

#### 4 DISKUSSION

Die *Alternaria*-Rapsschwärze ist eine sporadisch auftretende, weltweit verbreitete und wirtschaftlich bedeutende Krankheit des Rapses. Zurzeit kann dem Befall und den damit verbundenen Ernteverlusten - bei für den Pilz günstigen Bedingungen von bis zu 60 % (DAEBELER *et al.* 1986) - nur durch Fungizidbehandlung von Saatgut und Keimlingen begegnet werden. Wirtschaftlicher Schaden tritt aber erst im Schotenstadium auf, zu einem Zeitpunkt, wo der Einsatz von Pflanzenschutz nicht mehr sinnvoll ist. Die Entwicklung *Alternaria*-resistenter oder -toleranter Rapssorten steht deshalb im Mittelpunkt dieser Arbeit. Im Genpool von *Brassica napus* ist keine Resistenz gegen die Erreger der Rapsschwärze bekannt, so dass Resistenzen aus verschiedenen verwandten Arten durch interspezifische bzw. intergenerische Hybridisierungen in das Rapsgenom transferiert werden sollten. Zunächst wurden acht putative Resistenzdonoren aus der Familie *Brassicaceae* (Tab. 2.1) hinsichtlich ihrer Reaktion auf das Pathogen untersucht. Als Resistenztest wurde der Feuchtkammertest entwickelt, der es erlaubt, die Pflanze als intakten Organismus unter weitgehend naturidentischen Bedingungen auf Resistenz zu prüfen.

Bei allen putativen Resistenzdonoren waren bisher weder der Mechanismus noch die Vererbung der Resistenz bekannt. Bei jeder gegebenen Donorart kann eine Wirts- oder eine Nichtwirtsresistenz vorliegen, und - sofern die Resistenz vererbt wird - kann es sich jeweils um mono-, oligo- oder polygene, dominante oder rezessive Erbgänge handeln. Des Weiteren sind auch der Erfolg von Kreuzungen über Art- und Gattungsgrenzen hinweg sowie die Durchführbarkeit von Rückkreuzungen mit dem rekurrenten Elter nicht immer gegeben. Insbesondere die erste Rückkreuzung erweist sich, aufgrund mangelnder Chromosomenpaarungen in der Meiose, oft als schwierig. Die Erfolgsaussichten einer stabilen Übertragung der Resistenz in das Rapsgenom blieben daher zunächst offen. Deshalb wurden die vier Arten mit den stärksten Resistenzausprägungen für die Herstellung von interspezifischen bzw. intergenerischen Hybriden mit dem Raps ausgewählt und vier Kreuzungsansätze parallel verfolgt. Auch vergleichsweise schwach ausgeprägte (meist quantitative) Resistenzen - wie die bei *Diplotaxis tenuifolia*, *Sinapis alba* und *Brassica elongata* beobachteten - sind wertvoll, da sie in der Regel polygen vererbt werden (VANDERPLANK 1968) und im Feld dauerhaft, weil auch für verschiedene Rassen eines Erregers schwer zu durchbrechen sind.

Ausgangsmaterial für die Versuche bildeten zunächst sexuelle bzw. somatische Hybriden aus *B. napus* und den moderat resistenten Arten *B. elongata* und *S. alba* (PLÜMPER 1995). Weiterhin wurden sexuelle Hybriden aus *B. napus* und der ebenfalls moderat resistenten Art *D. tenuifolia* sowie vollständig *Alternaria*-resistenten Vertretern der Art *D. erucoides* hergestellt. In allen Kreuzungskombinationen wurden unter Einsatz von *in vitro*-Kulturtechniken (*embryo rescue*) Rückkreuzungs- und Selbstungsnachkommen erzeugt.

Chromosomenzahl und Genomzusammensetzung wurden dabei jeweils mittels klassischer Chromosomenpräparationen an Wurzelspitzen und genomischer *in situ*-Hybridisierung (GISH) untersucht. Resistente Pflanzen mit möglichst rapsähnlichem Karyotyp ( $2n = 38$ ) und wenig Donorchromatin wurden jeweils für das weitere Kreuzungsprogramm selektiert.

Nachfolgend wird zunächst die Prüfung auf *Alternaria*-Resistenz, insbesondere neu entwickelte Resistenztests als Grundlage der Untersuchungen diskutiert. Im Anschluss wird auf interspezifische bzw. intergenerische Hybridisierungen zwischen Raps und verwandten Arten eingegangen. Hierbei werden die Eignung und die Limitierungen von verschiedenen Donoren hervorgehoben, unter besonderer Berücksichtigung von *D. eruroides* als vielversprechendstem Resistenzdonor. Schließlich werden der Nutzen und die Verwertbarkeit der Ergebnisse thematisiert.

#### 4.1 Prüfung auf *Alternaria*-Resistenz

Verschiedene *Alternaria*-Resistenztests wurden in dieser Arbeit durchgeführt. Zunächst wurde der von PLÜMPER (1995) beschriebene Blattscheibentest angewandt. Es handelt sich hierbei um einen sehr schnellen Test (vier Tage von der Inokulation bis zur Auswertung), der einer groben Einschätzung der Anfälligkeit bzw. Resistenz der geprüften Pflanzen diene. Zweifelhaft war jedoch, ob dieser an Blattsegmenten durchgeführte Test eine vergleichbare Resistenzantwort auf das Pathogen anzeigt wie bei einer intakten Pflanze. In der vorliegenden Arbeit wurde bei diesem Test eine geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beobachtet, insbesondere bei den Arten mit vermutlich quantitativ ausgeprägter Resistenz und deren Hybriden mit dem Raps. Auch erwies es sich als schwierig, bei den Arten mit schwacher Resistenzausprägung mit diesem Test Abstufungen in der Abwehrreaktion zu bewerten und eine klare Grenze zwischen Anfälligkeit und Resistenz zu ziehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Prüfung auf *Alternaria*-Resistenz optimiert und der Feuchtkammertest entwickelt. In diesen Test ist die intakte Pflanze involviert, und es kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse weitestgehend dem Resistenzverhalten von Pflanzen im Feld entsprechen. Dennoch stellen die hohe Luftfeuchtigkeit in der Feuchtkammer sowie Temperaturen um 22 °C optimale Infektionsbedingungen für das Pathogen dar, die in der Natur nur selten auftreten. Auch der Einsatz von hohen Konidienkonzentrationen ( $5 \times 10^5$  Sporen/ml) macht den Feuchtkammertest zu einem sehr invasiven Test, der auf starke Resistenzausprägung selektiert. Als Standardinokulum wurden Sporen des sehr infektiösen, stark sporulierenden *A. brassicicola*-Isolats 62009 (BBA) verwendet. Auswahlkriterium war, dass dieses Isolat bei der anfälligen Kontrolle (Raps) besonders stark ausgeprägte, eindeutige und gut reproduzierbare Krankheitssymptome hervorrief.

