wurde unter der Federführung der Universität Davis sequenziert, dafür wurde die Kooperation „The Walnut Genomics Implementation Group“ (WGIG) gegründet. Durch die Zusammenarbeit gelang es 2015 das komplette Karyom zu sequenzieren. Das gesamte Genom besitzt eine Größe von 667 Mb (Martínez-García et al. 2016). Die Accession Nummer lautet LIHL01000000, wobei die 5172 Scaffolds zusätzlich bei National Center for Biotechnology Information (NCBI) veröffentlicht wurden.

Es existieren 5 Datenbank-Einträge (NCBI) bezüglich des Chloroplasten-Genoms (Stand Mai 2021), von drei unterschiedlichen Quellen, wobei keine spezifische Sorte untersucht wurde. Für diese Forschungsarbeit wurde als Referenzgenom die NCBI-Accession Nummer KT963008 verwendet. In deren Studie wurden fünf Chloroplasten-Genome der unterschiedlichen *Juglans* Arten sequenziert (Hu et al. 2016). In einer weiteren Publikation wurden die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der *Juglans* Arten mit Hilfe der Chloroplasten Sequenzierung analysiert, dabei wurden zwei Einträge veröffentlicht; MF167464 und MF167463 (Dong et al. 2017). Die erste Veröffentlichung erfolgte bereits 2015 von den Forschern Peng und Yu, dabei entstand eine Sequenz (KT870116) (Peng et al. 2017).

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Isolierung der Plastiden

Die Zellorganellen werden zunächst mechanisch und unter Verwendung von Reagenzien separiert. Durch diverse Zentrifugationsschritte erfolgt die Aufkonzentration und Reinigung der Plastiden.

Die Zerkleinerung des Zellgewebes wird mechanisch mit einem Dispergierer durchgeführt, durch die hohe Drehzahl von 3.000 bis 25.000 rpm wird das Probenmaterial in einzelne Zellfragmente zerlegt und die Oberfläche für nachfolgende Behandlungen vergrößert (Ding und Shah 2009). Zur Erhöhung der Pufferkapazität werden Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl), 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) oder 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) eingesetzt (Altura et al. 1980; Stellwagen et al. 2000). Zusätzlich finden Osmotika Anwendung, um intakte Plastiden zu erhalten, dabei handelt es sich um Saccharose oder Sorbit (Emes und England 1986). Als weiteres wichtiges Reagenz wird Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Komplexbildner zugefügt, um die bivalenten Magnesium-Ionen zu binden und eine Inhibierung der Nukleasen, durch Entzug der Co-Faktoren, zu bewirken (Schrader et al. 2012; Perrin et al. 1996).

Eine weitere Herausforderung stellt die komplexe, pflanzliche Matrix dar. Besonders der hohe Anteil an sekundären Pflanzenstoffen erschwert die Gewinnung von intakten Chloroplasten und die anschließende DNA-Isolierung. Hierfür werden Polyvinylpyrrolidon (PVP) und  $\beta$ -Mercaptoethanol eingesetzt. Dabei adsorbiert PVP Tannine und Polyphenole an der Oberfläche, sodass diese aus der Lösung separiert werden (Jobes et al. 1995).  $\beta$ -Mercaptoethanol verhindert die Oxidation von Polyphenolen, inaktiviert Enzyme und unterstützt die Präzipitation von Proteinen. Somit wird eine Interaktion von sekundären Pflanzenstoffen mit der DNA verhindert, welche eine inhibierende Wirkung auf die Amplifikation haben würden (Khan et al. 2000). Zudem besitzt pflanzliches Gewebe einen hohen Anteil an Polysacchariden, die für eine starke Viskositätserhöhung verantwortlich sind und somit auf weitere molekularbiologische Arbeitsschritte störend wirken. Hierfür wird unter anderem Borax oder Sorbitol eingesetzt, um eine gezielte Gelierung und anschließende Separierung zu erreichen (Souza et al. 2012).

Für die Gewinnung von reiner Plastiden-DNA muss die nukleäre DNA weitestgehend abgetrennt werden. Diesbezüglich werden unter anderem gezielt Nukleasen eingesetzt, um freie nukleäre DNA abzubauen, während die Plastiden-DNA in den intakten Zellorganellen geschützt vorliegt (Shi et al. 2012).

Während der oben genannten Methoden werden diverse Zentrifugationsschritte eingebaut, um eine Aufkonzentrierung der gewünschten Plastiden zu erreichen und eine Reinigung der Plastiden-DNA zu bewirken. Hierfür eignet sich besonders die Dichtezentrifugation, welche im folgenden Abschnitt spezifischer erläutert wird. Hierbei werden zwei Verfahren unterschieden: die Dichte-Zentrifugation und die Differential-Zentrifugation.

### 2.3.1.1 Zentrifugation

Bei der Zentrifugation werden Biomoleküle oder Zellbestandteile in einem Zentrifugalkraftfeld separiert. Bei der Differential-Zentrifugation werden mehrere Zentrifugationsschritte nacheinander bei variierten Geschwindigkeiten durchgeführt, um Bestandteile mit unterschiedlichen Dichten zu sedimentieren (s. Abbildung 10). Allerdings können nur Partikel mit großer Divergenz getrennt werden, sodass die Trennleistung als mäßig eingestuft werden kann (Duve und Berthet 1954; Anderson 1955).

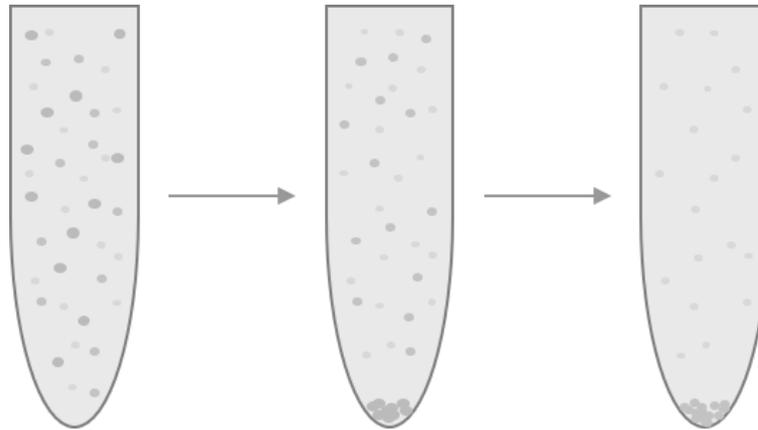


Abb. 10: Schema der Differential-Zentrifugation modifiziert nach Eichenberger (1971).

Bei der Dichte-Zentrifugation (isopyknische Zentrifugation) werden die Komponenten zusätzlich anhand ihrer Schwebedichte separiert. Hierbei werden hochkonzentrierte Saccharose-, Percoll™- und Cäsiumchlorid-Lösungen eingesetzt. Die Partikel wandern bis zu dem Punkt, der ihrer eigenen Dichte entspricht, sodass sich Banden im Gradienten ausbilden (s. Abbildung 11) (Britten und Roberts 1960; Brakke 1951).

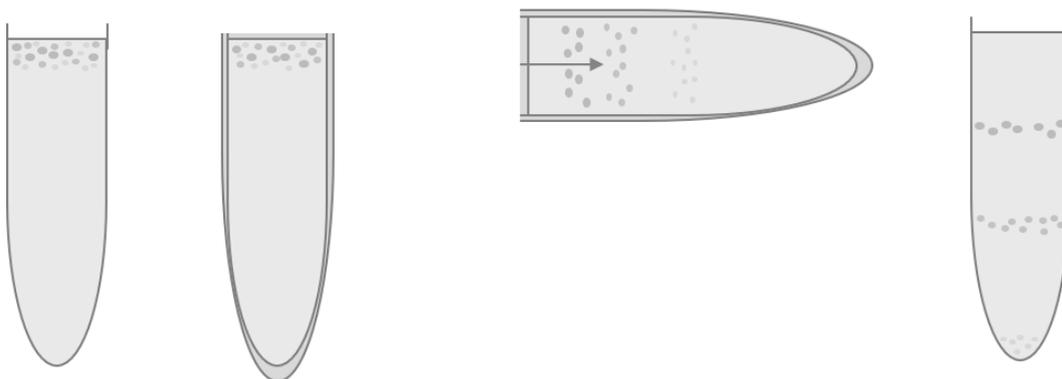


Abb. 11: Schema der Isopyknischen-Zentrifugation modifiziert nach Eichenberger (1971).

Ein Saccharose-Gradient wird auf Grund der guten Wasserlöslichkeit, seiner chemischen/elektrischen Neutralität und seines geringen Preises eingesetzt. Der Nachteil besteht in der höheren osmotischen Aktivität, die bei der Gewinnung von intakten Zellorganellen berücksichtigt werden muss und der

Präformierung des Gradienten (McConkey 1967; Mbiguino und Menezes 1991; Giraldo et al. 2003). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Percoll™ um eine wässrige, kolloidale Suspension aus kugelförmigen Polykieselsäure-Molekülen, die mit kovalent gebundenen Silan beschichtet sind. Dadurch wird ein Gradient während der Zentrifugation aufgebaut. Zudem besitzt der Percoll™-Gradient eine geringe osmotische Aktivität und Viskosität, penetriert kein biologisches Material und ist stabiler als ein Saccharose-Gradient (Dunkley et al. 2008; Arrowood und Sterling 1987).

Für die Abtrennung einer spezifischen DNA-Art (Plasmid-DNA, Plastiden-DNA, Kern-DNA) wird ein Cäsiumchlorid-Gradient verwendet. Hierbei liegt die Konzentrationsverteilung anfangs homogen vor und erst in Abhängigkeit von der Drehzahl bildet sich ein linearer Gradient aus. Hierfür ist eine Ultrazentrifuge erforderlich, da zum einen ein Vertikalrotor und zum anderen hohe Zentrifugalkräfte benötigt werden (Szybalski 1968; Flamm et al. 1966; Schildkraut et al. 1962).

### 2.3.2 DNA-Isolierung

Der Vorgang kann grundlegend in zwei Schritte eingeteilt werden: dem Zellaufschluss und die anschließende Trennung der DNA von der Begleitmatrix. Das Ziel der Isolierung beinhaltet die Gewinnung von qualitativ hochwertiger DNA für weiterfolgende molekularbiologische Analysen.

Die Zellyse kann physikalisch, chemisch oder enzymatisch erfolgen, um die Zellverbände zu brechen und eine Oberflächenvergrößerung zu erreichen, sodass eine anschließende DNA-Extraktion erleichtert wird. Zu den physikalischen/mechanischen Methoden zählt das Mörsern mit flüssigem Stickstoff oder bei härterem Material (Walnussperikarp) der Einsatz einer Messermühle mit Trockeneis (Takamatsu et al. 2018). Durch den extremen Temperaturunterschied wird das Probenmaterial porös und die Zellstruktur teilweise aufgelöst (Zheng et al. 2011). Für eine vollständige Zellyse erfolgt eine chemische Behandlung mit Detergenzien unter erhöhten Temperaturen. Die am häufigsten eingesetzten grenzflächenaktiven Substanzen sind Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) oder Natriumdodecylsulfat (SDS) (Doyle 1991; Ho et al. 2015; Shi et al. 2012). Hierbei bildet das kationische Detergenz mit den Proteinen und Kohlenhydraten, unter erhöhter Natriumchlorid-Konzentration, einen Komplex aus. Die DNA verbleibt in Lösung, da die Natrium-Ionen eine ionische Bindung mit der negativ geladenen Phosphatgruppe der DNA ausbilden und somit eine Komplexierung mit dem kationischen Detergenz verhindert wird (Murray und Thompson 1980). Bei den biologischen Methoden finden Enzyme Anwendung, unter anderem wird Proteinase K zur Spaltung von Proteinen eingesetzt (Blin und Stafford 1976). Oftmals wird bei der DNA -Isolierung eine Kombination der drei Verfahren durchgeführt. Zur weiteren Aufreinigung der DNA werden organische Lösungsmittel (Chloroform, Isoamylalkohol) verwendet, um Proteinkontaminationen abzutrennen und Lipide zu lösen (Vieira et al. 2014; Kim et al. 1997). Die DNA verbleibt in der wässrigen Phase, während die vorher erwähnten Kontaminationen mit der organischen Phase extrahiert werden.

Die anschließende Präzipitation der DNA erfolgt durch Zugabe eines Alkohols, wie Isopropanol oder Ethanol. Auf Grund der Polarität verdrängt der Alkohol die Hydrathülle der DNA, dies bewirkt eine Reduzierung der Löslichkeit und der Bildung eines Niederschlages (Hänni et al. 1995; Green und Sambrook 2016). Im Anschluss erfolgt eine Reinigung mit 70 %igem Ethanol, um Salze oder restliche Zellbestandteile zu entfernen. Durch den Einsatz von Silika-Säulen und chaotropen Salzen, wie Guanidiniumhydrochlorid, erfolgt die Bindung der Phosphatgruppen der DNA an die Silanolgruppen unter Hochsalzbedingungen. Hierbei können Kontaminationen leichter abgetrennt werden, da diese keine Wechselwirkungen mit der Silika-Säule eingehen. Die finale Elution erfolgt mit erwärmtem Reinstwasser (Niedrigsalzbedingungen), um die Elution zu begünstigen (Brüning et al. 2011).

### 2.3.3. Spezifizierung der DNA

Die amplifizierte DNA muss hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität für nachfolgende molekularbiologische Methoden überprüft werden. Hierfür finden photometrische und fluorimetrische Messprinzipien Anwendung.

#### 2.3.3.1 Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA

Bei der photometrischen Messung wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert und entsprechend absorbiert. Dabei weisen einige Molekülstrukturen spezifische Absorptionswellenlängenbereiche auf (s. Abbildung 12). So besitzt das aromatische System der Base eines Nukleotides ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, welches eine Aussage bezüglich der Quantität ermöglicht (McLeish und Sunderland 1961; Smeaton und Eichner 1983). Demgegenüber besitzen Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, sodass nur der Quotient ( $A_{260}/A_{280}$ ) eine Aussage über die Qualität der isolierten DNA zulässt. Da die Proteine eine ähnliche Absorption wie die DNA aufweisen und durch Interferenzen keine qualitative Aussage bei einer Adsorptionsmessung bei 260 nm getroffen werden kann, muss der Quotient für die Beurteilung herangezogen werden. Dabei kann bei einem Wert von über 1,8 von einem reinen DNA-Präparat ausgegangen werden. Bei pflanzlichem Probenmaterial treten zudem Zucker und Phenole auf, die ein entsprechendes Absorptionsmaximum bei 230 nm besitzen. Auch hier kann mit Hilfe des Quotienten ( $A_{260}/A_{230}$ ) eine Aussage über die Qualität der DNA getroffen werden, dabei besitzen reine DNA-Isolate einen Wert von über 2,0 (Yeates et al. 1998). Allerdings kann keine Aussage über die Kontamination mit exogener DNA getroffen werden, da eine identische Absorption vorliegt.

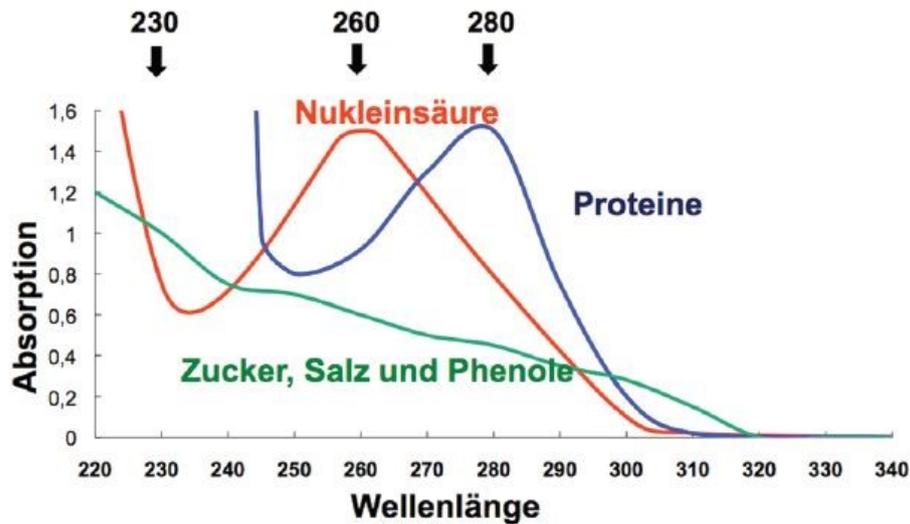


Abb. 12: Schematischer Absorptionsverlauf bestimmter Biomoleküle und anorganische Komponenten (Armbrecht 2013).

### 2.3.3.2 Quantifizierung der DNA

Die Bestimmung der Konzentration kann zum einen über die Wellenlänge bei 260 nm oder mit Hilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (Simbolo et al. 2013) erfolgen. Letzteres ermöglicht eine selektive Bestimmung der DNA-Konzentration im pg-Bereich. Bei der photometrischen Messung bei 260 nm werden alle Substanzen erfasst, die ein ähnliches Absorptionsmaximum aufweisen. Die DNA besitzt keine fluoreszierenden Eigenschaften, durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes werden die Valenzelektronen dieses konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems angeregt und bei der Relaxation in den Grundzustand wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Je mehr Farbstoff sich in die kleine Furche der DNA einlagern kann, desto intensiver ist die Färbung. Dieser Vorgang ist linear proportional und eignet sich somit für eine quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration (Jarvius et al. 2006; Downs und Wilfinger 1983).

### 2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) erfolgt eine exponentielle Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Prinzipiell wird bei dieser Methode doppelsträngige DNA (Template) denaturiert, sodass sich kurze, komplementäre Oligonukleotide (Primer) an das jeweilige 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches hybridisieren. Durch den Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase wird ein komplementärer DNA-Strang neu synthetisiert, wobei die Primer als Ausgangspunkt fungieren. Dieser Vorgang wird in mehreren Zyklen wiederholt, sodass ein exponentieller Konzentrationsanstieg eintritt (s. Abbildung 13) (Matissek et al. 2018).

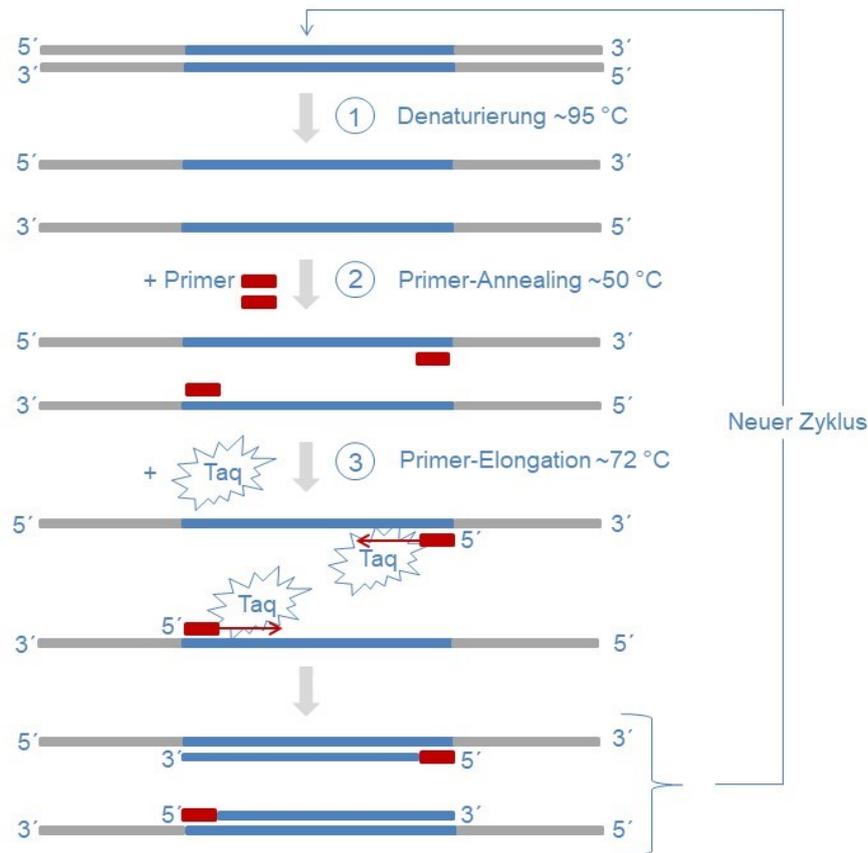


Abb. 13: Schema der Polymerasekettenreaktion modifiziert nach Matissek (2018).

#### 2.3.4.1 Quantitative PCR (qPCR)

Mit Hilfe der qPCR kann eine quantitative Aussage bezüglich der DNA-Konzentration getroffen werden. Die Detektion erfolgt einerseits über ein Sonden-System oder andererseits über Fluoreszenzfarbstoffe, da die DNA keine Eigenfluoreszenz besitzt (Okholm et al. 2014). Im Zuge dieser Forschungsarbeit wurde für die Quantifizierung ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der an die kleine Furche der DNA bindet. Hierbei handelt es sich um SYBR™ Green, einem klassischen Fluoreszenzfarbstoff. Dessen Fluoreszenzsignal verstärkt sich um das 1000-fache bei der Bindung an die DNA. Die Fluoreszenz begründet sich durch ein ausgeprägtes konjugiertes Elektronensystem, sodass Valenzelektronen leicht angeregt werden (488 nm) und eine Strahlung bei Relaxation in den Grundzustand emittieren (520 nm) (Battaglia et al. 2000). Die Zunahme der Intensität ist hierbei linear proportional zur DNA-Konzentration, sodass während der Amplifikation eine aktuelle Betrachtung der Reaktion möglich ist. Anhand des  $C_T$ -Wertes, dabei handelt es sich um die Zyklenzahl bei der das Signal das erste Mal das Grundrauschen übersteigt, erfolgt die Konzentrationsbestimmung anhand einer externen Kalibrierreihe (Cao und Shockey 2012; Zhang et al. 2015).

### 2.3.4.2 RFLP-PCR

Die RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*) basiert auf einem enzymatischen Verdau einer Zielsequenz. Durch die An- oder Abwesenheit eines SNPs interagiert das Enzym mit der Zielsequenz und das DNA-Fragment wird geschnitten, welches anschließend visuell dargestellt werden kann. Dadurch können Arten oder Sorten gezielt differenziert werden.

Die im Vorfeld amplifizierten DNA-Fragmente werden für mehrere Stunden zusammen mit dem Enzym, unter Verwendung eines geeigneten Puffers, welcher die notwendigen Substrate für das Enzym enthält, inkubiert. Dabei erfolgt der Verdau nur bei der Sorte, die exakt die Zielsequenz besitzt, wodurch unterschiedliche Fragmentlängen bei der Elektrophorese sichtbar werden. Wird die Sequenz nicht geschnitten, so bleibt das amplifizierte DNA-Fragment in seiner Originallänge erhalten (s. Abbildung 14).

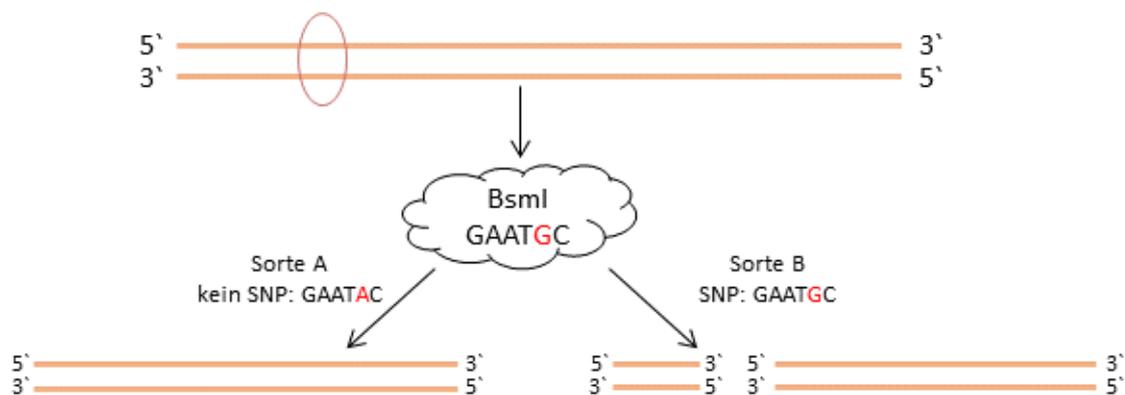


Abb. 14: Schematische Darstellung des Prinzips einer RFLP-PCR modifiziert nach (Berg Rasmussen 2012). Rot eingekreist ist die Stelle des SNPs, welchen einige Sorten besitzen und einige nicht. Das rot markierte Nukleotid ist die Stelle des SNPs in der Erkennungssequenz des Enzyms.

### 2.3.4.3 ARMS-PCR

Das Genom der Walnuss ist zu einem großen Teil heterozygot. Für die Analyse der SNPs wird daher eine Methode benötigt, die sowohl homozygote als auch heterozygote Mutationen detektiert. Hierfür eignet sich die ARMS-PCR (dt. **A**mplifikations-**R**efraktär-**M**utations-**S**ystem), die aus der klinischen Diagnostik stammt und die häufig zur Analyse von menschlichem Gewebe verwendet wird, um Krankheiten frühzeitig zu detektieren, die auf der Mutation eines Nukleotides beruhen (Chen et al. 2007; Lo 1998).

Das Prinzip basiert auf einer erwünschten Paarung bzw. Fehlpaarung des Nukleotids am 3'-Ende des FW-Primers (s. Abbildung 15). Als erster Schritt erfolgt das Entwerfen eines Primerpaars, das als Positivkontrolle fungiert, um die Funktionsfähigkeit der Amplifizierung zu bestätigen. Daran schließt sich die Entwicklung der zwei FW-Primer an, wobei das jeweilige 3'-Ende sich auf dem SNP befindet. Der erste Primer ist hierbei spezifisch für das Allel 1 (Mutante) und refraktär für das Allel 2 (Wildtyp),

beim zweiten Primer ist es entsprechend umgekehrt, sodass nur bei einem komplementären Primer eine Bindung an die Zielsequenz unter stringenten Bedingungen erfolgt. Zur Erhöhung der Spezifität des Primers wurde am zweiten Nukleotid vom 3'-Ende eine zusätzliche Fehlpaarung integriert. Dabei konnte durch Experimente verschiedene destabilisierende Effekte beobachtet werden, sodass bestimmte Fehlpaarungen besonders effektiv sind, dazu gehören: G/A oder C/T am ersten Nukleotid des 3'-Endes gefolgt von einem C/A oder C/T. Als mittelmäßige Fehlpaarungen werden A/A, C/C, G/G und T/T gewertet (Medrano und Oliveira 2014).

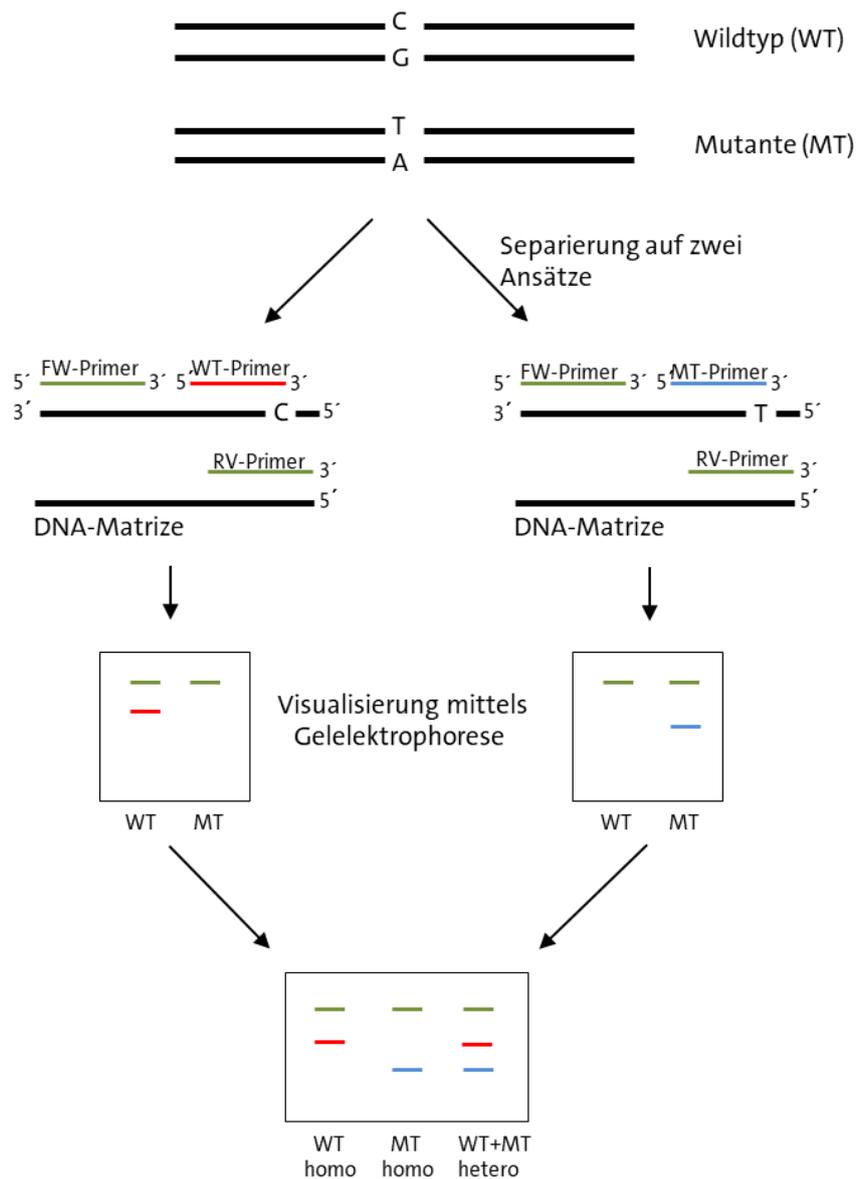


Abb. 15: Schematische Darstellung der ARMS-PCR.

### 2.3.5 Sequenzierungstechniken

Bei der DNA-Sequenzierung wird die Basensequenz eines DNA-Abschnittes analysiert. Dabei konnten anfangs nur kurze DNA-Fragmente sequenziert werden. Mittlerweile ist die Technik so weit

vorangeschritten, dass auch ganze Genome sequenziert werden können. Dadurch konnte im April 2003 das menschliche Genom offiziell vollständig entschlüsselt werden, wobei der Start des Projektes im Oktober 1990 erfolgte (Collins et al. 2003).

### 2.3.5.1 SANGER-Sequenzierung

Die heutzutage am häufigsten angewandte Methode wurde von F. Sanger etabliert, wobei ein komplementärer, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter DNA-Strang *in vitro* amplifiziert und durch die Verwendung von Didesoxynukleotiden (ddNTP) ein Kettenabbruch eingeleitet wird. Somit werden unterschiedlich lange DNA-Stränge synthetisiert. Jedoch wäre die Analyse eines kompletten Genoms mit dieser Methode zu aufwendig, sodass neue Strategien notwendig waren.

### 2.3.5.2 *Next-Generation Sequencing*

Die erste Generation der Sequenzierungstechniken wurde vorwiegend durch die Methode nach Sanger geprägt. Selbst heutzutage bietet dieses Verfahren die höchste Genauigkeit, allerdings sind die DNA-Fragmente auf 1000 Basen limitiert (Men et al. 2008). In den letzten Jahrzehnten entwickelten sich die Sequenzierungstechniken rasant weiter, sodass neue *Next-Generation Sequencing*-Technologien (NGS) etabliert wurden. Hierbei kann nicht nur genomische DNA sequenziert werden, es bietet auch Rückschlüsse auf das Transkriptom, epigenetische Marker und Proteininteraktionen. Im Gegensatz zum Sanger-Verfahren verlaufen eine Vielzahl an Reaktionen parallel, dadurch ist ein höherer Durchsatz von bis zu 100 Gigabasen pro Gerät möglich (Schuster 2008; Grada und Weinbrecht 2013; Pettersson et al. 2009).

### Sequencing-by-synthesis-Method von Illumina

Das Prinzip der Methode beruht auf der Cluster-Bildung von DNA-Fragmenten durch entsprechende Amplifizierung, wobei die eingebauten Nukleotide fluoreszenzmarkiert sind, sodass eine Detektion der Basenabfolge möglich ist.

Zu Beginn erfolgt eine enzymatische Fragmentierung der DNA und die Ligation von universellen Adaptern an die DNA, damit diese anschließend an einen Glasträger (*Flow Cell*) bindet (s. Abbildung 16). Auf der *Flow Cell* befinden sich *capture oligos*, die komplementär zu den eingesetzten Adaptern sind und somit eine Bindung an die Oberfläche ermöglichen. Zusätzlich werden weitere Indizes eingebaut, um mehrere Proben gleichzeitig zu sequenzieren und die Fragmente anschließend bioinformatisch zuordnen zu können. Durch eine Amplifikation der Template-DNA mit Hilfe einer Polymerase werden komplementäre DNA-Stränge gebildet. Die ursprünglichen DNA-Matrizen werden entfernt und die Tochterstränge binden an die freien *oligo captures*, in Form einer Brücke, weshalb dieses Prinzip auch als *Bridge-Amplifikation* bezeichnet wird. Durch Elongation der Einzelstränge entsteht ein komplementärer Strang, der nachfolgend sequenziert wird, wobei sich der Vorgang

wiederholt bis sich diverse Cluster auf der *Flow Cell* befinden. Dabei wird in jedem Zyklus ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid von der Polymerase eingebaut und die Fluoreszenzgruppe abgespalten, sodass ein Signal detektiert wird, dessen Intensität durch die Clusterbildung verstärkt wird. Durch die *Paired-End*-Sequenzierung werden die einzelnen DNA-Fragmente von beiden Seiten amplifiziert und die Genauigkeit der Methode signifikant gesteigert (Desai und Jere 2012; Buermans und den Dunnen 2014; Harismendy und Frazer 2009; Das und Vikalo 2012; Holt und Jones 2008).

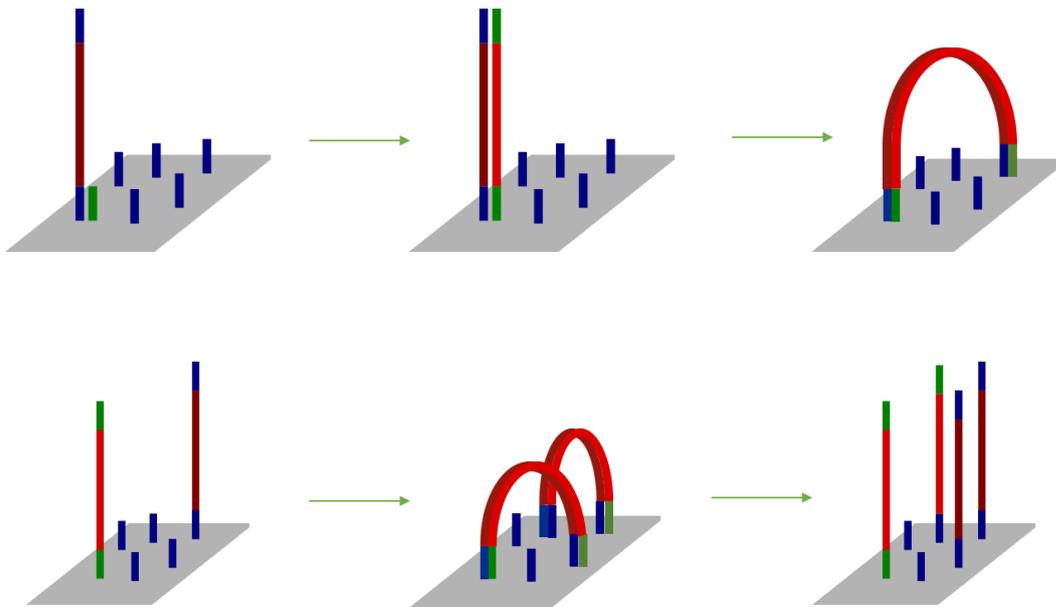


Abb. 16: Hybridisierung der DNA an die *Flow Cell* mit anschließender *Bridge Amplification* und Cluster-Bildung.

Zudem werden bei der Sequenzierung spezifische Parameter betrachtet, um eine Aussage über den Erfolg einer Sequenzierung treffen zu können. Hierbei beschreibt die *Cluster Density* die Dichte der einzelnen Cluster auf der *Flow Cell* und ermöglicht die Einschätzung ob eine Über- oder Unterclusterung vorliegt (Krueger et al. 2011). Dieses wird zusätzlich mit einer visuellen Aufnahme von dem Sequenzierungsgerät (Miseq System, Illumina) unterstützt, der bei jedem Sequenzierzyklus ein Foto von der Anregung der jeweiligen Base aufnimmt (s. Abbildung 17).

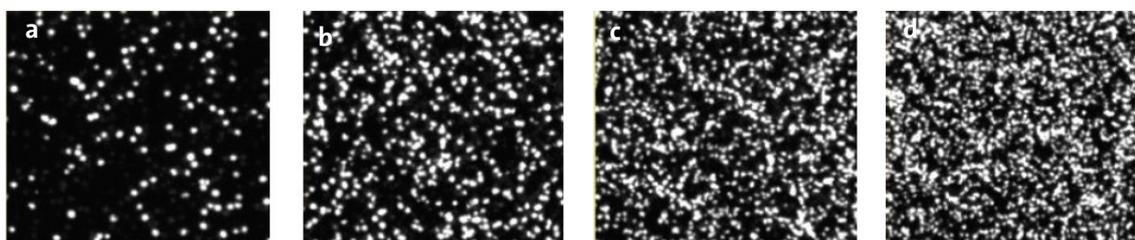


Abb. 17: Aufsteigend ist die zunehmende Cluster Density zu sehen, a) Unterclusterung der *Flow Cell*, b) und c) optimale *Cluster Density*, d) Überclusterung der *Flow Cell* (Illumina 2019).

Für das Sequenzierungsgerät und die verwendeten Reagenzien (Miseq Reagent Kit v2, Illumina) ist eine optimale *Cluster Density* von 1000 bis 1200 K/mm<sup>2</sup> angegeben (Illumina 2019). Allerdings konnte bei einer extremen Überclusterung eine geringere *Cluster Density* vom Gerät angezeigt werden, da dieses die Cluster visuell nicht mehr abtrennen konnte. Ein weiteres Qualitätskriterium bildete der *Cluster Passing Filter* (% PF), welches die Qualität der Signalübertragung der einzelnen Cluster bewertete. Bei einer Überlappung der Cluster wird die Template Generierung inhibiert, sodass weniger Signale detektiert werden und die Datenmenge herabgesetzt wird (Manley et al. 2016). Auch hierfür bietet die Benutzeroberfläche des Sequenzierungsgerätes eine Analysemöglichkeit. Dabei präsentiert die blaue Box die Cluster Density Range, während die grüne Box die Cluster Passing Filter Range veranschaulicht und die rote Linie den Median abbildet (Illumina 2019). Bei einer optimalen Sequenzierung liegen beide Parameter in einem kongruenten Bereich, sodass die Signale des Clusters fast vollständig detektiert werden können. Bei einer Überclusterung befindet sich die blaue Box weiterhin im oberen Bereich, allerdings sinkt die erhaltene Signalmenge der Cluster, sodass der Wert bei einer extremen Überclusterung gegen 0 % verläuft (s. Abbildung 18).

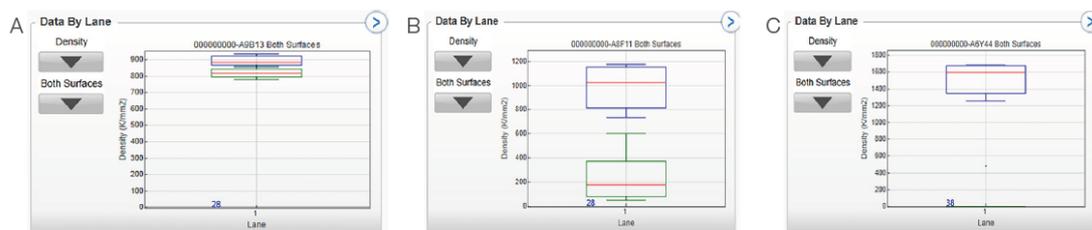


Abb. 18: a) Optimales Verhältnis aus *Cluster Density* und *Cluster Passing Filter*, b) leichte Überclusterung ersichtlich durch die verringerte *Cluster Passing Filter*, c) extreme Überclusterung verhindert jegliche Detektion von Cluster Signalen (Illumina 2019).

Zusätzlich kann in der Benutzeroberfläche des Sequenzierungsgerätes die Auslastung der *Flow Cell* betrachtet werden. Die orangen Felder repräsentieren Regionen, die eine hohe *Cluster Density* und Anzeichen für eine Überclusterung aufweisen. Wohingegen die blauen Felder eine sehr geringe *Cluster Density* symbolisieren, die unter anderem auf eine fehlerhafte Clusterbildung hinweisen, sodass in diesem Bereich keine Signale detektiert werden können (s. Abbildung 19) (Illumina 2019).

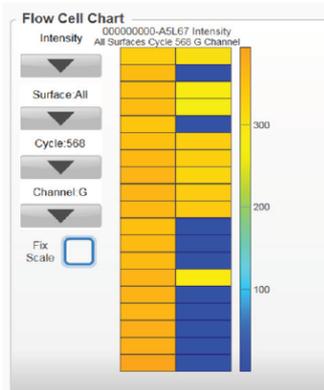


Abb. 19: Auslastung einer *Flow Cell* eines MiSeq (Sequenzierplattform von Illumina). Die orangen Felder symbolisieren hohe *Cluster Densities* und die blauen Felder weisen oftmals auf eine fehlgeschlagene Cluster-Ausbildung hin (Illumina 2019).

Der Q-Score ist ein weiterer Parameter, um die Fehlerwahrscheinlichkeit einer Base zu determinieren. Abgeleitet wird dieser Wert von dem *Phred Quality Score* der sich während der Sanger-Sequenzierung etablierte. Es handelt sich hierbei um einen Algorithmus, der die Peakauflösung und -scharfe beurteilt und somit eine Aussage über die Qualität der Sequenzierung ermöglicht. Die Berechnung wurde für die *Next-Generation Sequencing* Verfahren übernommen und weitere Parameter ergänzt. Der Q-Score ergibt sich somit aus folgender Gleichung:

$$Q = -10 \log_{10} P$$

Hierbei gilt in der Formel:

- Q            Quality Score
- P            Fehlerwahrscheinlichkeit der detektierten Base

Hierbei bedeutet ein Q-Score von 30 (Q30), dass in 1 von 1000 Fällen eine Base inkorrekt bestimmt wurde (99,9 %). In der Literatur wird dieser Wert auch als Richtlinie für sehr gute Sequenzierungsergebnisse angesehen (Illumina 2019). Im Vergleich dazu besitzt eine durchschnittliche Sanger-Sequenzierung eine Genauigkeit von Q20 mit circa 99,4 % Genauigkeit. Bei der Sequenzierung mittels MiSeq sind aus technischen Gründen keine Genauigkeiten von Q40 überschreitbar, sodass diese Limitierung bei heutigen *Next-Generation Sequencing*-Technologien immer noch vorhanden ist.

Tab. 2: Zusammenhang zwischen Q-Score, Genauigkeit und Fehlerwahrscheinlichkeit (Illumina 2019).

Q-Score	Wahrscheinlichkeit für inkorrekte Base	Genauigkeit [%]
10	1 in 10	90
20	1 in 100	99
30	1 in 1000	99,9
40	1 in 10.000	99,99

### 2.3.6 Non-targeted DNA-Analysen

Bei der *non-targeted* Analyse ist die Sequenz unbekannt. Diesbezüglich erfolgt im Vorfeld oftmals ein Screening von unspezifischen Primern, um potenzielle Kandidaten einzugrenzen. Anhand der amplifizierten DNA-Fragmente können Arten oder Sorten differenziert werden, wobei diverse Methoden mit unterschiedlichen Prinzipien zur Verfügung stehen. Dadurch kann ein genetischer Fingerabdruck für die Identifizierung eines Organismus entwickelt werden, dies wird auch als *DNA-Fingerprint* bezeichnet (Saez et al. 2004; Herrmann et al. 2015).

#### 2.3.6.1 RAPD-PCR

Eine weit verbreitete *non-targeted* Methode stellt die RAPD-PCR (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*) dar. Im Gegensatz zu klassischen PCR-Verfahren wird nur ein unspezifischer Primer mit einer durchschnittlichen Länge von 8 bis 10 Basen eingesetzt, der an mehreren Abschnitten auf dem gesamten Genom hybridisiert (Williams et al. 1990). Damit der Primer auch an nicht vollständig komplementären Abschnitten hybridisiert, wird eine Annealing-Temperatur unter 45 °C gewählt. Dadurch entsteht bei der Elektrophorese ein spezifisches Bandenmuster für jeden Organismus (s. Abbildung 20) (Jain et al. 2010, 2010). Anhand dieser Muster können unter anderem phylogenetische oder forensische Analysen durchgeführt werden. Der größte Vorteil dieser Methode beruht auf der schnellen und kostengünstigen Anwendung. Ein Nachteil besteht in der geringen Reproduzierbarkeit und dass die etablierte Methode für jedes Labor neu validiert werden muss, da bereits geringe Schwankungen der Enzym-, Primer- und Substratkonzentration sowie der Temperatur das Bandenmuster signifikant beeinflussen können (Power 1996; Atienzar und Jha 2006).

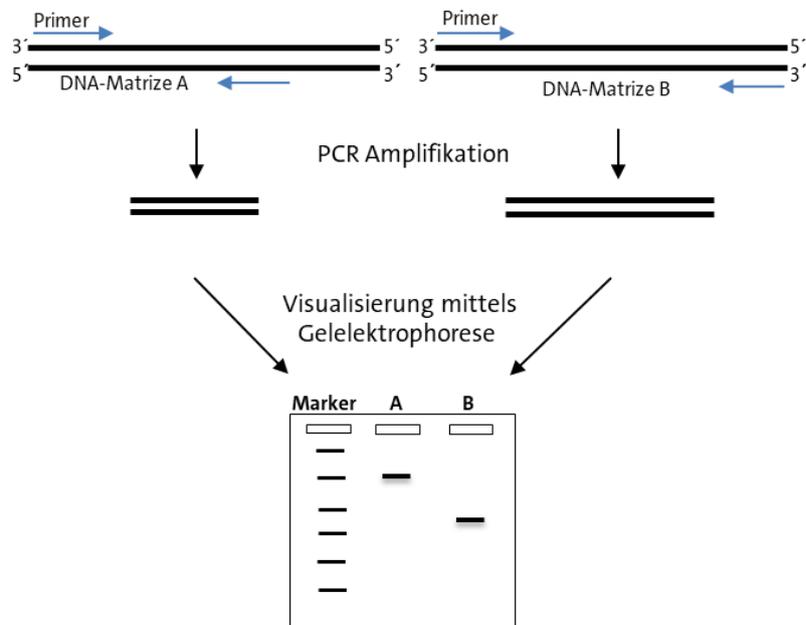


Abb. 20: Schematische Darstellung einer RAPD-PCR mit zwei verschiedenen DNA-Proben als Matrize modifiziert nach Kassim und Barceló (2009).

2.3.6.2 Mikrosatelliten-Analyse

Das eukaryotische Genom besteht aus proteincodierenden (Exons) und nicht codierenden (Introns) Abschnitten. Letztere besitzen repetitive Sequenzen und weisen eine hohe Variabilität auf im Vergleich zu den konservierten Genabschnitten. Hierbei können unterschiedliche Sequenzgrößen der Wiederholungseinheiten differenziert werden: Makrosatelliten- (>40), Minisatelliten (20-40 Basen) und Mikrosatelliten (1-5 Basen) (s. Abbildung 21) (Li et al. 2002).

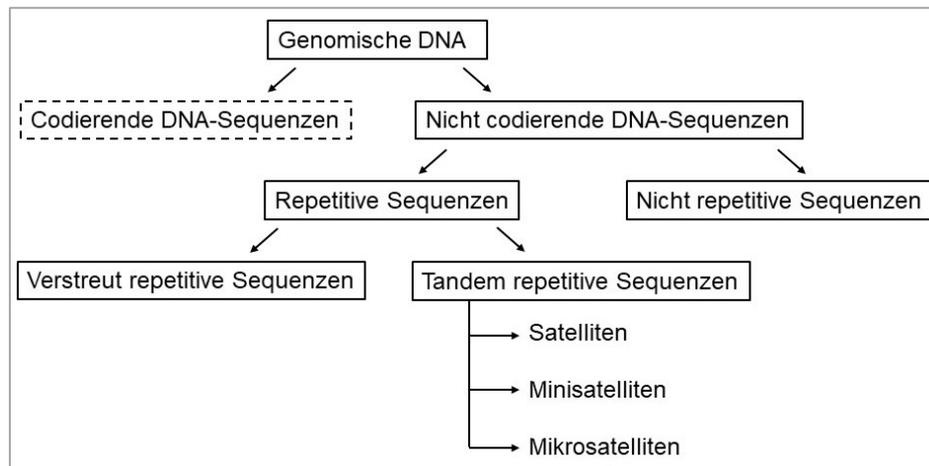


Abb. 21: Einteilung der genomischen DNA modifiziert nach Gassert (2005).

Die Mikrosatelliten (SSR, engl. *simple sequence repeats*) bezeichnen meistens Di-, Tri- oder Tetranukleotide, wobei sie Cluster von 10-30 Kopien auf dem Genom bilden und sich auf verschiedene Loci verteilen. Sie werden als genetische Marker genutzt, um eine Arten- oder Sortendifferenzierung durchzuführen (Gassert 2005). Oft besteht die Sequenz aus repetitiven Dinucleotiden, seltener Mono- oder Tetranukleotide. Die verschiedenen Formen können wie folgt auftreten:

Reiner Mikrosatellit:	5'...CACACACACACA...3'
Zusammengesetzter Mikrosatellit:	5'...CACACACACAGAGAGAGAGA...3'
Unterbrochener Mikrosatellit:	5'...CATTACATTCA...3'

Die Variabilität entsteht durch ein Replikations-*Slippage* während der Zellteilung. Dabei gerät die Polymerase während der Elongation ins „Stottern“ auf Grund der repetitiven Basenabfolge, sodass eine Mutation, Insertion oder Deletion die Folge sind. Somit besteht die Möglichkeit, verschiedene Arten oder Sorten durch Längenpolymorphismus zu differenzieren (Zane et al. 2002). Bei der SSR-PCR binden die Primer auf konservierte Bereiche, die die Mikrosatelliten flankieren. Im Gegensatz dazu erfolgt das Annealing der Primer bei der ISSR-PCR (engl. *Inter simple sequence repeats*) direkt auf dem Mikrosatelliten (Shen 2008). Für die Detektion der unterschiedlichen Längen wird eine hohe Auflösung

benötigt, aus diesem Grund wird eine Kapillargelelektrophorese eingesetzt, die die Fragmentlänge auf eine Base genau spezifizieren kann (Monnig und Kennedy 1994).

## 2.4 Molekularbiologische Arbeiten zu *J. regia*

Im folgenden Abschnitt erfolgt eine Auflistung der aktuellen (Stand August 2021) molekularbiologischen Analysen zu *J. regia*, die sich mit der genetischen Differenzierung, phylogenetischen Evolution und Sequenzierung des Chloroplasten-Genoms beschäftigen.

Tab. 3: Zusammenfassung der derzeitigen molekularbiologischen Forschungsergebnisse bezüglich *J. regia*.

Methode	Autor	Titel	Jahr
RAPD	Rashnoodi <i>et al.</i>	Evaluation of some walnut genotypes in the west of Iran using fruit characteristics and RAPD marker	2017
RAPD + SSR	Sevibdik <i>et al.</i>	Genetic diversity analysis of walnut ( <i>Juglans regia</i> L.) from Kashmir Valley using RAPD and ISSR markers	2020
SSR	Kefayati <i>et al.</i>	First simple sequence repeat-based genetic linkage map reveals a major QTL for leafing time in walnut ( <i>Juglans regia</i> L.)	2019
	Baksi <i>et al.</i>	Genetic diversity of walnut ( <i>Juglans regia</i> L.) seedlings through SSR markers in north-western Himalayan region of Jammu	2020
	Luo <i>et al.</i>	Distinguishing Sichuan walnut cultivars and examining their relationships with <i>Juglans regia</i> and <i>Juglans sigillata</i> by FISH, early-fruited gene analysis, and SSR analysis	2020
	Orhan <i>et al.</i>	Genetic diversity detection of seed-propagated walnut ( <i>Juglans regia</i> L.) germplasm from Eastern Anatolia using SSR markers	2020
	Gnuey <i>et al.</i>	Genetic diversity among some walnut ( <i>Juglans regia</i> L.) genotypes by SSR markers	2021
	Houmanat <i>et al.</i>	Molecular diversity of walnut ( <i>Juglans regia</i> L.) among two major areas in Morocco in contrast with foreign varieties	2021

Fortsetzung Tab.3: Zusammenfassung der derzeitigen molekularbiologischen Forschungsergebnisse bezüglich *J. regia*.

Methoden	Autor	Titel	Jahr
RT-qPCR	Niu <i>et al.</i>	Identification of appropriate reference genes for RT-qPCR analysis in <i>Juglans regia</i> L.	2018
	Zhou <i>et al.</i>	Molecular characterization of SBP-box gene family during floral induction in walnut ( <i>Juglans regia</i> L.)	2020
	Martínez-García <i>et al.</i>	The walnut ( <i>Juglans regia</i> ) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols	2016
	Dong <i>et al.</i>	Phylogenetic resolution in <i>Juglans</i> based on complete chloroplast genomes and nuclear DNA sequences	2017
	Hu <i>et al.</i>	Completion of the chloroplast genomes of five <i>Juglans</i> and their contribution to chloroplast phylogeny	2017
	Stevens <i>et al.</i>	Genomic variation among and within six <i>Juglans</i> species	2018
	Zhao <i>et al.</i>	Population genetics, phylogenomics and hybrid speciation of <i>Juglans</i> in China determined from whole chloroplast genomes, transcriptomes, and genotyping-by-sequencing (GBS)	2018
	Chen <i>et al.</i>	Genomics: cracking the mysteries of walnuts	2019
	Bastiaan-Net <i>et al.</i>	Gene expression analysis of the walnut oleosin variants A and B 3 different <i>Juglans regia</i> cultivars using RNA sequencing data	2019
	Song <i>et al.</i>	The complete chloroplast genome of paradox ( <i>Juglans major</i> × <i>Juglans regia</i> ), an interspecific hybrid in China	2020

### 3. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit ist die eindeutige Bestimmung der biologischen Identität (Sorte) der Walnuss. Die Grundlage basiert auf der Tatsache, dass die DNA für jeden Organismus einzigartig und nahezu unabhängig von exogenen Faktoren ist. Dadurch lassen sich molekularbiologische Verfahren für die Routineanalytik entwickeln.

Die Grundvoraussetzung für alle folgenden Strategien besteht in der Isolierung der DNA mit einem hohen Reinheitsgrad, um Kontamination mit bakterieller DNA zu vermeiden. Zusätzlich soll eine Methode etabliert werden, um Chloroplasten-DNA anzureichern und von der Kern- und Mitochondrien-DNA zu isolieren. Bei erfolgreicher Umsetzung sollen nachfolgend zwei unterschiedliche Down-Stream Ansätze verfolgt werden, wobei es sich um sequenzbasierte und *non-targeted Fingerprinting*-Strategien handelt.

Bei der sequenzbasierten Strategie wird die *Next-Generation-Sequencing*-Technologie genutzt, um das Chloroplasten-Genom zu sequenzieren, welches um ein Vielfaches kleiner als das Gesamt-Genom ist und somit optimale Voraussetzungen bietet. Mit Hilfe von computergestützten Vergleichen werden Unterschiede zwischen den einzelnen Walnussorten erkannt und anhand dieser Differenzen spezifische Nachweismethoden entwickelt. Bei längeren Sequenzunterschieden können bspw. isothermale DNA-Amplifikationen, wie die LAMP oder RPA eingesetzt werden. Treten jedoch nur Einzelbasenaustausche (SNP) auf, so eignen sich besonders die RFLP- und ARMS-PCR für die Analyse.

Für die Entwicklung von *non-targeted Fingerprinting*-Strategien liegt der Fokus auf der RAPD-PCR und Mikrosatelliten-Analyse. Diese Methoden werden bereits in der Routineanalytik angewandt und können somit schnell und unkompliziert von den jeweiligen Laboren übernommen werden.

Somit stehen am Ende der Forschungsarbeit eine Auswahl an diversen Strategien zur Verfügung, um eine Unterscheidung der Walnussorten zu ermöglichen und die Authentizität zu gewährleisten. Dadurch können Routinelabore die Methoden auswählen, die ihrer Laborausstattung und Personal optimal entsprechen.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Probenvorbereitung

Im ersten Schritt der Probenvorbereitung erfolgte eine Reinigung des Blattmaterials und des Walnussperikarps, um mögliche bakterielle Kontaminationen zu verringern. Zusätzlich musste im weiteren Verlauf das Material zerkleinert werden, um eine Oberflächenvergrößerung für die DNA-Isolierung zu erzielen, um die Effektivität der verwendeten Reagenzien zu steigern.

#### 4.1.1 Bakterielle Dekontaminierung

Für die Reinigung der Blattoberfläche wurde eine wässrige Lösung aus dem nicht-ionischen Detergenz Octoxinol hergestellt. Für diese Forschungsarbeit diente es zur Beseitigung von lipophilen und hydrophilen Kontaminanten und exogener mikrobieller DNA. Um die Effektivität zu steigern, wurde eine Reinigung mit 70 %igem Ethanol angeschlossen (Chambers et al. 2006). Dieses sorgte für eine abschließende Desinfizierung der Blattoberfläche, da Bakterien ubiquitär auf ihr vorkommen (Esser et al. 2015). Bei den anschließenden *non-targeted* Methoden oder Sequenzierungen erfolgte keine spezifische DNA-Amplifizierung, wodurch auch eine Amplifizierung von exogener DNA auftreten konnte und die *non-targeted* Methode an Aussagekraft verlieren würde. Hierbei wurde eine 70 %ige Ethanol-Lösung verwendet, da ein geringer Anteil an wässriger Lösung notwendig war, um eine desinfizierende Aktivität zu erzielen und vegetative Bakterien abzutöten. Das Ethanol bewirkt eine Desorganisation der Bakterienmembran, eine Proteindenaturierung und die Destruktion des Cytoplasmas durch Dehydratisierung der Zelle (Moorer 2003). Hierbei ermöglichte die Sequenzierung eine Überprüfung des Reinigungserfolges, wobei in den meisten Fällen nach dem o.g. Reinigungsprozess bakterielle DNA nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 4.3.1).

Des Weiteren wurde das Walnussperikarp ebenfalls dekontaminiert, allerdings bot die härtere Struktur invasivere Möglichkeiten die Reinigung durchzuführen. Hierbei wurden zwei Verfahren getestet, zum einen mit 70 %igem Ethanol, zum anderen mit 0,5%iger Natriumhypochloritlösung. Während der Durchführung wurde auch das Blattmaterial überprüft, allerdings löste sich das Material innerhalb weniger Sekunden unter Zugabe von Natriumhypochlorit (0,5%) auf, sodass die oben genannte Methode beibehalten wurde. Hierbei beruhte die Wirkungsweise des Natriumhypochlorits auf der Bildung von unterchloriger Säure, welche nach der Dissoziation in die Bakterienzelle Oxidationsreaktionen hervorruft unter Destruktion der DNA, Interferenz mit der Zellpermeabilität verursacht und Denaturierung von Enzymen bewirkt, sodass die Zellen absterben oder eine Reproduktion unterbunden wird (Duckhouse et al. 2004). Zur Überprüfung der Methode wurde die DNA nach beiden Schritten isoliert und die Quantität sowie die Qualität bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Auflistung der Ergebnisse der DNA-Isolierung bezüglich der DNA-Konzentration (Fluorometrie) und Qualität (Photometrie) nach der vorherigen Desinfektion des Walnussperikarps.

Desinfektionsmittel	Probe	Konzentration [ng/μL]	260/280	260/230
70 %iger Ethanol	1	0,958	2,03	1,30
	2	2,71	1,72	1,45
	3	2,99	1,78	1,47
	Mittelwert	2,21 ± 1,10	1,84 ± 0,16	1,41 ± 0,09
0,5 %ige Natriumhypochlorit-Lösung	1	0,389	1,36	0,991
	2	0,277	1,18	0,862
	3	1,07	1,68	0,940
	Mittelwert	0,579 ± 0,430	1,41 ± 0,25	0,931 ± 0,065

In Anbetracht der Ergebnisse (s. Tabelle 4) und der Durchführung eines t-Testes mit einem Konfidenzintervall von 95 % (Alphadi-Tab) wurde deutlich, dass kein signifikanter Unterschied in der DNA-Konzentrationen ( $p=0,138$ ) und der Reinheit bezüglich der Proteinkontamination ( $p=0,87$ ) vorlag (vgl. Kapitel 2.3.3;  $260/280 > 1,8$ ;  $260/230 > 2,0$ ). Nur die Reinheit in Bezug auf organische Kontaminanten wies einen signifikanten Unterschied auf ( $p=0,005$ ), sodass hierbei die Inkubation mit Ethanol bessere Ergebnisse erzielte. Somit konnte von einer Kontamination mit organischen Substanzen und Proteinen ausgegangen werden. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erläutert, ist Natriumhypochlorit in der Lage Nucleinsäuren zu oxidieren und eine Schädigung der DNA zu bewirken. Diese trat nicht nur in den Bakterienzellen auf, sondern zusätzlich in den Zellen des Walnussperikarps. Anhand der Sequenzierung des Blattmaterials konnte bereits die effektive Verringerung der bakteriellen DNA nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.3.1), sodass davon auszugehen ist, dass das Natriumhypochlorit zusätzlich eine Degradierung der DNA des Walnussperikarps bewirkte. Da der Einsatz mit Ethanol bessere Ergebnisse bezüglich der Reinheit erzielte, wurde diese Methode fortan eingesetzt und die Wirkung mit Hilfe einer Abklatschplatte überprüft. Um weitere Umwelteinflüsse zu erfassen, wurde zusätzlich das Reinstwasser, die Laborluft (eine offene Platte wurde für 4 h im Labor ausgelegt), ein unbehandeltes Walnussperikarp und eine ungereinigte Arbeitsfläche überprüft, um Rückschlüsse auf eventuelle Kontaminationen ziehen zu können. Die Ergebnisse sind im Anhang 9.3.1 aufgeführt. Anhand der Abbildung 63 im Anhang 9.3.1 wird deutlich, dass die Keimbelastung durch die Ethanol-Behandlung deutlich reduziert werden konnte, sodass nur wenige Bakterienkolonien vorhanden waren. Zusätzlich konnte die Keimfreiheit von dem Reinstwasser bestätigt (s. Anhang 9.3.1 Abbildung 65) werden und eine ubiquitäre Bakterien-Kontamination war durch die Trocknung des Walnussperikarps an der Luft nicht zu vermeiden (s. Abbildung 64). In Anbetracht der Ergebnisse wurde die Desinfektion als erfolgreich eingestuft und für alle weiteren Proben angewandt.

### 4.1.2 Probenvorbereitung für das Blatt- und Samenmaterial

Anfangs wurden alle Proben mechanisch aufgeschlossen, indem sie unter flüssigem Stickstoff gemörsert wurden, wobei erfolgreich pulverförmiges Ausgangsmaterial erhalten wurde, das sich für die DNA-Isolierung eignete. Hierbei wurden Zellverbände gebrochen und die Zellwand teilweise zerstört, sodass die DNA-Isolierung dadurch erleichtert wurde (Rogers und Bendich 1989). Zudem liegt die DNA in einem nicht hydratisierten Zustand vor und ist somit weniger anfällig für Scherkräfte. Zusätzlich wird die nukleolytische Degradation minimiert und die Lagerfähigkeit auf mehrere Jahre verlängert, ohne signifikante Defizite bei der DNA-Qualität zu erhalten (Murray und Thompson 1980). Des Weiteren wurde durch die lipidhaltige Matrix des Walnussamens eine Homogenisierung zu einem feinen Pulver erleichtert, da unter Raumtemperatur eine feste, viskose Masse entstand.

## 4.2 DNA-Isolierung aus Walnussmaterial

Zu Beginn wurden diverse Isolierungsmethoden überprüft und Optimierungen mit den Walnussmaterialien durchgeführt und die Verfahren hinsichtlich ihrer Qualität (Ratio 260/280, 260/230, photometrisch) und Quantität (fluorimetrisch) beurteilt. Nachdem die optimale Methode ausgewählt wurde, erfolgte die Aufarbeitung des authentischen Probenmaterials. Hierbei konnte erfolgreich DNA aus Blatt-, Perikarp- und Samenmaterial isoliert werden, um anschließend *Downstream*-Methoden durchführen zu können (vgl. Kapitel 4.3-4.6).

### 4.2.1 Gesamt DNA-Isolierung aus Samen- und Blattmaterial der Walnuss

Hierbei wurden insgesamt vier verschiedene Methoden (s. Kapitel 5.2.1) überprüft. Das peqGOLD Plant DNA Mini-Kit (VWR) und die CTAB-Isolierungsmethode in Verbindung mit einer Silika-Säule nach Brüning *et al.* (2011) wurden jeweils für Blatt- und Samenmaterial angewandt. Des Weiteren wurde das Blattmaterial nach eine der ersten, klassischen CTAB-Methode nach Doyle *et al.* (1991) isoliert, welches explizit für Blattmaterial entwickelt wurde. Diesbezüglich wurde ebenfalls eine Methode nach Akkak *et al.* (2008) überprüft, die sich auf eine DNA-Isolierung aus Nussamen fokussierte. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden alle Isolate in 200 µL Reinstwasser eluiert.

Die Ergebnisse der DNA-Isolierung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt, dabei wird die Qualität durch den Quotienten aus A260/A280 und A260/A230 charakterisiert (Photometrie) und die Quantität durch die Messung der Absorption (Flurometrie).

Tab. 5: Auflistung des verwendeten Probenmaterials (Sorte unbekannt) von zwei unterschiedlichen Walnussamenproben in einer Doppelbestimmung und die dazugehörigen Einwaagen für die DNA-Isolierung, die qualitativen Parameter und die DNA-Konzentration.

Methode	Probe	Einwaage [mg]	A260/A230	A260/A280	c [ng/μL]
peqGOLD Plant DNA Mini-Kit	01	50,7	0,731	1,92	0,895
	01	49,9	0,754	2,23	1,08
	02	50,2	0,990	1,61	1,39
	02	50,7	0,740	1,54	1,09
Mittelwert			<b>0,81 ± 0,13</b>	<b>1,86 ± 0,32</b>	<b>1,11 ± 0,20</b>
nach Brüning <i>et al.</i> (2011)	01	150,3	2,50	2,24	2,72
	02	151,2	2,52	2,27	3,44
	02	151,7	2,39	2,14	10,0
	02	150,1	2,42	2,16	4,95
Mittelwert			<b>2,54 ± 0,06</b>	<b>2,26 ± 0,06</b>	<b>5,28 ± 3,28</b>
nach Akkak <i>et al.</i> (2008)	01	1021,6	0,349	1,53	6,40
	01	1076,8	0,401	1,59	30,0
	02	1052,6	0,333	1,95	20,0
	02	1028,0	0,408	1,54	24,0
Mittelwert			<b>0,378 ± 0,038</b>	<b>1,65 ± 0,20</b>	<b>20,1 ± 10,0</b>

Tab. 6: Auflistung des verwendeten Probenmaterials (Sorte unbekannt) von zwei unterschiedlichen Walnussblattproben in einer Doppelbestimmung und die dazugehörigen Einwaagen für die DNA-Isolierung, die qualitativen Parameter und die DNA-Konzentration.

