
Posterbeitrag Themenkreis B: Biodiversität

P 2 Genetische Abgrenzung von Rooibos-Zuchtlinien zu Anbau- und Wildherkünften



*Genetic differentiation between breeding lines, commercial samples and wild populations of Rooibos (*Aspalathus linearis* (Burm f.) R. Dahlgren)*

Joana Ruzicka¹, Brigitte Lukas¹, Marcus Schefzig², Hans-Jürgen Hannig³, Johannes Novak^{1*}

¹Institut für Tierernährung und Funktionelle Pflanzenstoffe, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, 1220 Wien, joana.ruzicka@vetmeduni.ac.at

²Institut für Medizinische Biochemie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Österreich

³Martin Bauer Group MB-Holding GmbH & Co KG, Dutendorfer Straße 5-7, 91487 Vestenbergsgreuth, Deutschland

DOI 10.5073/jka.2018.460.027

Zusammenfassung

Rooibos (*Aspalathus linearis* (Burm.f.) R. Dahlgren, Fabaceae), ist eine weltweit beliebte Teepflanze, die bisher aus dem Anbau von Wildpflanzen und deren klonaler Vermehrung gewonnen wurde. Ziel dieser Arbeit war es, mit molekularen Markern neue Zuchtlinien von Rooibos zu charakterisieren und ihre genetische Verwandtschaft und ihre Positionierung gegenüber handelsüblichen Herkünften und Wildpopulationen zu bestimmen. Es wurden sequenzbasierte Marker entwickelt, die mit HRM (High-Resolution-Melting) ausgewertet wurden. Mit elf molekularen Markern wurden insgesamt 91 Proben aus fünf Zuchtlinien, zwei Herkünften aus kommerziellem Anbau und eine Wildsammlungsherkunft untersucht. Die statistische Auswertung mittels Diskriminanzanalyse ergab eine nahe Verwandtschaft der Zuchtlinien 16, 27 und 50, während die Selektion 48 genetisch am weitesten entfernt war. Die Linien 16 und 27 scheinen sogar genetisch ident zu sein. Die Selektionen waren von allen kommerziellen Proben und den Wildproben unterscheidbar, bei den Selektionen 32 und 50 war die Differenzierbarkeit allerdings mit einer größeren statistischen Unsicherheit behaftet, was durch die höhere Heterogenität dieser beiden Selektionen bedingt war. Eine statistisch besser abgesicherte Identifizierung wäre über zusätzliche Proben erreichbar. Die genetischen Analysen eignen sich gut für eine Identifizierung der Zuchtlinien bei vegetativer Vermehrung und lassen sich für eine weitere Zucht- und Vermehrungsplanung einsetzen.

Stichwörter: *Rooibos*, *Aspalathus linearis* (Burm f.) R. Dahlgren, Fabaceae, genetische Marker, SRAP, HRM

Abstract

Rooibos (*Aspalathus linearis* (Burm.f.) R. Dahlgren, Fabaceae) is a popular tea plant, so far produced by cultivating vegetatively propagated wild material. Aim of this work was the characterisation of newly derived breeding lines of Rooibos with molecular markers, the determination of their genetic relationships and the differentiation of breeding material to commercial samples and wild populations. Sequence-derived molecular markers were developed and analyzed with HRM (High-Resolution Melting). In total, 91 samples out of five breeding lines, two different accessions of commercial samples and one accession from the wild were analyzed with 11 molecular markers. Discriminant analysis showed a close relationship between breeding lines 16, 27 and 50, whereas the selection 48 was more distant. Lines 16 and 27 seem to be even genetically identical. All selections were distinguishable from the commercial samples and the wild accession. Anyhow, differentiation of lines 32 and 50 was statistically uncertain caused by the higher heterogeneity of these two lines. An improved statistical quality can be reached with additional samples. The genetical analysis is suitable for an identification of vegetatively propagated breeding lines and can be used for optimizing further breeding- and propagation planning.