Jede zu testende Pflanze wurde an drei Blättern wiederum an drei Stellen infiziert. Dies erlaubte eine sichere Abschätzung der Resistenz, auch bei Einzelpflanzen. Es wurden ausschließlich Blätter infiziert, die vollständig entfaltet waren, aber noch keine Seneszenzerscheinungen zeigten. Seneszenz würde zu saprophytischem Wachstum des Pilzes führen und die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber *Alternaria* erhöhen (SARKAR & SEN GUPTA 1978, BABADOOST & GABRIELSON 1979, KÖHLE & HOFFMANN 1989).

Der Feuchtkammertest wurde in dieser Arbeit als Standardresistenzprüfung angewandt. Zusätzlich wurde an ausgewählten blattresistenten Pflanzen ein Resistenztest an Schoten durchgeführt (in der Regel *in vitro* oder, sofern es die Wuchshöhe bei Schotenreife erlaubte, auch *in vivo* in der Feuchtkammer). Dieser diente der Überprüfung, ob die Resistenz an Blättern mit der Resistenz an Schoten korrelierte. Der Schotentest setzt allerdings eine ausreichende Fertilität der zu testenden Pflanze voraus, was bei den interspezifischen bzw. intergenerischen Hybriden und deren Rückkreuzungs- und Selbstungsnachkommen nur selten gegeben war. Die Ergebnisse an Blättern und Schoten, die jeweils in der Feuchtkammer getestet wurden, korrelierten miteinander. Die Symptome an abgetrennten Schoten aus *in vitro*-Tests fielen, ähnlich wie an Blattscheiben, in der Regel etwas stärker aus.

Eine Modifizierung des Standardfeuchtkammertests (im Folgenden als „Tröpfchenmethode“ bezeichnet) stellt die sogenannte „Plättchenmethode“ dar. Diese wurde entwickelt, um zu prüfen, ob in der gegen das Standardisolat (*A. brassicicola*, Isolat 62009) vollständig resistenten Donorart *D. eruroides* auch Resistenz gegenüber *A. brassicae* vorliegt. Bei *A. brassicae* gestaltet sich die Gewinnung größerer Mengen an Inokulum schwierig (SENIOR *et al.* 1987, JOSHI *et al.* 1988). Außerdem sind die Sporen dieser Art weniger infektiös als *A. brassicicola*-Sporen, so dass nach der „Tröpfchenmethode“ in der Feuchtkammer auch bei der anfälligen Kontrolle (Raps) durch Inokulation mit *A. brassicae* und der Standardsporenkonzentration ( $5 \times 10^5$  Sporen/ml) keine Läsionen hervorgerufen wurden. Bei der „Plättchenmethode“ wurde mit Filterpapierstückchen infiziert, die von sporulierendem *Alternaria*-Myzel überwachsen waren (Kapitel 2.6.4.2 und 2.7.2). Nach Inokulation mittels „Tröpfchenmethode“ und sieben Tagen Inkubation in der Feuchtkammer bildete *D. eruroides* keine Krankheitssymptome aus, auch nicht bei erhöhtem Infektionsdruck (Kapitel 3.3.4.1, Abschnitt „Resistenzausprägung und Isolatspezifität“). Durch die „Plättchenmethode“ hingegen wurden bei allen getesteten *Alternaria*-Isolaten Krankheitssymptome hervorgerufen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der „Plättchenmethode“ mit Myzel und einer erhöhten Anzahl an Konidien infiziert wurde. Der Pilz kann außerdem saprophytisch auf dem cellulosehaltigen Filterpapier wachsen und Toxine bilden, die das pflanzliche Gewebe schädigen und die sichtbaren Läsionen verursachen. Die mittels „Plättchenmethode“ hervorgerufenen Läsionen bei *D. eruroides* waren jedoch bei allen *Alternaria*-Isolaten signifikant kleiner als bei Raps. Bei beiden Inokulationsmethoden wurden die stärksten Symptome durch Inokulation mit den

*A. brassicicola*-Isolaten hervorgerufen. Aufgrund der ungleichmäßigen Sporenverteilung auf den Filterstückchen, mit denen infiziert wurde, und der damit verbundenen mangelnden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eignet sich die „Plättchenmethode“ nicht als Standardresistenztest und diente im Rahmen der vorliegenden Arbeit lediglich der Überprüfung der Resistenz gegen *A. brassicae* beim Donor *D. eruroides*.

#### 4.1.1 Bonitur in drei Klassen

Zur Auswertung der Feuchtkammertests wurden die Pflanzen aus allen Kreuzungskombinationen in drei Klassen bonitiert (S = anfällig, S-R = intermediär resistent, R = resistent). Den Klassen wurden verschiedene Läsionsgrößen zugeordnet, wobei die Schwellenwerte zur Einstufung stets von den Läsionsgrößen des jeweiligen Resistenzdonors abhingen (Kapitel 2.7.2). Um Nachkommen aus verschiedenen Kreuzungsgruppen miteinander vergleichen zu können, wurde der Relative Läsionsindex (RL) eingeführt. Ein RL = 0 bezeichnet eine Resistenzausprägung, die der des resistenten Elters entspricht, unabhängig von dessen Läsionsgröße im Vergleich zu Raps (in % angegeben). Ein RL = 1 entspricht dem anfälligen Elter. Die Klassen stellen keine genetischen Klassen dar, sondern sind *a priori* deskriptiv zu verstehen.

In der Donorart *S. alba* wird die Resistenz vermutlich quantitativ vererbt (Kapitel 4.3.1, Abschnitt „Resistenzdonor *S. alba*“), was das Vorkommen einer intermediären oder moderaten Resistenzausprägung (Klasse S-R) erklärt. Im Fall des Donors *D. eruroides* konnte hingegen ein monogen-dominanter Erbgang der Resistenz gezeigt werden. In den Nachkommenschaften aus der Kreuzung mit *B. napus* sollten daher erwartungsgemäß nur resistente oder anfällige Pflanzen auftreten. Tatsächlich aber wurden auch Pflanzen mit intermediärer Resistenzausprägung beobachtet, deren Läsionen signifikant kleiner als die der anfälligen Kontrolle und in mehreren unabhängigen Tests reproduzierbar waren. Die nicht vollständige Penetranz der Resistenz innerhalb solcher Kreuzungsnachkommen basiert wahrscheinlich auf physiologischen oder positionellen Effekten und hängt von der Umwelt, der Konstitution und dem jeweiligen genetischen Hintergrund der getesteten Pflanze ab. Auch innerhalb der Donorart selbst wurden neben resistenten, keinerlei Krankheitssymptome ausprägenden und anfälligen (durchschnittlicher Läsionsdurchmesser von 15 mm) Einzelpflanzen auch Pflanzen beobachtet, die nur schwache Symptome (Läsionsdurchmesser von 5-8 mm) zeigten. Durch Selbstungsversuche an solchen Pflanzen mit geringer Anfälligkeit konnte gezeigt werden, dass diese Pflanzen keine eigene Klasse darstellten, sondern der Klasse S zugeordnet werden müssen (R. SCHEUNEMANN, pers. Mitteilung). Deshalb wurden auch die Nachkommen aus der intergenerischen Kreuzung mit Raps, die eine moderate Resistenzausprägung zeigten, vom weiteren Rückkreuzungsprogramm ausgeschlossen.

