

Genetische und molekularbiologische
Untersuchungen zur Hitzestresstoleranz
bei Tomaten

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Dörthe Musmann
geboren am 24.07.1983 in Bremervörde

2015

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Debener

Korreferent: Prof. Dr. sc. agr. Hartmut Reinhold Ernst Stützel

Tag der Promotion: 24.09.2015

Kurzfassung

Die Tomate (*Solanum lycopersicum*) gehört zu den wichtigsten Gemüsearten mit einer weltweiten Produktionsfläche von 4,7 Mio. Hektar. Die Hauptanbauggebiete liegen in tropischen und subtropischen Ländern, in denen die Tomatenproduktion von der prognostizierten Klimaänderung durch stark steigende Temperaturen beeinflusst werden wird. Schon heute lassen sich Auswirkungen der hohen Temperaturen in diesen Gebieten auf die Lebensfähigkeit der Pollenkörner, den Fruchtansatz und damit verbunden auch den Fruchtertrag nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Klimafaktoren untersucht, die die Lebensfähigkeit von Pollenkörnern der Tomate unter Hitzestress beeinflussen können. Es konnten starke Einflüsse der minimalen Tagestemperatur, der Luftfeuchtigkeit sowie der Bodentemperatur ermittelt werden. Darüber hinaus wurden Zusammenhänge zwischen phänotypischen Merkmalen hergestellt, welche einen Einfluss der Pollenlebensfähigkeit auf Merkmale der Frucht wie den Fruchtertrag oder den Samenindex einer Frucht sowohl unter Hitzestress-, als auch unter optimalen Temperaturbedingungen nachwies. In umfangreichen phänotypischen Evaluierungen erfolgte eine Einschätzung der Hitzetoleranz zahlreicher Genotypen, wodurch optimale Kreuzungspartner für die Aufklärung der genetischen Architektur der Hitzetoleranz identifiziert werden konnten.

Eine Analyse der Hitzetoleranzmechanismen der Tomate fand sowohl auf regulatorischer als auch auf genomischer Ebene statt. Auf regulatorischer Ebene konnten 1.897 signifikant regulierte Transkripte mit Bezug zur Hitzestressantwort bzw. zum Hitzestresstoleranztyp in Antheren der Tomate identifiziert werden. Durchschnittlich weisen die hitzesensitiven Genotypen mehr Hochregulationen, die hitzetoleranten Genotypen mehr Herunterregulationen auf. Die identifizierten Expressionsänderungen beziehen sich auf Stoffwechselwege wie den Kohlenhydratstoffwechsel, blütenspezifische Regulationen in Bezug auf das Pollenschlauchwachstum oder die Pollenfunktion, autophagische oder apoptotische Mechanismen, die Zellwand beeinflussende Prozesse, Wassertransportmechanismen oder bekannte Hitzeschockproteine und Hitzestresstranskriptionsfaktoren. Im Rahmen einer QTL-Kartierung wurden 20 QTL mit Bezug zu Blüten- und Fruchtmerkmalen auf 6 der 12 Chromosomen der Tomate detektiert. Eine Kollokalisierung verschiedener QTL trat auf 4 Chromosomen auf. Durch Verknüpfung der Ergebnisse auf regulatorischer und genomischer Ebene konnten Kandidatengene für die Hitzetoleranz der Tomate identifiziert werden. In dieser Studie war es möglich, einen Eindruck über Toleranzmechanismen der Tomate gegenüber langandauerndem Hitzestress zu gewinnen und potenzielle Kandidatengene zu identifizieren. Diese Kenntnisse erweitern das Verständnis über die Vorgänge in der Ausbildung einer Hitzetoleranz in der Tomate.

Schlagwörter: Tomate, *Solanum lycopersicum*, Hitzestress, Klimafaktoren, Genexpression, Antheren, QTL, Kandidatengen

Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important vegetables worldwide with a production area of 4.7 million hectare. It is grown predominantly in tropical and sub-tropical areas, in which the production of tomato fruits will be strongly influenced by rising temperatures because of predicted climate changes. By now, effects of high temperatures on tomato production are already visible. These comprise the reduction of pollen viability, fruit set and fruit yield.

In this study, influences of different climate factors on the viability of pollen grains during heat stress were analysed. Strong effects were determined for minimal day temperature, humidity and soil temperature under heat stress conditions. In addition, correlation analysis between traits influenced by heat stress demonstrated the fundamental role of pollen viability in yielding fruits and setting seeds under heat stress. Extensive phenotypic evaluation resulted in the assessment of heat tolerance type of numerous genotypes, by what ideal parents for crossing experiments were determined to analyse the genetic architecture of heat tolerance in tomato.

Mechanisms of heat tolerance were analysed on both regulatory and genomic level. Expression analysis revealed 1,897 significantly regulated transcripts in anthers of tomato plants in response to heat stress or heat tolerance type. On average, heat sensitive genotypes showed more upregulations, whereas for heat tolerant genotypes, more downregulations were observed in response to heat stress. The identified regulations refer to carbohydrate metabolism, flower specific regulations like pollen tube growth or functionality of pollen grains, mechanisms of autophagy or apoptosis, cell wall influencing processes, water transportation or known heat shock proteins and heat stress transcription factors.

A QTL mapping approach revealed 20 QTL on 6 of the 12 chromosomes of tomato, which showed a significant influence on flower and fruit traits affected by long-term heat stress. Co-localization of QTL was observed on 4 chromosomes. The combination of results of the regulatory and genomic analysis identified candidate genes for heat tolerance in tomato. These are excellent candidates for further investigations on heat tolerance mechanisms.

In this study, it was possible to get an impression on heat tolerance mechanisms in tomato in response to long-term moderate heat stress and to identify candidate genes. Therefore, this study contributes to strengthen the understanding on how heat tolerance works in tomato and which processes are influenced by heat.

Key words: tomato, *solanum lycopersicum*, heat stress, climate factors, gene expression, anthers, QTL, candidate gene

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	I
Abstract	II
1. Einleitung	1
1.1 Hitzestress.....	1
1.2 Auswirkungen und Mechanismen des Hitzestresses	1
1.3 Hitzestress bei der Tomate.....	4
1.3.1 Tomate	4
1.3.2 Molekulargenetische Analysen in der Tomate.....	4
1.3.3 Auswirkungen des Hitzestresses auf die Tomate.....	6
1.3.4 Aufgabe von Hitzeschockproteinen in Tomaten.....	7
1.3.5 Reaktionsmechanismen auf kurzzeitigen Hitzestress in der Tomate.....	9
1.4 Zielsetzungen der Arbeit	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Pflanzenmaterial.....	12
2.2 Anzuchtbedingungen.....	13
2.2.1 Freilandversuch am AVRDC in Taiwan	13
2.2.2 Gewächshausversuch am AVRDC in Taiwan	14
2.2.3 Gewächshausversuche an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover	14
2.3 Boniturmerkmale für die Einstufung der Hitzetoleranz	15
2.3.1 Bonitur des Pollens	15
2.3.2 Boniturschemata der Frucht	16
2.4 Versuchsdesign	17
2.4.1 Phänotypische Einstufung der Hitzetoleranz	17
2.4.1.1 Beurteilung des Effektes einer nächtlichen Luftabkühlung unter Hitzestress	17
2.4.1.2 Einstufung des Hitzetoleranztyps unter Freilandbedingungen	17
2.4.1.3 Einstufung des Hitzetoleranztyps unter kontrollierten Bedingungen.....	19
2.4.1.4 Phänotypische Charakterisierung einer F4-Population unter kontrollierten Bedingungen....	19
2.4.1.5 Statistische Auswertung der phänotypischen Daten	20
2.5 Analyse der Hitzestresstoleranz auf Expressionsebene	20
2.5.1 RNA-Extraktion.....	20
2.5.2 Restriktion noch vorhandener DNA in RNA-Proben.....	21
2.5.3 Expressionsanalyse mit Hilfe des CustomArray™ 90K Microarray der Firma ‘Combimatrix‘ ...	22
2.6 Analyse der differentiellen Expression mittels RT-qPCR.....	24
2.6.1 Primerentwicklung für differentiell exprimierte Gene	24
2.6.2 Reverse Transkription	25
2.6.3 RT-qPCR.....	25
2.7 Molekulare Untersuchungen zur Hitzetoleranz	26
2.7.1 DNA Extraktion.....	26
2.7.2 Genotypisierung mit AFLP-Markern	27
2.7.3 Genotypisierung mit SSR-Markern.....	28
2.7.4 Analyse von DArT-Markern in der aufspaltenden Population	29
2.7.5 Analyse von SNP Markern in der aufspaltenden Population.....	29

2.7.6 Berechnung der genetischen Karten.....	29
2.7.7 Vergleich der genetischen mit der physikalischen Karte der Tomate	30
2.7.8 QTL-Kartierung.....	30
2.7.9 Vergleich der Expressions- und QTL-Ergebnisse.....	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Einfluss ausgewählter Klimafaktoren des Hitzestresses auf Merkmale des Pollens	32
3.1.1 Effekt einer verringerten nächtlichen Abkühlung unter Hitzestressbedingungen	32
3.1.2 Effekte der Luft- und Bodentemperatur sowie der Luftfeuchtigkeit	34
3.2 Statistische Analyse der Zusammenhänge zwischen phänotypischen Merkmalen	37
3.2.1 Zusammenhänge unter kontrollierten Bedingungen	37
3.2.2 Zusammenhänge unter Freilandbedingungen	39
3.3 Phänotypische Charakterisierungen zur Bestimmung der Hitzetoleranztypen	41
3.3.1 Phänotypische Charakterisierung unter kontrollierten Bedingungen	41
3.3.2 Phänotypische Charakterisierung unter Freilandbedingungen.....	44
3.4 Analyse der Hitzetoleranzmechanismen in Antheren der Tomate	46
3.4.1 Phänotypische Charakterisierung der F4-Population	46
3.4.2 Expressionsanalyse in Antheren der Tomate.....	50
3.4.3 Expressionsanalyse mittels RT-qPCR.....	59
3.5 Identifizierung merkmalsassoziierter Genomregionen mittels QTL-Kartierung	63
3.5.1 Erstellung einer genetischen Karte	63
3.5.2 QTL-Kartierung.....	64
3.6 Identifizierung von Kandidatengenen für die Hitzetoleranz der Tomate	77
4. Diskussion.....	79
4.1 Einfluss unterschiedlicher Klimafaktoren des Hitzestresses auf Merkmale des Pollens.....	79
4.2 Statistische Analyse der Zusammenhänge zwischen phänotypischen Merkmalen	82
4.3 Analyse der Hitzetoleranzmechanismen in Antheren der Tomate	85
4.3.1 Identifizierung von Genen mit Bedeutung in der Hitzestressantwort in Antheren.....	85
4.3.1.1 Komplexität der Regulation in Antheren unter Hitzestress	85
4.3.1.2 Expression von Genen der Hsf und Hsp in Tomatantheren.....	87
4.3.1.3 Expression von Genen der Blüte in Tomatantheren bei langanhaltendem moderatem Hitzestress	91
4.3.1.4 Beeinflussung von Stoffwechselwegen durch langanhaltenden moderaten Hitzestress.....	93
4.3.1.5 Beeinflussung der Zellwand- und Membranbeschaffenheit durch langanhaltenden moderaten Hitzestress	94
4.3.1.6 Initiierung von Autophagie-Mechanismen als Reaktion auf langanhaltenden moderaten Hitzestress	100
4.3.1.7 Beeinflussung des Wassertransportes bei langanhaltendem moderatem Hitzestress.....	103
4.3.2 Verifizierung der differentiellen Expression ausgewählter Gene mittels RT-qPCR	104
4.4 Identifizierung von QTL-tragenden Genomregionen.....	106
4.4.1 Qualität der genetischen Karte.....	106
4.4.2 Identifizierung merkmalsassoziierter Genomregionen.....	107
4.4.2.1 Fruchtansatz.....	108
4.4.2.2 Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner	109

4.4.2.3 Anzahl an Früchten pro Infloreszenz.....	110
4.4.2.4 Anzahl an samenhaltigen Früchten pro Infloreszenz.....	111
4.4.2.5 Anzahl an Blüten pro Infloreszenz.....	112
4.5 Identifizierung von Kandidatengen für die Hitzetoleranz der Tomate.....	113
5. Schlussfolgerung und Ausblick.....	117
6. Referenzen.....	119
7. ANHANG.....	A
7.1 zusätzliche Materialien.....	A
7.2 Primersequenzen.....	I
7.3 Internetadressen, Substanzen und Geräte.....	L
7.4 Elektrophoresen.....	O
7.4.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	O
7.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	O
Lebenslauf.....
Wissenschaftliche Publikationen.....
Danksagung.....

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Übersicht über Reaktionsmechanismen der Hitzestresstoleranz.3

Abbildung 1.2: Funktion von Hitzeschockproteinen in der Regulation apoptotischer Signalwege....3

Abbildung 1.3: Zusammenspiel von Hsf und Hsp in der Hitzestressantwort.....9

Abbildung 2.1: Evaluierung des Pollens sowie der Parthenokarpie und des Samenindexes..... 16

Abbildung 2.2: Versuchsdesign unter kontrollierten Bedingungen in Gewächshauskabinen am
AVRDC in Taiwan.....18

Abbildung 2.3: Freilandexperiment am AVRDC in Taiwan.....18

Abbildung 3.1: Effekt einer verringerten Nachttemperatur auf Merkmale des Pollens33

Abbildung 3.2: Klimatische Bedingungen während des Freilandexperiments am AVRDC35

Abbildung 3.3: Analyse der Korrelationen zwischen Klimafaktoren des Hitzestresses37

Abbildung 3.4: Vergleich der Korrelationsergebnisse unter Hitzestress und Kontrollbedingungen 39

Abbildung 3.5: Korrelationszusammenhänge der untersuchten Merkmale im Feldversuch41

Abbildung 3.6: Beeinflussung des Pollens durch Hitzestress.....42

Abbildung 3.7: Analyse der Hitzetoleranz verschiedener Nachkommenschaften46

Abbildung 3.8: Temperaturprofil einer Gewächshauskabine im F4-Nachkommenschaftstest47

Abbildung 3.9: Merkmalsverteilung für die Merkmale Anzahl lebensfähiger Pollenkörner und
Pollenausbeute48

Abbildung 3.10: Identifizierung extremer Hitzetoleranztypen I.....48

Abbildung 3.11: Identifizierung extremer Hitzetoleranztypen II49

Abbildung 3.12: Identifizierung extremer Hitzetoleranztypen III49

Abbildung 3.13: Expressionsänderung einiger differentiell exprimierter Gene57

Abbildung 3.14: Physikalische Lokalisation der differentiell exprimierten Gene auf den
Chromosomen 1 und 2.....59

Abbildung 3.15: C_T-Werte der Messwiederholungen für die Primerpaare 4, 6, 7 und Hsp17-6CII. 60

Abbildung 3.16-3.24: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte, QTL-Kartierung ..67-75

Abbildung 4.1: Rolle von Cystein als Ausgangspunkt für mögliche Toleranzmechanismen. 100

Abbildung 4.2: Veranschaulichung der Mechanismen der Autophagie..... 102

Abbildung 7.1.1: Physikalische Lokalisation der differentiell exprimierten Gene..... F

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Pflanzenmaterial sowie deren Prüfumwelten	12
Tabelle 2.2: RIL-Kartierungspopulation der Kreuzungseltern CLN1621L und CA4.....	13
Tabelle 2.3: Boniturmerkmale zur Bestimmung des Hitzetoleranztyps	15
Tabelle 2.4: Probenmischungen für die Expressionsanalyse mit Hilfe des CustomArray™ 90K....	21
Tabelle 2.5: Probenmischungen für die Expressionsanalyse mit Hilfe einer RT-qPCR	22
Tabelle 2.6: Belegung der drei CustomArray™ 90K Microarrays	24
Tabelle 2.7: PCR-Bedingungen zur Etablierung der neu entwickelten Primer.	25
Tabelle 2.8: PCR-Bedingungen der RT-qPCR.	26
Tabelle 2.9: PCR-Programm für die Präamplifikation.....	28
Tabelle 2.10: PCR-Programm für die finale Amplifikation.	28
Tabelle 2.11: PCR-Programm für eine Mikrosatelliten-PCR.....	29
Tabelle 3.1: Korrelationsanalyse zwischen der Nachttemperatur unter Tageshitzestress und Merkmalen des Pollens.....	33
Tabelle 3.2: Korrelationsanalyse zwischen Klimafaktoren des Hitzestresses und Merkmalen des Pollens	36
Tabelle 3.3: Merkmalskorrelationen unter kontrollierten Bedingungen	38
Tabelle 3.4: Merkmalskorrelationen unter Freilandbedingungen.....	40
Tabelle 3.5: Varianzanalyse für züchterisch wertvolle Merkmale.....	40
Tabelle 3.6: Einstufung der Hitzetoleranz unter kontrollierten Bedingungen	43
Tabelle 3.7: Einstufung der Hitzetoleranz verschiedener Genotypen unter Freilandbedingungen...	45
Tabelle 3.8: Regulationen mit Bezug zum Hitzestress oder Toleranztyp	51
Tabelle 3.9: Expressionsmuster ausgewählter Gene	52-54
Tabelle 3.10: Expressionsänderungen ausgewählter Gene analysiert mittels RT-qPCR	62
Tabelle 3.11: Übersicht über die Ergebnisse der genetischen Kartierung nach Kosambi	64
Tabelle 3.12: Ergebnisse der QT-Kartierung	76
Tabelle 3.13: Vergleich der Ergebnisse der QTL-Kartierung und Expressionsanalyse	78
Tabelle 7.1.1: Phänotypische Charakterisierung der F4-RIL-Kartierungspopulation.....	A-B
Tabelle 7.1.2: Expressionsmuster ausgewählter Gene mit Bezug zur Hitzetoleranz oder bedeutenden Funktionen	C-E
Tabelle 7.1.3: F2-Kartierungspopulation	G-H
Tabelle 7.1.4: Marker/Merkmal-Assoziationen nach Kruskal-Wallis	I
Tabelle 7.2.1 Primersequenzen der AFLP-Reaktion.....	I
Tabelle 7.2.2 AFLP-Primerkombinationen für die Endreaktion	J
Tabelle 7.2.3: Sequenzen der vom AVRDC bereitgestellten SSR-Primer.....	J-K

Tabelle 7.2.4 SSR-Primer aus der SGN-Datenbank.	K
Tabelle 7.2.5: Primer für die RT-qPCR.	L
Tabelle 7.8 Internetadressen	L
Tabelle 7.9 Substanzen und Reagenzien	L
Tabelle 7.10 Verwendete Geräte	M
Tabelle 7.11 Hersteller der Geräte und Chemikalien	N

Abkürzungsverzeichnis:

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
aRNA	amplified antisense RNA
ATP	Adenosintriphosphat
AVRDC	AVRDC - The World Vegetable Center (früher: The Asian Vegetable Research and Development Center)
B	Merkmal Anzahl an Blüten
Bl	Merkmal Blühbeginn
bp	Basenpaare
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
C.I.	Konfidenzintervall
cM	centi Morgan
C _T	cycle threshold
KW	Kalenderwoche
DArT	Diversity Arrays Technology
df	Freiheitsgrad
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphate
E	Expressionsänderung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tags
F1	erste Filialgeneration
F2	zweite Filialgeneration
F4	vierte Filialgeneration
F _A	Merkmal Fruchtansatz
F _B	Merkmal Fruchtbreite
F _{Boden}	Merkmal Form des Fruchtbodens
FDA	Fluorescein-Diacetat
F _H	Merkmal Fruchthöhe
HPLC-H ₂ O	High-Performance Liquid Chromatography- Wasser
Hsc	Hitzeschock-verwandtes Protein
Hsf	Hitzestresstranskriptionsfaktor
Hsp	Hitzeschockprotein
sHsp	kleines („small“) Hitzeschockprotein

ITAG	International Annotation Group
kb	Kilobasen
LOD	Logarithm of ODds
MAS	Marker-Assisted Selection, Marker-gestützte Selektion
Mbp	Mega- Basenpaare (10^6 bp)
mM	millimolar
MW	Molekulargewicht
NA	not assigned, keine Messdaten/ Ergebnisse vorhanden
NF	Merkmal Anzahl an Früchten je Pflanze
N_F	Merkmal Anzahl an Früchten je Infloreszenz
N_{FM}	Merkmal Anzahl an vermarktungsfähigen Früchten
N_{Fs}	Merkmal Anzahl samenhaltiger Früchte
P	Merkmal Parthenokarpie
PCR	Polymerase Chain Reaction
$Poll_G$	Merkmal Pollenausbeute
$Poll_k$	Merkmal Anzahl lebensfähiger Pollenkörner
$Poll_{nk}$	Merkmal Anzahl nicht lebensfähiger Pollenkörner
QTL	Quantitative Trait Locus, pl.: Quantitative Trait Loci
r	Korrelationskoeffizient
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGA	Resistenzgenanalogon
RIN	RNA Integritätswert
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	quantitative Realtime-PCR
S	Merkmal Samenindex
SE	Merkmal Stigma-Ausstülpung
SGN	SOL Genomics Network
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOL	The International Solanaceae Genome Project
SSR	Simple Sequence Repeat
SH	hitzesensitiver Genotyp unter Hitzestressbedingungen
SN	hitzesensitiver Genotyp unter optimalen Temperaturbedingungen
X	

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TH	hitzetoleranter Genotyp unter Hitzestressbedingungen
TN	hitzetoleranter Genotyp unter optimalen Temperaturbedingungen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

1. Einleitung

1.1 Hitzestress

Extrem- und Rekordtemperaturen sind ein weltweit zu beobachtendes Phänomen (National Climate Data Center NOAA, Februar 2015). Es treten sowohl erhöhte, als auch erniedrigte Temperaturen auf, an die sich das Tier- und das Pflanzenreich anpassen müssen. Bereits jetzt können negative Effekte auf die Agrarwirtschaft beobachtet werden, wobei besonders Temperaturextreme große Wirkung zeigen (LOBELL et al., 2011; HATFIELD et al., 2011). Der durch Hitze induzierte Stress tritt meist nicht in Form eines kurzzeitigen Schocks, sondern stetig und über einen längeren Zeitraum auf.

WAHID et al. (2007) definierten den Begriff Hitzestress als eine Temperaturerhöhung, welche einen definierten Schwellenwert über einen kurzzeitigen oder längeren Zeitraum überschreitet und das Wachstum sowie die Entwicklung der Pflanze irreversibel schädigt. Eine Temperaturerhöhung zwischen 10°C und 15 °C bezeichneten sie als Hitzeschock. Extreme Temperaturbedingungen treten besonders in tropischen und subtropischen Gebieten auf und stellen die Pflanzenproduktion vor große Herausforderungen. Ziel der Toleranzzüchtung ist es deshalb, die durch Hitzestress entstehenden Schädigungen an der Pflanze zu minimieren.

1.2 Auswirkungen und Mechanismen des Hitzestresses

Hitzestress beeinflusst die Entwicklung der Pflanze sowohl auf morphologischer bzw. physiologischer als auch auf biochemischer Ebene (WAHID et al., 2007). So sind beispielsweise Beeinflussungen des Fruchtertrages, der Fruchtqualität, zahlreicher Stoffwechselwege und des Cytoskeletts beobachtet worden (KINET UND PEET, 1997; MAESTRI et al., 2002; PRASAD et al., 2003; PRASAD et al., 2006; FIRON et al., 2006; SZALAY et al., 2007; TOIVOLA et al., 2010). KARIM et al. (1997) und SONG et al. (2014) konnten neben anderen über einen negativen Effekt des Hitzestresses auf Vorgänge der Photosynthese berichten. Die Ausbildung einer Hitzetoleranz hängt somit von vielen verschiedenen Mechanismen ab (Abbildung 1.1).

SONG et al. (2014) identifizierten 29.896 differentiell exprimierte Gene als Antwort auf einen kurzzeitigen Hitzeschock von 42 °C in *Populus simonii*. In anderen pflanzlichen Organismen konnten auf Expressionsebene Hochregulationen in ca. 5 % des Transkriptoms als Reaktion auf Hitzestress beobachten werden, wobei viele davon hitzeinduzierte Chaperone, so genannte Hitzeschockproteine, repräsentieren (RIZHSKY et al., 2004; LARKINDALE UND VIERLING, 2008; QIN et al., 2008; FINKA et al., 2011). Hitzeschockproteine (Hsp) wurden bereits in zahlreichen Studien untersucht und mit der Reaktion auf Hitzestress oder Hitzeschock in Verbindung gebracht. RICHTER et al. (2010) unterteilten sie in sieben Klassen: die eigentlichen Hsp-Proteine als molekulare Chaperone, daneben Komponenten des proteolytischen Systems, in Reparatur von Nukleinsäuren

involvierte Proteine wie DNA- oder RNA-modifizierende Enzyme, metabolische Enzyme, regulatorische Enzyme wie Transkriptionsfaktoren oder Kinasen, Proteine zur Erhaltung der zellulären Struktur sowie Proteine in Bezug auf Transport-, Entgiftungs- und Membranmodulierungsmechanismen. Die am häufigsten untersuchte Klasse ist die der eigentlichen Hsp. Diese umfasst Proteine wie Hsp60, Hsp70, Hsp80 und Hsp90, welche stark konserviert und in einem breiten Spektrum an Organismen vorkommen (VIERLING, 1991). Neben diesen gut untersuchten Proteinen konnten auch andere Hsp wie Hsp30 oder Hsp33 identifiziert werden (PIPER et al., 1997; JAKOB et al., 1999). Solche Chaperone sind in die Sicherung der korrekten Proteinfaltung und -degradation, die Proteintranslokation sowie die Reaktivierung geschädigter Proteine involviert und regulieren dadurch direkt die Mechanismen der Apoptose (GETHING UND SAMBROOK, 1992; HENDRICK UND HARTL, 1993; PARSELL UND LINDQUIST, 1993; MOSELEY et al., 1994; HARTL, 1996; SCHMITT et al., 2007; VOELLMY UND BOELLMANN, 2007; siehe Abbildung 1.2). Hsp27 und Hsp70 beeinflussen beispielsweise die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus den Mitochondrien, während eine Bindung von Hsp90 an Apaf1 die Aktivierung der Kaspase3 verhindert und so Apoptosemechanismen aussetzen kann. Neben der regulierenden Wirkung können Hsp70 und Hsp90 auch aktiv durch die Beeinflussung des Transkriptionsfaktors κ B auf das Überleben der Zelle einwirken. Solche Prozesse werden durch diverse Stresstypen ausgelöst (TIMPERIO et al., 2008; ZHANG et al., 2015). AHN UND ZIMMERMAN (2006) zeigten, dass durch die Übertragung und Expression eines Hsp17.7 kodierenden Gens aus *Daucus carota* L. eine verstärkte Hitzetoleranz in *Solanum tuberosum* L. erzielt werden konnte. Der funktionelle Nachweis der Aufgabe solcher Hsp-Proteine in der Ausbildung einer Hitzestresstoleranz ist somit auch durch transgene Ansätze erfolgt. Die Regulation von Hitzeschockproteinen übernehmen andere Proteine, die sogenannten Hitzestress-transkriptionsfaktoren. Diese werden in drei Klassen unterteilt: HsfA, HsfB und HsfC (NOVER et al., 2001).

Für die Gruppe der Hitzeschockproteine sind Funktionen in allgemeinen Zellprozessen unabhängig von einer Stresseinwirkung beschrieben worden (BECKER et al., 2003; SHEORAN et al., 2007; FRANK et al., 2009; BADISA et al., 2000). Diese umfassen Bereiche der Signaltransduktion, der Zellerhaltung oder der Unterstützung der Proteinfaltung. PRASINOS et al. (2005) berichten über Aufgaben während der Samenkeimung, der Embryogenese, der Entwicklung des Pollens sowie der Fruchtreifung.

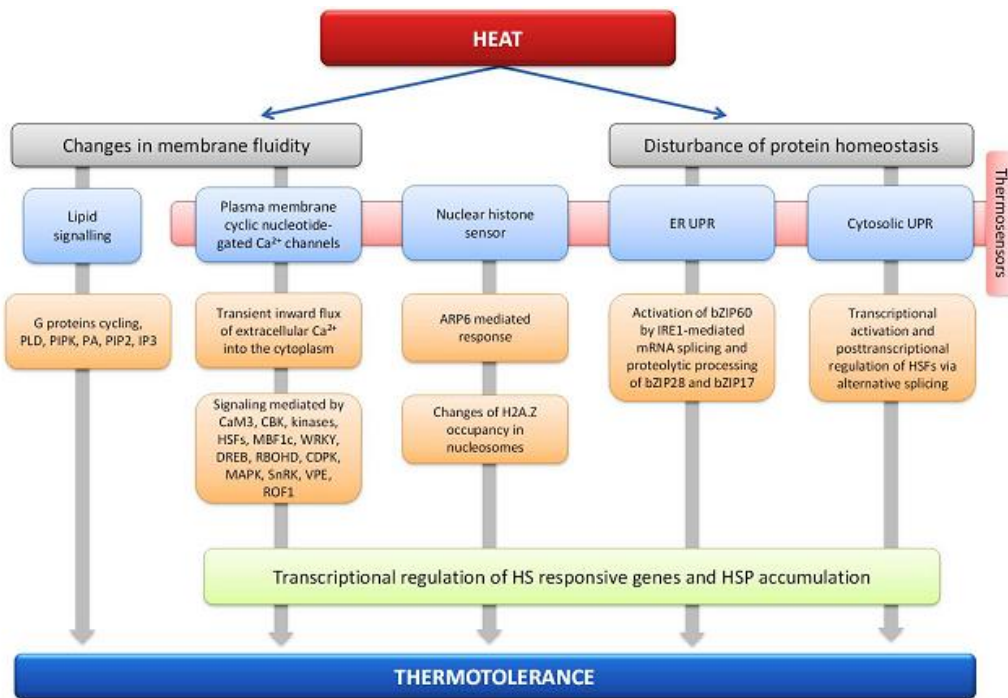


Abbildung 1.1: Übersicht über Reaktionsmechanismen der Hitzestresstoleranz. Beeinflusst werden Prozesse der Signaltransduktion, Eigenschaften der Zellmembran und der Homöostase der Proteine (BOKSZCANIN et al., 2013).

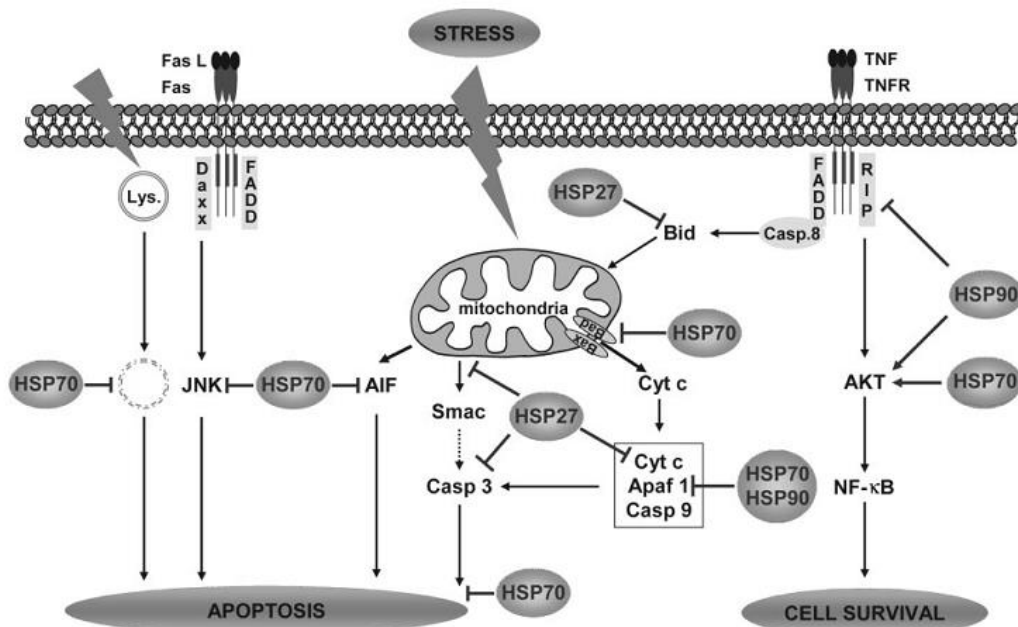


Abbildung 1.2: Funktion von Hitzeschockproteinen in der Regulation apoptotischer Signalwege. NF-κB: „nuclear factor- κB“, Transkriptionsfaktor mit Bezug zum Zellerhalt, Casp: Kaspase, RIP: Kinase, Cyt c: Cytochrome c (SCHMITT et al., 2007).

1.3 Hitzestress bei der Tomate

1.3.1 Tomate

Die Tomate (*Solanum lycopersicum*) wurde 2013 weltweit auf 4,7 Mio. ha produziert und gehört zu den am häufigsten angebauten Gemüsearten (FAOSTAT, März 2015). Ihre Wildform stammt ursprünglich aus Mittel- und Südamerika und wurde im 15. Jahrhundert in Europa heimisch (BAI UND LINDHOUT, 2007). Im 18. bzw. 19. Jahrhundert konnten erste Züchtungsfortschritte erzielt werden, welche die Grundlage für die heutige Biodiversität von über 2500 Sorten geschaffen haben. Die größten Anbauggebiete sind heute China, Indien sowie die USA und die Türkei (FAOSTAT, März 2015). Auf Grund der klimatischen Gegebenheiten in diesen tropischen bis subtropischen Regionen mit zeitweise starken Temperaturerhöhungen innerhalb einer Vegetationsperiode kann es vermehrt zu Ertragsreduktionen durch Hitzestress kommen. Um die Produktion von Tomaten in solchen Ländern zu sichern, sind die gezielte Züchtung hitzetoleranter Sorten sowie die Aufklärung entscheidender Hitzetoleranzmechanismen unumgänglich.

1.3.2 Molekulargenetische Analysen in der Tomate

Die Tomate (*Solanum lycopersicum*) besitzt als umfassend phänotypisch und molekulargenetisch untersuchte, diploide Art Modellcharakter und kann als Vergleichsorganismus sowohl für die Familie der *Solanaceae* als auch für andere Fruchtarten zur Analyse zahlreicher Merkmale herangezogen werden (EZURA, 2009). Um die Aufklärung molekularer Zusammenhänge sowie der genetischen Architektur wichtiger Zuchtmerkmale verbessern zu können, schloss sich 2004 ein internationales Konsortium zusammen, welches sich als Ziel setzte, das Genom von *Solanum lycopersicum* LA4345 („Heinz 1706“) zu sequenzieren und dieses als Referenzgenom für die am nächsten verwandte Wildsorte *Solanum pimpinellifolium* LA1589 zu verwenden. 2011 konnten die Analysen abgeschlossen und die Genomsequenz von *Solanum lycopersicum* veröffentlicht werden (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012).

Das Genom von *Solanum lycopersicum* umfasst auf Grundlage der Ergebnisse von THE TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012) ca. 900 Megabasenpaare (Mbp). 760 Mbp konnten von THE TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012) in 91 „Scaffolds“ auf allen 12 Chromosomen abgebildet werden. Schwierigkeiten in der Zusammenfügung der Sequenzen machten meist zentromernahe Regionen, was in lückenhaften Darstellungen dieser Bereiche resultierte. THE TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012) fanden heraus, dass innerhalb des Genoms repetitive Sequenzen meist in und um das Zentromer sowie in den Chromomeren und Telomeren zu finden waren. Im distalen Euchromatin konnten die meisten Rekombinationen, Gene und Transkripte nachgewiesen werden, während eine gleichmäßige Verteilung für konservierte Mikro-RNAs und chloroplastidäre Insertionen zu

beobachten war. Die zuvor postulierte Sonderstellung der Tomate unter den Angiospermen durch das überwiegende Vorkommen von low-copy DNA (ZAMIR UND TANKSLEY, 1988; PETERSON et al., 1998) konnte von THE TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012) bestätigt werden. Im Vergleich zum Genom der Kartoffel, *Solanum tuberosum*, zeigen sich 8,7 % bzw. 30 % Nukleotidunterschiede in der euchromatischen bzw. heterochromatischen DNA.

THE TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012) nahm eine Zuordnung der identifizierten Gene zu bekannten Funktionsbereichen vor. Dabei wurden gewebespezifische und merkmalsbezogene Funktionen aufgedeckt. Fruchtspezifische Gene repräsentieren beispielsweise Transkriptionsfaktoren und Enzyme der Ethylen-Biosynthese, für welche zuvor gezeigt werden konnte, dass sie die Reifung von Früchten beeinflusst (OELLER et al., 1991). Die Informationen über das von THE TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012) sequenzierte Genom der Tomate können zur umfassenden Aufklärung der genetischen Architektur von Merkmalen der Tomate beitragen.

Ein Ansatz, solche Aufklärungen vorzunehmen, ist die Kartierung von Merkmalen in genetischen Kopplungskarten. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Kopplungskarten auf Basis von Isozym-, RFLP-, AFLP-, SSR-, CAPS-, RGA- und EST-Markern erstellt, welche, zunächst basierend auf nur wenigen Markern, später einige Tausend Marker enthielten (Übersichtsartikel: FOOLAD et al., 2007). Auf Grund der geringen genetischen Diversität in der Kulturtomate trotz der hohen phänotypischen Variabilität wurden für die Merkmalskartierung meist interspezifische Kreuzungen mit Wildarten durchgeführt, um die Anzahl an genetischen Polymorphismen zu erhöhen (MILLER UND TANKSLEY, 1990). Durch die Verfügbarkeit von hoch effektiven Sequenzieretechnologien ist es heute möglich, hochdichte Kopplungskarten basierend auf mehreren Tausend SNP-Markern auch in intraspezifischen Kreuzungen zu konstruieren und damit die genetische Auflösung in Kartierungsstudien und die Übertragbarkeit der Erkenntnisse in die Züchtung der Kulturtomate zu erhöhen. So nutzten SHIRASAWA et al. (2010) öffentlich erhältliche EST-Sequenzen, um eine SNP-Genotypisierungsplattform zu entwickeln. Aus den 229.086 verfügbaren EST-Sequenzen war es ihnen möglich, 5.607 mögliche SNPs (eSNPs) abzuleiten. Auf dieser Grundlage war es SHIRASAWA et al. (2010) möglich, hochdichte genetische Kopplungskarten für zwei intraspezifische Kreuzungsnachkommenschaften von *Solanum lycopersicum* zu erstellen. Die Karten beschreiben die Position von 989 bzw. 637 molekularen Markern (SNP, SSR und andere) und definieren 1.467,8 cM bzw. 1.422,7 cM des Tomatengenoms. Ein Vergleich mit der bereits publizierten Kopplungskarte Tomato-EXPEN 2000, welche mit Hilfe einer interspezifischen Kreuzung zwischen *S. lycopersicum* und *S. peneellii* erstellt werden konnte, zeigt eine weitreichende Kollinearität ohne nennenswerte Translokationen oder Inversionen. Weitere hochdichte Kopplungskarten für die Tomate konnten SIM et al. (2012) auf Basis von SNP-Markern in interspezifischen Kreuzungen erstellen. Diese beinhalten zwischen 3.500 und 4.000 Markern. Solche hochdichten genetischen Kopplungskarten können dazu beitragen, über eine

kartenbasierte Klonierung züchterisch interessanter Gene den Zuchtfortschritt zu beschleunigen. In der Tomate wurden zahlreiche QTL identifiziert. Es konnten beispielsweise QTL für das Merkmal Fruchtertrag sowie dessen Komponenten wie den Fruchtansatz oder das Fruchtgewicht, für Resistenzen oder die Wurzelmorphologie identifiziert werden (GUR et al., 2011; FRARY et al., 2004; GRILLI et al., 2007; KADIRVEL et al., 2013; RON et al., 2013). Auch in Bezug auf Toleranzen konnten QTL identifiziert werden. So beschrieben FOOLAD et al. (2003) Einflüsse der Chromosomen 1, 8, 9 und 12 auf die Trockentoleranz von *Solanum pimpinellifolium*, während VALLEJOS UND TANKSLEY (1983) die Chromosomen 6, 7 und 12 mit der Kältetoleranz in Verbindung brachten. FRARY et al. (2010) konnten 125 QTL in Introgressionslinien von *Solanum pennellii* identifizieren, die in Verbindung mit einer Toleranz gegenüber Salzstress stehen. Über Genomregionen mit signifikantem Einfluss auf unter Hitzestress erhobene Merkmale oder die Hitzetoleranz an sich wurde bislang nur wenig berichtet. So identifizierten GRILLI et al. (2007) mit Hilfe von AFLP-Markern 6 Marker/Merkmal-Assoziationen auf den Kopplungsgruppen 1, 3, 4, 6, 7 und 9 sowie 3 QTL auf 3 der 9 berechneten Kopplungsgruppen (Gruppen 2, 4 und 7) für das Merkmal Fruchtansatz unter Hitzestressbedingungen. Eine Zuordnung zu den Chromosomen der Tomate erfolgte auf Grund fehlender Ankermarker nicht.

Die Ergebnisse solcher Kartierungen führten zusammen mit der Erstellung hochdichter Kopplungskarten zu kartenbasierten Klonierungsansätzen in Hinblick auf ausgewählte biochemische Prozesse, Resistenzen oder Entwicklungsprozesse der Frucht (MARTIN et al., 1993; JONES et al., 1994; PNUELI et al., 1998; RONEN et al., 2000; XIAO et al., 2008). Das Potential dieser Vorgehensweise ist auch für die Übertragung einer Hitzetoleranz gegeben. Die der Hitzetoleranz zugrunde liegenden Mechanismen müssen zuvor allerdings umfassend aufgeklärt werden.

1.3.3 Auswirkungen des Hitzestresses auf die Tomate

Die Wirkung von Hitzestress auf vegetatives sowie generatives Gewebe, auf generelle Entwicklungsprozesse, den Fruchtansatz sowie den Fruchtertrag wurde in der Tomate umfassend untersucht. Es konnten Beeinflussungen der Samenkeimung und der Membranstabilität (CAMEJO et al., 2005), der Zellatmung und der Photosynthese (KARIM et al., 1997; BOLAÑOS UND HSIAO, 1991; CAMEJO et al., 2005), des Wurzelwachstums und des Wasserpotentials (MORALES et al., 2003), des Hormonlevels (MAESTRI et al., 2002) oder des Chlorophyllgehaltes (SANGU et al., 2015) nachgewiesen werden. ABDUL-BAKI (1991) konnte eine starke Reduktion des Fruchtertrages unter Einfluss von Hitzestress beobachten. Ebenfalls nachzuweisen war ein verringerter Fruchtansatz, das Abwerfen von Blüten und abnormales Wachstum. Er unterschied in seinen Analysen zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen, wobei er für beide Beeinflussungen beobachtete, die hitzesensitiven aber stärkere Reduktionen zeigten. FIRON et al. (2006) und PRESSMAN et al. (2006)

untersuchten unterschiedliche Gewebe auf ihre Hitzesensitivität und fanden heraus, dass neben morphologischen Änderungen des generativen Gewebes wie beispielsweise der Samenanlagen der Mutterzelle oder des Endotheciums in den Antheren (KINET UND PEET, 1997) vor allem die Anzahl an Pollenkörnern und deren Lebensfähigkeit beeinflusst wird. Sie verbanden die reduzierte Lebensfähigkeit des Pollens mit Änderungen im Kohlenhydratstoffwechsel in Antheren und Pollenkörnern. Dies wiederum verursache einen reduzierten Fruchtansatz. SATO et al. (2002) bestimmten den Zeitpunkt, an welchem eine Schädigung des Pollens und damit seiner Funktionalität durch Hitzestress erfolgt, und wiesen nach, dass die stärkste Beeinflussung zwischen 8 und 13 Tage vor der Anthese stattfindet. FIRON et al. (2012) postulierten einen Einfluss von Ethylen auf die Pollenqualität unter Hitzestress, da sie bei Inhibierung des Ethylen-Biosyntheseweges eine 5-fach verringerte Anzahl an keimfähigen Pollenkörnern unter Hitzestressbedingungen beobachteten. Welche Mechanismen diesen Vorgängen zugrunde liegen, konnte nicht abschließend geklärt werden. SANGU et al. (2015) untersuchten in diesem Zusammenhang die Expressionsunterschiede von 4 Genen des Saccharose-Metabolismus, der Galactinol-Biosynthese sowie der Prolin-Akkumulation in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pollenkörner von hitzetoleranten und hitzesensitiven Tomatengenotypen und fanden heraus, dass in hitzetoleranten Genotypen tendenziell höhere Expressionen und in den hitzesensitiven Genotypen vorrangig niedrigere Expressionen für die untersuchten Gene zu beobachten waren. Eine Rolle in der Keimung von Pollenkörnern unter Hitzestressbedingungen könnte laut SHEN et al. (2014) das β -Alanin haben. Sie analysierten die Expression eines Gens der Beta-Ureidopropionase, eines Katalysators der β -Alanin-Bildung, in männlichen Blütenorganen zweier Genotypen unterschiedlicher Toleranzklasse und beobachteten höhere Expressionslevel im hitzetoleranten Genotyp unter Optimalbedingungen (25°C/ 20°C Tag/Nacht) und moderatem Hitzestress (30°C/ 25°C Tag/Nacht). Über einen transgenen Ansatz wiesen sie nach, dass eine Beeinflussung der Keimung des Pollens durch die Expressionsstärke dieses Gens sowohl unter optimalen Temperaturbedingungen als auch unter Hitzestress stattfindet. Die Wirkung eines Hitzestresses auf die Tomate bzw. die Ausbildung einer Hitzetoleranz ist folglich mit vielen unterschiedlichen Faktoren und Prozessen verbunden.

1.3.4 Aufgabe von Hitzeschockproteinen in Tomaten

Als Toleranzregulatoren in der Reaktion auf kurzzeitigen, starken Hitzeschock konnten in Tomaten, wie in anderen Pflanzenarten auch, verstärkt Hsf und Hsp identifiziert werden. Diese sollen die Pflanze vor einer Schädigung durch die erhöhte Temperatur schützen und die Regeneration der Zellen fördern (Abbildung 1.2). Solche Mechanismen sind unter kurzzeitigen extremen, für die Pflanzen auf Dauer lebensbedrohlichen Hitzeschockbedingungen gut untersucht. MISHRA et al. (2002) und BANIWAL et al. (2004) identifizierten einen Hauptregulator für die Hitzestressantwort in

Tomaten, den sogenannten Hitzestresstranskriptionsfaktor A1 (HsfA1), und deckten dessen Funktion in der Auslösung der stressinduzierten Genexpression von HsfB1 und HsfA2 auf. SCHARF et al. (1998) und SCHARF et al. (2012) stellten einen Zusammenhang zwischen HsfA1 und HsfA2 her und wiesen die hitzestressinduzierte Expression von HsfA2 sowie die konstitutive Expression von HsfA1 als Hauptregulator nach (Abbildung 1.3). FRAGKOSTEFANAKIS et al. (2015) untersuchten die Rolle von HsfA1 und HsfA2 in Blättern der Tomate unter kurzzeitigem starkem Hitzestress (39°C für 1 Stunde) und bestätigten deren Funktion in der Hitzestressantwort. HsfA2 sei dabei essentiell für die Erhöhung des Expressionslevels vieler in die Hitzestressreaktion involvierter Gene. GIORNO et al. (2010) untersuchten die Expression von HsfA2 in Antheren der Tomate und fanden heraus, dass HsfA2 stark in Antheren exprimiert und durch Hitzestress induziert wird. Vor allem während der Entwicklung der Pollenmutterzellen in jungen Antheren konnte eine Expression von HsfA2 nachgewiesen werden. Sie vermuteten, dass HsfA2 in diesem Stadium eine Aufgabe in der Proteinfaltung während der Meiose und der Bildung der Tetraden übernimmt. Sie wiesen darauf hin, dass eine Aktivierung nicht nur bei kurzem starkem Hitzestress, wie bei FRANK et al. (2009) beschrieben, erfolge, sondern auch unter langanhaltendem moderatem Hitzestress stattfindet. BARTKIEWICZ (2011) untersuchte die Expression von HsfA2 unter langanhaltendem moderatem Hitzestress in hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen, konnte aber keine Regulation unter Hitzestress in Antherengewebe nachweisen. Sie vermutete, dass das gewählte Temperaturregime von 32°C/ 28°C (Tag/Nacht) für eine Aktivierung der Transkription des HsfA2-Gens nicht ausreichte. GIORNO et al. (2010) untersuchten die Hitzeschockproteine Hsp17.4-CII und Hsp17.6-CII, da diese in direktem Zusammenhang mit HsfA2 stehen (BANIWAL et al., 2004). Für beide konnten Expressionen in jungen Antheren unter Kontrollbedingungen beobachtet werden. Bereits eine Stunde nach Applikation des Hitzestresses erfolgte eine Hochregulation in beiden Hsp. BARTKIEWICZ (2011) konnte diese Beobachtung in ihrer Analyse bestätigen. Ein Unterschied in der Reaktion von hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen lag jedoch nicht vor. Sie schloss daraus, dass möglicherweise andere Mechanismen für die Ausprägung der Hitzetoleranz verantwortlich seien.

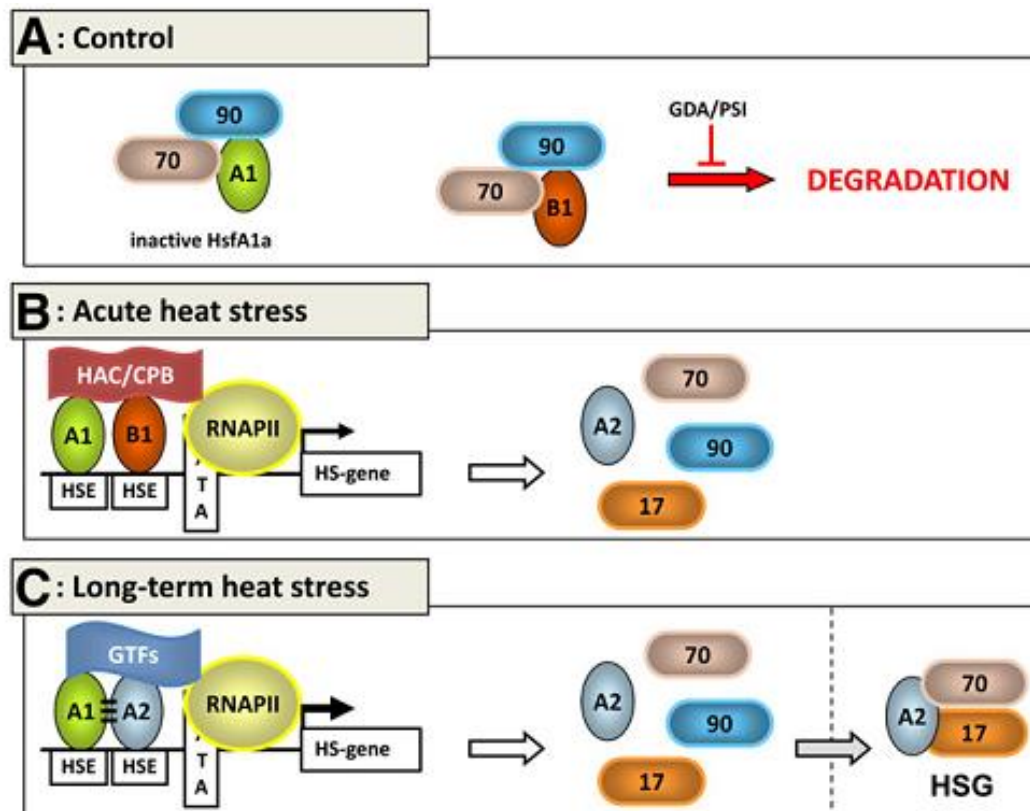


Abbildung 1.3: Zusammenspiel von Hsf und Hsp in der Hitzestressantwort. A) Unter Kontrollbedingungen liegt HsfA1 (A1) durch Komplexbildung mit Hsp70 (70) und Hsp90 (90) in inaktiver Form vor. Die Menge an HsfB1 (B1) wird durch Degradierungsprozesse reguliert. B) Bei akutem Hitzestress findet eine Aktivierung hitzeinduzierter Gene von Hsp70, Hsp90, Hsp17 (17) und HsfA2 (A2) durch Auflösung der Proteinkomplexe statt. C) Langanhaltender Hitzestress führt nach der Aktivierung hitzeinduzierter Gene zur Bildung sogenannter HSG (heat stress granuels). (SCHARF et al., 2012)

1.3.5 Reaktionsmechanismen auf kurzzeitigen Hitzestress in der Tomate

FRANK et al. (2009) untersuchten die Gesamtheit aller durch einen kurzzeitigen starken Hitzeschock exprimierten Gene in Mikrosporen der Tomate unter Temperaturbedingungen von 43°C bis 45°C über 2 Stunden, um schnelle Regulationsmechanismen als Antwort auf einen Hitzeschock zu erfassen. Sie unterschieden dabei zwischen der Reaktion eines hitzesensitiven und eines hitzetoleranten Genotyps von *Lycopersicon esculentum*. In beiden Genotypen traten weitreichende Schädigungen der Pflanze durch den starken Hitzeschock sowie eine Reduktion der Anzahl an lebensfähigen und keimfähigen Pollenkörnern auf. Einen Unterschied in der Reaktion der Toleranztypen konnten sie auf Grund des extremen Hitzestresses nicht detektieren. Diese Beobachtung steht in Kontrast zu der unter langandauerndem moderatem Hitzestress berichteten Toleranzklassifizierung (FIRON et al., 2006) und weist auf die Bedeutung des Temperaturregimes in der Ausbildung einer Hitzetoleranz hin. Um Toleranzmechanismen identifizieren und für die

praktische Züchtung nutzbar machen zu können, sollten diese unter möglichst praxisnahen Temperaturbedingungen (langandauernder moderater Hitzestress mit Absenkung der Nacht-Temperatur) untersucht werden.

Auch auf regulatorischer Ebene konnten FRANK et al. (2009) keine signifikanten Unterschiede zwischen dem hitzetoleranten und dem hitzesensitiven Genotyp identifizieren. Sie beobachteten eine relativ geringe Anzahl an Regulationen und eine einseitige Regulationsrichtung (Hochregulation). Signifikante Herunterregulationen konnten sie nicht nachweisen. Sie vermuteten, dass dies durch eine geringe Anzahl an untersuchten Genen (~10.000) und ein Fehlen pollenspezifischer Gene begründet sei. Insgesamt detektierten sie für 30 Gene eine mehr als 2-fache, aufwärtsgerichtete Expressionsänderung als Folge des Hitzestresses. 11 der identifizierten Gene repräsentieren Vertreter der sHsp-Familie, vier gehören den Hsp70-Proteinen an. Für diese postulierten sie eine Funktion im Schutz vor der Schädigung der Zellen durch den Hitzestress und der Regulation von Hsf. Die Expression von HsfA2 und HsfA3, als wichtige Faktoren der Hitzestressantwort, beschrieben sie als stark hochreguliert in Mikrosporen. Im Zusammenhang mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wiesen 5 Ascorbat-Peroxidase-Gene aufwärtsgerichtete Expressionsänderungen nach Hitzeschockapplikation auf. Ebenfalls nach Anlegen des Hitzestresses zu beobachten war die Transkriptionsinduktion von auf Ethylen reagierenden Genen sowie Genen mit Bezug zum Kohlenhydratstoffwechsel und zu Transportmechanismen. Eine Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels kann in Zusammenhang mit dem Schutz der Zellmembranen als Reaktion auf den Hitzestress stehen. FRANK et al. (2009) beobachteten auch eine Beeinflussung von Calcium-abhängigen Signalwegen und Transportvesikeln.

BITA et al. (2011) analysierten im Rahmen eines Hybridisierungsexperiments die Regulationsänderungen in Tomatantheren unter kurzzeitigem moderatem Hitzestress (32°C/ 26°C Tag/ Nacht für 0 bis 6 Stunden), um ebenfalls die schnellen Regulationsmechanismen zu Beginn des Hitzestresses einschätzen zu können. Sie unterschieden dabei zwischen hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen. In dieser Studie wurde etwa 1 % der untersuchten Gene differentiell exprimiert, wobei meist Herunterregulationen nach den ersten zwei Stunden erfolgten. Im Vergleich der Toleranztypen wies der hitzetolerante Genotyp meist schwächere Regulationen aber höhere Expressionsstärken auf, es waren somit bei kurzzeitigem moderatem Hitzestress Unterschiede zwischen den Toleranzgruppen zu beobachten. Sie konnten Expressionsänderungen für 56 bzw. 75 Gene als Reaktion der Pflanze auf Hitzestress in den hitzetoleranten bzw. hitzesensitiven Genotypen identifizieren. Für 45 davon konnte eine generelle Funktion in der Hitzestressantwort ohne Einfluss auf die Ausprägung der Hitzetoleranz nachgewiesen werden. Eine Gruppierung der regulierten Gene in funktionelle Gruppen ergab Regulationen in den Bereichen Zellschutz und -reparatur, Signalwege und Transkription sowie Metabolismus und Entwicklung. Die meisten Gene repräsentieren Hitze-

schockproteine. Vor allem Gene von zu Hsp17.6 gehörigen Proteinen wie Hsp17.6-CI und Hsp17.6-CII wiesen über alle Messzeitpunkte starke Expressionen auf. Die Expression vieler der nach 2 Stunden stark exprimierten Gene war nach 4 Stunden kaum mehr nachzuweisen. Zusammenfassend schlossen BITA et al. (2011) aus ihren Analysen, dass die Toleranz gegenüber kurzzeitigem Hitzestress auf einer verstärkten Expression von Genen mit Bezug zu Hitzeschockproteinen, Oxidoreduktasen und Transkriptionsregulatoren beruhe, während eine Hitzesensitivität überwiegend durch Änderungen auf metabolomischer Ebene begründet sei. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von FRANK et al. (2009) unter kurzzeitigem starkem Hitzestress überein. In der Reaktion auf einen kurzzeitig applizierten Hitzestress greifen somit nahezu unabhängig von der Stärke der Temperaturerhöhung ähnliche Mechanismen. Die Regulationsmechanismen unter langandauerndem moderatem Hitzestress ähnlich der Anbaubedingungen in tropischen und subtropischen Gebieten bleiben weiterhin ungeklärt.

1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Die Mechanismen der Hitzestressantwort in der Tomate wurden bislang meist nur unter kurzfristigen oder extremen und für die Pflanze lebensbedrohlichen bzw. enorm schädlichen Temperaturbedingungen untersucht. Diese experimentellen Ansätze entsprechen nicht den im praktischen Anbau auftretenden Klimabedingungen und können deshalb nur bedingt für eine Aufklärung der Hitzetoleranzmechanismen und die Verbesserung der Hitzetoleranz der Tomate genutzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Toleranzmechanismen der kultivierten Tomate unter langandauerndem moderatem Hitzestress im Hinblick auf folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welche Klimafaktoren beeinflussen die Lebensfähigkeit von Pollenkörnern und reduzieren den mit diesem Merkmal korrelierten Fruchtansatz?
2. Können Zusammenhänge zwischen Merkmalen hergestellt werden, die durch langandauernden moderaten Hitzestress negativ beeinflusst werden? Lassen sich daraus indirekte Selektionsparameter ableiten?
3. Welche regulatorischen Mechanismen unterliegen der Reaktion auf langandauernden moderaten Hitzestress in Antheren der Tomate und welche Toleranzmechanismen können detektiert werden?
4. Können in *Solanum lycopersicum* Genomregionen identifiziert werden, welche in Bezug zur Hitzetoleranz der Tomate stehen?
5. Lassen sich Kandidatengene für die Verbesserung der Hitzetoleranz der Tomate aus den Ergebnissen ableiten?

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden diploide Linien und Kreuzungsnachkommenschaften in erster bzw. vierter Filialgeneration von *Solanum lycopersicum* in diversen Umwelten phänotypisch auf ihre Hitzetoleranz untersucht (Tabelle 2.1 und 2.2). Die Prüfungen umfassten Versuche unter natürlichen Bedingungen im Freiland in Taiwan (AVRDC – The World Vegetable Center, Tainan) sowie unter kontrollierten Bedingungen in Gewächshauskabinen in Taiwan (AVRDC) und Deutschland (Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzengenetik). Die für die QTL-Kartierung verwendete Kreuzungspopulation in zweiter Filialgeneration wurde von MITTERBAUER (2008) und URBAN (2006) erstellt und dort unter kontrollierten Gewächshausbedingungen phänotypisch auf ihre Hitzetoleranz in einem Temperaturregime von 32°C/ 28°C (Tag/Nacht) charakterisiert. Sie umfasste 174 Genotypen, von denen 154 erhalten und in der vorliegenden Arbeit für die QTL-Kartierung verwendet werden konnten. Eine Übersicht über das Material sowie die Art der molekularen Charakterisierung ist im Anhang zu finden (Tabelle 7.1.3)

Tabelle 2.1: Pflanzenmaterial sowie deren Prüfumwelten für die phänotypische Einstufung der Hitzetoleranztypen. Das Saatgut der Genotypen wurde vom AVRDC bzw. von ‘Syngenta Taiwan Ltd ‘ (Pannovy F1) bezogen. Als Versuchsstandorte standen das AVRDC in Tainan (Taiwan) und das Institut für Pflanzengenetik in Hannover zur Verfügung. R_H= erwartete Reaktion der Genotypen auf Hitzestress, GK = Gewächshauskabine, m-tolerant = moderat tolerant.

Genotyp	R _H	Umwelten		
		Feld Taiwan	GK Taiwan	GK Hannover
CLN1621L	tolerant	x		x
CL5915-93D4-1-0-3	tolerant	x	x	x
CLN2026D	tolerant	x		x
FMTT260	tolerant			x
CL5915-206 D4	tolerant			x
CLN2498E	m-tolerant	x		x
CLN2777H	m-tolerant	x		x
FLA456-4	sensitiv	x		x
G2	sensitiv	x		
CA4	sensitiv	x	x	x
Pannovy F1	sensitiv			x
CLN1621L x CA4	unbekannt	x		x
CL5915-93D4-1-0-3 x CA4	unbekannt	x	x	x
CLN2026D x CA4	unbekannt	x		
CLN2498E x CA4	unbekannt	x		
FLA456-4 x CA4	unbekannt	x		
CLN2777H x G2	unbekannt	x		

Tabelle 2.2: RIL-Kartierungspopulation der Kreuzungseltern CLN1621L und CA4 in vierter Filialgeneration. Die phänotypische Charakterisierung zur Bestimmung der Hitzestresstoleranz fand in Gewächshauskabinen am Institut für Pflanzengenetik in Hannover statt.

Genotyp	Genotyp	Genotyp	Genotyp
TH-P1-F4-001	TH-P1-F4-055	TH-P1-F4-104	TH-P1-F4-129
TH-P1-F4-005	TH-P1-F4-056	TH-P1-F4-105	TH-P1-F4-130
TH-P1-F4-009	TH-P1-F4-059	TH-P1-F4-106	TH-P1-F4-131
TH-P1-F4-011	TH-P1-F4-061	TH-P1-F4-107	TH-P1-F4-132
TH-P1-F4-014	TH-P1-F4-062	TH-P1-F4-108	TH-P1-F4-133
TH-P1-F4-016	TH-P1-F4-066	TH-P1-F4-109	TH-P1-F4-134
TH-P1-F4-017	TH-P1-F4-067	TH-P1-F4-110	TH-P1-F4-135
TH-P1-F4-018	TH-P1-F4-068	TH-P1-F4-111	TH-P1-F4-136
TH-P1-F4-025	TH-P1-F4-071	TH-P1-F4-112	TH-P1-F4-137
TH-P1-F4-026	TH-P1-F4-076	TH-P1-F4-113	TH-P1-F4-138
TH-P1-F4-027	TH-P1-F4-077	TH-P1-F4-114	TH-P1-F4-139
TH-P1-F4-028	TH-P1-F4-078	TH-P1-F4-115	TH-P1-F4-140
TH-P1-F4-029	TH-P1-F4-080	TH-P1-F4-116	TH-P1-F4-141
TH-P1-F4-030	TH-P1-F4-084	TH-P1-F4-117	TH-P1-F4-142
TH-P1-F4-033	TH-P1-F4-087	TH-P1-F4-118	TH-P1-F4-143
TH-P1-F4-035	TH-P1-F4-090	TH-P1-F4-119	TH-P1-F4-144
TH-P1-F4-037	TH-P1-F4-093	TH-P1-F4-120	TH-P1-F4-145
TH-P1-F4-040	TH-P1-F4-094	TH-P1-F4-121	TH-P1-F4-146
TH-P1-F4-042	TH-P1-F4-097	TH-P1-F4-122	TH-P1-F4-147
TH-P1-F4-044	TH-P1-F4-098	TH-P1-F4-123	TH-P1-F4-148
TH-P1-F4-046	TH-P1-F4-099	TH-P1-F4-124	TH-P1-F4-149
TH-P1-F4-047	TH-P1-F4-100	TH-P1-F4-125	
TH-P1-F4-051	TH-P1-F4-101	TH-P1-F4-126	
TH-P1-F4-53	TH-P1-F4-102	TH-P1-F4-127	
TH-P1-F4-054	TH-P1-F4-103	TH-P1-F4-128	

2.2 Anzuchtbedingungen

2.2.1 Freilandversuch am AVRDC in Taiwan

Im Freilandexperiment wurden die zu untersuchenden Pflanzen in einem Substrat bestehend aus 40 % organischen Bestandteilen (Hühner- und Kuhmist, Knochenpuder und Sojabohnenreste) sowie 4 % Stickstoff (N), 2,8 % P₂O₅ und 2,6 % K₂O (Fa. 'KnownYou Seed Co.') angezogen. Die Aussaat der Pflanzen erfolgte zwischen dem 10. und 11. Juli 2008 in Anzuchttöpfen, die Überführung ins Feld (Nr. 94) im August 2008. Eine Düngung fand sowohl vor der Überführung der Pflanzen mit 80-120 kg/0,1 ha als auch 20-30 Tage nach der Überführung mit 20 kg/0,1 ha sowie regelmäßig 40-50,

60-70 und 80-90 Tage danach mit 40 kg/0,1 ha statt. Der verwendete lokale Dünger Nr. 43 stammt von der Firma 'Taiwan Fertilizer Co. Ltd' und setzt sich aus 15 % N, 15 % P₂O₅, 15 % K₂O und 4 % MgO zusammen. Die Bewässerung erfolgte einmal wöchentlich durch Flutung. Ein Ausgeizen der Pflanzen fand nicht statt, sie wurden stattdessen hochgebunden. Als Folie für das Saatbeet wurden 2 Rollen (400x5 Fuß/Rolle)/0,1 ha der Firma 'Her mei Plastic Co.' verwendet. Fungizide (Curzate M8 (Fa. 'DuPont Taiwan Ltd. '), Kocide (Fa. 'DuPont Taiwan Ltd. ')) und Insektizide (Trigard (Fa. 'Syngenta Taiwan Ltd. '), Lannate (Fa. 'DuPont Taiwan Ltd. '), Abamectin (Fa. 'Syngenta Taiwan Ltd. ')) wurden je nach Bedarf abwechselnd angewendet.

2.2.2 Gewächshausversuch am AVRDC in Taiwan

In diesem Versuch wurde das unter 2.2.1 beschriebene Substrat für die Anzucht verwendet, die Pflanzen täglich bewässert und die Sämlinge vor dem Topfen mit Foliar Nitrophoska[®] NPK 20:19:19:0.5 Magnesium (Fa. 'BASF Taiwan Ltd. ') bzw. getopfte Pflanzen alle zwei Wochen mit 2g NPK 12:18:12 gedüngt. Der Aussaat- bzw. Pflanzzeitpunkt war Juli bzw. August 2008. Folgende Pflanzenschutzmittel wurden verwendet, um Schaderreger zu bekämpfen: einmal wöchentlich Abamectin (Fa. 'Syngenta Taiwan Ltd. ') und 1[(6-chloro-3-pyridinyl) methyl] N-nitro-2-imidazolinimine 9,6 % gegen die Weiße Fliege und Thripse, nach Bedarf Curzate M8 (Fa. 'DuPont Taiwan Ltd. ') gegen pilzliche Erreger sowie Kupfer-Knallgas gegen die bakterielle Blattfleckenkrankheit. Die Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus betrug durchschnittlich 75 %. Die Temperaturbedingungen wurden auf 30°C/ 26°C Tag/Nacht für die Hitzestressbehandlung und auf 30°C/ 18°C Tag/Nacht für die Kontrollbehandlung eingestellt. Eine zusätzliche Lichtquelle wurde nicht verwendet.

