

**DNA-basierte Methoden zur Differenzierung der
ecuadorianischen Kakaosorten
Arriba und CCN-51**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg School of Food Science,
Institut für Lebensmittelchemie

vorgelegt von

Luise Herrmann

Hamburg 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2011 bis Mai 2014 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Markus Fischer und Dr. Ilka Haase an der Hamburg School of Food Science, Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

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

Tag der Disputation: 19. November 2015

Danksagung

Ich danke

meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Fischer für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die gewährten Freiheiten.

der ehemaligen Leiterin meines Arbeitskreises Dr. Ilka Haase für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die sehr gute und intensive Kooperation und das freundschaftliche Verhältnis.

der Leiterin des Arbeitskreises Biodiversität, Evolution und Ökologie Dr. Barbara Rudolph für ihre enorme Unterstützung.

Dr. Felix Focke für die gute Zusammenarbeit.

meinen zwei Diplomandinnen Nadine Barz und Maike Blauhut für ihren Ehrgeiz und ihr Talent im Labor, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr geholfen haben.

meinem verwandtschaftlichen Freund Tobias Herrmann, der unsere drei gemeinsamen Promotionsjahre sehr liebevoll bereichert und erheitert hat.

meinem Lieblingskollegen Tim Hünninger für einen intensiven und wunderbaren Alltag, meinen engsten Kommilitonen und Kommilitoninnen Ria Schwanke, Philipp Heiden, Jeannette Kayser und Sandra Lorenz für das gegenseitige Motivieren und Helfen während unseres Studiums sowie Holger Hecler und Thabo Getsome für die phantastische und Arbeitstempo erhöhende Musik während des Schreibens meiner Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt

meinen Eltern für ihr Interesse an meiner Arbeit sowie ihre finanzielle Zuwendung während meines Studiums.

meinem Verlobten Ákos Pécsi für seine Warmherzigkeit und mentale Unterstützung in den letzten Jahren.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Einheiten	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XIV
Zusammenfassung	XVII
Abstract	XVIII
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	2
2.1 Kakao	2
2.1.1 Botanische Einordnung, Morphologie und Sorten von <i>Theobroma cacao</i>	2
2.1.2 Kakaoverarbeitung	7
2.1.3 Kakaoanbau und – wirtschaft	10
2.1.4 Ecuador und die Kakaosorten Arriba und CCN-51	12
2.1.5 Rechtliche Einordnung von Edelmakao Produkten	14
2.2 DNA	15
2.2.1 DNA als Analyt	15
2.2.2 Plastidäre DNA	16
2.2.3 Sequenzen der Genome von <i>T. cacao</i>	18
2.3 Methoden	19
2.3.1 DNA-Isolierung und Charakterisierung der Isolate	19
2.3.2 Amplifikation der DNA – Polymerase chain reaction (PCR)	21
2.3.3 Detektion von PCR-Produkten	23
2.3.4 PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	26
2.3.5 <i>Ligation-dependent probe amplification</i> (LPA)	27
2.3.6 <i>High resolution melting analysis</i> (HRMA)	28
2.3.7 Sequenzierung	29
2.3.8 Mikrosatellitenanalyse	30
2.4 Molekularbiologische Arbeiten zu <i>Theobroma cacao</i>	31
2.5 Zielsetzung	32
2.5.1 Analytische Herangehensweise	33
2.5.2 Probenahme	33
3 Material und Methoden	34
3.1 Probenmaterial	34
3.2 PCR-Reagenzien, Enzyme, Kits, Puffer und Lösungen, Chemikalien, Geräte, Software und Primer	34
3.3 Isolierung von DNA	35
3.3.1 Isolierung von DNA aus Kakaobohnen und Schokolade	35
3.3.2 Isolierung von DNA aus Kakaoblättern ohne vorherige Chloroplastenisolierung	36
3.3.3 Isolierung von DNA aus Kakaoblättern mit vorheriger Chloroplastenisolierung	37

3.4	Überprüfung der DNA-Isolate	38
3.4.1	Gehaltsbestimmung	38
3.4.1.1	Fluorimetrisch	38
3.4.1.2	Photometrisch	38
3.4.2	Reinheitsbestimmung	38
3.5	PCR	39
3.5.1	Endpunkt-PCR	39
3.5.2	<i>Real-time</i> PCR	40
3.6	PCR-RFLP	41
3.7	AGE	41
3.8	dHPLC	42
3.9	CGE	42
3.10	Sequenzierung	43
3.10.1	Partiell	43
3.10.2	Gesamt-DNA	44
3.11	Mikrosatellitenanalyse	45
3.12	<i>Ligation Dependent Probe Amplification</i> (LPA)	45
3.13	<i>High Resolution Melting Analysis</i> (HRMA)	46
3.14	Herstellung definierter Mischungen beider Kakaosorten	46
4	Ergebnisse und Diskussion	47
4.1	DNA-Isolierung	47
4.2	Gesamtüberblick über die analytischen Pfade	50
4.3	Kerngenom	51
4.4	Das cpGenom und Sequenzierungen	54
4.4.1	Sequenzierung des cpGenoms mit vorheriger Chloroplasten-Isolierung	54
4.4.2	Sequenzierung des cpGenoms ohne vorherige Abtrennung der Chloroplasten	56
4.4.3	Sequenzierung der IRR	58
4.5	DNA-basierte Methoden aufgrund der unterschiedlichen Wiederholung des (TAAAG) _n -Repeats in der IRR	61
4.5.1	Detektion der verschiedenen (TAAAG) _n -Repeat-Längen nach der PCR	64
4.5.1.1	Detektion mittels AGE	64
4.5.1.2	Detektion mittels dHPLC	67
4.5.1.3	Detektion mittels CGE	70
4.5.1.4	Vergleich der Detektionsmethoden und des Probenmaterials	74
4.5.2	Bestimmung der Nachweisgrenze der entwickelten Methode	75
4.5.3	Ansätze zur Quantifizierung	75
4.5.3.1	Mischungen A und B der Kakaoblattproben	76
4.5.3.2	Mischungen A, B und C der Kakaobohnenproben	76
4.5.4	Anwendung auf die Matrix Schokolade	78
4.5.5	Zusammenfassung und Fazit	80
4.6	DNA-basierte Methoden aufgrund der SNPs im cpGenom von Arriba und CCN-51	81
4.6.1	Entwicklung der PCR-RFLP zur Differenzierung von Arriba und CCN-51	82
4.6.2	Durchführung der PCR-RFLP anhand der fünf SNPs	85
4.6.3	Bestimmung der Nachweisgrenze der entwickelten Methode	97

4.6.4	Ansätze zur Quantifizierung	97
4.6.4.1	Mischungen A und B der Kakaoblätter	98
4.6.4.2	Mischungen A, B und C der Kakaobohnen	98
4.6.5	Anwendung auf die Matrix Schokolade	100
4.6.6	Zusammenfassung und Fazit	101
4.7	Alternative Methoden	103
4.7.1	LPA	103
4.7.2	HRMA	105
4.8	Analytische Vorgehensweise	108
4.9	Mikrosatellitenanalyse	110
5	Anhang	119
5.1	Probenmaterial	119
5.2	Puffer, Kits, PCR-Reagenzien, Enzyme und Chemikalien	122
5.3	Geräte und Software	126
5.4	Primersequenzen	128
5.5	Isolierung von DNA mit vorheriger Abtrennung der Chloroplasten	132
5.6	Durchführung der LPA sowie der HRMA	133
5.7	Durch andere Teams publizierte Kakaochloroplastengenome (NCBI)	135
5.8	Darstellung der Ergebnisse zur des (TAAAG) _n -Repeats in der IRR	137
5.8.1	Ergebnisse weiterer Kakaobohnenproben mittels AGE	137
5.8.2	Darstellungen der Ergebnisse mittels AGE	138
5.8.3	Darstellungen der Ergebnisse mittels dHPLC	139
5.8.4	Darstellungen der Ergebnisse mittels CGE	141
5.8.5	Versuche der Quantifizierungen	143
5.8.6	Anwendung auf die Matrix Schokolade	147
5.9	Darstellung der Ergebnisse der PCR-RFLP basierend auf fünf SNPs	148
5.9.1	Zugabe an BSA-Lösung	148
5.9.2	Ergebnisse weiterer Kakaobohnenproben mittels AGE	149
5.9.3	Darstellung der Ergebnisse von Kakaobohnenproben mittels CGE	150
5.9.4	Versuche der Quantifizierungen	151
5.10	Darstellung der Ergebnisse der LPA basierend auf dem SNP im ccsA-Gen	156
	Literatur	158
	Publikationen	167
	Curriculum Vitae	170

Verzeichnis der Abkürzungen sowie Symbole und Einheiten

Abkürzungen

A: Arriba	Dr.: Doktor
AGE: Agarosegelelektrophorese	dsDNA: doppelsträngige DNA
ARGH3P: Auxin Responsive GH3 Protein	DTT: Dithiothreitol
ASU: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren	E: Eltern
ATP: Adenosintriphosphat	EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure
BSA: Rinderserumalbumin	EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
bspw.: beispielsweise	et al.: et alii
BW: Blindwert	FAM: Fluorescein amidite
bzgl.: bezüglich	FRET: Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
C: CCN-51	<i>Fw: Forward</i> (Vorwärts)
ca.: circa	ggf.: gegebenenfalls
ccsA-Gen: c cytochrome synthesis A	GmbH: Gesellschaft mit beschränkter Haftung
CGE: Kapillargelelektrophorese	HM: Hybridisierungs-Mastermix
CIB: Chloroplast Isolation Buffer	HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Co. KG: Compagnie Kommanditgesellschaft	HRMA: High resolution melting analysis
cpDNA: Chloroplasten-DNA	IBM: International Business Machines
cpGenom: Chloroplastengenom	ICGD: International Cocoa Germplasm Database
Cr: Criollo	INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
CTAB: Cetyltrimethylammoniumbromid	IRR: Inverted Repeat Region
d. h.: das heißt	LFGB: Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
ddNTPS: Didesoxyribonukleosidtriphosphate	LHCP: Light-Harvesting Complex Protein
dHPLC: denaturierende HPLC	LHS: Left Hybridizing Sequence
DMSO: Dimethylsulfoxid	LM: Ligase-Mastermix
DNA: Desoxyribonukleinsäure	LOC-CGE: Lab-on-a-Chip-CGE
dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphate	

Verzeichnis der Abkürzungen sowie Symbole und Einheiten

LPA: Ligation-dependent Probe Amplification	SM: Sondenmix
LPO: Left Probe Oligonucleotide	SNP: Single Nucleotide Polymorphism
LSC: Large Single Copy	span.: spanisch
Lsg.: Lösung	SSC: Small Single Copy
M: Marker	ssDNA: einzelsträngige DNA
MOPS: 3-(N-morpholino)-propansulfonsäure	SSP-PCR: Sequence Specific Sequence-PCR
NCBI: National Center for Biotechnology Information	SSR: Simple Single Repeats
NPR1: Natriuretic peptide receptor A	TAE: Tris-Acetat-EDTA
NSLTP: Non-specific Lipid Transfer Protein	<i>Taq</i> : <i>Thermus aquaticus</i>
PCR: Polymerasekettenreaktion	<i>T. c.</i> : <i>Theobroma cacao</i>
PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid	TcChiB: <i>Theobroma cacao</i> Chitinase B
PVP: Polyvinylpyrrolidon	TEAA: Triethylammoniumacetat
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA	Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
rDNA: ribosomale DNA	u. a.: unter anderem
<i>Re</i> : <i>Reverse</i> (Rückwärts)	UKE: Universitätsklinikum Eppendorf
RFLP: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	UV: ultraviolett
RHS: Right Hybridizing Sequence	v. Chr.: vor Christi
RPO: Right Probe Oligonucleotide	v. a.: vor allem
S: Schokolade	www: World Wide Web
SDS: Natriumdodecylsulfat	z. B.: zum Beispiel

Symbole und Einheiten

%: Prozent	min: Minute
°: Grad	mL: Milliliter
°C: Grad Celsius	mm: Millimeter
µg: Mikrogramm	mM: Millimolar
µL: Mikroliter	mm ² : Millimeter ²
µm: Mikrometer	ng: Nanogramm
∞: unendlich	nm: Nanometer
bp: Basenpaare	pH: potentia hydrogenii
c: Konzentration	s: Sekunde
K: Kelvin	t: Zeit
cm: Centimeter	U: Unit
C _t : threshold-cycle	V: Volt
E: Effizienz	V: Volumen
E _{260/280} : Quotient zur Bestimmung der Reinheit von DNA	vol.: Volumenteile
g: Erdbeschleunigung	QDNA: Quotient (Verhältnis plastidäre zu nukleärer DNA)
g: Gramm	
h: Stunde	
ha: Hektar	
Hz: Hertz	
kbp: Kilobasenpaare	
log: Logarithmus	
m: Geradensteigung	
m: Meter	
M: Molar	
mbar: Millibar	
mg: Milligramm	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Anbaugebiete von <i>Theobroma cacao</i> .
Abbildung 2.2:	Kakaoblätter.
Abbildung 2.3:	Kakaofrüchte von Arriba (links) und CCN-51 (rechts).
Abbildung 2.4:	Öffnung einer frisch gepflückten Kakaofrucht. Nach dem Zerschlagen der Schale wird die Pulpa sichtbar, die die Kakaobohnen umschließt.
Abbildung 2.5:	Ernte der Kakaofrüchte.
Abbildung 2.6:	Fermentation der Kakaobohnen, wobei die Pulpa abfließt.
Abbildung 2.7:	Menge von produziertem Kakao in den drei Hauptanbaugebieten im Zeitraum 2008/2009.
Abbildung 2.8:	Kakaoproduktion der Anbauländer in der Karibik, Mittel- sowie Südamerika (2008/2009).
Abbildung 2.9:	Verarbeitung an Rohkakao weltweit im Zeitraum 2008/2009.
Abbildung 2.10:	Verarbeitung an Rohkakao in Europa und in der Schweiz im Zeitraum 2008/2009.
Abbildung 2.11:	Rohkakaolieferanten von Deutschland, 2014.
Abbildung 2.12:	Fermentierte und getrocknete Kakaobohnen von CCN-51 (links) und Arriba (rechts). Die Früchte der beiden Sorten sind in Abbildung 2.3 dargestellt.
Abbildung 2.13:	Pflanzenzelle mit Chloroplasten.
Abbildung 2.14:	Schematische Darstellung der cpDNA von <i>Theobroma cacao</i> .
Abbildung 2.15:	Strukturformel des interkalierenden Fluorophors SYBR Green I.
Abbildung 2.16:	Strukturformel von Ethidiumbromid.
Abbildung 2.17:	DNA 1K Experion Chip mit den vier GS-, der L- sowie den Kavitäten 1-11; Hersteller: Bio-Rad.
Abbildung 2.18:	Schematischer Aufbau einer dHPLC mit den drei Arbeitsmodi und partiell-denaturierender Modus für eine optimale Trennung von Hetero- und Homoduplexen.
Abbildung 2.19:	Erkennungssequenz und Schnittmuster der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen.
Abbildung 2.20:	Schematische Darstellung der LPA.
Abbildung 2.21:	Beispiel für einen Mikrosatelliten. Die Sequenz AGT wird in Organismus 1 sechsmal und in Organismus 2 zehnmal wiederholt. Das Amplifikat von Organismus 1 ist nach einer PCR mit diese Region flankierenden Primern um 12 bp kleiner als das von Organismus 2.
Abbildung 4.1:	Analytische Ansätze ausgehend von der Recherche und Sequenzierungen im Kern- und im cpGenom sowie Markierung der Pfade, die zur erfolgreichen Methodenentwicklung führten.
Abbildung 4.2:	Alignment der Sequenzierung der Region TcChiB von Arriba und CCN-51 verglichen mit den publizierten Sequenzen von Matina 1-6 und Criollo. Die Unterschiede sind gelb markiert und die Restriktionsschnittstelle <i>Bam</i> HI ist rot gekennzeichnet. Die Primer-Paare für eine CCN-51-spezifische PCR TcChiB*, TcChiB** und TcChiB*** sind mit verschiedenen Farbtönen dargestellten Pfeilen gekennzeichnet.
Abbildung 4.3:	Schematische Darstellung des cpGenoms mit der IRR, die ein (TAAAG) _n -Repeat mit unterschiedlicher Wiederholung in CCN-51 und Arriba enthält.
Abbildung 4.4:	Alignment eines Ausschnittes der IRR des cpGenoms von CCN-51 und Arriba mit unterschiedlicher Wiederholung des (TAAAG) _n -Repeats mit n=6 für CCN-51 und n=14 für Arriba.
Abbildung 4.5:	Alignment der Sequenzierung des (TAAAG) _n -Repeats in der IRR für acht Arriba-Proben und fünf CCN-51-Proben.
Abbildung 4.6:	Detektion des (TAAAG) _n -Repeats einiger Arriba- und CCN-51-Proben, AGE, Kakaoblätter.
Abbildung 4.7:	Detektion des (TAAAG) _n -Repeats einiger Arriba- und CCN-51-Proben, AGE, Kakaobohnen.
Abbildung 4.8:	Detektion des (TAAAG) _n -Repeats der Kakaosorte CCN-51 (Probe C2, Bl., C5, Bl.) bei 2,5-2,8 min und der Kakaosorte Arriba (A1, Bl., A2, Bl.) bei etwa 1,3 min, dHPLC, Kakaoblätter.
Abbildung 4.9:	Detektion des (TAAAG) _n -Repeats einiger Arriba- und CCN-51-Proben, dHPLC, Kakaobohnen.
Abbildung 4.10:	Detektion des (TAAAG) _n -Repeats der Kakaosorte CCN-51 (Probe C1, Bl., C4, Bl.) bei 151 bp und 144 bp, CGE, Kakaoblätter.
Abbildung 4.11:	Detektion des (TAAAG) _n -Repeats der Kakaosorte Arriba (Probe A1, Bl., A4, Bl.) bei 112 bp, CGE, Kakaoblätter.

- Abbildung 4.12: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats einiger Arriba- und CCN-51-Proben, CGE, Kakaobohnen.
- Abbildung 4.13: PCR des (TAAAG)_n-Repeats von A: PCR-Produkten, B: DNA-Isolaten und C: fein gemahlenen Kakaobohnen aus Mischungen der beiden Kakaosorten. Das Mischungsverhältnis ist in CCN-51:Arriba angegeben. AGE.
- Abbildung 4.14: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Schokoladenproben mittels AGE.
- Abbildung 4.15: Ausschnitt des Alignments der sequenzierten cpGenome (A4, Bl. (EET-95); A6, Bl. (EET-103); A7, Bl. (EET-544); C1, Bl. (Crespo's Farm); C2, Bl. (Crespo's Farm); C4, Bl. (ICGD/ CCN51-RD), C5, Bl. (Botanischer Garten); E1, Bl. (ICS-95); E3, Bl. (Canelo I); E5, Bl. (IMC-67)) mit zwölf bereits publizierten, Referenzgenom: HQ244500.
- Abbildung 4.16: Phylogenetischer Stammbaum: A4, Bl. (EET-95); A6, Bl. (EET-103); A7, Bl. (EET-544); C1, Bl. (Crespo's Farm); C2, Bl. (Crespo's Farm); C4, Bl. (ICGD), C5, Bl. (Botanischer Garten); E1, Bl. (ICS-95); E3, Bl. (Canelo I); E5, Bl. (IMC-67); bereits publizierte cpGenome.
- Abbildung 4.17: Übersicht über den SNP (CCN-51: T, Arriba: G) in der Restriktionsschnittstelle 8. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *PsiI* grün und die Primer gelb.
- Abbildung 4.18: Übersicht über den SNP (CCN-51: T, Arriba: G) in der Restriktionsschnittstelle 17a/b. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *PsiI*/ *EcoRI* grün und die Primer gelb.
- Abbildung 4.19: Übersicht über den SNP (CCN-51: T, Arriba: G) in der Restriktionsschnittstelle 21. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *Asel* grün und die Primer gelb.
- Abbildung 4.20: Übersicht über den SNP (CCN-51: T, Arriba: G) in der Restriktionsschnittstelle 21. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRI* grün und die Primer gelb.
- Abbildung 4.21: Übersicht über den SNP (CCN-51: C, Arriba: A) in der Restriktionsschnittstelle 44. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRV* grün und die Primer gelb.
- Abbildung 4.22: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 8, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *PsiI*. Das 494 bp große Amplifikat von CCN-51 (schwarz) wird verdaut (373 bp, 121 bp; rot) und das des Arribas (gelb) nicht.
- Abbildung 4.23: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 17a, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *PsiI*. Das 390 bp große Amplifikat von CCN-51 (schwarz) wird verdaut (217 bp, 174 bp; rot) und das des Arribas (gelb) nicht.
- Abbildung 4.24: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 17b, Arriba-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *EcoRI*. Das 390 bp große Amplifikat von Arriba (schwarz) wird verdaut (218 bp, 173 bp; gelb) und das des CCN-51 (rot) nicht.
- Abbildung 4.25: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 21, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *Asel*. Das 436 bp große Amplifikat von CCN-51 (schwarz) wird verdaut (265 bp, 171 bp; rot) und das des Arribas (gelb) nicht.
- Abbildung 4.26: Ergebnisse der PCR-RFLP, Detektion mittels CGE, Probe C3, Bl., Restriktionsschnittstelle 21, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *Asel*. Das 436 bp große Amplifikat von CCN-51 wird verdaut (265 bp, 171 bp; rote Pfeile).*
- Abbildung 4.27: Ergebnisse der PCR-RFLP, Detektion mittels CGE, Probe A3, Bl., Restriktionsschnittstelle 21, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *Asel*. Das 436 bp große Amplifikat von Arriba (gelber Pfeil) wird nicht verdaut.*
- Abbildung 4.28: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 43, Arriba-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *EcoRI*. Das 440 bp große Amplifikat von Arriba (schwarz) wird verdaut (255 bp, 185 bp; gelb) und das des CCN-51 (rot) nicht.
- Abbildung 4.29: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 44, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *EcoRV*. Das 465 bp große Amplifikat von CCN-51 (schwarz) wird verdaut (342 bp, 123 bp; rot) und das des Arribas (gelb) nicht.

- Abbildung 4.30: Ausschnitt aus den Sequenzen der Kakaoblattproben A1, Bl. und A2, Bl. im Vergleich zu C1, Bl. und A4, Bl. um die Positionen 33075 und 33080 herum (Restriktionsschnittstelle 17a/b). Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *PsiI*, TTATAA (CCN-51-spezifisch) und *EcoRI*, GAATTC (Arriba-spezifisch) sind gelb hervorgehoben, der SNP ist rot markiert.
- Abbildung 4.31: Bestimmung der Nachweisgrenze mittels CGE, Restriktionsschnittstelle 21, *Asel*, ATTAAT. CCN-51-Gehalt: 1 %, Arriba-Gehalt: 99 %. Bei diesem Mischungsverhältnis wurde ein Flächenverhältnis Fläche 171 bp und 265 bp = 1 % und Fläche 436 bp = 99 % erwartet.
- Abbildung 4.32: Mischungen von A: PCR-Produkten, B: DNA-Isolaten und C: fein gemahlene Kakaobohnen der Amplifikate und Fragmente nach der PCR-RFLP, Sequenzregion 21, *Asel*, ATTAAT. Das Mischungsverhältnis ist in Arriba angegeben. AGE.
- Abbildung 4.33: Anwendung der PCR-RFLP-Methode um die Sequenzregion 21, *Asel*, ATTAAT auf die Matrix Schokolade. Die Amplifikate (schwarz) werden verdaut (rot) oder bleiben unverdaut (gelb). AGE.
- Abbildung 4.34: SNP im *ccsA*-Gen des cpGenoms.
- Abbildung 4.35: Detektion der Ergebnisse der LPA auf Basis des SNPs im *ccsA*-Gen. Kakaoblätter.
- Abbildung 4.36: Detektion der Ergebnisse der LPA auf Basis des SNPs im *ccsA*-Gen. Kakaobohnen.
- Abbildung 4.37: Schmelzkurve während der das (TAAAG)_n-Repeat detektierenden PCR.
- Abbildung 4.38: Erste Ableitung der Schmelzkurve nach der HRMA von Amplifikaten, die nach der das (TAAAG)_n-Repeat detektierenden PCR erhalten wurden.
- Abbildung 4.39: Möglichkeit einer analytischen Vorgehensweise zur Identifizierung der Sorte CCN-51 in einer Kakaoprobe.
- Abbildung 4.40: Elektropherogramm zur Detektion von Amplifikaten nach der Mikrosatellitenanalyse einer CCN-51-Probe.
- Abbildung 4.41: Clusteranalyse der CCN-51-, Arriba- und Criollo-Proben. Neighbour Joining mit Similarity Index kalkuliert nach Simpson. Arriba (A1 und A2) und Criollo (Cr1 und Cr2) wurden als Außengruppen in die Analyse integriert. Entsprechend der Gruppenbildung der CCN-51-Proben wurden drei Untergruppen innerhalb des CCN-51-Probenpools bestimmt.
- Abbildung 5.1: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Eltern des CCN-51, Kakaoblätter.
- Abbildung 5.2: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A2.
- Abbildung 5.3: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A11.
- Abbildung 5.4: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Kakaosorte Cr1, Bl. bei etwa 1,4 min, Kakaoblätter.
- Abbildung 5.5: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Eltern von CCN-51, Kakaoblätter.
- Abbildung 5.6: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A2.
- Abbildung 5.7: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A11.
- Abbildung 5.8: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Kakaosorte Cr1, Bl. bei 111 bp, Kakaoblätter.
- Abbildung 5.9: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Eltern von CCN-51, Kakaoblätter.
- Abbildung 5.10: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A2.
- Abbildung 5.11: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A11.
- Abbildung 5.12: Mischungen von A: PCR-Produkten des (TAAAG)_n-Repeats aus Arriba und CCN-51. Das Mischungsverhältnis ist in CCN-51:Arriba angegeben. Kakaoblätter.
- Abbildung 5.13: Mischungen von A: PCR-Produkten des (TAAAG)_n-Repeats aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot). Kakaoblätter.
- Abbildung 5.14: Mischungen von A: PCR-Produkten des (TAAAG)_n-Repeats aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot). Kakaobohnen.
- Abbildung 5.15: Mischungen von B: DNA-Isolaten des (TAAAG)_n-Repeats aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot). Kakaobohnen.
- Abbildung 5.16: Mischungen von C: fein gemahlene Kakaobohnen des (TAAAG)_n-Repeats aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot).
- Abbildung 5.17: Elektropherogramme der reinen Proben zur Untersuchung von Mischungen Arriba (gelb) und CCN-51 (rot). Kakaobohnen. Der für die Berechnung der prozentualen Flächenanteile zueinander berücksichtigte Peak ist grün markiert.
- Abbildung 5.18: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Schokoladenproben.

- Abbildung 5.19: Methodenoptimierung der PCR-RFLP; Detektion der Amplifikate nach der PCR mittels AGE durch Einsatz des Primer-Paars 21C_{Asel}. Durch die Verwendung von 4 %iger BSA-Lösung konnte die PCR optimiert werden.
- Abbildung 5.20: Ergebnisse der PCR-RFLP, Probe C8. Das 436 bp große Amplifikat von CCN-51 wird verdaut (265 bp, 171 bp; rote Pfeile).*
- Abbildung 5.21: Ergebnisse der PCR-RFLP, Probe A4. Das 436 bp große Amplifikat von Arriba (gelber Pfeil) wird nicht verdaut.*
- Abbildung 5.22: Mischungen von A: PCR-Produkten von Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels Asel (Sequenzregion 21). Kakaoblätter.
- Abbildung 5.23: Mischungen von B: DNA-Isolaten von Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels Asel (Sequenzregion 21). Kakaoblätter. Die gebildeten Heteroduplexe sind blau markiert.
- Abbildung 5.24: Mischungen von A: PCR-Produkten aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels Asel (Sequenzregion 21). Kakaobohnen.
- Abbildung 5.25: Mischungen von B: DNA-Isolaten von Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels Asel (Sequenzregion 21). Kakaobohnen. Die gebildeten Heteroduplexe sind blau markiert.
- Abbildung 5.26: Mischungen von C: fein gemahlenen Kakaobohnen von Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels Asel (Sequenzregion 21). Kakaobohnen. Die gebildeten Heteroduplexe sind blau markiert.
- Abbildung 5.27: Detektion der Ergebnisse der LPA auf Basis des SNPs im ccsA-Gen. Weitere Kakaoblattproben.
- Abbildung 5.28: Detektion der Ergebnisse der LPA auf Basis des SNPs im ccsA-Gen. Weitere Kakaoblattproben.

Abbildungsquellenverzeichnis

- Abbildung 2.1: <http://edeltruffes-ch.km32308.keymachine.de/modules/content/images/400px-KakoproduktionWelt.png>
- Abbildung 2.2: m.simplyscience.ch
- Abbildung 2.3: Bereitgestellt von Dr. Ilka Haase
- Abbildung 2.5: http://www.chocosuisse.ch/chocosuisse/de/instruction_material/picture_series.html
- Abbildung 2.6: <http://www.gepa-wug.de/wug/bilder/inhalt/fermentieren.jpg>
- Abbildung 2.7: Kakaoverein, 2012
- Abbildung 2.8: Kakaoverein, 2012
- Abbildung 2.9: Kakaoverein, 2012
- Abbildung 2.10: Kakaoverein, 2012
- Abbildung 2.11: http://www.bdsi.de/fileadmin/redaktion/_processed_/csm_Rohkakaolieferl%C3%A4nder_2014996b900d74.jpg
- Abbildung 2.13: <http://chloroplasten.defined.de/bilder/zellen.gif>
- Abbildung 2.14: Jansen et al., 2010
- Abbildung 2.17: http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/products/electrophoresis/product_overlay_content/global/lsr_experion_dna_chip.jpg
- Abbildung 2.20: www.mlpa.com

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Molekularbiologische Arbeiten zur Differenzierung von Sorten sowie Sequenzierung kompletter Genome.
Tabelle 3.1:	Endpunkt-PCR, Zusammensetzung des Reaktionsgemischs.
Tabelle 3.2:	PCR-Bedingungen.
Tabelle 3.3:	<i>Real-time</i> PCR, Zusammensetzung des Reaktionsgemischs.
Tabelle 3.4:	<i>Real-time</i> PCR, Temperaturprogramm.
Tabelle 3.5:	RFLP, Pipettierschema.
Tabelle 3.6:	dHPLC, Gradient.
Tabelle 3.7:	Herstellung von definierten Mischungen.
Tabelle 4.1:	DNA-Gehalt und Reinheit der Isolate, Kakaoblätter.
Tabelle 4.2:	DNA-Gehalt und Reinheit der Isolate, Kakaobohnen.
Tabelle 4.3:	Sequenzregionen, die in den sequenzierten Genomen von Criollo und Matina 1-6 Unterschiede aufweisen.
Tabelle 4.4:	Auflistung der zehn Proben, deren cpGenome sequenziert wurden.
Tabelle 4.5:	Zusammenfassung der Ergebnisse des (TAAAG) _n -Repeats, Kakaoblätter.
Tabelle 4.6:	Zusammenfassung der Ergebnisse des (TAAAG) _n -Repeats, Kakaobohnen.
Tabelle 4.7:	Prozentuale Flächenanteile der Peaks für die Amplifikate der beiden Kakaosorten Arriba und CCN-51 in den Mischungsansätzen A, B und C. CGE.
Tabelle 4.8:	Auflistung der 18 möglichen Restriktionsschnittstellen.
Tabelle 4.9:	Auflistung der fünf relevanten Punktmutationen.
Tabelle 4.10:	Auflistung der erhaltenen Amplifikat- sowie Fragmentlängen.
Tabelle 4.11:	Zusammenfassung der Ergebnisse, PCR-RFLP, Kakaoblätter.
Tabelle 4.12:	Zusammenfassung der Ergebnisse, PCR-RFLP, Kakaobohnen*.
Tabelle 4.13:	Struktur und Allelgrößen der untersuchten Mikrosatelliten.
Tabelle 4.14:	Amplifikatgrößen nach der PCR mit den Primer-Paaren mTcCIR1-12. Es wurden bis zu fünf verschiedene Allele erhalten, A-E (+: Allel anwesend, -: Allel abwesend). Unterschiede bei den CCN-51-Proben sind grau markiert.
Tabelle 4.15:	Amplifikatgrößen nach der PCR mit den Primer-Paaren mTcCIR15-60. Es wurden bis zu fünf verschiedene Allele erhalten, A-E (+: Allel anwesend, -: Allel abwesend). Unterschiede bei den CCN-51-Proben sind grau markiert.
Tabelle 5.1:	Probenmaterial, Kakaoblätter.
Tabelle 5.2:	Probenmaterial, Kakaobohnen.
Tabelle 5.3:	Probenmaterial, Schokolade.
Tabelle 5.4:	PCR-Reagenzien.
Tabelle 5.5:	Enzyme.
Tabelle 5.6:	Verwendete Kits.
Tabelle 5.7:	Puffer und Lösungen.
Tabelle 5.8:	Chemikalien.
Tabelle 5.9:	Geräte.
Tabelle 5.10:	Software.
Tabelle 5.11:	Recherche im Kerngenom.
Tabelle 5.12:	Recherche im cpGenom.
Tabelle 5.13:	Partielle Sequenzierung der IRR des cpGenoms.
Tabelle 5.14:	Insertion in der Inverted Repeat Region, (TAAAG) _n .
Tabelle 5.15:	PCR-RFLP.
Tabelle 5.16:	Bestimmung des Verhältnisses von Kern- und Plastiden-DNA mittels <i>Real-time</i> PCR.
Tabelle 5.17:	Mikrosatellitenanalyse.
Tabelle 5.18:	Weitere Primersequenzen für DNA-basierte Analytik
Tabelle 5.19:	Isolierung von Chloroplasten.
Tabelle 5.20:	Isolierung von DNA aus Chloroplasten.

Tabelle 5.21:	Durchführung der LPA.
Tabelle 5.22:	Pipettierschema für HRMA, einfacher Ansatz.
Tabelle 5.23:	Temperaturprogramm für HRMA.
Tabelle 5.24:	Daten zu den bereits publizierten cpGenomen des Kakaos.
Tabelle 5.25:	Zusammenfassung der Ergebnisse des (TAAAG) _n -Repeats, später gelieferte Kakaobohnen.
Tabelle 5.26:	Prozentuale Flächenanteile der Peaks für die Amplifikate von Arriba und CCN-51 im Mischungsansatz A.
Tabelle 5.27:	Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR-RFLP, weitere Kakaobohnenproben.
Tabelle 5.28:	A, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaoblätter.
Tabelle 5.29:	B, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaoblätter.
Tabelle 5.30:	A, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaobohnen.
Tabelle 5.31:	B, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaobohnen.
Tabelle 5.32:	C, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaobohnen.

Zusammenfassung

Der ecuadorianische Edelkakao Arriba wird vermutlich mit dem Konsumkakao CCN-51 gestreckt. Um die Reinheit edler Kakaoprodukte zu sichern, sind Methoden zur Differenzierung der beiden Kakaosorten notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese DNA-basiert entwickelt.

In der plastidären DNA wird ein höherer Grad an Variabilität vermutet als im nukleären Genom. Ein Sequenzunterschied zwischen beiden Kakaosorten wurde daher im Chloroplastengenom gesucht. Dazu wurden umfangreiche Sequenzierungsarbeiten kompletter plastidärer Genome durchgeführt. Diese erfolgten mithilfe der von Kane et al., 2012 publizierten Methode *low coverage whole genome shotgun sequencing*, wodurch eine aufwendige Isolierung der Chloroplasten von den restlichen Zellbestandteilen entfiel. Nach einem Vergleich der Sequenzen beider Kakaosorten konnten Single Nucleotide Polymorphisms festgestellt werden. Basierend auf fünf SNPs wurden sechs PCR-RFLP-Methoden zur Unterscheidung der Sorten Arriba und CCN-51 entwickelt.

Eine Sequenzierung der Inverted-Repeat-Region der beiden Kakaosorten entsprechend Dhingra et al., 2005 ergab eine unterschiedliche Wiederholung der fünfbasigen Sequenz (TAAAG)_n. Eine Methode zur Differenzierung der beiden Kakaosorten bestand in einer Universal-PCR: Es ergeben sich Amplifikate verschiedener Größe für die Sorten CCN-51 (n = 14) und Arriba (n = 6), die mittels Agarosegelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese oder dHPLC detektiert werden.

Mithilfe der entwickelten Verfahren wurde nachgewiesen, dass die als Probenmaterial dienenden Kakaobohnen teilweise bereits Mischungen beider Sorten waren. Der Verdacht, die Sorte Arriba würde mit CCN-51 gestreckt werden, wurde somit bestätigt.

Beim CCN-51-Blattprobenpool traten Ausnahmen auf. Da es sich bei diesem Organismus um einen Klon handelt, sollten keine Sequenzunterschiede zu beobachten sein, wie es bei der Sorte Arriba, die sich sexuell reproduziert, vorkommen kann. Der Verdacht lag nahe, dass es innerhalb der Sorte CCN-51 mehrere Typen gibt. Mittels einer Mikrosatellitenanalyse wurde dieser Verdacht bestätigt.

Abstract

The Ecuadorian fine cocoa type Arriba is presumed to be commonly adulterated with CCN-51, a bulk cocoa type. In order to ensure the purity of fine cocoa products from Ecuador, analytical methods for differentiation of the two are needed. In this project, DNA-based methods were developed and tested using leaf samples and cocoa bean samples.

The plastid genome is assumed to be more variable than the nucleic genome of cocoa plants. Therefore, sequence variations in the plastid DNA were examined and extensive sequencing of the plastid genomes of both cocoa types was performed using *low coverage whole genome shotgun sequencing*. Unlike other methods, this method does not necessitate time-consuming isolation of the chloroplasts or a separation of the plastid DNA from other cell components (such as the nucleus or mitochondria). The comparison of the sequenced genomes returned only single nucleotide polymorphisms (SNPs). Using five SNPs, six PCR-RFLP methods for differentiation of the two cocoa types were developed.

Additional sequencing of the plastid inverted repeat region revealed a difference in repeats of the five base sequence (TAAAG)_n. Most Arriba samples possessed six repeats of the sequence, while most CCN-51 possessed fourteen repeats. This allowed the differentiation of the two cocoa types using PCR with universal primers and DNA fragment length analysis. Fragments were analyzed using agarose gel electrophoresis, capillary gel electrophoresis, or dHPLC.

Amongst the CCN-51 leaf samples analyzed, some showed deviating results in the (TAAAG)_n fragment analysis. These should not occur as CCN-51 is a clone, unlike Arriba, which reproduces sexually. This suggests that there are several different subtypes of CCN-51. Microsatellite analysis of the samples in question confirmed this suspicion.

Application of the developed methods to cocoa bean samples showed that some of the sample material contained mixtures of both cocoa types. This confirmed the initial suspicion that Arriba cocoa is adulterated with CCN-51 cocoa.

1 Einleitung

Schokolade und andere Kakaoprodukte sind vor allem in Europa und USA beliebte Lebensmittel. Die Deklaration und Verpackungsgestaltung vieler Erzeugnisse versprechen eine hohe Qualität (z. B. hinsichtlich eines hohen Kakaogehalts oder einer bestimmten Edelkakaosorte), wie es häufig auch bei Wein und Kaffee der Fall ist. Die Nachfrage auf Seiten des Verbrauchers nimmt seit einigen Jahren zu und er ist zunehmend bereit, für entsprechende Produkte einen höheren Preis zu zahlen. Als ein entscheidendes Qualitätsmerkmal wird auf den Kakaoprodukten häufig auf den Ursprungsort des verarbeiteten Rohmaterials hingewiesen. Der Anbauort des Kakaos spielt demnach für die Qualität und letztlich auch für den Preis eine große Rolle. Der steigende Konsum von edlen Kakaosorten muss dabei entsprechend mit einer erhöhten Produktionsmenge an Edelkakaosorten einhergehen. Der Anteil liegt aktuell (Stand 2014) bei etwa 5 % der gesamten Kakaoproduktion (1).

Mit einem Produktionsvolumen von 50 % der Gesamtedelkakaoproduktion ist die Sorte Arriba die bedeutendste unter den Edelkakaosorten (2). Arriba hat ein intensives Aroma und wird ausschließlich in Ecuador kultiviert. Seit den 70er-Jahren wird hier auch der Klon CCN-51 angebaut, der den Konsumkakaosorten zuzuordnen ist. Die Vorteile dieser Sorte sind neben einer höheren Robustheit und Resistenz beim Anbau geringere Verluste bei der Ernte (3), (4), (5). Dies bedeutet eine größere Sicherheit beim Anbau für die ecuadorianischen Kakaobauern, was eine vermehrte Produktion der Kakaosorte CCN-51 in Ecuador nach sich zieht. So hat sich der Anteil an CCN-51 an der gesamten Kakaomenge zwischen den Jahren 2003 und 2005 verfünffacht (5). Hier wird die Diskrepanz zwischen einem vermehrten Anbau der Kakaosorte CCN-51 und der steigenden Nachfrage des Verbrauchers nach edlen Kakaoprodukten deutlich.

Kakao verarbeitende Hersteller vermuten die Vermischung beider Kakaosorten. Wird ein Gemisch der beiden Kakaosorten als reiner Arriba-Kakao gehandelt, wird ein höherer Preis für ein minderwertiges Produkt erzielt. Neben dieser von vor allem Kakaobauern und –händlern beabsichtigten und dadurch trügerischen Vermischung kann es zu einer ungewollten kommen, wenn beide Kakaosorten parallel an denselben Stätten weiterverarbeitet werden. Um die Reinheit der Sorte Arriba zu sichern, müssen der Edel- und der Konsumkakao aus Ecuador analytisch voneinander unterschieden werden können. Anerkannte Methoden zur Unterscheidung beider Organismen existieren bislang jedoch nicht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher DNA-basierte Methoden erarbeitet, die der Authentizitätsüberprüfung der ecuadorianischen Edelkakaosorte Arriba dienen.

2 Grundlagen

2.1 Kakao

2.1.1 Botanische Einordnung, Morphologie und Sorten von *Theobroma cacao*

Botanik, Morphologie und Anbau

Der Kakaobaum *Theobroma cacao* (*T. c.*) zählt zur Familie der *Sterculiaceae* und zur Gattung *Theobroma*, die etwa 20 Arten umfasst (6). *Theobroma*-Sorten wie *T. grandiflorum* und *T. bicolor* werden genau wie *T. cacao* bei der Herstellung von Kakaoprodukten eingesetzt. *T. cacao* hat dabei allerdings die größte wirtschaftliche Relevanz (7).

Seine Ursprünge hat der Kakaobaum in den Tropen Südamerikas, im Tiefland des Amazonas (8). Weitere Verbreitungsgebiete sind die Nordküsten Süd- sowie Mittelamerikas. Der heutige Kakaoanbau erstreckt sich jedoch über den gesamten Tropenbereich von Amerika (v. a. Ecuador und Brasilien), Asien (v. a. Indonesien und Papua-Neuguinea) sowie Afrika (v. a. Elfenbeinküste, Ghana, Nigeria, Kamerun), siehe Abbildung 2.1.



Abbildung 2.1: Anbauggebiete von *Theobroma cacao*.

Der in tropischen und subtropischen Gebieten beheimatete Kakaobaum benötigt eine optimale Jahresdurchschnittstemperatur von 25 bis 28 °C (9), eine Niederschlagsmenge von etwa 1 500 bis 2 000 mm und eine Luftfeuchtigkeit von 80 bis 90 %. Die Böden sollten locker sowie humus- und nährstoffreich sein. Außerhalb des Gebietes zwischen 20 ° nördlicher und 20 ° südlicher Breite trägt der Kakaobaum keine Früchte (10).

Der Baum zählt mit einer Höhe von 15 m im tropischen Regenwald zu den kleineren Bäumen. Er befindet sich in den unteren Baumschichten, wo er im Schatten wächst. Beim Kakaoanbau wird der Baum auf etwa 4 bis 5 m gestutzt, wodurch die Ernte erleichtert und höhere Ernteerträge erzielt werden (11). Der Kakaobaum besitzt einen etwa 20 bis 30 cm breiten, runden und mit hellen Flecken bedeckten Stamm (10). Die Blätter des Baums sind immergrün, haben eine ovale Form und eine Blattader mit einer Länge von maximal 35 cm (siehe Abbildung 2.2) (12).



Abbildung 2.2: Kakaoblätter.

Die Blüten des Kakaobaums sind fünfzählig und wachsen direkt am Stamm. Die Befruchtung der Blüten erfolgt natürlich (durch Insekten) oder per Hand – durch den Einsatz von Federn oder Pinseln. Aus nur 5 % der bestäubten Blüten entstehen Kakaofrüchte (10) mit einer Größe von etwa 15 bis 20 cm und einem Gewicht von ungefähr 500 g (11). Die Früchte sind zunächst grün und färben sich im Laufe der Reifung z. B. in Abhängigkeit vom Standort oder der Sorte gelb, orange oder rotbraun (siehe Abbildung 2.3).



Abbildung 2.3: Kakaofrüchte von Arriba (links) und CCN-51 (rechts).

Das Innere der Kakaofrucht bildet die Pulpa, aus der süßer Saft mit einem leichten Kakaoaroma gewonnen wird. In dieser weißlichen und schleimigen Masse sind etwa 20 bis 60 meist violett gefärbte Samen – die Kakaobohnen – enthalten. Aus den etwa 2 bis 4 cm langen Bohnen werden bei der Kakaoherstellung verschiedene Kakaoprodukte gewonnen. Die Abbildung 2.4 zeigt eine geöffnete Kakaofrucht.



Abbildung 2.4: Öffnung einer frisch gepflückten Kakaofrucht. Nach dem Zerschlagen der Schale wird die Pulpa sichtbar, die die Kakaobohnen umschließt.

Der Kakaobaum trägt nach zwei bis sechs Jahren erstmals Früchte. Da er eine immergrüne Pflanze ist, wachsen Blüten und Früchte zur selben Zeit. Bei einer natürlichen Befruchtung beträgt der jährliche Ertrag eines Kakaobaums 300 bis 1 000 Früchte. Bei einer künstlichen Befruchtung ist mit einer Ernte von etwa 3 500 Früchten zu rechnen (10).

Süd- und mittelamerikanische Kakaosorten: Criollo und Forastero

Die generelle Unterscheidung in die zwei Varietäten Criollo (span.: Hispanoamerikaner, Kreole, Einheimischer) und Forastero (span.: Fremder, Fremdling, Ankömmling) stammt aus Venezuela, wo man dadurch die einheimischen von den fremden Sorten der Nachbarstaaten abgrenzen wollte. Criollo und Forastero wurden dabei als Unterarten der Gattung *T. cacao* mit verschiedenen Ursprungsorten gewertet: In Mittelamerika soll sich der Criollo-Kakao und in Südamerika der Forastero-Kakao

entwickelt haben. Arbeiten zum Genom weisen allerdings darauf hin, dass sich der einzige Ursprungsort des Kakaobaums wahrscheinlich in Südamerika befindet. Von hier aus wurden in präkolumbianischer Zeit einzelne Pflanzen nach Mittelamerika und Mexiko gebracht. Da sich die beiden Sorten Criollo und Forastero fruchtbar miteinander kreuzen lassen, werden beide der Art *T. cacao* zugeordnet (6), (13), (14), (15).

Die grobe Gliederung von Kakao in Criollo und Forastero geht auf Cheesman, 1944 zurück und erfolgt auf Grundlage der Fruchtform und der Samenfarbe (16). Die Sorte Criollo besitzt längliche und spitz zulaufende Früchte mit rauer Oberfläche sowie große, runde und farblose oder schwach violett gefärbte Samen (17), (18). Die Früchte des Forastero-Kakaos sind breiter, größer und ihre Oberfläche ist glatt, während die Samen größer und dunkelviolett gefärbt sind. Die edlere Sorte ist der Criollo. Sein Fruchtfleisch besitzt einen höheren Zuckergehalt als die Forastero-Sorten und das Aroma der Kakaobohnen des Criollos ist milder, blumiger und fruchtiger. Der Ertrag der Kakaosorte Criollo ist hingegen relativ gering und sie zeigt Anfälligkeiten gegenüber Krankheiten (z. B. Schwarzfäule, Hexenbesen) und Schädlingen. Der Forastero-Kakao liefert zwar höhere Erträge als der Criollo-Kakao, weist allerdings in seinen Früchten einen geringeren Koffein- und einen höheren Polyphenolgehalt auf. Daraus resultiert eine weniger aromatische und eher bittere Note (10), (18), (19), (8).

Allgemein werden neuere Sorten wie IMC-67 oder Scavina 6 zum Forastero gezählt. Der Anteil dieser Sorten an der weltweiten Kakaoernte beträgt etwa 80 %. Die Kultivierung begann im 17. Jahrhundert und umfasst die meistverbreiteten Sorten (10), (18), (20). Weitere Unterteilungen des Forastero-Kakaos erfolgen entsprechend der Herkunft als Lower und Upper Amazonas Forastero (21).

Der Hybrid-Kakao Trinitario ist aus den beiden Kakaosorten Criollo und Forastero hervorgegangen und soll die edlen Aromaeigenschaften des Criollos mit der Robustheit des Forasteros vereinen (20).

Der Arriba-Kakao aus Ecuador – auch Nacional-Kakao – spielt unter den Forastero-Kakaosorten eine besondere Rolle: Aufgrund seines blumigen Aromas zählt er zu den Edelkakaosorten, denen eigentlich nur der Criollo-Kakao zugeordnet wird (22). Zusätzlich sind Züchtungen zu nennen, die sich durch eine höhere Resistenz gegen Krankheiten und bessere Anbaueigenschaften auszeichnen. Die Kultivierung dieser Sorten erfolgt in größerer Dichte, wodurch der Ernteertrag pro Fläche gesteigert wird. Zu solchen Züchtungen ist der Klon CCN-51 zu zählen, der neben dem Arriba-Kakao in Ecuador angebaut wird (5).

Edel- und Konsumkakao

Die Zuordnung nach Anbaugebieten bzw. -ländern ist aufgrund der jahrhundertelangen Kreuzung der verschiedenen Kakaosorten eindeutiger als die in Criollo und Forastero. Die Unterteilung in Edel- und Konsumkakao geht mit dieser Unterteilung einher. Konsumkakaosorten werden überwiegend an der Elfenbeinküste sowie in Ghana, Nigeria, Kamerun, Indonesien und im Bundesstaat Bahia (Brasilien) kultiviert (23). Die edlen Kakaosorten (24) werden vor allem in Ecuador, Venezuela, Jamaika, Trinidad und Tobago, sowie auf Java und Samoa angebaut (10). Neben der Herkunft sind für die Unterteilung in Edel- und Konsumkakao die Aromaeigenschaften einer Kakaosorte entscheidend. Ein Edelkakao hat ein fruchtigeres und blumigeres Aroma bei einer geringeren Säure- und Bitternote als ein Konsumkakao. Eine eindeutige Markersubstanz, die nur im Aromaprofil der einen oder anderen Sorte vorkommt, gibt es allerdings nicht.

Die Verbreitung von Kakao

Die kulturelle Bedeutung des Kakaos lässt sich auf die Olmeken, Mayas und Azteken zurückführen. Die Kultur der Olmeken bestand zwischen 1 500 und 400 v. Chr. im heutigen Mexiko. Bei Ausgrabungen wurden Rückstände von Kakao in Gefäßen gefunden. Die Domestikation und Züchtung des Kakaos entwickelten sich mit den Mayas, deren Kultur etwa 1 800 v. Chr. entstand. Sie fanden zahlreiche Verwendungen für den Kakao: als Heilmittel zur Desinfektion von Wunden, als Lebensmittel in Form von Brei oder als berauschendes Getränk aus dem Kakaopulver, Gewürzen und dem Fruchtmus. Durch die Einwanderung der Azteken in die Gebiete der Mayas etablierte sich Kakao als Zahlungs- und Handlungsmittel insbesondere in Form von Tributzahlungen der unterdrückten Völker an die Azteken. In dieser Epoche kam es erstmals zur Fälschung von Kakaobohnen (8), (10).

Der Kakao gelangte etwa im 16. Jahrhundert durch den spanischen Eroberer Hernan Cortez nach Europa und bereits im 17. Jahrhundert wurde flüssige Schokolade (Kakao gelöst in heißem Wasser oder heißer Milch) zu einem beliebten Getränk des europäischen Adels (10), (12), (25), (26). In den bürgerlichen Schichten war das kakaohaltige Getränk seit Mitte des 18. Jahrhunderts v. a. seit der Öffnung von Kaffeehäusern und Schokoladenstuben verbreitet. Die steigende Nachfrage nach Kakao wurde durch die Pflanzung größerer Kakaoplantagen in Mittel- und Südamerika gedeckt. Ein Großteil der Ware wurde aus den Ländern Venezuela, Ecuador und Brasilien nach Europa importiert. Um der stetig wachsenden Nachfrage gerecht zu werden, wurde Kakao ab etwa Ende des 19. Jahrhunderts auch in Afrika angebaut. Durch die vermehrte Produktion konnte der Kakaopreis gesenkt werden, sodass sich der Konsum ab dann in allen gesellschaftlichen Schichten ausbreitete. Zu dieser Zeit wurde die Qualitätskontrolle relevant. So wurde 1850 ein Ausschuss zur Analyse von Lebensmitteln gegründet, der sich u. a. mit der Vermengung des Kakaos mit anderen Stoffen, z. B. Stärke,

beschäftigte. Durch die Einführung einer „Richtlinie über die Inhaltsstoffe von Schokolade“ im Jahr 1905 konnte die Streckung des Kakaos eingedämmt werden (10), bis 1933 die erste Fassung der Verordnung über Kakao und Kakaoerzeugnisse (27) folgte.

2.1.2 Kakaoverarbeitung

Die Ernte ist der erste Schritt zur Gewinnung von Kakao und ihr Zeitpunkt ist entscheidend: Wird die Frucht zu früh geerntet, entsteht nicht das gewünschte Aroma, da aufgrund des zu geringen Zuckergehalts die Maillard-Reaktion in den darauffolgenden Schritten nicht in ausreichendem Maße stattfindet. Die alkoholische Gärung kann dann – ebenfalls durch den zu geringen Zuckergehalt bedingt – nicht vollständig ablaufen. Werden hingegen zu reife Früchte weiterverarbeitet, werden durch bereits ausgekeimte Samen Fehlgerüche gebildet und es kann zu einem Schimmelbefall kommen (10). In Abhängigkeit von der Sorte erfolgt die erstmalige Ernte der Kakaofrüchte zwei bis sechs Jahre nach dem Pflanzen der Bäume. Zweimal jährlich wird während der Neben- und Haupterntezeit geerntet. In Mexiko finden die Ernten bspw. im März und April (28), in Ecuador im Februar und Mai (10) und in Brasilien im Februar und Juli statt. Bei der Ernte werden die direkt am Stamm wachsenden Früchte mit Macheten vom Baum abgeschlagen (siehe Abbildung 2.5) (12).

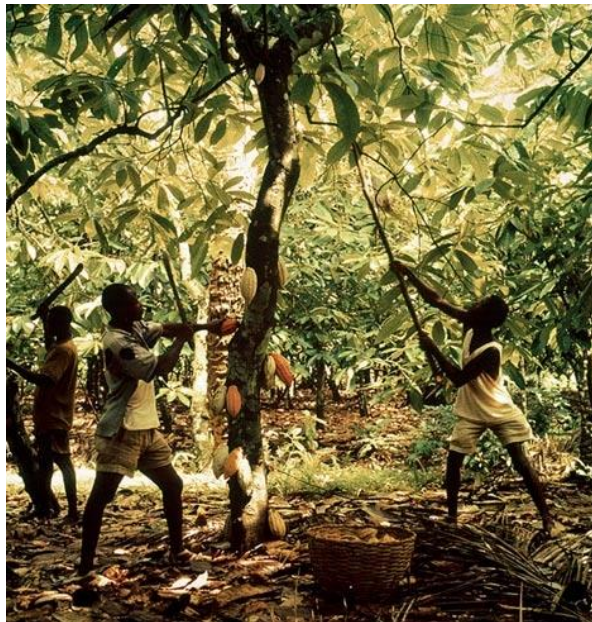


Abbildung 2.5: Ernte der Kakaofrüchte.

Im Anschluss werden die Kakaofrüchte geöffnet und die Pulpa wird mit den Samen z. B. auf Bananenblättern zur Trocknung und vor allem Fermentation ausgebreitet.

Die Fermentation ist entscheidend für die Bildung typischer Aromastoffe und der charakteristischen Färbung der Bohnen. Durch die Hydrolyse von Proteinen und Peptiden entstehen freie Aminosäuren, die Aromavorstufen bilden (28). Sie reagieren mit nichtreduzierenden Zuckern aus den Bohnen und der Pulpa zu Aromastoffen durch die Maillard- und Strecker-Reaktion sowie deren Folgereaktionen bei der sich anschließenden anaeroben Fermentation (29). Parallel dazu läuft in der zuckerhaltigen Pulpa eine alkoholische Gärung ab, wodurch es zu einem Temperaturanstieg auf bis zu 50 °C kommt (10). Durch den Prozess der Gärung wird der vorhandene Sauerstoff schnell verbraucht und der restliche Zucker sowie Ethanol werden zu Essigsäure abgebaut. Der dadurch bedingte Abfall des pH-Werts in den Kakaobohnen bewirkt, dass die einsetzende Keimung aufgehalten wird (12). Durch diese chemischen Prozesse wird die Pulpa verflüssigt und fließt als Gärssaft ab (siehe Abbildung 2.6) (28).



Abbildung 2.6: Fermentation der Kakaobohnen, wobei die Pulpa abfließt.

Die Fermentation unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Region sowie der eingesetzten Menge an Kakaobohnen. Kleinere Mengen an Bohnen werden gehäuft und abgedeckt, wobei sich die Hitze im Haufeninneren bildet. Größere Mengen müssen gewendet und belüftet werden. Ein Beispiel für die Fermentation ist die Boxmethode: Die Bohnen werden in Kisten mit an den Seiten und im Boden befindlichen Löchern gelagert, durch welche die Pulpa abfließt. Hierbei findet eine gleichmäßige Belüftung statt. Die Fermentationsdauer variiert von Sorte zu Sorte von fünf bis zehn Tagen. Dabei benötigt die Edelkakaosorte Arriba mit 24 h eine sehr kurze Dauer zur Entwicklung ihres Aromas (10).

Der nächste Schritt ist die Trocknung des Materials: Der Wassergehalt wird zur Erhöhung der Lagerstabilität von 60 % auf etwa 6 bis 8 % reduziert. Die traditionelle Trocknung in der Sonne bei 50 °C (10) dauert durchschnittlich sechs bis 14 Tage (17). Durch die Sonneneinstrahlung kann das Kakaoaroma optimiert werden (10), (28) und die enzymatische Bräunung der Kakaobohnen wird fortgeführt (30). Um die Trocknung des Bohnenmaterials zu verkürzen, findet sie teilweise auch in elektrischen Trocknungsanlagen oder Gas- und Holzöfen statt. Eine Veränderung des Aromas ist

hierbei wahrscheinlich (10). Die Bohnen sind nach dem Trocknen auf etwa 50 % ihres ursprünglichen Ausmaßes geschrumpft. Sie werden als Rohkakao in Säcke verpackt und in schokoladenproduzierende Länder – v. a. in Nordamerika und Europa – exportiert. Dort erfolgt meistens auch die weitere Verarbeitung der Kakaobohnen nach der Röstung zur -masse (12).

Bei der Röstung werden eine Intensivierung des Aromas sowie die Färbung der Bohnen durch enzymatische und thermische Prozesse erreicht. Die Schalen der Bohnen werden außerdem hart und spröde und lassen sich dadurch leichter ablösen (12). Durch diesen Vorgang wird eine weitere Reduktion des Wassergehalts auf etwa 3 % erreicht. Im Weiteren werden unerwünschte Aromakomponenten wie Essigsäure und Essigsäureester eliminiert (28). Der Prozess wird in die Trocknungs- sowie Röstungsphase unterteilt (28). Im ersten Schritt werden die Bohnen 10 bis 20 min auf ca. 90 °C und im zweiten Schritt etwa 10 min auf ca. 130 °C erhitzt. Dabei werden Darr- oder Röstapparaturen eingesetzt, die kontinuierlich oder im Chargenverfahren arbeiten. Die Wärme wird durch beheizte Flächen oder indirekt durch strömende Heißluft übertragen (31). Im Anschluss werden die gerösteten Kakaobohnen abgekühlt und den Brech- sowie Reinigungsanlagen zugeführt. Schalenbestandteile und Keimwürzelchen werden hierbei abgetrennt. Außerdem werden die Kakaobohnen so zerkleinert, dass sie in großen Bruchstücken mit einem geringen Staub- und Feingutanteil – dem Kakaobruck – anfallen (28).

Der Kakaobruck (Nibs) wird anschließend in Mühlen mit rotierenden Metallscheiben zermahlen, wobei die Kakaomasse entsteht (10). Letztere dient als Grundlage der Schokoladenherstellung oder wird in Kakaopulver und -butter getrennt (10).