#### 4.2 Transfer von *Alternaria*-Resistenz durch interspezifische bzw. intergenerische Hybridisierung

Die Introgression bestimmter Merkmale durch interspezifische und intergenerische Hybridisierungen zwischen kultivierten und nichtkultivierten Arten (Wildarten) stellt einen arbeits- und zeitaufwendigen Prozess dar, dessen Ergebnisse nicht immer vorhersagbar sind. Die Bedeutung von Wildarten für die züchterische Verbesserung von Kulturpflanzen und die damit verbundene Erweiterung des zur Verfügung stehenden Genpools wird trotzdem immer wieder positiv betont (zusammengefasst in STALKER 1980, KHUSH & BRAR 1992, KALLOO 1992, MIFLIN 2000).

Die Strategien zur Schaffung von Art- und Gattungshybriden sind abhängig von dem Verwandtschaftsgrad der Ausgangsarten. Ist die Verwandtschaft eng, so sind die Genome durch Homöologie gekennzeichnet. Es kann zu meiotischen Paarungen zwischen homöologen Chromosomen und zu intrachromosomalen Rekombinationsereignissen kommen. Die Erzeugung solcher Hybriden ist meist relativ problemlos mittels *embryo rescue* möglich. Ihre Fertilität ist aber oft aufgrund meiotischer Irregularitäten vermindert und ihre Stabilität über die Folgegenerationen aufgrund der fortgesetzten meiotischen Rekombination zwischen den homöologen Genomen begrenzt. Verwandtschaftlich weiter entfernte Ausgangseltern sind durch den Besitz weitgehend inhomologer Genome gekennzeichnet, bei denen im Normalfall keine interspezifische meiotische Rekombination zu erwarten ist.

Kartierungsergebnisse bei Mitgliedern der Familie *Brassicaceae* haben weitgehende Homöologien zwischen den Genomen von Arten sogar verschiedener Gattungen gezeigt (PARKIN & LYDIATE 1997, PARKIN *et al.* 1997). Die stabile Introgression von Chromosomen bzw. chromosomaler Abschnitte aus Genomen verwandter Arten in den Raps sollte daher möglich sein. Für Chromosomen des B-Genoms von *B. nigra* und *B. juncea* ist dies bereits gezeigt worden (SACRISTÁN & GERDEMANN 1986, GERDEMANN-KNÖRCK *et al.* 1994, STRUSS *et al.* 1996, CHÈVRE *et al.* 1996 und 1997).

Bisher beschriebene Experimente zum Transfer von *Alternaria*-Resistenz in *B. napus*, *B. oleracea* oder *B. juncea* beziehen sich hauptsächlich auf die Resistenzquelle *S. alba*. Mit dieser Art wurden mehrmals, sowohl auf sexuellem Weg unter Verwendung von *in vitro*-Kulturtechniken (mit *B. napus*: RIPLEY & ARNISON 1990, RIPLEY *et al.* 1992, CHÈVRE *et al.* 1994b, BROWN *et al.* 1997; mit *B. juncea*: MOHAPATRA & BAJAJ 1987; mit *B. oleracea*: NOTHNAGEL *et al.* 1996) als auch mittels Protoplastenfusion [*B. napus* (+) *S. alba*: PRIMARD *et al.* 1988, LELIVELT *et al.* 1993, PLÜMPER 1995; *B. juncea* (+) *S. alba*: GAIKWAD *et al.* 1996; *B. oleracea* (+) *S. alba*: HANSEN & EARLE 1997], intergenerische Hybriden hergestellt. Auch über die Erzeugung *Alternaria*-resistenter Nachkommen mittels somatischer Hybridisierung

zwischen *Camelina sativa* (+) *B. oleracea* (SIGAREVA & EARLE 1999) sowie sexueller Kreuzung aus *B. napus* und *B. elongata* (PLÜMPER 1995) wurde berichtet.

Mit wenigen Ausnahmen (RIPLEY *et al.* 1992, CHÈVRE *et al.* 1994b) beziehen sich die oben erwähnten Arbeiten nur auf die Erzeugung und Charakterisierung der Primärhybriden.

Wie bei den oben erwähnten Arbeiten wurden auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei allen Kreuzungskombinationen *in vitro*-Kulturtechniken (*embryo rescue*, Kapitel 2.5.4.2) eingesetzt. Nach der Befruchtung kommt es in interspezifischen und intergenerischen Kreuzungen und deren Rückkreuzungen oft zu Störungen der Endospermentwicklung, was das Absterben des Embryos zur Folge hat. Insbesondere bei den Rückkreuzungen der *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe wurden, wenn die Schoten an der Pflanze verblieben, bereits ab dem achten Tag nach der Befruchtung Zeichen der Autolyse des Embryos beobachtet. Das rechtzeitige Anwenden der Ovarienkultur ersetzt das Endosperm und bietet dem Embryo die nötige Nahrungsgrundlage.

Der Embryokultur wurde die Ovarienkultur vorgeschaltet, da sie sehr früh (sieben Tage nach der Bestäubung) angewandt werden kann und zu diesem Zeitpunkt die Embryonen noch zu klein zum Präparieren waren. Die Präparation und Kultur der Embryonen erfolgte ein bis zwei Wochen nach der Abnahme der Ovarien. Diese Technik hat sich vor allem bei Kreuzungen zwischen taxonomisch weiter entfernten Arten bewährt, bei denen der Zusammenbruch des Endosperms in der Regel früh erfolgt (DELOURME *et al.* 1989, TAKAHATA 1990, TAKAHATA & TAKEDA 1990, NANDA KUMAR & SHIVANNA 1993, INOMATA 1994).

Einige Embryonen späterer Generationen zeigten keine Anzeichen der Autolyse, auch wenn sie an der Pflanze heranreiften. Dennoch wurde bis zur Erstellung der BC<sub>3</sub>-Generation routinemäßig die *in vitro*-Kultur angewandt, da auf diese Weise die Ausbeute an Kreuzungsnachkommen deutlich gesteigert werden konnte. Darüber hinaus beschleunigt dieses Verfahren die Samenreifung und -keimung und verkürzt dadurch die Generationszeit. Bei der Erstellung zukünftiger Generationen sollte es jedoch möglich sein, auf die *in vitro*-Techniken zu verzichten.

### 4.3 Putative Resistenzdonoren

#### 4.3.1 Auswahl der Resistenzdonoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden acht putative Resistenzdonoren der Familie *Brassicaceae* auf ihre Reaktion gegenüber *A. brassicicola* hin untersucht. In der Literatur sind alle diese Arten als *Alternaria*-resistent beschrieben (Tab. 2.1).