Method	Probe	Einwaage [mg]	Ratio 260/230	Ratio 260/280	c [ng/μL]
peqGOLD Plant DNA Mini-Kit	01	105,5	1,14	1,76	15,0
	01	106,4	1,13	1,65	11,0
	02	104,8	1,28	1,83	8,40
	02	107,3	1,21	1,76	11,0
Mittelwert			<b>1,19 ± 0,07</b>	<b>1,75 ± 0,07</b>	<b>11,4 ± 2,72</b>
nach BRÜNING <i>et al.</i> (2011)	01	149,8	2,22	2,22	7,70
	01	151,3	2,18	2,17	7,10
	02	151,0	2,23	2,20	13,0
	02	152,5	2,24	2,19	11,0
Mittelwert			<b>2,22 ± 0,02</b>	<b>2,20 ± 0,02</b>	<b>9,70 ± 2,79</b>
nach DOYLE <i>et al.</i> (1991)	01	537,0	1,97	2,17	87,0
	01	504,0	2,00	2,09	97,0
	02	535,4	2,13	2,19	100,0
	02	506,9	2,07	2,05	117,0
Mittelwert			<b>2,04 ± 0,03</b>	<b>2,13 ± 0,07</b>	<b>100 ± 12</b>

Für die Qualifizierung wurde der Quotient aus A260/A230 ( $Q_{260/230}$ ) und A260/A280 ( $Q_{260/280}$ ) herangezogen, wobei ersteres über einem Wert von 2,0 und letzteres über einem Wert von 1,8 liegen sollte, um als reines Isolat klassifiziert zu werden. Hierbei wurde deutlich, dass sowohl bei den Blättern als auch bei den Samen die Methode nach Brüning *et al.* (2011) die höchste Reinheit aufwies (Kern:  $Q_{260/230} = 2,54$  und  $Q_{260/280} = 2,26$ , Blatt:  $Q_{260/230} = 2,22$  und  $Q_{260/280} = 2,20$ ). Dies könnte sich durch die Verwendung einer Silika-Säule begründen, die bereits erfolgreich für die Isolierung von anspruchsvollen DNA-Proben (*ancient DNA*) eingesetzt wurde und als schnell und einfach zu handhaben gilt (Anderung *et al.* 2008). Durch die Verwendung dieser speziellen Säulen können PCR-Inhibitoren besser eliminiert werden, da diese nur in geringen Konzentrationen an die Säule adsorbieren und im Waschschrift entfernt werden (Yang *et al.* 1998). Besonders Salze und andere Pufferkomponenten verbleiben bei konventionellen DNA-Isolierungsmethoden im Extrakt und inhibieren weitere *Downstream*-Anwendungen. Hierbei war der Einsatz eines chaotropen Salzes notwendig, um eine Adsorption der DNA an die Silanolgruppen der Säule zu induzieren. Dabei werden

die Hydrathüllen verdrängt, um eine Bindung zwischen den Molekülen auszubilden, die wahrscheinlich auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beruht, die mit den schwächeren elektrostatischen Abstoßungen konkurrieren (Melzak et al. 1996). Die Stärke der Bindung ist von der Fragmentlänge der DNA abhängig, je größer das Fragment, desto stärker erfolgt die Adsorption an die Säulenoberfläche (Shi et al. 2015). Durch die hohe Bindekapazität von 30 bis 40 µg DNA konnte davon ausgegangen werden, dass keine Kapazitätsüberschreitung vorlag (ALEXANDER et al. 2007). Die Elution erfolgte unter Niedrigsalzbedingungen, wodurch eine Rehydratisierung der Silanolgruppen hervorgerufen wird (Green und Sambrook 2016). Dennoch wurde in anderen Studien experimentell nachgewiesen, dass 5 bis 10% der DNA nach der Elution auf der Säule verblieben (MARCHERY-NAGEL 2014). Unterstützt wurde die DNA-Isolierung durch den verwendeten Extraktionspuffer, bestehend aus den Reagenzien EDTA, Tris-Base und CTAB. Diese Kombination zeigte sich als sehr wirkungsvoll. Zum einen bewirkt das CTAB, dass die DNA von den Histonen dissoziiert wird (Allen et al. 2006), zum anderen werden die Proteine präzipitiert. Die DNA verbleibt durch den Einsatz von Natriumchlorid in Lösung, da eine ionische Bindung zwischen dem Natrium-Ion und dem negativen Phosphatrückgrat der DNA ausgebildet wird und die DNA somit nicht in der Lage ist mit CTAB zu präzipitieren (Murray und Thompson 1980). Hierbei wirken die zusätzlichen Komponenten EDTA und Tris-Base unterstützend, da die DNAsen durch EDTA inhibiert werden und der pH-Wert durch die Puffersubstanz Tris-Base konstant gehalten wird, sodass die DNA in einer stabilen Form vorliegt (pH 7 bis 8) (Tateishi-Karimata und Sugimoto 2014). Während der Aufarbeitung wurde deutlich, dass sich die doppelte Extraktion mit Chloroform positiv auf die Reinheit der DNA auswirkte (Kern:  $Q_{260/230} = 2,54$  und  $Q_{260/280} = 2,26$ , Blatt:  $Q_{260/230} = 2,22$  und  $Q_{260/280} = 2,20$ ), wohingegen die anderen Methoden auf einer einmaligen Extraktion beruhten. Hierbei werden lipophile Verbindungen extrahiert und Proteine denaturiert indem die hydrophoben Wechselwirkungen beeinflusst werden, sodass die native Proteinstruktur verändert wird und eine Aggregatbildung der Proteine einsetzt, die bis zur Präzipitation der Proteine führt (Asakura et al. 1978). Des Weiteren besitzen Walnussblätter und -samen eine hohe Polyphenolkonzentration (Escobar et al. 2008). Besonders *o*- und *p*-Isomere von Diphenyl-Verbindungen und Aminophenole zeigen eine ausgeprägte Fähigkeit DNA zu degradieren. Zwar ist der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt, jedoch werden Polyphenole bei diesem Vorgang oxidiert. Ebenso verhält es sich mit den Flavonoiden, wobei deren OH-Gruppe aktiv an der DNA-Degradierung beteiligt ist (Yamada et al. 2014). Der Großteil dieser lipophilen Substanzen konnte mit Hilfe einer Chloroform-Extraktion eliminiert werden, sodass eine Degradierung der DNA minimiert wurde.

Als weitere Methode wurde das peqGOLD Plant DNA Mini-Kit getestet, welches speziell für Pflanzenmatrizes entwickelt wurde. Im Vergleich zur Methode nach Brüning *et al.* (2011) wurde eine signifikant niedrigere Reinheit erreicht (Kern:  $Q_{260/230} = 0,81$  ( $p=0,0$ ) und  $Q_{260/280} = 1,86$  ( $p=0,01$ ), Blatt:

$Q_{260/230} = 1,19$  ( $p=0,0$ ) und  $Q_{260/280} = 1,75$  ( $p=0,1$ )), da fast alle Werte des t-Tests ein  $p < 0,05$  erreichten, mit Ausnahme der Reinheit in Bezug auf die organische Kontamination, die keinen signifikanten Unterschied besaß ( $p=0,1$ ). Das Kit ist universell für Pflanzenmatrizes einsetzbar, allerdings müsste die Methode für Walnussmaterial optimiert werden. Die hohen Konzentrationen an sekundären Pflanzenstoffen wurden trotz Verwendung einer Silika-Säule nur teilweise reduziert. Zudem zeigten sich bereits nach dem Extraktionsschritt mit dem peqGOLD Plant DNA Mini-Kit Probleme bei der Phasentrennung, die auf die erhöhte Konzentration an organischen Verbindungen und Proteinen zurückzuführen war.

Die Methode nach Akkak *et al.* (2008) erzielte hierbei unzureichende qualitative Ergebnisse (Kern:  $Q_{260/230} = 0,37$  und  $Q_{260/280} = 1,65$ ). Der Quotient  $Q_{260/230}$  nahm hierbei einen niedrigen Wert ein, der auf eine starke Kontamination mit sekundären Pflanzenstoffen hinwies. Ebenso wurden Proteine in nicht ausreichender Form abgetrennt, da der Wert von  $Q_{260/280}$  unterhalb von 1,8 lag. Obwohl diese Methode speziell für Nussamen optimiert wurde und diverse Methoden kombinierte, schnitt sie im Vergleich zu Brüning *et al.* (2011) ( $p_{260/230}=0,0$ ;  $p_{260/280}=0,01$ ) signifikant schlechter ab und war qualitativ auf einer Stufe mit dem peqGOLD Plant DNA Mini-Kit ( $p_{260/230}=0,2$ ;  $p_{260/280}=0,6$ ). Eine mögliche Reduzierung der Kontaminanten könnte durch eine wiederholte Chloroform:Isoamylalkohol-Extraktion erzielt werden. Die Annahme beruht auf dem Nernst'schen Verteilungsgesetz, dessen Grundlage basiert auf einer Zwei-Phasenextraktion, in diesem Fall eine polare, wässrige Phase und eine unpolare Chloroform-Phase. Durch das Schütteln wird die Phasengrenze vergrößert und ein Teil der sekundären Pflanzenstoffe dissoziierte in die unpolare Phase, wobei sich ein Verteilungsgleichgewicht einstellt (Guha und Guha 1992). Durch Entfernung der unpolaren Phase und dem Zusatz einer neuen unpolaren Chloroform-Phase erfolgt ein erneutes Einstellen des Gleichgewichtes. Je öfter dieser Vorgang durchgeführt wird, desto größer ist der Anteil an sekundären Pflanzenstoffen und lipophilen Substanzen, die aus der wässrigen Phase entfernt werden. Jedoch müssen signifikante Verluste der DNA mit einkalkuliert werden. Die Zugabe von Isoamylalkohol soll das Schäumen während der Extraktion minimieren und die Ausbildung einer Phasengrenze beschleunigen, allerdings trat bei Abwesenheit dieses Zusatzes keines der genannten Effekte auf (Moore und Dowhan 2002).

Bei der entwickelten Methode von Doyle (1991) (Blatt:  $Q_{260/230} = 2,04$  und  $Q_{260/280} = 2,13$ ) für die Isolierung von DNA aus Blattmaterial erreichte die Reinheit ähnliche Werte wie die Methode nach Brüning *et al.* (2011) ( $Q_{260/230} = 2,22$  und  $Q_{260/280} = 2,20$ ) ohne den Einsatz einer Silika-Säule. Hierbei besaß die Reinheit  $Q_{260/230}$  einen signifikanten Unterschied ( $p=0,02$ ), jedoch keinen bei dem Wert  $Q_{260/280}$  ( $p=0,14$ ). Der Extraktionspuffer war nahezu identisch mit Ausnahme des  $\beta$ -Mercaptoethanols, welches Doyle (1991) einsetzte. Dieses verhindert die Oxidation von Polyphenolen und dementsprechend eine Degradation der DNA. Des Weiteren inhibiert es Proteine und beschleunigte deren Präzipitation (Khan et al. 2000). Die Effektivität dieses Reagenzes spiegelte sich in den hohen Reinheitswerten wider, da nachfolgend

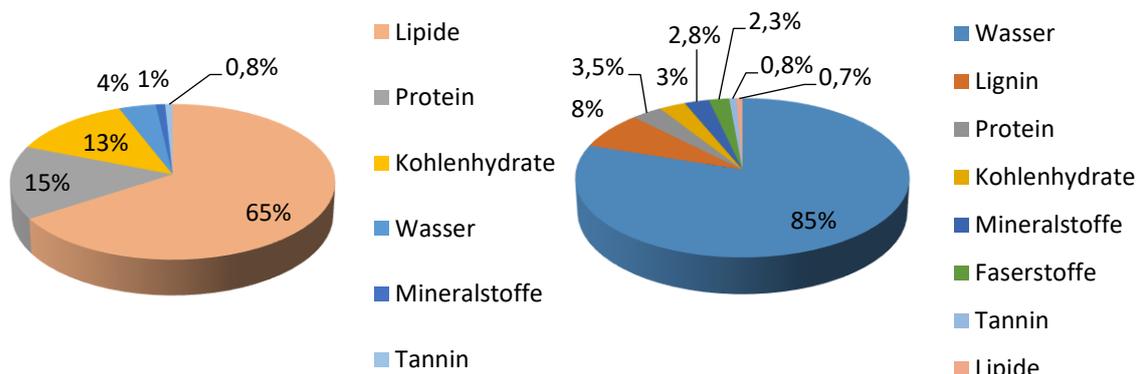
keine entscheidenden Veränderungen im Ablauf im Vergleich zu Brüning *et al.* (2011) vorhanden waren. Ein weiterer Unterschied bestand in der Zusammensetzung des Waschpuffers, der bei Doyle (1991) hauptsächlich aus Ammoniumacetat und bei Brüning *et al.* (2011) aus einer Kombination von Tris-Base, EDTA und NaCl bestand. Hierbei besitzt das Ammoniumacetat die Hauptfunktion eine Präzipitation der Histone hervorzurufen, sodass die DNA frei vorliegt und separiert werden kann, um ein reines Isolat zu erhalten. Zudem beschäftigte sich eine Studie von Saporito-Irwin *et al.* (1997) mit dem Vergleich einer Säulenchromatographie und einer Ammoniumacetat-Präzipitation, wobei ähnliche Ergebnisse wie in dieser Forschungsarbeit erzielt wurden. Beide Methoden wiesen nahezu identische Reinheiten auf und konnten für weitere *Downstream*-Methoden verwendet werden.

Bezüglich der Quantität wurden die Ergebnisse auf 100 mg Einwaage normiert, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können. Die Resuspension erfolgte bei allen Methoden mit 200 µL Reinstwasser, sodass hier keine weitere Normierung vorgenommen werden musste. In der nachfolgenden Tabelle sind die Werte vergleichend aufgeführt.

Tab. 7: Auflistung der vier Methoden und deren normierte Konzentration auf 100 mg Probeneinwaage von jeweils vier Proben pro Experiment.

	Brüning <i>et al.</i> (2011)	Doyle (1991) (Blätter)	peqGOLD Plant DNA Mini-Kit	AKKAK <i>et al.</i> (2008) (Samen)
<b>Ausbeute</b>	3,5 ± 2,1 (Samen)	20 ± 2,5	1,1 ± 0,2 (Samen)	2,0 ± 1,0
<b>[ng/µL]</b>	6,5 ± 1,9 (Blatt)		11,4 ± 2,7 (Blatt)	

Hierbei wurde ersichtlich, dass Blätter sich allgemein besser für eine DNA-Extraktion eignen und sich auch in der Literatur größtenteils auf Blattmaterial für die DNA-Isolierung fokussiert wird (Doyle 1991; Kasajima 2018). Die Zusammensetzung des Blattmaterials und des Samens variiert hinsichtlich der



organischen und anorganischen Komponenten (s. Abbildung 22).

Abb. 22: Durchschnittliche Zusammensetzung (links) eines Pflanzenblattes der Spezies *Piper betle* (Guha 2017), (rechts) eines Walnussamens (Sze-Tao *et al.* 2001; Ros 2010). Es wurden keine verfügbaren Daten zur Zusammensetzung eines Walnussblattes in der Literatur gefunden. Daher wurde die Pflanze *Piper betle* als Modellorganismus herangezogen.

Die wässrige Matrix des Blattmaterials erleichtert die Isolierung von pflanzlicher DNA, wobei inhibierende Komponente wie Proteine, Kohlenhydrate und Lipide in Summe weniger als 10 % der Gesamtmasse einnehmen (Guha 2017). Im Gegensatz dazu besteht der Samen zu über 60 % aus Lipiden, zu jeweils 15 % aus Proteinen und Kohlenhydraten und nur zu 4 % aus Wasser. Die Einflüsse der einzelnen Komponenten auf die Reinheit der DNA-Extraktion wurden bereits ausführlich im Kapitel 2.3.1 sowie 2.3.2 und im vorherigen Abschnitt detailliert erläutert. Zudem hemmt eine komplexe Matrix die DNA-*Exploitation*, unter anderem können irreversible Komplexe entstehen, sodass ein Teil der DNA nicht mehr zur Verfügung steht (Tan und Yip 2009). Hierbei binden Polyphenole in ihrer oxidierten Form kovalent an die DNA, die durch die Destruktion der Zelle freigesetzt werden (Peterson et al. 1997). Dieser Effekt wird durch eine Braunfärbung des Extraktes visualisiert. Zum anderen können diese Substanzen ein Verschluss der Trennsäule herbeiführen und dadurch die Bindungsstellen für die DNA blockieren, sodass signifikante DNA-Verluste auftreten (Fleischmann und Heubl 2009). Diese Vermutungen spiegeln sich in den quantitativen Ergebnissen der jeweiligen Methoden wider. So ergab die Isolierung der DNA nach Brüning *et al.* (2011) eine mittlere Konzentrationen von 3,5 ng/μL, mittels Kit 1,1 ng/ μL und nach Akkak *et al.* (2008) 2,0 ng/μL. Bei Verwendung der Blattmatrix im Vergleich zum Samen wurden allerdings signifikant höhere Konzentrationen bei identischer Durchführung erreicht, nach Brüning *et al.* (2011) Konzentrationen von 6,4 ng/μL ( $p=0,04$ ) und mittels Kit 11 ng/μL ( $p=0,005$ ). Anhand der Ergebnisse wurde ersichtlich, dass sich Brüning *et al.* (2011) als optimale Methode präsentierte, um hohe DNA-Konzentrationen und Reinheiten zu erhalten. Einzig die Isolierungsmethode nach Doyle (1991) wies für Blattmatrizes kongruierende Ergebnisse auf und könnte als Alternative für die Blattisolierung herangezogen werden.

#### 4.2.2 Gesamt DNA-Isolierung inklusive Probenvorbereitung aus dem Walnussperikarp

Damit die DNA erfolgreich aus dem Walnussperikarp isoliert werden konnte, musste zu Beginn eine geeignete Methode für die Zerkleinerung der harten Matrix etabliert werden. Dies war notwendig, um die Zellverbände aufzubrechen und somit die Oberfläche zu vergrößern und sie besser für den Extraktionspuffer zugänglich zu machen. Hierbei wurden diverse Methoden überprüft, unter anderem die Methode nach Brüning *et al.* (2011) (s. Kapitel 5.2.1.2) und die Ergebnisse miteinander verglichen. In dem folgenden Abschnitt werden die einzelnen Methoden vorgestellt und die Ergebnisse präsentiert sowie Vor- und Nachteile abgewogen. Zur Übersicht ist nachfolgend eine Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabellenform aufgeführt.

Tab. 8: Darstellung der angewandten Methoden und die verwendete DNA-Isolierungsmethode mit den erhaltenen Ergebnissen aus zwei Probenmessungen, Ausnahme Programm 2 mit Methode 1 mit 4 Probenmessungen, bezüglich der Qualität und Quantität der DNA. Die Programmparameter befinden sich im Kapitel 5.1.2. Hierbei markiert ein „-“, keine Messung und ein „/“ kein Ergebnis. Hierbei wurden 150 mg Probenmaterial für die DNA-Isolierung eingesetzt.

Zellaufschluss-Methode	DNA-Isolierung	260/280	260/230	Mittelwert Konzentration [ng/µL in 50 µL]
Hammer	Brüning <i>et al.</i> (2011)	-	-	0,11 ± 0,00
<i>Bead Ruptor</i> <sub>24</sub> Programm 1	Brüning <i>et al.</i> (2011)	-	-	0,07 ± 0,10
<i>Bead Ruptor</i> <sub>24</sub> Programm 2	Brüning <i>et al.</i> (2011)	-	-	0,35 ± 0,17
	Brüning <i>et al.</i> (2011), Extraktion: 20 h, 25 °C, 350 rpm	-	-	0,22 ± 0,02
	Rohland und Hofreiter (2007), Extraktion: 1 h, 65 °C, 650 rpm	-	-	0,117
	Rohland und Hofreiter(2007), Extraktion: 20 h, 25 °C, 350 rpm	-	-	0,42 ± 0,40
<i>Bead Ruptor</i> <sub>24</sub> Programm 3	Brüning <i>et al.</i> (2011)	-	-	0,16 ± 0,08
<i>Bead Ruptor</i> <sub>24</sub> Programm 4	Brüning <i>et al.</i> (2011)	-	-	0,12 ± 0,03
<i>Bead Ruptor</i> <sub>24</sub> Programm 5	Brüning <i>et al.</i> (2011)	-	-	0,17 ± 0,10
Messermühle	Brüning <i>et al.</i> (2011)+ Glasperlen (GP)	1,44 ± 0,01	0,84 ± 0,11	1,73 ± 0,44
	Asif und Cannon (2005)	2,00 ± 0,06	0,49 ± 0,40	0,18 ± 0,13
	Jiao <i>et al.</i> (2012)	1,37 ± 0,11	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,00
	Jiao <i>et al.</i> (2012) + Murray und Thompson (1980)	1,35 ± 0,11	0,31 ± 0,01	2,52 ± 0,01

### Zerkleinerung des Walnussperikarps mit Hilfe eines Hammers

Zu Beginn wurde eine einfache, mechanische Zerkleinerung mit Hilfe eines handelsüblichen Hammers (200 g Kopfgewicht) gewählt, der mit Alufolie umwickelt wurde, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Hierbei wurden im ersten Schritt grobe Walnussstückchen hergestellt und ausgewählte Teile zu einem feinen Pulver zerkleinert. Die Schwierigkeit bestand in der gleichmäßigen und reproduzierbaren Zerkleinerung des Walnussperikarps und zum anderen war ein großer Kraftaufwand notwendig. Anschließend wurde die DNA-Isolierung nach der Methode von Brüning *et al.* (2011) durchgeführt. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Doppelbestimmung ergaben im Durchschnitt 0,11 ng/ $\mu$ L DNA in einem 50  $\mu$ L Isolat. Auf Grund der unzureichenden DNA-Konzentration wurde auf eine Reinheitsbestimmung verzichtet und die Methode als nicht zielführend eingestuft. Die Festigkeit des Walnussperikarps ist durch seine besondere Struktur zu erklären. In einer Studie von Randall *et al.* (2019) wurde eine neue Zellstruktur definiert, die als Polylobat-Skleridzellen bezeichnet werden und charakteristisch für das Walnussperikarp sind. Diese bestehen aus diversen konkaven und konvexen Formen, welche in unregelmäßigen Verbänden zusammengefügt sind und ein komplexes Muster ausbilden. Zusätzlich erfolgt im Walnussperikarp ein Einbau von Lignin, um eine hohe Stabilität zu erreichen und den Samen vor mechanischen Einflüssen zu schützen (Lieberei und Reisdorff 2012). Des Weiteren werden eine Vielzahl an phenolischen Verbindungen eingelagert, um die Zellwände vor mikrobieller Zersetzung zu schützen. Diese Faktoren beeinträchtigen die Isolierung von reiner, hochwertiger DNA, sodass die Zerkleinerung in ein feines Pulver obligatorisch ist.

### Zerkleinerung des Walnussperikarps mit Hilfe eines Bead Ruptor<sub>24</sub>

Hierbei handelt es sich um eine Kugelmühle, wobei das zu mahlende Material mit Metallkugeln versetzt wird und durch eine äußere Krafteinwirkung die Zerkleinerung erfolgt. Durch den elektrischen Antrieb beginnen die Metallkugeln zu schwingen, so dass das Mahlgut zwischen zwei Kugeln oder der Gefäßwand verformt wird. Die Kontaktfläche ist dabei abhängig von der Größe der Kugelfläche, sodass durch unterschiedliche Kugelgrößen verschiedene Mahlgrade erzeugt werden können (Kotake *et al.* 2002). Damit das Walnussperikarp in ein 2-mL-Reaktionsgefäß überführt werden konnte, war eine Vorzerkleinerung mit Hilfe eines Hammers notwendig. Die Dauer der Zerkleinerung sollte sich auf ein Minimum beschränken, um ein feines Pulver zu erhalten, da keine direkte Kühlung des Probengefäßes möglich war und durch die Wärmeentwicklung eine Degradierung der DNA auftreten konnte (Moreano *et al.* 2005). Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Programmeinstellungen (s. Tabelle 8) überprüft. Die Pausen wurden genutzt, um die Proben zwischenzeitlich auf Eis zu kühlen und die Wahrscheinlichkeit einer zu starken Erwärmung zu verringern. Allerdings traten bei höheren Geschwindigkeiten Probleme mit dem 2-mL-Reaktionsgefäß auf, hierbei bildeten sich Risse in der Gefäßwand und der Deckel sprang ab. Somit wurden höhere Drehzahlen über 6,6 m/s ausgeschlossen,

wodurch das Walnussperikarp weniger pulverisiert vorlag. Die Isolierung der DNA erfolgte mit der Methode nach Brüning *et al.* (2011), jedoch zeigten sich kaum Unterschiede im Vergleich zur Aufarbeitung mit einem Hammer. So wurden DNA-Konzentrationen von 0,1 bis 0,4 ng/μL erzielt. Trotz höherer Geschwindigkeiten stieg die Konzentration nur in geringem Maße an (0,1-0,2 ng/μL). Zusammenfassend stellte sich diese Methode als nicht zielführend dar und es erfolgte diesbezüglich keine weitere Optimierung.

### Die Messermühle als optimales Verfahren zur Zerkleinerung des Walnussperikarps

Im Gegensatz zum Bead Ruptor<sub>24</sub> erfolgte die Zerkleinerung in einem großen Metallbehälter und mit vier elektrisch angetriebenen Messern, die sich am Boden des Gefäßes befanden. Hierbei können Partikelgrößen von <800 μm erreicht werden. Zur Kühlung wurde Trockeneis eingesetzt, welches nach der Vermahlung sublimierte, sodass keine Rückstände in der Probe verblieben. Ein weiterer Effekt wurde durch den extremen Temperaturunterschied begünstigt, wobei das Walnussperikarp spröder und somit leichter zu zerkleinern war. Während des Mahlvorganges wurde darauf geachtet, dass die Mahlzeit so gering wie möglich eingestellt wurde, da durch die extremen Scherkräfte eine DNA-Degradierung auftreten würde (Lengsfeld und Anchordoquy 2002). Daran schloss sich die DNA-Isolierung mit der Methode nach Brüning *et al.* (2011) an, wobei als Modifikation Glasperlen (GP) zum Extraktionspuffer zugefügt wurden, um zusätzlich eine weitere mechanische Komponente bei der Zellyse einzusetzen (Papanayotou *et al.* 2010). Die Ergebnisse der Isolierung legten den Schluss nahe, dass eine Erhöhung der durchschnittlichen DNA-Konzentration auf 1,7 und 2,5 ng/μL DNA technisch möglich war. Im Gegensatz dazu erzielten vorherige Zerkleinerungsmethoden im Durchschnitt eine DNA-Konzentration von 0,3 ng/μL. Allerdings war die Reinheit unzureichend, da  $Q_{260/280}$  einen Wert von 1,44 aufwies, welches einen Hinweis für eine Kontamination mit Proteinen darstellte. Ebenso wurden organische Kontaminationen nur unzureichend eliminiert, da der Wert  $Q_{260/230}$  0,84 betrug. Die Methode nach Brüning *et al.* (2011) bewährte sich bereits bei Blatt- und Samenmaterial, sodass die reduzierte DNA-Qualität auf der Zusammensetzung des Walnussperikarps zurückzuführen war. Eine mögliche Ursache könnte die Bindung der Carbonylgruppe der organischen Molekülen wie Proteine, Polysaccharide oder Alkohol an die Silika-Oberfläche der Säule sein (Parida *et al.* 2006). Im Gegensatz zum Blatt- oder Samenmaterial bestand das Walnussperikarp überwiegend aus Polysacchariden, Cellulose und Lignin, anstelle von Wasser oder Lipiden (Randall 2019). Dadurch wurde eine Aufreinigung gehemmt, da diese Bestandteile nur unvollständig mit Hilfe einer Silika-Säule separiert werden konnten. Aus diesem Grund wurden weitere DNA-Isolierungsmethoden überprüft, um eine Maximierung der Reinheit zu bewirken.

Auf Grund der ähnlichen Vorgänge beim sekundären Dickenwachstums von Bäumen und bei der Verholzung des Walnussperikarps wurden zwei Methoden ausgewählt, die für eine DNA-Isolierung aus Holz geeignet sind (Asif und Cannon 2005; Jiao *et al.* 2012). Durch das sekundäre Dickenwachstum

bilden Pflanzen ein stabileres Gewebe aus. Dabei wird durch die Zellteilung des Kambiums ständig neue Zellen produziert, sodass ältere Zellen nach außen wandern. In den äußeren Zellen kommt es zur Einlagerung von Lignin, wodurch der Stoffaustausch unterbrochen wird und den Zelltod herbeiführt (Lieberei und Reisdorff 2012). Dieser Vorgang erfolgt analog im Walnussperikarp, wobei bis zur Reife eine vollständige Verholzung eintritt. Zusätzlich schützt das Walnussperikarp den Samen durch Ausbildung einer harten, komplexen Polylobat-Skleridzellenstruktur (Randall 2019). Das Ergebnis der beiden Methoden ist in Tabelle 8 dargestellt. Die Isolate der Methode von Asif und Cannon (2005) besaßen keine Proteinkontamination ( $Q_{260/280} = 2,0$ ), wiesen allerdings eine hohe Konzentration an organischen Substanzen auf ( $Q_{260/230} = 0,49$ ). Im Vergleich zu Brüning *et al.* (2011) ergab sich ein kein signifikanter Unterschied ( $p_{260/280} = 0,06$  und  $p_{260/230} = 0,4$ ). Die Isolate der Methode nach Jiao *et al.* (2012) wiesen keinen signifikanten Unterschied zu der Methode nach Brüning *et al.* (2011) auf, sie erreichten nur einen  $Q_{260/280}$  -Wert von 1,37 sowie einen  $Q_{260/230}$  -Wert von 0,1 ( $p_{260/280} = 0,09$  und  $p_{260/230} = 0,5$ ), sodass von einer sehr hohen Kontamination von organischen Substanzen auszugehen war. Im Gegensatz zur Methode nach Brüning *et al.* (2011) verwenden beide Methoden keine Silika-Säulen. Die Methode nach Jiao *et al.* (2012) verzichtete zudem auf den Einsatz eines Waschpuffers und eine Reinigung erfolgt nur durch 75 %iges Ethanol. Diese Reinigungsart war jedoch nicht ausreichend, um den hohen Anteil an organischen Verbindungen im Walnussperikarp zu eliminieren. Hierbei wäre bei der Methode nach Jiao *et al.* (2012) die zusätzliche Verwendung eines Waschpuffers obligatorisch, um die sekundären Pflanzenstoffe zu entfernen. Im Vergleich der drei Methoden besaß Brüning *et al.* (2011) eine etwas höhere Proteinkontamination als Asif und Cannon (2005), allerdings konnten höhere DNA-Konzentrationen erhalten werden. Die beiden anderen Methoden wiesen Konzentrationen in einem Bereich von 0,18 und 0,2 ng/ $\mu$ L auf (s. Tabelle 8), wohingegen die Methode nach Brüning *et al.* (2011) 1,73 ng/ $\mu$ L erzielte bei gleicher Reinheit. Eine mögliche Ursache lag in der differierten Dauer und Temperatur der Präzipitationszeit. Beide Methoden besaßen eine Inkubationstemperatur von -20 °C, wobei die Inkubationszeit bei der Methode nach Jiao *et al.* (2012) eine Stunde und bei der Methode von Asif und Cannon (2005) über Nacht verlief. Bereits Chen *et al.* (Chen *et al.* 2010) beschäftigten sich intensiv mit den Parametern für die DNA-Präzipitation. Dabei erhielten sie die optimalen Ergebnisse bei einer Temperatur von 4 °C und dem größten Inkubationsvolumen, sowie einer sofortigen Zentrifugation. Bei der Methode nach Brüning *et al.* (2011) wurde eine Inkubationstemperatur von 4 °C und eine Inkubationszeit über Nacht eingehalten, sodass ähnliche Parameter wie bei Chen *et al.* (2010) verwendet wurden.

Somit kann abschließend zusammengefasst werden, dass sich die Methode nach Brüning *et al.* (2011), modifiziert mit Glasperlen und einer verlängerten Inkubationszeit, sich als optimal bewährte. Aus diesem Grund wurden alle authentischen Proben mit dem Verfahren aufgearbeitet. Um die geringere DNA-Konzentration auszugleichen, wurde von einigen Sorten mehrere Proben simultan extrahiert und

auf der Silika-Säule vereint. So konnte gewährleistet werden, dass genug DNA für weiterführende Methoden vorhanden und eine Reinigung mittels des Monarch®Kits durchführbar war. Die Ergebnisse der Isolierung sind im Anhang 9.4.2 aufgeführt. Hierbei variierte die isolierte DNA-Konzentration zwischen den einzelnen Sorten. Zwar traten Schwankungen auch innerhalb einer Sorte auf, so konnte bei der ersten Isolierung von Franquette 28 ng/μL DNA und in der zweiten Isolierung nur 6,2 ng/μL DNA erhalten werden. Allerdings wurde bei der Sorte Serr ersichtlich, dass trotz der Zusammenführung mehrerer Ansätze nur 1,71 ng/μL und 4,25 ng/μL DNA isoliert werden konnten und somit ein Zusammenhang zwischen der DNA-Konzentration und dem Walnussperikarp der einzelnen Walnussorten besteht, die auf eine unterschiedliche Perikarpstruktur zurückzuführen ist. So konnte beispielsweise bei der Sorte Lara 45 ng/μL DNA erhalten und eine Überladung der Säule ausgeschlossen werden, da zudem die Bindekapazität der Säule zwischen 30 und 40 μg betrug (NEB o. D. b). Die Ursache begründet sich unter anderem in dem unterschiedlichen Härtegrad des Walnussperikarps, so besitzen kalifornische Sorten eine dünnere Schale als französische Sorten (Tulecke und McGranham 1994). Dies spiegelte sich auch in den Ergebnissen wider, so wurde im Durchschnitt eine höhere DNA-Konzentration bei der Isolierung von kalifornischen Sorten erzielt (s. Anhang 9.4.2 Tabelle 63 und 64). Eine Ausnahme bildete die französische Sorte Lara, dessen Härtegrad durch die kalifornische Muttersorte Hartley geprägt wird und somit ein dünneres Perikarp aufweist. Die Reinheit der isolierten DNA befand sich bei allen Proben in einem akzeptablen bis sehr guten Bereich (s. Anhang 9.4.2 Tabelle 63 und 64). Dabei wurde der Wert von  $Q_{260/280}$  von fast allen Proben erreicht, mit Ausnahme von Serr (1,42) und Fernette (1,50). Dies könnte im Zusammenhang mit der niedrigen isolierten DNA-Konzentration stehen, durch eine erhöhte Konzentration an Proteinen und sekundären Pflanzenstoffen wurde die DNA-Isolierung inhibiert (Ghadia et al. 2016). Zum einen reagieren die entsprechenden Substanzen mit der DNA, sodass diese für die weitere Aufarbeitung nicht zur Verfügung steht, zum anderen können sie in Wechselwirkung mit der Oberfläche der Silika-Säule treten und Bindungsstellen blockieren (Parida et al. 2006; ALEXANDER et al. 2007). Der erhöhte Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen spiegelte sich auch in dem  $Q_{260/230}$ -Wert wider, der nur bei der Hälfte aller Proben in einem optimalen Bereich lag. Hierbei könnten weitere Pufferzusätze überprüft werden, um eine Komplexierung der diversen sekundären Pflanzenstoffe zu erreichen. So könnte Borax oder Sorbitol getestet werden, ersteres bildet mit Polysacchariden aus der Zellwand Komplexe, welche anschließend gelieren und abgetrennt werden können (Deuel und Neukom 1949). Auf einem ähnlichen Prinzip beruht die Wirkungsweise des Sorbitols, wodurch hauptsächlich Polysaccharide entfernt werden können (Jobes et al. 1995).

### 4.2.3 Isolierung der Chloroplasten-Plastiden aus Walnussamen und –blättern

Für die Sequenzierung der 12 Walnussorten war es notwendig, die Plastiden (Chloroplasten) anzureichern und in einer hohen Reinheit zu isolieren. Je besser die Abtrennung der ncDNA gelingt, desto mehr Kapazität der *Flow Cell* steht für die Sequenzierung des kompletten Chloroplasten-Genoms zur Verfügung.

Bezüglich der Isolierung wurden drei Methoden anhand von Blattmaterial überprüft, wobei sie sich im Wesentlichen in ihren Extraktionspuffern und Zentrifugationsschritten unterschieden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das Blattalter einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Chloroplasten und die Qualität und den Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen besitzt. Besonders ältere Blätter verfügen über eine hohe Konzentration an Polyphenolen, Tanninen und Polysaccharide (Varma et al. 2007). Zudem weisen Blätter, auf Grund der Photosynthese, im Vergleich zu anderen Pflanzengeweben die höchste Konzentration an Chloroplasten auf.

Die Zerkleinerung des Probenmaterials erfolgte bei allen Methoden mit Hilfe eines Ultra™-Turrax und einer anschließenden Filtration durch einen Miracloth-Filter. Anfangs wurde das Probenmaterial mit flüssigem Stickstoff vermahlen, allerdings wurden die Plastiden bei diesem Verfahren zerstört, sodass sich im Gradienten keine intakten Plastiden anreicherten. Mit dem Ultra™-Turrax konnte eine ausreichende Zerkleinerung des Samens- und Blattmaterials erreicht werden. Durch die zusätzliche äußere Eiskühlung sollte eine DNA-Degradierung minimiert und Nebenreaktionen unterbunden werden (Moreano et al. 2005). Der Miracloth-Filter diente zur Abtrennung von größeren Zellfragmenten, um die nachfolgende Isolierung zu erleichtern. Sie eignen sich besonders für hochviskose Matrices und bestehen aus einem Rayon-Polyester, einer baumwollartigen Struktur, die aus Cellulose gefertigt wird und somit als natürliche Kunstfaser einzustufen ist. Fragmente mit einem Durchmesser von 20 bis 25 µm können den Filter nicht passieren, die Chloroplasten mit einer durchschnittlichen Größe von 4 bis 6 µm sind dazu in der Lage (Li et al. 2013).

In Tabelle 9 befindet sich die Zusammenfassung der Ergebnisse der Methodenkombinationen bezüglich der Reinheit und der DNA-Konzentration.

Tab. 9: Die angewendeten Methodenkombinationen zur DNA-Aufreinigung wurden zusammen mit dem entsprechenden Probenmaterial, den Reinheitsparametern und der finalen DNA-Konzentration aufgelistet.

Nr.	Methode Chloroplasten	Methode DNA	Probe	280/260	260/230	c [ng/μL] Quantus™ (Elutionsvolumen)
1	Methode 1 Vieira <i>et al.</i> (2014) (Inkubationspuffer a)	Methode 2	Blatt	3,74	0,22	0,185 (240 μL)
2	Methode 3 (Inkubationspuffer a, Waschpuffer a)	Methode 3	Blatt	1,54	0,50	1,65 (100 μL)
3	Methode 1 Vieira <i>et al.</i> (2014) (Inkubationspuffer a)	Methode 1	Blatt	1,66	0,77	0,963 (200 μL)
4	Methode 3 (Inkubationspuffer b, Waschpuffer b)	Methode 1	Blatt	2,05	2,08	32,08 (100 μL)
5	Methode 1 Vieira <i>et al.</i> (2014) (Inkubationspuffer b)	Methode 1	Blatt	1,99	0,55	0,702 (100 μL)
6	Methode 1 Vieira <i>et al.</i> (2014) (Inkubationspuffer b)	Methode 1	Blatt	1,57	0,74	0,0237 (100 μL)
7	Methode 3 (Inkubationspuffer c, Waschpuffer b)	Methode 1 (Inkubation ü. Nacht)	Blatt	2,04	1,88	24,09 (100 μL)
8	Methode 2	Methode 1 (Inkubation ü. 2 Nächte)	Blatt	2,15	2,15	49,08 (100 μL)
9	Methode 3 (Inkubationspuffer c, Waschpuffer b)	Methode 1 (Inkubation ü. 2 Nächte)	Blatt	2,04	1,94	46,08 (100 μL)
10	Methode 2	Methode 1 (Inkubation ü. Nacht)	Blatt	2,06	1,93	31,00 (100 μL)
11	Methode 3 (Inkubationspuffer c, Waschpuffer b)	Methode 1	Nüsse	2,00	2,21	49,05 (100 μL)

### Isolierung der Plastiden (Chloroplasten)

#### **Methode 1**

Die erste Methode der Plastid-Isolierung basierte auf Vieira *et al.* (2014) in Kombination mit der Methode nach Jansen *et al.* (2005) in den zwei unterschiedlichen Variationen a und b, die sich in ihrem Extraktionspuffer differenzierten. Dabei wurde zu Beginn der Extraktionspuffer a verwendet, der im weiteren Verlauf optimiert wurde. Hierbei wurde im Extraktionspuffer b auf das  $\beta$ -Mercaptoethanol verzichtet und im Gegenzug Sorbitol eingesetzt. Der Einsatz der Pufferkomponenten EDTA,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Sorbitol und PVP wurde bereits in den vorherigen Kapiteln eingehend erläutert und wurde hauptsächlich zur Inhibierung der störenden sekundären Pflanzenstoffe angewendet. Durch den Zusatz von Sorbitol sollten einerseits Polysaccharide durch Gelierung entfernt werden, andererseits fördert das Osmotikum eine stabilere Reaktionsbedingung, um intakte Chloroplasten zu gewährleisten (Lutz *et al.* 2011). Des Weiteren konnte mit Hilfe diverser Zentrifugationsschritte eine Separierung von unterschiedlichen Zellbestandteilen vorgenommen werden. Durch eine beginnende Zentrifugation bei 200 rpm konnten größere Zellfragmente und –komponenten bereits abgetrennt werden, während die Plastiden in Lösung verblieben. Auch Zellkerne mit einer Dichte von über  $1,3 \text{ g/cm}^3$  sedimentieren teilweise (Follmann 2001). Erst durch höhere Zentrifugalkräfte, bei 4000 rpm, erfolgte eine Sedimentation der Chloroplasten (Dichte:  $1,20\text{-}1,25 \text{ g/cm}^3$ ), welches sich in der Entfärbung des Überstandes widerspiegelte (Jagendorf 1955). Durch ihre geringere Dichte ( $1,17\text{-}1,21 \text{ g/cm}^3$ ) verblieben die Mitochondrien teilweise in Lösung (Graham 2001). Zu Veranschaulichung der Sedimentationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Dichte der einzelnen Zellkomponenten dient die nachfolgende Abbildung 23.

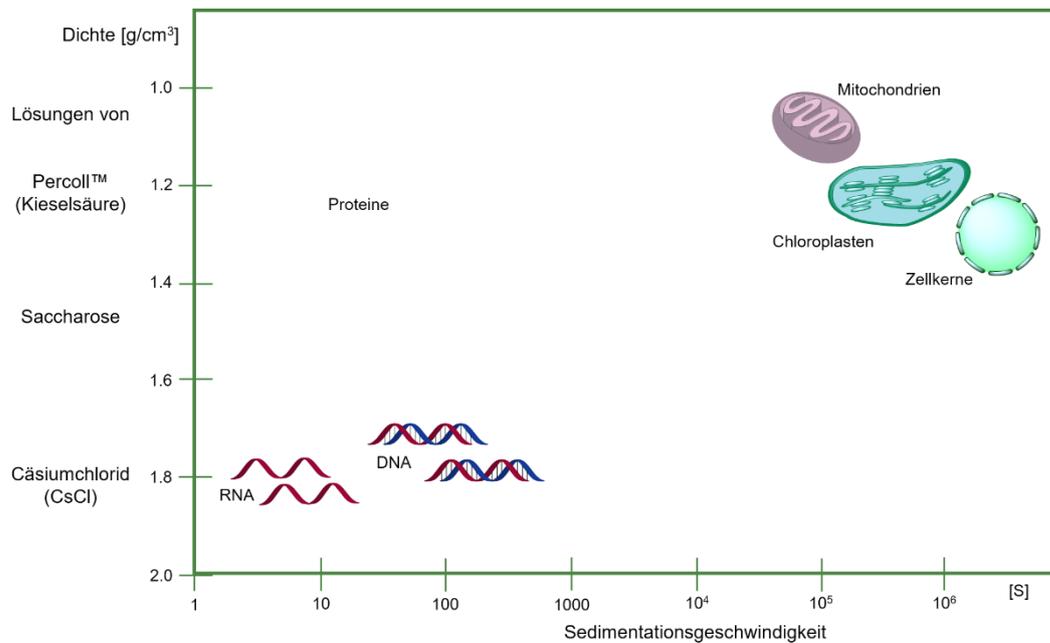


Abb. 23: Grafische Abbildung der einzelnen Zellkomponenten mit ihren jeweiligen Dichten und Sedimentationsgeschwindigkeiten (Follmann 2001).

Die Suspension mit den intakten Chloroplasten wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten überführt, mit einer 30 %igen und 60 %igen Phase und einer Dichte von  $1,08 \text{ g/cm}^3$  und  $1,28 \text{ g/cm}^3$ . Hierbei wurde ersichtlich, dass sich die Chloroplasten an der Grenzschicht akkumulierten, da ihre Dichte  $1,21$  bis  $1,25 \text{ g/cm}^3$  betrug. Auf Grund der höheren Dichte sedimentierten größere Zellfragmente und Nuklei am Boden, wobei eine 100 %ige Abtrennung durch die geringen Dichteunterschiede nicht erreicht werden konnte. Chloroplasten, die als Bruchstücke vorlagen, weisen eine Dichte von  $1,16$  bis  $1,18 \text{ g/cm}^3$  auf und sammelten sich ebenfalls an der Phasengrenze. Aus diesem Grund wäre der Einsatz eines dreischichtigen Gradienten sinnvoll, um eine zusätzliche Differenzierung der einzelnen Zellorganellen zu erreichen, da die Mitochondrien mit einer Dichte von  $1,17$  bis  $1,21 \text{ g/cm}^3$  ebenfalls an der Grenzschicht akkumulierten. Zudem sedimentierte bereits frei vorliegende DNA am Boden, da deren Dichte  $1,695 \text{ g/cm}^3$  beträgt (Bartels und Hyde 1970). In vielen Forschungsarbeiten wurde bereits die Effizienz eines Saccharose-Gradienten gezeigt, unter anderem bei Palmer *et al.* (1986) wurde die cpDNA von 200 Spezies erfolgreich isoliert. Dabei wurde nachgewiesen, dass die DNA eine höhere Reinheit aufwies, wenn nur wenig Material auf den Gradienten überführt wurde, um eine hohe Trennleistung zu gewähren. Allerdings zeigten die Isolierungsmethoden Nummer 1, 3, 5 und 6 eine geringere Reinheit im Hinblick auf organische Kontaminationen ( $Q_{260/230} = 0,22; 0,77; 0,55$  und  $0,74$ ) im Vergleich zu dem Percoll™-Gradienten ( $Q_{260/230} = 1,88; 2,15; 1,94; 1,93$  und  $2,21$ ). Hierbei bestand auch die Möglichkeit, dass ein Teil der Saccharose, durch ihre ausgeprägte Hydrophilie, in Lösung verblieb und zusammen mit der DNA co-isoliert wurde.

Bei der Methode 1 wurden zwei unterschiedliche Extraktionspuffer eingesetzt, wobei der Inkubationspuffer b kein  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt, dafür aber Sorbitol. In den folgenden

Abbildungen 24 a und b sind die Gradienten des Extraktionspuffers a aufgeführt und c und d präsentieren den Inkubationspuffer b. Anhand der farblichen Zusammensetzung wurde deutlich, dass weniger Chloroplasten auf Grund der schwächeren Grünfärbung vorhanden waren. Somit bewirkte das  $\beta$ -Mercaptoethanol eine bessere Abtrennung der sekundären Pflanzenstoffe, wodurch eine Anreicherung intakter Chloroplasten erreicht wurde. Dieser Effekt war beim Sorbitol verringert vorhanden, möglicherweise haben Polysaccharide nur einen marginalen Einfluss auf die Akkumulierung der Chloroplasten. Bei der Isolierung der DNA aus dem Walnussperikarp konnte durch den Verzicht von PVP eine Verbesserung der Isolierung erreicht werden, somit könnte die Konzentrationserhöhung des PVPs im Extraktionspuffer a von 0,1 % auf 1 % im Extraktionspuffer b einen negativen Einfluss auf die Isolierung ausgeübt haben. Hierbei wurden mit dem Inkubationspuffer a DNA-Konzentrationen von 0,2 und 0,96 ng/ $\mu$ L erzielt, wobei die Reinheit bezüglich der Proteine mit  $Q_{260/280}$  bei 3,74 und 1,66 als ausreichend einzustufen war. Hinsichtlich der Kontamination mit organischen Substanzen konnte von einer hohen Belastung ausgegangen werden auf Grund der niedrigen  $Q_{260/230}$ -Werte von 0,22 und 0,77. Ähnliche Ergebnisse wurden bei dem Extraktionspuffer b erzielt, mit DNA-Konzentrationen von 0,70 und 0,02 ng/ $\mu$ L und einem  $Q_{260/280}$ -Wert von 1,99 und 1,57 ( $p=0,5$ ) sowie einem  $Q_{260/230}$ -Wert von 0,55 und 0,74 ( $p=0,7$ ), sodass von identischen Kontaminationen ausgegangen werden konnte. In Anbetracht der niedrigen DNA-Konzentration wurde die Isolierungsmethode als nicht ausreichend befunden.

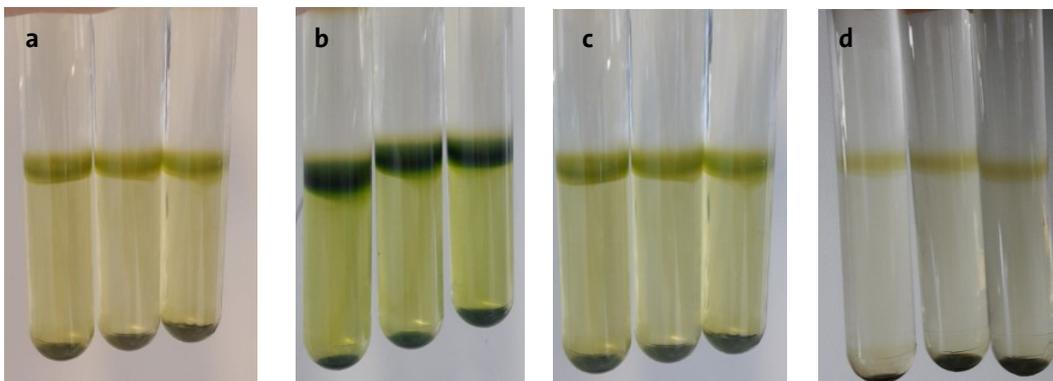


Abb. 24: a) Zelluläre Blattbestandteile im Saccharose-Gradienten nach Zentrifugation bei 111.200 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 1), b) Zelluläre Blattbestandteile im Saccharose-Gradienten nach Zentrifugation bei 111.200 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 3), c) Zelluläre Blattbestandteile im Saccharose-Gradienten nach Zentrifugation bei 111.200 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 5), d) Zelluläre Blattbestandteile im Saccharose-Gradienten nach Zentrifugation bei 111.200 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 6).

### Methode 2

Diese Methode basierte ebenfalls auf Vieira *et al.* (2014), allerdings wurde die Pufferzusammensetzung von dieser Studie verwendet. So wurde unter anderem ein saurer pH-Wert von 3,8 im Extraktionspuffer eingestellt. Der Vorteil sollte in der Denaturierung von Proteinen bei niedrigeren pH-Werten liegen, um diese Kontaminationen bereits im Vorfeld zu entfernen. Allerdings liegt der durchschnittliche

Proteingehalt in einem Blatt bei 4 % und bei Walnussamen bei circa 16 %, sodass der Effekt hauptsächlich bei Walnussamen signifikant wäre. Die Gelierung und damit einhergehende Selektion der Polysaccharide erfolgte bei dieser Methode nicht über Sorbitol, sondern durch den Einsatz von Borax (Deuel und Neukom 1949). Die Oxidation der sekundären Pflanzenstoffen wurde in der Methode 1 über das PVP und  $\beta$ -Mercaptoethanol reguliert, die in diesem Extraktionspuffer durch Ascorbinsäure und Natriumdisulfat ersetzt wurden (Vieira et al. 2014). Durch die Verwendung von Ascorbinsäure musste der pH-Wert unter 6,0 liegen, damit die Ascorbinsäure stabil gegenüber Luftsauerstoff war. Die Substanz dient als Radikalfänger und inhibiert reaktive Sauerstoffverbindungen (Gallarate et al. 1999). Bei dem Natriumdisulfid handelt es sich um ein starkes Reduktionsmittel, welches die sekundären Pflanzenstoffe in eine weniger reaktivere Form reduziert und Enzyme inhibiert (Vieira et al. 2014).

Im Gegensatz zur vorherigen Methode 1 wurde ein diskontinuierlicher Percoll™-Gradient eingesetzt, bestehend aus drei Phasen (20 %, 40 %, 60 %). In der Abbildung 25 a und b sind zwei exemplarische Gradienten nach der Zentrifugation abgebildet. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Dichten der Zellorganellen in Abhängigkeit von dem Gradienten-Medium variieren. So besitzt eine 40 %ige Percoll™-Phase eine Dichte von  $1,05 \text{ g/cm}^3$  und eine 60 %ige Phase eine Dichte von  $1,08 \text{ g/cm}^3$ . Es lagen keine präzisen Informationen über die Dichte intakter Chloroplasten in diesem Medium vor. Jedoch kann anhand der Korrelation mit anderen Zellorganellen von einer Dichte von etwa  $1,08 \text{ g/cm}^3$  ausgegangen werden. (Follmann 2001). Somit würden intakte Chloroplasten an der Phasengrenze zwischen 40 und 60 % akkumulieren. Im Vergleich zur Methode 1 schien das Chlorophyll und damit die Grünfärbung während der Aufarbeitung eine Veränderung erfahren zu haben. Hierfür konnte der niedrigere pH-Wert verantwortlich gewesen sein, der eine Umwandlung des Chlorophylls zu Protochlorophyllid katalysierte (Rabe und Kreeb 1980). Allerdings wirkte sich die Pufferzusammensetzung positiv auf die isolierte DNA-Konzentration aus, indem Konzentrationen von 31 und 49 ng/ $\mu\text{L}$  erzielt wurden. Zudem konnte eine sehr gute Reinheit erreicht werden, mit einem  $Q_{260/280}$ -Wert von über 1,8 (2,15 und 2,06) und einem  $Q_{260/230}$ -Wert von circa 2,0 (2,14 und 1,93). Allerdings wurde die Methode 3 als optimaler eingestuft, da eine bessere Differenzierung im Gradienten vorzufinden war, diese wird im nachfolgenden Abschnitt erläutert.

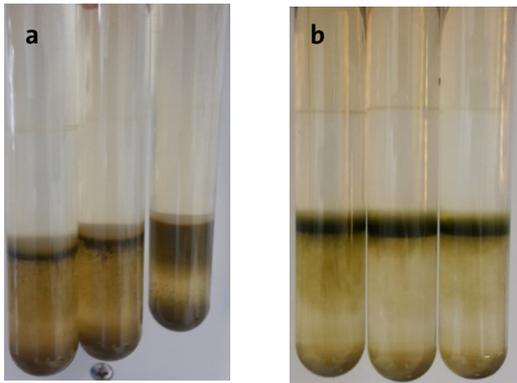


Abb. 25: a) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach der Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 8), b) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach der Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 10).

### Methode 3

Diese Methode von Lang *et al.* (2011) wurde für die Isolierung des authentischen Probenmaterials ausgewählt, da der Gradient die beste Abtrennung von sekundären Pflanzenstoffen erzielte. Die Durchführung war analog zu der Methode 2, der größte Unterschied bestand in der Zusammensetzung des Extraktionspuffers. Im Vergleich zu den anderen Methoden wurden neben Sorbitol, Tris-HCl und PVP als zusätzliche Pufferkomponenten zur Stabilisierung des pH-Wertes MOPS und HEPES eingesetzt. Diese sind in der Lage freie DNA zu komplexieren, sodass ncDNA teilweise aus der Suspension separiert werden kann. Hierbei agieren die protonierten Amine als Gegen-Ion für das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA (Stellwagen *et al.* 2000). Für die Methode 3 wurde ebenfalls ein Percoll™-Gradient verwendet, der nach der Zentrifugation diverse Phasen ausbildete (s. Abbildung 26). Hierbei zeigte sich, dass bei dem ersten Versuch mit dem Inkubationspuffer a und dem Waschpuffer a zu viel Suspension auf einen Gradienten überführt wurde, da keine klare Ausbildung einer Grenzschicht zu erkennen war. Zudem konnte nur eine geringe DNA-Konzentration von 1,65 ng/μL mit einer ausreichenden Reinheit ( $Q_{260/280}$  1,54 und  $Q_{230/260}$  0,50) erhalten werden. Durch die optimale Verteilung der Chloroplasten-Suspension und einer veränderten DNA-Isolierungsmethode konnte eine höhere DNA-Konzentration im Extraktionspuffer b erreicht werden (32,0 ng/μL). Zudem konnte eine hohe Reinheit erhalten werden ( $Q_{260/280}$  2,05 und  $Q_{230/260}$  2,04), sodass im weiteren Verlauf die Zugabe von 0,1% Mercaptoethanol geprüft wurde, um weitere sekundäre Pflanzenstoffe zu inhibieren. Hierbei zeigte sich eine signifikante Veränderung nach der Zentrifugation des Percoll™-Gradienten, wobei in der 20 %igen Phase vermehrt sekundäre Pflanzenstoffe akkumulierten, welches durch die charakteristische Braunfärbung deutlich wurde (Jobes *et al.* 1995; Möller *et al.* 1992). Des Weiteren erfolgte eine Akkumulation der aufgebrochenen Chloroplasten an der Grenzschicht zwischen der 20 %igen und 40 %igen Phase, wobei die Bande intensiver als die der intakten Chloroplasten war. Eine Möglichkeit bestand in der Zerkleinerung des Materials mittels Ultra™-Turrax, durch die hohen Scherkräfte wurde ein Großteil der Chloroplasten aufgebrochen. Zudem könnte die Sorbitol-

Konzentration nicht ausreichend gewesen sein, da ein Großteil mit den vorhandenen Polysacchariden reagierte und somit im Ansatz nicht mehr als Osmotikum wirkte (Lang et al. 2011). Allerdings wurde durch die hohe DNA-Konzentration von 24,0, 46,0 und 49,0 ng/ $\mu$ L auf weitere Optimierungsschritte verzichtet. Auch im Hinblick auf die DNA-Reinheit wurde eine sehr gute Qualität erzielt mit einem durchschnittlichen  $Q_{260/280}$ -Wert von 2,0 und einem  $Q_{230/260}$ -Wert von 1,9.

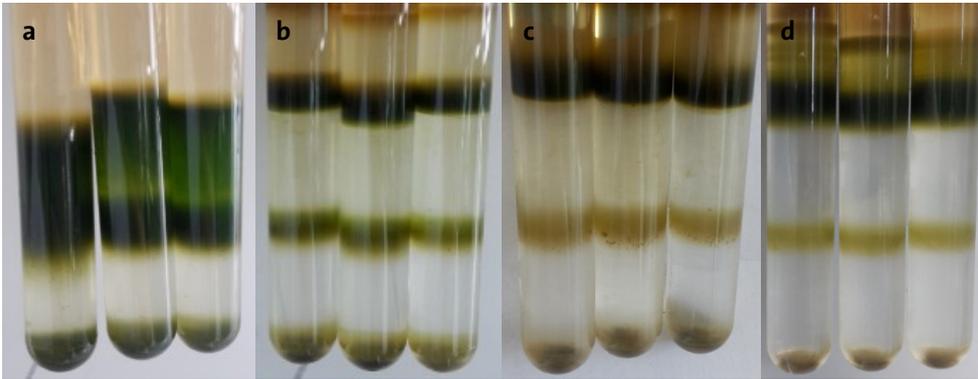


Abb. 26: a) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 2), b) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 4), c) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 7), d) Zelluläre Blattbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 9).

Des Weiteren wurde diese Methode für Nussmaterial überprüft. In der Abbildung 27 ist der Percoll™-Gradient nach der Zentrifugation abgebildet. An den Phasengrenzen akkumulierten die entsprechenden Proplastiden, wobei nur die intakten Zellen aus der unteren Grenzschicht für die weitere Isolierung verwendet wurden.

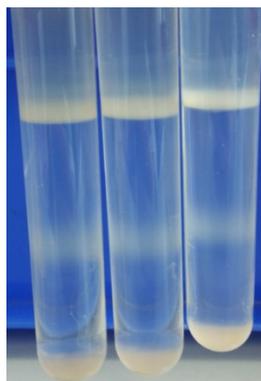


Abb. 27: Zelluläre Samenbestandteile im Percoll™-Gradienten nach Zentrifugation bei 16.000 g und 4 °C für 60 min (SW 40 Ti, Beckman Coulter) (Isolierung 11).

### Isolierung der cpDNA

#### **Methode 1**

Diese Methode wurde nach Brüning *et al.* (2011) durchgeführt und wurde bereits im Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 erläutert. Der einzige Unterschied bestand in den unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Isopropanol für eine oder zwei Nächte. Durch eine Verdoppelung der Zeit konnte eine Verdopplung der DNA-Konzentration bei der Isolierungsmethode nach Lang *et al.* (2011) (Methode 3) von 24,1 ng/μL auf 46,1 ng/μL erzielt werden. Allerdings kann die Zentrifugationszeit nicht kontinuierlich gesteigert werden, da anhand einer Studie von Chowdhury *et al.* (2003) die Präzipitation ab einem gewissen Zeitpunkt stagniert. Zudem können Kontaminanten co-eluieren, sodass eine Inkubationsdauer von zwei Nächten nicht überschritten werden sollte.

#### **Methode 2**

Die Isolierung der DNA erfolgte in Anlehnung an Vieira *et al.* (2014) unter Einsatz von Proteinase K als zusätzlichen Hilfsstoff zur Abtrennung der Proteine. Der Erfolg spiegelte sich in dem hohen Quotienten ( $Q_{260/280}$ ) mit einem Wert von 3,74 wider. Dies wurde außerdem durch den Zusatz von Ammoniumacetat unterstützt, welches unter anderem zur Präzipitation genutzt wurde (Vieira *et al.* 2014). Im Vergleich zu konventionellen Verfahren wurde anstelle von CTAB, SDS als Detergenz verwendet. Allerdings zeigte sich bei der Methode 2 der Plastiden-Isolierung ein signifikanter Unterschied in der DNA-Konzentration im Vergleich zur DNA-Isolierungsmethode nach Brüning *et al.* (2011) (Methode 1). So konnte mittels der Methode nach Brüning *et al.* (2011) eine DNA-Konzentration von 0,96 ng/μL erzielt werden und mit Methode 2 nach Vieira *et al.* (2014) nur 0,19 ng/μL. Bei der Entfernung von organischen Komponenten wurde das schlechteste Ergebnis im Vergleich zu allen anderen Isolierungen erzielt, mit einem Wert von 0,22. Somit müssten entsprechende Waschschrte eingefügt werden, um den Anteil an organischen Kontaminanten zu minimieren (Jobes *et al.* 1995). Allerdings könnte die Methode nach Brüning *et al.* (2011) (Methode 1) hinsichtlich der Verwendung von Proteinase K ergänzt werden, da diese einen positiven Effekt besaß. Somit wurde die Methode nach Vieira *et al.* (2014) nicht weiter optimiert und als nicht ausreichend bewertet.

#### **Methode 3**

Diese Methode wurde analog zur Methode nach Chaudhary *et al.* (2015) durchgeführt, wobei die Verwendung von DNase I die Besonderheit dieser Methode darstellte. Dabei erfolgte eine enzymatische Behandlung vor der Zellyse der intakten Chloroplasten, damit die cpDNA geschützt vorlag und nicht enzymatisch gespalten wurde. Hierbei war eine Denaturierung der DNase I im Anschluss der Reaktion notwendig, damit diese inaktiviert vorlag (Shi *et al.* 2012). Es zeigte sich am Ende eine signifikante DNA-Konzentrationsdifferenz. Dabei konnte mit dieser Methode nur 1,65 ng/μL

DNA isoliert werden, wohingegen die Methode nach Brüning *et al.* (2011) eine DNA-Konzentration von 32,1 ng/ $\mu$ L erzielte. Die Reinheit, bezüglich der Proteinkontamination, lag bei einem  $Q_{260/280}$ -Wert von 1,54 und einem unzureichenden  $Q_{260/230}$ -Wert von 0,50. Da die vorherigen Methoden bessere Ergebnisse erzielten, blieb diese Methode unberücksichtigt.

### Cäsiumchlorid Gradient

Auf Grund der limitierten Bindungskapazität der *Flow Cell* wurde eine hohe Reinheit der cpDNA angestrebt, um ausreichend Daten für die Erstellung eines vollständigen Genoms der einzelnen Sorten zu erhalten. Aus diesem Grund wurde in den vorherigen Abschnitten die Anreicherung der Chloroplasten und die anschließende DNA-Isolierung mit diversen Methoden überprüft. Nach erfolgreicher DNA-Isolierung wurde weiterführend die Verwendung eines Cäsiumchlorid-Gradienten in Betracht gezogen. Hierfür wurde ein cpDNA-Isolat mit einer DNA-Konzentration von 18  $\mu$ g zentrifugiert und zum visuellen Vergleich eine Kalibrierreihe mit einem Bakterien-Plasmid von 1,5 bis 15  $\mu$ g betrachtet. Hierbei wurde ersichtlich, dass die Plasmid-Bande im unteren Drittel des Cäsiumchlorid-Gradienten akkumulierte (s. Abbildung 28 a). Dahingegen wurde das cpDNA-Isolat im mittleren Bereich des Gradienten visualisiert (s. Abbildung 28 b).

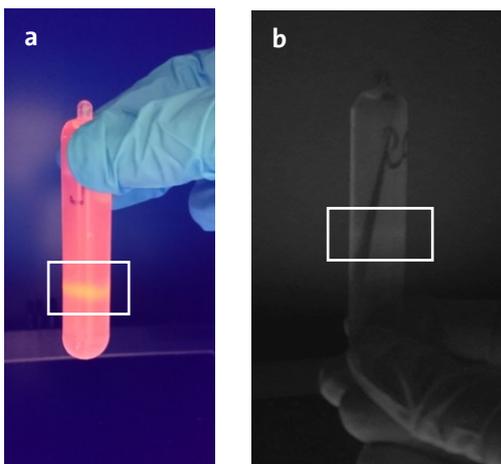


Abb. 28: a) Bildung einer Plasmid-Bande im unterem Drittel des Gradienten (V Ti 65.1, Beckman Coulter) nach einer Zentrifugation für 24 h bei 20 °C für 53.000 g und b) Bildung einer Bande im unterem Drittel des Gradienten (V Ti 65.1, Beckman Coulter) nach einer Zentrifugation für 24 h bei 20 °C für 53.000 g. Zusätzlich Ausbildung eines Niederschlages, der sich von der Wand des Zentrifugenröhrchens ablöst (schwarzer Streifen).

Zu Beginn der Forschungsarbeit wurde von einer zirkulären cpDNA ausgegangen, die durch eine *supercoiled* Form in einem ähnlichen Bereich wie Bakterien-Plasmide im Cäsiumchlorid-Gradienten akkumuliert und sich somit von der linearen ncDNA differenzieren sollte, wie bereits bei Mourad *et al.* vorgeführt (1998). Allerdings zeigten einige neuere Studien, dass es sich bei dem Chloroplasten-Genom nicht um ein einzelnes zirkuläres Molekül handelt, sondern um 5 bis 10 nacheinander folgende Nucleoide. Diese bilden nur unter extremen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert) eine *supercoiled*

Form aus (Bendich 2004). Diese Annahme wurde anhand der durchgeführten Analysen bestätigt und die Forschung diesbezüglich eingestellt, da die ncDNA und cpDNA im selben Bereich des Gradienten akkumulierten. Dadurch ist eine Trennung der beiden DNA-Arten ausgeschlossen und die isolierte DNA wurde direkt für die Sequenzierung eingesetzt.

### **4.3 Next-Generation Sequencing des Chloroplasten-Genoms**

#### *4.3.1 Ergebnisse der Sequenzierung der Chloroplasten-Genome*

Zu Beginn erfolgte eine Optimierung der Sequenzierung bezüglich der eingesetzten DNA-Konzentration und der erhaltenen Sequenz-Qualität. Diese spiegelt sich zum einen in der *Cluster Density*, den *Cluster Passing Filter* und zum anderen in dem Q-Score wider.

#### Optimierung der Sequenzierung

Im Rahmen der Forschungsarbeit wurde zu Beginn die Ladekonzentration für die Sequenzierung optimiert, um eine ideale *Cluster Density* zu erreichen. Hierbei wurden zwei Proben der Walnussorte Franquette sequenziert. Dabei fiel bereits bei der Auswertung der Ergebnisse der Kapillargelelektrophorese (Bioanalyzer) auf, dass kein einheitliches Schnittmuster auftrat. Bei einem optimalen enzymatischen Verdau würde ein Maximum bei 500 bp auftreten. Bei der ersten Sequenzierung befand sich das Maximum bei 2.200 bp und besaß noch eine hohe Konzentration an größeren Fragmenten (s. Abbildung 29). Hierbei befand sich auf der Abszissen-Achse die Angabe der Intensität des Fluoreszenzsignales und auf der Ordinatenachse die Zeit während der Messung. Für die Kalibrierung wurde für jede Messung zur Probe ein unterer (35 bp) und oberer (10.380 bp) Größenstandard zugefügt. In der Abbildung wird weiterhin ersichtlich, dass der obere Größenstandard durch die hohe Konzentration an größeren Fragmenten von über 10.000 bp schwer zu detektieren war. An der rechten Seite des Elektropherogramms wird zudem die Konzentration ersichtlich, indem eine grafische Darstellung analog zu einer Gelelektrophorese erfolgt. Auch in diesem Teil der Grafik ist die ungenügende Fragmentierung der DNA zu erkennen, da ein Großteil der DNA sich in einem Bereich von über 10.000 bp konzentrierte.