Zur Schokoladenherstellung wird die Kakaomasse mit den weiteren Grundzutaten Zucker und Kakaobutter – bei Milkschokolade Milchpulver – vermengt. Dadurch entsteht die Schokoladengrundmasse. Diese wird durch Walzen fein zerrieben und reift anschließend etwa 24 h bei 45 bis 50 °C aus. Es folgt der Conchierungsprozess, bei dem die Schokoladenmasse in Conchen, spezielle Rührwerke für die Schokoladenherstellung, gerieben, gerührt und geknetet wird. Dieser Veredelungsprozess wird in drei Phasen unterteilt: Im ersten Schritt wird durch u. a. Erwärmung der Wassergehalt gesenkt, ein Teil der unerwünschten flüchtigen Bestandteile (v. a. Essigsäure) entfernt und das Fett gleichmäßig verteilt. In der zweiten Phase wird die Schokoladenmasse durch Zugabe von Kakaobutter verflüssigt und homogenisiert. Im letzten Schritt werden die übrigen Zutaten sowie das emulgierende Lecithin hinzugefügt (10), (28). Aus dem folgenden Kristallisationsprozess geht eine Schmelzmasse mit homogenem, feinkristallinem und wärmestabilem Fettgefüge sowie guten Schmelzeigenschaften und optimalem Oberflächenglanz hervor (28).

2.1.3 Kakaoanbau und – wirtschaft (32)

Kakao wird im subtropischen sowie tropischen Gürtel dreier Kontinente produziert: Afrika, Asien und Amerika (siehe 2.1.1). Afrika kultiviert dabei mit Abstand die größte Kakaomenge (siehe Abbildung 2.7).

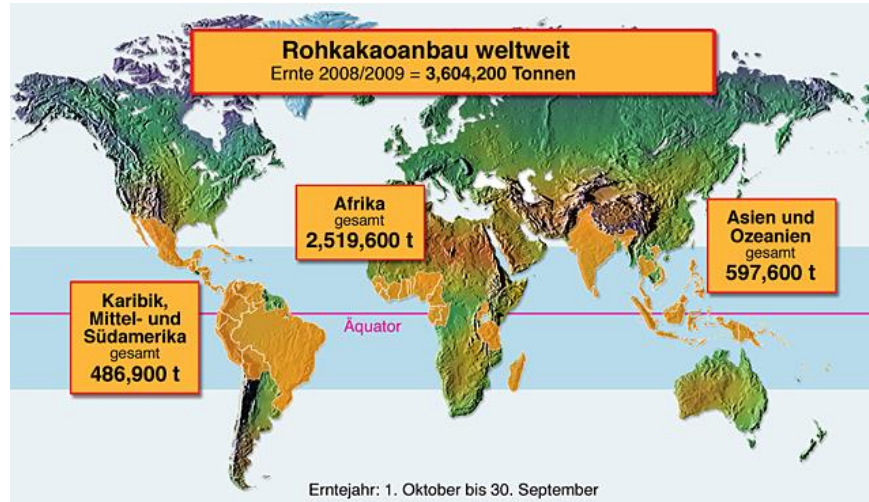


Abbildung 2.7: Menge von produziertem Kakao in den drei Hauptanbaugebieten im Zeitraum 2008/2009.

Mittel- und Südamerika sind die amerikanischen Regionen, in denen Kakao produziert wird. In Abbildung 2.8 sind die Erntemengen dargestellt, die im Zeitraum 2008/2009 auf die jeweiligen Länder dieser Region entfallen. Ecuador ist in diesem Raum Hauptproduzent und liegt im weltweiten Vergleich auf Platz 7, wobei die Elfenbeinküste den ersten Platz belegt.

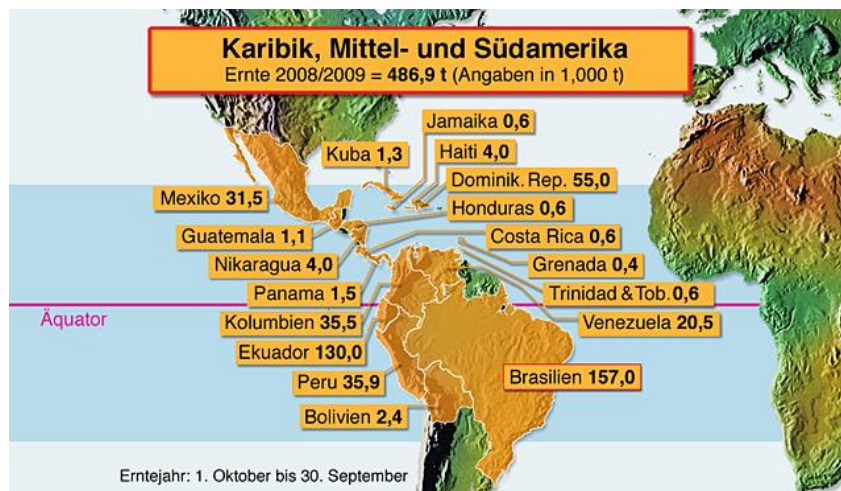


Abbildung 2.8: Kakaoproduktion der Anbauländer in der Karibik, Mittel- sowie Südamerika (2008/2009).

Während sich die Kakaoproduktion auf die in Abbildung 2.7 dargestellten Regionen beschränkt, findet die Weiterverarbeitung des Rohkakao überwiegend in den Ländern statt, in denen Kakaoprodukte konsumiert werden. Afrika ist bspw. der größte Kakaoproduzent und hat zugleich den geringsten Anteil an der Verarbeitung von Rohkakao. Im Gegensatz dazu steht die Europäische Union gemeinsam mit der Schweiz an der Spitze bei der Verarbeitung von Rohkakao (siehe Abbildung 2.9). Deutschland und die Niederlande verwerten dabei die größten Mengen (siehe Abbildung 2.10). Dennoch besteht der Trend, dass die Weiterverarbeitung von Rohkakao immer mehr auch in den produzierenden Ländern stattfindet.

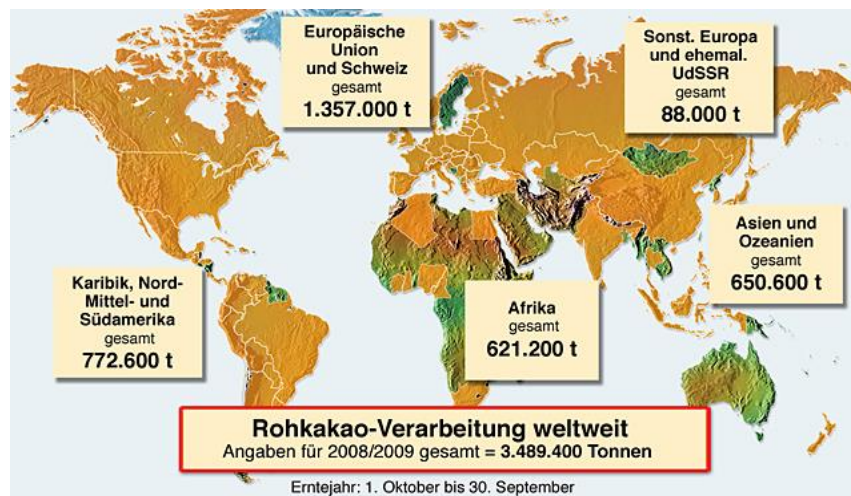


Abbildung 2.9: Verarbeitung an Rohkakao weltweit im Zeitraum 2008/2009.

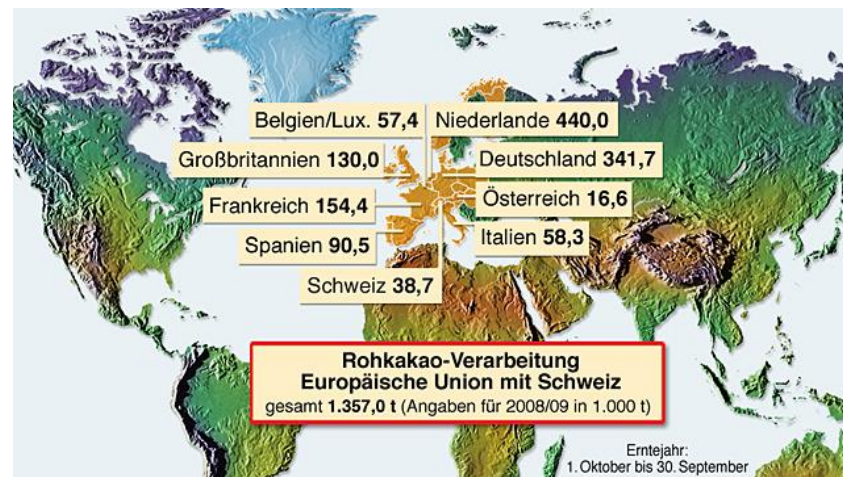


Abbildung 2.10: Verarbeitung an Rohkakao in Europa und in der Schweiz im Zeitraum 2008/2009.

Abbildung 2.11 zeigt die Rohkakaolieferanten von Deutschland. Der Hauptanteil wird von der Elfenbeinküste, einem der Hauptproduzenten von Konsumkakao, bezogen. Ecuador ist wiederum das einzige edelkakaoproduzierende Land, aus dem Deutschland Rohkakao importiert. Die Menge von verarbeitetem Edelkakao aus Ecuador ist mit einem Anteil von 6,2 % demnach gering (1).

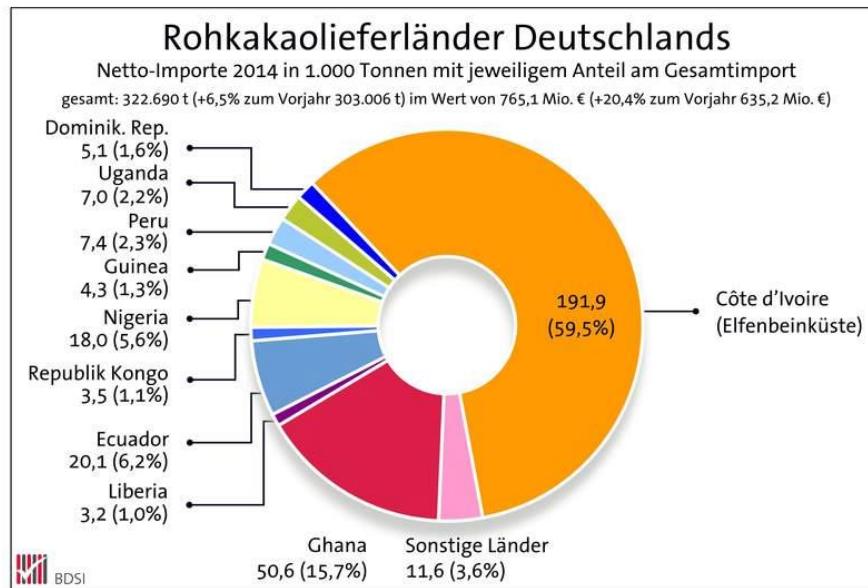


Abbildung 2.11: Rohkakaolieferanten von Deutschland, 2014.

2.1.4 Ecuador und die Kakaosorten Arriba und CCN-51

Die Sorte Arriba hat einen Anteil von mehr als 50 % am weltweiten Anbau von Edelkakao und ist somit die wichtigste Edelkakaosorte (2). Das Land Ecuador, in dem diese Sorte angebaut wird, ist bei den edelkakaoproduzierenden Ländern in Abschnitt C des Internationalen Kakaoabkommens aufgeführt. Somit ist Ecuador für die Edelkakaoproduktion essenziell (32), (1), (33), (3). Eine Ausweitung der Kultivierung dieser Sorte auf andere Gebiete außerhalb Ecuadors findet aufgrund der besonderen klimatischen Bedingungen nicht statt (34), (35). Auch Deutschland bezieht den größten Anteil von Edelkakao aus dieser Region (siehe 2.1.3). Die Sorte (siehe 2.1.2) stammt aus den Tieflandregionen Ecuadors, die stromaufwärts am Fluss Guaya liegen (36). Das charakteristische Aroma der Sorte Arriba ist durch eine geringe Bitterkeit und geringe Adstringenz gekennzeichnet (36), worin ihre Beliebtheit beim Verbraucher sowie die steigende Nachfrage begründet liegen.

Die Popularität der Kakaosorte hat zur Folge, dass andere Sorten minderer Qualität unter der Bezeichnung Arriba verkauft werden (36), wodurch die Einzigartigkeit dieser Edelkakaosorte vermindert wird. Diese Tatsache sowie insbesondere die geringere Resistenz beim Anbau der Sorte Arriba gegenüber anderen Kakaosorten führen dazu, dass die ecuadorianischen Kakaobauern

zunehmend ein Risiko in der Produktion dieser Edelkakaosorte sehen. Sie weichen daher auf den Anbau anderer Sorten aus und konzentrieren sich dabei auf die Kakaosorte CCN-51, die ebenfalls in Ecuador kultiviert wird (33), (32).

Der Klon CCN-51 wurde 1970 von Homer U. Castro in Ecuador gezüchtet und ist eine Kreuzung über Wurzelschnitte aus den Kakaosorten (IMC-67 x ICS-97) x Canelo (4). Die Bezeichnung CCN-51 (Colección Castro Naranjal 51) beinhaltet den Namen des Züchters sowie den Ort der Züchtung neben der Nummer in der Reihe der Züchtungen (37).

Eine Frucht des CCN-51 enthält meistens mehr als 50 Samen und ihr Fettgehalt ist höher als der des Arriba-Kakaos (38), (39). Doch insbesondere aufgrund des schwächeren Aromas zählt die Sorte CCN-51 nicht zu den Edelkakaosorten. Die Sorte ist gleichwohl resistenter gegenüber kakaotypischen Krankheiten wie Hexenbesenkrankheit oder Schwarzfäule und zeichnet sich durch eine hohe Produktivität mit bis zu 2 t Bohnen/ ha jährlich aus (3), (4). Die höhere Resistenz der Sorte gegenüber Krankheiten und Witterungsbedingungen stellt für die ecuadorianischen Kakaobauern im Vergleich zur Sorte Arriba einen Vorteil dar. Der Anbau des pflegeleichteren CCN-51-Kakaos bedeutet ein geringeres Risiko als der des Arriba-Kakaos, da die Erntesicherheit sowie die -erträge bei Ersterem höher sind. Es wird geschätzt, dass der Konsumkakao CCN-51 mittlerweile etwa 20 % der Kakaoanbaufläche Ecuadors einnimmt (3). Die Produktionsmenge von CCN-51 steigt, was der hohen Nachfrage des Verbrauchers nach dem Edelkakao Arriba entgegensteht (siehe 1 Einleitung) (32).

Hersteller von Edelkakaoprodukten befürchten die Vermischung beider Kakaosorten, woraus eine verminderte Qualität der Produkte resultieren würde. Dies könnte einerseits aus wirtschaftlichen Gründen erfolgen: Durch Streckung der edleren Sorte mit der kostengünstigeren wird ein höherer Gewinn erzielt. Andererseits kann die Vermengung auch unbewusst erfolgen: In Ecuador wird Kakao meistens von Kleinbauern produziert, die ihre Ernte zu Sammelstellen bringen, wo die Fermentation oder die Trocknung stattfinden. Werden beide Kakaosorten parallel verarbeitet, ist eine Mischung nicht auszuschließen (3). Um die Authentizität des Edelkakaos sicherzustellen, hat die edelkakaoverarbeitende Industrie ein großes Interesse an Methoden, um beide Sorten zu differenzieren. Die Früchte sowie einzelne und noch nicht verarbeitete Kakaobohnen beider Sorten können anhand ihrer Größe und Form voneinander unterschieden werden (siehe Abbildungen 2.3 und 2.12). Mit steigendem Verarbeitungsgrad ist das umso weniger möglich. In einem Gemisch beider Sorten – v. a. bei kleineren Anteilen einer Sorte – ist die Differenzierung jedoch unmöglich.



Abbildung 2.12: Fermentierte und getrocknete Kakaobohnen von CCN-51 (links) und Arriba (rechts). Die Früchte der beiden Sorten sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

2.1.5 Rechtliche Einordnung von Edelkakaoprodukten

Die Grundlage zur rechtlichen Bewertung von Edelkakao und -produkten bildet die Verordnung über Kakao- und Schokoladenerzeugnisse (Kakaoverordnung, Richtlinie 2000/36/E) (27). Der Kommentar zu dieser Verordnung gibt vor, dass die Herkunft das maßgebliche Kriterium für den Edelkakao ist. Die edelkacaoexportierenden Staaten beschränken sich bis auf Indonesien und Madagaskar auf den süd- und mittelamerikanischen Raum. Darüber hinaus sind dort Qualitätshinweise aufgeführt. Demnach müssen bei einer Edelschokolade mindestens 40 % der verarbeiteten Kakaomasse aus Edelkakao bestehen (40). Das Interesse an Methoden zur Differenzierung von Edel- und Konsumkakao wird ebenfalls erwähnt.

2.2 DNA

2.2.1 DNA als Analyt

Zur Authentizitätsüberprüfung bieten sich alle drei Ebenen der Omics-Bereiche an: Genomics (DNA), Proteomics (Proteine) und Metabolomics (Stoffwechselprodukte).

Die DNA ist individuell und für jeden Organismus über alle Zellen hinweg in ihrer Sequenz identisch. Im Gegensatz zu Proteinen und Stoffwechselprodukten ist sie im Rahmen der für die Lebensmittelanalytik relevanten Zeitskala von äußeren Einflussfaktoren unabhängig: Je weiter entfernt die Verwandtschaft zweier Organismen ist, desto größer sind die Abweichungen in ihrer Sequenz. Mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad – wie es z. B. bei den Sorten und Provenienzen derselben Art der Fall ist – werden die Sequenzen ähnlicher. Trotzdem existieren hier weniger ausgeprägte, aber dennoch nachweisbare Differenzen (41), die für die Entwicklung von DNA-basierten Methoden zur Unterscheidung von Organismen genutzt werden können. Beispielhaft sind Einzelbasenaustausche (SNP = *single nucleotide polymorphism*) zu nennen.

Neben ihrer hohen Spezifität zeigt die DNA eine große Stabilität durch einheitliche physikalische und chemische Eigenschaften. Die für die Analytik notwendige Isolierung der DNA ist wenig komplex und muss lediglich an die vorliegende Matrix angepasst werden. Trotz ihrer Beständigkeit kann die DNA durch äußere Einflüsse geschädigt werden, die bei der Verarbeitung von Lebensmitteln oder der Isolierung der DNA zu beachten sind. Befindet sich die DNA nicht mehr unter dem Schutz der intakten pflanzlichen oder tierischen Zelle, führen z. B. Scherkräfte zur Beeinträchtigung des Moleküls, v. a. zu Fragmentierungen (42), (43). Ein zu saurer pH-Wert führt zu einer irreversiblen Schädigung in Form von Hydrolyse. Ein zu basisches Medium bewirkt eine reversible Denaturierung zu Einzelsträngen. Weitere Veränderungen der DNA – v. a. in Form von Denaturierung – werden durch thermische Einflüsse, Nukleasen, ionisierende oder UV-Strahlung sowie durch Oxidation ausgelöst (44).

In einer pflanzlichen Zelle treten verschiedene Formen der DNA auf: die nukleäre DNA (Kerngenom) mit der rDNA, die mitochondriale DNA sowie die plastidäre DNA (cpDNA oder Chloroplastengenom/cpGenom). Diese Arbeit konzentrierte sich auf das Kern- sowie das cpGenom. Da jedoch eine höhere Variabilität im cpGenom vermutet wurde, liegt der Fokus auf diesem Genom. Arbeiten zur rDNA sowie zur mitochondrialen DNA spielten eine untergeordnete Rolle.

2.2.2 Plastidäre DNA

Chloroplasten sind die charakteristischen Organellen von phototrophen Eukaryoten. Sie sind der Ort der Photosynthese und für die grüne Färbung von Pflanzen verantwortlich. So finden in den Chloroplasten die Reduktion des atmosphärischen Kohlenstoffdioxids sowie die Synthese der Kohlenhydrate statt (41). Sie zählen zu den Plastiden (45) und kommen ausschließlich in Pflanzen vor (46). Plastiden bestehen grundsätzlich aus einer Hülle aus zwei Elementarmembranen sowie einem Membransystem – den Thylakoiden.

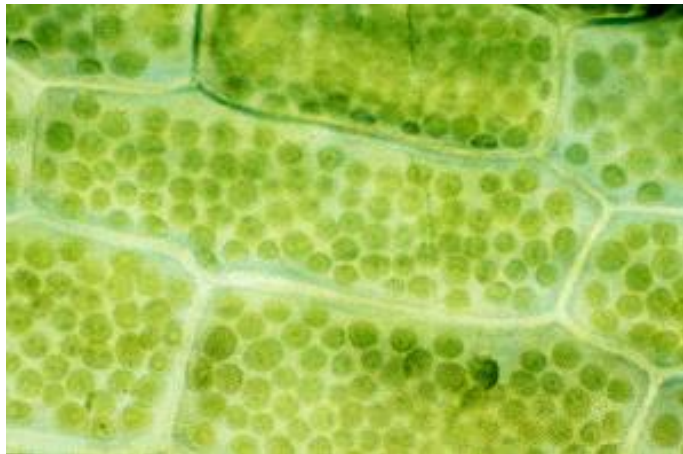


Abbildung 2.13: Pflanzenzelle mit Chloroplasten.

Chloroplasten sind linsen- bis kugelförmig und haben einen Durchmesser von 4 bis 10 μm (47). Ein Blatt verfügt über etwa 500 000 Chloroplasten pro 1 mm^2 Blattmaterial. Mit der Alterung sowie der Größe des Blattes sinkt jedoch die Chloroplastendichte (41). Neben den Chloroplasten befinden sich Stärkekörner, die als Energiespeicher während der Photosynthese gebildet werden (48). Eine photosynthetisch aktive Zelle kann mehr als 100 Chloroplasten enthalten (47), wobei es in den Zellen von *T. cacao* durchschnittlich nur drei sind (49), (50). Die Vererbung des Chloroplastengenoms erfolgt maternal (51).

Die Entstehung der Chloroplasten geht auf die Endosymbiontentheorie zurück. Hiernach haben sich eukaryotische Zellen die Chloroplasten – genau wie die Mitochondrien – in Form von Bakterien durch Phagozytose einverleibt. Partikel wurden vom Zytoplasma umflossen und in einer Nahrungsvakuole eingeschlossen. Die eukaryotische Zelle hat den Endosymbionten nicht verdaut, um sich seine Fähigkeiten anzueignen (52). Hierzu zählen: die Vermehrung durch Teilung, die doppelte Membranhülle sowie die zirkuläre DNA. Letztere weist hohe repetitive Sequenzbereiche auf und liegt nicht an Histone gebunden vor. Auf Basis der Endosymbiontentheorie stellen Chloroplasten semiautonome Organellen mit einer eigenen DNA dar: dem cpGenom (48), (53).

In einem Chloroplast befinden sich die circulären DNA-Moleküle zwischen den Thylakoiden. Die plastidäre DNA ist ein ringförmiges sowie doppelsträngiges Molekül und kommt in mehrfacher Kopie vor. Das heißt, in einem Chloroplasten liegen etwa 70 Kopien der DNA vor (siehe auch 4.4.2). Die durchschnittliche Größe dieses Multicopy-Moleküls beträgt 120 bis 200 kbp (54). Da die Evolution der Chloroplasten sehr langsam verläuft, sind Veränderungen in der Sequenz bei sortenidentischen Pflanzen sehr gering. So ist die cpDNA ein- und derselben Sorte über einen langen Zeitraum hinweg konstant und die intra-Spezies-spezifischen Unterschiede gering (55), (56), (57), (58), (59).

Die Struktur der cpDNA ist generell in vier Regionen gegliedert (60). Die zwei umgekehrten Wiederholungsregionen bzw. Inverted-Repeat-Regionen (IRR) IR a und IR b liegen zwischen einem Small-Single-Copy-Bereich (SSC-Bereich) sowie einem Large-Single-Copy-Bereich (LSC-Bereich) (siehe Abbildung 2.14). Bei höheren Pflanzen entstehen Abweichungen im cpGenom überwiegend durch unterschiedliche Basenpaarlängen in der IRR. Die Größe der IRR beträgt meistens 150 kbp bis 170 kbp.

In Abbildung 2.14 ist das cpGenom von *T. cacao* abgebildet. Nach Jansen et al., 2010 hat es eine Größe von 160 604 bp (61). Es ist etwa 2 000 Mal kleiner als das nukleäre Genom, das eine Größe von etwa 330 000 000 bp aufweist (siehe 2.2.3) (50).

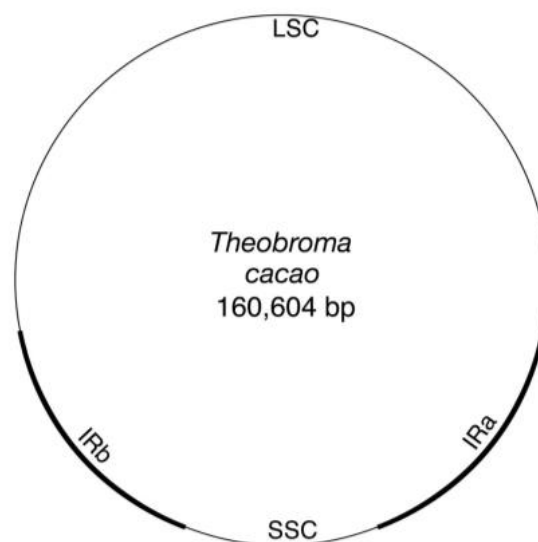


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der cpDNA von *Theobroma cacao*.

Das cpGenom kodiert etwa 100 Proteine, die überwiegend für die Photosynthese benötigt werden. Weitere für den Photosyntheseapparat notwendige Proteine werden im nukleären Genom kodiert (41).

2.2.3 Sequenzen der Genome von *T. cacao*

Um auf Sequenzunterschieden basierende Methoden zur Sortendifferenzierung zu entwickeln, müssen die Sequenzen der Organismen bekannt sein. Daher sind umfangreiche Sequenzierungsarbeiten notwendig oder es wird auf bereits publizierte Genomsequenzen zurückgegriffen. Sowohl das nukleäre als auch plastidäre Genom einiger Sorten von *T. cacao* wurden bereits veröffentlicht. Die Sorte CCN-51 zählt nicht dazu.

Kane et al., 2012 ist es mit der speziellen Technik *low coverage whole genome shotgun sequencing* (siehe 2.3.7) gelungen, von folgenden zehn Sorten die plastidären Genome zu sequenzieren: Criollo-22 (JQ2283679), Amelonado (JQ2283680), ICS-01 (JQ2283681), Scavina-6 (JQ2283682), ICS-06 (JQ2283683), EET-64 (JQ2283684), Stahel (JQ2283685), Pentagonum (JQ2283686), ICS-39 (JQ2283687) und *Theobroma grandiflorum* (JQ2283688) (55). Jansen et al., 2010 (61) sowie Sveinsson et al., 2010 haben ebenfalls das cpGenom entschlüsselt, das unter den Accession-Nummern HQ336404 sowie HQ244500 registriert ist.

Das nukleäre Genom ist ebenfalls zugänglich. Im Rahmen einer Kooperation des Schokoladenherstellers Mars Inc., der Forschungsabteilung des US-amerikanischen Landwirtschaftsministeriums sowie des Computerkonzerns IBM wurden im Jahr 2010 92 % des nukleären Genoms der Kakaosorte Matina 1-6 sequenziert (62), (63). Argout et al., 2010 haben das nukleäre Genom der Sorte Criollo entschlüsselt (64). Das Team um Mars Inc., 2010 hat einen Konsumkakao und das Team um Argout et al., 2010 einen Edelkakao als Probenmaterial eingesetzt. Daher ist der Vergleich der beiden Kerngenome im Rahmen dieser Arbeit relevant (siehe 4.3). Beide Sequenzen sind im Internet zugänglich: www.cacaoenomedb.org (65) und www.cocoagendb.cirad.fr (66).

2.3 Methoden

Die Methoden sind in drei Schwerpunkte untergliedert: erstens die Isolierung der DNA sowie die Charakterisierung der erhaltenen Isolate, zweitens die angewendeten Methoden sowie drittens die Vorgehensweise der Sequenzierung.

2.3.1 DNA-Isolierung und Charakterisierung der Isolate

Die in dieser Arbeit angewendete Isolierung der DNA wird der vorliegenden Matrix angepasst und ist in drei Arbeitsschritte unterteilt: Aufschluss der Zelle, Trennung der DNA von unerwünschten Zellbestandteilen und Reinigung sowie ggf. Konzentrierung der DNA.

Moleküle mit einem hohen Molekulargewicht, wie die DNA, können durch den Aufschluss der Zellwand besser extrahiert werden. Daher wird im ersten Schritt die pflanzliche Zellwand zerstört, die wesentlich robuster als die Membran tierischer Zellen ist. Der Aufschluss pflanzlicher Zellwände bedarf einer mechanischen Behandlung (67), (68). Bei Blattmaterial kann vorher eine Zerkleinerung mittels Mörser unter flüssigem Stickstoff erfolgen. Die Zellwand kann zusätzlich auch thermisch oder chemisch aufgebrochen werden. Dazu wird ein Extraktionspuffer eingesetzt, der den pH-Wert konstant hält, das Gewebe aufschließt und DNA-gebundene Proteine abbaut. Zusätzlich werden Enzyme inhibiert, die durch den Aufschluss der Zellwand freigesetzt werden und die DNA abbauen. Komponenten dieses Puffers sind grenzflächenaktive Substanzen wie die Tenside Natriumlaurylsulfat (SDS), Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) oder Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris).

Im folgenden Schritt werden die übrigen Zellbestandteile entfernt. Dabei werden organische Lösungsmittel, bspw. Chloroform, eingesetzt. Sie denaturieren und fällen Proteine und lösen Lipide. Da die DNA wasserlöslich ist, verbleibt sie in der wässrigen Phase und wird nicht mit den anderen Bestandteilen abgetrennt (69). Proteine und Polysaccharide werden durch das im Extraktionspuffer enthaltene CTAB komplexiert und mittels Zentrifugation abgetrennt. Die DNA verbleibt hierbei wegen der hohen Salzkonzentration in Lösung. Mitunter werden auch Enzyme wie Proteasen und Amylasen eingesetzt. Durch Zugabe eines Alkohols, wie Isopropanol, wird die DNA gefällt. Der Alkohol wirkt auf die Hydrathülle ein und verursacht eine Abnahme der Löslichkeit.

Eine weitere Fällungsmethode basiert auf der Extraktion der DNA mit CTAB. Der Zellaufschluss geschieht nach Zugabe von CTAB, Polyvinylpyrrolidon und Mercaptoethanol in einem Tris-Puffer (pH 8). Es folgt eine Chloroform-Isoamylalkohol- oder eine Chloroform-Octanol-Extraktion. Aufgrund des basischen pH-Werts bleibt die DNA in der wässrigen Phase gelöst. Die wässrige Phase wird abgetrennt und die DNA hieraus mittels Ethanol gefällt.

Zur Reinigung der DNA-Isolate wird z. B. 70 %iger Ethanol eingesetzt. Salz- und Alkoholreste bleiben im Überstand gelöst und werden abgetrennt. Neben Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR)-inhibierenden Bestandteilen wie Kohlenhydraten und Phenolen müssen die während der DNA-Isolierung zugesetzten Substanzen wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethanol oder Isopropanol abgetrennt werden (70), (71), (72).

Neben den beschriebenen Präzipitationsverfahren zur Isolierung von DNA werden weitere eingesetzt, die auf Adsorption und Waschschritten basieren. Hierzu werden Silicaoberflächen verwendet (73), wobei das Phosphat-Zucker-Rückgrat der DNA an die Oberfläche bindet (74).

Die DNA-Isolate werden hinsichtlich ihrer Reinheit sowie ihres Gehalts charakterisiert. Die Ausbeute an DNA kann sowohl fluorimetrisch als auch photometrisch ermittelt werden. Zur fluorimetrischen Bestimmung wird ein interkalierendes Fluorophor, bspw. SYBR Green I (siehe Abbildung 2.15), eingesetzt. Dieser Farbstoff bindet an der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix und lagert sich demnach lediglich in doppelsträngiger DNA (*double stranded DNA* = dsDNA) ein. Im interkalierten Zustand erfolgt eine Zunahme der Fluoreszenz, die messbar ist und sich proportional zur DNA-Konzentration verhält (74), (75). Bei der photometrischen Bestimmung des DNA-Gehalts wird das Spektrum von 200 bis 300 nm aufgenommen und die DNA-Konzentration über die Absorption bei 260 nm ermittelt (76).

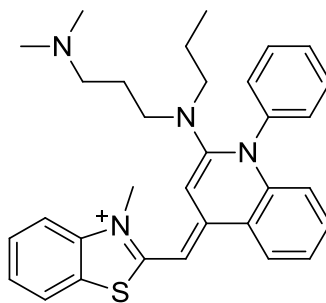


Abbildung 2.15: Strukturformel des interkalierenden Fluorophors SYBR Green I.

Die Reinheit eines DNA-Isolats wird photometrisch abgeschätzt, wobei das Spektrum zwischen 220 nm und 350 nm ausgewertet wird. Bei 260 nm zeigt reine DNA ein Absorptionsmaximum. Der Quotient $E_{260/280}$ aus den Extinktionen bei 260 nm und 280 nm hat dabei einen Wert von etwa 1,9. Ein Wert von $E_{260/280} < 1,8$ ist ein Hinweis auf Verunreinigungen durch Phenole oder Proteine, deren aromatische Aminosäuren bei 280 nm absorbieren (77), (78). Verunreinigungen, die keine oder eine der DNA ähnliche UV-Aktivität besitzen, werden mittels dieser Methode nicht erfasst.

2.3.2 Amplifikation der DNA – Polymerase chain reaction (PCR)

Die PCR ist ein enzymkatalysiertes *in-vitro*-Verfahren, mit dem definierte DNA-Abschnitte amplifiziert werden (79). Dieser Methode liegt das Prinzip der natürlichen Replikation der DNA in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen zugrunde (80). Einzelsträngige DNA (*single stranded* DNA = ssDNA) dient hierbei als Matrize für die Synthese von dsDNA. Eingesetzt wird ein Primer-Paar, bestehend aus Vorwärts-Primer (*Forward*-, *Fw-Primer*) und Rückwärts-Primer (*Reverse*-, *Re-Primer*). Die zwei sequenzspezifischen Oligonukleotide hybridisieren während der sogenannten Annealing-Phase mit der Ziel-DNA und flankieren den zu amplifizierenden Sequenzabschnitt: das Templat. Die Primer lagern am jeweiligen 3'-Ende des *Sense*- bzw. *Antisense*-Stranges an. Die Ziel-DNA muss während dieser Phase in Einzelsträngen vorliegen, was durch eine vorangegangene Hitzedenaturierung (94 °C) geschieht. In der folgenden Elongationsphase verlängert die Polymerase das freie 3'-OH-Ende der Primer unter Zuhilfenahme von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs). Wasser und Pyrophosphat werden dabei freigesetzt. Ein Zyklus, bestehend aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation, führt zu einer Verdoppelung der vorhandenen Templatmenge. In einem zweiten Zyklus dient der neu synthetisierte DNA-Strang ebenfalls als Templat. Die etwa 30- bis 40-fache Wiederholung dieses Zyklus führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Sequenzabschnitts. Sie folgt im Optimalfall der Gleichung 2^n mit n Zyklen. Der erwünschte DNA-Abschnitt liegt am Ende in erhöhter Konzentration vor (81), (82).

Die PCR wurde 1983 von Kary B. Mullis entwickelt, zählt zu den bedeutendsten Methoden der Molekularbiologie (83) und ist in der Lebensmittelanalytik etabliert. So können z. B. die Authentizität von Lebensmitteln (84), (85), der Nachweis gentechnisch veränderter Lebensmittel (86) sowie mikrobielle Verunreinigungen in Lebensmitteln (87), (88) mittels PCR untersucht werden.

Die PCR ist von einer Vielzahl von Reaktionskomponenten abhängig. Sie müssen in optimaler und angepasster Konzentration im Reaktionsgemisch vorliegen (siehe 3.6, Tabelle 3.5).

Die am häufigsten in der PCR-Analytik eingesetzte Polymerase ist die *Taq*-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Der Organismus lebt in heißen Quellen, wodurch die Polymerase temperaturstabil ist (89). Das Optimum liegt zwischen 75 ° und 80 °C (90). Durch den Einsatz von *hot start*-Polymerasen kann die PCR optimiert werden. So wird bspw. die Bindung an unerwünschte Template verringert. Die *hot start*-Polymerase ist bei Raumtemperatur inaktiviert und wird erst durch höhere Temperaturen (95 °C, 10 min) zu Beginn der PCR aktiviert (91).

Im Reaktionsgemisch sind dNTPs enthalten. Sie bilden das Substrat der Polymerase und somit die Bausteine des zu synthetisierenden DNA-Strangs. Magnesiumchlorid fungiert als Co-Faktor der

Polymerase. Durch Magnesium wird die Prozessivität des Enzyms beeinflusst. Es erhöht zugleich auch die Schmelztemperatur der DNA. dNTPs bilden mit den Magnesiumionen einen Komplex und werden so von der Polymerase erkannt (92), (93).

Durch Zugabe eines Puffers wird die Prozessivität der Polymerase ebenfalls erhöht (92). Puffernde Substanz ist hierbei Tris-HCl. Dimethylsulfoxid (DMSO), Formamid oder Betain können als weitere Zusätze des Puffers zur Erhöhung der Spezifität eingesetzt werden (94), (95), (96). Das Protein Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin* = BSA) stabilisiert Enzyme wie die Polymerase und erhöht die PCR-Ausbeute bei Templaten mit geringerer Reinheit. Es unterbindet die Adhäsion der Polymerase an Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen (97).

Endpunkt-PCR

Bei einer Endpunkt-PCR werden in der Regel 35 bis 40 Reaktionszyklen durchlaufen. Die Reaktion hat sich dann erschöpft und es wird keine DNA mehr gebildet. Dies geschieht z. B. durch den Verbrauch von Komponenten im Reaktionsgemisch. Da während der PCR Pyrophosphat entsteht, das als schwerlösliches Magnesiumpyrophosphat ausfällt, werden z. B. weniger Magnesiumionen als Co-Faktor für die Polymerase zur Verfügung gestellt. Nach der Detektion der gebildeten PCR-Produkte (siehe 2.3.3) können qualitative Aussagen über die PCR, bspw. die Spezifität eines Primers, getroffen werden.

Real-time PCR

Die *Real-time* PCR ist ein Verfahren, um die Menge an Start-DNA zu quantifizieren. Die Vervielfältigung der DNA wird durch das Messen von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit über 35-40 Zyklen begleitet. Die Fluoreszenz nimmt hierbei proportional mit der Menge der Amplifikate zu. Das Fluoreszenzsignal steigt umso früher an, je mehr Target-DNA vorliegt. Bei dieser Methode werden interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet (z. B. SYBR Green I, siehe Abbildung 2.15). Zur Quantifizierung während der PCR wird auch der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) genutzt. Man unterscheidet hierbei zwischen verschiedenen Systemen, bspw. *LightCycler*-Sonden, *Molecular Beacon*, *LoopTag*-Sonden oder *TaqMan*-Sonden (98).

Die Quantifizierung erfolgt unter Zuhilfenahme des C_t -Wertes („*threshold-cycle*“ = C_t). Dieser entspricht der zweiten Ableitung der Kurvenfunktion. Er beschreibt den Zyklus, bei dem das Signal erstmals über der Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Zwischen dem C_t -Wert und der Menge an Ausgangs-DNA besteht kein linearer, sondern ein exponentieller Zusammenhang. Daher wird zur Auswertung der durchgeführten *Real-time* PCR der C_t -Wert gegen den Logarithmus der Konzentration

$\log c$ aufgetragen. Aus der Geradensteigung m lässt sich die Effizienz E ableiten, die angibt, ob in jedem Zyklus eine Verdoppelung des Templates stattgefunden hat.

2.3.3 Detektion von PCR-Produkten

Nach der PCR werden die PCR-Produkte visualisiert und vor allem in Abhängigkeit von ihrer Größe detektiert.

Elektrophorese

Bei einer Elektrophorese wandern elektrisch geladene Teilchen durch ein elektrisches Feld, wobei die Auftrennung von DNA-Molekülen aufgrund ihrer negativen Ladung erfolgt. Die Methode wird in einer Matrix durchgeführt, in der größere DNA-Fragmente stärker zurückgehalten werden als kleinere. Die Wanderung im elektrischen Feld ist aufgrund dieser größeren Behinderung langsamer. Da die Moleküle ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis haben, erfolgt die Trennung nach Größe. Man unterscheidet z. B. die Agarosegelelektrophorese (AGE) sowie die Kapillargelelektrophorese (CGE).

AGE:

Mittels AGE werden die PCR-Produkte ihrer Länge nach in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Im Anschluss werden sie mit einem Interkalationsfluorophor wie Ethidiumbromid (siehe Abbildung 2.16) inkubiert und unter UV-Licht (Anregungswellenlänge: 312 nm, Emissionswellenlänge: 605 nm) betrachtet.

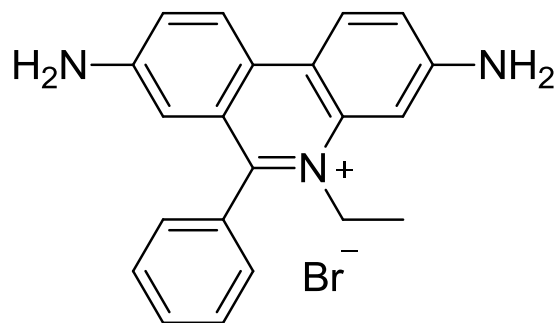


Abbildung 2.16: Strukturformel von Ethidiumbromid

CGE:

Alternativ zur AGE wird das hochauflösende Trenn- und Detektionsverfahren CGE eingesetzt. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgt dabei in einer Kapillare, die sowohl mit einem Elektrolyten als auch einer polymeren Gelmatrix gefüllt ist.

Die Methode der CGE mit einem Mikrochip, die *Lab-on-a-Chip*-CGE (LOC-CGE), wird im Mikromaßstab durchgeführt. In einen Glaschip sind Kapillaren in Form von Mikrokanälen geätzt, die entsprechend befüllt sind und in denen die Analyse erfolgt (69), (99), (100). In Abbildung 2.17 ist ein *Lab-on-a-Chip* dargestellt.

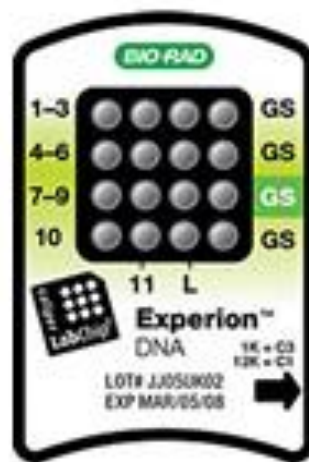


Abbildung 2.17: DNA 1K
Experion Chip mit den vier
GS-, der L- sowie den
Kavitäten 1-11; Hersteller:
Bio-Rad.

Die Detektion erfolgt über ein Interkalationsfluorophor und einen laserinduzierten Fluoreszenzdetektor, der die fluoreszierende DNA am Ausgang der Kanäle misst (101). Im Anschluss werden die Signale in ein digitales Gel oder ein Elektropherogramm umgewandelt.

Denaturierende HPLC (dHPLC)

Hauptsächlich wird das Verfahren der dHPLC zur Identifizierung von Mutationen und bei DNA-Varianzanalysen angewendet (102). Die Methode wird ferner zur Identifizierung von PCR-Produkten eingesetzt (103).

Die dHPLC ist eine Ionenpaar-Umkehrphasen-Flüssigchromatografie. Die Trennung erfolgt mit einem hydroorganischen Laufmittel, das ein amphiphiles Ion (bspw. Triethylammoniumion) sowie ein hydrophiles Gegenion (bspw. Acetat) enthält. Die amphiphilen Ionen lagern sich zwischen die unpolare stationäre Phase (alkylierte, nichtporöse Polystyroldivinylbenzol-Partikel, Ø 2 bis 3 µm (104)) und die hydroorganische mobile Phase. Die Trennung basiert bei der dHPLC auf der Wechselwirkung zwischen der positiv geladenen Oberfläche und der negativen Ladung der DNA. Durch einen zunehmenden Anteil an organischem Lösungsmittel, z. B. Acetonitril, werden die Fragmente an das Säulenmaterial gebunden. Der pH-Wert muss beachtet werden: In einem zu sauren Milieu nimmt die Ladung der DNA ab. Ein zu alkalischer pH-Wert führt zur Denaturierung der DNA (105).

In Abbildung 2.18 wird ein schematischer Aufbau der dHPLC gezeigt. In Abhängigkeit von der Temperatur unterscheidet man verschiedene Arbeitsmodi (die Säule ist durch einen Ofen beheizbar): Im nicht denaturierenden *Sizing*-Modus bei 45 bis 50 °C ist die Retentionszeit der dsDNA-Fragmente ausschließlich längenabhängig. Da längere Fragmente über mehr Phosphatgruppen verfügen, binden sie länger an das Säulenmaterial als kürzere.

Im denaturierenden Modus bei 75 bis 95 °C liegt die gesamte DNA in Einzelsträngen vor. Eine Renaturierung der ssDNA zu dsDNA erfolgt unter Abkühlung auf Raumtemperatur. Für eine Mutationsanalyse werden im partiell denaturierenden Modus bei 50 bis 75 °C ideale Trennergebnisse erzielt. Am Ende liegen Heteroduplexe- neben Homoduplexen vor und können so voneinander getrennt werden. Dabei sind pro SNP vier Peaks sichtbar (siehe Abbildung 2.18). Aufgrund des geringeren Schmelzpunkts von Heteroduplexen im Vergleich zu Homoduplexen liegen die Fragmente zu 70 bis 85 % als dsDNA und zu 15 bis 30 % als ssDNA vor. (106), (107).

Nach der Trennung und der Elution wird die DNA mittels UV oder Fluoreszenz detektiert.

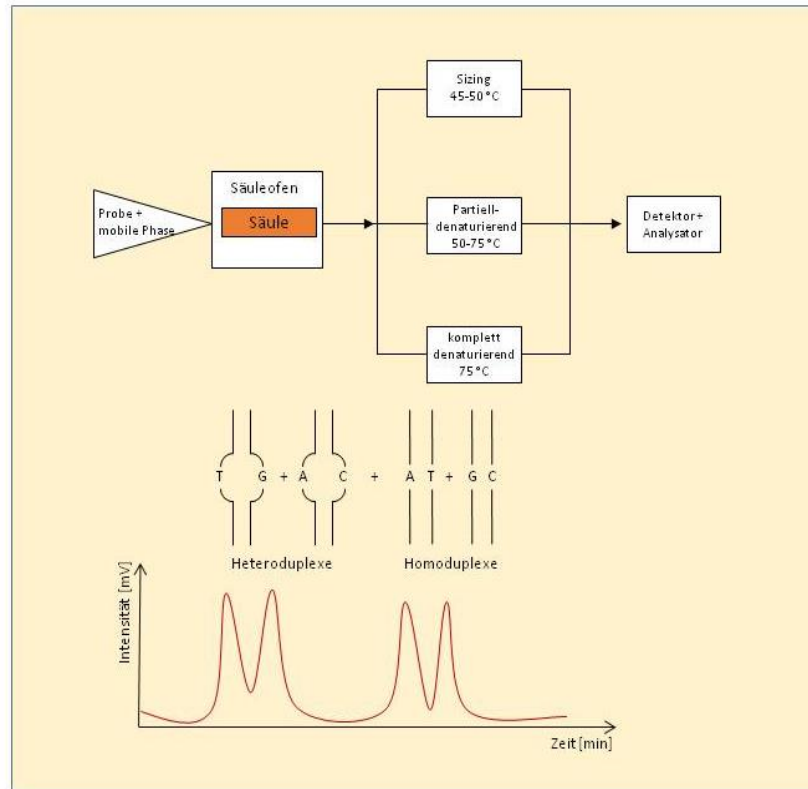


Abbildung 2.18: Schematischer Aufbau einer dHPLC mit den drei Arbeitsmodi und partiell-denaturierender Modus für eine optimale Trennung von Hetero- und Homoduplexen.

2.3.4 PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Bei einer RFLP-Analyse werden Endonukleasen eingesetzt. Diese kommen in Bakterien und Archaeen vor und dienen der Phagenabwehr. Bei der RFLP-Analyse werden DNA-Fragmente durch Endonukleasen geschnitten (41), (108), (44).

Das Enzym erkennt eine spezifische Sequenz (seine Erkennungssequenz), die vier bis acht Basenpaare lang ist. Ist die Sequenz der zu schneidenden DNA bekannt, so ist das entstehende Schnittmuster vorhersehbar (109).

Endonukleasen werden entsprechend ihrem Verhalten beim Schneiden von DNA in vier Typen unterteilt. Die im Rahmen einer RFLP-Analyse eingesetzten Enzyme sind allgemein dem Typ II zuzuordnen. Sie unterscheiden sich von den anderen Typen I, III und IV insofern, als sie die DNA innerhalb der Erkennungssequenz oder in deren unmittelbarer Nähe schneiden. Sie benötigen kein Adenosintriphosphat (ATP) und besitzen keine Methyltransferaseaktivität (81), (109), (69). Je nach Enzym entstehen Fragmente mit glatten Enden („*blunt ends*“) oder kurzen einzelsträngigen

Überhängen („sticky ends“) (110). Die Temperatur während der RFLP entspricht der Stoffwechseltemperatur des Organismus, aus dem das Enzym isoliert wurde. Die meisten Endonukleasen zeigen daher bei 37 °C die höchste Aktivität. In Abbildung 2.19 sind die in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsendonukleasen *Asel*, *EcoRI*, *EcoRV* und *PsiI* mit ihren Erkennungssequenzen sowie ihren Schnittmustern dargestellt.

Name	Herkunft	Erkennungssequenz	Schnittmuster
<i>Asel</i>	<i>Aquaspirillum serpens</i>	5' ... ATTAAT ... 3' 3' ... TAATTA ... 5'	<i>Sticky end</i>
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5' ... GAATTC ... 3' 3' ... CTTAAG ... 5'	<i>Sticky end</i>
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i>	5' ... GATATC ... 3' 3' ... CTATAC ... 5'	<i>Blunt end</i>
<i>PsiI</i>	<i>Pseudomonas species</i>	5' ... TTATAA ... 3' 3' ... AATATT ... 5'	<i>Blunt end</i>

Abbildung 2.19: Erkennungssequenz und Schnittmuster der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen.

Zwischen sehr nah miteinander verwandten Organismen tritt häufig nur ein SNP auf. Basierend auf diesem SNP können mittels einer PCR-RFLP zwei Individuen voneinander unterschieden werden (41): Befindet sich der SNP in der Erkennungssequenz einer Endonuklease, verfügt die eine Sorte über die korrekte Erkennungssequenz und die andere nicht. Nach der Amplifikation und Restriktion der Template beider Sorten werden für die eine Sorte zwei kleinere Fragmente erhalten. Für die andere Sorte wird nur das ungeschnittene PCR-Produkt detektiert. Sorten können durch die Detektion von Fragmenten bspw. über AGE oder CGE mit dieser Methode voneinander unterschieden werden (108).

2.3.5 Ligation-dependent probe amplification (LPA)

SNPs können auch Basis einer LPA sein. Bei diesem Verfahren werden zwei zur Zielsequenz komplementäre Oligonukleotide verwendet: *Left-Probe-Oligonucleotide* (LPO) und *Right-Probe-Oligonucleotide* (RPO). Die Struktur beider Oligonukleotide setzt sich, wie in Abbildung 2.20 dargestellt, aus einer der Targetsequenz entsprechenden Sequenz sowie einem Primer zusammen:

- LPO: Das 5'-Ende wird vom Universal-Fw-Primer gebildet. Dessen bindende Sequenz ermöglicht die PCR. Das 3'-Ende der LPO entspricht einer Sequenz, die zur Targetsequenz komplementär ist und daher mit ihr hybridisiert, die *Left Hybridizing Sequence* (LHS). Die LHS ist somit einer der zwei spezifischen Abschnitte.
- RPO: Das 5'-Ende wird von der die Targetsequenz hybridisierenden Sequenz *Right Hybridizing Sequence* (RHS) – dem zweiten spezifischen Abschnitt – gestellt. Der Universal-Re-Primer bildet das 3'-Ende des RPO.

Die Oligonukleotide hybridisieren lückenlos und in unmittelbarer Nachbarschaft an das Target. Bei der darauffolgenden Ligation werden die Oligonukleotide LPO und RPO durch den Einsatz einer Ligase verknüpft. Die Ligase ist empfindlicher als z. B. die Polymerase, sodass durch die Anwesenheit bspw. eines SNPs keine enzymatische Verknüpfung erfolgt. Bei der darauffolgenden Amplifikation kommen die gekoppelten Universalprimer zum Einsatz. Wurden LPO und RPO nicht miteinander verknüpft, läuft die Amplifikation nicht ab. In diesem Fall kann kein Amplifikat detektiert werden. Unterscheiden sich zwei Organismen durch einen SNP, können sie durch die LPA voneinander differenziert werden: Für den einen Organismus ist ein Amplifikat zu beobachten, für den anderen nicht (111), (112).

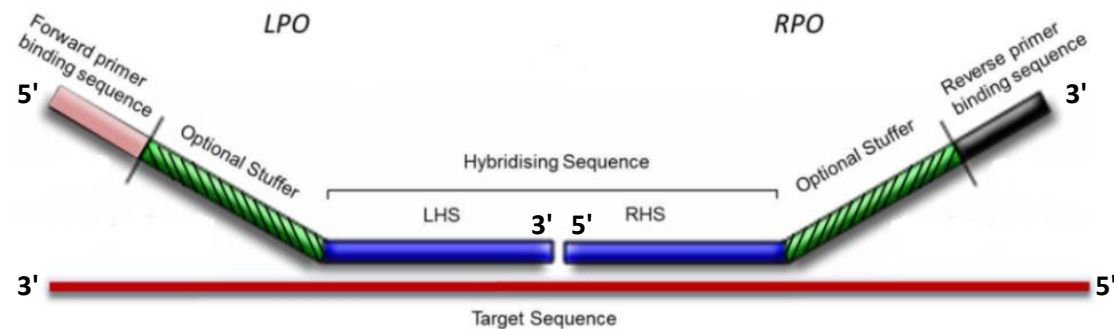


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der LPA.

2.3.6 High resolution melting analysis (HRMA)

PCR-Produkte können über eine hochauflösende Schmelzpunktanalyse (HRMA) charakterisiert werden. Der Schmelzpunkt ist die Temperatur, ab der die dsDNA in zwei Einzelstränge zerfällt. Die Amplifikate werden einem Temperaturgradienten ausgesetzt und das Schmelzverhalten wird mittels eines Interkalationsfarbstoffs beobachtet. Da der Schmelzpunkt eines Amplifikats neben seiner Größe von seiner Sequenz abhängig ist, kann die HRMA auch analytisch zur DNA-basierten Sortendifferenzierung genutzt werden. Haben die Amplifikate zweier ähnlicher Organismen eine abweichende Länge oder Unterschiede in ihrem Basenmuster, unterscheidet sich auch die Schmelztemperatur.

2.3.7 Sequenzierung

Eines der wichtigsten Verfahren zur Sequenzaufklärung ist das nach Sanger (44), (113), (114). Die Leseweite dieser Methode entspricht etwa 1 000 Nukleotiden, wobei die Analyse von 500 Nukleotiden in der Routineanalytik realistisch ist (69). Das Sanger-Verfahren wird vor allem zur partiellen Sequenzierung angewendet, z. B. zur Kontrolle von PCR-Produkten zum Vergleich mit bekannten Sequenzen. Mit Primern wird ein definierter Abschnitt sequenziert.

Die Methode basiert auf einer enzymatisch katalysierten Kettenabbruchsynthese, deren Produkte basenspezifisch terminierte DNA-Fragmente sind (81). Dabei wird eine PCR mit nur einem Primer durchgeführt, der den Startpunkt der Sequenzierung markiert. Neben gewöhnlichen dNTPs werden in geringer Konzentration 2'-3'-Dideoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) eingesetzt (114), (115), (116), die basenspezifisch mit einem Fluorophor versehen sind. Bei der Strangsynthese wird ein dNTP oder ein ddNTP eingebaut. Die statistische Häufigkeit ist hierbei vom eingesetzten dNTP/ddNTP-Verhältnis abhängig. Durch den Einbau eines ddNTPs wird die Polymerisation an dem entsprechenden Strang abgebrochen, da der Polymerase kein freies 3'-OH-Ende zur weiteren Synthese zur Verfügung steht. Dadurch entsteht ein Gemisch aus basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten. Sie unterscheiden sich in der Länge um eine Base mit einer für die jeweils letzte Base des Strangs spezifischen Fluoreszenzmarkierung. Da die vier ddNTPs unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe tragen, kann die Sequenzierungsreaktion in einem Ansatz durchgeführt werden. Es folgt eine hochauflösende CGE bei einer anschließenden Detektion mit vier verschiedenen Emissionswellenlängen. Im Elektropherogramm wird die Sequenz dargestellt: Die sich um eine Base unterscheidenden Fragmente erscheinen als Peaks, die das jeweilige ddNTP anzeigen. Da nur ein Primer eingesetzt wird, kommt es nicht zu einer exponentiellen, sondern einer linearen Vervielfältigung des DNA-Moleküls.

Aufgrund der Nachfrage nach schnelleren sowie kostengünstigen Methoden wurden Hochdurchsatz-Sequenzierungen entwickelt. Mit *next-generation-sequencing*-Verfahren ist es möglich, komplette Genome zu sequenzieren. Im Gegensatz zur Sequenzierung nach Sanger werden bei Genomsequenzierungen keine Primer eingesetzt; sie sind *non-targeted*. Ein Beispiel für eine *next-generation-sequencing*-Methode ist das Verfahren nach Illumina. Die fragmentierte Template-DNA wird über spezifische Adaptoren kovalent an einen Glasobjektträger gebunden. Ausgehend vom gebundenen Molekül werden ähnlich einer PCR Cluster aus identischen Molekülen gebildet. Der Vorgang läuft in Zyklen ab und unter Nutzung reversibler Terminatorchemie sowie fluoreszenzmarkierter Nukleotide. Pro Zyklus wird ein Nukleotid komplementär zur Template-DNA eingebaut. Hiernach erfolgt die Abspaltung der Fluoreszenzgruppe, das folgende Lichtsignal kann detektiert und die Terminatorgruppe entfernt werden. Im nächsten Zyklus kann ein weiteres Nukleotid

eingebaut werden. Mithilfe der Illumina-Sequenzierung kann eine *paired-end*-Sequenzierung durchgeführt werden. Dabei werden die DNA-Fragmente von jeder Seite mit einer vorher festgelegten Leseweite (etwa 100 bis 250 bp) sequenziert. Die Reads können in Abhängigkeit der Größe der Fragmente überlappen. Diese Methode erhöht die Genauigkeit der Sequenzierung.

Kane et al., 2012 haben die Methode *low coverage whole genome shotgun sequencing* vorgestellt. Um ein gesamtes Genom zu sequenzieren, sollte es möglichst frei von anderer DNA sein. Das heißt, dass bei der Sequenzierung eines cpGenoms die nukleäre DNA nicht anwesend sein sollte. Die Trennung der nukleären von der plastidären DNA bedeutet jedoch einen großen Aufwand (50). Diese Trennungsschritte entfallen entsprechend Kane et al., 2012. So ist die Sequenzierung des cpGenoms auch in Anwesenheit des Kerngenoms durchführbar: Die cpDNA ist wesentlich kleiner als die nukleäre DNA, allerdings in erhöhter Kopienzahl pro Zelle. Sie stellt die *high-copy*-Fraktion dar (siehe 2.2.2). Aufgrund einer geringen Abdeckung während der Sequenzierung wird lediglich diese Fraktion erfasst (55), (117), (118).

2.3.8 Mikrosatellitenanalyse

Individuen können auch durch die Analyse von Mikrosatellitenmustern voneinander differenziert werden. Mikrosatelliten – auch *Simple Sequence Repeats* (SSR) – sind repetitive DNA-Abschnitte. Die kurzen und nichtkodierenden Genom-Sequenzen wiederholen sich am selben Locus. Die Sequenz ist sehr einfach und besteht aus wenigen Nukleotiden (siehe Abbildung 2.21). Die Wiederholung eines SSR tritt in unterschiedlicher Häufigkeit auf. Die Zahl der Wiederholungen ist umso ähnlicher, je näher der Verwandtschaftsgrad zweier Organismen ist. Aus einer PCR, bei der die Primer die Region der Mikrosatelliten flankieren, resultieren Amplifikate unterschiedlicher Größe durch die unterschiedliche Wiederholung. Je näher verwandt zwei Organismen sind, desto ähnlicher ist auch die Größe ihrer Amplifikate.

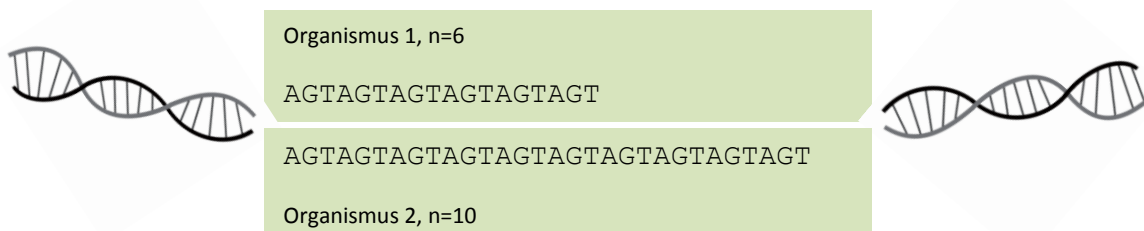


Abbildung 2.21: Beispiel für einen Mikrosatelliten. Die Sequenz AGT wird in Organismus 1 sechsmal und in Organismus 2 zehnmal wiederholt. Das Amplifikat von Organismus 1 ist nach einer PCR mit diese Region flankierenden Primern um 12 bp kleiner als das von Organismus 2.