Die vier Arten mit den stärksten Resistenzausprägungen (*S. alba*, *B. elongata*, *D. tenuifolia* und *D. eruroides*) wurden für interspezifische bzw. intergenerische Hybridisierungen mit *B. napus* ausgewählt. Vollständige Resistenz gegen das Pathogen („Immunität“,

charakterisiert durch die Abwesenheit von Krankheitssymptomen nach Inokulation mit *A. brassicicola*) zeigte nur *D. eruroides*. Bisher liegen bei keiner der ausgewählten Donorarten exakte Untersuchungen zum jeweiligen Resistenztyp und seiner Vererbung vor. Darüber hinaus waren bei den putativen Resistenzdonoren auch die jeweilige Übertragbarkeit der Resistenzeigenschaften in den Raps und deren Stabilität im Rezeptorgenom sowie der Erfolg eines anschließenden Rückkreuzungsprogramms offen. Um die Erfolgsaussichten einer stabilen Übertragung der Resistenz in den Raps zu optimieren, wurden vier Kreuzungsgruppen parallel bearbeitet.

### **Resistenzdonor *Sinapis alba***

Die Resistenz des Weißen Senfs (*S. alba*) gegen *A. brassicae* und *A. brassicicola* ist mehrfach in der Literatur beschrieben (KOLTE 1985, BRUN *et al.* 1987, SHARMA & SINGH 1992). Bisher ist es jedoch nicht gelungen, die Resistenz stabil in leistungsfähige Sorten zu übertragen. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nach einem Screening einer Vielzahl von *S. alba*-Akzessionen aus dem Gaterslebener Sortiment eine Resistenz prinzipiell bestätigt werden. Die Resistenz wurde als schwach eingestuft. Die getesteten Individuen zeigten eine quantitativ abgestufte Symptomausprägung, und einzelne Pflanzen, auch innerhalb derselben Akzession, konnten in ihrer Resistenzausprägung stark variieren.

Die verhältnismäßig schwachen und abgestuften Resistenzausprägungen innerhalb verschiedener Akzessionen lassen vermuten, dass es sich bei *S. alba* um eine polygen vererbte Resistenz handelt. Quantitative Resistenzen können aus züchterischer Sicht einen Vorteil darstellen, da sie in der Regel gegen mehrere Pathotypen eines Erregers wirksam sind und im Feld als weniger leicht zu durchbrechen gelten als qualitative, monogen vererbte Resistenzen (VANDERPLANK 1968, PINK 2002). Aufgrund der Ergebnisse aus dieser Arbeit ist allerdings davon auszugehen, dass die *S. alba*-spezifischen resistenzgenetischen Grundlagen sehr instabil sind und wahrscheinlich in großem Maße von Umwelteinflüssen und dem genetischen Hintergrund der Wirtspflanze abhängen.

Phylogenetisch werden Arten der Gattung *Sinapis*, insbesondere *S. arvensis*, in die Nähe des B-Genoms eingeordnet (SONG *et al.* 1988, WARWICK & BLACK 1991 und 1996, TSUKAMOTO *et al.* 1993, KAPILA *et al.* 1996, OSHIMA 2000, INABA & NISHIO 2002). Zum Rapsgenom zeigt *S. alba* jedoch nur geringe Homologien (MIZUSHIMA 1950, CHÈVRE *et al.* 1991 und 1994b). Homologe Rekombinationsereignisse zwischen dem *S. alba*- und dem Rapsgenom waren daher eher selten zu erwarten.

Der Kreuzungserfolg von *B. napus* x *S. alba* hängt stark von den verwendeten Genotypen (RIPLEY & ARNISON 1990) und vom Ausmaß des Versuchsumfangs ab. Trotz Einsatz von *embryo rescue* führten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten sexuellen

Kreuzungen zwischen *B. napus* und verschiedenen *S. alba*-Cultivaren zu matromorphen (diploid parthenogenetischen) Nachkommen, wenn *B. napus* als Mutterpflanze verwendet wurde, oder - insbesondere bei der reziproken Kreuzung - zur Bildung nicht keimfähiger Samen.

Abgesehen von der schwierigen Durchführung der Originalkreuzung zwischen Raps und *S. alba*, die durch Protoplastenfusion umgangen werden kann, hat ein Rückkreuzungsprogramm gute Erfolgsaussichten, was die Arbeiten von RIPLEY *et al.* (1992) und CHÈVRE *et al.* (1994b) zeigten.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten somatischen Hybriden wurden durch asymmetrische Protoplastenfusion unter Anwendung der Komplementation der Fusionsprodukte hergestellt. Die Hybridisierungspartner wurden hierbei verschiedenartig inaktiviert. Die Donorprotoplasten wurden röntgenbestrahlt, was Chromosomenbrüche hervorruft, und die *B. napus*-Protoplasten wurden Jodacetamid-inaktiviert (PLÜMPER & SACRISTÁN 1995).

Der Weiße Senf stellt eine vielseitige Quelle interessanter Eigenschaften für die Züchtung von Raps dar: Neben der Resistenz gegen *Alternaria* sind im Genpool von *S. alba* auch Resistenzen gegen *Leptosphaeria maculans* (GUGEL & SÉGUIN-SWARTZ 1997), *Rhizoctonia solani*, den Erreger der Wurzeltöterkrankheit (YANG & VERMA 1992) und den Nematoden *Heterodera schachtii* (LELIVELT & HOOGENDOORN 1993) vorhanden. Als weitere Vorteile von *S. alba* als potentiellen Resistenzdonor werden Hitze- und Trockentoleranz, Toleranz gegenüber dem Kohlerdfloh *Phyllotreta cruciferae* Goeze (LAMB 1980, BODNARYK & LAMB 1991) und der Mehligen Kohl-Blattlaus *Brevicoryne brassicae* (THOMPSON 1963) sowie frühe Reife und platzfeste Schoten (BROWN *et al.* 1997) genannt. Auch der hohe Erucasäuregehalt (OLSSON 1984) und die gelbe Samenschale machen diese Art agronomisch interessant.

### **Resistenzdonor *Brassica elongata***

Der Langtraubige Kohl (*B. elongata*) fand bisher in der Literatur nur wenig Beachtung. Neben der Resistenz gegenüber *A. brassicae* und *A. brassicicola* (PLÜMPER 1995) ist diese Art wegen ihres hohen Anteils an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Samen auch aus ernährungsphysiologischer Sicht wertvoll. So setzt sich das Öl im Samen der für diese Arbeit verwendeten Varietät *B. elongata* ssp. *integrifolia* zu mehr als 57 % aus den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linol (C18:2)- und Linolensäure (C18:3) zusammen (VELASCO *et al.* 1998). Bisher wurde noch kein ähnlich hoher Linolensäuregehalt in anderen Arten der Gattung *Brassica* beobachtet. Öle mit hohem Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren finden vor allem bei der industriellen Herstellung von Farben und Lacken auf Ölbasis ihre Anwendung (CARRUTHERS 1995).