2.2.3 Gewächshausversuche an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Die Pflanzen wurden in Torfkultursubstrat I angezogen, getopft und fünfmal wöchentlich über das Gießwasser mit 1 ‰ Universol blau (NPK 18:11:18:2 Magnesium) der Firma 'Everris GmbH' gedüngt. Die Topfgröße betrug 20 l. Um eine ausreichende Belichtung der Pflanzen gewährleisten zu können, fand eine künstliche Beleuchtung mit Pflanzenanzuchtleuchten (SON-KE 400, Fa. 'DH Licht') mit einer Photonenflussdichte von 62 µmol/m²s statt. Die Beleuchtungsdauer wurde auf 16 Stunden Licht von 6 bis 22 Uhr eingestellt. Als Temperaturregime wurden Temperaturen von 32°C/ 28°C Tag/Nacht als Hitzestress und 24°C/ 20°C als Kontrolle ausgewählt. Pflanzenschutzmittel wurden je nach Bedarf verwendet.

2.3 Boniturmerkmale für die Einstufung der Hitzetoleranz

Für die phänotypische Charakterisierung des genetischen Materials standen die in Tabelle 2.3 aufgelisteten Merkmale zur Auswahl. Eine detaillierte Nennung der bonitierten Merkmale in den unterschiedlichen Versuchsteilen ist der jeweiligen Versuchsbeschreibung (Kapitel 2.4) zu entnehmen. Entscheidende Merkmale wie die Pollenausbeute, die Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern sowie die Fruchtmerkmale Parthenokarpie und Samenindex wurden in fast allen Versuchen analysiert. Jede Bonitur umfasst mindestens 10 Früchte zur Analyse der Fruchtmerkmale, mindestens fünf Blüten für die Untersuchung des Pollens und mindestens 10 Blüten für die visuelle Bonitur der Stigma-Ausstülpung. Die Boniturschemata des Pollens sowie der Frucht werden unter 2.3.1 und 2.3.2 näher erläutert.

Tabelle 2.3: Boniturmerkmale zur Bestimmung des Hitzetoleranztyps. Angegeben sind das Merkmal, dessen Boniturschema sowie nähere Erläuterungen zur Bestimmung, Klassifizierung oder Art der Bonitur. Infl. = Infloreszenz.

Merkmal	Boniturschema	Erläuterung
Pollenausbeute (Poll _G)	Gesamtanzahl je Blüte	s. 2.3.1
lebensfähiger Pollen (Poll _k)	Anzahl je Blüte	s. 2.3.1
nicht lebensfähiger Pollen (Poll _{nk})	Anzahl je Blüte	s. 2.3.1
Früchte (NF bzw. N _F)	Anzahl je Infl. (N _F) bzw. Pflanze (NF)	
vermarktungsfähige Früchte (N _{FM})	Anzahl unbeschädigter Früchte	
samenhaltige Früchte (N _{FS})	Anzahl je Infl.	MITTERBAUER (2008)
Fruchtansatz (F _A)	Prozentualer Fruchtansatz	MITTERBAUER (2008)
Parthenokarpie (P)	0 (keine) - 5 (vollständig)	je Frucht, s. 2.3.2
Samenindex (S)	0 (keine Samen) – 5 (vollständig)	je Frucht, s. 2.3.2
Form des Fruchtbodens (F _{Boden})	1 - 3	s. 2.3.2
Fruchtbreite (F _B)	Breite einer Frucht [mm]	
Fruchthöhe (F _H)	Höhe einer Frucht [mm]	
Stigma-Ausstülpung (SE)	Häufigkeit: 0= nie, 0,25= selten, 0,5= Mittelwert über alle ausgeglichen, 0,75= häufig, 1= immer	Blüten (visuell)
Blüten (B)	Anzahl je Infl.	
Blühbeginn (Bl)	Kalenderwoche - Jahr	

2.3.1 Bonitur des Pollens

Die Analyse der Merkmale Pollenausbeute und -lebensfähigkeit erfolgte entsprechend HESLOP-HARRISON et al. (1984) durch die Färbung der Pollenkörner mit Fluorescein-Diacetat (FDA) und deren Auszählung in einer Fuchs- Rosenthal Zählkammer (Fa. ‘ Carl Roth GmbH & Co. KG ‘). Diese Vorgehensweise zur Unterscheidung zwischen lebensfähigem, degradiertem und nicht lebensfähigem Pollen ist in der Tomate von MITTERBAUER (2008) untersucht und bestätigt worden.

Die Entnahme des Pollens aus der Blüte fand mit Hilfe einer elektrischen Zahnbürste und eines speziellen Aufsatzes statt (Abbildung 2.1, A). Es wurde nur Pollen aus Blüten im Anthese-Stadium in 200 µl Reaktionsgefäßen aufgefangen und auf deren Lebensfähigkeit untersucht. Die FDA-Färbelösung bestand aus einer 1:25-Verdünnung zweier Stammlösungen. Lösung 1 besteht aus 2 mg FDA (MW: 416,38 g/mol) gelöst in 1 ml Aceton, Lösung 2 aus einer 10 % [w/v] Saccharose-Lösung. Die Färbung erfolgte mit 200 µl dieser Färbelösung. Eine Evaluierung der Lebensfähigkeit der Pollenkörner konnte nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten unter dem Mikroskop (Axiovision40 und Axiovision20, Fa. 'Carl Zeiss AG') und UV-Licht (Filterset 09 der Fa. 'Carl Zeiss AG', Anregung bei 450-490 nm, Emission bei 515 nm) erfolgen. Die Vergleichbarkeit der Messungen wurde durch eine exakte Vibrationszeit der Zahnbürste von 15 Sekunden geschaffen.

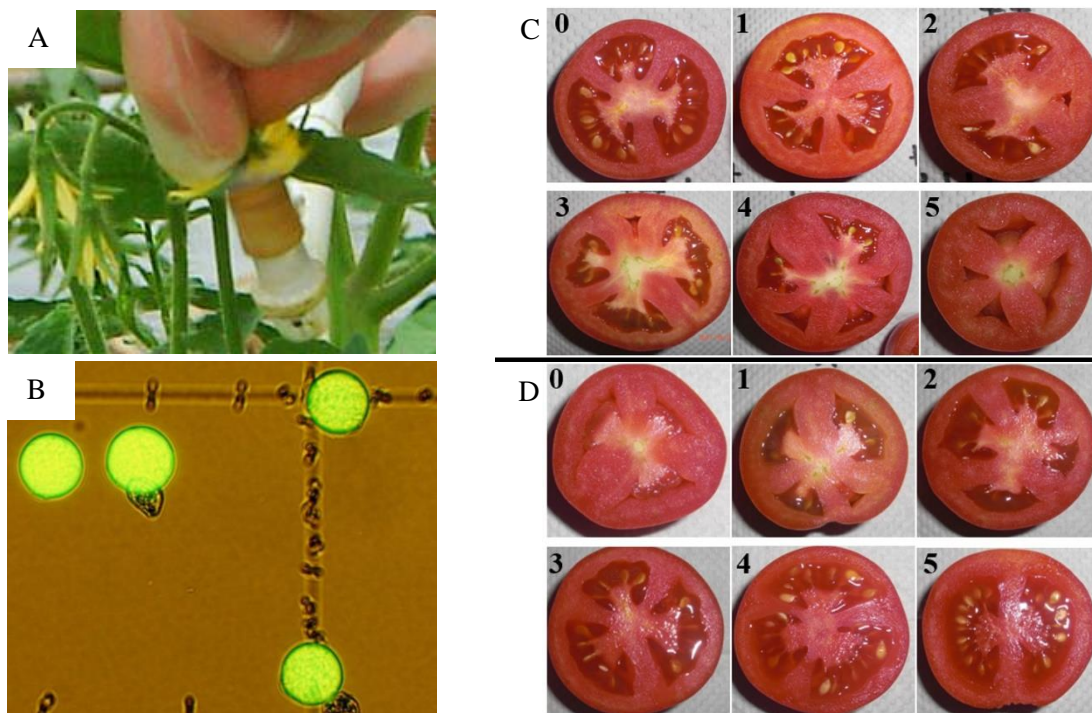


Abbildung 2.1: Evaluierung des Pollens sowie der Parthenokarpie und des Samenindex. A) Entnahme des Pollens mit Hilfe einer elektrischen Zahnbürste. B) Fluoreszenz des lebensfähigen Pollenkorns. C) Boniturschema für das Merkmal Parthenokarpie: 0 = keine Parthenokarpie zu beobachten, 5 = Frucht ist komplett parthenokarp. D) Boniturschema für das Merkmal Samenindex: 0 = keine Samen in der Frucht enthalten, 5 = eine komplett samenhaltige, normale Frucht.

2.3.2 Boniturschemata der Frucht

Bei der Bonitur der Fruchtmerkmale wurde besonders auf die Bestimmung der Anzahl parthenokarper und samenhaltiger Früchte geachtet. Um diese Merkmale bonitieren zu können, wurden nur Früchte ab der zweiten Infloreszenz verwendet, diese in der Mitte durchgeschnitten und der Grad an Parthenokarpie sowie der Samenindex mit Hilfe eines hier entwickelten Schemas

ermittelt (Abbildung 2.1, C und D). Neben diesen Merkmalen wurde die Fruchtform durch die Bonitur der Fruchthöhe, -breite und der Form des Bodens der Frucht, wie in INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE (1996) beschrieben, bestimmt.

2.4 Versuchsdesign

2.4.1 Phänotypische Einstufung der Hitzetoleranz

Im Rahmen kontrollierter sowie Freilandbedingungen wurden sowohl Linien als auch Nachkommen der ersten Filialgeneration von *Solanum lycopersicum* in Bezug auf ihre Hitzetoleranz charakterisiert (Tabelle 2.1). Der Einfluss einer nächtlichen Abkühlung unter hohen Tagestemperaturen auf pollenbezogene Merkmale sollte in diesen Versuchen beurteilt und der Effekt verschiedener Klimafaktoren des Hitzestresses auf die Ausprägung der Hitzetoleranz geschätzt werden. Des Weiteren sollten Zusammenhänge zwischen den untersuchten Merkmalen unter Hitzestress und optimalen Temperaturbedingungen aufgeklärt, indirekte Selektionsparameter für eine schnelle Eingruppierung von Prüfgliedern unbekanntem Hitzetoleranztyps ermittelt und Genotypen mit außergewöhnlicher Hitzetoleranz bzw. –sensitivität identifiziert werden. Diese Einstufung diente der Findung einer geeigneten Nachkommenschaft, in welcher die Hitzetoleranzmechanismen auf Expressionsebene untersucht werden sollte.

2.4.1.1 Beurteilung des Effektes einer nächtlichen Luftabkühlung unter Hitzestress

Um den Einfluss einer verringerten Abkühlung innerhalb eines Tages unter Hitzestressbedingungen auf die Merkmale Pollenausbeute und Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern abschätzen zu können, wurden ein hitzetoleranter (CL5915-93D4) und ein hitzesensitiver Genotyp (CA4) sowie deren Kreuzungsnachkommen in erster Filialgeneration (CL5915-93D4 x CA4) unter kontrollierten Bedingungen in Gewächshauskabinen am AVRDC untersucht. Dabei fand ein Vergleich zwischen Auswirkungen eines Hitzestresses mit erhöhter Nachttemperatur (30°C/ 26°C Tag/Nacht) und eines Hitzestresses mit verringerter Nachttemperatur als Kontrolle (30°C/ 18°C Tag/Nacht) statt. Die Genotypen wurden in 4 Wiederholungen je Temperaturregime in randomisierten Blöcken geprüft (Abbildung 2.2). Die Aussaat fand im Juli 2008, die Bonitur im September 2008 statt.

2.4.1.2 Einstufung des Hitzetoleranztyps unter Freilandbedingungen

Im Rahmen des Feldversuchs unter natürlichen Hitzestressbedingungen am AVRDC (Taiwan) wurden 14 Linien und Kreuzungsgenotypen untersucht (Tabelle 2.1). Je Genotyp standen 80 Pflanzen (vier Wiederholungen mit je 20 Pflanzen in zwei Blöcken, randomisiert, Abbildung 2.3)

zur Verfügung. Zur Vermeidung von Randeffekten wurden die äußeren Pflanzen jedes Saatbettes von der Bonitur ausgeschlossen. Untersucht wurden die in Tabelle 2.3 näher erläuterten Merkmale Pollenausbeute, Anzahl lebensfähiger Pollenkörner, Fruchthöhe, Fruchtbreite, Fruchtform, Parthenokarpie, Samenindex sowie das Merkmal Stigma-Ausstülpung. Die Probenahme des Pollens erfolgte ausschließlich nach einer 10-tägigen Hitzestressperiode von über 32°C maximaler Lufttemperatur. Die Aussaat der Pflanzen fand im Juli 2008, die Bonitur zwischen September und November 2008 statt. Zur Beurteilung des Einflusses verschiedener Klimafaktoren wurden die Lufttemperatur, die Bodentemperatur in 10 cm und 30 cm Tiefe sowie die Luftfeuchtigkeit aufgezeichnet.



Abbildung 2.2: Versuchsdesign unter kontrollierten Bedingungen in Gewächshauskabinen am AVRDC in Taiwan. Untersucht wurde der Einfluss einer verringerten Nachttemperatur bei erhöhter Tagestemperatur auf die Merkmale Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner.



Abbildung 2.3: Freilandexperiment am AVRDC in Taiwan. Das Design umfasste 4 Wiederholungen mit je 20 Pflanzen pro Genotyp in jeweils zwei Blöcken. Die Randpflanzen wurden nicht verwendet. Die Bewässerung fand durch regelmäßige Flutung statt.

2.4.1.3 Einstufung des Hitzetoleranztyps unter kontrollierten Bedingungen

Dieser Versuch wurde in Gewächshauskabinen am Institut für Pflanzengenetik in Hannover durchgeführt. Aussaattermin war Oktober 2008, die Ernte erfolgte im März 2009. Ziel war es, die im Freiland ermittelten Hitzetoleranztypen der ausgewählten Linien und F1-Nachkommen (Tabelle 2.1) unter kontrollierten Hitzestressbedingungen zu bestätigen und deren Leistungsfähigkeit unter Hitzestress mit der unter optimalen Kulturbedingungen zu vergleichen. Die Versuche umfassten die Temperaturregime 32°C/ 28°C (Tag/Nacht) als Stressumwelt und 24°C/ 20°C (Tag/Nacht) als Kontrollumwelt. Die Prüfung der Leistungsfähigkeit erfolgte in vierfacher Wiederholung. Auf Grund der Größenbegrenzung der Klimakabinen fand eine Aufteilung der Prüfglieder je Behandlung auf vier Klimakabinen mit jeweils 12 Pflanzen statt. Zusätzlich zu den unter 2.4.1.2 beschriebenen Merkmalen wurde die Anzahl an Früchten pro Pflanze, die Anzahl an vermarktungsfähigen Früchten pro Pflanze sowie der Blühbeginn bonitiert.

2.4.1.4 Phänotypische Charakterisierung einer F4-Population unter kontrollierten Bedingungen

Für die Analyse von Hitzetoleranzmechanismen auf Expressionsebene wurde eine RIL-Population der Linien CLN1621L und CA4 in vierter Filialgeneration verwendet (Tabelle 2.2). Die ausgewählten Elternlinien unterschieden sich in ihrer Hitzetoleranz stark und wiesen besonders in dem Merkmal Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern große Unterschiede auf. Die Aussaat der Nachkommenschaft erfolgte im September 2009. Auf Grund der Größe der Population erfolgte eine Randomisierung der Pflanzen entsprechend eines „augmented design“. Dabei wurden die zu untersuchenden F4-Pflanzen randomisiert in 12 Gewächshauskabinen zusammen mit 3 Kontrolllinien (CLN1621L, CL5915-93D4-1-0-3, CA4) je Kabine aufgestellt. Um einen Eindruck über die erste Filialgeneration der Kreuzungspartner zu bekommen, wurde jeweils eine Pflanze der F1 zusätzlich in 4 Gewächshauskabinen untersucht. Zur Applikation eines Hitzestresses wurden Temperaturen von 32°C/ 28°C (Tag/Nacht) angelegt. Eine Temperaturkontrolle erfolgte mit Hilfe elektronischer Temperaturmesser in jeder Gewächshauskabine. Die untersuchten Merkmale waren die Pollenausbeute und die Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern.

Jeweils drei extrem hitzetolerante bzw. hitzesensitive Genotypen der Nachkommenschaft in Bezug auf die Lebensfähigkeit des Pollens sowie wichtiger Fruchtmerkmale wurden zusammen mit den Kreuzungseltern erneut ausgesät und unter optimalen Temperaturbedingungen (24°C/ 20°C Tag/Nacht) sowie Hitzestress (32°C/ 28°C Tag/Nacht) untersucht. Das Versuchsdesign sowie die Ergebnisse der erneuten Phänotypisierung sind in BARTKIEWICZ (2011) beschrieben.

2.4.1.5 Statistische Auswertung der phänotypischen Daten

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms R 2.10.1 bzw. R 2.14.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). Die Berechnung der Heritabilität im weiten Sinne (H^2) basierte auf dem Quotienten aus genotypischer und phänotypischer Varianz. Da die Versuche jeweils nur in einem Jahr an einem Ort stattfanden, ist die Schätzung der orts- und jahresübergreifenden Heritabilität nicht möglich.

2.5 Analyse der Hitzestresstoleranz auf Expressionsebene

Negative Auswirkungen des Hitzestresses betreffen eine Vielzahl an Merkmalen. Da es sich dabei um quantitativ vererbte Merkmale handelt und zahlreiche Gene in die Toleranzreaktion involviert sein können, galt es im Rahmen einer Expressionsanalyse Unterschiede in den Regulationsmustern hitzetoleranter und -sensitiver Genotypen unter Hitzestress und Normalbedingungen zu untersuchen. Als Kriterium für die Hitzetoleranzeinstufung diente vorrangig das Merkmal Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern, da dieses durch Hitzestress stark beeinflusst wird und in Zusammenhang mit dem Fruchtansatz steht. Gelegentlich wurden zusätzlich Merkmale wie der Grad an Parthenokarpie oder der Samenindex in die Entscheidung mit einbezogen. Als Versuchsmaterial dienten jeweils drei Pflanzen der innerhalb des unter 2.4.1.4 beschriebenen Versuches identifizierten Genotypen mit extremer Reaktion auf den Hitzestress. Für diese fand eine Analyse der Hitzestressantwort auf Expressionsebene in Antheren basierend auf einer Mischprobe der Entwicklungsstadien 10 und 5 Tage vor der Anthese statt. Die Pflanzen wurden zunächst bei einer Temperatur von 24°C/ 20°C (Tag/Nacht) angezogen und beprobt. Nach einer Temperaturerhöhung auf 32°C/ 28°C (Tag/Nacht) für mindestens 3 Wochen konnten Proben derselben Pflanze auch unter Hitzestress gewonnen werden.

2.5.1 RNA-Extraktion

Es wurde sechs Proben je Genotyp (eine Probe je Stadium und Pflanze) für die Extraktion der Gesamt-RNA verwendet. Dazu wurde das Material in flüssigem Stickstoff eingefroren und in gefrorenem Zustand mit Hilfe einer Schwingmühle (Frequenz 20/s, 3 min.) zerkleinert. Dieses Material wurde nach Protokoll des Herstellers mit dem Anwendungspaket Invitek-InviTrap® Spin Plant RNA MiniKit der Firma 'Invitek' aufgearbeitet. Ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt von 2 Minuten bei 14.000 Upm wurde nach der Lyse hinzugefügt, um große Zellreste vor der Beladung des Filters zu entfernen. Die isolierte RNA wurde in 35 µl Elution Buffer R aufgenommen.

2.5.2 Restriktion noch vorhandener DNA in RNA-Proben

Bevor eine reverse Transkription durchgeführt werden konnte, musste noch vorhandene genomische DNA aus der RNA-Probe entfernt werden. Dies geschah mit dem Anwendungspaket Ambion® DNA-free™ kit der Firma ‘Life Technologies Corporation’. Ergänzend zum Protokoll des Herstellers wurde die Inkubationszeit von 20 Minuten auf 30 Minuten bei 37°C erhöht, um jegliche DNA entfernen zu können. Jede Probe wurde einzeln behandelt. Eine Quantifizierung der RNA fand in einem 3%-igen [w/v] Agarosegel nach SAMBROOK UND RUSSELL (2001) (Kapitel 7.4.1) sowie mit Hilfe eines Photometers bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm statt.

Da für die Expressionsanalyse verschiedene Probenmischungen hergestellt werden sollten, wurden RNA-Proben wie in Tabelle 2.4 und 2.5 dargestellten vermengt. Dabei wurde stets eine RNA-Mischung aus den unterschiedlichen Antheren-Entwicklungsstadien je Genotyp und Gewächshauskabine verwendet. Diese Probenmischungen wurden mit Hilfe des Bioanalyser 2100 (Fa. ‘Agilent’) und dem Programm „Eukaryote Total RNA Nano“ analysiert. RNA guter Qualität und Quantität konnte für die weitere Analyse verwendet werden.

Tabelle 2.4: Probenmischungen für die Expressionsanalyse mit Hilfe des CustomArray™ 90K Microarray der Fa. ‘Combimatrix’. Verwendet wurde immer eine Mischung aus beiden Entwicklungsstadien je Genotyp und Gewächshauskabine (10 und 5 Tage vor Anthese). P: Probennummer, Bez.: Bezeichnung der Probe, GK: Gewächshaus-Kabine, T: Temperaturregime (N= Normal-, H= Hitzestressbedingung), R_H: Hitzetoleranzgruppe (S= hitzesensitiv, T= hitzetolerant).

P	Bez.	GK	T	R _H	Genotypen (TH-P1-F4-)			Kreuzungselter
1	S-N K7	7	N	S	033	051	062	CA4
2	T-N K7	7	N	T	046	126	071	CLN1621L
3	S-N K15	15	N	S	033	051	062	CA4
4	T-N K15	15	N	T	046	126	071	CLN1621L
5	S-N K16	16	N	S	033	051	062	CA4
6	T-N K16	16	N	T	046	126	071	CLN1621L
7	S-H K7	7	H	S	033	051	062	CA4
8	T-H K7	7	H	T	046	126	071	CLN1621L
9	S-H K15	15	H	S	033	051	062	CA4
10	T-H K15	15	H	T	046	126	071	CLN1621L
11	S-H K16	16	H	S	033	051	062	CA4
12	T-H K16	16	H	T	046	126	071	CLN1621L

Tabelle 2.5: Probenmischungen für die Expressionsanalyse mit Hilfe einer RT-qPCR. Verwendet wurde immer eine Mischung aus beiden Entwicklungsstadien je Genotyp und Gewächshauskabine (10 und 5 Tage vor Anthese). T: Temperaturregime (N= Normal-, H= Hitzestressbedingung), R_H: Hitzetoleranztyp (S= hitzesensitiv, T= hitzetolerant).

Bezeichnung	Genotyp	T	R_H	Klimakabinen		
33-N	TH-P1-F4-033	N	S	7	15	16
51-N	TH-P1-F4-051	N	S	7	15	16
62-N	TH-P1-F4-062	N	S	7	15	16
CA4-N	CA4	N	S	7	15	16
46-N	TH-P1-F4-046	N	T	7	15	16
126-N	TH-P1-F4-126	N	T	7	15	16
71-N	TH-P1-F4-071	N	T	7	15	16
CLN1621L-N	CLN1621L	N	T	7	15	16
33-H	TH-P1-F4-033	H	S	7	15	16
51-H	TH-P1-F4-051	H	S	7	15	16
62-H	TH-P1-F4-062	H	S	7	15	16
CA4-H	CA4	H	S	7	15	16
46-H	TH-P1-F4-046	H	T	7	15	16
126-H	TH-P1-F4-126	H	T	7	15	16
71-H	TH-P1-F4-071	H	T	7	15	16
CLN1621L-H	CLN1621L	H	T	7	15	16

2.5.3 Expressionsanalyse mit Hilfe des CustomArray™ 90K Microarray der Firma ‘CombiMatrix’

Im Rahmen der Array-Hybridisierungen am „Dipartimento di Biotecnologie“ der „Università degli Studi di Verona“ in Italien (Verona) wurde das Anwendungspaket RNA ampULSe: Amplification and Labeling Kit for CombiMatrix arrays der Firma ‘Kreatech Biotechnology’ verwendet, um die RNA Proben aus Tabelle 2.4 auf die Hybridisierung vorzubereiten. Mit Hilfe von reverser Transkription wurde doppelsträngige cDNA synthetisiert, welche durch in vitro Transkription in aRNA umgeschrieben werden konnte. Die Qualität und Quantität der aRNA wurde mit Hilfe des NanoDrop 1000 und des Programms NanoDrop 1000 Version 3.7.1 der Firma ‘Thermo Fisher Scientific’ bei einer Wellenlänge von 130, 260 und 280 nm bestimmt. Für die Cy5 Markierung der Proben wurden 6 µg der aufgereinigten aRNA mit Cy5-ULS-Farbstoff wie im Protokoll erläutert vermischt, inkubiert und mit Hilfe des NanoDrops erneut quanti- und qualifiziert. Dies geschah mit Hilfe einer von der Firma ‘Kreatech Biotechnology’ zur Verfügung gestellten Formel:

$$\text{Erfolg der Markierung}[\%] = \frac{340 * \text{Konzentration Farbstoff [pmol/}\mu\text{l]} * 100\%}{\text{Konzentration der Nukleinsäure [ng/}\mu\text{l]} * 1000} \quad 2.1$$

Der hierbei errechnete Wert sollte höher als zwei sein um eine Hybridisierung durchführen zu können. Die dabei verwendeten Geräte waren das GeneAmp® PCR System 9700 von 'Life Technologies Corporation', das Wasserbad ED-5 der Firma 'Julabo Italia Srl' und die Zentrifuge 5417C von 'Eppendorf'.

Für die Hybridisierungen wurden drei CustomArray™ 90K Microarrays (TomatoArray 2.0) der Firma 'CombiMatrix' verwendet. Dieser beinhaltet insgesamt 25.789 Sonden mit insgesamt 28.470 Zielsequenzen, davon 23.282 mit einer und 2.507 mit mehreren Zielsequenzen. Je Sonde waren drei Wiederholungen und 40 Negativkontrollen mit 33 Kontrollwiederholungen im Chip eingeplant. Die Sonden wurden im „Dipartimento di Biotecnologie“ mit Hilfe von Sequenzen aus der Datenbank TIGR *Lycopersicon esculentum* Gene Index Release 12.0 (16. Juli 2008) abgeleitet und auf die leeren Chips platziert.

Das für diese Versuche verwendete Protokoll war das „CustomArray™ 90K Microarray: Hybridization and Imaging Protocol (PTL020)“ von 'CombiMatrix'. Für die Analysen wurden 6 µg der Cy5-ULS markierten aRNA eingesetzt. Die dafür benötigten Lösungen wurden immer frisch angesetzt. Da eine mehrfache Hybridisierung der Proben an die Arrays stattfinden sollte, sind in Tabelle 2.6 die Nummern der Arrays sowie die Probenmischungen aufgelistet, die auf dem jeweiligen Chip analysiert wurden. Nach einer erfolgreichen Hybridisierung wurde der Chip mit Hilfe des „Axon GenePix® 4400 A“ der Firma 'MDS Analytical Technologies' und des Programms GenePix Pro ausgewertet. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 635 nm (Fokus-Position = 120 µm, „PMT Gain“ = 440, „Power[%]“ = 50). Vom System falsch detektierte Datenpunkte wurden im Programm manuell auf die richtige Position verschoben. Nach der Bearbeitung der Daten in GenePix Pro und der Ausgabe der Hybridisierungsintensitäten wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Programms R 2.12.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) und einem von Alberto Ferrarini (Dipartimento di Biotecnologie, Verona) entwickelten Skript basierend auf dem Paket 'limma' analysiert. Eine Normalisierung der Daten fand statt.

Um die Arrays erneut verwenden zu können, mussten die hybridisierten Fragmente entfernt werden. Dies geschah mit Hilfe einer Lösung bestehend aus 1:1 Ethanol:Ethanolamin. Der Chip wurde mehrfach mit dieser Lösung gespült, für 1 Stunde 15 Minuten bei 65 °C in der Lösung inkubiert, mit Ethanol gereinigt und 10 Sekunden getrocknet. Danach wurde der Array in vortemperiertem 1xPBS Puffer entsprechend des Protokolls für 20 Minuten bei 65°C inkubiert. Abschließend wurde der Erfolg der Entfernung der Hybridisierungsprodukte mit Hilfe des „Axon GenePix® 4400 A“ überprüft. Die Lagerung der Microarrays fand in 1xPBS Puffer bei 4°C statt. Die hier verwendeten Geräte waren der Hybridisierungs-ofen Finepcr sv12dx der Firma 'Progen Scientific' und ein Rotor der Firma 'CombiMatrix' mit der Modellnummer 610004.

Tabelle 2.6: Belegung der drei CustomArray™ 90K Microarrays. Aufgelistet sind die Nummern der drei Microarrays sowie deren Belegung mit den unterschiedlichen Probenmischungen (Tab. 2.4).

Nummer des Arrays				
9007576	Probe 2	Probe 7	Probe 1	Probe 8
9007577	Probe 3	Probe 4	Probe 9	Probe 10
9007673	Probe 6	Probe 5	Probe 11	Probe 12

2.5.4 Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Eine Identifizierung differentiell exprimierter Gene erfolgte mit Hilfe der Software R 2.12.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). Zu diesem Zweck wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Sonden und Probenmischungen sowie die Expressionsänderung in unterschiedlichen Vergleichen berechnet. Verglichen wurden hitzetolerante und hitzesensitive Genotypen unter Normal- und Hitzestressbedingungen. Die allgemeine Hitzestressantwort wurde durch die gemeinsame Analyse der beiden Toleranzklassen unter Hitzestress und optimaler Temperaturbedingung untersucht. Die statistische Signifikanz der dabei ermittelten Expressionsänderungen wurde mit Hilfe des Paketes ‘samr‘ abgesichert. Abschließend fand eine Reduktion der Ergebnisse durch den Ausschluss solcher Regulationen statt, deren Änderung geringer als 2-fach war. Eine Zuordnung der Sonden zu GO-Annotationen erfolgte durch Informationen des „Dipartimento di Biotecnologie“ bzw. einen Vergleich der Zielsequenzen der Sonden mit den publizierten Sequenzen des Tomatengenoms (SOL Genomics Network, ITAG 2.3, Version 2.4) auf Nukleotidebene (BlastN) mit Hilfe des Programms Bioedit. Die Visualisierung der Expressionsergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software R 2.14.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) und dem Paket ‘pheatmap‘.

2.6 Analyse der differentiellen Expression mittels RT-qPCR

2.6.1 Primerentwicklung für differentiell exprimierte Gene

Der Primerentwicklung lagen die Ergebnisse der Expressionsanalyse zu Grunde. Aus den dabei identifizierten Sequenzen möglicher Kandidatengene konnten mit Hilfe der Software Primer3 Primersequenzen entsprechend der Vorgaben bei KLIE (2014) abgeleitet werden. Diese sollten ein Fragment von durchschnittlich 90-100 Nukleotiden amplifizieren (Tabelle 7.2.5). Als Referenzgene zur Normalisierung der Ergebnisse der RT-qPCR wurden die Gene 18S rRNA und LeEF1 (GIORNO et al., 2010) verwendet. Die neu entwickelten Primerpaare konnten in HPLC-H₂O (Fa. ‘AppliChem‘) gelöst und in einer PCR zusammen mit Lambda-DNA als Kontrolle eingesetzt werden. Die PCR setzte sich aus 200 ng cDNA bzw. DNA, 2 µl Williams Puffer (10x), 1,5 µl dNTPs (2 mM), 4 µl

Primermix (2,5 μM), 0,1 μl Taq-Polymerase und 20 μl HPLC- H_2O zusammen. Das Temperaturprogramm der PCR ist in Tabelle 2.7 dargestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte in einem 3 % igen Agarosegel (Kapitel 7.4.1). Für die weitere Analyse wurden nur Primerpaare verwendet, mit denen ein einzelnes Fragment amplifiziert werden konnte.

Tabelle 2.7: PCR-Bedingungen zur Etablierung der neu entwickelten Primer.

Amplifikationsschritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95 °C	5 min.
Denaturierung	35	94 °C	60 sek.
Primeranlagerung		60 °C	60 sek.
Synthese		72 °C	60 sek.
finale Synthese	1	72 °C	10 min.

2.6.2 Reverse Transkription

Für die RT-qPCR-Experimente wurde eine Reverse Transkription der isolierten RNA mit dem Anwendungspaket „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ der Firma ‘Life Technologies Corporation‘ durchgeführt. Es wurden 2 μg aufgereinigte Gesamt-RNA je Probenmischung eingesetzt. Das Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 20 μl) wurde für 15 Minuten bei 25°C und für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte eine Erhitzung auf 85°C für 5 Sekunden zur Trennung zusammengelagerter Fragmente. Die Visualisierung der Ergebnisse fand in einem 3 %igen Agarosegel statt (Kapitel 7.4.1).

2.6.3 RT-qPCR

Eine Analyse der Expressionsstärke der untersuchten Gene in den in Tabelle 2.5 aufgeführten Probenmischungen erfolgte mit Hilfe des StepOnePlus™ Systems von ‘Life Technologies Corporation‘. 2 μl cDNA (1:30 Verdünnung) wurden mit jeweils 1 μl Forward- bzw. Reverse-Primer (0,25 μM), 5 μl Mesa Fast SYBR Mastermix (Fa. ‘Eurogentec‘) und 2 μl HPLC- H_2O vermischt und wie in Tabelle 2.8 beschrieben behandelt. Für die Primerpaare 1, 4, 6, 7 und 8 konnten drei, für die Primerpaare HsfA2 und Hsp17.6-CII eine bzw. zwei Wiederholungen durchgeführt werden. Die Erfassung der Daten erfolgte mit der Software StepOnePlus™ V.2.0. Die Effizienz der PCR wurde sowohl visuell als auch statistisch bestimmt. Dazu wurden die Rohdaten aus der Software StepOnePlus™ V.2.0 ausgelesen und die ΔRn -Werte in das Programm „LinRegPCR: Analysis of quantitative RTPCR Data“ eingelesen. Die Berechnung der PCR-Effizienz je Primerpaar erfolgte mit Hilfe des LRE-Analyzers nach RUTLEDGE UND STEWART (2008). Die durch dieses Programm ermittelten Effizienzen und C_T -Werte wurden je nach Vergleich gemittelt und in Rest 2008 (PFAFFL

et al., 2001) auf statistische Signifikanz untersucht. Als Referenzgen konnte nur LeEF1 herangezogen werden. Es wurden Unterschiede zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen, Regulationsunterschiede in der Antwort auf den Hitzestress in der jeweiligen Toleranzgruppe sowie Expressionsunterschiede unanhängig von der Hitzetoleranzgruppe unter Normaltemperaturen und Hitzestress untersucht. Die Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Genotypen wurden ebenfalls analysiert, um die Variation innerhalb einer Toleranzgruppe beurteilen zu können.

Tabelle 2.8: PCR-Bedingungen der RT-qPCR.

Amplifikationsschritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95 °C	5 min.
Denaturierung	45	95 °C	15 sek.
Primeranlagerung	1	60 °C	45 sek.
Schmelzkurvenanalyse		60 °C bis 95 °C in 0,5 Schritten	

2.7 Molekulare Untersuchungen zur Hitzetoleranz

Für die molekulargenetische Analyse der Hitzetoleranz wurden die in Tabelle 7.1.3 und unter 2.1 näher erläuterten Kreuzungsnachkommen der von MITTERBAUER (2008) und URBAN (2006) erstellten Kartierungspopulation zwischen CLN1621L (AVRDC) und Pannovy F1 (Fa. ‘Syngenta Taiwan Ltd.’) herangezogen. Da der Kreuzungselter Pannovy (F1- Hybride) nicht mehr im Original vorlag, wurde eine Mischung aus 8 Einzelpflanzen dieser Sorte für die molekulare Charakterisierung verwendet. Auf Grund der geringen genetischen Distanz der Kartierungseltern und der dadurch zu erwartenden geringen Anzahl an Rekombinationsereignissen in der Nachkommenschaft, wurden vier verschiedene Markertypen zur molekularen Charakterisierung des Materials verwendet: AFLP-, SSR-, DArT- und SNP-Marker. Die Analyse der SNP-Marker konnte nur für 94 Genotypen der Population und deren Eltern erfolgen. Die Charakterisierung mit DArT-Markern führte die Firma ‘Diversity Arrays Technology’ durch, die SNP-Marker-Analyse mittels Illumina-Microarray ermöglichte Dr. Sjaak van Heusden (Wageningen-UR Plant Breeding).

2.7.1 DNA Extraktion

Für die DNA Extraktion wurde 70 mg frisches Blattmaterial in ein Reaktionsgefäß abgewogen, in eine mit Silikagel gefüllte Box gestellt und für 48 Stunden in einem Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Anschließend konnte das Material eingefroren oder für eine Extraktion mit zwei Stahlkugeln versehen werden. Die DNA Extraktion wurde mit dem „NucleoSpin Plant II Kit“ der Firma ‘Macherey-Nagel’ durchgeführt. Zu Beginn der Extraktion wurde das getrocknete

Blattmaterial in einer Schwingmühle (30 Schwingungen/s, 3 min.) zerkleinert. Danach konnte der Puffer für den Zellaufschluss hinzugefügt, das feine Probenpulver mit dem Lyse-Puffer vermischt und für 30 Minuten bei 65°C unter Schütteln aufgeschlossen werden. Anschließend fand eine zusätzliche Zentrifugation von zwei Minuten bei 14.000 Upm statt. Nach der Aufreinigung der DNA wurde diese in 100 µl Elutionspuffer aufgenommen. Die Quantifizierung fand in einem 1%-igen [w/v] Agarosegel (Kapitel 7.4.1) sowie photometrisch bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm statt.

2.7.2 Genotypisierung mit AFLP-Markern

Die AFLP- Methode wurde leicht verändert nach VOS et al. (1995) durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Restriktion der DNA-Proben mit Hilfe der Enzyme *MseI* und *HindIII*. Hierzu wurden in einem 25 µl Ansatz 100 ng DNA mit 10 U *HindIII*, 3 U *MseI* und 1/10 Volumen 10 x RL Puffer vermennt, auf das gewünschte Volumen mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und für 20 Stunden bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Die Ergebnisse der Restriktion wurden auf einem 1%-igen [w/v] Agarosegel überprüft. Danach konnte das Restriktionsgemisch mit 5 µl eines Adaptergemisches bestehend aus 0,5 µM *HindIII*- und 0,5 µM *MseI*-Adapter, 1,2 mM ATP, 1/10 Volumen 10 x RL Puffer, 2,85 µl bidestilliertem Wasser und 0,25 U T₄-DNA-Ligase vermennt und für 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert werden. Die bei dieser Ligation entstandenen Primerlagerungsstellen können für eine Vermehrung der Restriktionsfragmente (Präamplifikation) genutzt werden. Hierzu wurden 5µl der Ligation mit 75 ng *HindIII*-Primer (ohne eine zusätzliche selektive Base) sowie 75 ng *MseI*-Primer (ebenfalls ohne eine zusätzliche selektive Base) mit 0,2 mM dNTPs, 1/10 Volumen 10 x Williams Puffer, 31 µl bidestilliertem Wasser und 5 U Taq- Polymerase (‘Bioline’) vermennt und wie in Tabelle 2.9 dargestellt behandelt. Um die Anzahl an Fragmenten zu reduzieren, wurde eine finale Amplifikation mit Hilfe von *HindIII*- und *MseI*-Primern mit jeweils drei selektiven Basen am 3'-Ende des Primers durchgeführt. Es wurde ein 10 µl Ansatz bestehend aus 2,5 Volumen 1:20 in 1x TE verdünnter Präamplifikationslösung, 5 ng des fluoreszenzmarkierten *HindIII*- und 15 ng des *MseI*- Primers, 0,2 µM dNTPs, 0,25 U Taq-Polymerase (‘Bioline’) und 1/10 Volumen 10 x Williams Puffer hergestellt. In diesem Arbeitsschritt war die gemeinsame Verwendung von zwei verschiedenen *HindIII*- Primern (IRD₇₀₀ und IRD₈₀₀ markiert) in einer Reaktion mit einem unmarkierten *MseI*- Primer möglich. Dazu wurden 4 ng je *HindIII*-Primer eingesetzt. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit destilliertem Wasser erreicht. Eine Liste der verwendeten Primerkombinationen ist dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 7.2). Tabelle 2.10 zeigt das bei der Amplifikation verwendete PCR-Programm. Die amplifizierten Fragmente wurden mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 7.4.2) visualisiert. Die Auswertung der Fragmentmuster erfolgte manuell.

Tabelle 2.9: PCR-Programm für die Präamplifikation.

Amplifikationsschritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	94 °C	5 min.
Denaturierung	20	94 °C	30 sek.
Primeranlagerung		60 °C	30 sek.
Synthese		72 °C	60 sek.
finale Synthese	1	72 °C	10 min.

Tabelle 2.10: PCR-Programm für die finale Amplifikation.

Amplifikationsschritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	94 °C	5 min.
Denaturierung	1	94 °C	30 sek.
Primeranlagerung		65 °C	30 sek.
Synthese		72 °C	60 sek.
Denaturierung	11	94 °C	30 sek.
Primeranlagerung		65 °C -0,7°C je Zyklus	30 sek.
Synthese		72 °C	60 sek.
Denaturierung	24	94 °C	30 sek.
Primeranlagerung		56 °C	30 sek.
Synthese		72 °C	60 sek.
finale Synthese	1	72 °C	10 min.

2.7.3 Genotypisierung mit SSR-Markern

Neben der molekularen Charakterisierung des Materials mit Hilfe von AFLP-Markern fand eine Analyse mit Mikrosatelliten-Primerpaaren statt. Dazu wurden die im Anhang in den Tabellen 7.2.3 und 7.2.4 aufgelisteten Primerpaare verwendet. Die Mehrzahl der Primerpaare wurde der SGN-Datenbank (<http://solgenomics.net/>) entnommen. Die Primersequenzen der restlichen Primer stellte das AVRDC in Taiwan zur Verfügung, nachdem diese die Eltern der Kartierungspopulation mit Hilfe neu entwickelter, noch nicht veröffentlichter Marker analysiert hatten. Die optimalen Annealingtemperaturen jedes Primers wurden ebenfalls aus der Literatur bzw. aus der Mitteilung des AVRDCs übernommen und lagen zwischen 56°C und 58°C.

Die Vorgehensweise bei der Analyse der Mikrosatelliten-Primerpaare basierte auf der bei SCHUELKE (2000) beschriebenen Methode. Das Ziel dieser Methode ist es, ein in der PCR spezifisch vermehrtes Fragment mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Primers in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese detektierbar zu machen. An die Primersequenz des Forward-Primers wurde aus diesem Grund eine 17 bp lange Nukleotidsequenz (GTA AAA CGA CGG CCA GT) angehängt. Dies ermöglichte die Synthese des spezifischen Produktes mit dem fluoreszenzmarkierten M13-Primer. Das Reaktions-

gemisch (18 µl) bestand aus 20 ng DNA, 1/5 Volumen 10 x Williams Puffer, 0,16 mM dNTPs, 0,06 µM des unmarkierten Forward-M13-Primers, 0,07 µM fluoreszenzmarkierter M13-Primer (IRD₇₀₀), 0,2 µM unmarkierter Reverse-Primer und 0,7 U Taq-Polymerase (‘Bioline‘). Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 2.11 dargestellt. Die Visualisierung der Fragmente fand mit Hilfe einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 7.4.2) und deren Auswertung manuell statt.

Tabelle 2.11: PCR-Programm für eine Mikrosatelliten-PCR. Es wird ein fluoreszenzmarkierter M13-Primer (IRD₇₀₀) verwendet. Die Anlagerungstemperatur jedes Primers lag zwischen 56°C und 58°C.

Amplifikationsschritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	94 °C	5 min.
Denaturierung	25	94 °C	45 sek.
Primeranlagerung		56 - 58 °C	60 sek.
Synthese		72 °C	60 sek.
Denaturierung	8	94 °C	30 sek.
Primeranlagerung		52 °C	45 sek.
Synthese		72 °C	60 sek.
finale Synthese	1	72 °C	10 min.

2.7.4 Analyse von DArT-Markern in der aufspaltenden Population

Die Analyse der DArT-Marker wurde von der Firma ‘Diversity Arrays Technology‘ in Australien durchgeführt. Die Proben wurden in gewünschter DNA-Menge und -Konzentration an die Firma übermittelt. Die Ergebnisse der Analyse wurden in Form einer dominant ausgewerteten Markerdaten-Matrix übermittelt.

2.7.5 Analyse von SNP Markern in der aufspaltenden Population

Die Analyse der SNP-Marker sowie deren Nomenklatur erfolgte durch die Mitarbeiter des „UR Plant Breeding“ in Wageningen unter Leitung von Dr. Sjaak van Heusden. Zu diesem Zweck wurde 2 µg DNA je Genotyp an das Institut versendet. Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden in Form einer kodominant ausgewerteten Datenmatrix bereitgestellt. Das Probenkontingent musste auf 94 Nachkommengenotypen und deren Eltern beschränkt werden. Diese sind im Anhang in Tabelle 7.1.3 aufgelistet. Informationen zu dem Microarray sind in VÍQUEZ-ZAMORA et al. (2013) beschrieben.

2.7.6 Berechnung der genetischen Karten

Für die Berechnung der genetischen Karte wurde das Programm JoinMap 4 (VAN OOIJEN, 2006) verwendet. Da es sich bei der untersuchten Population um eine F₂-Nachkommenschaft handelt, wurde eine Klassifizierung der dominanten Marker (AFLP und DArT) in Form von (a, c) bzw. (b, d)

vorgenommen. Kodominante Marker wie die SNPs und SSR-Marker folgten der Klassifizierung (a, h, b). Eine Eingruppierung der molekularen Marker fand mit Hilfe der Methodik des „independence LOD“ mit einem Signifikanzniveau zwischen LOD 2 und 10 statt. Die Zuweisung molekularer Marker zu Kopplungsgruppen erfolgte ab einem Signifikanzniveau von LOD 3. Die Berechnung der Kopplungsgruppen wurde mit der Kartierungsfunktion nach KOSAMBI (1944) in Form einer Regressionskartierung (STAM, 1993) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Positionierung jedes einzelnen Markers auf Basis seiner besten Position auf der Kopplungskarte. Es wurde eine Rekombinationsfrequenz von 0,4 und ein LOD von 3 als Signifikanzniveau angenommen. Nach der Betrachtung aller Marker in der „ersten Runde“ wurden solche Marker aus der Karte entfernt, bei denen negative Distanzen auftraten oder der „goodness-of-fit“ zu stark abnahm („goodness-of-fit jump“ > 5). Bei der Berechnung der „zweiten Runde“ ist die Möglichkeit gegeben, dass auf Grund der höheren Anzahl an paarweisen Vergleichen weitere Marker in die genetische Karte integriert werden können. In einer letzten Berechnung („dritte Runde“) wird eine Karte erstellt, welche alle Marker unabhängig von negativen Distanzen oder dem „goodness-of-fit“ enthält. Da diese allerdings mit Ungenauigkeiten behaftet ist, sind die Karten der ersten und zweiten Runde vorzuziehen (VAN OOIJEN, 2006). Eine Zuordnung der Kopplungsgruppen zu den Chromosomen erfolgte über die SSR, DArT- und SNP-Marker.

2.7.7 Vergleich der genetischen mit der physikalischen Karte der Tomate

Mit Hilfe der kartierten SNP-Marker, für welche eine Sequenz vorlag, konnte ein Vergleich der hier erarbeiteten genetischen Karte mit der physikalischen Karte des sequenzierten Tomatengenoms erfolgen. Dazu wurden die DNA-Sequenzen der molekularen Marker mit den Sequenzen des Tomatengenoms (SOL Genomics Network, ITAG 2.3, Version 2.4) mit Hilfe des Programms Bioedit auf Nukleotidebene (BlastN) verglichen. Als übereinstimmend wurden Sequenzen mit einem E-Wert von mindestens 10^{-20} angesehen. Die Visualisierung des Vergleiches erfolgte mit MapChart 2.2 (VOORRIPS, 2002). Über die Verknüpfung der beiden Karten war eine Zuordnung von GO-Annotationen für die Sequenzen der SNP-Marker möglich.

2.7.8 QTL-Kartierung

Für die Berechnung von QTL wurde das Programm MapQTL 6 von VAN OOIJEN (2006) verwendet. Eine Analyse der Marker/Merkmal-Beziehungen erfolgte mit Hilfe der in JoinMap4 berechneten genetischen Karten der zweiten Runde sowie der von MITTERBAUER (2008) erhobenen, gemittelten phänotypischen Daten. Mit Hilfe des in MapQTL 6 integrierten Permutationstests nach CHURCHILL UND DOERGE (1994) konnten Schwellenwerte für die statistisch abgesicherte Detektion von QTL-

tragenden Regionen ermittelt werden. Es wurden 1.000 Permutationen und 5 Wiederholungen durchgeführt. Als chromosomen- bzw. genomweite Signifikanzschwelle wurde das 95 %ige Konfidenzintervall der relativen, kumulativen Werte des Permutationstestes angenommen. Dieser Test ermöglicht die Berechnung eines Signifikanzniveaus auch für nicht exakt normalverteilte Daten. Die phänotypischen Daten wurden zur Annäherung an eine Normalverteilung trotzdem mit Hilfe des Pakets 'car' in R 2.14.2 transformiert (je nach Bedarf mit Hilfe der Funktion 'sqrt' oder 'bcPower'). Zur Identifizierung von Marker/Merkmal-Beziehungen wurde sowohl eine Intervallkartierung als auch eine Kruskal-Wallis Korrelationsanalyse durchgeführt. Diese beiden unterscheiden sich in der Analysemethodik darin, dass bei der Methode nach Kruskal-Wallis eine Korrelation jedes einzelnen Markers mit dem Merkmal untersucht wird, während bei der Intervallkartierung ein Zusammenhang zwischen einem bestimmten Abschnitt eines Chromosoms und einem Merkmal hergestellt wird. Beide Methoden benötigen Signifikanzschwellen, um die statistische Signifikanz der detektierten Assoziationen nachzuweisen. Im Rahmen der Kruskal-Wallis-Korrelationsanalyse erfolgte eine Bonferroni-Adjustierung ($\alpha_{\text{adj}} = \alpha/12$), wobei der Divisor die Anzahl an Chromosomen im haploiden Genom der Tomate repräsentiert, sowie eine Berechnung des kritischen Wertes der Teststatistik in R 2.14.2 ($qchisq(1 - \alpha_{\text{adj}}, df)$), in welcher die Anzahl an Freiheitsgraden (df) jeder Markerklasse berücksichtigt wird.

Als Genomregion mit signifikantem Einfluss auf das untersuchte Merkmal wurden solche Regionen eingestuft, deren LOD-Werte den chromosomenweiten oder genomweiten Schwellenwert in der Intervallkartierung überschritten und gleichzeitig molekulare Marker enthielten, deren Teststatistik im Rahmen der Kruskal-Wallis-Korrelationsanalyse den kritischen Wert überschritten.

Die Darstellung der genetischen Karte sowie der Ergebnisse der QTL-Analyse erfolgte mit Hilfe der Software MapChart 2.2 (VOORRIPS, 2002). Die Nomenklatur eines QTL ergibt sich aus „Q“ für QTL, dem Merkmal, gefolgt vom Chromosom sowie einer fortlaufenden Nummerierung, sobald mehr als ein QTL für das gleiche Merkmal auf einem Chromosom lokalisiert sind.

2.7.9 Vergleich der Expressions- und QTL-Ergebnisse

Durch den beiderseitigen Abgleich sowohl der Ergebnisse der Expressionsanalyse zur Identifizierung von Hitzetoleranzmechanismen als auch der Ergebnisse der QTL-Studie mit den Genomsequenzen von *Solanum lycopersicum* konnte ein Vergleich der Befunde beider Studien erfolgen. Dabei wurden die ermittelten physikalischen Positionen herangezogen, um die in der Expressionsanalyse identifizierten Transkriptregulationen QTL-tragenden Genomregionen zuzuordnen.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss ausgewählter Klimafaktoren des Hitzestresses auf Merkmale des Pollens

3.1.1 Effekt einer verringerten nächtlichen Abkühlung unter Hitzestressbedingungen

Für die Beurteilung des Effektes der nächtlichen Temperaturen unter Hitzestressbedingungen wurde je ein Vertreter der Gruppe der hitzetoleranten (CL5915-93D4-1-0-3) bzw. der hitzesensitiven Genotypen (CA4) sowie deren F1-Nachkommenschaft (CL5915-93D4-1-0-3 x CA4) untersucht. Es konnten sowohl Unterschiede zwischen den beiden Temperaturregimen als auch zwischen den Genotypen beobachtet werden (Abbildung 3.1). Die hitzetolerante Linie wies im Temperaturregime mit einer verringerten nächtlichen Abkühlung Symptome einer Infektion mit dem TYLC-Virus („tomato yellow leaf curl virus“) auf, was sich in einer unvorteilhaften Entwicklung der Pflanzen und einer extrem negativen Beeinflussung der untersuchten Merkmale widerspiegelte. Von einer Verwendung der für diesen Genotyp unter starken Hitzestressbedingungen erhobenen Daten wurde abgesehen. CA4 und dessen Kreuzungsnachkommen tragen ein Resistenzgen für dieses Virus, so dass deren Leistungsfähigkeit nicht durch das Virus beeinflusst werden konnte.

Im Rahmen einer statistischen Auswertung der Boniturdaten konnten bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ statistisch signifikante Unterschiede für die Merkmale Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern sowie der Pollenausbeute zwischen der hitzetoleranten Linie CL5915-93D4-1-0-3 und dem hitzesensitiven Genotyp CA4 sowie der F1-Nachkommenschaft unter Hitzestressbedingungen mit verringerter Nachttemperatur beobachtet werden. In Bezug auf das Merkmal nicht lebensfähiger Pollen wurden unter diesen Temperaturbedingungen signifikante Unterschiede zwischen den F1-Nachkommen und der hitzesensitiven Linie CA4 nachgewiesen.

Unter starken Hitzestressbedingungen mit einer erhöhten Nachttemperatur konnten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen der hitzesensitiven Linie und Vertretern der F1-Nachkommenschaft nachgewiesen werden. Während die Pollenausbeute und die Lebensfähigkeit der Pollenkörner in der hitzesensitiven Linie CA4 stark durch eine verminderte Abkühlung in der Nacht reduziert wurde, wiesen die Kreuzungsnachkommen zwar ebenfalls negative Beeinflussungen der untersuchten Merkmale auf, ihre Leistungsfähigkeit übertraf aber die des hitzesensitiven Genotyps.

Um den generellen Einfluss der Nachtabskühlung auf die Bildung von Pollen und dessen Lebensfähigkeit zu klären, wurde eine Korrelationsanalyse aller erhobenen phänotypischen Daten unabhängig vom Toleranztyp mit Daten zur nächtlichen Temperatur durchgeführt (Tabelle 3.1). Es konnte ein signifikant negativer Einfluss einer erhöhten Nachttemperatur unter Hitzestressbedingungen auf die untersuchten Merkmale Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger sowie daraus resultierender nicht lebensfähiger Pollenkörner nachgewiesen werden. Eine Abkühlungsphase in der Nacht verbessert somit die Hitzetoleranz der Tomate.

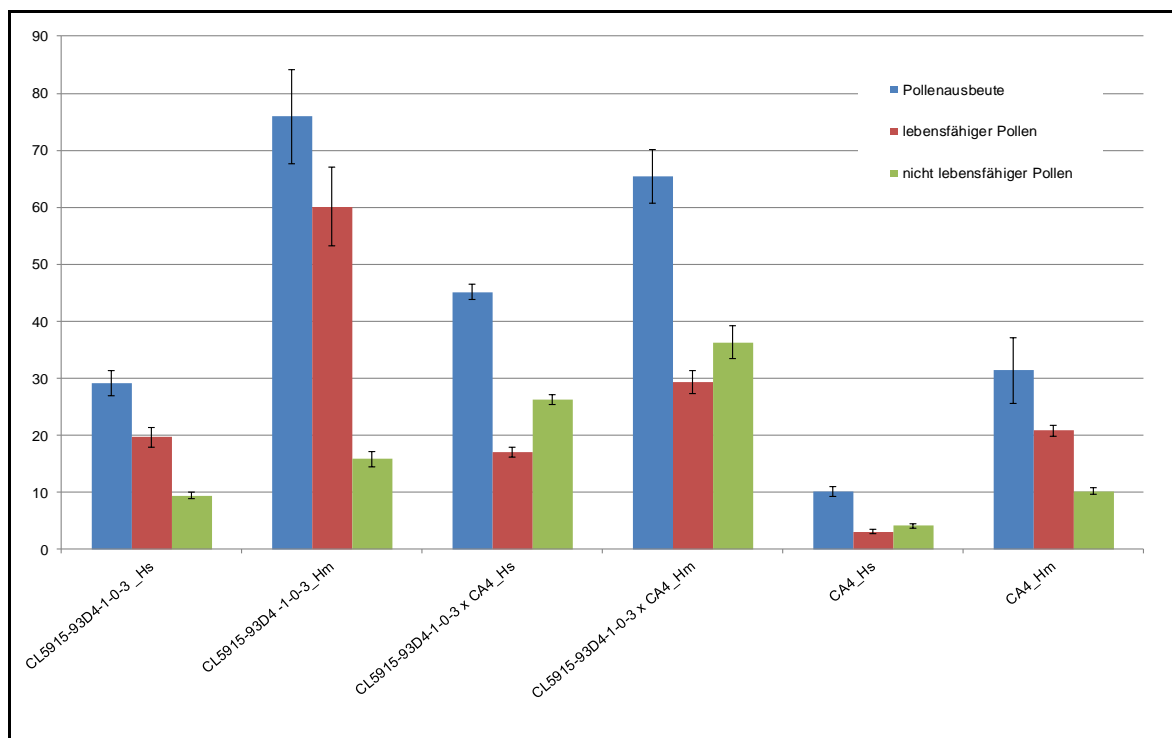


Abbildung 3.1: Effekt einer verringerten Nachttemperatur auf Merkmale des Pollens unter Hitzestressbedingungen. Untersucht wurden die Merkmale Pollenausbeute [Anzahl/1000] und die Anzahl lebensfähiger bzw. nicht lebensfähiger Pollenkörner [Anzahl/1000]. Die Beschriftung der X-Achse setzt sich aus dem Namen des untersuchten Genotyps und der Temperaturbedingung während der Prüfung zusammen (_Hs= starker Hitzestress (30°C/26°C Tag/Nacht), _Hm= moderater Hitzestress (30°C/18°C Tag/Nacht)). Die Messwerte für den Genotyp CL5915-94D4-1-0-3 sind auf Grund einer Virusinfektion im Temperaturregime starker Hitzestress (Hs) fehlerhaft.

Tabelle 3.1: Korrelationsanalyse zwischen der Nachttemperatur unter Tageshitzestress und Merkmalen des Pollens. Untersucht wurden die Pollenausbeute und die Anzahl lebensfähiger bzw. nicht lebensfähiger Pollenkörner. Berechnet wurden Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r). df= Freiheitsgrad.

Merkmal	df	r	p-Wert
Pollenausbeute	245	-0,2823	<0,001
lebensfähiger Pollen	245	-0,2905	<0,001
nicht lebensfähiger Pollen	245	-0,2038	0,0013

3.1.2 Effekte der Luft- und Bodentemperatur sowie der Luftfeuchtigkeit

Im Rahmen des unter 2.4.1.2 beschriebenen Freilandversuches am AVRDC in Taiwan wurden Klimadaten erhoben, welche für eine Untersuchung der Effekte, des Zusammenspiels sowie des Wirkungszeitpunktes unterschiedlicher Hitzestressklimakomponenten herangezogen werden sollten. Untersucht wurden die Klimafaktoren minimale bzw. maximale Lufttemperatur, Bodentemperatur in 10 cm bzw. 30 cm Tiefe und die prozentuale Luftfeuchtigkeit. Bis auf wenige Ausnahmen lagen konstante maximale Lufttemperaturen von über 30°C, Bodentemperaturen zwischen 27°C und 31°C sowie Luftfeuchtigkeiten zwischen 69 % und 98 % vor (Abbildung 3.2). Zu beobachten war ein negativer Zusammenhang zwischen der relativen Luftfeuchtigkeit und der maximalen Lufttemperatur, welcher sich in einer Korrelationsanalyse nach Pearson als signifikant erwies (Abbildung 3.3, Korrelationskoeffizient $r = -0,66$). Stark positive Zusammenhänge konnten zwischen der minimalen Lufttemperatur und der Temperatur in 10 cm ($r = 0,88$) bzw. 30 cm ($r = 0,73$) Bodentiefe hergestellt werden.

Im Rahmen der Korrelationsanalyse zwischen Klimafaktoren und phänotypischen Merkmalen konnte ein stark positiver Zusammenhang zwischen der Temperatur in einer Bodentiefe von 30 cm und Merkmalen des Pollens nachgewiesen werden (Tabelle 3.2, $r = 0,2$ bis $r = 0,47$). Die Temperatur 10 Tage vor der Anthese war dabei genauso einflussreich wie die Temperatur zum Boniturzeitpunkt. Für Vertreter beider Toleranzgruppen wurden signifikant positive Effekte der Bodentemperatur in 30 cm Tiefe auf die Pollenausbeute und die Lebensfähigkeit der Pollenkörner beobachtet. Besonders positiv beeinflusst wurden die hitzetoleranten Prüfglieder.

In einer Bodentiefe von 10 cm kehrte sich der oben beschriebene Effekt um, so dass in fast allen Analysen signifikant negative Korrelationen zwischen diesem Klimafaktor und den Merkmalen Pollenausbeute, Anzahl lebensfähiger und nicht lebensfähiger Pollenkörner auftraten ($r = -0,12$ bis $r = -0,42$). Zum Boniturzeitpunkt wurden die untersuchten Merkmale in beiden Toleranzgruppen durch die Bodentemperatur beeinflusst, Effekte der Temperaturen 10 Tage vor der Anthese waren vorrangig für die hitzesensitiven Genotypen zu beobachten. Die 10 Tage vor der Anthese herrschenden Temperaturbedingungen im Boden beeinflussten ebenfalls die Lebensfähigkeit des Pollens in hitzetoleranten Genotypen schwach negativ.

Für die mit der Bodentemperatur stark korrelierte minimale Lufttemperatur konnten negative Effekte auf die untersuchten Merkmale nachgewiesen werden ($r = -0,08$ bis $r = -0,32$). Vor allem Temperaturbedingungen zum Boniturzeitpunkt wirkten sich unabhängig vom Toleranztyp einer Pflanze auf die Ausprägung der Merkmale aus. Die Pollenausbeute und Anzahl an nicht lebensfähigen Pollenkörnern wurde in hitzesensitiven Genotypen ebenfalls durch die Temperaturen 10 Tage vor der Anthese schwach negativ beeinflusst. Ein Effekt dieses Wirkungszeitpunktes auf die Merkmalsausprägung hitzetoleranter Genotypen konnte nicht nachgewiesen werden.

Ein Einfluss der maximalen Lufttemperatur auf die Merkmale Pollenausbeute, Anzahl an lebensfähigen und nicht lebensfähigen Pollenkörnern konnte nicht beobachtet werden. Der für die Merkmale Pollenausbeute ($r=0,09$) und die Anzahl nicht lebensfähiger Pollenkörner ($r=0,11$) zum Boniturzeitpunkt detektierte Effekt konnte bei Trennung der Boniturdaten entsprechend des Toleranztyps nicht bestätigt werden.

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Luftfeuchtigkeit und pollenbezogenen Merkmalen identifizierte ausschließlich negative Korrelationen. Die Luftfeuchtigkeit zum Boniturzeitpunkt beeinflusste unabhängig vom Toleranztyp alle untersuchten Merkmale stark. Der größte Effekt war für die hitzetoleranten Genotypen zu beobachten. Eine hohe Luftfeuchtigkeit 10 Tage vor der Anthese reduzierte die Pollenausbeute und Lebensfähigkeit des Pollens in hitzetoleranten Pflanzen, während hitzesensitive Genotypen unbeeinflusst blieben.

Für alle Klimafaktoren erfolgte überwiegend eine verstärkte Einflussnahme auf die untersuchten Merkmale zum Boniturzeitpunkt.

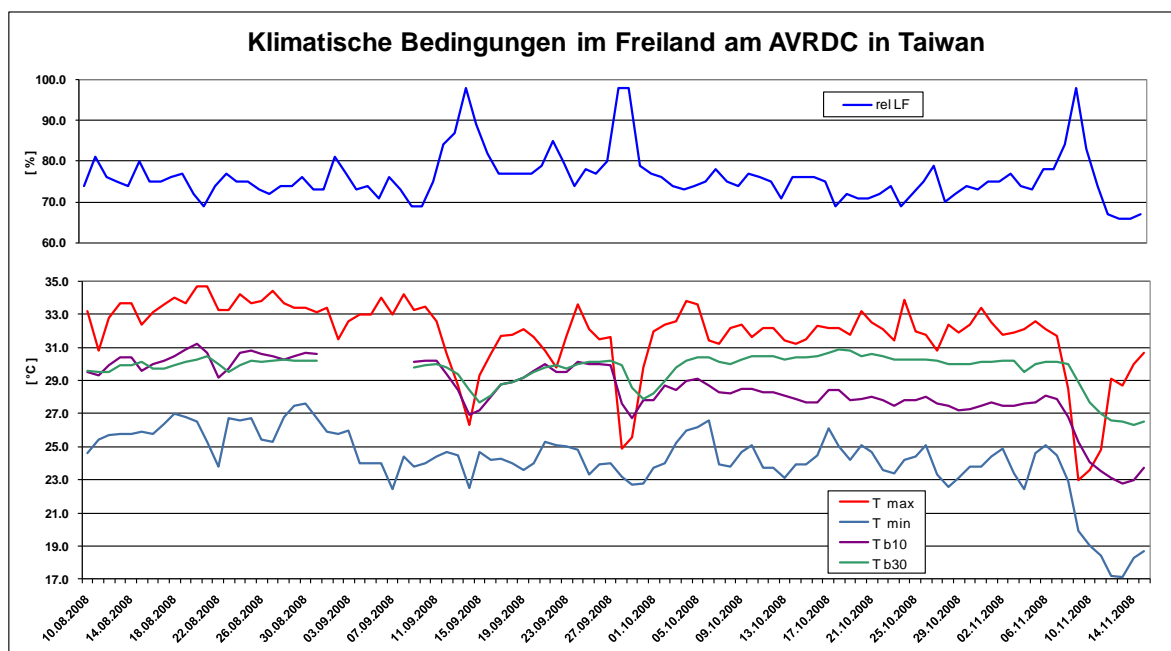


Abbildung 3.2: Klimatische Bedingungen während des Freilandexperiments am AVRDC in Taiwan. Dargestellt sind die maximale bzw. minimale Tagestemperatur gemessen in der Luft (T_{\max} , T_{\min}) sowie die mittleren Temperaturen in 10 cm (T_{b10}) und in 30 cm (T_{b30}) Tiefe im Boden. Darüber ist der Verlauf der relativen Luftfeuchtigkeit (rel LF) in Prozent im gleichen Zeitraum angegeben.