2.4 Molekularbiologische Arbeiten zu *Theobroma cacao*

In der folgenden Tabelle 2.1 sind molekularbiologische Arbeiten zu *Theobroma cacao* aufgeführt, die sich auf die Differenzierung von Sorten sowie die Sequenzierung kompletter Genome konzentrieren.

Tabelle 2.1: Molekularbiologische Arbeiten zur Differenzierung von Sorten sowie Sequenzierung kompletter Genome.

	Autoren	Angewendete Methode	Titel
Botanische Charakterisierung von <i>Theobroma cacao</i> -Arten	Lerceteau et al., 1997	RAPD, RFLP	<i>Genetic differentiation among Ecuadorian Theobroma cacao L. accessions using DNA and morphological analyses (119)</i>
	Lerceteau et al., 1997	RAPD, RFLP	<i>Evaluation of the extent of genetic variability among Theobroma cacao accessions using RAPD and RFLP markers (120)</i>
	Charters et al., 2000	ISSR-PCR	<i>The use of self-pollinated progenies as "in-groups" for the genetic characterization of cocoa germplasm (121)</i>
	Jones et al., 2002	PCR, Sequenzierung	<i>Gene discovery and microarray analysis of cacao (Theobroma cacao L.) varieties (122)</i>
SSR-Analyse	Lanaud et al., 1999	RFLP, RAPD, SSR	<i>Isolation and characterization of microsatellites in Theobroma cacao L. (6)</i>
	Alves et al., 2003	SSR	<i>Mating system in a natural population of Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum. by microsatellite markers (123)</i>
	Pugh et al., 2004	SSR, RFLP	<i>A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers (124)</i>
	Saunders et al., 2004	SSR, PCR	<i>Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of Theobroma cacao (125)</i>
	Cryer et al., 2005	SSR	<i>Allelic standards and reference genotypes to unify international cocoa (Theobroma cacao L.) microsatellite data (126)</i>
	Yang et al., 2011	SSR	<i>Chloroplast Microsatellite Primers for cacao (Theobroma cacao) and other Malvaceae (20)</i>

	Autoren	Angewendete Methode	Titel
	Smulders et al., 2012	SSR	<i>Identification of Cocoa (Theobroma cacao L.) varieties with different quality attributes and parentage analysis of their beans (22)</i>
Sequenzierung kompletter Genome von <i>Theobroma cacao</i> -Sorten	Jansen et al., 2010	Sequenzierung	<i>Complete plastid genome sequences of three rosid (Castaneae, Prunus, Theobroma): Evidence for at least two independent transfers of rpl22 to the nucleus (61)</i>
	Argout et al., 2011	Sequenzierung (Illumina, Sanger)	<i>The genome of Theobroma cacao (64)</i>
	MARS	Sequenzierung	<i>Mars, Press Release 15th September 2010: MARS, USDA-ARS, and IBM publicly release: Preliminary cacao genome sequence three years ahead of schedule (63)</i>
	Kane et al., 2012	Sequenzierung (low coverage shot gun sequencing)	<i>Ultra-Barcoding in cacao (Theobroma spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA (55)</i>

Das cpGenom oder nukleäre Genom der Kakaosorte CCN-51 wurde bislang nicht sequenziert und publiziert. Auf dieser Grundlage konnten demnach noch keine Sequenzunterschiede zwischen Arriba und CCN-51 festgestellt werden. Daher existieren keine hochauflösenden Methoden zur Differenzierung der beiden Kakaosorten Arriba und CCN-51.

2.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, molekularbiologische Methoden für die Authentizitätsüberprüfung der ecuadorianischen Edelkakaosorte Arriba zu entwickeln. Da die Konsumkakaosorte CCN-51 mit der Sorte Arriba vermutlich vermischt wird, soll CCN-51 detektiert werden können. Dadurch kann die Reinheit entsprechender Edelkakaoprodukte gesichert werden.

Da die Verarbeitung zunehmend in den Ursprungsländern stattfindet, soll die entwickelte Methode nicht nur auf Rohkakao, sondern auch geröstete Kakaobohnen sowie Kakaomasse anwendbar sein.

2.5.1 Analytische Herangehensweise

Zur Entwicklung einer DNA-basierten Methode zur Authentizitätsüberprüfung müssen Unterschiede in der Sequenz bestehen. Ist das Genom nicht bekannt, müssen aufwendige Sequenzierungsarbeiten durchgeführt werden. Hierfür muss die Extraktion der zu sequenzierenden DNA optimiert werden: Die DNA soll rein ($E_{260/280} = 1,7 - 1,9$), unfragmentiert und in ausreichender Menge (etwa 1 µg) vorliegen. Kann nach der Auswertung der Sequenzen ein Sequenzunterschied identifiziert werden, bildet dieser die Grundlage für die weitere Methodenentwicklung. Dabei wird eine dem Sequenzunterschied entsprechende Methode ausgewählt: Erstreckt sich der Unterschied über einen längeren Sequenzabschnitt, können spezifische Primer konstruiert werden, um eine *Sequence-specific-primer-PCR* (SSP-PCR) durchzuführen. Liegen SNPs vor, werden die Verfahren PCR-RFLP (siehe 2.3.4) oder LPA (siehe 2.3.5) angewendet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die nukleäre sowie die plastidäre DNA analysiert. Der Fokus wurde schließlich auf das cpGenom gerichtet, da hier eine größere Variabilität vermutet wird.

2.5.2 Probenahme

Im Fokus dieser Arbeit steht die Analyse des cpGenoms. Da sich die plastidäre DNA v. a. in Kakaoblättern befindet, wird für die Sequenzierung des cpGenoms Blattmaterial eingesetzt. In geringerer Konzentration ist die plastidäre DNA jedoch auch in Kakaobohnen enthalten. Dieser Fakt stellt einen Vorteil dar, da die Methode auf Kakaobohnen anwendbar sein soll. Die Methodenentwicklung fand demnach mit Kakaoblättern der beiden Sorten Arriba und CCN-51 statt und wurde im Anschluss auf Kakaobohnen angewendet.

Die Blätter sind zudem das verlässlichere Probenmaterial, da die Probenahme direkt vor Ort erfolgte. Dies war bei den Bohnen nicht der Fall. Es handelt sich hierbei v. a. um Lieferungen von kakaoproduzierenden oder -verarbeitenden Unternehmen. Daher gilt ihre Herkunft nicht als gesichert.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Kakaobohnen als auch -blätter der Sorten CCN-51 und Arriba, der Eltern des CCN-51 (ICS-95, Canelo, IMC-67) sowie von Criollo untersucht. Die Blattproben wurden mithilfe des Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Guayaquil, Ecuador, gesammelt oder vom Botanischen Garten, Hamburg, Deutschland, sowie von der International Cocoa Germplasm Database (ICGD), University of Reading, Großbritannien bezogen. Die Probenahme erfolgte direkt vor Ort und die Blätter wurden tiefgekühlt transportiert sowie gelagert.

Die INIAP sowie eine Vielzahl von kakaoverarbeitenden und -handelnden Unternehmen stellten die Kakaobohnenproben bereit. Der größte Teil der Bohnen war fermentiert und ungeröstet. Die entwickelten Methoden wurden in geringerem Maße auch in Bezug auf die Matrix Schokolade untersucht.

Das Probenmaterial ist im Anhang 5.1 in den Tabellen 5.1 bis 5.3 aufgelistet.

3.2 PCR-Reagenzien, Enzyme, Kits, Puffer und Lösungen, Chemikalien, Geräte, Software und Primer

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten PCR-Reagenzien, Enzyme, Kits, Puffer und Lösungen sowie Chemikalien sind im Anhang 5.2 in den Tabellen 5.4 bis 5.8 aufgeführt. Die verwendeten Geräte sowie die Software sind im Anhang 5.3 in den Tabellen 5.9 bis 5.10 und die eingesetzten Primer im Anhang 5.4 in den Tabellen 5.11 bis 5.18 aufgelistet. Die Verbrauchsmaterialien wurden steril bezogen oder ggf. autoklaviert. Der Begriff Wasser bezieht sich auf bidestilliertes sowie autoklaviertes Wasser.

3.3 Isolierung von DNA

Für die beiden Probenmaterialien Kakaobohnen und -blätter wurden zwei verschiedene Methoden zur Isolierung von DNA angewendet (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Die Extraktion der DNA aus Schokolade entsprach der aus Bohnen.

3.3.1 Isolierung von DNA aus Kakaobohnen und Schokolade

Für das Bohnenmaterial wurde die CTAB-Methode angewendet, die eine Modifikation der CTAB-Methode nach ASU § 64 LFGB (127) durch Focke et al., 2011 (128) hinsichtlich einer mechanischen Behandlung war. Die Zellwände wurden mittels einer Kugelmühle aufgebrochen, wobei diese Behandlung sowohl für das trockene als auch das mit dem Extraktionspuffer vermischte Material erfolgte. Auf den mechanischen folgten ein thermischer sowie ein chemischer Aufschluss. Hierbei wurden durch Zugabe von Chloroform die lipophilen sowie unlöslichen Bestandteile von den hydrophilen getrennt. Der folgende Schritt umfasste die Fällung der DNA durch Isopropanol bei 4 °C sowie das anschließende Lösen in Wasser.

Die Methode wird im Folgenden dargestellt:

- 50 bis 100 mg Probenmaterial wurden in ein 2 mL-Cap eingewogen sowie zwei entfettete, autoklavierte Stahlkugeln ($\varnothing = 6$ mm) zugegeben. Es folgte ein mechanischer Aufschluss mittels Kugelmühle: 5 min, 30 Hz.
- 1 mL Extraktionspuffer wurde zugegeben und ein erneuter Aufschluss mittels Kugelmühle (5 min, 30 Hz) durchgeführt. Ein thermischer Aufschluss im Wasserbad folgte (30 min, 65 °C).
- 500 μ L Chloroform wurden zugegeben und durchmischt. Eine Zentrifugation folgte (5 min, 10 000 g). Der wässrige Überstand wurde im Anschluss in ein 2 mL-Cap überführt.
- 500 μ L Isopropanol wurden zugegeben und gemischt. Eine Inkubation folgte (30 min, 4 °C) und eine anschließende Zentrifugation (5 min, 10 000 g).
- Der Überstand wurde dekantiert und verworfen und das Isopropanol im Exsikkator unter Vakuum entfernt (15 min, 300 mbar).
- Die pelletierte DNA wurde in 50 μ L Wasser aufgenommen, durchmischt und 1 h inkubiert. Eine Zentrifugation folgte (5 min, 10 000 g). Der Überstand wurde abgenommen.
- Die Lagerung der isolierten DNA (50 μ L) erfolgte bei -20 °C.

3.3.2 Isolierung von DNA aus Kakaoblättern ohne vorherige Chloroplastenisolierung

Zur Isolierung von DNA aus Kakaoblättern wurde das DNeasy Plant Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.6) im Mini-/ Maxiformat eingesetzt. Die Methode basiert auf der Adsorption von wässrig gelöster DNA an die Silicamatrix von Zentrifugationssäulen unter Hochsalzbedingungen. Die adsorbierte DNA wird mit Waschpuffern sowie Ethanollösungen gereinigt und mit einem wässrigen Elutionspuffer von dem Säulenmaterial eluiert.

Die Methode wird im Folgenden dargestellt (Die Gewichts- und Volumenangaben beziehen sich auf das Mini/Maxi Kit):

- Die Kakaoblätter wurden gewaschen, getrocknet, geschnitten und in flüssigem Stickstoff gemörsernt. Im Anschluss wurden für die Durchführung im Miniformat fünfmal ca. 100 mg und für die im Maxiformat ca. 20-mal 250 mg in ein 2 mL-Röhrchen eingewogen. Zwei Stahlkugeln ($\varnothing = 6 \text{ mm}$) wurden in die Röhrchen gegeben und diese 30 s in flüssigem Stickstoff gelagert.
- Ein mechanischer Aufschluss mittels Kugelmühle folgte (1 min, 30 Hz). Anschließend wurden die Röhrchen 30 s in flüssigem Stickstoff gewendet. Das Gemisch wurde mittels Kugelmühle erneut mechanisch aufgeschlossen (1 min, 30 Hz). Eine Mischung sowie eine Zentrifugation folgten (1 min, 18 000 g).
- Für die Durchführung im Maxiformat wurde das vorbereitete Material aus den 2 mL-Röhrchen auf fünf 50 mL-Röhrchen mit jeweils ca. 1 g aufgeteilt.
- 400 μL /5 mL Puffer AP1 sowie 4 μL /10 μL RNase A stock solution wurden zugegeben. Das Gemisch wurde im Wasserbad inkubiert: 10 min, 65 °C und dabei zwei- bis dreimal gemischt.
- 400 μL /1,8 mL Puffer A2 wurden zugegeben und gemischt. Eine 10-minütige Inkubation auf Eis sowie eine Zentrifugation (5 min, 16 000 g/ 3 100 g) schlossen sich an. Der Überstand wurde in eine QIAshredder Mini/Maxi Spin Column pipettiert und zentrifugiert (5 min, 18 000 g/ 3 100 g).
- Der Durchfluss wurde in ein 2 mL-/50 mL-Röhrchen gegeben und die 1,5-fache Menge an Puffer AP3/E zugegeben sowie gemischt. 650 μL /maximal 15 mL dieses Gemischs wurden auf eine DNeasy Mini/Maxi Spin Column in einem 2 mL-/50 mL-Röhrchen pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation (1 min, 6 000 g/ 3 100 g).
- Die DNeasy Mini/Maxi Spin Column wurde in ein 2 mL-/50 mL-Röhrchen überführt und 500 μL /12 mL Puffer AW zugegeben. Darauf folgte eine Zentrifugation (1 min, 6 000 g/ 1 400 g). 500 μL /12 mL Puffer AW wurden zugegeben. Eine Zentrifugation schloss sich an (1 min, 16 000 g/ 3 100 g).

- Die DNeasy Mini/Maxi Spin Column wurde in ein 2 mL-/50 mL-Röhrchen überführt und 100 µL/1 mL Wasser wurde(n) zugegeben. Das Säulchen wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (1 min, 6 000 g/ 1 400 g). 50 µL/500 µL Wasser wurden zugegeben und das Säulchen wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 6 000 g/ 3 100 g).
- Die Lagerung der vereinigten isolierten DNA (150 µL/ 1,5 mL) erfolgte bei -20 °C.

3.3.3 Isolierung von DNA aus Kakaoblättern mit vorheriger Chloroplastenisolierung

Anfangs wurde davon ausgegangen, dass das cpGenom für die Sequenzierung isoliert von der Kern-DNA vorliegen sollte. Hierzu wurden die Chloroplasten durch einen Zuckergradienten extrahiert und daraus wurde die DNA isoliert.

Die Methode ist im Detail im Anhang 5.5 in den Tabellen 5.19 bis 5.20 aufgeführt.

3.4 Überprüfung der DNA-Isolate

3.4.1 Gehaltsbestimmung

3.4.1.1 Fluorimetrisch

Die fluorimetrische Bestimmung von DNA-Gehalten erfolgte in 96 Well-Platten:

- Für jede Probe wurden 90 µL der SYBR-Green I-Lösung (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.7) in den Kavitäten vorgelegt.
- Von der auf 10 ng/µL eingestellten Plasmid-Lösung (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.7) wurden jeweils 1 µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL, 8 µL, 10 µL in diese Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und entsprechend mit Wasser auf 100 µL aufgefüllt.
- 10 µL der DNA-Isolate oder ihrer Verdünnungen wurden in die Kavitäten pipettiert.
- Die fluorimetrische Messung erfolgte gegen Wasser (10 µL in 90 µL SYBR-Green I-Lösung).
- Anregungswellenlänge: 494 nm; Emissionswellenlänge: 524 nm.

3.4.1.2 Photometrisch

Der DNA-Gehalt wurde mittels NanoDrop-Photometer (siehe Anhang 5.3, Tabelle 5.9) bestimmt. Hierzu wurde 1 µL des Proben-DNA-Isolats auf die Messeinheit pipettiert und die Absorption photometrisch bei 260 nm und für eine Abschätzung der Reinheit bei 280 nm gemessen.

3.4.2 Reinheitsbestimmung

Die photometrische Bestimmung der Reinheit von DNA-Isolaten erfolgte in 384 Well-Platten:

- 20 µL der wässrigen DNA-Isolate oder einer entsprechenden Verdünnung wurden in die Kavitäten pipettiert.
- Zur Auswertung wurden folgende Parameter aufgenommen:
 - o Absorptionsscan: Messung der Absorption von 200 bis 300 nm
 - o Reinheit: Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm sowie Berechnung des Quotienten 260 nm zu 280 nm $E_{260/280}$ (siehe 2.3.1). Der Quotient hat bei einer optimalen Reinheit einen Wert zwischen 1,7 und 1,9.

3.5 PCR

3.5.1 Endpunkt-PCR

2 µL der auf 1 bis 5 ng/µL eingestellten DNA-Isolate, 2 µL Wasser (Wasserwert) bzw. 2 µL des Blindwerts der Aufarbeitung wurden in einem Gesamtreaktionsvolumen von 40 µL eingesetzt (doppelter Ansatz). Für die Mikrosatellitenanalyse wurde 1 µL der auf 20 ng/µL eingestellten Isolate in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µL verwendet (einfacher Ansatz). Die Sequenzen der Primer sind im Anhang 5.4, Tabellen 5.11 bis 5.18 aufgelistet. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemischs ist der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Endpunkt-PCR, Zusammensetzung des Reaktionsgemischs.

Lösung	Volumen, einfacher Ansatz, µL	Volumen, doppelter Ansatz, µL
Template	1,0	2,0
Wasser*	14,8	29,6
10x-Puffer	2,0	4,0
dNTPs	1,6	3,2
Polymerase**	0,2	0,4
Fw-Primer	0,2	0,4
Re-Primer	0,2	0,4
	20 µL	40 µL

*Für die PCR-RFLP wurden 0,4 µL der 29,6 µL Wasser mit 4 %iger BSA-Lösung ersetzt

**Es wurde die *Taq*-, eine 1:10-Verdünnung der *Taq*, die *Phusion*-Polymerase oder ein 1:1-Gemisch der beiden Polymerasen eingesetzt.

In der folgenden Tabelle 3.2 sind die PCR-Bedingungen dargestellt.

Tabelle 3.2: PCR-Bedingungen.

Wiederholungen	PCR-Schritt	Zeit, s	Temperatur, °C
1	Initiale Denaturierung	300	94
35	Denaturierung	40	94
	Annealing*	40	55
	Elongation	40	72
1	Finale Elongation	300	72
1	Abkühlung	∞	4

*Für die PCR der Mikrosatellitenanalyse mittels Primer-Paar mTcCIR11 betrug die Annealingtemperatur 50 °C.

3.5.2 Real-time PCR

Das Verhältnis zwischen nukleärer und plastidärer DNA wurde mittels *Real-time* PCR bestimmt. 5 µL des DNA-Isolates (ca. 1 ng/µL) bzw. 5 µL Wasser (Wasserwert) bzw. 5 µL des Blindwerts der Aufarbeitung wurden pro Ansatz eingesetzt. Die Sequenzen der eingesetzten Primer sind im Anhang 5.4, Tabelle 5.16 aufgelistet. In der folgenden Tabelle 3.3 ist die Zusammensetzung des Reaktionsgemischs dargestellt.

Tabelle 3.3: *Real-time* PCR, Zusammensetzung des Reaktionsgemischs.

Lösung	Volumen, µL
Template	5
Wasser	9,2
10x-Puffer	2,0
dNTPs	1,6
SYBR-Green-Lösung	1,0
<i>Taq</i> -Polymerase (1:10 verdünnt)	1,0
<i>Fw</i> -Primer	0,1
<i>Re</i> -Primer	0,1

Der Tabelle 3.4 sind die PCR-Bedingungen zu entnehmen:

Tabelle 3.4: *Real-time* PCR, Temperaturprogramm.

Wiederholungen	PCR-Schritt	Zeit, s	Temperatur, °C
1	Initiale Denaturierung	300	94
40	Denaturierung	20	94
	Annealing	20	61
	Elongation	20	72
	Messschritt	10	80
1	Finale Elongation	300	72
Schmelzkurvenanalyse			Gradient: 55-95*

* mit 0,5 °C/s

3.6 PCR-RFLP

Die PCR wurde wie unter 3.5.1 beschrieben durchgeführt, wobei 0,4 µL des Wassers durch eine 4 %ige BSA-Lösung ersetzt wurden. Die Sequenzen der eingesetzten Primer sind dem Anhang 5.4, Tabelle 5.15 zu entnehmen.

Nach der PCR wurden die Amplifikate einem spezifischen Verdau unterworfen. Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.5) sowie das Pipettierschema sind in der folgenden Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tabelle 3.5: RFLP, Pipettierschema.

Restriktionsschnittstelle	8	17.1	17.2	21	43	44
Enzym	<i>PsiI</i>	<i>PsiI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>AseI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>
NEB-Puffer*	4.1	4.1	<i>EcoRI</i>	3.1	<i>EcoRI</i>	3.1
Enzym, Volumen	1,5 µL	1 µL	1 µL	3 µL	3 µL	4 µL
NEB-Puffer, Volumen	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Amplifikat **	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Wasser	Ad. 25 µL					

*Die Zusammensetzung des Puffers ist dem Anhang 5.2, Tabelle 5.7 zu entnehmen.

**Nach der PCR befinden sich etwa 20-50 ng/µL im Reaktionsansatz.

Der Reaktionsansatz wurde 3 h bei 37 °C inkubiert und die Endonuklease im Anschluss 20 min bei 65 °C inaktiviert. Die Detektion der Fragmente erfolgte durch die Auftrennung mittels AGE (siehe 3.7) oder CGE (siehe 3.9).

3.7 AGE

1- bis 3%ige Gele wurden hergestellt: Die entsprechende Agarosemenge wurde in 50 mL TAE-Puffer, 1x (Anhang 5.2, Tabelle 5.7) aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C in den Gelträger gegossen. Nach dem Gelierungsprozess wurde der Träger mit dem Gel in die mit TAE-Puffer, 1x gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. 10 µL der mit ca. 0,5 µL Loading Dye (Anhang 5.2, Tabelle 5.7) versetzten Proben wurden in die Taschen pipettiert und das Gel wurde bei 170 V, 20 min entwickelt. Die Detektion der DNA erfolgte nach 15-minütiger Inkubation in Ethidiumbromid-Lösung (Anhang 5.2, Tabelle 5.7) unter Lichtausschluss durch Betrachtung unter UV-Licht bei 312 nm. Als Vergleich diente der DNA-Marker pegGold Ladder Mix (Anhang 5.2, Tabelle 5.4).

3.8 dHPLC

Die Auftrennung der DNA wurde im Sizing-Modus bei 50 °C mit einer DNASep®-Säule (siehe 2.3.3) mit dem dHPLC Wave® System 3500 (siehe Anhang 5.3, Tabelle 5.9) durchgeführt. Die Amplifikate wurden in dHPLC-Caps überführt und der Lauf wurde mit einem angepassten Gradienten, bestehend aus den Puffern A und B (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.7), gestartet.

Tabelle 3.6: dHPLC, Gradient.

Zeit, min	Puffer A, %	Puffer B, %
0	50,2	49,8
0.7	41,8	58,2
3.8	41,8	58,2
4	38,2	61,8
4.1	40,8	59,2
4.2	41,8	58,2
4.3	55,0	54,0

3.9 CGE

Das Experion™ DNA 1K Analysis Kit wurde verwendet (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.6).

Herstellung der Gel-Färbemittellösung

12,5 µL der DNA-stain-Lösung wurden in das Tube DNA 1K Gel (250 µL) gegeben und der Inhalt wurde in die Gelaufreinigungssäule überführt. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 2 400 *g*. Die Lösung wurde bei 4 °C unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Probenvorbereitung

5 µL des Probenpuffers wurden in ein 100 µL PCR-Cap gegeben und 1 µL Amplifikat (Amplifikat-Lösung) oder 1 µL des Markers (Größenmarkergemisch) wurde zum Puffer pipettiert. Es folgten eine Durchmischung und Zentrifugation (1 min, 10 000 *g*).

Vorbereiten und Beladen des Chips

9 µL der Gel-Färbemittellösung wurden in die grün unterlegte Kavität des Chips (siehe Abbildung 2.17) pipettiert und dieser wurde in die Primingstation gesetzt. Das Programm: pressure: C, timing: 3 wurde gestartet. Die restlichen drei GS-Kavitäten wurden mit 9 µL Gel-Färbemittellösung befüllt. 5,95 µL des Größenmarkergemischs wurden in die L-Kavität und 5,95 µL der Amplifikat-Lösungen in die Kavitäten 1 bis 11 pipettiert. Der Chip wurde in die Elektrophoresestation gelegt und der Lauf gestartet.

3.10 Sequenzierung

Umfassende Sequenzierungen erfolgten: Hierbei wurden sowohl komplette Genome (siehe 3.10.2) als auch kurze DNA-Abschnitte (siehe 3.10.1) sequenziert.

3.10.1 Partiiell

Die von Dr. Felix Focke geleisteten Vorarbeiten hinsichtlich der kompletten Sequenzierung der IRR erfolgten durch partielle Sequenzierungen von Amplifikaten, die durch die PCR (siehe 3.5.1) mittels 27 Primer-Paaren erhalten worden sind (siehe Anhang 5.4, Tabelle 5.13). Die PCR-Produkte wurden für die Sequenzierung durch eine enzymatische Degeneration der Primer (Einzelstrangfragmentierung) und der dNTPs (Dephosphorylierung) vorbereitet: 40 µL des PCR-Produkts wurden mit 4 µL *ExoI* sowie 8 µL FastAP (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.5) versetzt und 15 min auf 37 °C erhitzt. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch eine 15-minütige Erhitzung auf 85 °C.

Weitere Sequenzen wurden überprüft. Hierzu wurden die entsprechenden DNA-Bereiche mittels PCR (siehe 3.5.1) amplifiziert. Zur Vorbereitung für die Sequenzierung wurde das jeweilige PCR-Produkt (100 µL PCR-Produkt, 10 µL Loading Dye) einer präparativen AGE (siehe 3.7) zugeführt und im Anschluss mithilfe des peqGOLD Gel Extraction Kits (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.6) gereinigt:

- Die DNA-Bande wurde aus dem Gel unter UV-Licht herausgetrennt und entsprechend ihrem Gewicht mit Binding Buffer versetzt (0,1 g entspricht 0,1 mL Puffer). Das Gelstück enthaltende Cap wurde 10 min bei 55 bis 65 °C in einem Wasserbad inkubiert.
- 750 µL der DNA-Agaroselösung wurden auf eine PerfectBind DNA Column gegeben. Eine Zentrifugation folgte (1 min, 10 000 *g*). Für Volumina über 750 µL wurde die Säule erneut beladen und der Zentrifugationsschritt wiederholt.
- Die Säule wurde in ein 2 mL-Collection-Tube gegeben, 300 µL Binding Buffer wurden auf die Säule gegeben und es folgte eine Zentrifugation (1 min, 10 000 *g*).
- 750 µL des CG Wash Buffers wurden auf die Säule pipettiert und es wurde zentrifugiert (1 min, 10 000 *g*). Der Waschschrift wurde einmal wiederholt.
- Die Säule wurde mittels Zentrifugation: 1 min, 10 000 *g* getrocknet. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation (1 min, 5 000 *g*) eluiert, indem 150 µL Elutionslösung auf die Säule gegeben wurden.

Die partiellen Sequenzierungen wurden von dem Unternehmen GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland, mittels Sanger-Sequenzierung (siehe 2.3.7) unter Zuhilfenahme der in den Tabellen 5.11 und 5.13 bis 5.15 gelisteten Primer durchgeführt. Die sequenzierten Bereiche aus CCN-51 und Arriba

wurden miteinander und mit bereits bekannten Sequenzen weiterer Kakaosorten vom National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA, verglichen (GENTle, Magnus Manske oder ClustalW, siehe Anhang 5.3, Tabelle 5.10).

Im Rahmen der Arbeit von Dr. Felix Focke zur partiellen Sequenzierung der IRR erfolgte ein Vergleich der Sequenzen von Arriba und CCN-51 miteinander sowie mit den Sequenzen aus den bis zu diesem Zeitpunkt publizierten cpGenomen (Accession-Nummern: NC_014676 und HQ336404).

3.10.2 Gesamt-DNA

Die Sequenzierung des kompletten cpGenoms wurde entsprechend Kane et al., 2012 ohne vorherige Isolierung der Chloroplasten durchgeführt (siehe 2.3.7). Die Gesamt-DNA wurde aus Blättern mittels DNeasy Plant Mini/Maxi Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland, (siehe 5.2, Tabelle 5.6) isoliert (siehe 3.3.2). Die DNA wurde anschließend mithilfe einer Ethanol-fällung gereinigt:

- Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2 (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.7) und 3 Vol. absolutem Ethanol (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.8) versetzt, durchmischt und 12 bis 16 h bei -20 °C inkubiert.
- Das Gemisch wurde pelletiert (60 min, 15 000 g, 4 °C) und das Pellet mit 4 °C kaltem 70 %igem Ethanol (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.8) gewaschen und im Anschluss zentrifugiert (10 min, 15 000 g, 4 °C).
- Das Pellet wurde getrocknet (15 min, 37 °C) und im Anschluss mit Wasser gelöst, wobei es 10 min bei 50 °C unter leichtem Schütteln inkubiert wurde.

Die Konzentration der wässrigen DNA-Isolate wurde durch Verdünnen oder Vakuumzentrifugation auf etwa 200 ng/μL eingestellt. Die Sequenzierung und die Erstellung der genomischen Standard-Libraries wurden von der GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland, durchgeführt. Angewendet wurde das Verfahren *low coverage whole genome shotgun sequencing* (siehe 2.3.7) auf dem Illumina HiSeq 2000 im 50 bp-*single-read*-Modus unter Verwendung des Sequenzierungskits TruSeq Kit v3 Illumina (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.6) mit anschließendem Mapping gegen eine genomische Referenz (HQ244500). Die Sequenzen wurden im Fasta-Format mithilfe des Programms VectorNTI (siehe Anhang 5.3, Tabelle 5.10) miteinander verglichen und zusätzlich wurde ein Vergleich mit allen in der Datenbank des NCBI vorhandenen cpGenom-Sequenzen durchgeführt.

3.11 Mikrosatellitenanalyse

Zehn Primer-Paare nach Lanaud et al., 1999 (6) und Cryer et al., 2005 (126) wurden eingesetzt, die im Anhang 5.4, Tabelle 5.17 aufgelistet sind. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sich die bei der ICGD hinterlegten Amplifikatgrößen von CCN-51 und Arriba maximal unterschieden (<http://www.icgd.rdg.ac.uk/>). Jeweils der Fw-Primer war hierbei 6-FAM-markiert. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde für jede Probe eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde eine PCR (siehe 3.5.1) in einem einfachen Ansatz durchgeführt. Die Annealing-Temperatur betrug hierbei 55 °C mit Ausnahme des Primer-Paars mTcCIR11 (50 °C). Das Ergebnis der PCR wurde mittels AGE (siehe 3.7) überprüft.

Für die Fragmentanalyse wurden die PCR-Produkte 1:20 mit Wasser verdünnt. 1 µL der verdünnten Probe wurde mit 1 µL GeneScan-500-LIZ™ size standard (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.7) und 10 µL Hi-Di™ Formamid (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.7) versetzt. Nach dem Durchmischen und Zentrifugieren wurden die Probenlösungen bei 95 °C 5 min denaturiert und im Anschluss auf Eis gekühlt. 12 µL der Probenlösungen wurden in eine 96er-Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte wurde mit einem Septum verschlossen. Eine Zentrifugation und der Start der Messung am ABI™ 8-capillary 3500 Genetic Analyzer (siehe Anhang 5.3, Tabelle 5.9) erfolgten. Die Daten wurden im Anschluss mithilfe der Gene Mapper® Software 5, Full (siehe Anhang 5.3, Tabelle 5.10) ausgewertet.

Eine 1-0-Matrix (1: Allel vorhanden, 0: Allel nicht vorhanden) wurde in einer Excel-Datei erstellt. Diese wurde bei der Clusteranalyse mit den genetischen Distanzen nach Simpson, Jaccard, Jukes und Euclidean zur Erstellung eines *Neighbor-Joining*-Baums verwendet.

3.12 Ligation Dependent Probe Amplification (LPA)

Die Methode der LPA wurde in Hinsicht auf die SNPs im cpGenom auf deren Eignung hin getestet. Die LPA wurde mittels SALSA MLPA EK 1 reagent kit FAM (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.6) durchgeführt. Die Sequenzen der Sonden sind im Anhang 5.4, Tabelle 5.18 aufgelistet. Im Anhang 5.6, Tabelle 5.21 ist die Durchführung im Detail dargestellt.

3.13 *High Resolution Melting Analysis (HRMA)*

Die Schmelzpunktanalyse wurde mithilfe des LightCycler® 480 High Resolution Melting Master Kits (siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.6) durchgeführt.

Die Durchführung ist im Anhang 5.6, Tabelle 5.22 dargestellt.

3.14 Herstellung definierter Mischungen beider Kakaosorten

Für die Quantifizierungsversuche wurden definierte DNA-Mischungen aus CCN-51 und Arriba mit drei unterschiedlichen Ansätzen hergestellt:

A: Mischung von PCR-Produkten

B: Mischung von DNA-Isolaten

C: Mischung von gemahlenen Kakaobohnen

Für sämtliche Mischungen wurde folgendes Probenmaterial eingesetzt:

Kakaoblätter: C2, Bl. und A2, Bl.

Kakaobohnen: C7 und A5 ((TAAAG)_n-Repeat) sowie C8 und A4 (PCR-RFLP)

Der DNA-Gehalt der DNA-Isolate bzw. PCR-Produkte wurde photometrisch mittels NanoDrop-Photometer (Detektion des (TAAAG)_n-Repeats) oder fluorimetrisch (PCR-RFLP) bestimmt.

Folgende Mischungen wurden angesetzt:

Tabelle 3.7: Herstellung von definierten Mischungen.

Mischung	Anteil CCN-51 (DNA-Isolat/ PCR-Amplifikat)	Anteil Arriba (DNA-Isolat/ PCR-Amplifikat)
1	10 %	90 %
2	30 %	70 %
3	50 %	50 %
5	70 %	30 %
6	90 %	10 %

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 DNA-Isolierung

Entsprechend den beiden Probenmatrices Blätter und Bohnen wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Isolierung der DNA eingesetzt. Zur Extraktion aus Kakaobohnen wurde die durch vorangegangene Projekte (128) optimierte CTAB-Methode (siehe 2.3.1 und 3.3.1) durchgeführt. Aus Kakaoblättern wurde die DNA mittels Silicasäulen extrahiert. Die folgenden Tabellen 4.1 und 4.2 fassen den DNA-Gehalt sowie die Reinheit aller Isolate zusammen:

Tabelle 4.1: DNA-Gehalt und Reinheit der Isolate, Kakaoblätter.

Isolat	Gehalt, fluorimetrisch, [ng/μL]	Gehalt, photometrisch, [ng/μL]	Reinheit, E _{260/280}
C1, Bl.	30,7	40,2	1,43
C2, Bl.	49,7	90,6	1,76
C3, Bl.	41,0	53,6	1,54
C4, Bl.	55,6	65,8	1,64
C5, Bl.	41,2	45,8	1,68
C6, Bl.	50,0	75,8	1,79
C7, Bl.	126,6	140,7	1,57
C8, Bl.	158,1	165,3	1,68
A1, Bl.	18,5	25,4	1,45
A2, Bl.	27,6	26,9	1,67
A3, Bl.	46,3	56,7	1,56
A4, Bl.	54,9	55,0	1,54
A5, Bl.	56,5	64,0	1,56
A6, Bl.	59,3	87,4	1,67
A7, Bl.	78,4	124,5	1,61
A8, Bl.	46,8	53,8	1,67
E1, Bl.	20,9	217,9	1,35
E2, Bl.	28,4	47,5	1,56
E3, Bl.	30,4	42,6	1,54
E4, Bl.	23,3	36,5	1,63
E5, Bl.	31,4	47,8	1,62
Cr1, Bl.	74,03	94,3	1,69
Cr2, Bl.	78,3	82,3	1,68

Tabelle 4.2: DNA-Gehalt und Reinheit der Isolate, Kakaobohnen.

Isolat	Gehalt, fluorimetrisch, [ng/ μ L]	Gehalt, photometrisch, [ng/ μ L]	Reinheit, E _{260/280}
C1	94,2	96,3	1,23
C2	98,9	407,6	1,45
C3	21,5	171,9	1,14
C4	165,4	1144,5	1,32
C5	100,9	869,0	1,24
C6	74,3	415,7	1,45
C7	87,9	354,9	1,23
C8	104,3	253,5	1,27
C10	211,4	906,5	1,64
C11	27,6	845,5	1,54
C12	20,3	453,9	1,36
C13	16,5	453,5	1,24
C14	28,6	564,7	1,36
C15	79,9	665,7	1,43
C16	98,9	546,8	1,56
A1	7,2	243,5	1,32
A2	89,1	657,3	1,25
A4	34,6	836,4	1,56
A5	67,5	672,4	1,53
A6	43,8	895,4	1,27
A7	54,8	783,4	1,29
A8	45,8	892,4	1,43
A9	32,8	763,2	1,38
A10	32,9	786,4	1,39
A11	16,8	672,4	1,26
A12	34,8	194,3	1,65
A13	32,9	893,4	1,52
A14	34,9	1002,3	1,17
A15	65,8	892,4	1,26
A16	76,9	937,2	1,38
A17	32,0	783,2	1,29
A18	45,8	893,4	1,32
A19	43,8	784,4	1,35
A20	85,3	956,3	1,18
A21	65,5	778,3	1,19
A22	76,5	1045,3	1,15
A23	76,9	1109,8	1,09
A24	68,3	783,4	1,37
A25	43,7	452,5	1,38
A26	78,6	893,5	1,31
A27	45,8	452,4	1,32
A28	74,2	894,5	1,53
A29	62,1	1003,6	1,08
A30	67,9	893,5	1,25
A31	65,5	672,4	1,27

Isolat	Gehalt, fluorimetrisch, [ng/ μ L]	Gehalt, photometrisch, [ng/ μ L]	Reinheit, $E_{260/280}$
A32	456,7	2045,3	1,08
A33	78,3	978,4	1,24
A34	45,7	673,5	1,27
A35	78,6	895,4	1,22
Cr1	96,4	693,5	1,31

Die Isolate aus den Kakaoblättern haben im Vergleich zu denen aus den Kakaobohnen einen geringeren Gehalt an DNA, was mit den verschiedenen Aufarbeitungsmethoden zu erklären ist. Die beschränkte Bindungskapazität der Silicasäulen bei der Aufarbeitung der Blätter steht dem unbegrenzten Präzipitationsvolumen der CTAB-Methode bei den Bohnen gegenüber. Ein weiterer Grund ist die unterschiedliche Matrix der beiden Probenmaterialien: Die Konsistenz der Blätter ist lederartig. Die Extraktion von DNA aus dieser Matrix ist daher komplexer als die aus den Bohnen. Die Matrix Letzterer ist durch Verarbeitungsschritte wie Röstung und Fermentation teilweise bereits aufgeschlossen. Im Weiteren ist denkbar, dass mit der DNA-Extraktion aus den Bohnen auch Bakterien-DNA isoliert wurde, die im Anschluss messbar war.

Die fluorimetrisch ermittelte DNA-Konzentration ist geringer als die photometrisch bestimmte. Die fluorimetrische Messung ist spezifischer: Hier wird der Interkalationsfarbstoff SYBR Green I eingesetzt, der lediglich an dsDNA bindet und somit auch nur diese erfasst (69). Die photometrische Messung wird allgemein bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, bei der neben der dsDNA sämtliche Oligonukleotide, monomere Nukleotide sowie bei dieser Wellenlänge optisch aktive Begleitstoffe absorbieren. Daraus resultiert ein höherer Messwert.

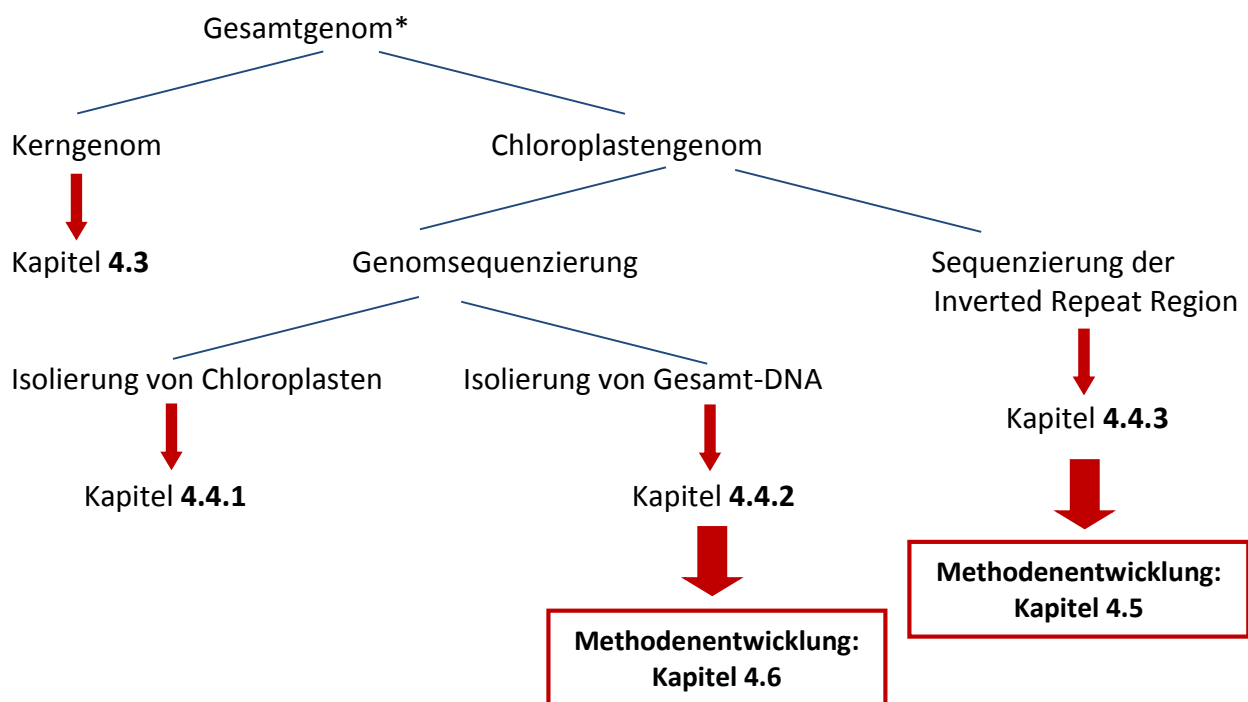
Die Ergebnisse der Reinheitsbestimmung lagen generell unter dem Wert von $E_{260/280} = 1,7$ bis 1,9. In Abhängigkeit von dem pH-Wert und dem Salzgehalt kann sich der Messwert der Reinheit verschieben (129). Ein möglicher Grund für eine schwankende Reinheit ist, dass teils Wasser (Kakaobohnen) und teils der mit dem DNeasy Plant Mini/ Maxi Kit (50) gelieferte Elutionspuffer zur Elution von DNA verwendet wurden. Ein Vergleich der Reinheit der Bohnen- mit jener der Blatt-Isolate zeigt, dass die CTAB-Methode zu einer geringeren Reinheit führt. Durch die Aufarbeitung mittels Silicasäulen wurden offensichtlich mehr Störsubstanzen abgetrennt.

Die Isolierung der DNA aus den Kakaoblättern ergab gegenüber der aus den Kakaobohnen eine geringere Ausbeute bei einer höheren Reinheit. Für die folgende Analytik spielten diese Faktoren eine eher untergeordnete Rolle: Sämtliche Isolate konnten für partielle Sequenzierungen, Amplifizierungen und weitere Methoden eingesetzt werden.

4.2 Gesamtüberblick über die analytischen Pfade

Prinzipiell liegen zwei unterschiedliche Typen von DNA vor (siehe 2.2.1), die in dieser Arbeit relevant waren: das Kern- sowie das cpGenom. Aufgrund einer höheren Variabilität im cpGenom wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit von Sequenzunterschieden hier höher ist als im Kerngenom. Dennoch wurden beide Genome untersucht.

Die folgende Grafik verdeutlicht die unterschiedlichen Pfade, die verfolgt wurden. Sie basieren auf Recherchen in bereits publizierten Genomen, auf *de-novo*-Sequenzierungen kompletter Genome oder partiellen Sequenzierungen. Besonders hervorgehoben werden die Ansätze, die zu einer Methodenentwicklung zur Sortendifferenzierung von Arriba und CCN-51 geführt haben.



*: Das Mitochondriengenom wurde nicht weiter berücksichtigt

Abbildung 4.1: Analytische Ansätze ausgehend von der Recherche und Sequenzierungen im Kern- und im cpGenom sowie Markierung der Pfade, die zur erfolgreichen Methodenentwicklung führten.

4.3 Kerngenom

Die anfängliche Recherche hinsichtlich des nukleären Genoms konzentrierte sich auf die Arbeiten der zwei Teams um Argout et al., 2010 (64), (66) und Mars Inc., 2010 (63), (65). Das erste Team sequenzierte die Kakaosorte Criollo aus Belize und das zweite die Sorte Matina 1 – 6 aus Costa Rica. Sequenzunterschiede zwischen Criollo und Matina 1 – 6 sind insofern relevant, als es sich bei dem einen (Criollo) um einen Edelkakao und dem anderen (Matina 1 – 6) um einen Konsumkakao handelt. Ausgewählte Regionen in den zwei veröffentlichten Genomen wurden miteinander verglichen. Der theoretische und softwareunterstützte Vergleich zeigte in fünf Sequenzregionen Unterschiede zwischen Criollo und Matina 1 – 6. Hierzu zählen die DNA-Abschnitte der Gensequenzen der Chitinase TcChiB, des *light-harvesting complex protein* LHCP, des *non-specific lipid transfer protein* NSLTP, des *auxin responsive GH3 protein* ARGH3P sowie des Transkriptions-Coaktivators NPR1 (130), (122), (131).

Tabelle 4.3: Sequenzregionen, die in den sequenzierten Genomen von Criollo und Matina 1-6 Unterschiede aufweisen.

Region	Eigenschaft	Accession-Nummer	Quelle
NPR1	Transkriptions Coaktivator	CK144298.1	
LHCP	<i>Light-harvesting complex protein</i>	CK144297	Bailey et al., 2004 (130)
TcChiB	<i>Class VII chitinase</i>	CF973685	Bailey et al., 2004 (130)
ARGH3P	<i>Auxin-responsive GH3 protein</i>	CF973685	Jones et al., 2002 (122)
NSLTP	<i>Non-specific lipid-transfer protein</i>	CM001882	Jones et al., 2002 (122)

Für die fünf Regionen wurden fünf Primer-Paare konstruiert, welche die Sequenzunterschiede in Criollo und Matina 1 – 6 flankieren (siehe Anhang 5.4, Tabelle 5.11). Diese fünf Bereiche wurden für die Sorten Arriba und CCN-51 amplifiziert, die Amplifikate gereinigt und anschließend einer Sequenzierung zugeführt. Ein Abgleich der erhaltenen Sequenzen beider Kakaosorten sollte zeigen, ob die Sequenzunterschiede zwischen dem Edelkakao Criollo und dem Konsumkakao Matina 1 – 6 auch zwischen den Kakaosorten Arriba und CCN-51 existieren. Eine der fünf Regionen konnte verifiziert werden: TcChiB beinhaltet eine 16 bp lange Insertion in Arriba, die bei CCN-51 ausblieb. Arriba verhielt sich in diesem Fall allerdings wie der Konsumkakao Matina 1 – 6 und CCN-51 wie der Edelkakao Criollo. Zusätzlich befindet sich in dieser Insertion die Restriktionsschnittstelle *BamHI*, die neben der Insertion in Abbildung 4.2 dargestellt ist.

Basierend auf diesem Sequenzunterschied wurden drei Primer-Paare TcChiB*/**/** entwickelt (siehe Anhang 5.4, Tabelle 5.11), mit deren Hilfe eine CCN-51-spezifische PCR ermöglicht werden sollte. Bei zwei Primer-Paaren ist der *Re*-Primer spezifisch, während bei dem anderen Primer-Paar der *Fw*-Primer spezifisch ist (siehe Abbildung 4.2).

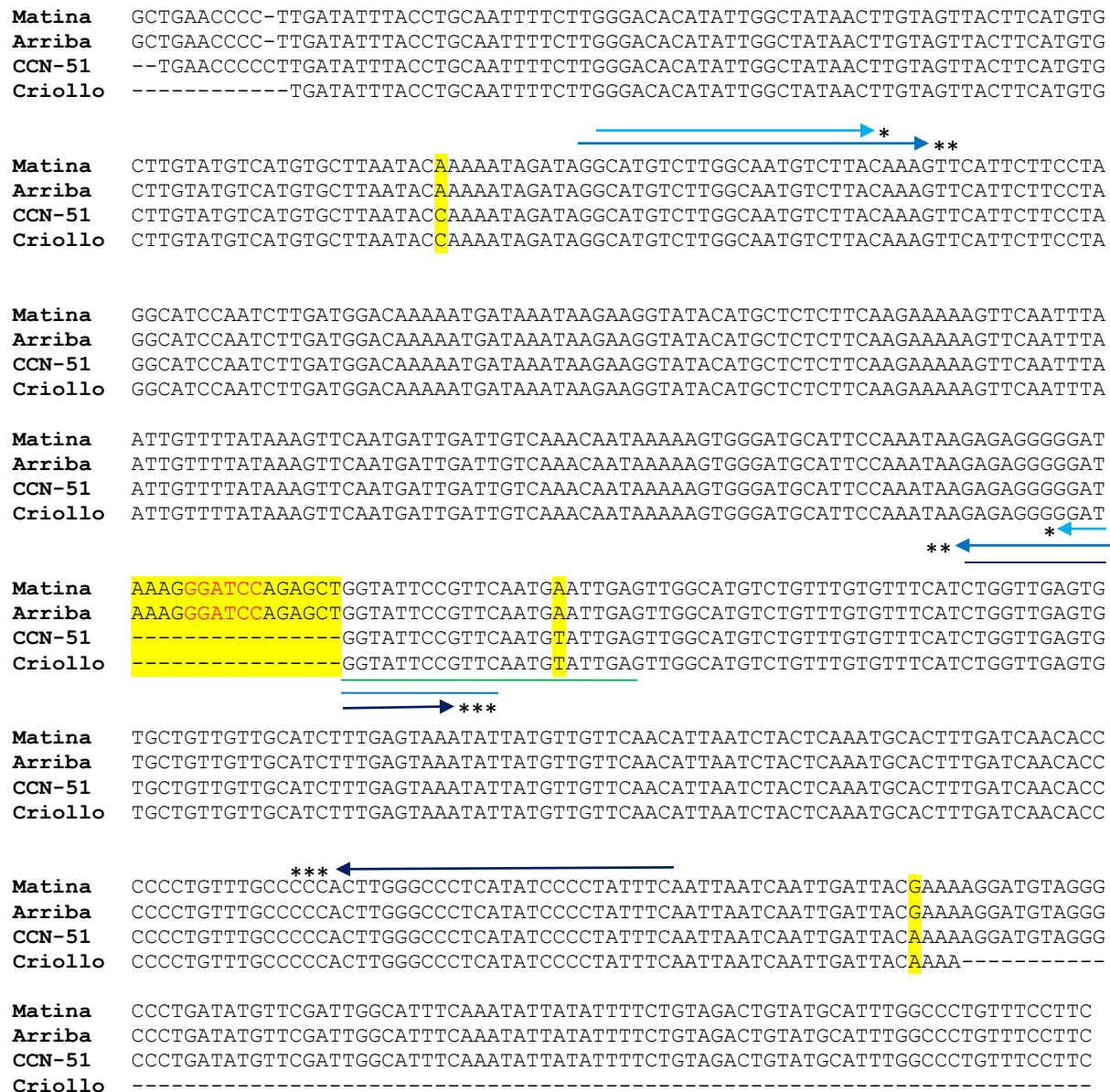


Abbildung 4.2: Alignment der Sequenzierung der Region TcChiB von Arriba und CCN-51 verglichen mit den publizierten Sequenzen von Matina 1-6 und Criollo. Die Unterschiede sind gelb markiert und die Restriktionsschnittstelle *Bam*HI ist rot gekennzeichnet. Die Primer-Paare für eine CCN-51-spezifische PCR TcChiB*, TcChiB** und TcChiB*** sind mit verschiedenen Farbtönen dargestellten Pfeilen gekennzeichnet.

Die PCR-Produkte wurden mittels AGE detektiert. Mit dem Primer-Paar TcChiB* wurden, wie erwartet, nur für CCN-51-Proben Amplifikate erhalten. Nach weiteren Durchführungen konnten allerdings wiederholt bei Arriba-Proben PCR-Produkte detektiert werden. Auch bei den Primer-Paaren TcChiB** und TcChiB*** ließen sich Fehlhybridisierungen mit Arriba beobachten. Demnach ist die 16 bp-Insertion nicht spezifisch. Der Grund hierfür ist vermutlich der heterozygote Charakter des Kerngenoms von Kakao: Beide Sequenzen sind bei beiden Kakaosorten vorhanden.

Die auf vermeintlichen Sequenzunterschieden im Kerngenom basierenden Arbeiten zur Sortendifferenzierung von Arriba und CCN-51 wurden eingestellt, da hieraus keine reproduzierbaren Ergebnisse resultierten. Bezüglich des nukleären Genoms wurden lediglich die Arbeiten zu den Mikrosatelliten vertieft. Diese sind jedoch nicht geeignet, um die beiden Sorten voneinander zu unterscheiden, da bereits innerhalb einer Sorte Abweichungen des SSR-Musters auftreten. Kapitel 4.9 informiert darüber, wie die Mikrosatellitenanalyse dennoch genutzt wird.

Der Fokus wurde auf die Recherche im cpGenom gerichtet.

4.4 Das cpGenom und Sequenzierungen

Im cpGenom wird eine höhere Variabilität als im nukleären Genom erwartet. Ein zusätzlicher Vorteil des plastidären Genoms ist die maternale Vererbung der Chloroplasten: Auch eine versehentliche Fremdbestäubung einer CCN-51-Pflanze durch eine andere Kakaopflanze sollte zu keiner Rekombination des cpGenoms führen, sodass es zu keiner Beeinflussung der plastidären Sequenz kommen kann. Die Sequenz ist konstant (siehe 2.2.2).

Bei NCBI sind bereits 14 cpGenome verschiedener Kakaosorten publiziert worden, nicht jedoch die Sequenz der Sorte CCN-51. Die Informationen hierzu sind im Anhang 5.7, Tabelle 5.24 aufgelistet. Aus diesen Genomen wurde ein Alignment erstellt, um Sequenzunterschiede von Kakaosorten untereinander abschätzen zu können. Ob diese Unterschiede auch zwischen den Kakaosorten Arriba und CCN-51 bestehen, sollte durch die partielle Sequenzierung solcher Regionen überprüft werden. Hierzu zählte die sogenannte ccsA-Region. Arbeiten zu diesem Sequenzabschnitt werden unter 4.7.1 erläutert.

Eigene Sequenzierungsarbeiten sollten durchgeführt werden, um genaue Informationen zur Sorte CCN-51 zu erhalten. Zur Sequenzierung eines kompletten Genoms sind hierbei die Isolierung sowie die Reinigung der zu sequenzierenden DNA von Bedeutung (siehe 4.4.1 und 4.4.2).

4.4.1 Sequenzierung des cpGenoms mit vorheriger Chloroplasten-Isolierung

Die klassische Methode für eine komplette cpGenom-Sequenzierung ist die DNA-Extraktion aus der entsprechenden Zellorganelle des Blattes. Der Chloroplast muss vorher von anderem Zellmaterial isoliert werden. Dadurch wird erreicht, dass Zellkerne samt ihrer nukleären DNA abgetrennt werden und somit reine plastidäre DNA aus isolierten Chloroplasten extrahiert wird.

Die Isolierung von Chloroplasten aus Erbsen und Kresse wurde bereits von Rödiger et al., 2009 (132) sowie Aronsson et al., 2002 (133) beschrieben. Die in dieser Arbeit angewendete Methode wurde in Anlehnung an diese Publikationen durchgeführt (siehe Anhang 5.5). Neben einer hohen Ausbeute an möglichst reiner plastidärer DNA war das Ziel, keine nukleäre DNA zu koextrahieren. Darüber hinaus sollte die extrahierte DNA unfragmentiert vorliegen.

Folgende Methodenparameter wurden variiert und optimiert:

1. Zwei Puffer wurden miteinander verglichen. Neben dem CIB-BSA-Puffer – Bestandteil eines Kits zur Chloroplastenisolierung (DNeasy Plant Mini/Maxi Kit (50), siehe Anhang 5.2, Tabelle 5.6) – wurde der von Rödiger et al., 2009 publizierte Puffer untersucht. Auch die Puffermenge wurde variiert. Dabei ergab der Puffer nach Rödiger et al., 2009 eine höhere Ausbeute an DNA. Durch die Erhöhung der eingesetzten Puffermenge um etwa 20 % im Vergleich zur empfohlenen Menge konnten die Matrixeffekte der lederartigen Blätter verringert werden.

2. Der Zellaufschluss konnte durch den Einsatz von flüssigem Stickstoff optimiert werden. Die Ausbeute an DNA wurde um das 5- bis 10-Fache erhöht.

3. Verschiedene Probenmatrices wurden hinsichtlich der Frische sowie des Alters der Blätter untersucht. Da die Matrix der älteren Blätter lederner ist, ist sie schwerer aufzuschließen als die der jüngeren. Die älteren Blätter verfügen im Gegensatz dazu aufgrund ihrer intensiveren Grünfärbung über eine höhere Zahl von Chloroplasten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Alter der Blätter keinen Einfluss auf die isolierte Menge an DNA hat. Matrixeffekte und Chloroplastengehalt halten sich die Waage.

Hinsichtlich der Frische der Blätter wurde festgestellt, dass durch den Einsatz der Gefriertrocknung die Ausbeute an DNA erhöht wurde.

Mittels *Real-time* PCR wurde die Menge an koextrahierter nukleärer DNA überprüft. Hierzu wurden die zwei Primer-Paare Uni3 und Tc-Vic für die Amplifikation nukleärer DNA und die zwei Primer-Paare Chloro-Ins-3' und psbA zur Amplifikation plastidärer DNA eingesetzt (siehe Anhang 5.4, Tabelle 5.16). Das Verhältnis von cp- zu Kern-DNA wurde mittels ΔC_t -Methode bestimmt und als Quotient Q_{DNA} ausgedrückt:

$$Q_{DNA} = 2^{-(C_{t,Chloro} - C_{t,Ref})}$$

Q_{DNA} : Quotient aus den C_t -Werten, Verhältnis von cp- zu Kern-DNA

$C_{t,Chloro}$: C_t -Wert, PCR-Produkt Primer-Paar Chloro-Ins-3' oder psbA

$C_{t,Ref}$: C_t -Wert, PCR-Produkt Uni3 oder Tc-Vic

Durch die Optimierung der oben aufgeführten Versuchsparameter wurde eine Zunahme von Q_{DNA} beobachtet. Es ist demnach gelungen, den Anteil an cpDNA gegenüber nukleärer DNA im Isolat zu erhöhen. In einigen Isolaten konnte gar keine nukleäre DNA nachgewiesen werden, was allerdings nicht reproduzierbar war.

Zusammenfassung und Fazit

Nach der beschriebenen Isolierung von DNA aus extrahierten Chloroplasten konnte die Ausbeute an cpDNA erhöht und das Verhältnis von cp- zu Kern-DNA im Isolat optimiert werden. Die nukleäre DNA konnte hierbei jedoch nicht reproduzierbar vollständig abgetrennt werden. Weiterhin wurde die erforderliche Menge an cpDNA für eine Sequenzierung von etwa 1 µg nicht in ausreichender Menge erhalten. Darüber hinaus waren die Isolate nicht rein: Die komplexe Matrix der Kakaoblätter ist mit einem hohen Gehalt an störenden Begleitsubstanzen wie Proteinen assoziiert.

Daneben wurden durch Dr. Felix Focke Versuche zur Affinitätsanreicherung von plastidärer Kakao-DNA aus Gesamt-DNA durchgeführt. Hierbei kamen an bestimmte Sequenzregionen des cpGenoms spezifisch bindende Sonden zum Einsatz. Sie waren biotinyliert und an mit Streptavidin beschichtete magnetische Partikel gekoppelt. Durch eine magnetische Separation sollte die plastidäre von der nukleären DNA getrennt werden. Doch auch hier waren Menge und Reinheit der erhaltenen DNA nicht ausreichend.

Die Arbeiten wurden eingestellt, da sowohl die Quantität als auch Qualität der isolierten plastidären DNA keine ausreichenden Ergebnisse lieferten.