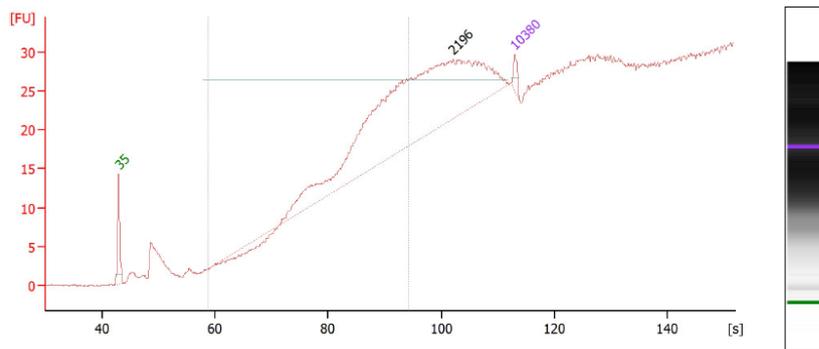


Abb. 29: Elektropherogramm der ersten Sequenzierung der Probe Franquette 01 mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 2.196 bp. Beinhaltet zwei Größenmarker mit 35 bp (grün) und 10380 bp (lila).

Bei der zweiten Probe gelang die Fragmentierung besser, allerdings war im niederen Basenbereich eine Überlagerung des Fluoreszenzsignales von der vorherigen Messung zu erkennen (s. Abbildung 30). Aus diesem Grund sank die Intensität im Verlauf der Messung in einen negativen Bereich, trotzdem wurde ein Maximum bei 587 bp deutlich. Im späteren Abschnitt stieg die Konzentration der Fragmente mit einer Länge von über 10.000 bp erneut an, sodass auch bei dieser Probe keine optimale Fragmentierung erreicht wurde.

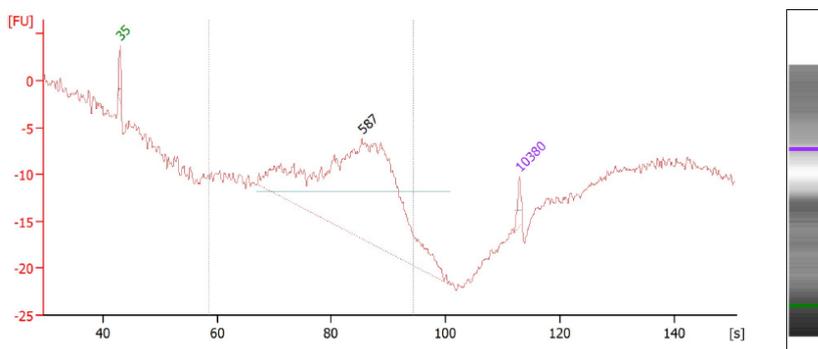


Abb. 30: Elektropherogramm der ersten Sequenzierung der Probe Franquette 02 mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 587bp. Beinhaltet zwei Größenmarker mit 35 bp (grün) und 10380 bp (lila).

Trotzdem wurden die Proben für eine Sequenzierung testweise eingesetzt (6 pm Ladekonzentration), um die Auswirkung der Fragmentierung auf die Ergebnisse einschätzen zu können. Allerdings zeigte sich eine starke Überclusterung mit einer durchschnittlichen *Cluster Density* von 1485 K/mm<sup>2</sup> (s. Abbildung 31). Die Clusterung der *Flow Cell* wies eine hohe Intensität durch eine entsprechende Färbung auf, da es sich um einen kleinen Chip handelte (500 mb Sequenzierkapazität), wurde nicht die komplette Anzeige ausgefüllt. Auch der Q-Score besaß nur einen durchschnittlichen Wert von 15 (s. Abbildung 31 c, blaue Balken). Nur ein Viertel der Reads erreichten einen Q-Score von über 30 und besaßen somit eine akzeptable Qualität (grüne Balken). Auch das Verhältnis aus *Cluster Density* und *Cluster Passing Filter* war ungenügend, weil nur eine geringe Anzahl an Signalen detektiert wurde. Diese negativen Auswirkungen waren vor allem auf die unzureichende Fragmentierung

zurückzuführen, sodass die längeren Sequenzen in unserem Fall eine Komprimierung der Cluster auf einen Teil der *Flow Cell* bewirkten.

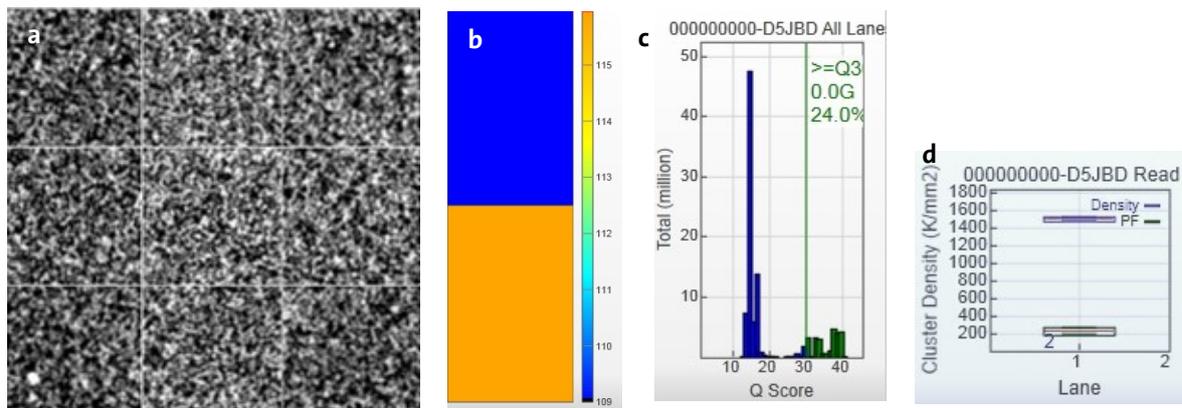


Abb. 31: a) *Cluster Density* der Sequenzierung, b) Auslastung der *Flow Cell* wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis *Cluster Density* und *Cluster Passing Filter*.

In der Analyse zeigte sich eine extreme Clusterbildung der *Flow Cell*. Diese könnten durch die langen DNA-Fragmente aufgetreten sein, die nur im vorderen Teil der *Flow Cell* hybridisierten und durch ihre Längen den hinteren Teil blockierten, sodass keine Cluster-Generierung möglich war. Aus diesem Grund war die allgemeine Signaldetektion (*Cluster Passing Filter*) verringert, da nur wenig Cluster die Filterkriterien erreichten und somit vom System nicht ausgeschlossen wurden. Damit zeigte sich, dass die Fragmentierung einen signifikanten Einfluss auf die Qualität der Sequenzierung und der erhaltenen Sequenzdaten besaß. Im Verlauf der *Library Präparation* wurden Beads eingesetzt, um kleinere als auch größere Fragmente zu eliminieren, allerdings konnte durch die erhöhte Konzentration keine vollständige Abtrennung erzielt werden (Illumina, o. D.).

Bei der zweiten Sequenzierung wurde die gleiche gepoolte *Library* verwendet und eine Reduktion der Ladekonzentration auf 4 pm durchgeführt. Die *Cluster Density* nahm hierbei weiter zu und stieg auf einen Wert von 1.684 K/mm<sup>2</sup>, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die *Cluster Density* der ersten Sequenzierung durch die Überclustering nicht korrekt angegeben wurde. Im Falle einer extremen Clustering ist das System nicht in der Lage eine exakte *Cluster Density* zu berechnen, sodass ein zu niedriger Wert angegeben wird. Durch den Vergleich der ersten und zweiten Sequenzierung wurde diese Besonderheit deutlich, da auf Grund einer geringeren Ladekonzentration eine Abnahme der *Cluster Density* zu vermuten wäre. Trotzdem besaß der Q-Score tendenziell einen besseren Durchschnitt von Q36, wobei 83 % der Reads eine akzeptable Qualität besaßen. Auch die Signaldetektion, die durch die *Cluster Passing Filter* charakterisiert wurden, lagen in einem höheren Bereich (s. Abbildung 32). Somit lässt sich zusammenfassend aussagen, dass eine unzureichende Fragmentierung trotzdem für eine Sequenzierung verwendet werden kann, allerdings muss die Ladekonzentration in einem Bereich von 2 bis 3 pm liegen, um eine Überclustering zu minimieren.

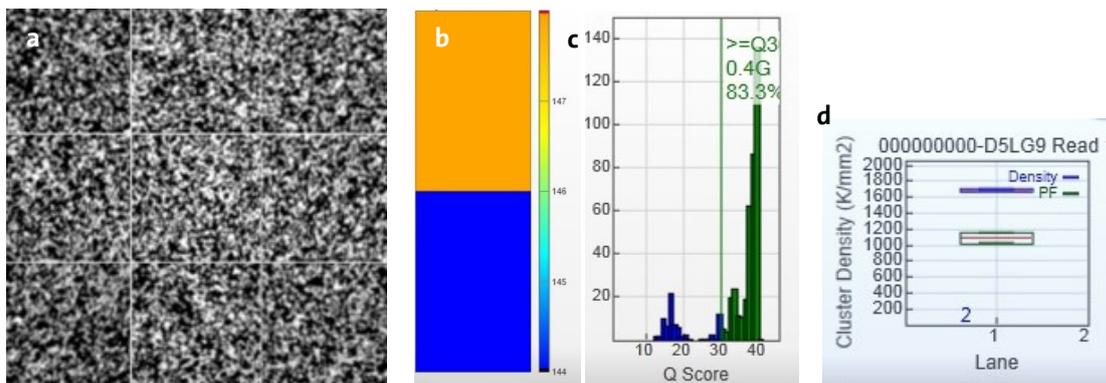


Abb. 32: : a) *Cluster Density* der Sequenzierung, b) Auslastung der *Flow Cell* wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis *Cluster Density* und *Cluster Passing Filter*.

Die Probenvorbereitung wurde wiederholt, um eine bessere Fragmentierung zu erreichen. Zudem wäre es möglich, auf eine enzymatische Fragmentierung zu verzichten und auf eine mechanische Fragmentierung mittels Ultraschalls, hydrodynamische Scherung oder Zerstäubung auszuweichen. Ein Vorteil lag in der besseren Skalierung der Enzyme und der flexibleren Reaktionsvolumen. Zudem wurde die Degradierung der DNA während der Fragmentierung auf ein Minimum reduziert. Allerdings war diese Methode anfällig für Sequenzverzerrungen und spezifische Schnittmuster. Dem gegenüber besitzen mechanische Fragmentierungen eine bessere Kontrolle der Fragmentgröße und sind unabhängiger von der Basenzusammensetzung. Andererseits können Degradierungen der DNA-Fragmente auftreten, wodurch ein Verlust zu erwarten ist (Tanaka et al. 2020).

Aus diesem Grund wurde die gepoolte *Library* erneut präpariert und jeweils zwei Proben der Sorte Chandler und Franquette aufbereitet. Nach Auswertung der Kapillargelelektrophorese (Bioanalyzer) konnte eine signifikante Optimierung der Fragmentlängen erzielt werden, sodass alle vier Proben im Durchschnitt eine Länge von 600 bis 700 bp besaßen. Ausgehend von den vorherigen Daten wurde eine Ladekonzentration von 2 pm gewählt, um eine Überclusterung vorzubeugen. Anhand der Abbildung 33 wurde ersichtlich, dass eine Unterclusterung vorlag. Dies zeigte sich zum einen an der geringen Cluster-Anzahl und zum anderen an der geringen *Cluster Density* von 300 K/mm<sup>2</sup>. Darüber hinaus konnten fast alle Cluster detektiert und die Signale ausgewertet werden, sodass ein hoher *Cluster Passing Filter*-Wert vorhanden war. Dadurch konnten qualitativ hochwertige Reads erhalten werden, sodass über 96 % der Reads einen Q-Score von mindestens 30 aufwiesen und der durchschnittliche Wert bei Q38 lag.

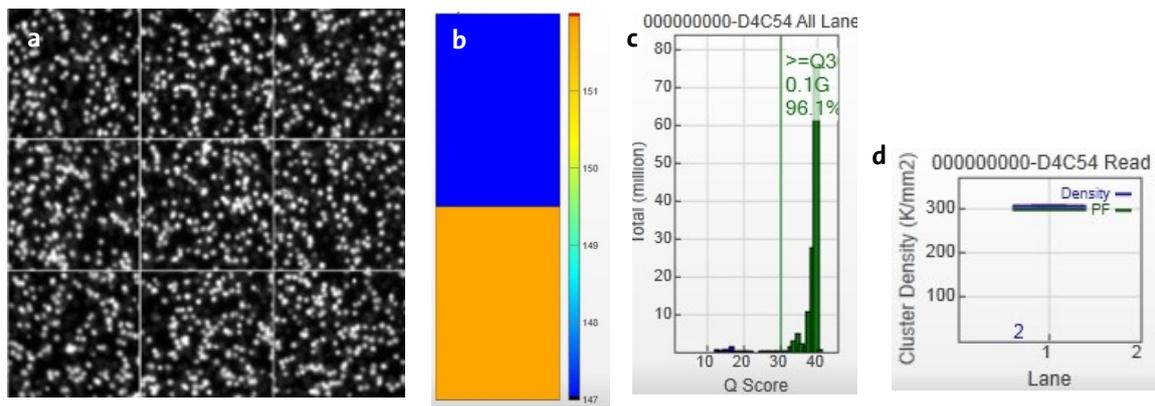


Abb. 33: a) *Cluster Density* der Sequenzierung, b) Auslastung der *Flow Cell* wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis *Cluster Density* und *Cluster Passing Filter*.

Durch die geringe Auslastung der *Flow Cell* wurden allerdings nur eine geringe Datenmenge produziert, die nicht ausreichend war, um das gesamte Chloroplasten-Genom abzubilden. Deshalb wurde eine weitere Sequenzierung durchgeführt mit einer Ladekonzentration von 6 pm. Dabei stieg die *Cluster Density* auf 820 K/mm<sup>2</sup> an, dies wird auch in der Abbildung 34 deutlich. Der Q-Score blieb auf einen identischen Wert, hierbei lagen über 95 % der Reads über Q30 und der durchschnittliche Q-Score bei 38. Durch die erhöhte *Cluster Density* war der Wert des *Cluster Passing Filter* leicht reduziert auf Grund stärkerer Überlagerungen einzelner Cluster. Allerdings konnte im Hinblick auf die erhaltene Datenmenge eine Verdreifachung erzielt werden, sodass in Kombination mit der vorherigen Sequenzierung ein komplettes Chloroplasten-Genom der beiden Sorten erstellt werden konnte.

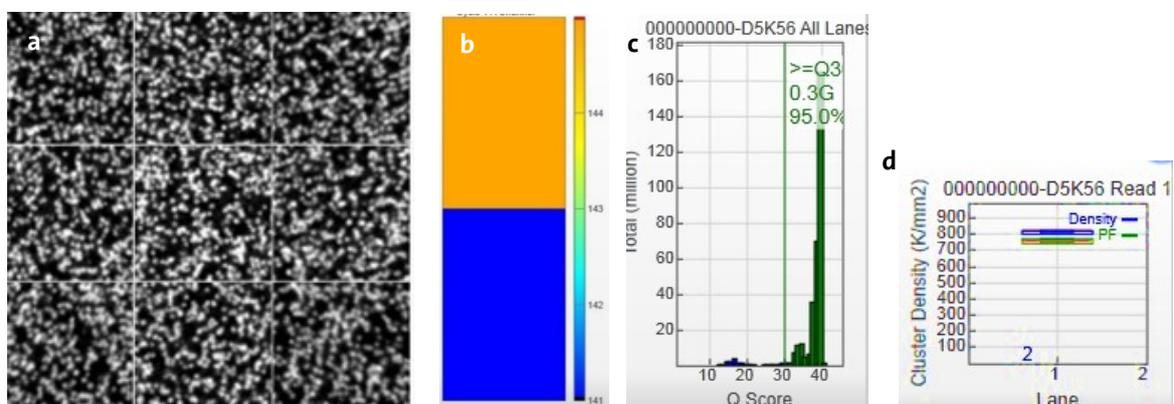


Abb. 34: a) *Cluster Density* der Sequenzierung, b) Auslastung der *Flow Cell* wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis *Cluster Density* und *Cluster Passing Filter*.

Durch den Erfolg der letzten Sequenzierung wurden die restlichen 10 Sorten in einer Doppelbestimmung sequenziert und ebenfalls eine Ladekonzentration von 6 pm angewandt. Eine Ausnahme bildete die Sorte Fernette, die auf Grund fehlenden Probenmaterials nur als Einzelbestimmung analysiert werden konnte. Zudem wurde die Sorte Howard in Dreifachbestimmung analysiert, da hier nur Samenmaterial als authentisches Material verwendet werden konnte. Die Schnittmuster, die mittels Kapillargelelektrophorese (Bioanalyzer) visualisiert wurden, wiesen alle

Fragmente in einem Bereich von 500 bis 700 bp auf. Es wurde zudem eine *Flow Cell* mit einer Datenkapazität von 7,5 Gb eingesetzt, weshalb die grafische Abbildung zu den vorherigen variiert (s. Abbildung 35). Die *Cluster Density* besaß einen niedrigeren Wert von 643 K/mm<sup>2</sup>, die Auslastung des Chips war auf der linken Seite sehr intensiv, wobei die rechte Seite im Vergleich dazu weniger Cluster ausgebildet hatte. Durch eine Erhöhung der Ladekonzentration auf 7 pm hätte die Auslastung optimaler erfolgen können. Zudem wiesen über 93 % der Reads einen Q-Score von über 30 auf, sodass eine sehr hohe Genauigkeit von über 99,9 % vorlag. Des Weiteren konnte die Signaldeduktion im Vergleich zur vorherigen Sequenzierung trotz höherer Cluster Density maximiert werden, sodass fast alle Cluster für die Analyse zur Verfügung standen.

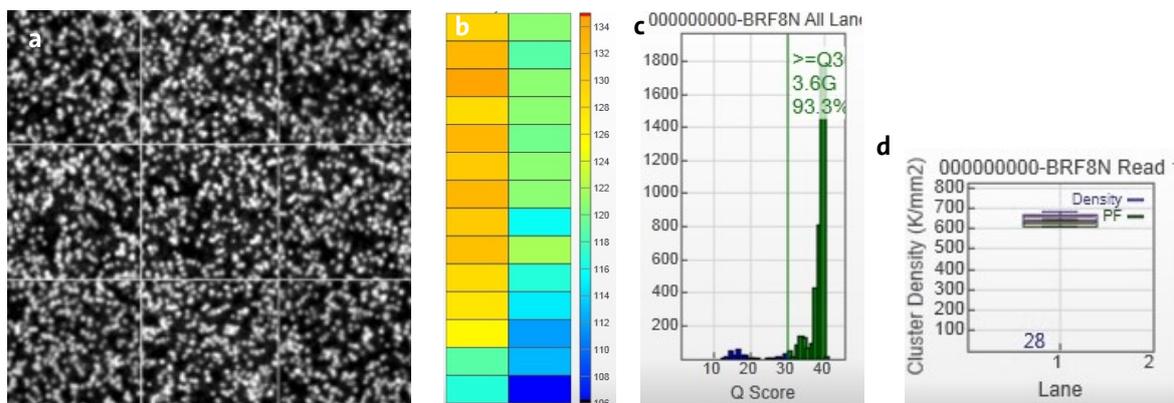


Abb. 35: a) *Cluster Density* der Sequenzierung, b) Auslastung der *Flow Cell* wobei die orangene Fläche für eine hohe Auslastung steht, c) Q-Score und Anteil der Reads über Q30, d) Verhältnis *Cluster Density* und *Cluster Passing Filter*.

### Auswertung der Sequenzdaten

Für die Analyse wurden die letzten drei Sequenzierungen verwendet, da eine ausreichende Qualität und genügend Daten für die Generierung eines Chloroplasten-Genoms vorlagen. Hierbei erfolgte die Auswertung der Sequenzdaten nach einem spezifischen Schema mit Hilfe der Software CLC Genomics Workbench Version 11.0 (s. Abbildung 36). Zuerst mussten die Daten getrimmt werden, hierbei wurden die Adapter-Sequenzen, Reads mit einer Qualität unterhalb Q16, Reads mit einer Länge von 10 Basenpaaren und Sequenzen die mehr als 10 aufeinanderfolgende, wiederholende Basen besaßen entfernt. Nach dem erfolgreichen Trimm-Prozess wurden 1,9 Mio *paired-end* Reads und 22 Mb für die Sorten Chandler und Franquette erhalten. Für die restlichen Sequenzen wurden 44 Mio *paired-end* Reads und 2,91 Gb Daten produziert. Der Q-Score rangierte in einem Bereich von 37 bis 39, sodass die Fehlerrate unter 0,0026 % lag. Des Weiteren konnte der GC-Gehalt überprüft werden, welcher Rückschlüsse auf bakterielle Kontaminationen zu lies. Das Chloroplasten-Genom der Walnuss besaß einen GC-Gehalt von 36,11 % (Hu et al. 2016), wohingegen Bakterien in einem Bereich von 22 bis 74 % liegen (Hildebrand et al. 2010). In früheren Sequenzierungen im Rahmen von anderen Forschungsprojekten konnten Kontaminationen mit *Pseudomonas* nachgewiesen werden, diese

existieren ubiquitär auf Pflanzenmaterial und können bei einer unzureichenden Desinfektion co-isoliert werden (Bunster et al. 1989). Allerdings weisen *Pseudomonas* Spezies einen GC-Gehalt von ca. 60 % auf und wären somit leicht detektierbar (Weinel et al. 2002). Fast alle Proben wiesen keine Verunreinigung mit Bakterien auf und besaßen ein GC-Maximum zwischen 36 bis 38 %, mit Ausnahme der Proben Chandler 02, Geisenheim 26 02 und Pedro 02. Diese besaßen zusätzlich ein Maximum bei 68 %, sodass in diesem Fall von einer bakteriellen Kontamination ausgegangen werden konnte. Im Anschluss erfolgte das Assembly, basierend auf einer Referenzsequenz bei NCBI (NCBI Accession Nr. KT963008). Dadurch war es möglich, für jede Sorte das Chloroplasten-Genom zu erhalten. Hierbei lag die durchschnittliche Coverage bei einem Wert von 49x, wobei eine Probe eine Coverage von 1118x (Fernette) aufwies und für die Berechnung des Durchschnitts unberücksichtigt blieb. Die Proben wurden alle gepoolt, trotzdem können Konzentrationsschwankungen aufgetreten sein, sodass einige Proben mit einem höheren Gehalt eingesetzt wurden und dementsprechend eine höhere Coverage aufwiesen. Dies wurde besonders bei der Probe Fernette deutlich, die eine hohe Coverage besaß, aber nur 6 % cpDNA enthielt. Demgegenüber wies Howard 01 eine Coverage von 529x auf, allerdings mit einem cpDNA-Anteil von 60 %, welches die hohe Coverage begründet. Bei den Proben Pedro 02, Chandler 02 und Geisenheim 26 02 wurde nur eine sehr niedrige Coverage von 3,84x, 5,41x und 1,18x erhalten. Zum einen könnten die Konzentrationen der Proben zu niedrig gewesen sein, zum anderen wäre es möglich, dass die DNA in einer geringeren Qualität vorlag und somit die Amplifizierung auf der *Flow Cell* inhibiert wurde (Quick et al. 2017). Diesbezüglich wurde im Vorfeld bereits analysiert, dass alle drei Proben eine signifikante Bakterienkontamination aufwiesen, sodass ein Teil der *Flow Cell* mit Bakterien-DNA belegt wurde. In der Literatur wird für eine Absicherung der einzelnen Basen eine Coverage von mindestens 30x bis 50x vorgegeben (Illumina, o. D.), welche erfolgreich eingehalten werden konnte. Hierbei wurde mit mindestens einer Probe einer Sorte ein vollständiges Chloroplasten-Genoms erzielt (s. Anhang 9.6.2 Tabelle 82). Dadurch konnte für jede Sorte eine Chloroplasten-Sequenz erstellt werden, sodass diese im Anschluss miteinander verglichen wurden. Zur Erstellung eines Alignments der 24 Sequenzen wurde die Software Integrative Genomics Viewer Version 2.5.0 verwendet, da diese SNPs besser darstellen konnte.

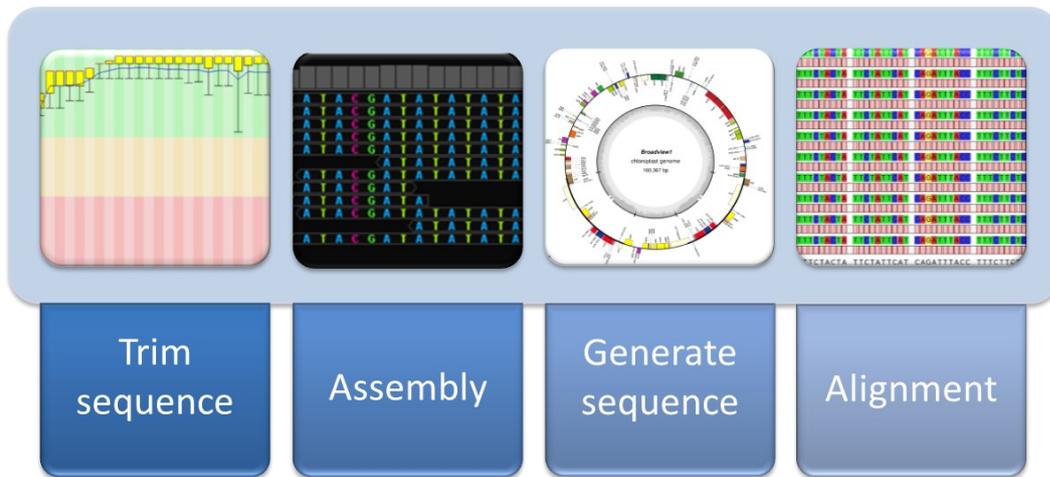


Abb. 36: Schematischer Ablauf der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse.

Es zeigte sich jedoch, dass keine Sequenzunterschiede auf dem Chloroplasten-Genom zwischen den einzelnen Sorten vorhanden waren. Eine Anreicherung der Chloroplasten mittels Gradientenzentrifugation war nicht möglich, d.h. im Durchschnitt konnten nur 3 bis 4 % der Reads mit dem Chloroplasten-Genom in Verbindung gebracht werden. Diese Rate war allerdings ausreichend, um zu Gesamtchloroplastengenom-Sequenzen zu gelangen. Andere Studien erzielten mit einem Gesamt-DNA-Isolat ähnliche Ergebnisse (Kane et al. 2012). Obwohl die Isolierungs-Methode in Anlehnung an erfolgreiche Anreicherungen durchgeführt wurde, Lang *et al.* (2011), Takamatsu *et al.* (2018) und Vieira *et al.* (2014), konnten keine positiven Effekte erzielt werden. Es sollten weitere Methoden in Betracht gezogen werden, unter anderem Primer explizit für das Chloroplasten-Genom anzufertigen und einen Bereich von 5.000 bis 7.000 bp zu amplifizieren. Dadurch kann das ganze Chloroplasten-Genom mittels PCR amplifiziert werden. Zudem existieren eine Vielzahl an Chloroplasten-Isolierungs-Kits von diversen Firmen (Merck, Abcam, BioVision), die teilweise eine Gradienten-Zentrifugation beinhalten (Chloroplast Isolierung Kit von Abcam). Diese könnten in weiteren Forschungsarbeiten überprüft werden, wozu aber weitere Sequenzierungen notwendig wären.

Bezüglich der Variabilität des Chloroplasten-Genoms und der damit auftretenden Einzelbasenaustausche sind momentan nur wenige Publikationen vorhanden. So wurde bei folgenden Pflanzenspezies *Theobroma cacao* (Kane et al. 2012; Herrmann et al. 2014), *Phoenix dactylifera* (Khan et al. 2012; Khan et al. 2018), *Cannabis sativa* (Oh et al. 2016), *Oryza sativa* (Tang et al. 2004), *Solanum lycopersicum* (Kahlau et al. 2006) und *Olea europea* (Mariotti et al. 2010) ein Vergleich der Chloroplasten-Sequenzen innerhalb der Sorten durchgeführt und unterschiedliche Ergebnisse erhalten. So wurde im Zuge der Analyse eine Differenzierung hinsichtlich Edel- und Konsumkakao vorgenommen, wobei zwischen 9 Sorten insgesamt 78 SNPs detektiert wurden (160.619 bp cpDNA) und 30 bis 50 SNPs zwischen den Sorten Arriba und CCN-51 (Kane et al. 2012; Herrmann et al. 2014). Des Weiteren wiesen die Olivenbaum Sorten Frantio und Bianchera 200 SNPs auf (155.889 bp cpDNA)

(Mariotti et al. 2010) und die Reissorten 93-11 und PA645 72 SNPs (134.551 bp cpDNA) (Tang et al. 2004). Dahingegen besaßen die vier Dattelpalmen Sorten Assel, Khalas, Naghal und Khanzei nur 56 SNPs (158.458 bp cpDNA) (Khan et al. 2012; Khan et al. 2018) und die Cannabis Sorten Cheungsam und Yoruba nur 9 SNPs (153.854 bp cpDNA) (Oh et al. 2016). Demgegenüber konnten bei den Tomaten Sorten Ailsa Craig und IPA-6 keine Unterschiede, analog zur Walnuss, identifiziert werden (Kahlau et al. 2006).

Die Ursachen für die unterschiedliche Variabilität der einzelnen Chloroplasten-Genome sind vielschichtig. Diesbezüglich spielen Generationszeiten und Mutationsraten eine wesentliche Rolle. Im Allgemeinen weisen die cpDNA eine Mutationsrate von  $1,0$  bis  $3,0 \times 10^{-9}$  Basen/Jahr auf (Wolfe et al. 1987). Die früheste namentlich bekannte Erwähnung erfolgte 1786 durch die Sorte Franquette (Brägger 1992; Szalatnay et al. 2011). Die Wahrscheinlichkeit war somit sehr gering, dass Mutationen auftraten, die sich wiederum im Organismus hätten durchsetzen müssen, sodass sie bei der Befruchtung vererbt werden würden. Die züchterische Sortenentwicklung wurde bei der Walnuss erst 1950 durch Serr und Forde begonnen und hauptsächlich wurden die Sorten Franquette und Payne (s. Kapitel 2.1.3 Abbildung 4 und 5) als maternale Grundlage für die meisten Sorten verwendet. Somit besteht ein enges Verwandtschaftsverhältnis zwischen den einzelnen Sorten und kombiniert mit einer geringen Mutationsrate zu den Sequenzierungsergebnissen führten und der Abwesenheit von SNPs. Zudem zeigt bereits eine Studie von Wang *et al.* (2015), dass die nah verwandten Arten *J. regia* und *Juglans sigillata* nur 8 SNPs auf ihren Chloroplasten-Genomen vorweisen. Diese Beobachtung liefert zusätzliche Hinweise darauf, dass das Chloroplasten-Genom der Walnuss im Vergleich zu anderen Pflanzengattungen eine niedrigere Mutationsrate aufweist. Demgegenüber verfügt der Kakao über eine ausgeprägtere Evolutionsgeschichte. Zum einen konnten sich diverse Sorten in den jeweiligen Anbauregionen etablieren, zum anderen wurde Kakao früh kultiviert und Edel- und Konsumkakao entwickelt. Dabei handelt es sich um die drei Hauptgruppen Criollo, Forastero und Trinitario, denen diverse Sorten zugeordnet werden (Kane et al. 2012). Ähnlich der Walnuss weisen auch die beiden Tomatensorten Ailsa Craig (europäische Sorte) und IPA-6 (lateinamerikanische Sorte) keine Unterschiede auf ihrem Genom auf. Die Tomate wurde aus Lateinamerika importiert und vor vielen hundert Jahren entstanden eigene Sorten in Europa (Kahlau et al. 2006). Dies legt nahe, dass auch die Tomate nur eine sehr geringe Mutationsrate besitzt, weshalb das Chloroplasten-Genom konserviert vererbt wurde.

Zusammenfassend lassen sich durch die gewonnenen Ergebnisse folgende Rückschlüsse ziehen. Das Chloroplasten-Genom kann für eine Sortendifferenzierung verwendet werden, allerdings sollte im Vorfeld die Verwandtschaftsverhältnisse und der Entwicklungszeitraum der Sorten überprüft werden, um mögliche Rückschlüsse auf die Nukleotidvariabilität ziehen zu können. Eventuelle Studien über die innerartliche Differenzierung ermöglichen es, eine Abschätzung vornehmen zu können. Zudem sollten detektierte SNPs durch eine Sanger-Sequenzierung überprüft werden, wenn die Coverage unter 30x

liegt, um Sequenzierungsfehler oder Mutationen eines Organismus und nicht der gesamten Sorte ausschließen zu können.

### **4.4 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von Genabschnitten auf dem Karyom**

In Anbetracht der Ergebnisse der Chloroplasten-Sequenzierung lag der weitere Fokus der Forschungsarbeit auf die ncDNA, die eine Mutationsrate von 3,2 bis  $9,0 \times 10^{-4}$  Basen/Jahr aufweist (Wolfe et al. 1987). Durch den diploiden Charakter der Walnuss und den maternalen und paternalen Einfluss im Hinblick auf die Befruchtung, konnte für eine eindeutige Identifizierung nur maternales Pflanzenmaterial verwendet werden. Hierbei handelt es sich um Walnussblätter und -perikarp. Bei den Walnussamen handelt es sich um ein Pflanzenmaterial, welches durch die Verschmelzung der Ei- und Samenzelle entsteht und somit die maternale und paternale Sorte im Genotyp verankert wird (s. Kapitel 2.1.2). Aus diesem Grund konnte der Samen nicht verwendet werden, allerdings wird die Walnuss zu 20 % in Schale importiert, sodass eine Analyse diesbezüglich wirtschaftlich relevant ist (s. Kapitel 2.1.3).

#### *4.4.1 Auswertung der Optimierungsschritte für die PCR der Sanger-Sequenzierung*

##### Optimierung der PCR-Bedingungen für die erste Sequenzierung

Das optimierte Pipettierschema wurde im Anhang 9.5.2 in der Tabelle 70 zusammengefasst. In Vorversuchen wurden diverse Polymerasen getestet, wobei sich die *OneTaq<sup>®</sup>HotStart*-DNA-Polymerase durchsetzte. Das Besondere an dieser Polymerase ist der Aptamer-basierte Inhibitor, der erst bei höheren Temperaturen abgespalten wird, sodass die Polymerase aktiv wird. Dadurch wird eine unspezifische Produktbildung bereits bei dem Pipettiervorgang minimiert. Durch die 3`-5`-Exonukleasefunktion ist das Enzym in der Lage einen fehlerhaften Baseneinbau zu korrigieren (NEB o. D. a). Des Weiteren zeigte sich, dass nur mit dieser Polymerase Amplifikate für die Genabschnitte ADH2 und FAD<sub>2,1</sub> gebildet werden konnten.

Nachdem die Annealing-Temperatur für jedes Primerpaar erfolgreich analysiert wurde, erfolgte die Amplifikation aller authentischen 12 Sorten, mit Ausnahme von FAD<sub>2,1</sub> bei dem bereits eine Verringerung der Primer-Konzentration erfolgte. Dabei konnte für FAD<sub>2,1</sub> und WRKY Amplifikationsprodukte mit einer ausreichenden Bandenschärfe erhalten werden, sodass keine weiteren Optimierungen vorgenommen werden mussten. Hierbei wird beispielhaft der Genabschnitt WRKY in folgender Abbildung präsentiert (Marker s. Anhang 9.5.3 Abbildung 66).

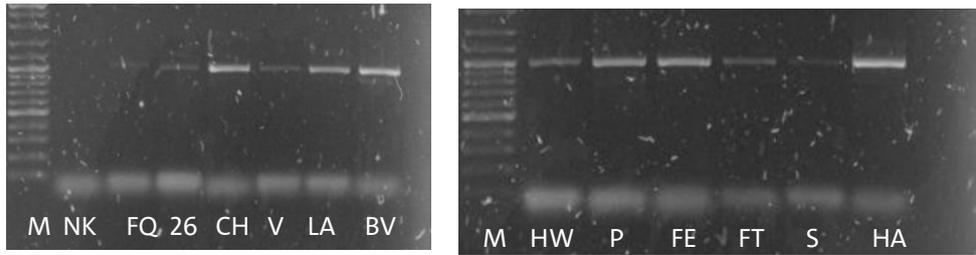


Abb. 37: a) Genabschnitt WRKY (100 bp) mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben mit der optimierten Annealing-Temperatur.

Für den Genabschnitt ADH2 konnte zwar überall ein gewünschtes Produkt erzeugt werden, allerdings traten bei den ersten 6 Sorten ein weiteres unspezifisches Produkt bei 1.100 und 1.300 bp auf. Weiterhin zeigten die Sorten Fernor, Fernette und Serr eine kontinuierliche über viele Größenbereiche verlaufende DNA-Bande (Schmier), sodass hier eine zu hohe DNA- oder Primer-Konzentration zu vermuten war (Zrimec et al. 2013). Die Wiederholung der Sorten Howard bis Hartley, zur Beseitigung der kontinuierlichen DNA-Bande, erfolgte zunächst mit unveränderten Bedingungen, um das vorherige Ergebnis zu überprüfen. Dabei konnte weiterhin eine leichte kontinuierliche DNA-Bande beobachtet werden, sodass eine Minimierung der Primerkonzentration vorgenommen und schärfere Banden erhalten wurden. Bei der Sorte Serr verringerte sich die Intensität signifikant, sodass für weitere Versuche die ursprünglichen Parameter verwendet wurden. Möglicherweise war die unzureichende Hybridisierung des Primerpaares auf einen Einzelbasenaustausch in dem DNA-Template zurückzuführen oder auf eine mindere Qualität des DNA-Isolates (Opel et al. 2010). Die Minimierung der unspezifischen Produkte bei den ersten sechs Sorten konnte ebenfalls durch Verringerung der Primerkonzentration bewirkt werden. Eine vollständige Eliminierung war jedoch nicht möglich, da eine weitere Reduktion keine oder nur schwache Amplifikate erzeugte und somit die Effizienz der PCR zu stark herabgesetzt wurde. Die Verringerung des DNA-Templates führte zu keiner Verbesserung. Somit wurde abschließend in Tabelle 70 im Anhang 9.5.2 die entsprechende Visualisierung der endgültigen Parameter dargestellt, die zum Erfolg führten.

Bei dem Genabschnitt ADH1 war es nicht möglich, für alle Sorten ein Amplifikat zu erhalten, sodass analog zu ADH2 Optimierungsschritte für die Sorten Lara, Howard und Hartley vorgenommen wurden. Dabei zeigte sich, dass durch eine Erhöhung der Templatekonzentration ein Amplifikat bei der Sorte Howard gebildet werden konnte (Opel et al. 2010). Trotzdem wurden für die Sorten Lara und Hartley keine Amplifikate erhalten. Erst durch die Verwendung von neuen Isolaten gelang die Amplifikation, sodass zu vermuten ist, dass die Qualität der DNA-Isolate für die Reaktion nicht ausreichend war (Q et al. 2016). Eventuell störten auch PCR-Inhibitoren die Reaktion, dabei könnte es sich um Artefakte aus der DNA-Isolierung handeln, die entweder aus dem Blattmaterial oder den Pufferlösungen stammten. Bei den bekanntesten PCR-Inhibitoren handelt es sich um organische Komponenten wie Phenol, Ethanol, Polysaccharide, Detergenzien und Proteine. Diese können einerseits einen irreversiblen Komplex mit der DNA ausbilden oder andererseits die Aktivität der Polymerase verringern oder diese

denaturieren (Opel et al. 2010). Somit wurde abschließend in den folgenden Abbildung 38 bis 41 die entsprechende Visualisierung der endgültigen Parameter dargestellt, die zum Erfolg führten.

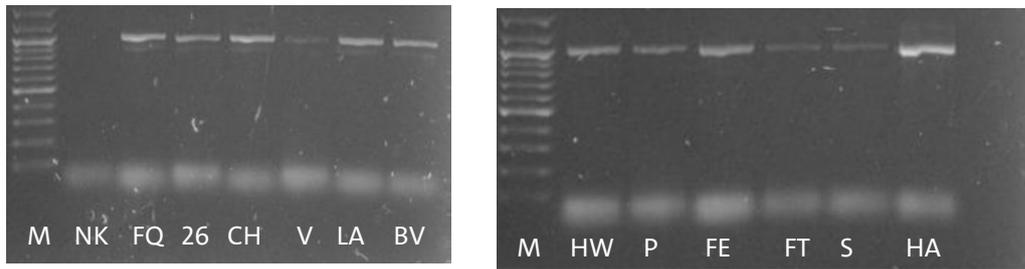


Abb. 38: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes WRKY mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung.

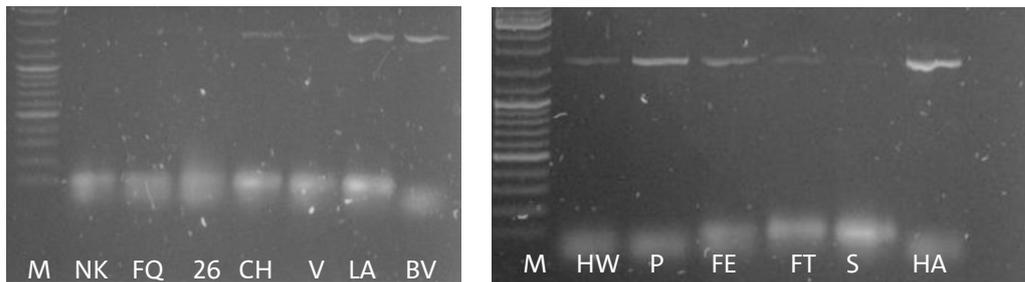


Abb. 39: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes ADH1 (1.600 bp) mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung.

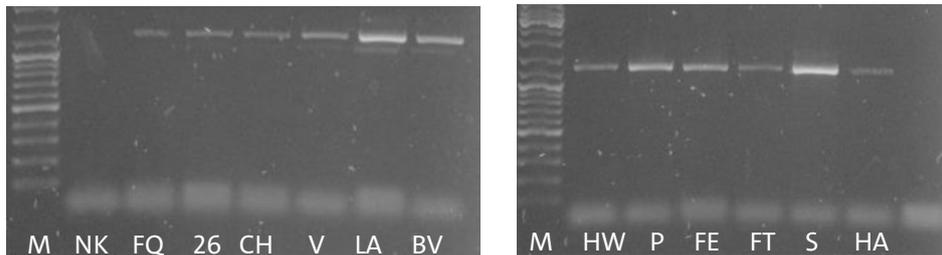


Abb. 40: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes ADH2 (1.300 bp) mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung.

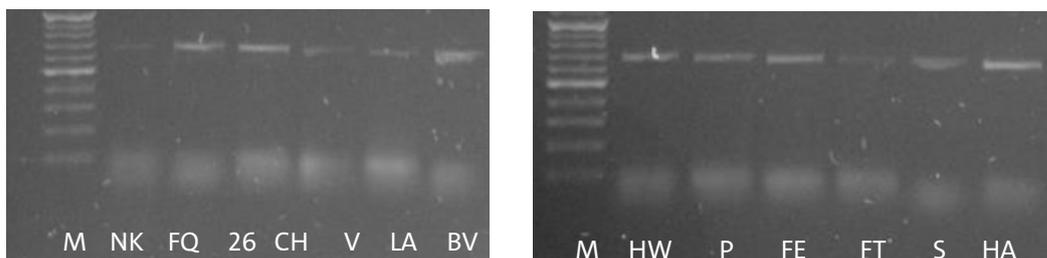


Abb. 41: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes FAD<sub>2.1</sub> (700 bp) mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung.

Für die Sanger-Sequenzierung war es notwendig, eine Mindestkonzentration von 20 ng/ $\mu$ L zu erreichen, um optimale Sequenzierungsergebnisse zu erhalten. Hierbei konnten die Maßgaben nur mit dem Genabschnitt WRKY in einem Reaktionsansatz von 100  $\mu$ L erreicht werden. Die anderen Genabschnitte wiesen alle eine geringere Konzentration auf, sodass die PCR-Experimente wiederholt werden mussten und die Produkte abschließend vereinigt und aufkonzentriert wurden. Zudem zeigte

sich bei ADH1 und ADH2 eine erneute kontinuierliche DNA-Bande, welche durch eine zu hohe DNA-Konzentration oder Degradierung der DNA hervorgerufen sein könnte (Zrimec et al. 2013). Zudem war die Polymerase auch in der Lage die längeren Fragmente von 1.300 und 1.600 bp zu bilden, da laut Spezifikationen Fragmentgrößen von bis zu 6 kbp erreicht werden können (NEB o. D. a). Zudem könnte die Ursache auch bei den Primern liegen, die durch ihre Sequenzabfolge zu Homo- oder Heterodimeren neigen könnten (Brownie et al. 1997; Opel et al. 2010). Die kontinuierliche DNA-Bande trat jedoch nicht reproduzierbar auf, sodass eventuelle natürliche Reaktionsschwankungen dafür verantwortlich sein könnten.

### Optimierung der PCR-Parameter für die zweite und dritte Sequenzierung

Nach der Auswertung der ersten Sequenzierung zeigte sich, dass bei den Proben, die aus mehreren PCR-Ansätzen vereint wurden, Sequenzüberlagerungen auftraten, vermutlich auf Grund von unerwünschten Nebenprodukten. Deshalb war es notwendig, die PCR für die jeweiligen Genabschnitte erneut zu optimieren. Dabei lag der Fokus auf den Genabschnitten ADH1, ADH2 und FAD<sub>2</sub>, wobei auch der Genabschnitt WRKY weiter optimiert wurde. Für den Genabschnitt FAD<sub>2</sub> wurde ein neues Primerpaar entworfen (FAD<sub>2,2</sub>), welches eine deutlich höhere Schmelztemperatur aufwies (57,2 und 59,7 °C statt 52,6 und 52,9 °C, s. Anhang 9.5.2 Tabelle 68). Dadurch konnte eine höhere Annealing-Temperatur angewendet werden und somit die unspezifische Produktbildung minimiert werden (Opel et al. 2010). Zudem wiesen die Primer eine niedrigere Affinität zueinander auf, sodass die Bildung von Homo- und Heterodimeren nachweislich verringert wurde (Brownie et al. 1997). Anhand der Gradienten-PCR konnten längere unspezifische Amplifikate festgestellt werden, diese wurden jedoch durch Verringerung der Elongationszeit verhindert. Zudem wurden für alle Genabschnitte die Template-Konzentrationen verzehnfacht, um eine ausreichende Konzentration des DNA-Templates gewähren zu können. Durch die optimierten Parameter gelang es für den Genabschnitt WRKY sowie für FAD<sub>2,2</sub> (s. Abbildung 42) für jede Sorte ein Amplifikat in ausreichender Konzentration zu erhalten. Allerdings wiesen die Sorten Franquette, Lara und Broadview nur eine schwache Intensität oder eine kontinuierliche DNA-Bande auf (s. Abbildung 42). Dadurch war es notwendig, zwei 100 µL Ansätze zu vereinigen.

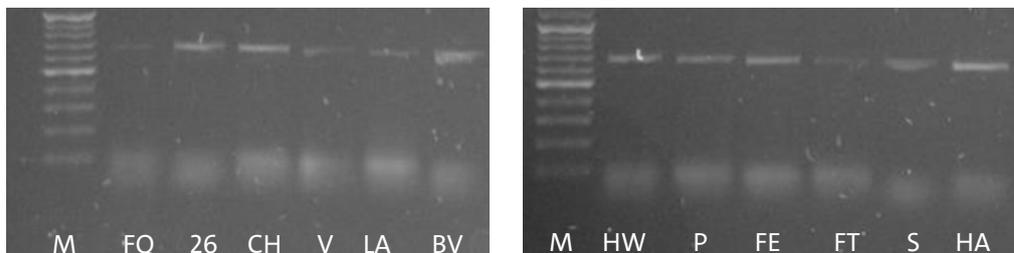


Abb. 42: Optimierte Bedingungen des Genabschnittes FAD<sub>2,2</sub> (700 bp) mit M (Marker) und den authentischen Proben für die erste Sanger-Sequenzierung.

Bei den Genabschnitten ADH1 und ADH2 wurden die gleichen Veränderungen vorgenommen, allerdings zeigte sich nur eine kontinuierliche DNA-Bande. Somit wurde eine andere Polymerase mit einer höheren Prozessivität ausgewählt und die *BiozymTaq*-DNA-Polymerase wurde anhand des Genabschnittes ADH1 getestet (Wang et al. 2004). Laut Herstellerangaben besitzt diese Polymerase eine höhere Geschwindigkeit, Spezifität und würde somit ein Anstieg der Quantität des Amplifikates bewirken (Biozym 2020). Dabei zeigten sich im ersten Versuch viele unspezifische Produkte, die durch eine Verringerung der Primerkonzentration und eine Kühlung mit Eis des Mastermixes bei der Probenvorbereitung eliminiert werden konnten. Die Polymerase war bereits bei Raumtemperatur aktiv, da im Gegensatz zur *OneTaq<sup>®</sup>HotStart*-DNA-Polymerase keine Inhibierung vorlag (NEB o. D. a). Aus diesem Grund war eine permanente Kühlung notwendig. Analog zur Optimierung von ADH1 wurde mit dem Genabschnitt ADH2 verfahren. Es zeigten sich auch bei diesem Genabschnitt viele unspezifische Produkte, die erst durch eine sehr hohe Annealing-Temperatur von 63,2 °C verhindert werden konnten. Jedoch lag dieser Wert 8 °C über den Schmelzpunkt des niedrigen schmelzenden Primers, sodass die angestrebte Spezifität zugleich eine Verringerung der Effizienz bewirkte. Somit konnte die angestrebte Konzentration für die Sanger-Sequenzierung nicht erreicht werden, weshalb erneut mehrere Reaktionsansätze vereint werden mussten.

Die optimierten Parameter sind im Anhang 9.5.2 in der Tabellen 73 aufgeführt.

### Optimierung der PCR-Parameter für das Walnussperikarp

Die Übertragung der Parameter zur Amplifizierung der Genabschnitte aus dem Blattmaterial konnte für das Walnussperikarp nicht analog übernommen werden. Lediglich der Genabschnitt WRKY produzierte Amplifikate mit einer geringen Intensität (s. Abbildung 43).

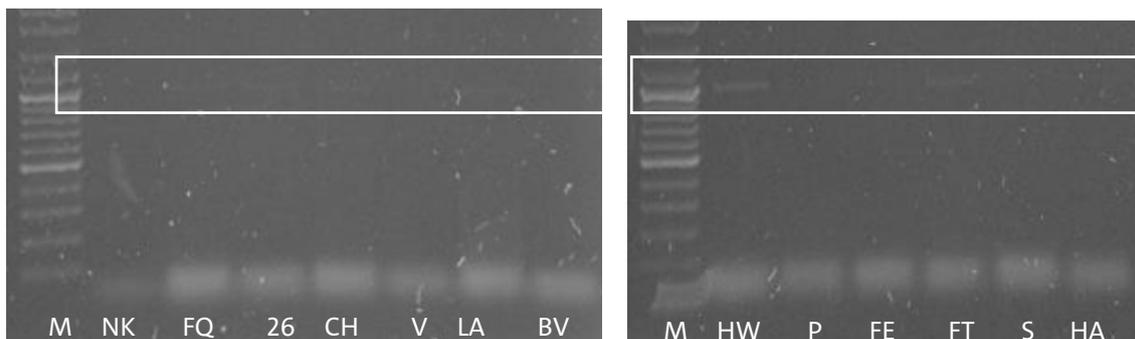


Abb. 43: Übertragung der Parameter des Genabschnittes FAD<sub>2.2</sub> mit M (Marker), NK (Negativkontrolle) und den authentischen Proben auf das Walnussperikarp.

Dies könnte auf eine geringe DNA-Qualität zurückzuführen sein, zum einen durch Degradation während der Aufarbeitung mit der Messermühle, zum anderen durch Kontaminationen mit organischen Substanzen (Jobes et al. 1995), die im Gegensatz zum Blattmaterial in höherer Konzentration auftraten. Trotz diverser Veränderungen der Versuchsparameter konnten keine reproduzierbaren Amplifikate für die jeweiligen Genabschnitte erhalten werden. Aus diesem Grund

wurden weitere PCR-Experimente (ARMS- und RFLP-PCR) direkt mit den Isolaten des Walnussperikarps getestet.

### 4.4.2 Auswertung der Sequenzierungsergebnisse hinsichtlich SNPs

Die Sequenzierung gelang nur mit Blattisolaten, da die Isolate aus dem Walnussperikarp weniger geeignet waren. Die Ergebnisse der ersten Sequenzierung zeigten, dass mit einigen Sorten keine auswertbaren Sequenzen erhalten wurden. Zudem traten Sequenzüberlappungen durch unspezifische Sequenzen auf. Die Ursache könnte in der Vereinigung von vielen Ansätzen liegen, die zu einer Anreicherung von unspezifischen Produkten führte. Möglicherweise reichte die DNA-Qualität für die Sequenzierung nicht aus oder die Anwesenheit von Kontaminanten beeinflussten die Sanger-Sequenzierung negativ, da es sich um eine enzymatische Reaktion handelte. Durch vorherige Überprüfung der DNA-Konzentration konnte eine zu hohe Konzentration ausgeschlossen werden. Allerdings könnte bei einer zu geringen DNA-Konzentration eine unzureichende Produktbildung auftreten, sodass die Signale für eine eindeutige Detektion nicht auswertbar waren. Die unzureichenden Sequenzierungsergebnisse traten hierbei am stärksten bei vereinten Ansätzen auf, die zum Erreichen der Mindest-DNA-Konzentration aufkonzentriert wurden. Aus diesem Grund wurden die darauffolgenden Sequenzierungsversuche weiter optimiert, um ausreichend DNA-Konzentration in einem PCR-Ansatz zu erhalten. Für die Genabschnitte wurden nur die fehlgeschlagenen Sorten erneut sequenziert. Durch die optimierten PCR-Parameter gelang es die geforderte Mindestkonzentration bereits in einem Ansatz zu erhalten, sodass nur wenige Sorten anhand von mehreren Ansätzen sequenziert werden mussten. Dadurch waren die Ergebnisse der Sequenzierung von höherer Qualität und längere Fragmente wurden sequenziert. So konnte zusammenfassend für jede Sorte und den jeweiligen Genabschnitt mindestens eine vollständige Sequenz erhalten werden. Diese Dateien wurden im Anschluss mit Hilfe der Software *Genome Compiler* aligniert und hinsichtlich SNPs untersucht. Dabei konnten erfolgreich Unterschiede auf dem Karyom detektiert werden. Hierbei wurden sowohl die Vorwärts- als auch die Rückwärtssequenzierungen miteinander verglichen, da durch die Überlappung der Sequenzierungsbereiche das Vorhandensein der SNPs in beiden Sequenzierungen überprüft werden konnte, um ihre Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung ist es theoretisch möglich Längen von bis zu 1.000 bp zu sequenzieren, allerdings zeigte sich in der Praxis nur Längen von bis zu 700 bp als aussagekräftig, da eine ausreichende Signalintensität gewährleistet werden konnte (Men et al. 2008). Durch die abnehmende Signalintensität konnten SNPs, die erst in späteren Sequenzbereichen auftraten, nicht eindeutig hinsichtlich ihrer Homo- oder Heterozygotie beurteilt werden. Durch den diploiden Charakter der Walnuss und den Ergebnissen der Studie von Zhu *et al.* ((Zhu et al. 2019) zeigten sich SNPs auf dem Karyom oftmals als heterozygot, sodass diese SNPs weniger geeignet für weitere *Downstream-*

Methoden waren. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt und die Allele hinsichtlich ihrer Homo- oder Heterozygotie zugeordnet.

Tab. 10: Zusammenfassung der Genabschnitte der Vorwärts (FW)- und Rückwärtssequenzierung (RV) und die detektierten SNPs sowie deren Polymorphismus und Einteilung hinsichtlich Hetero- und Homozygotie. Die grünen Sorten liegen in Doppelbestimmung vor, die roten Sorten nur in Einfachbestimmung.

Sequenzierungsfragment	SNP Nr.	Position auf Fragmentabschnitt	Polymorphismus	Allel	Sorte	HO	HE			
ADH1 FW	1	255	G/A	G	V, S	x				
				A/G	LA, CH		x			
				A	HA, FE, FT, BV, FQ	x				
	2	559	G/A	A/G	LA, V, S, BV		x			
				G	HA	x				
ADH1 RV	3	522	G/T	T/G	V, S, 26, LA		x			
				G	FE, FT, BV, HA, FQ	x				
ADH2 RV	4	76	G/A	G	LA, V	x				
				G/A	CH, P, 26, FT, S		x			
				A	FE, HA, BV, FQ	x				
	5	209	C/T	C	HA, BV, FQ	x				
				C/T	FE, CH, 26, S		x			
				T	LA, P, FT, V	x				
	6	306	G/A	A/G	P, S		x			
				G	FQ, V, FT, HA, restliche Sorten	x				
				7	484	C/A	C/A	FE, HA, CH, BV, FQ, 26, FT		x
							A	LA, V, P	x	
FAD <sub>2.2</sub> FW	8	164	G/C	G	BV	x				
				C	CH, V, FT, restliche Sorten	x				
	9	545	C/T	C	BV	x				

Fortsetzung Tab. 10: Zusammenfassung der Genabschnitte der Vorwärts (FW)- und Rückwärtssequenzierung (RV) und die detektierten SNPs sowie deren Polymorphismus und Einteilung hinsichtlich Hetero- und Homozygotie. Die grünen Sorten liegen in Doppelbestimmung vor, die roten Sorten nur in Einfachbestimmung.

Sequenzierungs-fragment	SNP Nr.	Position auf Fragmentabschnitt	Polymorphismus	Allel	Sorte	HO	HE
	10	575	G/A	T	CH, V, S, FQ, 26, LA, P, FE, HA	x	
				G	BV	x	
				A	CH, V, S, FQ, 26, LA, P, FE, HA	x	
FAD <sub>2.2</sub> RV	10	35	C/T	C	BV	x	
				T	V, FE, S, HA, P, FQ, 26, CH, LA	x	
	9	65	G/A	G	BV	x	
				A	V, FE, FT, S, P, FQ, 26, CH, LA, HA	x	
	8	446	C/G	C	BV	x	
G				V, 26, FQ, FT, restliche Sorten	x		
WRKY FW	11	189	A/T	A/T	CH		x
				T	FT, restliche Sorten	x	
	12	216	C/A	C	LA, V, FE	x	
				A/C	FQ, BV, CH, S, HA		x
WRKY RV	12	719	G/T	A	26, P, FT	x	
				G	LA, FE, V, HA	x	
				T/G	CH, BV, FQ		x
	11	746	T/A	T	P, 26, S, FT	x	
				T/A	CH		x
				A	FT, HA, FQ, S, restliche Sorten	x	

Anhand der Tabelle wird ersichtlich, dass alle Genabschnitte heterozygote SNPs besitzen und somit die Forschungsergebnisse von Zhu *et al.* (2019) bestätigen. Die Heterozygotie beruht auf dem diploiden

Charakter der Walnuss, dadurch besitzt ein Chromosom das Allel des maternalen Erbgutes und das andere Chromosom das Allel des paternalen Erbgutes, sodass bei dem SNP beide Basen auftreten (Aradhya et al. 2010). Zudem sollen in der Theorie beide Sequenzen mit einer gleichen Signalintensität vorhanden sein. In der Praxis zeigten sich aber unterschiedliche Signalintensitäten, je nachdem welches Allel bevorzugt amplifiziert wurde und eventuell bereits im Isolat mit einer höheren Konzentration vorlag. Dadurch mussten SNPs in einer Doppel- oder Dreifachbestimmung abgesichert werden, um eventuelle Signalinterferenzen zu detektieren. Oftmals war eine verringerte Coverage an dieser Stelle ein Hinweis auf ein möglichen heterozygoten SNP.

Für die Sorten wurden unterschiedlich lange Sequenzierungsergebnisse erhalten (ADH1 144 bis 940 bp, ADH2 105 bis 870 bp, FAD2 220 bis 651 bp, WRKY 245 bis 972 bp), sodass oftmals ein SNP nur in Einfachbestimmung vorlag (vgl. Tabelle 10, rote Markierung). Hierbei zeigte sich, dass höhere Konzentrationen längere Sequenzfragmente produzierten, sodass die maximale Konzentration von 80 ng/ $\mu$ L angestrebt werden sollte. Zudem konnten keine Insertionen oder Deletionen entdeckt werden, vielmehr traten nur Einzelbasenmutationen auf. Für weitere Sequenzierungen wäre es mitunter ratsam, die Targetregion zu verkürzen, da anhand der Elektropherogramme deutlich wurde, dass die Intensität und somit die Qualität der Signale oberhalb von 500 bp abnahmen. Deshalb sollte für zukünftige Versuche eine Fragmentlänge von 500 bis 600 bp angestrebt werden. Zudem kann nach der Identifizierung der SNPs die Primer so entworfen werden, dass besonders variable Regionen amplifiziert werden (Detwiler et al. 2004).

Durch die Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung konnte bei den Genabschnitten WRKY und FAD<sub>2</sub> die SNPs in beiden Sequenzierungen detektiert werden. Bei den Abschnitten ADH1 und 2 waren die Fragmente mit einer Größe von über 1.000 bp zu groß, um diese Absicherung zu gewährleisten. Die durchschnittliche Sequenzlänge betrug 500 bis 700 bp, jedoch konnte die Sequenzlänge stark variieren in Abhängigkeit zur Qualität und Quantität des eingesetzten DNA-Amplifikats (Men et al. 2008).

Bei der genaueren Betrachtung des SNP Nr. 6 wurde deutlich, dass dieser Bereich eine hohe Homologie aufwies, da die Base Adenin acht Mal hintereinander vorlag. Bei der Replikation stieg dadurch die Wahrscheinlichkeit, dass die Polymerase ins „Stottern“ gerät und somit ein inkorrektes Nukleotid eingebaut wurde. Aus diesem Grund sollte bei der Amplifizierung eine Polymerase mit *Proofreading*-Aktivität ausgewählt werden, was durch die *OneTaqHotStart*-DNA-Polymerase gewährleistet wurde (Tippin et al. 2004).

Dahingegen wies der SNP Nr. 12 auf der Vorwärts- und Rückwärtssequenz unterschiedliche Ergebnisse für die Sorten Hartley und Serr auf (vgl. Tabelle 10). Zum einen war das Fragment der Rückwärtssequenz zu kurz, um den SNP detektieren zu können, zum anderen könnte Heterozygotie dafür verantwortlich gewesen sein. Bei der ersten Sequenzierung wiesen die Proben einen homozygoten SNP auf, wobei die Signalintensität reduziert war, sodass ein Allelverlust aufgetreten sein könnte. Dies wird auch als *Allelic*

*Dropout* bezeichnet und beinhaltet die bevorzugte und dominante Amplifizierung eines Allels (Soulsbury et al. 2007). In der darauffolgenden Sequenzierung konnte eindeutig eine Basenüberlappung festgestellt werden.

Mit Hilfe der detektierten SNPs war es möglich, die 12 verschiedenen Sorten fast vollständig zu differenzieren (s. Abbildung 44). Einzig die Sorten Franquette und Hartley konnten nicht voneinander separiert werden. Anhand der Abbildung 44 und der Tabelle 10 wird die Heterozygotie von *J. regia* deutlich und die Entwicklung weitere *Downstream*-Methoden erschwert, da oftmals keine eindeutigen Ergebnisse produziert werden können. Aus diesem Grund lag der weitere Fokus auf der Etablierung von Methoden für die Routineanalytik, die diese komplexe Problematik veranschaulichen können.

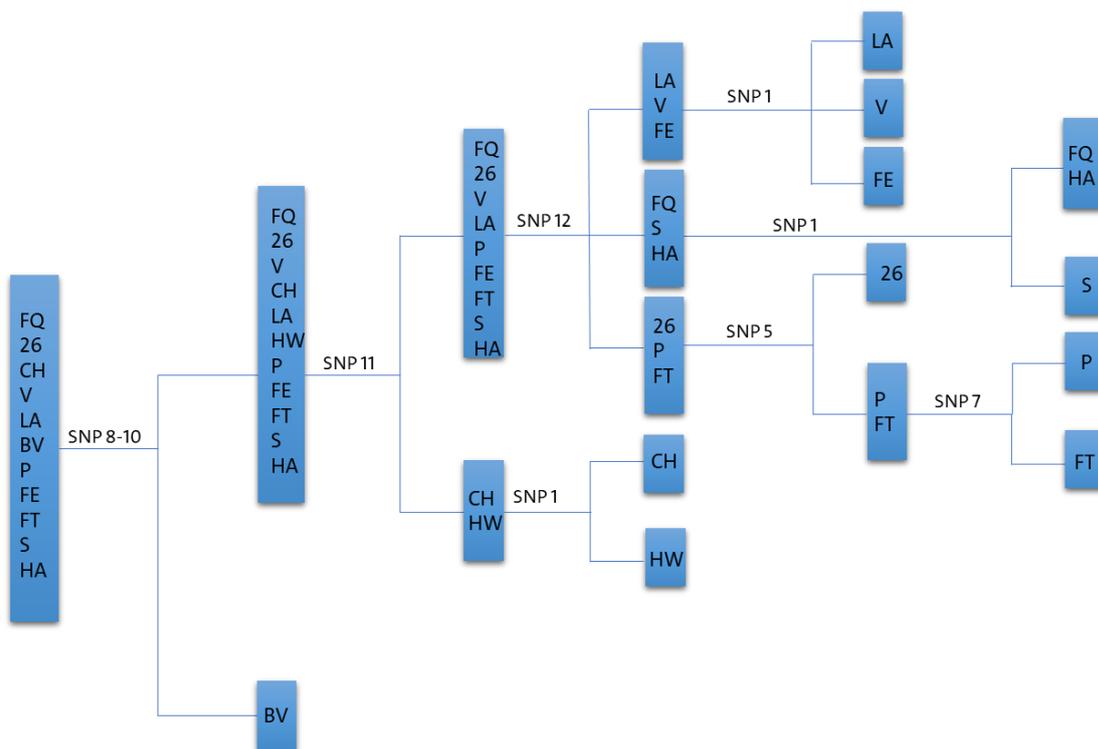


Abb. 44: Differenzierung der authentischen Walnussorten anhand der detektierten SNPs.

#### 4.5 Entwicklung von *Downstream*-Methoden für die Routineanalytik

Im Folgenden wurden zwei Methoden ausgewählt, die bereits in der Routineanalytik Anwendung finden. Hierbei handelt es sich um die RFLP- und die ARMS-PCR, wobei letztere besonders für heterozygote Organismen geeignet ist.

##### 4.5.1 Entwicklung einer RFLP-PCR für Walnussblätter und -perikarp

Zusammenfassend sind in Tabelle 11 die SNPs aufgelistet, welche in der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzymes lagen. Zudem wurde eine Einteilung hinsichtlich ihrer Homo- oder Heterozygotie vorgenommen. Auf Grund der Ergebnisse der SSR-Analyse wurde die Sorte Howard bei den Blattproben nicht analysiert (vgl. Kapitel 4.6.2).

Tab. 11: Zusammenfassung der Genabschnitte auf dem Karyom mit ihrer jeweiligen Schnittstelle und dem dazugehörigen Enzym sowie die optimale Inkubationstemperatur und die Kategorisierung nach homo- oder heterozygot. Die Sorten Broadview (BV), Chandler (CH), Fernor (FE) wiesen nur einen homozygoten SNP auf.