Tabelle 3.2: Korrelationsanalyse zwischen Klimafaktoren des Hitzestresses und Merkmalen des Pollens. Es wurde zwischen Einflussnahmen 10 Tage vor der Anthese (D1) sowie zum Boniturzeitpunkt (D2) unterschieden. Merkmale: Pollenausbeute (Poll_G), Anzahl lebensfähiger (Poll_k) und nicht lebensfähiger Pollenkörner (Poll_{nk}). r= Korrelationskoeffizient nach Pearson, p= p-Wert der Analyse, T_{max}=maximale Tagestemperatur, T_{min}= minimale Tagestemperatur, rel LF= relative Luftfeuchtigkeit [%], T_{b10}= mittlere Temperatur in 10 cm Tiefe im Boden, T_{b30}= mittlere Temperatur in 30 cm Tiefe im Boden, df= Freiheitsgrad. Rot markierte Korrelationskoeffizienten zeigen eine signifikant positive Korrelation bei einem Signifikanzniveau von α= 0,05, blau markierte eine signifikant negative Korrelation.

Vergleich	Analyse aller Genotypen					hitzesensitive Genotypen					hitzetolerante Genotypen					
	df	D1		D2		df	D1		D2		df	D1		D2		
		r	p	r	p		r	p	r	p		r	p			
T_{max}	Poll_G	666	0.03	4.74e ⁻⁰¹	0.09	1.43e ⁻⁰²	114	-0.09	3.54e ⁻⁰¹	-0.02	8.37e ⁻⁰¹	145	0.12	1.38e ⁻⁰¹	0.04	6.41e ⁻⁰¹
	Poll_k	666	0.01	7.67e ⁻⁰¹	0.06	1.01e ⁻⁰¹	114	-0.10	3.09e ⁻⁰¹	-0.04	6.40e ⁻⁰¹	145	0.12	1.33e ⁻⁰¹	0.04	5.94e ⁻⁰¹
	Poll_{nk}	666	0.04	3.10e ⁻⁰¹	0.11	3.74e ⁻⁰³	114	-0.05	6.00e ⁻⁰¹	0.04	7.01e ⁻⁰¹	145	0.06	4.60e ⁻⁰¹	0.03	7.39e ⁻⁰¹
T_{min}	Poll_G	666	-0.08	3.78e ⁻⁰²	-0.25	2.63e ⁻¹¹	114	-0.19	3.75e ⁻⁰²	-0.20	2.98e ⁻⁰²	145	-0.05	5.82e ⁻⁰¹	-0.32	6.55e ⁻⁰⁵
	Poll_k	666	-0.09	1.78e ⁻⁰²	-0.25	5.96e ⁻¹¹	114	-0.17	7.67e ⁻⁰²	-0.21	2.43e ⁻⁰²	145	-0.04	6.45e ⁻⁰¹	-0.32	6.75e ⁻⁰⁵
	Poll_{nk}	666	-0.04	2.85e ⁻⁰¹	-0.18	1.95e ⁻⁰⁶	114	-0.21	2.56e ⁻⁰²	-0.14	1.33e ⁻⁰¹	145	-0.07	4.02e ⁻⁰¹	-0.22	7.70e ⁻⁰³
rel LF	Poll_G	666	-0.14	1.72e ⁻⁰⁴	-0.34	2.20e ⁻¹⁶	114	-0.06	5.04e ⁻⁰¹	-0.21	2.46e ⁻⁰²	145	-0.24	2.80e ⁻⁰³	-0.38	2.46e ⁻⁰⁶
	Poll_k	666	-0.13	4.77e ⁻⁰⁴	-0.32	2.20e ⁻¹⁶	114	-0.06	5.54e ⁻⁰¹	-0.18	4.80e ⁻⁰²	145	-0.26	1.55e ⁻⁰³	-0.40	5.15e ⁻⁰⁷
	Poll_{nk}	666	-0.11	3.77e ⁻⁰³	-0.27	1.92e ⁻¹²	114	-0.06	5.02e ⁻⁰¹	-0.21	2.29e ⁻⁰²	145	-0.11	1.76e ⁻⁰¹	-0.20	1.65e ⁻⁰²
T_{b10}	Poll_G	480	-0.20	2.71e ⁻⁰⁶	-0.33	2.47e ⁻¹³	87	-0.30	3.19e ⁻⁰³	-0.32	2.35e ⁻⁰³	104	-0.17	5.67e ⁻⁰²	-0.42	7.38e ⁻⁰⁶
	Poll_k	480	-0.21	5.34e ⁻⁰⁷	-0.33	1.24e ⁻¹³	87	-0.28	7.61e ⁻⁰³	-0.29	5.30e ⁻⁰³	104	-0.18	4.45e ⁻⁰²	-0.41	1.14e ⁻⁰⁵
	Poll_{nk}	480	-0.12	6.47e ⁻⁰³	-0.21	3.30e ⁻⁰⁶	87	-0.31	2.86e ⁻⁰³	-0.30	4.56e ⁻⁰³	104	-0.09	3.12e ⁻⁰¹	-0.26	6.81e ⁻⁰³
T_{b30}	Poll_G	480	0.36	2.20e ⁻¹⁶	0.37	2.20e ⁻¹⁶	87	0.30	3.21e ⁻⁰³	0.27	1.20e ⁻⁰²	104	0.45	3.01e ⁻⁰⁷	0.44	2.28e ⁻⁰⁶
	Poll_k	480	0.35	2.20e ⁻¹⁶	0.35	2.22e ⁻¹⁵	87	0.25	1.44e ⁻⁰²	0.26	1.56e ⁻⁰²	104	0.47	4.99e ⁻⁰⁸	0.46	5.87e ⁻⁰⁷
	Poll_{nk}	480	0.25	2.16e ⁻⁰⁹	0.27	2.64e ⁻⁰⁹	87	0.36	4.53e ⁻⁰⁴	0.22	3.47e ⁻⁰²	104	0.22	1.45e ⁻⁰²	0.20	4.10e ⁻⁰²

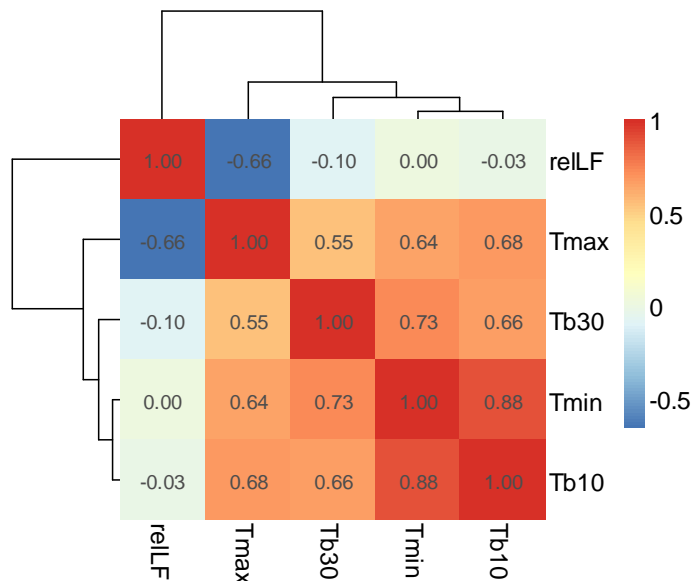


Abbildung 3.3: Analyse der Korrelationen zwischen Klimafaktoren des Hitzestresses. Untersucht wurden die minimale (Tmin) und maximale (Tmax) Tagestemperatur sowie die relative Luftfeuchtigkeit (relLF) und die Bodentemperatur in 10 cm (Tb10) bzw. 30 cm Tiefe (Tb30). Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Alle Korrelationen bis auf die zwischen relLF und Tmin, relLF und Tb10 bzw. relLF und Tb30 sind signifikant bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

3.2 Statistische Analyse der Zusammenhänge zwischen phänotypischen Merkmalen

3.2.1 Zusammenhänge unter kontrollierten Bedingungen

Eine Aufklärung der Zusammenhänge zwischen wichtigen Zuchtmerkmalen erfolgte zunächst unter kontrollierten Bedingungen (siehe Kapitel 2.4.1.3). Untersucht wurden die Merkmale Pollenausbeute ($Poll_G$), Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ($Poll_k$), Fruchthöhe (F_H), Fruchtbreite (F_B), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), Stigma-Ausstülpung (SE), Blühbeginn (BI) sowie Anzahl an Früchten pro Pflanze (NF) und prozentualer Anteil an vermarktungsfähigen Früchten (N_{FM}) unter Hitzestress- und optimalen Temperaturbedingungen.

Unter Hitzestressbedingungen konnte eine stark positive Korrelation zwischen der Pollenausbeute und den Merkmalen Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ($r = 0,81$) sowie Anzahl an Früchten ($r = 0,81$) beobachtet werden (Tabelle 3.3). Unter Normalbedingungen wurde eine Korrelation dieses Merkmals zur Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ($r = 0,8$) nachgewiesen.

Für das Merkmal Anzahl an Früchten konnte eine signifikante Korrelation zur Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern ($r = 0,93$) unter Hitzestress identifiziert werden. Ebenfalls signifikant in diesem Temperaturregime war der Zusammenhang zwischen diesem Fruchtmerkmal und dem Blühbeginn ($r = -0,62$). Beide Korrelationen traten unter Optimalbedingungen nicht auf.

Die Fruchthöhe korrelierte unter Hitzestressbedingungen mit der Fruchtbreite ($r= 0,94$), dem Blühbeginn ($r= 0,71$) und dem Anteil an vermarktungsfähigen Früchten ($r= -0,7$). Die Korrelation zur Fruchtbreite konnte auch unter ungestressten Bedingungen bestätigt werden ($r= 0,91$).

Stark negative Zusammenhänge wurden zwischen den Merkmalen Samenindex und Parthenokarpie in beiden Temperaturregimen detektiert. Unter Hitzestress war ein Korrelationskoeffizient von $-0,84$, unter Kontrollbedingungen von $-0,76$ zu beobachten.

Das Merkmal Samenindex korrelierte ebenfalls negativ mit dem prozentualen Anteil an vermarktungsfähigen Früchten ($r= -0,88$) unter Hitzestress. Bei optimalen Temperaturbedingungen trat dieser Zusammenhang nicht auf.

Durchschnittlich konnten höhere Korrelationskoeffizienten unter Hitzestressbedingungen ermittelt werden. Die Gruppierung der Merkmale basierend auf den Ergebnissen der Korrelationsanalyse, visualisiert durch das Dendrogramm in Abbildung 3.4, stimmt in beiden Temperaturregimen überwiegend überein. Die Merkmale Fruchthöhe und Fruchtbreite wurden in verschiedene Gruppen je nach Temperaturbedingung eingeordnet. Die stark negativ korrelierten Merkmale Samenindex und Parthenokarpie gruppieren sowohl unter Hitzestress- als auch unter Optimalbedingungen getrennt voneinander.

Tabelle 3.3: Merkmalskorrelationen unter kontrollierten Bedingungen. Die Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman (Fruchtboden, Stigma-Ausstülpung, Blühbeginn) bzw. Pearson (übrige Merkmale) unter Hitzestressbedingungen (oberhalb der blauen Diagonale, grau hinterlegt) und Normalbedingungen (unterhalb der blauen Diagonale) berechnet. Merkmale: Pollenausbeute ($Poll_G$), Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ($Poll_k$), Fruchthöhe (F_H), Fruchtbreite (F_B), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), Stigma-Ausstülpung (SE), Blühbeginn (Bl), Anzahl an Früchten pro Pflanze (NF) und prozentualer Anteil vermarktungsfähiger Früchte (N_{FM}). *= signifikante Korrelation bei einem Signifikanzniveau von $\alpha= 0,05$, rot markierte Korrelationskoeffizienten stellen signifikant positive Korrelationen, blau markierte signifikant negative Korrelationen dar. Für das Merkmal Fruchtboden war keine Variation zu beobachten, weshalb es von der Korrelationsanalyse ausgeschlossen wurde.

	$Poll_G$	$Poll_k$	F_H	F_B	P	S	SE	Bl	NF	N_{FM}
$Poll_G$	1	0,81*	0,37	0,42	-0,33	0,52	-0,16	-0,43	0,81*	0,38
$Poll_k$	0,8*	1	0	0,01	-0,22	0,55	-0,47	-0,54	0,93*	0,29
F_H	0,35	0,25	1	0,94*	-0,48	0,21	0,66	0,71*	0,1	-0,7*
F_B	0,46	0,34	0,91*	1	-0,36	0,14	0,66	0,6	0,13	-0,59
P	0,01	-0,25	0,15	-0,01	1	-0,84*	0,45	0,13	-0,15	-0,05
S	0,28	0,48	$-8e^{-5}$	0,27	-0,76*	1	-0,13	-0,5	0,45	0,16
SE	-0,39	-0,4	0,65	0,4	0,4	-0,66	1	0,67	-0,45	-0,88*
Bl	-0,1	0,13	0,15	0,1	0,38	-0,44	0,79	1	-0,62*	-0,35
NF	0,43	0,34	0,16	0,28	-0,33	0,29	0,09	-0,35	1	0,27
N_{FM}	-0,03	0,04	-0,18	0,12	-0,15	0,43	-0,21	-0,24	-0,08	1

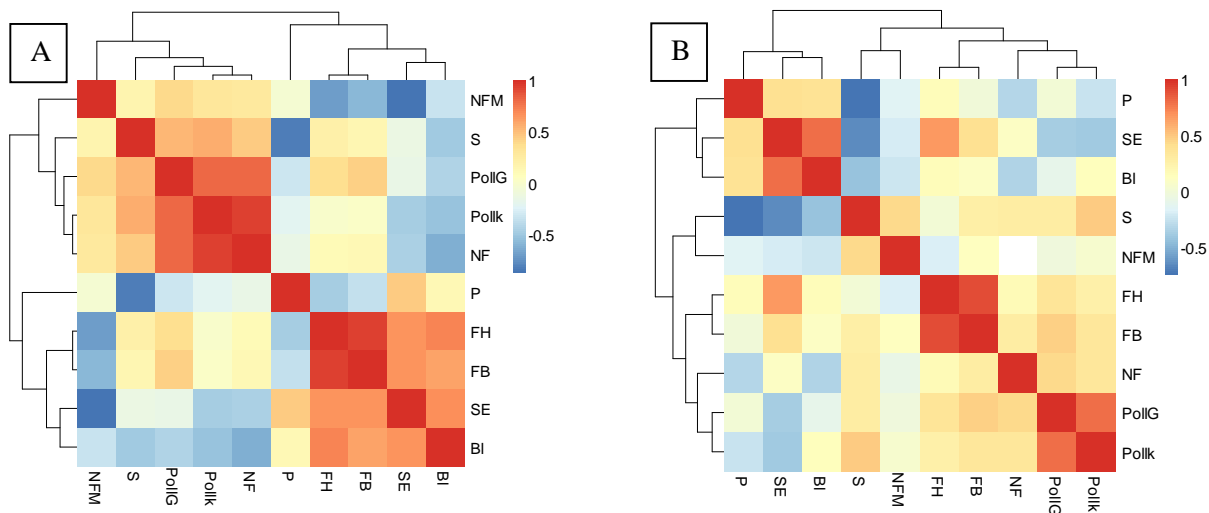


Abbildung 3.4: Vergleich der Korrelationsergebnisse unter Hitzestress (A) und Kontrollbedingungen (B). Farblich dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten, das Dendrogramm zeigt die Gruppierung der untersuchten Merkmale basierend auf ihren Koeffizienten. Merkmale: Pollenausbeute (Poll_G) und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner (Poll_k), Fruchthöhe (F_H), Fruchtbreite (F_B), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), Stigma-Ausstülpung (SE), Blühbeginn (BI), Anzahl an Früchten pro Pflanze (NF) und prozentualer Anteil vermarktungsfähiger Früchte (N_{FM}).

3.2.2 Zusammenhänge unter Freilandbedingungen

Nachdem signifikante Korrelationen zwischen ausgewählten Merkmalen unter kontrollierten Hitzestressbedingungen nachgewiesen werden konnten, sollten einige dieser Ergebnisse unter Freilandbedingungen bestätigt werden. Hierbei wurden die Merkmale Pollenausbeute (Poll_G), Anzahl lebensfähiger Pollenkörner (Poll_k), Fruchthöhe (F_H), Fruchtbreite (F_B), Fruchtboden (F_{Boden}), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), und Stigma-Ausstülpung (SE) unter Freilandbedingungen analysiert (siehe Kapitel 2.4.1.2).

Zwischen den Merkmalen Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner konnten starke, signifikant positive Korrelationen nachgewiesen werden (Tabelle 3.4). Ebenfalls stark positive Korrelationen traten zwischen den Merkmalen Pollenausbeute bzw. Anzahl lebensfähiger Pollenkörner und dem Merkmal Samenindex auf, während zwischen den Merkmalen Parthenokarpie und Samenindex, wie auch unter kontrollierten Hitzestressbedingungen beschrieben, ein stark negativer Zusammenhang beobachten wurde. Eine stark negative, allerdings nicht signifikante Korrelation zeigte sich zwischen den Merkmalen Pollenausbeute bzw. Anzahl lebensfähiger Pollenkörner und der Parthenokarpie. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unter kontrollierten Stressbedingungen konnte keine signifikante Beziehung zwischen den Merkmalen Fruchtboden und Fruchthöhe nachgewiesen werden.

Eine Gruppierung der Merkmale basierend auf den berechneten Korrelationskoeffizienten erbrachte

eine Einteilung in zwei Hauptgruppen bestehend aus der Fruchthöhe, Fruchtbreite und der Parthenokarpie bzw. den pollenbezogenen Merkmalen, dem Samenindex, der Stigma-Ausstülpung und dem Fruchtboden (Abbildung 3.5). Eine Analyse der Erbllichkeit der untersuchten Merkmale wies hohe Heritabilitäten zwischen 0,63 und 8,0 für alle Merkmale nach (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.4: Merkmalskorrelationen unter Freilandbedingungen. Es wurden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman (Fruchtboden) bzw. Pearson (übrige Merkmale) berechnet. Merkmale: Pollenausbeute ($Poll_G$), Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ($Poll_k$), Fruchthöhe (F_H), Fruchtbreite (F_B), Fruchtboden (F_{Boden}), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), Stigma-Ausstülpung (SE). *= signifikante Korrelation bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, rot markierte Korrelationskoeffizienten entsprechend einer signifikant positiven Korrelation, blau markierte einer signifikant negativen Korrelation.

	$Poll_G$	$Poll_k$	F_H	F_B	F_{Boden}	P	S	SE
$Poll_G$	1	0,81*	0,1	-0,17	0,38	-0,57	0,69*	0,41
$Poll_k$	0,81*	1	-0,12	-0,61*	0,45	-0,42	0,64*	0,58*
F_H	0,1	-0,12	1	0,48	0,01	-0,11	0,06	-0,58*
F_B	-0,17	-0,61*	0,48	1	-0,23	0,05	-0,06	-0,43
F_{Boden}	0,38	0,45	0,01	-0,23	1	-0,68*	0,61*	0,21
P	-0,57	-0,42	-0,11	0,05	-0,68*	1	-0,87*	-0,17
S	0,69*	0,64*	0,06	-0,06	0,61*	-0,87*	1	0,5
SE	0,41	0,58*	-0,58*	-0,43	0,21	-0,17	0,5	1

Tabelle 3.5: Varianzanalyse für züchterisch wertvolle Merkmale. Dargestellt sind Varianzkomponenten (δ) und Heritabilitäten im weiten Sinne (H^2) unter Berücksichtigung der Faktoren Genotyp (G) und Wiederholung im Versuch (R) bei $\alpha = 0,05$. δ_F : Fehler des Modells. Die Daten der Merkmale Pollenausbeute ($Poll_G$) und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ($Poll_k$) wurden wurzeltransformiert. F_H = Fruchthöhe, F_B = Fruchtbreite, P= Parthenokarpie, S= Samenindex, SE= Stigma-Ausstülpung. n.s.= kein signifikanter Einfluss des Faktors nachgewiesen.

Varianz- komponenten	$Poll_G$	$Poll_k$	F_H	F_B	P	S	SE
δ_G	2071,3	1664,42	42,777	2,524*e ⁻¹	0,786	0,542	0,077
δ_R	2320,2	1545,7	n.s.	8,441e ⁻¹⁰	0,298	0,021	n.s.
δ_F	4983,7	3130,77	43,9176	3,2905e ⁻¹	0,9356	0,877	0,093
H^2	0,63	0,68	0,8	0,75	0,77	0,71	0,77

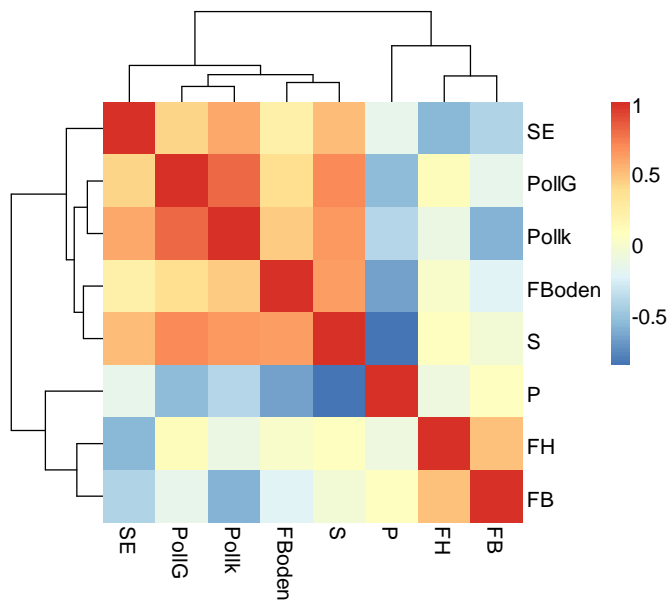


Abbildung 3.5: Korrelationszusammenhänge der untersuchten Merkmale im Feldversuch am AVRDC in Taiwan. Farblich dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten. Die Einordnung in Gruppen mit starker Zusammengehörigkeit verdeutlicht das Dendrogramm. Merkmale: Pollenausbeute ($Poll_G$), Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ($Poll_k$), Fruchthöhe (F_H), Fruchtbreite (F_B), Fruchtboden (F_{Boden}), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), Stigma-Ausstülpung (SE), Blühbeginn (Bl), Anzahl an Früchten pro Pflanze (NF) und prozentualer Anteil an vermarktungsfähigen Früchten (N_{FM}).

3.3 Phänotypische Charakterisierungen zur Bestimmung der Hitzetoleranztypen

3.3.1 Phänotypische Charakterisierung unter kontrollierten Bedingungen

Die phänotypische Charakterisierung des Untersuchungsmaterials in Bezug auf dessen Hitzetoleranz bzw. -sensitivität unter kontrollierten Bedingungen fand im Rahmen eines Gewächshausexperiments in Hannover statt (siehe Kapitel 2.4.1.3). Es wurden die Merkmale Pollenausbeute ($Poll_G$), Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ($Poll_k$), Fruchthöhe (F_H), Fruchtbreite (F_B), Fruchtboden (F_{Boden}), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), Stigma-Ausstülpung (SE), Blühbeginn KW 2008 (Bl), Anzahl an Früchten pro Pflanze (NF) sowie der prozentuale Anteil an vermarktungsfähigen Früchten (N_{FM}) je Genotyp erhoben.

Tabelle 3.6 zeigt die mit Hilfe eines linearen Modells berechneten adjustierten Mittelwerte im Vergleich zwischen der gestressten und der ungestressten Variante. Ebenfalls angegeben sind die Ergebnisse der multiplen Mittelwertvergleiche nach Tukey. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen hitzetoleranten Genotypen wie z.B. CLN1621L oder CL5915-92D4-1-0-3 und hitzesensitiven Genotypen wie CA4, G2 und FLA456-4 in Bezug auf die untersuchten Merkmale nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den Behandlungen innerhalb eines Genotyps traten für das Merkmal Pollenausbeute nur bei den Genotypen CA4 und CL5915-93D4-1-0-3 auf. Ähnliche

Ergebnisse konnten für das Merkmal Anzahl lebensfähiger Pollenkörner erarbeitet werden, wobei zusätzlich signifikante Unterschiede für die Genotypen CLN2498E, FM TT260 und Pannovy nachgewiesen wurden. Vor allem in Bezug auf die Merkmale Fruchthöhe, Fruchtbreite, Parthenokarpie und Samenindex wiesen sowohl hitzetolerante als auch hitzesensitive Genotypen Unterschiede zwischen den Temperaturregimen auf, während die Ausprägung des Merkmals Fruchtboden überwiegend unbeeinflusst vom Hitzestress blieb. Auch die Anzahl an Früchten sowie der Anteil an vermarktungsfähigen Früchten war stark abhängig von der Umgebungstemperatur. Ein Vergleich zwischen dem Merkmal Pollenausbeute bzw. Anzahl lebensfähiger Pollenkörner im Untersuchungsmaterial unter Hitzestress und Normalbedingungen wies klar den reduzierenden Einfluss der erhöhten Temperatur in Bezug auf diese Merkmale nach (Abbildung 3.6). Dabei wurden hitzetolerante Linien, wie beispielsweise CLN1621L, nur gering durch den Hitzestress beeinflusst. Innerhalb der Gruppe der hitzetoleranten Linien war ebenfalls eine Variation zu beobachten, welche die überragende Toleranz der Linie CLN1621L im Vergleich zur stark hitzetoleranten Linie CL5915-93D4-1-0-3 verdeutlichte.

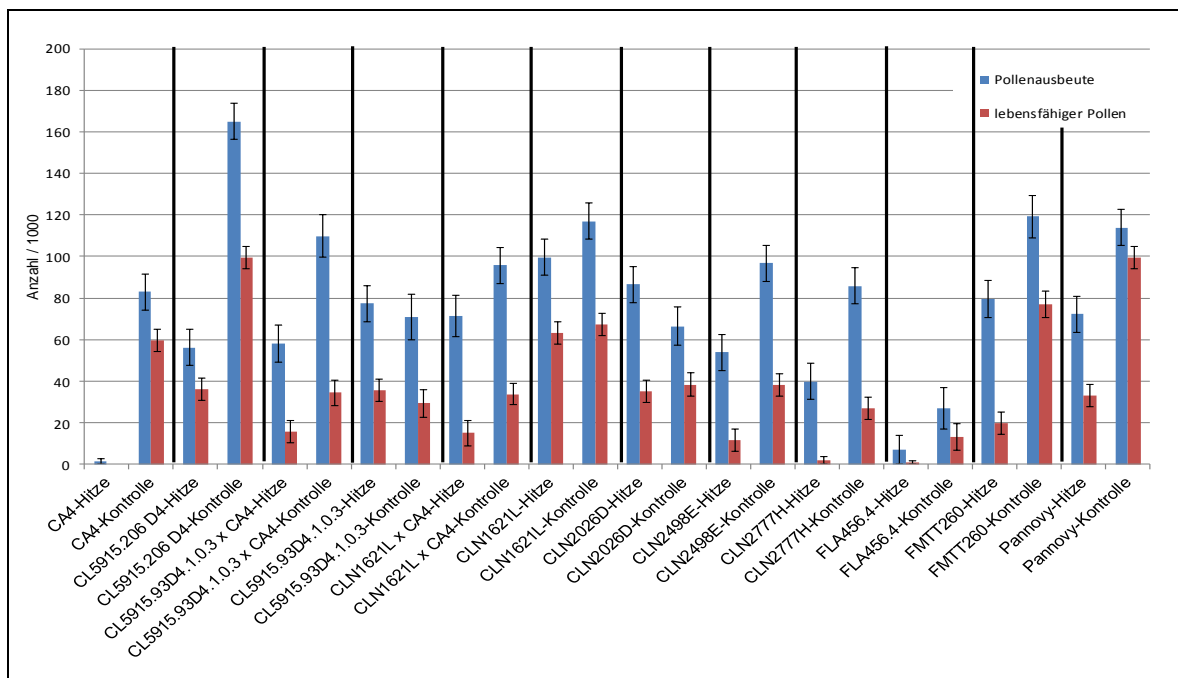


Abbildung 3.6: Beeinflussung des Pollens durch Hitzestress. Verglichen wurden die Merkmale Pollenausbeute [Anzahl/1000] und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner [Anzahl/1000] unter Hitzestress- (Hitze) und Optimalbedingungen (Kontrolle) in einem kontrollierten Gewächshausexperiment. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

Tabelle 3.6: Einstufung der Hitzetoleranz unter kontrollierten Bedingungen. Dargestellt sind die mit Hilfe eines gemischten linearen Modells berechneten adjustierten Mittelwerte für die Merkmale Pollenausbeute [Anzahl/1000] (Poll_G), lebensfähiger Pollen [Anzahl/1000] (Poll_k), Fruchthöhe (F_H) und Fruchtbreite (F_B), Fruchtboden (F_{Boden}), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), Stigma-Ausstülpung (SE), Blühbeginn KW 2008 (BI), Anzahl an Früchten (NF) sowie dem prozentualen Anteil an vermarktungsfähigen Früchten (N_{FM}). NA= kein Messwert verfügbar. Grau hinterlegte Felder zeigen einen signifikanten Unterschied ($\alpha=0,05$, Welch-Test) zwischen den Behandlungen (BE) innerhalb eines Genotyps auf. Buchstaben hinter den Mittelwerten geben signifikante Unterschiede zu einem Signifikanzniveau von $\alpha= 0,05$ zwischen den Genotypen je Behandlung nach TUKEY wieder (gleiche Buchstaben innerhalb eines Merkmals weisen auf keinen signifikanten Unterschied zwischen den betrachteten Genotypen je Behandlung hin). ++ beim Merkmal Blühbeginn bedeutet KW 01 bzw. 02 im Jahr 2009

Genotyp	BE	Poll _G	Poll _k	F _H	F _B	F _{Boden}	P	S	SE	BI	NF	N _{FM}							
CA4	Stress	1,4	a	0	ad	NA	ad	NA	-	NA	-	3	-	NA	-	0	51	0	0
	Kontrolle	83	ab	59,8	abc	30,8	abc	30,8	abcfgh	3	f	4	abcde	1,0	abef	0	51	4	100
CL5915.206.D4	Stress	56,2	a	36,3	abd	36,3	abd	36,3	abcd	2	abc	2	a	0,9	a	0,5	50	40	57,5
	Kontrolle	165	b	99,6	c	42,4	c	42,4	e	1	d	4	bc	3,2	bcd	0	50	52	98,08
CL5915-93D4-1-0-3 xCA4	Stress	58,1	a	15,5	abd	31,8	abd	31,8	abfg	2	abce	2	ad	1,0	ae	0,5	49	19	73,68
	Kontrolle	109,9	ab	34,6	abd	34,1	abd	34,1	abcf	2	bc	2	bc	2,0	ae	0,5	50	51	100
CL5915-93D4-1-0-3	Stress	77,3	ab	35,5	abd	32,5	abd	32,5	afg	2	ade	3	bde	2,3	bef	1	50	34	97,06
	Kontrolle	71,0	ab	29,4	abd	22,5	abd	22,5	h	1	de	3	ade	1,9	ae	0,5	50	29	96,55
CLN1621LxCA4	Stress	71,4	ab	15,0	abd	35,2	abd	35,2	abcdf	2	bcf	2	abde	1,8	abef	1	50	14	92,86
	Kontrolle	95,7	ab	33,9	abd	37,1	abd	37,1	abcdi	2	abc	2	bcefg	2,6	bdef	0	50	13	100
CLN1621L	Stress	99,6	ab	63,4	abc	32,5	abc	32,5	afg	2	bc	1	bc	3,9	cg	1	49	41	95,12
	Kontrolle	117	ab	67,3	abc	28,2	abc	28,2	g	2	abc	4	cfg	4,1	cg	1	49	21	100
CLN2026D	Stress	86,5	ab	35,1	abd	35,9	abd	35,9	abcdf	2	abde	3	ad	1,0	a	0,5	50	34	61,76
	Kontrolle	66,5	a	38,4	abd	42,3	abd	42,3	ei	1	de	1	bde	2,1	abef	0	50	29	68,97
CLN2498E	Stress	53,8	a	11,5	ad	46,0	ad	46,0	e	2	abcde	2	bcefg	3,0	bcdefg	0,5	50	13	46,15
	Kontrolle	96,7	ab	38,4	abd	34,7	abd	34,7	abcdfgi	2	abcde	3	bcdefg	1,0	ae	0,5	50	38	18,42
CLN2777H	Stress	40,0	a	1,8	d	36,2	d	36,2	abcdefgi	2	abcde	3	abcdef	0,8	ae	1	51	5	100
	Kontrolle	85,9	ab	26,8	abd	43,7	abd	43,7	e	2	abcde	4	bde	1,8	ae	0,5	50	17	100
FLA456.4	Stress	6,9	a	1,0	ad	23,0	ad	23,0	abcdfgh	2	abcdef	0	abcdefg	1,0	abcdefg	0,5	2 ++	1	100
	Kontrolle	27,1	a	13,2	abd	30,9	abd	30,9	fg	1	ade	3	fg	3,2	bcdfg	0	1 ++	26	100
FMTT260	Stress	79,6	ab	20	abd	41,3	abd	41,3	dei	2	cf	2	abde	1,9	aef	0	51	23	60,87
	Kontrolle	119,2	ab	77	bc	39,2	bc	39,2	cdei	2	abcf	2	bcde	2,5	abdef	0,5	51	20	55
Pannovy	Stress	72,3	ab	33	abd	33,6	abd	33,6	abcf	2	abc	0	bc	3,7	cdg	1	49	39	100
	Kontrolle	113,9	ab	99,4	c	36,6	c	36,6	bcd	2	abe	3	g	4,1	g	0,5	50	48	100

3.3.2 Phänotypische Charakterisierung unter Freilandbedingungen

Zur Verifizierung der Hitzetoleranzeinstufungen unter kontrollierten Bedingungen (siehe Kapitel 3.3.1) wurden Experimente unter Freilandbedingungen am AVRDC (Taiwan) durchgeführt (siehe 2.4.1.2). Dabei wurden die Merkmale Pollenausbeute ($Poll_G$), Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ($Poll_k$), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), Stigma-Ausstülpung (SE), Fruchthöhe (F_H), Fruchtbreite (F_B) und Fruchtboden (F_{Boden}) untersucht.

Im Rahmen der Analysen konnten signifikante Unterschiede zwischen den hitzetoleranten und den hitzesensitiven Genotypen beobachtet werden (Tabelle 3.7). Unter Verwendung der Merkmale Pollenausbeute bzw. Anzahl lebensfähiger Pollenkörner war eine klare Unterscheidung zwischen hitzetoleranten, moderat toleranten und hitzesensitiven Genotypen möglich (Abbildung 3.7). Eine Kreuzung zwischen einem hitzetoleranten und einem hitzesensitiven Elter führt unter Hitzestress zu einer geringeren Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern bzw. einer verringerten Pollenausbeute als beim toleranten Elter, im Vergleich zum sensitiven Elter weisen die Pflanzen eine höhere Pollenmenge und Lebensfähigkeit des Pollens auf. Eine Ausnahme stellt die Kreuzung zweier sensitiver Genotypen (CA4 und FLA456-4) dar, welche eine verbesserte Hitzetoleranz in Bezug auf beide Merkmale im Vergleich zu den Eltern aufweist. Eine Einstufung der untersuchten Genotypen in Toleranzgruppen bestätigt die unter kontrollierten Bedingungen gewonnenen Erkenntnisse (siehe 3.3.1). Die Linie CLN1621L zeichnet sich als Vertreter der hitzetoleranten Gruppe auch im Freilandversuch mit einer überragenden Hitzetoleranz aus. Diese überzeugt im Vergleich zu anderen hitzetoleranten Genotypen vor allem in den Merkmalen Pollenausbeute, Anzahl lebensfähiger Pollenkörner, Parthenokarpie und Samenindex.

Tabelle 3.7: Einstufung der Hitzetoleranz verschiedener Genotypen unter Freilandbedingungen. Dargestellt sind die mit Hilfe eines gemischten linearen Modells berechneten adjustierten Mittelwerte für die Merkmale Pollenausbeute [Anzahl/1000] ($Poll_G$), lebensfähiger Pollen [Anzahl/1000] ($Poll_k$), Parthenokarpie (P), Samenindex (S), Stigma-Ausstülpung (SE), Fruchthöhe (F_H), Fruchtbreite (F_B) sowie der Form des Fruchtbodens (F_{Boden}). NA= kein Messwert verfügbar. Buchstaben hinter den Mittelwerten geben signifikante Unterschiede ($\alpha= 0,05$) zwischen den Genotypen nach TUKEY wieder (gleiche Buchstaben innerhalb eines Merkmals weisen auf einen nicht signifikanten Unterschied zwischen den betrachteten Genotypen hin).

Genotyp	$Poll_G$		$Poll_k$		P		S		SE		F_H		F_B		F_{Boden}	
CA4	2,19	e	0,65	g	NA	-	NA	-	0,11	cd	NA	-	NA	-	NA	-
CL5915-93D4-1-0-3	31,17	ab	25,14	ab	0,45	a	3,53	bc	0,87	a	42,53	bcd	38,73	b	1,9	ab
CL5915-93D4-1-0-3xCA4	35,74	ab	12,02	acd	0,75	ab	3	abc	0,46	bc	47,35	abc	46,23	abc	1,75	ab
CLN1621L	39,77	ab	31,94	b	0,5	a	3,8	b	0,63	ab	40,70	bd	40,08	ab	1,75	ab
CLN1621L x CA4	40,59	a	15,87	abc	0,7	ab	2,65	abcd	0,09	cd	47,40	abce	47,25	abc	1	ab
CLN2026D	40,40	ab	25,72	abc	0,775	ab	2,85	abc	0,04	d	54,20	efg	43,80	abc	2	a
CLN2026D x CA4	18,75	bcd	6,61	def	1,75	abcd	2	ad	0,08	cd	51,98	aef	48,53	acd	1,75	ab
CLN2498E	27,34	bc	19,79	acd	2,525	cd	1,83	ad	0,08	cd	59,30	g	43,65	abc	1	b
CLN2498E x CA4	27,26	ab	9,41	cde	2,04	abcd	2,04	acd	0	d	55,70	fg	51,85	cd	1	b
CLN2777H	29,50	ab	17,18	acd	3,8	c	1	d	0,60	ab	36,60	d	39,93	ab	1	ab
CLN2777H x G2	27,01	ab	10,27	cde	1,87	bcd	2,74	abcd	0,37	bcd	49,79	acef	59,32	d	1	b
FLA456-4	6,82	de	2,66	fg	NA	-	NA	-	0	d	NA	-	NA	-	NA	-
FLA456-4 x CA4	27,32	ab	10,65	cde	1,13	abd	1,98	acd	0	d	48,74	acef	47,97	abc	1,75	ab
G2	8,07	cde	5,19	efg	2,5	abcd	1	acd	0	d	39	abcde	43,5	abcd	1	ab

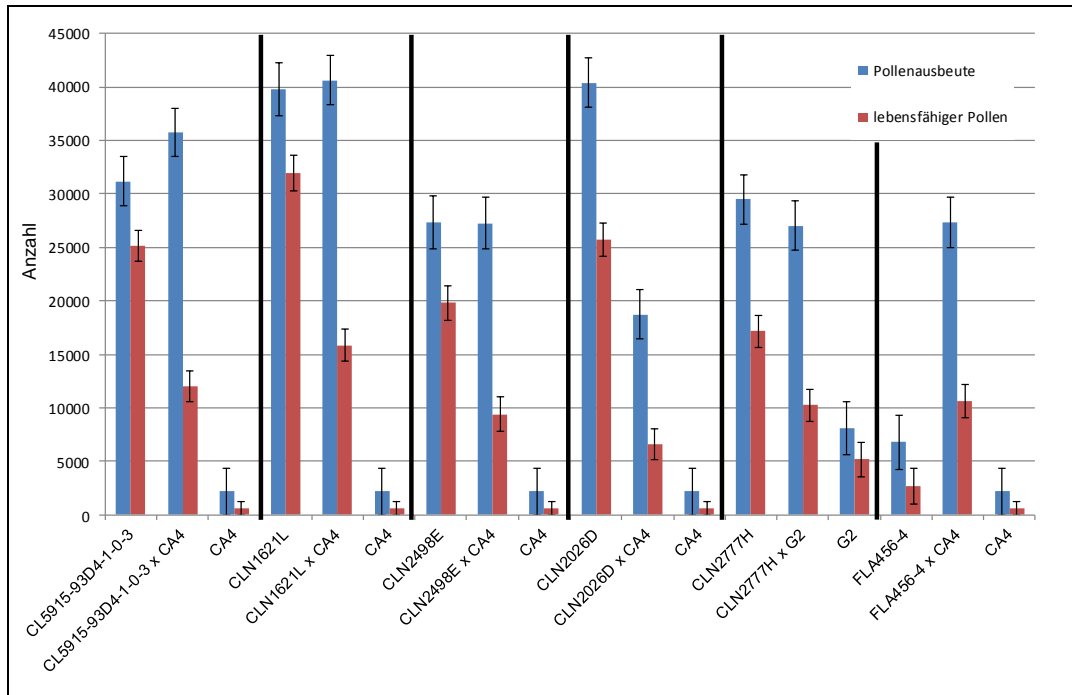


Abbildung 3.7: Analyse der Hitzetoleranz verschiedener Nachkommenschaften im Vergleich zu deren Kreuzungseltern. Untersucht wurden die Merkmale Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner.

3.4 Analyse der Hitzetoleranzmechanismen in Antheren der Tomate

Auf Grundlage der phänotypischen Charakterisierungen (siehe Kapitel 3.3) konnten die Genotypen CLN1621L und CA4 als vielversprechende Kreuzungseltern für die Analyse von Hitzetoleranzmechanismen identifiziert und eine bereits am AVRDC erstellte, auf diesen beiden Eltern basierende F4-Population aus rekombinanten Inzuchtlinien für die Expressionsstudie herangezogen werden.

3.4.1 Phänotypische Charakterisierung der F4-Population

Im Rahmen der Expressionsanalyse fand eine Evaluierung der F4-Population in Bezug auf die Merkmale Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner unter kontrollierten Hitzestressbedingungen in mehreren Gewächshauskabinen in Hannover statt (siehe 2.4.1.4). Da die untersuchten Merkmale stark von Temperaturschwankungen beeinflusst werden, wurde mit Hilfe von elektronischen Temperaturmessern ein Temperaturprofil je Gewächshauskabine erstellt (Beispiel in Abbildung 3.8). Es wurden sowohl Schwankungen als auch Temperaturmaxima beobachtet, so dass die Boniturzeitpunkte nach den Temperaturprofilen ausgerichtet werden

mussten. Die Bonituren in den Gewächshauskabinen 1, 10 und 20 wurden aus der weiterführenden Analyse ausgeschlossen, da im Versuchszeitraum keine exakte Einstellung der Temperaturen entsprechend des gewünschten Temperaturregimes erfolgen konnte.

Die adjustierten Mittelwerte der untersuchten Merkmale für die einzelnen Vertreter der vierten Filialgeneration sind in Tabelle 7.1.1 dargestellt. Es konnten Unterschiede in der Ausprägung beider Merkmale in der Nachkommenschaft detektiert werden (Abbildung 3.9). Einzelne Genotypen wiesen eine bessere bzw. schlechtere Leistungsfähigkeit als die Eltern auf. Für die hitzetoleranten Linien (CLN1621L, CL5915-93D4-1-0-3) konnten höhere Pollenmengen und Anzahlen an lebensfähigen Pollenkörnern als beim hitzesensitive Genotyp CA4 beobachtet werden. Die Leistungsfähigkeit der F1-Nachkommen wurde in Bezug auf das Merkmal lebensfähiger Pollen zwischen den Leistungswerten der beiden Eltern eingeordnet.

Zur Identifizierung besonders hitzetoleranter und hitzesensitiver F4-Genotypen fand ein Vergleich der Lebensfähigkeit des Pollens relativ zum hitzetoleranten Elter CLN1621L je Gewächshauskabine statt (Abbildungen 3.10 bis 3.12). Für 14 Genotypen konnte eine höhere Lebensfähigkeit, für 66 eine geringere Lebensfähigkeit des Pollens als für CLN1621L beobachtet werden. Die Nachkommen TH-P1-F4-046, TH-P1-F4-071 und TH-P1-F4-126 wurden als Vertreter der hitzetoleranten Gruppe zur Detektion von Kandidatengeneten für die Hitzetoleranz eingesetzt, deren Expressionsmuster sollten mit denen der hitzesensitive Gruppe, vertreten durch TH-P1-F4-033, TH-P1-F4-051 und TH-P1-F4-062, verglichen werden. Die erneute phänotypische Charakterisierung sowie deren statistische Auswertung sind in BARTKIEWICZ (2011) beschrieben. Sie konnte die Toleranztypen der ausgewählten Nachkommen bestätigen.

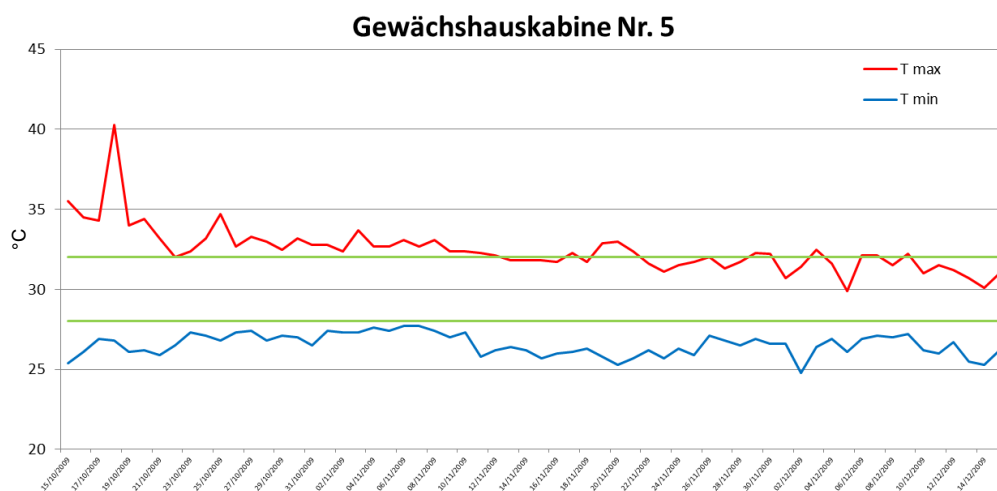


Abbildung 3.8: Temperaturprofil einer Gewächshauskabine im F4-Nachkommenschaftstest der Kreuzung zwischen CLN1621L und CA4. Dargestellt sind die maximale (T max, rot) und die minimale (T min, blau) Tagestemperatur im Verlauf des Versuches. Die grünen Geraden geben die Zieltemperaturen von 32°C Tag- und 28°C Nachttemperatur an.

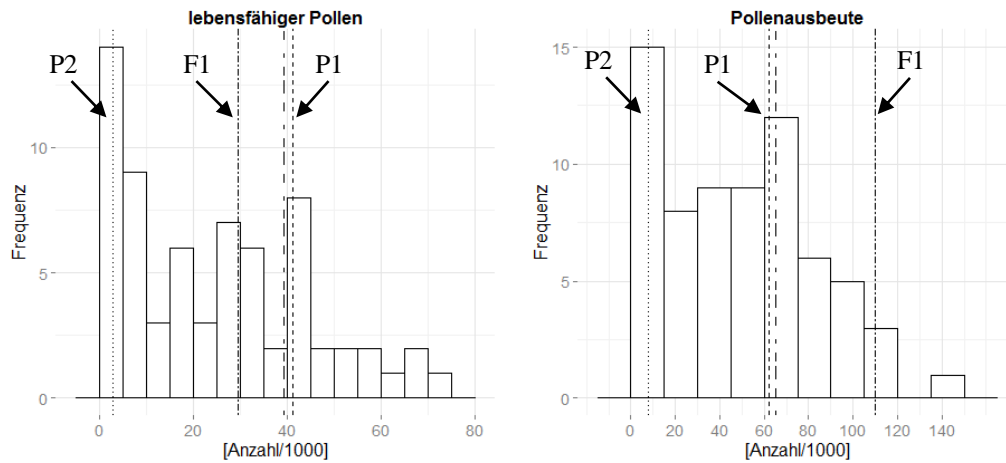


Abbildung 3.9: Merkmalsverteilung für die Merkmale Anzahl lebensfähiger Pollenkörner und Pollenausbeute. In jeder Grafik markiert sind jeweils der hitzetolerante (P1, gestrichelte Linie) bzw. sensitive (P2, gepunktete Linie) Elter der Nachkommenschaft sowie die F1 (gepunktete und gestrichelte Linie) und der tolerante Genotyp CL5915-93D4-1-0-3 (unterbrochen gestrichelte Linie).

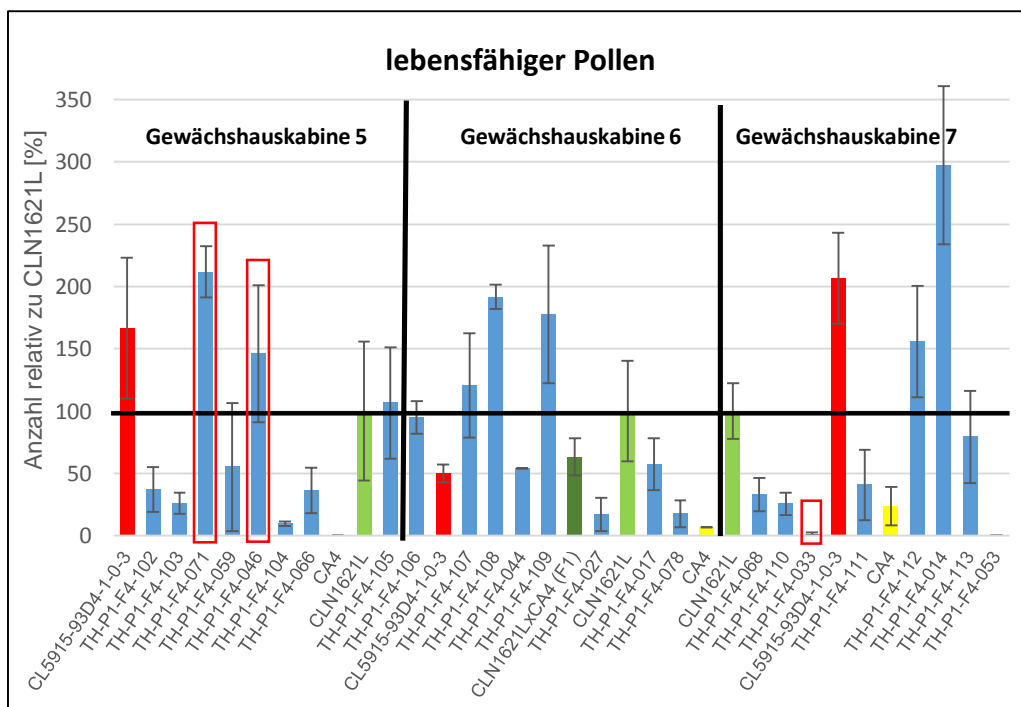


Abbildung 3.10: Identifizierung extremer Hitzetoleranztypen I. Vergleich der Anzahl an lebensfähigem Pollen je Genotyp der F4-Nachkommenschaft bzw. der zu untersuchenden Linie relativ zum hitzetoleranten Elter CLN1621L in der jeweiligen Gewächshauskabine (Kabine 5, 6, 7). Rot eingrahmt: Genotypen, welche im Rahmen der Expressionsanalyse untersucht wurden.

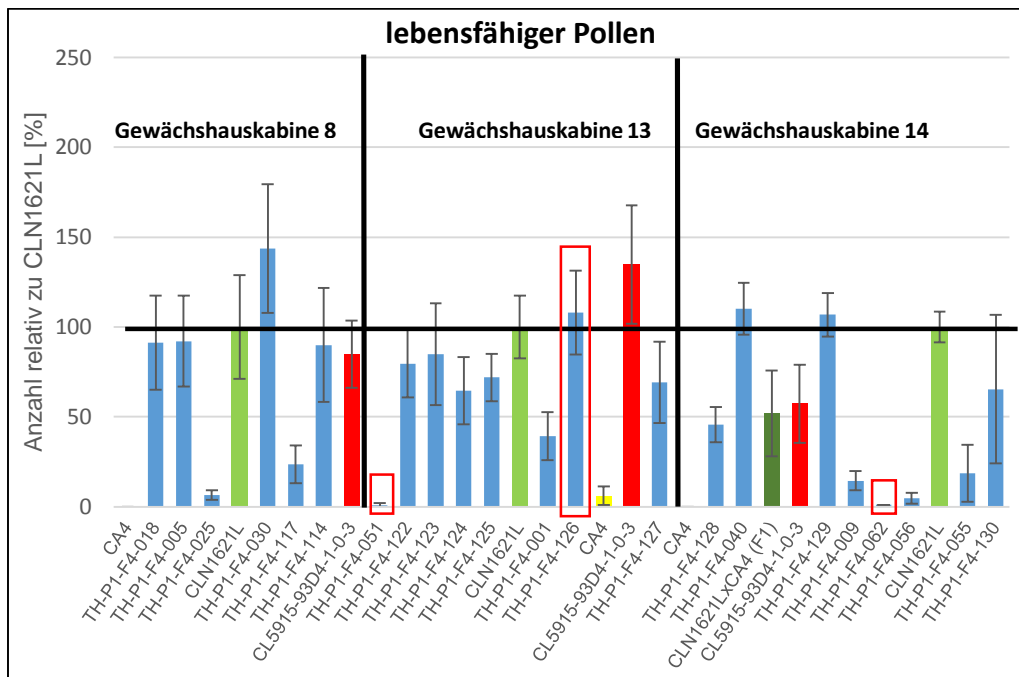


Abbildung 3.11: Identifizierung extremer Hitzetoleranztypen II. Vergleich der Anzahl an lebensfähigem Pollen je Genotyp der F4-Nachkommenschaft bzw. der zu untersuchenden Linie relativ zum hitzetoleranten Elter CLN1621L in der jeweiligen Gewächshauskabine (Kabine 8, 13, 14). Rot eingerahmt: Genotypen, welche im Rahmen der Expressionsanalyse untersucht wurden.

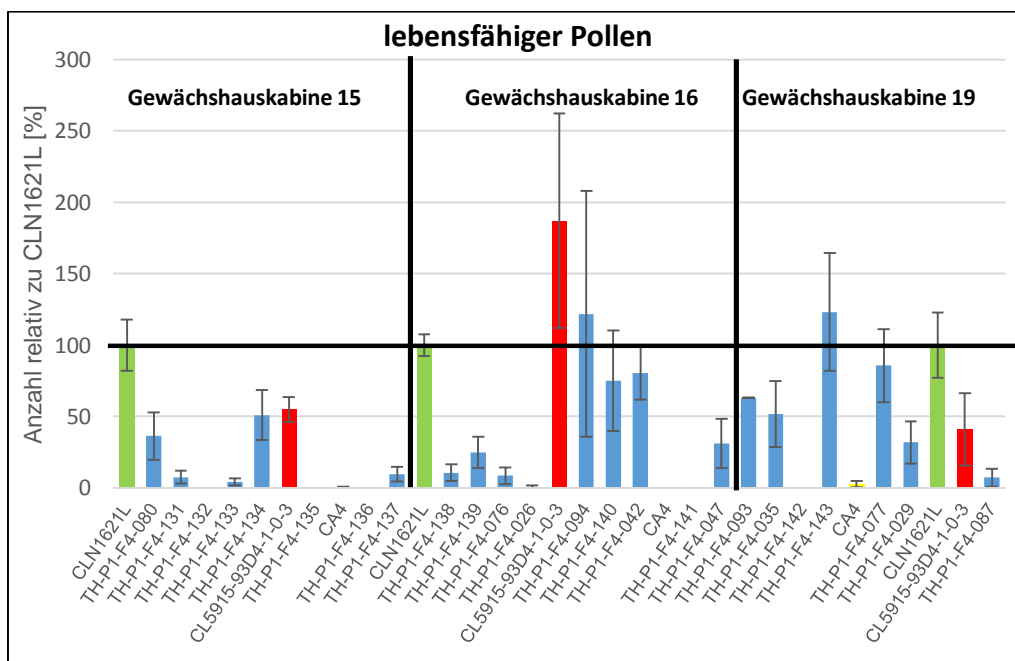


Abbildung 3.12: Identifizierung extremer Hitzetoleranztypen III. Vergleich der Anzahl an lebensfähigem Pollen je Genotyp der F4-Nachkommenschaft bzw. der zu untersuchenden Linie relativ zum hitzetoleranten Elter CLN1621L in der jeweiligen Gewächshauskabine (Kabine 15, 16, 19). Rot eingerahmt: Genotypen, welche im Rahmen der Expressionsanalyse untersucht wurden.

3.4.2 Expressionsanalyse in Antheren der Tomate

Im Rahmen der Expressionsanalysen wurde RNA aus den in Tabelle 2.4 aufgelisteten Antheren-Proben extrahiert, aufgereinigt und auf ihre Qualität und Integrität untersucht. Die RNA in den Mischungen wies mit RIN-Werten zwischen 7,8 und 8,7 hohe Qualitäten auf. In diesen Probenmischungen sollten differentielle Hybridisierungssignale identifiziert werden.

Um einen Eindruck über die differentielle Expression bestimmter Gene in Tomatantheren unter Hitzestress zu gewinnen, wurden die Expressionsmuster der sensitiven Genotypen unter Normalbedingungen (SN), der sensitiven Genotypen unter Hitzestress (SH), der toleranten Genotypen unter Normalbedingungen (TN), der toleranten Genotypen unter Hitzestress (TH) sowie toleranztypunabhängige Expressionen unter optimalen Temperaturbedingungen (N) und Hitzestress (H) miteinander verglichen. Für die 25.664 darstellbaren Sonden konnten 1.897 signifikante, differentielle Hybridisierungen nachgewiesen werden (Tabelle 3.8). Der Vergleich der Hybridisierungsergebnisse der hitzesensitiven Genotypen unter optimalen Temperaturbedingungen und Hitzestress detektierte 387 hochregulierte bzw. 206 herunterregulierte Transkripte mit einer maximal 17,6- bzw. 14,2-fachen Regulation (Tabelle 3.8 und 3.9). Ein Abgleich der Hybridisierungssignale für die hitzetoleranten Genotypen unter Normalbedingungen und Hitzestress wies 28 bzw. 78 regulierte Transkripte mit einer 11,7- bzw. 38,2-fachen Regulation im Maximum nach. Im Vergleich der hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen unter optimalen Temperaturbedingungen waren 717 Transkripte hochreguliert und 410 herunterreguliert, während sich die Anzahl unter Hitzestressbedingungen auf 31 bzw. 15 Transkripte reduzierte. Somit liegen mehr Unterschiede in den Expressionsmustern zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen unter Normalbedingungen als unter Hitzestressbedingungen vor. Die Höhe der Expressionsänderung variierte unter Hitzestress am stärksten mit einer 41,2- (maximal) bzw. 4,8-fachen (durchschnittlich) Regulationsänderung im Vergleich zu den Ergebnissen unter optimalen Temperaturbedingungen. Die Betrachtung der jeweils fünf stärksten Hoch- und Herunterregulationen in den fünf möglichen Vergleichen bestätigte diese Beobachtung (Tabelle 3.9). Hierbei konnten bereits unter Normalbedingungen häufig höhere Expressionsstärken differentieller Gene in den hitzetoleranten Genotypen beobachtet werden. Ausnahmen waren beispielsweise Transkripte von TC195238, einem im Stigma exprimierten Gen, oder TC215954, einem Lipid-Transferprotein. In diesen beiden Fällen fand unter Hitzestressbedingungen eine starke Hoch- (12-fach) bzw. geringe Herunterregulation (2,9-fach) in den hitzesensitiven Genotypen statt, während für die hitzetoleranten Genotypen für beide Hochregulationen zu beobachten waren (11- bzw. 6,6-fach). Die Expressionsstärke des in der Narbe exprimierten Gens blieb unterhalb der der hitzesensitiven Genotypen, während für das Lipid-Transferprotein eine stärkere Expression unter Hitzestress nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich der Toleranzgruppen konnten sowohl ähnliche als auch unterschiedliche

Expressionsstärken unter optimalen Temperaturbedingungen beobachtet werden. Die Analyse der Expressionsänderungen unter Hitzestress erbrachte Hochregulationen in beiden Toleranzgruppen für das Transkript von TC198445 (Cystein Protease Inhibitor). Die höchsten Expressionsstärken waren für die Transkripte des antherenspezifischen Gens LAT52 (TC214591), der Beta-Galactosidase (TC204032), eines mit der späten Embryogenese in Verbindung stehenden Gens (TC210322/TC211841) und eines Lipid-Transfer-Proteins (TC215954) zu beobachten. Das Gen eines Hsc70-Proteins, welches unter Hitzeschock mit der Hitzetoleranz in Verbindung gebracht wird, war in fast vierfacher Stärke höher in den hitzesensitiven Genotypen sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Hitzestress exprimiert. Starke Herunterregulationen von Transkripten waren besonders in den hitzetoleranten Genotypen im Vergleich zwischen Optimaltemperatur und Hitzestress zu beobachten (TC198413: Pectin Acetylerase, TC211841 bzw. TC210322: L-Ascorbat Oxidase homologer Precursor, TC203666: auxinunterdrücktes Protein, TC214591: antherenspezifisches LAT52, TC204032: Beta-Galctosidase).

Die Analyse der toleranztypunabhängigen Hitzestressantwort wies eine hohe Anzahl an differentiellen Hybridisierungssignalen nach (184 hoch-, 156 herunterreguliert). Die maximale Stärke der Regulation variiert dabei zwischen 10- und 25,5-fach. Vor allem das Transkript des zur L-Ascorbat Oxidase homologen Precursors zeigte eine starke Herunterregulation zwischen Normaltemperatur und Hitzestress.

Tabelle 3.8: Regulationen mit Bezug zum Hitzestress oder Toleranztyp. Verglichen wurden Regulationsmuster von hitzesensitiven (S) und -toleranten Genotypen (T) unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). Angegeben sind die Anzahl an Regulationen (n) sowie die minimale (Min), maximale (Max) und durchschnittliche (\emptyset) Stärke der Regulation.

Vergleich		hochreguliert	herunterreguliert	Summe
SN-SH	n	387	206	593
	Min	2	2	2
	Max	17,6	14,2	17,6
	\emptyset	2,9	4	3,3
TN-TH	n	28	78	106
	Min	2	2,1	2
	Max	11,8	38,2	38,2
	\emptyset	4,3	10,8	9,1
SN-TN	n	717	410	1127
	Min	2	2	2
	Max	14,55	18,1	18,1
	\emptyset	2,7	2,7	2,7
SH-TH	n	31	15	46
	Min	2	2,2	2
	Max	41,2	15,6	41,2
	\emptyset	4,8	4,1	4,6
N-H	n	184	156	340
	Min	2	2	2
	Max	11,7	25,5	25,5
	\emptyset	2,9	5,3	4

Tabelle 3.9: Expressionsmuster ausgewählter Gene. Dargestellt sind die jeweils fünf extremsten Hoch- bzw. Herunterregulationen der fünf Vergleiche. Verglichen wurden sowohl hitzesensitive (S) als auch -tolerante Genotypen (T) unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). Dargestellt sind der in dem jeweiligen Teilabschnitt betrachtete Vergleich (V), die regulierte Sonde, die dazugehörige Zielsequenz, deren physikalische Lokalisation (Chr= Chromosom, Pos= Position [Mbp]) sowie die Expressionsstärken in den Mischproben und deren Expressionsänderung in den fünf Vergleichen. PI= Protease Inhibitor, LAO= L-ascorbate oxidase homolog precursor. *: signifikante Regulation.

V	Sonde	Ziel	Chr	Pos	Expressionsstärke						Expressionsänderung					Annotation
					SN	TN	SH	TH	N	H	SN-SH	TN-TH	SN-TN	SH-TH	N-H	
SN-SH	TC205331_527_36_S	TC205331	8	61,04	163	1763	1657	533	963	1095	10,1*	-3,3	10,8*	-3,1	1,1	ethylene-responsive PI
	TC214687_607_35_S	TC214687	3	4,81	478	702	5585	8245	590	6915	11,7*	11,7*	1,5*	1,5	11,7*	response regulation
	TC195238_641_40_S	TC195238	4	54,44	2009	774	24139	8402	1392	16270	12*	10,9*	-2,6	-2,9	11,7*	stigma expr. protein
	TC206427_758_39_S	TC206427	7	51,87	192	531	3230	4390	361	3810	16,9*	8,3*	2,8*	1,4	10,6*	cysteine proteinase 3
	TC201660_726_37_S	TC201660	3	54,49	230	421	4038	2590	325	3314	17,6*	6,1*	1,8	-1,6	10,2*	Kunitz-type PI
	TC193215_763_36_S	TC193215	9	61,86	239	639	21	158	439	90	-11,2*	-4,1	2,7	7,4*	-4,9	cytoplasmic vesicle
	TC198413_262_35_S	TC198413	12	0,2	4908	9205	412	395	7056	404	-11,9*	-23,3*	1,9	-1,0	-17,5*	pectin acetylsterase
	TC204032_2292_40_S	TC204032			12309	21152	969	682	16730	825	-12,7*	-31*	1,7	-1,4	-20,3*	beta-galactosidase
	TC211841_910_38_S	TC211841	1	46,19	11186	26849	789	703	19018	746	-14,2*	-38,2*	2,4	-1,1	-25,5*	LAO
TC210776_295_37_S	TC210776	6	2,55	9354	6841	660	592	8097	626	-14,2*	-11,5*	-1,4	-1,1	-12,9*	-	
TN-TH	TC198445_806_36_S	TC198445			484	478	3591	3512	481	3552	7,4*	7,3*	-1,0	-1,0	7,4*	cysteine PI
	TC206427_758_39_S	TC206427	7	51,87	192	531	3230	4390	361	3810	16,9*	8,3*	2,8*	1,4	10,6*	cysteine PI 3
	TC193040_659_40_S	TC193040	3	54,52	9723	5127	50709	42744	7425	46726	5,2*	8,3*	-1,9	-1,2	6,3*	cathepsin D inhibitor
	TC195238_641_40_S	TC195238	3	54,44	2009	774	24139	8402	1392	16270	12*	10,9*	-2,6	-2,9	11,7*	stigma expr. protein
	TC214687_607_35_S	TC214687	3	4,82	478	702	5585	8245	590	6915	11,7*	11,7*	1,5*	1,5	11,7*	response regulation
	TC214591_411_36_X3	TC214591	10	1,68	24983	62612	2510	2333	43798	2421	-10*	-26,8*	2,5*	-1,1	-18,1*	anther-specific LAT52
	TC203666_93_36_S	TC203666	3	0,96	1670	7199	305	233	4434	269	-5,5*	-30,9*	4,3*	-1,3	-16,5*	auxin-repressed protein
	TC204032_2292_40_S	TC204032			12309	21152	969	682	16730	825	-12,7*	-31*	1,7	-1,4	-20,3*	beta-galactosidase
	TC210322_814_39_S	TC210322	1	46,19	11153	29186	1032	822	20169	927	-10,8*	-35,5*	2,6	-1,3	-21,8*	LAO
TC211841_910_38_S	TC211841	1	46,19	11186	26849	789	703	19018	746	-14,2*	-38,2*	2,4	-1,1	-25,5*	LAO	

Tabelle 3.9 Weiterführung: Expressionsmuster ausgewählter Gene. Dargestellt sind die jeweils fünf extremsten Hoch- bzw. Herunterregulationen der fünf Vergleiche. Verglichen wurden sowohl hitzesensitive (S) als auch -tolerante Genotypen (T) unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). Dargestellt sind der in dem jeweiligen Teilabschnitt betrachtete Vergleich (V), die regulierte Sonde, die dazugehörige Zielsequenz, deren physikalische Lokalisation (Chr= Chromosom, Pos= Position [Mbp]) sowie die Expressionsstärken in den Mischproben und deren Expressionsänderung in den fünf Vergleichen. PI= Protease Inhibitor.
*: signifikante Regulation.