4.4.2 Sequenzierung des cpGenoms ohne vorherige Abtrennung der Chloroplasten

Kane et al., 2012 (55) beschreiben eine Methode zur Sequenzierung des kompletten cpGenoms in Anwesenheit des Kerngenoms: „*low-coverage whole genome shotgun sequencing*“. Eine aufwendige Abtrennung der Chloroplasten, wie sie im Kapitel 3.3.3 und Anhang 5.5 beschrieben wird, ist demnach nicht notwendig. Die Grundlage dieser Methode ist die unterschiedliche Zahl der Kopien der nukleären und der plastidären DNA in einer Zelle: Das cpGenom kommt in einer wesentlich höheren Kopienzahl vor als das Kerngenom (siehe 2.2.2). In der isolierten Gesamt-DNA sind demzufolge wesentlich mehr Kopien des plastidären als des nukleären Genoms enthalten. Erfolgt die Sequenzierung mit einer geringen Abdeckung, wird lediglich die DNA erfasst, die in erhöhter Kopienzahl vorliegt. Dass die plastidäre DNA wesentlich kleiner ist als die nukleäre DNA (siehe 2.2.2), ist hierbei unbedeutend.

Die Gesamt-DNA von zehn Proben wurde isoliert (siehe Tabelle 4.4) und durch eine Ethanolfällung gereinigt (siehe 3.10.2). Im Anschluss wurde eine Sequenzierung mittels *low-coverage whole genome shotgun sequencing* durch das Unternehmen GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland, durchgeführt. Referenzgenom war hierbei: HQ244500.

Tabelle 4.4: Auflistung der zehn Proben, deren cpGenome sequenziert wurden.

Sorte	Probenname
CCN-51	C1, Bl.
CCN-51	C2, Bl.
CCN-51	C4, Bl.
CCN-51	C5, Bl.
Arriba: EET-95	A4, Bl.
Arriba: EET-103	A6, Bl.
Arriba: EET-544	A7, Bl.
ICS-95	E1, Bl.
Canelo	E3, Bl.
IMC-67	E5, Bl.

Die Sequenzen der zehn cpGenome wurden mithilfe der Software Vector NTI (Version X) sowohl miteinander als auch mit den 13 bei NCBI publizierten verglichen. Die weiterführenden Arbeiten werden unter 4.6 näher erläutert.

4.4.3 Sequenzierung der IRR

Entsprechend der Publikation nach Dhingra et al., 2005 (134) wurde ein Bereich des cpGenoms – die IRR (siehe 3.2.2) – untersucht. Abbildung 4.3 zeigt schematisch das cpGenom mit der IRR.

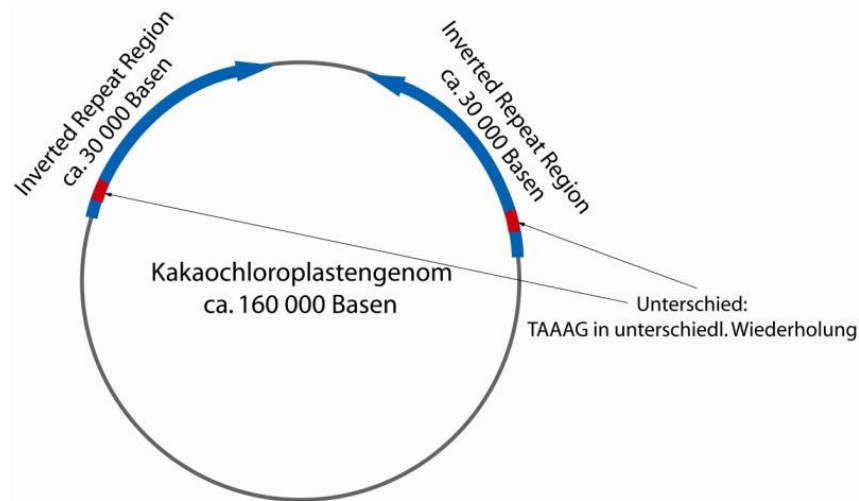


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des cpGenoms mit der IRR, die ein $(TAAAG)_n$ -Repeat mit unterschiedlicher Wiederholung in CCN-51 und Arriba enthält.

Die etwa 30 000 bp lange Sequenz kommt im cpGenom zweimal vor und wurde durch den Einsatz von 27 Primer-Paaren (siehe Anhang 5.4, Tabelle 5.13) durch partielle Sequenzierung entschlüsselt. Zunächst erfolgte die Sequenzierung einer CCN-51-Probe. Die erhaltenen 54 Amplifikate wurden in beide Richtungen sequenziert. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit denen der IRR bereits publizierter cpGenome von Kakao verglichen. Dabei ergab sich ein Sequenzunterschied zwischen CCN-51 und den restlichen cpGenomen bei dem Primer-Paar IRB22F. Dieser Unterschied wurde durch Resequenzierung einer CCN-51- sowie einer Arriba-Probe bestätigt: In der IRR befindet sich eine 5 bp lange Sequenz, die in den beiden Kakaosorten unterschiedlich oft wiederholt wird.

Die Sequenz $(TAAAG)_n$ tritt beim Arriba sechsmal auf ($n = 6$) und beim CCN-51 vierzehnmal ($n = 14$). Das entsprechende Alignment ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

A1,B1. -----TAAAGGGCGANG
A2,B1. -----TAAAGGGCGAGT
A3,B1. -----TAAAGGGCGA
A4,B1. -----TTAAGGGC
A5,B1. -----TAAGGGCGA
A6,B1. -----TAAAGGGCGA
A7,B1. -----TA
A8,B1. -----TTAAGGGCG
C1, B1. TAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAGGGCGA
C2, B1. TAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAGGGCGAGGT
C3, B1. TAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAGGGCGA
C5, B1. TAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAGGGCGA
C6, B1. TAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAGGGCGAGGT

Das Alignment zeigt ein einheitliches Ergebnis für sämtliche sequenzierten Arriba- und CCN-51-Proben: Eine sechsfache Wiederholung des (TAAAG)_n-Repeats für Arriba ist wie eine vierzehnfache für CCN-51 charakteristisch. Basierend auf diesem Sequenzunterschied wurde eine Methode entwickelt, mit der CCN-51 und Arriba voneinander unterschieden werden können (siehe 4.5).

4.5 DNA-basierte Methoden aufgrund der unterschiedlichen Wiederholung des (TAAAG)_n-Repeats in der IRR

Die unterschiedlich häufige Wiederholung der 5 bp langen Sequenz (TAAAG)_n ist zur Methodenentwicklung einer spezifischen PCR nicht geeignet: Hierbei handelt es sich nicht um einen qualitativen Unterschied, sondern um eine unterschiedliche Sequenzwiederholung. Sämtliche Primer würden mit der Sequenz beider Kakaosorten hybridisieren. Der Sequenzunterschied ist hingegen dazu geeignet, eine PCR durchzuführen, bei der das Primer-Paar die 5 bp lange (TAAAG)_n-Region flankiert. Dabei entstehen Amplifikate, die sich um 40 bp voneinander unterscheiden. Hierbei wurden dieselben Primer eingesetzt wie zuvor zur Sequenzierung der 13 Kakaoblattproben (siehe Anhang 5.4, Tabelle 5.14). Entsprechend den konstruierten Primern entstehen folgende PCR-Produkte (die 81 bp ergeben sich aus dem Primerdesign und entsprechen den umliegenden Basen):

CCN-51 mit (TAAAG) ₁₄	5 bp x 14	= 70 bp + 81 bp= 151 bp
Arriba mit (TAAAG) ₆	5 bp x 6	= 30 bp + 81 bp= 111 bp

Die unterschiedlich großen PCR-Produkte wurden mit drei Methoden detektiert: AGE, dHPLC und CGE. Die Tabellen 4.5 und 4.6 informieren darüber, ob für die jeweilige Probe das Ergebnis erzielt worden (+) oder nicht erzielt worden (-) ist. Die Interpretationen und Diskussionen hierzu erfolgen in 4.5.1. Die nicht erwarteten Ergebnisse für die Arriba- und CCN-51-Proben sind grau hinterlegt.

Kakaoblätter

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse des (TAAAG)_n-Repeats, Kakaoblätter.

Probe	AGE [bp]		dHPLC [min]		CGE [bp]		Ergebnis
	~110	~150	~1,4	~2,7	~110	~150	
C1, Bl.	-	+	-	+	-	+	CCN51-typisch
C2, Bl.	-	+	-	+	-	+	CCN51-typisch
C3, Bl.	-	+	-	+	-	+	CCN51-typisch
C4, Bl.	-	+	-	?	-	?	CCN51-typisch?
C5, Bl.	-	+	-	+	-	+	CCN51-typisch
C6, Bl.	-	+	-	+	-	+	CCN51-typisch
A1, Bl.	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A2, Bl.	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A3, Bl.	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A4, Bl.	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A5, Bl.	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A6, Bl.	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A7, Bl.	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A8, Bl.	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
Cr1, Bl.	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
E1, Bl.	+	-	+		+	-	Arriba-typisch
E2, Bl.	+	-	+		+	-	Arriba-typisch
E3, Bl.	-	+	-	+	-	+	CCN51-typisch
E4, Bl.	-	+	-	+	-	+	CCN51-typisch
E5, Bl.	+	-	+		+	-	CCN51-typisch

Kakaobohnen

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Ergebnisse des (TAAAG)_n-Repeats, Kakaobohnen.

Probe	AGE [bp]		dHPLC [min]		CGE [bp]		Ergebnis
	~110	~150	~1,4	~2,7	~110	~150	
C1	(+)	+	(+)	+	(+)	+	CCN51-typisch
C2	(+)	+	(+)	+	(+)	+	CCN51-typisch
C3	(+)	+	(+)	+	(+)	+	CCN51-typisch
C4	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
C5	(+)	+	(+)	+	(+)	+	CCN51-typisch
C6	(+)	+	(+)	+	(+)	+	CCN51-typisch
C7	(+)	+	(+)	+	(+)	+	CCN51-typisch
C8	(+)	+	-	+	(+)	+	CCN51-typisch
A1	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A2	-	+	-	+	-	+	Fehldeklaration?
A4	+	+	+	+	+	+	Mischung
A5	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A6	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A7	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A8	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A9	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A10	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A11	+	+	+	+	+	+	Mischung
A12	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A13	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch
A14	+	+	+	+	+	+	Mischung
Cr1	+	-	+	-	+	-	Arriba-typisch

Später gelieferte Proben (C10 – C15 sowie A15 – A34) wurden im Nachhinein hinsichtlich des Längenunterschieds des (TAAAG)_n-Repeats mittels AGE überprüft. Die Ergebnisse sind im Anhang 5.8.1 in der Tabelle 5.25 dargestellt.

als bei den verbleibenden Blattsorten des CCN-51. Das Amplifikat der Probe C4, Bl. wurde daher mittels partieller Sequenzierung untersucht: Anstelle einer vierzehnfachen Wiederholung des (TAAAG)_n-Repeats wurde eine zwölffache Wiederholung bestimmt. In Projektausschusssitzungen zum FEI-Projekt Aif/ FEI 16796 N wurde von Frau Dr. C. Rohsius bekannt gegeben, dass von der Sorte CCN-51 mindestens zwei Typen bekannt sind, obwohl CCN-51 ein Klon ist (135). Kapitel 4.9 informiert weitergehend über die Definition von CCN-51 als Klon.

Auch die Criollo-Blattprobe wurde hinsichtlich der Analyse des (TAAAG)_n-Repeats überprüft. Bei dieser Sorte wurde ein Amplifikat einer Größe von etwa 111 bp beobachtet, was dem für Arriba typischen Verhalten entspricht. Da das cpGenom maternal vererbt wird, weist dasselbe Muster der Sorten Arriba und Criollo auf eine gemeinsame Mutter der beiden Sorten hin.

Neben dem Arriba, dem CCN-51 sowie dem Criollo wurden die Kakaoblattproben der Eltern des CCN-51: ICS-95, Canelo, IMC-67 überprüft. Die fünf Proben zeigten unterschiedliche Ergebnisse (siehe Anhang 5.8.2, Abbildung 5.1). Während die Proben der Sorte ICS-95 (E1, Bl., E2, Bl.) sowie die IMC-67-Probe (E5, Bl.) das für Arriba typische Amplifikat von 151 bp zeigten, war bei den Canelo-Proben (E3, Bl., E4, Bl.) das CCN-51-typische Ergebnis einer Bande bei 111 bp zu beobachten. Bei der Kreuzung der drei Sorten muss der Canelo folglich der maternale Elternteil gewesen sein.

Kakaobohnen

Die Mehrheit der CCN-51-Kakaobohnen zeigte ein Amplifikat von 151 bp und die Arriba-Kakaobohnenproben zeigten eines bei 111 bp (siehe Abbildung 4.7). Bei den CCN-51-Proben ließ sich eine weitere Bande bei etwa 110 bp beobachten, die im Folgenden Störbande genannt wird. Ob die Störbande auch bei den Arriba-Proben auftrat, kann mithilfe der AGE nicht genau bestimmt werden. Die Auflösung der Methode ist zu gering, um diese Bande bei etwa 110 bp von der für Arriba typischen bei etwa 111 bp zu unterscheiden. Für die Criollo-Bohnenprobe war wie bei der Blattprobe das für Arriba typische Amplifikat von 111 bp festzustellen.

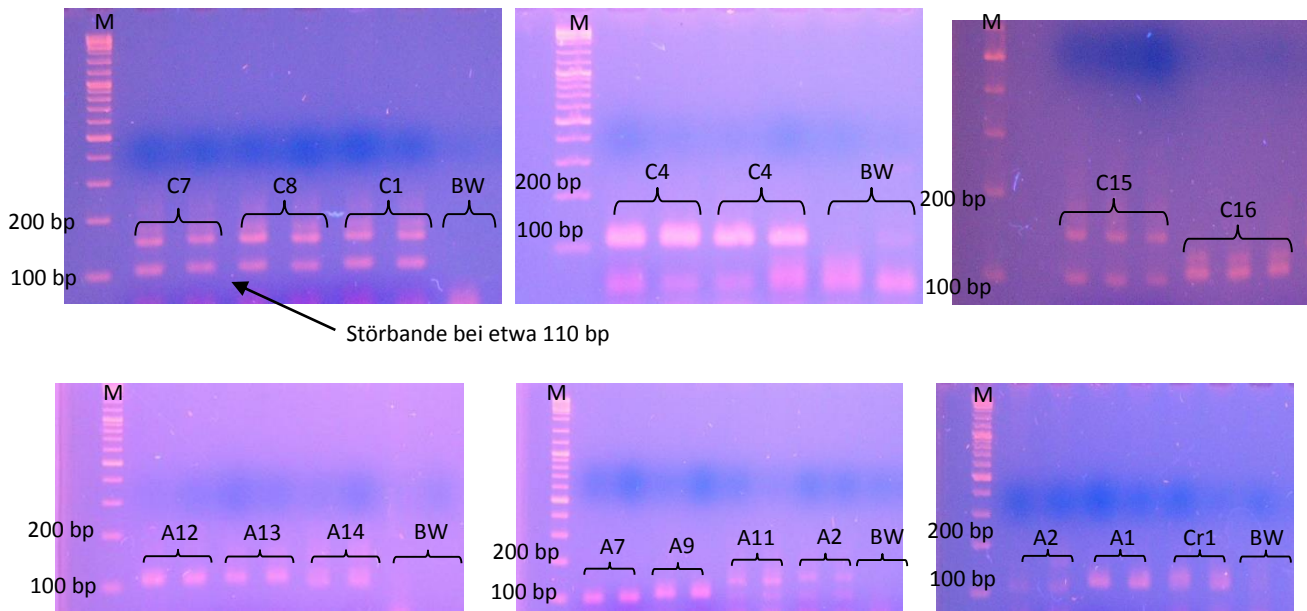


Abbildung 4.7: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats einiger Arriba- und CCN-51-Proben, AGE, Kakaobohnen.

Dabei wurden sechs Ausnahmen beobachtet:

- Die Proben C4 und C16 zeigten die für Arriba typischen Amplifikate bei 111 bp und keine für CCN-51 charakteristische Bande bei 151 bp (siehe Abbildung 4.7). Bei C4 liegt der Verdacht nahe, dass es sich um eine Falschdeklaration der Probe handelt. Bei der später gelieferten Probe C16 kann nicht davon ausgegangen werden. Dabei handelt es sich mit Sicherheit um die Sorte CCN-51, da die Probe C16 aus der Öffnung einer frischen Frucht stammte und somit direkt beprobt wurde.
- Die Probe A4 zeigte zwei Banden: bei 111 bp und 151 bp. Hier könnte eine Mischung beider Kakaosorten vorliegen.
- Die Arriba-Proben A2, A11 und A14 zeigten bei unterschiedlichen Versuchsdurchführungen einmal die CCN-51-typische Bande und ein anderes Mal die für Arriba typische Bande, was mittels weiterer Durchführungen überprüft wurde.

Die Ausnahmen bei den Kakaobohnen (mit Ausnahme von C16) wurden weiterhin untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob es sich tatsächlich um Falschdeklarationen oder Mischungen der beiden Sorten handelte. Hierzu wurde für jede der sechs Proben fünfmal DNA isoliert. Pro Isolat wurde die DNA anstatt aus verschiedenen Bohnen derselben Charge jeweils nur die aus einer Bohne extrahiert. Im Anschluss wurden die fünf DNA-Isolate der PCR zugeführt und das Amplifikat wurde mittels AGE detektiert. Im Anhang 5.8.2 (Abbildungen 5.2 und 5.3) sind exemplarisch die Ergebnisse der Arriba-Proben A2 und A11 dargestellt.

- Bei der Probe A11 zeigten drei der fünf DNA-Isolierungen die CCN-51-typische Fragmentlänge bei 151 bp (1., 2. und 4. Bohne) und die beiden anderen die für Arriba charakteristische bei 111 bp (3. und 5. Bohne). Dasselbe Resultat wurde bei den Einzelaufarbeitungen der Sorten A4 und A14 erzielt. Folglich erhärtet sich der Verdacht, dass es sich bei den Bohnenproben um Mischungen handelt.
- Die Proben C4 und A2 konnten anhand der erhaltenen Amplifikate der jeweils anderen Sorte zugeordnet werden. Somit wird von einer Falschdeklaration der Probe oder vielmehr der Charge ausgegangen.

4.5.1.2 Detektion mittels dHPLC

Der Laufmittelgradient wurde dahingehend optimiert, dass der dem CCN-51-Amplifikat bei 151 bp zugehörige und später eluierende Peak detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis ist ausreichend, da bei der vorliegenden Fragestellung die Detektion des Amplifikats von Arriba nicht vordergründig ist.

In den folgenden Grafiken 4.8 bis 4.9 ist der CCN-51-typische Peak rot und der für Arriba typische Peak gelb dargestellt. Der Störpeak, welcher der Störbande (siehe 4.5.1.1, Abbildung 4.7) entspricht, ist grün dargestellt.

Kakaoblätter

Die Blattproben bestätigten die Ergebnisse, die bereits mittels AGE ermittelt wurden. In den folgenden Chromatogrammen wird für das für Arriba spezifische Amplifikat (111 bp) ein Peak mit einer Retentionszeit von etwa 1,3 bis 1,5 min gezeigt. Das längere für CCN-51 charakteristische Amplifikat (151 bp) eluiert bei etwa 2,5 bis 2,8 min (siehe Abbildung 4.8). Schwankungen der Retentionszeit innerhalb einer Sorte von z. B. 0,3 min, wie es bei dem CCN-51 der Fall ist, sind auf das Auswechseln der mobilen Phase zwischen den Läufen oder Durchführungen längerer Dauer zurückzuführen. Hierdurch verändert sich die Zusammensetzung der Pufferlösungen aufgrund der Flüchtigkeit der Komponenten (v. a. Acetonitril). Die abweichende Wiederholung des (TAAAG)_n-Repeats der Probe C4, Bl. im Gegensatz zu den anderen CCN-51-Blattproben konnte daher auch mittels dHPLC nicht eindeutig detektiert werden.

Bei einigen CCN-51-Proben war im Lösungsmittel-Peak eine Schulter zu erkennen. Dieser Störpeak ist der Störbande (etwa 110 bp) zuzuordnen (siehe 4.5.1.1). Dieser zeigte sich in geringem Maße auch bei den Blattproben, während er bei der Detektion mittels AGE lediglich bei den Bohnenproben

beobachtet werden konnte. Auch bei der dHPLC konnte wie bei der AGE nicht zwischen dem für Arriba spezifischen Peak sowie dem Störpeak differenziert werden.

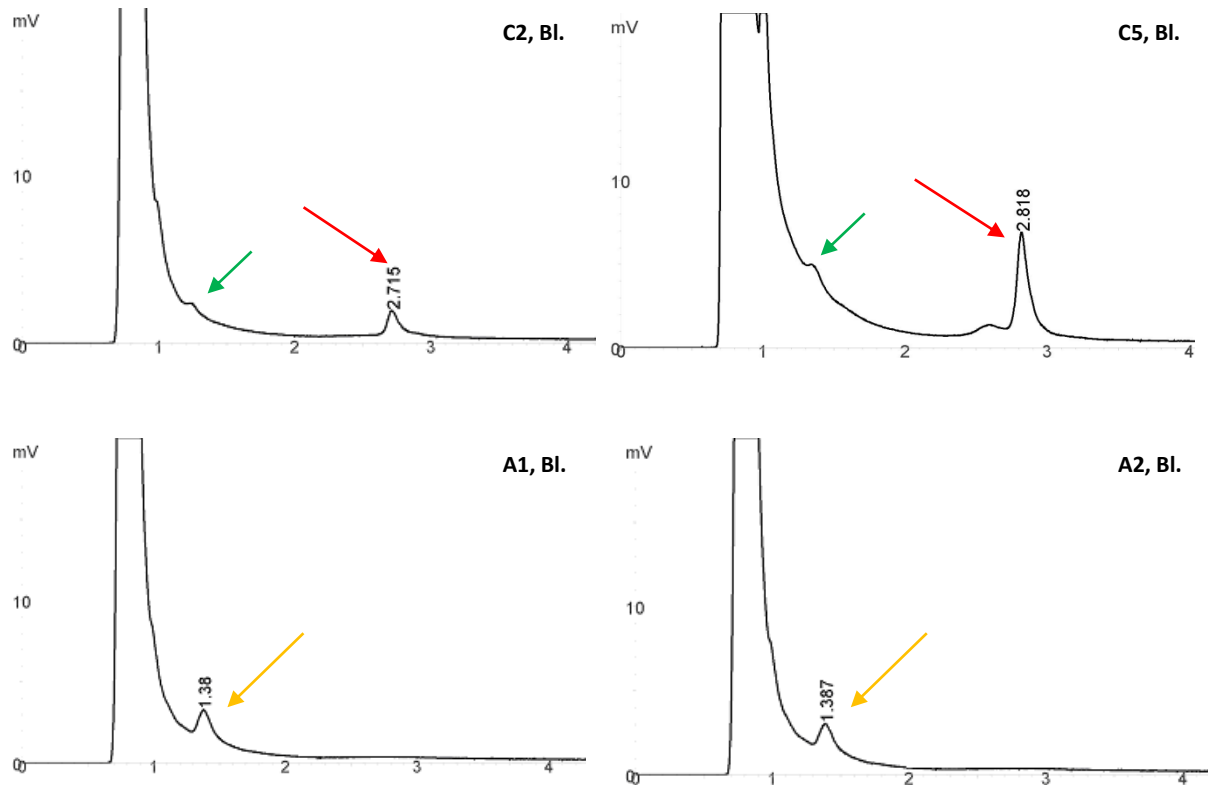


Abbildung 4.8: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Kakaosorte CCN-51 (Probe C2, Bl., C5, Bl.) bei 2,5-2,8 min und der Kakaosorte Arriba (A1, Bl., A2, Bl.) bei etwa 1,3 min, dHPLC, Kakaoblätter.

Die Kakaoblattprobe des Criollo Cr1, Bl. verhielt sich analog zu den Ergebnissen, die mittels AGE erzielt wurden. Das 111 bp lange Amplifikat eluierte bei etwa 1,4 min (siehe Anhang 5.8.3, Abbildung 5.4).

Die Ergebnisse für die Proben der Eltern des CCN-51 entsprachen denen der AGE. Die Amplifikate der Proben des ICS-95 E1, Bl. und E2, Bl. sowie des IMC-67 E5, Bl. zeigten ähnliche Elutionszeiten wie die Arriba-Proben (siehe Anhang 5.8.3, Abbildung 5.5), während die Canelo-Proben E3, Bl. und E4, Bl. wie die CCN-51-Proben eluierten.

Kakaobohnen

Die folgende Abbildung 4.9 zeigt beispielhaft Chromatogramme von Bohnenproben der verschiedenen Sorten. Neben den charakteristischen Peaks ist der Störpeak (grün markiert) in den Chromatogrammen des CCN-51 zu beobachten.

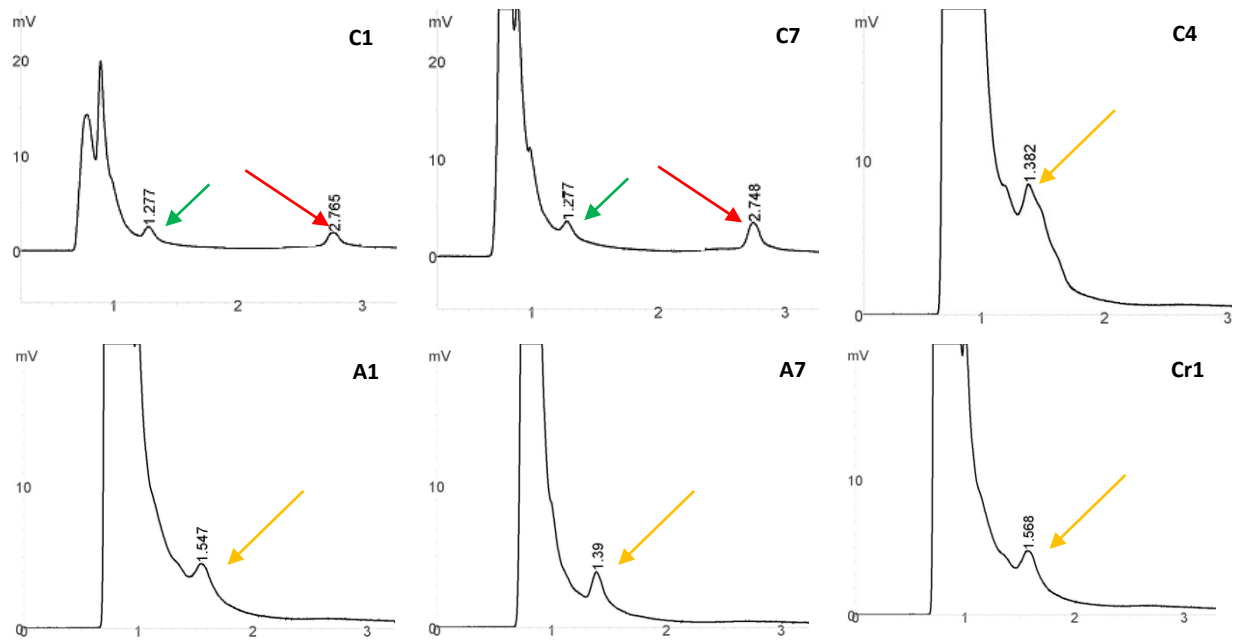


Abbildung 4.9: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats einiger Arriba- und CCN-51-Proben, dHPLC, Kakaobohnen.

Ähnlich den Ergebnissen der AGE zeigten sich nach der Bestimmung mittels dHPLC dieselben Ausnahmen:

- Die Retentionszeit für das PCR-Produkt der Probe C4 deutete auf eine Amplifikatlänge hin, die dem Arriba zuzuordnen ist. (Die Probe C16, für die mittels AGE dasselbe festgestellt wurde, wurde aus zeitlichen Gründen nicht mittels dHPLC gemessen.)
- Probe A4 wies in den Chromatogrammen beide Peaks auf (sowohl den für Arriba als auch den für CCN-51 charakteristischen), was auf eine Mischung hindeutete.
- Die Chromatogramme der Proben A2, A11 und A14 stimmten ebenfalls mit den Resultaten der AGE überein: Sie zeigten einmal die Arriba- und ein andermal die CCN-51-typische Retentionszeit.

Auch in diesem Fall wurden die oben beschriebenen Einzelaufarbeitungen dieser Proben untersucht. Im Anhang 5.8.3, Abbildungen 5.6 und 5.7 sind beispielhaft jeweils drei der fünf erhaltenen Chromatogramme der Sorten A2 und A11 dargestellt. Die Ergebnisse der dHPLC waren mit denen der AGE kongruent.

4.5.1.3 Detektion mittels CGE

Die Methode CGE ist empfindlicher als die der AGE. Die digitale Auswertung bei der CGE sowie die höhere Auflösung stehen der rein optischen Abschätzung der AGE gegenüber. In den Darstellungen wurden für die Peaks dieselben Farben gewählt wie bereits für die AGE und die dHPLC.

Kakaoblätter

In den Elektropherogrammen der CGE konnten das für Arriba spezifische Amplifikat bei 111 bp sowie das CCN-51-typische bei 151 bp detektiert werden. Die in den Elektropherogrammen angegebenen Größen können hierbei um etwa 1 bis 3 bp abweichen. Für die Sorte C4, Bl., die sich aufgrund einer abweichenden Wiederholung des (TAAAG)_n-Repeats von den anderen CCN-51-Blattproben unterscheidet (siehe 4.5.1.1), wurden im Elektropherogramm 144 bp als Amplifikatgröße angegeben. Das theoretische PCR-Produkt der Probe C4, Bl. entspricht mit $n = 12$ 141 bp. Die erhaltenen 144 bp liegen näher an den 141 bp als an den 151 bp der Amplifikate der anderen Proben. Mittels CGE kann der Unterschied zwischen C4, Bl. und den restlichen Blattproben dieser Sorte somit nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den charakteristischen Peaks wurde in den Elektropherogrammen der CCN-51-Proben ein kleinerer Peak mit einer Größe von 105 bp angezeigt (grüner Pfeil). Die Störbande/der Störpeak wurde bereits in 4.5.1.1 und 4.5.1.2 erwähnt. Es handelt sich vermutlich um eine sogenannte *Stutter*-Bande, ein bekanntes Artefakt der Polymerase bei der Amplifikation von Repeat-Regionen (136). Das prozentuale Flächenverhältnis des Peaks der *Stutter*-Bande sowie des CCN-51-typischen Peaks betrug etwa 93,0 % auf Seiten des erwarteten und größeren Amplifikats. Auch in einigen Elektropherogrammen der Arriba-Proben (bspw. A4, Bl., A5, Bl.) war ein zusätzlicher Peak bei etwa 104 bp zu erkennen. Er war mit einer Größe von etwa 2 % gegenüber dem Peak bei 111 bp jedoch vernachlässigbar.

In den folgenden Abbildungen 4.10 und 4.11 sind die CGE-Elektropherogramme einiger Arriba- und CCN-51-Blattproben dargestellt.

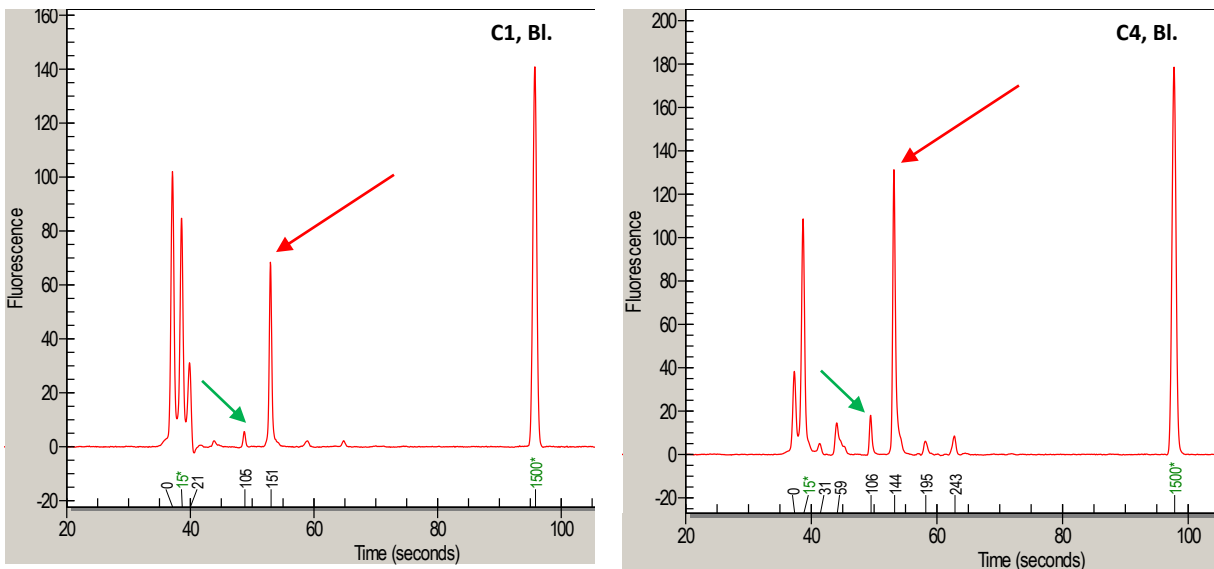


Abbildung 4.10: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Kakaosorte CCN-51 (Probe C1, Bl., C4, Bl.) bei 151 bp und 144 bp, CGE, Kakaoblätter.

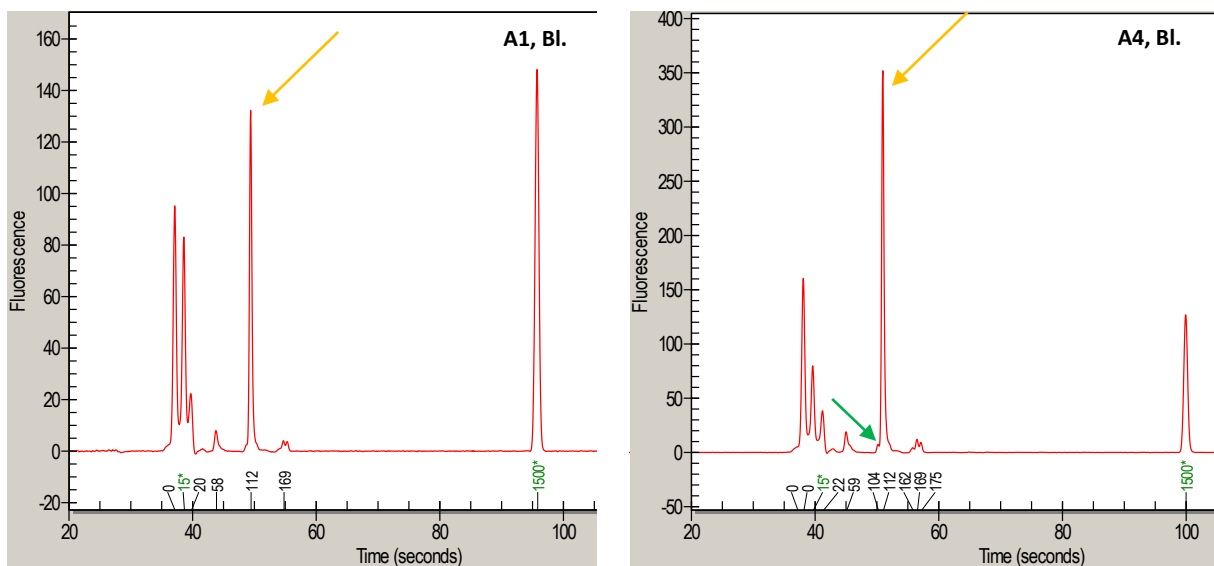


Abbildung 4.11: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Kakaosorte Arriba (Probe A1, Bl., A4, Bl.) bei 112 bp, CGE, Kakaoblätter.

Wie bei den beiden anderen Methoden zeigte die Criollo-Probe Cr1, Bl. einen Peak bei der für Arriba charakteristischen Retentionszeit, die eine sechsfache Wiederholung des (TAAAG)_n-Repeats voraussetzt. Das Elektropherogramm ist im Anhang 5.8.4, Abbildung 5.8 dargestellt. Ebenso verhielt es sich mit den Eltern des CCN-51, die nach der Detektion der Amplifikate mittels CGE bei den Methoden AGE und dHPLC entsprechende Ergebnisse lieferten. Die ICS-95- sowie die IMC-67-Probe eluierten bei einer Retentionszeit, die dem 111 bp großen Amplifikat zuzuordnen ist. Die Canelo-Probe zeigte das für CCN-51 charakteristische Muster mit einem Peak bei 151 bp (siehe Anhang 5.8.4, Abbildung 5.9).

Die CGE-Elektropherogramme der Kakaoblattproben bestätigen die Ergebnisse der partiellen Sequenzierungen des (TAAAG)_n-Repeats der IRR und sind mit denen der AGE und der dHPLC deckungsgleich.

Kakaobohnen

Die Elektropherogramme der Bohnenproben bestätigten die bisher erzielten Ergebnisse: Die Sorte CCN-51 zeigte ein charakteristisches Amplifikat bei etwa 151 bp und ein zusätzliches bei etwa 105 bp. Die Verhältnisse der beiden Peaks unterschieden sich allerdings gravierend von denen, die bei den Kakaoblättern beobachtet wurden. Sie schwankten zwischen 40:60 und 70:30 (151 bp:105 bp) und hatten demnach einen höheren Anteil am Störpeak. Die Sorte Arriba zeigte ein charakteristisches Amplifikat bei etwa 111 bp sowie ein zusätzliches bei etwa 104 bp. Ein prozentuales Verhältnis der beiden Peaks zueinander konnte hier jedoch nicht ermittelt werden, da beide Peaks nicht basisliniengetrennt vorlagen. Allerdings konnte ein Verhältnis von 10:90 auf Seiten des erwarteten Peaks bei 111 bp abgeschätzt werden. Lediglich bei der Probe A8 wurde ein abweichendes Ergebnis von etwa 50:50 geschätzt. Die Abbildung 4.12 zeigt die Elektropherogramme der Proben Arriba, CCN-51 sowie Criollo.

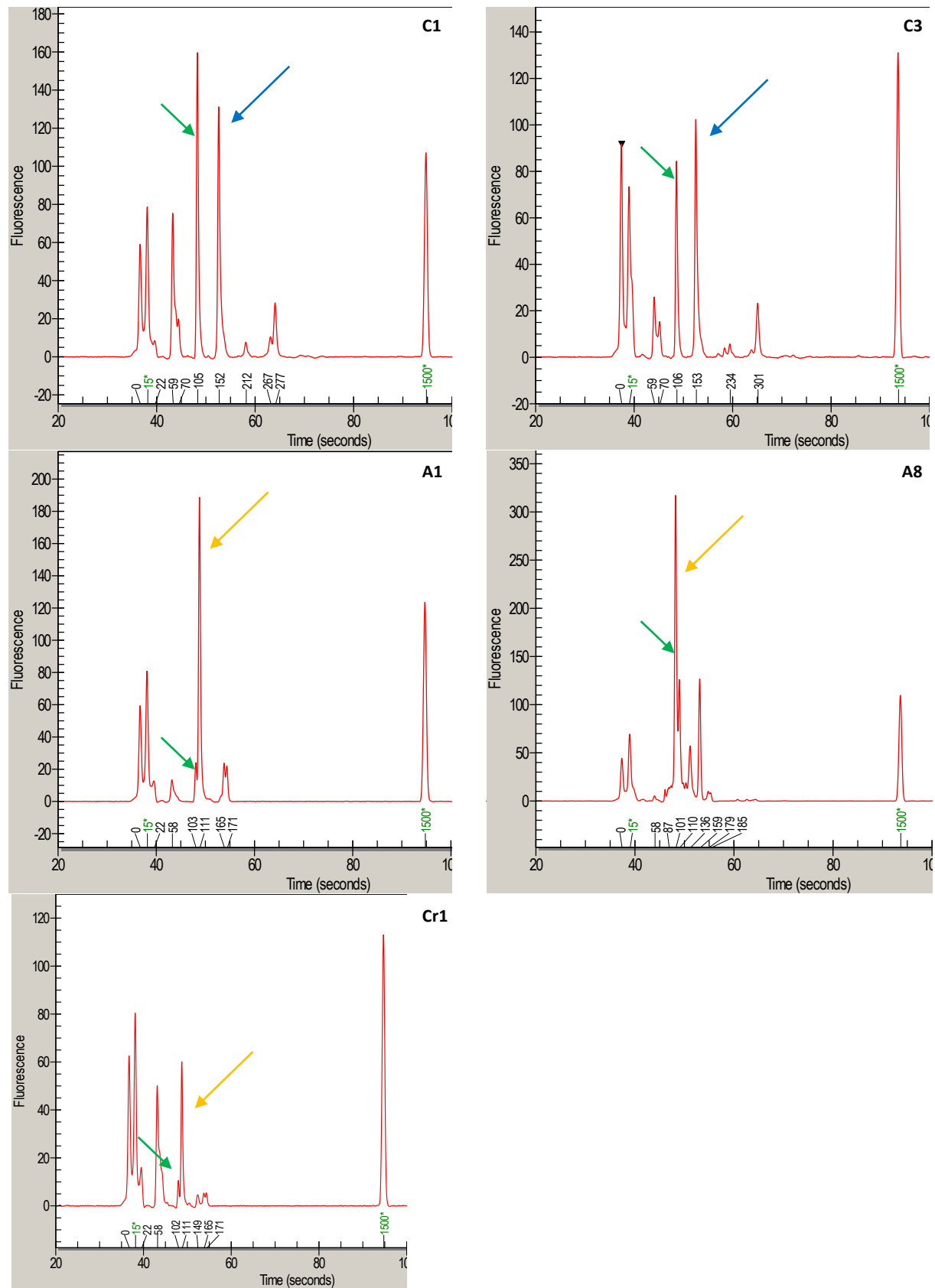


Abbildung 4.12: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats einiger Arriba- und CCN-51-Proben, CGE, Kakaobohnen.

Mittels CGE wurde für neun von 13 Bohnenproben der Sorte Arriba und für sieben von acht Bohnenproben der Sorte CCN-51 das erwartete Ergebnis erzielt. Die Ausnahmen bildeten wiederum die Proben C4, A2, A4, A11 und A14. (Die Probe C16 wurde aus zeitlichen Gründen nicht mittels CGE analysiert.) Auch hier wurden die fünf Einzelaufarbeitungen für die abweichenden Proben gemessen. Im Anhang 5.8.4, Abbildungen 5.10 und 5.11 sind die Elektropherogramme von zwei von fünf Aufarbeitungen der Proben A2 und A11 aufgeführt. Hierdurch wurden die Ergebnisse der AGE und dHPLC bestätigt. Auch hiernach lag der Verdacht nahe, dass die Proben A4, A11 sowie A14 Mischungen der Sorte Arriba mit CCN-51 sind. Dass die Proben C4 und A2 falsch deklariert worden sind, wurde ebenfalls vermutet.

Aufgrund der fehlenden Basislinientrennung konnte zwischen dem für Arriba typischen Peak sowie dem Störpeak nicht deutlich differenziert werden. Die Anwesenheit eines Peaks im entsprechenden Bereich hat demnach keine 100%ige Aussagekraft bzgl. eines Arriba-Anteils.

Das $(TAAAG)_n$ -Repeat wurde für später erhaltene Kakaobohnenproben (C10 – C16 und A15 – A34) mittels AGE detektiert. Hierbei wurde festgestellt, dass es sich bei einer Vielzahl von Proben um Falschdeklarationen oder Mischungen beider Sorten handelt (siehe Anhang 5.8.1, Tabelle 5.25).

4.5.1.4 Vergleich der Detektionsmethoden und des Probenmaterials

Die Kapitel 4.5.1.1 bis 4.5.1.3 zeigen, dass sich das $(TAAAG)_n$ -Repeat als Sequenzunterschied hinsichtlich einer qualitativen Unterscheidung der Sorten Arriba und CCN-51 eignet. Mit den drei Methoden AGE, dHPLC sowie CGE wurden das für Arriba typische Amplifikat von 111 bp sowie das für CCN-51 charakteristische von 151 bp detektiert.

Die Ergebnisse bzgl. der Kakaoblätter waren wesentlich einheitlicher als die hinsichtlich der Kakaobohnen. Da erstere Proben direkt vor Ort beprobt wurden, stellen sie das verlässlichere Material dar; ihr Ursprung ist gesichert. Die Kakaobohnen wurden von Kakaoproduzenten in Ecuador oder Deutschland geliefert und ihre Herkunft kann nicht 100%ig garantiert werden (siehe auch 2.5.2). Daher sind die Blätter für die Methodenentwicklung ausschlaggebend, auch wenn das eigentliche Untersuchungsmaterial die Kakaobohnen darstellen.

Von den drei Detektionsmethoden ist die CGE diejenige mit der höchsten Sensitivität. Ein Beispiel hierfür sind die Störbanden, die sich nach der AGE bei den Bohnenproben, jedoch nicht bei den Blattproben zeigten. Mittels CGE konnten die entsprechenden Störpeaks auch bei einigen Blattproben detektiert werden. Weiterführende Versuche sowie Optimierungen wurden hinsichtlich der CGE durchgeführt (siehe 4.5.2 und 4.5.3). Hinzu kommt, dass die CGE mehr als z. B. die dHPLC zur herkömmlichen Laborausstattung zählt und eher in Handelslaboratorien angewendet wird.

4.5.2 Bestimmung der Nachweisgrenze der entwickelten Methode

Für die CGE wurde die Konzentration bestimmt, ab der sich der Peak aus dem Grundrauschen hebt. Amplifikate der Kakaoblattproben A2, Bl. und C2, Bl. sowie der Kakaobohnenproben C7 und A5 wurden eingesetzt. Dabei erfolgten eine Bestimmung der Konzentration mittels NanoDrop und eine anschließende Einstellung definierter Konzentrationen durch Verdünnung. Nach der Vermessung der verschiedenen Konzentrationen wurde ein Näherungswert für die Nachweisgrenze von etwa 20 ng bestimmt.

4.5.3 Ansätze zur Quantifizierung

Es wurde überprüft, ob das (TAAAG)_n-Repeat geeignet ist, CCN-51-Zumischungen in Arriba nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ nachzuweisen. Dazu wurden Versuche mit definierten DNA-Mischungen von Arriba und CCN-51 durchgeführt. Der reale Fall bedeutet eine Mischung aus Bohnen. Zur Annäherung an diesen Fall wurden Mischungen der zwei Sorten wie folgt hergestellt (siehe 3.14):

A: Mischung von PCR-Produkten

B: Mischung von DNA-Isolaten und anschließende PCR

C: Mischung von fein gemahlenen Kakaobohnen und anschließende DNA-Isolierung sowie PCR

Die Versuche begannen mit A und endeten mit C. Für die Mischungen A und B wurden Versuche sowohl mit DNA aus Kakaobohnen als auch -blättern durchgeführt, für C lediglich mit Kakaobohnen. Erwartet wurde, dass die ermittelten Gehalte für die Kakaoblätter den eingestellten ähnlicher sind als die der Bohnen. Ebenso wurde angenommen, dass die Ergebnisse von A nach C stärker abweichen, da bspw. bei A eine Veränderung des Verhältnisses zwischen Arriba und CCN-51 durch die PCR nicht mehr erfolgen kann. Im Falle von C beeinflussen sämtliche Parameter der Versuchsführung das Verhältnis.

Für alle Mischungen wurden die Kakaobohnenproben C7 und A5 sowie C2, Bl. und A2, Bl. eingesetzt und anschließend mittels AGE und CGE gemessen.

4.5.3.1 Mischungen A und B der Kakaoblattproben

Bevor die Mischungsversuche mit den Kakaobohnen durchgeführt wurden, wurden Versuchsansätze mithilfe von Kakaoblättern durchgeführt (siehe 4.5.3). Dazu wurden im Fall A deren PCR-Produkte sowie im Fall B deren DNA-Isolate eingesetzt. Für den Fall A entsprachen die den prozentualen Gehalt in den Mischungen berechneten Werte eher der eingestellten Konzentration als bei den Kakaobohnen (siehe Anhang 5.8.5, Tabelle 5.26). Die entsprechenden Elektropherogramme der CGE, Agarosegele der AGE und die Tabelle der berechneten Gehalte für das Mischungsverhältnis A sind im Anhang 5.8.5, Abbildungen 5.12 und 5.13 dargestellt. (Nach der Versuchsführung mit der Mischung B wurden sehr schlechte Ergebnisse erzielt. Da es sich bei Mischung B aber generell um einen Vorversuch handelte, wurde dieses Experiment nicht wiederholt.)

Kakaoblätter stellen für die Methodenentwicklung das geeignetere Probenmaterial dar. Sie sind für die Kakaoindustrie allerdings nicht relevant. Daher stellen die Versuche zu den Mischungen mit Kakaoblättern lediglich Vorarbeiten dar.

4.5.3.2 Mischungen A, B und C der Kakaobohnenproben

Die folgende Abbildung 4.13 zeigt die Ergebnisse der Mischungen A, B und C nach der Detektion mittels AGE. Die entsprechenden Elektropherogramme nach CGE sind im Anhang 5.8.5 in den Abbildungen 5.14 bis 5.16 aufgeführt.

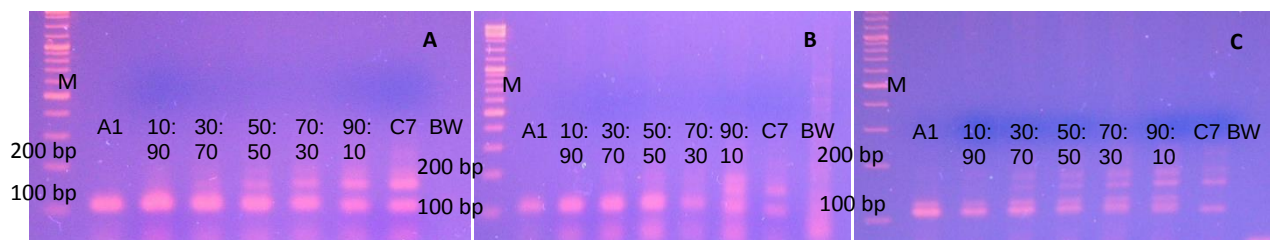


Abbildung 4.13: PCR des (TAAAG)_n-Repeats von A: PCR-Produkten, B: DNA-Isolaten und C: fein gemahlene Kakaobohnen aus Mischungen der beiden Kakaosorten. Das Mischungsverhältnis ist in CCN-51:Arriba angegeben. AGE.

Sowohl auf den Gelen der AGE als auch den Elektropherogrammen der CGE sind die für Arriba charakteristischen Peaks und Banden bei 111 bp sowie die CCN-51-typischen bei 151 bp sichtbar.

Hierbei ändert sich das Verhältnis der Peakfläche bzw. Bandenintensität entsprechend dem Trend eines zunehmenden CCN-51-Anteils bei einem sinkenden Arriba-Gehalt.

Mithilfe der CGE-Elektropherogramme wurden die prozentualen Flächenanteile der Peaks von Arriba und CCN-51 im Verhältnis zueinander berechnet. Der Störpeak bei etwa 105 bp (im Anhang 5.8.5, Abbildung 5.16, grün markiert) wurde dabei prozentual auf die beiden Sorten aufgeteilt. Grundlage der Berechnung bildeten die beiden Elektropherogramme der reinen Proben (siehe Anhang 5.8.5, Abbildung 5.17). Der prozentuale Anteil des Peaks wurde berechnet und anteilig zum Wert des Sortenanteils addiert (Arriba: 5 %, CCN-51: 45,6 %).

Die für die drei Mischungsansätze A, B und C ermittelten Werte sind im Vergleich zu den eingestellten Verhältnissen in der folgenden Tabelle 4.7 dargestellt.

Tabelle 4.7: Prozentuale Flächenanteile der Peaks für die Amplifikate der beiden Kakaosorten Arriba und CCN-51 in den Mischungsansätzen A, B und C, CGE.

	A		B		C	
A/C	Arriba	CCN-51	Arriba	CCN-51	Arriba	CCN-51
90/10	96,4	3,6	96,7	3,3	100,0	0
70/30	91,1	8,9	49,6	50,4	94,8	5,2
50/50	78,5	21,5	62,2	37,8	83,4	16,6
30/70	56,3	43,7	86,0	14,0	71,1	28,9
10/90	29,3	70,7	0	100,0	52,0	48,0

Die berechneten Werte belegen den in den Elektropherogrammen und Gelen beobachteten sowie den tatsächlichen Trend: Der CCN-51-Gehalt steigt bei einem sinkenden Arriba-Gehalt. Da die berechneten Anteile der zwei Kakaosorten jedoch nicht den tatsächlichen entsprechen, handelt es sich hierbei lediglich um einen Trend. Ein Vergleich der drei Mischungen zeigt, dass die Qualität der Ergebnisse von A über B nach C abnimmt. So wurde bei der Mischung B im Verhältnis 10/90 (A/C) gar kein Arriba-Peak mehr detektiert. Mit der Mischung C im Verhältnis 90/10 (A/C) verhielt es sich ähnlich.

Hauptsächliche Ursache hierfür ist der Störpeak bei etwa 105 bp. Sein Anteil an der Gesamtfläche ist bei der Sorte CCN-51 größer als bei Arriba. Der Fehler der Polymerase (136) ist bei dieser Sorte anscheinend gravierender. Dennoch tritt er auch bei der Sorte Arriba auf. Hinzu kommt, dass der Störpeak in unterschiedlicher Intensität bei beiden Sorten auftritt und bei der Sorte Arriba mit dem für Arriba typischen Peak oftmals nicht basisliniengetrennt vorliegt.

Ebenso lässt sich vermuten, dass ein PCR-Bias vorliegt. Während der PCR werden eher die Nukleotide der Sorte CCN-51 als die der Sorte Arriba vervielfältigt. Die Bildung von Heteroduplexen, die bei der Zusammenlagerung zweier unterschiedlicher Elternstränge zu beobachten ist, ist ebenfalls nicht zu vernachlässigen. In diesem Fall wäre nicht ein Peak, sondern ein Doppelpeak sichtbar (105).

Entsprechend der hier beschriebenen Untersuchung von Mischungen der Kakaobohnen ließe sich bei der Variante C (dem realen Fall) eine CCN-51-Beimengung zu der Kakaosorte Arriba ab einem Gehalt von etwa 30 % feststellen.

4.5.4 Anwendung auf die Matrix Schokolade

Mit der auf dem (TAAAG)_n-Repeat in der IRR basierenden Methode können die Sorten Arriba und CCN-51 in den Matrices Blättern und Bohnen erfolgreich differenziert werden. Daneben wurde untersucht, ob sich die Methode hinsichtlich der Matrix Schokolade eignet. Die Voraussetzung dafür ist, dass die cpDNA in ausreichender Menge und Qualität vorliegt.

Tabelle 5.3 im Anhang 5.1 informiert über die untersuchten Schokoladen. Drei Proben (S2, S3, S5) wurden ausgewählt, deren Deklaration darauf hinweist, dass bei der Herstellung ausschließlich oder anteilig Arriba-Kakao eingesetzt wurde. Auf zwei der fünf Proben (S1, S4) ist eine Angabe zu finden, dass Edelkakao verarbeitet wurde.

Die DNA wurde aus der vorliegenden Matrix mittels CTAB-Methode isoliert und der Universal-PCR zugeführt. Die Detektion erfolgte mittels AGE und CGE. Im Folgenden wird das Agarosegel der AGE gezeigt. Die entsprechenden CGE-Elektropherogramme sind im Anhang 5.8.6 in Abbildung 5.18 dargestellt.

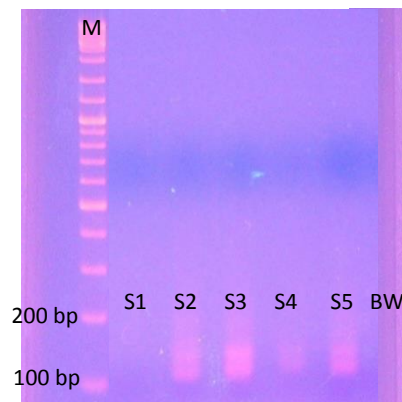


Abbildung 4.14: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Schokoladenproben mittels AGE.

Sowohl auf den Agarosegelen als auch in den CGE-Elektropherogrammen konnten Banden/Peaks detektiert werden. Mit der angewendeten Methode ist es demnach möglich, cpDNA aus Schokolade zu extrahieren. Eine Ausnahme bildete hierbei die Probe S1, die auf dem Gel keinerlei Banden zeigte. Bei allen anderen Proben wurden Schlierbanden beobachtet. Daher konnte nicht mit absoluter

Sicherheit festgestellt werden, ob sich eine Bande auf Höhe des für Arriba typischen Amplifikats befindet und demnach Arriba-Kakao in den Edelkakaoprodukten enthalten ist. Für die Proben S2, S3 und S5 kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgesagt werden, dass sich eine Bande auf Höhe des für CCN-51 charakteristischen Amplifikats bei etwa 151 bp befand. Möglicherweise ist der Konsumkakao CCN-51 in den betreffenden edlen Schokoladen enthalten. Hierbei ist allerdings nicht gänzlich auszuschließen, dass auch eine völlig andere Kakaosorte, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, eine vierzehnfache Wiederholung des (TAAAG)_n-Repeats zeigen könnte. Existiert solch eine Sorte und sie wurde in den untersuchten Schokoladenproben eingesetzt, würde sie dasselbe Muster wie die Sorte CCN-51 zeigen.

Über die CGE konnten aufgrund der höheren Empfindlichkeit exaktere Angaben getroffen werden. Die Vermutungen (siehe oben) bestätigten sich: Die PCR blieb bei der Probe S1 aus, im entsprechenden Elektropherogramm sind keinerlei Peaks zu erkennen. Das Elektropherogramm der Probe S4 zeigte zwei Peaks: bei 105 bp und 118 bp. Während der Peak bei 105 bp dem Störpeak zuzuordnen war, konnte der bei 118 bp nicht dem für Arriba spezifischen zugewiesen werden. Dieser Peak könnte ggf. von einer anderen Edelkakaosorte stammen. Der Hersteller dieser Sorte betont lediglich den Einsatz von Edelkakao und nicht explizit den von Arriba-Kakao. Da kein Peak bei 151 bp zu erkennen ist, kann die Verarbeitung von CCN-51 bei diesem Produkt ausgeschlossen werden.

Die Proben S2, S3 und S5 ließen ein breiteres Peakspektrum erkennen, das mit den Schlierbanden auf den Agarosegelen einherging. Daher ist hier der Einsatz von vielen verschiedenen Kakaosorten denkbar. Generell konnten alle relevanten Peaks in den drei Proben detektiert werden: S2: 106 bp, 114 bp, 153 bp; S3: 106 bp, 114 bp, 152 bp; S5: 104 bp, 113 bp, 151 bp. Neben dem Edelkakao enthielten die drei Proben demnach CCN-51. Das deutet darauf hin, dass der in den Schokoladen verarbeitete Arriba-Kakao mit der Sorte CCN-51 gestreckt war. Die Deklaration der Produkte schließt jedoch einen Einsatz von Konsumkakao nicht gänzlich aus. Bei der Verarbeitung von Konsumkakao werden allerdings vor allem afrikanische Sorten verarbeitet, wobei die Sorte CCN-51 als Konsumkakao weniger relevant ist (siehe 2.1.3). Die Sorte CCN-51 wurde demnach nicht gezielt eingesetzt.

4.5.5 Zusammenfassung und Fazit

Die 5 bp lange Sequenz (TAAAG)_n in der IRR des cpGenoms wird in CCN-51 (n = 14) und Arriba (n = 6) unterschiedlich oft wiederholt, was anhand einer Vielzahl von Proben durch partielle Sequenzierungen überprüft wurde: Bei 13 von 14 Blattproben wurde das erwartete Ergebnis erzielt. Demzufolge bildet diese Region eine optimale Grundlage, um die zwei Kakaosorten CCN-51 und Arriba qualitativ voneinander zu unterscheiden. Aus einer Universal-PCR, bei der das Primer-Paar das (TAAAG)_n-Repeat flankiert, ergeben sich Amplifikate mit einem Größenunterschied von 40 bp: Arriba: 111 bp und CCN-51: 151 bp. Es folgt eine Detektion der PCR-Produkte und somit der jeweiligen Sorte mittels AGE, dHPLC und CGE.

Der Sequenzunterschied ist für eine Quantifizierung eines CCN-51-Anteils in einer Mischung beider Kakaosorten nicht geeignet. Während der PCR bildet sich ein Artefakt bei etwa 105 bp. Dies erfolgt bei der Sorte CCN-51 in größerem Maße als bei der Sorte Arriba, jedoch ohne Regelmäßigkeit und in unterschiedlicher Menge. Eine Bestimmung von CCN-51-Anteilen in Mischungen ist dadurch nicht möglich.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde die These aufgestellt, es gäbe verschiedene CCN-51-Typen (siehe 4.5.1.1). Das steht im Gegensatz zu der Aussage, CCN-51 wäre ein reiner Klon. Die These resultierte aus den Ergebnissen des Probenmaterials, dessen Herkunft eindeutig ist. Hierzu zählen neben sämtlichen Blattproben die zwei Bohnenproben C15 und C16. Aus dieser These ergaben sich folgende Typen des CCN-51:

- Typ I: Für die Bohnenprobe C15 beträgt wie für nahezu alle anderen CCN-51-Proben für das (TAAAG)_n-Repeat n = 14. Nach der PCR entsteht das für CCN-51 charakteristische Amplifikat von 151 bp.
- Typ II: Die Probe C16 gilt als eine der zwei Ausnahmen. Da hier n = 6 gilt, wird nach der PCR das für Arriba spezifische Amplifikat von 111 bp nachgewiesen.
- Typ III: Die zweite Ausnahme: Die Probe C4, Bl. zeigt weder das für Arriba noch das CCN-51-typische Amplifikat. Mittels partieller Sequenzierung wurde gezeigt, dass n = 12 gilt.