Genabschnitt	FAD <sub>2</sub> (SNP Nr. 9)	ADH2-Rv (SNP Nr. 5)	WRKY-Fw (SNP Nr. 11)	ADH2-Rv (SNP Nr. 4)	ADH1-Rv (SNP Nr. 3)	ADH1-Fw (SNP Nr. 1)
Restriktions- enzym (NEB)	Bsm I	AluI	Dra I	ApaLI	Bps I	Tsp45I
Schnittstelle	GAATG/CN	AG/CT	TTT/AAA	G/TGCAC	GAAGACNN/	/GTSAC
Inkubation [°C]	65	37	37	37	37	65
homozygot	x (BV)		x (CH)		x (FE)	
heterozygot		x		x		x

Interessanterweise waren einige ausgewählte homozygote SNPs heterozygot in einigen Sorten, dies konnte allerdings in der praktischen Durchführung nicht nachgewiesen werden. Für die weitere Anwendung muss berücksichtigt werden, dass heterozygote Sorten bei einem unvollständigen Schnitt das gleiche Bandenmuster wie homozygote Sorten ergeben. Aus diesem Grund muss das Verfahren im Labor entsprechend validiert werden, um optimale Versuchsparameter anzuwenden. Dieses Phänomen tritt besonders bei zu hohen DNA-Konzentrationen auf (Lander und Botstein 1986). Zudem können Kontaminationen im DNA-Isolat zu einer Inhibierung des Enzyms führen, sodass falsch negative Ergebnisse entstehen (Opel et al. 2010). Hierbei wäre es möglich eine Positiv-Kontrolle eines abgesicherten homozygoten SNPs bei jeder Analyse zu bestimmen, um die Fehlerwahrscheinlichkeit einschätzen zu können. Für die Routineanalytik eignet sich die Methode dahingehend, dass einige Sorten gezielt differenziert werden können. So war es möglich die Sorten Broadview, Chandler und Fernor anhand eines Enzymes und einem spezifischen Schnittmuster von den anderen Sorten zu separieren (s. Tabelle 11). Hierbei zeigten die jeweils anderen Sorten keine Interaktion mit dem jeweiligen Enzym, sodass von den 12 Sorten nur eine geschnitten wurde. Dadurch wurde die Fehlerwahrscheinlichkeit signifikant reduziert, da falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse fast vollständig ausgeschlossen werden konnten.

#### Primerauswahl

Zu Beginn wurde mit Hilfe der Website Webcutter 2.0 die detektierten SNPs hinsichtlich ihrer Eignung für eine RFLP-Analyse analysiert und geeignete Restriktionsenzyme ausgewählt. Dabei muss die Basenmutation innerhalb der Erkennungssequenz des Enzymes auftreten, damit sich unterschiedliche Schnittmuster ergeben (Fjellstrom et al. 1994). Hierbei wurden sechs Bereiche identifiziert und die entsprechenden Enzyme dafür bereitgestellt (s. Tabelle 11). Dabei wurde die Gesamtfragmentgröße auf

circa 500 bp festgelegt und der entsprechende Genabschnitt ausgewählt. Zusätzlich wurde auf ein gleichmäßiges Verhältnis von A/T und G/C geachtet, um eine optimale Hybridisierung der Primer zu gewährleisten (Ralser et al. 2006). Die entwickelten Primer befinden sich im Anhang 9.5.3 in Tabelle 74. Diese wurden anschließend mit Hilfe einer Gradienten-PCR in einem Temperaturbereich von 40 bis 60 °C getestet, um die optimale Annealing-Temperatur zu erhalten, bei der nur eine spezifische DNA-Bande auf dem Gel visualisiert wurde. Dies war notwendig, da im weiteren Verlauf der RFLP-Analyse bis zu 3 Amplifikate auftreten konnten. Dazu gehörten das ungeschnittene Ausgangsprodukt und die beiden Teilfragmente nach einer erfolgreichen Spaltung mit Hilfe eines Restriktionsenzymes. Diese treten durch den heterozygoten Charakter von *J. regia* auf, wenn das maternale und paternale Erbgut an der ausgewählten Stelle variiert und somit nur ein Chromosom als Erkennungssequenz fungiert (Zhu et al. 2019).

### Optimierung der PCR-Bedingungen und Ergebnisanalyse

Für die jeweiligen Primer wurden unterschiedliche Optimierungsschritte durchgeführt, um ein auswertbares Ergebnis zu erhalten. Diese werden nachfolgend für die einzelnen SNPs aufgeführt. Hierbei wurde in einer Doppelbestimmung Blattmaterial analysiert und in einer Einfachbestimmung, wenn keine Abweichung auftrat, das Walnussperikarp.

Der SNP Nr. 1 mit dem ausgewählten Genabschnitt wurde bei einer Temperatur von 57 °C amplifiziert, sodass ein spezifisches Amplifikat erhalten wurde. Nach dem Einsatz des Restriktionsenzymes Tsp45I bei einer Inkubationszeit von 65 °C wurde ein entsprechendes Schnittmuster erhalten (s. Anhang 9.5.3 Abbildung 67). Hierbei konnte ohne weitere Optimierungsschritte ein entsprechendes Ergebnis erzielt werden. Anhand der Sanger-Sequenzierung sollten die Sorten Broadview, Fernor, Fernette, Franquette und Hartley keine entsprechende Erkennungssequenz aufweisen, da die Base Adenin anstelle von Guanin vorhanden war. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass alle Sorten von dem Enzym gespalten wurden. Da das zu amplifizierende Fragment die erwartete Größe aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass kein anderer Genabschnitt amplifiziert wurde. Somit blieb als einzige Erklärung, dass bei der Amplifizierung der Genabschnitte für die Sanger-Sequenzierung nur der maternale oder paternale Erbanteil dominant amplifiziert wurde, sodass die Intensität nicht ausreichend war, um ein entsprechendes Basensignal von Guanin zu erhalten. Möglicherweise könnte auch eine Signalüberlagerung stattgefunden haben, sodass keine Detektion möglich war, allerdings lagen einige Sorten in einer Doppel- oder Dreifachbestimmung vor, sodass diese nachgewiesen worden sein müssten. Generell sollten bei der Amplifikation beide Allele in ausreichender Konzentration amplifiziert werden, weshalb viele Sequenzierungsprojekte nach Methoden suchen, um nur den maternalen oder paternalen Teil zu analysieren (Langley et al. 2011). Des Weiteren wird anhand der

Abbildung 45 ersichtlich, dass bei einer Signalüberlagerung die entsprechende Stelle im Chromatogramm entsprechend markiert wurde. Dies trat bei den aufgeführten Sorten nicht auf, sodass eine Signalüberlagerung ausgeschlossen werden konnte. Somit blieb als einzige Erklärung ein *Allelic Dropout*, dabei handelt es sich um eine präferierte Amplifikation eines Allels bei Proben mit einer oftmals geringen Qualität oder Quantität (Soulsbury et al. 2007). Wie bereits im Kapitel 4.4.1 aufgeführt, war die Qualität der Amplifikate ausgezeichnet, allerdings war die Generierung einer entsprechenden DNA-Konzentration problematisch. Die Ursache dieses Phänomens ist bis heute kaum erforscht und kann nur durch eine Mehrfach-Bestimmung und wiederholte Extraktionen ausgeschlossen werden. Auf Grund des eingeschränkten, authentischen Probenmaterials war dies jedoch nicht möglich, weshalb diese Schlussfolgerung nicht überprüft werden konnte. Allerdings bietet es die einzige Erklärung für die Ergebnisse der RFLP-Analyse und der Sanger-Sequenzierung.

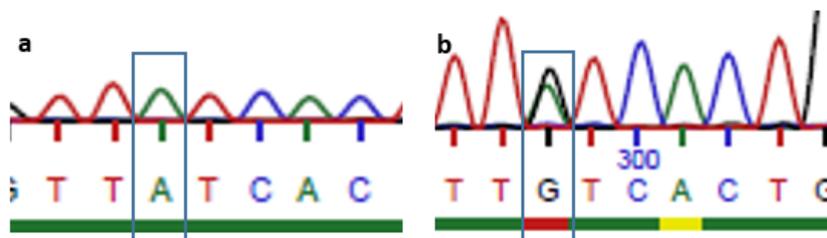


Abb. 45: Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung, mit Absicherung der Coverage in einem Ampelfarben-Code, a) Die Sorte Fernor an der signifikanten Stelle mit der Base Adenin, b) Die Sorte Vina an der entsprechenden Stelle mit einem Guanin.

Bei dem SNP Nr. 3 waren mehrere Optimierungsschritte notwendig. Das spezifische Amplifikat besaß eine Fragmentlänge von 500 bp, allerdings wurde ein weiteres Fragment bei 800 bp erhalten, das auch bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen erhalten blieb (Rychlik et al. 1990; Wu et al. 1991). Auf dem Gesamtgenom war somit eine annähernd weitere kompatible Sequenz vorhanden, die trotz Erhöhung der Temperatur über eine ausreichende Bindungsenergie der Primer an diese Sequenz verfügte. Aus diesem Grund wurde eine Temperatur von 60 °C ausgewählt. Des Weiteren wurden unterschiedliche Primerkonzentrationen getestet, um das Gleichgewicht auf die Bildung des 500 bp Amplifikates zu verschieben (Gunson et al. 2003). Hierbei wurde zuerst ein Volumen von 0,5 µL ausgewählt und im Anschluss eine weitere Reduktion auf 0,3 µL, jedoch blieb das Fragment mit einer Länge von 800 bp weiterhin bestehen. Zudem konnten nur schwache Banden erhalten werden, trotz einer Erhöhung des DNA-Templates auf 2 ng und einer Reduktion auf 0,1 ng. Aus diesem Grund waren die Ergebnisse des Restriktionsverdaus nur schwach sichtbar, jedoch konnte eindeutig eine fehlende Spaltung bei der Sorte Fernor detektiert werden (s. Anhang 9.5.3 Abbildung 68). Da sowohl die homozygoten als auch die heterozygoten Sorten über ein Guanin in der Erkennungssequenz des Enzyms verfügten, sollten alle Sorten eine enzymatische Spaltung und die homozygoten Sorten einen vollständigen Verdau aufweisen. Allerdings zeigte sich bei allen Sorten, mit Ausnahme von Fernor, ein einheitliches Schnittmuster. Das eingesetzte DNA-Template besaß eine Konzentration von 0,5 ng,

sodass die Enzymkonzentration die vorhandene DNA vollständig schneiden sollte. Bei dem Walnussperikarp war fast überall ein entsprechender enzymatischer Verdau erkennbar mit Ausnahme der Sorte Fernor und bei der Sorte Vina konnte kein Amplifikat gebildet werden, möglicherweise durch die geringe Qualität der Probe und enthaltenen Inhibitoren.

Bei dem SNP Nr. 4 wurden mehrere Versuche durchgeführt, die unspezifische Bandenzahl zu reduzieren. Hierbei wurden divergierende DNA-Konzentrationen eingesetzt (0,1 ng, 1 ng, 2 ng) die keinen signifikanten Unterschied erzeugten. Zudem wurden unterschiedliche Temperaturen überprüft, da die Gradienten-PCR nicht aussagekräftig war. Hierbei wurden die Temperaturen von 50 °C, 53 °C, 55 °C und 61 °C getestet, allerdings wurde bei letzterer die Schmelztemperatur des Primers überschritten, da keine Fragmente visualisiert werden konnten. Aus diesem Grund sollten neue Primer entworfen werden, da die verwendeten Primer an weiteren Stellen auf dem Gesamtgenom hybridisierten und zu unspezifisch waren (Hamajima et al. 2002).

Als weiterer SNP wurde die Nr. 5 analysiert, jedoch zeigte sich am Anfang der Gradienten-PCR viele unspezifische Banden, die jedoch durch eine Annealing-Temperatur von 53 °C verhindert werden konnten (Rychlik et al. 1990). Allerdings wiesen alle Sorten ein heterogenes Schnittmuster auf (s. Anhang 9.5.3 Abb. 70) Diesbezüglich sollten auf Grund der Sanger-Sequenzierungs-Ergebnisse, welche auf Homozygotie für diesen Locus hindeuteten, die Sorten Fernette, Lara, Pedro und Vina durch Homozygotie kein Schnittmuster aufweisen, da sie an der entscheidenden Stelle ein Thymin anstelle eines Cytosins besitzen, sodass die Erkennungssequenz des Enzyms nicht gegeben war. Hierbei scheint das *Allelic Dropout* die einzige Erklärung für dieses Phänomen zu sein. Bei der Amplifizierung für die Sanger-Sequenzierung wurden andere Primer verwendet und somit die Bildung eines Amplifikates des Allels mit einem Thymin favorisiert (Soulsbury et al. 2007). Dadurch wurde das Allel mit dem Cytosin nicht in ausreichender Quantität amplifiziert und befand sich unterhalb der Nachweisgrenze. Bei der RFLP-Analyse wurden neue Primer entwickelt, die kein *Allelic Dropout* hervorriefen, sodass das entstandene Schnittmuster hiermit zu begründen war. Durch das identische Bandenmuster konnte jedoch keine Sorte differenziert werden, sodass dieser SNP für eine RFLP-Analyse nicht geeignet war.

Ein eindeutigeres Ergebnis konnte mit dem SNP Nr. 9 erzielt werden, da nur die Sorte Broadview ein Guanin aufwies, dass für das Enzym BsmI notwendig war. Des Weiteren waren die anderen Sorten homozygot und verfügten über kein Guanin an dieser Stelle. Hierbei gelang die Amplifikation des entsprechenden Fragmentes bei 700 bp ohne weitere Optimierungsschritte und die Visualisierung zeigt ein intensives Amplifikat (s. Anhang 9.5.3 Abbildung 71). Auch der anschließende Restriktionsverdau wies ein eindeutiges Schnittmuster bei der Sorte Broadview auf, wobei auf Grund

der Homozygotie das vollständige DNA-Template geschnitten wurde, sodass ein Fragment bei 600 bp und 100 bp entstand. Zudem eignete sich der ausgewählte SNP hervorragend für die RFLP-Analyse, da gezielt eine Sorte eindeutig separiert werden konnte, welches auch im Einklang mit den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung stand. Jedoch konnte für das Walnussperikarp kein Amplifikat erhalten werden, trotz diverser Veränderungen der Reaktionsparameter.

Als letzte mögliche Position wurde der SNP Nr. 11 untersucht. Durch eine Temperaturerhöhung konnten unspezifische Amplifikate verhindert werden, sodass nur noch das spezifische Amplifikat für die RFLP-Analyse zur Verfügung stand (Rychlik et al. 1990). Bei dem Restriktionsverdau wurde nur an der Position der Sorte Chandler eine enzymatische Spaltung initiiert (s. Anhang 9.5.3 Abbildungen 72-74). Dies wurde auch anhand der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung vorhergesagt, da nur diese Sorte über ein Adenin verfügte, dass in der Erkennungssequenz des Enzymes vorhanden war. Alle anderen Sorten wiesen ein Thymin auf und wurden aus diesem Grund nicht geschnitten. Somit eignet sich dieser SNP für die Differenzierung und zur Identifizierung der Sorte Chandler.

Zusammenfassend konnten mit der RFLP-Analyse die Sorten Chandler, Broadview und Fernor von den restlichen *J. regia* Sorten differenziert werden. Allerdings bestand das größte Problem in einem ausgeprägten heterozygoten Charakter dieses Organismus, sodass die Schnittmuster oftmals keine eindeutige Identifikation ermöglichten (Zhu et al. 2019). Aus diesem Grund wurde im nächsten Kapitel die ARMS-PCR vorgestellt, die eine bessere Detektion hinsichtlich dieser Problematik gewährleistet.

### *4.5.2 Entwicklung einer ARMS-PCR für Walnussblätter und -perikarp*

Eine neue Methode wurde etabliert, die sich speziell für heterozygote Organismen eignet und bereits in der Medizin zur Detektion von Erbkrankheiten auf Grundlage einer Basenmutation eingesetzt wird. Auf Grund der Ergebnisse der SSR-Analyse wurde die Sorte Howard bei den Blattproben nicht analysiert (vgl. Kapitel 4.6.2) und der SNP für die Methodenentwicklung ausgewählt.

### Primerauswahl

Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf den Primerentwurf gelegt, um eine Hybridisierung eines Primers an einer polymorphen Sequenz zu verhindern, da die Methode auf der Visualisierung mehrerer DNA-Banden beruht. Damit die Inkompatibilität gesteigert wurde, erfolgte zusätzlich zur Veränderung der Base am 3'-Ende ein Austausch der benachbarten Base, wobei das Cytosin mit einem Guanin ausgetauscht wurde. Diesbezüglich wurde in wissenschaftlichen Arbeiten bereits die erfolgversprechendsten Fehlpaarungen analysiert und zeigten sich bei G/A, wohingegen A/A, C/C, G/G und T/T als weitere geeignete Fehlpaarungen einzustufen sind (Honardoost et al. 2014; Medrano und

Oliveira 2014). Hierbei wurden jeweils zwei Primer entwickelt, die jeweils für das Allel A (Wildtyp) oder Allel C (Mutation) spezifisch waren. Zur Kontrolle wurde im späteren Verlauf noch ein weiterer Primer zugegeben, der ein Amplifikat bildete, der die vorherige Sequenz umschloss. Dadurch wurde eine Positivkontrolle eingeführt, die die Funktionsweise der Methode reflektierte. Die erforderlichen Optimierungsschritte zur Amplifikation der DNA werden im nächsten Abschnitt erläutert.

### Optimierung der PCR-Bedingung

Zu Beginn wurde nur Blattmaterial für die einzelnen Optimierungsschritte herangezogen. Durch die Erhöhung der Template-Konzentration von 0,1 ng auf 1 ng wurde mehr Amplifikationsprodukt erzeugt, dadurch zeigte sich eine stärkere Intensität der Banden auf dem Agarosegel. Durch den Einsatz des doppelten Volumens des Mutations-Primers und des Rückwärtsprimers (0,6 µL) im Vergleich zum Vorwärtsprimer für die Positivkontrolle, bei gleicher Konzentration, konnte die Amplifikation zu Gunsten des gewünschten Produktes verschoben werden, sodass die Positivkontrolle nicht als dominante Reaktion auftrat (Chiapparino et al. 2004; Honardoost et al. 2014; Medrano und Oliveira 2014). Dadurch konnte ein auswertbares Ergebnis erhalten werden (s. Anhang 9.5.4 Abbildung 75). Die Analyse wurde mit der Sanger-Sequenzierung verglichen und wurde in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tab. 12: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und ARMS-PCR an dem SNP Nr. 12 mit dem Allel C (Mutante). Hierbei markiert ein x die Abwesenheit eines DNA-Fragment, wohingegen ein ✓ die Anwesenheit eines entsprechenden DNA-Fragmentes symbolisiert.

	FQ	HA	P	FE	BV	S	FT	LA	CH	V	26
Sanger	✓	✓	x	✓	✓	x	x	✓	✓	✓	x
ARMS	✓	✓	x	✓	✓	x	x	✓	✓	✓	x

Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse zur Sanger-Sequenzierung identisch waren. Zur Kontrolle wurde eine weitere Analyse mit anderem Blattmaterial vorgenommen und auch das Perikarp analysiert. Hierbei ergaben sich identische Ergebnisse, allerdings wiesen die Isolate der zweiten Bestimmungen eine geringere Intensität auf, sodass die Sorten Fernette (Probe aus der ersten Bestimmung), Chandler, Broadview, Serr und Vina wiederholt wurden (s. Anhang 9.5.4 Abbildung 76 bis 78). Ein möglicher Grund könnte eine mindere DNA-Qualität gewesen sein, die in einer teilweisen Inhibierung der PCR resultierte (Opel et al. 2010). Die Sorten Fernette und Serr zeigten erst in einem weiteren Versuch eine Amplifikatbildung (s. Anhang 9.5.4 Abbildung 78). Allerdings konnte nicht erklärt werden, wieso zuerst keine Amplifikatbildung auftrat, obwohl die Probe Fernette bereits in dem ersten Versuch erfolgreich amplifiziert werden konnte. Eventuell könnten enthaltene sekundäre Pflanzenstoffe bei den letzten Versuchen eine Inhibierung verursacht haben (Alaeddini 2012). Zusammenfassend wiesen alle drei Bestimmungen der 11/12 Sorten (11 Blattproben und 12 Perikarproben) ein einheitliches Bandenmuster

auf. Dadurch kann die Authentizität für einzelne Sorten überprüft werden, allerdings zeigte sich durch den nahen Verwandtschaftsgrad der Walnussorten eine geringe Variabilität hinsichtlich ihres Genoms, sodass nur wenige Sorten einzeln separiert werden konnten.

Bei dem weiteren Allel A (Wildtyp) mussten noch zusätzliche Optimierungsschritte vorgenommen werden, um ein auswertbares Ergebnis zu erhalten. Hierbei wurde der Fokus auf unterschiedliche Primerkonzentrationen gelegt, da diese die Reaktion maßgeblich beeinflussten und ein ausgeglichenes Amplifikationsverhältnis geschaffen werden sollte (Gunson et al. 2003). Dabei zeigte sich eine Zusammensetzung von 1:6 (Vorwärtsprimer:Rückwärtsprimer/Wildtypprimer) als optimal, sodass bei der Visualisierung beide DNA-Banden mit einer ausreichenden Intensität amplifiziert wurden (s. Anhang 9.5.4 Abbildung 81 bis 95). Wie bereits bei der Reaktion des Allels C (Wildtyp) scheint die Minimierung der Konzentration des Vorwärtsprimers eine signifikante Verbesserung zu ergeben. Die Ergebnisse wurden mit denen der Sanger-Sequenzierung verglichen, allerdings wurde bei der Sorte Hartley ein abweichendes Ergebnis festgestellt (s. Anhang 9.5.4 Abbildung 81). Anhand der Sanger-Sequenzierung sollte kein Amplifikat gebildet werden. Das Ergebnis wurde jedoch durch eine zweite Blatt- und Perikarprobe bestätigt. Wie bereits bei der RFLP-PCR (vgl. Kapitel 4.5.1) könnte ein *Allelic Dropout* dafür verantwortlich sein, sodass die Sorte Hartley neben einem Cytosin ebenfalls ein Adenin an dieser Stelle besaß auf Grund ihres heterozygoten Charakters (Soulsbury et al. 2007).

Tab. 13: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und ARMS-PCR an dem SNP Nr. 12 mit dem Allel A (Wildtyp). Hierbei markiert ein x die Abwesenheit eines DNA-Fragment, wohingegen ein ✓ die Anwesenheit eines entsprechenden DNA-Fragmentes symbolisiert.

	FQ	HA	P	FE	BV	S	FT	LA	CH	V	26
Sanger	✓	x	✓	x	✓	✓	✓	x	✓	x	✓
ARMS	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	x	✓	x	✓

### Zusammenfassung der Ergebnisse

Die gezeigte Methode eignet sich für diploide Organismen, da die Ausbildung zweier unterschiedlicher Allele durch beide Reaktionen (Wildtyp/Mutante) dargestellt werden kann. Dadurch war es möglich, eine bessere Sicherheit bei der Auswertung der Ergebnisse und somit hinsichtlich der Authentizität eine höhere Aussagekraft zu erreichen. Bei der RFLP-PCR wurde durch die Ausbildung von drei Banden bei einem heterozygoten Organismus die Differenzierung erschwert, da in diesem Fall keine konkrete Entscheidung getroffen werden konnte. Dies war jedoch mit der ARMS-PCR möglich, sodass diese Methode in der Routineanalytik für diploide Organismen eingesetzt werden sollte, die einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen und zusätzlich einen hohen Grad an Heterozygotie besitzen. Allerdings ist die Methodenentwicklung sehr aufwendig, da viele Einflussparameter berücksichtigt werden müssen, um eindeutige Bandenmuster zu erhalten.

#### 4.6 Entwicklung von *non-targeted* Methoden

Das Grundprinzip dieser Methoden basiert auf der sequenzunabhängigen Analyse des Zielorganismus. Durch ein Screening von diversen Primern wurden die optimalen Kandidaten ausgewählt und durch die jeweilige Methode ein DNA-Fingerabdruck erstellt. Diese meist schnellen und kostengünstigen Verfahren werden in der Routineanalytik genutzt, um die Authentizität experimentell erfassen zu können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei bekannte *non-targeted* Methoden etabliert, die Mikrosatelliten- und RAPD-Analyse.

##### 4.6.1 Etablierung einer RAPD-Analyse für Walnussblätter und -perikarp

###### Primerauswahl

Da die exakte Sequenz des nukleären Walnussgenoms unbekannt war, mussten diverse RAPD-Primer überprüft werden. Hierfür wurde ein Kit bestehend aus 14 Primern der Firma Roth verwendet, ebenso 12 Primer die aus der Literatur entnommen wurden (Gawel und Jarret 1991; Francesca et al. 2010; Erturk und Dalkilic 2011). Hierbei sind folgende Kriterien notwendig, um für weitere Optimierungsschritte ausgewählt zu werden:

- Amplifikationsprodukte unterschiedlicher Länge damit sie mittels Elektrophorese auswertbar sind,
- Intensive Amplifikationsprodukte auf dem Agarosegel,
- Unterschiede zwischen einzelnen Sorten,
- Reproduzierbarkeit,
- Stabile Bandenbildung bei leicht unterschiedlicher DNA-Konzentration.

Aus diesem Grund wurde im Vorfeld eine Überprüfung der Annealing-Temperatur vorgenommen. Diese befand sich in einem niedrigeren Bereich als bei der Amplifizierung für die Sanger-Sequenzierung (vgl. Kapitel 4.4.1) und lag in einem Temperaturintervall von 30 bis 50 °C. Hierbei banden die Primer nicht vollständig komplementär an die Sequenz, sodass relativ niedrige Temperaturen gewählt werden mussten, um ein komplexes Bandenmuster zu erhalten (Fernández et al. 2002; Lin et al. 2019). In diesem Fall ist die Ausbildung von einer Bande nicht erwünscht, da dadurch keine ausreichende Differenzierung der Sorten möglich ist. Durch die höhere Bindungsenergie der GC-Basen wurden Primer mit dieser Zusammensetzung favorisiert, da ihre Produktbildung stabiler ausfällt als bei AT-reichen Sequenzen. Somit lag die Zusammensetzung der Primer bei einem GC-Gehalt von 60 bis 90 %. Die oftmals auftretende Unschärfe der Banden wird durch die ersten PCR-Zyklen erklärt, da hier höhere Fehlpaarungen auftreten (Mori et al. 1999). Im weiteren Verlauf hybridisieren die Primer mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an bereits amplifizierte DNA-Fragmente. Dadurch wird eine Vielzahl an unterschiedlich langen Fragmenten gebildet (Fritsch et al. 1993). Diesbezüglich sollte berücksichtigt werden, dass eine visualisierte Bande nach der Elektrophorese aus Fragmenten mit unterschiedlichen

Sequenzen zusammengesetzt sein kann, die somit eine Verbreiterung der Banden im Agarosegel bewirken (Caetano-Anollés et al. 1992). Hierbei wies der Primer S 32 die geringste Anzahl an auswertbaren Banden auf, wohingegen die Primer OPA 08 und ROTH-A07 das komplexeste Bandenmuster aufwiesen (s. Abbildung 46). Die genaue Vorgehensweise bei der Bestimmung der Annealing-Temperatur wurden bereits im Kapitel 4.4.1 ausgiebig erläutert.

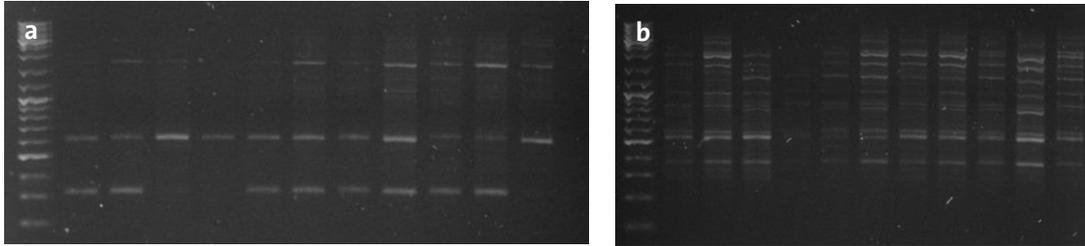


Abb. 46: Variation der Bandenmuster in Abhängigkeit des gewählten Primers a) S 32 und b) OPA 08. In beiden Abbildungen befindet sich auf der linken Spur der Marker.

### Optimierung der PCR-Bedingungen

Damit eine Auswertung nicht nur in diesem Labor gelang, sondern auch für die Routineanalytik in anderen Laboren, mussten robuste Parameter evaluiert werden. Hierfür war es notwendig die einzelnen Parameter zunächst zu optimieren (vgl. Kapitel 4.4.1), um aussagekräftige Bandenmuster zu erhalten. Diesbezüglich wurde die Konzentration des DNA-Templates, der Primer, der dNTPs, des Puffers und der DNA-Polymerase variiert. Eine Differenzierung der Walnussorten erfolgte über die An- oder Abwesenheit von den entsprechenden Banden. Leider war es nicht möglich, mit allen Primern auswertbare Ergebnisse zu produzieren. So konnten nur 12 der 24 Primer für die RAPD-Analyse verwendet werden. In Abbildung 47 sind zwei Primer abgebildet, deren Optimierung nicht zielführend war, sodass sie für weitere Analysen unberücksichtigt blieben.

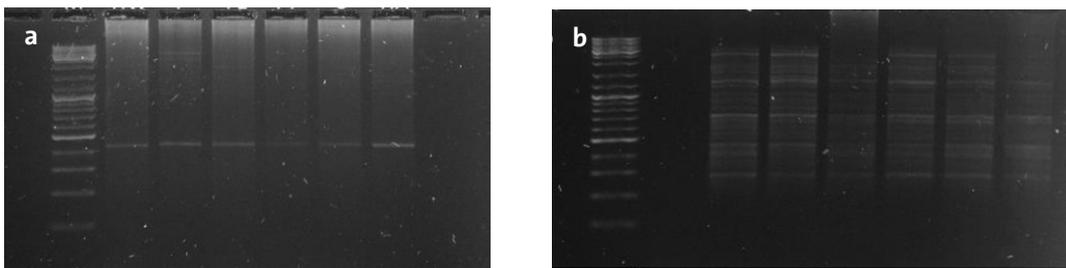


Abb. 47: a) Der Primer ROTH-A16 mit einer zu hohen Spezifität, b) Der Primer OPF 10 mit einer zu niedrigen Spezifität. In beiden Abbildungen befindet sich auf der linken Spur der Marker.

Der Primer ROTH-A16 (siehe Abb. 47 a) wies eine zu spezifische Bindung des Primers an die Zielsequenz auf, sodass nur eine intensive Bande gebildet wurde, die bei allen Sorten gleichermaßen auftrat. Hierbei hybridisierte der Primer fast vollständig komplementär an einen Sequenzabschnitt, sodass keine weiteren Regionen amplifiziert wurden. Die Temperatur könnte weiter reduziert werden, allerdings würde dadurch die Reproduzierbarkeit signifikant verringert werden, da der Primer in diesem Fall zu unspezifisch hybridisieren würde und bei jeder Reaktion ein verändertes Bandenmuster

auftreten könnte (Pérez et al. 1998). Bei dem Primer OPF 10 (siehe Abb. 47 b) wurde ein zu komplexes Bandenmuster erhalten, was zudem keine Unterschiede zwischen den ausgewählten Sorten aufwies. Eine weitere Erhöhung der Annealing-Temperatur könnte die Bandenanzahl minimieren oder zu spezifischeren Banden führen, da aber bereits keine Unterschiede ersichtlich waren, wurde darauf verzichtet.

Ein weiterer wichtiger Parameter, der einen Einfluss auf die Amplifikation ausübt, liegt in der Primerkonzentration. Mit deren Erhöhung stieg die Anzahl an Amplifikationsprodukten und ermöglichte somit eine bessere Differenzierung auf Sortenebene. Allerdings begünstigte eine zu hohe Konzentration die Bildung von kürzeren Fragmenten, sodass längere Fragmente abgeschwächt wurden und dadurch eine Bandenverdichtung auftrat, die eine exakte Differenzierung erschwerte (Ronimus et al. 1997; MacPherson et al. 1993). Bei dem Primer DAF 14 erfolgte eine ausführliche Analyse der Veränderung der Primer-Konzentration. Hierbei wurden Volumina von 0,5  $\mu\text{L}$ /0,7  $\mu\text{L}$ /1,0  $\mu\text{L}$  gleicher Konzentration eingesetzt. Dabei zeigte sich bei einer niedrigeren Primer-Konzentration eine bessere Differenzierung, da das Bandenmuster weniger ausgeprägt auftrat und eine Differenzierung anhand der An- oder Abwesenheit der Bande bei 800 bp (s. Abbildung 48) vorgenommen werden konnte. Je nach Primer kann dadurch eine Ergebnisverbesserung oder -verschlechterung erzielt werden, weshalb eine Überprüfung in Form einer Konzentrationsreihe die optimale Vorgehensweise darstellt.

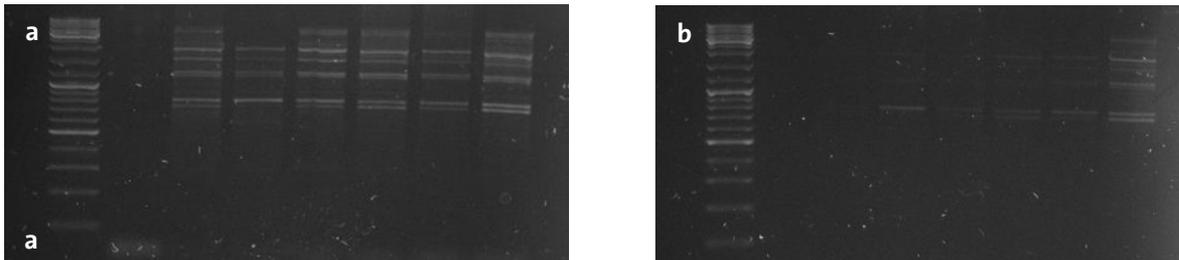


Abb. 48: Vergleich verschiedener Primer-Volumina: a) 0,7  $\mu\text{L}$  und b) 0,5  $\mu\text{L}$ .

Eine weitere Einflussgröße bildete die Polymerase-Konzentration und die unterschiedlichen Polymerasen. Hierbei befasste sich eine Studie von Schierwater und Ender (1993) mit der Untersuchung von 13 Polymerasen und verglich die entstanden Bandenmuster miteinander. Dabei konnten leichte Variationen detektiert werden. So waren die Aktivität und Spezifität der einzelnen Polymerasen abhängig von der Temperatur und Reaktionszusammensetzung, was die Produktbildung in den ersten kritischen Zyklen maßgeblich beeinflusste. In den meisten Fällen bewirkte eine Erhöhung der Polymerase-Konzentration ein differenziertes Bandenmuster, jedoch wird bei einer Überschreitung des optimalen Bereiches ebenfalls eine Inhibierung beobachtet. Bei dem Primer ROTH A17 wurde die Polymerase-Konzentration verringert, um eine exakte Identifizierung zu ermöglichen. Dadurch blieben nur relevante Banden sichtbar, die für eine Differenzierung der Sorten notwendig waren (s. Abbildung 49).

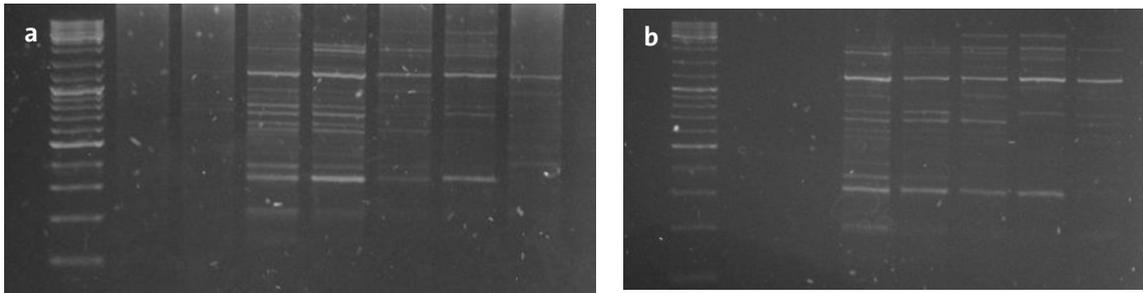


Abb. 49: Vergleich verschiedener Polymerase-Volumina: a) 0,1  $\mu$ L und b) 0,05  $\mu$ L.

Eine weitere wichtige Einflussgröße bildete die eingesetzte DNA-Konzentration. Durch eine Erhöhung der Template-Konzentration standen den Primern eine höhere Anzahl an komplementären Sequenzen zur Verfügung, sodass die statistische Wahrscheinlichkeit für reproduzierbare Amplifikationsprodukte stieg (Atienzar et al. 2000). Somit konnte eine zu geringe Konzentration eine Abschwächung der detektierten Banden bewirken, die allerdings zu einer negativen Reproduzierbarkeit führte. Hierbei wurde durch die erhöhte Wahrscheinlichkeit an Fehlpaarungen die Bildung von weiteren PCR-Produkten begünstigt, die in unterschiedlichen Variationen in den einzelnen RAPD-Analysen auftraten (Devos und Gale 1992). Allerdings konnte die Template-Konzentration nicht kontinuierlich gesteigert werden, da ab einem gewissen Grad inhibierende Effekte auftraten. Zum einen band das negativ geladene Phosphatrückgrat die Magnesium-Ionen des eingesetzten Puffers, wodurch sie der Polymerase nicht zur Verfügung standen und somit die Enzymaktivität reduzierten (Davin-Regli et al. 1995). Zum anderen konnte dadurch ein erhöhter Eintrag an weiteren PCR-Inhibitoren auftreten, die als Rückstände bei der DNA-Isolierung auftraten. So wirkt EDTA, was standardmäßig in den Inkubationspuffern eingesetzt wird, ab einer Konzentration von über 1 mM inhibierend (vgl. Kapitel 4.2) (Rossen et al. 1992). Wurde zudem die Primer-Konzentration nicht angepasst, wurden vermehrt längere Fragmente gebildet, die oftmals für eine Differenzierung weniger geeignet waren. Zudem wurde davon ausgegangen, dass nach dem Verbrauch der Primer eine Hybridisierung von zuvor gebildeten PCR-Produkten an das Template erfolgte, sodass unspezifische Fragmente auftraten, die zu einer kontinuierlichen DNA-Bande führten (Devos und Gale 1992). Dieser Effekt wurde anhand des Primers ROTH A09 deutlich (s. Abbildung 50). Bei der Verwendung von 1  $\mu$ L DNA-Template entstand ein dichteres Bandenmuster, dass keine Differenzierung der Sorten ermöglichte. Durch die Reduktion der Template-Konzentration auf 0,5  $\mu$ L konnten weniger Banden erhalten werden, die allerdings eine Differenzierung gewährleisteten.

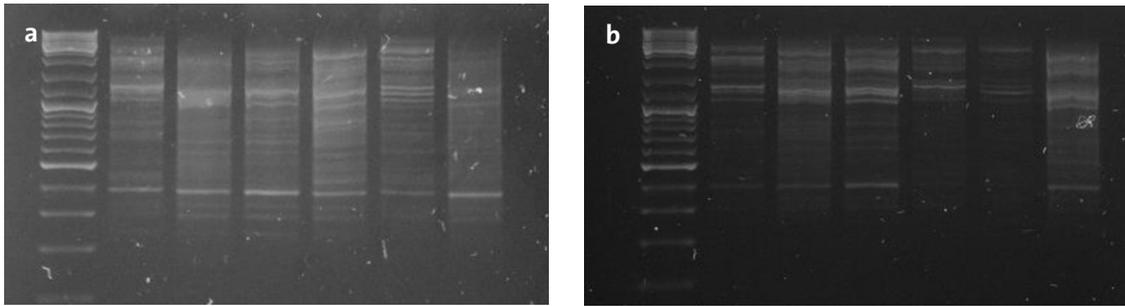


Abb. 50: Vergleich verschiedener Template-Volumina: a) 1 µL und b) 0,5 µL.

### Differenzierung der Walnussorten anhand eines Fließschemas

Auf Grund des engen Verwandtschaftsgrades der Walnussorten und der daraus resultierenden Sequenzähnlichkeit gelang es nicht, mit Hilfe eines RAPD-Primers alle 12 Sorten zu differenzieren. Vielmehr konnte anhand der Analysen ein Fließschema entwickelt werden, wodurch alle 12 Sorten voneinander separiert werden konnten. Dieses beruhte auf der An- oder Abwesenheit von DNA-Banden auf dem Agarosegel, die als Unterscheidungskriterien dienten.

So zeigte sich bei dem Primer DAF 14 bei allen Sorten eine Doppelbande bei ca. 800 bp. Eine Ausnahme bildete hierbei die Sorte Geisenheim 26, die nur eine Bande enthielt und somit von den anderen Sorten separiert werden konnte. Zusätzlich konnte durch das Fehlen einer Bande bei 900 bp die Sorte Howard abgetrennt werden.

Durch die Zuhilfenahme des Primers OPA 08 konnte die Sorte Fernette durch das Fehlen einer Bande bei 1.000 bp und Broadview bei 1.200 bp separiert werden.

Zusätzlich wurde Broadview mit Hilfe des Primers OPC 15 und dem Fehlen einer Bande bei 750 bp differenziert. Zudem konnten die Sorten Serr und Geisenheim 26 durch die Abwesenheit einer Bande bei 650 bp identifiziert werden. Diesbezüglich konnte letztere durch das Fehlen einer 700 bp Bande im Vergleich zu Serr separiert werden.

Bei der Verwendung des Primers OPE 14 erhielten fast alle Sorten eine charakteristische Doppelbande bei 650 bp. Allerdings fehlte der Sorte Broadview die obere Doppelbande, sodass dieses Merkmal zur Unterscheidung herangezogen wurde.

Zur Unterscheidung der Serr- und Howard-Sorten wurde der Primer ROTH A01 verwendet, da beide Sorten im Gegensatz zu den anderen Sorten keine Bande bei einer Größe von 650 bp aufwiesen.

Mit Hilfe des Primers ROTH A07 konnten die Sorten Howard, Lara und Fernor abgetrennt werden, da diese über eine zusätzliche Bande bei 1.000 bp verfügten. Zudem wies Fernor bei 550 bp nur eine Bande auf, während Lara und Howard, ähnlich der restlichen Sorten, über eine Doppelbande. Des Weiteren fehlte bei ROTH A07 bei den Sorten Broadview, Fernor, Franquette, Howard und Serr eine Bande bei 900 bp.

Anhand des Primers ROTH A10 gelang es die Sorte Serr zu separieren, wobei durch das Fehlen einer Bande bei 1.000 bp eine Unterscheidung zu den restlichen Sorten vorgenommen werden konnte. Des Weiteren wurde an der genannten Stelle durch die Ausbildung einer Einzelbande die Sorten Fernette und Fernor abgegrenzt, da die anderen Sorten eine Doppelbande ausbildeten. Außerdem konnten die Sorten Broadview, Fernette, Fernor und Howard durch das Fehlen einer Bande bei 300 bp differenziert werden.

Als weiterer Primer wurde ROTH A11 verwendet, um die Sorten Fernette, Fernor, Lara und Vina von den restlichen Sorten zu separieren. Hierbei erfolgte eine Bildung einer DNA-Bande bei 200 bp. Zusätzlich bildeten die Sorten Franquette, Hartley und Serr keine Bande bei 900 bp aus.

Zudem eignete sich der Primer ROTH A17 zur Differenzierung der Sorten Broadview und Franquette, da beide ein Fragment bei 300 bp ausbildeten.

Als letzter Primer wurde S 32 ausgewählt, wobei die Sorten Broadview, Geisenheim 26, Howard und Serr abgetrennt wurden, da diese keine Bande bei 300 bp aufwiesen.

Anhand der beschriebenen charakteristischen Ausbildung der einzelnen Banden erfolgte eine grafische Darstellung mit Hilfe eines Fließschemas. Dieses wird in der Abbildung 86 im Anhang 9.7.1 präsentiert und weist potenzielle Analysewege auf, um die Sortenauthentizität zu überprüfen. Hierbei sind unterschiedliche Variationen möglich, in diesem Beispiel wurden sieben der elf Primer eingesetzt.

### Auswertung der RAPD-Analyse des Walnussperikarps

Für die Überprüfung des Walnussperikarps wurden zu Beginn die Parameter des Blattmaterials verwendet. Jedoch war es erforderlich, die Reaktionsparameter erneut anzupassen, um den Veränderungen im DNA-Template gerecht zu werden. Dadurch entstand letztendlich ein weiteres Fließschema für die Analyse dieses Probenmaterials.

Zur Visualisierung der Notwendigkeit der erneuten Optimierung der Parameter wurden zwei Versuche mit den identischen Bedingungen, aber unterschiedlichen DNA-Templates, miteinander verglichen und in der Abbildung 51 dargestellt.

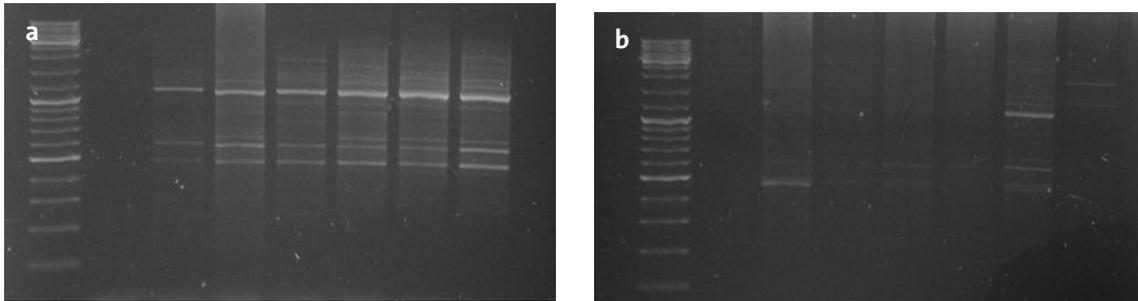


Abb. 51: Vergleich der RAPD-PCR mit ROTH-A01 (Primer): a) Blatt-DNA und b) Perikarp-DNA.

Hierbei wies das Bandenmuster des Walnussperikarps eine so geringe Intensität auf, dass keine eindeutige Identifizierung vorgenommen werden konnte. Die Ursache lag in dem Ursprung des DNA-Isolates, da dieser Parameter als einziger variiert wurde. Hierbei beeinflussten Inhibitoren wie Polyphenole und Polysaccharide die PCR, indem sie mit der DNA oder der Polymerase interagierten (Jobs et al. 1995). Nur durch den Einsatz einer höheren DNA-Konzentration von 0,1 ng/ $\mu$ L auf 1 ng/ $\mu$ L wurden bessere Ergebnisse erzielt (Rossen et al. 1992). Wahrscheinlich führten die Scherkräfte der Messermühle zu einer stärkeren Degradation der DNA und somit zu kürzeren Fragmenten. Insbesondere höhere Molekulargewichte waren hiervon betroffen. Zudem zeigte sich, dass besonders die dNTP-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die Reaktion ausübte. Hierbei wurden unterschiedliche Volumina getestet, wobei sich ein dNTP-Volumen von 0,5  $\mu$ L als optimal herausstellte. Dadurch wurde die Bildung von unspezifischen Produkten minimiert, da nicht genügend dNTPs zur Verfügung standen und somit nur signifikante Banden für die Differenzierung ausgebildet wurden (Prakash et al. 2002). Dabei wurde insgesamt weniger Amplifikationsprodukte gebildet, allerdings konnte eine bessere Reproduzierbarkeit gewährleistet werden.

Hierbei wurden neun Primer optimiert, sodass eine anschließende Erstellung eines Fließschemas für die Differenzierung aller 12 Sorten möglich war. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Howard-Probe nicht um die authentische Sorte handelte. Dadurch konnte bereits die Effektivität dieser Methode bewiesen werden. Dabei wurde der Primer S 32 verwendet, um diese Fehldeklaration zu belegen. Ein wichtiges Charakteristikum stellte die Abwesenheit der Bande mit einer Länge von 300 bp für die Sorte Howard da. Dies wurde auch durch die beiden Blattproben und die weitere Perikarpprobe veranschaulicht. Im Gegensatz dazu verfügte die vermutete Probe über eine Bande an dieser Stelle. Hierbei zeigte sich, dass trotz großem Aufwand nicht immer die Authentizität des Probenmaterials gewährleistet werden konnte. Allerdings war es somit möglich, die Funktionalität der RAPD-Methode zu beweisen. Durch die Verwendung von 4 authentischen Proben pro Sorte konnte eine Abweichung eindeutig identifiziert werden.

Mit Hilfe des Primers DAF14 wurde die Sorte Geisenheim 26 separiert, da diese kein Fragment bei 600 bp ausbildete. Zudem zeigten die Sorten Broadview, Geisenheim 26, Fernette und Lara nur eine Einzelbande bei 800 bp, wohingegen die anderen Sorten eine Doppelbande aufwiesen.

Durch den Einsatz des Primers OPA 08 wurden die Sorten Broadview, Fernette und Pedro differenziert, da ihnen eine Bande bei 1.000 bp fehlte. Zusätzlich wurde bei den Sorten Fernette, Fernor, Pedro und Serr keine Bande bei 1.200 bp amplifiziert.

Des Weiteren konnte mit dem Primer OPC 15 die 12 Walnussorten in zwei Gruppen unterteilt werden. Dabei wurde in der Gruppe I mit Broadview, Fernette, Franquette, Lara und Vina kein Fragment mit der Länge von 650 bp amplifiziert. In der Gruppe II, bestehend aus den restlichen sieben Sorten, wurde diese Bande erhalten. Darüber hinaus entstand eine weitere signifikante Bande bei den Sorten Chandler, Geisenheim 26 und Hartley mit einer Größe von 700 bp. Außerdem besaß die Sorte Serr ein Alleinstellungsmerkmal, da keine Bande bei 750 bp amplifiziert wurde.

Unter Verwendung des Primers ROTH A01 erfolgte eine Differenzierung der Sorten Geisenheim 26 und Serr, da diese ein Amplifikat mit einer Länge von 250 bp bildeten. Allerdings muss der Bereich exakt betrachtet werden, da die Sorte Howard bei 200 bp ein Fragment amplifizierte und die Sorte Broadview bei 260 bp. Des Weiteren wurde keine Bande bei 650 bp bei den Sorten Pedro und Serr detektiert.

Anhand des Primers ROTH A10 wurden die Sorten Broadview, Fernor, Hartley, Lara und Vina separiert, indem keine Bande bei 200 bp visualisiert wurde. Zusätzlich verfügten Fernette, Franquette und Howard über kein Amplifikat bei 300 bp. Darüber hinaus wurde bei den Sorten Chandler, Geisenheim 26, Hartley und Vina keine Doppelbande bei 1.000 bp detektiert. Zusätzlich wurde eine Bande bei den Sorten Broadview, Chandler, Fernor, Franquette, Lara und Serr mit einer Länge von 1.200 bp amplifiziert.

Durch den Einsatz des Primers ROTH A11 wurden die Sorten Chandler, Fernor, Franquette und Lara separiert, da diese keine Doppelbande bei einer Länge von 300 bp bildeten.

Zudem konnte mit dem Primer ROTH A17 die Sorte Broadview von den anderen differenziert werden, da kein Fragment bei 300 bp amplifiziert wurde. Darüber hinaus entstanden bei den anderen Sorten an dieser Stelle Einzel- oder Doppelbanden. Hierbei wiesen die Sorten Chandler, Howard, Serr und Vina eine Doppelbande auf und die restlichen Sorten eine Einzelbande.

Bei der Verwendung des Primers S 32 wurden die Sorten Broadview, Howard und Serr von den anderen Sorten differenziert, da diese keine Bande bei 300 bp ausbildeten. Dafür erhaltenen die Sorten Howard und Serr eine Bande bei 400 bp, die bei der Sorte Broadview fehlte.

Die vorherigen Ergebnisse wurden anhand eines Fließschemas zusammengefasst, um einen potenziellen Weg darzustellen, der für die Differenzierung der 12 Walnussorten gewählt werden könnte. Dabei war es möglich auch mit dem Walnussperikarp als Ausgangsmaterial eine vollständige Differenzierung zu erreichen.

### 4.6.2 Etablierung einer SSR-Analyse für Walnussblätter und -perikarp

#### Primerauswahl

Die Wahl der SSR-Primer basierte auf diversen Veröffentlichungen (siehe Anhang 9.7.2). Dabei wurde im Vorfeld darauf geachtet, dass unterschiedliche Fragmentlängen amplifiziert wurden, um die Differenzierung zu erleichtern, da jeweils drei Proben simultan mittels Kapillargelelektrophorese analysiert wurden.

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln 4.4.1 und 4.5.1 erläutert, wurde am Anfang die Annealing-Temperatur mit Hilfe der Gradienten-PCR überprüft. Eine Zusammenfassung der Annealing-Temperatur ist in Tabelle 88 im Anhang 9.7.2 dargestellt. Hierbei konnten alle ausgewählten Primer, auf Grund der Bildung eines Amplifikates an der gewünschten Position, für die weiteren Analysen verwendet werden. Zudem wurde nur ein spezifisches Amplifikat erhalten, sodass keine Signalüberlagerungen bei der Kapillargelelektrophorese zu erwarten waren.

Während der Analysen wurden die Proben nicht einzeln, sondern in zweier oder dreier Ansätzen mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen analysiert. Durch die unterschiedlichen Emissionswellenlängen traten keine Signalinterferenzen auf, sodass drei Proben simultan detektiert wurden (s. Abbildung 52).

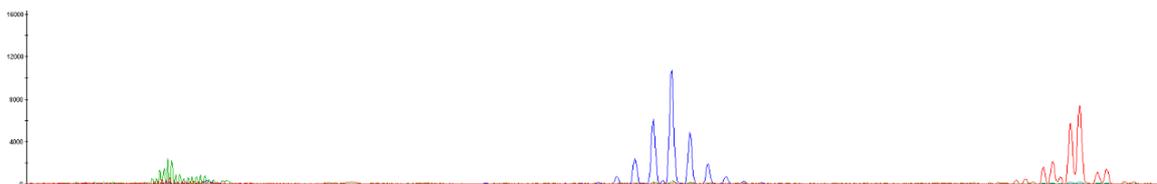


Abb. 52: Elektropherogramm mit den Farbstoffen HEX (grün), FAM-6 (blau) und ATTO 565 (rot), welche jeweils eine separate Probe darstellen. Hierbei zeigt sich eine ausreichende Abtrennung, da keine Signalüberlagerung zwischen den einzelnen Proben auftrat.

Die Kapillargelelektrophorese konnte bis zu vier unterschiedliche Wellenlängen analysieren, allerdings sollte eine optimale Trennung der Ergebnisse vorliegen, sodass die Kombination aus drei Farbstoffen weniger fehleranfällig war. Hierbei besitzt der Farbstoff 6-FAM eine Emissionswellenlänge von 519 nm, HEX von 556 nm und ATTO 565 eine Emissionswellenlänge von 592 nm. Dabei stellt der 6-FAM-Farbstoff einen gängigen Farbstoff dar, der die PCR-Reaktion nicht negativ beeinflusst (Moreira et al. 2005). Die 10 Primer wurden in vier Gruppen eingeteilt, wobei auf eine unterschiedliche Fragmentlänge geachtet wurde. Des Weiteren wurden die Annealing-Temperaturen aufeinander abgestimmt, um die PCR-Experimente kombinieren zu können (s. Anhang 9.7.2 Tabelle 88). Die fluoreszenzmakierten Primer wurden hinsichtlich ihrer PCR-Fähigkeit überprüft. Aus diesem Grund wurden die 12 authentischen Walnussorten amplifiziert und eine visuelle Überprüfung mittels Agarosegel vorgenommen (s. Anhang 9.7.2 Abbildung 88 und 89). Hierbei wurden ähnlich wie in Kapitel 4.4.1 und 4.5.1 Optimierungen der Polymerase-, Puffer-, dNTP- und Template-Konzentration vorgenommen. Allerdings konnte trotz dieser Variationen kein Amplifikat mit dem Primer WGA-70 erhalten werden. Durch die Veränderung des Primers und die Adaption des HEX-Farbstoffes stieg dessen Lipophilie, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wurde, dass die Amplifikation durch die hydrophilen Reaktionsbedingungen nicht ausreichend war (Chuvilin et al. 2009). Aus diesem Grunde blieb der Primer unberücksichtigt und könnte bei Bedarf mit einem anderen Farbstoff modifiziert werden. Nachdem die visuelle Überprüfung bei den restlichen Primern erfolgreich verlief, wurde eine Messung mittels Kapillargelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurde in den ersten Messungen eine 1:10 Verdünnung und eine unverdünnte Probenkombination eingesetzt. Allerdings zeigten die Ergebnisse der unverdünnten Proben eine bessere Auswertbarkeit hinsichtlich ihrer Intensität, weshalb die restlichen Analysen mit unverdünnten Proben erfolgten. Die Auswertung wurde mit der dazugehörigen Software *GeneMapper®Software* Version 5 der Firma ThermoFisherScientific™ durchgeführt. Durch die unterschiedliche Farbstoffwahl lag eine ausreichende Trennung bei allen Proben vor. Bei der Auswertung galt es zu berücksichtigen, dass im Elektropherogramm nicht ein Peak auftrat, sondern mehrere Peaks in aufsteigender Größe (s. Abbildung 53). Dies ist ein bekanntes Phänomen und wird durch das enzymatische *Slippage* hervorgerufen, welches bei der DNA Amplifikation auftritt (Shinde et al. 2003). Hierbei „verrutscht“ die Polymerase während der Replikation, sodass eine Verkürzung des Amplifikationsproduktes um ein oder mehrere Basenpaare entsteht. So traten vor dem Hauptpeak, der für die Auswertung berücksichtigt wurde, Stotterbanden (*stutter peaks*) auf, die eine Auswertung erschwerten, wenn mehrere DNA-Fragmente interferierten (Klintschar und Wiegand 2003). Dabei musste eine Amplitudenerhöhung durch diese Signale berücksichtigt werden und eine Überprüfung der Hauptpeaks vorgenommen werden. Des Weiteren traten Sequenzartefakte auf, die eine Verlängerung des Hauptfragmentes um eine Base entsprachen. Dies wurde durch die Addition einer Target-unspezifischen Adeninbase durch die Polymerase am 3`-

Ende impliziert und wird auch als Plus-A-Veränderung bezeichnet (s. Abbildung 55). Dieses Signal konnte jedoch durch seine geringe Intensität ohne Schwierigkeiten identifiziert werden (Magnuson et al. 1996).

Die analysierten Genbereiche zeigten eine Variation von 2 bis 11 verschiedenen Allelen, was auf einen signifikanten Grad an Polymorphismus an dieser Stelle hinweist. Aufgrund dieser Eigenschaft waren

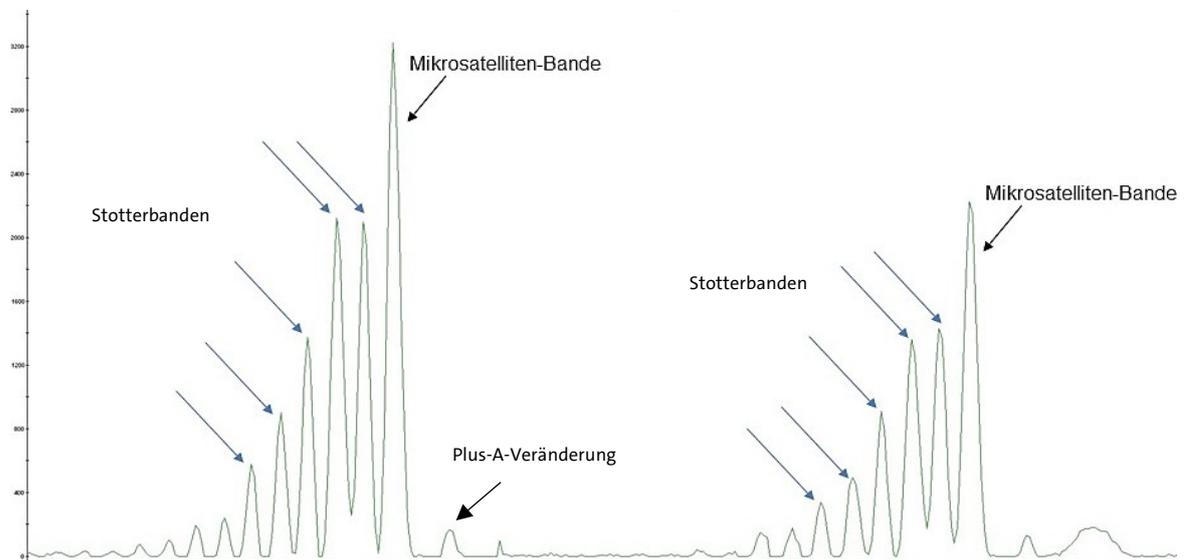


Abb. 53: Darstellung von Stotterbanden und die Plus-A-Veränderung nach dem intensivsten Peak in einem Elektropherogramm.

sie geeignet, um die Unterscheidung der Sorten vorzunehmen. Dieser Längenpolymorphismus wurde, wie oben bereits erwähnt, vermutlich durch das *Slippage* der DNA-Polymerase während der Replikation erzeugt (Tautz und Schlötterer 1994). Zu Beginn wurden ebenfalls die Ergebnisse der Walnussamen analysiert, um den diploiden Charakter und den maternalen und paternalen Einfluss zu bestätigen. Für die jeweiligen Sorten wurde je nach Primer ein oder mehrere Marker identifiziert (s. Anhang 9.7.2 Tabellen 90 und 91). Die An- oder Abwesenheit dieser wurde im Anschluss überprüft und das Blatt- und Samenmaterial miteinander verglichen.

Hierbei wurde ersichtlich, dass die Samenproben zusätzliche Allele im Vergleich zum Blattmaterial aufwiesen, die auf den paternalen Ursprung zurückzuführen waren. Die Blatt- und Samenproben der Sorte Franquette wiesen alle ein charakteristisches Fragment bei 223 bp auf, jedoch zeigten die Samenproben aus der USA ein zusätzliches Amplifikat bei 229 bp und die Probe aus Frankreich ein 231 bp Fragment. Dies wurde auch bei der Sorte Fernor ersichtlich, das 266 bp Fragment war überall vertreten, jedoch wiesen die Samenproben ein weiteres Fragment bei 228 bp auf. Dementsprechend besaß die Sorte Geisenheim 26 zwei charakteristische Amplifikate mit 138 und 155 bp, wobei die deutsche Samenprobe ebenfalls ein zusätzliches Fragment bei 144 bp und die Probe aus der Schweiz ein weiteres Fragment bei 153 bp aufwies. Aus diesem Grund können Früchte mit diesem Fortpflanzungsmechanismus für molekularbiologische Methoden nicht verwendet werden, wenn eine

Sortendifferenzierung im Fokus steht. Anhand dieser Untersuchungen wurden die Vermutungen bestätigt und die Relevanz des Walnussperikarps unterstützt.

Die Ergebnisse der Doppelbestimmung der Walnussorten sind im Anhang 9.7.2 in den Tabellen 95 und 96 dargestellt. Die Primer WGA-01 und WGA-69 wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt, da keine Unterschiede zwischen den Sorten auftraten. Möglicherweise wurde ein Genbereich amplifiziert, der nur über einen geringen Polymorphismus verfügt.

### Differenzierung der Walnussorten anhand eines Fließschemas

Für die Routineanalytik war es notwendig ein Fließschema zu erhalten, mit dessen Hilfe die einzelnen Sorten nacheinander differenziert oder bestimmte Sorten hinsichtlich ihrer Authentizität untersucht werden können. Dabei präsentiert das dargestellte Fließschema nur eine Möglichkeit, um eine Einteilung mit den ausgewählten Primern vornehmen zu können, sodass nach Bedarf auch andere Kombinationen möglich sind (s. Abbildung 56). Des Weiteren wurde die Sorte Howard nicht berücksichtigt, da beide Proben unterschiedliche Ergebnisse aufwiesen und keine Rückschlüsse auf die Authentizität möglich waren.

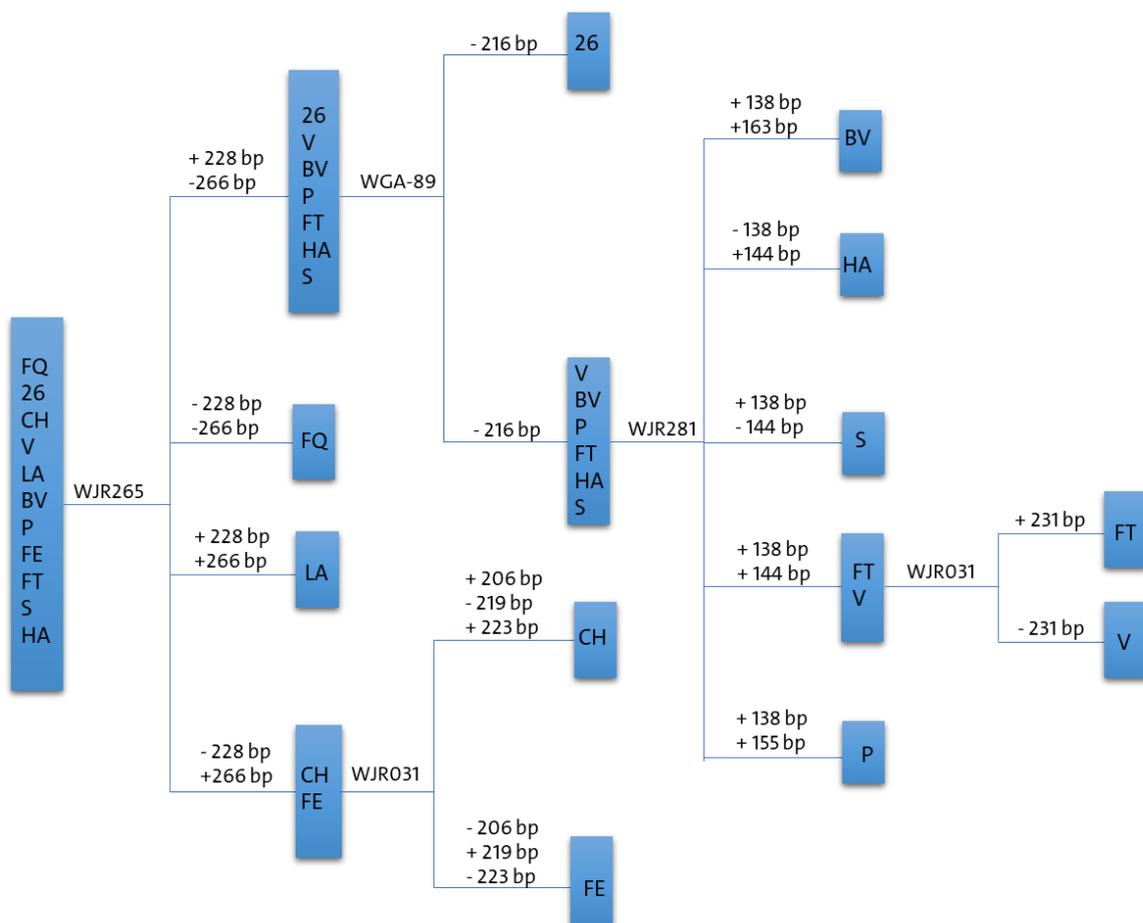


Abb. 54: Fließschema zur Differenzierung der authentischen Walnussorten anhand von Blattmaterial und Walnussperikarp mit Hilfe der SSR-Analyse.

Die Differenzierung begann mit dem Primer WJR265, der es ermöglichte, die Sorten Franquette und Lara von den anderen Sorten zu trennen. Dies wurde durch das Fehlen eines 228 oder 266 bp-Fragments bei Franquette und das Vorhandensein beider Fragmente bei der Sorte Lara erreicht. Bei allen anderen Sorten wurde jeweils nur ein charakteristisches Fragment erhalten. Bei der Sorte Franquette könnte durch Mutationen in der Sequenz an der Bindungsstelle des Primers eine Hybridisierung inhibiert worden sein, sodass keine Produktbildung auftrat (Boyle et al. 2009). Dies wurde durch unterschiedliche Proben (n=4) bestätigt. Die Sorten Chandler und Fernor bildeten ein Amplifikationsprodukt bei 266 bp, wohingegen die weiteren Sorten Broadview, Fernette, Geisenheim 26, Hartley, Pedro, Serr und Vina ein entsprechendes Produkt bei 228 bp aufwiesen.

Mit Hilfe des Primers WGA-89 wurde die Sorte Geisenheim 26 durch die Abwesenheit eines 216 bp Fragmentes von den oben aufgeführten Sorten separiert.

Diese wurden mit Hilfe des Primers WJR281 fast vollständig differenziert. Hierbei bildete die Sorte Broadview charakteristische Fragmente bei 138 und 163 bp. Die Sorte Hartley besaß kein Fragment bei 138 bp, dafür ein 144 bp Fragment, wohingegen es sich bei der Sorte Serr genau umgekehrt verhielt. Die Sorten Fernette und Vina besaßen beide Fragmente. Abschließend konnte die Sorte Serr durch Signale bei einer Länge von 138 und 155 bp differenziert werden.