V	Sonde	Ziel	Chr	Pos	Expressionsstärke					Expressionsänderung					Annotation	
					SN	TN	SH	TH	N	H	SN-SH	TN-TH	SN-TN	SH-TH		N-H
SN-TN	TC212407_1666_35_S	TC212407	8	39,81	207	1714	245	1183	961	714	1,2	-1,4	8,3*	4,8	-1,3	-
	TC204935_786_40_S	TC204935	6	32,99	27	231	8	332	129	170	-3,4	1,4	8,5*	41,2*	1,3	-
	TC203244_868_40_S	TC203244	8	56,69	412	3824	313	343	2118	328	-1,3*	-11,2*	9,3*	1,1	-6,5*	-
	TC205331_527_36_S	TC205331	8	61,05	163	1763	1657	533	963	1095	10,1*	-3,3	10,8*	-3,1	1,1	ethylene-responsive PI
	TC201912_461_40_S	TC201912	11	3,57	65	943	174	98	504	136	2,7	-9,6*	14,6*	-1,8	-3,7	DC7.1 precursor
	TC215954_316_38_S	TC215954			18543	1943	6391	12760	10243	9575	-2,9	6,6*	-9,5*	2,0	-1,1	lipid-transfer protein
	TC215709_249_40_S	TC215709	1	2,13	605	58	77	55	331	66	-7,9*	-1,1	-10,4*	-1,4	-5,0*	-
	TC213204_567_35_S	TC213204	4	63,27	382	27	382	25	205	203	1,0	-1,1	-14,1*	-15,6*	-1,0	zinc finger (FYVE type)
	TC204141_669_40_S	TC204141	8	56,35	2192	150	281	209	1171	245	-7,8*	1,4	-14,6*	-1,3	-4,8	pectin acetyltransferase
TC209231_278_39_S	TC209231			1766	98	180	137	932	159	-9,8*	1,4	-18,1*	-1,3	-5,9*	-	
SH-TH	TC202450_1246_40_S	TC202450	6	12,75	57	311	40	238	184	139	-1,4	-1,3	5,4*	6,0*	-1,3	Calcium ion binding
	TC193215_763_36_S	TC193215	9	61,86	239	639	21	158	439	90	-11,2*	-4,1	2,7	7,4*	-4,9	cytoplasmic vesicle
	TC201010_930_40_S	TC201010	6	2,63	30	104	10	82	67	46	-2,9	-1,3	3,5*	7,9*	-1,5	-
	TC196545_397_41_X2	TC196545	6	3,58	540	3191	421	3668	1866	2045	-1,3*	1,1	5,9*	8,7*	1,1	CP12 precursor
	TC204935_786_40_S	TC204935	6	32,99	27	231	8	332	129	170	-3,4	1,4	8,5*	41,2*	1,3	-
	TC204865_1543_40_S	TC204865			3413	899	3692	1024	2156	2358	1,1	1,1	-3,8*	-3,6*	1,1	Hsc protein 70
	TC198987_615_40_S	TC198987	1	4,98	1180	553	2210	553	866	1382	1,9*	1,0	-2,1*	-4,0*	1,6	-
	TC191852_1729_35_S	TC191852	9	3,89	940	306	1188	217	623	702	1,3*	-1,4	-3,1*	-5,5*	1,1	DNA binding
	TC209325_360_40_S	TC209325	9	4,09	583	91	815	145	337	480	1,4	1,6	-6,4*	-5,6*	1,4	one helix protein
TC213204_567_35_S	TC213204	4	63,27	382	27	382	25	205	203	1,0	-1,1	-14,1*	-15,6*	-1,0	zinc finger (FYVE type)	

Tabelle 3.9 Weiterführung: Expressionsmuster ausgewählter Gene. Dargestellt sind die jeweils fünf extremsten Hoch- bzw. Herunterregulationen der fünf Vergleiche. Verglichen wurden sowohl hitzesensitive (S) als auch -tolerante Genotypen (T) unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). Dargestellt sind der in dem jeweiligen Teilabschnitt betrachtete Vergleich (V), die regulierte Sonde, die dazugehörige Zielsequenz, deren physikalische Lokalisation (Chr= Chromosom, Pos= Position [Mbp]) sowie die Expressionsstärken in den Mischproben und deren Expressionsänderung in den fünf Vergleichen. PI= Protease Inhibitor, LAO= L-ascorbate oxidase homolog precursor, LEA 1: late embryogenesis abundant protein 1. *: signifikante Regulation.

V	Sonde	Ziel	Chr	Pos	Expressionsstärke					Expressionsänderung					Annotation	
					SN	TN	SH	TH	N	H	SN-SH	TN-TH	SN-TN	SH-TH		N-H
N-H	TC198445_806_36_S	TC198445			484	478	3591	3512	481	3552	7,4*	7,3*	-1,0	-1,0	7,4*	cysteine PI
	TC201660_726_37_S	TC201660	3	54,49	230	421	4038	2590	325	3314	17,6*	6,1*	1,8	-1,6	10,2*	Kunitz-type PI
	TC206427_758_39_S	TC206427	7	51,87	192	531	3230	4390	361	3810	16,9*	8,3*	2,8*	1,4	10,6*	cysteine proteinase 3
	TC195238_641_40_S	TC195238	3	54,44	2009	774	24139	8402	1392	16270	12,0*	10,9*	-2,6	-2,9	11,7*	stigma expr. protein
	TC214687_607_35_S	TC214687	3	4,82	478	702	5585	8245	590	6915	11,7*	11,7*	1,5*	1,5	11,7*	response regulation
	TC214591_411_36_X3	TC214591	10	1,68	24983	62612	2510	2333	43798	2421	-10,0*	-26,8*	2,5*	-1,1	-18,1*	anther-specific LAT52
	TC207972_100_35_S	TC207972	9	65,73	1646	4383	151	170	3015	161	-10,9*	-25,7*	2,7	1,1	-18,8*	LEA 1
	TC204032_2292_40_S	TC204032			12309	21152	969	682	16730	825	-12,7*	-31,0*	1,7	-1,4	-20,3*	beta-galactosidase
	TC210322_814_39_S	TC210322	1	46,19	11153	29186	1032	822	20169	927	-10,8*	-35,5*	2,6	-1,3	-21,8*	LAO
	TC211841_910_38_S	TC211841	1	46,19	11186	26849	789	703	19018	746	-14,2*	-38,2*	2,4	-1,1	-25,5*	LAO

Um einen Eindruck über die Funktionsbereiche der differentiell exprimierten Gene zu bekommen, wurden den Zielsequenzen GO-Einträge im Bereich biologische Prozesse, molekulare Funktion sowie zellulärer Bestandteil zugeordnet. Regulationen in Bezug auf Stress- bzw. bedeutende Funktionen sind in Abbildung 3.13 dargestellt und im Anhang in Tabelle 7.1.2 aufgeführt. Differentiell exprimierten Genen konnten Funktionsbereiche in Bezug auf Hitze, Kälte aber auch auf allgemeinen Stress zugewiesen werden. Vor allem in Transkripten mit Bezug zum Hitzestress konnten Hochregulationen beobachtet werden, von welchen zwei eine 5-fache bzw. 7-fache Hochregulation als Antwort auf den Hitzestress in hitzesensitiven Genotypen aufwiesen. Besonders stark regulierte Transkripte hatten eher geringe Expressionsstärken. Etwas stärkere Expressionen konnten für Gene repräsentiert durch TC193902 und TC193184 (Antwort auf Hitzestress), TC211889 (Hitzeschock-verwandtes Protein 80), TC208258 (Hitzeschockprotein) und TC215346 (endoplasmatische Hitzeschockprotein 90) nachgewiesen werden. Einzig für Transkripte des endoplasmatischen Hitzeschockproteins 90, des Hitzeschock-verwandten Proteins 80 und des Klasse I Hitzeschockproteins (TC207926) konnten signifikante Regulationsunterschiede zwischen den Toleranztypen unter Normalbedingungen detektiert werden. Weitere Unterschiede zwischen den hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen innerhalb des Hitzestress-Funktionsbereiches lagen nicht vor. In Regulationen von Transkripten mit Bezug zu der Antwort auf Kälte traten in vier der sieben Fälle signifikante Unterschiede zwischen den Toleranzklassen auf. Für diese Gene wurde eine stärkere Expression in den hitzetoleranten Genotypen beobachtet, häufig erfolgte unter Hitzestress eine Hochregulation in beiden Klassen (TC199069).

Im Bereich der Steuerung des Wasserhaushaltes konnten 6 signifikante Regulationen mit Bezug zum Wassertransport und 3 zur Austrocknung detektiert werden. In den hitzesensitiven Genotypen trat für alle Transkripte eine 2- bis 2,5-fache Hochregulation auf, welche in den Hitzetoleranten nur für ein Transkript zu beobachten war. Die Vertreter der hitzetoleranten Gruppe wiesen meist bereits unter Normalbedingungen Expressionsstärken auf, die die hitzesensitiven Genotypen erst unter Hitzestress erreichten. Eine starke Expression mit Bezug zur Austrocknung erfolgte für das durch die Sequenz von TC211636 repräsentierte Gen. Für dieses traten signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Toleranzgruppen auf, wobei die hitzetoleranten Genotypen eine stärkere Expression bereits unter Normalbedingungen aufwiesen. Eine Regulation als Antwort auf einen Hitzestress erfolgte nicht.

Auch in Bezug auf andere Funktionsbereiche wie die Autophagie, die Blütenentwicklung und weitere blütenbezogene Merkmale wie die Pollenschlauchentwicklung, stigmabezogene oder antherenspezifische Proteine konnten Transkriptregulationen beobachtet werden. Besonders interessant waren die überwiegend negativen Regulationen der Transkripte des Pollenschlauch-Proteins RhoGD12 und des antherenspezifischen Proteins LAT52 sowie die stark positive

Regulation des Transkripts eines in der Narbe exprimierten Gens nach Hitzestressapplikation.

Im Funktionsbereich Autophagie konnten signifikante Regulationsunterschiede zwischen den Toleranztypen unter Kontrollbedingungen mit einer erhöhten Expression in den hitzetoleranten Genotypen beobachtet werden. Unter Hitzestressbedingungen wurden keine signifikanten Regulationen detektiert. Tendenziell näherten sich die Toleranzgruppen aber einem ähnlichen Expressionsniveau durch Herunterregulation der Transkripte in den hitzetoleranten und Hochregulation in den hitzesensitiven Genotypen an. Weitere Regulationen betreffen Transkripte des Cathepsin D Inhibitor Precursors und eines DnaJ-ähnlichen Proteins.

Besonders starke Expressionsänderungen erfolgten in Genen mit Bezug zu kupferionenbindenden Proteinen und cytoplasmatischen, membrangebundenen Vesikeln. Deren Transkripte wiesen im Vergleich der hitzesensitiven bzw. -toleranten Genotypen unter Normal- und Hitzestressbedingungen eine 5- bis 10-fache bzw. 26- bis 38-fache Herunterregulation auf. Besonders beeinflusst wurden die Expressionen in den hitzetoleranten Genotypen. Unterschiede zwischen den Toleranzgruppen konnten nur unter Optimalbedingungen in einem Transkript (TC239077) identifiziert werden.

Einige Gene wiesen extrem hohe Expressionsänderungen auf. Darunter fallen beispielsweise Gene mit Bezug zu Verwundung, zu einem 14-3-3-ähnlichen Protein und zu einem Protein der Esterase/Lipase/Thioesterase Familie. Die Expression dieser Gene wurde zusammen mit der eines WRKY Transkriptionsfaktors, eines weiteren Transkriptionsfaktors sowie eines CP12 Precursors in einer RT-qPCR überprüft.

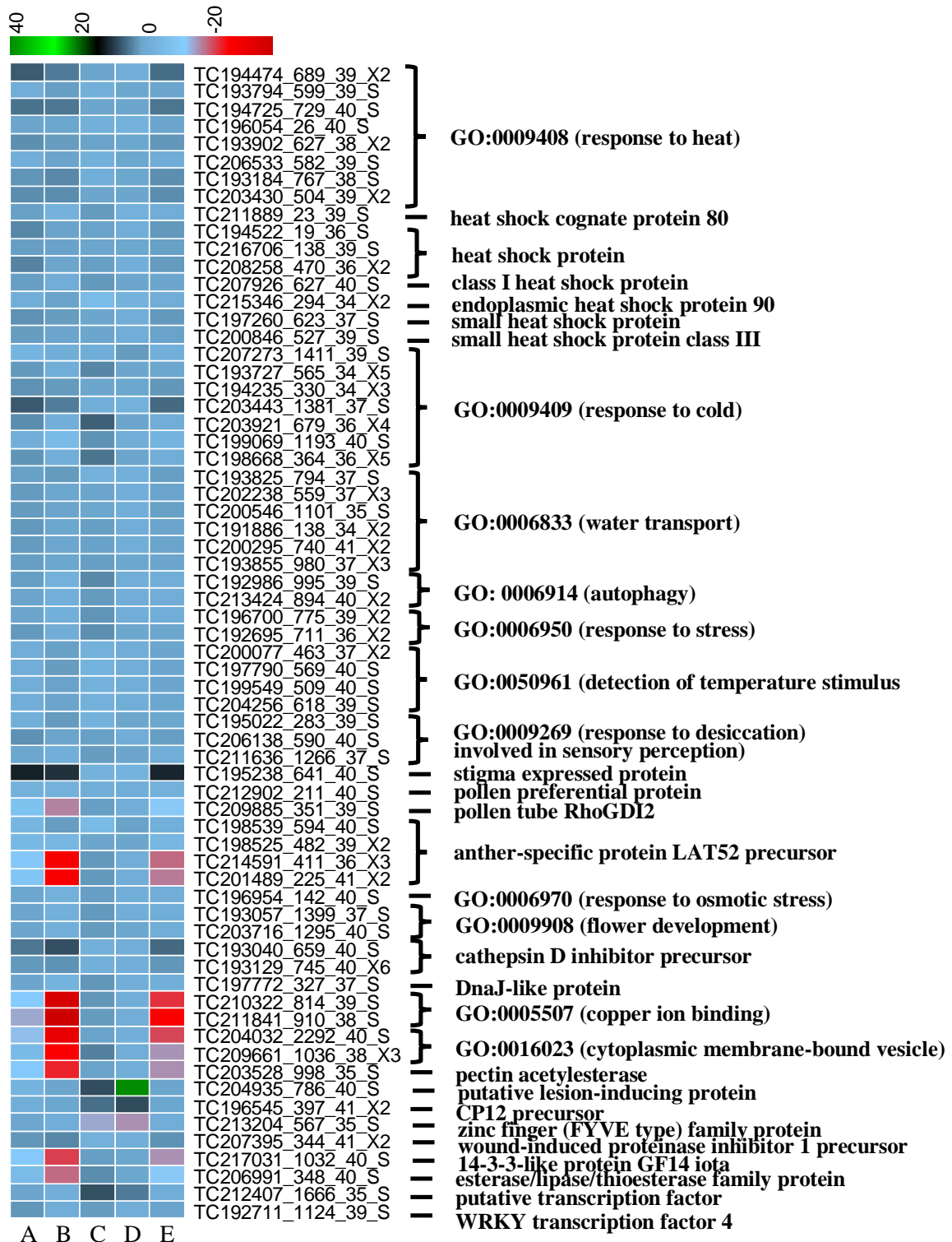


Abbildung 3.13: Expressionsänderung einiger differentiell exprimierter Gene mit bekannten Annotationen. Verglichen wurden hitzesensitive (S) und -tolerante (T) Genotypen unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). A: Vergleich SN zu SH, B: Vergleich TN zu TH, C: Vergleich SN zu TN, D: Vergleich SH zu TH, E: Vergleich normale Temperatur zu Hitzestress.

Eine Lokalisation der differentiell exprimierten Gene wurde über einen Sequenzabgleich der Sonden-Zielsequenzen mit Sequenzen des Tomatengenom-Assamby 2.40 angestrebt. Auf diese Weise war es möglich, hoch homologe Genomabschnitte zu detektieren. Auf Grund unzureichender Homologien konnten einige Regulationen nicht auf der physikalischen Karte abgebildet werden (93 für den Vergleich SN-SH, 18 für TN-TH, 228 für SN-TN, 16 für SH-TH, 62 für N-H). Die Bestimmung der physikalischen Position differentiell exprimierter Gene wies deren ungleichmäßige Verteilung im Genom der Tomate nach (Abbildung 7.1.1). Vor allem in distalen Bereichen zahlreicher Chromosomen traten starke Transkriptregulationen auf. Regulationsunterschiede zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen unter Hitzestressbedingungen bzw. tolerant Genotypen unter optimalen Temperatur- und Hitzestressbedingungen konnten nur selten kartiert werden.

Auf Chromosom 1 konnten sowohl hoch-, als auch herunterregulierte Transkripte gehäuft in den Bereichen zwischen 0 und 5 Mbp sowie zwischen 65 und 90Mbp lokalisiert werden (Abbildung 3.14). Nur wenige Expressionsänderungen bezogen sich auf den Bereich zwischen 5 und 65 Mbp. Im Vergleich zwischen hitzesensitiven und -toleranten Genotypen unter Normalbedingungen konnte im Bereich von 65 bis 90 Mbp eine Vielzahl differentiell exprimierter Gene beobachtet werden. Eher wenige Expressionsunterschiede konnten zwischen den hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen unter Hitzestressbedingungen bzw. den hitzetoleranten Genotypen in den beiden Temperaturregimen detektiert werden.

Auf Chromosom 2 konzentrierten sich die differentiell exprimierten Gene auf einen Bereich zwischen 27 und 49 Mbp. Im Vergleich der Expressionsmuster zwischen den hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen unter Hitzestress bzw. den hitzetoleranten Genotypen unter Normal- und Hitzestressbedingungen waren hier kaum Unterschiede zu beobachten.

Chromosom 3 wies eine ähnliche Verteilung der differentiell exprimierten Gene auf. In Genomregionen zwischen 0 und 13 Mbp bzw. 44 und 64 Mbp waren zahlreiche der hier identifizierten Gene lokalisiert. Für den Vergleich zwischen hitzesensitiven und -toleranten Genotypen unter Normalbedingungen konnte eine stärkere Präsenz von differentiell exprimierten Genen im distalen Bereich zwischen 44 und 64 Mbp nachgewiesen werden.

Auf den Chromosomen 4, 5, 7 und 8 konnten meist in distalen Genomregionen starke Regulationen identifiziert werden. Der proximale Bereich wies verstärkt Regulationsunterschiede in den hitzesensitiven Genotypen zwischen Normal- und Hitzestressbedingungen auf. Regulationen fanden in Bereichen zwischen 0 und 10 Mbp sowie 50 und 65 Mbp statt. Ähnliches konnte für die Chromosomen 9, 10 und 12 beobachtet werden.

Chromosom 6 wies Regulationsbereiche zwischen 0 und 4 bzw. 28 und 45 Mbp auf.

Chromosom 11 wies in drei der 5 Vergleiche eine Anreicherung von kartierbaren Regulationen

sowohl im distalen als auch im proximalen Bereich auf. Für die Vergleiche zwischen hitzesensitiven und -toleranten Genotypen unter Hitzestress bzw. zwischen den beiden Temperaturregimen in den hitzetoleranten Genotypen konnten keine bzw. kaum Regulationen kartiert werden.

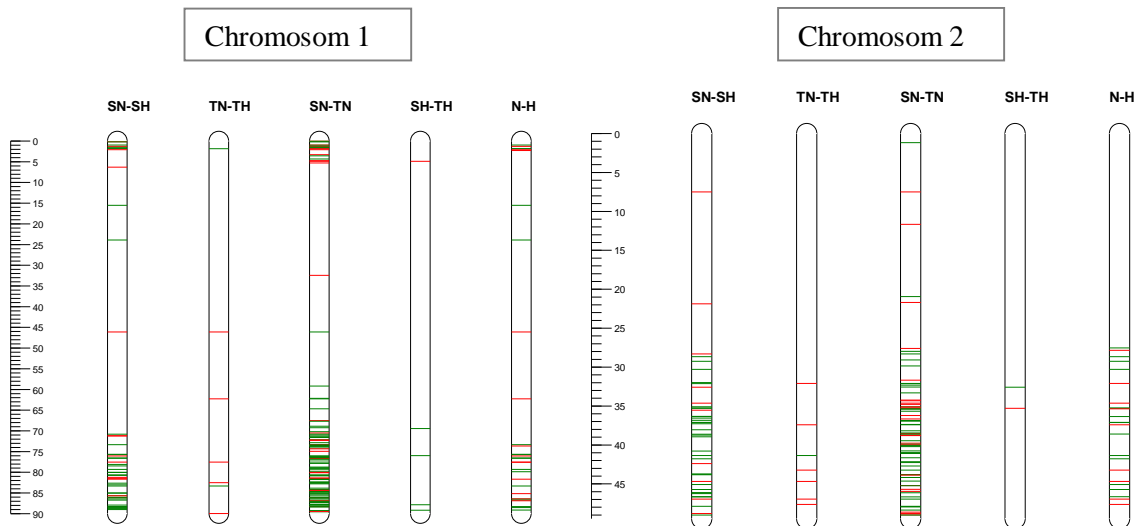


Abbildung 3.14: Physikalische Lokalisation der differentiell exprimierten Gene auf den Chromosomen 1 und 2. Angegeben ist die physikalische Position [Mbp] der regulierten Gene. Verglichen wurde das Expressionsmuster sowohl hitzesensitiver (S) als auch -toleranter Genotypen (T) unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). Rot: herunterreguliert, grün: hochreguliert.

3.4.3 Expressionsanalyse mittels RT-qPCR

Nachdem differentiell exprimierte Gene im Rahmen der Microarray-Hybridisierungen identifiziert werden konnten, wurden spezifische Primer aus den Zielsequenzen ausgewählter Sonden abgeleitet und im Untersuchungsmaterial getestet. Da hierbei eine größere Anzahl an Proben untersucht werden konnte, wurden neue Mischproben aus isolierter RNA wie in Tabelle 2.5 beschrieben hergestellt. Nach Qualitätsüberprüfung konnten diese für die weiteren Analysen verwendet werden.

Für das Primerdesign wurden Sequenzabschnitte solcher Gene herangezogen, deren Transkripte eine möglichst hohe Regulation (>2) aufwiesen, sowohl hoch- als auch herunterreguliert und in den Vergleichen zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen unter Normalbedingungen bzw. Hitzestress die größte Variation zeigten. Dies traf auf die in Tabelle 7.2.5 aufgeführten Zielgene zu. Zusätzlich zu diesen wurden zwei Referenzgene (18S rRNA, LeEF1) und bekannte, unter Hitzeschock exprimierte Gene (HsfA2, Hsp17.4-CII, Hsp17.6-CII) untersucht. Die Primerpaare 2, 3 und 5 wurden auf Grund multipler Banden auf Agarosegelebene von der Analyse ausgeschlossen. Innerhalb der RT-qPCR wurden bis zu drei technische Wiederholungen je Primerpaar durchgeführt. Für das Primerpaar HsfA2 lagen Daten von einer Wiederholung vor. Abbildung 3.15 stellt

beispielhaft die Variation zwischen den Wiederholungen innerhalb eines Genotyps in den C_T -Werten dar. Für Primer 4 ist eine gleichmäßige Variation mit einer relativ starken Abweichung zwischen den Wiederholungen zu erkennen, während für die übrigen Primerpaare eine eher geringere Variation innerhalb eines Genotypen, dafür aber eine höhere zwischen den Genotypen und Behandlungen zu beobachten war. Ein Unterschied zwischen der hitzesensitiven und -toleranten Gruppe unter Hitzestress besteht nicht.

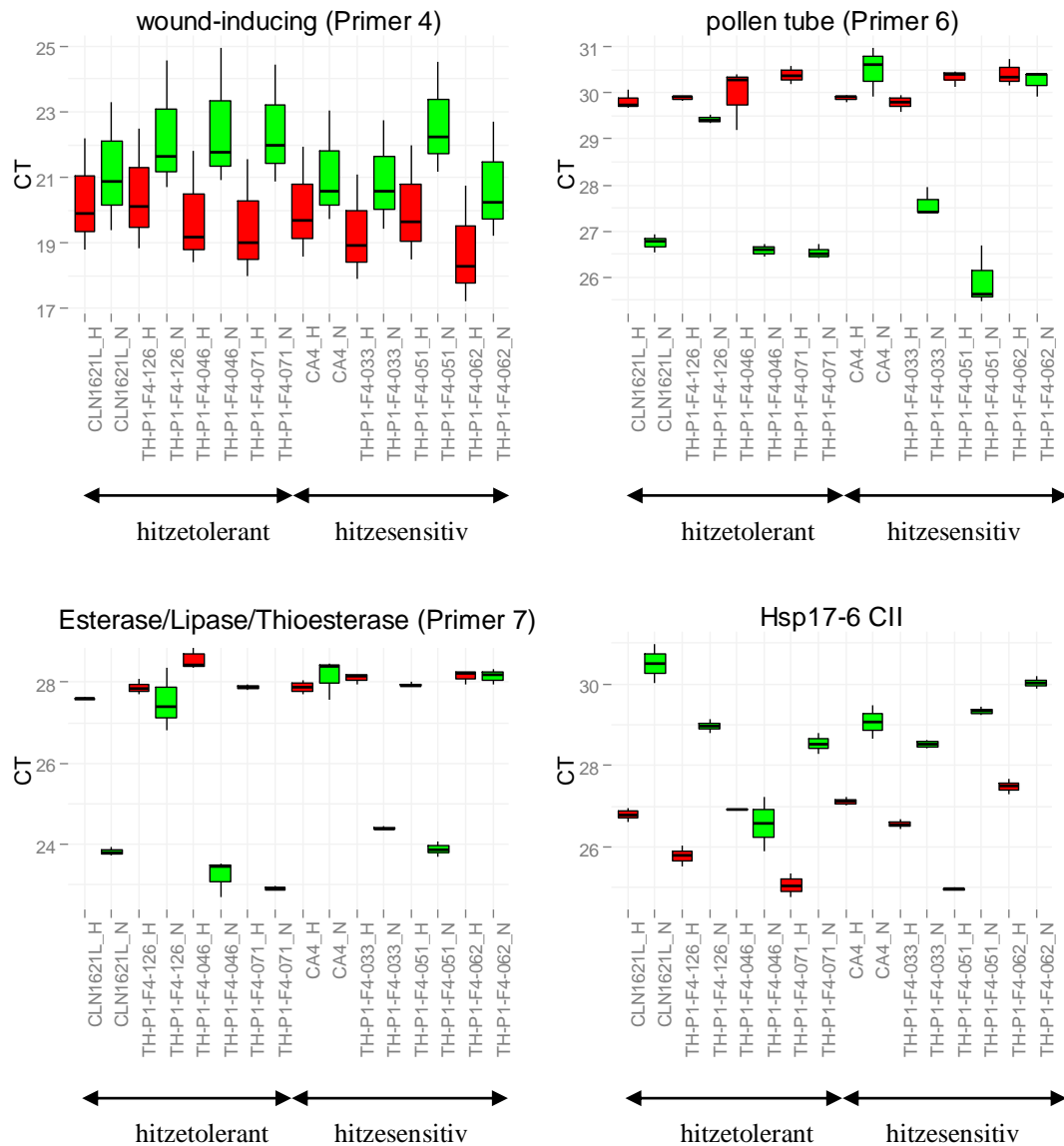


Abbildung 3.15: C_T -Werte der Messwiederholungen für die Primerpaare 4, 6, 7 und Hsp17-6 CII. Verglichen werden die Nachkommen TH-P1-F4-126, TH-P1-F4-046, TH-P1-F4-071 und CLN1621-L als hitzetolerante Genotypen sowie TH-P1-F4-033, TH-P1-F4-051, TH-P1-F4-062 und CA4 als hitzesensitive Genotypen.

Die statistische Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse erfolgte wie unter 2.6.3 beschrieben mit Hilfe der Programme LinReg und REST. Hierbei konnten PCR-Effizienzen zwischen 0,91 und 1 beobachtet werden. Für Primerpaar 1 konnte eine signifikante Regulation in allen Vergleichen mit Ausnahme des Vergleiches zwischen den hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen unter Normalbedingungen nachgewiesen werden (Tabelle 3.10). Die Regulationsstärke überschritt nicht den üblichen Schwellenwert von 2. Eine getrennte Betrachtung der einzelnen Genotypen bestätigte die beobachteten Regulationsänderungen.

Primerpaar 4 wies signifikante Regulationen in vier Vergleichen nach (SN-SH, TN-TH, SH-TH, N-H). Für diese waren 3- bis 4-fache Hochregulationen als Reaktion auf den Hitzestress zu beobachten. Es konnten keine Regulationsunterschiede zwischen der hitzesensitiven und -toleranten Gruppe unter Normalbedingungen nachgewiesen werden. In der Nachkommenschaft erfolgten stets höhere Expressionsänderungen als in den Eltern.

Mit Hilfe der Primerpaare 6 und 7 konnten für die toleranztypunabhängige Antwort auf Hitzestress (SN-SH, TN-TH, N-H) stark negative Transkriptregulationen entsprechend der Ergebnisse in 3.4.2 nachgewiesen werden. Eine stärkere Herunterregulation der Transkripte in der hitzetoleranten Gruppe im Vergleich zu der hitzesensitiven Gruppe war nicht zu beobachten. Unter Hitzestressbedingungen konnten große Unterschiede in der Transkriptregulation zwischen den Toleranzgruppen nachgewiesen werden. Eine Betrachtung der Expressionsänderung in den einzelnen Genotypen klärte die Zusammenhänge weiter auf und identifizierte Nachkommen (THP1-F4-046, THP1-F4-071), die stärkere Regulationen aufwiesen als andere Gruppenmitglieder.

In Bezug auf Primerpaar 8 konnten keine signifikanten Regulationen weder in den Toleranzgruppen noch in den einzelnen Genotypen identifiziert werden.

Für HsfA2 konnte keine starke Regulationsänderung in den Toleranzgruppen detektiert werden. Bei Betrachtung der Expressionsänderungen in den einzelnen Genotypen konnte ein Trend in der Reaktion auf Hitzestress vermutet werden. So wiesen hitzetolerante Genotypen eher eine Herunterregulation, hitzesensitive eher eine Hochregulation auf. In THP1-F4-126 konnte eine signifikante, weniger als 2-fache Hochregulation des Transkriptes nachgewiesen werden. THP1-F4-071 wies mit einer 2,5-fachen Herunterregulation die stärkste Änderung auf.

In Bezug auf Hsp17.6-CII konnten toleranztypunabhängige Reaktionen auf Hitzestress beobachtet werden. In drei Vergleichen (SN-SH, TN-TH und N-H) wurden signifikante, zwischen 4,7- und 6,8-fache Hochregulationen beobachtet. Ein Unterschied zwischen den Toleranzgruppen konnte in keinem der beiden Temperaturregime signifikant bestätigt werden. Einzelne Genotypen wiesen eine verstärkte, nicht signifikante Regulationsänderung auf.

Tabelle 3.10: Expressionsänderungen ausgewählter Gene analysiert mittels RT-qPCR. Für die einzelnen Genotypen fand nur ein Vergleich der Expression zwischen Normaltemperatur und Hitzestress statt. Angegeben sind die Expressionsänderung [x-fach] innerhalb der RT-qPCR (E) bzw. des Microarray-Experiments (Em) sowie das 95%ige Konfidenzintervall (C.I.) der RT-qPCR. S: hitzesensitiv, T: hitzetolerant, H: Hitzestressbedingung, N: Normalbedingung. *: signifikante Regulation ($\alpha=0,05$), NA: kein Wert schätzbar.

Primer	Analyse							hitzesensitive Genotypen				hitzetolerante Genotypen			
			SN-SH	TN-TH	SN-TN	SH-TH	N-H	CA4	THP1-F4-033	THP1-F4-051	THP1-F4-062	CLN1621L	THP1-F4-046	THP1-F4-071	THP1-F4-126
1 TC230935	RT-qPCR	E	1,76*	1,56*	-1,05	1,48*	1,66*	1,2	2,33	1,94	1,66	1,39	1,67	1,76	1,37
		C.I.	1,4-2,3	1,1-2,2	0,7-1,1	1,0-1,9	1,1-2,3	0,1-19,3	0,2-46,4	0,1-43,2	0,1-25,7	0,1-23,3	0,08	0,1-34,3	0,3-15,7
	Microarray	Em	-3,4	1,4	8,5*	41,2*	1,3								
4 TC233891	RT-qPCR	E	3,86*	3,63*	-1,01	3,58*	3,74*	1,58	3,84	6,55	4,48	1,4	5,41	5,7	4,3
		C.I.	1,9-7,6	1,1-12,7	0,4-2,5	1,2-11,6	1,2-12,0	0,01-248,1	0,03-513,78	0,04-959,2	0,03-744,2	0,01-236,4	0,04-959,5	0,04-793,1	0,03-753,4
	Microarray	Em	2,6*	4	-2,1*	-1,4	3,1*								
6 TC236806	RT-qPCR	E	-5	-3,03	-1,58	-4,76	-3,85*	1,17	-3,12	-16,6*	1,1	-10	-10,41	-14,29	-1,06
		C.I.	0,05-1,5	0,1-1,8	0,1-12,5	0,05-1,8	0,05-1,7	0,1-22,5	0,02-4,7	0,004-0,9	0,1-17,7	0,01-1,8	0,01-2,0	0,003-1,16	0,1-13,9
	Microarray	Em	-7,8*	-16,6*	2,1	-1	-12*								
7 TC230132	RT-qPCR	E	-7,69	-4,35	-1,85	-8,33	-5,88*	-1,06	-8,3	-12,5	1,22	-14,29	-37,04*	-31,25*	1
		C.I.	0,04-1,3	0,04-1,6	0,03-21,5	0,03-1,4	0,03-1,6	0,04-21,3	0,01-2,2	0,004-1,6	0,1-24,7	0,004-1,1	0,0-0,6	0,002-0,56	0,04-28,3
	Microarray	Em	-5,6*	-18,1*	3,4*	1,1	-12*								
8 TC239779	RT-qPCR	E	1,13	1,1	1,19	1,31	1,12	-1,07	1,58	1,34	1,23	1,18	-1,16	-1,1	1
		C.I.	0,8-1,7	0,8-1,8	0,8-1,9	0,9-2,1	0,7-1,9	0,02-68,9	0,03-135,3	0,02-150,1	0,02-95,3	0,02-107,9	0,02-85,0	0,02-110,9	0,02-84,7
	Microarray	Hm	1,2	-1,4	8,3*	4,8	-1,3								
HsfA2	RT-qPCR	E	1,1*	1,11	1,06	1,07*	1,11*	1,02	1,85*	2,5	1,06	-1,15*	-1,3*	-2,56*	1,85*
		C.I.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Microarray	Em													
Hsp17.6-CII	RT-qPCR	E	6,81*	4,69*	-1,19	-1,72*	5,65*	2,8	4,6	21,56	6,4	8,19	-1,41	8,12	10,73
		C.I.	NA	NA	NA	NA	NA	0,4-33,2	0,6-70,5	2,5-434,9	0,8-88,1	0,9-115,1	0,1-6,5	1,2-94,8	1,6-110,9
	Microarray	Em													

3.5 Identifizierung merkmalsassoziierter Genomregionen mittels QTL-Kartierung

3.5.1 Erstellung einer genetischen Karte

Für die Erstellung der genetischen Karte der F₂-Population von CLN1621L und Pannovy (siehe 2.7) wurden 384 AFLP-Primerkombinationen und 169 Mikrosatelliten-Marker in den Eltern genotypen untersucht. Auf Grund der geringen Anzahl an genetischen Polymorphismen, die durch eine AFLP-Primerkombination amplifiziert werden konnte (ca. 4% der Primerpaare zeigten Polymorphismen bei einer durchschnittlichen Bandenanzahl von ca. 90 je Primerpaar), wurden nur solche AFLP-Primerkombinationen in der Nachkommenschaft untersucht, welche eine hohe Anzahl genetischer Polymorphismen (mindestens 2) zwischen den Kartierungseltern aufwiesen.

Insgesamt konnten 119 molekulare Marker (94 AFLP-Fragmente entsprechend 42 AFLP-Primerkombinationen und 25 SSR-Marker) als eindeutig polymorph und spaltend in der Nachkommenschaft identifiziert werden. Bei der Analyse der DArT-Marker erzeugten 275 Marker ein auswertbares Signal. 40 davon wurden wegen Ungenauigkeiten im Analyseprofil sofort entfernt, so dass insgesamt 235 DArT-Marker für die Kartierung verwendet werden konnten. Im Rahmen der SNP-Analysen wurden 5.526 SNPs untersucht, für 1.482 konnte ein Polymorphismus zwischen den Eltern beobachtet werden. Von diesen wurden 1.115 auf Grund unzureichender Qualität entfernt. Die übrigen 367 SNP-Marker wurden für die Erstellung der genetischen Kopplungskarte herangezogen. Damit standen für die Kartierung 729 molekulare Marker zur Verfügung. Im Rahmen der Kartierung nach Kosambi konnten 390 dieser molekularen Marker in eine genetische Karte integriert werden (Tabelle 3.11). Der Prozentsatz an kartierten DArT-Markern fiel relativ gering aus, während im Fall der SNP-Marker über 80% nach Entfernen der identischen Marker kartiert werden konnte. Die Gesamtlänge der genetischen Karte beträgt 618,1 cM. Die durchschnittliche Länge einer Kopplungsgruppe liegt bei 51,5 cM mit einem durchschnittlichen Abstand von 1,63 cM und 32,5 Markern je Kopplungsgruppe.

Ein Vergleich der innerhalb dieser Studie berechneten Position der molekularen Marker auf der genetischen Karte mit deren Position auf der physikalischen Karte wies eine starke Kollinearität in der Abfolge der Marker auf beiden Karten nach (Abbildungen 3.16 bis 3.24). Eine gleichmäßige Abdeckung des Genoms mit molekularen Markern war für nahezu alle Chromosomen gegeben. Diese variierte zwischen 7 % und nahezu 100 % (Tabelle 3.12). Bei der Berechnung der Abdeckung von Chromosom 7 musste der Positionsunterschied eines Ankermarkers im distalen Bereich der genetischen Karte bzw. proximalen Bereich der physikalischen Karte berücksichtigt werden.

Tabelle 3.11: Übersicht über die Ergebnisse der genetischen Kartierung nach Kosambi. Angegeben ist die Anzahl molekularer Marker je Chromosom und Markertechnik, die Länge der innerhalb dieser Studie berechneten Kopplungsgruppen [cM] sowie die geschätzte Abdeckung [%] des Tomatengenoms mit molekularen Markern in der genetischen Karte unter Verwendung von Ankermarkern in der physikalischen Karte. Die Beurteilung der Abdeckung von Chromosom 7 ist auf Grund der unterschiedlichen Positionierung eines Ankermarkers ungenau. M_G : Gesamtanzahl an Markern, welche in JoinMap eingelesen wurden. M_E : Anzahl an Markern, welche nach Entfernen identischer Marker für die weitere Kartierung verwendet wurden. M_K : Anzahl an kartierten Markern. M_P : Prozentsatz an molekularen Markern, welche im Vergleich zu der Gesamtanzahl der Marker nach Entfernen der identischen Marker kartiert werden konnten.

Chr	AFLP	SSR	DArT	SNP	Summe	Länge [cM]	Abdeckung [%]
1	11	1	3	8	23	46,4	73
2	3	2	3	25	33	59,5	16
3	2	0	8	25	35	62,3	93
4	1	0	3	23	27	27,7	7
5	0	0	1	18	19	30,1	95
6	22	1	0	37	60	60,5	73
7	0	1	2	9	12	41,5	(95)
8	4	0	23	9	36	54,9	15
9	8	2	24	45	79	51,2	80
10	2	0	0	37	39	70,3	100
11	6	0	0	7	13	47,2	88
12	0	6	0	8	14	66,5	93
M_G	94	25	235	367	721		
M_E	94	25	182	311	612		
M_K	59	13	67	251	390		
M_P [%]	63	52	37	81	64		

3.5.2 QTL-Kartierung

Die Identifizierung von Genomregionen, welche einen Einfluss auf die Ausprägung der untersuchten Merkmale haben können, wurde mit Hilfe der genetischen Karte nach Kosambi und den phänotypischen Daten aus MITTERBAUER (2008) durchgeführt. Untersucht wurden die Merkmale Anzahl an Blüten pro Infloreszenz, Anzahl an Früchten pro Infloreszenz, Anzahl an samenhaltigen Früchten pro Infloreszenz, Fruchtansatz in Prozent, prozentual lebensfähiger Pollen und Pollenausbeute. Um eine Normalverteilung der Merkmale gewährleisten zu können, wurden die Merkmale Blüten, samenhaltige Früchte [%], Pollenausbeute und lebensfähiger Pollen Box-Cox-transformiert, während auf die Merkmale Früchte, samenhaltige Früchte und Fruchtansatz eine Wurzeltransformation angewandt wurde. Der kritische Werte für die Teststatistik betrug für

dominante Marker 8,21 (df=1) und für kodominante Marker 10,96 (df=2). Molekulare Marker, deren Teststatistik der Korrelationsanalyse nach Kruskal-Wallis den kritischen Wert überschritt und somit eine Marker/Merkmal-Assoziation aufwies, sind in Tabelle 7.1.4 aufgeführt und in den Abbildungen 3.17, 3.18, 3.20-3.22 und 3.24 farbig sowie mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Ein merkmalsassoziierter Marker konnte nicht in die genetische Karte nach Kosambi integriert werden. Für diesen fand eine chromosomale Zuordnung statt. Wenn möglich verankerte ein Vergleich mit der physikalischen Referenzkarte die Ergebnisse im Tomatengenom.

Mit Hilfe der Intervallkartierung konnten auf den Chromosomen 3, 4, 6, 7, 8 und 11 insgesamt 20 QTL identifiziert werden (Tabelle 3.12, Abbildungen 3.17, 3.18, 3.20-3.22 und 3.24). Für das Merkmal Anzahl an Blüten wurden 3 QTL detektiert (2 auf Chromosom 7, einer auf Chromosom 8). Diese erklären zusammen 20,8 % der phänotypischen Varianz. In Bezug auf das Merkmal Pollenausbeute wurden 4 QTL identifiziert, die zusammen eine Varianz von 44,2% erklären (2 QTL auf Chromosom 4, einer auf Chromosom 8 und einer auf Chromosom 11). Für das Merkmal lebensfähiger Pollen wurde eine QTL-tragende Region ermittelt (Chromosom 11), welche bereits 10,1 % der beobachteten Variation erklärte. Bei Analyse der fruchtbezogenen Merkmale Anzahl an Früchten bzw. Anzahl samenhaltiger Früchte konnten 5 (3 auf Chromosom 3, 2 auf Chromosom 6) bzw. 4 QTL (3 auf Chromosom 4, 1 auf Chromosom 11) identifiziert werden. Mit Hilfe dieser QTL konnten 44,3 % bzw. 46,3 % der beobachteten Varianz erklärt werden. Für das Merkmal Fruchtansatz konnten 3 QTL auf den Chromosomen 6, 7 und 8 beobachtet werden. Diese erklärten zusammen eine Varianz von 25,2 %.

Auf Chromosom 3 konnten signifikante Einflüsse in Bezug auf das Merkmal Anzahl an Früchten (Abbildung 3.17, rot) in Bereichen von 24 cM bis 47 cM beobachtet werden, wobei der LOD- Wert die chromosomenweite Signifikanzschwelle überschreitet (QNF_3.1 - QNF_3.3). Die identifizierten QTL erklären zwischen 7,4 % und 9,7 % der phänotypischen Varianz. In diesen Bereichen kartieren 8 molekulare Marker, für welche eine signifikante Marker/Merkmal-Assoziation beobachtet wurde. Nach Abbildung dieser Ergebnisse auf die physikalische Karte konnte für die Genomregion zwischen 57,7 Mbp und 60,8 Mbp ein Einfluss auf das Merkmal Anzahl an Früchten nachgewiesen werden. Eine mittels Kruskal-Wallis-Test identifizierte Signifikanz in Bezug auf das Merkmal Pollenausbeute (hellgrün, Bereich ~35 cM) bzw. die Anzahl an samenhaltigen Früchten (braun, Bereich ~62 cM) konnte im Rahmen der Intervallkartierung und der dabei angelegten Signifikanzschwelle nicht bestätigt werden.

Für Chromosom 4 (Abbildung 3.18) konnte ein genomweit signifikanter Einfluss einiger Regionen im Bereich zwischen 3 cM und 27 cM in Bezug auf die Merkmale Anzahl samenhaltiger Früchte (braun, QNFs_4.1-QNFs_4.3) und Pollenausbeute (hellgrün, QPollG_4.1 und QPollG_4.2) nachgewiesen werden. Die durch diesen Genomabschnitt erklärte phänotypische Varianz variierte

zwischen 11,3 % und 16,1 %. In dieser Region wurden drei molekulare Marker identifiziert, welche eine signifikante Assoziation mit den untersuchten Merkmalen aufwiesen. Da es sich bei diesen Markern um DARt-Marker handelt, konnte eine gezielte Abbildung auf das Genom nicht stattfinden. Eine Einordnung in den distalen Bereich des Chromosoms 4 konnte allerdings erfolgen.

Chromosom 6 weist 9 SNP-Marker auf, die signifikant mit dem Merkmal Anzahl an Früchten (Abbildung 3.20, rot) korreliert sind. Im Rahmen der Intervallkartierung lässt sich in dieser Chromosomenregion (46,7 cM bis 57,8 cM) sowohl ein chromosomenweit signifikanter Einfluss auf das Merkmal Fruchtansatz (blau, QFA_6), als auch eine genomweite Signifikanz in Bezug auf das Merkmal Anzahl an Früchten (rot, QNF_6.1 und QNF_6.2) nachweisen. Die erklärte phänotypische Varianz beträgt zwischen 8,6 % und 10,8 %. Auf Grund nicht vorhandener Marker/Merkmal-Assoziationen in diesem Bereich für das Merkmal Fruchtansatz kann der QTL QFA_6 nicht bestätigt werden. Die Abbildung des QTL für das Merkmal Anzahl an Früchten ergab eine Lokalisation in der physikalischen Genomregion zwischen 36,6 Mbp und 37 Mbp distal auf Chromosom 6.

Auf Chromosom 7 konnten drei QTL identifiziert werden, deren LOD-Werte das chromosomenweite Signifikanzniveau überschritten (Abbildung 3.21). Diese betreffen die Merkmale Fruchtansatz (blau, QFA_7 bei ca. 24,3 cM) und Anzahl an Blüten (dunkelgrün, QB_7.1 und QB_7.2). In Bezug auf das Merkmal Fruchtansatz konnten für zwei DARt-Marker Marker/Merkmal-Assoziationen im Intervall nachgewiesen werden. Die Marker/Merkmal-Assoziation einzelner Marker mit der Anzahl an Früchten (rot) wurde im Rahmen der Intervallkartierung nicht signifikant bestätigt. Die physikalische Lokalisation des QTL QFA_7 erfolgte distal auf Chromosom 7. Auf Grund möglicher Rearrangements in der relativ weitreichenden Region zwischen zwei benachbarten SNP-Markern in der QTL-tragenden Region wurde von einer exakten Lokalisation abgesehen.

Ein Chromosomenabschnitt auf Chromosom 8 im Bereich um 35 cM wies in der Intervallkartierung einen signifikanten Einfluss auf das Merkmal Anzahl an Blüten auf (Abbildung 3.22, grün, QFB_8.1), welcher durch die Marker/Merkmal-Assoziation von 6 signifikant korrelierten SNP- und AFLP-Markern bestätigt wurde. Der berechnete LOD-Wert weist dabei auf einen chromosomenweit signifikanten QTL hin. Mit Hilfe dieses QTL konnte 8,2 % der phänotypischen Varianz erklärt werden. Auf der physikalischen Karte umfasst die QTL-tragende Region den Bereich zwischen 55,7 Mbp und 56,9 Mbp. In Bezug auf die Merkmale Pollenausbeute bzw. Fruchtansatz konnten zwei QTL identifiziert werden (QPOLLG_8 bzw. QFA_8, erklärte phänotypische Varianz 7,4 % bzw. 8 %). Diese konnten in der Region zwischen 50 Mbp und 56 Mbp lokalisiert werden.

Für Chromosom 11 konnte ein chromosomenweit signifikanter Einfluss auf die Merkmale Anzahl samenhaltige Früchte (Abbildung 3.24, braun, Bereich 25 cM-38 cM, QNFs_11), lebensfähiger Pollen (pink, Bereich 23 cM-27 cM, QPOLL_11) und Pollenausbeute (hellgrün, Bereich ~ 0 cM-3cM, QPOLLG_11) in der Intervallkartierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden durch die

Marker/Merkmal-Assoziation von 3 AFLP-Markern für den QTL QPollk_11 und einem AFLP-Marker für den QTL QNFs_11 bestätigt. Von einer exakten physikalischen Lokalisation der QTL wurde auf Grund fehlender eng gekoppelter Ankermarker zur physikalischen Karte abgesehen.

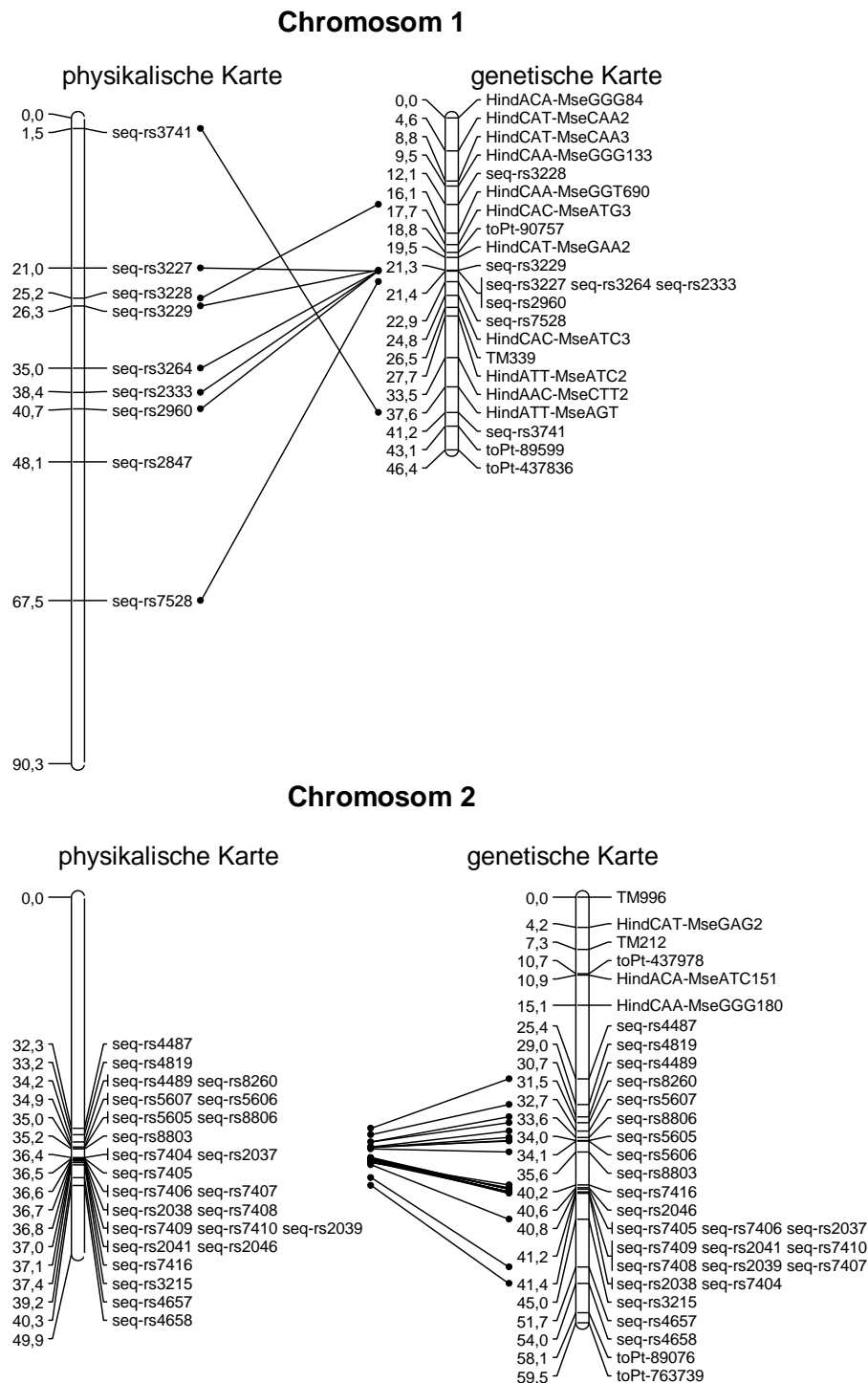


Abbildung 3.16: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte für die Chromosomen 1 und 2. Die Position der Marker ist in Mb (physikalische Karte) bzw. cM (genetische Karte) angegeben. Homologe Marker sind mit einer Linie verbunden. Es konnten keine signifikanten Marker/Merkmal-Assoziationen oder QTL auf diesen Chromosomen detektiert werden.

Chromosom 3

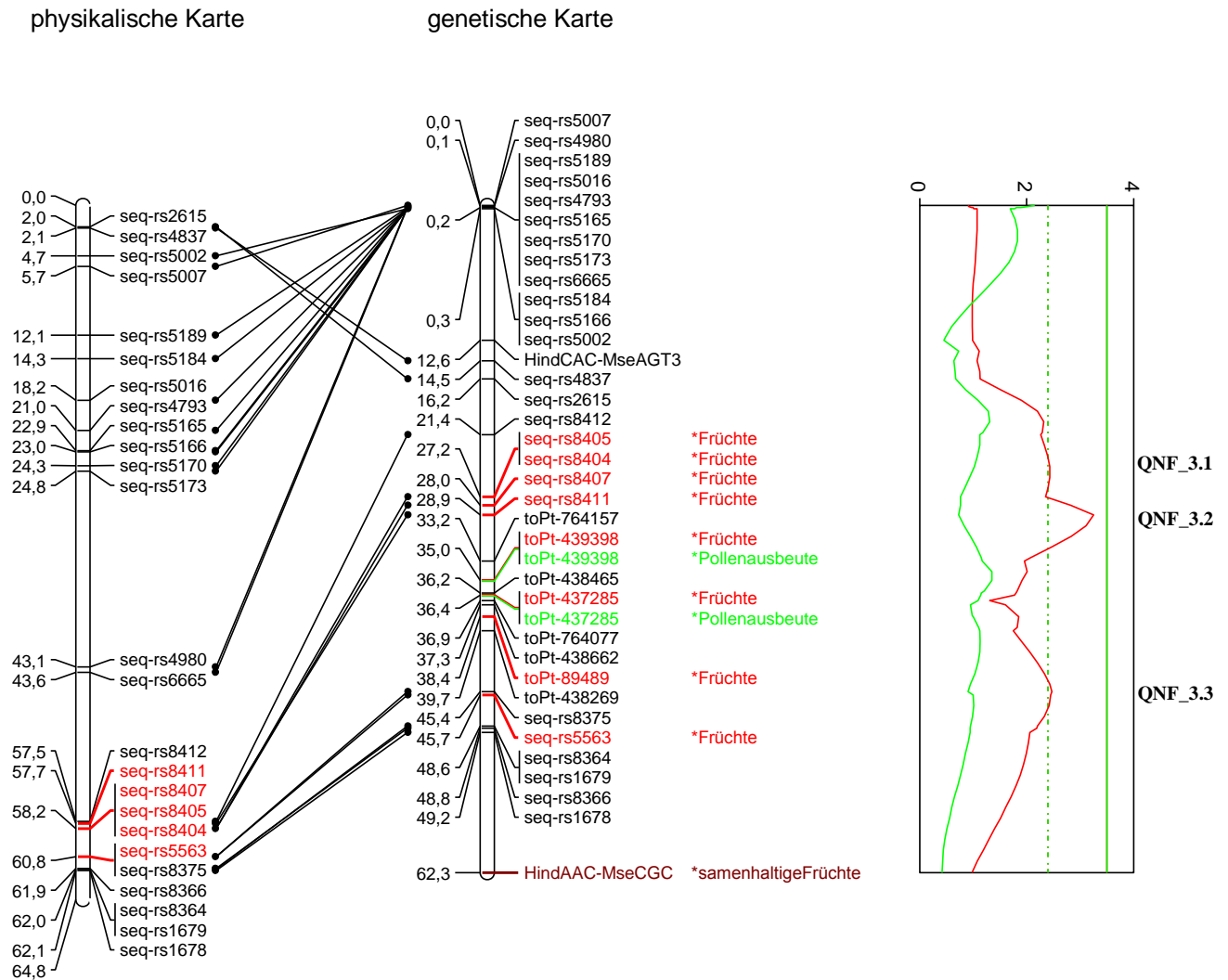


Abbildung 3.17: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte sowie Identifizierung von QTL auf Chromosom 3. Die Position der Marker ist in Mbp (physikalische Karte) bzw. cM (genetische Karte) angegeben, homologe Marker sind mit einer Linie verbunden, farblich markierte Marker zeigen eine signifikante Korrelation mit einem der untersuchten Merkmale. Rechts neben den Markernamen ist das Merkmal angegeben, zu welchem eine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Für die Merkmale Pollenausbeute (hellgrün), Anzahl an Früchten (Früchte, rot, QNF_3.1, QNF_3.2, QNF_3.3) sowie Anzahl an samenhaltigen Früchten (samenhaltigeFrüchte, braun) konnten signifikante Marker/Merkmal-Assoziationen nachgewiesen werden. Entlang des Chromosoms sind die LOD-Werte der Intervallkartierung aufgetragen. Signifikanzschwellen sind in der Farbe des jeweiligen Merkmals eingezeichnet. Durchgängige Gerade: genomweite Signifikanzschwelle, gestrichelte Gerade: chromosomenweite Signifikanzschwelle.

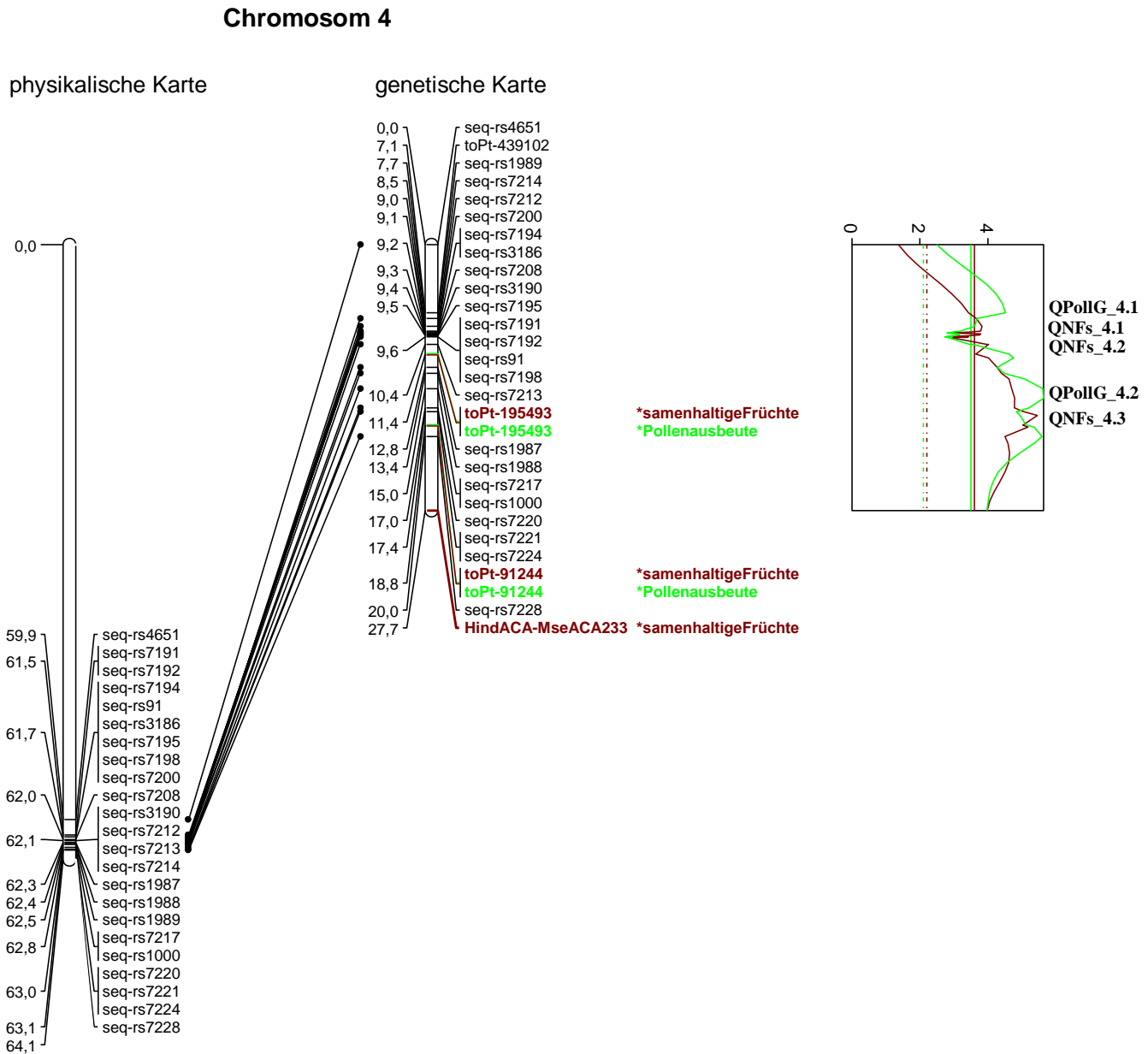
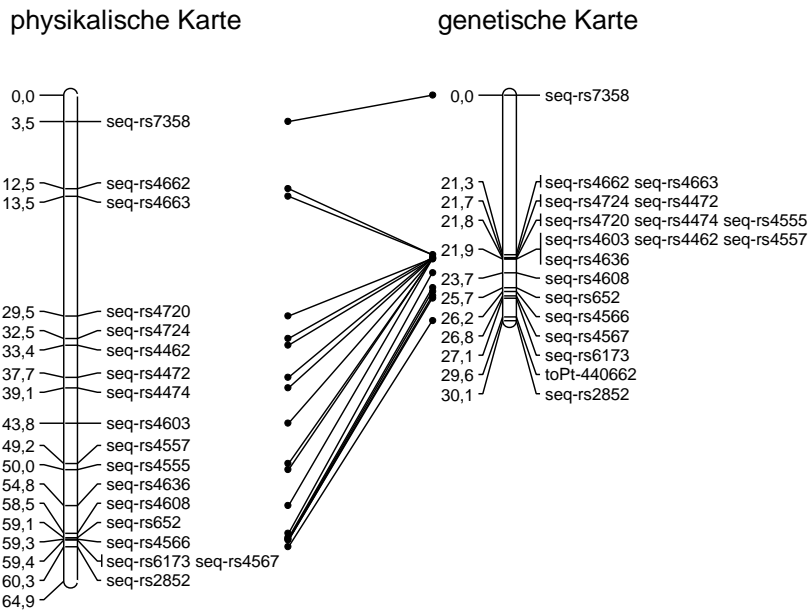


Abbildung 3.18: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte sowie Identifizierung von QTL auf Chromosom 4. Die Position der Marker ist in Mbp (physikalische Karte) bzw. cM (genetische Karte) angegeben, homologe Marker sind mit einer Linie verbunden, farblich markierte Marker zeigen eine signifikante Korrelation mit einem der untersuchten Merkmale. Rechts neben den Markernamen ist das Merkmal angegeben, zu welchem eine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Für die Merkmale Anzahl an samenhaltigen Früchten (samenhaltigeFrüchte, braun, QNFs_4.1, QNFs_4.2, QNFs_4.3) sowie Pollenausbeute (Pollenausbeute, hellgrün, QPollG_4.1, QPollG_4.2) konnten signifikante Marker/Merkmal-Assoziationen nachgewiesen werden. Entlang des Chromosoms sind die LOD-Werte der Intervallkartierung aufgetragen. Signifikanzschwellen sind in der Farbe des jeweiligen Merkmals eingezeichnet. Durchgängige Gerade: genomweite Signifikanzschwelle, gestrichelte Gerade: chromosomenweite Signifikanzschwelle.

Chromosom 5



Chromosom 12

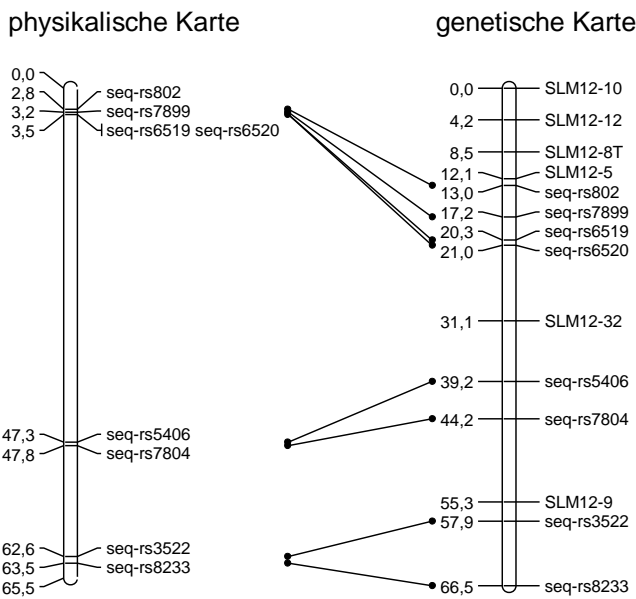


Abbildung 3.19: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte für die Chromosomen 5 und 12. Die Position der Marker ist in Mbp (physikalische Karte) bzw. cM (genetische Karte) angegeben. Homologe Marker sind mit einer Linie verbunden. Es konnten keine signifikanten Marker/Merkmal-Assoziationen oder QTL auf diesen Chromosomen detektiert werden.