Über die Genetik und den Mechanismus der Resistenz gegen *Alternaria* ist auch in dieser Art nichts bekannt. Möglicherweise beruht die Resistenz von *B. elongata* auf präformierten Faktoren, insbesondere auf einer glatten, wachsbeschichteten Blattoberfläche. Wachsauflagerungen spielen auch in der Feldresistenz einiger Genotypen von *B. napus* und *B. rapa* eine Rolle (CONN & TEWARI 1989).

### ***Diplotaxis tenuifolia* (Feinblättriger Doppelsame) und *D. eruroides* (Raukenähnlicher Doppelsame) als potentielle Resistenzdonoren**

Innerhalb der Subtribus *Brassicinae* wurden in der Gattung *Diplotaxis* die höchsten Linolensäuregehalte im Öl (um 30 %) beobachtet (VELASCO *et al.* 1998). *D. tenuifolia* wird außerdem als Resistenzquelle gegen *L. maculans* genannt (PLÜMPER 1995, CHEN & SÉGUIN-SWARTZ 1999).

Nach *Brassica* ist *Diplotaxis* die artenreichste Gattung in der Tribus *Brassiceae*. Homologien zwischen Vertretern der Gattung *Diplotaxis* (D-Genom) und verschiedenen *Brassica*-Arten konnten gezeigt werden (HARBINDER & LAKSHMIKUMARAN 1990, BANGA *et al.* 2003). Meiose-Studien an Hybriden aus *D. siifolia* x *B. rapa* und *D. siifolia* x *B. juncea* (AHUJA *et al.* 2003) sowie aus *D. eruroides* x *B. rapa* (MALIK *et al.* 1999) zeigten Homologien zwischen dem Genom der jeweiligen Wildart und dem A-Genom. Zwischen dem *D. eruroides*- und dem C-Genom von *B. oleracea* wurde ebenfalls eine hohe Affinität beobachtet (MIZUSHIMA 1980, siehe auch Kapitel 4.5).

Wie bei den anderen Donoren waren auch in der Gattung *Diplotaxis* der Mechanismus und die Vererbung der Resistenz gegen *Alternaria* unbekannt. Bei *D. tenuifolia* ließen die Aufspaltungsverhältnisse in den im Laufe dieser Arbeit erstellten F<sub>1</sub>- und F<sub>2</sub>-Generationen der Kreuzungen mit dem Raps einen komplizierten Vererbungsmodus der Resistenz vermuten. Die Unterschiede in den reziproken Kreuzungen weisen auf cytoplasmatisch-nukleare Interaktionen oder auf Phänomene wie Sequenzeliminierungen, Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster bzw. selektives *gene silencing* hin, die nach interspezifischen Kreuzungen häufig beobachtet werden (PIKAARD 2001, RIESEBERG 2001).

*D. eruroides* stellt die einzige im Rahmen dieser Arbeit getestete Art mit vollständiger Resistenz dar. Bei dieser Art wurde darüber hinaus anhand von intraspezifischen Kreuzungen zwischen resistenten und anfälligen Einzelpflanzen derselben Akzession eine monogen-dominante Vererbung der Resistenz postuliert (Kapitel 3.3.4.1, Abschnitt „Vererbung der Resistenz innerhalb der Art *D. eruroides*“). Weiterhin wurde gezeigt, dass es sich bei *D. eruroides*, obwohl monogen vererbt, um eine Resistenz handelt, die sich gegen alle in dieser Arbeit untersuchten *Alternaria*-Isolate (zwei *A. brassicae*- und zwei *A. brassicicola*-Isolate, Kapitel 3.3.4.1, Abschnitt „Resistenzausprägung und Isolat-spezifität“) als wirksam erwies.

Zahlreiche Versuche zur interspezifischen Hybridisierung zwischen Vertretern der Gattungen *Brassica* und *Diplotaxis* wurden unternommen (HARBERD & MCARTHUR 1980, MIZUSHIMA 1980, QUIROS *et al.* 1988, SALISBURY 1989, KIRTI *et al.* 1995, VYAS *et al.* 1995, BIJRAL & SHARMA 1996 und 1998, MOHAPATRA *et al.* 1998), davon einige zwischen *B. napus* und *D. tenuifolia* (PLÜMPER 1995) und zwischen *B. napus* und *D. eruroides* (HARBERD & MCARTHUR 1980, QUIROS *et al.* 1986, RINGDAHL *et al.* 1987, DELOURME *et al.* 1989). Viele Kreuzungen zielten hierbei auf die Induktion cytoplasmatischer männlicher Sterilität (CMS) der Hybriden durch das Plasma von *D. eruroides* ab (HINATA & KONNO 1979, RINGDAHL *et al.* 1987).

Meist wurden nur die Originalkreuzungen durchgeführt, erfolgreiche Rückkreuzungen mit *B. napus* gelangen CHÈVRE *et al.* (1994a) und VYAS *et al.* (1995).

Mit einem haploiden Chromosomensatz von  $n = 7$  ist *D. eruroides* eine der Arten mit den geringsten Chromosomenzahlen in der Tribus *Brassicaceae*. Es war zu hoffen, dass schon nach wenigen Rückkreuzungen mono- oder disome Raps-Additionslinien entstehen.

Der monogen-dominante Vererbungsmodus der Resistenz innerhalb von *D. eruroides* stellt eine gute Voraussetzung für den Transfer des resistenzvermittelnden DNA-Abschnitts aus der Donorart in den Raps dar.

Monogen vererbte Resistenzen sind meist R-Gen bedingt (siehe dazu Übersichtsartikel von JOHNSON 1984) und durch Mutationen auf Seiten des Erregers möglicherweise zu durchbrechen. Dass dies nicht zwangsläufig der Fall sein muss, wird ausführlicher in Kapitel 4.8 diskutiert.

Als weiterer interessanter Aspekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass *D. eruroides* auch bei massiver künstlicher Infektion mit dem Erreger (bei Inokulationen mit bis mindestens  $3 \times 10^7$  Konidien/ml) immun blieb.

#### **4.3.2 Eignung der putativen Resistenzdonoren für den Transfer der Resistenz**

Drei der für interspezifische und intergenerische Hybridisierungen mit dem Raps eingesetzten Donoren (*S. alba*, *B. elongata* und *D. tenuifolia*) wurden in dieser Arbeit als ungeeignet für den Transfer einer Resistenz gegen *Alternaria* in *B. napus* eingestuft. Ein maßgeblicher Grund hierfür war die schwach ausgeprägte Resistenz der jeweiligen Kreuzungsnachkommen, insbesondere in der *S. alba*-Kreuzungsgruppe. Hierbei spielte die Resistenzausprägung des Donors selbst eine entscheidende Rolle. So wurden bei *S. alba* bereits durchschnittliche Läsionsgrößen von mehr als 40 % der durchschnittlichen Läsionsgrößen von *B. napus* cv. ‚Ceres‘ gemessen. Entsprechend schwach war auch die Resistenzausprägung in den Rückkreuzungs- und Selbstungsnachkommenschaften (Tab. 3.20). Des Weiteren war die Resistenz in der *S. alba*-Kreuzungsgruppe bereits in