Durch den Einsatz des Primers WJR031 erfolgte eine abschließende Separierung. Dabei konnten die Sorten Chandler und Fernor getrennt werden, da sie beide durch eine gegensätzliche An- oder Abwesenheit ihrer charakteristischen Fragmente differenzierbar waren. Ebenso wurden die Sorten Fernette und Vina getrennt, da Fernette ein Signal bei 231 bp aufwies, dass bei Vina nicht vorhanden war.

### Auswertung der Mikrosatelliten-Analyse des Walnussperikarps

Durch die verminderte Qualität des DNA-Isolates aus dem Walnussperikarp, erfolgte analog zur RAPD-Analyse (vgl. Kapitel 4.6.1) eine Überprüfung der Amplifizierbarkeit und eine anschließende Optimierung. Hierbei wurden die Annealing-Temperaturen (siehe Anhang 9.7.2 Tabelle 88) beibehalten und nur Veränderungen am Reaktionsansatz vorgenommen. Hierbei erfolgte eine Anpassung der Primer-, Template-, Polymerase und dNTP-Konzentration. Darüber hinaus wurden neue fluoreszenzmarkierte Primer bestellt, da die zuvor gelagerten Primer nach einem Jahr nur eine geringe Intensität aufwiesen. Diese Problematik kann durch eine Lagerung im Tris- und EDTA-Puffer verzögert werden, allerdings sollten fluoreszenzmarkierte Primer zügig verbraucht werden, da die Fluoreszenz-Abnahme einen natürlicher Prozess darstellt (Rye et al. 1993).

Die Resultate stimmten mit dem Blattmaterial überein und bestätigten somit die maternale Herkunft des Walnussperikarps. Aus diesem Grund bestand keine Notwendigkeit ein neues Fließschema zu implementieren.

## 5. Material und Methoden

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Aufarbeitung des Probenmaterials und den verwendeten Analysemethoden. Dies beinhaltet Blatt-, Samen- und Perikarpmaterial.

Im Anhang (s. Kapitel 9.1 und 9.2) sind die verwendeten Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien gelistet. Zudem werden die eingesetzten Proben aufgeführt und die Reaktionsparameter dargelegt (s. Anhang ab Kapitel 9.4).

### 5.1 Probenvorbereitung

Sofern nicht explizit auf eine andere Temperatur verwiesen wurde, erfolgten alle Aufarbeitungsschritte bei Raumtemperatur. Zudem basierten alle Lösungen auf einer wässrigen Basis, solange kein anderes Lösungsmittel angegeben wurde.

#### 5.1.1 Bakterielle Dekontaminierung

Das größte Problem für die Analyse stellte die Kontamination mit bakterieller DNA dar, weil die Walnuss ein natürliches Mikrobiom auf den Blättern und Perikarp besitzt. Somit war eine Reinigung der Materialien vor der DNA-Isolierung obligatorisch.

##### Walnussblätter

Die Proben wurden bei -20 °C gelagert und vor der DNA-Isolierung gereinigt. Hierfür wurden drei Behälter bereitgestellt. In dem ersten befand sich das Detergenz Octoxinol (0,5 g/5 L) in dem die Blätter eingetaucht und vorsichtig gewaschen wurden (2 min). Im zweiten befand sich destilliertes Wasser, das zur Entfernung des Detergenz diente (30 sek). Im Letzten wurde eine Lösung aus 70 %igem Ethanol bereitgestellt, um die Blätter zu desinfizieren (2 min). Die Flüssigkeiten wurden nach jeder Probe gewechselt. Im Anschluss der Trocknung auf Graupapier wurde die DNA-Isolierung durchgeführt (s. Kapitel 5.2).

##### Walnussperikarp

Die Walnusschale wurde mit zwei unterschiedlichen Reagenzien behandelt (s. Tab. 14) und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

Tab. 14: Verwendete Reagenzien und ihre Zusammensetzung sowie die Inkubationsdauer.

<b>Desinfektionsmittel</b>	<b>Dauer der Behandlung</b>
70 %ige Ethanol-Lösung	5 min
0,5 %ige Natriumhypochloritlösung	5 min

Zur Überprüfung wurden Abklatschplatten (*Envirocheck® Contact Plate*, Merck) eingesetzt auf denen die Schale leicht eingedrückt wurde. Zudem wurde als Vergleich ungereinigte Walnussschale, die Laborluft (1 h und 2 h), die Arbeitsfläche sowie das Reinstwasser untersucht. Die Untersuchung fand vormittags bei hohem Laborbetrieb statt. Alle Platten wurden bei 33 °C für 72 h in einem Trockenschrank inkubiert.

#### 5.1.1 Gesamt DNA-Isolierung aus Walnusssamen und -blättern

Für die DNA-Isolierung wurden 1 g gefrorenes (-20 °C) Material (s. Anhang 9.4) verwendet und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet. Im Anschluss erfolgte eine mechanische Zerkleinerung des Materials mit Hilfe eines Mörsers und Pistille, sodass eine homogene, pulverförmige Masse entstand. Diese wurden bei -20 °C in einem 2-mL-Reaktionsgefäß gelagert und dienten für die folgenden Isolierungsmethoden als Ausgangsmaterial.

#### 5.1.2 Methoden zum Zellaufschluss des Walnussperikarps

##### Zellaufschluss mit Hilfe des *Bead Ruptors*<sub>24</sub>

Das Perikarp wurden im Vorfeld mit Hilfe einer Walnuss-Handknackmaschine (Feucht Obsttechnik) von dem Samen separiert. Für den Versuch wurde das Perikarp mit einem Hammer grob zerkleinert, in 2-mL-Reaktionsgefäße eingewogen (150-200 mg), zwei Metallkugeln (Ø 3 mm) hinzugefügt und im *Bead Ruptor 24* zerkleinert. In Tabelle 15 sind die Parameter der verwendeten Programme zusammengefasst. Zwischen den einzelnen Zyklen wurden die Proben auf Eis gekühlt.

Tab. 15: Programmparameter des *Bead Ruptors*<sub>24</sub> für den Zellaufschluss des Walnussperikarps.

Programmnummer	Geschwindigkeit [m/s]	Zyklenzahl	Dauer eines Zyklus [s]	Pause [s]
1	3,0	1	180	30
	4,0	1	60	
	4,0	1	60	
2	4,5	3	30	60
3	5,0	3	30	60
4	5,5	2	30 / 10	60
5	6,6	2	30	60

Zellaufschluss mit Hilfe der Messermühle

Das Perikarp (5-10 g) wurde mit 300-400 g Trockeneis in einer Messermühle vermahlen. Dafür wurde im ersten Schritt bei 1000 rpm für 20 s das Trockeneis zerkleinert. Danach wurde die Walnusschale zugeführt und eine entsprechende Programmkonfiguration vorgenommen (s. Tabelle 16). Die Proben wurden in ein offenes Gefäß umgefüllt, um die Sublimation des Trockeneises zu beschleunigen. Zudem wurden größere Perikarpfragmente entfernt, sodass nur das feine Pulver für die DNA-Isolierung verwendet wurde.

Tab. 16: Programmparameter der Messermühle für den Zellaufschluss des Walnussperikarps.

Programmnummer	Geschwindigkeit [rpm]	Zyklenzahl	Dauer eines Zyklus [s]	Pause [s]
1	1000	1	20	-
2	4000	1	30	15
	4000	1	30	15
	4000	1	30	15
	4000	1	30	-

**5.2 DNA-Isolierung**

*5.2.1 DNA-Isolierung aus dem Blatt- und Samenmaterial*

5.2.1.1 DNA-Isolierung mittels VWR peqGOLD Plant DNA Mini-Kit

Für die Isolierung wurden 50 mg der mit flüssigem Stickstoff aufgeschlossene Probe in ein 2-mL-Reaktionsgefäß eingewogen. Die Durchführung wurde strikt nach Anleitung durchgeführt (VWR o. D.). Für die Elution wurde 100 µL Reinstwasser verwendet, dieses wurde im Vorfeld auf 65 °C erwärmt. Der schematische Ablauf ist in folgender Abbildung 55 dargestellt.

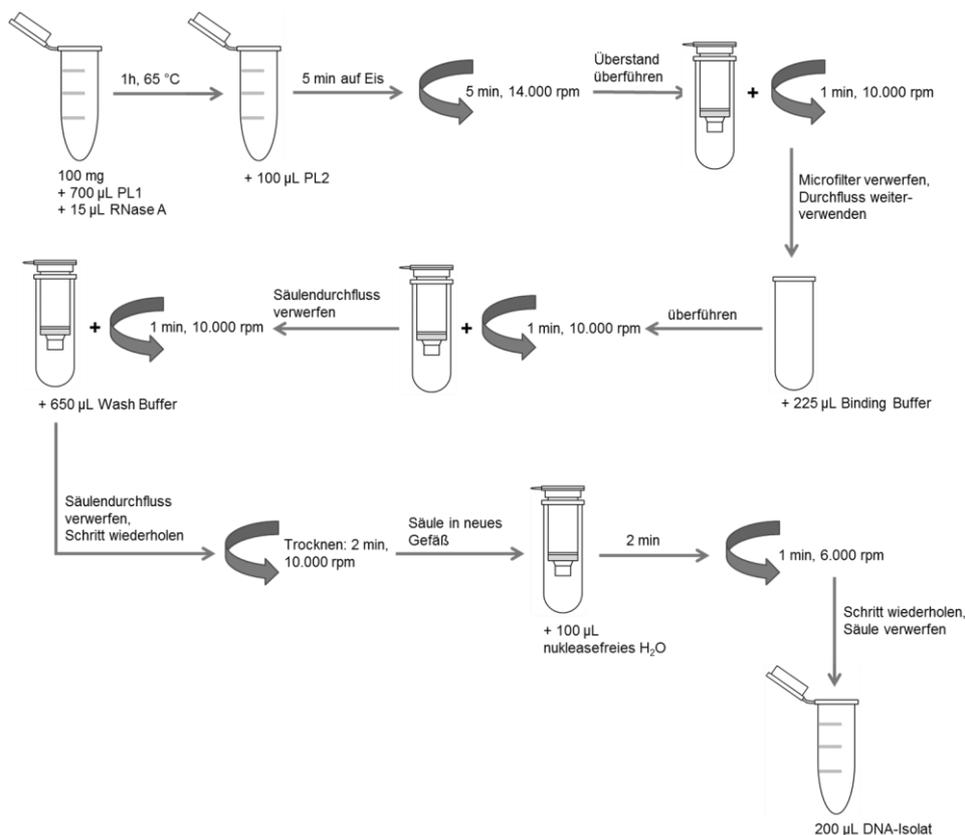


Abb. 55: Schematischer Ablauf der DNA-Isolierung mittels VWR peqGold Plant DNA Mini-Kit.

### 5.2.1.2 DNA-Isolierung nach Brüning *et al.* (2011)

Von den gefriergetrockneten, homogenisierten Proben wurden 150 mg in ein 2-mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL Extraktionspuffer (s. Tabelle 17) versetzt und mittels Vortexer homogenisiert.

Tab. 17: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions-, Binde- und Waschpuffers nach Brüning *et al.* (2011).

Extraktionspuffer (pH 8,0)	Bindepuffer (pH 6,6)	Waschpuffer (pH 7,4)
55 mM CTAB	5,5 M Guanidiniumhydrochlorid	20 mM Tris-Base
1,4 M NaCl	20 mM Tris-Base	1 mM EDTA
0,1 M Tris-Base		50 mM NaCl
20 mM EDTA		in 50 %igem abs. Ethanol

Der Ansatz wurde im Anschluss für 1 h bei 65 °C und 250 rpm in einen Thermoschüttler inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 700 µL Chloroform und eine erneute Homogenisierung mittels Vortexer. Die Suspension wurde für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und 800 µL des Überstandes in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt. Der Extraktionsschritt mit Chloroform wurde wiederholt, hierbei wurde die Zentrifugation auf 5 min verkürzt. Von dem Überstand wurden 700 µL in ein 1,5-mL-

Reaktionsgefäß pipettiert und mit 700 µL Isopropanol (-20 °C) versetzt und kurz mittels Vortexer homogenisiert. Der Ansatz wurde 30 min inkubiert und anschließend für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, während der Rückstand in 650 µL Bindepuffer gelöst wurde. Die Lösung wurde in eine EconoSpin®-Säule pipettiert, wobei auch unlösliche Bestandteile übertragen wurden. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 12.000 rpm wurde das Filtrat verworfen und die Säule mit 600 µL Waschpuffer gewaschen. Daran schloss sich ein weiterer Waschschrift mit 500 µL 70 %iges Ethanol (-20 °C) an. Zwischen den jeweiligen Waschschriften wurde für 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Abschließend wurde die Säule trocken zentrifugiert. Die DNA wurde durch die Zugabe von heißem Reinstwasser (65 °C) eluiert, indem zuerst eine Inkubation für 10 min erfolgte und sich daran eine Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm anschloss. Hierbei wurde ein neues 1,5-mL-Reaktionsgefäß verwendet. Der schematische Ablauf wurde nachfolgend in Abbildung 56 dargestellt.

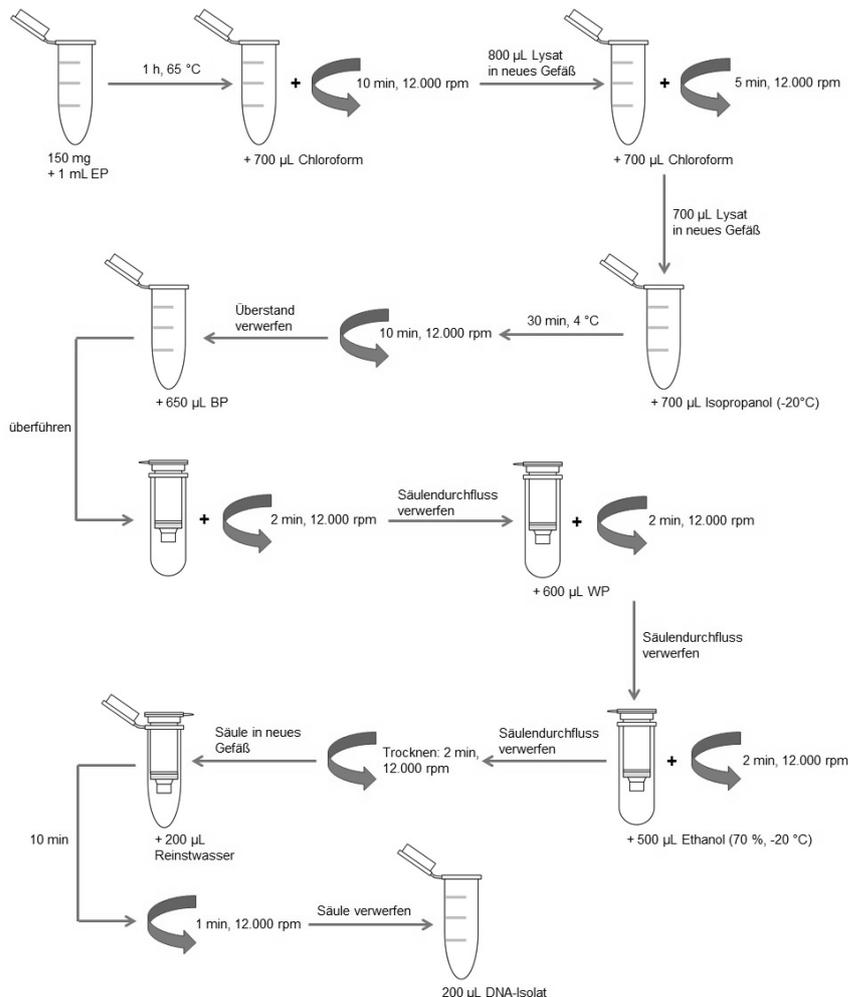


Abb. 56: Schematischer Ablauf der DNA-Isolierung nach der Methode von Brüning *et al.* (2011).

### 5.2.1.3 DNA-Isolierung nach Akkak et al. (2008) für Walnusssamen

Für die Aufarbeitung wurde 1 g gefriergetrocknetes, homogenisiertes Material verwendet und in einem 50-mL-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 8 mL vorgewärmten Extraktionspuffer (65 °C) versetzt (s. Tab 18).

Tab. 18: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Akkak *et al.* (2008).

Extraktionspuffer (pH 8,0)	
50 mM EDTA	1 % PVP
500 mM NaCl	1 % $\beta$ -Mercaptoethanol
100 mM Tris-Base	
2 % SDS	

Die Suspension wurde für 45 min bei 65 °C in einem Wasserbad inkubiert, wobei alle 10 min die Probe geschwenkt wurde. Daraufhin wurden 8 mL Chloroform:Isoamylalkohol (V/V, 24:1) zugegeben, in regelmäßigen Abständen geschwenkt und die Suspension für 40 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 2 mL in ein neues 15-mL-Reaktionsgefäß überführt und 1,5 ml Bindepuffer (VWR peqGOLD Plant DNA Mini-Kit) zugegeben. Die Suspension wurde gevortext und 650  $\mu$ L auf eine PerfectBind-DNA-Säule (VWR peqGOLD Plant DNA Mini-Kit) gegeben und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis die vollständige Suspension auf die Säule gegeben wurde, wobei das Filtrat stets verworfen wurde. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 650  $\mu$ L Waschpuffer (VWR peqGOLD Plant DNA Mini-Kit) und eine Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Das Filtrat wurde verworfen. Die Säule wurde für 2 min bei 10.000 rpm trocken zentrifugiert. Im Anschluss wurde 100  $\mu$ L erwärmtes Reinstwasser (65 °C) auf die Säule pipettiert und eine Inkubationszeit von 2 min eingehalten. Die Elution erfolgte bei einer Zentrifugation für 2 min bei 6.000 rpm. Dieser Schritt wurde erneut wiederholt, sodass ein Isolat mit einem Volumen von 200  $\mu$ L erhalten wurde. Dieses wurde im darauffolgenden Schritt mit 100  $\mu$ L Ammoniumacetatpuffer (7,5 M) versetzt. Die Lösung wurde für 10 min auf Eis inkubiert und bei 10 min für 4 °C für 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2-mL-Reaktionsgefäß überführt und 210  $\mu$ L Isopropanol (-20 °C) und 30  $\mu$ L Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei -20 °C, dabei wurde im Anschluss eine Zentrifugation für 2 min bei 4 °C und 12.000 rpm durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500  $\mu$ L 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen und erneut für 10 min bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugiert. Das Ethanol wurde dekantiert und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und abschließend in 200  $\mu$ L Reinstwasser resuspendiert. Nachfolgend wurde der schematische Ablauf in Abbildung 57 dargestellt.

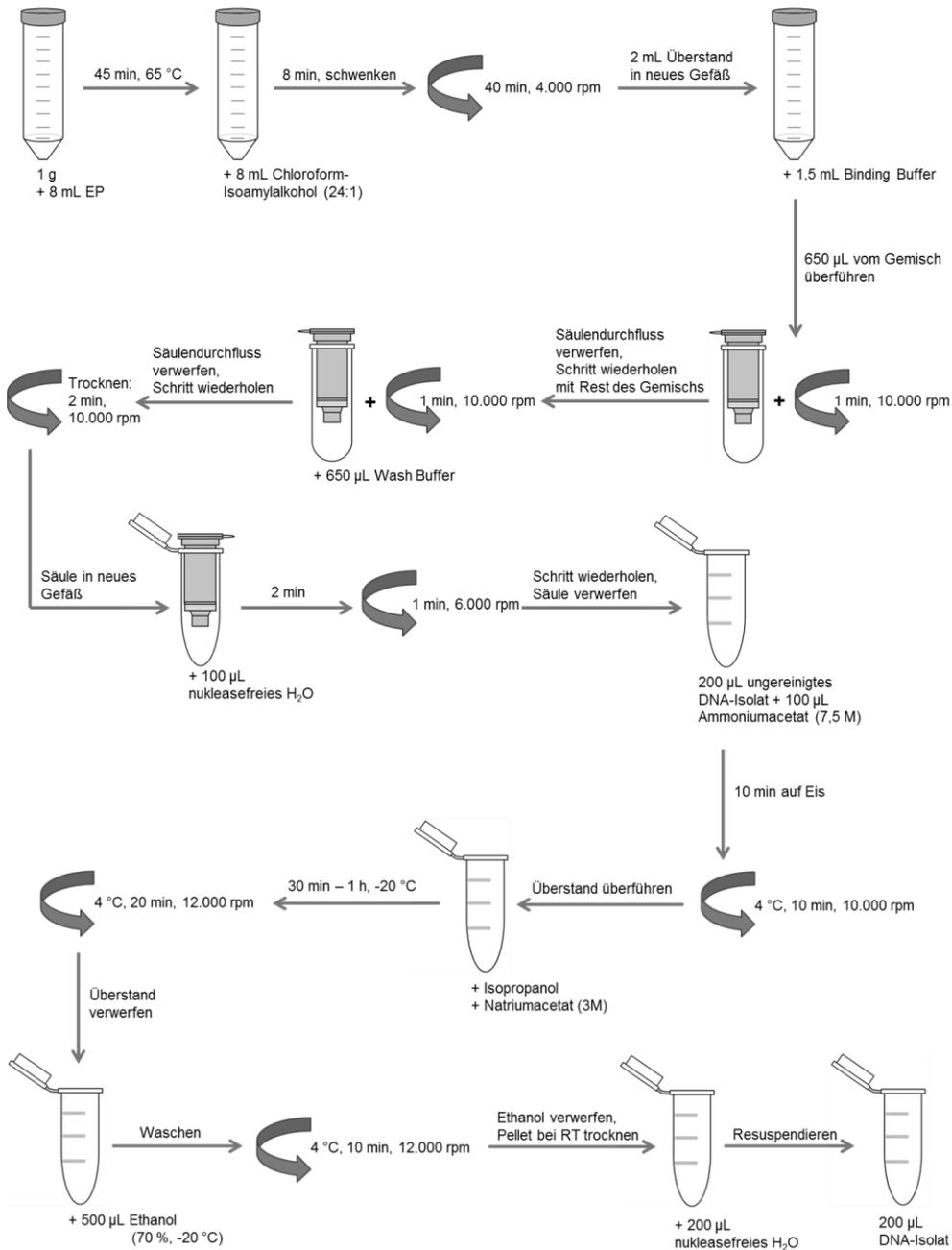


Abb. 57: Schematischer Ablauf der DNA-Isolierung nach der Methode von Akkak *et al.* (2008).

#### 5.2.1.4 DNA-Isolierung mittels CTAB nach Doyle (1991) für Blattmaterial

Zu Beginn wurden 1 g der gefriergetrockneten, homogenisierten Proben in ein 50-mL-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 7,5 mL vorgewärmten Extraktionspuffer (60 °C) versetzt und mittels Vortexer homogenisiert (s. Tabelle 19).

Tab. 19: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Doyle (1991).

Extraktionspuffer (pH 8,0)	Waschpuffer (pH 7,4)
2 % CTAB	0,01 M Ammoniumacetat
1,4 M NaCl	70 %igem abs. Ethanol
0,2 % $\beta$ -Mercaptoethanol	
0,1 M Tris-Base	
20 mM EDTA	

Die Suspension wurde für 1 h bei 60 °C in einem Wasserbad inkubiert und in regelmäßigen Abständen dreimal geschwenkt. Anschließend wurde mit 5 mL Chloroform:Isoamylalkohol (V/V, 24:1) extrahiert und für 20 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 3 mL Isopropanol (-20 °C) versetzt und gevortext. Die Inkubationszeit betrug 30 min und erfolgte bei 4 °C. Die Suspension wurde anschließend auf zwei 2-mL-Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 2 ml Waschpuffer versetzt und resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug 20 min, darauf folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Abschließend wurde das Pellet mit 100  $\mu$ L Reinstwasser resuspendiert und die beiden DNA-Isolate vereinigt, sodass ein Gesamtvolumen von 200  $\mu$ L resultierte. In der nachfolgenden Abbildung 58 wurde die Durchführung schematisch dargestellt.

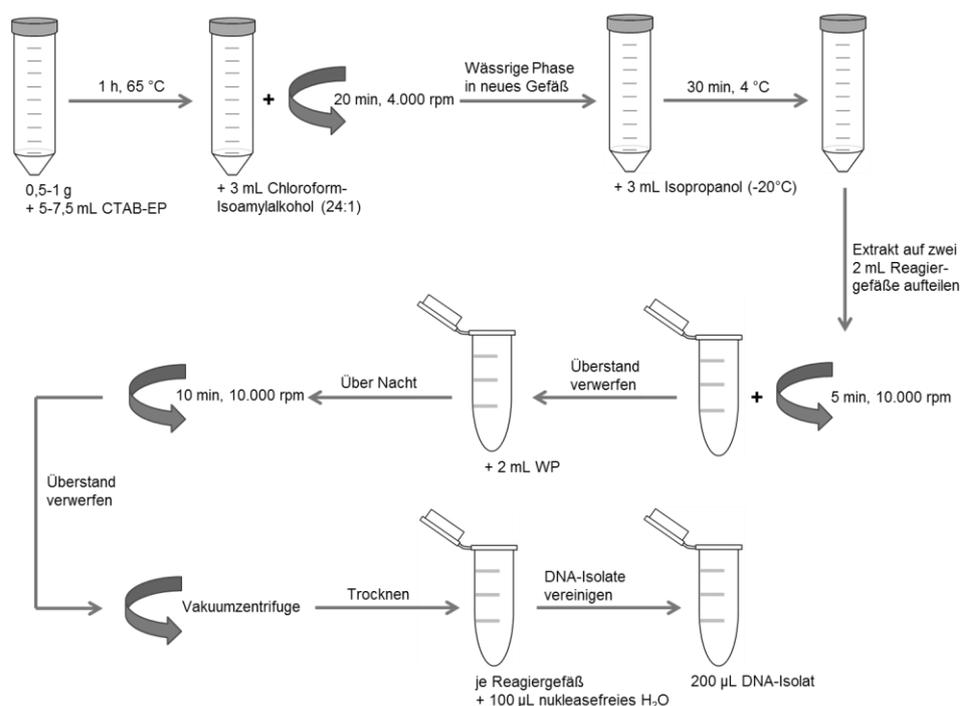


Abb. 58: Schematischer Ablauf der DNA-Isolierung nach Doyle (1991).

### 5.2.2 DNA-Isolierung aus dem Walnussperikarp

Für die Isolierung der DNA war es im Vorfeld obligatorisch das Perikarp fein zu zerkleinern, um den Zellaufschluss zu erleichtern. Dafür wurden unterschiedliche Methoden getestet, die folgend aufgelistet werden.

#### DNA-Isolierung nach Brüning *et al.* (2011)

##### a) Originalmethode

Die Methode erfolgte analog zur Isolierung der Gesamt-DNA (s. Abschnitt 5.2.1.2). Mit Ausnahme der Inkubationszeit mit Isopropanol, die über Nacht erfolgte.

##### b) Modifizierte Methode

Die anfängliche Extraktionsdauer wurde auf 20 h erhöht und bei 25 °C und 350 rpm in einem Thermoschüttler durchgeführt. Darauf folgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 65 °C und 650 rpm. Zusätzlich wurden 3 Glasperlen ( $\emptyset$  2,9-3 mm) zur Extraktion zugefügt.

#### DNA-Isolierungsmethode für Holz

Auf Grund der ähnlichen Zellstruktur wurden zwei Methoden zur DNA-Gewinnung aus Holz überprüft.

##### c) Methode nach Asif und Cannon (Asif und Cannon 2005)

Die Durchführung und die Zusammensetzung des Extraktionspuffers werden nachfolgend beschrieben (s. Tab. 20 und Abb. 59).

Tab. 20: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Asif und Cannon (2005).

Extraktionspuffer (pH 8,0)		Waschpuffer
100 mM Tris-HCl	3 % CTAB	10 mM Ammoniumacetat
20 mM EDTA	1 % PVP	In 75 %igem Ethanol
1,4 mM NaCl	0,2 % Mercaptoethanol	

Das pulverisierte Perikarp wurde in 2-mL-Reaktionsgefäßs (ca. 150 mg) eingewogen, mit 1 mL 65 °C warmen Extraktionspuffer und 3 Glasperlen ( $\emptyset$  2,9-3,3 mm) versetzt und bei 65 °C für 2 h und 350 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Darauf erfolgte die Zugabe von 700  $\mu$ L Chloroform:Isoamylalkohol (V/V, 24:1) mit entsprechender Homogenisierung auf einem Vortexer. Die Suspension wurde bei 4 °C und 500 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit 700  $\mu$ L Chloroform:Isoamylalkohol versetzt und zentrifugiert. Durch Zugabe von 700  $\mu$ L Isopropanol erfolgte die DNA-Präzipitation, die über Nacht bei -20 °C inkubiert wurde. Im Anschluss wurde bei 4 °C und

5000 rpm für 20 min zentrifugiert, hierbei wurde der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 1 mL Waschpuffer gewaschen und bei 4 °C und 5000 rpm für 2 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und der gleiche Ablauf mit 70 %igem Ethanol durchgeführt. Das Pellet wurde in einer Vakuumzentrifuge für 20 min getrocknet und am Ende in 50 µL Reinstwasser aufgenommen.

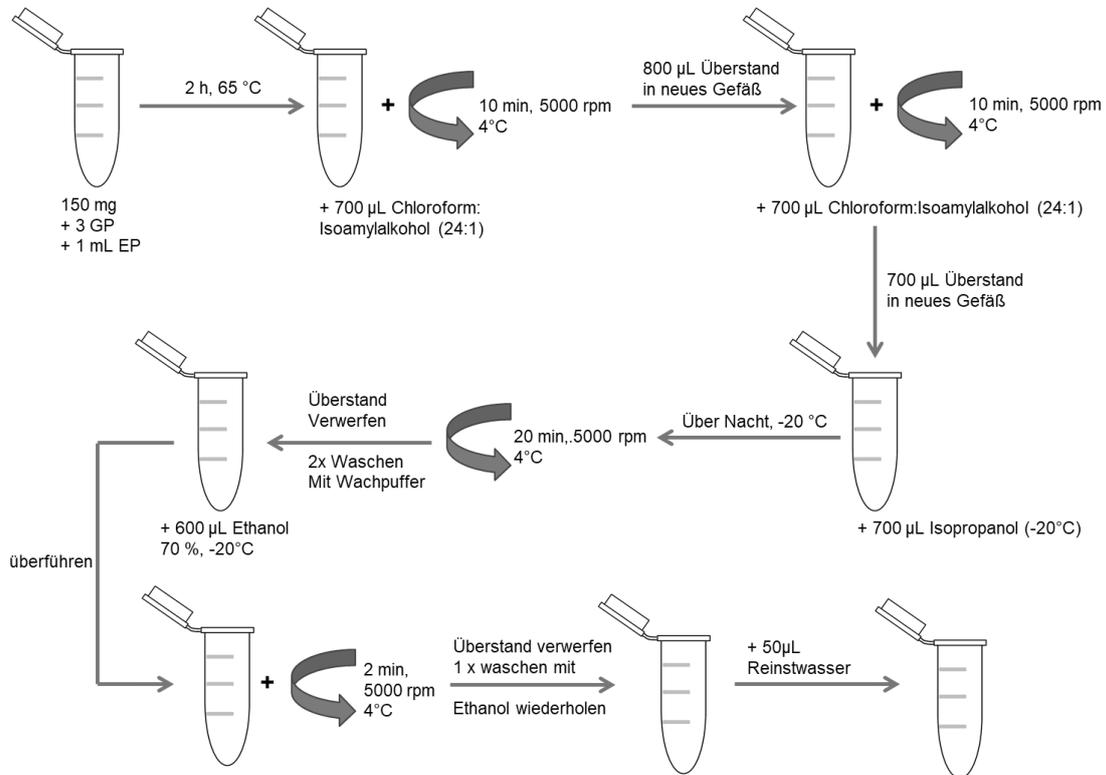


Abb. 59: Schematische Durchföhrung der DNA-Isolierung nach Asif und Cannon (2005).

d) Methode nach Jiao *et al.* (2012)

Diese Methode wurde zur DNA-Isolierung aus frischem und getrocknetem Holz verwendet. Die Durchföhrung und die Zusammensetzung des Extraktionspuffers werden nachfolgend beschrieben (s. Tab. 21 und Abb. 60).

Tab. 21: Zusammensetzung des verwendeten Extraktionspuffers nach Jiao *et al.* (2012).

Extraktionspuffer (pH 8,0)	
2% CTAB	20 mM EDTA
5% PVP	100 mM Tris-HCl
1,4 mM NaCl	2 % Mercaptoethanol

Die Einwaage und Zugabe des Extraktionspuffers waren analog zur Methode c von Asif und Cannon. Ebenso erfolgte eine Zugabe von 700 µL Chloroform:Isoamylalkohol (V/V, 24:1) mit anschließender Homogenisierung und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde erneut mit 700 µL Chloroform:Isoamylalkohol versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Für die DNA Präzipitation

wurden 1 mL Isopropanol zugefügt und für 1 h bei -20 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 rpm für 10 min, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde mit 75 %igem Ethanol gewaschen, bei 12.000 rpm für 2 min zentrifugiert, dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach der Trocknung, mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge für 30 min, wurde die DNA in 50 µL Reinstwasser aufgenommen.

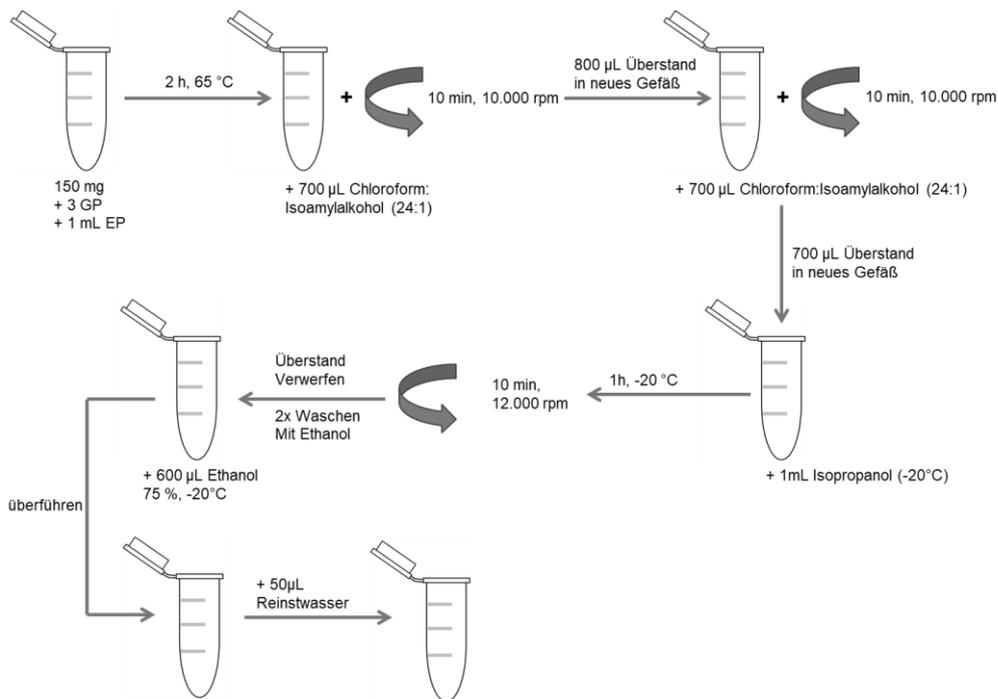


Abb. 60: Schematische Durchföhrung der DNA-Isolierung nach Jiao *et al.* (2012).

e) Methode nach Jiao *et al.* (2021) modifiziert nach Murray und Thompson (1980)

Die Durchföhrung erfolgte analog zur Methode d nach Jiao *et al.* (2012). In diesem Versuch wurde die Zusammensetzung des Extraktionspuffers nach Murray und Thompson (1980) modifiziert. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tab. 22: Zusammensetzung des verwendeten Extraktionspuffers nach Murray und Thompson (1980).

Extraktionspuffer (pH 8,0)	
1 % CTAB	50 mM Tris-HCl
0,7 mM NaCl	1 % Mercaptoethanol
10 mM EDTA	

5.2.3. Isolierung der Plastide aus Samen- und Blattmaterial

Im ersten Schritt wurden die Plastide (Chloroplasten) isoliert und angereichert. Hierbei wurden diverse Methoden untersucht und teilweise kombiniert. Zudem wurden unterschiedliche

Zentrifugationstechniken angewandt. Für die Etablierung der Methoden wurde anfangs Blattmaterial verwendet. Im Anschluss erfolgte eine Überprüfung der Methode mit Samenmaterial.

a) Methode nach Vieira *et al.* (2014)

Die Durchführung erfolgte nach Vieira *et al.* (2014) zur Isolierung von Pinien-Chloroplasten. Die Zusammensetzung der Pufferlösungen ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tab. 23: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Vieira *et al.* (2014).

Extraktionspuffer (pH 3,8)	Waschpuffer (pH 8,0)
1.25 M NaCl	1.25 M NaCl
0.25 M Ascorbinsäure	12.5 mM Borax
10 mM Natriumdisulfit	50 mM Tris-HCl
12.5 mM Borax	25 mM EDTA
7 mM EDTA	1 % PVP
50 mM Tris-HCl	
1 % PVP	

Als Ausgangsmaterial diente 10 g gefrorenes Blattmaterial (-20 °C), das von der Mittelrippe befreit und in circa 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geteilt wurde. Dieses wurde daraufhin in einen Metallzylinder gegeben und mit 200 mL Inkubationspuffer (4 °C) suspendiert und mittels Ultra-Turrax® für 90 s auf Stufe 12 homogenisiert. Dabei wurde der Metallzylinder von außen mit Eis gekühlt. Die Suspension wurde bei 4 °C zweimal durch einen Miracloth-Filter filtriert und das Filtrat auf 50-mL-Reaktionsgefäße aufgeteilt, um diese für 5 min bei 4 °C und 200 rpm zu zentrifugieren. Der Überstand wurde dekantiert und erneut für 15 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µL Waschpuffer versetzt. Die Suspension wurde vorsichtig auf drei diskontinuierlichen Percoll™-Gradient (20 %/40 %/60 %) verteilt. Dieser wurde im Vorfeld vorsichtig geschichtet, beginnend mit 4 mL einer 60 %igen Percoll™-Lösung gefolgt von 4 mL einer 40 %igen Percoll™-Lösung und abschließend 4 mL einer 20 %igen Percoll™-Lösung in ein Ultra-Clear™-Zentrifugenröhrchen. Die Zentrifugation wurde in einem Ausschwingrotor (SW 40 Ti, Beckman Coulter) für 1 h bei 4 °C und 12.000 rpm durchgeführt. An der Phasengrenze wurde die intensive Bande vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und die Phasen vereint. Zur Suspension wurden im Anschluss 30 mL Waschpuffer zugegeben und das Ganze für 40 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für die Isolierung der DNA eingesetzt (s. Kapitel 5.2.4).

b) Methode nach Vieira *et al.* (2014) und Jansen *et al.* (2005)

Die Durchführung erfolgte zu Beginn nach Vieira *et al.* (2014) und wurde anschließend durch die Methode nach Jansen *et al.* (2005) erweitert. Die Zusammensetzung der Pufferlösungen ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tab. 24: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Vieira *et al.* (2014) und Jansen *et al.* (2005).

Extraktionspuffer (pH 8,0)		Waschpuffer (pH 8,0)
a)	b)	
50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl
7 mM EDTA	7 mM EDTA	0.35 M Sorbitol
0.1 % Mercaptoethanol	150 mM Sorbitol	25 mM EDTA
0.1 % PVP	1 % PVP	

Die Suspension wurde nach der Filtration für 10 min bei 4 °C und 200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und erneut für 20 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µL Waschpuffer versetzt. Die Suspension wurde vorsichtig auf einem diskontinuierlichen Saccharose-Gradient (30%/60%) pipettiert. Auf Grund der Ausgangskonzentration wurde die Suspension auf 3 Gradienten verteilt. Die Zentrifugation erfolgte in einem Ausschwingrotor (SW 40 Ti, Beckman Coulter) für 1 h bei 4 °C und 31.500 rpm. Nach der Zentrifugation wurde die intensive, grüne Bande an der Phasengrenze mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und die Suspensionen vereinigt. Diese wurde mit 30 mL Waschpuffer versetzt und für 40 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für die Isolierung der DNA eingesetzt (s. Kapitel 5.2.4).

c) Methode nach Lang *et al.* (2011)

Die Durchführung erfolgte nach Lang *et al.* (2011) zur Isolierung von Reis-Chloroplasten. Die Zusammensetzung der Pufferlösungen ist in Tabelle 25 dargestellt. Hierbei wurden unterschiedliche Kombinationen getestet, die mit einem entsprechenden Buchstaben versehen sind.

Tab. 25: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Lang *et al.* (2011).

Extraktionspuffer (pH 7,8)			Waschpuffer (pH 7,8)	
a)	b)	c)	a)	b)
300 mM Sorbitol	300 mM Sorbitol	300 mM Sorbitol	300 mM Sorbitol	300 mM Sorbitol
13 mM Tris-HCl	13 mM Tris-HCl	13 mM Tris-HCl	50 mM HEPES	50 mM HEPES
20 mM MOPS	20 mM MOPS	20 mM MOPS	2 mM EDTA	2 mM EDTA
1 % PVP	1 % PVP	1 % PVP	1 mM MgCl <sub>2</sub>	
3 mM MgCl <sub>2</sub>		0,1 % Mercaptoethanol		

Für die Isolierung wurden 10 g Blatt- oder Samenmaterial verwendet. Die Blätter wurden analog zu den beiden vorherigen Methoden aufgearbeitet. Die Samen wurden gemörsert und über Nacht in 200 mL Inkubationspuffer inkubiert. Die Blätter wurden kurz vor der Zerkleinerung mit 200 mL Inkubationspuffer versetzt. Die weitere Aufarbeitung der beiden Materialien verlief analog. Mit Hilfe des Ultra-Turrax® wurde die Probe für 90 s bei Stufe 12 homogenisiert. Die Suspension wurde zweimal durch einen Miracloth-Filter bei 4 °C filtriert und für 5 min bei 4 °C und 200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und für 15 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Pellet in 500 µL Waschpuffer resuspendiert. Dies wurde anschließend auf einen diskontinuierlichen Percoll™-Gradienten (20 %/40 %/60 %) überführt und auf drei Gradienten aufgeteilt. Die Zentrifugation wurde für 1 h bei 4 °C und 16.000 rpm durchgeführt, wobei der gleiche Ausschwingrotor (SW 40 Ti, Beckman Coulter) wie für die vorherigen Methoden verwendet wurde. Anschließend wurden die Banden an der Phasengrenze vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen, vereint und 30 mL Waschpuffer zugegeben. Die Suspension wurde für 40 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µL Waschpuffer resuspendiert. Für die Dichtezentrifugation wurde ein diskontinuierlicher Percoll™-Gradient (20 %/40 %/60 %,) hergestellt. Die Probe wurde auf drei Gradienten aufgeteilt und analog zu den vorherigen Methoden mittels Ultrazentrifuge zentrifugiert für 1 h bei 4 °C und 16.000 rpm. Im Anschluss wurden die Plastide an den Phasengrenzen mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen und mit 30 mL Waschpuffer versetzt und für 40 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für die Isolierung der DNA eingesetzt (s. Kapitel 5.2.4).

#### 5.2.4 Isolierung der Plastiden-DNA

Im vorherigen Kapitel 5.2.3 erfolgte die Isolierung und Anreicherung der Plastide, deren DNA-Isolierung in diesem Kapitel erläutert wird. Hierbei wurden drei Methoden untersucht.

a) Methode nach Brüning *et al.* (2011)

Die Durchführung erfolgte analog zur Gesamt-DNA-Isolierung im Kapitel 5.2.1.2. Allerdings stand mehr Ausgangsmaterial (Pellet der Zentrifugation, s. Kapitel 5.2.3) zur Verfügung, weshalb die Volumina entsprechend auf 2-mL-Reaktionsgefäße aufgeteilt wurden, sodass 1 mL Extraktionspuffer zugegeben werden konnte. Die Extrakte wurden auf der Silika-Säule vereinigt. Am Ende erfolgte die Elution mit 100 µL Reinstwasser.

b) Methode nach Vieira *et al.* (2014)

Die Isolierung der DNA erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Vieira *et al.* (2014). Die Zusammensetzung der Pufferlösungen ist in Tabelle 26 dargestellt.

Tab. 26: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Vieira *et al.* (2014).

Stammlösung (pH 7.5)	Extraktionspuffer (pH 8,0)
50 mM Tris-HCl	100 mM NaCl
5 mM CaCl <sub>2</sub>	100 mM Tris-HCl
	50 mM EDTA

Das Pellet der Zentrifugation (s. Kapitel 5.2.3) wurde aufgeteilt auf 2-mL-Reaktionsgefäße und mit 1 mL Stammlösung versetzt. Nach Zugabe von 20 µL Proteinase K (10 mg/mL) wurde für 2 h bei 65 °C und 250 rpm mittels Thermoschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde für 15 min und bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Daraufhin wurden 0,5 mL Lysepuffer, 0,3 mL 20 %ige SDS-Lösung und 20 µL β-Mercaptoethanol hinzu pipettiert. Die Lösung wurde für 4 h bei 55 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert und abschließend für 15 min und bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 1,5 mL Ammoniumacetat-Lösung (5 M) versetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach diesem Schritt erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 10.000 rpm. Der Überstand wurde dekantiert und mit 1 mL Chloroform:Isoamylalkohol (V/V, 49:1) versetzt und die Lösung für 20 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt und mit einem äquivalenten Volumen an Isopropanol (-20 °C) versetzt und für 5 Tage bei -20 °C inkubiert. Die Lösung wurde daraufhin für 20 min bei 15.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 mL 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen. Der Rückstand wurde bis zur Massenkonstanz mit einer Vakuumzentrifuge eingengt und anschließend in 100 µL Reinstwasser resuspendiert. Die schematische Durchführung ist in folgender Abbildung 61 dargestellt.

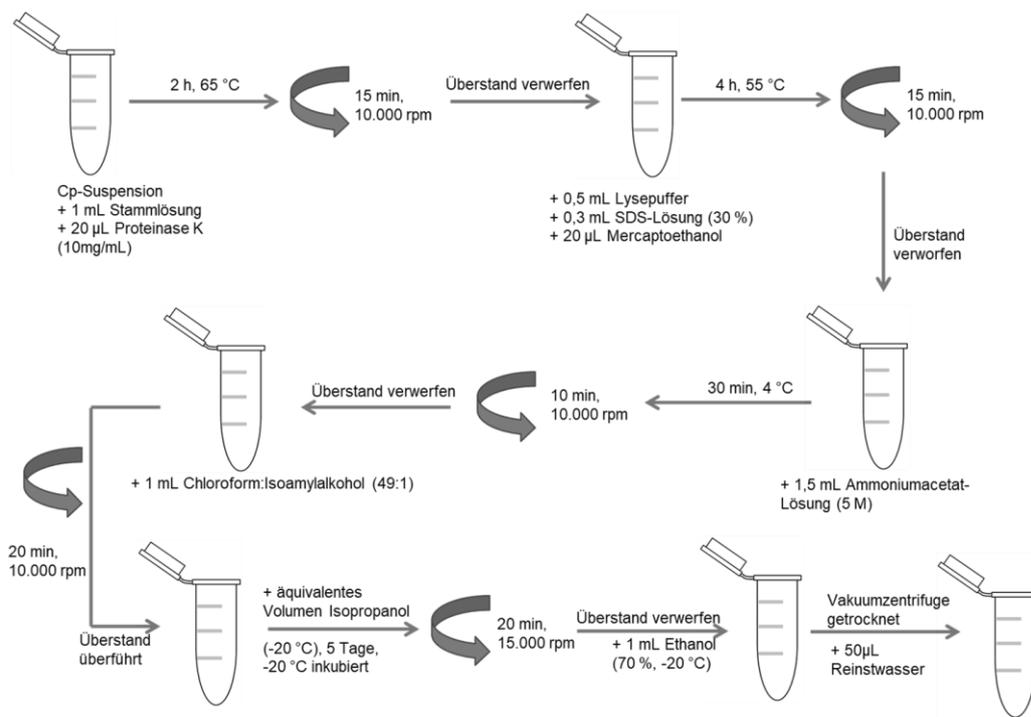


Abb. 61: Schematische Durchführung der DNA-Isolierung nach Vieira *et al.* (2014).

c) Methode nach Chaudhary *et al.* (2015)

Die Isolierung der DNA erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Chaudhary *et al.* (2015). Die Zusammensetzung der Pufferlösungen ist in Tabelle 27 dargestellt.

Tab. 27: Zusammensetzung des verwendeten Extraktions- und Waschpuffers nach Chaudhary *et al.* (2015).

DNase-Puffer (pH 7.8)	Shelf-Puffer (pH 7.4)	Extraktionspuffer (pH 8)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	600 mM Saccharose	100 mM Tris-HCl
100 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl	10 mM EDTA
5 mM CaCl <sub>2</sub>	20 mM EDTA	2 % SDS

Das Pellet der Zentrifugation (s. Kapitel 5.2.3) wurde in ein 2-mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µL DNase-Puffer und 5 µL DNase I versetzt. Die Lösung wurde für 25 min bei 37 °C und 250 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Unterschichtung mit 1 mL Shelf-Puffer und eine Zentrifugation für 20 min bei 12.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL Lyse-Puffer und 5 µL Proteinase K (10 mg/mL) gelöst. Die Lösung wurde für 1 h bei 60 °C und 250 rpm inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 140 µL NaCl-Lösung (5 M) und 250 µL 2 %ige CTAB-Lösung und eine Fortsetzung der Inkubation für 30 min bei 65 °C und 250 rpm. Des Weiteren wurde 20 µL RNase A (20 mg/mL) zugefügt und erneut für 1 h bei 37 °C und 250 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Abschließend wurde zur Lösung 500 µL Chloroform zugegeben und für 15 min bei 18.500 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde weiterverwendet und die untere Phase verworfen. Zu dieser

Lösung wurden 100 µL Natriumacetat-Lösung (5 M) und 600 µL Isopropanol (-20 °C) pipettiert und die Lösung über Nacht bei -20 °C inkubiert und am nächsten Tag für 15 min bei 18.500 rpm zentrifugiert. Daran schloss sich ein Waschvorgang mit 600 µL einer 70 %igen Ethanol-Lösung an, gefolgt von einer Zentrifugation für 15 min bei 18.500 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 60 min zentrifugiert und bis zur Massenkonstanz eingengt. Das Pellet wurde abschließend in 100 µL Reinstwasser resuspendiert. Die schematische Durchführung ist in folgender Abbildung 62 dargestellt.

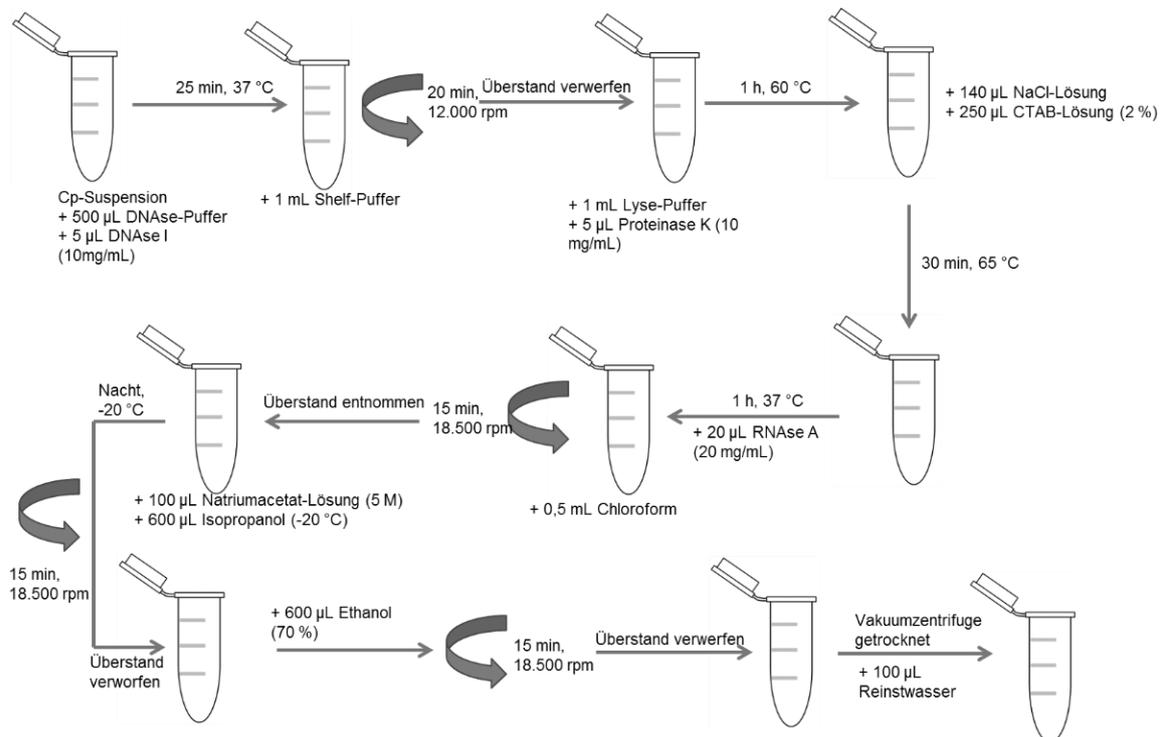


Abb. 62: Schematische Durchführung der DNA-Isolierung nach Chaudhary *et al.* (2015).

#### 5.2.4.1. Aufreinigung der Chloroplasten mittels Cäsiumchlorid-Gradienten nach Palmer (1986) und Sandbrink *et al.* (1989)

Diesbezüglich wurde ein Gesamt-DNA-Isolat aus dem Abschnitt 5.2.1.2 nach der Methode von Brüning *et al.* (2011) verwendet. Während der gesamten Durchführung müssen Handschuhe getragen werden und die Kontamination mit Ethidiumbromid auf ein Mindestmaß reduziert werden.

Im Vorfeld wurde eine Lösung bestehend aus Cäsiumchlorid und TE-Puffer (s. Tabelle 28) angesetzt. Ein Ultra-Clear™-Reaktionsgefäß (Beckman Coulter) wurde mit Hilfe einer Spritze mit Cäsiumchlorid-Puffer befüllt, das DNA-Isolat überführt und das Reaktionsgefäß vollständig mit Cäsiumchlorid-Puffer aufgefüllt. Die Öffnung wurde mit einem passenden Schweißgerät von Beckman Coulter verschlossen und ein Gegengewicht ohne DNA-Isolat hergestellt. Beide Lösungen wurden in einem Vertikalrotor (V Ti 65.1, Beckman Coulter) eingeschlossen und für 24 h bei 20 °C für 53.000 rpm zentrifugiert. Die Bande

wurde mit Hilfe einer spitzen Nadel entnommen, hierfür musste im Vorfeld eine Öffnung im oberen Teil des Reaktionsgefäß gestochen werden. Die abgenommene Lösung wurde mit äquivalenten Volumenanteilen Isopropanol-Lösung gewaschen. Nach einer kurzen Inkubationsdauer (ca. 1 min) bildeten sich zwei Phasen aus, hierbei wurde die obere Phase verworfen und erneut zu äquivalenten Volumenanteilen Isopropanol-Lösung zugegeben. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die untere Phase keine rosa Eigenfärbung mehr aufwies. Zu der Lösung wurde zu äquivalenten Volumenanteilen Isopropanol (-20 °C) zugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 12.000 rpm, wobei der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µL Reinstwasser aufgenommen wurde.

Tab. 28: Zusammensetzung des verwendeten Lösungen nach Palmer (1986) und Sandbrink *et al.* (1989).

TE-Puffer (pH 8,0)	Cäsiumchlorid-Puffer	Isopropanol-Lösung
10 mM Tris-HCl	10 mL TE-Puffer	3 mL TE-Puffer
1 mM EDTA	20 g CsCl	10 g CsCl
	200 µL Ethidiumbromid-Lösung	100 mL Isopropanol

### 5.2.5 Aufreinigung der DNA-Isolate mit Hilfe des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit

Zur weiteren Aufreinigung der DNA-Isolate wurde das *Monarch®PCR & DNA Cleanup Kit* verwendet. Die Durchführung erfolgte analog zur Anleitung. Die Elution erfolgte je nach Methode mit 20 bis 100 µL vorgewärmten Reinstwasser (NEB o. D. b).

### 5.3 Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurden unter einer Workstation (DNA/RNA UV-Cleaner Box von Biotech) durchgeführt, um die Kontamination mit exogener DNA zu minimieren. Diese wurde im Vorfeld mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und für 15 min mit UV-Licht bestrahlt, um DNA-Kontaminationen zu eliminieren. Zudem wurden die Enzyme während des Pipettierens auf Eis gelagert, während die restlichen Reagenzien bei RT zugegeben wurden.

#### 5.3.1 Überprüfung der Reinheit Chloroplasten-Isolate

Um die Anreicherung der cpDNA zu überprüfen und eine Verunreinigung mit ncDNA und mtDNA zu visualisieren, wurde eine PCR mit spezifischen Primern für die jeweiligen Abschnitte auf dem Genom durchgeführt. Hierbei wurden die jeweiligen Primerpaare gezielt mit Hilfe des *OligoAnalyzer Tools* der Firma IDT® entworfen. Für die cpDNA wurde das matK Gen (NCBI, Accession Nr. KC920677, 350 bp) verwendet, für die ncDNA der ITS-Bereich (NCBI, Accession Nr. MF182375, 630 bp) und für die mtDNA ein universelles Primerpaar auf der Cytochrome C Oxidase Untereinheit I (710 bp) (Folmer et al. 1994) (s. Anhang 9.5.1).

#### Qualitative PCR

Die DNA-Isolate wurden im Vorfeld qualitativ und quantitativ (siehe 5.6) überprüft, um die Konzentration für die PCR einstellen zu können. Für die PCR-Reaktion wurde folgende Reagenzien benötigt: ein spezifischer Polymerase-Puffer, dNTPs, ein Primerpaar, die *DreamTaq*-DNA-Polymerase sowie das DNA-Template. Das Pipettierschema ist in folgender Tabelle 29 abgebildet. Auf Grund unspezifischer Banden wurde die Probenkonzentration im späteren Verlauf von 1 ng/μL auf 0,1 ng/μL reduziert.

Tab. 29: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen zur DNA-Amplifizierung.

Reagenz	Stammkonzentration	1 x Ansatz [μL]
Reinstwasser	-	4,95
<i>DreamTaq</i> -Polymerase Puffer	5 fach	1
dNTPs (gesamt)	100 mM	1
Fw-Primer	10 μM = 10 pmol/μL	1
Rv-Primer	10 μM = 10 pmol/μL	1
<i>DreamTaq</i> -DNA-Polymerase	5 U/μL	0,05
Template	0,1 ng/μL	1
		Σ 10

Zur Effizienzsteigerung wurden die Reagenzien in einem Mastermix angesetzt, entsprechend der Probenanzahl auf die jeweiligen 200- $\mu$ L-Reaktionsgefäße gleichmäßig aufgeteilt und das DNA-Template zugegeben. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle angesetzt, um eventuelle Kontaminationen mit exogener DNA in den Reagenzien zu detektieren. Die Proben wurden für die Amplifizierung in einem Thermocycler überführt (s. Tabelle 30). Im ersten Schritt erfolgte eine Gradienten-PCR in einem Temperaturbereich von 45 bis 65 °C zur Überprüfung der Annealing-Temperatur. Im Zuge der Optimierung wurde die Elongationszeit von 1 min auf 1:30 min erhöht. Die etablierten Annealing-Temperaturen und Primersequenzen befinden sich im Anhang (9.5.1).

Tab. 30: Programmparameter des Thermocyclers für die DNA-Amplifizierung.

Schritt	Status	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]
-	Deckelheizung	99	-	-	-
1	Initiale Denaturierung	95	0	2	0
2	Denaturierung	95, 58,6/46,9, 72	0	0	30
3	Annealing		0	0	30
4	Elongation		0	1	30
5	Finale Elongation	72	0	5	0
6	Lagerung	4	Dauerhaft		

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte analog zum Kapitel 5.6.1. Es wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet und eine direkte Färbung mit 1  $\mu$ L GelRed™ vorgenommen. Die Trenndauer wurde auf 40 min eingestellt.

### 5.3.2 Amplifizierung von spezifischen Genabschnitten auf dem Karyom

Für die Sanger-Sequenzierung wurden größere DNA-Konzentrationen benötigt (>20 ng/ $\mu$ L), sodass eine vorherige Amplifizierung der spezifischen Genabschnitte notwendig war. Für die Genabschnitte wurden die jeweiligen Primerpaare gezielt mit Hilfe des *OligoAnalyzer Tools* der Firma IDT® entworfen (s. Anhang 9.5.2 Tabelle 68). Für die ADH wurden zwei Primerpaare entwickelt, um die Fragmentlängen zu reduzieren (NCBI, Accession Nr. XM\_018984340). Dies galt auch für die FAD<sub>2</sub> (NCBI, Accession Nr. XM\_018993369) sowie für das WRKY 44-Gen (NCBI, Accession Nr. KP784656).

Die Annealing-Temperatur wurde im Vorfeld für jedes Primerpaar ermittelt, wobei eine *OneTaq®HotStart*-DNA-Polymerase verwendet (s. Tabelle 31) und ein Temperaturbereich von 50 bis 65 °C überprüft wurde.

Tab. 31: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die Gradienten-PCR.

Reagenz	Stammkonzentration	1 x Ansatz [ $\mu\text{L}$ ]
Reinstwasser	-	4,95
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> <i>Standard Reaction-Buffer</i>	10 fach	2
dNTPs	1 mM	1
Fw-Primer	10 $\mu\text{M}$ = 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,5
Rv-Primer	10 $\mu\text{M}$ = 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,5
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> <i>HotStart</i> -DNA-Polymerase	5 U/ $\mu\text{L}$	0,05
DNA-Template	0,1 ng/ $\mu\text{L}$	1
		$\Sigma$ 10

Tab. 32: Programmparameter des Thermocyclers für die Gradienten-PCR.

Schritt	Status	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]	
-	Deckelheizung	99	-	-	-	
1	Initiale Denaturierung	94	0	4	0	
2	Denaturierung	94	0	0	30	
3	Annealing		50-65	0	0	30
4	Elongation		68	0	2	0
5	Finale Elongation	68	0	10	0	
6	Lagerung	4	Dauerhaft			

Die Optimierung der PCR und die anschließende Sanger-Sequenzierung wurde mit Blattmaterial in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Für die einzelnen Amplifizierungen wurden alle Parameter überprüft, um die Konzentration des Amplifikates zu erhöhen oder grundlegend den Erfolg der PCR zu gewährleisten. Hierbei wurden die einzelnen Parameter nach jeder Sequenzierung weiter optimiert. Für alle Sequenzierungen wurde ein Reaktionsansatz von 100  $\mu\text{L}$  ausgewählt, nachdem die optimalen Parameter ermittelt wurden.

#### Optimierung der PCR-Bedingungen für die erste Sequenzierung

Für die PCR wurden Primer-Konzentrationen in einem Bereich von 0,3 bis 0,5  $\mu\text{M}$  überprüft. Für die Amplifizierung wurde das Primerpaar FAD<sub>2,1</sub> angewandt. Die dNTPs wurden in einer finalen Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Für das DNA-Template wurden 0,08 bis 0,4 ng DNA verwendet.

Das beste Verhältnis von Polymerase-Puffer und Polymerase lag bei 4:1. Die endgültigen Parameter befinden sich in den Tabellen 33 und 34.

Tab. 33: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die Amplifikation der nukleären Genabschnitte für die erste Sanger-Sequenzierung.

Reagenz	Konz.	1x Ansatz [µL]					
		ADH1	ADH1 HW	ADH2	ADH2 S	FAD <sub>2.1</sub>	WRKY
Reinstwasser	/	3,95	2,95	4,15	3,95	4,35	3,95
Puffer	5x	2	2	2	2	2	2
dNTPs	1 mM	1	1	1	1	1	1
Primer-FW	10 µM	0,5	0,5	0,4	0,5	0,3	0,5
Primer-RV	10 µM	0,5	0,5	0,4	0,5	0,3	0,5
Polymerase	5 U/µL	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Probe	0,1 ng/µL	1	2	1	1	1	1

Tab. 34: Programmparameter des Thermocyclers für die nukleären Genabschnitte.

Schritt	Status	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]
-	Deckelheizung	99	-	-	-
1	Initiale Denaturierung	94	0	4	0
2	Denaturierung	94 <i>Primerspezifisch</i> (Anhang 10.5.2)	0	0	30
3	Annealing		0	0	30
4	Elongation		68	0	2
5	Finale Elongation	68	0	10	0
6	Lagerung	4	Dauerhaft		

#### Optimierung der PCR-Bedingungen für die zweite Sequenzierung

Für die erneute Sequenzierung wurde ein neues Primerpaar für den Genabschnitt FAD<sub>2</sub> erstellt (FAD<sub>2.2</sub>) und in einer Doppelbestimmung amplifiziert. Die Primerkonzentrationen wurden erhöht und ein Bereich von 0,5 bis 0,8 µM überprüft. Die Konzentration an dNTPs wurden für das neue Primerpaar angepasst und auf 0,5 mM festgesetzt. Das DNA-Template wurde in einer Konzentration von 1 bis 2 ng verwendet. Das Verhältnis von Polymerase-Puffer und Polymerase wurde auf 2,5:1 verändert (s. Anhang 9.5.2).

Zudem wurden die Elongationszeiten für das Primerpaar FAD<sub>2,2</sub> auf 50 s reduziert. Die finalen Parameter sind in den Tabellen 35 und 36 hinterlegt.

Tab. 35: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die Amplifikation der nukleären Genabschnitte für die zweite Sanger-Sequenzierung.

Reagenz	Konzentration	1x Ansatz [µL]			
		FAD <sub>2,2</sub>	FAD <sub>2,2</sub> HW	FAD <sub>2,2</sub> BV	WRKY
Reinstwasser	/	4,10	4,70	3,70	4,10
Puffer	5x	2	2	2	2
dNTPs	10 mM	0,5	0,5	0,5	0,5
Primer-FW	10 µM	0,8	0,5	0,5	0,8
Primer-RV	10 µM	0,8	0,5	0,5	0,8
Polymerase	0,5 U/µL	0,8	0,8	0,8	0,8
Probe	1 ng/µL	1	1	2	1

Tab. 36: Programmparameter des Thermocyclers für den Genabschnitt FAD<sub>2,2</sub> für die zweite Sequenzierung.

Schritt	Status	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]
-	Deckelheizung	99	-	-	-
1	Initiale Denaturierung	94	0	4	0
2	Denaturierung	94 <i>Primerspezifisch</i> (Anhang 9.X)	0	0	30
3	Annealing		0	0	30
4	Elongation		0	0	50
5	Finale Elongation	68	0	10	0
6	Lagerung	4	Dauerhaft		

#### Optimierung der PCR-Bedingungen für die dritte Sequenzierung

Für die letzte Sequenzierung wurde der ADH Genabschnitt für die meisten Sorten in einer Doppelbestimmung wiederholt. Entsprechend wurden die Primerkonzentrationen in einem Bereich von 0,3 bis 0,8 µM getestet, ebenso die dNTP-Konzentration die zwischen 0,5 bis 1 mM rangierte. Das Konzentrationsverhältnis der Polymerase und des Puffers (1:20) blieb unverändert sowie die Konzentration des DNA-Templates (1 ng/µL). Zusätzlich wurde eine weitere Polymerase getestet, die *BiozymTaq*-DNA-Polymerase mit einem Verhältnis zum entsprechenden Puffer von 1:4 (s. Tabellen 37 und 38).

Tab. 37: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die nukleären Genabschnitte für die dritte Sequenzierung.

Reagenz	Konzentration	1x Ansatz [ $\mu$ L]			
		ADH1	ADH1 S	ADH1 26,HW,P	ADH2
Reinstwasser	/	6,15	6,35	5,15	6,15
<i>BiozymTaq</i> - Polymerase	10x	1	1	1	1
Puffer					
dNTPs	10 mM	1	1	1	1
Primer-FW	10 $\mu$ M	0,4	0,3	0,4	0,4
Primer-RV	10 $\mu$ M	0,4	0,3	0,4	0,4
<i>BiozymTaq</i> - DNA- Polymerase	5 U/ $\mu$ L	0,05	0,05	0,05	0,05
Probe	1 ng/ $\mu$ L	1	1	2	1

Tab. 38: Programmparameter des Thermocyclers für die Genabschnitt ADH1 und ADH2 für die dritte Sequenzierung.