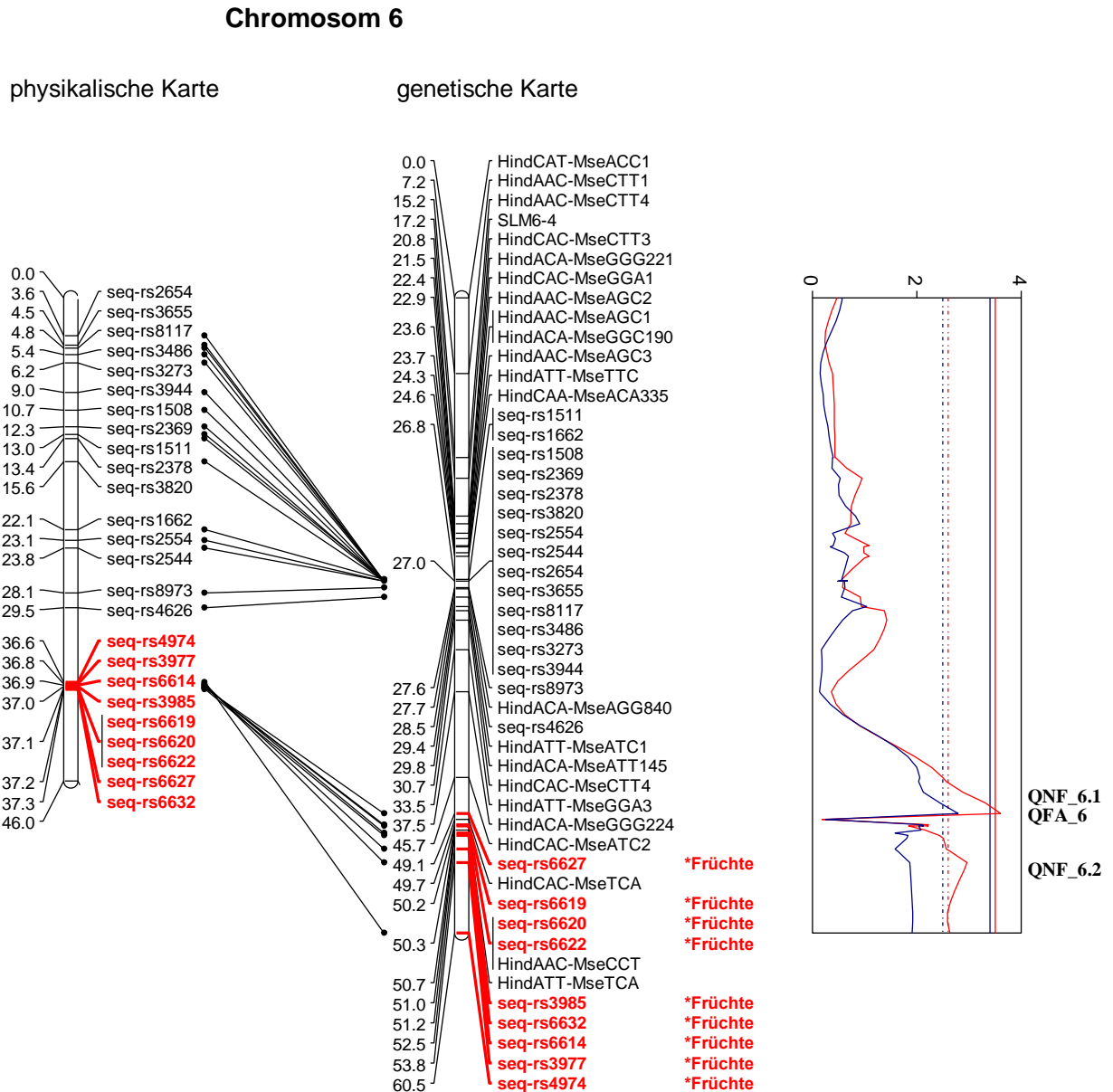


Abbildung 3.20: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte sowie Identifizierung von QTL auf Chromosom 6. Die Position der Marker ist in Mbp (physikalische Karte) bzw. cM (genetische Karte) angegeben, homologe Marker sind mit einer Linie verbunden, farblich markierte Marker zeigen eine signifikante Korrelation mit einem der untersuchten Merkmale. Rechts neben den Markernamen ist das Merkmal angegeben, zu welchem eine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Für die Merkmale Anzahl an Früchten (Früchte, rot, QNF_6.1, QNF_6.2) sowie Fruchtansatz (Fruchtansatz, blau, QFA_6, nur in der Intervallkartierung) konnten signifikante Marker/Merkmal-Assoziationen nachgewiesen werden. Entlang des Chromosoms sind die LOD-Werte der Intervallkartierung aufgetragen. Signifikanzschwellen sind in der Farbe des jeweiligen Merkmals eingezeichnet. Durchgängige Gerade: genomweite Signifikanzschwelle, gestrichelte Gerade: chromosomenweite Signifikanzschwelle.

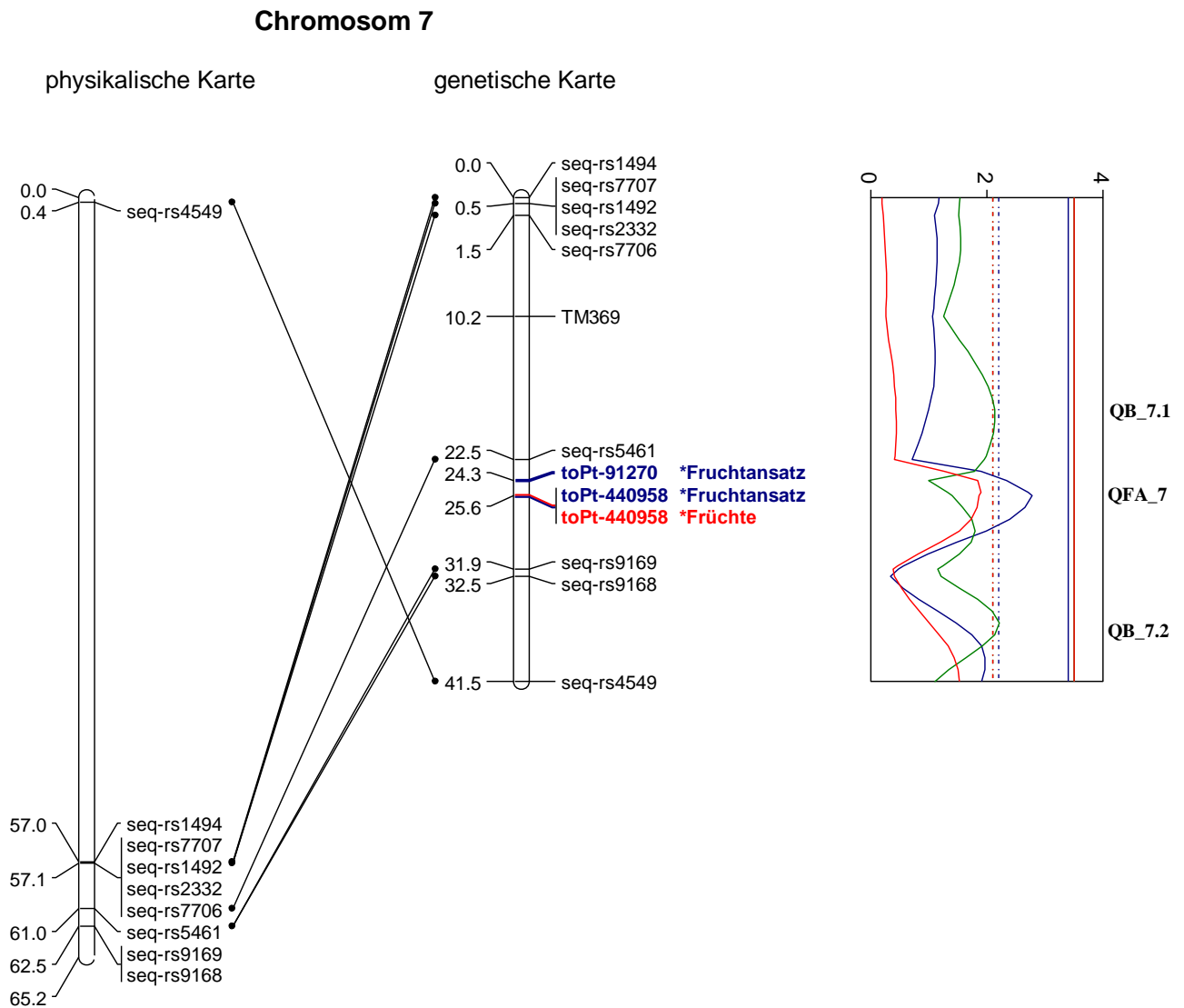


Abbildung 3.21: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte sowie Identifizierung von QTL auf Chromosom 7. Die Position der Marker ist in Mbp (physikalische Karte) bzw. cM (genetische Karte) angegeben, homologe Marker sind mit einer Linie verbunden, farblich markierte Marker zeigen eine signifikante Korrelation mit einem der untersuchten Merkmale. Rechts neben den Markernamen ist das Merkmal angegeben, zu welchem eine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Für die Merkmale Anzahl an Früchten (Früchte, rot), Fruchtansatz (Fruchtansatz, blau, QFA_7) und Anzahl an Blüten (Blüten, dunkelgrün, QB_7.1, QB_7.2, nur in der Intervallkartierung) konnten signifikante Marker/Merkmal-Assoziationen nachgewiesen werden. Entlang des Chromosoms sind die LOD-Werte der Intervallkartierung aufgetragen. Signifikanzschwellen sind in der Farbe des jeweiligen Merkmals eingezeichnet. Durchgängige Gerade: genomweite Signifikanzschwelle, gestrichelte Gerade: chromosomenweite Signifikanzschwelle.

Chromosom 8

physikalische Karte

genetische Karte

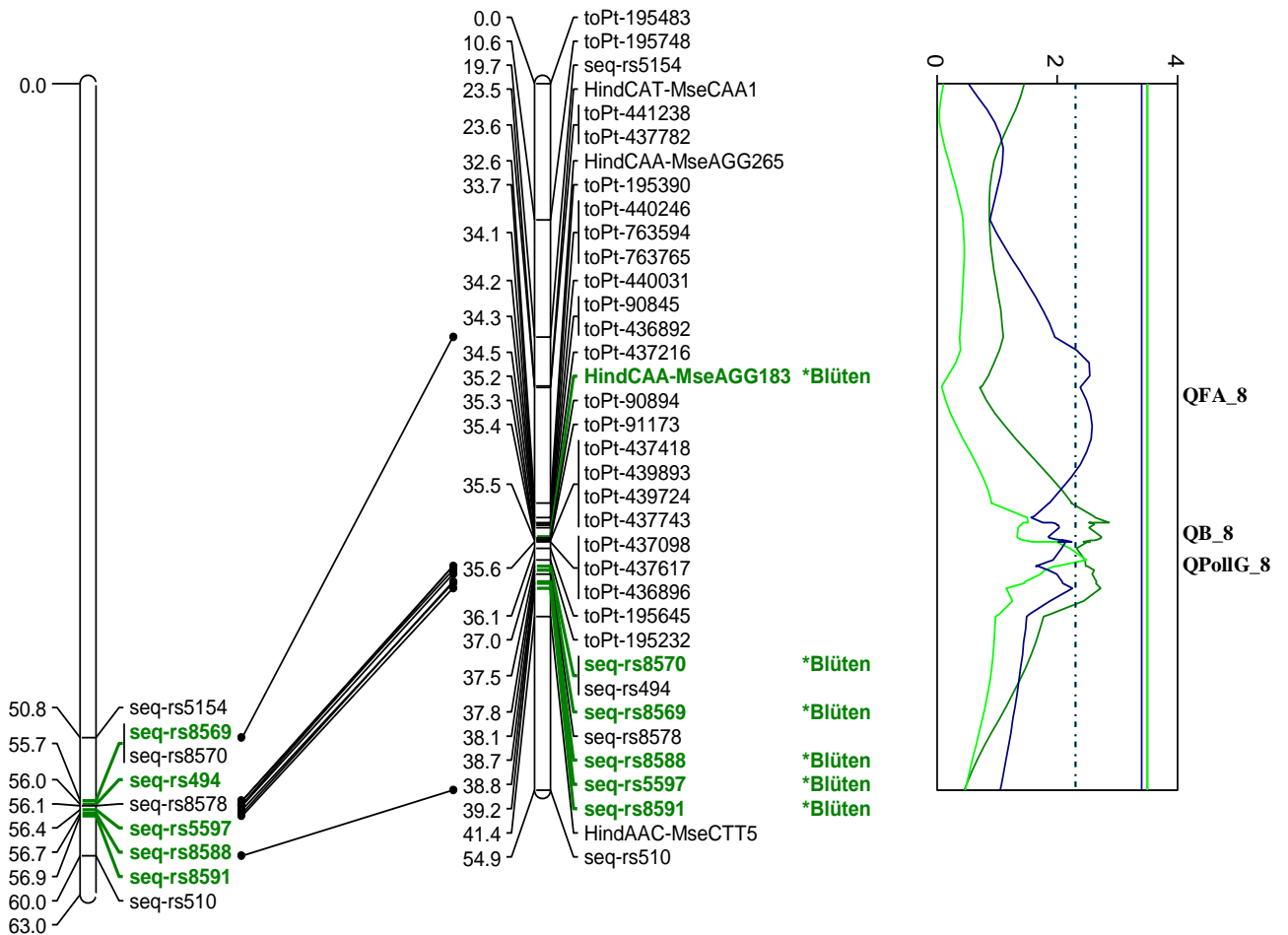
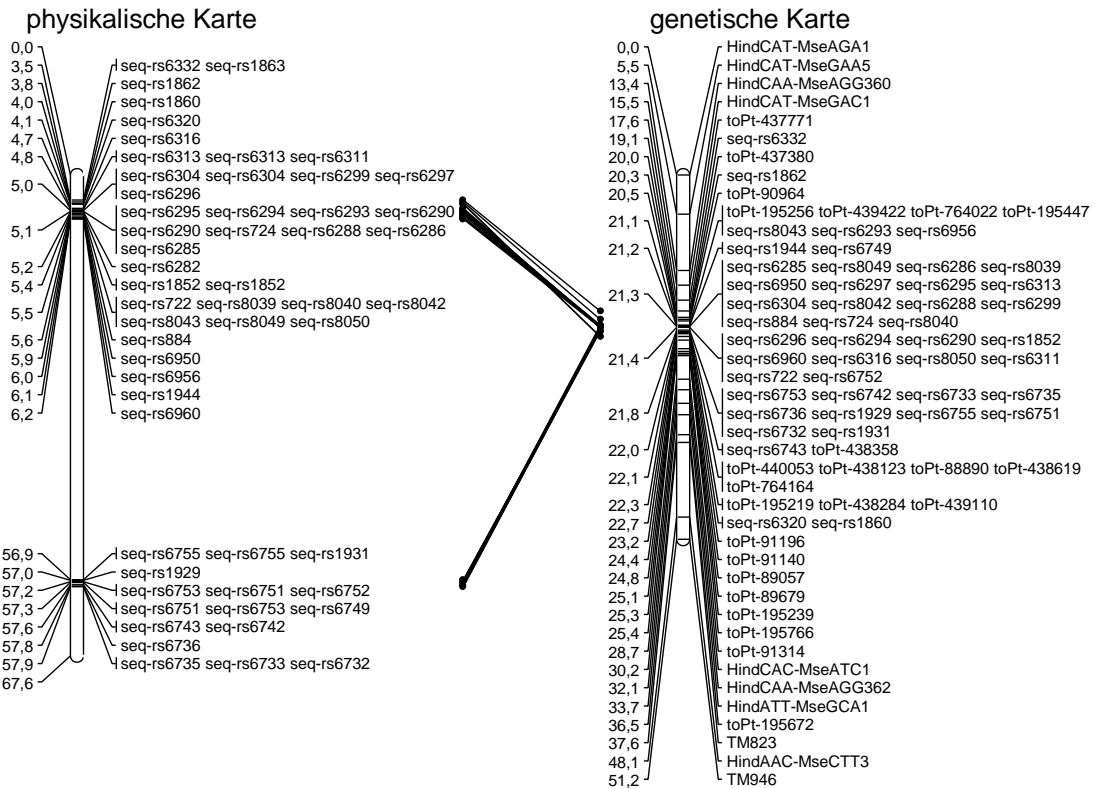


Abbildung 3.22: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte sowie Identifizierung von QTL auf Chromosom 8. Die Position der Marker ist in Mbp (physikalische Karte) bzw. cM (genetische Karte) angegeben, homologe Marker sind mit einer Linie verbunden, farblich markierte Marker zeigen eine signifikante Korrelation mit einem der untersuchten Merkmale. Rechts neben den Markernamen ist das Merkmal angegeben, zu welchem eine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Für die Merkmale Anzahl an Blüten (Blüten, dunkelgrün, QB_8), Pollenausbeute (hellgrün, QPollG_8) und Fruchtausatz (blau, QFA_8) konnten QTL identifiziert werden. Entlang des Chromosoms sind die LOD-Werte der Intervallkartierung aufgetragen. Signifikanzschwellen sind in der Farbe des jeweiligen Merkmals eingezeichnet. Durchgängige Gerade: genomweite Signifikanzschwelle, gestrichelte Gerade: chromosomenweite Signifikanzschwelle.

Chromosom 9



Chromosom 10

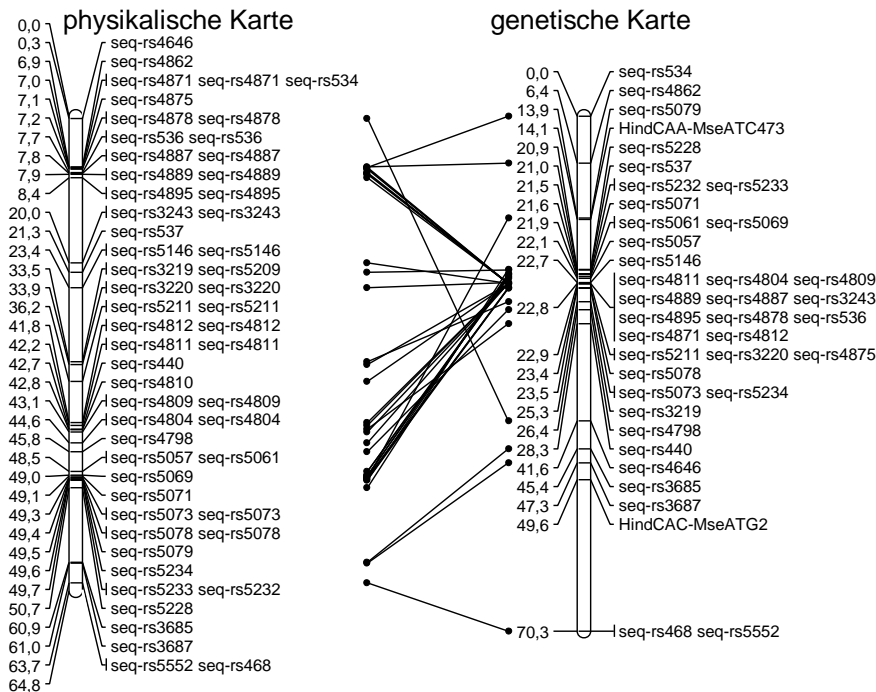


Abbildung 3.23: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte für die Chromosomen 9 und 10. Die Position der Marker ist in Mbp (physikalische Karte) bzw. cM (genetische Karte) angegeben. Homologe Marker sind mit einer Linie verbunden. Es konnten keine signifikanten Marker/Merkmal-Assoziationen oder QTL auf diesen Chromosomen detektiert werden.

Chromosom 11

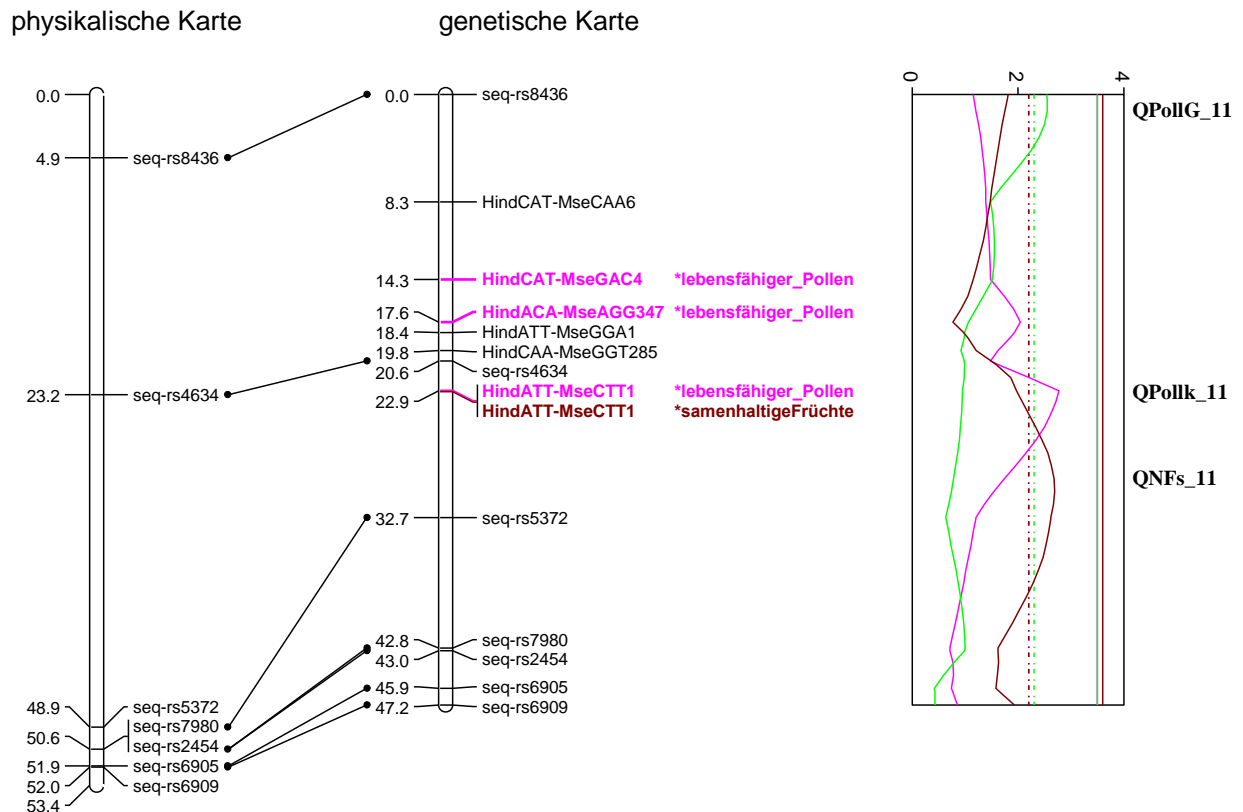


Abbildung 3.24: Vergleich der genetischen und physikalischen Karte sowie Identifizierung von QTL auf Chromosom 11. Die Position der Marker ist in Mbp (physikalische Karte) bzw. cM (genetische Karte) angegeben, homologe Marker sind mit einer Linie verbunden, farblich markierte Marker zeigen eine signifikante Korrelation mit einem der untersuchten Merkmale. Rechts neben den Markernamen ist das Merkmal angegeben, zu welchem eine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Für die Merkmale Pollenausbeute (hellgrün, QPollG_11, nur in der Intervallkartierung), lebensfähiger Pollen [%] (pink, QPollk_11) und Anzahl an samenhaltigen Früchten (samenhaltigeFrüchte, braun, QNFs_11) konnten signifikante Marker/Merkmal-Assoziationen nachgewiesen werden. Entlang des Chromosoms sind die LOD-Werte der Intervallkartierung aufgetragen. Signifikanzschwellen sind in der Farbe des jeweiligen Merkmals eingezeichnet. Durchgängige Gerade: genomweite Signifikanzschwelle, gestrichelte Gerade: chromosomenweite Signifikanzschwelle.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der QT-Kartierung. Analyse von Genomregionen mit signifikantem Einfluss auf die Merkmale Anzahl an Blüten pro Infloreszenz (B), Pollenausbeute (Poll_G), lebensfähiger Pollen [%] (Poll_k), Anzahl an Früchten pro Infloreszenz (N_F) und an samenhaltigen Früchten pro Infloreszenz (N_{Fs}) sowie des Fruchtansatzes (F_A). QTL: Name des QTL, Chr: chromosomale Position, Start bzw. End: Start- und Endposition des QTL auf der genetischen Karte in cM, LOD-Wert, M_{rechts} bzw. M_{links}: flankierende Marker des QTL, (V_P): erklärte phänotypische Varianz je QTL in Prozent, (S_C) bzw. (S_G): chromosomenweite bzw. genomweite Signifikanzschwelle, additiv bzw. Dominanz: additive bzw. Dominanzeffekte.

	QTL	Chr	Start	Ende	LOD	M _{links}	M _{rechts}	V _P	S _C	S _G	additiv	Dominanz
B	QB_7.1	7	18,2	20,2	2,14	TM369	seq-rs5461	6,2	2,1	3,5	-0,13	-0,18
	QB_7.2	7	36,5	37,5	2,21	seq-rs9168	seq-rs4549	6,4	2,1	3,5	-0,18	-0,24
	QB_8	8	33,6	40,2	2,86	HindCAA-MseAGG265	HindAAC-MseCTT5	8,2	2,3	3,5	0,09	-0,26
Poll_G	QPollG_4.1	4	3	8,5	4,52	seq-rs4651	seq-rs7214	13,1	2,1	3,5	-1956,72	728,62
	QPollG_4.2	4	11,4	27,7	5,66	seq-rs7213	HindACA-MseACA233	16,1	2,1	3,5	-831,27	-1880,39
	QPollG_8	8	37,0	37,0	2,48	toPt-195232	toPt-195232	7,4	2,3	3,5	-88,48	1381,28
	QPollG_11	11	0	3	2,56	seq-rs8436	HindCAT-MseCAA6	7,6	2,3	3,5	-926,5	-464,97
Poll_k	QPk_11	11	22,6	26,9	2,77	seq-rs4634	seq-rs5372	10,1	2,2	3,5	-4,26	2,67
N_F	QNF_3.1	3	24,4	25,4	2,43	seq-rs8412	seq-rs8404	7,4	2,4	3,5	0,13	0,05
	QNF_3.2	3	27,9	31,9	3,25	seq-rs8407	toPt-764157	9,7	2,4	3,5	0,15	0,03
	QNF_3.3	3	44,7	46,7	2,47	toPt-438269	seq-rs1679	7,5	2,4	3,5	0,09	0,12
	QNF_6.1	6	46,7	49,1	3,61	HindCAC-MseATC2	seq-rs6627	10,8	2,6	3,5	0,12	0,11
	QNF_6.2	6	53,5	57,8	2,96	seq-rs6614	seq-rs4974	8,9	2,6	3,5	0,13	0,05
N_{Fs}	QNFs_4.1	4	7,7	9	3,83	seq-rs1989	seq-rs7212	11,4	2,2	3,6	-0,22	0,07
	QNFs_4.2	4	9,3	9,4	3,79	seq-rs7208	seq-rs3190	11,3	2,2	3,6	-0,23	0,09
	QNFs_4.3	4	10,4	27,7	5,34	seq-rs7213	HindACA-MseACA233	15,5	2,2	3,6	-0,37	0,23
	QNFs_11	11	24,9	37,7	2,69	HindATT-MseCTT1	seq-rs7980	8,1	2,2	3,6	-0,12	0,13
F_A	QFA_6	6	48,7	49,1	2,79	HindCAC-MseATC2	seq-rs6627	8,6	2,5	3,4	0,31	0,35
	QFA_7	7	24,3	27,6	2,78	toPt-91270	seq-rs9169	8,6	2,2	3,4	0,43	0,08
	QFA_8	8	20,7	29,6	2,58	seq-rs5154	HindCAA-MseAGG265	8	2,3	3,4	0,08	0,60

3.6 Identifizierung von Kandidatengenenen für die Hitzetoleranz der Tomate

Die Ergebnisse der QTL-Kartierung und der Expressionsstudie wurden in die physikalische Karte des Tomatengenoms integriert. In beiden Studien konnten die starken Einflüsse zahlreicher distaler Genomregionen nachgewiesen werden.

Für die Merkmale Anzahl an Blüten pro Infloreszenz und Fruchtansatz konnten zwei QTL auf Chromosom 8 im Intervall zwischen 55,7 Mbp und 56,9 Mbp identifiziert werden (QB_8, QFA_8). In dieser Region wurden im Rahmen der Expressionsstudie starke Regulationsvorgänge als Antwort auf einen Hitzestress nachgewiesen (Tabelle 3.13). Die stärksten Regulationen waren für Transkripte Pectinacetyltransferase-ähnlicher Proteine (TC204141, TC202602) zu beobachten, welche in hitzesensitiven Genotypen im Vergleich zwischen Normal- und Hitzestressbedingung starke Herunterregulationen (7,8-fach) und im Vergleich zu den hitzetoleranten Genotypen unter Normalbedingungen eine höhere Expressionsstärke (14,6-fache Herunterregulation) aufwiesen.

In die QTL-tragende Genomregion auf Chromosom 3, welche einen Einfluss auf das Merkmal Anzahl an Früchten aufweist, 5 SNP-Marker beinhaltet und im Bereich zwischen 24 cM und 47 cM lokalisiert ist, konnten unter Hitzestress differentiell exprimierte Gene aus der Expressionsstudie intergriert werden. Insgesamt wurden 24 signifikante Regulationen in dieser Genomregion nachgewiesen. Die stärkste Regulation weist das Transkript eines Calmodulin ähnlichen Proteins (TC193615) in hitzesensitiven Genotypen zwischen den Temperaturregimen auf (3,02-fach). Ebenfalls stärker reguliert waren Transkripte einiger Zinc-finger ähnlichen Proteine (TC212242, TC197560), zweier MYB Transkriptionsfaktoren (TC205861, TC193256) sowie eines WRKY Transkriptionsfaktors (TC207230).

Auf Chromosom 6 konnten Regionen identifiziert werden, welche einen Einfluss auf die Merkmale Anzahl an Früchten pro Infloreszenz und Fruchtansatz aufwiesen. Die QTL konnten auf der genetischen Karte zwischen 46 cM und 58 cM, auf der physikalischen Karte zwischen 36,6 Mbp und 37,0 Mbp lokalisiert werden. Innerhalb dieses Intervalls sind 9 SNP-Marker mit den untersuchten Merkmalen assoziiert. 3 in Antheren der Tomate differentiell exprimierte Gene sind in diesem Intervall enthalten. Diese kodieren eine GDSL Esterase/Lipase (TC196088, TC217023), einen BHLH Transkriptionsfaktor (TC208318) sowie ein FAD-bindendes Domänen-beinhaltenes Protein (TC216007). Die stärkste Regulation konnte für Transkripte der GDSL Esterase/Lipase mit einer fast 3-fachen Hochregulation in den hitzetoleranten Genotypen zwischen optimalen Temperaturbedingungen und Hitzestress bzw. einer 2,7-fachen Herunterregulation unter Normaltemperaturen zwischen den hitzesensitiven und -toleranten Genotypen beobachtet werden.

4. Diskussion

4.1 Einfluss unterschiedlicher Klimafaktoren des Hitzestresses auf Merkmale des Pollens

PEET UND BARTHOLEMEW (1996), SATO et al. (2002) und SATO et al. (2006) beschrieben den negative Einfluss von Hitzestress auf die Ausbildung und Lebensfähigkeit des Pollens sowie der Antherenentwicklung in Tomaten und der daraus resultierenden Ertragsreduktion von vermarktungsfähigen Früchten. Neben der von ihnen untersuchten durchschnittlichen Tagestemperatur bzw. der Nachttemperatur mit optimaler Tagestemperatur können auch andere Klimafaktoren eine wichtige Rolle bei der Ausbildung lebensfähiger Pollenkörner spielen. Die Unterschiede zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen wurden in Bezug auf ihre Beeinflussung durch Klimakomponenten nicht untersucht. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einiger Klimafaktoren des Hitzestresses wie der minimalen Tagestemperatur in Zusammenhang mit einer erhöhten maximalen Tagestemperatur, der Bodentemperatur in einer Tiefe von 10 cm bzw. 30 cm sowie der Luftfeuchtigkeit auf pollenbezogene Merkmale in hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen analysiert.

Der Einfluss der minimalen Tagestemperatur in Zusammenhang mit einer erhöhten maximalen Tagestemperatur auf ausgewählte Merkmale wurde sowohl unter kontrollierten Bedingungen als auch im Freiland evaluiert. In beiden Temperaturregimen konnten signifikant negative Zusammenhänge zwischen der minimalen Tagestemperatur und den drei untersuchten Merkmalen Pollenausbeute, Anzahl lebensfähiger sowie nicht lebensfähiger Pollenkörner unter Hitzestressbedingungen nachgewiesen werden (Tabelle 3.1 und 3.2). Eine geringere Abkühlung im Verlauf des Tages hat folglich einen starken Einfluss auf die Produktion bzw. Lebensfähigkeit des Pollens bei der Tomate. Der von PEET UND BARTHOLEMEW (1996) beschriebene Effekt einer erhöhten Nachttemperatur unter optimalen Tagestemperaturen auf Merkmale des Pollens konnte somit in dieser Studie auch unter erhöhter Tagestemperatur bestätigt werden. Hierbei wies eine erhöhte Nachttemperatur sogar einen stärkeren Effekt auf pollenbezogene Merkmale auf als eine erhöhte Tagestemperatur. KHANAL et al. (2013) untersuchten den Effekt der mittleren Tagestemperatur in unterschiedlichen Temperaturregimen. Diese variierten zwischen 24°C/ 17°C, 27°C/ 14°C und 30°C/ 11°C (Tag/Nacht). Sie fanden heraus, dass nicht die mittlere Tagestemperatur sondern die maximale bzw. minimale Tagestemperatur entscheidend für die Ausprägung von Merkmalen wie die Pollenproduktion, Pollenkeimfähigkeit und Fruchtqualität ist. Das Temperaturregime 30°C/ 11°C wirkte sich am positivsten auf die untersuchten Merkmale aus. MOORE UND THOMAS (1952) beobachteten einen großen Einfluss einer erhöhten Nachttemperatur auf das Merkmal Fruchtansatz, für welches die Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern auf Grund der starken Korrelation als indirekter Selektionsparameter verwendet wird (SATO et al. 2000). Diese Beobachtung lässt ebenfalls auf die positiven Einflüsse einer nächtlichen Temperaturabkühlung auf die Lebensfähigkeit des Pollens unter Hitzestress schließen. PEET et al. (1997) beobachteten hingegen einen stärkeren Effekt der durchschnittlichen Tagestemperatur anstatt der durchschnittlichen Nachttemperatur auf die Tomatenproduktion.

Eine negative Beeinflussung der Pollenmerkmale durch eine verringerte Nachtabkühlung konnte hauptsächlich

für die hitzesensitiven Linien beobachtet werden. In der hitzetoleranten Gruppe konnten Beeinflussungen des Pollens durch eine erhöhte nächtliche Temperatur nur zum Boniturzeit und nicht 10 Tage vor der Anthese nachgewiesen werden. Das sowie der fehlende Effekt der maximalen Tagestemperatur auf den Pollen hitzetoleranter Linien legt nahe, dass pollenbezogene Merkmale hitzetoleranter Pflanzen zum Zeitpunkt der bislang publizierten Wirkung des Hitzestresses auf die Ausbildung funktionalen Pollens 10 Tage vor der Anthese (SATO et al. 2002) kaum vom Hitzestress beeinflusst werden, dadurch eine hohe Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern und damit auch an potentiell keimfähigem Pollen bilden können und erst durch einen später einsetzenden Effekt des Hitzestresses die Keimfähigkeit der lebensfähigen Pollenkörner verlieren. Diese These müsste im Rahmen eines kontrollierten Experiments überprüft werden.

PRESSMAN et al. (2002) und FIRON et al. (2006) beobachteten den starken Effekt von Hitzestress auf die Merkmale Pollenausbeute, -keimfähigkeit sowie -lebensfähigkeit. FIRON et al. (2006) konnten zusätzlich Unterschiede zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen detektieren. Sie führten die Hitzesensitivität auf einen reduzierten Stärkegehalt im entwickelnden Pollenkorn drei Tage vor der Anthese und einen daraus resultierenden Abfall des Gehalts an löslicher Stärke im voll entwickelten Pollen zurück. Eine Unterscheidung zwischen dem Einfluss minimaler bzw. maximaler Tagestemperaturen fand nicht statt. HARSANT et al. (2013) beobachteten einen verstärkten negativen Einfluss einer erhöhten Nachttemperatur zusätzlich zu einer hohen Tagestemperatur auf die Anzahl an Pollenkörnern und deren Lebensfähigkeit in *Brachypodium distachyon*.

Neben der minimalen Tagestemperatur wurde der mit diesem Merkmal korrelierte Klimafaktor Bodentemperatur in einer Tiefe von 10 cm und 30 cm im Freiland untersucht. Auf Grund der stark positiven Korrelation wurde erwartet, dass diese ebenfalls einen positiven Effekt auf Pollenmerkmale aufweisen. In einer Bodentiefe von 10 cm konnten allerdings stark negative Auswirkung des Hitzestresses auf pollenbezogene Merkmale besonders in hitzesensitiven Genotypen nachgewiesen werden. In einer Tiefe von 30 cm kehrte sich der Effekt um, so dass dort stark positive Einflüsse insbesondere in den hitzetoleranten Linien auftraten. Das deutet darauf hin, dass hitzetolerante Sorten durch ein tieferes Wurzelsystem positive Effekte der Bodentemperatur in 30 cm Tiefe auf die Lebensfähigkeit und Ausbeute des Pollens besser nutzen können als hitzesensitiven Genotypen. Diese These müsste in einem Experiment unter kontrollierten Bedingungen entweder invasiv durch Ausgraben der Wurzeln oder nicht-invasiv durch innovative bildgebende Methoden überprüft werden. MORALES et al. (2003) beschrieben in diesem Zusammenhang eine Beeinflussung der Wasserleitfähigkeit der Wurzeln von Tomatenpflanzen durch Hitzestress und wiesen ebenfalls auf die Bedeutung des Wurzelraums hin. KHAN et al. (2014) untersuchten den Effekt von Acetyl-Salicylsäure und 24-Epibrassinolid als bekannte Chemikalien zur exogenen Applikation zur Unterstützung der Pflanze unter Stressbedingungen an 4 Wochen alten Sämlingen der Tomate. Sie fanden heraus, dass unter wiederkehrenden Hitzeschockbedingungen von 46 °C für 4 Stunden pro Tag und 21 Tagen Dauer die Wurzelbildung stark reduziert, der Hitzeschockeffekt allerdings durch exogene Zugabe der beiden Substanzen abgemildert werden

konnte. Dies stellt einen Ansatz dar, die Hitzetoleranz der Tomate bei permanentem Hitzestress auch in hitzesensitiven Sorten zu erhöhen. Da allerdings eine andauernde Applikation dieser beiden Substanzen nicht wünschenswert ist, sollte untersucht werden, ob diese beiden Stoffe in genetischen Ressourcen verstärkt vorkommen und mittels markergestützter Selektion für die kultivierten Arten nutzbar gemacht werden können. REYNOLDS UND EWING (1989) untersuchten den Einfluss erhöhter Luft- und Bodentemperaturen auf die Wurzeln, den Spross und die Knolle bei der Kartoffel (*Solanum tuberosum*). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine Kühlung des Bodens die Entwicklung des Sprosses unter hohen Lufttemperaturen fördert und die Ausbildung von Hitzestresssymptomen verringert. Diese Beobachtung deutet auf eine entscheidende Rolle des Wurzelsystems in der Ausbildung einer Hitzetoleranz hin.

Ein weiterer, in dieser Studie untersuchter Klimafaktor ist die Luftfeuchtigkeit. Für diese waren signifikant negative Korrelationen zu den untersuchten pollenbezogenen Merkmalen zu beobachten. Der stärkste Effekt der relativen Luftfeuchtigkeit konnte um den Boniturzeitpunkt herum nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass ein negativer Einfluss auf den reifen Pollen vorlag. Bei getrennter Betrachtung der Toleranztypen konnte eine stärkere Beeinflussung der hitzetoleranten Genotypen durch diesen Klimafaktor gezeigt werden. Auch hier waren maximale Effekte der Luftfeuchte zum Boniturzeitpunkt zu beobachten ($r=-0,4$ für das Merkmal lebensfähiger Pollen). Eine hohe Luftfeuchtigkeit beeinflusst somit die Lebensfähigkeit des vollständig ausgebildeten Pollens vor allem in hitzetoleranten Sorten negativ. PEET et al. (2003) untersuchten den Einfluss der Luftfeuchte auf drei verschiedene Genotypen und beobachteten, dass eine zu hohe (90%) bzw. zu niedrige (30%) Luftfeuchte einen stark negativen Einfluss auf die Ausbildung von Pollenkörnern hat und zum Abwurf der Blüten besonders beim hitzetoleranten Genotyp führt. Eine zu hohe Luftfeuchtigkeit resultierte in einem Entwicklungsabbruch im jungen Pollenstadium, während eine zu niedrige Luftfeuchte das Mikrosporenstadium beeinflusste. Für die niedrige Luftfeuchtigkeit wurde vermutet, dass eine erschwerte Wasserversorgung in den Pflanztopfen und eine dadurch auftretende Welke der Pflanzen für die beobachteten Effekte verantwortlich war. PEET et al. (2003) beobachteten einen stärkeren Einfluss der Luftfeuchtigkeit als einer erhöhten Lufttemperatur auf die Pollenentwicklung. Über signifikante Unterschiede zwischen dem hitzetoleranten und dem -sensitiven Genotyp wurde nicht berichtet. Eine in der Studie von PEET et al. (1996) und PEET et al. (2003) sowie in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesene Korrelation zwischen der Lufttemperatur und der Luftfeuchte kann die Einschätzung der Einzeleffekte der beiden Komponenten allerdings beeinflusst haben. HAREL et al. (2014) beobachteten eine positive Korrelation zwischen der Lebensfähigkeit des Tomatenpollens und der Luftfeuchtigkeit (maximal 75%), konnten aber keine Korrelation zwischen der Luftfeuchtigkeit und der Lufttemperatur nachweisen. Sie fügten hinzu, dass der Effekt höherer Luftfeuchtigkeiten, wie sie beispielweise bei den oben genannten Arbeiten vorlag, noch zu untersuchen sei. Mit Hilfe der hier durchgeführten Versuche konnte ein erster Eindruck über die Einflusskraft bestimmter Klimafaktoren des Hitzestresses auf Genotypen unterschiedlichen Hitzetoleranztyps und deren Bedeutung für die Ausprägung von Merkmalen des Pollens gewonnen werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollten

weiterführende Forschungen besonders in Hinblick auf den Einfluss von Hitzestress auf das Wurzelsystem und der damit verbundenen Bodentemperatur angestrebt werden.

4.2 Statistische Analyse der Zusammenhänge zwischen phänotypischen Merkmalen

Für die gezielte Selektion hitzetoleranter Sorten ist es wichtig, möglichst schnell und zuverlässig die Leistungsfähigkeit eines Kandidaten unter Hitzestressbedingungen einschätzen zu können. Da die Beurteilung des Toleranztyps in Bezug auf Fruchtmerkmale erst nach der Ernte erfolgen kann, ist es wünschenswert, indirekte Selektionsparameter zur frühzeitigen Reduzierung des Prüfumfanges heranziehen zu können. Ebenfalls wichtig ist die Analyse der Übertragbarkeit der unter kontrollierten Bedingungen detektierten Merkmalszusammenhänge, um den Umfang von kostenintensiven Feldexperimenten zur Einstufung einer Hitzetoleranz reduzieren zu können. Neben diesen selektionsbezogenen Fragestellungen ist auch die Analyse der Erbllichkeit züchterisch interessanter Merkmale unter Hitzestressbedingungen entscheidend, um die Aussagekraft der in der vorliegenden Studie erarbeiteten Ergebnisse sowie deren Nutzungsmöglichkeiten in der praktischen Züchtung beurteilen zu können.

In der vorliegenden Studie konnten signifikante Zusammenhänge zwischen einer Vielzahl an Merkmalen detektiert werden. So wiesen die Merkmale Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner eine stark positive Korrelation ($r=0,81$) sowohl unter kontrollierten Hitzestress- als auch unter Freilandbedingungen auf. Ein ebenfalls stark positiver Zusammenhang konnte für die Merkmale Pollenausbeute bzw. Anzahl lebensfähiger Pollenkörner und der Anzahl an Früchten pro Pflanze unter kontrollierten Hitzestressbedingungen hergestellt werden ($r=0,81$ bzw. $r=0,93$). Diese Ergebnisse bestätigen Beobachtungen, welche einen reduzierten Fruchtansatz mit einem durch Hitzestress geschädigten Pollen und einer verringerten Bildung samenhaltiger Früchte verbinden (PEET et al., 1997; PEET et al., 1998; SATO et al., 2001; FIRON et al., 2006). SATO et al. (2000) brachten einen reduzierten Fruchtertrag unter Hitzestress mit einer gestörten Ausschüttung des Pollens sowie deren Keimfähigkeit in Verbindung. PORCH UND JAHN (2001) beobachteten den negativen Effekt von Hitzestress auf die Antherenentwicklung, die Lebensfähigkeit des Pollens sowie den Ertrag in einem hitzesensitiven Genotyp bei *Phaseolus vulgaris*, während eine hitzetolerante Linien vom Stress unbeeinflusst blieb. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass der beobachtete Zusammenhang zwischen der Lebensfähigkeit des Pollens und der Anzahl an Früchten spezifisch unter Hitzestressbedingungen auftrat. Unter optimalen Temperaturbedingungen konnte ein schwächerer, nicht signifikanter Zusammenhang beobachtet werden ($r=0,34$, nicht signifikant). Daraus lässt sich schließen, dass die Vorhersage der Hitzetoleranz eines Genotyps an Hand der Merkmale Pollenausbeute bzw. Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern nur unter Hitzestressbedingungen und sowohl unter kontrollierten als auch Freilandbedingungen erfolgen kann.

Ein weiteres, mit dem Merkmal Fruchtansatz korreliertes Merkmal ist der Blühbeginn. Dieser wurde unter kontrollierten Bedingungen bonitiert und wies eine signifikant negative Korrelation von $r=-0,88$ zum Fruchtansatz auf. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass ein früher Blühbeginn mit einem erhöhten

Fruchtansatz unter moderatem Hitzestress einhergeht und eine Selektion von frühblühenden Genotypen zur Steigerung der Hitzetoleranz und damit des Ertrages im Freiland in tropischen und subtropischen Gebieten führen kann. Da keine Fruchtmerkmale im Freilandversuch erhoben wurden, muss diese These in nachfolgenden Experimenten bestätigt werden.

In Bezug auf das Merkmal Samenindex, also der Menge an Samen in der Frucht, konnten signifikante Zusammenhänge zu den Merkmalen Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner im Freiland nachgewiesen werden ($r= 0,69$ bzw. $r= 0,64$). Unter kontrollierten Bedingungen war ein nicht signifikanter Effekt der Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern auf die Ausprägung des Samenindex sichtbar ($r= 0,48$, nicht signifikant). Da für die Züchtung hitzetoleranter Sorten die Evaluierung im Feld entscheidend ist und auch von SATO et al. (2001) ein Zusammenhang zwischen der Anzahl an samenhaltigen Früchten und der Pollenqualität nachgewiesen wurde, können beide Pollenmerkmale als Selektionsparameter für die Bildung samenhaltiger Früchte unter Hitzestressbedingungen herangezogen werden.

Stark negative Zusammenhänge konnten zwischen den Merkmalen Samenindex und Parthenokarpie unter moderatem Hitzestress hergestellt werden. Diese traten sowohl im Feld ($r= -0,87$) als auch im Gewächshaus ($r= -0,88$) in fast identischen Stärken auf, so dass eine Selektionsentscheidung in Bezug auf dieses Merkmal in Gewächshausversuchen getroffen werden kann. Die starke Korrelation der beiden Merkmale kann dadurch begründet sein, dass fehlendes Gelee in der Frucht die Bildung von Samenanlagen verschlechtert und so zu einer verminderten Samenbildung führt. Die unter kontrollierten Bedingungen beobachteten Korrelationen traten sowohl unter Hitzestress als auch unter Optimalbedingungen in ähnlichen Stärken auf ($r= -0,84$ bzw. $r= -0,76$). Eine Selektion kann folglich unter optimalen Temperaturbedingungen erfolgen. Die Leistungsfähigkeit der selektierten Pflanzen unter Hitzestress kann allerdings nicht in Versuchen unter Normalbedingungen vorhergesagt werden.

Ein weiteres Merkmal, dessen Funktion in der Ausbildung einer Hitzetoleranz diskutiert wird, ist die Ausstülpung des Stigmas. In den hier durchgeführten Versuchen konnten keine klaren Unterschiede in der Ausprägung dieses Merkmals zwischen Hitzestress- und Optimalbedingung, dafür aber genotypspezifische Unterschiede festgestellt werden. So wies der hitzesensitive Genotyp CA4 keine Stigma-Ausstülpung auf, während diese im hitzetoleranten Genotyp CLN1621L sehr häufig auftrat. Es könnte sich hierbei also entsprechend der Beobachtung von KINET UND PEET (1997) und SATO et al. (2006) um ein toleranzbeeinflussendes, aber genotypspezifisches Merkmal handeln. Grund für die Ausprägung dieses Merkmals ist ein gestörter Zuckermetabolismus, welcher zu einer Beeinflussung des Antherenwachstums und damit zu einer Verkürzung der Antheren führt (SATO et al., 2006). Innerhalb der Korrelationsstudie dieser Arbeit konnten keine klaren Zusammenhänge zu anderen Merkmalen hergestellt werden. Während unter Freilandbedingungen und moderatem Hitzestress signifikant positive Korrelationen ($r= 0,58$) zur Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern und signifikant negative zur Fruchthöhe ($r= -0,58$) beobachtet wurden, traten unter kontrollierten Hitzestressbedingungen starke, nicht signifikante Korrelationen auf, die die Zusammenhänge unter

Freilandbedingungen bekräftigten (lebensfähiger Pollen: $r=0,55$) aber auch anzweifelten (Fruchthöhe: $r=0,21$). Dies deutet darauf hin, dass die Ausstülpung des Stigmas von anderen Faktoren als dem Hitzestress abhängt. Trotz einer stark signifikanten Korrelation zwischen Merkmalen des Pollens und dem Samenindex bzw. der starken Korrelation zwischen dem Samenindex und der Parthenokarpie der Früchte konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen pollenbezogenen Merkmalen und dem Grad an Parthenokarpie der Früchte, weder im Freiland noch im Gewächshaus, beobachtet werden. Allerdings konnten in beiden Experimenten negative Korrelationskoeffizienten in Bezug auf diese Merkmale ermittelt werden, so dass ein Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden kann. Unter optimalen Temperaturbedingungen traten kaum Effekte auf.

Die Erbllichkeit eines Merkmals ist für die gezielte Züchtung hitzetoleranter Sorten und die Identifizierung von QTL-tragenden Genomregionen von großer Bedeutung. Für die in der vorliegenden Studie untersuchten Merkmale konnten mittlere bis hohe Heritabilitäten beobachtet werden. Züchterisch besonders wichtige Merkmale wie die Parthenokarpie oder der Samenindex wiesen Heritabilitäten von $H^2=0,77$ bzw. $H^2=0,71$ auf, was auf eine gute Erbllichkeit und geringe Beeinflussungen durch Umweltfaktoren schließen lässt. Mittlere Heritabilitäten konnten für die Merkmale Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner ermittelt werden ($H^2=0,63$ bzw. $H^2=0,68$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die untersuchten Merkmale eine hohe Umweltübertragbarkeit gegeben ist und diese als Selektionskriterium zur Einstufung einer Hitzetoleranz dienen können.

Für die Züchtung neuer Tomatensorten ist es wichtig, hitzetolerante Linien zu entwickeln und die Fruchtproduktion und -Qualität in den tropischen und subtropischen Anbaugebieten zu erhöhen. Als indirekte Selektionsparameter für die Einstufung der Hitzetoleranz ausgewählter Pflanzen können die Merkmale Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner herangezogen werden, um eine schnelle und effiziente Selektion möglichst in frühen Entwicklungsstadien der Pflanze vorzunehmen. Die Selektion muss dabei unter Hitzestressbedingungen erfolgen. Dies bedeutet einen hohen methodischen Aufwand und stellt die Züchtung vor eine Herausforderung. In Bezug auf das Merkmal Samenindex (samenhaltige Früchte) konnten Korrelationen zu Merkmalen des Pollens in beiden Experimenten (im Freiland und unter kontrollierten Bedingungen) nachgewiesen werden. Eine Einschätzung der Hitzetoleranz ausgewählter Genotypen basierend auf diesen indirekten Selektionsparametern kann in Bezug auf den Samenindex bereits in Gewächshausversuchen erfolgen. Die Verwendung der beiden Pollenmerkmale als indirekte Selektionsparameter für die Einschätzung des Grades an Parthenokarpie einer Tomatenfrucht unter Hitzestress ist durch die stark negative Korrelation zwischen den Merkmalen Samenindex und Parthenokarpie sowie die Korrelation des Samenindex zu den Pollenmerkmalen gegeben. Da ein direkter Zusammenhang zwischen der Parthenokarpie und den Pollenmerkmalen nicht nachgewiesen werden konnte, muss diese These in weiterführenden Analysen genauer untersucht werden.

4.3 Analyse der Hitzetoleranzmechanismen in Antheren der Tomate

4.3.1 Identifizierung von Genen mit Bedeutung in der Hitzestressantwort in Antheren

In der vorliegenden Studie wurden Hitzetoleranzmechanismen in entwickelnden Antheren unter langandauerndem moderatem Hitzestress auf Expressionsebene untersucht. Der Effekt solch eines Hitzestresses, wie er in tropischen und subtropischen Anbaugebieten natürlicherweise vorkommt, ist auf phänotypischer Ebene zahlreich untersucht worden. Hier konnten verstärkt Effekte auf Merkmale der generativen (MOORE UND THOMAS, 1952; KINET UND PEET, 1997; PEET et al., 1997; PEET et al., 1998; SATO et al., 2000; SATO et al., 2001; FOOLAD et al., 2005; SATO et al., 2006; FIRON et al., 2006) und seltener der vegetativen Entwicklung (MORALES et al., 2003; SATO et al., 2006) beobachtet werden. Die Aufklärung von Hitzetoleranzmechanismen erfolgte meist unter kurzzeitigem starkem und für die Pflanze auf lange Sicht lebensbedrohlichem Hitzestress, welcher schnellere, kurzfristige und extremere Reaktionen der Pflanze bedingt. Um ein Verständnis über die im praktischen Anbau auftretenden Ausprägungen der Hitzetoleranz zu erhalten und die Züchtung hitzetoleranter Sorten unterstützen zu können, müssen langfristige Toleranzmechanismen unter praxisnahen Bedingungen unter langandauerndem moderatem und für die Pflanze nicht lebensbedrohlichem Hitzestress aufgeklärt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, Schutzmechanismen der Pflanze vor allem in Hinblick auf den Erhalt der Lebensfähigkeit von Pollenkörnern zu identifizieren. Die Analyse der Hitzetoleranz erfolgte aus diesem Grund in ausgewählten Pflanzen einer für das Merkmal Anzahl lebensfähiger Pollenkörner spaltenden F₄-RIL-Population der Kreuzung CLN1621L (hitzetolerant) und CA4 (hitzesensitiv). Entsprechend SATO et al. (2002), welche starke Einflüsse des Hitzestresses auf die Lebensfähigkeit des Pollens zwischen 8 und 13 Tage vor der Anthese nachwies, wurden Proben von Antheren unter Hitzestress- bzw. Optimalbedingungen 10 und 5 Tage vor der Anthese untersucht und zur umfassenden Analyse der Hitzetoleranzmechanismen zusammengefasst. Um genotypspezifische Effekte in der Analyse zu minimieren, wurden jeweils vier hitzetolerante bzw. –sensitive Genotypen je Temperaturregime zu einer Probenmischung zusammengefügt.

4.3.1.1 Komplexität der Regulation in Antheren unter Hitzestress

Im Rahmen der Expressionsstudie wurden Transkriptregulationen hitzetoleranter (T) sowie hitzesensitiver (S) Genotypen unter Optimalbedingungen (N) und permanentem moderatem Hitzestress (H) in kontrollierten Bedingungen (N) miteinander verglichen. Insgesamt konnte für 1.897 (7,4 %) der 25.664 Sonden eine signifikante, differentielle Hybridisierung in einem der 5 Vergleiche (SN-SH, TN-TH, SN-TN, SH-TH, N-H) identifiziert werden. Dabei traten in der Antwort auf moderaten Hitzestress mehr Regulationen in den hitzesensitiven Genotypen (593 Regulationen mit 387 Hoch- und 206 Herunterregulationen) als in den hitzetoleranten Genotypen auf (106 Regulationen mit 28 Hoch- und 78 Herunterregulationen). Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BITA et al. (2011) nach einem kurzzeitigen

moderaten Hitzestress. Häufig traten Expressionsunterschiede zwischen den Toleranztypen unter optimalen Temperaturbedingungen auf (1.127 Regulationen mit 717 Hoch- und 410 Herunterregulationen), welche unter Hitzestressbedingungen nur noch vereinzelt zu beobachten waren (46 Regulationen mit 31 Hoch- und 15 Herunterregulationen). Dies lässt auf eine differentielle Ausgangssituation in der Genexpression bei hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen als Begründung für die unterschiedlichen Toleranzreaktionen schließen. Bei Analyse der toleranztypunabhängigen Hitzestressantwort konnten weniger Expressionsunterschiede zwischen Optimal- und Hitzestressbedingung beobachtet werden (340 Regulationen mit 184 Hoch- und 156 Herunterregulationen). Dies zeigt, dass eine Unterteilung in Toleranzgruppen zur Aufklärung der Hitzetoleranzmechanismen sinnvoll ist.

BITA et al. (2011) untersuchten die Expressionsunterschiede zwischen hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen in Tomatantheren unter kurzfristigem (2-30 Stunden) moderatem Hitzestress. Dabei erfassten sie die Reaktion der Pflanze auf eine plötzliche moderate Temperaturerhöhung, welche sich in Form von relativ wenigen Expressionsänderungen (95 Gene) von überwiegend bekannten Hitzeschockproteinen sowie der zeitlichen Begrenzung der Vielzahl der Regulationen auf einen Zeitraum bis 2 Stunden nach der Applikation zeigte. Hinzu kam, dass die Vielzahl der Regulationen abwärts gerichtet war. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit den hier erarbeiteten Erkenntnissen zu Hitzetoleranzmechanismen bei langandauerndem moderatem Hitzestress erbrachte nur selten Übereinstimmungen. Von den 95 differentiell exprimierten Genen aus BITA et al. (2011) waren 57 auf dem in dieser Arbeit verwendeten Microarray vertreten. 21 Transkripte dieser Gene zeigten eine signifikante Regulation, allerdings stimmten nur 14 davon in Regulationsrichtung und -Gruppe mit den Beobachtungen in BITA et al. (2011) überein. Die von BITA et al. (2011) beobachteten genotypspezifischen Regulationen konnten in der vorliegenden Studie häufig als nicht genotypspezifisch und in mehreren Vergleichen reguliert identifiziert werden. Die Verwendung unterschiedlichen Pflanzenmaterials erschwert allerdings den direkten Vergleich dieser Ergebnisse. Ein Abgleich der differentiellen Fragmente der cDNA-AFLP-Analyse von BITA et al. (2011) über die darin angegebenen TC-Nummern mit den Regulationsergebnissen der vorliegenden Arbeit erbrachte, dass 16 der 24 exprimierten Gene in der vorliegenden Arbeit untersucht worden sind, aber keine signifikante Transkriptregulation in einem der 5 Vergleiche nachgewiesen werden konnte. Es konnte lediglich eine nicht signifikante 2,63-fache Hochregulation eines Transkripts (TC213983) in den toleranten Genotypen zwischen Optimal- und Hitzestressbedingung beobachtet werden. Aus dem Vergleich dieser beiden Arbeiten lässt sich auf Grund der beiderseitigen Verwendung meiotischer Antheren schließen, dass große Unterschiede in der Reaktion auf kurzzeitigen bzw. langandauernden Hitzestress in Antheren hitzetoleranter und hitzesensitiver Tomaten bestehen und eine Analyse unter praxisnahen Bedingungen tropischer und subtropischer Anbaugebiete der Tomate unter langanhaltendem moderatem Hitzestress für die Einschätzung der langfristigen Hitzetoleranzmechanismen anzuraten ist.

Auf der Ebene der Mikrosporen analysierten FRANK et al. (2009) die Expressionsänderungen in Tomaten unter kurzfristigem extremem Hitzeschock (43°C - 45 °C für 2 Stunden). Sie beobachteten sowohl im hitzetoleranten

als auch im hitzesensitiven Genotyp starke Beeinflussungen der Pflanzenentwicklung durch die gewählten Temperaturen und konnten auf Grund des extremen Hitzestresses weder auf phänotypischer, noch auf regulatorischer Ebene Unterschiede zwischen den Hitzetoleranztypen feststellen. Insgesamt identifizierten sie nur wenige Regulationen (Transkripte von 30 Genen). Diese bezogen sich auf Prozesse wie den Kohlenhydratstoffwechsel, die Zellwandbeschaffenheit, Transportmechanismen sowie die Regulation von bekannten Hitzeschockproteinen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Beeinflussung ähnlicher Prozesse in Antheren der Tomate durch langandauernden moderaten Hitzestress nachgewiesen werden. Während FRANK et al. (2009) zahlreiche Hochregulationen von Transkripten mit Bezug zu Hitzeschockproteinen in Mikrosporen nachweisen konnten, waren unter langandauerndem Hitzestress in Antheren ebenfalls Regulationen in Bezug auf einige Hitzeschockproteine zu beobachten. Diese stellten allerdings nicht die stärksten Regulationsänderungen dar und relativierten die Bedeutung der Hitzeschockproteine in der Ausprägung der Hitzetoleranz unter langanhaltenden Hitzestressbedingungen.

Der Vergleich der Ergebnisse von FRANK et al. (2009) und BITA et al. (2011) unter kurzzeitigem Hitzestress mit den hier erarbeiteten Erkenntnissen zu langandauerndem Hitzestress weist auf die wesentlich komplexere und vielfach auch toleranztypspezifische Transkriptregulation unter langanhaltendem Hitzestress hin. Diese Beobachtung deutet auf umfassende Hitzetoleranzmechanismen hin, die die Schäden durch erhöhte Temperaturen langfristig abmildern sollen.

4.3.1.2 Expression von Genen der Hsf und Hsp in Tomatantheren

In der vorliegenden Studie wurde die Expression einiger mit der Hitzestressantwort in Verbindung stehender Gene sowie von Genen der Hsp-Familie untersucht. Diese werden häufig mit einer Funktion in der Ausbildung einer Hitzetoleranz verbunden (NEUMANN et al., 1993; BANIWAL et al., 2004). GIORNO et al. (2010) beschrieben die Expression von HsfA2 und Vertretern der Hsp17-CII-Klasse in Antheren der hitzetoleranten Tomatensorte *Solanum lycopersicum* cv. Saladette unter kurzzeitigem, aber auch wiederholtem Hitzeschock von 36°C für jeweils eine bis sechs Stunden. Sie untersuchten die Expression dieser Gene in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Geweben der Blüte und beobachteten, dass besonders HsfA2 stark durch eine milde Hitzeschockapplikation in jungen Antheren exprimiert wird. Auch für Hsp17.4-CII und Hsp17.6-CII konnten starke Hochregulationen in jungen Stadien vor der Bildung von Mikrosporen nachgewiesen werden. In diesem Stadium wurde nur HsfA2 exprimiert, was GIORNO et al. (2010) mit der Beobachtung von PORT et al. (2004) erklärten, die die Inaktivierung von HsfA2 mit einer Interaktion mit Hsp17.4-CII in Zusammenhang brachten. In der vorliegenden Studie konnten vermehrt signifikante Regulationen in der Gruppe der hitzesensitiven Genotypen identifiziert werden, die eine 2,8- bis 7,4-fache Hochregulation umfassten. Die Expressionsstärken fielen aber meist sehr gering aus. Die durch TC193902, TC193184, TC211889, TC208258 und TC215346 repräsentierten Gene wiesen hohe Expressionsstärken auf und konnten mit der Reaktion auf den Hitzestress verknüpft werden. In fast allen Transkripten dieser Gene fanden signifikante Hochregulationen in der

hitzesensitiven Toleranzgruppe statt, während für die hitzetolerante Gruppe teilweise starke, aber nicht signifikante Hochregulationen zu beobachten waren. Im Vergleich der Regulationsunterschiede zwischen den Toleranzgruppen konnten die Transkripte der Gene TC206533 (Antwort auf Hitzestress, geringe Expressionsstärke, stärkere Expression in hitzesensitiven Genotypen), TC211889 (Hsc80, mittlere Expressionsstärke, stärkere Expression in hitzetoleranten Genotypen), TC208258 (Hitzeschockprotein, hohe Expressionsstärke, stärkere Expression in hitzetoleranten Genotypen), TC207926 (Klasse I Hitzeschockprotein, mittlere Expressionsstärke, stärkere Expression in hitzetoleranten Genotypen) und TC215346 (endoplasmatisches Hitzeschockprotein, mittlere Expressionsstärke, stärkere Expression in hitzesensitiven Genotypen) als signifikant unter optimalen Temperaturbedingungen reguliert identifiziert werden. Unter Hitzestressbedingungen traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Toleranzgruppen auf. Eine erhöhte Expression dieser Gene kann folglich nicht mit einer erhöhten Lebensfähigkeit des Pollens unter Hitzestress in Verbindung stehen, da in den Genotypen mit erhöhter Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern geringere Expressionen zu beobachten waren. Die verstärkte Expression ist folglich mit anderen Mechanismen der Hitzestressreaktion oder hitzestressunabhängigen Regulationsmechanismen in Zusammenhang zu bringen. Hitzestressunabhängige Expressionen wurden in der Embryogenese, der Pollenreifung, der Samenreifung oder der zygotischen Embryogenese nachgewiesen, wobei über gewebespezifische Expressionen ohne eine Einwirkung von Hitzestress, wichtige Funktionen in der Bindung beschädigter Proteine als Schutz vor Proteinabbau und Expressionen infolge von Austrocknung berichtet wurde (NIEDEN et al., 1995; WATERS et al., 1996; ALMOGUERA et al., 2002; WEHMEYER UND VIERLING, 2000). Im Vergleich der Expression dieser Gene unter optimalen Temperaturbedingungen und Hitzestress konnten signifikante Hochregulationen zahlreicher Transkripte beobachten werden. Die Expression der betreffenden Gene erhöhte sich unter Hitzestress stark, was auf eine hitzestressinduzierte Regulation und damit eine toleranztypunabhängige Reaktion auf Hitzestress hindeutet. Diese Regulationsänderung kann in Bezug zu vermehrt auftretenden, durch Hitzestress geschädigten Proteinen stehen, da durch die Aktivität der Hitzeschockproteine als Chaperone eine Bindung derselben erfolgt und diese somit unschädlich gemacht werden (VOELLMY UND BOELLMANN, 2007).

BITA et al. (2011) untersuchten die Expression von unterschiedlichen Hitzeschockproteinen bei der Tomate unter kurzfristigem moderatem Hitzestress und konnten für deren Transkripte eine starke Hochregulation zwei Stunden nach Hitzestressapplikation beobachten. Hsp82 zeigte beispielsweise eine generelle Hochregulation in den hitzesensitiven Genotypen, während eine Regulation für die hitzetoleranten Genotypen nicht zu beobachten war. Hsp70 wies eine Hochregulation in beiden Toleranzgruppen auf. Hsp17.6 und Hsc70 wurden in dieser Studie als unter Hitzestress differentiell reguliert eingestuft. Sie wiesen eine geringere Expression in den hitzesensitiven Genotypen unter Normalbedingungen im Vergleich zu den hitzetoleranten Genotypen auf. Unter Hitzestress glichen sich die Expressionsstärken beider Toleranzgruppen an. Auch unter kurzzeitigem starkem Hitzestress konnten starke Regulationen solcher hitzestressbezogenen Gene beobachtet werden. FRANK et al. (2009) identifizierten Regulationen von Hsp18.2, Hsp90 sowie Hsp70 und konnten eine starke Hochregulation

der entsprechenden Transkripte nachweisen. Keines der genannten konnte im Rahmen der vorliegenden Studie detektiert werden.