einem frühen Stadium des Rückkreuzungsprogramms (in der BC<sub>2</sub>-Generation) nicht mehr nachweisbar. Beide Phänomene sind vermutlich auf eine quantitative Vererbung der Resistenz in *S. alba*, die auf mehreren Genen mit additiven Effekten basiert, zurückzuführen. Dies erklärt auch die größtenteils intermediäre Resistenzausprägung der asymmetrischen Hybriden und deren Nachkommen. Alternativ wäre eine geringe Transmissionsrate des oder der resistenztragenden Chromosomen der Donorart denkbar. Sowohl die *S. alba*- als auch die *B. elongata*-vermittelten Resistenzausprägungen in *B. napus* waren außerdem instabil: Die besten Genotypen erreichten zwar jeweils mindestens das Resistenzniveau des Donors (Tab. 3.20), jedoch waren die Ergebnisse in unabhängigen Testwiederholungen nicht immer reproduzierbar. Teilweise zeigten unterschiedliche Klone desselben Genotyps verschieden starke Resistenzausprägungen. Das Phänomen ließ sich sogar an verschiedenen, gleichwertigen Blättern derselben Pflanze beobachten. Eventuell spielten hierbei leichte Schwankungen der Testbedingungen (wie Temperatur und Lichtintensität im Gewächshaus) eine modifizierende Rolle. Auch wurden bei diesen Kreuzungsgruppen zahlreiche Genotypen mit mixoploiden Zellen im Wurzelmeristem beobachtet. Instabilitäten der Chromosomenzahlen sind ein häufig beschriebenes Phänomen bei höheren Pflanzen (z. B. NIRMALA & RAO 1996, JELENIC *et al.* 2001) und werden insbesondere mit Allopolyploidie, interspezifischen Hybridisierungen und Gewebekultur (LARKIN & SCOWCROFT 1981, KARP 1991, SAHIJRAM *et al.* 2003, WINTER 2004) in Zusammenhang gebracht. Meist handelt es sich um somaklonale Variationen in somatischen Geweben, was Hinweise auf mitotische Eliminierung einzelner oder mehrerer Chromosomen gibt.

In der *B. elongata*-Kreuzungsgruppe wurden außerdem sehr hohe Chromosomenzahlen beobachtet, was auf eine spontane Verdoppelung des Chromosomensatzes in der F<sub>1</sub>-Generation von  $2n = 30$  auf  $2n = 60$  Chromosomen zurückzuführen war. In der BC<sub>1</sub>-Nachkommenschaft wurden Chromosomenzahlen bis zu  $2n = 80$  (mit jeweils mindestens zehn Additionschromosomen aus dem Donor) beobachtet, die resistenten Genotypen wiesen jeweils mindestens  $2n = 57$  Chromosomen auf. Solch hohe Chromosomenzahlen sind erfahrungsgemäß nur schwer und durch viele Rückkreuzungen auf den Rapskaryotyp ( $2n = 38$ ) zu reduzieren. Erschwerend kam hinzu, dass die interessanten BC<sub>1</sub>- und BC<sub>2</sub>-Genotypen dieser Kreuzungsgruppe größtenteils steril waren (Tab. 3.6).

Die Unterschiede in der Resistenzausprägung der F<sub>1</sub>-Hybriden aus der reziproken Kreuzung zwischen *B. napus* und *D. tenuifolia* lassen vermuten, dass in dieser Donorart das Cytoplasma zumindest teilweise einen Einfluss auf die Resistenzreaktion gegen *Alternaria* hat. Ein ähnliches Phänomen konnten BANGA *et al.* (1984) bei alloplasmatischen Linien von *B. juncea* nachweisen. Da sich der Vererbungsmodus der Resistenz bei *D. tenuifolia* als unklar herausstellte, wurde auch dieser Donor als ungeeignet eingestuft, nicht zuletzt, weil die Resistenzausprägung in den Hybriden vergleichsweise schwach war.

Aus den oben genannten Gründen wurden die *S. alba*-, *B. elongata*- und *D. tenuifolia*-Kreuzungsgruppen jeweils ab einem bestimmten Stadium des Rückkreuzungsprogramms nicht weiter verfolgt (vgl. Abb. 3.3).

Im Gegensatz zu den zuletzt genannten Kreuzungsgruppen wurde in der *D. eruroides*-Gruppe die Resistenz stabil auf die Nachkommen vererbt. Die Resistenzausprägung in den Hybriden war stark, die Resistenzantwort eindeutig und weitestgehend von der Umwelt unabhängig. Resistenz war – sowohl bei der Donorart als auch bei den Kreuzungsnachkommen – stets mit Symptomfreiheit nach Inokulation mit *A. brassicicola* verbunden. Diese eindeutige Reaktion auf das Pathogen ermöglichte eine schnelle und sichere Identifikation resistenter Genotypen.

Aus den genannten Gründen wurde der Schwerpunkt der Arbeit auf die *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe gelegt. Im Kapitel 4.5 wird detailliert auf diese Gruppe eingegangen.

#### **4.4 Genomische *in situ*-Hybridisierung (GISH) als Methode zur Selektion geeigneter Rückkreuzungspartner**

Die Methode der genomischen *in situ*-Hybridisierung (GISH) erlaubt die Detektion von unterschiedlichen Genomkomponenten in interspezifischen und intergenerischen *Brassica*-Hybriden (SNOWDON *et al.* 1997) und somit die Identifizierung von Chromosomen aus den Donorarten, vorausgesetzt diese weisen ausreichend unterschiedliche DNA-Sequenzen auf. In der vorliegenden Arbeit konnte bei allen untersuchten Kreuzungskombinationen [*B. napus* (+) *S. alba*, *B. napus* x *B. elongata*, *B. napus* x *D. eruroides*] mittels GISH zwischen dem jeweiligen Donor- und dem Rezeptorgenom unterschieden und so die Genomzusammensetzungen in den sukzessiven Rückkreuzungsgenerationen der verschiedenen Kreuzungsgruppen analysiert werden. Fluoreszenzmarkiert waren hierbei in der Regel ganze Chromosomen, so dass die Methode vorrangig einen Überblick über den Umfang des transferierten genetischen Materials verschafft und ein Gesamtbild des Pflanzengenoms vermittelt. Die Möglichkeit der Detektion von Introgressionen kleinerer DNA-Abschnitte aus der Donorart ist mittels GISH nur begrenzt gegeben. Limitierend wirken sich hierbei insbesondere die Größe und die Position der Introgression aus. Distal im heterochromatischen Bereich gelegene DNA-Abschnitte lassen sich mittels GISH nur schwer nachweisen, da Chromosomenarme in der *Brassica*-Verwandtschaft eine ungewöhnlich niedrige Kopienzahl von über das Gesamtgenom verteilten Sequenzwiederholungen (*dispersed repeat sequences*) enthalten. Diese Sequenzwiederholungen bilden jedoch die Basis für GISH-Fluoreszenzsignale, so dass in der Regel nur der Perizentromerbereich der Donorchromosomen angefärbt wird. Eine Translokation oder Introgression im euchromatischen Bereich oder in den Chromosomenarmen ist daher mit dieser Methode schwer nachzuweisen. Introgressionen

können außerdem nur ab einer bestimmten Größe mittels GISH detektiert werden. Die Nachweisgrenze wird auf Fragmentgrößen von ca. 10 kb geschätzt (R. J. SNOWDON, pers. Mitteilung).