Keywords: *Rooibos*, *Aspalathus linearis* (Burm f.) R. Dahlgren, Fabaceae, genetic marker, SRAP, HRM

Einleitung

Aspalathus linearis (Burm.f.) R. Dahlgren (Fabaceae) findet als Rooibostee weltweit breite Anwendung. Obwohl der Anbau aus klimatischen Gründen auf Südafrika beschränkt ist, lag das Produktionsvolumen dieses Tees 2007 bei 14.000 Tonnen (DIRECTORATE MARKETING, 2010), eine Menge, die in etwa 10 % des globalen Kräuterteemarktes entspricht. Mit einer gezielten Züchtung von Rooibos, um Ertrag, Ertragsstabilität und Inhaltsstoffgehalt positiv zu beeinflussen, wurde erst vor einigen Jahren begonnen. Die bisher im Handel erhältlichen Herkünfte stammen noch aus dem Anbau von Pflanzen, die wild gesammelt wurden, dementsprechend ist das für die Teedroge zur Verfügung stehende Material oft sehr uneinheitlich. Der Einsatz von genetischen Markern für eine weitere Selektion und Abschätzung der genetischen Distanz von Züchtungslinien und Sorten könnte die Züchtung weiter voran treiben. Die Verwendung solcher Marker ist bei Teepflanzen wie *Chamellia sinensis* (L.) Kuntze oder *Chamellia taliensis* (W. W. Smith) Melch. (SHARMA et al., 2014; ZHAO et al., 2014; ORI et al., 2017), aber auch bei anderen Fabaceae-Arten (CHAISAN et al., 2012) mittlerweile weit verbreitet. Neben der praktischen Anwendung für die Analyse genetischer Verwandtschaftsbeziehungen werden hier auch Marker eingesetzt, die mit bestimmten phänotypischen oder chemotypischen Merkmalen oder erhöhter Krankheitsresistenz korrelieren (KAUNDUN und MATSUMOTO, 2003; SUGANTHI et al., 2014). Da die Züchtungshistorie von Rooibos sehr kurz ist, existieren solche Methoden für Rooibos noch nicht. Es ist auch kaum Sequenzinformation über *Aspalathus linearis* (Burm.f.) R. Dahlgren publiziert, die die Entwicklung von sequenzbasierten molekularen Markern wie SNPs oder Mikrosatelliten ermöglichen würde. Neben Markern, die auf konkreter Sequenzinformation basieren, gibt es auch solche, die ohne genetische Vorinformation verwendet werden können, wie z. B. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism). Diese Technik ist zwar günstig und leicht anwendbar, hat aber den Nachteil einer subjektiven und oftmals schlecht reproduzierbaren Auswertung komplexer Bandenmuster. Sie wurde hier angewandt, um Einzelbanden von Rooibos-Zuchtlinien und Handelsherkünften zu generieren und anschließend auf Basis von ermittelten Sequenzpolymorphismen dieser Einzelbanden HRM-Marker zu entwickeln. HRM (High-Resolution-Melting) ist eine stabile Methode, die rasch und relativ kostengünstig ist und sich besonders gut für die Identifizierung von Punktmutationen oder Indels eignet (SCHMIDERER et al., 2010). Sie basiert auf der Tatsache, dass Sequenzunterschiede zu unterschiedlichen Schmelzkurven führen, die durch Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffs gemessen werden können. Mit dieser Methode wurden genetische Marker zur Charakterisierung von Rooibos-Zuchtlinien analysiert und die Positionierung der Zuchtlinien gegenüber handelsüblichen Herkünften ermittelt.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Insgesamt wurden fünf Zuchtlinien und drei Herkünfte aus kommerziellem Anbau bzw. Wildsammlung untersucht. Mit Ausnahme der Zuchtlinie 32 (n=2) und 48 (n=14) wurden 10 Individuen pro Zuchtlinie untersucht. Die Wildsammlung (H3) bestand aus 20 Individuen, die kommerziellen Proben umfassten 16 (Handelsherkunft H2) respektive 9 (Handelsherkunft H1) Einzelproben pro Herkunft.