Die Verteilung der Sorte CCN-51 auf die drei Typen ist nicht gleichmäßig. Der Schwerpunkt liegt auf dem CCN-51-Typ I. Bis auf die zwei Ausnahmen C4, Bl. und C16 zählen alle anderen Proben zum Typ I. Die Wiederholung n = 14 gilt demnach als CCN-51-typisch. In 4.9 werden die drei vermuteten CCN-51-Typen mithilfe der Mikrosatellitenanalyse überprüft.

4.6 DNA-basierte Methoden aufgrund der SNPs im cpGenom von Arriba und CCN-51

In Abbildung 4.15 ist ein Auszug aus dem Alignment der zehn sequenzierten cpGenome von Arriba (A4, Bl.; A6, Bl.; A7, Bl.), CCN-51 (C1, Bl.; C2, Bl.; C4, Bl.; C5, Bl.) sowie der Eltern von CCN-51 (E1, Bl.; E3, Bl.; E5, Bl.) mit bereits publizierten cpGenomen dargestellt. Die Sequenzierung erfolgte mittels *low coverage whole genome shotgun sequencing* (siehe 2.3.7 und 4.4.2).

	(861)	861	870	880	890	900	910	920	930	946	Section 11
HQ244500	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
ICS-95	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
Canelo	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
IMC-57	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
CCN51-C1	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
CCN51-C2	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
CCN51-BG1	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
CCN51-RD	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
EET-544	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
EET103	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
EET95	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228384	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228379	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228380	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228381	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228382	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228383	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228385	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228386	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228387	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228388	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
JQ228389	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								
HQ336404	(860)	AGCAGCTACGATATTATAAGTTTCTTCCTCTTGACCGAATCTGTAACCTTCATTAGC	AGATTCATTTTCTGTGGTTTCCCTGATCA								

Abbildung 4.15: Ausschnitt des Alignments der sequenzierten cpGenome (A4, Bl. (EET-95); A6, Bl. (EET-103); A7, Bl. (EET-544); C1, Bl. (Crespo's Farm); C2, Bl. (Crespo's Farm); C4, Bl. (ICGD/ CCN51-RD), C5, Bl. (Botanischer Garten); E1, Bl. (ICS-95); E3, Bl. (Canelo I); E5, Bl. (IMC-67)) mit zwölf bereits publizierten, Referenzgenom: HQ244500.

Die Abbildung ist für das gesamte Alignment beispielhaft: Die Sequenzen sind weitestgehend identisch und die Zahl der Unterschiede zwischen den cpGenomen ist gering. Zwischen den 23 Genomen konnten keine Sequenzunterschiede identifiziert werden, die sich über mehrere benachbarte Basenpaare erstrecken. Stattdessen wurden etwa 30 bis 50 SNPs identifiziert. Bei einer Größe des cpGenoms von etwa 160 000 bp bedeutet das einen prozentualen Unterschied von ca. 0,03 %. Methoden, die basierend auf diesen SNPs entwickelt worden sind, werden unter 4.6.1 erläutert.

Auf Basis der SNPs wurde ein phylogenetischer Stammbaum entwickelt (siehe Abbildung 4.16).



Abbildung 4.16: Phylogenetischer Stammbaum: A4, Bl. (EET-95); A6, Bl. (EET-103); A7, Bl. (EET-544); C1, Bl. (Crespo's Farm); C2, Bl. (Crespo's Farm); C4, Bl. (ICGD/ CCN-51-RD), C5, Bl. (Botanischer Garten); E1, Bl. (ICS-95); E3, Bl. (Canelo I); E5, Bl. (IMC-67); bereits publizierte cpGenome.

Die ICGD-Probe C4, Bl. weicht von den restlichen CCN-51-Proben ab. Bereits unter 4.5.1.1 und 4.5.5 wurde die These formuliert, bei C4, Bl. handle es sich um einen anderen Typ CCN-51. Dieser Verdacht wird durch den Befund aus dem phylogenetischen Stammbaum gestützt. Die möglichen verschiedenen Typen des CCN-51 werden unter 4.9 näher erläutert.

4.6.1 Entwicklung der PCR-RFLP zur Differenzierung von Arriba und CCN-51

18 von den 30 bis 50 SNPs sind solche, die zur An- oder Abwesenheit einer Restriktionsschnittstelle führen. Der SNP ist in diesem Fall in der Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease enthalten. Die Erkennungssequenz befindet sich dabei in den sequenzierten CCN-51-Proben, da diese Sorte detektiert werden soll. Die 18 Schnittstellen sind in der folgenden Tabelle 4.8 aufgelistet. Ihr Name entspricht der Nummer in der chronologischen Folge der SNPs im Alignment aller cpGenome, basierend auf dem Referenzgenom (HQ244500).

Tabelle 4.8: Auflistung der 18 möglichen Restriktionsschnittstellen.

Name der Schnittstelle	Position im Alignment	Enzyme
1	3490	<i>FspEI, MspJI, TfiI, HinfI</i>
4	5250	<i>MspJI</i>
6	6917	<i>FspEI, HpyAV</i>
7	8110	<i>FspEI</i>
8	8134	<i>PsiI, MspJI</i>
9	8600	<i>LpnPI, PspGI</i>
11	14195	<i>MspJI</i>
13	18322	<i>DpnII, MspJI, PsiI</i>
14	21178	<i>MspJI</i>
16	31504	<i>MseI</i>
17	33075	<i>PsiI</i>
18	35966	<i>CviQI, RsaI, MssJI</i>
21	43631	<i>AseI</i>
27	61357	<i>PsiI</i>
29	66138	<i>BsaBI, TfiI, HinfI</i>
38	120643	<i>ApoI, MlnCI</i>
44	130953	<i>EcoRV</i>
45	131164	<i>TfiI, HinfI, TaqI</i>

Von den 18 SNPs wurden geeignete Restriktionsschnittstellen nach den folgenden Kriterien ausgewählt:

- Alle sequenzierten CCN-51-Proben haben am entsprechenden SNP dieselbe Base, auch die Arriba-Proben sollten einheitlich sein.
- *Theobroma cacao* weist in seiner Sequenz einen ungewöhnlich hohen Gehalt an Adenin und Thymin auf. Die Sequenzen eines optimalen Primer-Paars haben ein ausgewogenes Verhältnis der vier DNA-Basen. Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, dass der Gehalt an Guanin und Cytosin im entsprechenden Hybridisierungsbereich höher als im Rest ist.
- Die Länge der Erkennungssequenz des Enzyms ist mit etwa 5 bis 6 bp möglichst lang, um einen hohen Grad an Spezifität zu erreichen. Diese Sequenz soll im PCR-Produkt nicht ein weiteres Mal erscheinen, um die Bildung weiterer Fragmente zu vermeiden.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien blieb eine geringere Zahl von optimalen SNPs zur Methodenentwicklung übrig. Zusätzlich wurden zwei weitere SNPs gewählt (17b, 43), die dem Nachweis der Sorte Arriba dienen. Die Erkennungssequenz um den SNP war in diesem Fall in der dem Arriba und nicht dem CCN-51-zugehörigen Sequenz enthalten.

Fünf SNPs bildeten die Grundlage weiterer Arbeiten (siehe Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9: Auflistung der fünf relevanten Punktmutationen.

Name der Schnittstelle	Position im Alignment	Enzym	Spezifität
8	8134	<i>PsiI</i>	CCN-51
17a	33075	<i>PsiI</i>	CCN-51
17b	33075	<i>EcoRI</i>	Arriba
21	43631	<i>AseI</i>	CCN-51
43	130863	<i>EcoRI</i>	Arriba
44	130953	<i>EcoRV</i>	CCN-51

Die Restriktionsschnittstelle 17 (17a, 17b) ist eine Besonderheit: Der SNP führt aufgrund der ihn umgebenden Basen zu einer Anwesenheit der Erkennungssequenz sowohl der Restriktionsendonuklease *PsiI* (TTATAA) in CCN-51 als auch der von *EcoRI* (GAATTC) in Arriba. Aus demselben Amplifikat ergibt sich je nach Einsatz der jeweiligen Restriktionsendonuklease zum einen eine CCN-51-Spezifität (*PsiI*) und zum anderen eine Arriba-Spezifität (*EcoRI*).

Die Anwendung wird im Folgenden dargestellt:

- Durchführung einer Universal-PCR für Arriba und CCN-51, bei der die Primer den SNP/die Restriktionsschnittstelle weiträumig flankieren.
- Durchführung der Restriktion mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease: Das Amplifikat der Kakaosorte, welche die Erkennungssequenz enthält, wird geschnitten. Die Restriktionsschnittstelle ist für diese Sorte spezifisch (siehe Tabelle 4.9). Das PCR-Produkt der anderen Sorte wird aufgrund des SNPs nicht verdaut.
- Detektion des Verdaus mittels AGE oder CGE: Die Sorte, welche die Erkennungssequenz enthält, zeigt aufgrund der erfolgreichen Restriktion zwei Fragmente (Banden, AGE/ Peaks, CGE). Für die andere Sorte wird aufgrund des ausbleibenden Verdaus nur das ursprüngliche PCR-Amplifikat detektiert (siehe Spezifität, Tabelle 4.9).

4.6.2 Durchführung der PCR-RFLP anhand der fünf SNPs

Die Durchführung der PCR-RFLP erfolgte anhand der in 3.6 beschriebenen Parameter. Für die PCR wurden die im Anhang 5.4, Tabelle 5.15 aufgeführten Primer und für die RFLP die im Anhang 5.2, Tabelle 5.5 gelisteten Restriktionsendonukleasen eingesetzt.

In den Abbildungen 4.17 bis 4.21 sind die fünf SNPs mit den entsprechend konstruierten Primern für jede Restriktionsschnittstelle dargestellt.

Restriktionsschnittstelle 8, *PsiI*, Erkennungssequenz: TTATAA

```
CCN-51  CACCGAAGAACCCTATTAGAGTCCGCCACAATATATAATTGTTGGTATGAAAGAATTTTTTTGTAAATGAAAGA
Arriba  CACCGAAGAACCCTATTAGAGTCCGCCACAATATATAATTGTTGGTATGAAAGAATTTTTTTGTAAATGAAAGA
*****

CCN-51  CTCAACTCTTATTACAAGTGAATTTCTGAAAATTCCTTTTCGATTTCTAGAATTTCTAGAAATCGCTTTATTTCTT
Arriba  CTCAACTCTTATTACAAGTGAATTTCTGAAAATTCCTTTTCGATTTCTAGAATTTCTAGAAATCGCTTTATTTCTT
*****

CCN-51  GGTGTCAAAATAGGATTATGTGGTATAAAAACGGAGAATCTATTCTCTCTCTTTTCCAAAAAATGATCTTGGAG
Arriba  GGTGTCAAAATAGGATTATGTGGTATAAAAACGGAGAATCTATTCTCTCTCTTTTCCAAAAAATGATCTTGGAG
*****

CCN-51  ATTGTGTAATGCTTACTCTTAAACTCTTTGTTTACACCGTAGTGATATTCTTTGTTTCTCTCTTCATCTTCGGAT
Arriba  ATTGTGTAATGCTTACTCTTAAACTCTTTGTTTACACCGTAGTGATATTCTTTGTTTCTCTCTTCATCTTCGGAT
*****

CCN-51  TCCTATCTAATGATCCGGGACGTAATCCTGGACGCGAAGAATAAAAAAGGAGAGTTCCTTGCTTCATTTTATAA
Arriba  TCCTATCTAATGATCCGGGACGTAATCCTGGACGCGAAGAATAAAAAAGGAGAGTTCCTTGCTTCATTTTATAGA
*****

CCN-51  AATGGTATTAGGATTTGATCTATTCCACTGTCAAAAACCGAAACGGAAAGAGAGGGATTCTGAACCCCTCGGTACGA
Arriba  AATGGTATTAGGATTTGATCTATTCCACTGTCAAAAACCGAAACGGAAAGAGAGGGATTCTGAACCCCTCGGTACGA
*****

CCN-51  ATAAATCGCACACGGATTA GCAATCCGACGCTTTAGTCCACTC
Arriba  ATAAATCGCACACGGATTA GCAATCCGACGCTTTAGTCCACTC
*****
```

Abbildung 4.17: Übersicht über den SNP (CCN-51: T, Arriba: G) in der Restriktionsschnittstelle 8. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *PsiI* grün und die Primer gelb.

Restriktionsschnittstelle 17a/b, *PsiI*/ *EcoRI*, Erkennungssequenz: TTATAA/ GAATTC

```
CCN-51  CGGTGGACAAAGCAAATCTCTTCATCACATGCTTCGATAAAATATCTTGGATCTATGTCGAATTGCTAAGGTACA
Arriba  CGGTGGACAAAGCAAATCTCTTCATCACATGCTTCGATAAAATATCTTGGATCTATGTCGAATTGCTAAGGTACA
*****

CCN-51  TGTATCAATCAAATCAAATAAATGAATTTTCATTCTGTTCTGATAAGACAATTATGATCGGTCTTGAAACAATTCA
Arriba  TGTATCAATCAAATCAAATAAATGAATTTTCATTCTGTTCTGATAAGACAATTATGATCGGTCTTGAAACAATTCA
*****

CCN-51  TTGCATTGATATTTATCAAATCCAATATCAATAAACCCATTTTACTCTCTACGCGTTAAGTAAATTAATTCTC
Arriba  TTGCATTGATATTTATCAAATCCAATATCAATAAACCCATTTTACTCTCTACGCGTTAAGTAAATTAATTCTC
*****

CCN-51  ATTCCTGAATGAGCTACTAGCCACTATGAGTCTACTGCATATACTTATATATATATAAATAGATCTTATCCGTCT
Arriba  ATTCCTGAATGAGCTACTAGCCACTATGAGTCTACTGCATATACTTATATATATATAAATAGATCTTATCCGTCT
*****

CCN-51  ACTGATTCATTCAGTAATTGAATCGAACGGCCCTTTTAACTCAGTGGTAGAGTAACGCCATGGTAAGCGCTAAGT
Arriba  ACTGATTCATTCAGTAATTGAATCGAACGGCCCTTTTAACTCAGTGGTAGAGTAACGCCATGGTAAGCGCTAAGT
*****

CCN-51  CATCGGTTCAAATCCG
Arriba  CATCGGTTCAAATCCG
*****
```

Abbildung 4.18: Übersicht über den SNP (CCN-51: T, Arriba: G) in der Restriktionsschnittstelle 17a/b. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *PsiI*/ *EcoRI* grün und die Primer gelb.

Restriktionsschnittstelle 21, *AseI*, Erkennungssequenz: ATTAA

```
CCN-51  CTCCCTCGGCAAAACTGGGATAAAGTTGAGCCAAAAGATCACGATTCAAGATAAATTCATGGGGAAGTGGGATCT
Arriba  CTCCCTCGGCAAAACTGGGATAAAGTTGAGCCAAAAGATCACGATTCAAGATAAATTCATGGGGAAGTGGGATCT
*****

CCN-51  CTTTAGGGTCTACTCCAGCATTTAGAAATTGGTTAATCGGTAAAGATACATGTACTTGATGCCCGGCCAAGAAA
Arriba  CTTTAGGGTCTACTCCAGCATTTAGAAATTGGTTAATCGGTAAAGATACATGTACTTGATGCCCGGCCAAGAAA
*****

CCN-51  GGGACCCAAGCCCTAGTAGCCCTGCTAAATGGTGATTCAACATAGATTCTACATCTTGAACCAAGCCAATTTTG
Arriba  GGGACCCAAGCCCTAGTAGCCCTGCTAAATGGTGATTCAACATAGATTCTACATCTTGAACCAAGCCAATTTTG
*****

CCN-51  GGGCCGCTTTGTGATAATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAAAGCCGCAAGACCAATGCACCAATTGCGGTAC
Arriba  GGGCCGCTTTGTGATAATGGAACCAACCGGCAAAAAGCATTAAAGCCGCAAGACCAATGCACCAATTGCGGTAC
*****

CCN-51  AATAGAGTTGTAATTCAGTATTTCCAGATGCTCGCCAAATCTGAAAAAACCAGAGGTTATTTGTATTCCTC
Arriba  AATAGAGTTGTAATTCAGTATTTCCAGATGCTCGCCAAATCTGAAAAAACCAGAGGTTATTTGTATTCCTC
*****

CCN-51  GGAAACCCCGCCACATCACCATTCAAGATTTCTTGGCCTACTATTGGCCAAACCACCTG
Arriba  GGAAACCCCGCCACATCACCATTCAAGATTTCTTGGCCTACTATTGGCCAAACCACCTG
*****
```

Abbildung 4.19: Übersicht über den SNP (CCN-51: T, Arriba: G) in der Restriktionsschnittstelle 21. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *AseI* grün und die Primer gelb.

Restriktionsschnittstelle 43, *EcoRI*, Erkennungssequenz: GAATTC

```
CCN-51  GAACCAAAGTTCAGATTCGATATAGGACGACTTAGTATTTCTTCATTCATTCCCATCCAATCAAAAGGACTTCT
Arriba  GAACCAAAGTTCAGATTCGATATAGGACGACTTAGTATTTCTTCATTCATTCCCATCCAATCAAAAGGACTTCT
*****

CCN-51  TTTTTTATTGGATGGGTGCTTTCTTGATCTTGATAAATTGTGAAATAAAAAAGGCCCTCTTGTTAATTTTATC
Arriba  TTTTTTATTGGATGGGTGCTTTCTTGATCTTGATAAATTGTGAAATAAAAAAGGCCCTCTTGTTAATTTTATC
*****

CCN-51  AATTATTTGATAATTATTAACCACAGTCTTAATATTTTTATTACTCTTGGTACTGGTACTGACCCAGGACTCAAT
Arriba  AATTATTTGATAATTATTAACCACAGTCTTAATATTTTTATTACTCTTGGTACTGGTACTGACCCAGGACTCAAT
*****

CCN-51  CTCGGCCTTATTTCTAAGACAAAAGTTAAATTCTCCAATCAAAATATTTTCTATGCGAAAATTTCCCATAGC
Arriba  CTCGGCCTTATTTCTAAGACAAAAGTTAAATTCTCCAATCAAAATATTTTCTATGCGAAAATTTCCCATAGC
*****

CCN-51  ATCCATAATATCATCTTCTCCTAGATAATTATGGATAGGGATATCCCCAGCGTATCAAAAAATTTTCGTTTATC
Arriba  ATCCATAATATCATCTTCTCCTAGATAATTATGGATAGGGATATCCCCAGCGTATCAAAAAATTTTCGTTTATC
*****

CCN-51  CATGTTGTAATTATAAGAAATCTCTTCTTTCTTATTTAATTGGAATGGTGATCCATAAGTATATG
Arriba  CATGTTGTAATTATAAGAAATCTCTTCTTTCTTATTTAATTGGAATGGTGATCCATAAGTATATG
*****
```

Abbildung 4.20: Übersicht über den SNP (CCN-51: T, Arriba: G) in der Restriktionsschnittstelle 21. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRI* grün und die Primer gelb.

Restriktionsschnittstelle 44, *EcoRV*, Erkennungssequenz: GATATC

```
CCN-51  CTCAATCTCGGCCTTATTTCTAAGACAAAAGTTAATAATTCTCCAATCAAAATATTTTCTATGCGAAAATTTCCC
Arriba  CTCAATCTCGGCCTTATTTCTAAGACAAAAGTTAATAATTCTCCAATCAAAATATTTTCTATGCGAAAATTTCCC
*****

CCN-51  CATAGCATCCATAATATCATCTTCTCCTAGATAATTATGGATAGGGATATGATATCCCCAGCGTATCAAAAAATTTTCG
Arriba  CATAGCATCCATAATATCATCTTCTCCTAGATAATTATGGATAGGGATATACCCAGCGTATCAAAAAATTTTCG
*****

CCN-51  TTTATCCATGTTGTAATTATAAGAAATCTCTTCTTTCTTATTTACTTGAATGGTGATCCATAAGTATATGAGTC
Arriba  TTTATCCATGTTGTAATTATAAGAAATCTCTTCTTTCTTATTTACTTGAATGGTGATCCATAAGTATATGAGTC
*****

CCN-51  CCTCTTATCTTGATAATTAATAGATTTATATGATAAAAAATCATATCCATAGTCTTTTTTAAAATTATATTTTTT
Arriba  CCTCTTATCTTGATAATTAATAGATTTATATGATAAAAAATCATATCCATAGTCTTTTTTAAAATTATATTTTTT
*****

CCN-51  ATATTTTTTTTTCTTGATTAAGTTTATATCTTGATTCGATAATGAATTCGCTTGAAATCATTTTTTTTTTTCGTT
Arriba  ATATTTTTTTTTCTTGATTAAGTTTATATCTTGATTCGATAATGAATTCGCTTGAAATCATTTTTTTTTTTCGTT
*****

CCN-51  TTCGTAATGAATTAATCTTTCTTTTTCATATGAATCCATTTTGTTAAATCTTTATTTTGAAGCCATATAGTGTG
Arriba  TTCGTAATGAATTAATCTTTCTTTTTCATATGAATCCATTTTGTTAAATCTTTATTTTGAAGCCATATAGTGTG
*****

CCN-51  ATTGACTCTATTTTCG
Arriba  ATTGACTCTATTTTCG
*****
```

Abbildung 4.21: Übersicht über den SNP (CCN-51: C, Arriba: A) in der Restriktionsschnittstelle 44. Der SNP ist rot markiert, die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRV* grün und die Primer gelb.

Aus den schematisch dargestellten Primern ergaben sich für die PCR folgende Amplifikate sowie Fragmente für die RFLP:

Tabelle 4.10: Auflistung der erhaltenen Amplifikat- sowie Fragmentlängen.

Restriktionsschnittstelle	PCR	RFLP	
	Amplifikat	Fragment 1	Fragment 2
8	494 bp	373 bp	121 bp
17a/ 17b	391 bp	217/ 218 bp	174/ 173 bp
21	436 bp	265 bp	171 bp
43	440 bp	255 bp	185 bp
44	465 bp	123 bp	342 bp

Die Experimente mit DNA-Isolaten aus Kakaoblättern führten zu besseren Ergebnissen als mit denen aus Kakaobohnen (Ausnahmen waren die Proben C15 und C16, die aus einer frischen Kakaofrucht isoliert wurden). Die Gründe für diesen Befund sind folgende:

- der höhere cpDNA-Gehalt in den Blättern im Gegensatz zu den Bohnen
- der Verarbeitungsgrad der Bohnen durch z. B. Röstung und Fermentation
- ein höherer Gehalt an PCR-inhibierenden Substanzen in den Bohnen als in den Blättern

Für die PCR wurde für das Bohnenmaterial eine Methodenoptimierung durchgeführt. Die Proben C2, C3, A10 sowie A11 wurden für die PCR bzgl. der Restriktionsschnittstellen 21 und 43 eingesetzt. Folgende Parameter wurden variiert:

- die Zyklenzahl während des Annealings
- die Konzentration an eingesetzter Template-Menge
- der Einsatz der Phusion-Polymerase anstelle der *Taq*-Polymerase
- die Zugabe von BSA sowie Formamid zum Reaktionsgemisch

Durch die Verwendung von BSA-Lösung konnte die PCR für die Kakaobohnen optimiert werden (siehe 3.6). So wurden die erwarteten Fragmente (Detektion AGE/ CGE) erhalten. Im Anhang 5.9.1 ist in Abbildung 5.19 dargestellt, welchen Einfluss dieser Parameter auf die PCR hatte.

Die Zielsetzung bzgl. der Entwicklung der RFLP-Bedingungen war der geringstmögliche Zeit- sowie Materialaufwand. Die kürzeste Dauer für den Restriktionsverdau sowie die geringstmöglichen Enzymmengen wurden ermittelt (siehe 3.6, Tabelle 3.5).

Mittels sechs PCR-RFLP-Methoden war es möglich, die beiden Kakaosorten Arriba und CCN-51 anhand von fünf SNPs qualitativ voneinander zu unterscheiden. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen 4.11 und 4.12 aufgeführt.

Tabelle 4.11: Zusammenfassung der Ergebnisse, PCR-RFLP, Kakaoblätter.

Stelle	8	17	21	43	44
Enzym	<i>PsiI</i>	<i>PsiI</i> <i>EcoRI</i>	<i>AseI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>
Erkennungssequenz	TTATAA	TTATAA GAATTC	ATTAAT	GAATTC	GATATC
Spezifität	CCN-51	CCN-51 Arriba	CCN-51	Arriba	CCN-51
C1, Bl.	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
C2, Bl.	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
C3, Bl.	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
C4, Bl.	C-typisch	A-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
C5, Bl.	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
C6, Bl.	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
C7, Bl.	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
C8, Bl.	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch
A1, Bl.	C-typisch	<i>PsiI</i> → negativ <i>EcoRI</i> → negativ	C-typisch	C-typisch	C-typisch
A2, Bl.	C-typisch	<i>PsiI</i> → negativ <i>EcoRI</i> → negativ	C-typisch	C-typisch	C-typisch
A3, Bl.	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch
A4, Bl.	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch
A5, Bl.	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch
A6, Bl.	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch
A7, Bl.	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch
A8, Bl.	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch	A-typisch
E1, Bl.	C-typisch	A-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
E2, Bl.	C-typisch	A-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
E3, Bl.	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
E4, Bl.	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
E5, Bl.	C-typisch	A-typisch	C-typisch	C-typisch	C-typisch
Cr1, Bl.	C-typisch	<i>PsiI</i> → neg. <i>EcoRI</i> → neg.	C-typisch	C-typisch	C-typisch
Cr2, Bl.	C-typisch	<i>PsiI</i> → neg. <i>EcoRI</i> → neg.	C-typisch	C-typisch	C-typisch

Tabelle 4.12: Zusammenfassung der Ergebnisse, PCR-RFLP, Kakaobohnen*.

Stelle	8	17		21	43	44
Enzym	<i>PsiI</i>	<i>PsiI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>AseI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>
Erkennungssequenz	TTATAA	TTATAA	GAATTC	ATTAAT	GAATTC	GATATC
Spezifität	CCN-51	CCN-51	Arriba	CCN-51	Arriba	CCN-51
C1	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
C2	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
C3	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
C4	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
C5	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
C6	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
C7	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
C8	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
C15	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
C16	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A1	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A2	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	
A4	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A5	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A6	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
A7	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
A8	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A9				A-typisch	A-typisch	
A10	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A11	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A12	C-typisch	C-typisch		C-typisch	C-typisch	C-typisch
A13	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A14	/	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A33	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A35	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch

* alle weiteren Bohnenproben wurden nur stichprobenartig und nur für einige Restriktionsschnittstellen eingesetzt, siehe Anhang 5.9.2, Tabelle 5.27

Die folgenden Abbildungen 4.22 bis 4.29 zeigen die Ergebnisse, die mittels AGE erzielt wurden, beispielhaft an den Proben C3, Bl. und A3, Bl. Für die Restriktionsschnittstelle 21, *PsiI*, TTATAA ist das CGE-Elektropherogramm für beide Kakaosorten, Arriba und CCN-51, dargestellt. Im Anhang 5.9.3 sind zwei CGE-Elektropherogramme der Kakaobohnenproben C8 und A4 für die Restriktionsschnittstelle 21, *PsiI*, TTATAA gezeigt.

Restriktionsschnittstelle 8, *PsiI*, TTATAA

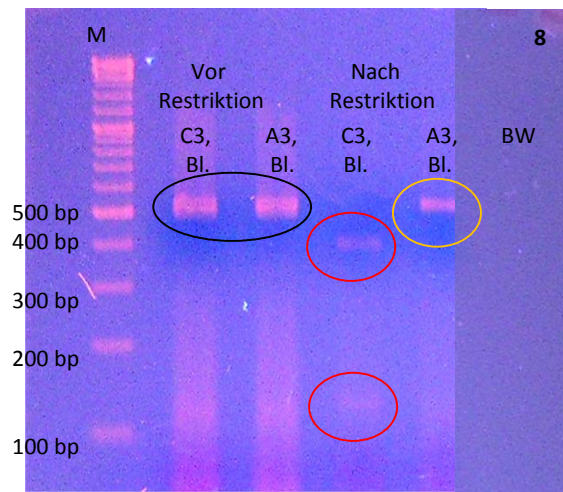


Abbildung 4.22: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 8, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *PsiI*. Das 494 bp große Amplifikat von CCN-51 (schwarz) wird verdaut (373 bp, 121 bp; rot) und das des Arribas (gelb) nicht.

Restriktionsschnittstelle 17a, *PsiI*, TTATAA

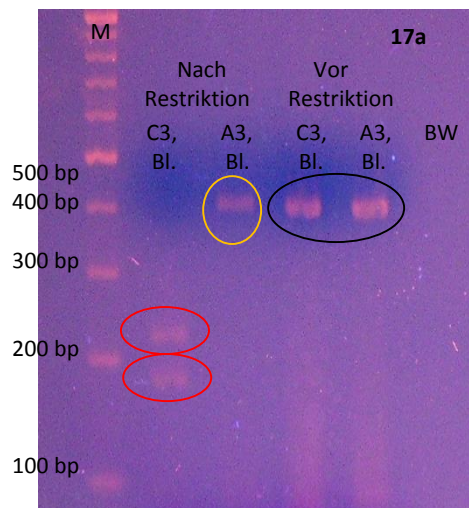


Abbildung 4.23: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 17a, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *PsiI*. Das 390 bp große Amplifikat von CCN-51 (schwarz) wird verdaut (217 bp, 174 bp; rot) und das des Arribas (gelb) nicht.

Restriktionsschnittstelle 17b, *EcoRI*, GAATTC

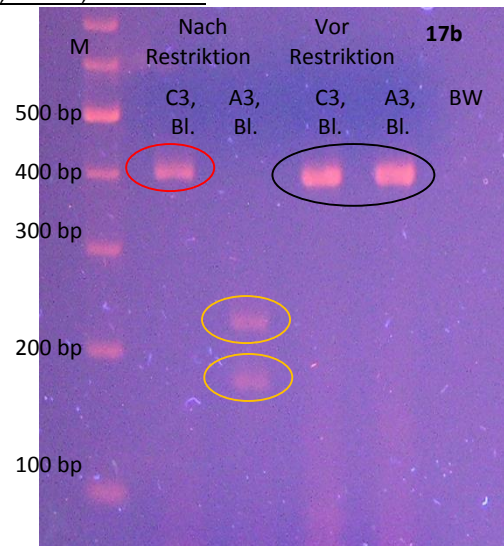


Abbildung 4.24: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 17b, Arriba-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *EcoRI*. Das 390 bp große Amplifikat von Arriba (schwarz) wird verdaut (218 bp, 173 bp; gelb) und das des CCN-51 (rot) nicht.

Restriktionsschnittstelle 21, *AseI*, ATTAAAT

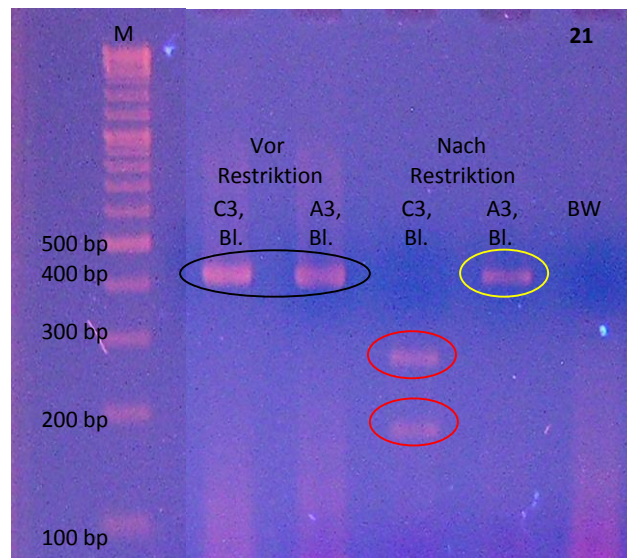


Abbildung 4.25: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 21, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *AseI*. Das 436 bp große Amplifikat von CCN-51 (schwarz) wird verdaut (265 bp, 171 bp; rot) und das des Arribas (gelb) nicht.

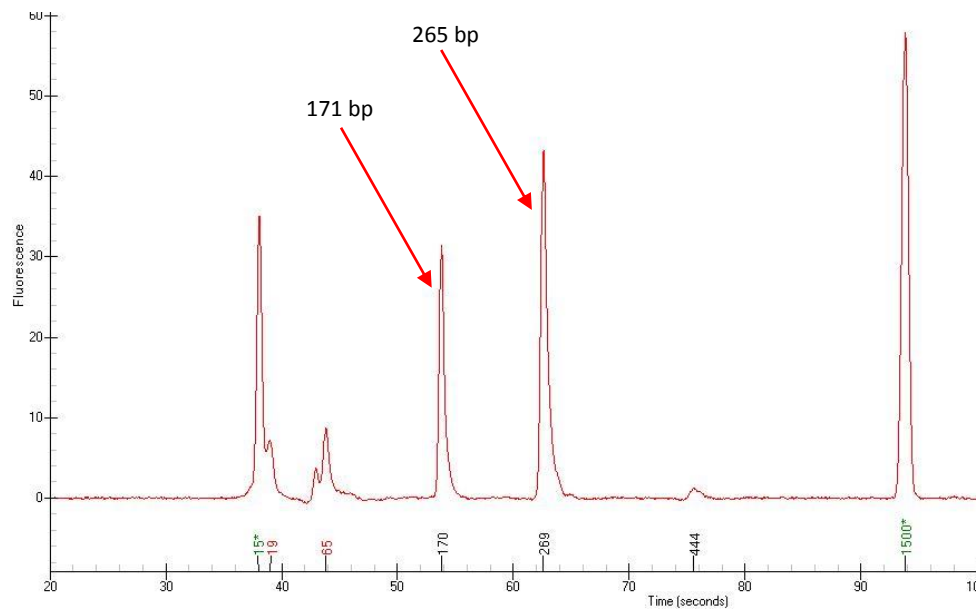


Abbildung 4.26: Ergebnisse der PCR-RFLP, Detektion mittels CGE, Probe C3, Bl., Restriktionsschnittstelle 21, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: AseI. Das 436 bp große Amplifikat von CCN-51 wird verdaut (265 bp, 171 bp; rote Pfeile).*

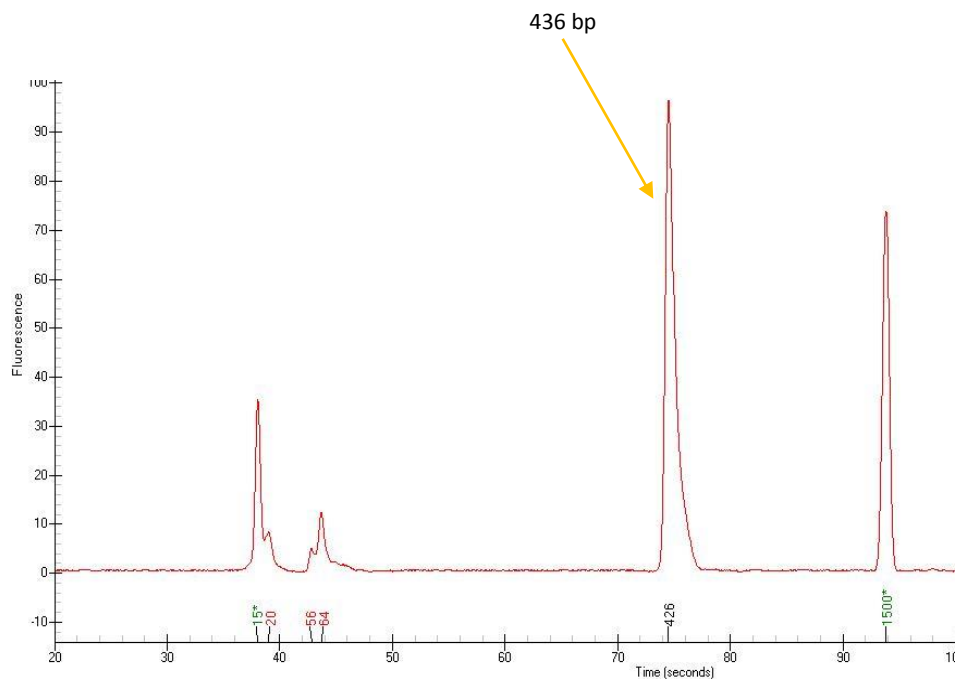


Abbildung 4.27: Ergebnisse der PCR-RFLP, Detektion mittels CGE, Probe A3, Bl., Restriktionsschnittstelle 21, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: AseI. Das 436 bp große Amplifikat von Arriba (gelber Pfeil) wird nicht verdaut.*

*Die Genauigkeit der CGE nimmt mit steigender bp-Länge des zu messenden Amplifikats ab.

Restriktionsschnittstelle 43, *EcoRI*, GAATTC

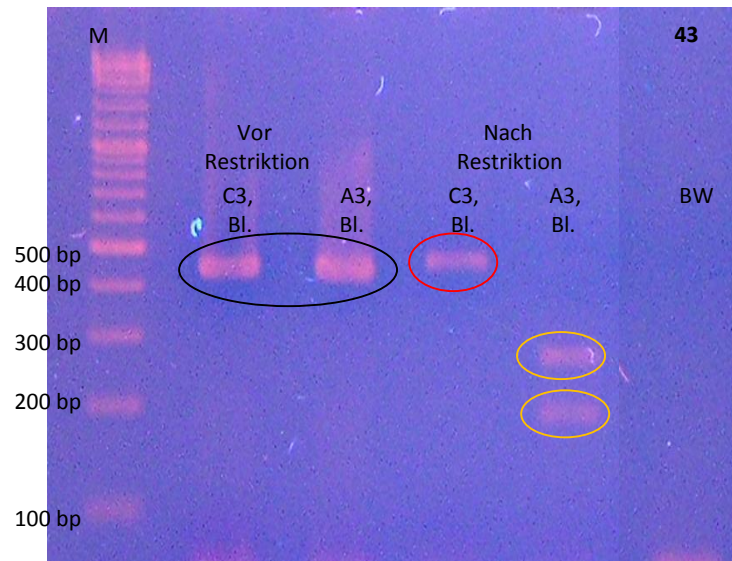


Abbildung 4.28: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 43, Arriba-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *EcoRI*. Das 440 bp große Amplifikat von Arriba (schwarz) wird verdaut (255 bp, 185 bp; gelb) und das des CCN-51 (rot) nicht.

Restriktionsschnittstelle 44, *EcoRV*, GATATC

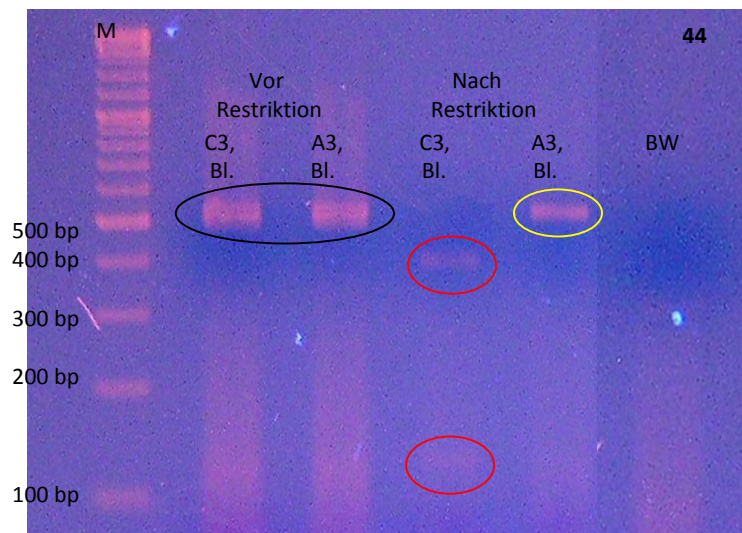


Abbildung 4.29: Ergebnisse der PCR-RFLP, Kakaoblätter, Restriktionsschnittstelle 44, CCN-51-spezifisch, Restriktionsendonuklease: *EcoRV*. Das 465 bp große Amplifikat von CCN-51 (schwarz) wird verdaut (342 bp, 123 bp; rot) und das des Arribas (gelb) nicht.

Die Tabellen 4.11 und 4.12 sowie die Abbildungen 4.22 bis 4.29 zeigen, dass die erwarteten Ergebnisse (siehe Tabelle 4.10) erzielt wurden. Die auf den fünf SNPs basierenden sechs PCR-RFLP-Methoden sind demnach geeignet, die beiden Kakaosorten Arriba und CCN-51 voneinander zu differenzieren.

Die Kakaoblattproben A1, Bl. und A2, Bl. zeigten Abweichungen vom erwarteten Ergebnis bei der Sequenzregion 17a/b, *PsiI/EcoRI*, TTATAA/GAATTC. Die Amplifikate wurden weder von der Restriktionsendonuklease *PsiI* (CCN-51-spezifisch) noch von *EcoRI* (für Arriba spezifisch) geschnitten. Dieses Phänomen wurde mittels partieller Sequenzierung untersucht (siehe Abbildung 4.30):

```

                                33075 33080
                                |   |
A1, Bl.  5'-...CTCTCTACGCGTTAAGTAAATTAGAATTATCATTCCCTGAATGAGCTACTAGCCA...-3'
A2, Bl.  5'-...CTCTCTACGCGTTAAGTAAATTAGAATTATCATTCCCTGAATGAGCTACTAGCCA...-3'
A4, Bl.  5'-...CTCTCTACGCGTTAAGTAAATTAGAATTATCATTCCCTGAATGAGCTACTAGCCA...-3'
C1, Bl.  5'-...CTCTCTACGCGTTAAGTAAATTAGAATTATCATTCCCTGAATGAGCTACTAGCCA...-3'

```

Abbildung 4.30: Ausschnitt aus den Sequenzen der Kakaoblattproben A1, Bl. und A2, Bl. im Vergleich zu C1, Bl. und A4, Bl. um die Positionen 33075 und 33080 herum (Restriktionsschnittstelle 17a/b). Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *PsiI*, TTATAA (CCN-51-spezifisch) und *EcoRI*, GAATTC (Arriba-spezifisch) sind gelb hervorgehoben, der SNP ist rot markiert.

Beide Proben besitzen an der Position 33075 die für Arriba typische Base Guanin. Fünf Basen weiter weisen die Proben die Base Adenin auf, während sämtliche anderen Proben an dieser Stelle über Cytosin verfügen. Die für Arriba typische Erkennungssequenz für das Enzym *EcoRI* GAATTC (siehe A4, Bl. in Abbildung 4.30) um die Positionen 33075 und 33080 ist somit nicht mehr vorhanden.

Die Restriktionsschnittstelle 17a/b, *PsiI/EcoRI*, TTATAA/GAATTC ist demnach dazu geeignet, CCN-51-Proben spezifisch zu schneiden und dadurch zu identifizieren. Ein Nachweis der Sorte Arriba durch eine Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* kann jedoch nicht für alle Arriba-Proben garantiert werden.

Eine weitere Abweichung vom typischen Schema zeigte die CCN-51-Kakaoblattprobe C8, Bl: Bei sämtlichen Durchführungen wurde das für Arriba typische Verhalten nachgewiesen. Im Gegensatz zu den anderen Blattproben stammt diese aus Costa Rica. Auch hier liegt der Verdacht nahe, dass es sich um einen anderen CCN-51-Typ handelt. Die Probe C4, Bl. wiederum zeigte lediglich bei der Sequenzregion 17a/b das für Arriba charakteristische Verhalten, bei allen anderen Stellen das CCN-51-typische.

Auch bei den Kakaobohnen waren Ausnahmen zu beobachten. Die CCN-51-Probe C16 zeigte das für Arriba spezifische Verhalten: Bei den CCN-51-spezifischen Stellen wurden die Amplifikate nicht verdaut

und die charakteristischen Fragmente ließen sich nicht detektieren. Bei den für Arriba spezifischen Restriktionsschnittstellen wurden die Amplifikate hingegen verdaut, sodass für diese Probe fälschlicherweise die Sorte Arriba detektiert wurde. Der Ursprung der Probe C16 ist eindeutig, da die Bohnen einer Frucht entnommen wurden. Hier entsteht wieder der Verdacht, dass es innerhalb der Sorte CCN-51 verschiedene Typen gibt (135). Auch bei der (TAAAG)_n-Analyse wurde festgestellt, dass die Probe die Arriba typische Repeatwiederholung n=6 besitzt (siehe 4.5.1). Die Ergebnisse der beiden Methoden entsprechen sich im Falle dieser Probe. Die SSR-Analyse klärt über verschiedene Typen der Sorte CCN-51 auf (siehe 4.9).

Für die Kakaobohnenproben A2, A6, A7 sowie A12 der Sorte Arriba wurden bei sämtlichen CCN-51-spezifischen Restriktionsschnittstellen zwei Fragmente detektiert. Ihre Amplifikate blieben bei den für Arriba spezifischen Sequenzregionen 17b, *EcoRI*, GAATTC und 43, *EcoRI*, GAATTC unverdaut. Mit fünf Einzelaufarbeitungen wurden diese Ausnahmen untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob es sich tatsächlich um Ausnahmen handelt. Bei jeder Durchführung zeigten die vier Proben das für CCN-51 charakteristische Verhalten. Daher lag der Verdacht nahe, dass es sich bei den Proben A2, A6, A7 sowie A12 um CCN-51-Proben handelt. Entsprechend sind diese Proben falsch deklariert worden. Diese Beobachtungen sind nicht analog zu den Ergebnissen bzgl. des (TAAAG)-Repeats (siehe 4.5.1.1), da die Methoden auf anderen Sequenzunterscheiden basieren. Lediglich Probe A2 kann über beide Methoden als Falschdeklaration bestimmt werden.

Die restlichen, in der Tabelle 4.12 nicht aufgeführten Bohnenproben wurden stichprobenartig mit den Restriktionsschnittstellen 8, *PsiI*, TTATAA, 21, *Asel*, ATTAAT und 43, *EcoRI*, GAATTC überprüft (siehe Anhang 5.9.2, Tabelle 5.27). Hier zeigten 15 von 23 Proben das jeweils andere Ergebnis. Dieser Befund ließ sich vor allem bei den Arriba-Proben beobachten. Der Verdacht, die Kakaobohnen wurden falsch deklariert oder miteinander vermischt, erhärtet sich dadurch. Die Relevanz der These der vorliegenden Forschungsarbeit, Arriba würde mit CCN-51 gestreckt werden, wird hier wieder deutlich (siehe 1 Einleitung).

Sämtliche Proben der Eltern des CCN-51 (ICS-95, Canelo, IMC-67) zeigten bei allen PCR-RFLP-Methoden das CCN-51-spezifische Ergebnis. Die einzige Ausnahme war bei der Restriktionsschnittstelle 17a/b, *PsiI*/*EcoRI*, TTATAA/GAATTC zu beobachten: Die ICS-95- sowie IMC-67-Proben zeigten hier das für Arriba charakteristische Verhalten. Die Übereinstimmung der Ergebnisse bzgl. der Eltern und der CCN-51-Proben zeigt, dass die SNPs von den Eltern stammen müssen und sich nicht erst während der Kultivierung des CCN-51 herausgebildet haben. Die aufgeführten SNPs sind als stabile Marker für den CCN-51 zu bewerten.

4.6.3 Bestimmung der Nachweisgrenze der entwickelten Methode

Der kleinstmögliche CCN-51-Anteil in einer Mischung beider Kakaosorten sollte detektiert werden. Hierzu wurden Mischungen aus Kakaobohnen mit einem CCN-51-Gehalt zwischen 1 % und 30 % hergestellt. Die Bestimmung wurde mit der Sequenzregion 21, AseI, ATTAAT durchgeführt. Einen Zusammenhang zwischen der Peakfläche und dem CCN-51-Anteil schien es allerdings nur in geringem Maße zu geben, da die Peakflächen der entsprechenden CCN-51-Fragmente der verschiedenen Mischungsverhältnisse nicht der Tendenz eines abnehmenden CCN-51-Gehalts entsprachen. Die Werte für die Peakflächen lagen unabhängig vom CCN-51-Gehalt zwischen 65 % und 90 %.

Sowohl mittels AGE als auch CGE konnte noch eine Beimengung von 1 % CCN-51 detektiert werden, was der Nachweisgrenze entspricht. Das entsprechende Elektropherogramm ist in der folgenden Abbildung 4.31 dargestellt.

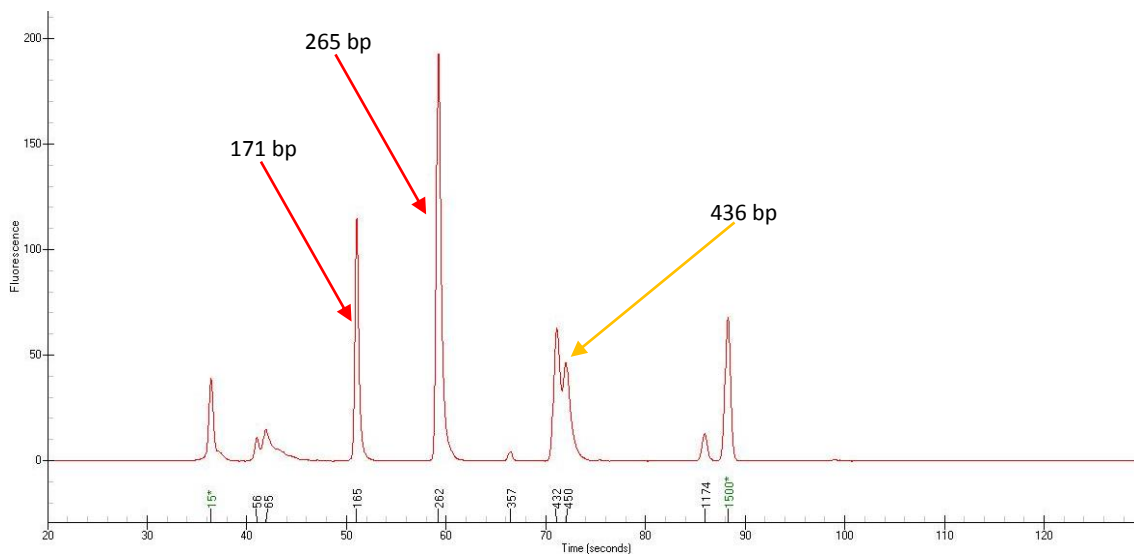


Abbildung 4.31: Bestimmung der Nachweisgrenze mittels CGE, Restriktionsschnittstelle 21, AseI, ATTAAT. CCN-51-Gehalt: 1 %, Arriba-Gehalt: 99 %. Bei diesem Mischungsverhältnis wurde ein Flächenverhältnis Fläche 171 bp und 265 bp = 1 % und Fläche 436 bp = 99 % erwartet.

4.6.4 Ansätze zur Quantifizierung

Es wurde überprüft, ob die PCR-RFLP-Methoden geeignet sind, CCN-51-Anteile in einer Mischung mit Arriba zu quantifizieren. Hier wurden – wie bei den Ansätzen zum (TAAAG)_n-Repeat – die definierten Mischungen (A: Mischung von PCR-Produkten, B: Mischung von DNA-Isolaten und anschließende PCR-RFLP und C: Mischung von fein gemahlene Kakaobohnen und anschließende DNA-Isolierung sowie PCR-RFLP) eingesetzt. Die Versuche zu den Mischungen A und B wurden mit Blatt- und Bohnenproben

und die zu der Mischung C nur mit Bohnen durchgeführt. Die Vermutungen hinsichtlich der Unterschiede zwischen beiden Probenmaterialien, die in 4.5.3 formuliert wurden, sind auch hier gültig.

Die Versuche wurden für die Sequenzregionen 21, *Asel*, *ATTAAAT* und 43, *EcoRI*, *GAATTC* durchgeführt. Grundlage der Versuche waren somit sowohl ein für Arriba - als auch ein CCN-51-spezifischer Verdau. Für sämtliche Mischungen wurden die Kakaobohnenproben C8 und A4 sowie die Kakaoblattproben C3, Bl. und A3, Bl. eingesetzt sowie im Anschluss mittels AGE und CGE vermessen.

4.6.4.1 Mischungen A und B der Kakaoblätter

Einhergehend mit der Vorgehensweise beim $(TAAAG)_n$ -Repeat fanden Vorversuche mit Kakaoblattproben statt.

Die ermittelten Ist-Werte für den CCN-51-Gehalt entsprachen eher den Soll-Werten als bei den Kakaobohnen. Erstere waren sowohl bei der Mischung A als auch der Mischung B nahezu identisch. Der Wert der Steigungen der beiden Kalibriergeraden für A und B betrug demnach nahezu 1,0.

Die entsprechenden Elektropherogramme und Kalibriergeraden sind im Anhang 5.9.4 in den Abbildungen 5.22 bis 5.23 ebenso in den dazugehörigen Tabellen 5.28 und 5.29 dargestellt.

4.6.4.2 Mischungen A, B und C der Kakaobohnen

Die folgende Abbildung 4.32 zeigt die Ergebnisse der Mischungen A, B und C nach der Detektion mittels AGE. Die entsprechenden Elektropherogramme nach CGE sind im Anhang 5.9.4 in den Abbildungen 5.24 bis 5.26 aufgeführt. Da sich die Ergebnisse der Sequenzregionen 21, *Asel*, *ATTAAAT* und 43, *EcoRI*, *GAATTC* ähneln, wird im Folgenden die Restriktionsschnittstelle 21, *Asel*, *ATTAAAT* exemplarisch diskutiert.

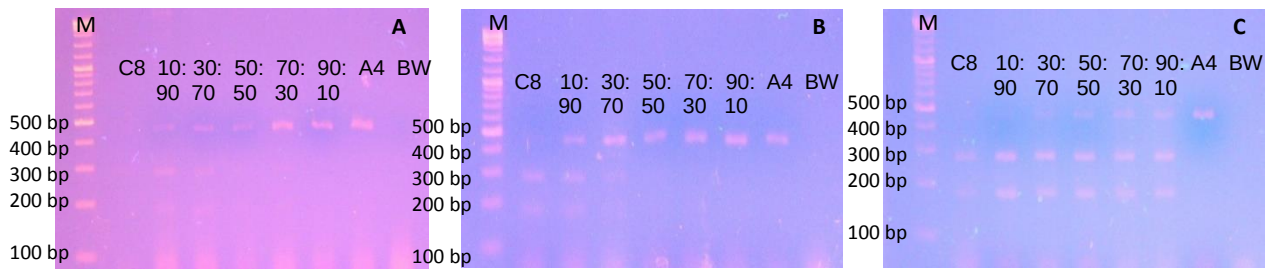


Abbildung 4.32: Mischungen von A: PCR-Produkten, B: DNA-Isolaten und C: fein gemahlene Kakaobohnen der Amplifikate und Fragmente nach der PCR-RFLP, Sequenzregion 21, AseI, ATTAAT. Das Mischungsverhältnis ist in Arriba:CCN-51 angegeben. AGE.

Sowohl auf den Agarosegelen als auch den Elektropherogrammen der CGE sind die unverdauten Amplifikate des Arriba-Anteils sowie die zwei verdauten Fragmente des CCN-51-Anteils entsprechend einem steigenden Arriba-Gehalt bei sinkendem CCN-51-Gehalt zu erkennen. Im Anhang 5.9.4 sind neben den Elektropherogrammen die tabellarische Auswertung der Peaks aus der CGE (siehe Tabellen 5.30 – 5.32) sowie die daraus resultierende Kalibriergerade für A (siehe Anhang 5.9.4, Abbildung 5.24) dargestellt. Der prozentuale Anteil der Peakfläche der zwei Fragmente der Sorte CCN-51 wurde gegen den prozentualen Anteil der Peakfläche des unverdauten PCR-Produkts der Sorte Arriba berechnet. Dieser Ist-Anteil wurde gegen den Soll-Anteil aufgetragen.

Der Ist-Wert entsprach in keiner der drei Mischungen dem Soll-Wert. Das Verhältnis zwischen Soll- und Ist-Wert war bei den Mischungen A, B und C unterschiedlich:

- Mischung A: Die Soll- und Ist-Werte stimmten in dieser Mischung am ehesten überein. Abweichungen zwischen beiden Werten sind auf Fehler während der Konzentrationseinstellung zurückzuführen.
- Mischung B: Der ermittelte Ist-Wert war geringer als der Soll-Wert (= Wiederfindung < 100 %). Ein linearer Zusammenhang zwischen Soll- und Ist-Werten bestand nicht. Da diese Experimente nur einmal durchgeführt wurden, konnten keine definitiven Aussagen über die Wiederfindungsrate getroffen werden.
- Mischung C: Der Ist-Wert war höher als der Soll-Wert.

Ein möglicher Grund dafür, warum Ist- und Soll-Wert bei der Mischung C nicht übereinstimmten, ist, dass in der isolierten Gesamt-DNA beider Sorten ein unterschiedliches Verhältnis zwischen plastidärer und nukleärer DNA vorliegen könnte. Liegt in der Sorte CCN-51 ein höherer Gehalt an Chloroplasten und demnach auch an cpGenom pro Zelle vor, würde das zu einer Überquantifizierung von CCN-51 im Vergleich zur Sorte Arriba führen. Auch ein PCR-Bias ist denkbar: Die Polymerase vervielfältigt eher das Template der Sorte CCN-51 als das der Sorte Arriba. Das Verhältnis der Mischung bleibt somit nicht konstant. Das wurde bereits in der Arbeit bzgl. des (TAAAG)_n-Repeats vermutet (siehe 4.5.3.2). Ein Bias durch Polymerase inhibierende Substanzen scheidet jedoch aus: Auch wenn es prinzipiell möglich ist,

dass eine Kakaosorte mehr Inhibitoren enthält als die andere, würde sich dieses Phänomen in einer Mischung nicht beobachten lassen. Die inhibierende Wirkung würde bei beiden Sorten gleichermaßen auftreten.

In den Elektropherogrammen sind Heteroduplexe zu erkennen, die während der Durchführung gebildet werden (siehe z. B. Anhang 5.9.4, Abbildungen 5.25 und 5.26, markiert durch einen blauen Pfeil). Die Heteroduplexe sollten in denselben Mengenanteilen aus beiden Kakaosorten stammen. Daher wurden sie zu gleichen Anteilen zu den für Arriba und den CCN-51-typischen Peaks addiert. Die Bildung der Heteroduplexe war bei den unterschiedlichen Versuchsdurchführungen nicht homogen. Der Anteil der den Heteroduplexen entsprechenden Peaks an der Gesamtpeakfläche schwankte zwischen 7 % und 25 %.

4.6.5 Anwendung auf die Matrix Schokolade

Es wurde untersucht, ob sich die entwickelten PCR-RFLP-Methoden auch mit der Matrix Schokolade durchführen lassen. Hierzu wurden die Schokoladen S1, S2, S6, S7 und S8 (siehe Anhang 5.1, Tabelle 5.3) eingesetzt. Die Verpackungsangaben werden im Folgenden zusammengefasst:

- S1 und S7 enthalten Edelkakao
- S2 enthält die Kakaosorte Arriba
- S6 besteht zu 100 % aus Arriba-Kakao
- In der Probe S8 wurde ausschließlich Konsumkakao verarbeitet

Die DNA wurde mittels CTAB-Methode aus der Schokolade extrahiert und die Isolate wurden der PCR-RFLP-Methode um die Sequenzregion 21, *Asel*, ATTAAT zugeführt. Die Amplifikate nach der PCR sowie die Fragmente nach der RFLP wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und entsprechend detektiert (siehe Abbildung 4.33).

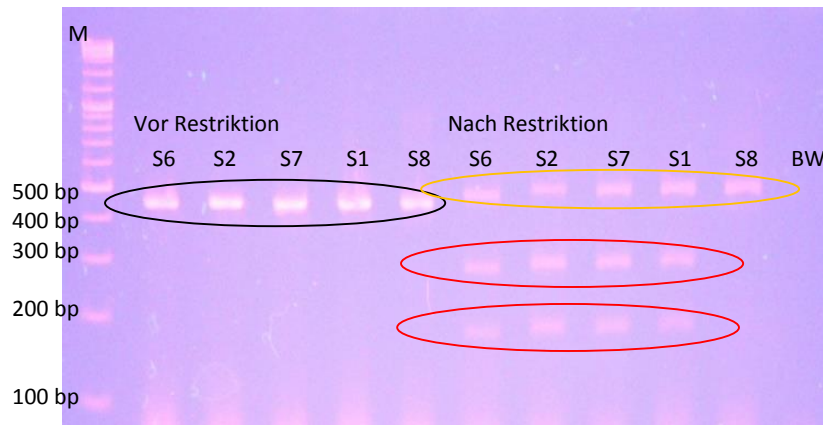


Abbildung 4.33: Anwendung der PCR-RFLP-Methode um die Sequenzregion 21, AseI, ATTAAT auf die Matrix Schokolade. Die Amplifikate (schwarz) werden verdaut (rot) oder bleiben unverdaut (gelb). AGE.

Bei allen Proben wurden Banden detektiert. Demnach konnte cpDNA aus einem hochverarbeiteten Produkt wie Schokolade isoliert und die entwickelte PCR-RFLP-Methode angewendet werden. Die Intensität der Banden ist mit der von DNA-Isolaten aus Blatt- und Bohnenproben vergleichbar.

In der Probe S8 wurde lediglich das unverdaute Amplifikat beobachtet. Die CCN-51-spezifischen Fragmente nach der Restriktion wurden folglich nicht detektiert. S8 ist eine Schokolade aus Konsumkakao, der üblicherweise aus Afrika importiert wird. In Schokoladensorten wie S8 wird demnach nicht die Sorte CCN-51 verarbeitet. Konsumkakaosorten aus Afrika scheinen an dieser Stelle eine andere Sequenz als CCN-51 aufzuweisen.