Im Rahmen der Expressionsstudie konnten Regulationen für Cofaktoren der Hsp beobachtet werden. Eine Klasse von funktionellen Partnern für Hsp70 sind Proteine, die eine J-Domäne enthalten, wie das DnaJ-Protein, auch Hsp40 genannt. Dabei erhöht das DnaJ die Aktivität der ATPase und reguliert durch die Hydrolyse die Aktivität von Hsp70 durch Stärkung der Bindung des Hsp70 an seine Substrate (BUKAU UND HORWICH, 1998). Für DnaJ ist beschrieben, dass es wichtige Funktionen in der Stressantwort übernimmt und an der Instandsetzung von geschädigten Zellen, aber auch an grundlegenden Prozessen wie der Proteinfaltung und -degradierung beteiligt ist (WANG et al., 2004; HENNESSY et al., 2005; CRAIG et al., 2006; CHEN et al., 2010). DnaJ-Proteine können dabei helfen, eine Störung des Photosystems II wieder auszugleichen. YANG et al. (2009) untersuchten die Aufgabe des Gens "*Thermosensitive male sterile 1*" (*TMS1*), welches eine DnaJ-Domäne aufweist, in *Arabidopsis thaliana* in Bezug auf das Wachstum des Pollenschlauchs unter Hitzeschock. Sie fanden heraus, dass bei Hitzeschock die Expressionsstärke des Gens in wachsenden Pollenschläuchen erhöht ist, während in Knockout-Mutanten eine Reduktion der männlichen Fertilität durch ein verzögertes Pollenschlauchwachstum stattfindet. Sie konnten Expressionen in Pollenkörnern und in vegetativen Geweben wie den Blättern, Wurzeln und Stängeln beobachten. Eine stärkere Expression des Gens in Folge des Hitzeschocks konnte nur in Pollenschläuchen und vegetativem Gewebe, nicht in Pollenkörnern nachgewiesen werden. KONG et al. (2014) untersuchten ein chloroplastidäres DnaJ-Protein, das *LeCDJ1*, in transgenen Tomaten und fanden heraus, dass eine höhere Expression des Gens *LeCDJ1* in Temperaturregimen zwischen 38°C und 45°C, nicht aber bei 30°C bzw. 35°C stattfindet. Auch andere Merkmale wie der Entwicklungszustand, der Chlorophyllgehalt und die Störung des Photosystems II konnten unter Hitzestress bei Anwesenheit dieses Gens positiv beeinflusst werden. DnaJ-Proteine übernehmen folglich in der Ausbildung einer Hitzetoleranz eine wichtige Funktion.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Expression für zwei Varianten des chloroplastidären Hsp70-Gens unter moderatem Hitzestress beobachtet wurde, konnten signifikante Expressionsunterschiede zwischen hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen unter optimalen Temperaturbedingungen für ein DnaJ-ähnliches Protein (TC197772) nachgewiesen werden. FRANK et al. (2009) beobachteten als Reaktion auf kurzzeitigen starken Hitzestress ebenfalls die Regulation DnaJ-ähnlicher Proteine in Mikrosporen. Dabei fanden starke Hochregulationen statt, einen Unterschied zwischen den Toleranzgruppen detektierten sie aber nicht. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit unter Normaltemperaturen eine fast 3-fach stärkere Expression in den hitzetoleranten Genotypen im Vergleich zu den hitzesensitiven Genotypen identifiziert werden. Unter Hitzestress wurde eine gegenteilige Regulation beobachtet, in welcher in der hitzetoleranten Gruppe geringere Expressionen gemessen wurden. Dies deutet entweder darauf hin, dass auf Grund der fehlenden Expression des Hsp70 auch die Menge an DnaJ-Protein verringert ist oder dass es sich hierbei um ein Protein handelt, welches eine Funktion in der regulären Zellentwicklung hat und somit nicht in die Reaktion auf

langandauernden moderaten Hitzestress involviert ist. Diese These wird durch die nicht signifikante Regulation im Vergleich der Expressionsstärken zwischen Optimalbedingungen und Hitzestress bekräftigt.

Eine ähnliche Beobachtung konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit für das Hsc Protein 70 erfolgen. Für dieses Protein lagen zwar keine signifikanten Regulationen zwischen Normal- und Hitzestressbedingung vor, es traten aber große Unterschiede zwischen den Toleranzgruppen auf, wobei die hitzesensitiven Genotypen stets eine höhere Expression aufwiesen als die hitzetoleranten Genotypen. Da das Hsc70 als Chaperon an der Faltung und Reifung von Proteinen beteiligt und eine stärkere Expression in den hitzesensitiven Genotypen zu beobachten ist, ist es trotz der bei FRANK et al. (2009) beschriebenen Regulation bei kurzzeitigem extremem Hitzeschock eher unwahrscheinlich, dass diese Expressionsänderung in Zusammenhang mit langfristigen Hitzetoleranzmechanismen steht. Die beobachtete Regulation kann somit auf normale Entwicklungsvorgänge zurück zu führen sein. DUCK UND FOLK (1994) berichteten in Bezug auf das Hsc70 über eine Expression in Mikrosporen und Pollenkörnern der Tomate während der Pollenentwicklung ohne Hitzestressapplikation und beschrieben, dass keine Induktion der Bildung von Hsc70 durch den Hitzestress erfolgte. Bei den hier beobachteten Regulationen handelt es sich somit wahrscheinlich um entwicklungsbezogene Expressionsänderungen. KOSE et al. (2005) schlossen aus ihren Analysen, dass das Hsc-Protein 70 den nuklearen Export von Rezeptorproteinen regulieren kann.

YANO et al. (2006) berichteten von einem Protein, welches in *Drosophila* als Reaktion auf einen Hitzestress Hochregulationen aufwies. Diesem Protein, dem 14-3-3-Protein, wurden Aufgaben beispielsweise in Bezug auf die Signaltransduktion oder die Apoptose zugeschrieben. Die Funktionsweise eines 14-3-3-Proteins als ATP-bindendes Protein basiert auf einer Konformationsänderung und damit einer Änderung in der Aktivität von Enzymen (TZIVION et al., 1998; OBSIL et al., 2001). Durch diese Funktion ist die Möglichkeit gegeben, als Regulator in einer Hitzestressantwort einzugreifen. YANO et al. (2006) ist es gelungen, diesen Zusammenhang herzustellen und für die Isoform ζ eine Funktion in der Renaturierung von wärmeaggregierten Proteinen nachzuweisen. SATOH et al. zeigten 2005, dass das Protein 14-3-3 einen Komplex mit einem Hitzeschockprotein 60 in menschlichen Zellen eingehen kann. Dieser Zusammenhang mit Hitzeschockproteinen spricht für eine Aufgabe in der Hitzestressreaktion. Im Rahmen der hier durchgeführten Analyse konnte eine signifikante Regulation eines 14-3-3 ähnlichen Proteins nachgewiesen werden. Die dabei beobachteten Regulationen umfassten allerdings entgegen der Beobachtungen von YANO et al. (2006) starke Herunterregulationen unter Hitzestress sowohl in hitzetoleranten als auch in hitzesensitiven Genotypen. Unter Hitzestress war eine Expression des entsprechenden Gens kaum noch messbar. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Toleranzgruppen konnte nicht nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass das 14-3-3-Protein nicht wie die bei YANO et al. (2006) beschriebene Isoform ζ einen positiven Einfluss auf die Renaturierung von Proteinen hat. Ob es eine Aufgabe im Zusammenhang mit der Apoptosereaktion unter Hitzestress übernimmt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Da innerhalb dieser Studien keine Analyse des Hsp60 stattgefunden hat, kann auch keine Aussage über ein mögliches Zusammenspiel dieser beiden Proteine unter Hitzestress getätigt werden.

Trotz der generellen Tendenz einer Hochregulation der Expression von Hitzestresstranskriptionsfaktoren konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass differentielle Regulationsmuster zwischen hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen vorliegen. Für einige Transkripte konnte eine stärkere Hochregulation in hitzesensitiven Genotypen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Ausprägung einer Hitzetoleranz in Bezug auf die Lebensfähigkeit des Pollens unter langanhaltendem moderatem Hitzestress nicht entscheidend von bekannten Hitzestresstranskriptionsfaktoren und -Proteinen abhängen kann. Eine Ausbildung lebensfähigen Pollens hängt folglich von anderen Faktoren ab. Auch die meist geringen Expressionsstärken und die relativ schwachen Regulationsänderungen weisen darauf hin. BARTKIEWICZ (2011) untersuchte die Hitzeschockproteine Hsp17.4 und Hsp17.6 sowie den Hitzestresstranskriptionsfaktor HsfA2 unter langanhaltendem moderatem Hitzestress in Antheren der Tomate und fand heraus, dass nur für die beiden Hitzeschockproteine eine Hochregulation der Transkription unter Hitzestress stattfand. Sie wies 3,9- bis 21,4-fache Regulationen für die hitzetoleranten Genotypen und 5- bis 10,9-fache Expressionsänderungen in der hitzesensitiven Gruppe nach. Es konnte kein Expressionsunterschied zwischen den Toleranzgruppen unter Normalbedingungen identifiziert werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass andere Mechanismen für die Ausbildung lebensfähiger Pollenkörner unter langandauernden moderaten Hitzestressbedingungen entscheidend sind.

4.3.1.3 Expression von Genen der Blüte in Tomatantheren bei langanhaltendem moderatem Hitzestress

Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten konnten Regulationen blütenspezifischer Transkripte identifiziert werden, die bislang unter kurzzeitigem Hitzestress sowohl in Antheren als auch in Mikrosporen der Tomate nicht beschrieben wurden (BITA et al., 2011; FRANK et al., 2009). So konnte eine differentielle Regulation des antherenspezifischen LAT52-Proteins beobachtet werden, welches sowohl für die hitzetoleranten als auch die hitzesensitiven Genotypen bei Hitzestressapplikation eine starke Herunterregulation aufwies. Der Effekt des Hitzestresses war deutlicher in den hitzetoleranten Pflanzen zu erkennen, da für diese eine mehr als doppelt so hohe Herunterregulation nachgewiesen wurde als für die hitzesensitiven Genotypen. Bereits unter optimalen Temperaturbedingungen lag ein Expressionsunterschied zwischen den beiden Toleranzgruppen vor. So konnte für die hitzetolerante Gruppe eine 2,5-fach höhere Expression unter Optimalbedingungen beobachtet werden. Unter Hitzestress glichen sich die Expressionsstärken der beiden Toleranzgruppen einander an. MUSCHIETTI et al. (1994) untersuchten die Wirkung dieses Proteins auf die Entwicklung des Tomatenpollens. Sie beobachteten eine abnormale Pollenfunktion bei Reduktion der Proteinmenge von LAT52 und postulierten eine Funktion dieses Proteins in der Pollenhydratisierung und/oder der Pollenkeimung. Eine verringerte Expression des entsprechenden Gens unter Hitzestress kann folglich in der vorliegenden Studie zu einer Reduktion der Lebensfähigkeit des Pollens geführt haben. Hitzetolerante Genotypen wiesen zwar starke Herunterregulationen auf, für sie konnte aber eine fast dreifach höhere Genexpression unter Normalbedingungen beobachtet werden. Diese Beobachtung weist auf den Einfluss des untersuchten Gens auf die Lebensfähigkeit von Pollenkörnern

unter langanhaltendem moderatem Hitzestress hin. Eine Bestätigung dessen Funktion muss in weiterführenden Studien erfolgen.

Für das Transkript TC209885, welches das Gen RhoGD12 repräsentiert und für welches eine Funktion in Bezug auf die Pollenschlauchentwicklung postuliert wird, wurden signifikante Regulationen beobachtet. Als Reaktion auf einen Hitzestress konnten starke Herunterregulationen nachgewiesen werden, ein signifikanter Unterschied zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen war nicht festzustellen. In den hitzesensitiven Genotypen erfolgte eine 7,8-fache Herunterregulation, in den hitzetoleranten eine 16,6-fache Herunterregulation. In der toleranzgruppenübergreifenden Analyse konnte eine signifikante 12,1-fache Herunterregulation beobachtet werden. Bei Betrachtung der Expressionsstärken fiel die unter Optimalbedingungen höhere Expression dieses Gens in den hitzetoleranten Genotypen auf. Unter Hitzestress wiesen sie ähnlich niedrige Expressionsstärken wie die hitzesensitiven Genotypen auf. Diese Beobachtungen deuten auf einen Vorteil der hitzetoleranten Genotypen zu Beginn eines Hitzestresses und einen Einfluss dieses Gens auf die Ausbildung von Früchten unter Hitzestressbedingungen hin. KLAHRE et al. (2006) klärten die Wirkweise dieses Gens in *Nicotiana tabacum* auf und beobachteten die Steuerung des polaren Wachstums der Pollenschläuche durch dieses Gen. Eine Überexpression depolarisierte bzw. verhinderte das Pollenschlauchwachstum. Eine Herunterregulation der Transkription dieses Gens in meiotischen Antheren unter Hitzestress beeinflusst somit das Pollenschlauchwachstum negativ und verhindert dadurch die Bildung von Früchten. Da dieser Vorgang in beiden Toleranztypen stattfindet, handelt es sich hierbei um eine toleranztypunabhängige Hitzestressreaktion. Toleranztypabhängige Hitzestressantworten wurden für die antherenspezifischen Transkripte von TC198539, TC198525, TC214591 und TC201489 beobachtet, für welche in hitzetoleranten Genotypen starke Herunterregulationen unter Hitzestressbedingungen erfolgten.

Die starken Hochregulationen eines im Stigma exprimierten Gens (TC195238) stehen in Zusammenhang mit der Hitzestressantwort. Für dieses Gen wurde sowohl bei den hitzetoleranten als auch den hitzesensitiven Genotypen eine mehr als 10-fache Hochregulation unter Hitzestress nachgewiesen. Die Expressionsstärke war bei den hitzesensitiven Genotypen unter Normalbedingungen zunächst 2,6-fach höher, erhöhte sich aber unter Hitzestress auf fast die 3-fache Stärke. Die maximale Expressionsstärke unter Hitzestress betrug 24.139 und entsprach ungefähr der Expression des antherenspezifischen LAT52-Gens in der hitzesensitiven Gruppe unter optimalen Temperaturbedingungen. Es konnten somit Hinweise auf eine Funktion dieses Gens in der Ausbildung einer Hitzesensitivität erarbeitet werden. Nach Abgleich dessen Gensequenz mit den Sequenzen des vollständig sequenzierten Tomatengenoms konnte eine Ähnlichkeit zu dem Kunitz-Typ ähnlichen Proteinase Inhibitor A4 identifiziert werden. Die mögliche Funktion eines solchen Proteins in der Hitzestressantwort wird unter 4.3.1.5 diskutiert.

4.3.1.4 Beeinflussung von Stoffwechselwegen durch langanhaltenden moderaten Hitzestress

Die stärkste Transkriptregulation innerhalb der Expressionsstudie konnte einem L-Ascorbat Oxidase ähnlichen Vorprodukt (TC210322, TC211841, EC:1.10.3.3) zugewiesen werden. Dessen Expressionsstärke lag im mittleren bis hohen Bereich. Da sowohl für die hitzesensitiven (-14,2-fach) als auch für die hitzetoleranten Genotypen (-38,2-fach) im Vergleich der Expressionen unter Optimaltemperatur und Hitzestress eine starke Herunterregulation beobachtet werden konnte, welche auch im toleranztypunabhängigen Vergleich zwischen Expressionen unter Normalbedingungen und Hitzestress bestätigt wurde (-25,5-fach), handelt es sich bei der Transkriptregulation um eine generelle Reaktion auf moderaten Hitzestress ohne Unterscheidung des Toleranztyps. In den hitzetoleranten Genotypen konnten stärkere Regulationen als in den hitzesensitiven Genotypen beobachtet werden, was durch eine höhere Expression des Gens in hitzetoleranten Pflanzen unter Optimalbedingungen erklärt werden konnte. Unter Hitzestressbedingungen wiesen beide Klassen ähnliche Expressionsstärken auf. Bei einer L-Ascorbat Oxidase handelt es sich um eine kupferbindende Oxidoreduktase, welche in *Nicotiana tabacum* als pollenspezifisches Protein identifiziert und mit der Pollenkeimung sowie dem Pollenschlauchwachstum in Verbindung gebracht werden konnte (The Universal Protein Resource (UniProt), P29162 - ASOL_TOBAC). Dieses Protein steht in Verbindung mit dem Kohlenhydratmetabolismus und ist an der Umwandlung von L-Galactonat zu L-Galactono-1,4-Lacton beteiligt (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Die differentielle Expression eines mit diesem Protein in Verbindung stehenden Gens weist auf die Bedeutung der L-Ascorbat Oxidase in der Ausbildung lebensfähiger Pollenkörner unter Hitzestress hin. Eine Herunterregulation dieses Gen kann die Befruchtung sowie die Ausbildung von Früchten beeinflussen und steht somit in Zusammenhang mit einem unter Hitzestress reduzierten Fruchtansatz. GARCHERY et al. (2013) untersuchten die Wirkung einer verringerten Ascorbat Oxidase-Aktivität in Tomaten mit Hilfe einer RNAi-Strategie und beobachteten einen erhöhten Fruchtansatz unter verminderter Wasserverfügbarkeit. Sie berichten ebenfalls über eine positive Beeinflussung des Assimilat-Transportes, einen erhöhten Zuckergehalt in Blättern und Früchten sowie eine erhöhte Leitfähigkeit der Stomata. Eine verringerte Expression eines L-Ascorbat Oxidase-Gens könnte auch unter Hitzestress zu einem verbesserten Assimilat-Transport und damit zu einer besseren Versorgung der Antheren mit vor Hitze schützenden Stoffen bzw. mit Wasser zur Kühlung geführt haben. Gegen eine alleinige Verantwortlichkeit der Reduktion der Lebensfähigkeit des Pollens sprechen die ähnlichen Expressionsstärken beider Toleranztypen unter Hitzestress, obwohl in den Gruppen unterschiedliche Anzahlen an lebensfähigen Pollenkörnern auftraten. FRANK et al. (2009) detektierten Regulationen in Bezug auf den Kohlenhydratstoffwechsel unter kurzfristigem starkem Hitzestress in Tomaten-Mikrosporen und ordneten diese unter anderem verschiedenen Oxidasen zu. Die hier beschriebene Ascorbat-Oxidase war nicht darunter vertreten.

Eine in den Kohlenhydratstoffwechsel involvierte Beta-Galactosidase (EC: 3.2.1.23) wies in der vorliegenden Studie hohe Expressionen unter Hitzestress auf. Es konnten ähnliche Expressionsmuster wie für die L-Ascorbat-Oxidase mit einer stärkeren Expression in den hitzetoleranten Genotypen unter Hitzestress beobachtet werden.

Unter optimalen Temperaturbedingungen traten fast doppelt so hohe Expression dieses Gens in den hitzetoleranten Genotypen im Vergleich zu Vertretern der hitzesensitiven Gruppe auf. Die Aufgabe der Beta-Galactosidase im Kohlenhydratstoffwechsel umfasst die Umwandlung von Lactose oder Galactan zu D-Galactose (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). FRASCHINA et al. (1998) und SMITH et al. (2002) untersuchten den Einfluss der Beta-Galactosidase 4 auf Fruchtcharaktere der Tomate und berichteten über eine positive Beeinflussung der Festigkeit der Frucht bei Abwesenheit der Beta-Galactosidase 4. VICENTE et al. (2005) identifizierten Zusammenhänge zwischen der Beschaffenheit der Früchte und der Aktivität der Beta-Galactosidase in der Erdbeere. BALOCH et al. (2006) nutzten den Effekt des Hitzeschocks für die Haltbarkeitmachung von Tomatenfrüchten und eine effektivere Lagerung durch die Verringerung des Wasserverlustes in hitzestressierten Früchten.

4.3.1.5 Beeinflussung der Zellwand- und Membranbeschaffenheit durch langanhaltenden moderaten Hitzestress

Im Rahmen der Analyse differentiell unter Hitzestress exprimierter Gene konnten Expressionsänderungen in Genen mit Bezug zur Zellwand- und Membranbeschaffenheit nachgewiesen werden. Zellwände von Pflanzen bestehen überwiegend aus Polysacchariden wie Cellulose, Hemizellulose und Pektin (HARRIS UND STONE, 2008; MOHNEN, 2008; MOHNEN et al., 2008; PETTOLINO et al., 2012), während Membranen vorwiegend aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten bestehen. Eine Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels durch Hitzestress, wie sie unter 4.3.1.4 beschrieben wurde, kann folglich einen starken Einfluss auf die Stabilität von Zellwänden und -membranen haben. Neben Kohlenhydraten beinhalten Zellwände auch Polypeptide, welche zur Stabilisierung der Zellwände beitragen. Diese können beispielsweise durch Hydrolasen, welche am Auf- und Abbau der Zellwand beteiligt sind, gespalten werden. Dadurch kann die Stabilität der Zellwände negativ beeinflusst werden und ein Absterben der Zellen erfolgen. Eine Applikation von Hitzestress kann zu einer Hemmung der Zellzyklen, der Zellvermehrung sowie des Zellwachstums führen und dadurch den Zelltod auslösen (ZEUTHEN, 1971; LINDQUIST, 1980; YOST UND LINDQUIST, 1986). XUE et al. (2010) und SUN et al. (2012) konnten nachweisen, dass durch eine Überexpression von Hsps eine verbesserte Proteinfaltung sowie eine Stabilisierung von Enzymen und Zellmembranen unter Hitzestress und damit eine Hitzetoleranz erreicht werden konnte. Die Stabilität der Zellwände und Membranen ist folglich ein wichtiger Faktor, um die Zellen vor Hitzestress zu schützen.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikant negativer Einfluss von langanhaltendem moderatem Hitzestress auf die Beschaffenheit der Zellwände durch eine starke Regulation einer Pectin-Acetyltransferase (EC:3.1.1.6), welche in die Zellwanddegradation als Hydrolase involviert ist, beobachtet werden. Es lagen Regulationen in beiden Toleranzklassen sowie höhere Expressionsstärken in der hitzetoleranten Gruppe als bei den hitzesensitiven Genotypen unter Normalbedingungen vor. Ein solcher Unterschied war unter Hitzestressbedingungen nicht zu beobachten. CAMEJO et al. (2005) vermuteten eine Beeinflussung der die Zelle umschließenden Wände und brachten eine verringerte Membranintegrität in Verbindung mit Hitzestress.

VICENTE et al. (2005) untersuchten die Zusammensetzung der Zellwände sowie die Aktivität von Zellwanddegradierenden Enzymen unter Hitzestress bei Erdbeeren und fanden heraus, dass durch eine Hitzestressapplikation die Löslichkeit von Pektinen und Hemizellulosen, welche Bestandteile der Zellwand sind, beeinflusst werden. Eine ausbleibende Herunterregulation der Pectin-Acetylase könnte zu einem Abbau des Pektins in der Mittellamelle, einem zerstörten Zellgefüge, einem verringerten Schutz der Zelle vor zu hohen Temperaturen, Problemen in der Kühlung der Zellen und einer Beeinflussung der darin stattfindenden Prozesse führen. Als Reaktion auf einen Hitzestress müssen solche Abbauprozesse verhindert werden. Die Beobachtung, dass die hitzesensitiven Genotypen eine stärkere Expression dieses Gens unter Normaltemperatur aufweisen, könnte auf stärkere Beeinflussungen der Blüten in diesem Toleranztyp bereits unter Normalbedingungen hinweisen und die verstärkt auftretende Deformation der Blüte in dieser Gruppe erklären.

SAVCHENKO et al. (2002) fanden heraus, dass die Lipid-Doppelschicht von Zellmembranen durch einen Anstieg an ungesättigten Fettsäuren oder an denaturierten Proteinen in der Membran unter Hitzestress destabilisiert und verflüssigt werden kann. Auch innerhalb der vorliegenden Studie konnte die Regulation eines Lipid-Transfer-Proteins beobachtet werden. Für das Transkript dieses Proteins erfolgte in hitzesensitiven Genotypen eine Herunterregulation bei Applikation von Hitzestress, während für die hitzetoleranten Genotypen eine Hochregulation als Reaktion auf Hitzestress zu beobachten war. Der Vergleich zwischen hitzesensitiven und -toleranten Genotypen zeigte, dass bereits unter Normalbedingungen Expressionsunterschiede vorlagen. In hitzetoleranten Pflanzen wurde eine geringere Expression unter optimalen Temperaturbedingungen und eine stärkere Expression unter Hitzestressbedingungen beobachtet. Die hitzetoleranten Genotypen passten sich somit besser an den Hitzestress an und reagierten schneller mit einer Expressionsänderung dieses Gens darauf, um den sich entwickelnden Pollen vor den Folgen des Hitzestresses und einer möglichen Degradation zu schützen.

In Zusammenhang mit der Zellwand- bzw. Membranstabilität ist auch der Cathepsin D Inhibitor zu sehen, welcher die Aktivität von Endopeptidasen und damit die Aufspaltung von Peptidbindungen in Polypeptiden, beispielsweise in Zellwänden, beeinflusst. Bekannt ist, dass Cathepsine die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran in tierischen Zellen einleiten und dadurch Apoptose und den programmierten Zelltod ermöglichen können (NYLANDSTED et al., 2004). QI et al. untersuchten 2011 die Rolle des Hsp70 in Reis in Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod. Sie fanden heraus, dass bei Überexpression des mitochondrialen Hsp70 eine gesteigerte Zelllebensfähigkeit und eine verringerte Fragmentierung der genomischen DNA auftritt. Sie schlossen daraus, dass das mitochondriale Hsp70 den hitze- bzw. wasserstoffperoxidinduzierten programmierten Zelltod im Protoplast unterdrückt. Auch unter Hitzeschock wies es eine gewisse Wirksamkeit auf und verminderte die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte die Regulation eines Vorstufenproteins des Cathepsin D Inhibitors identifiziert werden (Transkripte von TC193040, TC193129). Unter Hitzestress war für beide Toleranzgruppen eine starke Hochregulation zu beobachten. Ein Regulationsunterschied zwischen den Toleranztypen unter Normalbedingungen bzw. Hitzestress konnte beobachtet, allerdings nicht als signifikant und mehr als 2-fach reguliert

eingestuft werden. Das deutet darauf hin, dass es sich bei der Transkriptregulation um eine generelle Antwort auf Hitzestress unabhängig vom Toleranztyp handelt. Durch die signifikante Hochregulation als Reaktion auf Hitzestress könnte die Inhibierung des Cathepsin D dazu dienen, den Abbau von Zellwänden zu verhindern und einen möglichen Zelltod aufzuhalten. Dies würde sich auf die Integrität der Antheren bzw. die Ausbildung von lebensfähigem, intaktem Pollen auswirken. Bei der Evaluierung der Lebensfähigkeit des Tomatenpollens konnten drei Klassen an Pollenkörnern beobachtet werden: lebensfähige und normal geformte, degradierte sowie nicht lebensfähige Pollenkörner. Dies ist ein Hinweis auf einen Hitzetoleranzmechanismus der Tomate und die Beeinflussung der Pollenkornlebensfähigkeit durch die Regulation des Cathepsin D unter Hitzestress.

Aufgaben in der Hydrolyse übernehmen auch Esterase/Lipase/Thioesterase ähnliche Proteine. Für diese sind Aktivitäten einer Transferase, die Determination der bilateralen Symmetrie der Zelle sowie katalytische Aktivitäten beschrieben (The Universal Protein Resource (UniProt), Q9LZP9 - CP122_ARATH). Sie haben somit einen Einfluss auf die Beschaffenheit der Zellwände. Im Rahmen der Expressionsanalysen konnten Herunterregulationen für die Transkripte dieses Gens sowohl in hitzesensitiven als auch in hitzetoleranten Genotypen beobachtet werden. Eine verstärkte Herunterregulation in der hitzetoleranten Gruppe war durch eine sehr viel stärkere Expression unter Normaltemperaturen bedingt. Unter Hitzestress zeigten beide Toleranztypen ähnliche Expressionen. Da für diese Proteinfamilie ein Zusammenhang zum Aufbau von Zellen und somit auch der Zellwand hergestellt werden konnte, deutet eine höhere Expression in den hitzetoleranten Genotypen unter Normalbedingungen auf eine vorteilhafte Wirkung eines hohen Transkriptvorkommens dieses Gens unter optimalen Temperaturbedingungen hin.

Ebenfalls einen Einfluss auf die Hydrolaseaktivität haben die Cystein Proteinase 3 sowie Cystein Protease Inhibitoren, deren Transkripte differentielle Regulationen in der Expressionsstudie aufwiesen. Hierbei erfolgten jeweils stark positive Hochregulationen (zwischen 7- und 10-fach) toleranztypunabhängig im Vergleich zwischen Optimaltemperaturen und moderatem Hitzestress. Ein Unterschied zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen konnte nur selten festgestellt werden. ZHAO et al. (2014) untersuchten Vertreter der Cystatin Genfamilie auf ihre Funktion in der sexuellen Reproduktion, der Embryogenese und der Samenbildung. Sie fanden heraus, dass neun der 10 untersuchten Cystatine das Potential aufwiesen, die Aktivität von Cathepsin-L Proteasen und Cystein Proteasen zu hemmen. Sie schlossen aus ihren Analysen, dass Cystatine sowohl in der Zelldetermination als auch der Zell-zu-Zell-Kommunikation im Prozess der sexuellen Reproduktion eine wichtige Rolle spielen. Weiterhin werden Sie mit Prozessen wie der Samenkeimung (HWANG et al., 2009) oder dem programmierten Zelltod (SOLOMON et al., 1999; ZHAO et al., 2013) in Verbindung gebracht. HWANG et al. (2010) untersuchten die Expression zweier Phytocystatin-Gene in *Arabidopsis thaliana* unter Hitzestress und beobachteten eine verstärkte Expression der beiden Gene *AtCYS1* und *AtCYS2* unter abiotischen Stressbedingungen. BITA et al. (2011) wiesen eine starke Hochregulation des Cystein Protease Inhibitors unter Hitzestress in den hitzetoleranten Genotypen nach, während in den hitzesensitiven zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Regulation dieses Inhibitors zu beobachten war. Das deutet auf einen Unterschied zwischen

kurzfristigem und langanhaltendem Hitzestress in Tomatantheren hin. FRANK et al. (2009) berichteten unter Hitzeschockbedingungen nicht über Regulationen im Zusammenhang mit Cystein in Mikrosporen der Tomate. ZAGORCHEV et al. (2013) untersuchten die Rolle des Cystein in der Toleranz gegenüber abiotischem Stress und identifizierten zahlreiche Zusammenhänge mit unterschiedlichen Resistenzmechanismen (Abbildung 4.1). Für Thioredoxin und Glutaredoxin ist beispielsweise bekannt, dass sie zwei Cysteine beinhalten, Enzymaktivitäten im Calvinzyklus sowie der Rubisco-Aktivase steuern, maßgeblich an der Regulation des primären Kohlenstoffwechsels beteiligt sind und somit einen Einfluss auf die Ausbildung einer Hitzetoleranz haben könnten. Eine Inaktivierung solcher Proteine durch Cystein Proteinasen kann weitreichende Folgen auch in diversen Stoffwechselwegen haben.

NURUZZAMAN et al. (2012) konnten differentielle Expressionen in Bezug auf Thioredoxin bei abiotischem Stress nachweisen. Unter Kältestress wurden Herunterregulationen vieler Thioredoxintranskripte nachgewiesen. Eine in der vorliegenden Studie beobachtete Hochregulation einer Cystein Proteinase bzw. eines Cystein Protease Inhibitors deutet darauf hin, dass einerseits unter Stressbedingungen der Abbau von Peptidbindungen durch den Inhibitor verhindert und andererseits vermehrt Peptidbindungen durch Proteinase abgebaut werden. Sie spielen ebenfalls eine Rolle in der Spaltung bzw. Erhaltung von Proteinen und Enzymen. Die Expressionsstärke der Gene der beiden Cystein Protease Inhibitoren entsprach sich in fast allen Vergleich. Ein Unterschied in der Regulation zwischen den hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen war nur unter Normalbedingungen für eines der Gene zu beobachten. Bei Betrachtung der Expressionsmuster der Cystein Proteinase 3 waren sowohl bei den hitzetoleranten als auch bei den hitzesensitiven Genotypen starke Hochregulationen zu beobachten. Die stärkste Regulation wiesen die hitzesensitiven Genotypen als Reaktion auf den Hitzestress auf. Unter Optimalbedingungen war nur eine sehr geringe Expression dieses Gens in der hitzesensitiven Gruppe sowie ein Unterschied zu den hitzetoleranten Genotypen in Form einer fast 3-fach niedrigeren Expression nachzuweisen. Ein Unterschied in den Expressionsmustern der Toleranzgruppen lag unter Hitzestress nicht vor. Ein toleranztypunabhängiger Vergleich zwischen den Expressionsstärken unter Kontroll- und Hitzestressbedingung wies eine 10-fache Hochregulation nach. Dies lässt auf eine entscheidende Funktion der Cystein Proteinase 3 in der Hitzestressantwort schließen.

Die Regulation eines CP12-Proteins, welches ein chloroplastidäres Protein ist, steht in Beziehung zu dem Regulationssystem des Thioredoxin (TROST et al., 2006; MARRI et al., 2009) und könnte eine Bedeutung für die Reaktion auf abiotischen Stress haben (Abbildung 4.1). In *Arabidopsis thaliana* konnte ihm ein Aufgabe im Calvin-Cyclus als kupferionenbindendes Protein sowie der Antwort auf Hitze zugeteilt werden (SINGH et al., 2008). SINGH et al. (2008) beobachteten spezifische Expressionen dreier CP12-Gene in Blüten und Wurzeln von *Arabidopsis thaliana*. Hierbei konnten zwei nur in Sepalen und Griffeln (CP12-1, CP12-2) und eins nur in Antheren und im Stigma (CP12-3) nachgewiesen werden. Aufbauend auf den Ergebnissen ihrer Studie vermuteten sie, dass das CP12-Protein möglicherweise einen Einfluss auf die Vorgänge bei der Bestäubung und Befruchtung durch seine Funktion als Regulator von Redoxreaktionen haben könnte. In den hier durchgeführten

Studien konnten signifikante Expressionsunterschiede vor allem zwischen den Toleranzgruppen identifiziert werden. Hierbei traten sowohl unter Hitzestress als auch unter Normalbedingungen 8,7-fach bzw. 5,9-fach stärkere Expressionen in den hitzetoleranten Genotypen auf. Eine Regulation mit Bezug auf die Antwort auf Hitzestress lag nicht vor. Eine überwiegend in den hitzetoleranten Genotypen vorliegende Expression könnte ein Hinweis auf ein die Pollenlebensfähigkeit beeinflussendes Gen und damit einer verbesserten Hitzetoleranz sein. Um diesen Zusammenhang klären zu können, wurde eine RT-qPCR-Analyse angestrebt. Leider konnte keine Etablierung der neu entwickelten Primer erfolgen. Eine Verifizierung der Ergebnisse müsste folglich in weiterführenden Experimenten stattfinden.

Neben der Regulation von Cystein Proteinasen sowie Cystein Protease Inhibitoren konnten noch weitere Regulationen in Bezug auf Proteinase Inhibitoren beobachtet werden. Überwiegend starke Hochregulationen der Transkription wurden für einen Kunitz-Typ Proteinase Inhibitor sowie einen auf Ethylen reagierenden Proteinase Inhibitor nachgewiesen. Eine Applikation von Hitze führte in Bezug auf beide Proteine in den hitzesensitiven Genotypen zu einer verstärkten Expression der dazugehörigen Gene. In Bezug zum Kunitz-Typ Proteinase Inhibitor war eine Hochregulation für die hitzetoleranten Genotypen bei Anlegen eines Hitzestresses, für den auf Ethylen reagierenden Proteinase Inhibitor eine Herrunterregulation im Vergleich der beiden Toleranzgruppen unter Optimalbedingungen zu beobachten. Im Vergleich zwischen den Toleranzgruppen unter Hitzestress traten keine signifikanten Unterschiede auf. Eine toleranztypunabhängige Regulation dieser Gene deutet auf die wichtige Aufgabe der Proteinase Inhibitoren zur Verhinderung von Protein- bzw. Enzymspaltungen unter Hitzestress hin. FIRON ET AL. (2012) untersuchten den Einfluss von Ethylen auf die Pollenqualität der Tomate unter Hitzestress und fanden heraus, dass eine Applikation von Ethylen vor dem Hitzestress eine 5-fache Erhöhung der Anzahl an keimenden Pollenkörnern erzielte, während ein Ethylen Inhibitor eine 5-fach verringerte Anzahl keimender Pollenkörner nach sich zog und somit die Hitzesensitivität erhöhte. In den hitzetoleranten Genotypen konnte innerhalb der vorliegenden Studie eine schon unter Kontrollbedingungen 10-fach höhere Expression des Ethylen-sensitiven Proteinase Inhibitors gegenüber den hitzesensitiven Genotypen nachgewiesen werden. Eine exogene Applikation von Ethylen könnte genau an dieser Stelle ansetzen und für eine erhöhte Pollenvitalität sorgen.

In *Brassica oleracea* konnten Proteine mit einer hohen Ähnlichkeit zu Proteinase Inhibitoren des Kunitz-Typs mit der Reaktion auf Hitzestress in Verbindung gebracht werden. Eine Expression der entsprechenden Gene konnte nur unter Hitzestressbedingungen (30°C bis 40 °C für 4-72 Stunden) nachgewiesen werden (ANNAMALAI UND YANAGIHARA, 1999). Interessant könnte in diesem Zusammenhang auch das unter Kapitel 4.3.1.3 diskutierte, im Stigma exprimierte Gen sein, welches eine enorm hohe Expression unter Hitzestressbedingungen in der hitzesensitiven Gruppe aufwies. Da für dieses ein Zusammenhang zu einem Proteinase Inhibitor des Kunitz-Typs vermutet wurde und eine starke Regulation in Folge von Hitzestress zu beobachten war, könnte dies für eine Rolle solcher Proteine in der Hitzestressantwort sprechen.

Ein wichtiger Einflussfaktor auf die Beschaffenheit von Zellwänden ist das Calcium. DEMARTY et al. (1984) berichteten in ihrer Zusammenfassung über den Zusammenhang zwischen Calcium und der Beschaffenheit der Zellwände über Funktionen des Calciums in der Stabilisierung der Zellwände und der Kontrolle von Zellwandenzymen. GONG et al. (1998) untersuchten die Wirkung von heißem Wasser (Hitzeschock) auf junge Keimlinge von *Nicotiana plumbaginifolia* und beobachteten einen signifikanten Anstieg des cytosolischen Calciums. Die erhöhten Werte konnten auch 10 bis 20 Minuten nach dem Hitzeschock noch gemessen werden, verringerten sich allerdings danach wieder auf das Maß einer entspannten Pflanze. Eine Einflussnahme chloroplastidären Calciums auf eine verringerte Photosyntheserate begründet durch eine verringerte Chloroplastenaktivität unter Hitzeschock schlossen sie auf Grund eines fehlenden Anstiegs des Calciumgehalts in den Chloroplasten aus. Eine im Rahmen der vorliegenden Studie identifizierte erhöhte Expression eines Calcium-Ionen-bindenden Proteins in den hitzetoleranten Genotypen deutet auf einen erhöhten Gehalt an Calcium und damit auch einer besseren Stabilität der Zellwände bei den hitzetoleranten Genotypen im Vergleich zu den hitzesensitiven Genotypen hin. Diese Beobachtung gibt einen Hinweis auf Hitzetoleranzmechanismen in Antheren der Tomate, die einen besseren Schutz des Pollens vor Hitze gewährleisten könnten. Dabei würde sich die Toleranz auf eine vorteilhaftere Beschaffenheit der Pflanze beispielsweise in Bezug auf die Konstitution der Zellwände in Vorbereitung auf einen Hitzestress handeln, da keine Regulation als Antwort auf eine Applikation unter Hitzestress zu beobachten war. Ebenfalls möglich ist ein Unterschied zwischen hitzesensitiven und hitzetoleranten Genotypen in Bezug auf andere zelluläre Prozesse, da für Calcium vielfache Funktionen und Wirkmechanismen beispielsweise in der Zellatmung oder Zellstreckung beschrieben sind (Überblick durch DEMARTY et al., 1984). Da in der vorliegenden Studie keine Messungen des Calciumgehalts in den Antheren vorgenommen wurden, müsste dies innerhalb eines nachfolgenden Experiments geklärt werden.

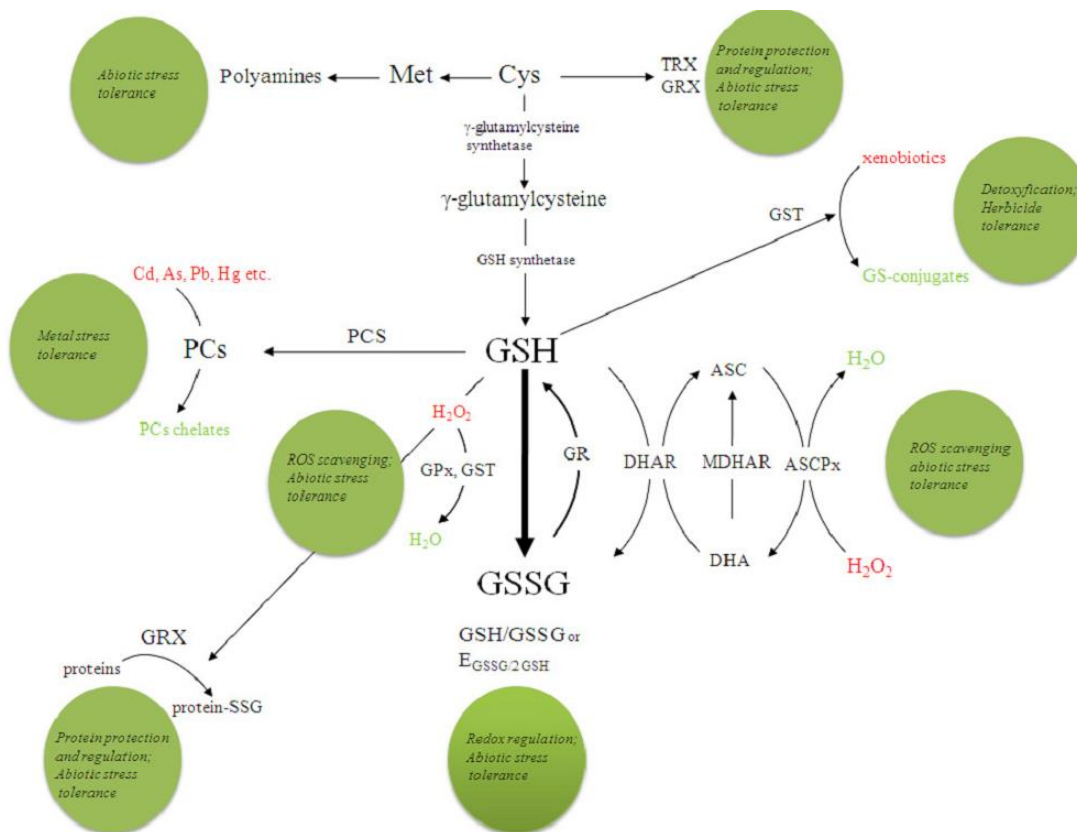


Abbildung 4.1: Zentrale Rolle von Cystein als Ausgangspunkt für mögliche Toleranzmechanismen. Rot markiert wurden mögliche schädliche Inhaltstoffe, das dazugehörige Addukt in grün. GSSG: Glutathiondisulfid, GSH: Glutathion, Met: Methionin, Cys: Cystein, TRX: Thioredoxin, GRX: Glutaredoxin, PC: Phytochelatin, PCS: Phytochelatin Synthetase, GST: Glutathion-S-Transferase, GPx: Glutathion Peroxidase, GR: Glutathion Reduktase, DHAR: Dehydroascorbat Reduktase, ASC: Ascorbat, MDHAR: Monodehydroascorbat Reduktase, DHA: Dehydroascorbat, ASCPx: Ascorbat Peroxidase. (ZAGORCHEV et al. 2013)

4.3.1.6 Initiierung von Autophagie-Mechanismen als Reaktion auf langanhaltenden moderaten Hitzestress

In der hier vorliegenden Studie konnten sowohl signifikante Regulationen in Bezug auf Autophagie (TC192986, TC213424), als auch auf einen WRKY Transkriptionsfaktor (TC224697) nachgewiesen werden. In der Literatur wird zwischen drei Gruppen des Zelltodes unterschieden: Typ 1 (Apoptose, programmierter Zelltod), Typ2 (Autophagie) und Typ3 (Nekrose) (CLARKE, 1990; KROEMER et al., 2005; GALLUZZI et al., 2007). Unter Autophagie versteht man einen lysosomalen Prozess, in welchem cytoplasmatische Bestandteile zu den Lysosomen transportiert und dort abgebaut werden, wodurch er sich stark von dem Abbau von Membranproteinen während der Apoptose unterscheidet (CUERVO et al., 2004a; MIZUSHIMA UND KLIONSKY, 2007). Das Ziel dieses Vorgangs ist es, unerwünschte, beschädigte und zerstörte Proteine, Organellen oder Kompartimente abzubauen und irreversibel in ihre Bestandteile zu zerlegen (SEGLEN UND BOHLEY, 1992; KIM UND KLIONSKY, 2000; DICE, 2000; CUERVO, 2004b; MEIJER, 2003; LEMASTERS et al., 2002; BELLU UND KIEL, 2003; ROBERTS et al., 2003). Die in den Vorgang der Autophagie involvierten Gene sowie deren

Zusammenhänge sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Da durch Hitzestress Proteine und Zellkompartimente geschädigt werden können, diese toxisch sind und deshalb abgebaut werden müssen, liegt ein Zusammenhang zwischen einem Hitzeschock und Autophagie-Mechanismen nahe.

In den Autophagie-bezogenen Transkripten, welche physikalisch die gleiche Position aufwiesen und deshalb wahrscheinlich das gleiche Gen repräsentieren, konnten leichte Hochregulationen in der hitzesensitiven Gruppe und leichte Herunterregulationen in der hitzetoleranten Gruppe im Vergleich zwischen Normaltemperatur und Hitzestress beobachtet werden. Dies könnte entsprechend der Beobachtungen von ZHOU et al. (2014) ein Indiz für die unterschiedliche Reaktionsweise von hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen in Bezug auf Autophagie sein. Es deutet darauf hin, dass hitzetolerante Genotypen bei Hitzestress Autophagie-bezogene Prozesse inhibieren können und deshalb einem Abbau von Proteinen und damit dem Zelltod entgehen. Solche Prozesse können auch eine Wirkung auf die Ausbildung lebensfähigen Pollens haben. Da in der Regulation dieser Prozesse vor allem Hitzeschockproteine wie Hsp70 involviert sind (DOKLADNY et al., 2013) und diese vermehrt in hitzetoleranten Genotypen vorkommen, stellt das einen Hinweis auf die Wichtigkeit von Autophagie-Prozessen in der Hitzesensitivität dar. Unter Normalbedingungen war eine erhöhte Expression in den hitzetoleranten Genotypen zu beobachten, während unter Hitzestress etwas höhere Expressionen in den hitzesensitiven Genotypen vorlagen. Das deutet darauf hin, dass unter Normalbedingungen eine vorteilhaftere Situation für die hitzetoleranten Genotypen zur Erhaltung der Zellen durch verstärkten Abbau geschädigter Zellbestandteile vorliegt und dass unter Hitzestress solche Prozesse herunterreguliert werden um einer übermäßigen Degradation und damit einer starken Schädigung der Zelle zu entgehen. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden nur zwischen den Toleranztypen unter Optimalbedingungen. Neben den hier aufgeführten Transkripten zeigten noch weitere Sonden mit Bezug auf Autophagie signifikante Regulationen, diese konnten allerdings meist den Schwellenwert einer mindestens 2-fachen Regulation nicht überschreiten (Daten nicht gezeigt).

DOKLADNY et al. (2013) untersuchten das Zusammenspiel zwischen Hitzestress und Autophagie und fanden heraus, dass unter Hitzeschock aktivierte Hitzeschockproteine die Mechanismen der Autophagie behindern. Besonders das Hsp70 schien eine entscheidende Rolle in der Kontrolle dieses Systems zu haben und die Regulation der Autophagie zu übernehmen. ZHOU et al. (2014) untersuchten den Effekt der Autophagie unter Hitzestress in Blättern der Tomate. Sie evaluierten sowohl den Elektrolytverlust, die maximale Ausbeute des Photosystems II und die licht-gesättigte CO₂-Assimilation als auch die Leitfähigkeit der Stomata und die intrazelluläre CO₂-Konzentration. Innerhalb ihrer Studien konnten sie zeigen, dass Gene der Tomate, welche eine Homologie zu bekannten Autophagie-verwandten Genen aus *Arabidopsis thaliana* aufwiesen, durch Virus-induziertes Gene-Silencing (VIGS) eine verstärkte Hitzesensitivität in Blättern auslösten und somit in Verbindung zu Hitzestress gebracht werden konnten.

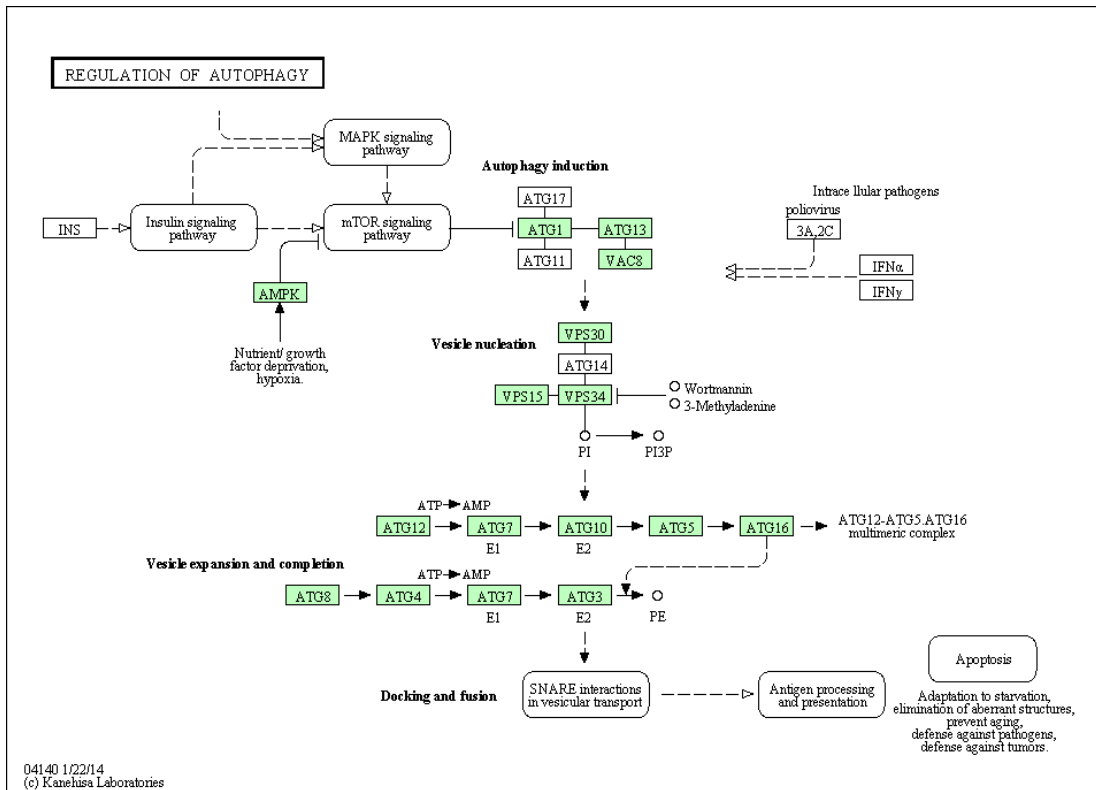


Abbildung 4.2: Veranschaulichung der Mechanismen der Autophagie und der darin involvierten Gene in *Arabidopsis thaliana*. Homologe der grün hervorgehobenen Gene konnten auch in *Solanum lycopersicum* identifiziert werden. Quelle: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>).

LAI et al. (2011) wiesen auf eine Beeinflussung autophagischer Vorgänge in der Pathogenabwehr durch WRKY33 in *Arabidopsis thaliana* hin und berichteten über verstärkt auftretende Autophagie-Prozesse bei Anwesenheit dieses Transkriptionsfaktors. Auf Grundlage dieser Informationen untersuchten auch ZHOU et al. (2014) das Transkriptlevel zweier Homologe in der Tomate unter Hitzeschock und beobachteten einen positiven Zusammenhang mit Autophagieprozessen durch eine verringerte Hitzetoleranz. Daraus schlossen Sie, dass sowohl die Autophagie-verwandten Gene als auch die WRKY33-Transkriptionsfaktoren die Hitzetoleranz in Tomaten beeinflussen.

Es konnte eine signifikante Regulation eines WRKY-Transkriptionsfaktors in dieser Studie nachgewiesen werden, welcher mit der Reaktion auf Hitzestress und Autophagie in Verbindung stehen kann. Für diesen konnte eine signifikante Hochregulation für die hitzesensitiven Genotypen, aber auch generell unter Hitzestress nachgewiesen werden. In den hitzetoleranten Genotypen fand keine Regulationsänderung unter Hitzestress statt, sie wiesen aber eine höhere Expression unter Normalbedingungen auf. Unter Hitzestress konnten wiederum keine Unterschiede ermittelt werden. Da die Funktion eines Autophagie-beeinflussenden WRKY-Transkriptionsfaktors in einer Förderung der Autophagie-Prozesse liegt und sich die Regulationsmuster mit dem des Autophagie-bezogenen Gens ähneln, ist eine Funktion des hier detektierten WRKY-Transkriptionsfaktors

als Regulator der Autophagie-Prozesse möglich.

Eine weiterführende Analyse der Sequenzen des Autophagie-bezogenen Gens erbrachte eine mögliche Funktion als cytoplasmatisches membrangebundenes Vesikel, was auf die Bildung eines doppelmembrangebundenen Autophagosoms hindeutet, welches ein wichtiges Element der Makroautophagie und für den Transport cytoplasmatischer Zellbestandteile zu den Lysosomen zuständig ist (FÜLLGRABE et al., 2014). Es könnte sich also bei TC192986, TC213424 und TC224697 um bedeutende Transkripte für die Ausbildung lebensfähigen Pollens und somit für eine Hitzetoleranz handeln.

4.3.1.7 Beeinflussung des Wassertransportes bei langanhaltendem moderatem Hitzestress

Innerhalb der vorliegenden Studie wurden 34 Sonden mit Bezug zum Wassertransport oder Wassermangel und Austrocknung analysiert, 25 davon zeigten eine signifikante Expressionsänderung, 9 davon eine signifikante, mehr als 2-fache Regulationsänderung. Es konnten 6 Regulationen im Bereich des Wassertransportes und 3 in Bezug auf Austrocknung in den Antheren von Tomaten identifiziert werden. Wasser sowie dessen Verfügbarkeit spielt unter Hitzestress eine wichtige Rolle. So verursachen hohe Temperaturen eine Störung des Wasserstatus in Blättern, eine veränderte Zellform und –Größe sowie eine verringerte stomatäre Leitfähigkeit und des Gehalts an interzellulärem CO₂ (RODRÍGUEZ et al, 2005; ASRAF UND HAFEEZ, 2004; GREER UND WEEDON, 2012). Es konnten aber auch morphologische Effekte beobachtet werden, die mit einer Beeinflussung des Wasserhaushaltes in Verbindung stehen. So berichteten MORALES et al. (2003) über eine negative Beeinflussung des Wurzelsystems, während SARIEVA et al. (2010) über einen möglichen Vorteil vieler Pflanzen durch das Einrollen der Blätter und einer damit verbundenen verbesserten Effizienz des Wasserhaushalt berichteten. TSUKAGUCHI et al. (2003) untersuchten die Beeinflussung des Wasserhaushalts unter langanhaltendem moderatem Hitzestress (32°C/26°C Tag/Nacht) auf blütenbezogene Merkmale wie die Pollenfertilität. Sie unterschieden dabei in der Reaktion eines hitzetoleranten und eines hitzesensitiven Genotyps. Sie beobachteten, dass der hitzetolerante Genotyp eine höhere Pollenfertilität und einen besseren Wasserstatus unter Hitzestressbedingungen im Vergleich zum hitzesensitiven Genotyp aufwies. Für beide war eine Reduktion der Pollenfertilität sowie des Wassergehalts und damit die Auswirkung des Hitzestresses zu erkennen. Eine Verringerung des Wasserstatus war besonders in Blütenknospen im Tetraden-Stadium des Pollens sichtbar. In Bezug auf die stomatäre Leitfähigkeit konnte für beide Toleranztypen eine gesteigerte Rate unter Hitzestress nachgewiesen werden, wobei der hitzetolerante Genotyp nachmittags eine stärkere Wasserleitfähigkeit aufwies. FRANK et al. (2009) konnten die Regulation eines Aqua-Porin-ähnlichen Proteins in Hitzestressexperimenten beobachten. Für dieses identifizierten sie eine 5-fache Hochregulation als Reaktion auf Hitzestress. In der vorliegenden Arbeit waren meist positive Regulationen als Reaktion auf den Hitzestress in den hitzesensitiven Genotypen zu erkennen, während hitzetolerante Genotypen weniger oft Hochregulationen aufwiesen. Häufig konnten höhere Expressionen der betreffenden Gene in den hitzetoleranten Genotypen bereits unter Normaltemperatur beobachtet werden, was darauf hinweist, dass bereits unter Normalbedingungen eine bessere

Wasserversorgung in den hitzetoleranten Genotypen vorliegt. Unter Hitzestressbedingungen konnte keine signifikante Änderung in der Expression dieser Gene beobachtet werden. Ein verringerter Wassertransport in der hitzetoleranten Gruppe deutet auf eine bessere Speicherung des zur Verfügung stehenden Wassers zum Schutz vor Austrocknung hin. Eine direkte Funktion in der Sicherung der Pollenvitalität kann auf Grund der geringen Genexpressionen in hitzetoleranten Genotypen unter Hitzestressbedingungen ausgeschlossen werden. Es könnte sich bei den hier identifizierten Regulationen um Toleranzmechanismen handeln, die einen Einfluss auf andere, nicht in der Studie untersuchte blütenbezogene Merkmale haben. Ebenfalls möglich wäre eine Beeinflussung der Vorgänge des Zelltods, da auch für diese Vorgänge, wie dem Transport von degradierten Zellbestandteilen, Wasser nötig ist. Für eine detailliertere Einschätzung der Funktion dieser Gene müssten weiterführende Studien erfolgen.

4.3.2 Verifizierung der differentiellen Expression ausgewählter Gene mittels RT-qPCR

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten zahlreiche differentiell exprimierte Gene mit der Hitzestressreaktion in Verbindung gebracht werden. Für einige fand eine Überprüfung der Expressionsstärken in unterschiedlichen Genotypen und Toleranzgruppen mit Hilfe einer RT-qPCR statt.

Für drei der differentiell exprimierten Gene konnte in diesem Versuch eine Bestätigung der Expressionsunterschiede zwischen hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen unter optimalen Temperatur- und Hitzestressbedingungen erfolgen. Diese umfassten die durch TC233891, TC236806 und TC230132 repräsentierten Gene. Für TC233891, ein durch Verwundung induziertes Gen, konnten in 4 der fünf Vergleiche signifikant positive Hochregulationen beobachtet werden. Ein Expressionsunterschied zwischen hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen unter optimalen Temperaturbedingungen konnte für dieses Gen nicht beobachtet werden. Da keine Unterschiede zwischen den Toleranzgruppen in der Reaktion auf den Hitzestress nachzuweisen waren, handelt es sich hierbei um eine toleranztypunabhängige Antwort auf den Hitzestress. Bei getrennter Betrachtung der einzelnen Genotypen wiesen die Nachkommen stets eine höhere, aber nicht signifikante Expression auf als die Eltern. Dies spricht für die erfolgreiche Auswahl der Genotypen basierend auf ihrer Hitzetoleranz und der Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern. Die Tatsache, dass in beiden Toleranzgruppen Hochregulationen in den Nachkommen identifiziert werden konnten, deutet auf die Beeinflussung anderer Merkmale als der Lebensfähigkeit des Pollens durch eine Transkriptionsregulation dieses Gens in Reaktion auf einen Hitzestress hin. FRANK et al. (2009) beobachteten eine starke Expressionsänderung eines verwundungsinduzierten Gens unter kurzzeitigem starkem Hitzestress (35-fache Änderung). Unterschiede zwischen den Toleranztypen konnten sie nicht detektieren. BITA et al. (2011) beobachteten unter kurzzeitigem moderatem Hitzestress keine Regulation eines solchen Gens. Dies lässt auf die unterschiedlichen Regulationsmechanismen unter kurz- und langfristigem moderatem Hitzestress schließen.

In Bezug auf das Gen TC236806, welches das pollenschlauchbezogene Protein RhoGD12 kodiert, konnten entsprechend der Beobachtungen im Hybridisierungsexperiment toleranztypunabhängig signifikante Herunter-

egulationen als Reaktion auf den Hitzestress nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Transkriptregulationen einzelner Genotypen waren extreme Herunterregulationen und Unterschiede in der Reaktion der Genotypen auf den Hitzestress zu beobachten. Es traten vereinzelt über 10-fache Regulationen auf. Eine toleranztypspezifische Regulation erfolgte nicht. Es handelt sich also um ein unter Hitzestress stark differentiell exprimiertes Gen ohne Bezug auf die Lebensfähigkeit des Pollens, welches aber einen Einfluss auf die Auskeimung des Pollenkorns unter Hitzestress und damit auf die Ausbildung von Früchten haben kann. Unter kurzzeitigem Hitzestress (FRANK et al., 2009; BITA et al., 2011) konnte die Expression eines solchen Gens nicht identifiziert werden. Das deutet darauf hin, dass für dieses eine wichtige Funktion in der Ausbildung einer Hitzetoleranz unter langandauerndem moderatem Hitzestress vorliegt. Genotypen, welche im Rahmen der vorliegenden Studie besonders hohe bzw. niedrige Expressionen aufwiesen, stellen Kandidaten für weiterführende Analysen zur Aufklärung der Zusammenhänge mit der Hitzetoleranz dar.

Das dritte bestätigte Gen betrifft die Beeinflussung der Zellwand unter Hitzestress. Die Transkripte eines Esterase/Lipase/Thioesterase ähnlichen Proteins (TC230132) wiesen toleranztypunabhängig starke Herunterregulationen im Vergleich der Expressionsstärke unter optimalen Temperatur- und Hitzestressbedingungen auf. Es waren starke, nicht signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Toleranztypen unter Hitzestress und viel stärkere Herunterregulationen in den hitzetoleranten Genotypen als Reaktion auf den Hitzestress zu beobachten. Bei Einzelauswertung der Expressionsänderungen je Genotyp konnten für die Nachkommen THP1-F4-046 und THP1-F4-071 extrem hohe, signifikante Herunterregulationen als Hitzestressantwort ermittelt werden. Da diese Genotypen der hitzetoleranten Gruppe angehörten und das hier erwähnte Gen den Abbau der Zellwandbestandteile fördert, könnte eine so starke Herunterregulation die Hitzetoleranz in Bezug auf die Lebensfähigkeit des Pollens erklären.

In der Analyse der Hitzeschockproteine HsfA2 und Hsp17.6-CII wies besonders Hsp17.6-CII starke, signifikante Hochregulationen in der toleranztypunabhängigen Hitzestressantwort auf. Ein Unterschied zwischen den Toleranztypen konnte nicht bestätigt werden. Bei Betrachtung der Expressionsänderung einzelner Genotypen wurden starke, nicht signifikante Hochregulationen als Antwort auf den Hitzestress beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen der Expressionsänderung und der Lebensfähigkeit des Pollens konnte nicht hergestellt werden. BARTKIEWICZ (2011) untersuchte die Expression in Bezug auf das Hsp17.6-CII unter Hitzestress in der hier analysierten Population und konnte eine Hochregulation nach Hitzestressapplikation feststellen. Da für Hsp17.6-CII eine wichtige Aufgabe in der Regulation der Hitzestressantwort in Bezug auf die Hitzeschockproteine bekannt ist, könnte dies ein Hinweis auf dessen Funktion unter langandauerndem moderatem Hitzestress sein.

Für HsfA2 konnte wie bereits von BARTKIEWICZ (2011) beschrieben in den fünf Vergleichen keine Regulation beobachtet werden. Bei Betrachtung der einzelnen Genotypen konnten hingegen signifikante, aber nicht eindeutige Regulationen nachgewiesen werden. Da die Expression dieses Gens nur in einer Wiederholung analysiert werden konnte, ist eine Interpretation dieser Beobachtung schwierig und wahrscheinlich

fehlerbehaftet.

Für 2 der Transkripte (TC239779, TC230935) konnte weder bei Betrachtung der Toleranzgruppen noch in einzelnen Genotypen eine signifikante Regulation nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sequenzen TC236806 und TC230132 sehr interessante Kandidaten für die Vermittlung einer Hitzetoleranz in Bezug auf die Verbesserung der Lebensfähigkeit des Pollens sind. Diese könnten die Zellwandbestandteile durch Herunterregulation der Esterase/Lipase/Thioesterase besser vor Hitzestress schützen, gleichzeitig aber auch eine Erklärung für den verringerten Fruchtansatz sein. Es bietet sich also an, nachfolgende Analysen mit diesen Genen durchzuführen.

4.4 Identifizierung von QTL-tragenden Genomregionen

4.4.1 Qualität der genetischen Karte

Für die Erstellung einer genetischen Karte fanden Genotypisierungen mit 384 AFLP-Primerkombinationen und 169 SSR-Marker statt. Je AFLP-Primerkombination konnten durchschnittlich etwa 90 Fragmente amplifiziert und analysiert werden. Auf Grund der Verwendung einer intraspezifischen Kreuzung zweier genetisch sehr ähnlichen *Solanum lycopersicum*-Sorten sowie einer F1-Hybride als Kreuzungselter durch MITTERBAUER (2008), konnte für nur rund 4% der untersuchten Primerkombinationen ein genetischer Polymorphismus im Untersuchungsmaterial detektiert werden. Dieser geringe Polymorphiegrad bestätigte sich im Rahmen der DARt- und SNP-Analysen. Diese Beobachtung stimmt gut mit den Ergebnissen von MILLER UND TANKSLEY (1990) überein, welche eine Variabilität von 5% in *Lycopersicon esculentum* beschrieben und damit auf die geringe genetische Diversität innerhalb dieser Art hinwiesen. Dies führte dazu, dass die meisten genetischen Karten auf interspezifischen Kreuzungen beruhen. SALIBA-COLOMBANI et al. (2000) erstellten eine genetische Karte basierend auf zwei Inzuchtlinien von *Lycopersicon esculentum* and *L. esculentum* var. *Cerasiforme*, beobachteten aber einen höheren Polymorphiegrad zwischen 30% in Bezug auf RFLP-Marker und 100 % für AFLP-Primerkombinationen. In ihrer Studie war eine Anhäufung der AFLP-Marker in Zentromer-nahen Regionen und eine ungleichmäßige Verteilung über das Genom zu beobachten. In der vorliegenden Studie verteilten sich die AFLP-Marker gleichmäßig über das Genom.

Für die Kartierungspopulation CLN1621L x Pannovy konnte eine belastbare genetische Karte erstellt werden, die insgesamt 618,1 cM umfasst. Ein Vergleich mit der Karte von SALIBA-COLOMBANI et al. (2000) mit einer Gesamtlänge von 965 cM und einer durchschnittlichen Distanz von 8,3 cM zwischen zwei Markern wies nach, dass eine höhere Markerdichte und eine kürzere Kartenlänge erzielt werden konnte. Der Abgleich der hier erarbeiteten genetischen Karte mit der physikalischen Referenzkarte bestätigte deren gute Qualität, da zwischen 7 % (Chromosom 4) und nahezu 100 % (Chromosom 10) einzelner Chromosomen des Tomatengenoms mit molekularen Markern abgedeckt werden konnte. Besonders gut durch Marker repräsentiert waren die Chromosomen 1, 3, 5, 6, 9, 10, 11 und 12. Für Chromosom 10 erfolgte eine nahezu 100 %ige Abdeckung. Für einige Chromosomen wie Chromosom 2 (16%), 8 (15%) und 9 (80%) konnten höhere Abdeckung als angegeben

durch physikalisch nicht kartierte DArT- oder AFLP-Marker erzielt werden, eine exakte Berechnung war aber auf Grund des Fehlens von Ankermarkern zur physikalischen Karte in distalen und proximalen Bereichen des Genoms nicht möglich.

Zahlreiche Studien belegen, dass es Tendenzen in der Lokalisierung von DNA-Markern in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen gibt. SHIRASAWA et al. (2010) fanden heraus, dass Marker in kodierenden Bereichen eher gleichmäßig über das Chromosom verteilt zu finden sind, während Marker in nicht-kodierenden Bereichen eher Zentromer-nahe anzusiedeln sind. Unter Verwendung von SNP-Markern in hoher Anzahl sollte die Wahrscheinlichkeit einer gleichmäßigen Markerabdeckung der Chromosomen erhöht werden. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Studie für die rekombinierenden Bereiche beobachtet werden. In den berechneten genetischen Karten wurden relativ regelmäßige Verteilungen der unterschiedlichen Markertypen auf den Chromosomen beobachtet. Diese Tatsache erhöht die Wahrscheinlichkeit, Genomregionen mit einem signifikanten Einfluss auf züchterisch wertvolle Merkmale im Rahmen einer QTL-Studie identifizieren zu können.