Alle Herkünfte wurden von der Fa. Martin Bauer (Vestenbergsgreuth, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden 8mg getrocknetes, verriebenes Blattmaterial eingesetzt. Die Extraktion erfolgte gemäß dem Protokoll von Schmiderer et al. (2013).

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Qualität und der DNA-Gehalt wurden mittels Gelelektrophorese auf einem 1,4 %igem Agarose-Gel nach Ethidiumbromidfärbung und mit dem Nanodrop (ThermoScientific, USA) gemäß Angaben des Herstellers bestimmt. Die Proben wurden auf eine einheitliche Konzentration von 2ng/µl gebracht.

PCR mit publizierten Primern (GAUR et al., 2012)

Die PCR Amplifikation wurde im Eppendorf MastercyclerGradient (Eppendorf, Österreich) in 15 µl Reaktionsvolumina durchgeführt, die 1x PCR-Puffer B (80 mM Tris-HCL pH 9,4 – 9,5 at 25 °C; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,02 % w/v Tween-20), 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 600 nM F- und R-Primer, 0,6 U Taq Polymerase (HOT FIREPol[®]DNA Polymerase I, Solis Biodyne, Estland) und 2ng genomischer DNA enthielten.

Das PCR-Programm war wie folgt: 15 min bei 95°C für die Aktivierung der Polymerase, anschließend 35 Zyklen mit 45 s bei 95°C, 45 s bei 50°C und 90 s bei 72°C und einer Extensionzeit von 9 min bei 72°C. Die Überprüfung der Amplifikationsergebnisse (Vorhandensein und Anzahl der Banden, Längenpolymorphismen) erfolgte mittels Gelelektrophorese auf einem 1,4 %igem Agarosegel und durch Färbung mit Ethidiumbromid. Die Banden wurden mit einem DNA-Längenmarker verglichen.

SRAP

Die PCR Amplifikation wurde in 15 µl Reaktionsvolumina durchgeführt, die aus 1x PCR-Puffer B (80 mM Tris-HCL pH 9,4 – 9,5 at 25 °C; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,02 % w/v Tween-20), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 600 nM F- und R-Primer (Tab. 1), 0,6 U Taq Polymerase (HOT FIREPol[®]DNA Polymerase I, Solis Biodyne, Estland) und 1 µl genomischer DNA (2ng/µl) bestanden. Die PCR wurde nach Aktivierung der Polymerase für 15 min bei 95°C in 38 Zyklen mit 1 min bei 95°C, 1 min bei 50°C und 2 min bei 72°C und einer Extensionzeit von 5 min bei 72°C durchgeführt. Die Reaktion erfolgte auch hier im Eppendorf MastercyclerGradient (Eppendorf, Österreich). Die Überprüfung der Amplifikationsergebnisse (Vorhandensein und Anzahl der Banden, Längenpolymorphismen) erfolgte mittels Gelelektrophorese auf einem 1,4 %igem Agarosegel und durch Färbung mit Ethidiumbromid. Die Banden wurden mit einem DNA-Längenmarker verglichen.

Es wurden vier Proben (DNA von jeweils zwei Selektionen und zwei kommerziellen Proben) für ein erstes Screening verwendet. Monomorphe Banden wurden sequenziert und die Sequenzen der Selektionen mit Sequenzen der kommerziellen Proben verglichen. Anhand der Sequenzen wurden Primer für die HRM entwickelt.