In den restlichen Proben wurden neben dem unverdauten für Arriba spezifischen Amplifikat die beiden für CCN-51 charakteristischen Banden bei 171 bp und 265 bp detektiert. Die Proben bestehen laut Deklaration aus Edelschokolade. Dieser stammt meistens aus Mittel- und Südamerika, z. B. Ecuador (siehe 2.1.4). Entsprechend dem Ergebnis wird zeitgleich mit dem Edelschokolade der Konsumkakao CCN-51 verarbeitet. Die Bedenken der Kakaoindustrie werden bestärkt (siehe 2.1.4). Vor allem die Probe S6, die laut Auslobung zu 100 % aus Arriba-Kakao bestehen sollte, fiel hierbei auf; es handelt sich um eine Falschdeklaration.

4.6.6 Zusammenfassung und Fazit

Die Sequenzen der cpGenome der Kakaosorten Arriba und CCN-51 weisen neben dem Unterschied in der (TAAAG)_n-Region wenige SNPs auf. Einige der SNPs befinden sich in den Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen. Sie können genutzt werden, um die beiden Kakaosorten über eine PCR-RFLP zu differenzieren: Nach einer Universal-PCR wird ein spezifischer Verdau mit einer bestimmten

Restriktionsendonuklease durchgeführt. Je nach der Spezifität wird das Amplifikat der einen Sorte verdaut und das der anderen nicht. So können im Falle der Spezifität zwei Fragmente und im anderen Fall kann auch nach der RFLP nur das unverdaute PCR-Produkt detektiert werden. Die Detektion erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl mittels AGE als auch CGE.

Während mittels PCR-RFLP eine qualitative Unterscheidung möglich war, zeigte sich, dass sich die Methode für eine Quantifizierung der beiden Sorten in Mischungen nicht eignet. Es entstehen Heteroduplexe in unterschiedlichen Mengen und deren Peakflächen können nicht korrekt auf die Sorten aufgeteilt werden. Durch einen Bias wird die Kakaosorte CCN-51 zudem eher amplifiziert als Arriba, wodurch es zu einer Verschiebung des tatsächlichen Mischungsverhältnisses kommt. Eine grobe und semiquantitative Abschätzung des CCN-51-Gehalts in einer Kakaoprobe ist hingegen möglich.

Bei der Methodenentwicklung wurden – insbesondere bei den Kakaobohnenproben – Ausnahmen festgestellt. Diese decken sich nicht immer mit denen des (TAAAG)_n-Repeats. Die Anwendung nur einer Methode ist daher nicht sinnvoll. Wie aus einer Kombination der in dieser Arbeit aufgeführten Methoden mit größerer Sicherheit die jeweilige Sorte festgestellt werden kann, wird in 4.8 dargestellt.

Durch die Ausnahmen bei der Kakaoblatt- (C8, Bl.) und der -bohnenprobe C16 liegt wieder der Verdacht nahe, dass innerhalb der Sorte CCN-51 in Ecuador neben einem quantitativ herausstechenden und somit für CCN-51 charakteristischen Haupttypen Nebentypen existieren. Während sich die Probe C15 wie nahezu alle anderen CCN-51-Proben verhielt, ließ sich für Probe C16 das für Arriba charakteristische Verhalten nachweisen. Die Probe C8, Bl. zeigte an der Position 17a/b das Muster einer Arriba-Probe.

4.7 Alternative Methoden

4.7.1 LPA

Auf Basis eines SNPs kann eine LPA entwickelt werden. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass sich die Punktmutation nicht in der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym befinden muss, um auf ihr basierend eine Methode zu entwickeln. Vor der eigentlichen Amplifikation erfolgt eine Ligation. Aus der höheren Sensitivität der Ligase gegenüber Fehlhybridisierungen im Vergleich zur Polymerase ergibt sich auch eine höhere Empfindlichkeit der Methode, was ein weiterer Vorteil ist (siehe 2.3.5).

Die Methode wurde zunächst anhand eines SNPs durchgeführt, der sich im *ccsA*-Gen des cpGenoms befindet. Mittels partieller Sequenzierung wurde die Punktmutation überprüft. Sämtliche CCN-51-Blattproben zeigten die charakteristische Sequenz. Bei den Arriba-Blattproben wurden nur zwei von acht Ausnahmen beobachtet. Der SNP wurde daher als geeignete Grundlage für die Differenzierung der beiden Kakaosorten bewertet. Der Einzelbasenaustausch von Adenin und Thymin zwischen Arriba und CCN-51 wird in der folgenden Abbildung 4.34 dargestellt.

```

A { CCSA84  GAACCATAACTATGTAAACCTATTCCTAATAGATTGACCCCAAAATAGCATATCCAAATTATAAGAAAGCCCAT
  ACCSAF  -----GCATATCCAAATTATAAGAAAGCCCAT
  ACCSAR  -AACCATAACTATGTAAACCTATTCCTAATAGATTGACCCCAAAATAGCATATCCAAATTATAAGAAAGCCCAT
  C { CCSSAR -AACCATAACTATGTAAACCTATTCCTAATAGATTGACCCCAAAATAGCATATCCAAATTATAAGAAAGCCCAT
    CCCSAF  -----GCATATCCAAATTATAAGAAAGCCCAT
                                     *****

A { CCSA84  GAAGCCACAATTGCGGAATTTACACCTTCAAATTTTATTTGTTTCGTATATGTAAATAAATCGCGAATACGGTC
  ACCSAF  GAAGCCACAATTGCGGAATTTACACCTTCAAATTTTATTTGTTTCGTATATGTAAATAAATCGCGAATACGGTC
  ACCSAR  GAAGCCACAATTGCGGAATTTACACCTTCAAATTTTATTTGTTTCGTATATGTAAATAAATCGCGAATACGGTC
  C { CCSSAR GAAGCCACAATTGCGGAATTTACACCTTCAAATTTTATTTGTTTCGTATATGTAAATAAATCGCGAATACGGTC
    CCCSAF  GAAGCCACAATTGCGGAATTTACACCTTCAAATTTTATTTGTTTCGTATATGTAAATAAATCGCGAATACGGTC
                                     *****

A { CCSA84  CAAGTAATAAATGCCCAAGTTTCCTTTGGGTCCCAATTCCAATATGATCCCCACGCCTCATTAGCCCATACGGCT
  ACCSAF  CAAGTAATAAATGCCCAAGTTTCCTTTGGGTCCCAATTCCAATATGATCCCCACGCCTCATTAGCCCATACGGCT
  ACCSAR  CAAGTAATAAATGCCCAAGTTTCCTTTGGGTCCCAATTCCAATATGATCCCCACGCCTCATTAGCCCATACGGCT
  C { CCSSAR CAAGTAATAAATGCCCAAGTTTCCTTTGGGTCCCAATTCCAATATGATCCCCACGCCTCATTAGCCCATACGGCT
    CCCSAF  CAAGTAATAAATGCCCAAGTTTCCTTTGGGTCCCAATTCCAATATGATCCCCACGCCTCATTAGCCCATACGGCT
                                     *****

A { CCSA84  CCCGAAAGAATCCCTATGGTTAAAAAGATAAACCCGAGACTAATAATACGATAACTCCAACGATCCAATTGTT
  ACCSAF  CCCGAAAGAATCCCTATGGTTAAAAAGATAAACCCGAGACTAATAATACGATAACTCCAACGATCCAATTGTT
  ACCSAR  CCCGAAAGAATCCCTATGGTTAAAAAGATAAACCCGAGACTAATAATAC-----
  C { CCSSAR CCCGAAAGAATCCCTATGGTTAAAAAGATAAACCCGAGACTAATAATAC-----
    CCCSAF  CCCGAAAGAATCCCTATGGTTAAAAAGATAAACCCGAGACTAATAATACGATAACTCCAACGATCCAATTGTT
                                     *****

```

Abbildung 4.34: SNP im *ccsA*-Gen des cpGenoms.

Im Folgenden werden Auszüge aus den Ergebnissen bzgl. der Blatt- und Bohnenproben dargestellt. Weitere Blattproben sind im Anhang 5.10 in den Abbildungen 5.27 und 5.28 dargestellt.

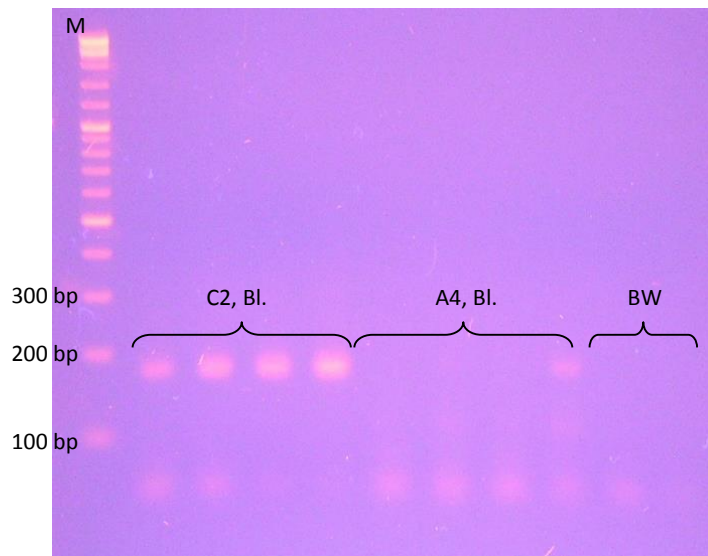


Abbildung 4.35: Detektion der Ergebnisse der LPA auf Basis des SNPs im *ccsA*-Gen. Kakaoblätter.

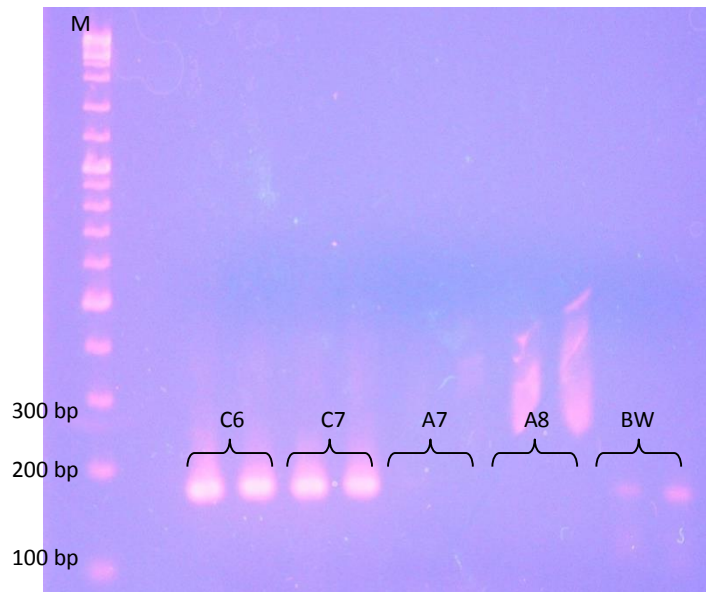


Abbildung 4.36: Detektion der Ergebnisse der LPA auf Basis des SNPs im *ccsA*-Gen. Kakaobohnen.

In Abbildung 4.35 ist für die CCN-51-Blattprobe eine Bande auf einer Höhe von etwa 180 bp zu erkennen, was ungefähr dem theoretischen Amplifikat von 172 bp entspricht. Diese Bande bleibt, wie erwartet, bei der Arriba-Blattprobe aus. Bei der Auswertung des Agarosegels, das in Abbildung 5.27 (siehe Anhang 5.10) gezeigt wird, ist wiederum die erwartete Bande bei der CCN-51-Blattprobe zu erkennen. Diese Bande ist bei einer der zwei Bestimmungen der Arriba-Blattprobe hingegen ebenfalls schwach sichtbar. Das Agarosegel, das in Abbildung 5.28 (siehe Anhang 5.10) präsentiert wird, zeigt

für die CCN-51-Blattprobe die Bande in erwarteter Höhe und für die Arriba-Blattprobe nicht. Auf dem Agarosegel sind ebenfalls die Ergebnisse zweier Eltern des CCN-51 abgebildet: Die Proben E1, Bl. und E3, Bl. zeigen jeweils bei der Doppelbestimmung einmal eine Bande und ein andermal nicht. Bei den Kakaobohnenproben lässt sich wieder die erwartete Bande bei etwa 180 bp beobachten (siehe Abbildung 4.36). Schwache Banden auf Höhe der Bahnen des Blindwerts rühren wahrscheinlich von minimalen Verunreinigungen her. Die Banden werden bei den Arriba-Bohnenproben nicht beobachtet.

Generell scheint die LPA auf Basis des SNPs im *ccsA*-Gen bzgl. der vorliegenden Problemstellung geeignet zu sein. Erste Ansätze führten zum Erfolg. Nichtsdestotrotz bergen die Ergebnisse eine gewisse Unsicherheit. Auch bei den Arriba-Proben wurden selten Banden detektiert. Es besteht Optimierungsbedarf – v. a. hinsichtlich der Reproduzierbarkeit.

Die LPA wurde hinsichtlich weiterer SNPs angewendet. Erste Versuche fanden zu den SNPs in den Sequenzregionen 17a/b, *PsiI/EcoRI*, TTATAA/GAATTC und 21, *Asel*, ATTAAT (siehe 4.6.2) mit Kakaoblattproben statt. Neben den erwarteten Amplifikaten des CCN-51 wurden bei den Arriba-Proben häufig Banden beobachtet.

Da die unter 4.5 und 4.6 beschriebenen Methoden zur Differenzierung von Arriba und CCN-51 zum Erfolg führten, wurde die Entwicklung einer LPA nicht weiter verfolgt.

4.7.2 HRMA

Unterschiede in der Sequenz führen zu einer Veränderung des Schmelzpunkts eines Amplifikats. Im Falle des (TAAAG)_n-Repeats liegt ein quantitativer Unterschied zwischen den PCR-Produkten von Arriba und CCN-51 vor. Hinsichtlich der Punktmutationen handelt es sich um einen qualitativen Unterschied. Zur Sortendifferenzierung kann demnach eine hochauflösende Schmelzpunktanalyse (HRMA) durchgeführt werden (siehe 2.3.6).

In Kooperation mit dem Universitätsklinikum Eppendorf (UKE), Hamburg, Deutschland, wurden die Schmelzpunkte der Amplifikate der Kakaoblattproben A1, Bl., A2, Bl., A8, Bl. sowie C1, Bl., C4, Bl., C6, Bl. bestimmt. Die PCR-Produkte stammten aus den Durchführungen zum (TAAAG)_n-Repeat und zur Restriktionsschnittstelle 17, *EcoRI*, GAATTC. Aufgrund des sehr hohen Einflusses der MgCl₂-Konzentration im Reaktionsgemisch wurde die Bestimmung für sechs verschiedene MgCl₂-Konzentrationen (1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 mM, 3,5 mM) durchgeführt.

Die Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte, die nach der PCR zur Restriktionsschnittstelle 17, *EcoRI*, GAATTC erhalten wurden, ergab für keine MgCl₂-Konzentrationen signifikante Abweichungen

zwischen den beiden Kakaosorten. Jedoch konnten Unterschiede nach der HRMA nach der PCR zum (TAAAG)_n-Repeat beobachtet werden.

In den Abbildungen 4.37 und 4.38 wird die Schmelzkurve der Proben A2, Bl. und C4, Bl. parallel präsentiert.

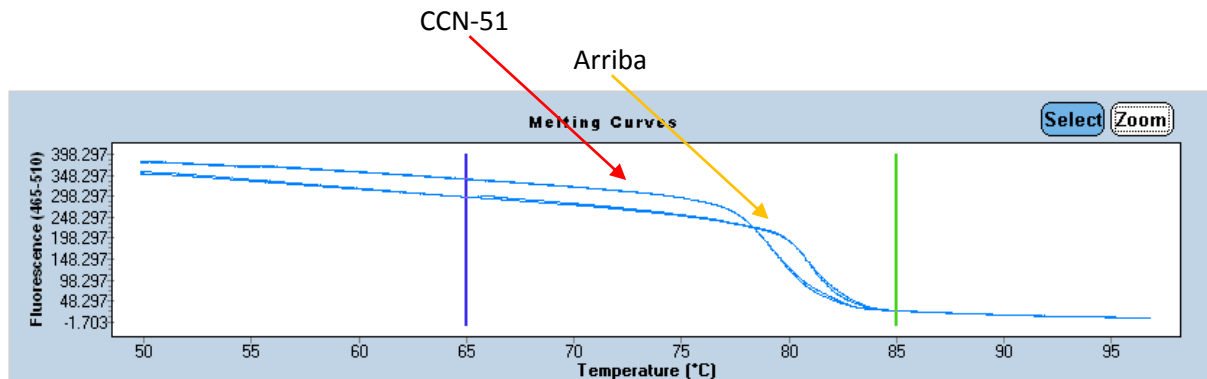


Abbildung 4.37: Schmelzkurve während der das (TAAAG)_n-Repeat detektierenden PCR.

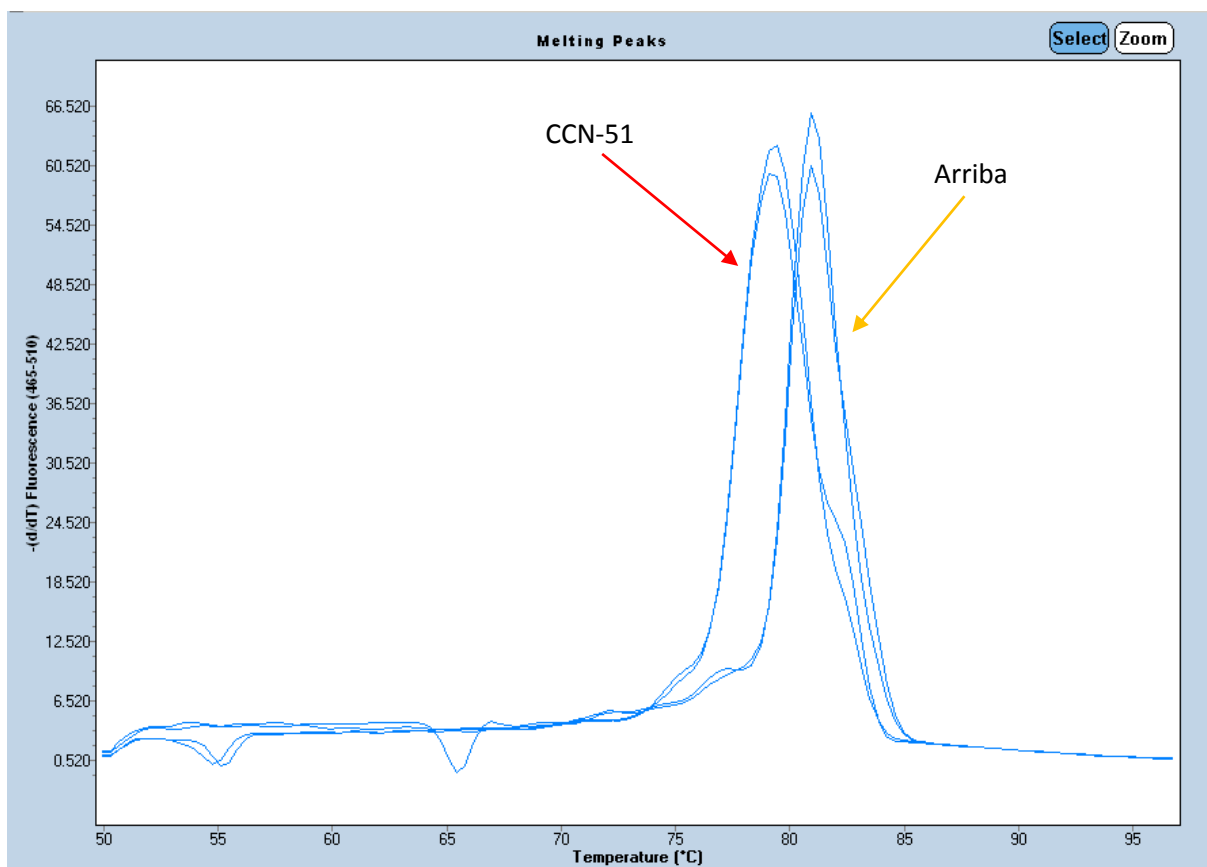


Abbildung 4.38: Erste Ableitung der Schmelzkurve nach der HRMA von Amplifikaten, die nach der das (TAAAG)_n-Repeat detektierenden PCR erhalten wurden.

Die Kurven der beiden Kakaosorten Arriba und CCN-51 unterscheiden sich voneinander. Die Differenz der Schmelzpunkte betrug 4 °C. Die gemessene Schmelztemperatur des Amplifikats der Sorte CCN-51 (77,8 °C) war geringer als die von Arriba (77,3 °C), obwohl das Amplifikat aufgrund der vierzehn- anstelle der sechsfachen Wiederholung des Repeats um 40 bp größer ist. Auch über die berechneten Schmelztemperaturen für CCN-51: 76,2 °C und Arriba: 77,3 °C (berechnet nach (137)) wurde bereits vermutet, dass (TAAAG)_n mit zunehmender Länge eine Destabilisierung und somit einen geringeren Schmelzpunkt des Amplifikats bewirkt.

Die optimale Temperatur wurde so bestimmt, dass die Ergebnisse einer Doppelbestimmung übereinstimmten und dass eine maximale Differenz zwischen den Schmelztemperaturen der Sorten Arriba und CCN-51 erreicht wurde. Der Einfluss der MgCl₂-Konzentration wird durch den Vergleich der Ergebnisse der sechs unterschiedlichen Konzentrationen deutlich: Für dieselbe Probe schwankten die Werte bis zu 2 °C. Die optimale MgCl₂-Konzentration betrug 3,0 mM.

Die Detektion der Amplifikate mittels HRMA ist geeignet, um die Kakaosorten voneinander zu differenzieren. Die Bestimmung wurde mehrmals durchgeführt, die Ergebnisse waren jedoch nicht ausreichend reproduzierbar. Auf eine umfangreiche Optimierung wurde verzichtet, da die Detektionsmöglichkeiten für die PCR-Produkte mittels AGE, dHPLC und CGE verlässlicher waren.

4.8 Analytische Vorgehensweise

In den Kapiteln 4.5 und 4.6 wurden Methoden zur Differenzierung der zwei Kakaosorten Arriba und CCN-51, basierend auf Sequenzunterschieden im cpGenom, beschrieben. Eine Beimischung des Konsumkakaos CCN-51 in einer Charge des Edelkakaos Arriba kann mittels Analyse des (TAAAG)_n-Repeats sowie der auf den fünf SNPs basierenden sechs PCR-RFLP-Methoden identifiziert werden. Ein mögliches Vorgehen in der Praxis wird im Folgenden beschrieben:

Eine Kakaoprobe wird hinsichtlich des (TAAAG)_n-Repeats untersucht. Wird die für CCN-51 charakteristische Bande/ Peak bei 151 bp beobachtet, ist das ein erster und verlässlicher Hinweis auf die Anwesenheit von CCN-51. Die Detektion des 40 bp längeren Amplifikats, z. B. mittels AGE, CGE oder dHPLC, kann als schnelle Screeningmethode eingesetzt werden. Nachfolgend können die sechs PCR-RFLP-Methoden durchgeführt werden, um den Verdacht der Beimischung der Kakaosorte CCN-51 zu bestätigen. Eine oder mehrere geeignete PCR-RFLP werden durchgeführt, um – je nach Spezifität des SNPs in der Sequenzregion – die Sorte Arriba oder CCN-51 oder ein Gemisch aus beiden nachzuweisen. Nach dem Einsatz entsprechender Restriktionsendonukleasen werden zwei Fragmente erhalten, welche die Anwesenheit der jeweiligen Sorte bestätigen oder nicht. Die analytische Vorgehensweise ist in Abbildung 4.39 schematisch dargestellt:

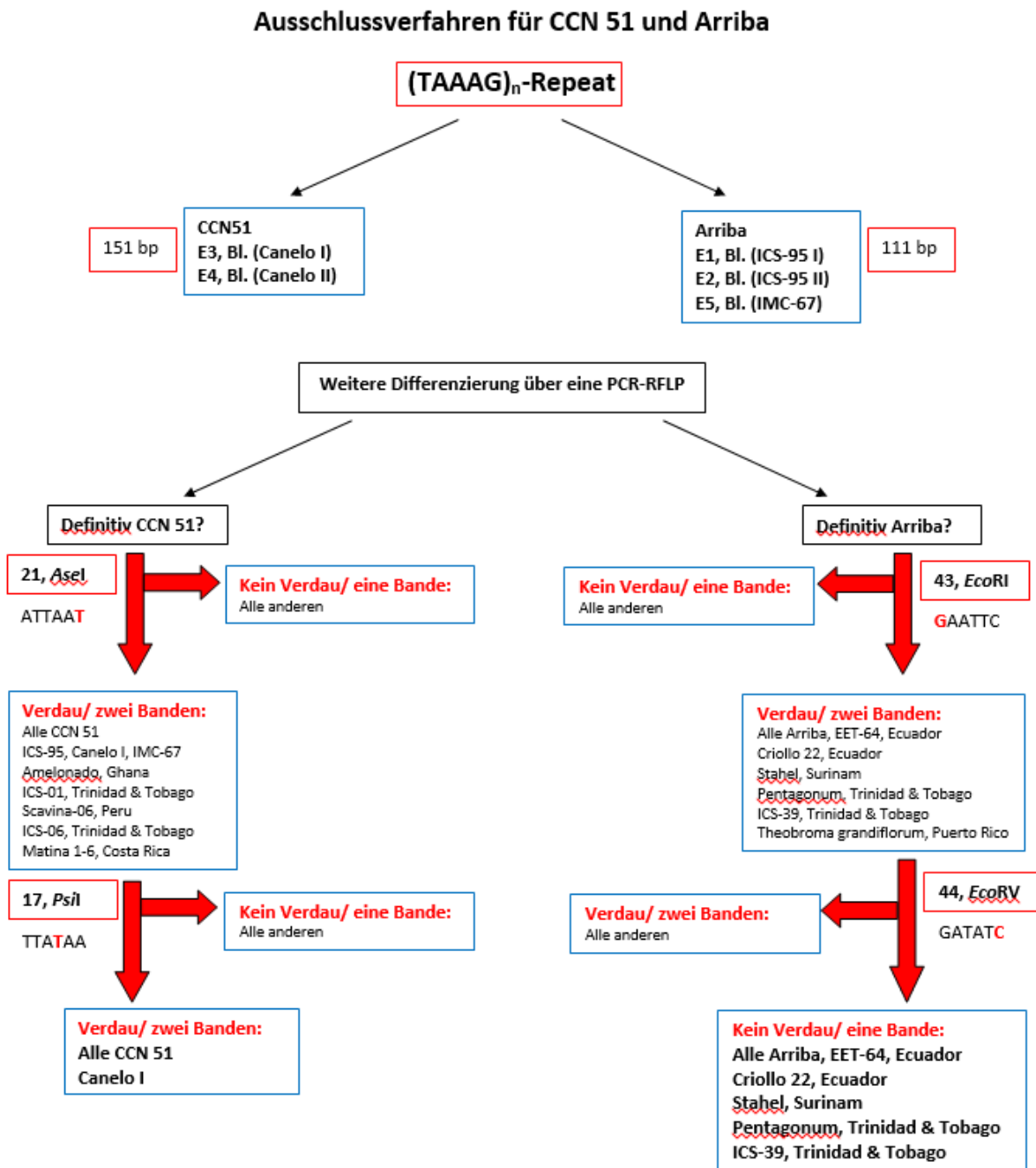


Abbildung 39: Möglichkeit einer analytischen Vorgehensweise zur Identifizierung der Sorte CCN-51 in einer Kakaoprobe.

Sobald CCN-51 in der Kakaoprobe identifiziert wurde, kann in einem weiteren Schritt über die PCR-RFLP mit der Sequenzregion 21, AseI, ATTAAT eine semiquantitative Abschätzung des CCN-51-Gehalts erfolgen.

4.9 Mikrosatellitenanalyse

Bei den Ergebnissen zu einigen Proben der Kakaosorte CCN-51 wurden Ausnahmen beobachtet. Die Herkunft dieser Proben gilt als sicher: Die Beprobung von C1, Bl. bis C8, Bl. wurde eigenhändig durchgeführt und die Proben C15 und C16 wurden einer frischen Frucht entnommen. Innerhalb dieses Probenpools wurde neben dem charakteristischen CCN-51-Muster für wenige Proben ein abweichendes Ergebnis detektiert:

- Nahezu alle CCN-51-Proben zeigten bei der Detektion des (TAAAG)_n-Repeats ein CCN-51-typisches Amplifikat einer Größe von 151 bp. Bei wenigen Proben wurden andere Haplotypen des Chloroplasten detektiert. Das Amplifikat der Probe C16 wies z. B. mit einer sechsfachen Wiederholung des Repeats ein um 40 bp kleineres und somit das für Arriba typische PCR-Produkt auf. Die Blattprobe C4, Bl. zeigte mit einem zwölffachen Repeat ein hiervon stark abweichendes Verhalten.
- Bei den PCR-RFLP-Methoden ließ sich für die Probe C16 wiederum das für Arriba typische Verhalten detektieren, ebenso wie für die Probe C8, Bl. Die Probe C4, Bl. wurde bei der Restriktionsschnittstelle 17a, *PsiI*, TTATAA nicht verdaut, allerdings bei der Sequenzregion 17b, *EcoRI*, GAATTC, was auf das für Arriba typische Verhalten hinweist. Für alle anderen CCN-51-Proben ließ sich ein für CCN-51 charakteristisches Verhalten nachweisen.

Demnach wird vermutet, dass innerhalb der Sorte CCN-51 neben dem mengenmäßig überwiegenden Haupttypen Nebentypen existieren. In der FEI-Projektsitzung vom 9. April 2013 (135) wurde diese Tatsache ebenfalls erwähnt. Dass es verschiedene Typen der Sorte CCN-51 gibt, ist theoretisch auszuschließen, da es sich bei der Sorte um einen reinen Klon handelt (siehe 2.1.4). Im Gegensatz zu der Sorte Arriba wird die Sorte CCN-51 vegetativ vermehrt. Bei dieser Sorte dürften demnach so gut wie keine Sequenzabweichungen zwischen einzelnen Proben zu beobachten sein. Geringe Variationen im Sequenzmuster des Arriba-Genoms sind u. a. durch seine sexuelle Reproduktion zu erklären. Das Auftreten von unterschiedlichen Haplotypen innerhalb des CCN-51-Probenpools widerspricht demnach der Tatsache, dass diese Kakaosorte ein reiner Klon ist. Ist die Kakaosorte ein Klon, sind die Mikrosatellitenmuster der einzelnen CCN-51-Proben identisch. Unterschiede im Muster bestätigen den Verdacht, es gäbe verschiedene Typen der Kakaosorte.

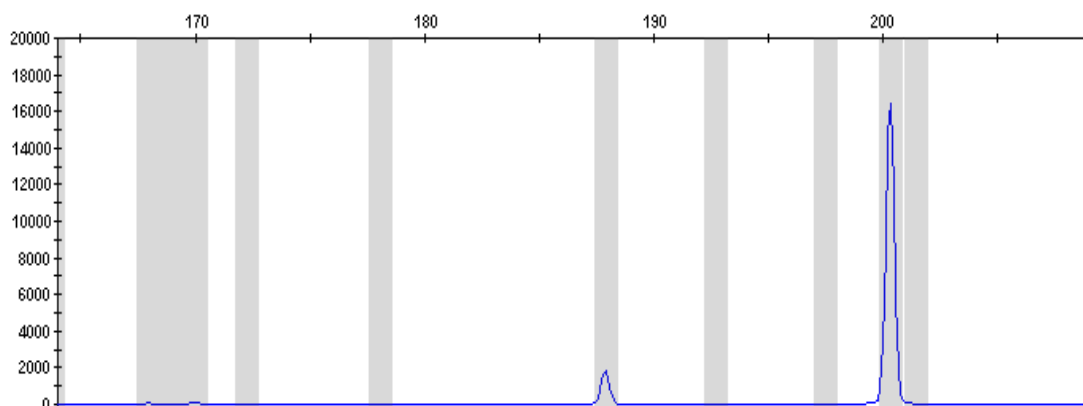
Die Struktur der Mikrosatelliten-Allele sowie der erwartete und publizierte Allelbereich sind in der Tabelle 4.13 dargestellt. Die zugehörigen Primersequenzen sind im Anhang 5.4 in Tabelle 5.17 aufgelistet (6), (126), (138).

Tabelle 4.13: Struktur und Allelgrößen der untersuchten Mikrosatelliten.

Marker	Struktur des Mikrosatelliten	Erwarteter Allelbereich	Publizierter Allelbereich (Irish, 2010) (138)
mTcCIR1	(CT) ₁₄	128 – 140	127 – 144
mTcCIR6	(TG) ₇ (GA) ₁₃	230 – 248	222 – 247
mTcCIR8	(TC) ₅ TT(TC) ₁₇ TTT(CT) ₄	288 – 304	288 – 304
mTcCIR11	(TC) ₁₃	302 – 315	288 – 317
mTcCIR12	(CATA) ₄ N ₁₈ (TG) ₆	188 – 212	188 – 251
mTcCIR15	(TC) ₁₉	234 – 252	232 – 256
mTcCIR18	(GA) ₁₂	331 – 345	331 – 355
mTcCIR24	(AG) ₁₃	185 – 201	185 – 203
mTcCIR25	(CT) ₂₁	135 – 153	-
mTcCIR60	(CT) ₇ (CA) ₂₀	194 – 212	187 – 223

Insgesamt wurden 14 Proben mit den zehn Primer-Paaren untersucht. Hierzu zählten die acht Kakaoblattproben C1, Bl. bis C8, Bl. sowie die Kakaobohnen C15 und C16 des CCN-51, zwei Kakaoblattproben des Arribas, EET-19 (A1, Bl.) und EET-48 (A2, Bl.), sowie zwei Blattproben des Criollos: Cr1, Bl. und Cr2, Bl. (siehe Anhang 5.1, Tabellen 5.1 und 5.2).

Die PCR-Bedingungen (siehe 3.5.1) wurden optimiert: Die Templatmenge im Reaktionsgemisch wurde von 5 ng/μL auf 20 ng/μL erhöht. In den Publikationen von Lanaud et al., 1999 (6) und Cryer et al., 2005 (126) wurde in Abhängigkeit vom Primer-Paar eine Annealing-Temperatur von 46 °C oder 51 °C angegeben. Sie wurde auf 55 °C erhöht. Die Ergebnisse der Vierfachbestimmung waren identisch und die Bestimmung war demnach reproduzierbar. In Abbildung 4.40 ist beispielhaft ein Elektropherogramm einer CCN-51-Probe dargestellt.

**Abbildung 4.40:** Elektropherogramm zur Detektion von Amplifikaten nach der Mikrosatellitenanalyse einer CCN-51-Probe.

Die Amplifikatgrößen werden in den Tabellen 4.14 und 4.15 dargestellt. Sie entsprechen hierbei den erwarteten Größen (siehe Tabelle 4.13).

Für jeden SSR-Locus wurden zwei bis fünf verschiedene Allele (A – E) im gesamten Probenset erhalten. Hierbei wiesen die meisten Individuen zwei verschiedene Fragmentlängen und somit zwei Allele pro SSR-Locus auf (heterozygot). Zeigen beide Allele dieselbe Fragmentlänge, ist der Mikrosatellit homozygot.

Tabelle 4.14: Amplifikatgrößen nach der PCR mit den Primer-Paaren mTcCIR1-12. Es wurden bis zu fünf verschiedene Allele erhalten, A-E (+: Allel anwesend, -: Allel abwesend). Unterschiede bei den CCN-51-Proben sind grau markiert.

Probe	mTcCIR																			
	1			6				8			11				12					
	A	B	C	A	B	C	D	A	B	C	A	B	C	D	A	B	C	D	E	
	128	138	140	230	236	240	248	288	292	304	288	292	302	315	188	200	204	210	212	
C1, Bl. (Ecuador)	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
C2, Bl. (Ecuador)	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
C3, Bl. (Ecuador)	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
C4, Bl. (ICGD)	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	
C5, Bl. (HH)	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	
C6, Bl (HH)	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
C7, Bl. (Costa Rica)	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
C8, Bl. (Costa Rica)	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
C15 (Costa Rica)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
C16 (Costa Rica)	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
A1, Bl. (EET-19)	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
A2, Bl. (EET-48)	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cr1, Bl.	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
Cr2, Bl.	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	

Tabelle 4.15: Amplifikatgrößen nach der PCR mit den Primer-Paaren mTcCIR15-60. Es wurden bis zu fünf verschiedene Allele erhalten, A-E (+: Allel anwesend, -: Allel abwesend). Unterschiede bei den CCN-51-Proben sind grau markiert.

Probe	mTcCIR																			
	15				18					24			25					60		
	A	B	C	D	A	B	C	D	E	A	B	C	A	B	C	D	E	A	B	
	234	248	250	252	331	333	335	343	345	185	193	201	135	141	141	148	153	194	212	
C1, Bl. (Ecuador)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	
C2, Bl. (Ecuador)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	
C3, Bl. (Ecuador)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	
C4, Bl. (ICGD)	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	
C5, Bl. (HH)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	
C6, Bl. (HH)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	
C7, Bl. (Costa Rica)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	
C8, Bl. (Costa Rica)	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
C15 (Costa Rica)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
C16 (Costa Rica)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
A1, Bl. (EET-19)	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	
A2, Bl. (EET-48)	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	
Cr1, Bl.	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	
Cr2, Bl.	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	

Da sich die Allelgrößen der beiden Kakaosorten Arriba und CCN-51 voneinander unterscheiden, ist eine Unterscheidung über ihre Mikrosatellitenmuster möglich (z. B. mTcCIR8: CCN-51, Allele A und C; Arriba, Allele A und B). Innerhalb des CCN-51-Probensets zeigten sich aber auch Unterschiede beim Allelmuster einzelner Mikrosatelliten-Loci.

Die CCN-51 Proben aus Ecuador (C1, Bl. – C3, Bl.) wiesen ein identisches Mikrosatellitenmuster auf. Bei diesen Proben waren acht der zehn Mikrosatelliten heterozygot und zwei homozygot (mTcCIR15, mTcCIR24). Für die Proben C5, Bl., C6, Bl., C7, Bl. und C15 wurden generell dieselben Allele detektiert. Teilweise ist auch nur eines der zwei Allele anwesend (z. B. C5, Bl., mTcCIR6, mTcCIR12, mTcCIR25). In diesem Fall waren die Loci homozygot. Für einige Loci konnten keine Amplifikate detektiert werden (z. B. C15, mTcCIR1, mTcCIR11, mTcCIR15). Es handelt sich hierbei um Nullallele. Die Abweichungen der SSR-Muster in diesen Proben können durch somaklonale Variationen innerhalb der Genotypen erklärt werden. Hierbei handelt es sich um ein Phänomen, das bei Bäumen wie Kaffee- und Pappelbäumen beobachtet werden konnte (139), (140), (141). In den vegetativen Zellen langlebiger Organismen wie Bäumen kommt es zu Mutationen. Diese breiten sich durch Zellteilungen in somatischen Zellen im Organismus aus und tragen dadurch zur genetischen Variabilität dieser Organismen und damit der Populationen bei. Die Proben C1, Bl. – C3, Bl., C5, Bl. – C7, Bl. und C15 zeigten identische Ergebnisse bei der Detektion des Haplotypen im (TAAAG)_n-Repeat (n = 14) sowie bei den auf den SNPs basierenden PCR-RFLP-Methoden (C-typisch). Hinsichtlich der SSR-Analyse ließ sich allerdings eine geringfügige genetische Variabilität beobachten.

Die Proben C4, Bl., C8, Bl. und C16 unterschieden sich gravierend von den anderen CCN-51-Proben. Sie zeigten in den Loci zweierlei Phänomene: zum einen eine verminderte Zahl von Allelen und zum anderen gänzlich abweichende Allele (siehe Tabellen 4.14 und 4.15). Während für C8, Bl. und C16 drei bzw. zwei abweichende Amplifikate detektiert wurden, wurden für die ICGD-Probe C4, Bl. die größten Abweichungen zu den oben erwähnten CCN-51-Proben festgestellt. So unterscheidet sich bei den Mikrosatelliten mTcCIR6, mTcCIR11, mTcCIR12, mTcCIR15, mTcCIR18 und mTcCIR24 jeweils ein Allel von den oben aufgelisteten CCN-51-Proben. Für die Mikrosatelliten mTcCIR8, mTcCIR25 und mTcCIR60 ist lediglich eines der beiden Allele nicht vorhanden. Hier ist eine Reduktion der Heterozygotie zu erkennen. Bei den drei Proben C4, Bl., C8, Bl. und C16 wurden bei der chloroplastengenombasierten Analytik (siehe 4.5 und 4.6) ebenfalls nicht CCN-51-typische Haplotypen identifiziert (siehe 4.5.1.1, 4.6.2, 4.6.6). Diese Ergebnisse finden sich auch in der SSR-Analyse wieder.

Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse (siehe Tabellen 4.14 und 4.15) wurden zunächst manuell ausgewertet. Demnach können die CCN-51-Proben in vier Typen eingeteilt werden: C1, Bl. – C3, Bl. (Typ I); C5, Bl. – C7, Bl., C15 (Typ II); C8, Bl., C16 (Typ III); C4, Bl. (Typ IV). Diese Typisierung spiegelt die geografische Herkunft der Kakaoproben wider: Die Typ-I-Proben stammen aus Ecuador und die Typ-II-

sowie Typ-III-Proben aus Costa Rica, wo sie bereits als CCN-51 Typ I (C15) und II (C16) gehandelt werden. Die ICGD-Probe der University of Reading, Großbritannien, fungiert als Typ IV.

Die Clusteranalyse nach Simpson, Jaccard, Jukes und Euclidean lieferte identische Ergebnisse für die vier Methoden. Beispielhaft ist das Dendrogramm nach Simpson in Abbildung 4.41 dargestellt. Ein Vergleich der manuellen Auswertung (siehe oben) mit dem Dendrogramm der Clusteranalyse zeigt auf, dass hier Typ I und Typ II ein Cluster bilden (Gruppe I). Die Proben von Typ III (C8, Bl. und C16 aus Costa Rica) bilden Gruppe II. Die Probe C4, Bl. zeigt hier wieder die größte Abweichung. Die Probe liegt als eigener Zweig (Gruppe III) basal zu den anderen CCN-51-Proben mit der geringsten genetischen Similarität vor. Dieses Individuum zeigt verschiedene Allelmuster in acht der zehn SSR-Loci.

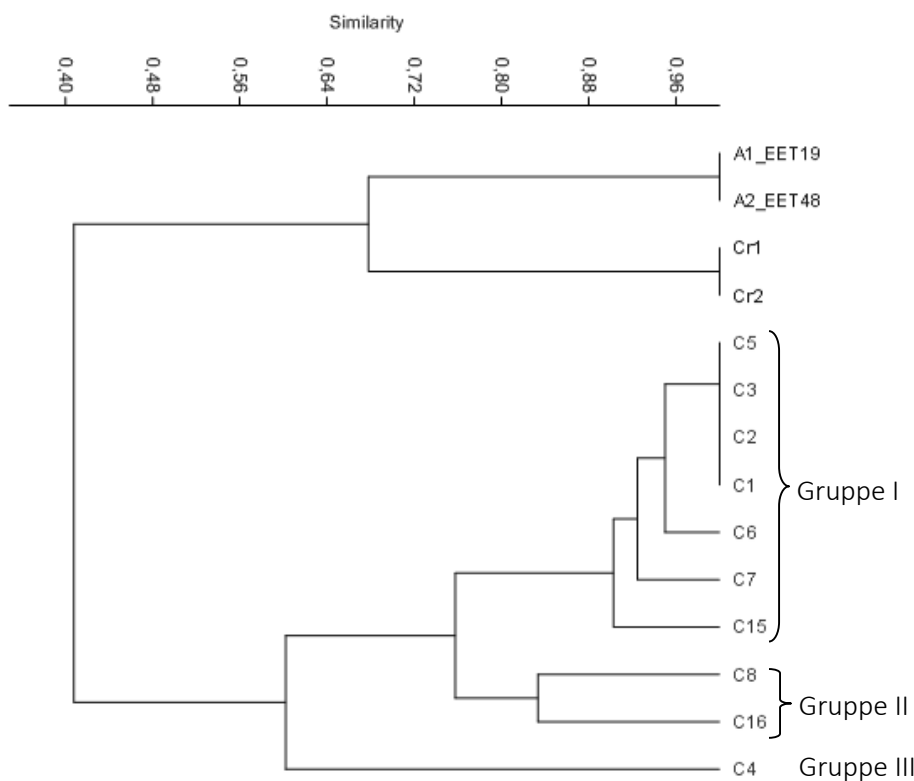


Abbildung 4.41: Clusteranalyse der CCN-51-, Arriba- und Criollo-Proben. Neighbour Joining Baum mit Similarity Index kalkuliert nach Simpson. Arriba (A1 und A2) und Criollo (Cr1 und Cr2) wurden als Außengruppen in die Analyse integriert. Entsprechend der Gruppenbildung der CCN-51-Proben wurden drei Untergruppen innerhalb des CCN-51-Probenpools bestimmt.

Die Gruppeneinteilung geht mit den Beobachtungen und Ergebnissen der chloroplastengenombasierten Befunde (siehe 4.5 und 4.6) einher (142). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse würde man die Proben in derselben Weise gruppieren: C1, Bl. – C3, Bl, C5, Bl. – C7, Bl. als erste, C8, Bl. und C16 als zweite und C4, Bl. als dritte Gruppe.

Neben den CCN-51-Proben wurden zwei Arriba- und zwei Criollo-Proben untersucht, um die Abweichungen der Ergebnisse des CCN-51-Probenpools im Kontext zu anderen Kakaosorten zu bewerten. Die SSR-Muster der zwei Arriba-Proben zeigten einen hohen Grad an Übereinstimmung. Der einzige Unterschied war beim SSR-Locus mTcCIR12 zu erkennen (siehe Tabelle 4.14). Dieser wird mit der sexuellen Reproduktion des Organismus erklärt. Die zwei Criollo-Proben zeigten ebenfalls nahezu identische Ergebnisse. Unterschiede zwischen den Arriba- und den Criollo-Proben waren bei den Mikrosatelliten mTcCIR1, mTcCIR6, mTcCIR11, mTcCIR24 und mTcCIR25 festzustellen.

Entsprechend den chloroplastengenombasierten Untersuchungen und den identifizierten Biomarkern (siehe 4.5 und 4.6) lag der Verdacht nahe, es handle sich bei der Kakaosorte CCN-51 nicht um einen reinen Klon. Die Analyse der im Kerngenom zu lokalisierenden Mikrosatelliten deutet auf dasselbe hin. Die Hypothese, CCN-51 sei kein reiner Klon, wird somit durch verschiedene Marker in zwei unterschiedlichen Genomen bestätigt.

Eine mögliche Erklärung für diese genetische Variation innerhalb des CCN-51 sind Fehler bei der Fortpflanzung, z. B. das Wachstum aus der Sämlingsunterlage oder des Sprossklons nach dem Pfropfen. Ferner kann in einigen Fällen eine Saatgutvermehrung nicht ausgeschlossen werden. Dadurch sind eine Falschdeklaration und Fehlidentifizierung bei der Pflanzenerfassung und in Pflanzensammlungen denkbar. Falsche Identifizierungen von Kakaoproben in Keimgewebesammlungen wurden von anderen Forschungsteams bereits erkannt (143), (144).

Bei näherer Betrachtung der acht SSR-Loci, in denen sich die Probe C4, Bl. von den anderen CCN-51-Proben unterscheidet, ist auffallend, dass jeweils ein Allel der Mikrosatelliten CCN-51-typisch ist, während das zweite Allel abweicht (siehe Tabellen 4.14 und 4.15). Daher ist bei C4, Bl. wahrscheinlich, dass zwei verschiedene Genome miteinander kombiniert wurden, wobei dieses Muster typisch bei einer Fremdbefruchtung ist. Bei der Probe weicht auch der chloroplastidäre Haplotyp ab. Die Chloroplasten werden beim Kakao, wie bei Angiospermen üblich, maternal vererbt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der vom CCN-51 abweichende Genotyp maternalen Ursprungs ist.

Zusammenfassung und Fazit

Innerhalb eines CCN-51-Probenpools wurden verschiedene Muster detektiert. Entsprechend der Clusteranalyse (siehe Abbildung 4.41) bilden die ecuadorianischen und einige aus Costa Rica stammende Proben eine Gruppe und zwei aus Costa Rica erhaltene Proben formieren eine zweite Gruppe, während die ICGD-Probe der University of Reading, Großbritannien, einen eigenen Zweig bildet. Verschiedene Genotypen können unterschieden werden, wobei einige dieser genetischen Unterschiede durch somaklonale Variationen erklärt werden können.

Das trifft hingegen nicht auf die am stärksten abweichende Probe (C4, Bl.) zu. Hier ist die Einkreuzung eines fremden Genoms denkbar. Die Proben C4, Bl., C8, Bl. und C16 sollten aufgrund der von den anderen CCN-51-Proben abweichenden Muster der SSR-Loci genauer untersucht werden, um sie weiterhin zweifelsfrei der Sorte CCN-51 zuordnen zu können.

Anhang

5.1 Probenmaterial

Tabelle 5.1: Probenmaterial, Kakaoblätter.

Name	Sorte	Ursprung und Details
C1, Bl.	CCN-51	Crespo's Farm, Naranjal, Ecuador
C2, Bl.	CCN-51	Crespo's Farm, Naranjal, Ecuador
C3, Bl.	CCN-51	Monica's Farm, Playas, Ecuador
C4, Bl.	CCN-51	ICGD, University of Reading, England
C5, Bl.	CCN-51	Botanischer Garten, Hamburg, Deutschland
C6, Bl.	CCN-51	Botanischer Garten, Hamburg, Deutschland
C7, Bl.	CCN-51	CCN-51 Typ 1, ICS-3-CATIE, Cartago, Costa Rica
C8, Bl.	CCN-51	CCN-51 Typ 2, ICS-3-CATIE, Cartago, Costa Rica
A1, Bl.	Arriba	EET-19, INIAP, Milagro, Ecuador
A2, Bl.	Arriba	EET-48, INIAP, Milagro, Ecuador
A3, Bl.	Arriba	EET-62, INIAP, Milagro, Ecuador
A4, Bl.	Arriba	EET-95, INIAP, Milagro, Ecuador
A5, Bl.	Arriba	EET-96, INIAP, Milagro, Ecuador
A6, Bl.	Arriba	EET-103, INIAP, Milagro, Ecuador
A7, Bl.	Arriba	EET-544, INIAP, Milagro, Ecuador
A8, Bl.	Arriba	EET-558, INIAP, Milagro, Ecuador
E1, Bl.	Eltern	ICS-95 I, Soraya's Farm, Naranjal, Ecuador
E2, Bl.	Eltern	ICS-95 II, Soraya's Farm, Naranjal, Ecuador
E3, Bl.	Eltern	Canelo I, Soraya's Farm, Naranjal, Ecuador
E4, Bl.	Eltern	Canelo II, Soraya's Farm, Naranjal, Ecuador
E5, Bl.	Eltern	IMC-67, INIAP, Milagro, Ecuador
Cr1, Bl.	Criollo	EEB23I, INIAP, Milagro, Ecuador
Cr2, Bl.	Criollo	INIAP, Milagro, Ecuador

Tabelle 5.2: Probenmaterial, Kakaobohnen.

Name	Sorte	Weiteres
C1	CCN-51	Chocoladefabriken Lindt & Sprüngli GmbH, Aachen, Deutschland
C2	CCN-51	Schwartauer Werke GmbH & Co. KGaA, Schwartau, Deutschland
C3	CCN-51	Handelsgesellschaft Schlüter & Maack, Hamburg, Deutschland
C4	CCN-51	H.D.COTTERELL GmbH & Co. KG, Marke ECUACOFFEE S.A., Hamburg, Deutschland
C5	CCN-51	H.D.COTTERELL GmbH & Co. KG, Marke PO Ecuador Osella, Hamburg, Deutschland
C6	CCN-51	Transmar Commodity Group Ltd., Hamburg, Deutschland
C7	CCN-51	Crespo's Farm, Naranjal, Ecuador
C8	CCN-51	Monica's Farm, Naranjal, Ecuador
C10	CCN-51	Ecuador
C11	CCN-51	Ecuador
C12	CCN-51	Ecuador
C13	CCN-51	Ecuador
C14	CCN-51	Ecuador
C15	CCN-51	Typ I, Costa Rica
C16	CCN-51	TypII, Costa Rica
A1	Arriba	Alfred Ritter GmbH & Co. KGaA, Waldenbuch, Deutschland
A2	Arriba	Chocoladefabriken Lindt & Sprüngli GmbH, Aachen, Deutschland
A4	Arriba	Hamburger Quartiersmannsbetrieb Quast & Cons. GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
A5	Arriba	EET-95, INIAP, Quito, Ecuador
A6	Arriba	EET-103, INIAP, Milagro, Ecuador
A7	Arriba	EET-400, INIAP, Milagro, Ecuador
A8	Arriba	Arriba mixed, INIAP, Milagro, Ecuador
A9	Arriba	Arriba mixed, UNOCACE, Ecuador
A10	Arriba	Nacional Buena Fe, Transmar Commodity Group Ltd., Guayaquil, Ecuador
A11	Arriba	Nacional Vines, Transmar Commodity Group Ltd., Guayaquil, Ecuador
A12	Arriba	Nacional Esmeraldas, Transmar Commodity Group Ltd., Guayaquil, Ecuador
A13	Arriba	Nacional Manabi, Transmar Commodity Group Ltd., Guayaquil, Ecuador
A14	Arriba	Nacional Sur, Transmar Commodity Group Ltd., Guayaquil, Ecuador
A15	Arriba	MCCH, Hamburg, Deutschland
A16	Arriba	Casaluker, Hamburg, Deutschland
A17	Arriba	Agro Manobanda, Hamburg, Deutschland
A18	Arriba	Quevexport, Hamburg, Deutschland
A19	Arriba	Carsan Export, Hamburg, Deutschland
A20	Arriba	Santa Fe, Hamburg, Deutschland
A21	Arriba	Adelpro, Hamburg, Deutschland
A22	Arriba	Gold Cocoa, Hamburg, Deutschland
A23	Arriba	Cafeica, Hamburg, Deutschland
A24	Arriba	Ecuadoriana, Hamburg, Deutschland
A25	Arriba	Eximore, Hamburg, Deutschland
A26	Arriba	Transmar Commodity Group Ltd., Guayaquil, Ecuador
A27	Arriba	Agroexport, Hamburg, Deutschland
A28	Arriba	AYJ, Hamburg, Deutschland
A29	Arriba	Risiokcacao, Hamburg, Deutschland
A30	Arriba	Exportadora Kam, Hamburg, Deutschland
A31	Arriba	Osella, Hamburg, Deutschland

Name	Sorte	Weiteres
A32	Arriba	Macias, Hamburg, Deutschland
A33	Arriba	Vervesa, Hamburg, Deutschland
A34	Arriba	P. O. Ecuador
A35	Arriba	Victoria's Farm, Playas, Ecuador
Cr1	Criollo	EEB23I, INIAP, Ecuador

Tabelle 5.3: Probenmaterial, Schokolade.

Name	Relevante Angabe	Hersteller und Herkunft
S1	Besonders milde Edelkakaosorten	Lindt Excellence, mild 85 % Cacao, Edelbitter mild Chocoladefabriken Lindt & Sprüngli GmbH, Aachen, Deutschland
S2	Arriba	Hachez, Cocoa d'Arriba classic, 77 % Cacao, milde Edel-Bitter-Chocolade Bremer Hachez Chocolate GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
S3	40 % vom Kakaoanteil Arriba	Rittersport, Edel-Vollmilch, 35 % Kakao, mit edlem Arriba-Kakao aus Ecuador Alfred Ritter GmbH & Co. KG, Waldenbuch, Deutschland
S4	Mischung mit exquisiten Edelkakaosorten	Lindt Excellence, 85 % Cacao, Edelbitter kräftig Chocoladefabriken Lindt & Sprüngli GmbH, Aachen, Deutschland
S5	Arriba	Zetti, Edelbitter 85 % Kakao, feinste edelmilde Bitterschokolade mit erlesenem Arriba Edelkakao Goldeck Süßwaren GmbH, Leipzig, Deutschland
S6	100 % Arriba	Caoni, Dark Arriba Chocolate, Manabi 55 % Cacao, BLK Corporation, Almagro, Ecuador
S7	Edelkakao	/
S8	Konsumkakao	Milka Alpenmilchschokolade, Mondelez Deutschland Services GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland

5.2 Puffer, Kits, PCR-Reagenzien, Enzyme und Chemikalien

Tabelle 5.4: PCR-Reagenzien.

Reagenz	Bezeichnung, Hersteller	Zusammensetzung
BSA-Lösung	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland	4 %ig in Wasser
DNA-Marker peqGold Ladder Mix	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	-
dNTPS	dNTP-Mix, Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland (Eigene Herstellung)	Gesamtkonzentration: 10 mM in Wasser, jeweils 2,5 mM
Phusion-Polymerase	Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland	-
Primer	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	Eingestellt: 100 µM
Reaktionspuffer, 5x (Phusion)	5x Phusion HF Buffer, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland	Keine genauen Angaben, 100 % DMSO, 50 mM MgCl ₂
Reaktionspuffer, 10x (<i>Taq</i>)	Eigene Herstellung	30 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, 0,1 % Triton® X-100
SYBR Green® I	SYBR Green® I nucleic acid gel stain, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	10 000fach Konzentrat
<i>Taq</i> -Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus quaticus</i> , eigene Herstellung	ca. 30 U/µL

Tabelle 5.5: Enzyme.

Enzym	Bezeichnung, Hersteller	Konzentration, units/mL
<i>AseI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland	10 000
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland	20 000
<i>EcoRV</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland	20 000
<i>PsiI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland	5 000
<i>ExoI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland	20 000
FastAP	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	1 000

Tabelle 5.6: Verwendete Kits.

Kit	Herstellerangaben	Weitere Angaben
DNeasy Plant Mini/ Maxi Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland	DNeasy Mini (Maxi) Spin Column, QIAshredder Mini (Maxi) Spin Column, RNase A, Puffer, Collection Tube
Experion™ DNA 1 K Analysis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland	Experion 15-1 500 bp DNA analysis kit, 10 DNA chips, 1 cleaning chip, reagents (DNA stain and DNA 1K gel, ladder, loading buffer), 3 spin filters
SALSA MLPA EK1 reagent kit FAM	MRC Holland, Amsterdam, Niederlande	SALSA MLPA buffer, SALSA Ligase-65, Ligase Buffer A, Ligase Buffer B, SALSA PCR primer mix, SALSA polymerase
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland	Perfect Bind DNA Columns, Collection Tube, Binding Buffer, CG Wash Buffer
Chloroplast Isolation Kit	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland	Chloroplast Isolation Buffer 5x (CIB), Percoll, Bovine Serum Albumin (BSA), Filter Mesh 100
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master Kits	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	Master-Mix (2fach), MgCl ₂ (25 mM), H ₂ O (prep.grade)
TruSeq Kit v3 Illumina	Illumina GmbH, München, Deutschland	

Tabelle 5.7: Puffer und Lösungen.

Lösung/ Puffer	Hersteller	Zusammensetzung
ABI-Größenstandard (GeneScan-500-LIZ™ size standard)	Life technologies, Darmstadt, Deutschland	
Äquilibratorpuffer	Eigene Herstellung	50 mM Tris-HCl pH 8.0
CIB-Puffer	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland	/
Ethidiumbromid-Lösung	Eigene Herstellung	0,001 % in Wasser
Elutionspuffer	Eigene Herstellung	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM Biotin
Extraktionspuffer	Eigene Herstellung	55 mM CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris, 20 mM Na ₂ -EDTA, HCl qs pH 8,0
HiDi™ Formamid	Life technologies, Darmstadt, Deutschland	
Loading Dye	Eigene Herstellung	50 Vol. % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol in TAE-Puffer
Natriumacetat-Puffer	Eigene Herstellung	3 M Natriumacetat in Wasser
NEB Puffer 3	New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA	100 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl 1mM Dithiothreitol pH 7,9

Lösung/ Puffer	Hersteller	Zusammensetzung
NEB Puffer 4	New England BioLabs Inc., Massachusetts, USA	50mM Kaliumacetat 20mM Tris/Acetat 10mM Magnesiumacetat 1mM Dithiothreitol pH 7,9
NEB EcoRI Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland	50 mM NaCl 100 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 0,025 % Triton X-100 pH 7,5
Plasmid-Lösung	Eigene Herstellung	10 ng/μL
Puffer A (dHPLC)	Eigene Herstellung	25 mL TEAA mit Wasser auf 500 mL auffüllen
Puffer B (dHPLC)	Eigene Herstellung	Zu 25 mL TEAA 125 mL Acetonitril hinzugeben und mit Wasser auf 500 mL auffüllen
Puffer nach Rödiger et al.	Eigene Herstellung	0,45 M Saccharose; 15 mM MOPS; 1,5 mM EGTA; KOH qs pH 7,4 Vor Gebrauch Zugabe von: 0,6 % PVP; 0,2 % BSA, 10 mM DTT, 0,2 mM PMSF
Regenerationspuffer	Eigene Herstellung	50 mM Tris-HCl pH 6,8
Stocklösung	Eigene Herstellung	500 mM Tris
SYBR Green I-Lösung	Eigene Herstellung	1:6250-Verdünnung von SYBR Green® I
Tris-Acetat—EDTA- Puffer (TAE-Puffer), 50x	Eigene Herstellung	40 mM Tris/ Acetat; 2 mM EDTA; HCl qs pH 8,2
TAE-Puffer, 1x	Eigene Herstellung	1:50-Verdünnung aus TAE- Puffer, 50x

Tabelle 5.8: Chemikalien.