Eine Voraussetzung für die Durchführbarkeit einer QTL-Studie ist die zuverlässige Anordnung der kartierten molekularen Marker auf den Kopplungsgruppen. Nur durch eine korrekte Anordnung der Marker können Effekte innerhalb eines Intervalls mit Hilfe der Intervallkartierung abgeschätzt werden. Die in der vorliegenden Arbeit erstellte genetische Karte wies eine ausgeprägte Kollinearität zur physikalischen Karte der Tomate auf. Lediglich in seltenen Fällen wie z.B. auf Chr. 1, 3 oder 7 kamen kleinere Rearrangements einzelner Marker vor. Eine Verschiebung ganzer Blöcke wurde nicht detektiert. Die gute Übereinstimmung mit der physikalischen Karte der Tomate sowie die gleichmäßige Verteilung der untersuchten molekularen Marker auf der genetischen Karte dokumentieren, dass die in dieser Arbeit berechnete genetische Karte sehr gut für eine Analyse von QTL-tragenden Genomregionen mit Bezug zu phänotypischen Merkmalen geeignet ist.

4.4.2 Identifizierung merkmalsassoziierter Genomregionen

Mit Hilfe der Intervallkartierung konnten insgesamt 20 QTL mit Bezug zur Hitzetoleranz auf 6 der 12 Chromosomen der Tomate identifiziert werden. In vorangegangenen Studien wurden vor allem in Wildarten resistenzspezifische, aber auch toleranz- oder morphologiebezogene QTL detektiert (Zusammenfassung siehe FOOLAD, 2007; LIU et al., 2011; RON et al., 2013). Wenig ist bislang über QTL für die Hitzetoleranz oder damit verbundene Merkmale wie die Lebensfähigkeit des Pollens oder den Fruchtansatz bekannt.

Durch die Anwendung der Intervallkartierung, welche ein Vorhandensein doppelter chromosomaler Rekombinationsereignisse nicht berücksichtigt und damit zu Fehleinschätzungen eng benachbarter QTL führen kann (KEARSEY, 1998), könnte es sich bei QTL benachbarter Positionen um eine einzige merkmalsassoziierte Genomregion mit überschätzter Wirkung des umgebenden Genombereiches handeln. Um keine eventuell wichtigen Erkenntnisse zu übergehen, werden alle QTL einzeln, aber auch in Zusammenhang zu benachbarten QTL diskutiert.

4.4.2.1 Fruchtansatz

Für das Merkmal Fruchtansatz, welches bereits mehrfach in QTL-Studien unter optimalen Temperaturbedingungen untersucht wurde, konnten 3 QTL detektiert werden. Auf Chromosom 6 erklärt der QTL QFA_6 (LOD= 2,79) 8,6 % der beobachteten phänotypischen Varianz. Es konnte eine Genomregion zwischen 48,7 cM und 49,1 cM mit der Hitzetoleranz in Verbindung gebracht werden. Eine Bestätigung des chromosomenweit signifikanten QTL durch signifikante Marker/Merkmal-Assoziationen erfolgte nicht. Für den QTL QFA_7 gelang eine Bestätigung der beobachteten Effekte in der Intervallkartierung mit Hilfe von signifikanten Marker/Merkmalassoziationen innerhalb des QTL-Intervalls. Zwei DArT-Marker weisen einen Zusammenhang mit dem Merkmal Fruchtansatz auf. Das QTL-Intervall umfasst den Genomabschnitt von 24,3 cM bis 27,6cM, was einer distalen Position auf der physikalischen Karte entspricht. Der dritte QTL mit Bezug zum Fruchtansatz unter Hitzestress (QFA_8) wurde auf Chromosom 8 lokalisiert. Der LOD-Wert dieses QTL überschreitet die chromosomale Signifikanzschwelle, beinhaltet aber keine signifikant assoziierten Marker. Eine physikalische Lokalisation erfolgte distal im Bereich zwischen 55,7 Mbp und 56,9 Mbp.

Studien unter ungestressten Bedingungen in interspezifischen Kreuzungen bzw. Rückkreuzungspopulationen von Wildtypen wiesen Einflüsse der Chromosomen 3, 4, 5, 7, 9 und 12 auf das Merkmal Fruchtansatz nach (DOGANLAR et al., 2002; FRARY et al., 2004; LIU et al., 2011). GRILLI et al. (2007) analysierten QTL-Regionen für das Merkmal Fruchtansatz unter langanhaltenden Hitzestressbedingungen zwischen 33°C und 50°C und konnten Genomregionen auf 3 Kopplungsgruppen mit dem Fruchtansatz in Verbindung bringen. Eine Zuordnung zu den Chromosomen der Tomate erfolgte nicht. Auf Grund des Fehlens von Ankermarkern bzw. von Bezügen zu physikalischen Positionen kann ein detaillierter Vergleich der Ergebnisse mit den hier identifizierten QTL nicht stattfinden.

MITTERBAUER (2008) versuchte über Introgressionslinien einen Eindruck über Genomregionen mit Einfluss auf den Fruchtansatz unter Hitzestress zu bekommen und vermuteten, dass merkmalsassoziierte Genomabschnitte auf den Chromosomen 1, 3 und 12 vorliegen. In der vorliegenden Studie konnte für keines der genannten Chromosomen ein Einfluss in der untersuchten Population beobachtet werden. Da die Untersuchungen bei MITTERBAUER (2008) auf Introgressionslinien von *Lycopersicon peruvianum* basierten und in der vorliegenden Arbeit Vertreter der Art *Solanum lycopersicum* untersucht wurden, deutet dies auf artspezifische Unterschiede in der Hitzetoleranzreaktion hin.

Durch die in dieser Arbeit identifizierten QTL mit Bezug zum Merkmal Fruchtansatz konnte 44,3 % der phänotypischen Varianz erklärt werden. Ein Potential der Nutzung der hier gewonnen Erkenntnisse zur Entwicklung von Selektionsmethoden zur Verbesserung der Hitzetoleranz besteht damit. Da die Identifizierung von QTL auf phänotypischen Daten lediglich einer Umwelt beruhte, ist zunächst eine Validierung der Ergebnisse in zusätzlichen Umwelten erforderlich, um eine Übertragbarkeit der Erkenntnisse in die praktische Züchtung für die Verbesserung des Fruchtansatzes unter Hitzestressbedingungen zu prüfen.

4.4.2.2 Pollenausbeute und Anzahl lebensfähiger Pollenkörner

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten 4 QTL für das Merkmal Pollenausbeute und 1 QTL für die Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern identifiziert werden. Pleiotrope Effekte zwischen QTL traten trotz starker Korrelation der Merkmale nicht auf.

Für das Merkmal Pollenausbeute konnten zwei QTL auf Chromosom 4 ermittelt werden. Diese liegen zwischen 3 cM und 8,5 cM bzw. 11,4 cM und 27,7 cM auf der genetischen Karte. Die LOD-Werte beider überschreiten die genomweite Signifikanzschwelle, so dass es sich hierbei um Genomregionen mit starkem Einfluss auf die Anzahl an Pollenkörnern unter Hitzestress handeln muss. Diese These unterstützt die relativ hohe Prozentzahl an durch die QTL erklärter phänotypischer Varianz (QPollG_4.1= 13,1%, QPollG_4.2= 16,1%). Innerhalb dieser Regionen bestätigen zwei signifikant assoziierte DArT-Marker die Effekte auf die Ausprägung des Merkmals Pollenausbeute. Eine Bestimmung der physikalischen Intervalle dieser QTL konnte den Einfluss einer Genomregion zwischen 60 Mbp und 64 Mbp nachweisen. Durch die vielfachen Bestätigungen der QTL-Positionen sowie den hohen Prozentsatz an erklärter phänotypischer Varianz stellen diese Genomregionen eine wertvolle Grundlage für die Verbesserung der Pollenausbeute unter Hitzestressbedingungen dar. Durch die Verfügbarkeit der Sequenzinformationen des Tomatengenoms kann gezielt nach Kandidatengenen in diesem Bereich gesucht werden. Allerdings umschreibt das QTL-Intervall noch eine relativ große Region. Deshalb sollte in zusätzlichen QTL-Studien versucht werden, das Intervall zu verkleinern und die Übertragbarkeit der hier gewonnen Erkenntnisse in andere Populationen nachzuweisen.

Auf Chromosom 8 sowie auf Chromosom 11 weisen die Genomregionen um 37 cM bzw. zwischen 0 cM und 3cM chromosomenweit signifikante Zusammenhänge mit der Pollenausbeute unter Hitzestressbedingungen auf. Die durch die QTL erklärte phänotypische Varianz beträgt 7,4 % (QPollG_8) bzw. 7,6 % (QPollG_11). Eine Verifizierung dieser Ergebnisse durch signifikante Marker/Merkmal-Assoziationen innerhalb der QTL-Intervalle konnte nicht erfolgen. Die Anzahl lebensfähiger Pollenkörner wird ebenfalls durch Genomregionen auf Chromosom 11 beeinflusst. Pleiotrope Effekte mit der QTL-Region für die Pollenausbeute wurden nicht beobachtet. Der QTL QPollk_11 umfasst das Intervall zwischen 22,6 und 26,9 cM. Dieser Locus auf Chromosom 11 erklärt 10,1 % der beobachteten phänotypischen Varianz. Weitere Genomregionen konnten nicht detektiert werden. Begründet werden könnte die geringe Anzahl an QTL-tragenden Regionen des komplex vererbten Merkmals durch die Konstitution der Kartierungspopulation. Durch die Verwendung von Kreuzungseltern der Art *Solanum lycopersicum* war die genetische Diversität in der Kartierungspopulation eingeschränkt, was in einer geringen phänotypischen Variation des Merkmals resultierte. Signifikante Unterschiede in Bezug auf die Pollenausbeute bzw. die Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern konnten nur selten innerhalb der Population beobachtet werden. Das würde darauf hindeuten, dass die innerhalb der Kartierungspopulation beobachtete Variation zu gering war, um viele der pollenbeeinflussenden Genomregionen detektieren zu können. Aus diesem Grund würde es sich anbieten, diese Analysen mit einer Population zu wiederholen, die eine höhere Variation für dieses Merkmal aufweist. Neben der Variation des Zielmerkmals besitzen insbesondere der Stichproben-

umfang einer Kartierungspopulation sowie die Anzahl an Prüfumwelten für die Zahl detektierter QTL zentrale Bedeutung (SCHÖN et al., 2004). Da innerhalb der hier durchgeführten QTL-Analyse lediglich 154 Nachkommen in nur einer Umwelt untersucht wurden, könnte der Prüfumfang in dieser Studie nicht hoch genug gewesen sein, um die in der Population enthaltenen QTL zu identifizieren. Ein verändertes Versuchsdesign würde die Effizienz einer QTL-Studie erhöhen.

Über QTL Regionen in Bezug auf die Pollenlebensfähigkeit und Pollenausbeute unter langanhaltenden Hitzestressbedingungen ist bislang nichts bekannt. TANKSLEY et al. (1984) untersuchten das Phänomen der männlichen Sterilität in *Lycopersicon pimpinellifolium* und konnten Marker für das auf Chromosom zwei lokalisierte Gen entwickeln. Ein Zusammenhang zwischen diesem Merkmal und den hier untersuchten pollenbezogenen Merkmalen könnte einen Vergleich der Studien miteinander ermöglichen. Dieser konnte aber in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Die hier identifizierten QTL stellen einen Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen dar. Da sowohl die Pollenausbeute, als auch die Anzahl lebensfähiger Pollenkörner einen Einfluss auf Merkmale der Frucht haben und wichtige Genomregionen mit Bezug zu diesen Merkmalen identifiziert werden konnten, sollten die hier erarbeiteten Ergebnisse eine Aussagekraft haben, die eine Übertragung der Erkenntnisse in andere Populationen mindestens zur schnelleren Beurteilung der Hitzetoleranz zulassen sollte. Die QTL QPollG_4.1 und QPollG_4.2 können zusammen genommen einen großen Einfluss auf die Ausbildung samenhaltiger Früchte haben und damit einen Ansatzpunkt für die Erhöhung der Vermarktungsfähigkeit von Tomatenfrüchten in tropischen und subtropischen Anbaugebieten darstellen. Eine Verifizierung der Ergebnisse in anderen Populationen und umfassenderen Umwelten sollte allerdings erfolgen.

4.4.2.3 Anzahl an Früchten pro Infloreszenz

Für das Merkmal Anzahl an Früchten pro Infloreszenz konnten 5 QTL detektiert werden. 3 dieser QTL liegen auf Chromosom 3 in einem Intervall von 24,4 cM bis 46,7 cM. Zwei eng benachbarte QTL (QNF_3.1 und QNF_3.2) sowie das nur knappe Überschreiten der Signifikanzschwelle des LOD-Wertes von QNF_3.1 sind Hinweise auf eine Überschätzung der Effekte der um den QTL QNF_3.2 liegenden Region. Auch die Beobachtung, dass für QNF_3.1 ein Einfluss nur innerhalb eines Intervalls zwischen zwei Markern nachgewiesen werden konnte und keine signifikante Korrelation eines der flankierenden molekularen Marker direkt zum untersuchten Merkmal vorliegt, spricht für die Detektion einer einzigen QTL-tragenden Region. Allerdings weist der hohe Prozentsatz an erklärter phänotypischer Varianz von QNF_3.1, welcher für ein quantitativ vererbtes Merkmal mit 7,4 % relativ hoch ist, auf eine bedeutende Genomregion auch in diesem Chromosomenbereich hin. Ein Abgleich der physikalischen Position der QTL-flankierenden Marker identifizierte deren Abstand in Höhe von 31,7 kbp, was ebenfalls für eine getrennte Betrachtung und einen QTL geringeren Effektes spricht. QNF_3.2 weist bei einem LOD von 3,25 einen höheren Prozentsatz an erklärter phänotypischer Varianz auf (9,7 %). Innerhalb des QTL-Intervalls wurden signifikante, merkmalsassoziierte

Marker identifiziert. Auch für QNF_3.3, welcher eine phänotypische Varianz von 7,5 % erklärt, konnte ein signifikant korrelierter SNP-Marker innerhalb des Intervalls ermittelt werden. Alle drei QTL können zur Aufklärung der genetischen Architektur des Merkmals Anzahl an Früchten pro Infloreszenz beitragen.

Chromosom 6 weist zwei Genomregionen mit einem Einfluss auf die Ausbildung von Früchten unter Hitzestressbedingungen auf (QNF_6.1 und QNF_6.2). Zusammen mit den auf Chromosom 3 identifizierten QTL kann eine phänotypische Varianz von 44,3 % erklärt werden. Durch diesen hohen Prozentsatz und die entscheidende Bedeutung des Merkmals Anzahl an Früchten für die Produktion von Tomaten unter Hitzestressbedingungen bietet sich die Verwendung der QTL-flankierenden Marker für eine Marker-gestützte Selektion an. Ob auf Grund der Größe der QTL-Regionen auch ertragsmindernde Gene in den Intervallen enthalten sind, muss in nachfolgenden Analysen untersucht werden.

LIU et al. (2011) berichteten in ihren Studien unter optimalen Temperaturbedingungen und in einer interspezifischen Kreuzung zwischen *Lycopersicon esculentum* Mill. XF98-7 und *Lycopersicon pimpinellifolium* LA2184 über QTL in Bezug auf das hier untersuchte Merkmal auf den Chromosomen 1, 2, 4, 5 und 9. Diese konnten in der vorliegenden Studie nicht detektiert werden. Gründe dafür sind die Verwendung unterschiedlichen Pflanzenmaterials in inter- bzw. intraspezifischen Kreuzungen und der damit verbundenen Höhe der phänotypischen Variation sowie der Beeinflussung der Ausprägung des Merkmals durch den in der vorliegenden Arbeit angelegten Hitzestress. Zwischen den Kreuzungseltern CLN1621L und Pannovy konnten unter Hitzestress keine signifikanten Unterschiede durch MITTERBAUER (2008) detektiert werden. In der Nachkommenschaft war zwar eine Aufspaltung sichtbar, signifikante Unterschiede traten aber nur sehr selten auf. Diese Beobachtung beeinflusst die Auflösung der QTL-Kartierung und die Detektion von QTL negativ (SCHÖN et al., 2004). Trotz dieser Einschränkung konnten 5 QTL für das Merkmal Fruchtansatz unter moderatem, langanhaltendem Hitzestress identifiziert werden, die einen hohen Prozentanteil der phänotypischen Varianz erklären. Die in dieser Studie erarbeiteten Erkenntnisse tragen somit zur Aufklärung der genetischen Architektur des Merkmals Fruchtansatz unter Hitzestressbedingungen bei. Soweit bekannt ist, wurden bislang keine QTL für das Merkmal Anzahl an Früchten pro Infloreszenz in Zusammenhang mit Hitzestress auf den Chromosomen 3 und 6 beschrieben. Es ist somit erstmals in der vorliegenden Arbeit gelungen, diese Genomregionen in Verbindung zur Hitzetoleranz zu bringen.

4.4.2.4 Anzahl an samenhaltigen Früchten pro Infloreszenz

Für das Merkmal Anzahl samenhaltiger Früchte unter Hitzestressbedingungen konnten 4 QTL identifiziert werden. Die QTL QNFs_4.1, QNFs_4.2 und QNFs_4.3 sind in einem relativ kleinen Intervall auf Chromosom 4 lokalisiert und eventuell als ein einziger QTL anzusehen. Innerhalb des Intervalls von QNFs_4.3 konnten 3 signifikante Marker-Merkmalassoziationen zu diesem Merkmal nachgewiesen werden, was dessen Bedeutung für die Hitzetoleranz der Tomate bekräftigt. Da für alle drei QTL eine genomweite Signifikanz auftrat, liegt der Schluss nahe, dass jeder QTL einzeln betrachtet informativ für weiterführende Analysen ist. Der hohe

Prozentsatz an phänotypischer Varianz (38,2 %), welcher durch die drei QTL erklärt wird, spricht für die Nutzung der Erkenntnisse in der praktischen Züchtung in Form einer Marker-gestützten oder genomischen Selektion. Vor einer Übertragung der Ergebnisse in die praktische Züchtung muss aber eine Verifizierung der QTL-Effekte durch mehrortige Prüfungen und variiertes Pflanzenmaterial erfolgen.

Der QTL QNFs_11, welcher eine chromosomenweite Signifikanz aufweist, wurde auf Chromosom 11 im Bereich zwischen 24,9 cM und 37,7 cM lokalisiert. Der Einfluss dieser Genomregion auf die Anzahl an samenhaltigen Früchten unter Hitzestress konnte durch die signifikante Marker/Merkmal-Assoziation eines AFLP-Markers bekräftigt werden. Da dieser QTL nur 8,1 % der beobachteten phänotypischen Varianz erklärt, bietet sich eine Verwendung zur Verbesserung der Hitzetoleranz der Tomate nur in Kombination mit den QTL auf Chromosom 4 an. Allerdings muss auch hier zuvor die Übertragbarkeit der Erkenntnisse in andere Populationen nachgewiesen werden.

In Bezug auf das Merkmal samenhaltige Früchte unter Hitzestressbedingungen sind bislang noch keine QTL beschrieben worden. Lediglich Merkmalen wie beispielsweise der Samenausbeute konnten Genomregionen auf fast allen 12 Chromosomen zugeordnet werden (SEMEL et al., 2006).

Eine Analyse der von MITTERBAUER (2008) erhobenen Boniturdaten für das Merkmal Anzahl an samenhaltigen Früchten unter Hitzestressbedingungen deckt eine eingeschränkte Variation zwischen den Eltern der Kartierungspopulation auf. Signifikante Unterschiede in der Ausprägung des Merkmals konnten nur zwischen Vertretern der Nachkommenschaft beobachtet werden. Die geringe Variation kann einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit haben, QTL für das untersuchte Merkmal zu detektieren (SCHÖN et al., 2004). Die relativ geringe Anzahl an QTL für dieses komplex vererbte Merkmal könnte dadurch erklärt werden. Dass trotz der geringen Variation bzw. der Verwendung einer intraspezifischen Kreuzung QTL mit relativ großen Effekten identifiziert werden konnten, weist auf die Bedeutung dieser Genomregionen für die Ausbildung einer Hitzetoleranz in dieser Population hin. Die Prüfung der Übertragbarkeit der in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf das Merkmal Anzahl an samenhaltigen Früchten unter Hitzestressbedingungen auf andere Populationen sowie der Umweltstabilität der QTL wird die Aufklärung der Hitzetoleranzmechanismen der Tomate unterstützen. Besonders QNFs_4.3 könnte durch den hohen Prozentsatz an erklärter phänotypischer Varianz sowohl für die Forschung als auch für die Züchtung interessant sein.

4.4.2.5 Anzahl an Blüten pro Infloreszenz

Die Anzahl an Blüten ist unter Hitzestressbedingungen durch das Abwerfen von Blüten stark beeinflusst. Eine Analyse der diesen Prozessen unterliegenden genetischen Mechanismen erfolgte bislang nicht. SEMEL et al. (2006) analysierten ausführlich die Architektur vieler morphologischer Eigenschaften der Tomate in Introgressionslinien von *Solanum lycopersicum* unter ungestressten Bedingungen und konnten Einflüsse auf die untersuchten Merkmale für zahlreiche Chromosomen nachweisen. Insgesamt detektierten sie 841 QTL für 35 Merkmale, darunter auch das Merkmal Anzahl an Früchten pro Infloreszenz. Effekte auf die Anzahl an Blüten

ordneten sie den Chromosomen 1, 4, 5, 8, 9, 10, 11 und 12 zu. Eine exakte Lokalisation der QTL erfolgte nicht. Da QTL auf fast allen Chromosomen nachgewiesen wurden, ist ein Vergleich mit den in der vorliegenden Studie und unter Hitzestress detektierten QTL kaum aussagekräftig.

Der Einfluss von Chromosom 8 auf die Anzahl an Blüten konnte in der vorliegenden Arbeit unter Hitzestress bestätigt werden. So wurden zahlreiche Marker/Merkmal-Assoziationen im QTL-Intervall von QB_8 zwischen 33,6 cM und 40,2 cM identifiziert. Die chromosomenweite Signifikanz sowie der Anteil an durch diesen QTL erklärter phänotypischer Varianz (8,2 %) geben einen Hinweis auf die Bedeutung dieser Genomregion für die Ausprägung einer Hitzetoleranz in Bezug auf das Abwerfen der Blüten bei der Tomate. Weiterführende Analysen zur Bestätigung der hier gewonnenen Erkenntnisse können die Aufklärung dieses komplex vererbten Merkmals unterstützen.

Auf Chromosom 7 wurden zwei Regionen mit Einfluss auf das untersuchte Merkmal identifiziert. Neben der Region zwischen 18,2 cM und 20,2 cM (QB_7.1) weist der Genombereich zwischen 36,5 cM und 37,5 cM (QB_7.2) einen signifikanten Einfluss auf. Der Einfluss dieses Chromosoms auf die Anzahl an Blüten ist bei SEMEL et al. (2006) nicht beschrieben. Eine Prüfung der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse in andere Populationen sollte auf Grund des relativ geringen LOD-Wertes sowie des Fehlens von Marker/Merkmal-Assoziationen innerhalb des QTL-Intervalls erfolgen.

MITTERBAUER (2008) postulierte auf Basis von Introgressionslinien aus *Lycopersicon peruvianum* eine Lokalisation von die Blütenzahl beeinflussenden Genomregionen auf Chromosom 2 und 3. Diese Beobachtung stimmt ebenfalls nicht mit denen von SEMEL et al. (2006) überein und konnte auch in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Dies lässt auf die Genotypabhängigkeit des untersuchten Merkmals, temperaturabhängige Prozesse als Reaktion auf einen Hitzestress oder ein nicht ideales Versuchsdesign entsprechend der Erkenntnisse von SCHÖN et al. (2004) schließen.

In der vorliegenden Arbeit ist es nicht gelungen, die komplexe Architektur des quantitativ vererbten Merkmals Anzahl an Blüten pro Infloreszenz vollständig aufzuklären. Für nachfolgende Studien wird deshalb empfohlen, eine Auswahl der Kartierungspopulation basierend auf der Variation in der Nachkommenschaft sowie der Eltern, der Populationsgröße aber auch der umfangreichen Phänotypisierungsmöglichkeiten vorzunehmen und ein optimales Versuchsdesign anzustreben. Dies garantiert eine möglichst hohe Auflösung in QTL-Studien und eine Erfassung möglichst vieler Faktoren der Merkmalsbildung. Vor dem Hintergrund der starken Beeinflussung zahlreicher Merkmale durch Hitzestress sollten sich geeignete Populationen zur Evaluierung solcher Fragestellungen entwickeln lassen.

4.5 Identifizierung von Kandidatengenen für die Hitzetoleranz der Tomate

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl auf Expressions- als auch auf genomischer Ebene Informationen über Hitzetoleranzmechanismen, Regulationen als Antwort auf Hitzestress und QTL-tragende Genomregionen erarbeitet werden. Als letzter Schritt folgt die Zusammenführung der Ergebnisse der unterschiedlichen Ansätze,

um das Verständnis der Toleranzmechanismen unter langanhaltendem moderatem Hitzestress zu verbessern. Da in den hier durchgeführten Experimenten unterschiedliche Nachkommenschaften verwendet wurden, welche nur einen Elter gemeinsam hatten, sind Voraussetzungen gegeben, um die Wahrscheinlichkeit der Übertragbarkeit der hier gewonnenen Erkenntnisse in andere Populationen zu erhöhen.

Im Rahmen der QTL-Kartierung konnten 20 QTL identifiziert werden. Eine Bestimmung der physikalischen Positionen der QTL erfolgte über einen Sequenzvergleich der in der genetischen Karte lokalisierten SNP-Marker mit dem von THE TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012) veröffentlichten, vollständig sequenzierten Genom der Tomate. So wurde eine Verknüpfung der Ergebnisse der Expressionsstudie mit denen der QTL-Kartierung ermöglicht. Für drei Chromosomenabschnitte, welche die verlässlichsten QTL enthielten, konnte eine Integration differentiell exprimierter Gene in die durch SNP-Marker begrenzten QTL-Intervalle stattfinden.

Einer dieser Chromosomenabschnitte umfasst das Intervall zwischen 57,7 Mbp und 60,8 Mbp auf Chromosom 3, welcher die drei QTL QNF_3.1, QNF_3.2 und QNF_3.3 für das Merkmal Anzahl an Früchten enthält. In dieses Intervalls konnten 24 unter Hitzestress oder toleranztypspezifisch regulierte Transkripte integriert werden, welche Gene unterschiedlichster Funktionen repräsentierten. Solche umfassten sowohl weniger stark regulierte MADS-Box-Transkriptionsfaktoren als auch stark regulierte Chaperone oder Calmodulin-ähnliche Proteine. In Bezug zum Hitzestress stehen die Chaperon-Proteine der DnaJ-Klasse (TC199344, TC200209), welche eine wichtige Funktion in der Regulation von Hitzeschockproteinen wie Hsp70 und der Proteinfaltung oder der Regeneration geschädigter Zellen haben (WANG et al., 2004; HENNESSY et al., 2005; CRAIG et al., 2006; CHEN et al., 2010). Yang et al. (2009) berichteten über eine Beteiligung von DnaJ-Proteinen an der Reaktion auf einen Hitzeschock und die Hochregulation der Genexpression in Pollenschläuchen und vegetativem Gewebe. In Pollenkörnern sei keine Regulation zu beobachten gewesen. Da das Wachstum der Pollenschläuche für eine Befruchtung und Ausbildung von Früchten verantwortlich ist, lässt die Regulation solcher Transkripte auf Kandidatengene für die Ausbildung von Früchten unter Hitzestress schließen. In meiotischen Antheren konnte für eines der Transkripte ein Regulationsunterschied zwischen hitzetoleranten und hitzesensitiven Genotypen unter Hitzestress mit einer stärkeren Expression in der hitzetoleranten Gruppe beobachtet werden, ein anderes zeigte allerdings einen Unterschied der Toleranzgruppen unter Normalbedingungen (Kapitel 4.3.1.2). Eine generelle Aussage über die Expression der unterschiedlichen DnaJ-Proteine und deren Wirkung auf die Anzahl an Früchten unter Hitzestress kann auf Grund der relativ geringen Regulationen nicht abschließend erfolgen. Da für diese Gruppe von Proteinen bereits mehrfach eine Funktion in der Hitzestressantwort beschrieben wurde, könnte eine Nutzung dieser Kandidatengene zur Verbesserung der Hitzetoleranz der Tomate vielversprechend sein.

Ebenfalls in Verbindung mit der Hitzestressreaktion könnte der WRKY-Transkriptionsfaktor stehen (Kapitel 4.3.1.6). Für solche Faktoren ist beschrieben, dass sie eine fördernde Wirkung auf Autophagie-bezogene Prozesse haben und damit den Zelltod begünstigen. Der hier identifizierte WRKY-Transkriptionsfaktor zeigt eine signifikante 1,9-fache Hochregulation im Vergleich beider Toleranzgruppen zusammengenommen nach

Hitzestressapplikation, was auf eine Expression als toleranzunabhängige Reaktion auf den Hitzestress schließen lässt. Eine stärkere signifikante Hochregulation in den hitzesensitiven Genotypen im Vergleich zu einer nicht signifikanten Regulation in den hitzetoleranten Genotypen deutet auf eine wichtige Funktion in der Ausbildung einer Hitzesensitivität hin. Die Expressionsstärke unterscheidet sich in den Toleranzgruppen nicht signifikant in beiden Temperaturregimen. Das Transkriptregulationsmuster dieses Gens könnte entweder in Zusammenhang mit einer verringerten Anzahl an Früchten durch Schädigung des Pollens bzw. der Blüte entsprechend autophagischer Prozesse oder einem kompletten Absterben der Blüten bzw. der Schädigung der Blütenmorphologie durch Verstärkung der Autophagie in den entsprechenden Organen stehen. Die Analyse solcher Zusammenhänge kann helfen, die Mechanismen der Hitzetoleranz besser zu verstehen und effektiver auf diese Merkmale mit Hilfe Marker-gestützter Selektion zu selektieren.

Der zweite Genomabschnitt, für welchen ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Strategien möglich ist, ist der Bereich zwischen 36,6 Mbp und 37,0 Mbp auf Chromosom 6. In diesem Bereich konnten signifikante Einflüsse auf die Merkmale Anzahl an Früchten und Fruchtansatz beobachtet werden. Innerhalb dieses Intervalls konnten im Rahmen der Expressionsanalyse 4 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Das am stärksten regulierte Transkript repräsentiert eine GDSL Esterase/Lipase aus *Arabidopsis thaliana*. Für diese ist beschrieben, dass sie hydrolytische Aktivitäten aufweist und somit in apoptotische Vorgänge involviert sein kann (AKOH et al., 2004). Ein Expressionsunterschied in Bezug auf dieses Gen konnte besonders zwischen den Toleranzgruppen unter Normalbedingungen beobachtet werden, wobei die hitzetoleranten Genotypen eine geringere Expression aufwiesen. Eine nicht signifikante Hochregulation als Antwort auf einen Hitzestress war ausschließlich in der hitzetoleranten Gruppe zu beobachten. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei der GDSL Esterase/Lipase um ein Kandidatengen für die Verbesserung der Anzahl an Früchten bzw. den Fruchtansatz unter Hitzestress handelt, ist sehr gering. Eine signifikante hitzestressinduzierte Regulation zeigt innerhalb dieses QTL-Intervalls nur ein BHLH Transkriptionsfaktor. Ob dieser aber in Bezug zur Hitzetoleranz in den untersuchten Merkmalen steht, müsste in einem neuerlichen Experiment überprüft werden. Eine Analyse weiterer Kandidatengene innerhalb dieses Segmentes ist allerdings anzuraten.

Auf Chromosom 8 konnten in der Region zwischen 55,7 Mbp und 56,88 Mbp QTL für die Merkmale Anzahl an Blüten, Pollenausbeute sowie den Fruchtansatz identifiziert werden. In diesem Abschnitt konnten 10 differentiell exprimierte Gene integriert werden. Zwei repräsentieren die unter Kapitel 4.3.1.5 diskutierte Pectin-Acetylerase. Für diese wurde eine Funktion als Hydrolase und damit auch eine Beteiligung an apoptotischen Prozessen nachgewiesen. CAMEJO et al. (2005) untersuchten den Effekt von Hitzestress auf die Zellwände und vermuteten eine Verringerung der Membranintegrität unter erhöhten Temperaturen. Diese Beeinflussung deutet auf einen Zusammenhang mit der Pectinase-Acetylerase-Aktivität hin. In der vorliegenden Studie war eine starke Herunterregulation des entsprechenden Transkripts im Vergleich zwischen Normalbedingungen und Hitzestress zu beobachten. Ein Unterschied in der Reaktion der Toleranztypen war in der Form nachweisbar, dass eine höhere Expression in hitzesensitiven Genotypen unter Normalbedingungen auftrat und diese bei

Hitzestress eine viel stärkere Herunterregulation als Schutz vor zusätzlicher Schädigung der Zellmembranen durch den enzymatischen Abbau aufwies. Das deutet darauf hin, dass eine Herunterregulation der Transkripte dieses Gens für einen Schutz gegen Austrocknung und Zellabbau unerlässlich ist. Eine solche Regulation kann die in diesem Intervall beobachteten QTL-Effekte erklären, da eine Störung des Zellgefüges zu Entwicklungsproblemen und damit beispielsweise zu einer verringerten Pollenmenge oder einem reduzierten Fruchtansatz führen kann. Die Pectin-Acetylerase ist somit ein vielversprechender Kandidat für die Vermittlung einer Hitzetoleranz in der Tomate. Investitionen in die weitere Analyse dieser Zusammenhänge lohnen sich sowohl für die Forschung als auch für die Entwicklung neuer Züchtungsstrategien.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Erkenntnisse über den Einfluss verschiedener Klimafaktoren des Hitzestresses, Zusammenhänge zwischen phänotypischen Merkmalen und Regulationsmechanismen der Hitzestressantwort gewonnen werden. Es wurden Einflüsse der Bodentemperatur auf die Leistungsfähigkeit ausgewählter Genotypen unter Hitzestressbedingungen im Freiland detektiert. Dies lässt auf eine Bedeutung des Wurzelsystems in der Ausbildung einer Hitzetoleranz schließen. Ein solcher Zusammenhang könnte gezielt in der praktischen Züchtung genutzt werden, um die Hitzetoleranz der Tomate zu erhöhen. Diese Erkenntnis wird durch die Beobachtung von MORALES et al. (2003) bzw. KHAN et al. (2014) unterstützt, welche über eine starke Beeinflussung des Wurzelsystems durch Hitzestress berichteten und als Lösung die exogene Applikation von Acetyl-Salicylsäure oder 24-Epibrassinolid zur Abschwächung des negativen Effektes des Hitzestresses anboten. Eine nähere Analyse der Zusammenhänge zwischen Wurzelmorphologie, -wachstum sowie der Bewurzelungstiefe und der Hitzestresstoleranz bietet sich folglich an.

In Bezug auf die Detektion von indirekten Selektionsparametern zur Effizienzsteigerung der Selektion konnten die Zusammenhänge zwischen der Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern und dem Merkmal Fruchtansatz bestätigt werden (SATO et al., 2006). Dieser Parameter zeigt vielfältige Korrelationen zu unter Hitzestress beeinflussten Merkmalen wie dem Samenindex. Auch für diese ist die Beurteilung der Lebensfähigkeit der Pollenkörner für die Einstufung einer Hitzetoleranz möglich und damit dessen Verwendung als schneller und effizienter Selektionsparameter gegeben.

Die Identifizierung differentiell exprimierter Gene hat zur Aufklärung der Hitzetoleranzmechanismen in Tomatenantheren unter langandauerndem moderatem Hitzestress entsprechend tropischer und subtropischer Anbaubedingungen beigetragen und Unterschiede zu Mechanismen unter kurzzeitigem Hitzestress aufgezeigt. Die dabei identifizierten Gene, beispielsweise das RhoGD12 oder auf den Pollenschlauch bezogene Gene, besitzen das Potential, die Hitzetoleranz in der Tomate zu verbessern, das Auswachsen der Pollenschläuche zu unterstützen und damit den Fruchtansatz unter Hitzestress zu sichern. Funktionelle Nachweise, beispielsweise über transgene Ansätze, könnten die Funktion dieser Gene in der Hitzestressantwort bestätigen. Bei Verifizierung der Ergebnisse müssten neue Marker aus den Sequenzen der Kandidatengene abgeleitet, überprüft und für die Züchtung nutzbar gemacht werden. Dies ermöglicht die Nutzung der neuen Erkenntnisse für Marker-gestützte Selektionsansätze und steigert die Effizienz der Züchtung hitzetoleranter Linien. Eine Übertragung der Ergebnisse in andere Populationen könnte weitere Evidenzen bringen und die Anwendungsmöglichkeiten auch auf andere Arten erweitern.

Die genetische Aufklärung von Marker/Merkmal-Beziehungen konnte Genombereiche identifizieren, welche einen signifikanten Einfluss auf züchterisch bedeutende Merkmale wie den Fruchtansatz oder die Anzahl an Blüten pro Infloreszenz aufweisen. Da die flankierenden Marker meist ein relativ großes Intervall umspannen und nicht direkt in einer Marker-gestützten Selektion eingesetzt werden sollten, muss eine höhere Auflösung in

nachfolgenden QTL-Studien zur Feinkartierung und Identifizierung möglicher Kandidatengene erzielt werden. Für diesen Zweck können aus der Tomatengenomsequenz gezielt neue Marker entwickelt und in die Zielintervalle kartiert werden. Die in diesen Intervallen lokalisierten, hitzestressregulierten Transkripte stellen im Zusammenhang mit der Anreicherung von Markern attraktive Sequenzressourcen dar. Alternativ eröffnet eine genomweite Assoziationskartierung die Möglichkeit zur Identifizierung enger gekoppelter Marker (SHIRASAWA et al., 2013). Diese könnten für Selektionsentscheidungen zur Verbesserung der Hitzetoleranz herangezogen werden.

Über den Vergleich der Ergebnisse der Expressionsstudie und der QTL-Kartierung konnten in Antheren der Tomate differentiell unter Hitzestress exprimierte Gene in QTL-tragenden Regionen des Tomatengenoms lokalisiert werden. Diese Beobachtung bestätigt die in den beiden Studien gewonnen Erkenntnisse zur genetischen Architektur der Hitzetoleranz in Tomaten. Bei den regulierten Genen handelt es sich um Kandidaten zur Verbesserung der Hitzetoleranz in der Tomate. Die Verwendung unterschiedlichen Pflanzenmaterials in den Studien lässt auf die Übertragbarkeit der erarbeiteten Erkenntnisse auf andere Populationen schließen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Kandidatengene könnten somit in anderen Vertetern der Art *Solanum lycopersicum* zur Verbesserung der Hitzetoleranz beitragen. Diese These müsste in nachfolgenden Projekten in umfangreichen Tomatensortimenten näher untersucht werden. Ein funktioneller Nachweis kann über transgene Ansätze durch Einbringen der Kandidatengene in Tomatenpflanzen unterschiedlichen Toleranztyps erfolgen.

6. Referenzen

- ABDUL-BAKI, A. A (1991): Tolerance of tomato cultivars and selected germplasm to heat stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Vol. 116 (6): 1113-1116
- AHN, Y. J UND ZIMMERMAN, J. L. (2006): Introduction of the carrot HSP17.7 into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization in vitro. *Plant Cell Environment*, Vol. 29: 95–104
- AKOH, C. C.; LEE, G. C; LIAW, Y. C.; HUANG, T. H UND SHAW, J. F. (2004): GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res.*, Vol. 43(6): 534-52
- ALMOGUERA, C.; ROJAS, A.; DÍAZ-MARTÍN, J.; PRIETO-DAPENA, P.; CARRANCO, R. UND JORDANO, J. (2002): A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15; 277(46):43866-72
- ANNAMALAI, P. UND YANAGIHARA, S. (1999): Identification and characterization of a heat-stress induced gene in Cabbage encodes a Kunitz type protease inhibitor. *Journal of Plant Physiology*, Vol. 155: 226–233
- ASHRAF, M. UND HAFEEZ, M. (2004): Thermotolerance of pearl millet and maize at early growth stages: Growth and nutrient relations. *Biologia Plantarum*, Vol. 48: 81–86
- BADISA, R. B.; CHAUDHURI, S. K.; PILARINOU, E.; RUTKOSKI, N. J.; HARE, J. UND LEVENSON, C. W. (2000): *Licania michauxii* Prance root extract induces hsp 70 mRNA and necrotic cell death in cultured human hepatoma and colon carcinoma cell lines. *Cancer Letter*, Vol. 149 (1-2): 61-8
- BAI, Y. UND LINDHOUT, P. (2007): Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, Vol. 100: 1085–1094
- BALOCH, M.; MORIMOTO, T. UND HATOU, K. (2006): Postharvest heat stress application to reduce water loss in tomato during storage. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. Manuscript FP 06 018. Vol. VIII
- BANIWAL, S. K.; BHARTI, K.; CHAN, K. Y.; FAUTH, M.; GANGULI, A.; KOTAK, S.; MISHRA, S. K.; NOVER, L.; PORT, M.; SCHARF, K.-D.; TRIPP, J.; WEBER, C.; ZIELINSKI, D. UND VON KOSKULL-DÖRING, P. (2004): Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.*, Vol. 29 (4): 471-487
- BARTKIEWICZ (2011): Histologische und genetische Untersuchungen zum Hitzestress in Tomaten. Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover
- BECKER, J. D.; BOAVIDA, L. C.; CARNEIRO, J.; HAURY, M. UND FEIJO, J. A. (2003): Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiol.*, Vol. 133: 713–725
- BELLU, A. R. UND KIEL, J. A. (2003): Selective degradation of peroxisomes in yeasts. *Microscopy Research and Technique*, Vol. 61: 161– 170
- BITA, C. E; ZENONI, S; VRIEZEN, W. H; CELESTINA, M.; PEZZOTTI, M. UND GERATS, T. (2011): Temperature stress differentially modulates transcription in meiotic anthers of heat-tolerant and heat-sensitive tomato plants. *BMC Genomics* 2011, Vol. 12: 384
- BOKSZCZANIN, K. L.; SOLANACEAE POLLEN THERMOTOLERANCE INITIAL TRAINING NETWORK (SPOT-ITN) CONSORTIUM UND FRAGKOSTEFANAKIS, S. (2013): Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Frontiers in Plant Science*, Vol.4: 315

- BOLAÑOS, J. A. UND HSIAO, T. C. (1991): Photosynthetic and respiratory characterization of field grown tomato. *Photosynth Res.*, Vol. 28 (1): 21-32
- BUKAU, B. UND HORWICH, A. L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.*, Vol. 92(3): 351-66
- CAMEJO, D.; RODRIGUEZ, P.; MORALES, A. M.; AMICO, J. M.; TORRECILLAS, A. UND ALARCON, J. J. (2005): High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology*, Vol. 162: 281–289
- CHEN, K. M.; HOLMSTRÖM, M.; RAKSAJIT, W.; SUORSA, M.; PIIPPO, M. UND ARO, E. M. (2010): Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, Vol. 43: 1471–2229
- CHURCHILL, G. A. UND DOERGE, R. W. (1994): Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping. *Genetics*, Vol. 138: 963-971
- CLARKE, P. G. (1990): Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, Vol. 181: 195–213
- CRAIG, E. A.; HUANG, P.; ARON, R. UND ANDREW, A. (2006): The diverse roles of J proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 156: 1–21
- CUERVO, A. M. (2004a): Autophagy: In sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14:70–77
- CUERVO, A. M. (2004b): Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.*, Vol. 263 (1-2): 55-72
- DEMARTY, M.; MORVAN, C. UND THELLIER, M. (1984): Calcium and the cell wall. *Plant, Cell & Environment*, Vol. 7 (6): 441-448
- DICE, J. F. (2000): Lysosomal Pathways of Protein Degradation, *Molecular Biology Intelligence Unit*, Vol. 11
- DOGANLAR, S.; FRARY, A.; KU, H. M. UND TANKSLEY, S. D. (2002): Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome*, Vol. 45 (6): 1189–1202
- DOKLADNY, K.; ZUHL, M. N.; MANDELL, M.; BHATTACHARYA, D.; SCHNEIDER, S.; DERETIC, V. UND MOSELEY, P.L. (2013): Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: heat shock response and autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 288 (21): 14959-14972
- DUCK, N. B. UND FOLK, W. R. (1994): Hsp70 heat shock protein cognate is expressed and stored in developing tomato pollen. *Plant Molecular Biology*, Vol. 26(4): 1031-9
- EZURA, H. (2009): Tomato is a next-generation model plant for research and development. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, Vol. 78: 1–2
- FIRON, N.; SHAKED, R.; PEET, M. M.; PHARR, D. M.; ZAMSKI, E.; ROSENFELD, K.; ALTHAN, L. UND PRESSMAN, E. (2006): Pollen grains of heat tolerant tomato cultivars retain higher carbohydrate concentration under heat stress conditions. *Scientia Horticulturae*, Vol. 109: 212–217
- FIRON, N.; PRESSMAN, E.; MEIR, S.; KHOURY, R. UND ALTAHAN, L. (2012): Ethylene is involved in maintaining tomato (*Solanum lycopersicum*) pollen quality under heat-stress conditions. *AoB PLANTS* 2012: pls024; doi:10.1093/aobpla/pls024
- FINKA, A.; MATTOO, R. U. UND GOLOUBINOFF, P. (2011): Meta-analysis of heat- and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. *Cell Stress Chaperones*, Vol. 16: 15–31
- FOOLAD, M. R.; ZHANG, L. P. UND SUBBIAH, P. (2003): Genetics of drought tolerance during seed germination in tomato: inheritance and QTL mapping. *Genome*, Vol. 46 (4): 536–545

- FOOLAD, M. R. (2005): Breeding for abiotic stress tolerances in tomato. In: Abiotic Stresses: Plant resistance through breeding and molecular approaches. The Haworth Press 2005:613-684
- FOOLAD, M. R. (2007): Genome Mapping and molecular breeding of tomato. International Journal of Plant Genomics 2007, Article ID 64358, 52 pages
- FRAGKOSTEFANAKIS, S.; SIMM, S.; PAUL, P.; BUBLAK, D.; SCHARF, K.-D UND SCHLEIFF, E. (2015): Chaperone network composition in *Solanum lycopersicum* explored by transcriptome profiling and microarray meta-analysis. Plant Cell Environment, Vol. 38 (4): 693-709
- FRANK, G.; PRESSMAN, E.; OPHIR, R.; ALTHAN, L.; SHAKED, R.; FREEDMAN, M.; SHEN, S. UND FIRON, N. (2009): Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat stress response. J Exp Bot., Vol. 60 (13): 3891–3908
- FRARY, A.; FULTON, T.M.; ZAMIR, D UND TANKSLEY, S. D. (2004): Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* × *L. pennellii* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae. Theoretical and Applied Genetics, Vol. 108 (3): 485–496
- FRARY, A.; GÖL, D.; KELEŞ, D.; ÖKMEN, B.; PINAR, H.; ŞİĞVA, H.; YEMENICIOĞLU, A. UND DOĞANLAR, S. (2010): Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. BMC Plant Biology, Vol. 10: 58
- FRASCHINA, A. A.; SOZZI, G. O. UND CASCONI, O (1998): Impact of a chronic exposure to a high temperature stress in tomato fruit ripening. Acta Horticulturae (ISHS), Vol. 464: 515-515
- FÜLLGRABE, J.; KLIONSKY, D. J. UND JOSEPH, B. (2014): The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. Nature Reviews Molecular Cell Biology, Vol. 15: 65–74
- GALLUZZI, L.; MAIURI, M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M. UND ZITVOGEL, L. (2007): Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. Cell Death Differ, Vol. 14: 1237–1243
- GARCHERY, C.; GEST, N.; DO, P. T.; ALHAGDOW, M.; BALDET, P.; MENARD, G.; ROTHAN, C.; MASSOT, C.; GAUTIER, H.; AARROUF, J.; FERNIE, A. R. UND STEVENS, R. (2013): A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit. Plant Cell Environment, Vol. 36(1): 159-75
- GETHING, M. J. UND SAMBROOK, J. (1992); Protein folding in the cell. Nature, Vol. 355: 33–45
- GIORNO, F.; WOLTERS-ARTS, M.; GRILLO, S.; SCHARF, K.D.; VRIEZEN, W.H. UND MARIANI, C. (2010): Developmental and heat stress-regulated expression of *hsfa2* and small heat shock proteins in tomato anthers. Journal of Experimental Botany, Vol. 61 (2): 453-462
- GONG, M.; VAN DER LUIT, A. H.; KNIGHT, M. R. UND TREWAVAS, A.J. (1998): Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. Plant Physiology, Vol. 116(1): 429–437
- GREER, D. H. UND WEEDON, M. M. (2012): Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. Plant Cell Environment, Vol. 35: 1050–1064
- GRILLI, G. V. G.; TREVIZAN BRAZ, L. UND MACEDO LEMOS, E. G. (2007): QTL identification for tolerance to fruit set in tomato by fAFLP markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology, Vol. 7: 234-241

- GUR, A.; SEMEL, Y.; OSORIO, S.; FRIEDMANN, M.; SEEKH, S.; GHAREEB, B.; MOHAMMAD, A.; PLEBAN, T.; GERA, G.; FERNIE, A. R. UND ZAMIR, D. (2011): Yield quantitative trait loci from wild tomato are predominately expressed by the shoot. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 122 (2): 405–420
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. UND SHIVANNA, K. R. (1984): The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the Fluorochromatic (FCR) Test. Procedure. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 67: 367-375
- HAREL, D; FADIDA, H; SLEPOY, A.; GANTZ, S. UND SHILO, K. (2014): The effect of mean daily temperature and relative humidity on pollen, fruit set and yield of tomato grown in commercial protected cultivation. *Agronomy*, Vol. 4, 167-177
- HARRIS, P. J. UND STONE, B. A. (2008): Chemistry and molecular organization of plant cell walls. In ME Himmel, ed, *Biomass Recalcitrance*. Blackwell, Oxford: 60–93
- HARSANT, J.; PAVLOVIC, L.; CHIU, G.; SULTMANIS S. UND SAGE, T. L. (2013): High temperature stress and its effect on pollen development and morphological components of harvest index in the C3 model grass *Brachypodium distachyon*. *Journal of Experimental Botany* 2013:1-13
- HARTL, F. U. (1996): Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, Vol. 381(6583): 571-9
- HATFIELD, J. L.; BOOTE, K. J.; KIMBALL, B. A.; ZISKA, L. H.; IZAURRALDE, R. C. UND ORT, D. (2011): Climate impacts on agriculture: implications for crop production. *Agron. Journal*, Vol. 103: 351–370
- HENDRICK, J. P. UND HARTL, F. U. (1993): Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 62: 349–384
- HENNESSY, F.; NICOLL, W. S.; ZIMMERMANN, R.; CHEETHAM, M. E. UND BLATCH, G. L. (2005): Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40–Hsp70 interactions. *Protein Science*, Vol. 14: 1697–1709
- HWANG, J. E.; HONG, J. K.; JE, J. H; LEE, K. O. ; KIM, D. Y.; LEE, S. Y. UND LIM, C. O. (2009): Regulation of seed germination and seedling growth by an Arabidopsis phytoalexin isoform, *AtCYS6*. *Plant Cell Reports*, Vol. 28: 1623–1632
- HWANG, J. E.; HONG, J. K.; LIM, C. J.; CHEN, H.; JE, J.; YANG, K. A.; KIM, D. Y.; CHOI, Y. J.; LEE, S. Y. UND LIM, C. O. (2010): Distinct expression patterns of two Arabidopsis phytoalexin genes, *AtCYS1* and *AtCYS2*, during development and abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, Vol. 29: 905–915
- INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE (1996): Descriptors for tomato (*Lycopersicon* spp.). ISBN-10: 92-9043-294-2, <http://www.biodiversityinternational.org/>.
- JAKOB, U.; MUSE, W.; ESER, M. UND BARDWELL, J. C. (1999): Chaperone activity with a redox switch. *Cell*, Vol. 96: 341–352
- JONES, D. A; THOMAS, C. M; HAMMONDKOSACK, K. E; BALINTKURTI, P. J UND JONES, J. D. G (1994): Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, Vol. 266: 789–793
- KADIRVEL, P.; DE LA PEÑA, R.; SCHAFLEITNER, R.; HUANG, S.; GEETHANJALI, S.; KENYON, L.; TSAI, W.; HANSON, P. (2013): Mapping of QTLs in tomato line FLA456 associated with resistance to a virus causing tomato yellow leaf curl disease. *Euphytica*, Vol. 190 (2): 297-308
- KARIM, M. S.; PERCIVAL, G. C. UND DIXON, G.R. (1997): Comparative composition of aerial and subterranean potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 75: 251-257

- KEARSEY, M. J. (1998): The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49: 1619-1623
- KHAN, A. R.; CHENG, Z.; GHAZANFAR, B.; KHAN, M. A. UND YONGXING, Z. (2014): Acetyl salicylic acid and 24-epibrassinolide enhance root activity and improve root morphological features in tomato plants under heat stress. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, Vol. 64: 304-311
- KHANAL, B.; SUTHAPARAN, A.; HÜCKSTÄDT, A.B.; WOLD, A.B.; MORTENSEN, L. UND H. R. GISLERØD, H. R. (2013): The effect of high day and low night temperature on pollen production, pollen germination and postharvest quality of tomatoes. *American Journal of Plant Sciences* 2013, Vol. 4, 19-25
- KIM, J. S. UND KLIONSKY, D. J. (2000): Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 69: 303–342
- KINET, J. M. UND PEET, M. M. (1997): Tomato. In: Wien, H.C. (Ed.), *The Physiology of Vegetable Crops*. CAB International, New York: 207–258
- KLAHRE, U.; BECKER, C.; SCHMITT, A. C. UND KOST, B. (2006): *Nt-RhoGDI2* regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes. *Plant J.* 2006, Vol. 46(6): 1018-31
- KLIE, M. (2014): Genetic and genomic analysis of polyploid *Chrysanthemum* hybrids with emphasis on shoot branching. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- KONG, F.; DENG, Y.; WANG, G.; WANG, J.; LIANG, X. UND MENG, Q. (2014): LeCDJ1, a chloroplast DnaJ protein, facilitates heat tolerance in transgenic tomatoes. *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol. 56 (1): 63-74
- KOSAMBI, D. D. (1944): The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics*, Vol. 12: 172-175
- KOSE, S.; FURUTA, M.; KOIKE, M.; YONEDA, Y. UND IMAMOTO, N. (2005): The 70-kD heat shock cognate protein (hsc70) facilitates the nuclear export of the import receptors. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 171(1): 19-25
- KROEMER, G.; EL-DEIRY, W.; GOLSTEIN, P.; PETER, M.; VAUX, D. UND VANDENABEELE, P. (2005): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, Vol. 12 (Suppl 2): 1463–1467
- LAI, Z.; LI, Y.; WANG, F.; CHENG, Y.; FAN, B.; YU, J. Q. UND CHEN, Z. (2011): Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense. *Plant Cell*, Vol. 23 (10): 3824-41
- LARKINDALE, J. UND VIERLING, E. (2008): Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiol.*, Vol. 146: 748–761
- LEMASTERS, J. J.; QIAN, T.; HE, L.; KIM, J. S.; ELMORE, S. P.; CASCIO, W. E. UND BRENNER, D. A. (2002): Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol. 4: 769 – 781
- LINDQUIST, S. (1980): Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: implications for regulation. *Developmental Biology*, Vol. 77: 463–479
- LIU, Y.; ZHOU, X.; ZHANG, J.; LI, H.; ZHUANG, T.; YANG, R. UND CHEN, H. (2011): Bayesian analysis of interacting quantitative trait loci (QTL) for yield traits in tomato. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10 (63): 13719-13723

- LOBELL, D. B.; SCHLENKER, W. UND COSTA-ROBERTS, J. (2011). Climate trends and global crop production since 1980. *Science*, Vol. 333: 616–620
- MAESTRI, E.; KLUEVA, N.; PERROTTA, C.; GULLI, M.; NGUYEN, H. T. UND MARMIROLI, N. (2002): Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Molecular Biology*, Vol. 48: 667–681
- MARRI, L.; ZAFFAGNINI, M.; COLLIN, V.; ISSAKIDIS-BOURGUET, E.; LEMAIRE, S. D. UND PUPILLO, P. (2009): Prompt and easy activation by specific thioredoxins of Calvin cycle enzymes of *Arabidopsis thaliana* associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex. *Molecular Plant* 2009, Vol.2: 259-69
- MARTIN, G. B.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A. UND GANAL, M. W. (1993): Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, Vol. 262: 1432–1436
- MEIJER, A. J. (2003): Amino acids as regulators and components of non proteinogenic pathways. *Journal of Nutrition*, Vol. 133: 2057–2062
- MILLER, J. C. UND TANKSLEY, S. D. (1990): RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.*, Vol. 80: 437–448
- MITTERBAUER, E. (2008): Identification of factors limiting fruit set in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with the aim of genetic improvement of heat tolerance. Dissertation, Leibniz Universität Hannover
- MISHRA, S. K.; TRIPP, J.; WINKELHAUS, S.; TSCHIERSCHE, B.; THERES, K.; NOVER, L. UND SCHARF, K.-D. (2002): In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes & Development*, Vol. 16: 1555-1567
- MIZUSHIMA, N. UND KLIONSKY, D. J. (2007): Protein turnover via autophagy: Implications for metabolism. *Annual Review of Nutrition*, Vol. 27: 19–40
- MOHNEN, D. (2008): Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 11: 266–277
- MOHNEN, D.; BAR-PELED, M. UND SOMERVILLE, C. (2008): Biosynthesis of plant cell walls. In ME Himmel, ed, *Biomass Recalcitrance*. Blackwell Publishing, Oxford: 94–187
- MOORE, E. L. UND THOMAS, W. O. (1952): Some effects of shading and parachlorophenoxy acetic acid on fruitfulness of tomatoes. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, Vol. 60: 289-294
- MORALES, D.; RODRIGUEZ, P.; DELL'AMICO, J.; NICOLAS, E.; TORRECILLAS, A. UND SANCEZ-BLANCO, M. J. (2003): High-temperature preconditioning and thermal shock imposition affects water relations, gas exchange and root hydraulic conductivity in tomato. *Biologia Plantarum*, Vol. 47 (2): 203-208
- MOSELEY, P. L.; GAPEN, C. ; WALLEN, E. S.; WALTER, M. E. UND PETERSON, M. W. (1994): Thermal stress induces epithelial permeability. *Am. J. Physiol.*, Vol. 267: 425–434
- MUSCHIETTI, J.; DIRCKS, L.; VANCANNEYT, G. UND MCCORMICK, S. (1994): LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant Journal* 1994, Vol. 6(3): 321-38
- NEUMANN, D. M.; EMMERMANN, M.; THIERFELDER, J. M.; ZUR N. U.; CLERICUS, M.; BRAUN, H. P.; NOVER, L. UND SCHMITZ, U.K. (1993): HSP68-a DNA K-like heat-stress protein of plant mitochondria. *Planta* 1993, Vol. 190: 32–43
- NIEDEN, U.; NEUMANN, D.; BUCKA, A. UND NOVER, L. (1995): Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. *Planta*, Vol. 196: 530–538
- NOVER, L.; BHARTI, K.; DÖRING, P.; MISHRA, S.K.; GANGULI, A. UND SCHARF, K.D. (2001): Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones*, Vol. 6 (3): 177-89

- NURUZZAMAN, M.; SHARONI, A. M.; SATOH, K.; AL-SHAMMARI, T.; SHIMIZU, T.; SASAYA, T.; OMURA, T. UND KIKUCHI, S. (2012): The thioredoxin gene family in rice: Genome-wide identification and expression profiling under different biotic and abiotic treatments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, Vol. 423: 417–423
- NYLANDSTED, J.; GYRD-HANSEN, M.; DANIELEWICZ, A.; FEHRENBACHER, N.; LADEMANN, U.; HØYER-HANSEN, M.; WEBER, E.; MULTHOFF, G.; ROHDE, M. UND JÄÄTTELÄ, M. (2004): Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 200 (4): 425–435
- OBSIL, T.; GHIRLANDO, R.; KLEIN, D. C.; GANGULY, S. UND DYDA, F. (2001): Crystal structure of the 14-3-3 zeta:serotonin N-acetyltransferase complex: a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell*, Vol. 105: 257–267
- OELLER, P. W.; WONG, L. M.; TAYLOR, L. P.; PIKE, D. A. UND THEOLOGIS, A. (1991): Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, Vol. 254: 437-439
- PARSELL, D. A. UND LINDQUIST, S. (1993): The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, Vol. 27: 437–496
- PEET, M. M. UND BARTHOLEMUEW, M. (1996): Effect of night temperature on pollen characteristics, growth and fruit set in tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, Vol. 121 (3): 514-519
- PEET M. M.; WILLITS, D. H. UND GARDNER, R. (1997): Response to ovule development and post-pollen production processes in male-sterile tomatoes to chronic sub-acute high temperature stress. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 48: 101-111
- PEET, M.M.; SATO, S. UND GARDNER, R.G. (1998): Comparing heat stress effects on male-fertile and male-sterile tomatoes. *Plant Cell Environment*, Vol. 21: 225–231
- PEET, M.M.; SATO, S.; CLÉMENTE, C. UND PRESSMAN UND E. (2003): Heat stress increases sensitivity of pollen, fruit and seed production in tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to non-optimal vapor pressure deficits. *Acta Horticulturae*, Vol. 618: 209- 2015
- PETERSON, D. G.; PEARSON, W. R. UND STACK, S. M. (1998): Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using in vitro and in situ DNA reassociation. *Genome*, Vol. 41: 346–356
- PETTOLINO, F.A.; WALSH, C.; FINCHER, G. B. UND BACIC, A. (2012): Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols* 2012, Vol. 7(9): 1590-607
- PFAFFL, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 29: 2002-2007
- PIPER, P.W.; ORTIZ-CALDERON, C.; HOLYOAK, C.; COOTE, P. UND COLE, M. (1997): Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharmyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell Stress Chaperones.*, Vol. 2 (1): 12–24
- PNUELI, L.; CARMEL-GOREN, L.; HAREVEN, D.; GUTFINGER, T. UND ALVAREZ, J. (1998); The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development*, Vol. 125: 1979–1989
- PORCH, T. G. UND JAHN, M. (2001): Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotype of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environment*, Vol. 24: 723–731
- PORT, M.; TRIPP, J.; ZIELINSKI, D.; WEBER, C.; HEERKLOTZ, D.; WINKELHAUS, S.; BUBLAK, D. UND SCHARF, K. D. (2004): Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress

- transcription factor HsfA2. *Plant Physiology*, Vol. 135 (3): 1457-1470
- PRASAD, P. V. V.; BOOTE, K. J.; ALLEN, L. H. UND THOMAS, J. M. G. (2003): Supra-optimal temperatures are detrimental to peanut (*Arachis hypogaea* L.) reproductive processes and yield at ambient and elevated carbon dioxide. *Global Change Biology*, Vol. 9: 1775– 1787
- PRASAD, P. V. V.; BOOTE, K. J. UND ALLEN, L. H. (2006): Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology*, Vol. 139: 237– 251
- PRASINOS, C.; KRAMPIS, K.; SAMAKOVLI, D. UND HATZOPOULOS, P. (2005): Tight regulation of expression of two *Arabidopsis* cytosolic Hsp90 genes during embryo development. *J Exp Bot*, Vol. 56: 633–644
- PRESSMAN, E.; PEET, M. M. UND PHARR, D. D. (2002): The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Annals of Botany*, Vol. 90: 631-636
- PRESSMAN, E.; HAREL, D.; ZAMSKI, E.; SHAKED, R.; ALTHAN, L.; ROSENFELD, K. UND FIRON, N. (2006): The effect of high temperatures on the expression and activity of sucrose cleaving enzymes during tomato (*Lycopersicon esculentum*) anther development. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, Vol. 81: 341-348
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2012): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- REYNOLDS, M. P. UND EWING, E. E. (1989): Effects of high air and soil temperature stress on growth and tuberization in *Solanum tuberosum*. *Annals of Botany*, Vol. 64 (3): 241-247
- RICHTER, K.; HASLBECK, M. UND BUCHNER, J. (2010): The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*, Vol. 40 (2): 253-66
- RIZHSKY, L.; LIANG, H. J.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S. UND MITTLER, R. (2004): When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.*, Vol. 134: 1683–1696
- ROBERTS, P.; MOSHITCH-MOSHKOVITZ, S.; KVAM, E.; O'TOOLE, E.; WINEY, M. UND GOLDFARB, D. S. (2003): Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 14: 129 – 141
- RODRÍGUEZ, M.; CANALES, E. UND BORRÁS-HIDALGO, O. (2005): Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnologia Aplicada*, Vol. 22: 1–10
- RON, M.; DORRITY, M. W.; DE LUCAS, M.; TOAL, T.; HERNANDEZ, R. I.; LITTLE, S. A.; MALOOF, J. N.; KLIEBENSTEIN, D. J. UND BRADY, S. M. (2013): Identification of novel loci regulating interspecific variation in root morphology and cellular development in tomato. *Plant Physiol.*, Vol. 162 (2): 755-68
- RONEN, G.; CARMEL-GOREN, L.; ZAMIR, D. UND HIRSCHBERG, J. (2000): An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *PNAS*, Vol. 97: 11102–11107
- RUTLEDGE, R. G. UND STEWART D. (2008): A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. In: *BMC Biotechnology*
- SALIBA-COLOMBANI, V.; CAUSSE, M.; GERVAIS, L. UND PHILOUZE, J. (2000): Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome*, Vol. 43: 29–40

- SAMBROOK, J. UND RUSSELL, D. W. (2001): Molecular cloning. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- SANGU, E.; TIBAZARWA, F. I.; NYOMORA, A. UND SYMONDS, R. C. (2015): Expression of genes for the biosynthesis of compatible solutes during pollen development under heat stress in tomato (*Solanum lycopersicum*). Journal of Plant Physiology, Vol. 178: 10–16
- SARIEVA, G. E.; KENZHEBAEVA, S. S. UND LICHTENTHALER, H. K. (2010): Adaptation potential of photosynthesis in wheat cultivars with a capability of leaf rolling under high temperature conditions. Russ. J. Plant Physiol., Vol. 57: 28–36
- SATO, S.; PEET, M. M. UND THOMAS, J.F (2000): Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under chronic high temperature stress. Plant, Cell and Environment, Vol. 23: 719-726
- SATO, S.; PEET, M. M. UND GARDNER, R.G. (2001): Formation of parthenocarpic fruit, undeveloped flowers and aborted flowers in tomato under moderately elevated temperatures. Scientia Horticulturae, Vol. 90: 243–254
- SATO, S.; PEET, M.M. UND THOMAS, J.F (2002): Determining critical pre-and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures. Journal of Experimental Botany 2002, Vol. 53, 1187–1195
- SATO, S.; KAMIYAMA, M.; IWATA, T.; MAKITA, N.; FURUKAWA, H. UND IKEDA, H. (2006): Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of *Lycopersicon esculentum* by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. Annals of Botany, Vol. 97, 731–738
- SATO, J.; ONOUE, H.; ARIMA, K. UND YAMAMURA, T. (2005): The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, Vol. 64(10): 858-68
- SAVCHENKO, G. E; KLYUCHAREVA, E. A.; ABRABCHIK, L. M UND SERDYUCHENKO, E. V. (2002): Effect of periodic heat shock on the membrane system of etioplasts. Russ Journal of Plant Physiology Vol. 49: 349-359
- SCHARF, K.-D.; HEIDER, H.; HÖHFELD, I.; LYCK, R.; SCHMIDT, E. UND NOVER, L. (1998): The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. Molecular and Cellular Biology, Vol. 18 (4): 2240-2251
- SCHARF, K.-D.; BERBERICH, T.; EBERSBERGER, I. UND NOVER, L. (2012): The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. Biochimica et Biophysica Acta 1819: 104–119
- SCHMITT, E.; GEHRMANN, M.; BRUNET, M; MULTHOFF, G. UND GARRIDO, C. (2007): Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. Journal of Leukocyte Biology, Vol. 81: 15-27
- SCHÖN, C. C; UTZ, H. F; GROH, S.; TRUBERG, B.; OPENSHAW, S. UND MELCHINGER, A. E. (2004): Quantitative trait locus mapping based on resampling in a vast maize testcross experiment and its relevance to quantitative genetics for complex traits. Genetics, Vol. 167: 485-498
- SCHUELKE, M. (2000): An economic method for fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology, Vol. 18: 233-234
- SEGLEN, P.O. UND BOHLEY, P. (1992): Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. Experientia, Vol. 48: 158–172