Tab. 1 Primer, mit denen die SRAP durchgeführt wurde (Guo et al., 2014)

Tab. 1 Primers used for SRAP analysis (Guo et al., 2014)

Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
me1 TGAGTCCAAACCGGATA	em1 GACTGCGTACGAATTAAT
me2 TGAGTCCAAACCGGAGC	em2 GACTGCGTACGAATTTGC
me3 TGAGTCCAAACCGGAAT	em3 GACTGCGTACGAATTGAC
me4 TGAGTCCAAACCGGACC	em4 GACTGCGTACGAATTTGA
me5 TGAGTCCAAACCGGAAG	em5 GACTGCGTACGAATTAAC
me6 TGAGTCCAAACCGGTAG	em6 GACTGCGTACGAATTGCA
me7 TGAGTCCAAACCGGTTG	em7 GACTGCGTACGAATTATG
me8 TGAGTCCAAACCGGTGT	em8 GACTGCGTACGAATTAGC
me9 TGAGTCCAAACCGGTCA	em9 GACTGCGTACGAATTACG
me10 TGAGTCCAAACCGGAGG	em10 GACTGCGTACGAATTTAG
me11 TGAGTCCAAACCGGAGA'	em11 GACTGCGTACGAATTTGC

Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
me12 TGAGTCCAAACCGGAAA	em12 GACTGCGTACGAATTGTC
me13 TGAGTCCAAACCGAAC	em13 GACTGCGTACGAATTGGT
me14 TGAGTCCAAACCGACA	em14 GACTGCGTACGAATTCAG
me15 TGAGTCCAAACCGGACG	em15 GACTGCGTACGAATTCTG
me16 TGAGTCCAAACCGGACT	em16 GACTGCGTACGAATTCGG
me17 TGAGTCCAAACCGGCAT	em17 GACTGCGTACGAATTCCA
me18 TGAGTCCAAACCGGGAC	em18 GACTGCGTACGAATTGAT
me19 TGAGTCCAAACCGGGTA	em19 GACTGCGTACGAATTCAA
me20 TGAGTCCAAACCGGGGT	em20 GACTGCGTACGAATTCAT
me21 TGAGTCCAAACCGGCAG	em21 GACTGCGTACGAATTCTA

Sequenzvorbereitung und Sequenzierung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels Enzymverdau mit Exo I und FAP (Fermentas, USA). Die Sequenzierung wurde von einer externen Firma durchgeführt, dementsprechend wurden die Proben (Verdünnung der PCR-Amplifikationsprodukte, Primerkonzentration) nach Angaben der Sequenzierfirma (Microsynth, Schweiz) aufbereitet.

Primerentwicklung

Die Sequenzbearbeitung, Vergleich der Sequenzen in Alignments und Primerentwicklung wurden mit dem Programm Geneious Pro 5.3.4 (Biomatters, Neuseeland) durchgeführt.

HRM

Die HRM und vorgeschaltete PCR wurde mit dem Rotor-Gene™ 6000 (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Für eine 10 µl PCR Reaktion wurde 2ng genomischer DNA, 1x HRM Mastermix (Solis BioDyne, Estland) und je 0.1 µM Forward- und Reverseprimer (Sigma, Austria) verwendet. Das PCR-Programm entsprach 95°C 14min für die Aktivierung der Polymerase, gefolgt von jeweils 45 Zyklen mit 95°C für 10s Denaturation, 10-20s Annealing und 72°C 20s Elongation. Die Ermittlung der Schmelzkurven erfolgte in Schritten von 0,1°C im Anschluss an eine abermalige Erhitzung auf 95°C für 30s. Die Annealingtemperatur und -länge und der Messbereich für die Schmelzkurvenanalyse waren abhängig von der jeweiligen Primerkombination (Tab. 2). Das Primerannealing war standardmäßig 20s, wurde aber für einige Primerkombinationen auf 10s angepasst. Es wurden alle Primerkombinationen mit einem kleineren Probenet (8 Proben) angetestet. Primer, die keine variablen Kurventypen oder nicht auswertbare Kurven ergaben, wurden ausgeschieden. Mit elf Primerkombinationen wurden alle Proben getestet. Die Analyse sämtlicher Proben erfolgte in Doppelbestimmungen. Die Qualität der PCR-Reaktion wurde anhand der Cq-Werte überprüft. Proben, bei denen die Einzelbestimmungen in Cq-Wert und/oder HRM-Kurve nicht übereinstimmten, wurden wiederholt. Die Vergleichbarkeit und Wiederholbarkeit der HRM-Kurven zwischen den Läufen wurde durch Festlegung von Referenzproben für bestimmte Kurventypen sichergestellt.