Chemikalie	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Acetonitril	GHS02, GHS07	225-302/312/3 32-319	210-305/351/338- 403/235	Merck
Agarose	/	/	/	Serva
Biotin	/	/	/	Sigma Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	/	/	/	Merck
Bromphenolblau	/	/	/	Eigene Abfüllung
Cetyltrimethylammonium- bromid (CTAB)	GHS05, GHS07, GHS09	302-315-318- 335-400	261-273-280- 305/351/338	Sigma-Aldrich
Dinatriummethyldiamin- tetraessigsäure (Na ₂ -EDTA)	GHS07	319	305/351/338	Roth

Chemikalie	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Dithiothreitol (DTT)	GHS07	302/315/319/335	280/301+312/302+352/304+340/305+351+338/403+233	Merck
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	/	/	/	Merck
Eisessig, 100 %, p.a.	GHS02, GHS05	226-341	280-301/330/331-305/351/338	Roth
Ethanol, absolut, p.a.	GHS02	225	210	Eigene Abfüllung
Ethanol, 70 %	GHS02	225	210	Eigene Abfüllung
Ethidiumbromid	GHS06, GHS08	302-330-341	281-304/340	Fluka
Glycerin	/	/	/	Roth
Isopropanol	GHS02, GHS07	225-319-336	210-233-305/351/338	Eigene Abfüllung
Kaliumhydroxid (KOH)	GHS05, GHS07	290/302/314	280/301+330+331/305+351+338/308+310	Merck
3-(N-morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	GHS07	315-319-335	261-305+351+338	Sigma Aldrich
Natriumacetat	/	/	/	Roth
Natriumchlorid	/	/	/	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	GHS05, GHS06	301-314	280-305+351+338-310	Sigma Aldrich
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	/	/	/	Merck
Saccharose	/	/	/	Merck
Salzsäure (HCl), 37 %, p.a.	GHS05, GHS07	314-335-290	280-301/330/331/305/351/338	Merck
Stickstoff, flüssig	GHS04	280	403	Eigene Abfüllung
Trichlormethan	GHS07, GHS08	302-315-351-373	281-302/352-308/313	Roth
Triethylammoniumacetat (TEAA)	/	/	/	Transgenomic
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	GHS07	315-319	302/352-305/351/338	Roth
Xylencyanol	GHS07	319	305/351/338	Merck

5.3 Geräte und Software

Tabelle 5.9: Geräte.

Gerät	Hersteller	Beschreibung
ABI	life technologies, Darmstadt, Deutschland	ABI™ 8-capillary 3500 Genetic Analyzer
Analysenwaage	Kern ABS 220-4, max. 220 g, Genauigkeit 0,1 mg	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Autoklav	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland	Horizontaler Tischaufoklav DX 23
Bidestille	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland	Destamat, Bi 18 E
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland	Thermo scientific Heraeus
dHPLC Wave® System 3500	Transgenomic, Omaha, USA	Wave Nucleic Acid fragment Analysis System
Eismaschine	AB Ninolab, Upperlands Väsby, Schweden	Imaskin IQ-135
Elektrophoreseeinheit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	EV 231
Geldokumentationseinheit	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland	Biostep Dark Hood DH-40/50
Grobwaage	Sartorius-Werke GmbH, Göttingen, Deutschland	Sartorius 1203 MP, max. 3700 g, Genauigkeit: 0,1 g
Gefriertrocknung	Christ, Alpha 1-4 LD, Martin Christ, Osterode, Deutschland	
Kapillargelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland	Experion™ System
Kugelmühle	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	Qiagen Mixer Mill MM 300
Lightcycler	Roche, Mannheim, Deutschland	Lightcycler 480
Mikrowelle	Panasonic Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland	
Minizentrifuge	Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland	Microfuge 16
Mikroplattenleser	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland	SpectraMax M5
Moulinette	Tefal, Offenbach, Deutschland	La Moulinette, 800 W
NanoDrop	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
pH-Einstabsmesskette	Schott Geräte GmbH, Ludwigshafen, Deutschland	Blue line pH 12
pH-Meter	Schott Geräte GmbH, Ludwigshafen, Deutschland	Listed 8FG93, CG842
Plattenzentrifuge	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland	Hermle Z300K
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland	T3000 oder TGradient
Thermocycler <i>Real-time</i>	Bio-Rad, München, Deutschland	iQ5

Gerät	Hersteller	Beschreibung
Vakuumzentrifuge	Biotec Fischer GmbH Reiskirchen, Deutschland	
Vortex	Scientific Industries Inc., New York, USA	Genie 2
Wasserbad	Haake GmbH, Berlin Deutschland	
Zentrifuge	Sartorius, Göttingen, Deutschland	Sigma 3-16 PK

Tabelle 5.10: Software.

Software	Beschreibung, Hersteller
Argus XI Version 5.0.9	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Bio-Rad IQ5 Optical System Software	Standard Edition Version 2.0.148.60623, Bio-Rad Laboratories 2006
ClustalW	http://www.clustal.org/
Gene Mapper® Software 5, Full	Invitrogen by life technologies
Gentle Version 1.9.4	Autor: Magnus Manske, Universität Köln, veröffentlicht unter GPL 3000
SoftMaxPro 5.4.3	molecular devices Navigator™ Software Version 2.2.0
Vector NTI Advance® 11.5	Invitrogen by life technologies
Navigator™ Software	Transgenomic, Omaha, USA

5.4 Primersequenzen

Kerngenom

Tabelle 5.11: Recherche im Kerngenom.

Name	5' <i>Fw-Primer</i> 3'	5' <i>Re-Primer</i> 3'
NPR1	CTATTCCATGACTATGGAATAGAGTC	TCTTATAGCATGTTTGGTTTCGC
LHCP	GGTAAGCCGGTTAGATTTTAAC	CCATATCGTTTGCTTCAATTCTCC
ARGH3P	GAGGAGATACTTAATCGAAATGC	GCAATATAATTTATTGACGAATGAGG
NSLTP	GCACTTGCTTGGCATTGAC	GAATCAAGGCGGTATAACATTCTTG
TcChiB	GCTGAACCCCTTGATATTTACC	GAAGGAAACAGGGCCAAATG
TcChiB*	GCATGTCTTGGCAATGTCTTAC	CTCAATACATTGAACGGAATACCATC
TcChiB**	GGCATGTCTTGGCAATGTCTTACAAAG	GAACGGAATACCATCCCCCTCTC
TcChiB***	GAGAGGGGGATGGTATTCCGTC	GAAATAGGGGATATGAGGGCCCAAG

Chloroplastengenom

Tabelle 5.12: Recherche im cpGenom.

Name	5' <i>Fw-Primer</i> 3'	5' <i>Re-Primer</i> 3'
IR-10bpIns- <i>Fw</i>	ATATAAAATCAATCTACCCACGCTAC	ATGGTAGACTAGCTGATATTTCTATC
IR-79Ins- <i>Fw</i>	TTTCACAAATTTTACGAACGGAAGCC	TATCCGAATTGTATCCGAAACTTTCC

Partielle Sequenzierung der IRR des Chloroplastengenoms

Tabelle 5.13: Partielle Sequenzierung der IRR des cpGenoms.

Name	5' <i>Fw-Primer</i> 3'	5' <i>Re-Primer</i> 3'
IRB01F	GGATTTTTTTTTAGTGAACGTGTCAT*	AAGTATCGACGTAATTTTCATAGAGTC
IRB02F	CATCTGGCTTATGTTCTTCATGTAGC	CAACTAGGACAGAAATAAAGCATTGG
IRB03F	ATACGCCTGTAATGCATTGTATGTCC*	GAAGATACAGGAGCGAAACAATCAAC
IRB04F	AAGAAAAAATCTCTATTTGACAGGGC*	GTTTCGTTCCGTTTGAAGAAAGGAAGG*
IRB05F	CGATTCCATTAGTAATGAGGATTCGG*	GAGGATCGAACCATTTCTTCTGACTC
IRB06F	CTTCGAATATGGAATTCAAAGGGATC	TGAATATGTTAGATACCTGCGACTCG*
IRB07F	ACAATTCCTCAATATCTTGTTTCATTC	TCTTCTAGAGAATCTCCTAATTGTTT
IRB08F	GAAAAGGTCAAATCTTTGATGATTCC	TTTCCGACATCATATCCATAGTTAAC*
IRB09F	CTGAACAAGTTCCTGGATAACAAGCT*	AAATCTCTGATCAACGATAGAACAAAG*
IRB10F	GATCTAGTTCATGGCCTATTAGAAGT	TAGCATATTGTTCCATGGAGCTAAGG*
IRB11F	CGGATGAAATGAAAATTTGGATTTCATG	AATCGGGCCTTCTTTTACATATCTC*
IRB12F	CCAATTGCTTCGATTTGAAGTATCCG*	TGGAAATCCTAGCTATTCTTAGCATG
IRB13F	ATTCCAATAATTACATATCCGATTTG	CTTATCAATACACAAATGTATAACTC
IRB14F	TACGTCAGGAGTCCATTGATGAGAAG	AATATGGCTTTCAAATTAAGTTCCGA
IRB15F	GTGCAAAAGCTCTATTTGCCTCTGCC	TCACTGCTTATATACCTGGTATTGGC*
IRB16F	TCCTCGAACAATGTGATATCTCACAC	CAACATAGGTCGTCGAAAGGATCTCG*
IRB17F	GTGTGAGCTTATCCATGCGGTTATGC	GCTTCATATTCGCCTGGAGTTCGCTC*
IRB18F	AAGTCATCAGTTCGAGCCTGATTATC	TGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTC
IRB19F	CGACACTGACACTGAGAGACGAAAGC	ATAGAAAGTTGGATCTACATTGGATC*
IRB20F	GGGCTATTAGCTCAGTGGTAGAGCGC	CAAGAGCGGAGCTCTACCAACTGAGC
IRB21F	GAGGTCTCTGGTTCAAGTCCAGGATG	ATAAGCGGACTCGAACCGCTGACATC
IRB22F	AGATTTTGAGAAGAGTTGCTCTTTGG	TAGATGTCCAGTCAACTGCTGCGCCT
IRB23F	GAAACTAAGTGGAGGTCCGAACCGAC	CGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTAC
IRB24F	GGTCTCCGCAAAGTCGTAAGACCATG	ACATCACTGCACTTCCACTTGACACC
IRB25F	CTGCTGAAAGCATCTAAGTAGTAAGC	GGTTGTGGGCGAGGAGGGATTCTGAAC
IRB26F	AAATGGCTGGGGAGAGGAAAGGTTCC	ATTATCTTCATGCATAAGGATATTAG*
IRB27F*	TGGCTCTATTTTATTATATTCCATCC	GGTGGATACCTCTTGTTCCCTGTTTAT*

* modifiziert

Insertion in der IRR, (TAAAG)_n**Tabelle 5.14:** Insertion in der Inverted Repeat Region, (TAAAG)_n.

Name	5' <i>Fw-Primer</i> 3'	5' <i>Re-Primer</i> 3'
(TAAAG) _n	GCAGCACCTTAGGATGGCATAGC	CTCTGGGTGCCTAGGTATCCAC

Primer für die PCR-RFLP

Tabelle 5.15: PCR-RFLP.

Name	Fw-Primer 5' 3'	Re-Primer 5' 3'
8C _{Psil}	CACCGAAGAACCCTATTTAGAGTCCG	GAGTGGACTAAAGCGTCGGATTGC
17C _{Psil} /A _{EcoRI}	CGGTGGACAAAGCAAATCTCTTCATC	CGGATTTGAACCGATGACTTACGC
21C _{AseI}	CTCCCTCGGCAAACTGGGATAAAG	CAGGTGGTTTGGCCAATAGTAGGC
43A _{EcoRI}	GAACCAAAGTTCCAGATTCGATATAG	CATATACTTATGGATCACCATTCCAAG
44C _{EcoRV}	CTCAATCTCGGCCTTATTTCTAAGACAAAA G	CGAAATAGAGTCAATCAACACTATATGGCT C

Bestimmung des Verhältnisses von Kern- und Plastiden-DNA mittels *Real-time* PCR**Tabelle 5.16:** Bestimmung des Verhältnisses von Kern- und Plastiden-DNA mittels *Real-time* PCR.

Name	Fw-Primer bzw. Sonde 5' 3'	Re-Primer bzw. Sonde 5' 3'
Uni3*	GCAACGGATATCTCGGCTCT	TTCAAAGACTCGATGGTTCACG
TC-Vic*	CCCTGCCTGTTAATTCTC	TTCAGGTTTATTATTTCCAGCG
Chloro-Ins-3'***	AGTGCAACTGGGTGAATCC	AATAAATCTAAGTGTAGTCCTTGG
psbA**	CATGCATAGCACTGAATAGGG	AACTTCATGATTGTATTCCAGGC

*Primer-Paar hybridisiert auf der Kern-DNA; **Primer-Paar hybridisiert auf der Plastiden-DNA

Mikrosatellitenanalyse

Tabelle 5.17: Mikrosatellitenanalyse.

Name	Fw-Primer 5' 3'	Re-Primer 5' 3'
mTcCIR1	[6FAM] GCAGGGCAGGCTCAGTGAAGCA	TGGGCAACCAGAAAACGAT
mTcCIR6	[6FAM] TTCCCTCTAAACTACCCTAAAT	TAAAGCAAAGCAATCTAACATA
mTcCIR8	[6FAM] CTAGTTTCCCATTTACCA	TCCTCAGCATTTTCTTTC
mTcCIR11	[6FAM] TTTGGTGATTATTAGCAG	GATTCGATTTGATGTGAG
mTcCIR12	[6FAM] TCTGACCCCAAACCTGTA	ATTCCAGTTAAAGCACAT
mTcCIR15	[6FAM] CAGCCGCCTCTTGTTAG	TATTTGGGATTCTTGATG
mTcCIR18	[6FAM] GATAGCTAAGGGGATTGAGGA	GGTAATTCAATCATTTGAGGATA
mTcCIR24	[6FAM] TTTGGGGTGATTTCTTCTGA	TCTGTCTCGTCTTTTGGTGA
mTcCIR25	[6FAM] CTTCGTAGTGAATGTAGGAG	TTAGGTAGGTAGGGTTATCT
mTcCIR60	[6FAM] CGCTACTAACAAACATCAAA	AGAGCAACCATCACTAATCA

Weitere Primersequenzen für DNA-basierte Analytik

Tabelle 5.18: Weitere Primersequenzen für DNA-basierte Analytik.

Name	<i>Fw-Primer</i>	<i>Re-Primer</i>
	5' 3'	5' 3'
ccsA	CAGGTATCAATTGACTCAACAATTG	GAACCATAACTATGTAAACCTATTC
RFLP	CGGTGGACAAAGCAAATCTCTTCATC	CGGATTTGAACCGATGACTTACG
SNP-LPA	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACCAAAGGAAAC TTGGGCATTTATTACTTGGACCGTATTCGC GATTTATTTACATATACGAACAAATAT	P-AAATTTTGAAGGTGTAAATTCCGCAA TTGTGGCTTCTATGGGCTTTCTTATAAT TTGGATATTCTAGATTGGATCTTGCTGG CAC

5.5 Isolierung von DNA mit vorheriger Abtrennung der Chloroplasten

Isolierung der Chloroplasten

Alle Schritte wurden bei 2-4 °C durchgeführt. Die Kakaoblätter wurden auf verschiedene Weise zerkleinert:

1. 30 g des gewaschenen Probenmaterials wurden in 1-3 cm große Streifen geschnitten und die Mittelrippe entfernt.
2. 30 g des gewaschenen Probenmaterials wurden mit flüssigem Stickstoff gemörsert.
3. Das gewaschene Probenmaterial wurde gewaschen und 30 h lang lyophilisiert. 20 g des gefriergetrockneten Materials wurden mit flüssigem Stickstoff gemörsert.

Das vorbereitete Material wurde wie folgt eingesetzt:

Tabelle 5.19: Isolierung von Chloroplasten.

Schritt	Durchführung
1	Material mit 150 mL CIB-BSA-Puffer oder Puffer nach RÖDIGER et al. in der Moulinette 2 min lang homogenisieren
2	Gemisch durch einen Gewebefilter in 4 50 mL-Tubes pressen
3	Zentrifugation: 3 min, 200 g (intakte Zellen im Pellet abtrennen)
4	Überführung des Überstands in 50 mL-Tubes, Zentrifugation: 1 min, 1000 g
5	Pellets aufbrechen, jedes Pellet in 1-2 mL CIB-BSA-Puffersuspendieren, Pellets vereinen
6	4 mL Percoll und 6 mL CIB-BSA-Puffer in einem 50 mL-Tube vorlegen, mischen und mit Chloroplasten-Suspension überschichten
7	Zentrifugation: 6 min, 1 700 g (intakte Chloroplasten unten, beschädigte oben)
8	Überstand entfernen, Pellet in 1,5 mL Extraktionspuffer aufnehmen

Isolierung der DNA aus Chloroplasten

Tabelle 5.20: Isolierung von DNA aus Chloroplasten.

Schritt	Durchführung
1	Je 750 µL der Chloroplasten-Lösung bzw. 750 µL Wasser (Blindwert) wurden in 2 mL-Caps gegeben
2	Thermischer Aufschluss im Wasserbad: 30 min, 65 °C
3	Zugabe von 500 µL Trichlormethan, mischen, Zentrifugation: 5 min, 10 000 g
4	Überführung des Überstands in 1,5 mL-Cap
5	Zugabe von 500 µL Isopropanol, mischen, Inkubation: 30 min, 4 °C, Zentrifugation: 5 min, 10 000 g
6	Überstand dekantieren und verwerfen, Präzipitat in 500 µL 70 %igem Ethanol suspendieren, Zentrifugation: 6 min, 10 000 g
7	Überstand abdekantieren und verwerfen
8	Ethanol im Vakuumsexsikkator entfernen (15 min, 300 mbar)
9	Aufnahme der DNA in 50 µL bidest., autoklaviertes Wasser

5.6 Durchführung der LPA sowie der HRMA

Durchführung der LPA

Tabelle 5.21: Durchführung der LPA.

Vorbereitung Sondenmix (SM)
- Erstellung einer 100 μM Stammlösung jeder Sonde. Anschließend Erstellung einer 1 μM Lösung jeder Sonde. - Je 0,8 μL der verdünnten Sondenlösungen wurden zusammengegeben und mit Wasser auf 200 μL auffüllen (4 nM je Sonde).
DNA-Denaturierung
- 5 μL der DNA-Isolate (ca. 10-20 ng/μL) wurden in ein 200 μL Gefäß gegeben und dieses in den Thermocycler überführen. - 1. Schritt des Programms : ▪ 98 °C, 5 min ▪ 25 °C, halten
Hybridisierung
- Der Hybridisierungs-Mix (HM) wurde pro Reaktionsansatz angesetzt: 1,5 μL SALSA MLPA Puffer + 1,5 μL SM. - 3 μL des HM wurden zu den vorbehandelten DNA-Isolaten (bei 25 °C) gegeben, mischen. - 2. Schritt des Programms: ▪ 95 °C, 1 min ▪ 60 °C, 18 h
Ligationsreaktion
- Der Ligase-Mix (LM) wurde pro Reaktionsansatz angesetzt: 3 μL Ligase-65 Puffer A + 3 μL Ligase-65 Puffer B + 25 μL Wasser, mischen. - Pro Reaktionsansatz wurde 1 μL Ligase-65 zu LM gegeben, mischen. - Der Reaktionsansatz wurde auf 54 °C erwärmt. - Zu jedem Reaktionsansatz wurden 32 μL LM gegeben. - Fortsetzung des Programms: ▪ 54 °C, 15 min ▪ 98 °C, 5 min ▪ 20 °C, halten
PCR
- Der Polymerase-Mix wurde pro Reaktionsansatz angesetzt: 7,5 μL Wasser + 2 μL SALSA PCR Primermix + 0,5 μL SALSA Polymerase, mischen und auf Eis lagern . - 10 μL des Mix wurden zu jedem Reaktionsansatz gegeben, mischen. - 3. Schritt des Programms: ▪ 95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 60 s (35 Zyklen) ▪ 72 °C, 20 min ▪ 15 °C, halten

Die Detektion der LPA-Amplifikate erfolgt entweder mittels AGE (siehe 3.7) oder CGE (siehe 3.9).

Durchführung der HRMA

In der folgenden Tabelle ist das Pipettierschema für einen einfachen Ansatz sowie für die sechs verschiedenen MgCl_2 -Konzentrationen dargestellt:

Tabelle 5.22: Pipettierschema für HRMA, einfacher Ansatz.

	1 mM	1.5 mM	2.0 mM	2.5 mM	3.0 mM	3.5 mM
Mastermix	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Primermix	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
MgCl_2 -Lsg.	0,8 µL	1,2 µL	1,6 µL	2,0 µL	2,4 µL	2,8 µL
Wasser	3,2 µL	2,8 µL	2,4 µL	2,0 µL	1,6 µL	1,2 µL
DNA-Templat	5,0 µL					

Das Temperaturprogramm ist im Folgenden aufgelistet:

Tabelle 5.23: Temperaturprogramm für HRMA.

	Zyklen	Temperatur, °C	Zeit, hh:mm:ss	Ramp, °C/s
Präinkubation	1	95	00:05:00	4,40
Amplifikation	45	95	00:00:15	4,40
		55	00:00:10	2,20
		72	00:00:10	4,40
Finale Extension	1	72	00:02:00	4,40
Schmelzkurve	1	95	00:00:05	4,40
		50	00:01:00	2,20
		97	-	0,02
Abkühlungsphase	1	40	00:00:30	2,20

Für die Bestimmung der Schmelztemperaturen der Amplifikate des $(\text{TAAAG})_n$ -Repeats in Arriba und CCN-51 wurden die im Anhang 5.3 aufgelisteten Primer verwendet.

5.7 Durch andere Teams publizierte Kakaochloroplastengenome (NCBI)

Tabelle 5.24: Daten zu den bereits publizierten cpGenomen des Kakaos.

Accession Nummer	Datum	Länge	Informationen
NC_014676.2	01.08.2011	160619 bp	Country="Peru" Collection_date="1937" Genotype="Scavina 6"
HQ244500.2	01.08.2011	160619 bp	Country="Peru" Collection_date="1937" Genotype: Scavina 6
HQ336404.2	14.4.2011	160604 bp	No information
JQ228379.1	16.01.2012	160619 bp	Cultivar="Pure Criollo" Genotype: Criollo-22"
JQ228380.1	16.01.2012	160619 bp	Cultivar="Lower Upper Amazon Forastero" Country="Ghana" Genotype: Amelonado"
JQ228381.1	16.01.2012	160619 bp	Cultivar="Trinitario" Country="Trinidad and Tobago" Genotype: ICS-01"
JQ228382.1	16.01.2012	160619 bp	Cultivar="Upper Amazon Forastero, Peru" Country="Peru" Genotype: Scavina-6"
JQ228383.1	16.01.2012	160619 bp	Cultivar="Trinitario" Country="Trinidad and Tobago" Genotype: ICS-06"
JQ228384.1	16.01.2012	160619 bp	Country="Ecuador" Note="hybrid between Upper Amazon Forastero (Nacional from Ecuador) and Trinitario (from Venezuela) Genotype: EET-64"
JQ228385.1	16.01.2012	160619 bp	Cultivar="Trinitario with similarities to lower Amazon Forastero" Country="Suriname" Genotype: Stahel"
JQ228386.1	16.01.2012	160619 bp	Cultivar="Trinitario (Criollo-type)" Country="Trinidad and Tobago" Note="genotype: Pentagonum"
JQ228387.1	16.01.2012	160619 bp	Cultivar="Trinitario" Country="Trinidad and Tobago" Note="genotype: ICS-39"
JQ228388.1	16.01.2012	160619 bp	Organism="Theobroma grandiflorum"

Accession Nummer	Datum	Länge	Informationen
			Cultivar="Species related to T. cacao. Wild and cultivated in Amazon Basin" Country="Puerto Rico"
JQ228389.1	16.01.2012	160619 bp	Organism="Theobroma cacao" Cultivar="Genbank number GI328924764"

5.8 Darstellung der Ergebnisse des (TAAAG)_n-Repeats in der IRR

5.8.1 Ergebnisse weiterer Kakaobohnenproben mittels AGE

Tabelle 5.25: Zusammenfassung der Ergebnisse des (TAAAG)_n-Repeats, später gelieferte Kakaobohnen.

Probe	AGE [bp]		Ergebnis
	~110	~150	
C10	-	+	CCN-51-typisch
C11	(+)	+	Mischung
C12	(+)	+	Mischung
C13	-	+	CCN-51-typisch
C14	+	+	Mischung
C15	(+)	+	CCN-51-typisch
C16	+	-	Fehldeklaration?
A15	+	-	Arriba-typisch
A16	-	+	Fehldeklaration?
A17	-	+	Fehldeklaration?
A18	(+)	+	Mischung
A19	(+)	+	Mischung
A20	/	/	/
A21	-	+	Fehldeklaration?
A22	(+)	+	Mischung
A23	-	+	Fehldeklaration?
A24	(+)	-	Arriba-typisch
A25	-	+	Fehldeklaration?
A26	+	(+)	Mischung
A27	+	-	Arriba-typisch
A28	(+)	+	Mischung
A29	-	+	Fehldeklaration?
A30	-	+	Fehldeklaration?
A31	+	-	Arriba-typisch
A32	-	+	Fehldeklaration?
A33	+	-	Arriba-typisch
A34	-	+	Fehldeklaration?

5.8.2 Darstellungen der Ergebnisse mittels AGE

Kakaoblattproben, Eltern des CCN-51

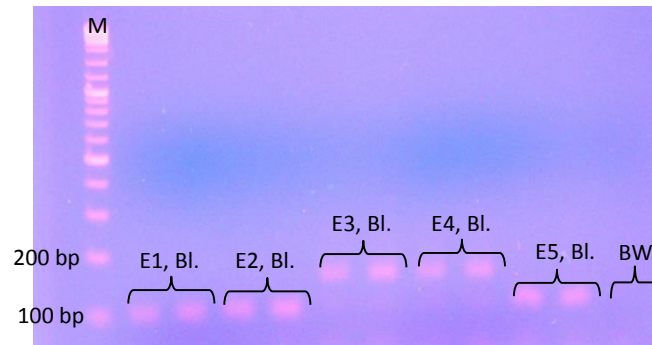


Abbildung 5.1: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Eltern des CCN-51, Kakaoblätter.

Einzelaufarbeitungen einzelner Kakaobohnenproben

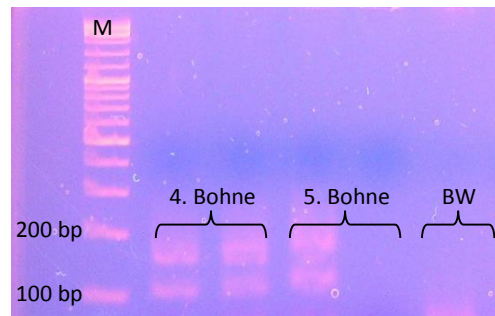
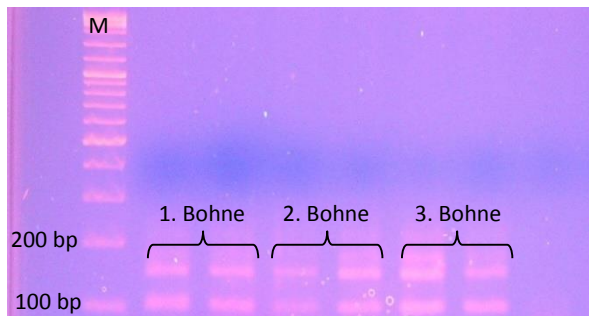


Abbildung 5.2: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A2.

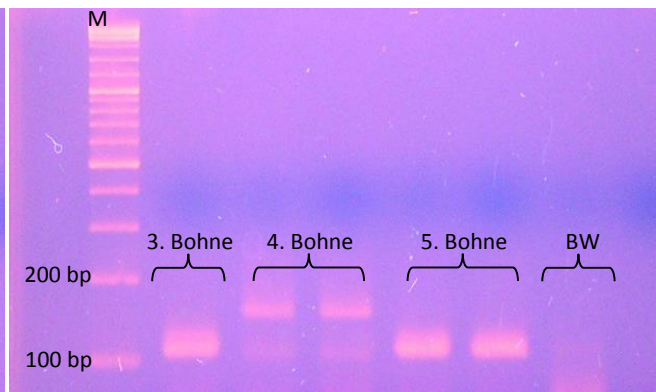
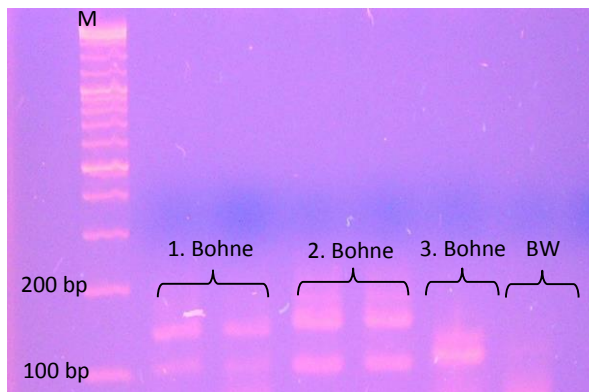


Abbildung 5.3: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A11.

5.8.3 Darstellungen der Ergebnisse mittels dHPLC

Kakaoblattprobe, Criollo

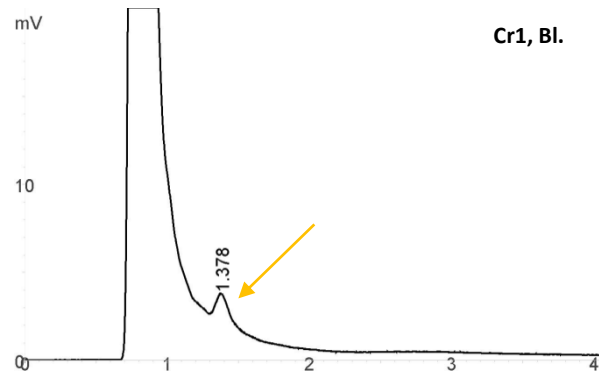


Abbildung 5.4: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Kakaosorte Cr1, Bl. bei etwa 1,4 min, Kakaoblätter.

Kakaoblattproben, Eltern des CCN-51

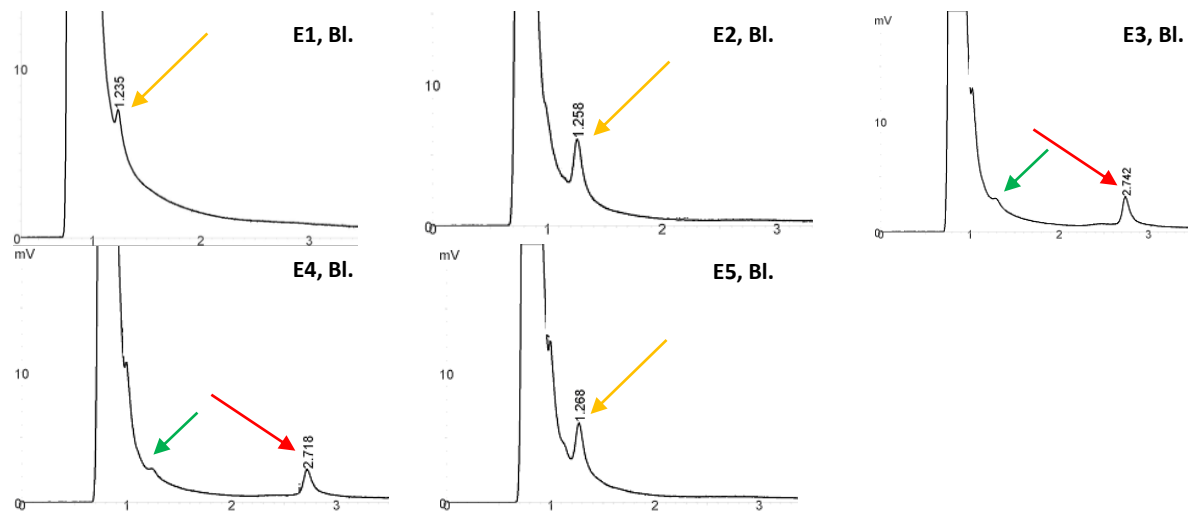


Abbildung 5.5: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Eltern von CCN-51, Kakaoblätter.

Einzelaufarbeitungen einzelner Kakaobohnenproben

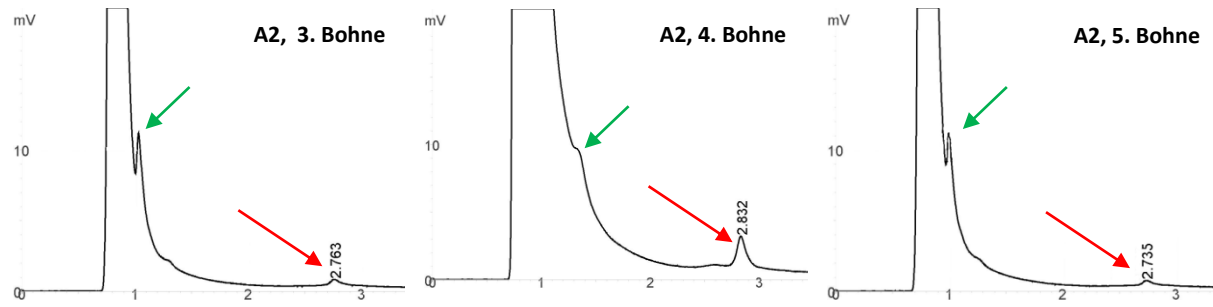


Abbildung 5.6: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A2.

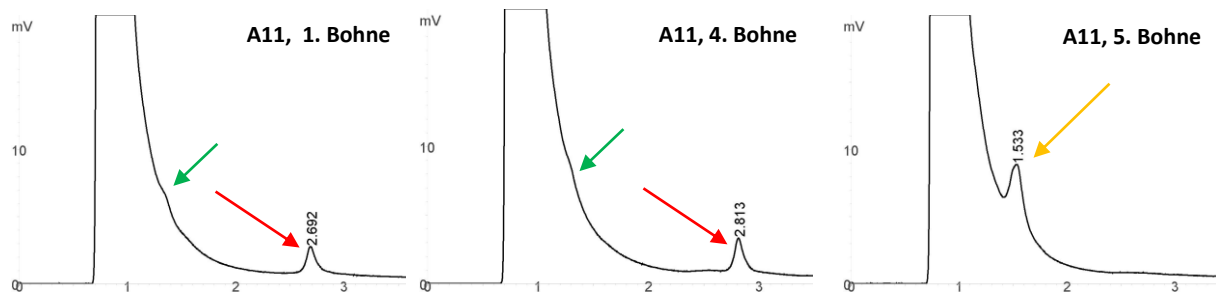


Abbildung 5.7: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A11.

5.8.4 Darstellungen der Ergebnisse mittels CGE

Kakaoblattprobe, Criollo

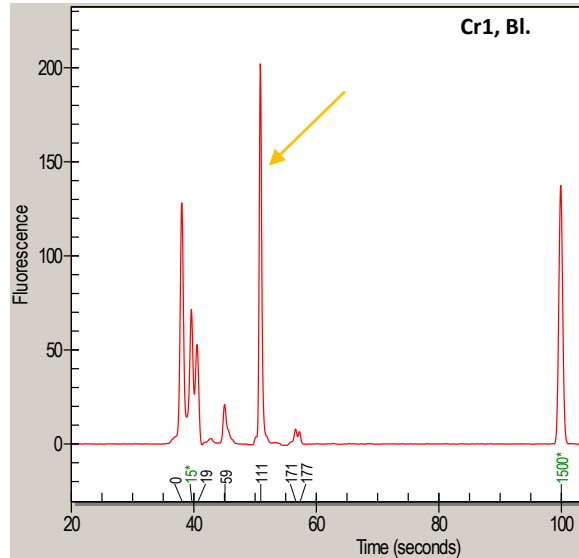


Abbildung 5.8: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Kakaosorte Cr1, Bl. bei 111 bp, Kakaoblätter.

Kakaoblattproben, Eltern des CCN-51

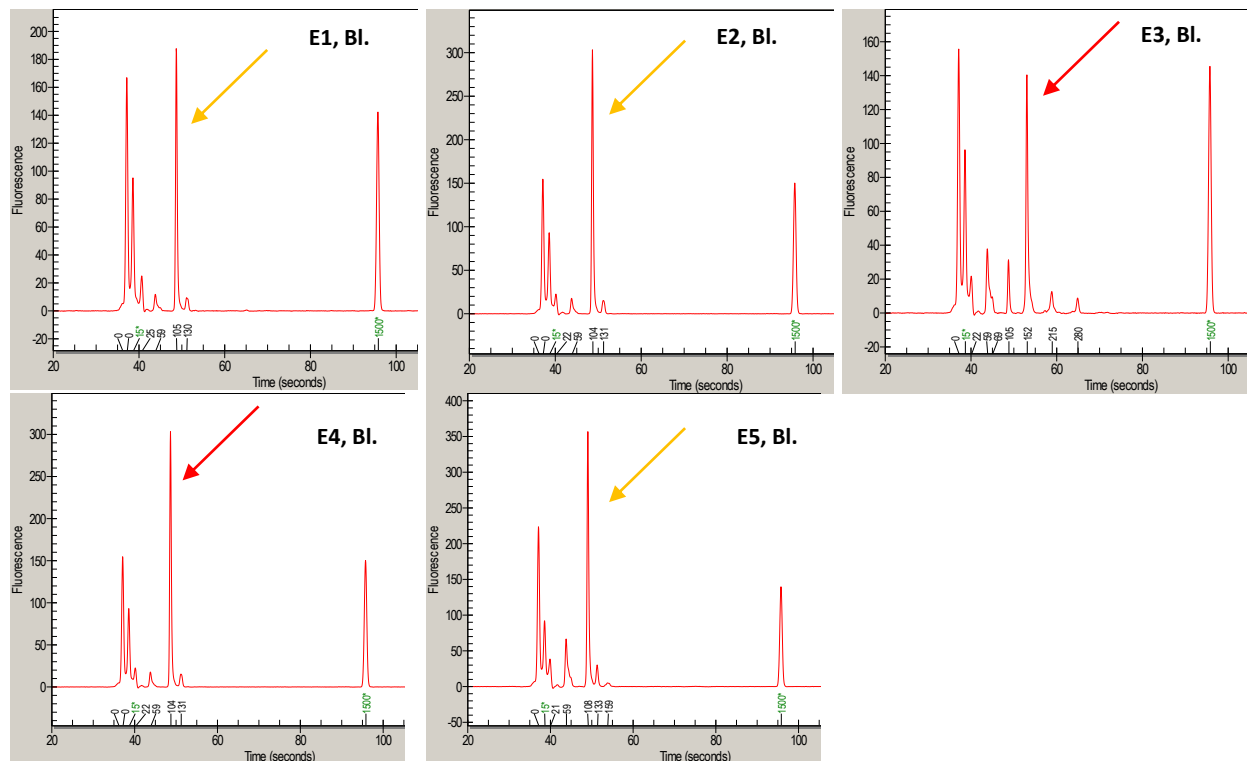


Abbildung 5.9: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Eltern von CCN-51, Kakaoblätter.

Einzelauflösungen einzelner Kakaobohnenproben

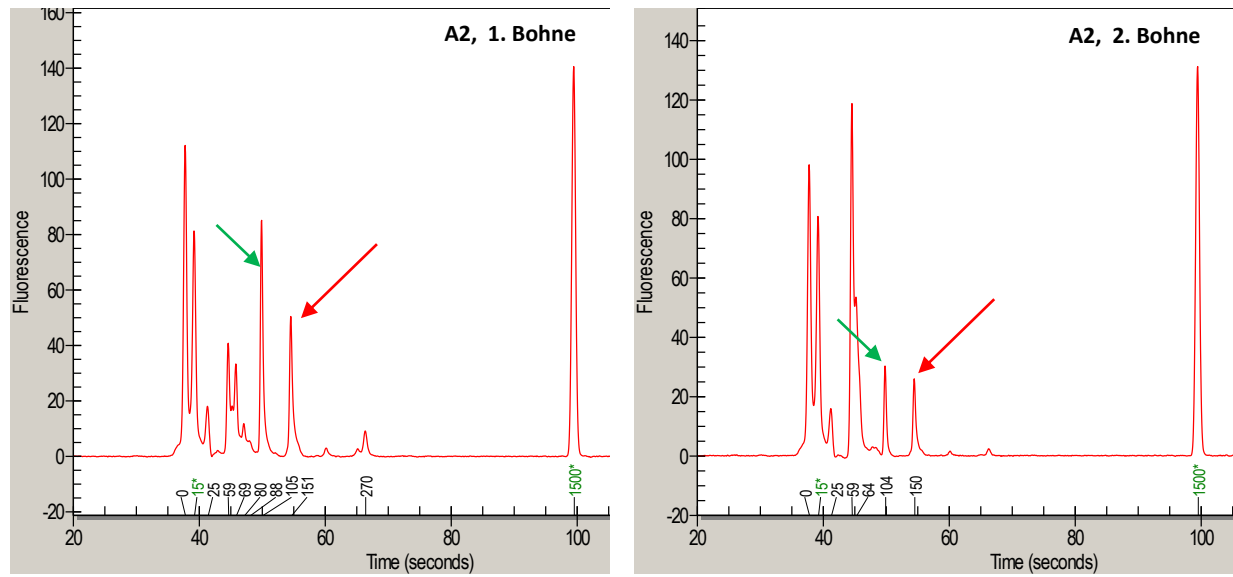


Abbildung 5.10: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A2.

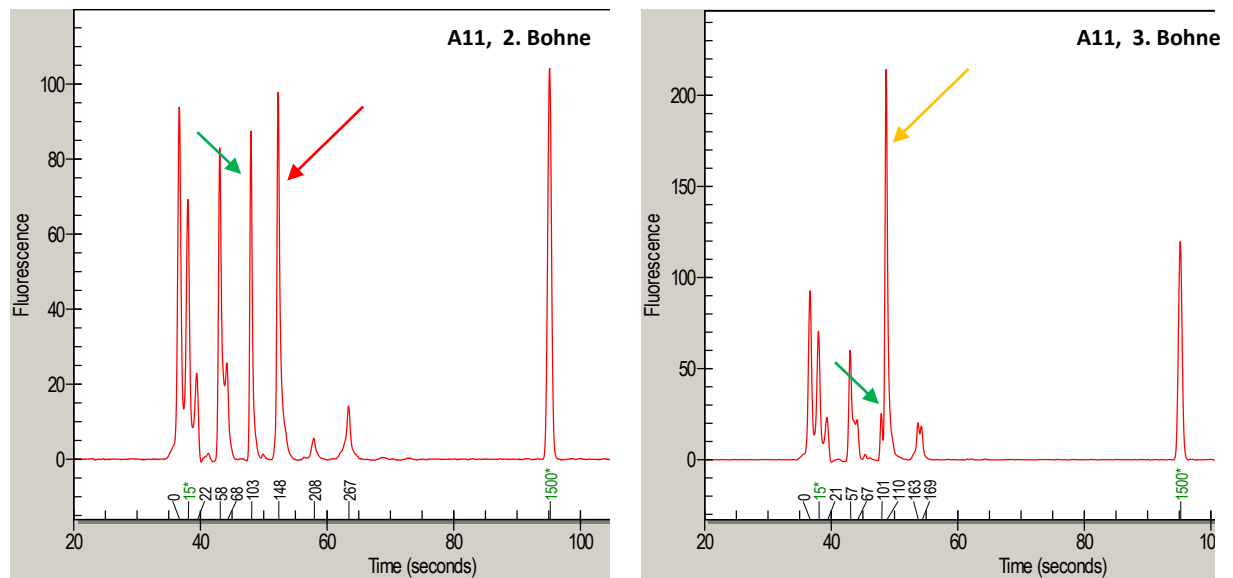


Abbildung 5.11: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats, Einzelaufarbeitungen der Probe A11.

5.8.5 Versuche der Quantifizierungen

AGE-Gel der Kakaoblattproben

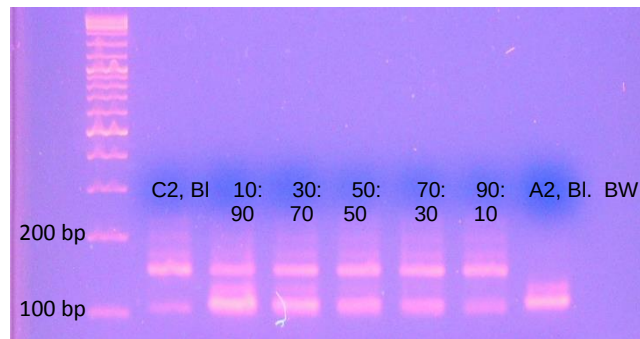


Abbildung 5.12: Mischungen von A: PCR-Produkten des $(TAAAG)_n$ -Repeats aus Arriba und CCN-51. Das Mischungsverhältnis ist in CCN-51:Arriba angegeben. Kakaoblätter.

CGE-Elektropherogramme der Kakaoblattproben

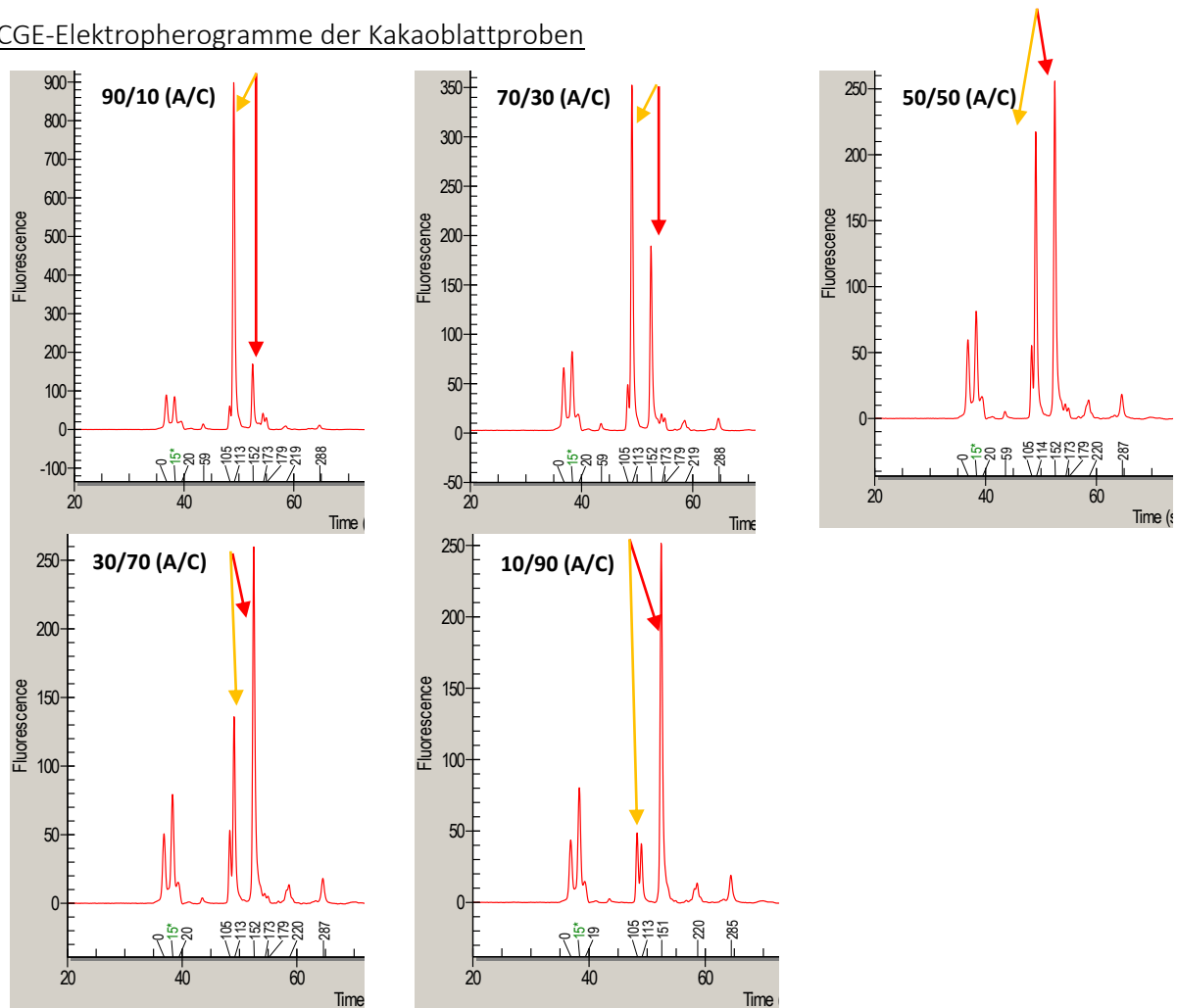


Abbildung 5.13: Mischungen von A: PCR-Produkten des $(TAAAG)_n$ -Repeats aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot). Kakaoblätter.

Tabelle 5.26: Prozentuale Flächenanteile der Peaks für die Amplifikate von Arriba und CCN-51 im Mischungsansatz A.

	A	
A/C	Arriba	CCN-51
90/10	82,8	17,2
70/30	61,8	38,8
50/50	57,0	43,0
30/70	31,7	68,3
10/90	12,9	87,1

CGE-Elektropherogramme der Kakaobohnenproben

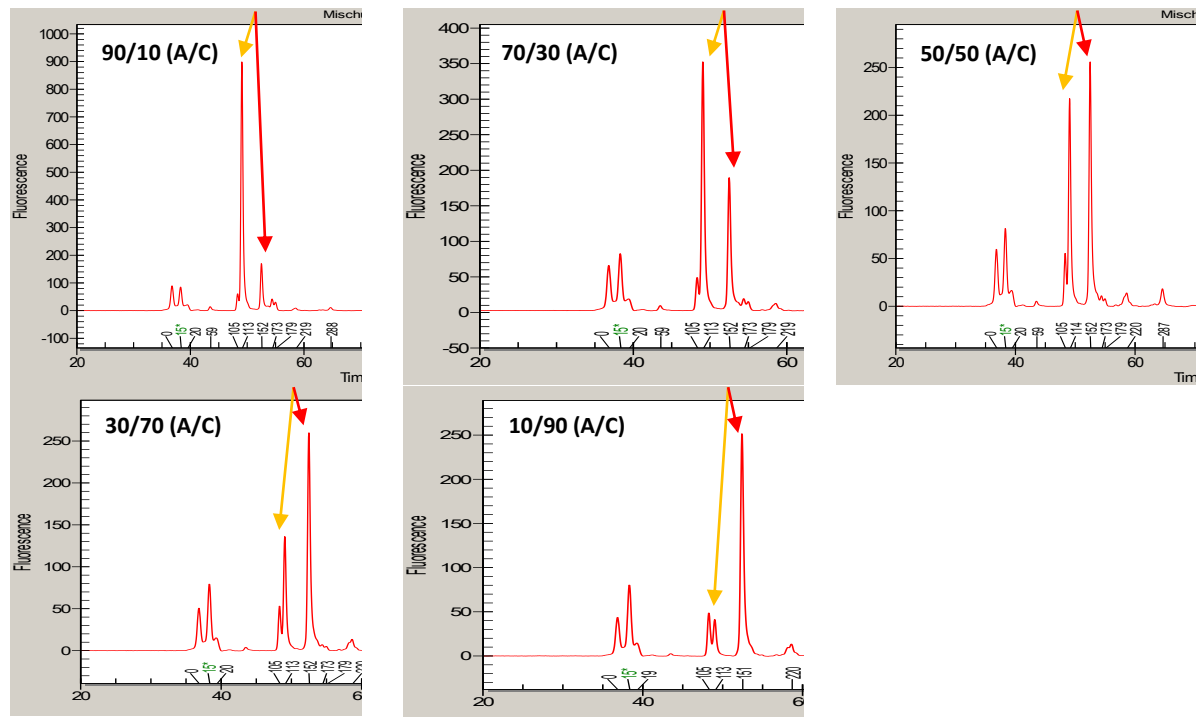


Abbildung 5.14: Mischungen von A: PCR-Produkten des (TAAAG)_n-Repeats aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot). Kakaobohnen.

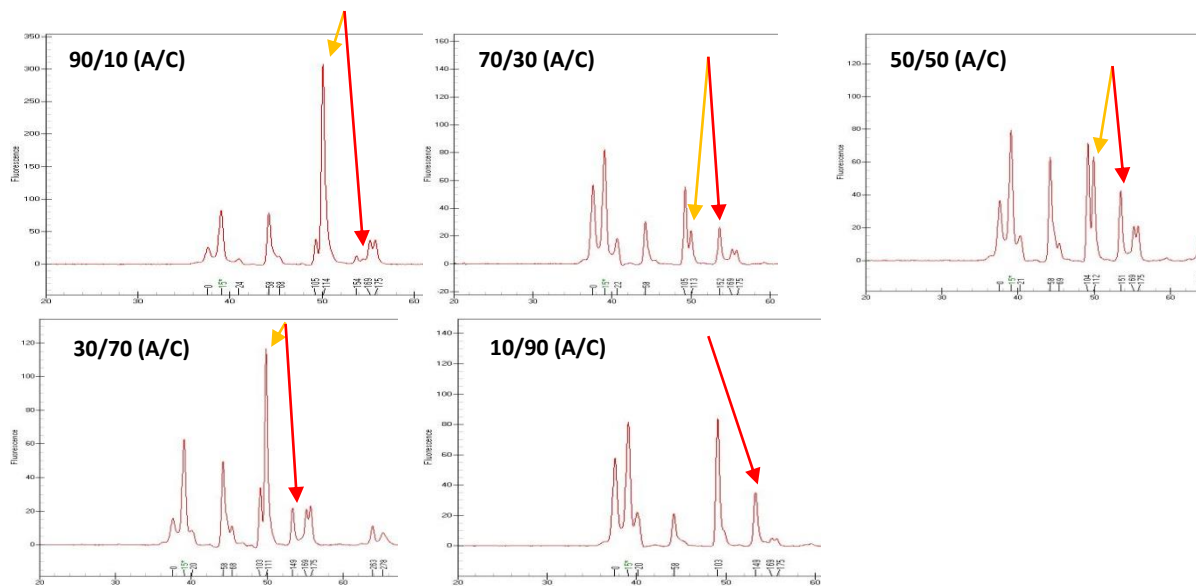


Abbildung 5.15: Mischungen von B: DNA-Isolaten des (TAAAG)_n-Repeats aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot). Kakaobohnen.

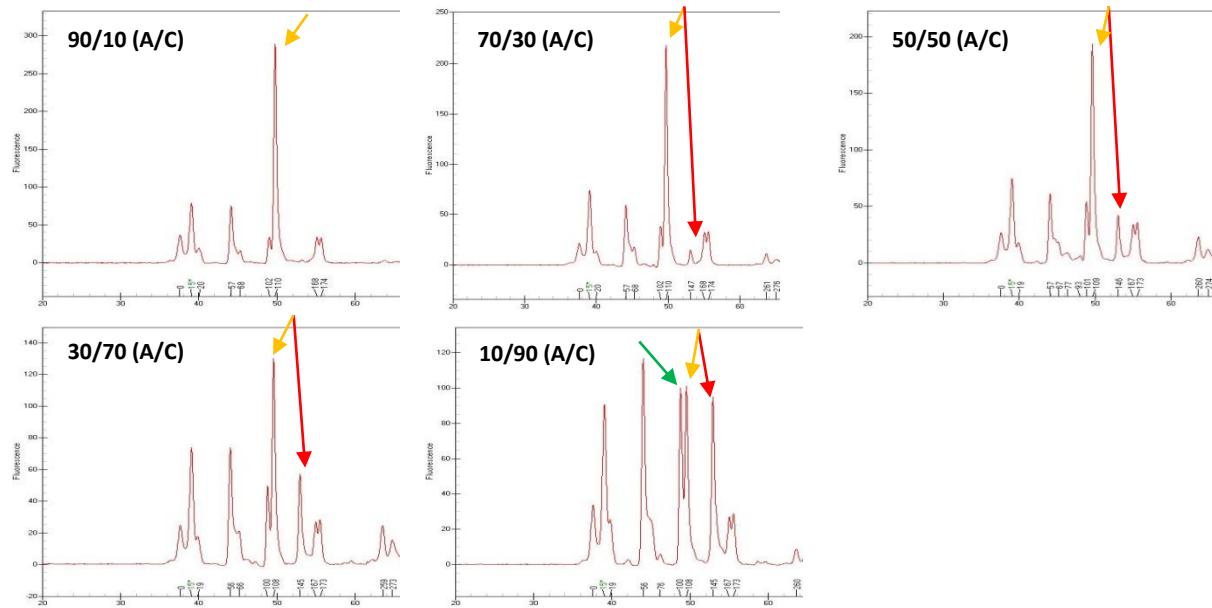


Abbildung 5.16: Mischungen von C: fein gemahlene Kakaobohnen des (TAAAG)_n-Repeats aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot).

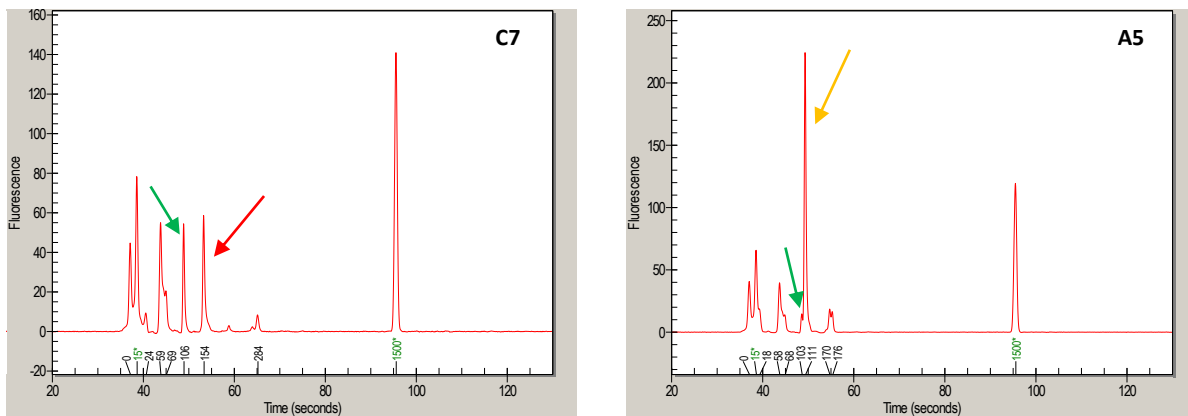


Abbildung 5.17: Elektropherogramme der reinen Proben zur Untersuchung von Mischungen Arriba (gelb) und CCN-51 (rot), Kakaobohnen. Der für die Berechnung der prozentualen Flächenanteile zueinander berücksichtigte Peak ist grün markiert.

5.8.6 Anwendung auf die Matrix Schokolade

CGE-Elektropherogramme

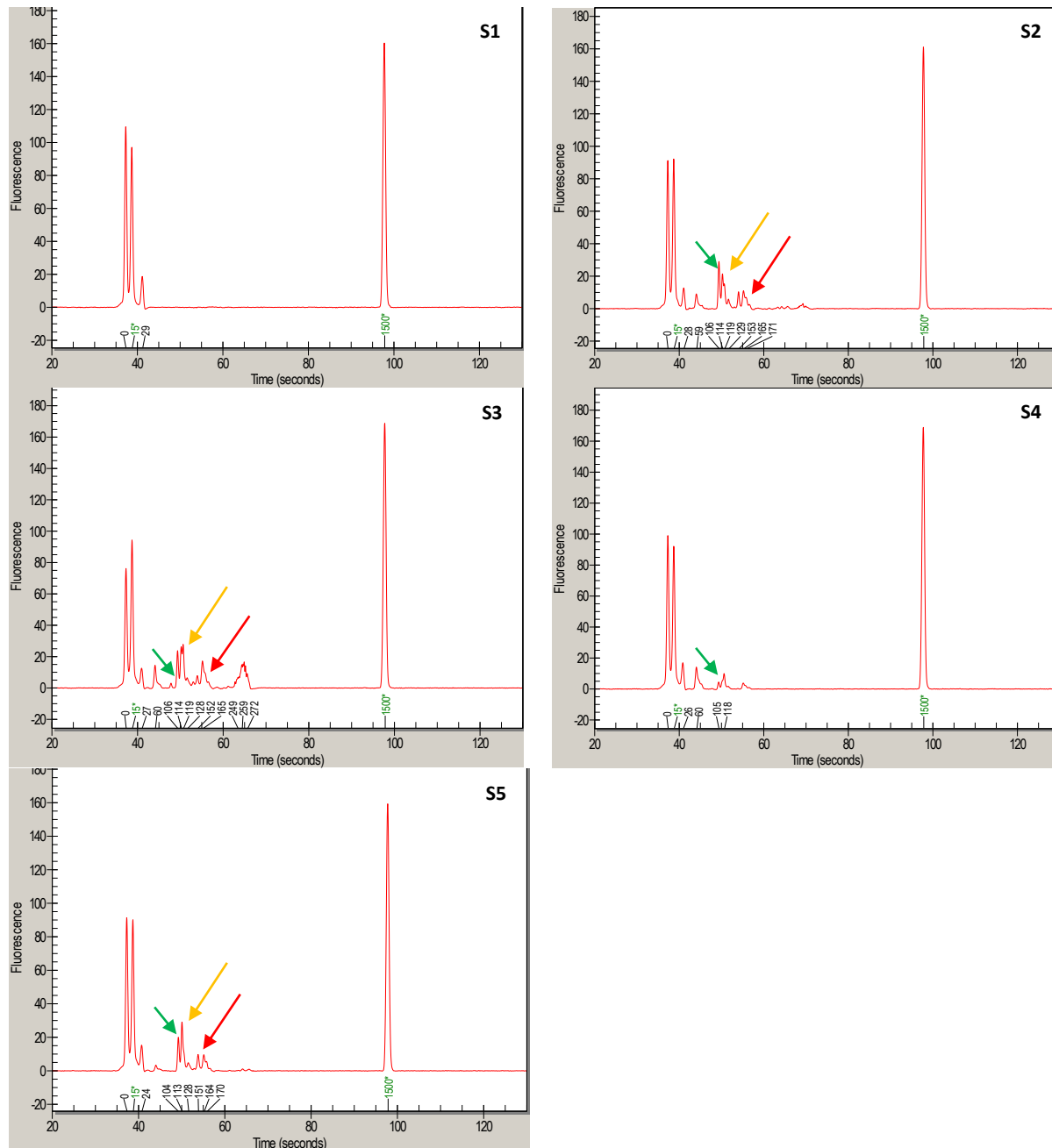


Abbildung 5.18: Detektion des (TAAAG)_n-Repeats der Schokoladenproben.