Bei Nachkommen der *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe wurden in späteren Rückkreuzungs- bzw. Selbstungsgenerationen Chromosomen beobachtet, die nur stellenweise fluoreszenzmarkiert waren, so z. B. beim in den Abbildungen 3.33a+b gezeigten BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>xC-Genotypen {(CxDe9)xC1b[S]7}xC11.

Verschiedene Erklärungen hierfür wären denkbar: Zum einen könnte es sich um ein akrozentrisches Chromosom handeln, das nur im perizentromeren Bereich mit GISH angefärbt wurde. Da aber bei Chromosomen der Donorart in den F<sub>1</sub>-Hybriden in der Regel mehr als nur der Perizentromerbereich mit GISH angefärbt wurde (vgl. Abb. 3.18), können die partiell fluoreszenzmarkierten Chromosomen auch als Hinweis auf Rekombination in Folge von intergenerischer meiotischer Chromosomenpaarung oder auf eine extern induzierte (z. B. durch Gewebekultur, Kallusphase, Temperatur) intergenerische Translokation gewertet werden. Umfangreiche SSR-Markeranalysen in Zusammenarbeit mit der Saaten-Union Resistenzlabor GmbH (Leopoldshöhe) gaben ebenfalls starke Hinweise auf Rekombinationsereignisse zwischen dem Rapschromosom und Chromosomen des Donors *D. eruroides* (Kapitel 3.5, diskutiert in Kapitel 4.6). Dass die Visualisierung von Rekombinationsereignissen mittels genomischer *in situ*-Hybridisierung prinzipiell möglich ist, zeigte die Arbeit von NIELEN (1999). Ihm gelang es, in Rückkreuzungsnachkommen aus der somatischen Hybridisierung *B. napus* (+) *B. nigra* ein „Zebrachromosom“ mit mehreren, sich abwechselnden Bereichen aus den Elternarten darzustellen. SNOWDON *et al.* (1999) berichten von der Detektion einer Translokation in einem Rückkreuzungsgenotypen aus der Kreuzung *B. napus* x *Raphanus sativus*.

Es ist schwer, eine der angeführten Varianten zu favorisieren, insbesondere, weil bei der Intensität und der Größe der dargestellten GISH-Signale immer auch die Belichtungszeit beim Erstellen der Fotos und somit der subjektive Faktor bei der Interpretation der Bilder eine Rolle spielen.

#### **4.5 Übertragung auf den Raps und Ausprägung der Resistenz aus *D. eruroides***

##### **4.5.1 Kreuzungseffizienz und Fertilität**

Die Originalkreuzung zwischen *B. napus* (Genom AACC) und *D. eruroides* (Genom DeDe) ließ sich - mittels *embryo rescue* - in beide Richtungen (reziprok) vergleichsweise unproblematisch durchführen. Die F<sub>1</sub>-Generationen waren homogen resistent. Alle Nachkommen entsprachen in ihrer Resistenzausprägung dem resistenten Elter (Relativer

Läsionsindex  $RL = 0$ ). Sie zeichneten sich durch  $2n = 26$  Chromosomen aus, was der Addition der haploiden Genome der Elternarten ( $19 + 7$ , Genom ACDe) entspricht. Die  $F_1$ -Pflanzen waren weitgehend steril, und die erste Rückkreuzung erwies sich als schwierig. Trotz Einsatz von *in vitro*-Techniken (*embryo rescue*) lag die Kreuzungseffizienz nur bei knapp 6 % (durchschnittlich 100 Knospen wurden bestäubt, um sechs Genotypen zu erzeugen). Die verminderte Fertilität der  $F_1$ -Hybriden ist durch mangelnde Paarung zwischen Chromosomen der Elterngenome während der Gametogenese zu erklären. Dies bestätigen auch die von CHÈVRE *et al.* (1994a) durchgeführten Meiose-Analysen an  $F_1$ -Hybriden aus der Kreuzung *D. eruroides* x *B. napus*, in denen hauptsächlich Univalente, aber auch Di-, Tri- und Quadrivalente ( $12, 87 \text{ I} + 6,25 \text{ II} + 0,12 \text{ III} + 0,07 \text{ IV}$ ) beobachtet wurden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten GISH-Analysen lassen vermuten, dass die erzeugten  $BC_1$ -Nachkommen größtenteils in Folge der Befruchtung unreduzierter weiblicher Gameten der  $F_1$ -Hybriden oder durch somatische Verdopplung des Genoms vor der Meiose entstanden sind (vgl. auch Übersichtsartikel von VAN TUYL & LIM 2003). So zeichneten sich viele der Nachkommen durch  $2n = 45$  Chromosomen aus, von denen sieben *D. eruroides*-spezifisch waren. Die zur Sterilität führenden Unregelmäßigkeiten in der Meiose konnten dadurch vorübergehend stabilisiert werden. Theoretisch sollten bei den  $BC_1$ -Pflanzen mit  $2n = 45$  (Genom AACCD<sub>e</sub>) die Rapschromosomen während der Meiose normal, d. h. in Form von 19 Bivalenten, paaren und segregieren und die *D. eruroides*-Chromosomen sieben Univalente bilden. Tatsächlich aber beobachteten CHÈVRE *et al.* (1994a) in 32 % der untersuchten Zellen von  $BC_1$ -Nachkommen aus derselben Kreuzung weniger als sieben Univalente, vielmehr wurden in 36 % der Zellen Multivalente gebildet. Dies zeigt, dass eine hohe Affinität zwischen dem *B. napus*- und dem *D. eruroides*-Genom besteht. Intergenomische Chromosomenpaarungen in *Brassica*-Hybriden wurden bereits bei HOWARD (1938) beschrieben. MIZUSHIMA (1980) zeigte anhand interspezifischer Kreuzungen zwischen *D. eruroides* und *B. oleracea*, dass, aufgrund partieller Homöologien, vier der sieben *D. eruroides*-Chromosomen zu allosyndetischen Paarungen mit Chromosomen des C-Genoms befähigt sind. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zwischen dem A- und dem C-Genom sowie Duplikationen einiger Chromosomen sind darüber hinaus auch autosyndetische Paarungen zwischen Chromosomen der beiden Rapsgenome möglich (MIZUSHIMA 1950 und 1972, RÖBBELEN 1960, KAMALA 1976, RENARD & DOSBA 1980, ARMSTRONG & KELLER 1981 und 1982, ATTIA & RÖBBELEN 1986, CHOUDHARY & JOSHI 1999).