Software

Die HRM-Kurven wurden mit Hilfe der Rotor-Gene™ 6000 series software version 1.7.94. normalisiert und analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS 20 (SPSS Inc.).

Tab. 2 HRM-Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Primer sind auf Basis der ermittelten Sequenzen von SRAP-Einzelbanden respektive auf Basis publizierter Sequenzen einer nahe verwandten Fabaceae (*Cicer arietinum* L., GAUR et al, 2012) generiert worden. Angegeben sind die Temperaturen für Annealing und den Messbereich der HRM.

Tab. 2 HRM primers used in this study. The primers were designed based on sequence information achieved by sequencing of single SRAP bands or based on sequence information of a close relative (*Cicer arietinum* L., GAUR et al, 2012). Given are the temperatures for annealing and HRM ramp.

Primername	Sequenz (5'-3')	Tm in °C	Ramp in °C
Me12-Em7_1F	TCGATCAGTTAAGGAAGACTACTGAAGGG	55	73-82
Me12-Em7_1R	ACTGCGTACGAATTCAGCTTGC		
Me14-Em14_3F	TGGGCTTCGCGTTAATCACGCAT	57	68-89
Me14-Em14_3R	AGGCTGGTTGGTGCAGACCAT		
Me20-Em19_1F	AGGATGACNGCCTTGACGGT	57	77-86
Me20-Em19_1R	ACGGAGAATTACAGAAACCCTATGCT		
Me20-Em19_2F	AGCATAGGGTTTCTGTAATTCTCCGT	57	74-84
Me20-Em19_2R	AGCGTAGTGTCTTTTGTGACRA		
Me20-Em19_3F	CCTCTAGTGTCTGTACAAAACCCCC	59	73-83
Me20-Em19_3R	TCACTGTTGCTTCATGCTGTCTGT		
Me20-Em19_4FSSR	ACGACAGCATGAAGCAACAGTG	59	71-84
Me20-Em19_4RSSR	GCGCAATCGCAAAACCTGCCT		
Me21-Em2_3F	TGTTTCACGTACAGCTACTCCAGGT	57	77-90
Me21-Em2_3R	TGCAGCAGCACAAAGTCCCAGC		
Me2-EM20_2F	TGTKGGGACGGTTCATCCTG	56	73-85
Me2-Em20_2R	AGGCCTARCACTCATGGAGCGAA		
Me2-Em20_3F	TGGTTTCAGAGGACATTCGCTCCA	58	76-88
Me2-Em20_3R	CCTCGCCCTCCACCACCGAT		
Me11-Em16_2F	TCACCTCTCCCTCTCCGGC	59	74-87
Me11-Em16_2Ra	GCGACTTTGAAGAGGAATTGCAGGC		
Cic_ari_SNP7F	TGTTTCAGCGCGGAGCCAGG	55	78-87
Cic_ari_SNP7R	TGGACTGGAGACATGGGCGACT		

Ergebnisse

Ein erster Vergleich der genetischen Diversität der Zuchtlinien zu den Wildproben erfolgte mittels SRAP (sequence related amplified polymorphism). Es wurden vier Proben (DNA von jeweils zwei Selektionen und zwei kommerziellen Proben) und 441 SRAP-Primerkombinationen für ein erstes Screening verwendet. Es wurden aber nicht wie üblich polymorphe Bandenmuster ausgewertet, sondern Einzelbanden direkt sequenziert und die Sequenzen der Selektionen mit Sequenzen der kommerziellen Proben verglichen. Anhand gefundener Sequenzunterschiede wurden 63 Primersets für die HRM entwickelt. Diese Vorgangsweise hat den Vorteil, die zeitaufwendige und oft subjektive Auswertung der Bandenmuster zu umgehen und die Ergebnisse in ein stabileres System zu überführen. Zusätzlich wurde publizierte Sequenzinformation anderer Fabaceae-Arten (z.B. *Cicer arietinum*, GAUR et al., 2012) genutzt, um weitere HRM-Primer zu entwickeln, sodass in Summe 80 Kombinationen getestet wurden, von denen sich elf als polymorph und gut auswertbar erwiesen.