5.9 Darstellung der Ergebnisse der PCR-RFLP basierend auf fünf SNPs

5.9.1 Zugabe an BSA-Lösung

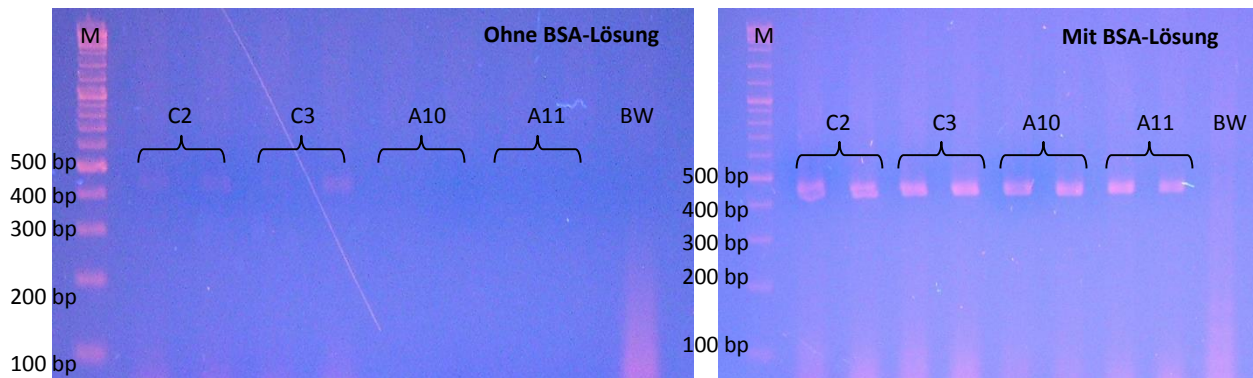


Abbildung 5.19: Methodenoptimierung der PCR-RFLP; Detektion der Amplifikate nach der PCR mittels AGE durch Einsatz des Primer-Paars 21C_{AseI}. Durch die Verwendung von 4 %iger BSA-Lösung konnte die PCR optimiert werden.

5.9.2 Ergebnisse weiterer Kakaobohnenproben mittels AGE

Tabelle 5.27: Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR-RFLP, weitere Kakaobohnenproben.

Stelle	8	17		21	43	44
Enzym	<i>PsiI</i>	<i>PsiI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>AseI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>
Erkennungssequenz	TTATAA	TTATAA	GAATTC	ATTAAT	GAATC	GATATC
Spezifität	CCN-51	CCN-51	Arriba	CCN-51	Arriba	CCN-51
C10	/	/		C-typisch	C-typisch	/
C11	/	C-typisch		C-typisch	C-typisch	/
C12	/	/		C-typisch	C-typisch	/
C13	/	/		C-typisch	C-typisch	/
C14	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A15	/	/		C-typisch	/	/
A16	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A17	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A18	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A19	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A20	/	/		/	A-typisch	/
A21	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A22	C-typisch	/		C-typisch	C-typisch	C-typisch
A23	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A25	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A26	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A27	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A28	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A29	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A30	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A31	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch
A32	/	/		C-typisch	C-typisch	/
A34	A-typisch	A-typisch		A-typisch	A-typisch	A-typisch

5.9.3 Darstellung der Ergebnisse von Kakaobohnenproben mittels CGE

Restriktionsschnittstelle 21, AseI, ATTAAT

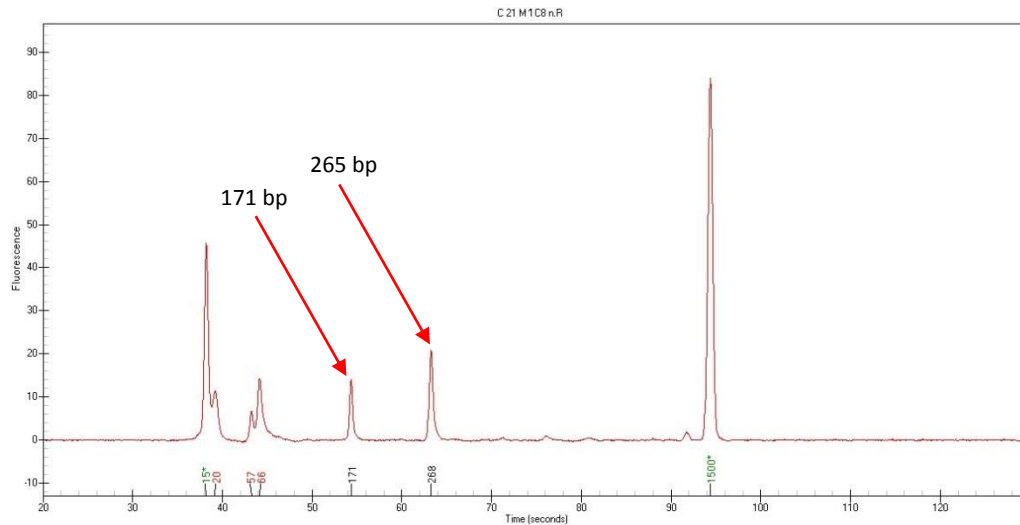


Abbildung 5.20: Ergebnisse der PCR-RFLP, Probe C8. Das 436 bp große Amplifikat von CCN-51 wird verdaut (265 bp, 171 bp; rote Pfeile).*

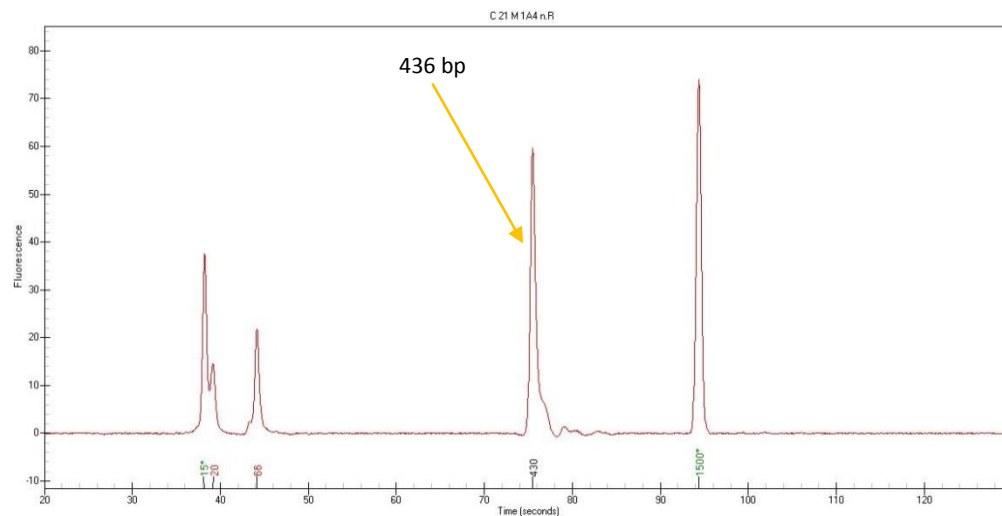


Abbildung 5.21: Ergebnisse der PCR-RFLP, Probe A4. Das 436 bp große Amplifikat von Arriba (gelber Pfeil) wird nicht verdaut.*

*Die Genauigkeit der CGE nimmt mit steigender bp-Länge des zu messenden Amplifikats ab.

5.9.4 Versuche der Quantifizierungen

CGE-Elektropherogramme der Kakaoblattproben

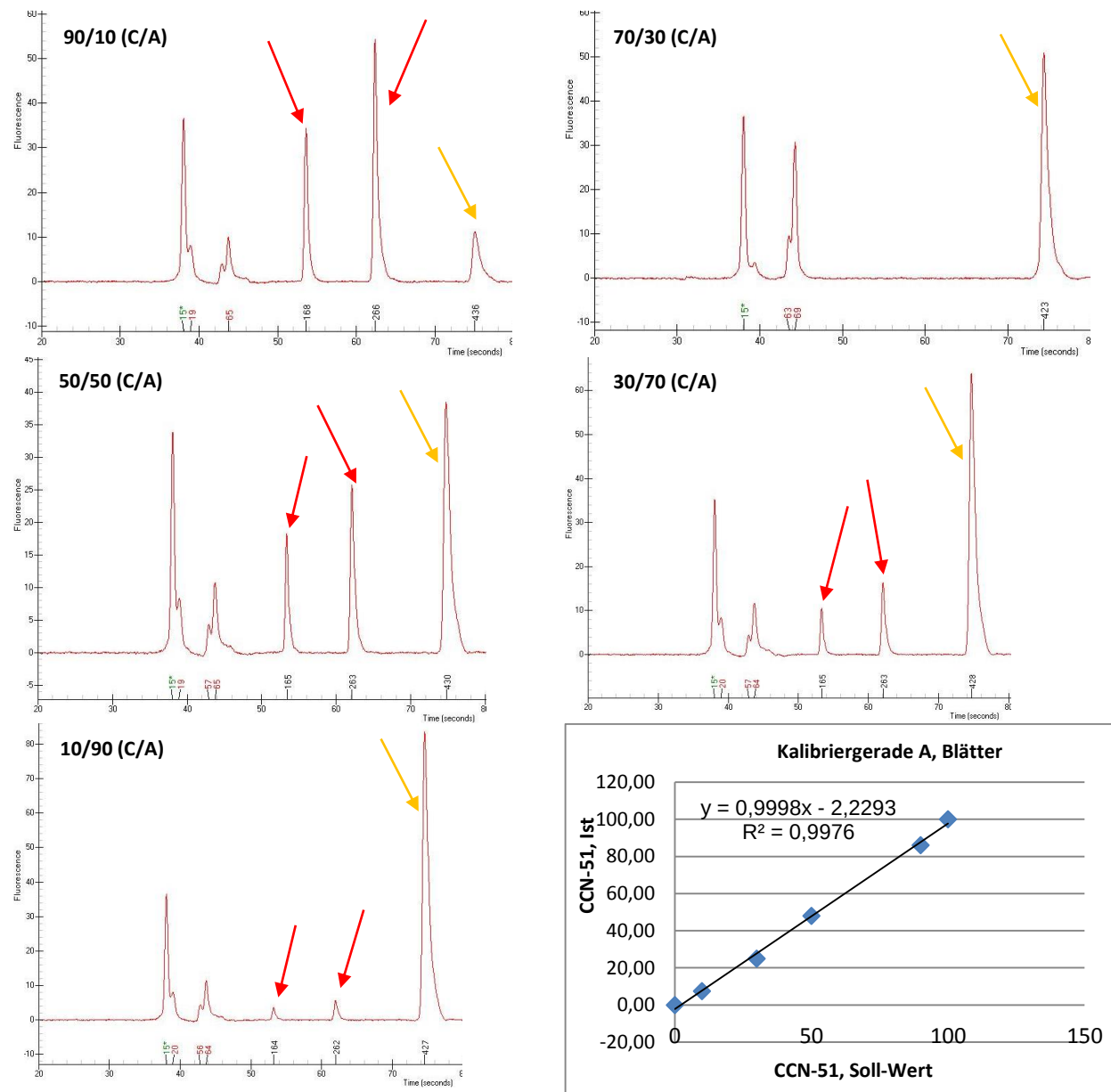


Abbildung 5.22: Mischungen von A: PCR-Produkten von Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels AseI (Sequenzregion 21). Kakaoblätter.

Tabelle 5.28: A, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaoblätter.

CCN-51-Anteil, Soll	CCN-51-Anteil, Ist
10	7,4
30	24,1
50	48,0
70	100
90	86,1

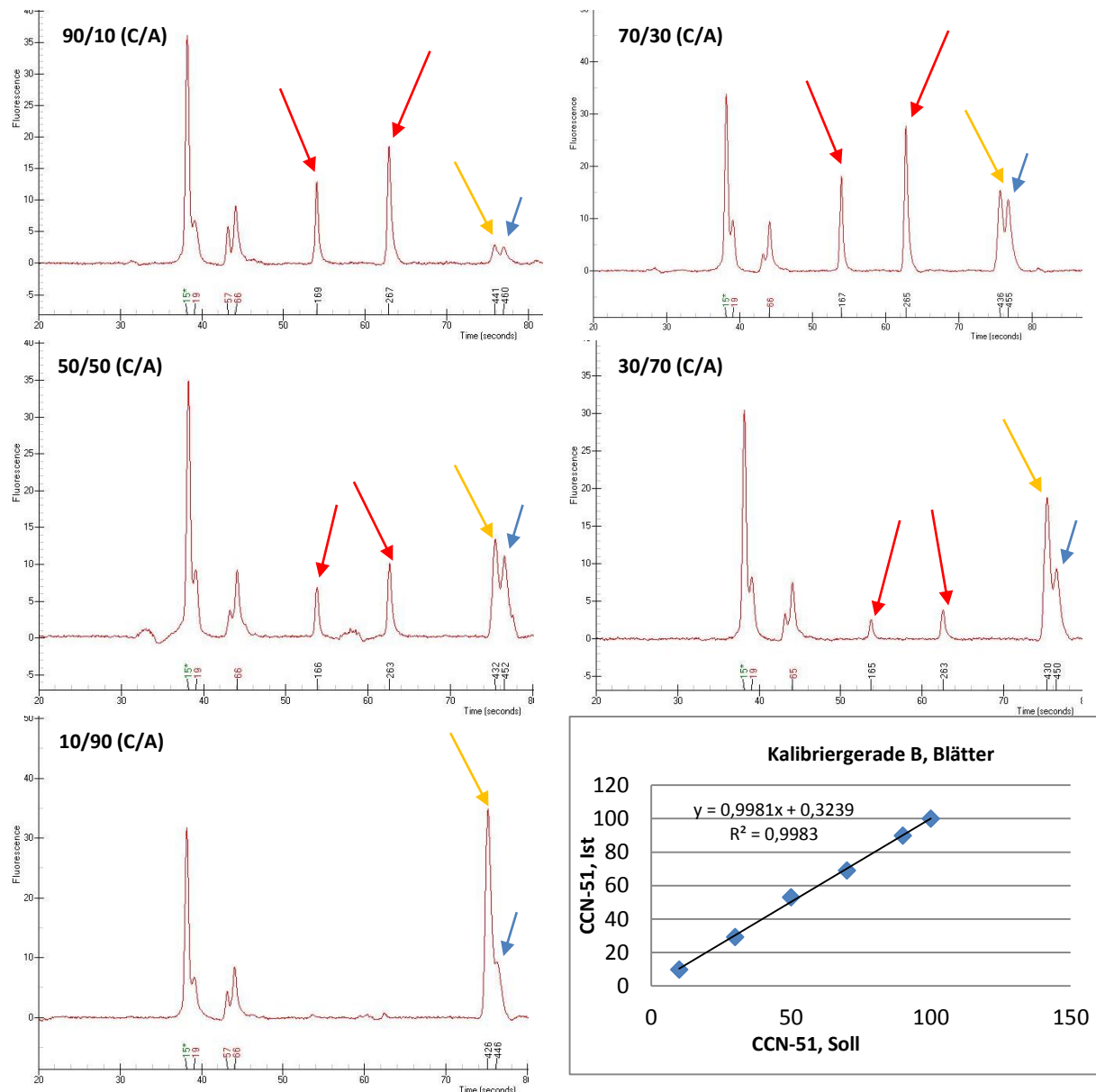


Abbildung 5.23: Mischungen von B: DNA-Isolaten von Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels AseI (Sequenzregion 21). Kakaoblätter. Die gebildeten Heteroduplexe sind blau markiert.

Tabelle 5.29: B, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaoblätter.

CCN-51-Anteil, Soll	CCN-51-Anteil, Ist
10	9,8
30	29,3
50	53,1
70	69,1
90	89,9

CGE-Elektropherogramme der Kakaobohnenproben

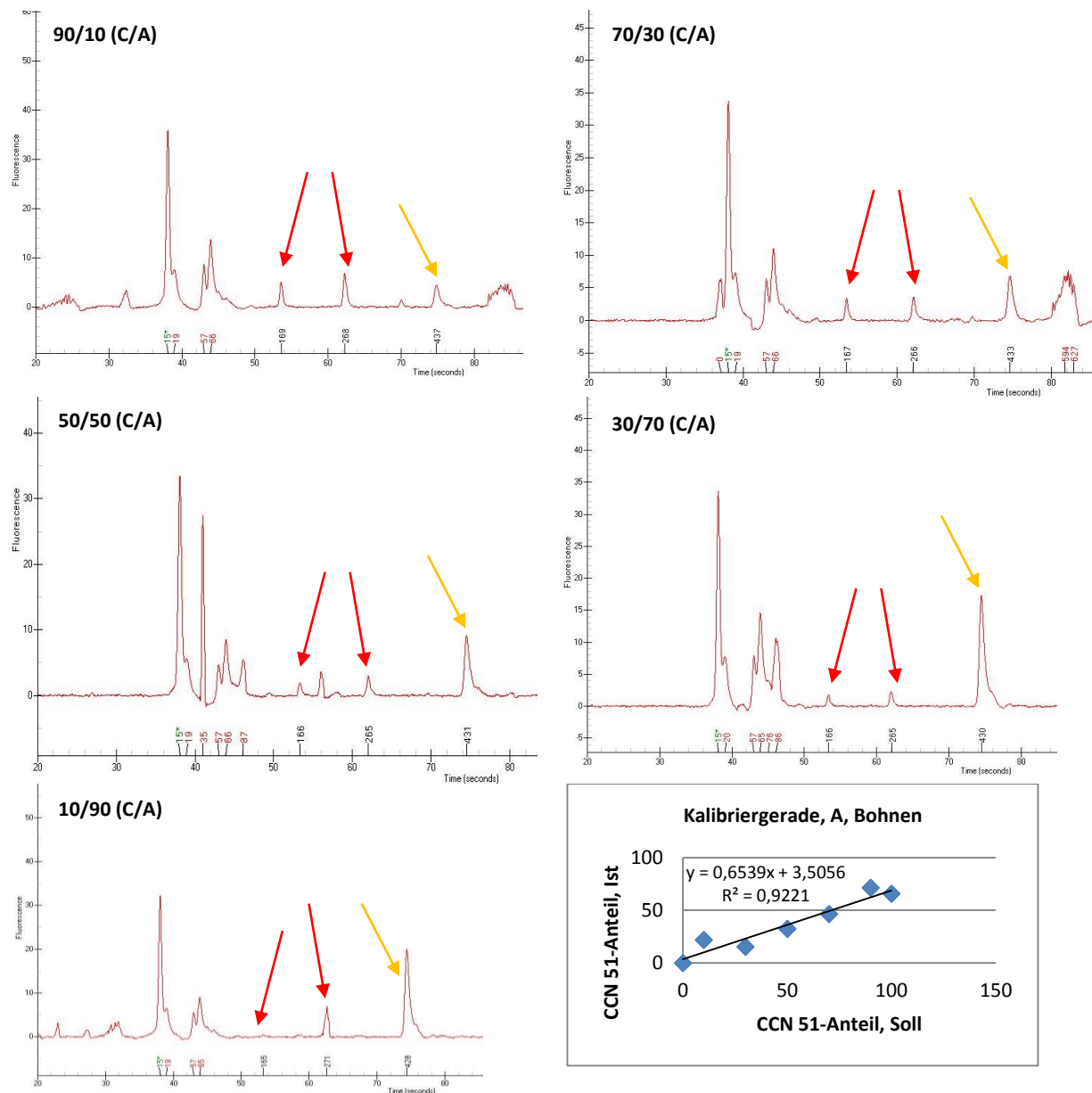


Abbildung 5.24: Mischungen von A: PCR-Produkten aus Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels AseI (Sequenzregion 21). Kakaobohnen.

Tabelle 5.30: A, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaobohnen.

CCN 51-Anteil, Soll	CCN-51-Anteil, Ist
10	21,9
30	15,5
50	32,4
70	46,5
90	71,4

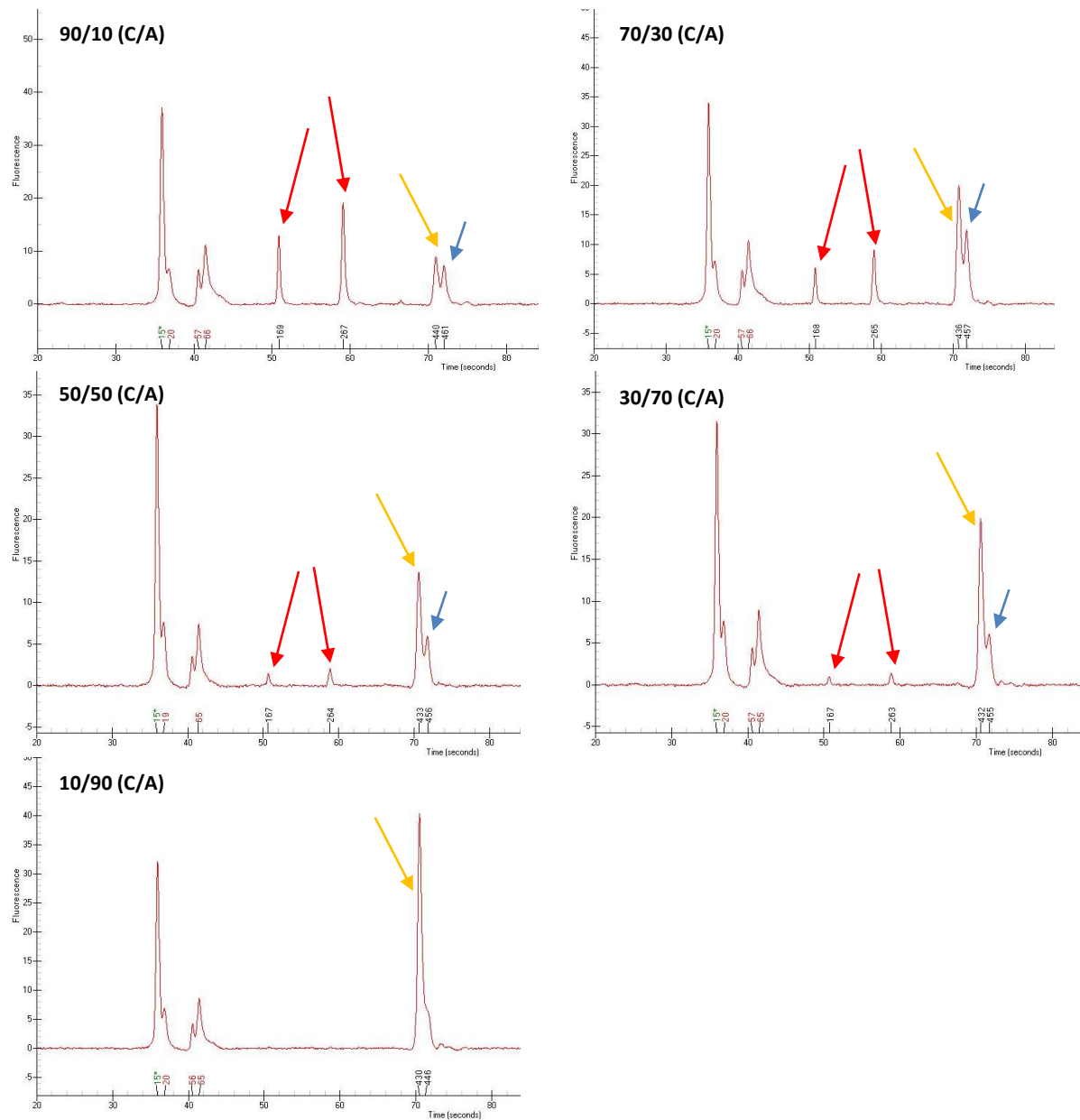


Abbildung 5.25: Mischungen von B: DNA-Isolaten von Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels AseI (Sequenzregion 21). Kakaobohnen. Die gebildeten Heteroduplexe sind blau markiert.

Tabelle 5.31: B, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaobohnen.

CCN-51-Anteil, Soll	CCN 51-Anteil, Ist
10	7,0
30	16,8
50	24,1
70	43,0
90	73,4

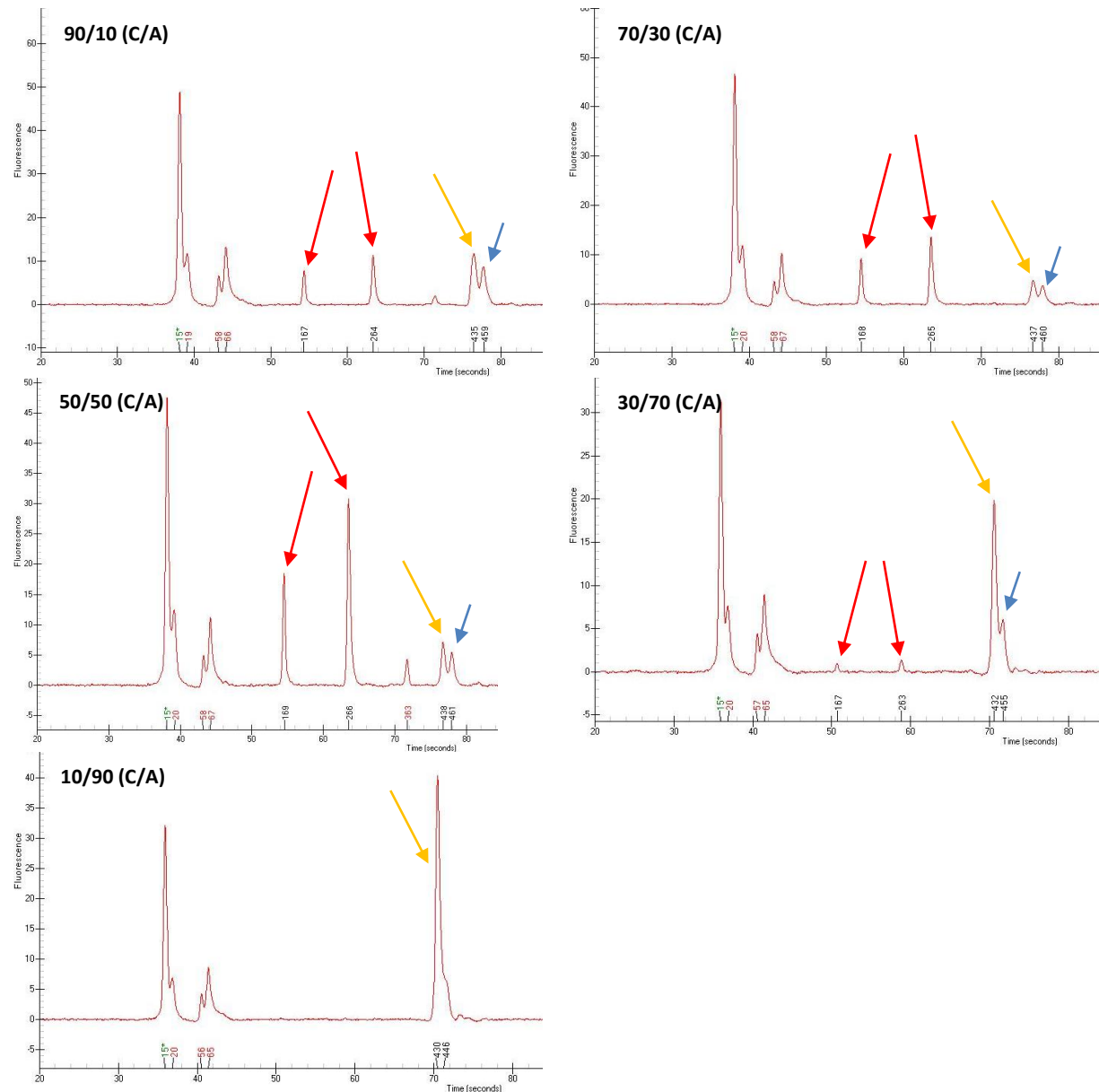


Abbildung 5.26: Mischungen von C: fein gemahlene Kakaobohnen von Arriba (gelb) und CCN-51 (rot) nach der PCR-RFLP mittels AseI (Sequenzregion 21). Kakaobohnen. Die gebildeten Heteroduplexe sind blau markiert.

Tabelle 5.32: C, Vergleich von CCN-51-Soll und CCN-51-Ist, Kakaobohnen.

CCN-51-Anteil, Soll	CCN-51-Anteil, Ist
10	56,7
30	77,6
50	83,8
70	86,1
90	92,1

5.10 Darstellung der Ergebnisse der LPA basierend auf dem SNP im ccsA-Gen

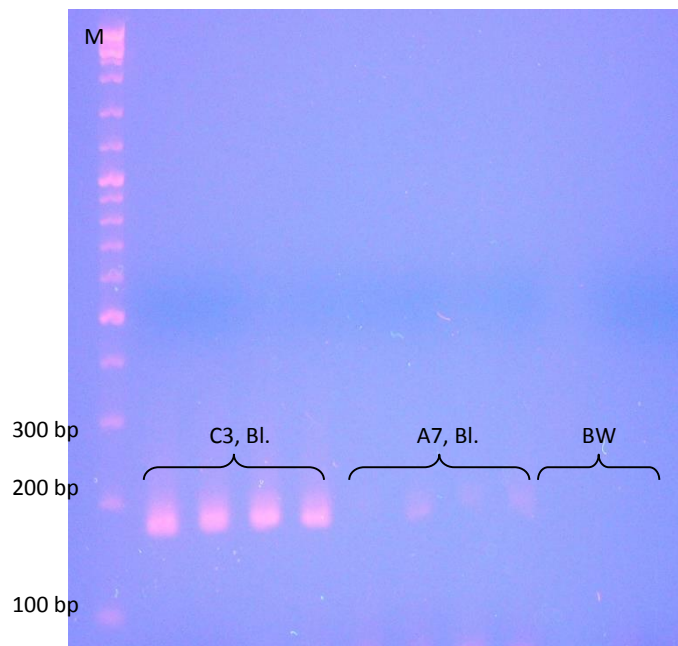


Abbildung 5.27: Detektion der Ergebnisse der LPA auf Basis des SNPs im ccsA-Gen. Weitere Kakaoblattproben.

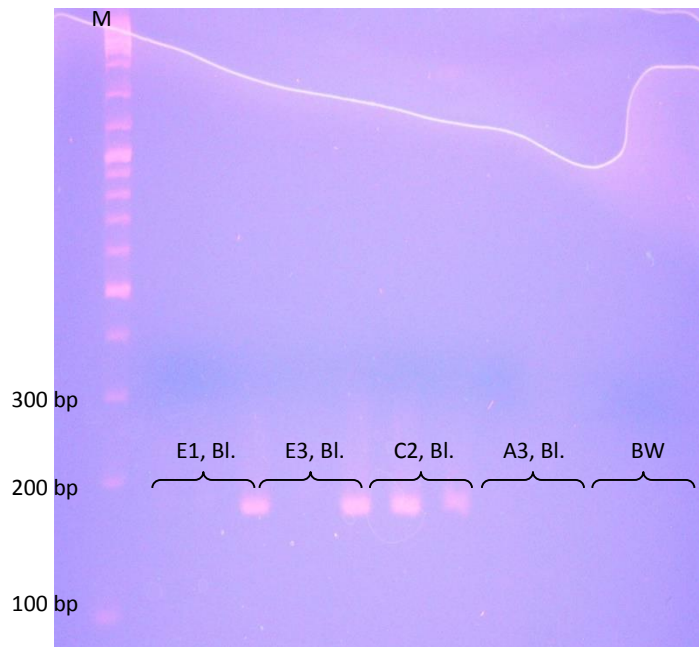


Abbildung 5.28: Detektion der Ergebnisse der LPA auf Basis des SNPs im ccsA-Gen. Weitere Kakaoblattproben.

Literatur

1. ICCO International cocoa agreement. 2010.
2. van der Kooij, S., Market study of fine flavour cocoa in 11 selected countries - revised version. Royal Tropical Institute, KIT Development Policy & Practic. 2013.
3. Stern, J. G., The History of CCN-51 in Ecuador. www.jeffreygstern.com. 2011.
4. Turnbull, C. J.; Hadley, P. International Cocoa Germplasm Database: CCN 51. 2015.
5. Sütterlin, S., Eine Frage des Geschmacks. Berliner Zeitung. 2006.
6. Lanaud, C.; Risterucci, A. M.; Pieretti, I.; Falque, M.; Bouet, A.; Lagoda, P. J. L., Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. . Mol. Ecol 1999, 8, 2141-2143.
7. Nowak, B.; Schulz, B., Taschenlexikon tropischer Nutzpflanzen und ihrer Früchte Quelle & Meyer Verlag: Wiebelsheim. 2009.
8. Motamayor, J. C.; Risterucci, A. M.; Lopez, P. A.; Ortiz, C. F.; Moreno, A.; Lanaud, C., Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas Heredity 2002, 89, 380-386.
9. Beckett, S., The Science of Chocolate. Royal Society of Chemistry: Cambridge 2009; Vol. 2.
10. Durry, A.; Schiffer, T., Kakao: Speise der Götter. Oekom-Verlag: München. 2012.
11. Matissek, R., Nachhaltigkeit im Kakaosektor-Bestandsaufnahme, Herausforderungen und Lösungsansätze. Moderne Ernährung, Relations Gesellschaft für Kommunikation mbH: 2012; Vol. 1.
12. Lieberei, R.; Reisdorff, C., Nutzpflanzenkunde. Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, New York, 2007; Vol. 7.
13. Lanaud, C.; Motamayor, J. C.; Risterucci, A. M., Implications of new insight into the genetic structure of *Theobroma cacao* L. for breeding strategies. Proc. of the Int. Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, NGENIC 2000 2001, 93-111.
14. Motamayor, J. C.; Lanaud, C., Molecular Analysis of the Origin and Domestication of *Theobroma cacao* L. . Managing Plant Genetic Diversity, IPGRI 2002, 77-87.
15. Schultes, R. E., Amazonian cultigens and their northward and westward migrations in pre-Columbian time D. Stone (Ed.), Ptr-Columbian plant migration, Papers of the Peabody Museum of Archaeology and Ethnology 1984, 76, 69-83.
16. Cheesman, E. E., Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. Trop. Agricult. 1944, 21, 144-159.
17. Lieberei, R.; Rohsius, C.; Elwers, S., Cocoa atlas: 2010 edition. Dresenfunke PR/ Kommunikation und Produktion GmbH: Leverkusen. 2010; Vol. 1.
18. Elwers, S., Zusammensetzung und histologische Verteilung der phenolischen Substanzen in Samen von Massen- und Edelkakaovarietäten. Dissertation des Departments Biologie der Universität Hamburg 2008.
19. Soria, J. N., Principal varieties of cocoa cultivated in tropical America. Cocoa Growers Bull 1970, 19, 12-21.

20. Yang, J. Y.; A., M. L.; Dempewolf, H.; Maharaj, K.; Cronk, Q. C. B., Chloroplast Microsatellite Primers for cacao (*Theobroma cacao*) and other *Malvaceae*. Am. J. Bot. 2011, e372-e374.
21. Iwaro, A. D.; Singh, V.; Barath, S.; Jugmohan, N., Germplasm evaluation at the International Cocoa Genebank. Trinidad for resistance to Phytophthora pod rot. Annual Report 2000 of the Cocoa Research Unit., University of the West Indies 2001, 34-40.
22. Smulders, M. J. M.; Esselink, D.; Amores, F.; Ramos, G.; Sukha, D. A.; Butler, D. R.; Vosman, B.; van Loo, E. N., Identification of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties with different quality attributes and parentage analysis of their beans AgSci, Plant Science, INGENIC 2012, 12, 1-13.
23. Sounigo, O.; Lachenaud, P.; Bastide, P.; Cilas, C.; N'Goran, J. A. K.; Lanaud, C., Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. J. Appl. Genet. 2003, 44, 339-353.
24. Amores, F.; Butler, D.; Ramos, G.; Sukha, D.; Espin, S.; Gomez, A.; Zambrano, A.; Hollywood, N.; van Loo, R.; Seguíne, E., Project to determine the physical, chemical and organoleptic parameters to differentiate between fine and bulk cocoa. Project Executing Agency 2007.
25. Budde, C., www.weinreich-schokolade.de/de/schokolade-a-z/geschichte.html.
26. Traub, R., www.spiegel.de/spiegel/spiegelspecial/d-40858020.html. 2005.
27. Verordnung über Kakao- und Schokoladenerzeugnisse (Kakaoverordnung), Ausfertigungsdatum: 15.12.2003, zuletzt geändert durch Art. 2 V v. 30.9.2008 I 1911. In.
28. Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P., Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2008; Vol. 6.
29. Frede, W., Handbuch für Lebensmittelchemiker. Springer-Verlag: Heidelberg, London, New York, 2010.
30. Quesnel, V. C.; Jugmohunsingh, K., Browning reaction in drying cacao. J. Agric. Food Chem. 1970, 18, 537-541.
31. Kopp, G. M.; Seyller, M.; Hennen, J. C.; Brandstetter, B., Process for producing high flavor cacao. 2012.
32. Kakaoverein Geschäftsbericht 2011/2012; Hamburg. 2012.
33. Lieberei, R., Die Vielfalt des Kakaos. Moderne Ernährung, Relations, Gesellschaft für Kommunikation GmbH: 2006; p 6-12.
34. Zeitung, N. Z., Kakao-Speise der Götter. In www.nzzformat.ch, Ed. 2005.
35. Cook, L. R., Chocolate Production and Use. 1982; Vol. 1. Auflage.
36. Destination Ecuador: "fine or flavor" versus bulk cocoa, destination-ecuador.net, 2011.
37. c-spot, The source for premium chocolate ratings, reviews and intel: CCN-51. 2015.
38. Bohnkaf-Kolonial, www.bohnkaf-kolonial.de/en/origins-qualities-colombia-and-ecuador-11.htm. 2014.
39. Rohsius, C., Die Heterogenität der biologischen Ressource Rohkakao (*Theobroma cacao* L.). Universität Hamburg, Hamburg, 2007.
40. Kommentar Recht der Süßwarenwirtschaft, 2013 Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie, Behr's Verlag: Hamburg, 2013.

41. Knippers, R., Molekulargenetik. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, 2006; Vol. 9. Auflage.
42. Reese, H. R.; Zimm, B. H., Fracture of polymer chains in extensional flow: experiments with DNA, and a molecular-dynamics simulation. *Journal of Chemical Physics* 1990, 92:4.
43. Levinthal, C.; Davison, P. F., Degradation of deoxyribonucleic acid under hydrodynamic shearing forces. *J. Mol. Biol.* 1961, 3, 674-683.
44. Löffler, G., Basiswissen Biochemie. Springer Verlag Heidelberg, 2008; Vol. 7. Auflage.
45. Mendel, R.-R., Zellbiologie der Pflanzen. Ulmer Verlag: Stuttgart, 2011; Vol. 1.
46. Nabors, M. W., Botanik. Pearson Studium: München, 2007; Vol. 1.
47. Lüttge, U.; Kluge, M.; Thiel, G., Botanik-Die umfassende Biologie der Pflanzen. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2010; Vol. 1.
48. Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E., Biologie der Pflanzen. Walter de Gruyter GmbH & Co KG: Berlin, 2006; Vol. 4.
49. Baker, N. R.; Hardwick, K.; Jones, P., Biochemical and Physiological Aspects of Leaf Development in Cacao (*Theobroma cacao*) II. Development of Chloroplast Ultrastructure and Carotenoids *New Phytol.* 1975, 75, 513-518.
50. Yeoh, H. H.; Chung, D. K.; Fritz, P. J., *Theobroma cacao* Chloroplast DNA: Isolation, Molecular Cloning, and Characterization. *Café Cacao Thé* 1990, XXXIV.
51. Graw, J.; Henning, W., Genetik. Springer Verlag: Heidelberg, 2010; Vol. 5.
52. Lüttge, U.; Kluge, M., Botanik-Die einführende Biologie der Pflanzen. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co KG KGaA: Weinheim, 2005.
53. Strasburger, E.; Bresinsky, A.; Körner, C.; Kadereit, J. W.; Neuhaus, G.; Sonnwald, U., Lehrbuch der Botanik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg, 2008.
54. Janning, W., Genetik. Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, 2008; Vol. 2.
55. Kane, N.; Sveinsson, S.; Dempewolf, H.; Yang, J. Y.; Zhang, D.; Engels, J. M. M.; Cronk, Q., Ultra-Barcoding in cacao (*Theobroma spp.*; *Malvaceae*) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA *Am. J. Bot.* 2012, 99, 320-329.
56. Palmer, J. D., Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae *Monographs in evolutionary biology: Molecular evolutionary genetics* 1985, 131-240.
57. Wolfe, K. H.; Li, W. H.; Sharp, P. M., Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1987, 84, 9054-9058.
58. Zurawski, G.; Clegg, M. T., Evolution of higher-plant chloroplast DNA-encoded genes: Implications for structure-function and phylogenetic studies *Annual Review of Plant Physiology* 1987, 38, 391-418.
59. Laurent, V.; Risterucci, A. M.; Lanaud, C., Chloroplast and mitochondrial DNA diversity in *Theobroma cacao*. *Theor Appl Genet* 1993, 87, 81-88.
60. Shaw, J.; Lickey, E. B.; Schilling, E. E.; Small, R. L., Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms. The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 2007, 94 (3), 275-88.

61. Jansen, R. K.; Saski, C.; Lee, S.; Hansen, A. K.; Daniell, H., Complete plastid genome sequences of three rosid (*Castaneae*, *Prunus*, *Theobroma*): Evidence for at least two independent transfers of rpl22 to the nucleus Mol. Biol. Evol. 2010, 28, 835-847.
62. Knop, C., Das Genom des Kakaos ist entschlüsselt. FAZ 2010.
63. Inc., M., Press Release 15th September 2010: MARS, USDA-ARS, and IBM publicly release: Preliminary cacao genome sequence three years ahead of schedule. 2010.
64. Argout, X.; Salse, J.; Aury, J. M.; Guiltinan, M. J.; Droc, G.; Gouzy, J.; Allegre, M.; Chaparro, C.; Legavre, T.; Maximova, S. N.; Abrouk, M.; Murat, F.; Fouet, O.; Poulain, J.; Ruiz, M.; Roguet, Y.; Rodier-Goud, M.; Barbosa-Neto, J. F.; Sabot, F.; Kudrna, D.; Ammiraju, J. S.; Schuster, S. C.; Carlson, J. E.; Sallet, E.; Schiex, T.; Dievart, A.; Kramer, M.; Gelley, L.; Shi, Z.; Bérard, A.; Viot, C.; Boccara, M.; Risterucci, A. M.; Guignon, V.; Sabau, X.; Axtell, M. J.; Ma, Z.; Zhang, Y.; Brown, S.; Bourge, M.; Golser, W.; Song, X.; Clement, D.; Rivallan, R.; Tahi, M.; Akaza, J. M.; Pitollat, B.; Gramacho, K.; D'Hont, A.; Brunel, D.; Infante, D.; Kebe, I.; Costet, P.; Wing, R.; McCombie, W. R.; Guiderdoni, E.; Quetier, F.; Panaud, O.; Wincker, P.; Bocs, S.; Lanaud, C., The genome of *Theobroma cacao* Nat. Genet. 2011, 43, 101-108.
65. Mars, I., www.cacaogenomedb.org.
66. Argout, X., <http://cocoagendb.cirad.fr/>.
67. Varma, A.; Padh, H.; Shrivastava, N., Plant genomic DNA isolation: an art or a science. Biotechnology Journal 2007, 2 (3), 386-392.
68. Qiagen, DNeasy Plant Handbook. 2006.
69. Mülhardt, C., Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2009; Vol. 6. Auflage.
70. Demeke, T.; Adams, R. P., The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. BioTechniques 1992, 12 (3):2.
71. Porebski, S.; Bailey, L. G., Modification of a CTAB DNA Extraction protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components Plant Mol. Biol. Rep. 1997, 15 (1), 8-15.
72. Oliveri, C.; Frequin, M., A Simple Extraction Method Useful to Purify DNA from Difficult Biologic Sources. Cell Preservation Technology 2006, 4 (1), 51-54.
73. Sassa, H., A technique to isolate DNA from woody and herbaceous plants by using a silica-based plasmid extraction column. Anal. Biochem. 2007, 363 (1), 166-167.
74. Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M., Lebensmittelanalytik. Springer Verlag Heidelberg, London New York, 2010; Vol. 4.
75. Vitzthum, F.; Bernhagen, J., SYBR green I: an ultrasensitive fluorescent dye for double-stranded DNA quantification in solution and other applications. Recent Research Developments in Analytical Biochemistry 2002, 2, 65-93.
76. Scientific, T., NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. 2008.
77. Hameed, A.; Malik, S. A.; Iqbal, N.; Arshad, R.; Farooq, S., A rapid (100 min) method for isolating high yield and quality DNA from leaves, roots and coleoptile of wheat (*Triticum aestivum* L.) suitable for apoptotic and other molecular studies International Journal of Agriculture and Biology 2004, 6 (2), 383-387.

78. Lottspeich, F.; Zorbas, H., Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg, 1998; Vol. 1.
79. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988, 239, 487-491.
80. Fischer, M.; Haase, I., PCR in der Lebensmittelanalytik. GIT Labor-Fachzeitschrift 2006, 3, 206-209.
81. Lottspeich, F.; Engels, J., Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH: München, 2006; Vol. 2.
82. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia Science 1985, 230 (4732), 1350-1354.
83. Bartlett, J. M. S.; Stirling, D., A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR protocols 2003, 226, 3-6.
84. Brüning, P.; Haase, I.; Fischer, M., Marzipan: polymerase chain reaction-driven methods for authenticity control. J. Agric. Food Chem. 2011, 59 (22), 11910-11917.
85. Mayer, F.; Haase, I.; Graubner, A.; Heising, F.; Paschke-Kratzin, A.; Fischer, M., Use of polymorphisms in the γ -gliadin gene of spel and wheat as a toll for authenticity control. J. Agric. Food Chem. 2012, 60 (6), 1350-1357.
86. Zahradnik, C.; Kolm, C.; Martzy, R.; Mach, R. L.; Krska, R.; Farnleitner, A. H.; Brunner, K., Detection of the 35S promoter in transgenic maize via various isothermal amplification techniques: a practical approach Anal. Biochem. Chem. 2014.
87. Oscar, T. P., Use of enrichment real-time PCR to enumerate *Salmonella* on chicken parts. J. Food. Prot. 2014, 77 (7).
88. Gattuso, A.; Gianfranceschi, M. V.; Sonnessa, M.; Delibato, E.; Marchesan, M.; Hernandez, M.; De Meici, D.; Rodriguez-Lazaro, D., Optimization of a Real Time PCR based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in pork meat. Int. J. Food Microbiol. 2014, 184, 106-108.
89. Chien, A.; Edgar, D. B., Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. Journal of Bacteriology 1976, 127 (3), 1550-1557.
90. Lawyer, F. C.; Stoffel, S., High-level Expression, Purification, and Enzymatic Characterization of Full-length *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and a Truncated Form Deficient in 5' to 3' Exonuclease Activity Genome Research 1993, 2, 275-287.
91. Birch, D. E.; Kolmodin, L., Simplified hot start CR. Nature 1996, 381, 445-446.
92. Müller, H.-J., PCR Polymerasekettenreaktion. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2001.
93. Blanchard, M. M.; Taillon-Miller, P.; Nowotny, P.; Nowotny, V., PCR buffer optimization with uniform temperature regimen to facilitate automation. Genome Research 1992, 2 (3), 234-240.
94. Ralser, M.; Querfurth, R., An efficient and economic enhancer mix for PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications 2006, 347, 747-751.
95. Frackman, S.; Kobs, G., Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. Promega Notes 1998, 65, 27-30.

96. Mayer, F., Dissertation: Methoden zur Unterscheidung von Weizen und Dinkel Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg 2012.
97. Scientific, T., Product information Bovine Serum Albumin (BSA). 2012.
98. Holzapfel, B.; Wickert, L., Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit* 2007, 37 (2), 120-126.
99. Panaro, N. J.; Yuen, P. K.; Sakazume, T.; Fortina, P.; Kricke, L. J.; Wilding, P., Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clin. Chem.* 2000, 11, 1851-1853.
100. Mitchelson, K. R., The use of capillary electrophoresis for DNA polymorphism analysis. *Molecular Biotechnology* 2003, 24, 41-68.
101. Chang, B.; Larson, E.; Whitman-Guliaev, C., The Experion™ System: Microfluidics-based automated electrophoresis. Bulletin 5283, Bio-Rad Laboratories, Inc. 2010.
102. Premstaller, A.; Oefner, P. J., Denaturing HPLC of Nucleic Acids. *LC-GC Eur.* 2002.
103. Goldenberg, O.; Herrmann, S.; T., A.; Marjoram, G.; Hong, G.; Göbel, U. B.; Graf, B., Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven candida species. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 5912-5915.
104. Leung, K. H.; Yip, S. P., Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC) for Nucleic Acid Analysis. *Science, Molecular Biomethods Handbook* 2008, 9.
105. Xiao, W.; Oefner, P. J., Denaturing high-performance liquid chromatography-A review. *Hum. Mutat.* 2001, 17, 439-474.
106. Oefner, P. J.; Huber, C. G., A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers *J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci* Dec 25 2002, 782 (1-2), 3-25.
107. Schmitt, T. J.; Robinson, M. L.; Doyle, J., Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion Detection on the WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System Transgenomic Inc. Application 2000, Note 112.
108. Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davis, R. W., Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980, 32, 314-331.
109. Brown, T. A., *Genome und Gene*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg, 2007; Vol. 3.
110. Buselmaier, W., *Biologie für Mediziner*. Springer Verlag: 2012; Vol. 12.
111. MLPA, M. H., Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). 2012.
112. Schouten, J. P.; McElgunn, J.; Pals, G., Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification *Nucleic Acids Research* 2002, 30 (12).
113. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74 (12), 5463-5467.
114. Sanger, F.; Air, G. M., Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977, 265, 687-695.
115. Sanger, F.; Coulson, A. R., A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase *J. Mol. Biol.* 1975, 94 (3), 441-448.

116. Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutmann, R., Biochemie. Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, 2012; Vol. 3.
117. Steele, P. R.; Pires, J. C., Biodiversity assessment: State-of-the-art techniques in phylogenomics and species identification Am. J. Bot. 2011, 98, 415-425.
118. Straub, S. C. K.; Parks, M.; Weitemier, K.; Fishbein, M.; Cronn, R. C.; Liston, A., Navigating the tip of the genomic iceberg: Next-generation sequencing for plant systematics. Am. J. Bot. 2012, 99, 349-364.
119. Lerceteau, E.; Flipo, S.; Quiroz, J.; Soria, J.; Pétiard, V.; Crouzil, D., Genetic differentiation among Ecuadorian *Theobroma cacao* L. accessions using DNA and morphological analyses. Euphytica 1997, 95.
120. Lerceteau, E.; Robert, T.; Pétiard, V.; Crouzil, D., Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 1997, 95.
121. Charters, Y. M.; Wilkinson, M. J., The use of self-pollinated progenies as "in-groups" for the genetic characterization of cocoa germplasm. Theor. Appl. Genet. 2000, 100, 160-166.
122. Jones, P. G.; Allaway, D.; Gilmour, D. M.; Harris, C.; Rankin, D.; Retzel, E. R.; Jones, C. A., Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties Planta 2002, 216, 255-264.
123. Alves, R. M.; Artero, A. S.; Sebbenn, A. M.; Figueira, A., Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. by microsatellite markers. Genet. Mol. Biol. 2003, 26, 373-379.
124. Pugh, T.; Follet, C.; Risterucci, A. M.; Brottier, P.; Deletrez, C.; Courtois, B.; Clément, D.; Lamande, P.; N'Goran, J. A. K.; Lanaud, C., A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 2004, 198.
125. Saunders, J.; Mischke, S.; Leamy, E. A.; Hemeida, A. A., Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. Theor. Appl. Genet. 2004, 110, 41-47.
126. Cryer, N. C.; Fenn, M. G. E.; Turnbull, C. J.; Wilkinson, M. J., Allelic size standards and reference genotypes to unify international cocoa (*Theobroma cacao* L.) microsatellite data. Genet. Resour. Crop Evol. 2005, 53, 1643-1652.
127. LFGB, Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais (*Zea mays*) mit Hilfe der PCR und Restriktionsanalyse oder Hybridisierung des PCR-Produktes. In In., L.15.05-1. Ed.
128. Focke, F., Dissertation-Molekularbiologische Methoden für die Lebensmittelanalytik am Beispiel der Gewürze. Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg 2011.
129. Wilfinger, W. W.; Chomczynski, P., Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity BioTechniques 1994, 22, 474-481.
130. Bailey, B. A.; Strem, M. D.; Bae, H.; Mayolo, G. A. d.; Guiltinan, M. J., Gene expression in leaves of *Theobroma cacao* in response to mechanical wounding, ethylene, and/ or methyl jasmonate. Plant Science 2004 168, 1247 - 1258.
131. Borrone, J. W.; Kuhn, D. N.; Schnell, R. J., Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao* Theor. Appl. Genet. 2004, 109, 495-507.

132. Rödiger, A.; Baudisch, B.; Klösigen, R. B., Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *J. Plant Physiol.* 2010, 167, 620-624.
133. Aronsson, H.; Jarvis, P., A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis* chloroplasts *FEBS Lett.* 2002, 529, 215-220.
134. Dhingra, A.; Folta, K. M., ASAP: Amplification, sequencing & annotation of plastomes. *BMC Genomics* 2005, 6.
135. Projektausschusssitzung 9.4.13 zum FEI-Projekt AiF/ FEI 16796 N In Rohsius, C., Hamburg, 2013 Projektausschusssitzung 09.04.13.
136. Murray, V.; Monchawin, C.; England, P. R., The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Research* 1993, 21, 2395-2398.
137. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. 2010.
138. Irish, B. M.; Goenaga, R.; Zhang, D.; Schnell, R. J.; Brown, J. S.; Motamayor, J. C., Microsatellite Fingerprinting of the USDA-ARS Tropical Agriculture Research Station Cacao (L.) Germplasm Collection. *Crop Sci* 2010, 50, 656-667.
139. Etienne, H.; Bertrand, B., Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants *Tree Physiology* 2003, 23, 419-426.
140. Rahman, M.; Rajora, O., Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*) *Plant Cell Rep* 2001, 20, 531-536.
141. Ostry, M.; Ward, K., Field performance of *Populus* expressing somaclonal variation in resistance to *Septoria musiva* *Plant Sci* 2003, 164, 1-8.
142. Herrmann, L.; Haase, I.; Blauhut, M.; Barz, N.; Fischer, M., DNA-based differentiation of he Ecuadorian cocoa types CCN-51 and Arriba based on sequence differences in the chloroplast genome. *J Agric Food Chem* 2014, 62, 12118-12127.
143. Motamayor, J. C.; Lachenaud, P.; e Mota, J. W. d. S.; Loo, R.; Kuhn, D. N.; Brown, J. S.; Schnell, R. J., Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS One* 2008, 3, e3311.
144. Motilal, L.; Butler, D., Verification of identities in global cacao germplasm collections *Genet. Resour. Crop Ev.* 2003, 50, 799-807.

Publikationen

Paper und Artikel

Herrmann, L., Haase, I., Blauhut, M., Barz, N., Fischer, M.
DNA-Based Differentiation of the Ecuadorian Cocoa Types CCN-51 and Arriba Based on Sequence Differences in the Chloroplast Genome
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, 12118-12127 (2014)

Herrmann, L., Felbinger, C., Haase, I., Rudolph, B., Biermann, B., Fischer, M.
Food Fingerprinting: Characterization of the Ecuadorean Type CCN-51 of *Theobroma cacao* L. Using Microsatellite Markers
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63 (18), 4539-4544 (2015)

Herrmann, L., Haase, I., Fischer, M.
Differenzierung der Kakaosorten CCN-51 und Arriba anhand von Sequenzunterschieden in ihrer Plastiden-DNA
Lebensmittelchemie 67, 77 (2013)
Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft "Food Science meets Industry", 19.-20. Februar 2013, Hamburg

Fischer, M., Werner, P., Herrmann, L., Hünninger, T., Hackl, T.
Food Profiling - Von der Hightech-Forschung bis zur Anwendung im Unternehmen
Food-Lab 5-6/13, 10-14

Herrmann, L., Blauhut, M., Barz, N., Haase, I., Hünninger, T., Fischer, M.
Edler Genuss - Das Chloroplastengenom im Fokus der Authentizitätsüberprüfung von Lebensmitteln am Beispiel des ecuadorianischen Edelkakaos
Labor & more 3.14, 60-65 (2014)

Herrmann, L., Blauhut, M., Barz, N., Haase, I., Hünninger, T., Fischer, M.
DNA-basierte Authentizitätsüberprüfung des Edelkakaos aus Ecuador
Deutsche Lebensmittel-Rundschau, Mai 2014, 210-214

Vorträge

Evaluierung molekularbiologischer Methoden zur Differenzierung von hochwertigem Arriba-Edelkakao und Konsumkakao (CCN 51)
2. Sitzung des Projektausschusses des AIF/ FEI-Projektes 16796 N: Differenzierung von Kakao, Freising, 24.4.2012.

Evaluierung molekularbiologischer Methoden zur Differenzierung von hochwertigem Arriba-Edelkakao und Konsumkakao (CCN 51)

3. Sitzung des Projektausschusses des AIF/ FEI-Projektes 16796 N: Differenzierung von Kakao, Hamburg, 30.10.2012.

Differenzierung der Kakaosorten CCN 51 und Arriba anhand von Sequenzunterschieden in der Plastiden-DNA

L. Herrmann, Dr. I. Haase, Prof. Dr. M. Fischer

Regionalverbandstagung Nord (LChG), Food Science Meets Industry, Hamburg, Germany, 19.2.2013.

Evaluierung molekularbiologischer Methoden zur Differenzierung von hochwertigem Arriba-Edelkakao und Konsumkakao (CCN 51)

Abschlusssitzung des Projektausschusses des AIF/ FEI-Projektes 16796 N: Differenzierung von Kakao, Hamburg, 9.4.2013.

DNA-basierte Authentizitätskontrolle von Edelkakao aus Ecuador

L. Herrmann, T. Hünninger, Dr. I. Haase, Prof. Dr. M. Fischer

42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, 2013.

Authentizitätsüberprüfung von Edelkakao basierend auf Sequenzunterschieden im Chloroplastengenom

L. Herrmann, Dr. I. Haase, Prof. Dr. M. Fischer

Regionalverbandstagung Nord (LChG), Food Science Meets Authority, Hamburg, Germany, 25.3.2014.

Poster

Entwicklung von Methoden zur DNA-basierten Differenzierung von Konsum (CCN 51)- und von Edelkakao (Arriba)

L. Herrmann, Dr. I. Haase, Dr. F. Focke, Prof. Dr. M. Fischer

Infoveranstaltung der MIN-Fakultät des Fachbereichs Chemie, Universität Hamburg, 2012.

Molekularbiologische Methoden zur Differenzierung von CCN 51- und Arribakakao aus Ecuador anhand von Chloroplasten-DNA

L. Herrmann, M. Blauhut, Dr. I. Haase, Prof. Dr. M. Fischer

FEI-Jahrestagung, Hamburg, 2012.

Nutzung von Sequenzunterschieden im Chloroplastengenom zur Differenzierung von CCN 51-Konsumkakao und Arriba-Edelkakao aus Ecuador

L. Herrmann, N. Barz, T. Hünninger, Dr. I. Haase, Prof. Dr. M. Fischer

Runder Tisch Kakao, Bio-Zentrum Klein Flottbek, Hamburg, 2013.

Curriculum Vitae

Luise Herrmann

Staatlich geprüfte Diplom-Lebensmittelchemikerin

7. Februar 1983,
Berlin



seit 07/2015	Senior-Consultant bei Höppner Management und Consultants GmbH
05/2011 - 05/2015	Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotion am Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
11/2010 - 05/2011	Zweite Hälfte des Anerkennungsjahres für Lebensmittelchemiker am Institut für Hygiene und Umwelt Hamburg Zweites Staatsexamen in Lebensmittelchemie
05/2010 - 11/2010	Erste Hälfte des Anerkennungsjahres für Lebensmittelchemiker bei Eurofins Scientific, Nantes, Frankreich
04/2005 - 04/2010	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg Diplom und Erstes Staatsexamen
10/2003 - 03/2005	Studium der Ökotrophologie an der HAW, Hamburg Vordiplom
2002	Abitur

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass vorher keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind oder an einer anderen Stelle vorgelegt wurden.

Hamburg, 13. August 2015

Lise 

Eidesstattliche Versicherung über die selbständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und allein von mir unter den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde.

Hamburg, 13. August 2015

Lise 