Schritt	Status	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]
-	Deckelheizung	99	-	-	-
1	Initiale Denaturierung	94	0	4	0
2	Denaturierung	94	0	0	30
3	Annealing	<i>Primerspezifisch</i> (Anhang 8.X)	0	0	30
4	Elongation	68	0	0	45
5	Finale Elongation	68	0	10	0
6	Lagerung	4	Dauerhaft		

### Elektrophoretische Trennung

Alle Amplifikationen wurden visuell mittels Elektrophorese überprüft (s. Kapitel 5.6.1). Es wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet und eine direkte Färbung mit 2  $\mu$ L GelRed™ vorgenommen. Die Trenndauer wurde auf 45 min eingestellt.

### 5.3.3 RFLP-PCR

Die RFLP-Analyse erfolgte mit Walnussperikarp und -blättern nachdem entsprechende SNPs mittels Sanger-Sequenzierung identifiziert wurden. Diese mussten kompatibel zu einem Schnittmuster eines

Restriktionsenzym sein. Die Primer wurden auf Grundlage der Sanger-Ergebnisse entworfen (s. Kapitel 9.5.3 Tabelle 74). Mit Hilfe des Blattmaterials erfolgte die Überprüfung der Annealing-Temperatur und eine Optimierung der PCR-Parameter bis das gewünschte Fragment amplifiziert wurde. Im Anschluss wurde der Restriktionsverdau bei der optimalen Temperatur des jeweiligen Enzyms durchgeführt mit Blatt- und Perikarpmaterial.

Für die Gradienten-PCR wurde ein Temperaturbereich von 45 °C bis 65 °C gewählt. Die eingesetzten Konzentrationen der PCR-Produkte und die Parameter des Thermocyclers sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt. Für die Amplifizierung wurde die *DreamTaq*-DNA-Polymerase von ThermoFisher ausgewählt. Zudem wurden jeweils sechs Ansätze von einer Sorte für die Gradienten-PCR eingesetzt. Nach der Überprüfung der Annealing-Temperatur erfolgte die Optimierung der Konzentrationen der PCR-Produkte, um eine scharfe Bandenseparierung zu erzielen (s. Tabelle 39 und 40). Zur Visualisierung wurde ein 1%iges Agarosegel angesetzt und mit 2 µL Gelred™ versetzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 120 V und 40 min.

Tab. 39: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die jeweiligen nukleären Genabschnitte der RFLP-PCR.

Reagenz	Konzentration der Ausgangssubstanz	SNP 9 [µL]	SNP 5 -200 [µL]	SNP 11 [µL]	SNP 4 [µL]	SNP 3 [µL]	SNP 1 [µL]
Reinstwasser	-	4,9	4,9	4,9	6,8	4,9	5,9
<i>DreamTaq</i> -Polymerase	5 fach	1	1	1	1	1	1
Puffer							
dNTPs	1 mM	1	1	1	1	1	1
Fw-Primer	10 µM =10 pmol/µL	1	1	1	0,3	1	1
Rv-Primer	10 µM =10 pmol/µL	1	1	1	0,3	1	1
<i>DreamTaq</i> -DNA-Polymerase	5 U/µL	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
DNA-Template	0,1 ng/µL	1	1	1	0,5	1	3
		Σ 10	Σ 10	Σ 10	Σ 10	Σ 10	Σ 10
Annealing [°C]		56	53	56	60	60	57

Tab. 40: Programmparameter des Thermocyclers für die RFLP-PCR.

Schritt	Status	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]	
-	Deckelheizung	99	-	-	-	
1	Initiale Denaturierung	95	0	4	0	
2	Denaturierung	30 Zyklen Primer abhängig	95	0	0	30
3	Annealing		72	0	0	30
4	Elongation		72	0	0	30
5	Finale Elongation	72	0	10	0	
6	Lagerung	4	Dauerhaft			

Nach erfolgreicher Amplifizierung wurde ein erneuter Ansatz durchgeführt, der im Anschluss als Target für den Restriktionsverdau diente (s. Tabelle 41). Die Bedingungen für den Thermocycler wurden an das jeweilige Enzym angepasst (s. Tabelle 42). Die Visualisierung wurde analog zum vorherigen Abschnitt durchgeführt.

Tab. 41: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für den enzymatischen Verdau.

Reagenz	FAD <sub>2</sub> [μL]	ADH2-Rv -200 [μL]	WRKY-Fw [μL]	ADH1-Rv -500 [μL]	ADH1-Fw -250 [μL]
Reinstwasser	6,9	3,9	7,9		5,9
Enzym- Buffer	1	1	1		1
Restriktions- enzym	0,1 [10 U/μL]	0,1 [10 U/μL]	0,1		0,1
DNA- Template	2	5	1		3
Gesamt- volumen [μL]	Σ 10	Σ 10	Σ 10	Σ 10	Σ 10

Tab. 42: Programmparameter des Thermocyclers für den enzymatischen Verdau.

Schritt	Status	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]
-	Deckelheizung	99	-	-	-
1	Inkubation	Enzymspezifisch	1	0	0
2	Inaktivierung des Enzyms	Enzymspezifisch	0	20	0
3	Lagerung	4	Dauerhaft		

### 5.3.4 ARMS-PCR

Die ARMS-PCR erfolgte mit Walnussperikarp und -blättern nachdem entsprechende SNPs mittels Sanger-Sequenzierung identifiziert wurden. Daraufhin erfolgte ein spezifischer Primerentwurf für den SNP Nr. 12, wobei der SNP (C/A) auf dem 3'-Ende eines Primers lag. Zur besseren Differenzierung der Ergebnisse wurden zwei Reaktionsansätze durchgeführt. Hierbei wurde der SNP als Mutante (C-Allel) und die Ursprungsform als Wildtyp (A-Allel) bezeichnet. Damit die Funktionalität gewährleistet werden konnte wurde weiterhin eine Positivkontrolle in beiden Reaktionen implementiert.

Im ersten Schritt wurde die Annealing-Temperatur in einem Bereich von 45 bis 65 °C überprüft und eine Temperatur ausgewählt, die sowohl ein Amplifikat bei der Positivkontrolle als auch bei der Mutante oder Wildtyp erzeugte. Hierbei war es ausschlaggebend, dass die Reaktion spezifisch genug war, um kein falsch-positives Ergebnis zu erhalten. In folgenden Schritten wurde hauptsächlich die Template- und Primerkonzentration variiert, da diese den größten Einfluss ausübten. Nachdem die Parameter erfolgreich für das Blattmaterial etabliert waren, wurde das Perikarpmaterial überprüft und die visualisierten Ergebnisse des Blatt- und Perikarpmaterials miteinander verglichen. Dabei wurden folgende Parameter für den Reaktionsansatz (s. Tabelle 43) und für den Thermocycler (s. Tabelle 44) ausgewählt.

Tab. 43: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für den SNP der Mutante und Wildtyp der ARMS-PCR.

Reagenz	Stammkonzentration	Mutante [ $\mu\text{L}$ ]	Wildtyp [ $\mu\text{L}$ ]
Reinstwasser	-	5,45	5,65
<i>DreamTaq</i> -Polymerase Buffer	5 fach	1	1
dNTPs	1 mM	1	1
Fw-Primer	10 $\mu\text{M}$ =10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,3	0,1
Rv-Primer	10 $\mu\text{M}$ =10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,6	0,6
MT/WT-Primer	10 $\mu\text{M}$ =10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,6	0,6
<i>DreamTaq</i> - DNA-Polymerase	5 U/ $\mu\text{L}$	0,05	0,05
DNA-Template	1 ng/ $\mu\text{L}$	1	1
Gesamt-Volumen		$\Sigma$ 10	$\Sigma$ 10

Tab. 44: Programmparameter des Thermocyclers für die ARMS-PCR von der Mutante und des Wildtypes.

Schritt	Status	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]	
-	Deckelheizung	99	-	-	-	
1	Initiale Denaturierung	95	0	2	0	
2	Denaturierung	30 Zyklen	95	0	0	30
3	Annealing		61,8	0	0	30
4	Elongation		72	0	1	0
5	Finale Elongation	72	0	10	0	
6	Lagerung	4	Dauerhaft			

## 5.4 Sequenzierungstechniken

### 5.4.1 Sanger-Sequenzierung

Nachdem eine Amplifizierung mittels Gelelektrophorese visualisiert wurde (10 µL von 100 µL, dem gesamten Reaktionsansatz), erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte mittels *Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit* (NEB o. D. b). Hierbei wurden die verbliebenen 90 µL des PCR-Ansatzes mit 500 µL Bindepuffer versetzt und eine Elution mit 20 µL Reinstwasser durchgeführt. Das weitere Vorgehen entsprach der Anleitung des Kits.

Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration ermittelt (s. Anhang 9.6.1 Tabelle 77), diese musste einen Wert zwischen 20 und 80 ng/µL besitzen als Voraussetzung für die externe Sanger-Sequenzierung (Eurofins). Für einige Sorten mussten mehrere PCR-Ansätze vereinigt werden, um die geforderte Konzentration zu erreichen. Die Aufkonzentrierung erfolgte mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge.

Für die Sequenzierung wurden die Primer auf 5 µM verdünnt. Der Probenversand erfolgte in einer 96-Well-Platte, die mit jeweils 5 µL Fw- oder Rv-Primer und 5 µL aufgereinigtes DNA-Template versehen wurden. Dabei wurden leere Positionen mit Reinstwasser aufgefüllt. Mit Hilfe von *Cap stripes* wurden die Platten verschlossen und in einem Kuvert verschickt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte anhand der Software *GenomeCompiler* (Version 2.2.88) und die Elektropherogramme wurden zur Überprüfung der Qualität herangezogen.

### 5.4.2 Next Generation Sequencing (Bridge-Amplifikation von Illumina)

Zu Beginn wurden die DNA-Isolate der Chloroplastenanreicherung (s. Kapitel 5.2.3 und im Anhang Kapitel 9.4.3) mittels des *Monarch® PCR & DNA Cleanup Kits* (NEB o. D. b) aufgereinigt. Hierfür wurden 100 µL Probe eingesetzt und mit 500 µL Bindepuffer versetzt und am Ende in 25 µL Reinstwasser eluiert. Die weitere Durchführung entsprach der Anleitung im Kit.

Die Erstellung der *Library* erfolgte mit 5 ng Material nach Herstellerangabe (Illumina 2017). Die Arbeitsanweisungen der Anleitung wurden exakt umgesetzt (*Nextera™ DNA Flex Library Prep 24 Samples*, Illumina). Die Fragmentierung der Proben wurde für 15 min durchgeführt. Zudem erhielt jede Probe eine spezifische Indexkombination (s. Anhang, 9.6.2 Tabelle 80), um eine spätere Unterscheidung zu gewährleisten. Die Konzentration der fertigen *Library* wurde auf 4 nM eingestellt. Zudem wurden die Fragmentlängen mittels Kapillargelelektrophorese (Bioanalyzer, Agilent) überprüft. Hierfür war es notwendig ein *High Sensitivity Chip* (Agilent) einzusetzen, um ein Signal detektieren zu können. Die Präparation des Chips erfolgte analog zur Anleitung.

Vor der Sequenzierung wurde die Kartusche mit den notwendigen Reagenzien aufgetaut. Zum Pooling der *Libraries* wurden jeweils 5 µL von jeder Probe vereint, von diesem Pool 5 µL entnommen und mit 5 µL frisch angesetzter Natronlauge (0,2 M) versetzt. Die Lösung wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 990 µL *Hybridization Buffer* zugegeben, sodass der Pool eine Konzentration von 20 pM aufwies. Im nächsten Schritt erfolgte eine weitere Verdünnung auf 6 pM. Als interner Standard wurde eine PhiX-Kontrolle zugegeben (MiSeq Reagent Kit v2/ MiSeq Nano Reagent Kit v2, Illumina), die Herstellung erfolgte nach Anleitung. Für die Sequenzierung wurden 594 µL der 6 pM gepoolten *Library* mit 6 µL der 12,5 M PhiX-Lösung gespiked und in die Kartusche pipettiert.

Die *Flow Cell* wurde vorsichtig aus der Salzlösung entnommen und mit Reinstwasser abgespült, mit einem fusselfreien Tuch getrocknet und anschließend in die vorgegebene Position im Sequenzierungsgerät eingeführt. Für die ersten beiden Sequenzierungen wurden vier Proben mit einem MiSeq Reagent Nano Kit v2 (0,5 Gb) sequenziert, die restlichen 20 Proben mit einem MiSeq Reagent Kit v2 (7,5 Gb). Bei den ersten vier Proben handelte es sich um die Sorten Chandler und Franquette in einer Doppelbestimmung (s. Anhang 9.6.2). Die bioinformatische Auswertung erfolgte mit der Software *GenomeCompiler* (Version 2.2.88).

### 5.5 Non-targeted DNA-Analysen

#### 5.5.1 RAPD-PCR

Die RAPD-Analyse erfolgte mit Walnussperikarp- und -blättern. Mit Hilfe des Blattmaterials erfolgte die Überprüfung der Annealing-Temperatur und eine Optimierung der PCR-Parameter. Für jeden Primer wurde ein PCR-Mastermix angesetzt und die Probe separat zugefügt. Die Auswahl der Primer basierte auf Literaturquellen, Projektpartnern (Agrolab, Herr Tichy) und einem Random-Primer Set (s. Anhang 9.7.1 Tabelle 84).

#### Blattmaterial

Für die Gradienten-PCR wurde ein Temperaturbereich von 30 °C bis 50 °C gewählt. Die eingesetzten Konzentrationen der PCR-Produkte und die Parameter des Thermocyclers sind in den nachfolgenden Tabellen 45 und 46 aufgeführt. Für die Amplifizierung wurde die *DreamTaq*-DNA-Polymerase von

ThermoFisher ausgewählt. Zudem wurden jeweils sechs Ansätze von drei unterschiedlichen Sorten für die Gradienten-PCR hergestellt.

Nach der Überprüfung der Annealing-Temperatur erfolgte die Optimierung der Konzentrationen der PCR-Edukte, um eine scharfe Bandenseparierung zu erzielen. Dabei wurden für jeden einzelnen Primer die jeweils optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt (s. Anhang 9.7.1 Tabelle 85).

Tab. 45: Zusammensetzung und Ausgangskonzentration für die RAPD-Gradienten-PCR anhand von Blattmaterial.

Reagenz	Stammkonzentration	1 x Ansatz [ $\mu$ L]
Reinstwasser	-	5,9
<i>DreamTaq</i> -Polymerase Puffer	5 fach	1
dNTPs	1 mM	1
Primer	10 $\mu$ M = 10 pmol/ $\mu$ L	1
<i>DreamTaq</i> -DNA-Polymerase	5 U/ $\mu$ L	0,1
DNA-Template	0,1 ng/ $\mu$ L	1
		$\Sigma$ 10

Tab. 46: Parameter des Thermocyclers für die RAPD-PCR.

Schritt	Status	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]	
-	Deckelheizung	99	-	-	-	
1	Initiale Denaturierung	94	0	2	0	
2	Denaturierung	30 Zyklen Primer abhängig	92	0	0	45
3	Annealing		0	1	0	
4	Elongation		72	0	2	0
5	Finale Elongation	72	0	10	0	
6	Lagerung	4	Dauerhaft			

#### Perikarpmaterial

Für das Walnussperikarp wurden die optimierten Annealing-Temperaturen und Reaktionsbedingungen verwendet. Allerdings mussten einige Parameter angepasst werden, um eine erfolgreiche Amplifikation zu gewährleisten. Die veränderten Konzentrationen im Mastermix werden in folgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 47: Zusammensetzung und Ausgangskonzentration für die RAPD-Gradienten-PCR anhand des Walnussperikarps.

Reagenz	Stammkonzentraion	1 x Ansatz [ $\mu$ L]
Reinstwasser	-	5,95
<i>DreamTaq</i> -Polymerase Buffer	5 fach	1
dNTPs	100 mM	1
Primer	10 $\mu$ M = 10 pmol/ $\mu$ L	1
<i>DreamTaq</i> -DNA-Polymerase	5 U/ $\mu$ L	0,05
DNA-Template	1 ng/ $\mu$ L	1
		$\Sigma$ 10

Für die einzelnen Primer wurde jeweils ein optimierter Reaktionsansatz etabliert (s. Anhang 9.7.1 Tabelle 86).

### Elektrophoretische Trennung

Die Gelelektrophorese erfolgte analog zum Abschnitt 5.6.1. Das GelRed™ wurde direkt zugegeben und in Konzentrationen von 1 bis 3  $\mu$ L zugesetzt, bis die optimalen Verhältnisse für jeden einzelnen Primer vorlagen. Auch die Dauer der elektrophoretischen Trennung wurde variiert, sowie die Konzentration des Agarosegels.

### 5.5.2 Mikrosatelliten-Analyse

Die Mikrosatelliten-Analyse erfolgte mit Walnussperikarp und -blättern, wobei das Perikarp erst 1 Jahr später analysiert wurde. Im ersten Schritt erfolgte eine Amplifizierung der ausgewählten Bereiche, dabei wurden 10 Primer aus der Literatur verwendet (s. Anhang 9.7.2 Tabelle 88). Diese wurden fluoreszenzmarkiert, um eine Detektion zu ermöglichen. Die Fragmentlängen-Analyse erfolgte mittels Kapillargelelektrophorese (Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer, ThermoFisher), sodass am Ende ein Elektropherogramm mit den Längen der DNA-Fragmente der authentischen Sorten erhalten wurde.

### Amplifikation der DNA-Fragmente des Blattmaterials

Zu Beginn wurden die Annealing-Temperaturen der ausgewählten Primer mit Hilfe einer Gradienten-PCR überprüft und einer *OneTaq*®*HotStart*-DNA-Polymerase. Hierbei wurden unterschiedliche Temperaturen, in diesem Fall 50,0 °C bis 64,0 °C, angesteuert (s. Anhang 9.7.2 Tabelle 89). Die DNA-Template wurden auf 0,1 ng/ $\mu$ L verdünnt und für die PCR eingesetzt. Dabei wurde folgendes

Pipettierschema für die Blätter verwendet und aus den Reagenzien, exklusive DNA-Template, ein Mastermix angesetzt (s. Tabelle 48 und 49).

Tab. 48: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die Gradienten-PCR.

Reagenz	Stammkonzentration	1 x Ansatz [ $\mu\text{L}$ ]
Reinstwasser	-	5,85
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> Standard Reaction-Buffer	10 fach	2
dNTPs	100 mM	0,1
Fw-Primer	10 $\mu\text{M}$ = 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,5
Rv-Primer	10 $\mu\text{M}$ = 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,5
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> HotStart-DNA-Polymerase	5 U/ $\mu\text{L}$	0,05
DNA-Template	0,1 ng/ $\mu\text{L}$	1
		$\Sigma$ 10

Dabei wurde folgendes Temperaturprogramm mit dem Thermocycler verwendet.

Tab. 49: Programmparameter des Thermocyclers für die Gradienten-PCR.

Schritt	Status	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Zeit [h]	Zeit [min]	Zeit [s]
-	Deckelheizung	99	-	-	-
1	Initiale Denaturierung	94	0	4	0
2	Denaturierung	94 Primer abhängig 68	0	0	30
3	Annealing		0	0	30
4	Elongation		0	0	20
5	Finale Elongation	68	0	10	0
6	Lagerung	4	Dauerhaft		

Nach erfolgreicher Amplifizierung und Auswahl der geeigneten Annealing-Temperatur wurde das authentische Probenmaterial untersucht. Dafür wurden die DNA-Template auf 0,1 ng/ $\mu\text{L}$  verdünnt und die Vorwärts-Primer fluoreszenzmarkiert (s. Tabelle 50). Durch die unterschiedliche Emissions-Wellenlänge konnten bei der Kapillargelelektrophorese drei Proben simultan analysiert werden.

## Material und Methoden

Tab. 50: Auflistung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und ihr jeweiliges Absorptions- und Emissionsmaximum.

Farbstoff	Spezifikation	Absorption [nm]	Emission [nm]
FAM	6-Carboxyfluorescein	495	520
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescein	535	556
ATTO 565	Rhodaminfarbstoff	564	590

Die PCR-Bedingungen waren identisch mit denen zur Überprüfung der Annealing-Temperatur. Die Ansätze erfolgten in einem Volumen von 50  $\mu\text{L}$ .

### Amplifikation des Walnussperikarps

Die Annealing-Temperaturen und die Parameter des Thermocyclers wurden beibehalten, einzig der Mastermix wurde für einzelne Sorten optimiert, um eine erfolgreiche Amplifikation zu gewährleisten. Dabei ergaben sich folgende Variationen, die in der Tabelle 51 aufgeführt werden.

Tab. 51: Pipettierschema der Reagenzien und eingesetzten Konzentrationen für die PCR.

Reagenz	Konzentration	Volumen [ $\mu\text{L}$ ] (Mastermix 1)	Volumen [ $\mu\text{L}$ ] (Mastermix 2)	Volumen [ $\mu\text{L}$ ] (Mastermix 3)	Volumen [ $\mu\text{L}$ ] (Mastermix 4)	Volumen [ $\mu\text{L}$ ] (Mastermix 5)
Reinstwasser	-	29,25	24,25	26,75	21,75	23,75
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> Standard Reaction- Buffer	5x	10	10	10	10	10
dNTPs	10 mM	0,5	0,5	0,5	0,5	1
fwd-Primer	10 $\mu\text{M}$	2,5	2,5	3,75	3,75	2,5
rvs-Primer	10 $\mu\text{M}$	2,5	2,5	3,75	3,75	2,5
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> <i>Ho</i> <i>tStart</i> -DNA- Polymerase	5 U/ $\mu\text{L}$	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
DNA- Template	0,1 ng/ $\mu\text{L}$	5	10	5	10	10
Summe	-	$\Sigma$ 50				

Für welche Probe welche Schemata eingesetzt wurde, ist im Anhang 9.7.2 in Tabelle 94 hinterlegt. Zudem wurden die Primergruppen neu strukturiert, sodass nur die notwendigen Primer für die Amplifikation verwendet wurden (s. Anhang 9.7.2 Tabelle 93).

### Gelelektrophorese zur Überprüfung der Amplifikation der Blatt-DNA

Die Durchführung entsprach der Anleitung im Abschnitt 5.6.1. Ein Längenstandard (peqGOLD DNA Ladder Mix, 100-10.000 bp) wurde mit 3 µL hinzugefügt. Für die Elektrophorese wurde eine Trenndauer von 35 min durchgeführt. Zur Färbung wurde das Gel in einem Färbegrad inkubiert, dieses enthielt eine Lösung aus 75 µL Gelred™ in 200 mL dest. Wasser gelöst. Die Färbedauer variierte je nachdem wie oft das Färbegrad bereits im Einsatz war zwischen 7 bis 30 min.

### Gelelektrophorese zur Überprüfung der Amplifikation der Perikarp-DNA

Die Bedingungen waren identisch zum vorherigen Abschnitt. Allerdings wurde auf ein Färbegrad verzichtet und die klare, viskose Agaroselösung mit 2 µL Gelred™ direkt versetzt. Zudem wurde nur 1 µL des Längenstandards eingesetzt.

### Kapillargelelektrophorese der Blatt- und Perikarproben

Anfangs wurden 10 µL des Hi-Di™ Formamids sowie 1 µL des LIZ™ 500 Standards (1:25 verdünnt) in eine 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurden die entsprechenden Primergruppen in ein Well pipettiert und mit einer Folie verschlossen, mit einem Vortexer kurz homogenisiert und für 30 s bei 1000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte eine Denaturierung im Thermocycler bei 95 °C für 10 min. Die Platte wurde daraufhin auf Eis gekühlt. Die Folie wurde vorsichtig entfernt und mit einer Septen-Matte verschlossen und erneut für 30 s bei 1000 rpm zentrifugiert. Zuletzt wurde die Platte in eine Halterung gespannt und in den Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer gestellt. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit der Software *GeneMapper*® Version 5 der Firma ThermoFisherScientific.

## **5.6 Spezifizierung der DNA**

### *5.6.1 Visualisierung der DNA mittels Elektrophorese*

Für die Visualisierung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten Agarose variierte hierbei zwischen 1 bis 2%, je nach Fragestellung, wobei für Fragmente unter 1000 bp eine Konzentration von 2 % verwendet wurde. Für die Agarose-Suspension wurden 50 mL eines Tris-Acetat-EDTA-Puffers (TAE) verwendet (s. Anhang 9.1 Tabelle 56) und anschließend in einer Mikrowelle (450 Watt, circa 2 min) zum Sieden erhitzt. Das Glasgefäß wurde kurz unter fließendem Wasser abgekühlt und 1 bis 2 µL Gelred™ hinzugefügt. Die direkte Zugabe von

GelRed™ erfolgte erst in späteren Versuchen, anfangs wurde das fertige Gel in einem Färbebad inkubiert, bestehend aus 75 µL GelRed™ und 200 mL dest. Wasser. Die viskose Flüssigkeit wurde in einen Gelschlitten überführt und mit den gewünschten Kämmen ausgestattet. Nach circa 20 min bildete sich ein stabiles Gel, welches in eine Elektrophoresekammer überführt wurde. Die zu analysierenden Proben (10 µL des PCR-Ansatzes) wurden mit 1 µL *Loading Dye* direkt versetzt oder bei einer Weiterverwendung der Proben 5 bis 10 µL Probe aus dem Ansatz entnommen. Von jeder Probe inklusive *Loading Dye* wurden jeweils 10 µL in das Gel pipettiert und zur Einschätzung der Fragmentlängen 1 µL DNA-Größenstandard (peqGOLD DNA Ladder Mix von VWR, 100-10000 bp) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 120 V, 150 W und 1 A für 35 bis 45 min. Die anschließende Visualisierung erfolgte mit einer Geldokumentationseinheit sowie der Software *Argus X1*, Version 5.1.11 von biostep.

### 5.6.2 Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA

Für die qualitative Beurteilung der Reinheit der DNA-Isolate wurde das DS-11-Spektrometer (DeNovix®) verwendet. Zuerst wurde ein Nullabgleich mit 1 µL Reinstwasser durchgeführt (Blank), indem dieses auf den Probenmesspunkt pipettiert und der Probenarm gesenkt wurde. Mit Hilfe der Software konnte zwischen Blank und Sample variiert werden. Nach erfolgreicher Kalibrierung erfolgte die Messung der Probenisolate. Hierfür wurden ebenfalls 1 µL Lösung auf den Messpunkt pipettiert und der Probenarm gesenkt. Der Quotient der gemessenen Wellenlänge bei 260/230 und 260/280 erschien auf dem Display. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Oberflächen mit einem fusselreien Tuch gereinigt.

### 5.6.3 Quantifizierung der DNA-Isolate

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit dem QuantiFluor®dsDNA (Promega). Hierfür wurde der 20x Tris-EDTA-Puffer (TE) auf 1x verdünnt. Die Analyse wurde in einem 500 µL Reaktionsgefäß (ThermoFisherScientific) durchgeführt, dessen Material kaum Eigenabsorption aufwies. Hierbei wurde von dem Farbstoff QuantiFluor®dsDNA Dye eine 1:400 Verdünnung mit dem TE-Puffer in einem Reaktionsgefäß angesetzt. Bei mehreren Ansätzen wurde ein Mastermix in einem 15-mL-Reaktionsgefäß hergestellt. Abschließend wurde zu jedem Reaktionsansatz (200 µL) 2 µL Probe hinzugefügt, die Ansätze wurden mit Hilfe eines Vortexers homogenisiert und für 5 min unter Lichtausschluss inkubiert. Zu jeder Durchführung wurde eine Negativkontrolle gemessen, hierbei wurde auf die Zugabe von 2 µL Probe verzichtet.

## 6. Fazit

Der Fokus dieser Forschungsarbeit lag auf der eindeutigen Bestimmung der biologischen Identität von Walnussorten. Die Differenzierung sollte anhand des Chloroplasten-Genoms ermöglicht werden, wofür eine *Next-Generation* Sequenzierung durchgeführt wurde. Allerdings zeigten die Sorten keine Mutation, somit war eine Authentizitätsbestimmung über diesen Weg nicht zielführend. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis kann mit dem kurzen Entwicklungszeitraum der Sorten begründet werden, da das Walnusszuchtprogramm erst vor 100 Jahren etabliert wurde. Dieser Zeitraum war somit nicht ausreichend, um eine konstitutive Mutation zu bewirken, die charakteristisch für eine Sorte wäre.

Daraufhin wurde im weiteren Verlauf der Forschungsarbeit das maternale Pflanzenmaterial (Blätter, Perikarp) analysiert, um Unterschiede auf dem Karyom zu detektieren. Dadurch wurde sichergestellt, dass keine paternalen Einflüsse die Ergebnisse beeinflussten. Hierbei wurden vielversprechende Genbereiche ausgewählt und mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Als Ergebnis konnten Einzelbasenaustausche identifiziert werden, die die Grundlage für alle weiteren *Downstream*-Methoden bildeten.

Die identifizierten SNPs wurden unter anderem für die Entwicklung zweier *targeted*-Methoden verwendet, wobei eine ARMS- und RFLP-PCR etabliert wurden. Die RFLP-PCR eignet sich hauptsächlich für homozygote SNPs, da die Aussagekraft bei heterozygoten SNPs stark eingeschränkt war und nur die Sorten Chandler, Broadview und Fernor eindeutig identifiziert werden konnten. Dahingegen benötigt die ARMS-PCR einen längeren Entwicklungszeitraum, allerdings eignet sich die Methode besonders für Organismen mit einem hohen Anteil an heterozygoten SNPs wie es bei *J. regia* der Fall ist.

Zusätzlich wurden *non-targeted* Methoden entwickelt, die keine Kenntnis der Sequenz voraussetzten, wobei es sich um die Mikrosatelliten-Analyse und die RAPD-PCR handelte. Diese Methoden werden standardmäßig in der Routineanalytik eingesetzt und gelten als unkomplizierte sowie kostengünstige Verfahren, die zudem eine vollständige Differenzierung der 12 Sorten erreichten.

Somit konnten für Walnüsse, die in Schale importiert und gehandelt werden, die oben beschriebenen Methoden angewandt werden, da diese einen maternalen Ursprung besitzen. Dadurch kann die biologische Identität eindeutig verifiziert werden und die Strategien bspw. in den Handelslaboren eingesetzt werden.

## 7. Ausblick

Hinsichtlich der Chloroplasten-Sequenzierung und der Verwendung zur Sortendifferenzierung existieren nur wenige Forschungsergebnisse, sodass keine Vorhersagen über die Variabilität des Chloroplasten-Genoms getroffen werden konnte. Im Vorfeld wurde bereits erfolgreich eine Sortendifferenzierung von Kakaosorten vorgenommen, sodass in diesem Projekt die Nussfrucht eingehender untersucht werden sollte. Es zeigte sich jedoch, dass der Verwandtschaftsgrad der Walnussorten und der kurze Züchtungszeitraum nicht ausreichend war, um Mutationen auf dem Chloroplasten-Genom zu entwickeln. Generell eignet sich die Analyse dieses Genoms hervorragend für diploide Organismen, deren Früchte für die Lebensmittelindustrie eingesetzt werden und auf Grund ihres diploiden oder polyploiden Erbgutes keine Sortendifferenzierung der Frucht vorgenommen werden kann. Da die meisten Chloroplasten maternal vererbt werden und als Proplastide bereits im Embryo vorliegen, können diese bei Pflanzen sequenziert und für eine Sortendifferenzierung herangezogen werden.

Des Weiteren bieten die *Next-Generation Sequencing*-Technologien neue Möglichkeiten, um *Food Fraud* aufzudecken. Hierbei können komplexe Lebensmittel hinsichtlich ihrer Komponenten analysiert und die Sequenzierungsergebnisse mit Datenbanken verglichen werden. Dadurch können Zugaben von anderen Spezies identifiziert werden. So können bspw. Tierarten wie Hund oder Katze, die bei uns nicht auf dem Speiseplan stehen und routinemäßig nicht untersucht werden, eindeutig durch die Sequenzierung identifiziert werden. Auch exotische Beimischungen können auf Grund ihres DNA-Profiles detektiert werden und *Food Fraud* signifikant erschweren. Hierbei werden nicht nur pflanzliche oder tierische Organismen detektiert, sondern auch mikrobielle Kontaminationen werden nachgewiesen. Somit können gesundheitsgefährdende Mikroorganismen schneller detektiert und positiv getestete Lebensmittel oder deren Rohstoffe zügiger vernichtet werden, um Lebensmittelvergiftungen vorzubeugen.

Durch die NGS-Verfahren stehen der Lebensmittelkontrolle ein neues Instrument zur Verfügung, um die biologische Identität eines Lebensmittels zu verifizieren und die Verbraucher effektiv vor *Food Fraud* zu schützen. Somit kann die Authentizität und Rückverfolgbarkeit über alle Produktions-, Verarbeitungs- und Vertriebsstufen gewährleistet werden.

## 8.Literaturverzeichnis

- Aaij, C.; Borst, P. (1972): The gel electrophoresis of DNA. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 269 (2), S. 192–200. DOI: 10.1016/0005-2787(72)90426-1.
- Aas, G. (2008): Die Walnuss (*Juglans regia*): Systematik, Verbreitung und Morphologie. In: *Bayrische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft* 60, S. 5–10.
- Adkins, S.; Burmeister, M. (1996): Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands. Applications for preparative gels and educational demonstrations. In: *Analytical biochemistry* 240 (1), S. 17–23. DOI: 10.1006/abio.1996.0325.
- Agilent Technologies (2018): Applications for DNA, RNA, and Protein analysis. Application Compendium (5991-8974EN).
- Ahmed, N.; Mir, J. I.; Mir, R. R.; Rather, N. A.; Rashid, R.; Wani, S. H. et al. (2012): SSR and RAPD analysis of genetic diversity in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Jammu and Kashmir, India. In: *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology* 18 (2), S. 149–160. DOI: 10.1007/s12298-012-0104-z.
- Aigner, A. (2012): Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum akademischer Verlag.
- Akkak, A.; Boccacci, P.; Botta, R. (2008): An efficient DANN-extraction protocol for nut seeds. In: *Journal of Food Quality* 31 (4), S. 549–557. DOI: 10.1111/j.1745-4557.2008.00219.x.
- Alaeddini, R. (2012): Forensic implications of PCR inhibition--A review. In: *Forensic science international. Genetics* 6 (3), S. 297–305. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.08.006.
- Alexander, P. J.; Rajanikanth, G.; Bacon, C. D.; Bailey, C. D. (2007): Recovery of plant DNA using a reciprocating saw and silica-based columns. In: *Mol Ecol Notes* 7 (1), S. 5–9. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01549.x.
- Allemand, J. F.; Bensimon, D.; Jullien, L.; Bensimon, A.; Croquette, V. (1997): pH-dependent specific binding and combing of DNA. In: *Biophysical Journal* 73 (4), S. 2064–2070. DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78236-5.
- Allen, G. C.; Flores-Vergara, M. A.; Krasynanski, S.; Kumar, S.; Thompson, W. F. (2006): A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. In: *Nature protocols* 1 (5), S. 2320–2325. DOI: 10.1038/nprot.2006.384.
- Altura, B. M.; Carella, A.; Altura, B. T. (1980): Adverse effects of tris, hepes and mops buffers on contractile responses of arterial and venous smooth muscle induced by prostaglandins. In: *Prostaglandins and Medicine* 5 (2), S. 123–130. DOI: 10.1016/0161-4630(80)90099-3.
- Anderson, N. G. (1955): Studies on isolated cell components. In: *Experimental Cell Research* 9 (3), S. 446–459. DOI: 10.1016/0014-4827(55)90075-6.
- Anderung, C.; Persson, P.; Bouwman, A.; Elburg, R.; Götherström, A. (2008): Fishing for ancient DNA. In: *Forensic science international. Genetics* 2 (2), S. 104–107. DOI: 10.1016/j.fsigen.2007.09.004.
- AOC: Noix de Grenoble. Hg. v. Ville S.A. Online verfügbar unter <https://www.valnoix.fr/nusse-aus-der-grenoble/aoc-noix-de-grenoble.html>, zuletzt geprüft am 13.08.2019.
- Aradhya, M.; Woeste, K.; Velasco, D. (2010): Genetic diversity, structure, and differentiation in cultivated walnut (*Juglans regia* L.). In: *Acta Horticulturae* (861), S. 127–132. DOI: 10.17660/ActaHortic.2010.861.16.
- Aradhya, M. K.; Potter, D.; Simon, C. J. (2005): Origin, evolution, and biogeography of *Juglans*. A phylogenetic perspective. In: *Acta Horticulturae* (705), S. 85–94. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.705.8.
- Arrowood, M. J.; Sterling, C. R. (1987): Isolation of *Cryptosporidium* Oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. In: *The Journal of Parasitology* 73 (2), S. 314. DOI: 10.2307/3282084.
- Asakura, T.; Adachi, K.; Schwartz, E. (1978): Stabilizing effect of various organic solvents on protein. In: *The Journal of Biological Chemistry* 253 (18), S. 6423–6425.
- Asgar, K. (1956): Chemical analysis of human teeth. In: *Journal of dental research* 35 (5), S. 742–748. DOI: 10.1177/00220345560350051201.

- Asif, M. J.; Cannon, Charles H. (2005): DNA extraction from processed wood. A case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). In: *Plant Molecular Biology Reporter* 23 (2), S. 185–192. DOI: 10.1007/BF02772709.
- Atienzar, F.; Evenden, A.; Jha, A.; Savva, D.; Depledge, M. (2000): Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. In: *BioTechniques* 28 (1), S. 52–54. DOI: 10.2144/00281bm09.
- Atienzar, F. A.; Jha, A. N. (2006): The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies. A critical review. In: *Mutation research* 613 (2-3), S. 76–102. DOI: 10.1016/j.mrrev.2006.06.001.
- Bamberger, C.; Rossmeyer, A.; Lechner, K.; Wu, L.; Waldmann, E.; Stark, R. G. (2017): A walnut-enriched diet reduces lipids in healthy Caucasian subjects, independent of recommended macronutrient replacement and time point of consumption. A prospective, randomized, controlled trial. In: *Nutrients* 9 (10). DOI: 10.3390/nu9101097.
- Bartels, P. G.; Hyde, A. (1970): Buoyant density studies of chloroplast and nuclear deoxyribonucleic acid from control and 3-amino-1,2,4-triazole-treated wheat seedlings, *Triticum vulgare*. In: *Plant physiology* 46 (6), S. 825–830. DOI: 10.1104/pp.46.6.825.
- Battaglia, C.; Salani, G.; Consolandi, C.; Bernardi, L. R.; Bellis, G. de (2000): Analysis of DNA microarrays by non-destructive fluorescent staining using SYBR green II. In: *BioTechniques* 29 (1), S. 78–81. DOI: 10.2144/00291st01.
- Baumgartner, B. J.; Rapp, J. C.; Mullet, J. E. (1989): Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development. In: *Plant physiology* 89 (3), S. 1011–1018. DOI: 10.1104/pp.89.3.1011.
- Bendich, A. J. (2004): Circular chloroplast chromosomes. The grand illusion. In: *The Plant cell* 16 (7), S. 1661–1666. DOI: 10.1105/tpc.160771.
- Bennetzen, J. L.; Ma, J.; Devos, K. M. (2005): Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. In: *Annals of botany* 95 (1), S. 127–132. DOI: 10.1093/aob/mci008.
- Berg Rasmussen, H. (2012): Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis - valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In: *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, S. 315–333.
- Bernard, A.; Barreneche, T.; Lheureux, F.; Dirlewanger, E. (2018a): Analysis of genetic diversity and structure in a worldwide walnut (*Juglans regia* L.) germplasm using SSR markers. In: *PloS one* 13 (11), e0208021. DOI: 10.1371/journal.pone.0208021.
- Bernard, A.; Lheureux, F.; Dirlewanger, E. (2018b): Walnut. Past and future of genetic improvement. In: *Tree Genetics & Genomes* 14 (1), S. 35. DOI: 10.1007/s11295-017-1214-0.
- Biozym (2020): Biozym Taq DNA Polymerase. Online verfügbar unter [https://www.biozym.com/DesktopModules/WebShop/downloads/331610\\_BiozymTaqDNAPolymerase04-15.pdf](https://www.biozym.com/DesktopModules/WebShop/downloads/331610_BiozymTaqDNAPolymerase04-15.pdf), zuletzt aktualisiert am 11.09.2020.
- Birky, C. W. (2008): Uniparental inheritance of organelle genes. In: *Current biology : CB* 18 (16), R692-5. DOI: 10.1016/j.cub.2008.06.049.
- Blessington, T.; Mitcham, E. J.; Harris, L. J. (2014): Growth and survival of *Enterobacteriaceae* and inoculated *Salmonella* on walnut hulls and maturing walnut fruit. In: *Journal of food protection* 77 (9), S. 1462–1470. DOI: 10.4315/O362-028X.JFP-14-075.
- Blin, N.; Stafford, D. W. (1976): A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. In: *Nucleic acids research* 3 (9), S. 2303–2308. DOI: 10.1093/nar/3.9.2303.
- Borrone, J. W.; Kuhn, D. N.; Schnell, R. J. (2004): Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. In: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 109 (3), S. 495–507. DOI: 10.1007/s00122-004-1662-4.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davis, R. W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. In: *American Journal of Human Genetics* 23 (3), S. 314–331, zuletzt geprüft am 09.10.2019.
- Boyle, B.; Dallaire, N.; MacKay, J. (2009): Evaluation of the impact of single nucleotide polymorphisms and primer mismatches on quantitative PCR. In: *BMC Biotechnology* 9, S. 75. DOI: 10.1186/1472-6750-9-75.

- Brägger, R. (1992): Kulturgut Nussbaum. In: *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau* 7, S. 172–181, zuletzt geprüft am 15.08.2019.
- Brakke, M. K. (1951): Density gradient centrifugation: A new separation technique. In: *Journal of the American Chemical Society* (73), S. 1847–1848.
- Britten, R. J.; Roberts, R. B. (1960): High-resolution density gradient sedimentation analysis. In: *Science* 131 (3392), S. 32–33. DOI: 10.1126/science.131.3392.32.
- Brownie, J.; Shawcross, S.; Theaker, J.; Whitcombe, D.; Ferrie, R.; Newton, C.; Little, S. (1997): The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. In: *Nucleic acids research* 25 (16), S. 3235–3241. DOI: 10.1093/nar/25.16.3235.
- Brüning, P.; Haase, I.; Matissek, R.; Fischer, M. (2011): Marzipan. Polymerase chain reaction-driven methods for authenticity control. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 59 (22), S. 11910–11917. DOI: 10.1021/jf202484a.
- Buermans, H. P. J.; den Dunnen, J. T. (2014): Next generation sequencing technology. Advances and applications. In: *Biochimica et biophysica acta* 1842 (10), S. 1932–1941. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015.
- Bunster, L.; Fokkema, N. J.; Schippers, B. (1989): Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. In: *Applied and Environmental Microbiology* 55 (6), S. 1340–1345.
- Caetano-Anollés, G.; Bassam, B. J.; Gresshoff, P. M. (1992): Primer-Template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. In: *Molecular & general genetics : MGG* 235 (2-3), S. 157–165. DOI: 10.1007/bf00279356.
- Cambria, D.; Pierangeli, D. (2012): Application of a life cycle assessment to walnut tree (*Juglans regia* L.) high quality wood production. A case study in southern Italy. In: *Journal of Cleaner Production* 23 (1), S. 37–46. DOI: 10.1016/j.jclepro.2011.10.031.
- Cao, H.; Shockey, J. M. (2012): Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 60 (50), S. 12296–12303. DOI: 10.1021/jf304690e.
- Chambers, S. T.; Peddie, B.; Pithie, A. (2006): Ethanol disinfection of plastic-adherent micro-organisms. In: *Journal of Hospital Infection* 63 (2), S. 193–196. DOI: 10.1016/j.jhin.2006.01.009.
- Chaudhary, A.; Chaudhary, S.; Ghosh, A.; Vuduthala, S.; Singh, K. M.; Chikara, S. K. (2015): A Rapid, low cost, and efficient method for isolation of high quality mitochondrial DNA from *Oryza sativa*. In: *Journal of Crop Science and Biotechnology* 18 (3), S. 155–160. DOI: 10.1007/s12892-014-0095-0.
- Chen, F.; Chen, J.; Wang, Z.; Zhang, J.; Li, X.; Lin, M. (2019): Genomics. Cracking the mysteries of walnuts. In: *Journal of Genetics* 98 (2), S. 418. DOI: 10.1007/s12041-019-1084-3.
- Chen, H.; Rangasamy, M.; Tan, S. Y.; Wang, H.; Siegfried, B. D. (2010): Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. In: *PLoS one* 5 (8), e11963. DOI: 10.1371/journal.pone.0011963.
- Chen, L.; Ma, Q.; Chen, Y.; Wang, B.; Pei, D. (2014): Identification of major walnut cultivars grown in China based on nut phenotypes and SSR markers. In: *Scientia Horticulturae* 168, S. 240–248. DOI: 10.1016/j.scienta.2014.02.004.
- Chen, Q.; Lu, P.; Jones, A. V.; Cross, N. C. P.; Silver, R. T.; Wang, Y. L. (2007): Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 9 (2), S. 272–276. DOI: 10.2353/jmol dx.2007.060133.
- Chiapparino, E.; Lee, D.; Donini, P. (2004): Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. In: *Genome* 47 (2), S. 414–420. DOI: 10.1139/g03-130.
- Chowdhury, E. H.; Sasagawa, T.; Nagaoka, M.; Kundu, A. K.; Akaike, T. (2003): Transfecting mammalian cells by DNA/calcium phosphate precipitates: Effect of temperature and pH on precipitation. In: *Analytical biochemistry* 314 (2), S. 316–318. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00648-6.
- Chuvilin, A. N.; Serebryakova, M. V.; Smirnov, I. P.; Pozmogova, G. E. (2009): Byproduct with altered fluorescent properties is formed during standard deprotection step of hexachlorofluorescein labeled oligonucleotides. In: *Bioconjugate chemistry* 20 (8), S. 1441–1443. DOI: 10.1021/bc900076e.
- Collins, F. S.; Morgan, M.; Patrinos, A. (2003): The Human Genome Project. Lessons from large-scale biology. In: *Science* 300 (5617), S. 286–290. DOI: 10.1126/science.1084564.

- Crisafuli, F. A. P.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. (2015): Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. In: *European biophysics journal : EBJ* 44 (1-2), S. 1–7. DOI: 10.1007/s00249-014-0995-4.
- Cronn, R.; Knaus, B. J.; Liston, A.; Maughan, P. J.; Parks, M.; Syring, J. V.; Udall, J. (2012): Targeted enrichment strategies for next-generation plant biology. In: *American Journal of Botany* 99 (2), S. 291–311. DOI: 10.3732/ajb.1100356.
- Dar, A. A.; Choudhury, A. R.; Kancharla, P. K.; Arumugam, N. (2017): The FAD2 gene in plants. Occurrence, regulation, and role. In: *Frontiers in Plant Science*. 8, S. 1336. DOI: 10.3389/fpls.2017.01789.
- Das, S.; Vikalo, . (2012): OnlineCall. Fast online parameter estimation and base calling for illumina's next-generation sequencing. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (13), S. 1677–1683. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts256.
- Das, S.; Mohapatra, S. C.; Hsu, J. T. (1999): Studies on primer-dimer formation in polymerase chain reaction (PCR). In: *Biotechnology Techniques* 13 (10), S. 643–646. DOI: 10.1023/A:1008924615839.
- Davin-Regli, A.; Abed, Y.; Charrel, R.N; Bollet, C.; Micco, P. de (1995): Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. In: *Research in Microbiology* 146 (7), S. 561–568. DOI: 10.1016/0923-2508(96)80562-6.
- Desai, A. N.; Jere, A. (2012): Next-generation sequencing. Ready for the clinics? In: *Clinical genetics* 81 (6), S. 503–510. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x.
- Detwiler, M. M.; Hamp, T. J.; Kazim, A. L. (2004): DNA sequencing using the liquid polymer POP-7 on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. In: *BioTechniques* 36 (6), S. 932–933. DOI: 10.2144/04366BM01.
- Deuel, von H.; Neukom, H. (1949): Über die Reaktion von Borsäure und Borax mit Polysacchariden und anderen hochmolekularen Polyoxy-Verbindungen. In: *Die Makromolekulare Chemie* 3 (1), S. 13–30. DOI: 10.1002/macp.1949.020030102.
- Devos, K. M.; Gale, M. D. (1992): The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. In: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 84 (5-6), S. 567–572. DOI: 10.1007/BF00224153.
- Ding, W. K.; Shah, N. P. (2009): Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein. In: *Journal of food science* 74 (6), M231-6. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01195.x.
- Dixon, R.A. (2001): Natural products and plant disease resistance. In: *Nature* 411 (6839), S. 843–847. DOI: 10.1038/35081178.
- Dong, W.; Liu, J.; Yu, J.; Wang, L.; Zhou, S. (2012): Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. In: *PloS one* 7 (4), e35071. DOI: 10.1371/journal.pone.0035071.
- Dong, W.; Xu, C.; Li, W.; Xie, X.; Lu, Y.; Liu, Y. et al. (2017): Phylogenetic resolution in *Juglans* based on complete chloroplast genomes and nuclear DNA sequences. In: *Frontiers in plant science* 8, S. 1148. DOI: 10.3389/fpls.2017.01148.
- Downs, T. R.; Wilfinger, W. W. (1983): Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. In: *Analytical biochemistry* 131 (2), S. 538–547. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90212-9.
- Doyle, J. (1991): DNA protocols for plants. In: Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. (eds) *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology). Berlin, Heidelberg: Springer (57).
- Drouin, G.; Daoud, H.; Xia, J. (2008): Relative rates of synonymous substitutions in the mitochondrial, chloroplast and nuclear genomes of seed plants. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 49 (3), S. 827–831. DOI: 10.1016/j.ympev.2008.09.009.
- Duckhouse, H.; Mason, T. J.; Phull, S. S.; Lorimer, J. P. (2004): The effect of sonication on microbial disinfection using hypochlorite. In: *Ultrasonics sonochemistry* 11 (3-4), S. 173–176. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2004.01.031.
- Dunkley, P. R.; Jarvie, P. E.; Robinson, P. J. (2008): A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. In: *Nature protocols* 3 (11), S. 1718–1728. DOI: 10.1038/nprot.2008.171.
- Duve, Chr. de; Berthet, J. (1954): The Use of differential centrifugation in the study of tissue enzymes. In: *International Review of Cytology* 3, S. 225–275. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)60440-4.

- Ebeling, W.; Hennrich, N.; Klockow, M.; Metz, H.; Orth, H. D.; Lang, H. (1974): Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. In: *European journal of biochemistry* 47 (1), S. 91–97. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x.
- Ebrahimi, A.; Mathur, S.; Lawson, S. S.; LaBonte, N. R.; Lorch, A.; Coggeshall, M. V.; Woeste, K. E. (2019): Microsatellite borders and micro-sequence conservation in *Juglans*. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 3748. DOI: 10.1038/s41598-019-39793-z.
- Ebrahimi, A.; Zarei, A.; McKenna, J. R.; Bujdoso, G.; Woeste, K. E. (2017): Genetic diversity of Persian walnut (*Juglans regia*) in the cold-temperate zone of the United States and Europe. In: *Scientia Horticulturae* 220, S. 36–41. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.03.030.
- Eichenberger, W. (1971): Trennung biologischer Partikel durch Zentrifugation im Dichtegradienten. In: *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich* 116, S. 319–332, zuletzt geprüft am 12.09.2019.
- Emes, M. J.; England, S. (1986): Purification of plastids from higher-plant roots. In: *Planta* 168 (2), S. 161–166. DOI: 10.1007/BF00402959.
- Eom, S. H.; Wang, J.; Steitz, T. A. (1996): Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. In: *Nature* 382 (6588), S. 278–281.
- Erturk, U.; Dalkilic, Z. (2011): Determination of genetic relationship among some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes and their early-bearing progenies using RAPD markers. In: *Romanian Biotechnological Letters* 16 (1), S. 5944–5952, zuletzt geprüft am 02.10.2019.
- Escobar, M. A.; Shilling, A.; Higgins, P.; Uratsu, S. L.; Dandekar, A. M. (2008): Characterization of polyphenol oxidase from walnut. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science. Sci.* 133 (6), S. 852–858. DOI: 10.21273/JASHS.133.6.852.
- Esser, D. S.; Leveau, J. H. J.; Meyer, K. M.; Wiegand, K. (2015): Spatial scales of interactions among bacteria and between bacteria and the leaf surface. In: *FEMS microbiology ecology* 91 (3). DOI: 10.1093/femsec/fiu034.
- Fady, B.; Ducci, F.; Aleta, N.; Becquey, J.; Diaz Vazquez, R.; Fernandez Lopez, F. et al. (2003): Walnut demonstrates strong genetic variability for adaptive and wood quality traits in a network of juvenile field tests across Europe. In: *New Forests* 25 (3), S. 211–225. DOI: 10.1023/A:1022939609548.
- FAOSTAT (2018): Crops and livestock products. Online verfügbar unter <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP>, zuletzt geprüft am 24.04.2019.
- Felbinger, C.; Schelm, S.; Fischer, M. (2015): Food Fraud – Hindernisse und Lösungswege bei der Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln. In: *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 10 (S1), S. 25–30. DOI: 10.1007/s00003-015-0994-0.
- Fernández, E.; Figueiras, M.; Benito, C. (2002): The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. In: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 104 (5), S. 845–851. DOI: 10.1007/s00122-001-0848-2.
- Fjellstrom, R. G.; Parfitt, D. E.; McGranahan, G. H. (1994): Genetic relationships and characterization of Persian Walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). In: *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119 (4), S. 833–839. DOI: 10.21273/JASHS.119.4.833.
- Flamm, W. G.; Bond, H. E.; Burr, H. E. (1966): Density-Gradient centrifugation of DNA in a fixed-angle rotor. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 129 (2), S. 310–317. DOI: 10.1016/0005-2787(66)90373-X.
- Flavell, R. B. (1986): Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 312 (1154), S. 227–242. DOI: 10.1098/rstb.1986.0004.
- Fleischmann, A.; Heubl, G. (2009): Overcoming DNA extraction problems from carnivorous plants. In: *Anal. Jard. Bot. Madr.* 66 (2), S. 209–215. DOI: 10.3989/ajbm.2198.
- Follmann, H. (2001): Biochemie. Grundlagen und Experimente. Stuttgart: Teubner.
- Folmer, O. J.; Black, M.; Hoeah, W.; Vrijenhoek, R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. In: *Molecular marine biology and biotechnology* 3, 1994 (5), S. 294–299.

- Francesca, P. I.; Pamfil, D.; Raica, P.; Petricele, I. V.; Sisea, C.; Vas, E. et al. (2010): Assessment of the genetic variability among some *Juglans* cultivars from the Romanian National Collection at S.C.D. P. Vâlcea using RAPD markers. In: *Romanian Biotechnological Letters* 15 (2), S. 41–46.
- Fritsch, P.; Hanson, M. A.; Spore, C. D.; Pack, Phillip E.; Rieseberg, L. H. (1993): Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. In: *Plant Molecular Biology Reporter*. 11 (1), S. 10–20. DOI: 10.1007/BF02670555.
- Gallarate, M.; Carlotti, M. E.; Trotta, M.; Bovo, S. (1999): On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. In: *International Journal of Pharmaceutics* 188 (2), S. 233–241. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00228-8.
- Gandev, S. (2007): Budding and grafting of the walnut (*Juglans regia* L.) and their effectiveness in Bulgaria (Review). In: *683 Bulgarian Journal of Agricultural Science* 13, S. 683–689, zuletzt geprüft am 15.08.2019.
- Gassert, F. (2005): Untersuchung der genetischen Diversität ausgewählter Populationen der Mauereidechse (*Podarcis muralis*, Laurenti 1768) mit Hilfe der Mikrosatelliten-DNA-Analyse. Dissertation. Universität Trier, Trier. Geographie/Geowissenschaften.
- Gawel, N. J.; Jarret, R. L. (1991): A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa and Ipomoea*. In: *Plant Molecular Biology Reporter*. 9 (3), S. 262–266. DOI: 10.1007/BF02672076.
- Gerstein, M. B.; Bruce, C.; Rozowsky, J. S.; Zheng, D.; Du, J.; Korbil, J. O. et al. (2007): What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. In: *Genome Research* 17 (6), S. 669–681. DOI: 10.1101/gr.6339607.
- Ghadia, B.; Singh, A. K.; Khatnani, T.; Hirpara, Ma.; Patel, Sh.i; Joshi, P. (2016): An improved method of DNA purification from secondary metabolites rich medicinal plants using certain chaotropic agents. In: *Acta Physiologiae Plantarum* 38 (8), S. 25. DOI: 10.1007/s11738-016-2223-6.
- Giraldo, G.; Talens, P.; Fito, P.; Chiralt, A. (2003): Influence of sucrose solution concentration on kinetics and yield during osmotic dehydration of mango. In: *Journal of Food Engineering* 58 (1), S. 33–43. DOI: 10.1016/S0260-8774(02)00331-X.
- Golenberg, E. M.; Bickel, A.; Weihs, P. (1996): Effect of highly fragmented DNA on PCR. In: *Nucleic acids research* 24 (24), S. 5026–5033. DOI: 10.1093/nar/24.24.5026.
- Goodell, E. (1983): Walnuts for the Northeast. In: *Arnoldia* 44, 1983 (1), S. 2–19.
- Grada, A.; Weinbrecht, K. (2013): Next-generation sequencing. Methodology and application. In: *The Journal of investigative dermatology* 133 (8), e11. DOI: 10.1038/jid.2013.248.
- Graham, J. M. (2001): Purification of a crude mitochondrial fraction by density-gradient centrifugation. In: *Current protocols in cell biology* Chapter 3, 3.4.1-3.4.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb0304s04.
- Green, M. R.; Sambrook, J. (2016): Precipitation of DNA with ethanol. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2016 (12). DOI: 10.1101/pdb.prot093377.
- Guern, J.; Felle, H.; Mathieu, Y.; Kurkdjian, A. (1991): Regulation of intracellular pH in plant cells. In: *International Review of Cytology* 127, S. 111–173. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)60693-2.
- Guha, P. (2017): Betel leaf. The neglected green gold of India. In: *Journal of Human Ecology* 19 (2), S. 87–93. DOI: 10.1080/09709274.2006.11905861.
- Guha, P. Kr.; Guha, R. (1992): Principle of extraction of solute by solvent. In: *Journal of Chemical Education* 69 (1), S. 73. DOI: 10.1021/ed069p73.
- Gunson, R.; Gillespie, G.; F Carman, W. (2003): Optimisation of PCR reactions using primer chessboarding. In: *Journal of Clinical Virology* 26 (3), S. 369–373. DOI: 10.1016/S1386-6532(03)00006-4.
- Haas, C. J.; Zink, A.; Molnár, E.; Szeimies, U.; Reischl, U.; Marcsik, A. (2000): Molecular evidence for different stages of tuberculosis in ancient bone samples from Hungary. In: *American Journal of Physical Anthropology*. 113 (3), S. 293–304. DOI: 10.1002/1096-8644(200011)113:3<293::AID-AJPA2>3.0.CO;2-6.
- Hamajima, N.; Saito, T.; Matsuo, K.; Tajima, K. (2002): Competitive amplification and unspecific amplification in polymerase chain reaction with confronting two-pair primers. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 4 (2), S. 103–107. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60688-5.
- Hänni, C.; Brousseau, T.; Laudet, V.; Stehelin, D. (1995): Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. In: *Nucleic acids research* 23 (5), S. 881–882. DOI: 10.1093/nar/23.5.881.

- Hardman, W. E.; Ion, G. (2008): Suppression of implanted MDA-MB 231 human breast cancer growth in nude mice by dietary walnut. In: *Nutrition and cancer* 60 (5), S. 666–674. DOI: 10.1080/01635580802065302.
- Harismendy, O.; Frazer, K. (2009): Method for improving sequence coverage uniformity of targeted genomic intervals amplified by LR-PCR using Illumina GA sequencing-by-synthesis technology. In: *BioTechniques* 46 (3), S. 229–231. DOI: 10.2144/000113082.
- Harry, D. E.; Kimmerer, T. W. (1991): Molecular genetics and physiology of alcohol dehydrogenase in woody plants. In: *Forest Ecology and Management* 43 (3-4), S. 251–272. DOI: 10.1016/0378-1127(91)90130-N.
- Hashimoto, H. (2003): Plastid division. Its origins and evolution. In: *International Review of Cytology* 222, S. 63–98. DOI: 10.1016/S0074-7696(02)22012-4.
- He, Q.; Viljanen, M. K.; Mertsola, J. (1994): Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. In: *Molecular and cellular probes* 8 (2), S. 155–159. DOI: 10.1006/mcpr.1994.1021.
- Heber, U.; Heldt, H. W. (1981): The chloroplast envelope: Structure, function, and role in leaf metabolism. In: *Plant physiology* 32, S. 139–168.
- Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L. (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Henikoff, S.; Comai, L. (2003): Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. In: *Annual Review of Plant Biology*. 54 (1), S. 375–401. DOI: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.135009.
- Herrmann, L.; Felbinger, C.; Haase, I.; Rudolph, B.; Biermann, B.; Fischer, M. (2015): Food Fingerprinting. Characterization of the Ecuadorean Type CCN-51 of *Theobroma cacao* L. Using microsatellite markers. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 63 (18), S. 4539–4544. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01462.
- Herrmann, L.; Haase, I.; Blauhut, M.; Barz, Na.; Fischer, M. (2014): DNA-based differentiation of the Ecuadorian cocoa types CCN-51 and Arriba based on sequence differences in the chloroplast genome. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 62 (50), S. 12118–12127. DOI: 10.1021/jf504258w.
- Hildebrand, F.; Meyer, A.; Eyre-Walker, A. (2010): Evidence of selection upon genomic GC-content in bacteria. In: *PLoS genetics* 6 (9), e1001107. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001107.
- Hillis, D. M.; Dixon, M. T. (1991): Ribosomal DNA. Molecular evolution and phylogenetic inference. In: *The Quarterly Review of Biology* 66 (4), S. 411–453. DOI: 10.1086/417338.
- Ho, C. M.; Ooi, L. C. L.; Tan, S. G.; Ho, C. L.; Singh, R. (2015): A chloroplast DNA (cpDNA) extraction protocol for diversity analysis of oil palm (*Elaeis spp.*). In: *Journal of Oil Palm Research* 27 (4), S. 306–314, zuletzt geprüft am 23.04.2019.
- Holler, E. (1978): Proteinbiosynthese. Die codonspezifische Aktivierung der Aminosäuren. In: *Angewandte Chemie International Edition*. 90 (9), S. 682–690. DOI: 10.1002/ange.19780900907.
- Hollingsworth, P. M.; Forrest, L. L.; Spouge, J. L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; van der Bank, M. et al. (2009): A DNA barcode for land plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (31), S. 12794–12797. DOI: 10.1073/pnas.0905845106.
- Holt, R. A.; Jones, S. J. M. (2008): The new paradigm of flow cell sequencing. In: *Genome Research* 18 (6), S. 839–846. DOI: 10.1101/gr.073262.107.
- Honardoost, M. Amin; Tabatabaeian, H.; Akbari, M.; Salehi, M. (2014): Investigation of sensitivity, specificity, and accuracy of Tetra primer ARMS PCR method in comparison with conventional ARMS PCR, based on sequencing technique outcomes in IVS-II-I genotyping of beta thalassemia patients. In: *Gene* 549 (1), S. 1–6. DOI: 10.1016/j.gene.2014.05.071.
- Hu, Y.; Woeste, K. E.; Zhao, P. (2016): Completion of the chloroplast genomes of five Chinese *Juglans* and their contribution to chloroplast phylogeny. In: *Frontiers in plant science* 7, S. 1955. DOI: 10.3389/fpls.2016.01955.
- Huang, Q.; Baum, L.; Fu, W. L. (2020): Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. In: *Clinical Laboratory* 56, S. 149–152, zuletzt geprüft am 08.10.2019.
- Illumina (ohne Datum): Coverage depth recommendations. Online verfügbar unter <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/coverage.html>, zuletzt geprüft am 28.11.2019.

- Illumina (2017): Illumina DNA Prep. Reference Guide (1000000025416v09). Online verfügbar unter [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/illumina\\_prep/illumina-dna-prep-reference-guide-1000000025416-09.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/illumina-dna-prep-reference-guide-1000000025416-09.pdf).
- Illumina (2019): ClusterOptimization (1000000071511v00), zuletzt geprüft am 08.08.2020.
- Ipek, M.; Arıkan, Ş.; Pırlak, L.; Eşitken, A. (2019): Phenological, morphological and molecular characterization of some promising walnut (*Juglans regia* L) genotypes in Konya. In: *Erwerbs-Obstbau* 61 (2), S. 149–156. DOI: 10.1007/s10341-018-0411-9.
- Jacob, H. (2008): Walnussforschung – Aufgaben und Ziele. In: *Mitteilungen aus der Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft Rheinland-Pfalz* (66), S. 39–50.
- Jagendorf, A. T. (1955): Purification of Chloroplasts by a Density Technique. In: *Plant physiology* 30 (2), S. 138–143. DOI: 10.1104/pp.30.2.138.
- Jahanban-Esfahlan, A.; Ostadrahimi, A.; Tabibiazar, M.; Amarowicz, R. (2019): A comprehensive review on the chemical constituents and functional uses of walnut (*Juglans* spp.) Husk. In: *International journal of molecular sciences* 20 (16). DOI: 10.3390/ijms20163920.
- Jain, S. K.; Neekhara, B.; Pandey, D.; Jain, K. (2010): RAPD marker system in insect study: A review. In: *Indian Journal of Biotechnology* 9, S. 13–17, zuletzt geprüft am 09.10.2019.
- Jansen, R. K.; Raubeson, L. A.; Boore, J. L.; dePamphilis, C. W.; Chumley, T. W.; Haberle, R. C. et al. (2005): Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences 395, S. 348–384. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)95020-9.
- Jarvis, J.; Melin, J.; Göransson, J.; Stenberg, J.; Fredriksson, S.; Gonzalez-Rey, C. (2006): Digital quantification using amplified single-molecule detection. In: *Nature methods* 3 (9), S. 725–727. DOI: 10.1038/nmeth916.
- Jiao, L.; Yin, Y.; Xiao, F.; Sun, Q.; Song, K.; Jiang, X. (2012): Comparative analysis of two DNA extraction protocols from fresh and dried wood of *Cunninghamia lanceolata* (Taxodiaceae). In: *IAWA Journal* 33 (4), S. 441–456. DOI: 10.1163/22941932-90000106.
- Jobes, D. V.; Hurley, D. L.; Thien, L. B. (1995): Plant DNA isolation: A method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. In: *Taxon* 44 (3), S. 379–386. DOI: 10.2307/1223408.
- Johansson, B. G. (2009): Agarose gel electrophoresis. In: *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 29 (sup124), S. 7–19. DOI: 10.3109/00365517209102747.
- Kahlau, S.; Aspinall, S.; Gray, J. C.; Bock, R. (2006): Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. In: *Journal of molecular evolution* 63 (2), S. 194–207. DOI: 10.1007/s00239-005-0254-5.
- Kane, N.; Saemundur, D.; Dempewolf, H.; Yang, J. Y.; Zhang, D.; Engels, J. M. M.; Cronk, Q. (2012): Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA. In: *American Journal of Botany* 99 (2), S. 320–329. DOI: 10.3732/ajb.
- Kasajima, I. (2018): Successful tips of DNA extraction and PCR of plants for beginners. In: *Trends in Research* 1 (3). DOI: 10.15761/TR.1000115.
- Kassim, T. A.; Barceló, D. (2009): Contaminated sediments, S. 97–160. DOI: 10.1007/978-3-540-88014-1.
- Kefayati, S.; Ikhsan, A. S.; Sutyemez, M.; Paizila, A.; Topçu, H.; Bükücü, Ş. B.; Kafkas, Sa. (2019): First simple sequence repeat-based genetic linkage map reveals a major QTL for leafing time in walnut (*Juglans regia* L.). In: *Tree Genetics & Genomes* 15 (1), S. 27. DOI: 10.1007/s11295-019-1318-9.
- Khan, A. L.; Asaf, S.; Lee, I.-J.; Al-Harrasi, A.; Al-Rawahi, A. (2018): First chloroplast genomics study of *Phoenix dactylifera* (var. Naghal and Khanezi). A comparative analysis. In: *PloS one* 13 (7), e0200104. DOI: 10.1371/journal.pone.0200104.
- Khan, A.; Khan, I. A.; Heinze, B.; Azim, M. K. (2012): The chloroplast genome sequence of date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv. 'Aseel'). In: *Plant Molecular Biology Reporter* 30 (3), S. 666–678. DOI: 10.1007/s11105-011-0373-7.
- Khan, N. S.; Ahmad, A.; Hadi, S.M (2000): Antioxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. In: *Chemico-Biological Interactions* 125 (3), S. 177–189. DOI: 10.1016/S0009-2797(00)00143-5.