Mit diesen elf molekularen Markern wurden insgesamt 91 Proben aus fünf Zuchtlinien, zwei Herkünften kommerziellen Anbaus bzw. aus Wildsammlungsmaterial untersucht. Anhand der in der HRM-Analyse ermittelten Unterschiede wurden mittels kanonischer Diskriminanzanalyse (IBM SPSS Vs20) Diskriminanzfunktionen und eine Gruppenzugehörigkeit errechnet. Die ersten zwei Diskriminanzfunktionen wurden in einem Scatterplot dargestellt (Abb. 1).

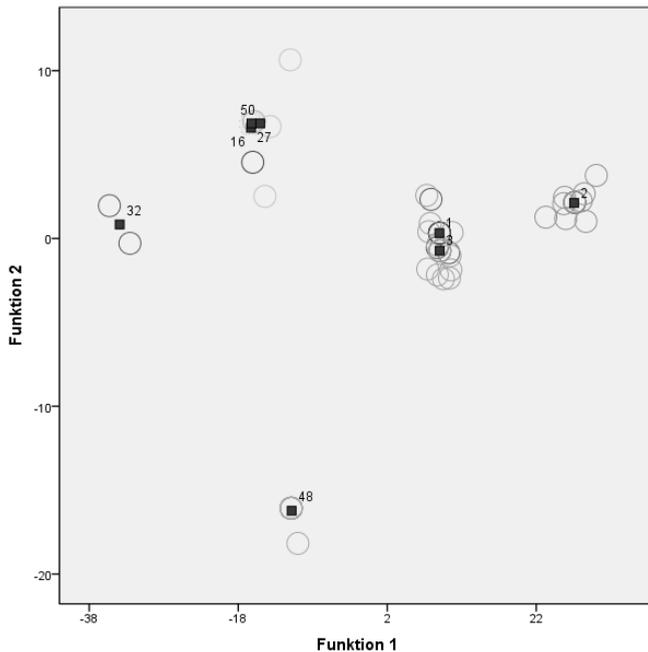


Abb. 1 Darstellung der ersten beiden Diskriminanzfunktionen von elf Primerkombinationen in Form eines 2D-Scatterplots. Die Herkünfte 1 bis 3 stammen aus Anbau bzw. Wildsammlung, alle anderen Bezeichnungen sind Zuchtlinien. Dargestellt sind Einzelproben mit Gruppenzentroiden, wobei genetisch idente Proben überlappen.

Fig. 1 2D scatterplot using the data of the first two functions of a discriminant analysis of eleven primer combinations. Genotypes 1, 2 and 3 originate from commercial samples and from wild collections, the other numbers (16, 27, 32, 48, 50) belong to different breeding lines. The circles correspond to single samples with overlapping circles for identical samples. The group's centroids are given in blue rectangles.

Die Diskriminanzfunktion 1 (75 % Varianzanteil) unterschied deutlich vier Gruppen, (1) Selektion 32, (2) Selektionen 16, 27, 48 und 50, (3) Handelsherkunft 1 und die Wildherkunft, (4) Handelsherkunft 2. Die Diskriminanzfunktion 2 (15 % Varianzanteil) führte zu einer zusätzlichen Abtrennung der Selektion 48 von der Gruppe 2. Damit sind drei von den fünf Züchtungslinien nicht eindeutig unterscheidbar. Die Linien 16 und 27 scheinen sogar genetisch ident zu sein. Die Selektion 48 war genetisch am weitesten entfernt.