- SEMEL, Y.; NISSENBAUM, J.; MENDA, N.; ZINDER, M., KRIEGER, U.; ISSMAN, N.; PLEBAN, T.; LIPPMAN, Z.; GUR, A. UND ZAMIR, D. (2006): Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *PNAS*, Vol. 103 (35): 12981-12986
- SHEN, Y.-H.; CHEN, Y.-H.; LIU, H.-Y.; CHIANG, F.-Y.; WANG, Y.-C.; HOU, L.-Y.; LIN, J.-S.; LIN, C.-C.; LIN, H.-H.; LAI, H.-M. UND JENG, S.-T. (2014): Expression of a gene encoding β -ureidopropionase is critical for pollen germination in tomatoes. *Physiologia Plantarum*, Vol. 150: 425–435
- SHEORAN, I. S.; ROSS, A. R. S.; OLSON, D. J. H. UND SAWHNEY, V. K. (2007): Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *J. Exp. Bot.*, Vol. 58: 3525–3535
- SHIRASAWA, K.; ISOBE, S.; HIRAKAWA, H.; ASAMIZU, E.; FUKUOKA, H.; JUST, D.; ROTHAN, C.; SASAMOTO, S.; FUJISHIRO, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S. UND TABATA, S. (2010): SNP discovery and linkage map construction in cultivated tomato. *DNA Research*, Vol. 17: 381-391
- SHIRASAWA, K.; FUKUOKA, H.; MATSUNAGA, H.; KOBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, I.; HIRAKAWA, H.; ISOBE, S. UND TABATA, S. (2013): Genome-wide association studies using single nucleotide polymorphism markers developed by re-sequencing of the genomes of cultivated tomato. *DNA Research*, Vol. 20 (6): 593-603
- SIM, S. C.; DURSTEWITZ, G.; PLIESKE, J.; WIESEKE, R.; GANAL, M. W.; DEYNZE, A. V.; HAMILTON, J. P.; BUELL, C. R.; CAUSSE, M.; WIJERATNE, S. UND FRANCIS, D. M. (2012): Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in tomato. *PLoS ONE*, Vol. 7 (7)
- SINGH, P.; KALOUDAS, D. UND RAINES, C. A. (2008): Expression analysis of the Arabidopsis *CP12* gene family suggests novel roles for these proteins in roots and floral tissues. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59(14): 3975–3985
- SMITH, D. L.; ABBOTT, J. A. UND GROSS, K. C. (2002): Down-regulation of tomato beta-galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiology*, Vol. 129(4): 1755-62
- SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E. UND LEVINE, A. (1999): The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *The Plant Cell*, Vol. 11: 431–444
- SONG, Y.; CHEN, Q.; CI, D.; SHAO, X. UND ZHANG, D. (2014): Effects of high temperature on photosynthesis and related gene expression in poplar. *BMC Plant Biology*, Vol. 14: 111
- STAM, P. (1993): Construction of Integrated Genetic-Linkage Maps by Means of A New Computer Package - Joinmap. *Plant Journal*, Vol. 3: 739-744
- SUN, L.; LIU, Y.; KONG, X.; ZHANG, D.; PAN, J.; ZHOU, Y.; WANG, L.; LI, D. UND YANG, X. (2012): ZmHSP16.9, a cytosolic class I small heat shock protein in maize (*Zea mays*), confers heat tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.*, Vol. 31(8): 1473-84
- SZALAY, M. S.; KOVÁCS, I. A.; KORCSMÁROS, T.; BÖDE, C. UND CSERMELY, P. (2007): Stress-induced rearrangements of cellular networks: Consequences for protection and drug design. *FEBS Letter*, Vol. 581: 3675–3680
- TANKSLEY, S. D.; RICK, C. M. UND VALLEJOS, C. E. (1984): Tight linkage between a nuclear male-sterile locus and an enzyme marker in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 68 (1-2): 109–113
- THE TOMATO GENOME CONSORTIUM (2012): The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, Vol. 485: 635-641

- TIMPERIO, A. M.; EGIDI, M. G. UND ZOLLA, L. (2008): Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, Vol. 71 (4): 391–411
- TOIVOLA, D. M.; STRNAD, P.; HABTEZION, A. UND OMARY, M. B. (2010): Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biology*, Vol. 20: 79–91
- TROST, P.; FERMANI, S.; MARRI, L.; ZAFFAGNINI, M.; FALINI, G. UND SCAGLIARINI, S. (2006): Thioredoxin-dependent regulation of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: autonomous vs. CP12-dependent mechanisms. *Photosynthesis Research*, Vol. 89: 263-75
- TZIVION, G.; LUO, Z. UND AVRUCH, J. (1998): A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*, Vol. 394: 88 –92
- TSUKAGUCHI, T.; KAWAMITSU, Y.; TAKEDA, H.; SUZUKI, K. UND EGAWA, Y. (2003): Water Status of Flower Buds and Leaves as Affected by High Temperature in Heat-Tolerant and Heat-Sensitive Cultivars of Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)
- URBAN, F. (2006): Histologische Untersuchungen zu den Auswirkungen von Hitzestress auf die Blütenentwicklung bei Tomate. Diplomarbeit, Leibniz Universität Hannover
- VALLEJOS, C. E. UND TANKSLEY, E. D. (1983): Segregation of isozyme markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 66 (3-4): 241–247
- VAN OOIJEN, J. W. (2006): JoinMap@4 – Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands
- VICENTE, A. R.; COSTA, M. L.; MARTÍNEZ, G. A.; CHAVES, A.R. UND CIVELLO, P. M. (2005): Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 38: 213-222
- VIERLING, E. (1991): The role of heat shock proteins in plants. In: *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, Vol. 42: 579–620
- VÍQUEZ-ZAMORA, M.; VOSMAN, B.; VAN DE GEEST, H.; BOVY, A.; VISSER, R. G. F.; FINKERS, R. UND VAN HEUSDEN, A. W. (2013): Tomato breeding in the genomics era: insights from a SNP array. *BMC Genomics* 2013, Vol. 14: 354
- VOELLMY, R. UND BOELLMANN, F. (2007): Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv Exp Med Biol.*, Vol. 594: 89-99
- VOORRIPS, R.E. (2002): MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity*, Vol. 93 (1): 77-78
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. UND ZABEAU, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Vol. 23 (21): 4407-4414
- WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M. UND FOOLAD, M. R. (2007): Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 61: 199-223
- WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O. UND ALTMAN, A. (2004): Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, Vol. 9: 244–252
- WATERS, E.; LEE, G. UND VIERLING, E. (1996): Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.*, Vol. 47: 325–338

- WEHMEYER, N. UND VIERLING, E. (2000): The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.*, Vol. 122 (4): 1099-108
- QI, Y.; WANG, H.; ZOU, Y.; LIU, C.; LIU, Y.; WANG, Y. UND ZHANG, W. (2011): Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, Vol. 585(1): 231-9
- QIN, D.; WU, H.; PENG, H.; YAO, Y.; NI, Z. UND LI, Z. (2008): Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array. *BMC Genomics*, Vol. 9: 432
- XIAO, H.; JIANG, N.; SCHAFFNER, E.; STOCKINGER, E. J. UND VAN DER KNAAP, E. (2008): A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science*, Vol. 319: 1527–1530
- XUE, Y.; PENG, R.; XIONG, A.; LI, X.; ZHA, D. UND YAO, Q. (2010): Over-expression of heat shock protein gene *hsp26* in *Arabidopsis thaliana* enhances heat tolerance. *Biologia Plantarum*, Vol. 54 (1): 105-111
- YANG, K. Z.; XIA, C.; LIU, X. L.; DOU, X. Y.; WANG, W.; CHEN, L. Q.; ZHANG, X. Q.; XIE, L. F.; HE, L.; MA, X. UND YE, D. (2009): A mutation in *Thermosensitive Male Sterile 1*, encoding a heat shock protein with DnaJ and PDI domains, leads to thermosensitive gametophytic male sterility in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, Vol. 57(5): 870-82
- YANO, M.; NAKAMUTA, S.; WU, X.; OKUMURA, Y. UND KIDO, H. (2006): A Novel Function of 14-3-3 Protein: 14-3-3 ζ Is a Heat-Shock-related Molecular Chaperone That Dissolves Thermal-aggregated Proteins. *Molecular Biology Cell*, Vol. 17(11): 4769–4779
- YOST, H. J. UND LINDQUIST, S. (1986): RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell*, Vol. 45(2): 185–193
- ZAGORCHEV, L.; SEAL, C. E.; KRANNER, I. UND ODJAKOVA, M (2013): A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *International Journal of Molecular Science* 2013, Vol. 14: 7405-7432
- ZAMIR, D. UND TANKSLEY, S. D. (1988): Tomato genome is comprised largely of fast-evolving, low copy-number sequences. *Molecular and General Genetics*, Vol. 213: 254–261
- ZEUTHEN, E. (1971). Synchrony in *Tetrahymena* by heat shocks spaced a normal cell generation apart.. *Experimental Cell Research*, Vol. 68: 49–60
- ZHANG, J.; LIU, B.; LI, J.; ZHANG, L.; WANG, Y.; ZHENG, H.; LU, M. UND CHEN, J. (2015): *Hsf* and *Hsp* gene families in *Populus*: genome-wide identification, organization and correlated expression during development and in stress responses. *BMC Genomics*, Vol. 16: 18
- ZHAO, P.; ZHOU, X. M.; ZHANG, L. Y.; WANG, W.; MA, L. G.; YANG, L. B.; PENG, X. B.; BOZHKOVA, P. V. UND SUN, M. X. (2013): A bipartite molecular module controls cell death activation in the basal cell lineage of plant embryos. *PLoS Biology*, Vol. 11, e1001655: 1-15
- ZHAO, P.; ZHOU, X. M.; ZOU, J.; WANG, W.; WANG, L.; PENG, X. B. UND SUN, M. X. (2014): Comprehensive analysis of cystatin family genes suggests their putative functions in sexual reproduction, embryogenesis, and seed formation. *Journal of Experimental Botany* 2014, Vol. 65: 5093-5107
- ZHOU, J.; WANG, J.; YU, J. Q. UND CHEN, Z. (2014): Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Front Plant Science*, Vol. 5: 174

7. ANHANG

7.1 zusätzliche Materialien

Tabelle 7.1.1: Phänotypische Charakterisierung der F4-RIL-Kartierungspopulation. Berechnet wurden adjustierte Mittelwerte und Standardabweichungen für die Merkmale Pollen ausbeute (Poll_G, [Anzahl/1000]) und Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern (Poll_k, [Anzahl/1000]). G= Nummer des Genotyps (G) der Population (TH-P1-F4-), GK= Gewächshauskabine, in der die Charakterisierung stattfand.

G	GK	Poll _G	Poll _k	G	GK	Poll _G	Poll _k
001	13	52.86 ±19.5	29.33 ±10	093	19	95.5 ±0	25.67 ±0
005	8	64.72 ±12.7	50.94 ±14	094	16	31.58 ±21.3	23.83 ±16.9
009	14	19.54 ±6.7	8.67 ±3.2	102	5	34.2 ±14.6	14.93 ±7.2
014	7	104.38 ±8	79.29 ±16.9	103	5	38.04 ±3.3	10.5 ±3.3
017	6	35.92 ±13.7	21.5 ±7.8	104	5	16.33 ±2	3.89 ±0.8
018	8	63 ±17.8	50.4 ±14.5	105	5	57.97 ±21.1	42.72 ±17.9
025	8	49.22 ±1.6	3.5 ±1.5	106	6	73.56 ±24.1	35.39 ±4.9
026	16	1 ±0.2	0.17 ±0.1	107	6	61 ±19.9	45 ±15.7
027	6	18.25 ±4.8	6.33 ±5	108	6	140.58 ±33.6	71.5 ±3.7
029	19	23.92 ±10.6	12.96 ±6	109	6	99 ±27.8	66.25 ±20.6
030	8	124.92 ±18.4	79.5 ±19.8	110	7	14.83 ±4.8	6.83 ±2.4
033	7	1.5 ±1.1	0.42 ±0.3	111	7	44.17 ±23.2	10.89 ±7.5
035	19	58.23 ±24.2	21 ±9.4	112	7	84.31 ±12.3	41.56 ±12
040	14	97.44 ±9.7	66.44 ±8.6	113	7	42.13 ±15.1	21.19 ±9.9
042	16	24.38 ±6.2	15.79 ±3.6	114	8	90.17 ±16.3	49.75 ±17.6
044	6	43.67 ±0	20.17 ±0	117	8	26.42 ±10.1	12.96 ±5.8
046	5	83.95 ±31.3	58.57 ±22.1	122	13	87.17 ±17.9	59.74 ±14.2
047	19	58 ±13.1	12.67 ±7.1	123	13	81.5 ±23	63.58 ±21.2
051	13	0.87 ±0.9	0.67 ±0.7	124	13	59.97 ±16.9	48.4 ±13.9
053	7	0 ±0	0 ±0	125	13	121.17 ±18.6	53.92 ±9.8
055	14	14.94 ±10.9	11.19 ±9.6	126	13	105.42 ±21.8	80.88 ±17.5
056	14	5.42 ±3	2.83 ±1.8	127	13	68.67 ±20.5	51.92 ±16.9
059	5	48.83 ±30.8	22.13 ±20.6	128	14	97.58 ±13.3	27.5 ±5.9
062	14	3.5 ±0.7	0.58 ±0.1	129	14	94.44 ±20	64.44 ±7.3
066	5	38.27 ±16.5	14.63 ±7.3	130	14	49.67 ±29.6	39.44 ±25
068	7	20.83 ±7.5	8.83 ±3.6	131	15	26.94 ±7	5.72 ±3.5
071	5	112.89 ±8.2	84.83 ±8.3	132	15	0 ±0	0 ±0
076	16	4 ±2.4	1.67 ±1.2	133	15	8.17 ±3.5	3.17 ±1.9
077	19	65.64 ±13.4	34.86 ±10.5	134	15	56.54 ±13.9	38.75 ±13.3
078	6	15.87 ±8.8	6.67 ±4	135	15	1.33 ±0.8	0 ±0
080	15	54.5 ±24.1	27.62 ±12.6	136	15	0 ±0	0 ±0
087	19	9.94 ±7	2.94 ±2.5	137	15	83.97 ±7.3	7.2 ±3.9

Tabelle 7.1.1 Weiterführung: Phänotypische Charakterisierung der F4-RIL-Kartierungspopulation. Berechnet wurden adjustierte Mittelwerte und Standardabweichungen für die Merkmale Pollenausbeute (Poll_G, [Anzahl/1000]) und Anzahl an lebensfähigen Pollenkörnern (Poll_k, [Anzahl/1000]). G= Nummer des Genotyps (G) der Population (TH-P1-F4-), GK= Gewächshauskabine, in der die Charakterisierung stattfand.

G	GK	Poll _G	Poll _k
138	16	7.29 ±3.3	2.08 ±1.1
139	16	37.78 ±14.3	4.89 ±2.2
140	16	30.6 ±11.7	14.7 ±6.9
141	16	1.5 ±0.1	0 ±0
142	19	0.13 ±0.1	0 ±0
143	19	105.61 ±29.8	50.17 ±16.8
CLN1621L	13	90.75 ±14.5	75 ±13.1
CLN1621L	14	79.79 ±4.5	60.33 ±5.2
CLN1621L	15	104.17 ±24.8	75.94 ±13.6
CLN1621L	16	28.71 ±3.9	19.58 ±1.5
CLN1621L	19	53.25 ±10.3	40.72 ±9.3
CLN1621L	5	79.58 ±21.7	40.08 ±22.4
CLN1621L	6	78.36 ±22	37.31 ±15
CLN1621L	7	51.75 ±8.2	26.67 ±6
CLN1621L	8	74.36 ±18.7	55.31 ±16
CL5915-93D4-1-0-3	13	120.07 ±23.2	100.93 ±24.7
CL5915-93D4-1-0-3	14	41.08 ±16.3	34.58 ±13.1
CL5915-93D4-1-0-3	15	65.06 ±6.1	41.56 ±6.7
CL5915-93D4-1-0-3	19	49.08 ±12.7	16.67 ±10.3
CL5915-93D4-1-0-3	5	80.67 ±23.6	66.7 ±22.6
CL5915-93D4-1-0-3	6	31.04 ±6.3	18.67 ±2.6
CL5915-93D4-1-0-3	7	93.31 ±15.7	55.1 ±9.7
CL5915-93D4-1-0-3	8	70.81 ±8.8	46.89 ±10.3
CL5915-93D4-1-0-3	16	42.9 ±16.4	36.67 ±14.7
CA4	13	9.76 ±6.6	4.6 ±3.9
CA4	14	0.44 ±0.1	0 ±0
CA4	15	3.44 ±1.3	0.33 ±0.2
CA4	16	0 ±0	0 ±0
CA4	19	3.44 ±2.9	1.11 ±0.9
CA4	5	3.75 ±1	0 ±0
CA4	6	13.67 ±0	2.5 ±0
CA4	7	10.58 ±6.7	6.33 ±4.1
CA4	8	0 ±0	0 ±0
F1	14	108.11 ±46.6	31.33 ±14.5
F1	6	125.77 ±23.3	23.63 ±5.5

Tabelle 7.1.2: Expressionsmuster ausgewählter Gene mit Bezug zur Hitzetoleranz oder bedeutenden Funktionen. Untersucht wurden sowohl hitzesensitive (S) als auch -tolerante Genotypen (T) unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). Dargestellt ist die Bezeichnung der Sonde, die dazugehörige Zielsequenz, deren physikalische Lokalisation (Chr= Chromosom, Pos= Position [Mbp]) sowie die Expressionsstärken in den Mischproben und deren Expressionsänderung in den fünf Vergleichen. *: signifikante Regulation.

Sonde	Ziel	Chr	Pos	Expressionsstärke						Expressionsänderung					Annotation
				SN	TN	SH	TH	N	H	SN-SH	TN-TH	SN-TN	SH-TH	N-H	
TC194474_689_39_X2	TC220846	9	7,4	119	142	883	707	130	795	7,4*	5,0	1,2	-1,2	6,1*	
TC193794_599_39_S	TC193794	9	7,4	570	300	548	634	435	591	-1,0	2,1	-1,9*	1,2	1,4	
TC194725_729_40_S	TC194725	1	83,4	91	118	502	621	105	562	5,5*	5,3*	1,3	1,2	5,4*	
TC196054_26_40_S	TC196054	9	7,4	157	81	223	86	119	155	1,4	1,1	-1,9*	-2,6	1,3	GO:0009408 (response to heat)
TC193902_627_38_X2	TC193902	6	43,9	2134	3647	7193	8058	2891	7626	3,4*	2,2	1,7	1,1	2,6*	
TC206533_582_39_S	TC206533			810	369	539	581	589	560	-1,5*	1,6	-2,2*	1,1	-1,1	
TC193184_767_38_S	TC193184	8	48,3	1826	1510	5180	5737	1668	5459	2,8*	3,8	-1,2	1,1	3,3*	
TC203430_504_39_X2	TC203430	4	4,7	384	478	1357	1680	431	1518	3,5*	3,5	1,2	1,2	3,5*	
TC211889_23_39_S	TC211889	7	64,7	1995	4640	3703	1809	3318	2756	1,9*	-2,6	2,3*	-2,0	-1,2	Heat shock cognate protein 80
TC194522_19_36_S	TC194522	9	62,5	315	540	1238	958	428	1098	3,9*	1,8	1,7*	-1,3	2,6*	
TC216706_138_39_S	TC216706	9	62,5	146	205	301	352	176	327	2,1*	1,7	1,4	1,2	1,9*	Heat shock protein
TC208258_470_36_X2	TC208258	9	62,5	7819	16353	33317	23712	12086	28515	4,3*	1,4	2,1*	-1,4	2,4*	
TC207926_627_40_S	TC207926	9	5,0	841	2123	1745	2122	1482	1933	2,1*	-1,0	2,5*	1,2	1,3	Class I heat shock protein
TC215346_294_34_X2	TC215346	4	63,1	3267	577	2659	952	1922	1806	-1,2	1,6	-5,7*	-2,8	-1,1	Endoplasmic heat shock protein 90
TC197260_623_37_S	TC197260			127	163	394	346	145	370	3,1*	2,1	1,3	-1,1	2,6*	Small heat shock protein
TC200846_527_39_S	TC200846	3	64,4	142	192	304	294	167	299	2,1	1,5	1,4	-1,0	1,8*	Small heat stress protein class CIII
TC207273_1411_39_S	TC207273			2654	2193	736	1747	2424	1241	-3,6*	-1,3	-1,2	2,4	-2,0*	
TC193727_565_34_X5	TC242622	10	0,1	338	1344	865	1015	841	940	2,6*	-1,3	4,0*	1,2	1,1	
TC194235_330_34_X3	TC194235	9	63,8	1144	1580	3551	3625	1362	3588	3,1*	2,3	1,4	1,0	2,6*	GO:0009409(response to cold)
TC203443_1381_37_S	TC203443	9	4,4	457	352	3500	1666	404	2583	7,7*	4,7	-1,3	-2,1	6,4*	
TC203921_679_36_X4	TC203921	10	0,1	490	3451	1738	2179	1971	1959	3,5	-1,6	7,0*	1,3	-1,0	

U **Tabelle 7.1.2 Weiterführung: Expressionsmuster ausgewählter Gene mit Bezug zur Hitzetoleranz oder bedeutenden Funktionen.** Untersucht wurden sowohl hitzesensitive (S) als auch -tolerante Genotypen (T) unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). Dargestellt ist die Bezeichnung der Sonde, die dazugehörige Zielsequenz, deren physikalische Lokalisation (Chr= Chromosom, Pos= Position [Mbp]) sowie die Expressionsstärken in den Mischproben und deren Expressionsänderung in den fünf Vergleichen. *: signifikante Regulation.

Sonde	Ziel	Chr	Pos	Expressionsstärke						Expressionsänderung					Annotation
				SN	TN	SH	TH	N	H	SN-SH	TN-TH	SN-TN	SH-TH	N-H	
TC199069_1193_40_S	TC199069	6	1,2	2414	7418	1600	1376	4916	1488	-1,5*	-5,4*	3,1*	-1,2	-3,3*	GO:0009409 (response to cold)
TC198668_364_36_X5	TC198668	10	0,1	322	1730	906	1137	1026	1022	2,8	-1,5	5,4*	1,3	-1,0	
TC193825_794_37_S	TC193825			777	340	1527	801	559	1164	2,0*	2,4*	-2,3*	-1,9	2,1*	
TC202238_559_37_X3	TC231755	9	1,3	2900	4489	7017	4838	3695	5928	2,4*	1,1	1,5*	-1,5*	1,6*	
TC200546_1101_35_S	TC200546	3	51,7	706	717	1705	1070	711	1387	2,4*	1,5	1,0	-1,6*	2,0*	GO:0006833 (water transport)
TC191886_138_34_X2	TC191886	11	51,1	672	1396	1673	1458	1034	1566	2,5*	1,0	2,1*	-1,1	1,5*	
TC200295_740_41_X2	TC200295	9	1,3	2834	5004	6666	5046	3919	5856	2,4*	1,0	1,8*	-1,3	1,5*	
TC193855_980_37_X3	TC193855	11	51,1	2246	4465	4763	5058	3356	4911	2,1*	1,1	2,0*	1,1	1,5*	
TC192986_995_39_S	TC192986	3	62,9	439	1661	878	804	1050	841	2,0	-2,1	3,8*	-1,1	-1,2	GO:0006914 (autophagy)
TC213424_894_40_X2	TC213424	3	62,9	685	1590	1033	895	1137	964	1,5	-1,8	2,3*	-1,2	-1,2	
TC196700_775_39_X2	TC196700	6	3,0	1674	4691	2496	2456	3182	2476	1,5	-1,9	2,8*	-1,0	-1,3	GO:0006950 (response to stress)
TC192695_711_36_X2	TC192695	1	88,0	208	699	520	598	454	559	2,5	-1,2	3,4*	1,1	1,2	
TC200077_463_37_X2	TC222685	10	2,9	4123	1590	3681	3101	2856	3391	-1,1	2,0	-2,6*	-1,2	1,2	GO:0050961 (detection of temperature stimulus involved in sensory perception)
TC197790_569_40_S	TC197790	10	2,9	2049	708	1751	1564	1379	1658	-1,2	2,2	-2,9*	-1,1	1,2	
TC199549_509_40_S	TC199549	1	72,3	4527	1896	4300	3356	3211	3828	-1,1	1,8	-2,4*	-1,3	1,2	
TC204256_618_39_S	TC204256	1	73,5	7261	3049	6038	4921	5155	5480	-1,2	1,6	-2,4*	-1,2	1,1	
TC195022_283_39_S	TC195022	1	88,4	2881	1101	1789	2521	1991	2155	-1,6*	2,3	-2,6*	1,4	1,1	GO:0009269 (response to desiccation)
TC206138_590_40_S	TC206138	1	88,4	570	1115	1755	1693	842	1724	3,1*	1,5	2,0*	-1,0	2,0*	
TC211636_1266_37_S	TC211636	4	62,6	14050	30513	14854	19268	22281	17061	1,1	-1,6	2,2*	1,3	-1,3	
TC195238_641_40_S	TC195238	3	54,4	2009	774	24139	8402	1392	16270	12,0*	10,9*	-2,6	-2,9	11,7*	Stigma expressed protein
TC212902_211_40_S	TC212902	1	1,4	738	549	312	229	643	271	-2,4	-2,4	-1,3	-1,4	-2,4*	Pollen preferential protein
TC209885_351_39_S	TC236806	5	63,2	717	1472	92	89	1095	90	-7,8*	-16,6*	2,1	-1,0	-12*	Pollen tube RhoGDI2

Tabelle 7.1.2 Weiterführung: Expressionsmuster ausgewählter Gene mit Bezug zur Hitzetoleranz oder bedeutenden Funktionen. Untersucht wurden sowohl hitzesensitive (S) als auch -tolerante Genotypen (T) unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). Dargestellt ist die Bezeichnung der Sonde, die dazugehörige Zielsequenz, deren physikalische Lokalisation (Chr= Chromosom, Pos= Position [Mbp]) sowie die Expressionsstärken in den Mischproben und deren Expressionsänderung in den fünf Vergleichen. PI: Proteinase Inhibitor, fam. = family. *: signifikante Regulation.

Sonde	Ziel	Chr	Pos	Expressionsstärke						Expressionsänderung					Annotation
				SN	TN	SH	TH	N	H	SN-SH	TN-TH	SN-TN	SH-TH	N-H	
TC198539_594_40_S	TC198539	2	36,6	884	168	218	377	526	298	-4,1	2,3	-5,3*	1,7	-1,8	
TC198525_482_39_X2	TC229846	7	62,5	2259	2717	473	668	2488	571	-4,8	-4,1	1,2	1,4	-4,4*	Anther-specific protein LAT52
TC214591_411_36_X3	TC214591	10	1,7	24983	62613	2510	2333	43798	2422	-10,0*	-26,8*	2,5*	-1,1	-18*	precursor
TC201489_225_41_X2	TC201489	10	1,7	23497	59338	2649	2228	41417	2439	-8,9*	-26,6*	2,5*	-1,2	-17*	
TC196954_142_40_S	TC196954	10	47,5	912	1808	1025	779	1360	902	1,1	-2,3	2,0*	-1,3	-1,5	GO:0006970(response to osmotic stress)
TC193057_1399_37_S	TC224826	12	64,9	2481	6370	3477	3197	4426	3337	1,4	-2,0*	2,6*	-1,1	-1,3	GO:0009908 (flower development)
TC203716_1295_40_S	TC203716	11	7,8	2656	6369	3290	3413	4513	3352	1,2	-1,9	2,4*	1,0	-1,3	
TC193040_659_40_S	TC193040	3	54,5	9723	5127	50709	42744	7425	46726	5,2*	8,3*	-1,9	-1,2	6,3*	Cathepsin D Inhibitor precursor
TC193129_745_40_X6	TC193129	3	54,5	11256	6491	29006	19731	8874	24369	2,6*	3,0*	-1,7*	-1,5*	2,7*	
TC197772_327_37_S	TC197772	2	28,3	3003	8174	4289	2835	5588	3562	1,4	-2,9	2,7*	-1,5	-1,6	DnaJ-like protein
TC210322_814_39_S	TC210322	1	46,2	11153	29186	1032	822	20169	927	-10,8*	-35,5*	2,6	-1,3	-22*	GO:0005507 (copper ion binding)
TC211841_910_38_S	TC211841	1	46,2	11186	26849	789	703	19018	746	-14,2*	-38,2*	2,4	-1,1	-26*	
TC204032_2292_40_S	TC204032			12309	21152	969	682	16730	825	-12,7*	-31,0*	1,7	-1,4	-20,3	GO:0016023 (cytoplasmic membrane-bound vesicle)
TC209661_1036_38_X3	TC239077	1	46,2	6204	27868	1138	1064	17036	1101	-5,5*	-26,2*	4,5*	-1,1	-15,5	
TC203528_998_35_S	TC203528	12	0,2	33643	59730	3284	2627	46686	2955	-10,2*	-22,7*	1,8	-1,3	-15,8	Pectin acetylerase
TC204935_786_40_S	TC230935	6	33,0	27	231	8	332	129	170	-3,4	1,4	8,5*	41,2*	1,3	putative lesion-inducing protein
TC196545_397_41_X2	TC228684	6	3,6	540	3191	421	3668	1866	2045	-1,3*	1,1	5,9*	8,7*	1,1	CP12 precursor
TC213204_567_35_S	TC222160	4	63,3	382	27	382	25	205	203	1,0	-1,1	-14,1*	-15,6*	-1,0	zinc finger (FYVE type) family protein
TC207395_344_41_X2	TC233891	9	64,5	18282	8536	48059	33849	13409	40954	2,6*	4,0	-2,1*	-1,4	3,1*	Wound-induced PI 1 precursor
TC217031_1032_40_S	TC245174	5	5,7	570	1156	55	56	863	55	-10,4*	-20,8*	2,0	1,0	-16*	14-3-3-like protein GF14 iota
TC206991_348_40_S	TC230132	4	3,6	9230	31351	1639	1733	20290	1686	-5,6*	-18,1*	3,4*	1,1	-12*	esterase/lipase/thioesterase fam. protein
TC212407_1666_35_S	TC239779	8	39,8	207	1714	245	1183	961	714	1,2	-1,4	8,3*	4,8	-1,3	putative transcription factor
TC192711_1124_39_S	TC224697	1	70,9	296	672	785	671	484	728	2,7*	-1,0	2,3*	-1,2	1,5*	WRKY transcription factor 4

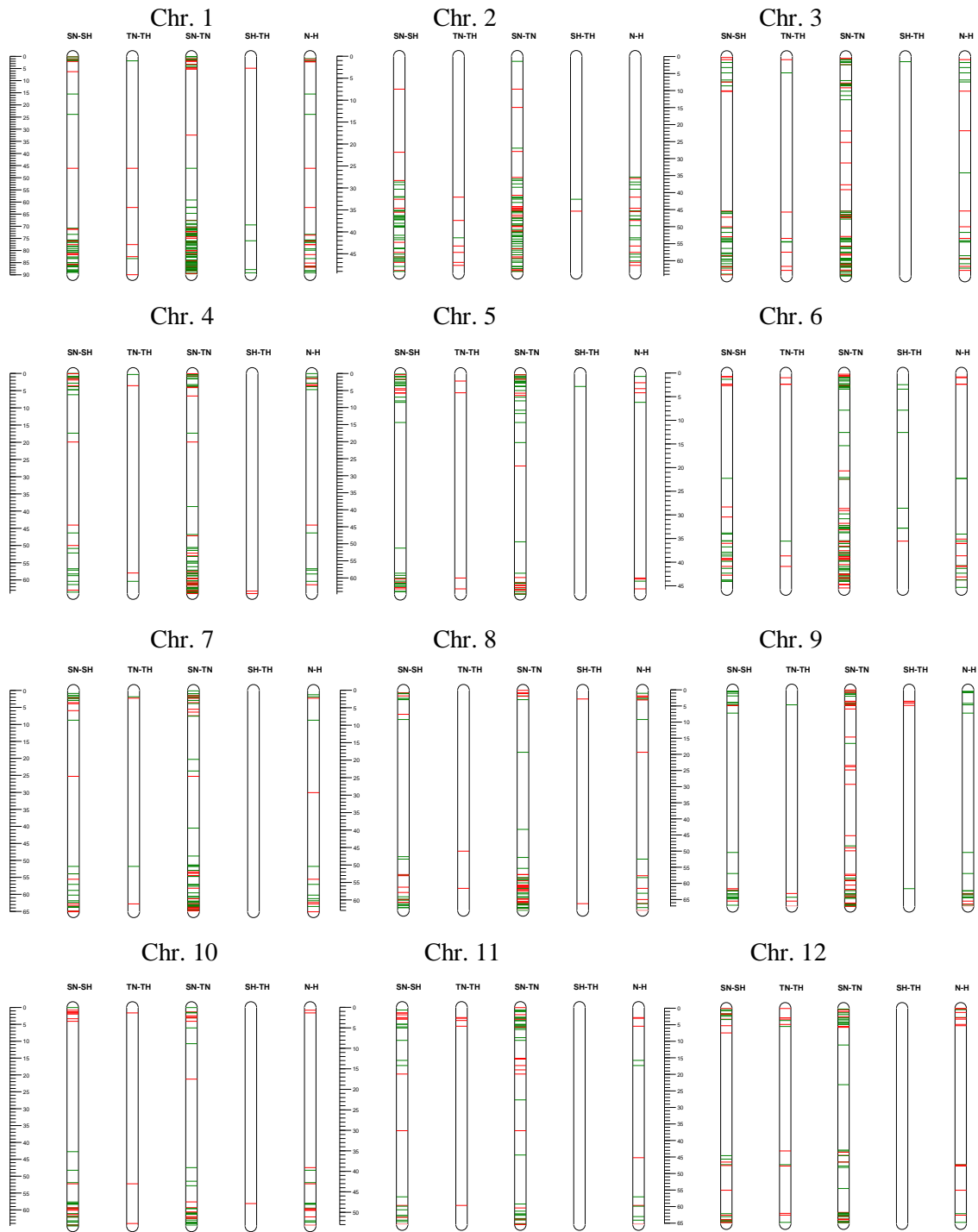


Abbildung 7.1.1: Physikalische Lokalisation der differentiell exprimierten Gene. Angegeben ist die physikalische Position [Mbp] der differentiell exprimierten Gene. Es sind die Chromosomen von 1 bis 12 von links nach rechts und oben nach angegeben. Verglichen wurde das Expressionsmuster sowohl sensibler (S) als auch toleranter Genotypen (T) unter Normalbedingungen (N) und Hitzestress (H). Rot: herunterreguliert, grün: hochreguliert.

Tabelle 7.1.3: F2-Kartierungspopulation. Genotypen der im Rahmen der molekularen Analysen verwendeten Kreuzungspopulation zwischen CLN1621L und Pannovy in zweiter Filialgeneration (erstellt und phänotypisiert von MITTERBAUER, 2008). Die Art der molekularen Charakterisierung ist in Form der Markertechnologie und eines x angegeben.

Genotyp	Markertechnologie				Genotyp	Markertechnologie			
	AFLP	SSR	SNP	DArT		AFLP	SSR	SNP	DArT
CLN1621L	x	x	x	x	45	x	x	x	x
Pannovy	x	x	x	x	46	x	x		x
1	x	x	x	x	47	x	x		x
2	x	x	x	x	48	x	x	x	x
3	x	x	x	x	49	x	x	x	
5	x	x	x	x	50	x	x	x	x
6	x	x		x	51	x	x		x
8	x	x	x	x	52	x	x		x
9	x	x	x	x	53	x	x	x	x
10	x	x	x	x	54	x	x		x
11	x	x		x	55	x	x	x	x
12	x	x	x	x	56	x	x	x	
13	x	x	x	x	57	x	x	x	x
14	x	x		x	59	x	x	x	x
15	x	x	x	x	60	x	x	x	x
16	x	x	x	x	61	x	x		x
17	x	x		x	62	x	x		x
18	x	x		x	63	x	x	x	x
19	x	x	x	x	64	x	x		x
20	x	x	x	x	67	x	x	x	x
21	x	x		x	72	x	x		x
22	x	x	x	x	73	x	x	x	x
23	x	x	x	x	74	x	x	x	x
24	x	x	x	x	76	x	x		x
25	x	x	x	x	77	x	x	x	x
27	x	x	x	x	78	x	x	x	x
30	x	x		x	79	x	x	x	x
31	x	x		x	80	x	x	x	x
33	x	x	x	x	82	x	x	x	x
35	x	x	x	x	83	x	x	x	x
36	x	x		x	85	x	x		x
37	x	x	x	x	86	x	x	x	x
38	x	x		x	87	x	x	x	x
39	x	x	x	x	88	x	x	x	x
40	x	x	x	x	89	x	x	x	x
41	x	x	x	x	91	x	x	x	x
42	x	x	x	x	92	x	x	x	
43	x	x	x	x	93	x	x		
44	x	x		x	94	x	x		x

Tabelle 7.1.3 Weiterführung: F2-Kartierungspopulation. Genotypen der im Rahmen der molekularen Analysen verwendeten Kreuzungspopulation zwischen CLN1621L und Pannovy in zweiter Filialgeneration (erstellt und phänotypisiert von MITTERBAUER, 2008). Die Art der molekularen Charakterisierung ist in Form der Markertechnologie und eines x angegeben.

Genotyp	Markertechnologie				Genotyp	Markertechnologie			
	AFLP	SSR	SNP	DArT		AFLP	SSR	SNP	DArT
95	x	x		x	134	x	x	x	x
96	x	x		x	135	x	x		x
97	x	x		x	136	x	x	x	x
98	x	x		x	137	x	x		
99	x	x	x	x	138	x	x	x	x
100	x	x		x	139	x	x		x
101	x	x		x	140	x	x	x	x
102	x	x		x	141	x	x	x	x
103	x	x		x	142	x	x		x
104	x	x		x	143	x	x	x	x
105	x	x	x	x	144	x	x	x	x
106	x	x	x	x	145	x	x		x
107	x	x	x	x	146	x	x	x	x
108	x	x	x	x	147	x	x	x	x
109	x	x	x	x	148	x	x	x	x
110	x	x		x	149	x	x	x	x
111	x	x	x	x	150	x	x	x	x
112	x	x		x	151	x	x	x	x
113	x	x	x	x	152	x	x	x	x
114	x	x		x	153	x	x	x	x
115	x	x	x	x	154	x	x		
116	x	x	x	x	155	x	x	x	x
117	x	x		x	156	x	x		x
118	x	x	x	x	157	x	x	x	x
119	x	x		x	158	x	x	x	x
120	x	x		x	159	x	x		x
121	x	x	x	x	160	x	x		x
122	x	x		x	161	x	x		x
123	x	x	x	x	162	x	x	x	x
124	x	x	x	x	163	x	x		x
125	x	x		x	164	x	x		x
126	x	x	x	x	165	x	x		x
127	x	x	x	x	166	x	x		x
128	x	x		x	167	x	x	x	x
129	x	x	x	x	169	x	x		x
130	x	x		x	170	x	x		x
131	x	x		x	171	x	x	x	x
132	x	x	x	x	172	x	x	x	x
133	x	x	x	x	173	x	x	x	x

Tabelle 7.1.4: Marker/Merkmal-Assoziationen nach Kruskal-Wallis. Angegeben sind das Merkmal, der Marker sowie die Teststatistik K*. Merkmale: Anzahl an Blüten pro Infloreszenz (B), Pollenausbeute (Poll_G), lebensfähiger Pollen [%] (Poll_k), Anzahl an Früchten pro Infloreszenz (NF) und an samenhaltigen Früchten pro Infloreszenz (NFs), Fruchtansatz (FA).

	Marker	K*		Marker	K*		Marker	K*
B	HindCAA-MseAGG183	8,3	NFs	toPt-195493	10,3	NF	seq-rs6622	14,9
	seq-rs8569	11,4		toPt-91244	12,8		seq-rs6627	17,5
	seq-rs494	11,1		seq-rs5593	11,6		seq-rs3986	17,5
	seq-rs8582	11,5	NF	toPt-440958	8,7		seq-rs6632	17,2
	seq-rs5597	11,5		toPt-439398	8,2	FA	toPt-440958	9,6
	seq-rs8588	11,2		toPt-437285	11,5		toPt-91270	9,6
	seq-rs8591	11,1		toPt-89489	10,9			
Poll _G	toPt-439398	9,6		seq-rs8411	13,6			
	toPt-195493	10,7		seq-rs8407	13,6			
	toPt-91244	15,7		seq-rs8405	11,0			
	toPt-437285	9,5		seq-rs8404	11,2			
	SLM4-21	11,5		seq-rs5563	10,9			
Poll _k	HindCAT-MseGAC4	8,9		seq-rs4974	18,4			
	HindACA-MseAGG347	9,3		seq-rs3977	18,4			
	HindATT-MseCTT1	11,7		seq-rs6614	15,2			
NFs	HindACA-MseACA233	8,9		seq-rs3985	16,3			
	HindATT-MseCTT1	8,5		seq-rs6619	14,5			
	HindAAC-MseCGC	8,7		seq-rs6620	14,4			

7.2 Primersequenzen

Tabelle 7.2.1 Primersequenzen der AFLP-Reaktion. Sequenzen der Adaptoren in der Ligation (L), der Primer für die Präamplifikation (P) sowie der Primer in der Endreaktion (E) ohne Angabe der zusätzlichen selektiven Basen (N). Die innerhalb dieser Studie untersuchten Primerkombinationen der AFLP-Analyse sind in Tabelle 7.2.2 aufgeführt. *: *HindIII*+CAT und *HindIII*+CAA sind IRD_{700nm}, *HindIII*+ACA ist ein IRD_{800nm} markierter Primer.

Primer	Sequenz	Hersteller	Verwendung
<i>HindIII</i> - oben	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	MWG Biotech GmbH	L
<i>HindIII</i> - unten	5'-AGCTGGTACGCAGTCTAC-3'	MWG Biotech GmbH	L
<i>MseI</i> - oben	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'	MWG Biotech GmbH	L
<i>MseI</i> - unten	5'-TACTCAGGACTCAT-3'	MWG Biotech GmbH	L
<i>HindIII</i> + 0	5'-AGACTGCGTACCAGCTT-3'	MWG Biotech GmbH	P
<i>MseI</i> + 0	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA-3'	MWG Biotech GmbH	P
<i>HindIII</i> +NNN*	5'-GACTGCGTACCAGCTT NNN-3'	MWG Biotech GmbH	E
<i>MseI</i> +NNN	5'-GATGAGTCCTGAGTAA NNN-3'	MWG Biotech GmbH	E

Tabelle 7.2.2 AFLP-Primerkombinationen für die Endreaktion. Primerkombinationen, die in der Endreaktion einen Polymorphismus in der Kartierungspopulation zeigten. Kombiniert wurden immer ein IRD_{700nm}- oder IRD_{800nm}-markierter *HindIII*-Primer mit einem *MseI*-Primer. Beispiel für Nomenklatur: HindACA: Sequenz des *HindIII*+NNN-Primers mit den selektiven Basen A, C und A. *: AFLP-Primerkombinationen, welche von BARTKIEWICZ (2011) untersucht wurden.

Primerkombination <i>HindIII-MseI</i>	Primerkombination <i>HindIII-MseI</i>	Primerkombination <i>HindIII-MseI</i>	Primerkombination <i>HindIII-MseI</i>
HindACA-MseACA	HindACC-MseCTT*	HindCAA-MseAGG	HindCAC-MseGGA*
HindACA-MseAGG	HindATT-MseAAC*	HindCAA-MseATC	HindCAC-MseTCA*
HindACA-MseATC	HindATT-MseAGT*	HindCAA-MseGGG	HindCAC-MseTCG*
HindACA-MseATT	HindATT-MseATC*	HindCAA-MseGGT	HindCAT-MseACC
HindACA-MseGGC	HindATT-MseCTT*	HindCAC-MseAGT*	HindCAT-MseAGA
HindACA-MseGGG	HindATT-MseGCA*	HindCAC-MseATC*	HindCAT-MseCAA
HindACC-MseAGC*	HindATT-MseGGA*	HindCAC-MseATG*	HindCAT-MseGAA
HindACC-MseCAT*	HindATT-MseTCA*	HindCAC-MseCCT*	HindCAT-MseGAC
HindACC-MseCCT*	HindATT-MseTTC*	HindCAC-MseCTT*	HindCAT-MseGAG
HindACC-MseCGC*	HindCAA-MseACA	HindCAC-MseGCA*	HindCAT-MseTAA

Tabelle 7.2.3: Sequenzen der vom AVRDC bereitgestellten SSR-Primer.

Marker	Sequenz_forward	Sequenz_reverse
SLM4-18	CGCCCTCACTCCCTCTCTAT	CCATCTTTTGCCTCTGGTTC
SLM4-20	GCAGCAAATGCTCCGTTACT	GCTTGAATTGTGGTGTATCGAG
SLM4-21	TGGTGGGGTGGACATAATCT	TCCAGCTGTAAGGGCTGTTT
SLM6-4	GGGATCATTTGTTGCTGGTT	ACACCAAAGGCTCACAACT
SLM6-5	ATGCACGCAAAGGTTATTCC	AGTCGAAGTTGGCTTGACCA
SLM6-13	TCGCCTCTCACGCTTATACA	CGTAAAAGAACTGGGCATAGG
SLM6-18	TCAAATGGTGCTCCTTATATTCA	AGGAGTATGCAAGCTGATCTGA
SLM6-43	TCGATGAAAAGTGCAGTAGCA	AAAGATGTAAAGCAACAATCCACA
SLM6-52	AGGAGTATGCAAGCTGATCTGA	TCAAATGGTGCTCCTTATATTCA
SLM12-2	ATCTCATTCAACGCACACCA	AACGGTGGAACTATTGAAAGG
SLM12-5	CATGTATTAGCGTGATTGAAGACTC	CTTTGCCTCTTTTGAGAATGG
SLM12-8	TGACATAGAGTCGAAGGCAATC	AACCGAGTCGTGGAAACAAC
SLM12-9	CGCGATATATAAAGAGCGAACA	AATTCTCATCCCAAGGCAAC
SLM12-10	ACCGCCCTAGCCATAAAGAC	TGCGTCGAAAATAGTTGCAT
SLM12-12	AATTGCCACGTGGATTGACT	TGCAAGCTGTTCTTTTCAGA
SLM12-18	TTGCACAAGGGTAGACGTGA	GCCAACATTCAAGTGATTCCA
SLM12-20	TTCGGGGACGAACTAATGA	TTCGGGCATAGATTGAGGAT
SLM12-31	TCGTAGCTTCTTTCACGTTGT	CCGAATGAAAAGGACAAGGA
SLM12-32	GGTTCGTGTTCTGGGGTAAG	GGTAATGGACCACATCGTGTA
SLM12-33	GGACACATTTATGTCATAGCGTAG	CGATTGTCTGCATATCGGAAG
TM3	CGACACAATTAATCAAACAGTAGC	ACTCTTTGTAGGTTGGGAATTT

Tabelle 7.2.3 Weiterführung: Sequenzen der vom AVRDC bereitgestellten SSR-Primer.

Marker	Sequenz_forward	Sequenz_reverse
TM19	CCCTAAGGTACTCTTATGTTTT	CCCATAGTTATGATTCATCG
TM123	GACTGGAGGAAGATGAAGC	ATTATTTCTCCCTCCCCTTC
TM212	GGTAGAAGACAAAGGGTTC	CGTTAAAACAAAGTGGCTTC
TM319	CATGAAATTCCGCACAATAA	CATTTACCTTCCTTAGACTACTG
TM339	CTGAGATGAAACGACTTTAAGA	CCCCTTAGATTACATTATTGC
TM350	AGCTTATCGGCTACAGGTTT	TATTGGTGTAACCCATGGT
TM369	CCACATTTAAGCCCATAAAA	CTTTGGGAGGAATTAACAT
TM371	GAGTCATCCGTTTCAGATATAT	CTAGCCTATTAGGTTACATCATTAC
TM528	ATTGAATCTCAACCCATCAC	GAATCAAGCAGATGCTATCC
TM711	GGAGACAGGTGAATTGTCAT	GCTAAACCCAACATAATTTCG
TM823	CTCTCTATTCGCCCTTCTCT	TAGGAGCTGCTATCCATTGT
TM872	CAGGATACCAATATGGCAAG	GATTATGGATCTCTGGCATC
TM874	AATCCAGCCTGATGTACAAG	CCATTACCTCCTCATCAAAG
TM946	GGTGCTCATGGATAGCTTAC	ACTATATAGGCGATAGCACCA
TM953	GTTTGAGAATCTGGTCTGGA	AAAGTGGAGGTTCTGGCTAT
TM956	AGCTTATCGGCTTAAATGG	ATATAATCGATCGCCCTTG
TM996	CATTAATCTTGAGCGTCCAT	GAATCAAGCAGATGCTATCC
TM1018	TCACCATAGTTATGCACGTC	CTGATCCAATAGAGCAAAGC
TM1026	TTCCTCCCTCAATTTTTGTA	GCTACGAGATGCTTAGGAAA
TM1031	ATAAGGGAGCAGAGGCTACT	TTTTTGGAGCATTTACCATT
TM1033	GAAGACAAAGGGTTCCAAAT	CGTTAAAACAAAGTGGCTTC

Tabelle 7.2.4 SSR-Primer aus der SGN-Datenbank.

Marker	Marker	Marker	Marker	Marker	Marker
SSR51	SSR11	SSR69	SSR98	SSR37	SSR335
SSR270	SSR300	SSR237	SSR266	SSR572	SSRB105694
SSR316	SSR27	SSR155	SSR61	SSR341	SSRB102358
SSR135	SSR43	SSR34	SSR336	SSR595	SSR606
SSR222	SSR593	SSR218	SSR29	SSR288	SSR526
SSR150	SSR450	SSR248	SSR589	SSR582	SSR318
SSR156	SSR306	SSR223	SSR134	SSR62	SSR360
SSR586	SSR638	SSR80	SSR9	SSR325	SSR74
SSR349	SSR188	SSR67	SSR105	SSR162	SSR479
SSR605	SSR13	SSR124	SSR75	SSR49	TMS17
SSR26	SSR557	SSR92	SSR65	SSR18031	T0028
SSR111	SSR244	SSR478	SSR42	SSR15	TMS9
SSR320	SSR73	TMS45	SSR346	SSR63	

Tabelle 7.2.5: Primer für die RT-qPCR. Angegeben sind die TC- bzw. Akzessionsnummern der Zielgene, die Primersequenzen sowie die Amplikongrößen [nt]. Ref1: 18S rRNA, Ref2: LeEF1.

Zielgen	Primer	Primersequenz_forward	Primersequenz_reverse	[nt]
TC230935	1	TGATAATGGCCACTCCACTTC	GGCACTGGAGGAACTCTTGTA	93
TC228684	2	GCGGAAAGTGTAAAGAAGCTG	GCGGAAAGTGTAAAGAAGCTG	94
TC222160	3	AAGCTTCAGGAGGAGATGGAG	AGTAGGGCAAGCAACCTCTTT	93
TC233891	4	GCACGAAAAGAAAGTGATGGA	CTGGCCAAAATTGTTTCCCTT	91
TC245174	5	AAGAAGAGTCGAAAGGGAACG	TCAGAGCAAATCTTCGAGAGC	91
TC236806	6	GCAGGCAAATGAGTGAGAGTT	GTTCTTTGAGAGTGCATTGTGG	102
TC230132	7	GGCTACAAACAGCTCACCAAC	AGTCACAGTGTCTCTTCACCA	110
TC239779	8	GCTATTGACGGGTGGTATGAG	CTCCAACGGATTTGTAGACCA	97
X6760	HsfA2	GGATGGAGGAGGAGCTAGAAA	TTCTCTGACTCTGCTGTTGC	94
AF090115	Hsp17.4-CII	GGAGAATGCGAATACTGATGC	ACTTCTTTGGCTCAGGAGGAG	95
LEU72396	Hsp17.6-CII	ACTCTTCCACACTCTCCACCA	GGCCTTAGCATCACGAACATA	100
X51576.1	Ref1	GGGAAACTTACCAGGTCCAGA	GACAAATCGCTCCACCAACTA	108
X14449	Ref2	ATGGATATGCTCCAGTGCTTG	TACCTGAACGCCTGTCAATCT	90

7.3 Internetadressen, Substanzen und Geräte

Tabelle 7.8 Internetadressen

Name	Internetadresse
Bioedit	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
FAOSTAT	http://faostat3.fao.org/
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	http://www.genome.jp/kegg/
LinRegPCR	http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&sub=LinRegPCR
National Climate Data Center NOAA	http://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
SOL Genomics Network	http://solgenomics.net/
The Universal Protein Resource (UniProt)	http://www.uniprot.org

Tabelle 7.9 Substanzen und Reagenzien

Puffer	Zusammensetzung	Puffer	Zusammensetzung
1x TAE-Puffer	40 mM Tris base 1 mM EDTA pH 8,0	10x Ladepuffer für Agarose-Gelelektrophorese	0,25 % (w/v) Bromphenolblau oder OrangeG 30 % (w/v) Glycerin
TE-Puffer	10 mM TrisHCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0	Ladepuffer für Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese	98 % Formamid 10 mM EDTA pH 8,0 0,05 % Pararosanilin
1x TBE-Puffer	89 mM Tris base 89 mM Borsäure	RL Puffer	100 mM Tris HCl 100 mM Magnesiumacetat 500 mM Kaliumacetat 50 mM DTT Dithiothreitol pH 7,5
1x Williams Puffer	10 mM Tris pH 8,3 50 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 0,001 % Gelatine (BioRad)		

Tabelle 7.10 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Microarray Scanner	MDS Analytical Technologies	Axon GenePix 4400
Bioanalyzer	Agilent	Bioanalyzer 2100
Doppellasersequenziersystem	Licor	DNA Analyzer 4200 und 4300
Geldokumentationssystem	Intas	Intas GDS
Gelelektrophoresekammern	MWG Biotech, Kisker Biotech, Peqlab	
Hybridisierungsöfen	Progen Scientific	Finepcr sv12dx
Inkubationsschüttler	Incutec	IH50
Magnetrührer	IKA, IDL GmbH	Ikamag RET, Hotplate stirrer
Mikroskop	Carl Zeiss AG	Axiovision40 und Axiovision20
NanoDrop	Thermo Fisher Scientific Inc	NanoDrop 1000
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0,1ml)	Applied Biosystems	
Minispinn	Neolab	C1301
Pipetten, Multipipetten	Gilson, Eppendorf, Abimed	Labmate, Multipipette plus, Multichannel8
pH-Messgerät	Hanna Instruments	pH211 Microprocessor pH Meter
Photometer	LAT, Safas	
Reinstwasseranlage	Sartorius	Arium G11
Schüttler	Edmund Bühler	Swip KS-10
Schwingmühle	Retsch, Qiagen	Tissue Lyser 2
StepOne™ Plus	Applied Biosystems	
Thermocycler	Peqlab, Biometra, Applied Biosystems, Life technologies corp.	Primus 96 advanced Gradient, T Gradient, GeneAmp® PCR System 9700
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hettich	5415D, Rotina 420R, Universal 32R
Vortex	VWR international	444-1372
Waagen	Satorius, Mettler	Universal, AE260 Delta Range
Wärmeschrank	Memmert	
Wasserbad	LAT, Julabo Italia Srl	W16, ED-5
Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG	Fuchs-Rosenthal Zählkammer

Tabelle 7.11 Hersteller der Geräte und Chemikalien

Hersteller	Standort	Hersteller	Standort
Abimed	Langenfeld (D)	Kreatech Biotechnology	Amsterdam (NL)
Agilent	Santa Clara (USA)	LAT	Hannover (D)
Ambion	Cambridgeshire (UK)	Licor	Lincoln (USA)
AppliChem	Darmstadt (D)	Life Technologies Corporation	Carlsbad (USA)
Applied Biosystems	Forster City (USA)	Macherey-Nagel	Düren (D)
BASF Taiwan Ltd	Taipei (TWN)	MDS Analytical Technologies	Sunnyvale (USA)
Biometra	Jena, Göttingen (D)	Memmert	Schwabach (D)
BioRad	München (D)	Merck	Darmstadt (D)
Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf (D)	Mettler	Greifensee (S)
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe (D)	MWG Biotech	Ebersberg (D)
Carl Zeiss AG	Oberkochen (D)	Neolab	Heidelberg (D)
CombiMatrix Laboratory	Irvine (USA)	Nerbe plus	Winsen/ Luhe (D)
Diversity Arrays Technology	Canberra (AUS)	Peqlab Biotechnologie	Erlangen (D)
DH Licht	Wülfrath (D)	Progen Scientific	London (UK)
DuPont Taiwan Ltd	Taipei (TWN)	Promega	Mannheim (D)
Edmund Bühler	Hechingen (D)	Qiagen	Hilden (D)
Eppendorf	Hamburg (D)	Retsch	Haan (D)
Eurogentec	Köln (D)	Roche Diagnostics	Mannheim (D)
Everris GmbH	Nordhorn (D)	Roth	Karlsruhe (D)
Fermentas	St. Leon-Rot (D)	Sarstedt	Nürnberg (D)
Gilson	Middleton (UK)	Sartorius	Göttingen (D)
Hanna Instruments	Woonsocket (USA)	Syngenta Taiwan Ltd	Taipei (TWN)
Her mei Plastic Co	Tainan (TWN)	Taiwan Fertilizer Co. Ltd	Taipei (TWN)
Hettich Zentrifugen	Tuttlingen (D)	Thermo Fisher Scientific	Schwerte (D)
IDL GmbH	Nidderau (D)	VWR international	West Chester (USA)
IKA	Wilmington (USA)		
Incutec	North Carolina (USA)		
Intas	Göttingen (D)		
Invitek	Berlin (D)		
Invitrogen	Karlsruhe (D)		
Julabo Italia Srl	Milano (I)		
Kisker Biotech	Steinfurt (D)		
KnownYou Seed Co	Kaohsiung (TWN)		

7.4 Elektrophoresen

7.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten 1-3%igen Agarosegele (SAMBROOK UND RUSSELL, 2001) setzten sich aus 1-3% Agarose (PegGold Universal Agarose, Peqlb), 1xTAE-Puffer sowie 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zusammen. Als Ladepuffer wurde der 10x Ladepuffer für Agarose-Gelelektrophoresen eingesetzt. Je nach Fragmentgröße fand eine Auftrennung bei 6 bis 9 V/cm statt. Eine Visualisierung der Ergebnisse erfolgte unter UV-Licht (312 nm), die Auswertung wurde visuell durchgeführt.

7.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine Auftrennung von SSR- und AFLP-PCR-Fragmenten erfolgte auf Grund der IRD₇₀₀- bzw. IRD₈₀₀-Markierung der *HindIII*-Primer mit dem Doppellasersequenziersystem 4200 oder 4300 bei 1500 V, 40 W und 35 mA sowie einer Temperatur von 40 °C in 6 %igen denaturierenden Polyacrylamidgelen entsprechend des Herstellerprotokolls (SequaGelTM XR, Fa. Biozym Scientific). Es wurden 0,2 – 0,25 mm dicke Gele mit einer Länge von 15 bzw. 25 cm verwendet. Als Größenstandards dienten der 50-350 Size Standard bzw. der 50-700 Size Standard der Firma Licor. Als Ladepuffer und zur Anpassung der Signalintensität wurde der Ladepuffer für Polyacrylamid-Gelelektrophoresen in entsprechenden Mengen eingesetzt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Musmann, Dörthe
Geburtsdatum: 24.07.1983
Geburtsort: Bremervörde

Berufliche Praxis

Seit 09.2013: Angestellte der HYBRO Saatzucht GmbH & Co. KG, Leiterin des Bereiches
Forschung & Entwicklung

04.2011 – 08.2013: wissenschaftliche Angestellte am Julius Kühn-Institut, Institut für
Züchtungsforschung an landwirtschaftlichen Kulturen

03.2008 – 03.2011: wissenschaftliche Angestellte an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität
Hannover, Abteilung für molekulare Pflanzenzüchtung

12.2004 – 02.2008: studentische bzw. wissenschaftliche Hilfskraft im Bereich In-Vitro
Kulturtechniken an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,
Abteilung für molekulare Pflanzenzüchtung

Hochschulausbildung

Seit 03.2008: Promotionsstudium an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Abteilung: molekulare Pflanzenzüchtung
Arbeitsthema: „Genetische und molekularbiologische Untersuchungen zur
Hitzestresstoleranz bei Tomaten“
Betreuer: Prof. Dr. Thomas Debener

10.2005 - 02.2008: Masterstudium an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Abteilung: molekulare Pflanzenzüchtung
Fachrichtung: Pflanzenbiotechnologie
Arbeitsthema: „Transcriptional profiling der *Rpp1* Resistenz in Rosen“
Abschluss: Master of Science

10.2002 – 09.2005: Bachelorstudium an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Abteilung: Zierpflanzenbau
Fachrichtung: Pflanzenbiotechnologie
Arbeitsthema: „Untersuchungen zu differenziell exprimierten Genen in
embryogenem und nicht-embryogenem Kallus von *Cyclamen persicum* Mill.“
Abschluss: Bachelor of Science

Schulbildung

08.1995 - 06.2002 Besuch des Hölty Gymnasiums Celle
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Wissenschaftliche Publikationen

- Musmann, D.;** Jansen, G.; Kilian, A.; Kusterer, B.; Jürgens, H.-U.; Fromme, F. J. und Hackauf, B. (2014): Genome-wide association mapping reveals novel insights in the genetic architecture of agronomic and quality traits in rye hybrids. EUCARPIA Cereals Section – ITMI Joint Conference. Vortrag
- Musmann, D.;** Jansen, G.; Kusterer, B.; Jürgens, H.-U.; Kilian, A.; Fromme, F.-J. und Hackauf, B. (2014): Hochdurchsatzanalyse qualitätsbestimmender Inhaltsstoffe für die Züchtung von Hybridroggen. Ber. 64. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2013. Vortrag
- Musmann, D.;** Krumpel, A.; Geyer, R.; Kusterer, B.; Huber, F.; Fromme, F.-J. und Hackauf, B. (2014): High-throughput metabolic profiling based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy identifies signatures of heterotic pools and QTL for complex inherited traits in hybrid rye. EUCARPIA Cereals Section – ITMI Joint Conference. Posterbeitrag
- Hackauf, B.; Goldfisch, M.; Braun, E.-M.; Krezdorn, N.; **Musmann, D.;** Rotter, B. und Winter, P. (2014): Identification of novel markers for the dominant dwarfing gene *Ddw1* in rye by next generation sequencing approaches. EUCARPIA Cereals Section – ITMI Joint Conference. Posterbeitrag
- Hackauf, B.; Goldfisch, M. T.; **Musmann, D.;** Melz, Gilbert und Wehling, P. (2013): Evaluation of the dominant dwarfing gene *Ddw1* with respect to its use in hybrid rye breeding. Ber. 63. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2012, 41 – 42. Vortrag
- Horres, R.; Enders, M.; Hackauf, B.; **Musmann, D.;** Roux, S.; Dieterich, R.; Fromme, F.-J.; Kusterer, B.; Ordon, F.; Krezdorn, N.; Kahl, G. (2013): Assaying functional diversity in rye. CBB nov. Posterbeitrag
- Musmann, D.;** Geyer, R.; Wagner, M.; Jansen, G.; Krumpel, A.; Kusterer, B.; Kilian, A.; Ordon, F.; Huber, F.; Fromme, F.J.; Wehling, P. und Hackauf, B. (2013): Präzisionszüchtung von Energieroggen – ein Beitrag zur Erhaltung der Diversität im Energiepflanzenanbau. 4. Symposium Energiepflanzen der FNR. Posterbeitrag
- Musmann, D.;** Kusterer, B.; Kilian, A.; Ordon, F.; Fromme, F.J.; Wehling, P. und Hackauf, B. (2013): Association mapping of Agronomic and Quality Traits in a Breeding Population of Hybrid Rye. Plant and animal genome conference XXI 2013 in San Diego, USA. Posterbeitrag
- Musmann, D.;** Lornsen, E.; Jansen, G.; Enders, M.; Kusterer, B.; Jürgens, H.-U.; Ordon, F.; Kilian, A.; Fromme, F.-J.; Wehling, P. und Hackauf, B. (2012): Assoziationskartierung in einer Hybridroggen-Zuchtpopulation. Ber. 62. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2011, 9 – 18. Vortrag

- Musmann, D.;** Jansen, G.; Kusterer, B.; Jürgens, H.U.; Ordon, F.; Kilian, A.; Fromme, F.J.; Wehling, P. und Hackauf, B. (2012): Association Mapping of Agronomic and Quality Traits in a Breeding Population of Hybrid Rye. GPZ Genomanalyse in Halle 2012. Posterbeitrag
- Musmann, D.;** Lornsen, E.; Jansen, G.; Enders, M.; Kusterer, B.; Jürgens, H.U.; Ordon, F.; Fromme, F.J.; Wehling, P. und Hackauf, B. (2012): Association mapping in a breeding population of hybrid rye. GPZ Tagung 2012 in Gießen. Posterbeitrag
- Musmann, D.;** Enders, M.; Lornsen, E.; Kusterer, B.; Fromme, F.-J.; Dieterich, R.; Ordon, F.; Wehling, P. und Hackauf, B. (2011): Identification of molecular markers associated with QTLs in rye. Berichte aus dem Julius Kühn-Institut, Nr. 162. Vortrag
- Musmann, D.;** Debener, T. Linde, M. und Kadirvel, P. (2010): Genetic analysis of heat tolerance during pollen development in tomato. 10. GPZ Haupttagung in Freising. Posterbeitrag
- Musmann, D.** (2009): Hitzetoleranz bei der Blütenbildung bei Tomaten. GFP Tagung in Bonn, Sitzung der Abteilung Gemüse, Heil- und Gewürzpflanzen. Vortrag
- Musmann, D.** (2009): Molecular markers - The AFLP technique. 5th Workshop Plant Science. Forschungsinitiative „Angewandte Pflanzenbiotechnologie“. Vortrag

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Thomas Debener für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende und kompetente Betreuung sowie die hilfreichen Diskussionen.

Herrn Professor Hartmut Stützel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Pflanzenzüchtung bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die schönen Stunden im Labor. Dr. Marcus Linde danke ich besonders für seine fachliche und persönliche Unterstützung, die vielen hilfreichen Ratschläge und die ausgiebigen Diskussionen über die Ergebnisse dieser Arbeit.

Dr. Bernd Hackauf danke ich besonders für die kritische Durchsicht meines Manuskripts und die allzeit guten Diskussionen. Die Zeit am JKI werde ich nie vergessen.

I thank Robert de la Peña as well as the staff at AVRDC for their hospitality and kindness during my training in Taiwan. I had a wonderful time and learned a lot. Special thanks to Rachael, Jessica, Dennis and Christian.

Dr. Sjaak van Heusden danke ich für die Möglichkeit, die F2- Kartierungspopulation mit SNP-Markern zu charakterisieren. Ohne diese wäre eine Abbildung der Ergebnisse auf die physikalische Karte des Tomatengenoms nicht möglich gewesen.

Bei meinen Eltern, meinen Brüdern, meinem Freund und meinen Freunden möchte ich mich ganz besonders für ihren steten Zuspruch und die Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken. Danke, dass ihr immer für mich da wart. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.