- Kim, C. S.; Lee, C. H.; Shin, J. S.; Chung, Y. S.; Hyung, N. I. (1997): A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. In: *Nucleic Acid Research* 25 (5), S. 1085–1086. DOI: 10.1093/nar/25.5.1085.
- Kindermann, W.; Keul, J.; Huber, G. (1977): Physical exercise after induced alkalosis (bicarbonate or tris-buffer). In: *European journal of applied physiology and occupational physiology* 37 (3), S. 197–204. DOI: 10.1007/BF00421775.
- Kircher, M.; Heyn, P.; Kelso, J. (2011): Addressing challenges in the production and analysis of illumina sequencing data. In: *BMC genomics* 12, S. 382. DOI: 10.1186/1471-2164-12-382.
- Klitschar, M.; Wiegand, P. (2003): Polymerase slippage in relation to the uniformity of tetrameric repeat stretches. In: *Forensic Science International* 135 (2), S. 163–166. DOI: 10.1016/S0379-0738(03)00201-9.
- Kotake, N.; Suzuki, K.; Asahi, S.; Kanda, Y. (2002): Experimental study on the grinding rate constant of solid materials in a ball mill. In: *Powder Technology* 122 (2-3), S. 101–108. DOI: 10.1016/S0032-5910(01)00405-3.
- Koyuncu, M. A.; Koyuncu, F.; Bakir, N. (2003): Selected drying conditions and storage period and quality of walnut selections. In: *J Food Processing Preservation* 27 (2), S. 87–99. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2003.tb00504.x.
- Kress, W. J.; Wurdack, K. J.; Zimmer, E. A.; Weigt, L. A.; Janzen, D. H. (2005): Use of DNA barcodes to identify flowering plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (23), S. 8369–8374. DOI: 10.1073/pnas.0503123102.
- Krueger, F.; Andrews, S. R.; Osborne, C. S. (2011): Large scale loss of data in low-diversity illumina sequencing libraries can be recovered by deferred cluster calling. In: *PloS one* 6 (1), e16607. DOI: 10.1371/journal.pone.0016607.
- Kubo, T.; Newton, K. J. (2008): Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. In: *Mitochondrion* 8 (1), S. 5–14. DOI: 10.1016/j.mito.2007.10.006.
- Küster, H. (2008): Die Verbreitungsgeschichte der Walnuss. In: *Bayrische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft* 60, S. 11–15.
- Lahiri, D. K.; Schnabel, B. (1993): DNA isolation by a rapid method from human blood samples. Effects of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. In: *Biochemical genetics* 31 (7-8), S. 321–328. DOI: 10.1007/BF02401826.
- Lander, E. S.; Botstein, D. (1986): Mapping complex genetic traits in humans: new methods using a complete RFLP linkage map. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, S. 49–62. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.007.
- Lang, E. G. E.; Mueller, S. J.; Hoernstein, S. N. W.; Porankiewicz-Asplund, J.; Vervliet-Scheebaum, M.; Reski, R. (2011): Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics. In: *Plant cell reports* 30 (2), S. 205–215. DOI: 10.1007/s00299-010-0935-4.
- Langley, C. H.; Crepeau, M.; Cardeno, C.; Corbett-Detig, R.; Stevens, K. (2011): Circumventing heterozygosity: sequencing the amplified genome of a single haploid *Drosophila melanogaster* embryo. In: *Genetics* 188 (2), S. 239–246. DOI: 10.1534/genetics.111.127530.
- Lemus, G. (2010): Innovative methods of walnut production in South America. In: *Acta Horticulturae*. (861), S. 191–198. DOI: 10.17660/ActaHortic.2010.861.25.
- Lengsfeld, C. S.; Anchordoquy, T. J. (2002): Shear-induced degradation of plasmid DNA. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 91 (7), S. 1581–1589. DOI: 10.1002/jps.10140.
- Li, Y.; Ren, B.; Ding, L.; Shen, Q.; Peng, S.; Guo, S. (2013): Does chloroplast size influence photosynthetic nitrogen use efficiency? In: *PloS one* 8 (4), e62036. DOI: 10.1371/journal.pone.0062036.
- Li, Y.-C.; Korol, A. B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. (2002): Microsatellites. Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. In: *Molecular ecology* 11 (12), S. 2453–2465. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x.
- Lieberei, R.; Reisdorff, C. (2012): *Nutzpflanzen*. 8. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Lilly, J. W.; Havey, M. J.; Jackson, S. A.; Jiang, J. (2001): Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. In: *The Plant cell* 13 (2), S. 245–254. DOI: 10.1105/tpc.13.2.245.
- Lin, C.-C.; Tang, P.-C.; Chiang, H.-I. (2019): Development of RAPD-PCR assay for identifying Holstein, Angus, and Taiwan Yellow Cattle for meat adulteration detection. In: *Food science and biotechnology* 28 (6), S. 1769–1777. DOI: 10.1007/s10068-019-00607-7.

- Lin, Y.; Jayasena, S. D. (1997): Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer. In: *Journal of Molecular Biology* 271 (1), S. 100–111. DOI: 10.1006/jmmbi.1997.1165.
- Lo, Y. M. (1998): The amplification refractory mutation system. In: *Methods in molecular medicine* 16, S. 61–69. DOI: 10.1385/0-89603-499-2:61.
- Lockley, A.K; Bardsley, R.G (2000): DNA-based methods for food authentication. In: *Trends in Food Science & Technology* 11 (2), S. 67–77. DOI: 10.1016/S0924-2244(00)00049-2.
- Logan, D. C. (2010): The dynamic plant chondriome. In: *Seminars in cell & developmental biology* 21 (6), S. 550–557. DOI: 10.1016/j.semcdb.2009.12.010.
- Lorenz, T. C. (2012): Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (63), e3998. DOI: 10.3791/3998.
- Lutz, K. A.; Wang, W.; Zdepski, A.; Michael, T. P. (2011): Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. In: *BMC Biotechnology* 11 (1), S. 1–9. DOI: 10.1186/1472-6750-11-54.
- Lynch, M. (2006): Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. In: *Science* 311 (5768), S. 1727–1730. DOI: 10.1126/science.1118884.
- Mackenzie, S.; McIntosh, L. (1999): Higher plant mitochondria. In: *The Plant cell* 11 (4), S. 571–585. DOI: 10.1105/tpc.11.4.571.
- MacPherson, J. M.; Eckstein, P. E.; Scoles, G. J.; Gajadhar, A. A. (1993): Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. In: *Molecular and cellular probes* 7 (4), S. 293–299. DOI: 10.1006/mcpr.1993.1043.
- Magnuson, V. L.; Ally, D. S.; Nylund, S. J.; Karanjawala, Z. E.; Rayman, J. B.; Knapp, J. I. et al. (1996): Substrate nucleotide-determined non-Templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning. In: *BioTechniques* 21 (4), S. 700–709. DOI: 10.2144/96214rr03.
- Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J. (2012): Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. In: *Molecular immunology* 52 (3-4), S. 174–182. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.05.011.
- Manley, L. J.; Ma, D.; Levine, S. S. (2016): Monitoring error rates in illumina sequencing. In: *Journal of biomolecular techniques : JBT* 27 (4), S. 125–128. DOI: 10.7171/jbt.16-2704-002.
- MARCHERY-NAGEL (2014): Genomic DNA from tissue. Online verfügbar unter [https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/NucleoSpin%20Tissue%20Genomic%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20\(PT4010-1\)\\_Rev\\_13.pdf](https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/NucleoSpin%20Tissue%20Genomic%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20(PT4010-1)_Rev_13.pdf).
- Mariotti, R.; Cultera, N. G. M.; Díez, C. M.; Baldoni, L.; Rubini, A. (2010): Identification of new polymorphic regions and differentiation of cultivated olives (*Olea europaea* L.) through plastome sequence comparison. In: *BMC Plant Biology* 10 (1), S. 1–13. DOI: 10.1186/1471-2229-10-211.
- Marras, S. A. E. (2008): Interactive fluorophore and quencher pairs for labeling fluorescent nucleic acid hybridization probes. In: *Molecular biotechnology* 38 (3), S. 247–255. DOI: 10.1007/s12033-007-9012-9.
- Marshall, T. (1984): Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of serum after protein denaturation in the presence or absence of 2-mercaptoethanol. In: *Clinical Chemistry* 30 (3), S. 475–479. DOI: 10.1093/clinchem/30.3.475.
- Martin, W. F.; Garg, S.; Zimorski, V. (2015): Endosymbiotic theories for eukaryote origin. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370 (1678), S. 20140330. DOI: 10.1098/rstb.2014.0330.
- Martínez, M. L.; Labuckas, D. O.; Lamarque, A. L.; Maestri, D. M. (2010): Walnut (*Juglans regia* L.). Genetic resources, chemistry, by-products. In: *Journal of the science of food and agriculture* 90 (12), S. 1959–1967. DOI: 10.1002/jsfa.4059.
- Martínez-García, P. J.; Crepeau, M. W.; Puiu, D.; Gonzalez-Ibeas, D.; Whalen, J.; Stevens, K. A. (2016): The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 87 (5), S. 507–532. DOI: 10.1111/tpj.13207.
- Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M. (2018): Lebensmittelanalytik. Kapitel 5: Instrumentelle Techniken. 6. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer.

- Mbiguino, A.; Menezes, J. (1991): Purification of human respiratory syncytial virus. Superiority of sucrose gradient over percoll, renografin, and metrizamide gradients. In: *Journal of Virological Methods* 31 (2-3), S. 161–170. DOI: 10.1016/0166-0934(91)90154-R.
- McConkey, E. H. (1967): [83] The fractionation of RNA's by sucrose gradient centrifugation. In: *Methods in Enzymology* 12, S. 620–634. DOI: 10.1016/S0076-6879(67)12095-8.
- McGranahan, G.; Leslie, C. (1991): Walnuts (*Juglans*). In: *Acta Horticulturae* (290), S. 907–974. DOI: 10.17660/ActaHortic.1991.290.20.
- McLeish, J.; Sunderland, N. (1961): Measurements of deoxyribosenucleic acid (DNA) in higher plants by Feulgen photometry and chemical methods. In: *Experimental Cell Research* 24 (3), S. 527–540. DOI: 10.1016/0014-4827(61)90452-9.
- Medrano, R. F. V.; Oliveira, C. A. de (2014): Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. In: *Molecular biotechnology* 56 (7), S. 599–608. DOI: 10.1007/s12033-014-9734-4.
- Melzak, K. A.; Sherwood, C. S.; Turner, R. F.B.; Haynes, C. A. (1996): Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. In: *Journal of colloid and interface science* 181 (2), S. 635–644. DOI: 10.1006/jcis.1996.0421.
- Men, A. E.; Wilson, P.; Siemerling, K.; Forrest, S. (2008): Sanger DNA sequencing. In: *Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*, S. 1–11.
- Mexis, S. F.; Badeka, A. V.; Riganakos, K. A.; Karakostas, K. X.; Kontominas, M. G. (2009): Effect of packaging and storage conditions on quality of shelled walnuts. In: *Food Control* 20 (8), S. 743–751. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.09.022.
- Mittag, M. (2017): Plastiden besitzen eigene DNA: "Das Plastom". Online verfügbar unter [https://www.botanik.uni-jena.de/ibpmedia/Vorlesungen/Plastiden\\_Proteinimport-p-340.pdf](https://www.botanik.uni-jena.de/ibpmedia/Vorlesungen/Plastiden_Proteinimport-p-340.pdf), zuletzt geprüft am 24.04.2019.
- Möller, E. M.; Bahnweg, G.; Sandermann, H.; Geiger, H. H. (1992): A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. In: *Nucleic acids research* 20 (22), S. 6115–6116. DOI: 10.1093/nar/20.22.6115.
- Monnig, C. A.; Kennedy, R. T. (1994): Capillary electrophoresis. In: *Analytical chemistry* 66 (12), 280R-314R. DOI: 10.1021/ac00084a013.
- Moore, D.; Dowhan, D. (2002): Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. In: *Current protocols in molecular biology* Chapter 2, Unit 2.1A. DOI: 10.1002/0471142727.mb0201as59.
- Moorer, W. R. (2003): Antiviral activity of alcohol for surface disinfection. In: *International journal of dental hygiene* 1 (3), S. 138–142. DOI: 10.1034/j.1601-5037.2003.00032.x.
- Moreano, F.; Busch, U.; Engel, K.-H. (2005): Distortion of genetically modified organism quantification in processed foods: influence of particle size compositions and heat-induced DNA degradation. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 53 (26), S. 9971–9979. DOI: 10.1021/jf051894f.
- Moreira, B. G.; You, Y.; Behlke, M. A.; Owczarzy, R. (2005): Effects of fluorescent dyes, quenchers, and dangling ends on DNA duplex stability. In: *Biochemical and biophysical research communications* 327 (2), S. 473–484. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.12.035.
- Mori, E.; Liò, P.; Daly, S.; Damiani, G.; Perito, B.; Fani, R. (1999): Molecular nature of RAPD markers from *Haemophilus influenzae* Rd genome. In: *Research in Microbiology* 150 (2), S. 83–93. DOI: 10.1016/S0923-2508(99)80026-6.
- Morton, B. R.; Gaut, B. S.; Clegg, M. T. (1996): Evolution of alcohol dehydrogenase genes in the palm and grass families. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (21), S. 11735–11739. DOI: 10.1073/pnas.93.21.11735.
- Mourad, G. S. (1998): Chloroplast DNA isolation. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 82, S. 71–77. DOI: 10.1385/0-89603-391-0:71.
- Müller, H.-J.; Prange, D. R. (2016): PCR - Polymerase-Kettenreaktion. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Mullet, J. E. (1988): Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bioi. 1988. 39:475-502 In: *Plant physiology* 39, S. 475–502.
- Murray, M. G.; Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In: *Nucleic acids research* 8 (19), S. 4321–4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.

- Muthaiyah, B.; Essa, M. M.; Lee, M.; Chauhan, V.; Kaur, K.; Chauhan, A. (2014): Dietary supplementation of walnuts improves memory deficits and learning skills in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. In: *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 42 (4), S. 1397–1405. DOI: 10.3233/JAD-140675.
- NEB (ohne Datum a): Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg). FAQs & Troubleshooting. Online verfügbar unter [https://international.neb.com/products/t1030-monarch-pcr-dna-cleanup-kit-5-ug#FAQs%20%20Troubleshooting\\_Troubleshooting](https://international.neb.com/products/t1030-monarch-pcr-dna-cleanup-kit-5-ug#FAQs%20%20Troubleshooting_Troubleshooting), zuletzt geprüft am 12.06.2020.
- NEB (ohne Datum b): Produktinformationen OneTaq® HotStart DNA-Polymerase. Hg. v. New England BioLabs GmbH. Online verfügbar unter <https://www.neb.com/products/m0481-onetaq-hot-start-dna-polymerase#Product%20Information>, zuletzt geprüft am 10.09.2020.
- Nebel, B. R. (1939): Chromosome structure. In: *Bot. Rev* 5 (11), S. 563–626. DOI: 10.1007/BF02870166.
- Nett, M. (2014): Von Schüttelmaschinen, Monster-Staubsaugern, viel Staub und grünen Bäumen: ein Besuch auf der Walnussplantage – Reisebericht zur kalifornischen Walnussernte Teil 2. Online verfügbar unter <https://www.moeyskitchen.com/2014/11/kalifornische-walnussernte-teil2.html>, zuletzt geprüft am 05.09.2019.
- Nicese, F. P.; Hormaza, J. I.; McGranahan, G. H. (1998): Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. In: *Euphytica* 101 (2), S. 199–206. DOI: 10.1023/A:1018390120142.
- Oh, H.; Seo, B.; Lee, S.; Ahn, D.-H.; Jo, E.; Park, J.-K.; Min, G.-S. (2016): Two complete chloroplast genome sequences of *Cannabis sativa* varieties. In: *Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis* 27 (4), S. 2835–2837. DOI: 10.3109/19401736.2015.1053117.
- Okholm, A. H.; Nielsen, J. S.; Vinther, M.; Sørensen, Ra. S.; Schaffert, D.; Kjems, J. (2014): Quantification of cellular uptake of DNA nanostructures by qPCR. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 67 (2), S. 193–197. DOI: 10.1016/j.jymeth.2014.01.013.
- Opel, K. L.; Chung, D.; McCord, B. R. (2010): A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. In: *Journal of forensic sciences* 55 (1), S. 25–33. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x.
- Owens, V. N.; Albrecht, K. A.; Muck, R. E.; Duke, S. H. (1999): Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total nonstructural carbohydrates. In: *Crop Science*. 39 (6), S. 1873–1880. DOI: 10.2135/cropsci1999.3961873x.
- Palmer, J. D. (1986): Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. In: *Methods in Enzymology* 118, S. 167–186. DOI: 10.1016/0076-6879(86)18072-4.
- Papanayotou, I.; Sun, B.; Roth, A. F.; Davis, N. G. (2010): Protein aggregation induced during glass bead lysis of yeast. In: *Yeast (Chichester, England)* 27 (10), S. 801–816. DOI: 10.1002/yea.1771.
- Parida, S. K.; Dash, S.; Patel, S.; Mishra, B. K. (2006): Adsorption of organic molecules on silica surface. In: *Advances in colloid and interface science* 121 (1-3), S. 77–110. DOI: 10.1016/j.cis.2006.05.028.
- Patel, R. K.; Jain, M. (2012): NGS QC Toolkit. A toolkit for quality control of next generation sequencing data. In: *PLoS one* 7 (2), e30619. DOI: 10.1371/journal.pone.0030619.
- Peng, J.; Richards, D. E.; Hartley, N. M.; Murphy, G. P.; Devos, K. M.; Flintham, J. E. (1999): 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. In: *Nature* 400 (6741), S. 256–261. DOI: 10.1038/22307.
- Peng, S.; Yang, G.; Liu, C.; Yu, Z.; Zhai, M. (2017): The complete chloroplast genome of the *Juglans regia* (Juglandales, Juglandaceae). In: *Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis* 28 (3), S. 407–408. DOI: 10.3109/19401736.2015.1127367.
- Pereira, J. A.; Oliveira, I.; Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Bento, A.; Estevinho, L. (2008): Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46 (6), S. 2103–2111. DOI: 10.1016/j.fct.2008.02.002.
- Pérez, T.; Albornoz, J.; Domínguez, A. (1998): An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. In: *Molecular ecology* 7 (10), S. 1347–1357. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00484.x.
- Perrin, D. M.; Mazumder, A.; Sigman, D. S. (1996): Oxidative chemical nucleases. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 52, S. 123–151. DOI: 10.1016/S0079-6603(08)60966-6.

- Peterson, D. G.; Boehm, K. S.; Stack, S. M. (1997): Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), A plant containing high levels of polyphenolic compounds. In: *Plant Molecular Biology Reporter* 15 (2), S. 148–153. DOI: 10.1007/BF02812265.
- Petterson, E.; Lundeberg, J.; Ahmadian, A. (2009): Generations of sequencing technologies. In: *Genomics* 93 (2), S. 105–111. DOI: 10.1016/j.ygeno.2008.10.003.
- Potter, D.; Gao, F.; Aiello, G.; Leslie, C.; McGranahan, G. (2002): Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127 (1), S. 75–81. DOI: 10.21273/JASHS.127.1.75.
- Power, E.G.M. (1996): RAPD typing in microbiology—a technical review. In: *Journal of Hospital Infection* 34 (4), S. 247–265. DOI: 10.1016/S0195-6701(96)90106-1.
- Powikrowska, M.; Oetke, S.; Jensen, P. E.; Krupinska, K. (2014): Dynamic composition, shaping and organization of plastid nucleoids. In: *Frontiers in plant science* 5, S. 424. DOI: 10.3389/fpls.2014.00424.
- Powles, S. B.; Preston, C. (2006): Evolved glyphosate resistance in plants. Biochemical and genetic basis of resistance. In: *Weed technol.* 20 (2), S. 282–289. DOI: 10.1614/WT-04-142R.1.
- Prakash, D. P.; Narayanaswamy, P.; Sondur, Suresh N. (2002): Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. In: *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77 (3), S. 287–293. DOI: 10.1080/14620316.2002.11511494.
- Preuten, T.; Cincu, E.; Fuchs, J.; Zoschke, R.; Liere, K.; Börner, T. (2010): Fewer genes than organelles: extremely low and variable gene copy numbers in mitochondria of somatic plant cells. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 64 (6), S. 948–959. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04389.x.
- Q, H.; Y, L.; S, Y.; D, H. (2016): The effect of six common PCR inhibitors on DNA polymerase and DNA template. In: *International Journal of Forensic Science & Pathol* 8 (2), S. 1–4. DOI: 10.5281/ZENODO.48007.
- Quick, J.; Grubaugh, N. D.; Pullan, S. T.; Claro, I. M.; Smith, A. D.; Gangavarapu, K. (2017): Multiplex PCR method for MiniION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. In: *Nature protocols* 12 (6), S. 1261–1276. DOI: 10.1038/nprot.2017.066.
- Rabe, R.; Kreeb, K. H. (1980): Bioindication of air pollution by chlorophyll destruction in plant leaves. In: *Oikos* 34 (2), S. 163. DOI: 10.2307/3544177.
- Raghavan, V. (2003): Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. In: *New Phytologist* 159 (3), S. 565–583. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00846.x.
- Ralsler, M.; Querfurth, R.; Warnatz, H.-J.; Lehrach, H.; Yaspo, M.-L.; Krobitsch, S. (2006): An efficient and economic enhancer mix for PCR. In: *Biochemical and biophysical research communications* 347 (3), S. 747–751. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.06.151.
- Randall, I. (2019): Why walnuts are such tough nuts to crack. In: *Science*. DOI: 10.1126/science.aaz3669.
- Rashnoodi, N. Z.; Moghadam, J. E.; Fazeli, A. (2017): Evaluation of some walnut genotypes in the west of Iran using fruit characteristics and RAPD marker. In: *Iranian Journal of Plant Biology* 9 (3), S. 1–19, zuletzt geprüft am 02.10.2019.
- Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; Manchester, L. C.; Korkmaz, A.; Fuentes-Broto, L.; Hardman, W. E. (2013): A walnut-enriched diet reduces the growth of LNCaP human prostate cancer xenografts in nude mice. In: *Cancer investigation* 31 (6), S. 365–373. DOI: 10.3109/07357907.2013.800095.
- Rivero, E. R. C.; Neves, A. C.; Silva-Valenzuela, M. G.; Sousa, S. O. M.; Nunes, F. D. (2006): Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. In: *Pathology, research and practice* 202 (7), S. 523–529. DOI: 10.1016/j.prp.2006.02.007.
- Rogers, S. O.; Bendich, A. J. (Hg.) (1989): Extraction of DNA from plant tissues. Unter Mitarbeit von Gelvin S.B., Schilperoort R.A. und Verma D.P.S. Dordrecht: Springer (Plant Molecular Biology Manual).
- Rohland, N.; Hofreiter, M. (2007): Ancient DNA extraction from bones and teeth. In: *Nature protocols* 2 (7), S. 1756–1762. DOI: 10.1038/nprot.2007.247.
- Roloff, A. (2008): Baum des Jahres 2008 - die Walnuss (*Juglans regia* L.): Interessantes zur Biologie, Ökologie und Verwendung, zuletzt geprüft am 04.03.2019.

- Ronimus, R. S.; Parker, L. E.; Morgan, H. W. (1997): The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. In: *FEMS microbiology letters* 147 (1), S. 75–79. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10223.x.
- Roor, W.; Konrad, H.; Mamadjanov, D.; Geburek, T. (2017): Population differentiation in common walnut (*Juglans regia* L.) across major parts of its native range—insights from molecular and morphometric data. In: *The Journal of heredity* 108 (4), S. 391–404. DOI: 10.1093/jhered/esw122.
- Ros, E. (2010): Health benefits of nut consumption. In: *Nutrients* 2 (7), S. 652–682. DOI: 10.3390/nu2070652.
- Rossen, L.; Nørskov, P.; Holmstrøm, K.; Rasmussen, O. F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. In: *International Journal of Food Microbiology* 17 (1), S. 37–45. DOI: 10.1016/0168-1605(92)90017-W.
- Rossmann, P.; Röder, B.; Frühwirth, K.; Vogl, C.; Wagner, M. (2011): Mechanisms of degradation of DNA standards for calibration function during storage. In: *Applied microbiology and biotechnology* 89 (2), S. 407–417. DOI: 10.1007/s00253-010-2943-2.
- Russell, S. D. (1992): Double fertilization. In: *International Review of Cytology* 140, S. 357–388. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)61102-X.
- Rychlik, W.; Spencer, W. J.; Rhoads, R. E. (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. In: *Nucleic acids research* 18 (21), S. 6409–6412. DOI: 10.1093/nar/18.21.6409.
- Rye, H. S.; Yue, S.; Quesada, M. A.; Haugland, R. P.; Mathies, R. A.; Glazer, A. N. (1993): Picogram detection of stable dye-DNA intercalation complexes with two-color laser-excited confocal fluorescence gel scanner 217, S. 414–431. DOI: 10.1016/0076-6879(93)17080-O.
- Saez, R.; Sanz, Y.; Toldrá, F. (2004): PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. In: *Meat Science* 66 (3), S. 659–665. DOI: 10.1016/S0309-1740(03)00186-4.
- Sandbrink, J. M.; Vellekoop, P.; van Ham, R.; van Brederode, J. (1989): A method for evolutionary studies on RFLP of chloroplast DNA, applicable to a range of plant species. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 17 (1), S. 45–49. DOI: 10.1016/0305-1978(89)90041-0.
- Saporito-Irwin, S. M.; Geist, R. T.; Gutmann, D. H. (1997): Ammonium acetate protocol for the preparation of plasmid DNA suitable for mammalian cell transfections. In: *BioTechniques* 23 (3), S. 424–427. DOI: 10.2144/97233bm16.
- Savage, G. P. (2001): Chemical composition of walnuts (*Juglans regia* L.) grown in New Zealand. In: *Plant Foods for Human Nutrition* 56, S. 75–82. DOI: 10.1023/A:1008175606698.
- Schierwater, B.; Ender, A. (1993): Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. In: *Nucleic acids research* 21 (19), S. 4647–4648. DOI: 10.1093/nar/21.19.4647.
- Schildkraut, C. L.; Marmur, J.; Doty, P. (1962): Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. In: *Journal of Molecular Biology* 4 (6), S. 430–443. DOI: 10.1016/S0022-2836(62)80100-4.
- Schlörmann, W.; Müller, A. K.; Lorkowski, S.; Gleis, M. (2016): Nüsse – kleiner Snack mit großer Wirkung. In: *Moderne Ernährung heute* (5), S. 1–14, zuletzt geprüft am 08.08.2019.
- Schrader, C.; Schielke, A.; Ellerbroek, L.; John, R. (2012): PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. In: *Journal of applied microbiology* 113 (5), S. 1014–1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Schuster, S. C. (2008): Next-generation sequencing transforms today's biology. In: *Nature methods* 5 (1), S. 16–18. DOI: 10.1038/nmeth1156.
- Shen, S. (2008): Genetic diversity analysis with ISSR PCR on green algae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. In: *Journal of Oceanology and Limnology* 26 (4), S. 380–384. DOI: 10.1007/s00343-008-0380-1.
- Shi, B.; Shin, Y. K.; Hassanali, A. A.; Singer, S. J. (2015): DNA binding to the silica surface. In: *The journal of physical chemistry. B* 119 (34), S. 11030–11040. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b01983.
- Shi, C.; Hu, N.; Huang, H.; Gao, J.; Zhao, Y.-J.; Gao, L.-Z. (2012): An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing. In: *PLoS one* 7 (2), e31468. DOI: 10.1371/journal.pone.0031468.
- Shinde, D.; Lai, Y.; Sun, F.; Arnheim, N. (2003): Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. In: *Nucleic acids research* 31 (3), S. 974–980. DOI: 10.1093/nar/gkg178.

- Sibbett, G.; Hendricks, L.; Carnill, G.; Olson, W.; Jeter, R.; Ramos, D. et al. (1974): Walnut quality and value maximized by harvest management. In: *California Agriculture* 28 (7), S. 15–17.
- Simbolo, M.; Gottardi, M.; Corbo, V.; Fassan, M.; Mafficini, A.; Malpeli, G. (2013): DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. In: *PloS one* 8 (6), e62692. DOI: 10.1371/journal.pone.0062692.
- Smeaton, T. C.; Eichner, R. D. (1983): Measurement of DNA with an automatic spectrophotometer. In: *Analytical biochemistry* 131 (2), S. 394–396. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90189-6.
- Soulsbury, C. D.; Iossa, G.; Edwards, K. J.; Baker, P. J.; Harris, S. (2007): Allelic dropout from a high-quality DNA source. In: *Conservation Genetics* 8 (3), S. 733–738. DOI: 10.1007/s10592-006-9194-x.
- Souza, H. A. V.; Muller, L. A. C.; Brandão, R. L.; Lovato, M. B. (2012): Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. In: *Genetics and molecular research : GMR* 11 (1), S. 756–764. DOI: 10.4238/2012.March.22.6.
- Stellwagen, N. C.; Bossi, A.; Gelfi, C.; Righetti, P. G. (2000): DNA and buffers. Are there any noninteracting, neutral pH buffers? In: *Analytical biochemistry* 287 (1), S. 167–175. DOI: 10.1006/abio.2000.4848.
- Stevens, K. A.; Woeste, K.; Chakraborty, S.; Crepeau, M. W.; Leslie, C. A.; M.-G., P. J. (2018): Genomic variation among and within six *Juglans* species. In: *G3 (Bethesda, Md.)* 8 (7), S. 2153–2165. DOI: 10.1534/g3.118.200030.
- Stommel, H. (2018): Die Walnuss. Reichhaltiges Energiebündel mit hohem Gesundheitswert. BZfE. Online verfügbar unter <https://www.bzfe.de/inhalt/die-walnuss-33016.html>, zuletzt geprüft am 24.04.2019.
- Stranneheim, H.; Lundeberg, J. (2012): Stepping stones in DNA sequencing. In: *Biotechnology journal* 7 (9), S. 1063–1073. DOI: 10.1002/biot.201200153.
- Sugiura, M. (1992): The chloroplast genome. In: *10 Years Plant Molecular Biology*, S. 146–168. DOI: 10.1007/978-94-011-2656-4\_10.
- Szalatnay, D.; Kellerhals, M.; Frei, M.; Müller, U. (2011): Früchte, Beeren, Nüsse: Die Vielfalt der Sorten - 800 Porträts. 1. Auflage. Berne: Haupt.
- Sze-Tao, K. W. C.; Schrimpf, J. E.; Teuber, S. S.; Roux, K. H.; Sathe, S. K. (2001): Effects of processing and storage on walnut (*Juglans regia* L) tannins. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81 (13), S. 1215–1222. DOI: 10.1002/jsfa.932.
- Szybalski, W. (1968): [124] Use of cesium sulfate for equilibrium density gradient centrifugation 12, S. 330–360. DOI: 10.1016/0076-6879(67)12149-6.
- Takamatsu, T.; Baslam, M.; Inomata, T.; Oikawa, K.; Itoh, K.; Ohnishi, T. (2018): Optimized method of extracting rice chloroplast DNA for high-quality plastome resequencing and de novo assembly. In: *Frontiers in plant science* 9, S. 266. DOI: 10.3389/fpls.2018.00266.
- Tamura, K.; Hara-Nishimura, I. (2014): Involvement of the nuclear pore complex in morphology of the plant nucleus. In: *Nucleus* 2 (3), S. 168–172. DOI: 10.4161/nucl.2.3.16175.
- Tan, S. C.; Yiap, B. C. (2009): DNA, RNA, and protein extraction. The past and the present. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2009, S. 574398. DOI: 10.1155/2009/574398.
- Tanaka, N.; Takahara, A.; Hagio, T.; Nishiko, R.; Kanayama, J.; Gotoh, O.; Mori, S. (2020): Sequencing artifacts derived from a library preparation method using enzymatic fragmentation. In: *PloS one* 15 (1), e0227427. DOI: 10.1371/journal.pone.0227427.
- Tang, J.; Xia, H.; Cao, M.; Zhang, X.; Zeng, W.; Hu, S. (2004): A comparison of rice chloroplast genomes. In: *Plant physiology* 135 (1), S. 412–420. DOI: 10.1104/pp.103.031245.
- Tao, T. Y.; Ouellet, T.; Dadej, K.; Miller, S. S.; Johnson, D. A.; Singh, J. (2006): Characterization of a novel glycine-rich protein from the cell wall of maize silk tissues. In: *Plant cell reports* 25 (8), S. 848–858. DOI: 10.1007/s00299-006-0128-3.
- Tateishi-Karimata, H.; Sugimoto, N. (2014): Structure, stability and behaviour of nucleic acids in ionic liquids. In: *Nucleic acids research* 42 (14), S. 8831–8844. DOI: 10.1093/nar/gku499.
- Tautz, D.; Schlötterer, C. (1994): Simple sequences. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 4 (6), S. 832–837. DOI: 10.1016/0959-437X(94)90067-1.

- ThermoFisherScientific (2019): DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. User guide (COL 3 3 2 87 1119).
- Tippin, B.; Kobayashi, S.; Bertram, J. G.; Goodman, M. F. (2004): To slip or skip, visualizing frameshift mutation dynamics for error-prone DNA polymerases. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (44), S. 45360–45368. DOI: 10.1074/jbc.M408600200.
- Topcu, H.; Coban, N.; Woeste, K.; Sutyemez, M.; Kafkas, S. (2015): Developing new microsatellite markers in walnut (*Juglans regia* L.) from *Juglans nigra* genomic GA enriched library. In: *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics* 1 (2), S. 93–99.
- Topçu, H.; Ikhsan, A. S.; Sütyemez, M.; Çoban, N.; Güney, M.; Kafkas, S. (2015): Development of 185 polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from walnut (*Juglans regia* L.). In: *Scientia Horticulturae* 194, S. 160–167. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.08.014.
- Tridge (2019): Walnut. Online verfügbar unter <https://www.tridge.com/intelligences/walnut/price>.
- Tsoukas, M. A.; Ko, B.-J.; Witte, T. R.; Dincer, F.; H., W. Elaine; Mantzoros, C. S. (2015): Dietary walnut suppression of colorectal cancer in mice. Mediation by miRNA patterns and fatty acid incorporation. In: *The Journal of nutritional biochemistry* 26 (7), S. 776–783. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.02.009.
- Tulecke, W.; McGranaham, G. (1994): The walnut germplasm collection of the University of California, Davis. Report No. 13. Hg. v. University of California Genetic Resources Conservation Program. Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. Davis, California.
- Ugozzoli, L.; Wallace, B. (1991): Allele-specific polymerase chain reaction. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 2 (1), S. 42–48. DOI: 10.1016/S1046-2023(05)80124-0.
- van Soolingen, D.; Haas, P. E. de; Kremer, K. (2001): Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria. In: *Methods in molecular medicine* 54, S. 165–203. DOI: 10.1385/1-59259-147-7:165.
- Varma, A.; Padh, H.; Shrivastava, N. (2007): Plant genomic DNA isolation. An art or a science. In: *Biotechnology journal* 2 (3), S. 386–392. DOI: 10.1002/biot.200600195.
- Vieira, L. do N.; Faoro, H.; Fraga, H. P. de F.; Rogalski, M.; Souza, E. M. de; Oliveira P., F. de (2014): An improved protocol for intact chloroplasts and cpDNA isolation in conifers. In: *PLoS one* 9 (1), e84792. DOI: 10.1371/journal.pone.0084792.
- Vischi, M.; Chiabà, C.; Raranciuc, S.; Poggetti, L.; Messina, R.; Ermacora, P. (2017): Genetic diversity of walnut (*Juglans Regia* L.) in the Eastern Italian Alps. In: *Forests* 8 (3), S. 81. DOI: 10.3390/f8030081.
- Voytas, D. (2001): Agarose gel electrophoresis. In: *Current protocols in molecular biology* Chapter 2, 2.5A.1-2.5A.9. DOI: 10.1002/0471142727.mb0205as51.
- VWR (ohne Datum): Arbeitsanleitung. peqGOLD Plant DNA Mini Kit (V0815). Online verfügbar unter [https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de\\_DE/id/17035093/contents](https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de_DE/id/17035093/contents).
- Wang, H.; Pan, G.; Ma, Q.; Zhang, J.; Pei, D. (2015): The genetic diversity and introgression of *Juglans regia* and *Juglans sigillata* in Tibet as revealed by SSR markers. In: *Tree Genetics & Genomes* 11 (1), S. 85. DOI: 10.1007/s11295-014-0804-3.
- Wang, Y.; Prosen, D.E.; Mei, L.; Sullivan, J. C.; Finney, M.; Vander Horn, P. B. (2004): A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. In: *Nucleic acids research* 32 (3), S. 1197–1207. DOI: 10.1093/nar/gkh271.
- Weinel, C.; Nelson, K. E.; Tümmler, B. (2002): Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. In: *Environmental microbiology* 4 (12), S. 809–818. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2002.00331.x.
- Whittall, J. B.; Syring, J.; Parks, M.; Buenrostro, J.; Dick, C.; Liston, A.; Cronn, R. (2010): Finding a (pine) needle in a haystack. Chloroplast genome sequence divergence in rare and widespread pines. In: *Molecular ecology* 19 Suppl 1, S. 100–114. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04474.x.
- Williams, J. G.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. In: *Nucleic acids research* 18 (22), S. 6531–6535. DOI: 10.1093/nar/18.22.6531.
- Wolfe, K. H.; Li, W.-H.; Sharp, P. M. (1987): Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (24), S. 9054–9058. DOI: 10.1073/pnas.84.24.9054.

- Wu, D. Y.; Ugozzoli, L.; Pal, B. K.; Qian, J.; Wallace, R. B. (1991): The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. In: *DNA and cell biology* 10 (3), S. 233–238. DOI: 10.1089/dna.1991.10.233.
- Xu, Z.; Hu, T.; Zhang, F. (2012): Genetic diversity of walnut revealed by AFLP and RAPD markers. In: *JAS* 4 (7). DOI: 10.5539/jas.v4n7p271.
- Yamada, K.; Shirahata, S.; Murakami, H.; Nishiyama, K.; Shinohara, K.; Omura, H. (2014): DNA Breakage by Phenyl Compounds. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (5), S. 1423–1428. DOI: 10.1080/00021369.1985.10866902.
- Yang, D. Y.; Eng, B.; Wayne, J. S.; Dudar, J. C.; Saunders, S. R. (1998): Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. In: *American Journal of Physical Anthropology*. 105 (4), S. 539–543. DOI: 10.1002/(SICI)1096-8644(199804)105:4<539::AID-AJPA10>3.0.CO;2-1.
- Yang, G. Y.; Zhang, W. H.; Sun, Y. D.; Zhang, T. T.; Hu, D.; Zhai, M. Z. (2017): Two novel WRKY genes from *Juglans regia*, JrWRKY6 and JrWRKY53, are involved in abscisic acid-dependent stress responses. In: *Plant Biology* 61 (4), S. 611–621. DOI: 10.1007/s10535-017-0723-x.
- Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T. L. (2012): Primer-BLAST. A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In: *BMC bioinformatics* 13 (1), S. 134–135. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.
- Yeates, C.; Gillings, M. R.; Davison, A. D.; Altavilla, N.; Veal, D. A. (1998): Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. In: *Biological Procedures Online* 1, S. 40–47, zuletzt geprüft am 08.10.2019.
- Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation. A review. In: *Molecular ecology* 11 (1), S. 1–16. DOI: 10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x.
- Zhang, Q.; Wang, J.; Deng, F.; Yan, Z.; Xia, Y.; Wang, Z. et al. (2015): TqPCR. A touchdown qPCR assay with significantly improved detection sensitivity and amplification efficiency of SYBR Green qPCR. In: *PloS one* 10 (7), e0132666. DOI: 10.1371/journal.pone.0132666.
- Zhang, Z. Y.; Han, J. W.; Jin, Q.; Wang, Y.; Pang, X. M.; Li, Y. Y. (2013): Development and characterization of new microsatellites for walnut (*Juglans regia*). In: *Genetics and molecular research : GMR* 12 (4), S. 4723–4734. DOI: 10.4238/2013.October.18.10.
- Zhao, P.; Zhou, H.-J.; Potter, D.; Hu, Y.-H.; Feng, X.-J.; Dang, M. (2018): Population genetics, phylogenomics and hybrid speciation of *Juglans* in China determined from whole chloroplast genomes, transcriptomes, and genotyping-by-sequencing (GBS). In: *Molecular phylogenetics and evolution* 126, S. 250–265. DOI: 10.1016/j.ympev.2018.04.014.
- Zheng, H.; Yin, J.; Gao, Z.; Huang, H.; Ji, X.; Dou, C. (2011): Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids. A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 164 (7), S. 1215–1224. DOI: 10.1007/s12010-011-9207-1.
- Zhu, T.; Le, W.; You, F. M.; Rodriguez, J. C.; Deal, K. R.; Chen, L. (2019): Sequencing a *Juglans regia* × *Juglans microcarpa* hybrid yields high-quality genome assemblies of parental species. In: *Horticulture research* 6, S. 55. DOI: 10.1038/s41438-019-0139-1.
- Zoschke, Reimo; Liere, K.; Börner, T. (2007): From seedling to mature plant. *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 50 (4), S. 710–722. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03084.x.
- Zrimec, J.; Kopinč, R.; Rijavec, T.; Zrimec, T.; Lapanje, A. (2013): Band smearing of PCR amplified bacterial 16S rRNA genes: dependence on initial PCR target diversity. In: *Journal of microbiological methods* 95 (2), S. 186–194. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.08.002.

## 9. Anhang

### 9.1 Verwendete Reagenzien

Tab. 52: Verwendete Reagenzien mit ihrem Hersteller und Spezifikationen.

Reagenzien	Hersteller	Spezifikation
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	99 % CAS: 60-24-2
2-Propanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	100 % CAS: 67-63-0,
Agarose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Agarose SERVA for DNA electrophoresis research grade,
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	CAS: 631-61-8
Ascorbinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	CAS 631-61-8
<i>BiozymTaq</i> -DNA-Polymerase	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland	5 u/μL; 0,1 mL
BSA	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland	<i>purified</i> , 100x, 0,25 mL
Bsml	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland	10000 U/mL, 0,05 mL
Borax	Fluka®-Analytical	CAS: 1330-43-4
Calciumchlorid	Fluka®-Analytical	CAS 10043-52-4
Chloroform	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	≥ 99,9 %, HPLC Grade CAS: 67-66-3,
CTAB	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %, für die Biochemie CAS: 57-090, Charge 019277868
CutSmart Buffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland	10x, 1,25 mL Lot: 10021119
DNAse I	New England Biolabs® Inc.	2000 U/mL
dNTPs	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland	1:1:1:1 (dATP:dTTP:dGTP:dCTP) 10 mM (4x2,5 mM)
<i>DreamTaq</i> Reaction Buffer (10x)	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	10x,
<i>DreamTaq</i> -DNA-Polymerase	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	5 U/μL
EDTA	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	EDTA-disodium analytical grade CAS: 6381-92-6,
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	100 % CAS: 64-17-5,
GelRed™	Biotium, Inc. Fremont, Kalifornien	10000x in Wasser
Guanidiniumhydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99,5 % für die Biochemie CAS: 50-01-1
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	CAS 7365-45-9
Hi-Di™ Formamid	Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, Kalifornien, USA	High-Di™, 5 mL Flasche für 3500 <i>Genetic Analyzer</i>
Isoamylalkohol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	CAS: 123-51-3
LIZ™ 500 Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, Kalifornien, USA	GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	≥ 99,9 %, HPLC Grade CAS: 67-56-1
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥99%ig

Fortsetzung Tab. 52: Verwendete Reagenzien mit ihrem Hersteller und Spezifikationen.

Reagenzien	Hersteller	Spezifikation
Natriumacetat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	99% CAS: 127-09-3
Natriumdodecylsulfat	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	99% CAS: 151-21-3
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	100 % CAS: 7647-14-5,
Natriumdisulfit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	98-100.5%ig CAS: 7631-90-5
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	≥ 97 % CAS: 1310-73-2
Natriumhypochlorit	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	14 % Cl <sub>2</sub> in wässriger Lösung CAS:7681-52-9
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> HotStart-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland	Lot: 0031708 # B9022S
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> Standard Reaction Buffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland	Lot: 10034534 # M0481L
<i>peqGOLD</i> DNA Ladder Mix	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	100-10000 bp
Percoll <sup>™</sup>	GE Healthcare, Uppsala, Schweden	CAS: 7365-45-9
Proteinase K	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA	recombinant PCR Grade
PVP	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	CAS: 9003-39-8
RNase	Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, Kalifornien, USA	EN0531
Saccharose	Nordzucker AG	Haushaltszucker
Sorbitol	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	98% CAS: 50-70-4
<i>Taq</i> Reaction Buffer (10x)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland	1 mL
Tris (Tris Pufferan <sup>®</sup> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99,9 %, Ultra Qualität, CAS: 77-86-1
Tris-HCl (Trizma <sup>®</sup> hydrochlorid)	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	reagent grade, ≥ 99 % CAS: 1185-53-1

Tab. 53: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Einstufung ihrer Sicherheitsmerkmale sowie ihre Entsorgung nach der GESTIS.Stoffdatenbank (2020).

Reagenzien	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung <sup>a)</sup>
2-Mercaptoethanol	05, 06, 08, 09	301+331, 310, 315, 317, 318, 373, 410	273, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310	4
2-Propanol	02, 07	225, 319, 336	210, 233, 240, 305+351+338, 403, 235	3
Agarose	Keine Einstufung nach GHS.			5
Ammoniumacetat	Keine Einstufung nach GHS.			4
<i>BiozymTaq</i> -DNA-Polymerase	Keine Einstufung nach GHS.			3
BSA	Keine Einstufung nach GHS.			3
BsmI	Keine Einstufung nach GHS.			3
Borax	07, 08	360FD, 319	201, 305+351+338, 308+313	5
Calciumchlorid	07	319	305+351+338	
Chloroform	06, 08	302, 315, 319, 331, 351, 361d, 336, 372, 412	201, 273, 301+312+330, 302+352, 304+340+311	4
CTAB	05, 07, 08, 09	302, 315, 318, 335, 373, 410	273, 280, 302+352, 305+351+338, 314	4
Cut Smart Buffer	Keine Einstufung nach GHS.			1
DNAse I	Keine Einstufung nach GHS.			3
dNTPs	Keine Einstufung nach GHS.			3
<i>DreamTaq</i> Reaction Buffer (10x)	Keine Einstufung nach GHS.			3
<i>DreamTaq</i> -DNA-Polymerase	Keine Einstufung nach GHS.			3
EDTA-disodium	07, 08	332, 373	260	1
Ethanol	02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233	3
GelRed™	Keine Einstufung nach GHS.			4
Glycerin	Keine Einstufung nach GHS.			3
Guanidiniumhydrochlorid	07	302+332, 315, 319	261, 280, 301+312, 330, 304+340+312, 305+351+338, 337+313	1
HEPES	Keine Einstufung nach GHS.			3
Hi-Di™ Formamid	08	360, 351, 371	202, 260, 281, 308+313,	4
Isoamylalkohol	02, 07	226, 315, 319, 332, 335, EUH066	210, 280, 304+340, 302+352, 332+313, 337+313	3
Methanol	02, 06, 08	225, 301+311+331, 370	210, 233, 280, 301+310, 306+361+353, 304+340+311	4
MOPS	Keine Einstufung nach GHS.			3
Natriumacetat	Keine Einstufung nach GHS.			1
Natriumchlorid	Keine Einstufung nach GHS.			1
Natriumdisulfit	0,5, 07	302, 318 EUH031	280, 305+351+338, 313	1
Natriumdodecylsulfat	02, 05, 07 Gefahr	228, 302, 315, 318, 335, 412	210, 273, 280, 302+352, 305+351+338, 313	2
Natriumhydroxid	05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310	2
Natriumhypochlorit	05, 09	290, 314, 400, 411, EUH031	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310	1

Fortsetzung Tab. 53: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Einstufung ihrer Sicherheitsmerkmale sowie ihre Entsorgung nach der GESTIS.Stoffdatenbank (2020).

Reagenzien	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze	Entsorgung <sup>a)</sup>
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> HotStart-DNA-Polymerase	Keine Einstufung nach GHS.			3
<i>OneTaq</i> <sup>®</sup> Standard Reaction Buffer	Keine Einstufung nach GHS.			3
peqGOLD DNA Ladder Mix	Keine Einstufung nach GHS.			3
Primer	Keine Einstufung nach GHS.			3
Proteinase K	07, 08	315, 317, 319, 334, 335	260, 280	4
Puffer zu Polymerasen	Keine Einstufung nach GHS.			1
PVP	Keine Einstufung nach GHS.			3
RNase	08	317, 334	261, 280, 284, 304+340, 342+311	4
Saccharose	Keine Einstufung nach GHS.			5
Salzsäure	05, 07	290, 314, 335	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310	1
Sorbitol	Keine Einstufung nach GHS.			3
<i>Taq</i> Reaction Buffer (10x)	Keine Einstufung nach GHS.			3
Tris-Base	Keine Einstufung nach GHS.			3
Tris-HCl	Keine Einstufung nach GHS.			3
Trockeneis	-	-	403	6

Tab. 54: Entsorgungsschlüssel für die in Tabelle 64 angegebene Entsorgung.

Nummer	Entsorgungsschlüssel
1	Sammelbehälter für andere Säure (HCl- und H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -haltig), ggf. lösen und sauren pH-Wert einstellen
2	Sammelbehälter für andere Basen (Laugen und Laugengemische), ggf. lösen und basischen pH-Wert einstellen
3	Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösungsmittel
4	Sammelbehälter für halogenhaltige, giftige oder KMR-haltige organische Lösungsmittel
5	Sammelbehälter für kontaminierte Betriebsmittel
6	vorsichtig im Abzug verdampfen lassen

Tab. 55: GHS-Symbole und die zugehörige Ziffer für Codierung der Tabelle 64.

Nummer	Symbol	Nummer	Symbol	Nummer	Symbol
01		04		07	
02		05		08	
03		06		09	

Tab. 56: Verwendete Lösungen sowie ihr Hersteller und Spezifikation.

Lösungen	Hersteller	Spezifikation
Ammoniumacetat-Lösung nach AKKAK	eigene Herstellung	7,5 M
Extraktionspuffer nach AKKAK	eigene Herstellung	50 mM EDTA, 500 mM NaCl 100 mM Tris-Base, 2 % SDS 1 % PVP, 1 % $\beta$ -Mercaptoethanol pH 8
Natriumacetat-Lösung nach Akkak	eigene Herstellung	3 M pH 5,2
CTAB-Extraktionspuffer nach Doyle	eigene Herstellung	2 % CTAB, 1,4 M NaCl 0,2 % $\beta$ -Mercaptoethanol 0,1 M Tris-Base, 20 mM EDTA pH 8
Waschpuffer nach Doyle	eigene Herstellung	0,01 M Ammoniumacetat 76 %igem abs. Ethanol pH 7,4
Extraktionspuffer Brüning	eigene Herstellung	55 mM CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, 20 mM EDTA pH = 8
Bindepuffer Brüning	eigene Herstellung	5,5 M Guanidiniumhydrochlorid, 20 mM Tris-HCl pH = 6,6
Waschpuffer Brüning	eigene Herstellung	20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, in 70 %igem Ethanol pH = 7,4
Inkubationspuffer nach Vieira und Jansen	eigene Herstellung	55 mM CTAB, 1,4 mM NaCl 0,1 M Tris-HCl, 20 mM EDTA pH 8,0
Waschpuffer nach Vieira und Jansen	eigene Herstellung	50 mM Tris-HCl, 0,35 M Sorbitol 25 mM EDTA pH 8,0
Inkubationspuffer nach Vieira	eigene Herstellung	1,25 M NaCl, 0,25 M Ascorbinsäure 10 mM Natriumdisulfit 12,5 mM Borax, 50 mM Tris-HCl 7 mM EDTA, 1 % PVP pH 3,8
Resuspensionspuffer nach Vieira	eigene Herstellung	1,25 M NaCl, 12,5 mM Borax 50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA 1 % PVP pH 8,0
Inkubationspuffer nach Lang	eigene Herstellung	13 mM Tris-HCl, 300 mM Sorbitol 20 mM MOPS, 1 % PVP 0,1 % Mercaptoethanol pH 7,8
Resuspensionspuffer nach Lang	eigene Herstellung	50 mM HEPES, 300 mM Sorbitol 2 mM EDTA pH 7,8
Extraktionspuffer nach Vieira	eigene Herstellung	2 % SDS, 100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 7,8
Stammlösung nach Vieira	eigene Herstellung	50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,5
Ammoniumacetat-Lösung Nach Vieira	eigene Herstellung	pH 5,2 5 M
Extraktionspuffer nach Chaudhary	eigene Herstellung	100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA 2 % SDS pH 8,0

Fortsetzung Tab. 56: Verwendete Lösungen sowie ihr Hersteller und Spezifikation.

<b>Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Spezifikation</b>
DNase-Puffer nach Chaudhary	eigene Herstellung	25 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris-HCl 5 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,8
Shelf-Puffer nach Chaudhary	eigene Herstellung	600 mM Saccharose, 10 mM Tris-HCl 20 mM EDTA
Extraktionspuffer Nach Asif und Cannon	eigene Herstellung	100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1,4 mM NaCl, 3 % CTAB, 1 % PVP, 0,2 % Mercaptoethanol pH = 8
Waschpuffer nach Asif und Canon	eigene Herstellung	10 mM Ammoniumacetat in 75 %igem Ethanol
Extraktionspuffer Nach Jiao	eigene Herstellung	100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1,4 mM NaCl, 2 % CTAB, 5 % PVP, 2 % Mercaptoethanol pH = 8
Extraktionspuffer Nach Jiao	eigene Herstellung	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,7 mM NaCl, 1 % CTAB, 1 % Mercaptoethanol pH = 8
Extraktionspuffer nach Rohland und Hofreiter	eigene Herstellung	0,45 M EDTA, 0,1 % PVP, 0,25 mg/mL Proteinase K pH = 8
TAE-Puffer	eigene Herstellung	2 M Tris, 100 mM EDTA, mit Eisessig auf pH 8
<i>Loading Dye</i>	eigene Herstellung	50 % Glycerin, 50 % TAE-Puffer, 0,005 % Xylenblau
Ethanol	eigene Herstellung	70 % und 75 %
Chloroform:Isoamylalkohol	eigene Herstellung	24:1 (v/v)
TE-Puffer	eigene Herstellung	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH = 8,0
Cäsiumchlorid-Puffer	eigene Herstellung	10 mL TE-Puffer, 20 g CsCl 200 µL Ethidiumbromid-Lösung
Isopropanol-Lösung	eigene Herstellung	3 mL TE-Puffer, 10 g CsCl 100 mL Isopropanol

Tab. 57: Verwendete Kits sowie ihr Hersteller und Spezifikation.

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Spezifikation</b>
QuantiFluor® dsDNA System	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland	20x TE-Puffer (pH 7,4) QuantiFluor® dsDNA Dye Lambda DNA Standard (100 µg/mL)
Miseq Reagent Nano Kit v2	Illumina®, San Diego, USA	0,5 Gb 500 Cycles
Miseq Reagent Kit v2	Illumina®, San Diego, USA	7,5 Gb 500 Cycles
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland	Lot: 0071711
Nextera™ DNA Flex Library Prep 24 Samples (Box 1)	Illumina®, San Diego, USA	Ref: 20015825 Lot: 20328810 TWB Sample Purification Beads TSB
Nextera™ DNA Flex Library Prep 24 Samples (Box 2)	Illumina®, San Diego, USA	Ref: 20015826 Lot: 20314546 Resuspension Buffer TB1 EPM
Nextera™ DNA Flex Library Prep 24 Samples (Box 3)	Illumina®, San Diego, USA	Ref: 20015827 Lot: 20319161 BLT
peqGOLD Plant DNA Mini Kit	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	PerfectBind DNA Column Microfilter 2 mL Collection Reaktionsgefäßs Lysis Buffer PL1 Lysis Buffer PL2 DNA Binding Buffer DNA Wash Buffer Elution Buffer RNase A (20 mg/mL)

## 9.2 Verwendete Materialien, Geräte und Software

Tab. 58: Verwendete Materialien sowie ihr Hersteller und Spezifikation.

Material	Hersteller	Spezifikation
96 PCR-Platte (Sanger)	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	MircoAmp® Optical 96-Well Reaction Plate
96-Well Platte	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland	96 PCR-Platte randlos, St. 5 Ref: 72.1978.202 Lot:150132
Biosphere Filterspitzen 0,1-20 µL	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	Länge: 46mm, PP, Filter:PE, steril, DNA-, DNase- /RNase-, PCR Inhib.-, ATP-frei, pyrogenfrei/endotoxinfrei
Biosphere Filterspitzen 100-1000 µL	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	Durchmesser: 9mm Länge: 72mm, PP Filter: PE, steril, DNA-, DNase- /RNase-, PCR Inhib.-, ATP-frei, pyrogenfrei/endotoxinfrei
Biosphere Filterspitzen 2-100 µL	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	Durchmesser: 8mm Länge: 51mm, PP Filter: PE, steril, DNA-, DNase- /RNase-, PCR Inhib.-, ATP-frei, pyrogenfrei/en
Deckel 96 PCR-Platte (Sanger)	Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA	Flat PCR Caps, strips of 8
EconoSpin® Column	Epoch Life Science Inc., Missouri City, Texas	Bindekapazität 30-40 µg
Envirocheck® Contact Plate	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Soja Agar und Natriumsulfat als Neutralisierer
Einmal-Kunststoff-Spatel Mikro	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	antistatisch, unsteril
Glasperlen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Ø 2,85-3,3 mm Charge 50680124
Klebefolie	Thermo Fisher Scientific Inc, Carlsbad, Californien, USA	MicroAmp™ Clear Adhesive Film für 96-Well Reaction Plates
Metallkugeln (für <i>Bead Ruptor</i> <sub>24</sub> )	Fahrradgebrauchmarkt Hamburg	Fahrradlagerkugeln Ø 3 mm
Nitrilhandschuhe	VWR International bvba, Leuven, Belgien	unsteril, ungepudert, strukturierte Oberfläche
Parafilm	Bemis Company, Inc., Oshkosh, USA	Laboratory Film, 4inchX 125 ft.-Rolle, PM-996
Pasteurpipetten	ThermoFisherScientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Länge: 230 mm/ 150 mm
PCR-Einzelgefäß mit flachem Deckel 0,2mL	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	Länge: 21,7mm, PP, Multiply®-Pro, PCR Performance Tested (DNA-, DNase-/RNase-, PCR-Inhib.-frei), transparent, dünnwandig, mit Anti-Kontaminationsschild
PCR-Einzelgefäß mit flachem Deckel	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland	0,5 mL für Qunatus
Pipettenspitzen 10 µL (StackPack)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	Durchmesser: 6mm Länge: 31mm, PP
Pipettenspitzen 1000 µL	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	Durchmesser: 9mm Länge: 72mm, PP
Pipettenspitzen 2-200 µL (StackPack)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	Länge: 51mm, PP, PCR Performance Tested (DNA-, DNase-/RNase-, PCR-Inhib.-frei)

Fortsetzung Tab. 58: Verwendete Materialien sowie ihr Hersteller und Spezifikation.

Material	Hersteller	Spezifikation
Reaktionsgefäß 0,5 mL	ThermoFisherScientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Axygen RNase-, DNase-, pyrogenfrei
Reaktionsgefäß 1,5 mL	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	Durchmesser: 10,8mm Länge: 39mm, PP
Reaktionsgefäß 2,0 mL	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	Durchmesser: 10,8mm Länge: 40mm, PP
Reaktionsgefäß 15 mL	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	120X17 mm, PP, pyrogenfrei, nicht zytotoxisch, DNA frei, DNase frei, RNase frei, steril
Reaktionsgefäß 50 mL (braun)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	114X28 mm, PP, pyrogenfrei, steril
Reaktionsgefäß 50 mL (klar)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland	114X28 mm, PP, pyrogenfrei, nicht zytotoxisch, DNA frei, DNase frei, RNase frei, steril
Ultra-Clear™ Centrifuge Reaktionsgefäßs	Beckman Coulter® Inc., Brea, Kalifornien, USA	50 Stk. 14 x 95 mm
Vinylhandschuhe	VWR International bvba, Leuven, Belgien	unsteril, gepudert/ungepudert

Tab. 59: Verwendete Geräte sowie ihr Hersteller und Spezifikation.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer	ThermoFisherScientific GmbH, Schwerte, Deutschland	8-Kapillar-Array und POPTM-Polymer
<i>Bead Ruptor</i> <sub>24</sub>	Omni International, Georgia, USA	50-60 Hz, 0,8-8 m/s
Biometra® T3 Thermocycler (Cycler 2)	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland	3x bis zu 48 Proben
Biometra® T3000 Thermocycler (Cycler 3)	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland	3x bis zu 48 Proben
Biometra®Tgradient Thermocycler (Cylcler 1)	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland	bis zu 96 Proben
Bohrer	NusGear DE, Guangdong, China	Modell: InLife electronic grinder, 10000-37000 Umdrehung/min
Brutschrank	Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Deutschland	Heraeus B20
Eismaschine	ITV Ice Makers inc., Miami, Florida, USA	Ice Queen IQ 135
Elektrophoreseeinheit	Galileo Bioscience, Camebridge, Massachusetts, USA	Modell: 80-0911
Elektrophorese-Netzgerät	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Deutschland	Electrophoresis Power Supply peQlab EV231
Eppendorf Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	100-1000 µL. 1-100 µL, 1-10 µL, 0,1-2,5 µL
Gefrierschrank	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland	GSP36A31/02, -21 °C
	Liebherr-Internatinal Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland	Comfort, G1213, -21 °C
Geldokumentationseinheit	Biostep® GmbH, Jahnsdorf, Deutschland	Modell: Biostep® Gel-Dokumentationssystem Darkhood DH-40/50
Heizrührgerät	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland	RCT basic
Grobwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	Modell: 1203 MP, bis 3700 g

Fortsetzung Tab. 59: Verwendete Geräte sowie ihr Hersteller und Spezifikation.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Kapillargelelektrophorese	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA	2100 Bioanalyzer Instrument
Kühlschrank	Liebherr-Internatinal Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland	MediLine, Lkexv 3600, 5 °C
	Liebherr-Internatinal Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland	Comfort, TP1410, 5 °C
	Liebherr-Internatinal Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland	Comfort, TP 1410 Index 21 C / 001
Messermühle	Retsch GmbH, Haan, Deutschland	Modell: GM 300
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland	Typ.: 7810
NanoDrop	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland	DeNovix DS-11 Spektrophotometer
PCR-BOX (DNA/RNA UV-Cleaner Box)	Kisker Biotech GmbH & Co KG, Steinfurt, Deutschland	UVC/T-M-AR
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz	FiveEasy F20
Quantitative PCR	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA	CFX96 Deep Well™ Real-Time Systems C1000 Touch™ Thermal Cycler
Quantus™ Fluorometer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland	
Sequencer	Illumina	MiSeq System
Thermoschüttler	Grant Instruments Ltd, Cambs, England	Typ: PHMT; Aufsatz: PSC24N (24 x 1,5 mL)
	LFT Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland	Typ: TS-100; Aufsatz: SC-18 (20 x 0,5 mL + 12 x 1,5 mL)
Ultra-Turrax + Dispergierwerkzeug	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland	T 18 digital Ultra-Turrax S 25 N – 18 G
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	Optima™ XPN-90 Rotor: SW 40 Ti (Ausschwingrotor)
Vakuumbzentrifuge	Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Deutschland	Modell: ROTO-vac 3 No.: 606006
Vortexer	VWR International bvba, Leuven, Belgien	Modell: 1719
	VWR International bvba, Leuven, Belgien	Modell: 444-1372
	Kisker Biotech GmbH & Co KG, Steinfurt, Deutschland	Modell: LSM Mixer Uzusio VTX-3000L
Waage	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz	Modellreihe: TLE, Genauigkeit: 0,1mg
	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland	Modell: AGB 210-4 Max 210 g, d=0,1 mg
Wasseraufbereitung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Direct-Q® 3 UV-R, Endfilter: Biopak, Reinstwasser (Typ1)
Workstation	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland	DNA/RNA UV-Cleaner Box UVC/T-M-AR
Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	Microfuge 16, Non-Refrigerated, 50/60 Hz, 220-240 V
	LaboGene A/S, Allerød, Dänemark	ScanSpeed 1236R kühlbar

Fortsetzung Tab. 59: Verwendete Geräte sowie ihr Hersteller und Spezifikation.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland	Modell: 3-18KS kühlbar
	Kisker Biotech GmbH & Co KG, Steinfurt, Deutschland	Combi Spin FVL-2400N

Tab. 60: Verwendete Software für die jeweilige Anwendung.

Anwendung	Hersteller	Software
Statistik	Alphadi	Alphadi-Tab
Auswertung ABI	Thermo Fisher Scientific	GeneMapper® Software 5
Datenauswertung Sequenzierung	Qiagen GmbH	CLC Genomics Workbench 11.0
Erstellen von Grafiken	Microsoft	PowerPoint, Office 365
Geldokumentation	Biostep GmbH	Argus X1, Version 5.1.11
Kapillargelelektrophorese	Agilent Technologies	Agilent 2100 Bioanalyzer Expert Software
Literaturverwaltung	Swiss Academic Software	Citavi, Version 6.3
Sequenzvergleich	Genome Compiler Corporation	GenomeCompiler, Version 2.2.88
Sequenzvergleich	Broad Institute and the Regents of the University of California	IGV – Integrative Genomics Viewer, Version 2.8.10
Statistikprogramm	Past3	Version 3.17, Oyvind Hammer
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH	Version 1.0.676

### 9.3 Probenvorbereitung

#### 9.3.1 Bakterielle Dekontaminierung

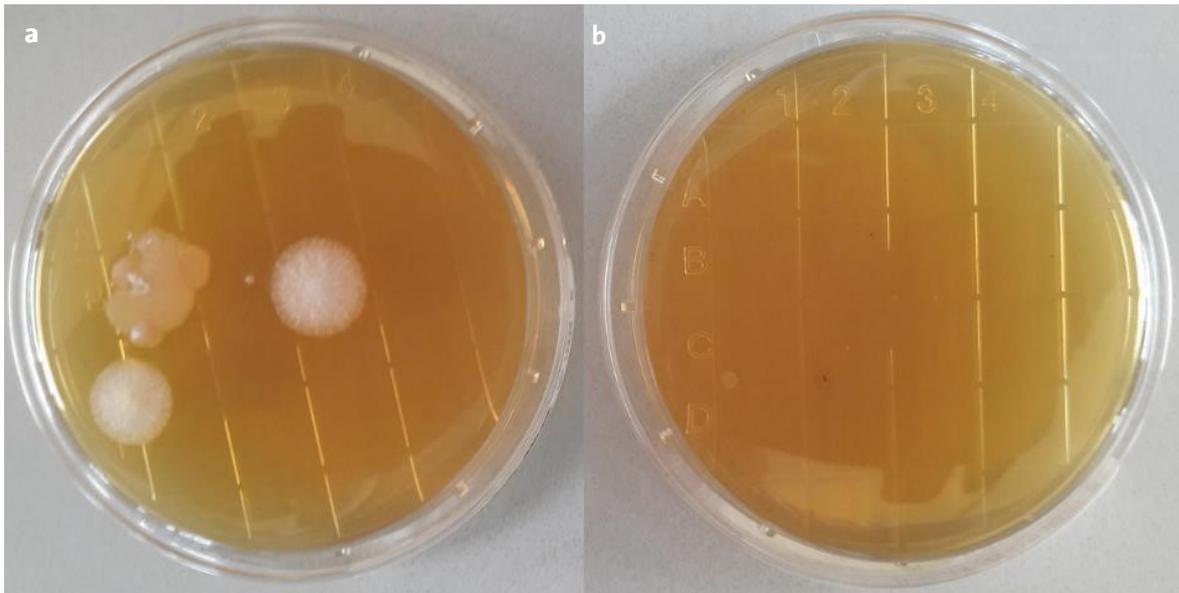


Abb. 63: a) Mikrobielle Besiedlung der ungereinigten Walnusschale, b) Mikrobielle Besiedlung der gereinigten Walnusschale mit 70 %igem Ethanol.