Die aus den Diskriminanzfunktionen errechnete Gruppenzugehörigkeit der Einzelproben ist in Tab. 3 dargestellt. Dementsprechend wurden alle Proben zu 100 % dem korrekten Genotyp zugeordnet mit Ausnahme der Selektion 27, bei der 80 % der Proben als Selektion 16 und 20% als Selektion 50 klassifiziert wurden.

Tab.3 Vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit und kreuzvalidierte (strikt berechnete) Gruppenzugehörigkeit der Genotypen in Prozent. Genotyp H1 und H2 sind Handelsherkünfte, Genotyp H3 stammt aus Wildsammlungen (n ... Anzahl der Individuen).

Tab. 3 Classification results and crossvalidated grouped cases of the genotypes given in percentages. Genotype H1 and H2 are commercial samples, genotype H3 originates from wild collections (n ... number of individuals).

Klassifizierungsergebnisse	Genotyp	H1	H2	H3	Sel16	Sel27	Sel32	Sel48	Sel50	Total %	Total n
Original %	H1	100	0	0	0	0	0	0	0	100	9
	H2	0	100	0	0	0	0	0	0	100	16
	H3	0	0	100	0	0	0	0	0	100	20
	Sel16	0	0	0	100	0	0	0	0	100	10
	Sel27	0	0	0	80	0	0	0	20	100	10
	Sel32	0	0	0	0	0	100	0	0	100	2
	Sel48	0	0	0	0	0	0	100	0	100	14
	Sel50	0	0	0	0	0	0	0	100	100	10
Kreuzvalidiert %	H1	88,9	0	11,1	0	0	0	0	0	100	9
	H2	0	43,8	6,3	0	6,3	18,8	18,8	6,3	100	16
	H3	10	25	35	0	0	15	10	5	100	20
	Sel16	0	0	0	90	0	0	10	0	100	10
	Sel27	0	0	0	80	0	0	0	20	100	10
	Sel32	0	0	50	0	0	0	0	50	100	2
	Sel48	0	0	0	0	0	0	100	0	100	14
	Sel50	0	20	10	0	0	0	0	70	100	10

Zwischen der Darstellung als Scatterplot (Abb. 1) und der Tabelle der Gruppenzugehörigkeit (Tab. 3) gibt es Unterschiede, die dadurch bedingt sind, dass die Abbildung nur die ersten beiden Dimensionen (Diskriminanzfunktionen) darstellen kann, während bei der Berechnung der Gruppenzugehörigkeit alle Diskriminanzfunktionen (in diesem Fall sechs Dimensionen) berücksichtigt werden. Deswegen ist die Gruppenzugehörigkeit in Tab. 3 verlässlicher als eine eigene visuelle Abschätzung aus dem Scatterplot in Abb. 1.

Bei der Kreuzvalidierung wird jede Probe, die gerade klassifiziert werden soll, aus dem Probensatz genommen und mit dem verbleibenden Probensatz die Diskriminanzfunktionen neu berechnet. Die Probe ist daher eine wirkliche Unbekannte. Dementsprechend ist eine Kreuzvalidierung immer wesentlich strikter als die normale Berechnung der Gruppenzugehörigkeit. Nach Kreuzvalidierung waren die Sicherheiten einer korrekten Klassifikation nur mehr 57 % im Gegensatz zu 89 % bei normaler Klassifizierung (Tab. 3). Der hohe Überlappungsgrad einiger Herkünfte war unter anderem ein Grund dafür. Ein weiterer Grund war, dass die Handelsproben und die Wildprobe sehr heterogen waren, aber auch die Individuen der Selektionen zum Teil variabel waren, obwohl sie durch ihre klonale Vermehrung eigentlich genetisch ident sein sollten. Dies könnte auf die Verwendung mehrerer Mutterpflanzen für die Verklonung der Linien oder auf einen Saatgutausfall innerhalb des Mutterquartiers hinweisen. Zusätzlich zu diesen Argumenten deutet die deutliche Verschlechterung der Gruppenzugehörigkeit bei der Kreuzvalidierung darauf hin, dass noch nicht genügend Analysen in die Erstellung des Diskriminanzmodells eingeflossen sind.