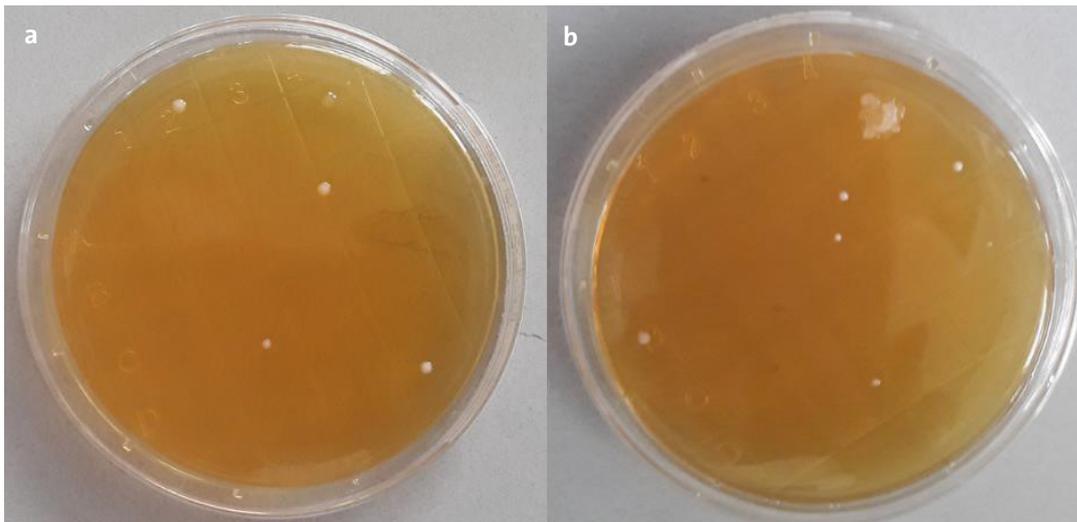


Abb. 64: a) Luftkeimgehalt im Labor nach 60 min. b) Luftkeimgehalt im Labor nach 120 min.

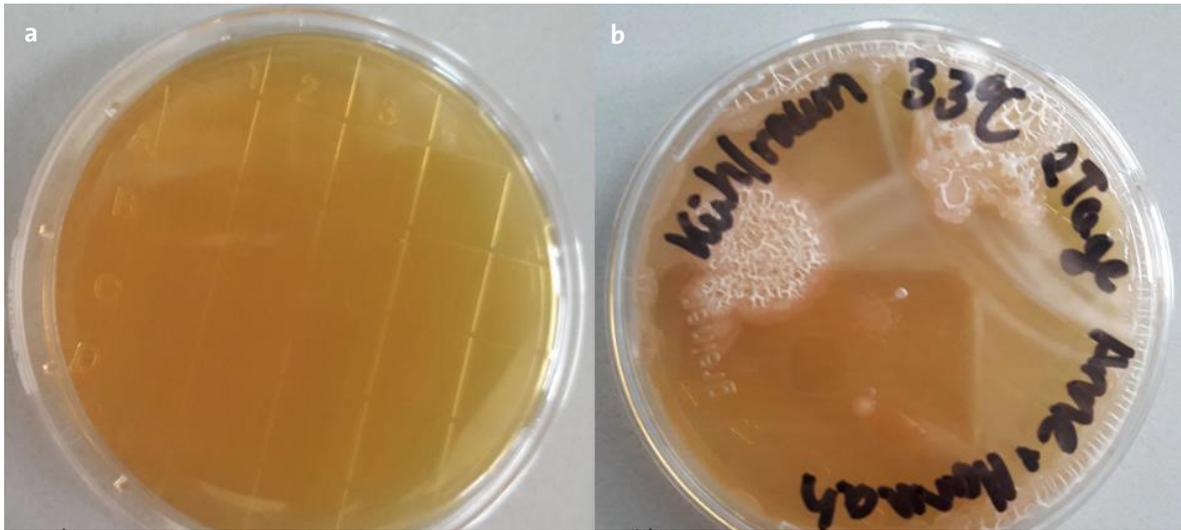


Abb. 65: a) Mikrobielle Besiedlung des Reinstwassers, b) Mikrobielle Besiedlung der ungereinigten Arbeitsfläche im Aufarbeitungsraum nach 3 Tagen Inkubation (Beschriftung inkorrekt).

## 9.4 DNA-Isolierung

### 9.4.1 Gesamt-DNA-Isolierung aus Blatt- und Samenmaterial

Tab. 61: Auflistung der Walnussproben für die Isolierung der Gesamt-DNA unter Angabe der Sorte, des Barcodes, der LAB-ID, des Ursprungslandes und die DNA-Ausbeute. Die Proben wurden im Jahr 2017 geerntet, mit Ausnahme von Broadview-00 und -01.

Material	Sorte	Barcode	LAB-ID	Ursprungsland	c [ng/μL] Quantus™
Blatt	Broadview	BV-00-26062016	BV 00	Deutschland	2,20
		BV-01-30062016	BV 01	Deutschland	8,10
		BV-02-12072017	BV 02	Schweiz	4,10
		BV-03-19092017	BV 03	Schweiz	4,18
Blatt	Chandler	CH-01-02082017	CH 01	Frankreich	6,30
		CH-02-19092017	CH 02	Schweiz	5,80
Blatt	Fernette	FT-00-02082017	FT 00	Frankreich	3,34
		FT-01-19092017	FT 01	Schweiz	2,28
Blatt	Fernor	FE-01-02082017	FE 01	Frankreich	3,13
		FE-02-25082017	FE 02	Frankreich	5,70
		FE-03-19092017	FE 03	Schweiz	2,19
Blatt	Franquette	FQ-02-16062017	FQ 02	Deutschland	16,0
		FQ-08-19092017	FQ 08	Schweiz	7,40
Blatt	Geisenheim 26	26-00-16062017	26 00	Deutschland	10,0
		26-03-17072017	26 03	Deutschland	2,39
		26-04-19092017	26 04	Schweiz	4,04
Blatt	Hartley	HA-00-02082017	HA 00	Frankreich	1,75
		HA-01-19092017	HA 01	Schweiz	1,38
		HA-02-25092017	HA 02	USA	4,41
Blatt	Lara	LA-04-25082017	LA 04	Frankreich	4,05
		LA-05-19092017	LA 05	Schweiz	4,91
Blatt	Pedro	P-00-19092017	P 00	Schweiz	5,40
		P-01-05102017	P 01	Deutschland	1,92
Blatt	Serr	S-00-02082017	S 00	Frankreich	1,16
		S-01-19092017	S 01	Schweiz	4,77

Fortsetzung Tab. 61: Auflistung der Walnussproben für die Isolierung der Gesamt-DNA unter Angabe der Sorte, des Barcodes, der LAB-ID, des Ursprungslandes und die DNA-Ausbeute. Die Proben wurden im Jahr 2017 geerntet, mit Ausnahme von Broadview-00 und -01.

Material	Sorte	Barcode	LAB-ID	Ursprungsland	c [ng/μL] Quantus™
Blatt	Vina	V-00-19092017	V 00	Schweiz	4,29
		V-01-25092017	V 01	USA	9,80
Samen	Broadview	17-CH-002-TG-BV-WG	BV 01	Schweiz	8,20
Samen	Chandler	17-US-005-CA-CH-WFF	CH 01	USA	1,53
		17-TR-001-KC-CH-WG	CH 02	Türkei	2,11
Samen	Fernette	17-CH-003-TG-FT-WG	FT 01	Schweiz	17,0
Samen	Fernor	17-FR-027--FE-WG	FE 01	Frankreich	4,59
		17-FR-015-NA-FE-WS	FE 02	Frankreich	7,00
Samen	Franquette	17-US-004-CA-FR-WFF	FQ 01	USA	0,95
		17-FR-025-NB-FR-WG	FQ 02	Frankreich	3,40
Samen	Geisenheim 26	17-DE-011-BW-26-WG	26 01	Deutschland	2,89
		17-CH-004-TG-26-WG	26 02	Schweiz	3,26
Samen	Lara	17-FR-026-NB-LA-WG	LA 01	Frankreich	6,40
		17-FR-009-NA-LA-WS	LA 01	Frankreich	4,33
Samen	Parisienne	17-CH-005-TG-PA-WG	PA 01	Schweiz	2,16
Samen	Serr	17-CL-001-NB-SR-WG	S 01	Chile	7,90
Samen	Vina	17-CH-001-TG-VI-WG	V 01	Schweiz	4,95
		17-US-003-CA-VI-WFF	V 02	USA	2,25

## 9.4.2 Gesamt-DNA-Isolierung aus dem Walnussperikarp

Tab. 62: Auflistung der Walnussproben für die Isolierung der Gesamt-DNA aus dem Walnussperikarp unter Angabe der Sorte, des Barcodes, der LAB-ID und des Ursprungslandes.

<b>Probe</b>	<b>Barcode</b>	<b>LAB-ID</b>	<b>Ursprungsland</b>
Franquette	18-FR-040-OZ-FR-WG	FQ 11	Frankreich
Franquette	18-FR-038-AR-FR-WG	FQ 03	Frankreich
Nr. 26	17-DE-011-BW-26-WG	26 26	Deutschland
Nr. 26	18-CH-006-TG-26-WG	26 06	Schweiz
Chandler	18-IT-008-RO-CH-WG	CH 08	Italien
Chandler	18-IT-014-CN-CH-WG	CH 14	Italien
Vina	18-CH-012-TG-VI-WG	V I	Schweiz
Vina	18-CH-012-TG-VI-WG	V II	Schweiz
Lara	18-FR-032-GE-LA-WG	LA 10	Frankreich
Lara	18-FR-030-AR-LA-WG	LA 03	Frankreich
Broadview	18-CH-011-TG-BV-WG	BV I	Schweiz
Broadview	18-CH-011-TG-BV-WG	BV II	Schweiz
Howard	17-US-001-NB-Ho-WFF	HW 07	USA
Howard	17-US-008-NB-HO-WG	HW 08	USA
Pedro	18-CH-009-TG-PE-WG	P I	Schweiz
Pedro	18-CH-009-TG-PE-WG	P II	Schweiz
Fernor	18-FR-037-GE-FE-WG	FE 10	Frankreich
Fernor	18-CH-016-TG-FE-WG	FE 16	Schweiz
Fernette	18-CH-008-TG-FT-WG	FT I	Schweiz
Fernette	18-CH-008-TG-FT-WG	FT II	Schweiz
Serr	18-CL-005-NB-SR-WG	S 05	Chile
Serr	18-CH-010-TG-PA-WG	S 10	Schweiz
Hartley	18-CH-007-TG-HY-WG	HA 07	Schweiz
Hartley	18-DE-020-HE-HY-WG	HA 02	Deutschland

Tab. 63: Ergebnisse der Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen vor und nach der Aufreinigung der Isolate der authentischen Walnusschalenproben Bestimmung 1 mit dem Monarch®Kit.

Sorte	LAB-ID	Anzahl Ansätze; Σ Einwaage [mg]	vor Aufreinigung (50 µL Isolat)			nach Aufreinigung (20 µL Isolat)		
			Konz. [ng/µL]	260/280	260/230	Konz. [ng/µL]	260/280	260/230
Franquette	FQ 11	6; 984,4	28	1,96	2,40	48	1,89	2,10
Nr. 26	Nr. 26 26	8; 1314	6,7	1,73	1,75	15	1,87	1,90
Chandler	CH 08	6; 990,3	19	2,00	2,35	35	1,78	1,36
Vina	V I	2; 330,9	9	1,82	1,80	17	1,97	1,30
Lara	LA 10	10; 1643,4	17	2,01	2,37	29	1,89	1,66
Broadview	BV I	4; 669,7	4,41	1,92	1,82	8,2	1,89	1,68
Pedro	P I	6; 988,6	7,1	2,05	2,56	14	2,06	1,85
Fernor	FE 10	8; 1304,1	5,6	1,76	1,36	8,0	1,87	1,27
Fernette	FT I	4; 659,3	2,70	2,21	2,91	3,48	2,20	0,94
Serr	S 05	8; 1323,1	1,71	1,42	1,23	3,13	2,03	1,09
Hartley	HA 07 I	4; 615,6	7,2	2,17	2,35	15	1,82	1,08
	HA 07 II	4; 660,2	13	1,99	1,30	23	1,85	1,36

Tab. 64: Ergebnisse der Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen vor und nach der Aufreinigung der Isolate der authentischen Walnusschalenproben Bestimmung 2 mit dem Monarch®Kit.

Sorte	LAB-ID	Anzahl Ansätze; Σ Einwaage [mg]	vor Aufreinigung (50 µL Isolat)			nach Aufreinigung (20 µL Isolat)		
			Konz. [ng/µL]	260/280	260/230	Konz. [ng/µL]	260/280	260/230
Franquette	FQ 03	8; 1327,9	6,2	1,98	2,29	6,5	1,88	1,76
Nr. 26	Nr. 26 06	6; 977,8	5,8	1,90	2,11	5,6	1,87	1,45
Chandler	CH 14	8; 1316,9	27	1,88	1,84	36	1,79	1,53
Vina	V II	2; 330,3	6,2	1,70	1,52	9,4	1,90	1,37
Lara	LA 03	10; 1602,8	45	2,12	2,45	49	1,92	1,69
Broadview	BV II	6; 1000	4,16	1,82	1,74	5,1	1,85	1,52
Howard	HW 08	4; 660,6	7,6	1,99	2,52	9,7	1,75	1,11
Pedro	P II	8; 1307,5	6,2	1,83	1,61	11	1,77	1,23
Fernor	FE 16	8; 1300	4,01	1,80	1,95	4,81	1,72	1,27
Fernette	FT II	4; 665	3,41	1,50	1,24	4,34	1,74	1,12
Serr	S 10	4; 657,9	4,25	1,97	1,56	7	1,74	1,14
Hartley	HA 02	8; 1306,5	8,9	1,87	1,76	11	1,78	1,18

## 9.4.3 DNA-Isolierung der cpDNA

Tab. 65: Auflistung der Walnussproben für die Isolierung der Gesamt-DNA unter Angabe der Sorte, des Barcodes, des Ausgangsmaterials und der LAB-ID.

Material	Sorte	Barcode	LAB-ID
Blatt	Broadview	BV-02-12072017	Broadview 01
		BV-03-19092017	Broadview 02
Blatt	Chandler	CH-01-02082017	Chandler 01
		CH-02-19092017	Chandler 02
Blatt	Fernette	FT-00-02082017	Fernette
Blatt	Fernor	FE-02-25082017	Fernor 01
		FE-03-19092017	Fernor 02
Blatt	Franquette	FQ-02-16062017	Franquette 02
		FQ-08-19092017	Franquette 01
Blatt	Geisenheim 26	26-00-16062017	Nr. 26 01
		26-03-17072017	Nr. 26 02
Blatt	Hartley	HA-01-19092017	Hartley 01
		HA-02-25092017	Hartley 02
Nuss	Howard	16-US-001-NB-HO-WG	Howard 01
		17-US-006-CA-HO-WFF	Howard 02
		17-US-008-NB-HO-WG	Howard 03
Blatt	Lara	LA-04-25082017	Lara 01
		LA-05-19092017	Lara 05
Blatt	Pedro	P-00-19092017	Pedro 01
		P-01-05102017	Pedro 02
Blatt	Serr	S-00-02082017	Serr 01
		S-01-19092017	Serr 02
Blatt	Vina	V-00-19092017	Vina 01
		V-01-25092017	Vina 02

Tab. 66: Ergebnisse der Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen vor und nach der Aufreinigung der Isolate der authentischen Sequenzierproben.

Probe	280/260	260/230	c [ng/μL] Quantus™	c [ng/μL] Quantus™ (nach Aufreinigung)
Franquette 01	2.07	2.38	107.05	86 (20 μL)
Franquette 02	2.06	1.97	23.09	66.09 (20 μL)
Nr. 26 01	1.97	2.37	95.07	120 (25 μL)
Nr. 26 02	1.86	1.65	22.07	48 (25 μL)
Chandler 01	2.03	2.31	97.09	98 (25 μL)
Chandler 02	2.11	2.38	67.09	76 (25 μL)
Vina 01	2.11	2.40	91.09	101 (25 μL)
Vina 02	1.90	2.11	108	97 (25 μL)
Lara 01	2.09	2.30	83.09	103 (25 μL)
Lara 02	1.93	2.16	94	96 (25 μL)
Broadview 01	2.12	2.42	83	109 (25 μL)
Broadview 02	1.98	2.38	79.33	220 (25 μL)
Pedro 01	2.08	2.34	68	95 (25 μL)
Pedro 02	1.89	2.10	8.8	28 (25 μL)
Fernor 01	2.01	2.31	74	101 (25 μL)
Fernor 02	2.01	2.33	82	120 (25 μL)
Fernette	2.02	2.29	48	72 (25 μL)
Serr 01	1.98	2.26	80	103 (25 μL)
Serr 02	2.14	2.48	101	108 (25 μL)
Hartley 01	2.06	2.26	57	92 (25 μL)
Hartley 02	2.01	2.34	85	130 (25 μL)
Howard 01	1.93	1.14	24	50 (25 μL)
Howard 02	2.05	2.35	77	160 (25 μL)
Howard 03	1.92	2.35	77.06	120 (25 μL)

## 9.5 Polymerasekettenreaktion

### 9.5.1 Überprüfung der Chloroplasten-Isolate mittels PCR

#### Qualitative PCR

Tab. 67: Eigenständig entwickelte Primer für die qualitative PCR mit entsprechender Annealing-Temperatur und Länge des Amplifikationsproduktes.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]	Länge [bp]
ITS-Fw	5'-GATACCTGCCCAGCAGAACACC-3'	58,6	630
ITS-Rv	5'-CGATGGTAGAGTCGCAGGAACG-3'		
matK-Fw	5'-CCATTAGTAAGCTGACTCGGGCC-3'	58,6	350
matK-Rv	5'-TCATAATTGGCCTGCCATTGATGC-3'		
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	46,9	710
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC-3'		

### 9.5.2 Parameter zur Amplifizierung der spezifischen Genabschnitte auf dem Karyom

Tab. 68: Eigenständig entwickelte Primer der nukleären Genabschnitte mit entsprechender Annealing-Temperatur und Länge des Amplifikationsproduktes.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]	Länge [bp]
ADH1-Fw	5'-CACAGTGACAACCTTGGAACATGG-3'	55,9	1600
ADH1-Rv	5'-GGCACCAAGACCTGTGGATATTC-3'		
ADH2-Fw	5'-GCCACTTTGAATGTTGCAAAACCC-3'	63,2	1300
ADH2-Rv	5'-GGCAAAGGAAACATACGTAAATTTTATTCG-3'		
FAD <sub>2,1</sub> -Fw	5'-TGCTTGATGACATAGTTGGTC-3'	58,1	700
FAD <sub>2,1</sub> -Rv	5'-TTGATCGCCTTTGTAGCTTC-3'		
FAD <sub>2,2</sub> -Fw	5'- CCACTATAACCCCTTACGGCCC-3'	63,1	700
FAD <sub>2,2</sub> -Rv	5'-CTACCACGACAAGGGGCTCAAG-3'		
WRKY-Fw	5'-ATTGCGAAACCAGTCGCATC-3'	53,5	1000
WRKY-Rv	5'-CCTTTGTAGACAATCTCTGCA-3'		

Tab. 69: Temperaturintervall des Thermocyclers der Gradienten-PCR.

Gen	T1 [°C]	T2 [°C]	T3 [°C]	T4 [°C]	T5 [°C]	T6 [°C]	Annealing-T [°C]
ADH1	-	-	-	-	-	-	55,9
ADH2	56,1	57,6	59,5	61,4	63,2	64,0	63,2
FAD <sub>2,1</sub>	40,4	44,0	48,8	53,5	58,1	60,0	58,1
FAD <sub>2,2</sub>	45,4	49,0	53,8	58,5	63,1	65,0	63,1
WRKY	40,4	44,0	48,8	53,5	58,1	60,0	53,5

Erste Sequenzierung

Tab. 70: Pipettierschema mit den variierten Parametern der einzelnen Komponenten für die erste Sequenzierung.

Genabschnitt	Konz. Primer [µM]	Konz. dNTPs [mM]	Probe [ng]/10 µL PCR-Ansatz	OneTaq®HotStart-DNA-Polymerase-Einheiten	Puffer-Einheiten
ADH1	0,4; 0,5	0,1	0,1; 0,2; 0,3; 0,4	0,25	1
ADH2	0,3; 0,4; 0,5	0,1	0,08; 0,09; 0,1	0,25	1
FAD <sub>2,1</sub>	0,3; 0,5	0,1	0,1	0,25	1
WRKY	0,5	0,1	0,1	0,25	1

Zweite Sequenzierung

Tab. 71: Pipettierschema mit den variierten Parametern der einzelnen Komponenten für die zweite Sequenzierung.

Genabschnitt	Konz. Primer [µM]	Konz. dNTPs [mM]	Probe [ng]/10 µL PCR-Ansatz	Polymerase-Einheiten	Puffer-Einheiten
FAD <sub>2,2</sub>	0,5; 0,8	0,5	1; 2	0,4	1
WRKY	0,8	0,5	1	0,4	1

Dritte Sequenzierung

Tab. 72: Pipettierschema mit den variierten Parametern der einzelnen Komponenten für die dritte Sequenzierung.

Genabschnitt	Konz. Primer [µM]	Konz. dNTPs [mM]	Probe [ng]/10 µL PCR-Ansatz	Polymerase-Einheiten	Puffer-Einheiten
ADH1	0,3; 0,4; 0,5; 0,8	0,5; 1	1	0,4 (OT) 0,25 (BT)	1
ADH2	0,4; 0,8	0,5; 1	1	0,4 (OT) 0,25 (BT)	1

Tab. 73: Pipettierschema mit den variierten Parametern der einzelnen Komponenten der dritten Sequenzierung für die *BiozymTaq-DNA-Polymerase* (BT) und der *OneTaq-Hottart-DNA-Polymerase* (OT).

Gen- abschnitt	Konz. Primer [ $\mu\text{M}$ ]	Konz. dNTPs [mM]	Probe [ng]/10 $\mu\text{L}$ PCR-Ansatz	Polymerase- Einheiten	Puffer- Einheiten	BSA- Einheiten
ADH1	0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8	0,1; 0,3; 0,5; 0,8	0,1; 0,2; 0,7; 1	0,25; 0,4 (beide Polymerasen)	1	0; 1
ADH2	0,4; 0,5; 0,6; 0,8	0,1; 0,3; 0,5; 0,8	0,1; 0,7; 1; 2	0,25; 0,4 (beide Polymerasen)	1	0; 1
FAD2.2	0,8	0,5	1	0,4 (OT)	1	0
WRKY	0,4; 0,5; 0,6; 0,8	0,1; 0,2; 0,5	0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1	0,25; 0,4 (OT)	1	0; 1

### 9.5.3 RFLP-PCR

Tab. 74: Eigens konzipierte Primer für die RFLP-PCR, für den ausgewählten SNP, die Sequenz und die Länge des Amplifikates und die DNA-Teilfragmente des enzymatischen Verdau.

Primer	SNP	Sequenz	Fragmentlänge [bp]
RFLP-ADH2-RV-FW	5	5'- CACATGAACATTACTTTAGA -3'	372
RFLP-ADH2-RV-RV		5'- GTTGAAACTAAAATTTGCCT-3'	106 + 262
RFLP-WRKY-FW-FW	11	5'- ATGCCTCACCGTCCAAT-3'	520
RFLP-WRKY-FW-RV		5'- GACTCTTTTACTTCAGAAGTATAC-3'	386 + 134
RFLP-ADH2RV 90FW	4	5'- ATGCCTCACCGTCCAAT-3'	401
RFLP-ADH2RV 90RV		5'- GATTCATTCAAGACTCATCC-3'	361 + 40
RFLP-ADH1RV 500FW	3	5'- GCTGAAAATACAACACTATTACAA-3'	502
RFLP-ADH1RV 500RV		5'- GTAAGCCACTGGTGATTG-3'	366 + 136
RFLP-ADH1FW 280FW	1	5'- CACAGTCAGAGACACGTA-3'	405
RFLP-ADH1FW 280RV		5'- CGAAGCAACTTGAAGACG-3'	204 + 201
RFLP-FAD2-FW	9	5'- AGAACTGGGAGGTCCAATTC-3'	422
RFLP-FAD2-RV		5'- GATTCCTCCGAGTGGGACT-3'	362 + 60

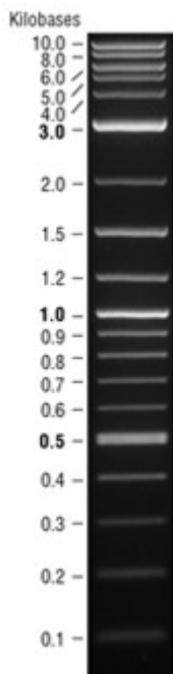


Abb. 66: Größenstandard des peqGOLD DNA Ladders für die Agarosegelelektrophorese.

Tab. 75: Schlüssel der verwendeten Abkürzungen zur Beschriftung der Auftragung der folgenden Abbildungen.

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
M	Marker	CH	Chandler	HW	Howard	S	Serr
NK	Negativkontrolle	V	Vina	P	Pedro	HA	Hartley
FQ	Franquette	FT	Fernette	LA	Lara	FE	Fernor
BV	Broadview	26	Geisenheim Nr. 26				

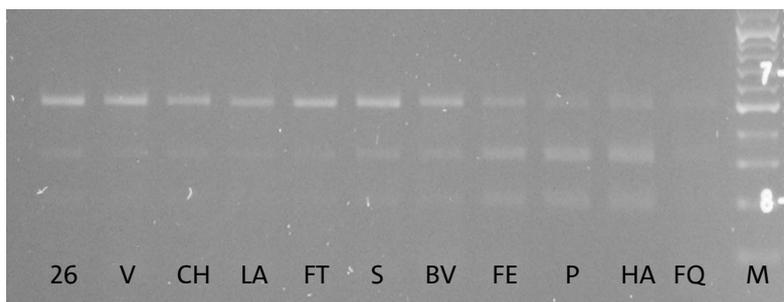


Abb. 67: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 1 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial.

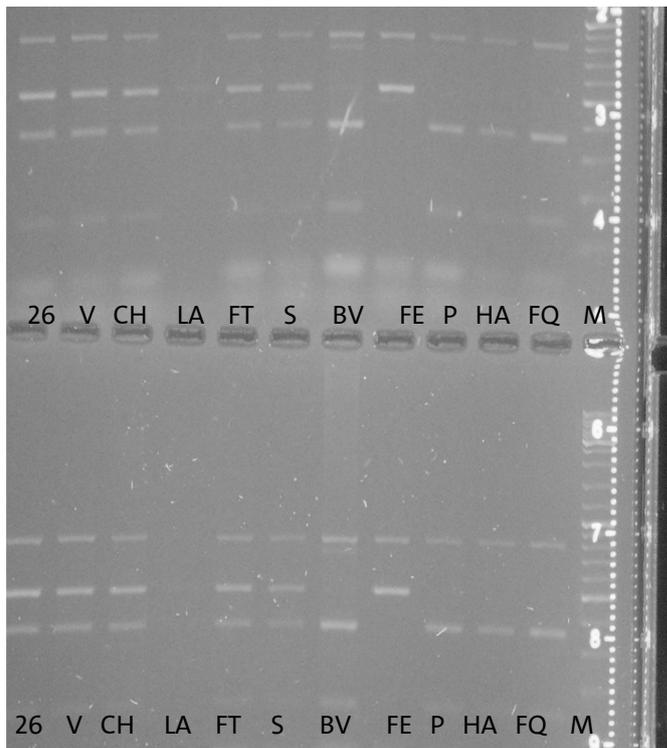


Abb. 68: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 3 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial.

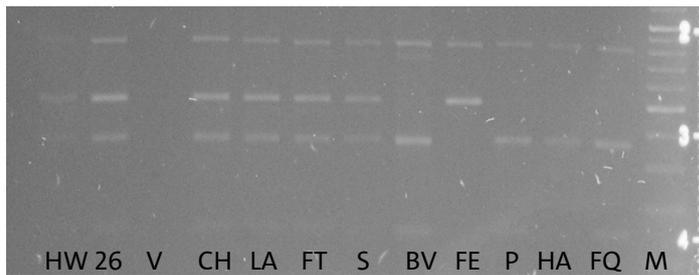


Abb. 69: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 3 mit den optimierten Parametern für das Walnussperikarp.

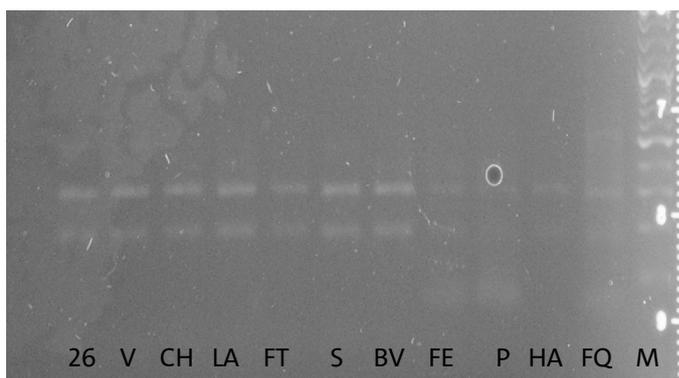


Abb. 70: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 5 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial.

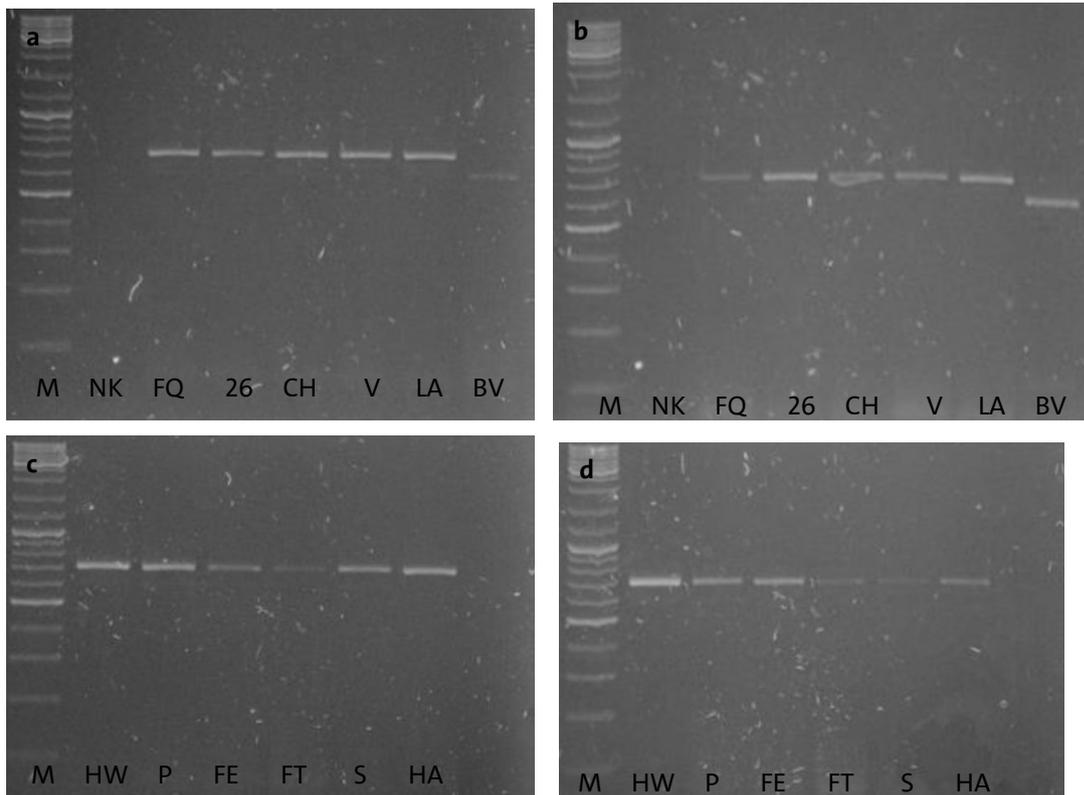


Abb. 71: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 9 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial, mit a und b für die erste und c und d für die zweite Analyse.

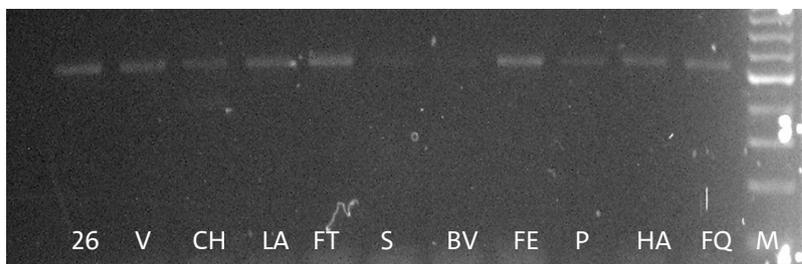


Abb. 72: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 11 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial.



Abb. 73: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 11 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial.

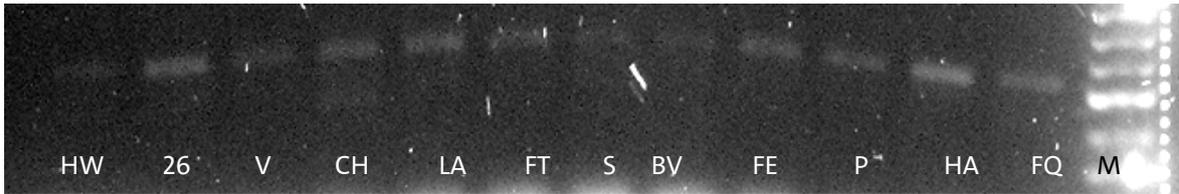


Abb. 74: Überprüfung der authentischen Sorten an der Stelle des SNP Nr. 11 mit den optimierten Parametern für das Blattmaterial.

#### 9.5.4 ARMS-PCR

Tab. 76: Eigens konzipierte Primer für die ARMS-PCR.

Primer	Sequenz	Fragmentlänge [bp]
OFW WRKY1	5'-CAAAGACTGTGAGGTTCAAGC-3'	500
ORV WRKY1	5'-GACCAGTACTGAAATTCCTG-3'	
IFW-WRKY-WT (A-Allel)	5'-CTCATCTTCTGATCTTTCTAATCGA-3'	370
IFW-WRKY-MT (C-Allel)	5'-CTCATCTTCTGATCTTTCTAATCGC-3'	370

#### Mutante

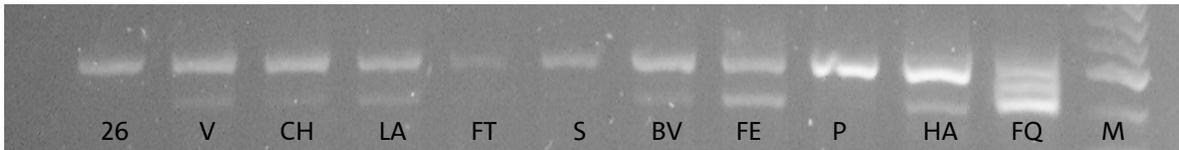


Abb. 75: Visualisierung der ARMS-PCR der ersten authentischen Blattproben der Mutante, die Beschriftung befindet sich im Kapitel 10.5.3 in Tabelle 91.

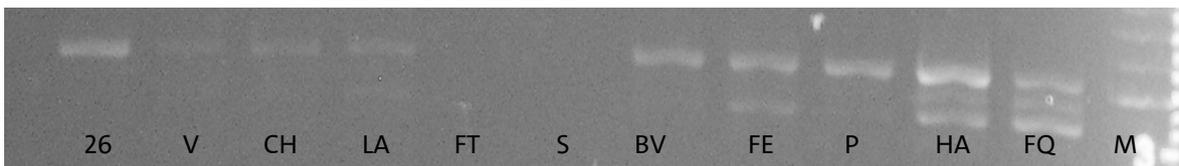


Abb. 76: Visualisierung der ARMS-PCR der zweiten authentischen Blattproben der Mutante.



Abb. 77: Wiederholung der ARMS-PCR zur besseren Differenzierung der Sorten Vina, Chandler, Fernette, Serr und Broadview.

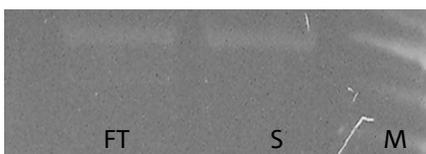


Abb. 78: Wiederholung der ARMS-PCR Wiederholung zur besseren Differenzierung der Sorten Fernette und Serr.

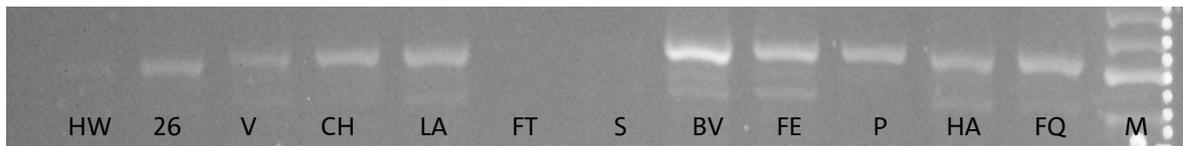


Abb. 79: Visualisierung der ARMS-PCR des authentischen Walnussperikarps der Mutante.

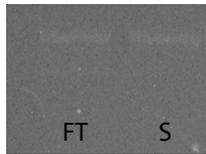


Abb. 80: Wiederholung der ARMS-PCR Wiederholung zur besseren Differenzierung der Sorten Fernette und Serr.

Wildtyp

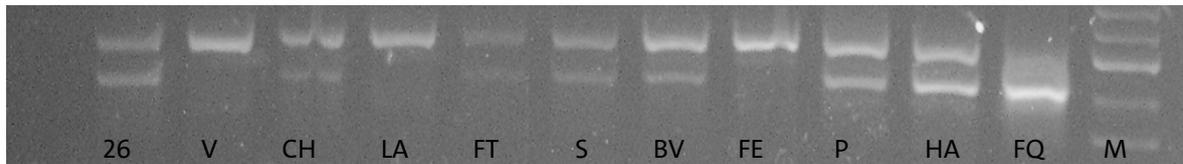


Abb. 81: Visualisierung der ARMS-PCR der ersten authentischen Blattproben des Wildtypes, die Beschriftung befindet sich im Kapitel 10.5.3 in Tabelle 91.

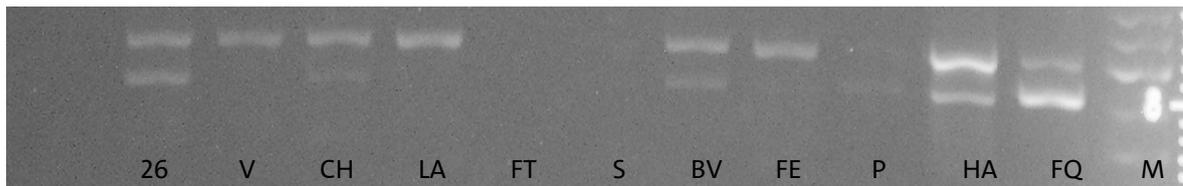


Abb. 82: Visualisierung der ARMS-PCR der zweiten authentischen Blattproben des Wildtypes.

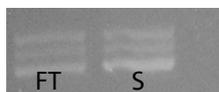


Abb. 83: Wiederholung der ARMS-PCR Wiederholung zur besseren Differenzierung der Sorten Fernette und Serr.

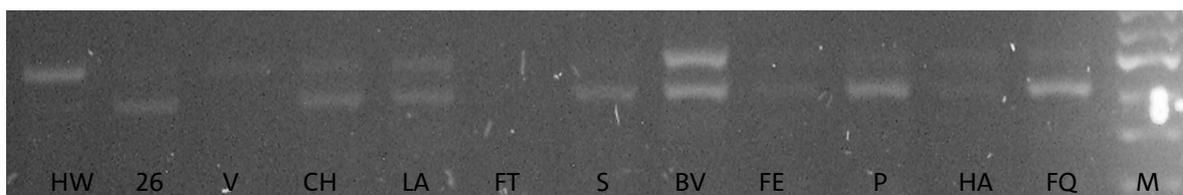


Abb. 84: Visualisierung der ARMS-PCR des authentischen Walnussperikarps der Mutante.



Abb. 85: Wiederholung der ARMS-PCR Wiederholung zur besseren Differenzierung der Sorten Serr, Fernette und Lara.

## 9.6 Sequenzierungen

## 9.6.1 Sanger-Sequenzierung

Tab. 77: Konzentrationen der PCR-Produkte für die einzelnen Genabschnitte der jeweiligen Sorten für die erste Sequenzierung. Hierbei steht X für keine Produktbildung.

Sorte	ADH1			ADH2			FAD <sub>2</sub>			WRKY1		
	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]
FQ 02	20	11	36	11	11	19	26	11	47	28	20	28
26 00	21	11	38	11	11	19	12	11	22	34	20	34
CH 01	26	11	48	17	11	31	23	11	41	47	20	47
V 01	19	11	34	12	11	22	4	5	16	11	11	21
LA 04	24	11	44	23	11	42	17	11	30	40	20	40
BV 03	22	11	41	20	11	37	26	11	48	36	20	36
HW 01	36	20	36	15	11	28	23	11	41	26	11	48
P 01	22	11	39	29	20	29	21	11	39	28	11	51
FE 02	14	11	25	16	11	29	4	5	16	23	11	42
FT 00	11	11	19	13	11	24	3	5	13	13	11	24
S 00	16	11	29	22	11	40	X	X	X	9	11	17
HA 00	13	11	24	45	20	45	22	11	40	73	20	73

Tab. 78: Konzentrationen der PCR-Produkte für die einzelnen Genabschnitte der jeweiligen Sorten für die zweite Sequenzierung. Hierbei steht X für keine Produktbildung.

Sorte	ADH1			ADH2			FAD <sub>2</sub>			WRKY1		
	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]
FQ 08	X	X	X	33	20	33	76	20	76	100	26	70
26 03	34	20	34	39	20	39	53	20	53	95	25	70
CH 02	31	20	31	35	20	35	61	20	61	115	29	70
V 00	32	20	32	23	11	42	66	20	66	92	24	70
LA 05	40	20	40	24	11	44	61	20	61	105	27,5	70
BV 02	X	X	X	25	11	46	37	20	37	67	20	67
HW 01	36	20	36	23	20	23	46	20	46	91	24,5	70
P 00	28	20	28	37	20	37	72	20	72	114	29	70
FE 01	X	X	X	19	10	38	38	20	38	98	26	70
FT 00	X	X	X	26	10	52	61	20	61	38	20	38
S 01	33	20	33	29	20	29	45	20	45	73	20	73
HA 01	44	20	44	24	20	24	61	20	61	97	25	97

Tab. 79: Konzentrationen der PCR-Produkte für die einzelnen Genabschnitte der jeweiligen Sorten für die dritte Sequenzierung.

Sorte	ADH1			ADH2			FAD <sub>2</sub>			WRKY1		
	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]	∑ Konz. [ng/μL]	gelöst in [μL]	Konz. jetzt [ng/μL]
FQ 02	28	11	50	26	11	48	46	20	46	90	24	70
26 00	28	11	51	62	20	62	39	20	39	X	X	X
CH 01	24	11	44	49	20	49	71	20	71	79	20	79
V 01	42	20	42	47	20	47	76	20	76	112	29	70
LA 04	38	20	38	52	20	52	72	20	72	X	X	X
BV 03	41	20	41	23	11	42	57	20	57	X	X	X
HW 01	36	20	36	48	20	48	64	20	64	71	20	71
P 01	24	20	43	32	20	32	43	20	43	83	20	83
FE 02	28	20	28	25	20	25	60	20	60	119	30,5	70
FT 00	13	10	26	26	20	26	87	20	87	40	20	40
S 00	25	20	25	21	20	63	60	20	60	28	20	28
HA 00	24	20	24	41	20	41	28	20	28	X	X	X

## 9.6.2 Next-Generation Sequenzierung

Tab. 80: Auswahl der Adapterkombinationen der jeweiligen Proben für die *Next-Generation* Sequenzierung.

<b>Probe</b>	<b>Adapter P7</b>	<b>Adapter P5</b>
Franquette 01	H 705	H 503
Franquette 02	H 706	H 505
Nr. 26 01	H 711	H 506
Nr. 26 02	H 714	H 517
Chandler 01	H 707	H 506
Chandler 02	H 710	H 517
Vina 01	H 705	H 503
Vina 02	H 706	H 505
Lara 01	H 707	H 506
Lara 02	H 710	H 517
Broadview 01	H 710	H 503
Broadview 02	H 711	H 505
Pedro 01	H 706	H 506
Pedro 02	H 707	H 505
Fernor 01	H 714	H 506
Fernor 02	H 705	H 505
Fernette	H 705	H 517
Serr 01	H 707	H 503
Serr 02	H 710	H 505
Hartley 01	H 705	H 506
Hartley 02	H 706	H 517
Howard 01	H 711	H 503
Howard 02	H 714	H 505
Howard 03	H 706	H 503

Tab. 81: Fragmentlängen der jeweiligen *Libraries* nach dem Restriktionsverdau, die anhand des Bioanalyzers ermittelt wurden und die daraus abgeleitete Konzentration.

<b>Probe</b>	<b>Fragmentlänge [bp]</b>	<b>Konzentration [nM]</b>
Franquette 01	730	3.94
Franquette 02	588	3.92
Nr. 26 01	754	4.17
Nr. 26 02	593	4.09
Chandler 01	619	3.72
Chandler 02	609	3.76
Vina 01	586	4.16
Vina 02	629	4.26
Lara 01	642	4.06
Lara 02	644	3.91
Broadview 01	748	4.09
Broadview 02	713	3.85
Pedro 01	801	4.18
Pedro 02	618	3.97
Fernor 01	618	4.07
Fernor 02	781	4.15
Fernette	761	3.92
Serr 01	741	4.07
Serr 02	798	4.01
Hartley 01	737	4.11
Hartley 02	790	4.03
Howard 01	647	3.04
Howard 02	548	4.01
Howard 03	806	3.97

Tab. 82: Ergebnisse der Sequenzierungen unter Angabe der Acession Number, Paired-End Reads, Mapped Reads, die durchschnittliche Coverage und die prozentuale Abdeckung des Chloroplasten-Genoms.

Sorte	Acession Number	Gesamt paired-end Reads	Mapped Reads	Mapped Reads [%]	Durch. Coverage	% Abdeckung des Chloroplasten-Genom
Broadview	MN397924	1091176	46264	4.24	36.4 ± 14.9	100
Broadview	-	1130432	30949	2.74	25.2 ± 10.8	100
Chandler	MN397925	497860	20830	4.18	17.8 ± 8.3	100
Chandler	-	464756	7025	1.51	5.41 ± 5.40	96.1
Fernette	MN397926	22784032	1359027	5.96	1118 ± 419	100
Fernor	-	1167020	22640	1.94	17.4 ± 12.5	100
Fernor	MN397927	1164818	45554	3.91	37.2 ± 19.4	100
Franquette	-	576956	21512	3.73	18.2 ± 10.9	100
Franquette	MN397928	443042	25590	5.78	22.3 ± 10.2	100
Geisenheim 26	MN397929	1270004	28771	2.27	22.7 ± 11.5	100
Geisenheim 26	-	1032072	1997	0.19	1.18 ± 4.17	37.9
Hartley	MN397930	1339334	61765	4.61	50.3 ± 18.0	100
Hartley	-	1129800	44358	3.93	36.1 ± 14.4	100
Howard	MN397931	1049592	629358	59.9	529 ± 234	100
Howard	-	1084282	55619	5.13	46.6 ± 13.6	100
Howard	-	1003160	10297	1.03	7.89 ± 6.40	99.5
Lara	-	1146706	23150	2.02	18.3 ± 11.1	100
Lara	MN397932	1108086	59156	5.34	46.9 ± 18.0	100
Pedro	MN397933	1180994	53216	4.51	42.9 ± 26.3	100
Pedro	-	1319144	6589	0.50	3.84 ± 6.03	89.2
Serr	-	1193884	46573	3.90	37.5 ± 14.4	100
Serr	MN397934	1124886	78267	6.96	63.2 ± 22.9	100
Vina	MN397935	1266008	42894	3.39	34.3 ± 23.3	100
Vina	-	1283590	13794	1.07	10.4 ± 10.5	99.7

## 9.7 Non-targeted DNA-Analysen

### 9.7.1 RAPD-Analyse

Tab. 83: Temperaturintervall des Thermocyclers der Gradienten-PCR.

Position Nr.	1	2	3	4	5	6
Temperatur [°C]	30,4	34	38,8	43,5	48,1	50

Tab. 84: Auflistung der verwendeten Primer mit den Sequenzen, Annealing-Temperatur und der Literaturquelle.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]	Literatur
DAF14	5'-GCGGCTGCGC-3'	44,0	Projektpartner Agrolab/Tichy
OPA08	5'-GTGACGTAGG-3'	36,0	Gawel und Jarret 1991
OPC15	5'-GACGGATCAG-3'	48,0	Francesca <i>et al.</i> 2010
OPE 14	5'-TGGCGCTGAG-3'	38	
ROTH-A01	5'-CAGGCCCTTC-3'	34,0	Roth GmbH+Co. KG 2019
ROTH-A07	5'-GAAACGGGTG-3'	44,0	
ROTH-A10	5'-GTGATCGCAG-3'	48,0	
ROTH-A11	5'-CAATCGCCGT-3'	48,0	
ROTH-A17	5'-GACCGCTTGT-3'	44,0	
S32	5'-TCGGCGATAG-3'	34,0	Erturk und Dalkilic 2011

Tab. 85: Auflistung der positiv getesteten Primer in Abhängigkeit ihres optimalen Reaktionsansatzes für Walnussblätter.

Primer	Wasser [µL]	Puffer [µL]	dNTPs [µL]	Primer [µL]	<i>DreamTaq</i> -DNA-Polymerase [µL]	Template [ng/µL]
DAF 14	5,2	1	1	0,7	0,1	2
OPA 08	5,9	1	1	1	0,1	1
OPC 15	5,9	1	1	1	0,1	1
OPE 14	5,9	1	1	1	0,1	1
ROTH-A 01	6,4	1	1	1	0,1	0,5
ROTH-A 07	6,15	1	1	1	0,1	0,75
ROTH-A 09	6,4	1	1	1	0,1	0,5
ROTH-A 10	5,9	1	1	1	0,1	1
ROTH-A 11	5,9	1	1	1	0,1	1
ROTH-A 17	4,95	1	1	1	0,05	2
S 32	4,9	1	1	1	0,1	2
S 35	4,9	1	1	1	0,1	2

Tab. 86: Auflistung der positiv getesteten Primer in Abhängigkeit ihres optimalen Reaktionsansatzes für Walnussperikarp.

Primer	Wasser [ $\mu\text{L}$ ]	Puffer [ $\mu\text{L}$ ]	dNTPs [ $\mu\text{L}$ ]	Primer [ $\mu\text{L}$ ]	<i>DreamTaq</i> -DNA-Polymerase [ $\mu\text{L}$ ]	Template [ng/ $\mu\text{L}$ ]
DAF14	6,95	1	0,5	0,5	0,05	1
OPA08	5,95	1	1	1	0,05	1
OPC15	6,85	1	1	0,1	0,05	1
ROTH-A01	6,95	1	0,5	1	0,05	0,5
ROTH-A07	5,95	1	1	1	0,05	1
ROTH-A10	6,45	1	1	1	0,05	0,5
ROTH-A11	7,35	1	0,1	0,5	0,05	1
ROTH-A17	5,95	1	1	1	0,05	1
S32	6,95	1	0,5	1	0,05	0,5

Tab. 87: Volumina des Farbstoffes für die Gelelektrophorese.

Primer	GelRed® [ $\mu\text{L}$ ] (Blattmaterial)	GelRed® [ $\mu\text{L}$ ] (Schalenmaterial)
DAF 14	2	1,5
OPA 08	1,5	1,5
OPC 15	2	1,5
OPE 14	1,5	-
ROTH-A01	1,5	2
ROTH-A07	2	2
ROTH-A09	1,5	-
ROTH-A10	1,25	2
ROTH-A11	1,5	1,5
ROTH-A17	1,5	2
S 32	2	1,5
S 35	2	-

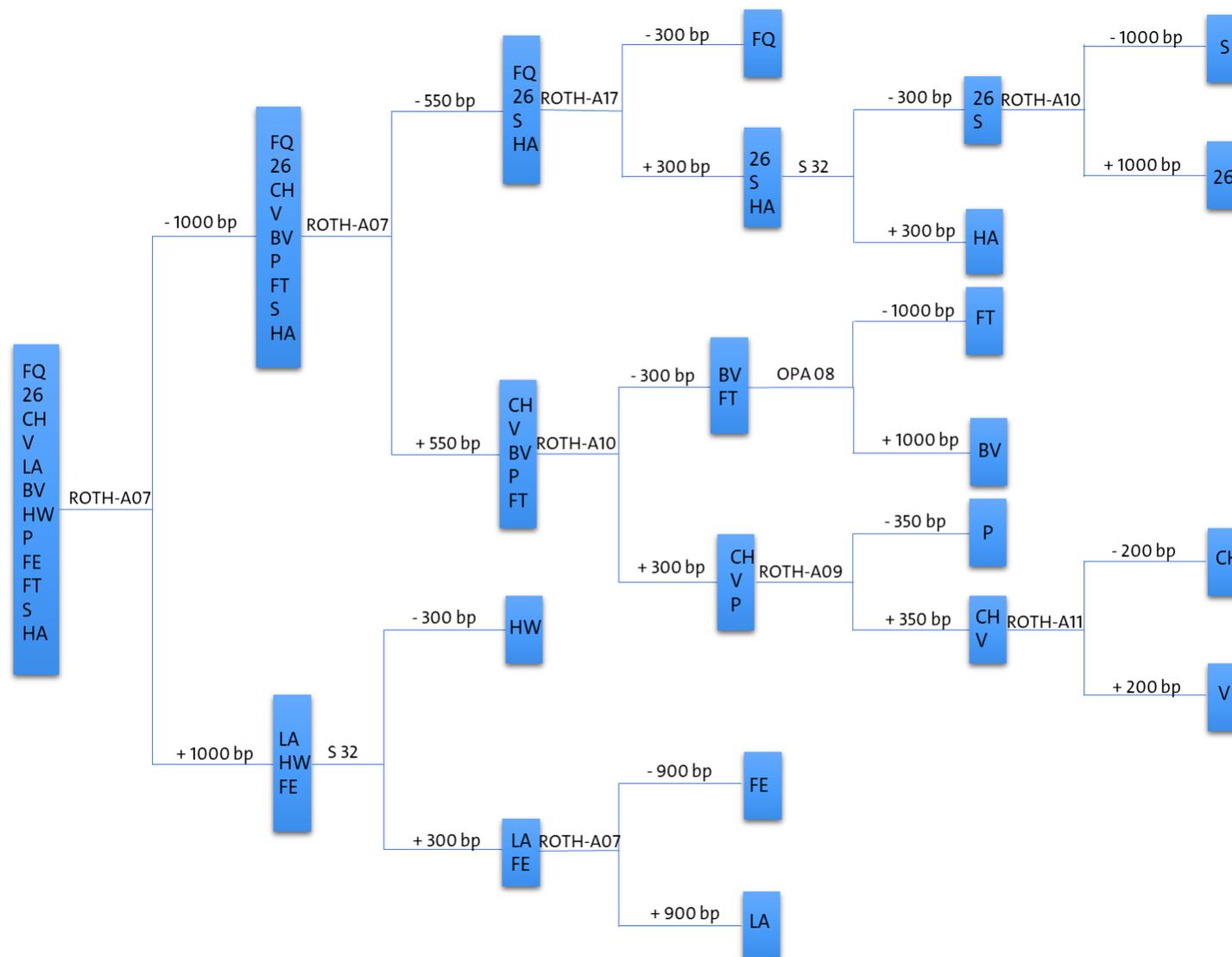


Abb. 86: Fließschema zur Bestimmung der authentischen Sorten anhand des Blattmaterials.

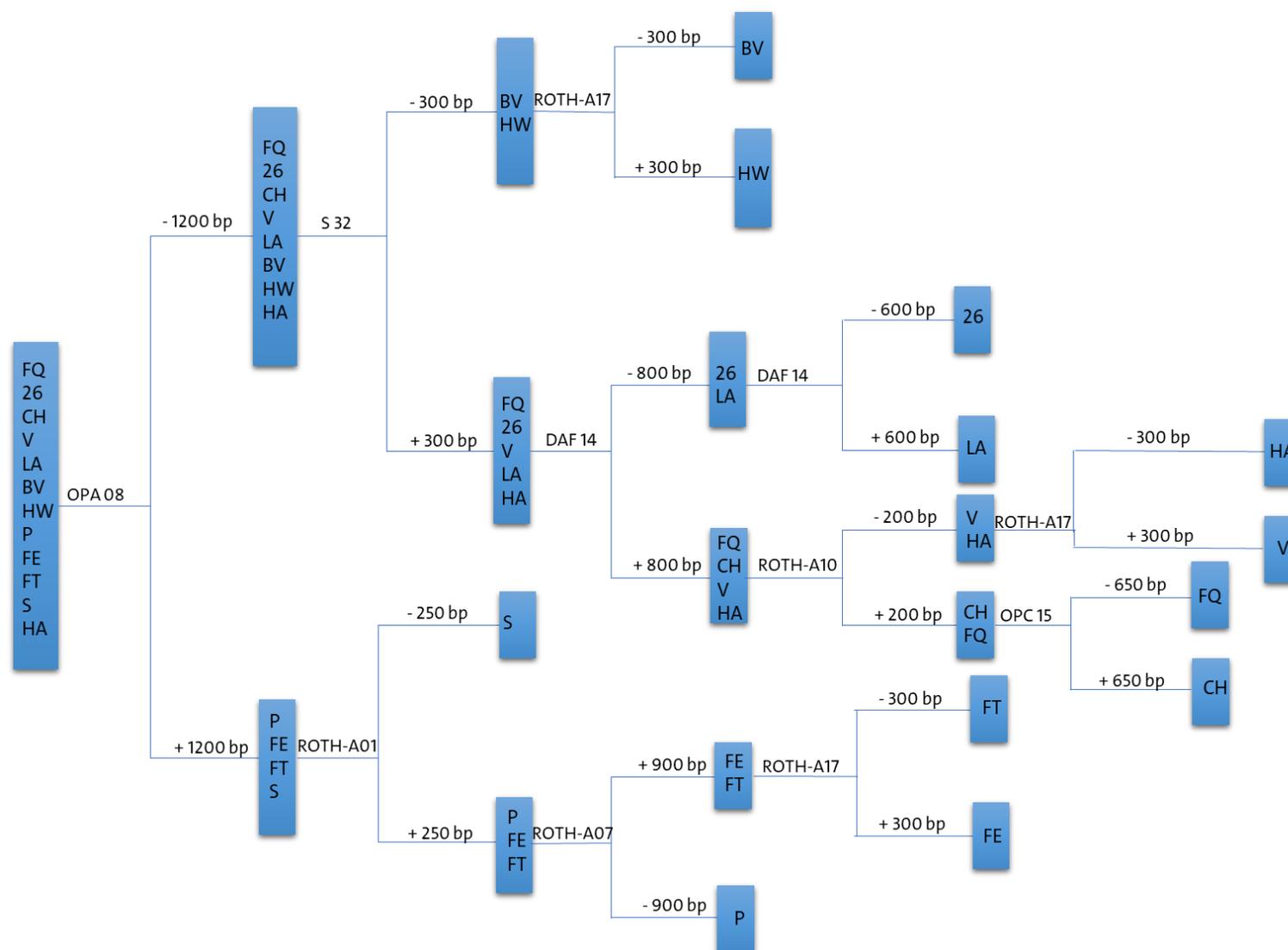


Abb. 87: Fließschema zur Bestimmung der authentischen Sorten anhand des Walnussperikarps.

## 9.7.2 Mikrosatelliten-Analyse

Tab. 88: Auflistung der verwendeten Primer und die dazugehörige Literaturquelle.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]	Literatur	
WJR031-Fw	5'-AGCTTCCCCATTCTCCTAA-3'	62,0	Chen <i>et al.</i> 2014	
WJR031-Rv	5'-GGACCTCCACAACCAAAAGA-3'			
WJR069-Fw	5'-CAGTACCCTTGGTTGAAGGA-3'	60,0		
WJR069-Rv	5'-GTGCATTAGTGCCCAAACCT-3'			
WJR265-FW	5'-TGGCTATTGCAAATCAGGTC-3'	62,0		
WJR265-Rv	5'-CAAAGCATGTAGGTCGGGT-3'			
WJR281-Fw	5'-TTCCATGGCTCTCTACCACA-3'	62,0		
WJR281-Rv	5'-ATGGAGCTGGTTCCTGACAC-3'			
WGA-01-Fw	5'-ATTGGAAGGGAAGGGAAATG-3'	60,0		Aradhya <i>et al.</i> 2010 Wang <i>et al.</i> 2008 Woeste <i>et al.</i> 2002
WGA-01-Rv	5'-CGCGCACATACGTAAATCAC-3'			
WGA-42-Fw	5'-GTGGGTCGACCGTGAAC-3'	60,0		
WGA-42-Rv	5'-AACTTGCACCACATCCACA-3'			
WGA-69-Fw	5'-TTAGTTAGCAAACCCACCCG-3'	62,0		
WGA-69-Rv	5'-AGATGCACAGACCAACCCTC-3'			
WGA-70-Fw	5'-TGTAATTGGGGAATGTTGCA-3'	55,0		
WGA-70-Rv	5'-TGGGAGACACAATGATCGAA-3'			
WGA-76-Fw	5'-AGGGCACTCCCTTATGAGGT-3'	53,0		
WGA-76-Rv	5'-CAGTCTCATTCCCTTTTCC-3'			
WGA-89-Fw	5'-ACCCATCTTTCACGTGTGTG-3'	60,0		
WGA-89-Rv	5'-TGCCTAATTAGCAATTTCCA-3'			

Analyse des Samen- und Blattmaterials

Tab. 89: Temperaturintervall für die Gradienten-PCR.

Position Nr.	1	2	3	4	5	6
Temperatur [°C]	54,0	56,0	58,4	59,6	62,0	64,0

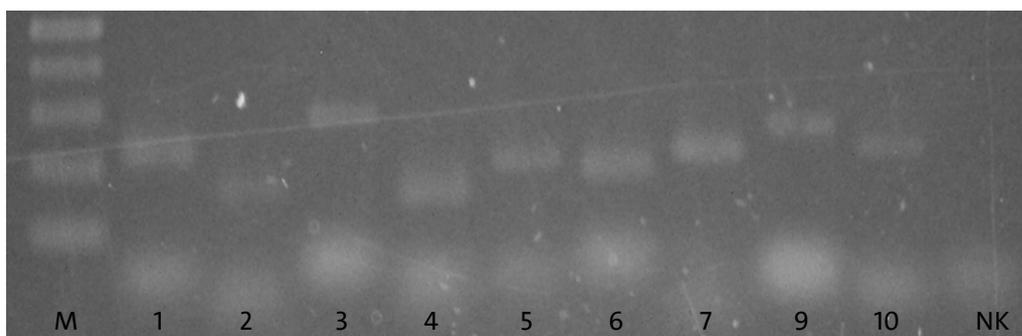


Abb. 88: Agarosegel Fernor Blattprobe FE-01-02082017 (Positionen siehe Tabelle 106).

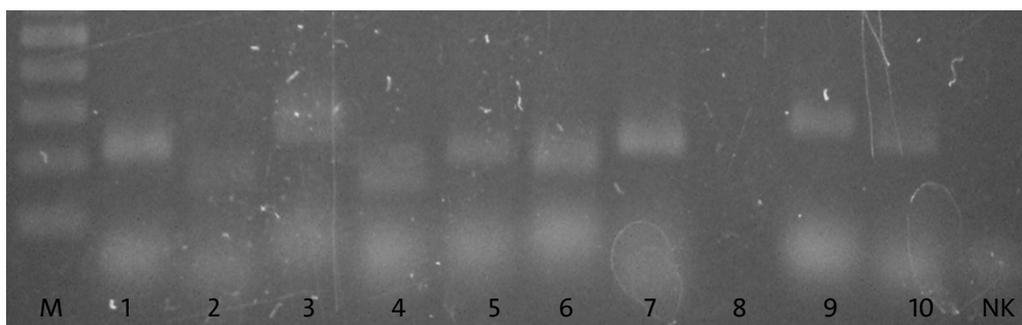


Abb. 89: Agarosegel Fernor Samenprobe 17-FR-027-FE-WG (Positionen siehe Tabelle 106).

Tab. 90: Primer an der jeweiligen Position in den Abbildungen 86 und 87.

Position	Primer
M	Marker
1	WJR031
2	WJR069
3	WJR265
4	WJR281
5	WGA-01
6	WGA-69
7	WGA-42
(8)	(WGA-70)
9	WGA-76
10	WGA-89
NK	Negativkontrolle

Tab. 91: Zusammenfassung der Primergruppen für die simultane Analyse bei der Kapillargelelektrophorese.

Gruppe Nr.	Primer	Fluoreszenzmarkierung
1	WJR031	FAM
	WJR069	HEX
	WJR265	ATTO 565
2	WJR281	FAM
	WGA-01	HEX
	WGA-69	ATTO 565
3	WGA-042	FAM
	WGA-70	HEX
	WGA76	ATTO 565
4	WGA89	FAM

Tab. 92: Methodenparameter des Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers.

Bezeichnung	Parameter
Anodenpuffer	ABC
Application Type	Fragment
Capillary Array	Länge: 50 cm Kapillareinheiten: 8 Seriennummer: L511D1909, Lot: 19
Data Delay	1 sec
Dye Set	G5
Injection Time	8 sec
Injection Voltage	1,6 kV
Kathodenpuffer	CBC
Oventemperature	60 °C
Polymer	POP-7
PreRun Time	180 sec
PreRun Voltage	15 kV
Run Time	1330 sec
Run Voltage	17 kV

## Analyse des Walnussperikarps

Tab. 93: Zusammenfassung der Primergruppen für die simultane Analyse bei der Kapillargelelektrophorese.

Gruppe Nr.	Primer	Fluoreszenzmarkierung
1	WJR031	FAM
	WJR069	HEX
	WJR265	ATTO 565
2	WJR281	ATTO 565
	WGA42	FAM
3	WGA76	ATTO 565
	WGA89	FAM

Tab. 94: Einteilung der Proben und die Verwendung des jeweiligen Mastermix bei den entsprechenden Primern.

Primer Probe	Mastermix Nr.						
	WJR031	WJR069	WJR265	WJR281	WGA-42	WGA-76	WGA-89
FQ 11	1	1	-	1	1	2	1
FQ 03	1	1	-	1	1	2	2
26 26	1	1	1	1	2	1	2
26 06	1	1	2	1	3	2	1
CH 08	1	2	1	1	1	2	3
CH 14	1	1	2	2	4	2	2
V I	1	1	1	1	1	1	1
V II	1	1	2	2	4	1	4
LA 10	1	1	1	1	1	1	1
LA 03	2	4	4	1	2	1	3
BV I	1	1	1	1	3	4	2
BV II	1	2	1	1	1	4	1
HW 07	1	1	1	1	1	2	1
HW 08	1	4	2	1	1	1	4
P I	1	4	1	1	1	3	1
P II	1	1	1	1	1	2	2
FE 10	1	2	4	1	1	1	2
FE 16	1	1	2	1	2	1	1
FT I	1	1	1	1	1	3	1
FT II	1	1	2	2	4	5	1
S 05	2	3	4	1	1	1	1

Fortsetzung Tab. 94: Einteilung der Proben und die Verwendung des jeweiligen Mastermix bei den entsprechenden Primern.

## Mastermix Nr.

Primer Probe	Mastermix Nr.						
	WJR031	WJR069	WJR265	WJR281	WGA-42	WGA-76	WGA-89
HA 07	1	1	2	1	1	1	1
HA 02	1	1	1	1	1	2	1

Tab. 95: Auswertung der Ergebnisse der SSR-Analyse anhand einer 0/1-Matrix.

Walnuss-Primer	WJR031						WJR069					WJR281			
Marker Allele [bp]	206	209	219	223	229	231	143	145	149	154	158	138	144	155	163
Sorte															
Franquette	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Nr. 26	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Chandler	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Vina	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Lara	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
Broadview	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
Pedro	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
Fernor	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Fernette	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Serr	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
Hartley	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

Tab. 96: Auswertung der Ergebnisse der SSR-Analyse anhand einer 0/1-Matrix.

Walnuss-Primer	WJR265		WGA-42				WGA-76			WGA-89			
Marker Allele [bp]	228	266	207	231	242	246	230	239	246	212	216	219	221
Sorte													
Franquette	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Nr.26	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
Chandler	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
Vina	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
Lara	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Broadview	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1
Pedro	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
Fernor	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Fernette	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Serr	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
Hartley	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0

### 9.8 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde. In diese Arbeit eingebrachte Ergebnisse aus Praktika und Projektstudien entstammen meiner Anleitung.

Hamburg, 14.08.2023

Ort, Datum

Doreen Lackner, D. Lackner

Vorname und Nachname, Unterschrift