Trotzdem waren die Selektionen 16 und 27 gut von allen kommerziellen Proben und den Wildproben unterscheidbar, bei den Selektionen 32 und 50 war die Differenzierbarkeit mit einer größeren statistischen Unsicherheit behaftet. Anhand der Klassifizierungsergebnisse wäre eine gemeinsame Herkunft der Linien 16, 27 und 50 sowie der beiden Linien 32 und 48 denkbar.

Obwohl für eine statistisch gut abgesicherte Identifizierung mittels Kreuzvalidierung die Zuchtlinien wirklich klonal sein sollten und noch mehr Proben für die Erstellung des Diskriminanzmodells notwendig sein dürften, eignet sich die bestehende Methode bereits gut für eine Identifizierung der Zuchtlinien und lässt sich für eine weitere Zucht- und Vermehrungsplanung effizient einsetzen.

Danksagung

Wir danken der Fa. Martin Bauer (Vestenbergreuth, Deutschland) für die finanzielle Unterstützung dieser interessanten Fragestellung.

Literatur

- Chaisan, T., Van, K., Kim, M.Y., Kim, K.D., Choi, B.S. und S.H. Lee, 2012: In silico single nucleotide polymorphism discovery and application to marker-assisted selection in soybean. *Mol Breeding* 29,221–233.
- Directorate Marketing, 2010: A Profile of the South African Rooibos Tea Market Value Chain. Department Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of South Africa. www.daff.gov.za letzter Besuch: 29.5.2018.
- Gaur, R., Azam, S., Jeena, G., Khan, A.W., Choudhary, S., Jain, M., Yadav, G., Tyagi, A.K., Chattopadhyay, D. und S. Bhatia, 2012: High-Throughput SNP discovery and genotyping for constructing a saturated linkage map of chickpea (*Cicer Arietinum* L.). *DNA Res* 19, 357–373.
- Guo, Y., Lin, H., Liu, Z., Zhao, Y., Guo, X. und K. Li, 2014: SSR and SRAP marker-based linkage map of *Vitis vinifera* L.. *Biotechnol Biotec Eq* 28 (2), 221-229.
- Kaundun, S.S. und S. Matsumoto, 2003: Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in Tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between assamica and sinensis varieties. *Theor Appl Genet* 106, 375-383.
- Ori, F., Ma, J.Q., Gori, M., Lenzi, A., Chen, L. und E. Giordani, 2017: DNA-based diversity of tea plants grown in Italy. *Genet Resour Crop Evol* 64(8), 1905-1915.
- Schmiderer, C., Lukas, B. und J. Novak, 2013: Effect of different DNA extraction methods and DNA dilutions on the amplification success in the PCR of different medicinal and aromatic plants. *Z Arznei- Gewürzpfl* 18, 65-72.
- Schmiderer, C., Mader, E. und J. Novak, 2010: DNA-based identification of *Helleborus niger* by High-Resolution-Melting Analysis (HRM). *Planta Med* 76, 1-4.
- Sharma, R.K., Bhardwaj, P., Negi, R., Mohapatra, T. und P.S. Ahuja, 2014: Identification, characterization and utilization of unigene derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis* L.). *BMC Plant Biol* 9: 53.
- Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S., Rajkumar, R. und K.N. Chandrashekar, 2014: RAPD and SCAR Markers Linked to Tea-Mosquito Resistance in Tea. *Journal of Crop Improvement*, 28 (6), 795-803.
- Zhao, D.W., Yang, J.B., Yang, S.X., Kato, K. und J.P. Luo, 2014: Genetic diversity and domestication origin of tea plant *Camellia taliensis* (Theaceae) as revealed by microsatellite markers. *BMC Plant Biol* 14: 14.