Der hohe Grad an Homöologie zwischen den kombinierten Genomen ist, bedingt durch die Bildung von Uni- und Multivalenten in der Metaphase I der Meiose (ESPINASSE *et al.* 1995, CHEN *et al.* 2004), vermutlich der Grund für eine gestörte Gametogenese und die daraus resultierenden Fertilitätsprobleme. Durch meiotische Unregelmäßigkeiten entstehen in den sukzessiven Generationen jeweils Gameten mit variablen Chromosomenzahlen, die zur Bildung aneuploider Nachkommen führen. Diese zeichnen sich – wiederum aufgrund

meiotischer Irregularitäten – teilweise durch eine geringere Fertilität aus (PAGLIARINI 2000). Erfahrungsgemäß stabilisiert sich das meiotische Paarungsverhalten der Chromosomen schon nach wenigen Rückkreuzungen, abhängig von der Abnahme der Additionschromosomen aus der Donorart. Bei Hybriden aus *B. napus* und *D. erucoides* erzeugten CHÈVRE *et al.* (1994a) nach drei Rückkreuzungen und anschließender Selbstung monosome Additionslinien. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine weitgehende Reduktion von Donorchromatin nach nur wenigen Rückkreuzungen möglich ist. Jedoch wurden die Rückkreuzungseltern hier lediglich nach Chromosomenzahlen ausgewählt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hingegen auf Resistenz gegen *Alternaria* selektiert. Bereits in der BC<sub>2</sub>-Generation wurden auch hier Pflanzen mit 39 Chromosomen beobachtet, die allerdings keine Resistenz mehr gegen *Alternaria* zeigten. Es ist wahrscheinlich, dass der resistenzvermittelnde DNA-Abschnitt auf einem der zum Rapsgenom homöologen Chromosomen liegt, die an der Bildung von Multivalenten beteiligt sind. Dies würde erklären, warum resistente Pflanzen, auch in den zuletzt erstellten Generationen, noch einen hohen Anteil an Donorchromatin (jeweils mindestens drei GISH-Signale) aufwiesen. Ein hoher Grad an Homologie zwischen den Ausgangsgenomen und die Bildung von Multivalenten fördern aber auch Introgressionen, da diese eine gute Voraussetzung für Rekombinationsereignisse zwischen Chromosomen von Raps und der Donorart sind (CHÈVRE *et al.* 1994a). Eine stabile Integration des resistenzvermittelnden DNA-Abschnitts aus der Donorart in das *B. napus*-Genom sollte demnach begünstigt werden, wenn dieser auf einem der homöologen Chromosomen lokalisiert ist (siehe dazu auch Kapitel 4.6).

In allen Generationen der *D. erucoides*-Kreuzungsgruppe war die Fertilität gering und der Einsatz der *embryo rescue*-Technik notwendig. Viele resistente Genotypen aus verschiedenen Generationen ließen sich weder rückkreuzen noch selbst, was auf Griffeldeformationen, Entwicklungsstörungen im Bereich der Blüte oder vollständigem Ausbleiben der Infloreszenz beruhte. In der Regel war der Samenansatz nach Fremdbefruchtung (Rückkreuzung) besser als nach Selbstung (Knospenbestäubung). In den Tabellen 4.1 und 4.2 sind alle erstellten Generationen vergleichend dargestellt. Erwartungsgemäß nahm die Kreuzungseffizienz von Rückkreuzung zu Rückkreuzung, mit Abnahme der Extrachromosomen aus der Donorart, zu (von 6 % in der BC<sub>1</sub> bis auf 34 % in der BC<sub>3</sub>). Die durchgeführten Selbstungen waren im Schnitt weniger effizient.

Im Gegensatz zu Tieren sind Pflanzen, insbesondere polyploide Arten wie Raps, in der Lage, Additions- oder Substitutionschromosomen ohne Fertilitätseinbußen zu tolerieren, und erfahrungsgemäß sollte die Fertilität interspezifischer Hybriden bereits nach wenigen Rückkreuzungen mit dem rekurrenten Elter wiederhergestellt sein. Trotzdem war, auch in den zuletzt erstellten Generationen (BC<sub>3</sub>, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>xC), der Samenansatz nach Selbstung (Knospenbestäubung) noch relativ gering: Von insgesamt 1446 Genotypen waren 197 resistent, aber nur drei dieser Pflanzen waren vergleichsweise fertil.

Interessanterweise resultierten alle drei Genotypen aus der Originalkreuzung mit *B. napus* als Mutterpflanze und zeichneten sich somit durch das Cytoplasma des Rapses aus. Der fertilsten Genotyp - [(CxDe9)xC1b][S]7xC11 mit  $2n = 44$  Chromosomen und drei GISH-Fluoreszenzsignalen - zeichnete sich durch einen durchschnittlichen Selbstungsansatz von sechs Samen pro Schote aus. Die Keimungsraten der Samen der fertileren Nachkommen (ohne Einsatz von *embryo rescue*) lagen bei durchschnittlich 30 %. Im Vergleich dazu bildet Raps 20-30 Samen pro Schote mit einer Keimungsrate von 99 %. Möglicherweise spielen hier nicht nur chromosomale Inbalancen (Bildung von Uni- bzw. Multivalenten) eine Rolle. Vielmehr können auch nucleo-cytoplasmatische Interaktionen wie eine durch *D. eruroides* möglicherweise induzierbare cytoplasmatisch männliche Sterilität (RINGDAHL *et al.* 1987, DELOURME *et al.* 1989, MALIK *et al.* 1999), Geninteraktionen zwischen den Genomen (RIESEBERG *et al.* 1996) oder asynchrone Zellteilungen (JOSHI & CHOUDHARY 1999) zu Sterilität führen. Evidenzen für Meiose-Unregelmäßigkeiten in den späteren Generationen stellen zumindest die Chromosomenzahlen, die zwischen  $2n = 40$  und  $2n = 61$  variierten, und die Spaltungsverhältnisse resistenter zu anfälliger Nachkommen dar. So zeigt die Variation in den Chromosomenzahlen in den jeweiligen Generationen ausgewählter resistenter Kreuzungslinien (Abb. 3.32), dass in allen Generationen jeweils Gameten mit unterschiedlichen Chromosomensätzen befruchtet worden sein müssen. Auch die Spaltungsverhältnisse von resistenten zu anfälligen Genotypen nach Selbstung bzw. Rückkreuzung (Tab. 4.1 und 4.2) entsprachen – bedingt durch Aneuploidien – erwartungsgemäß nicht den klassischen Aufspaltungen monogen-dominanter Erbgänge.

**Tab. 4.1:** Vergleich aller erstellten Rückkreuzungsnachkommen der *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe (R = resistent, S = anfällig).

	Kreuzungseffizienz ( <i>embryo rescue</i> )	2n resistenter Pflanzen	Resistente Genotypen (R:S)
<b>BC<sub>1</sub></b>	<b>6 %</b> 1298 Blüten 58 Keimlinge + 21 Kallusse	29-69 (45)	49 % <b>(1:1)</b>
<b>BC<sub>2</sub></b>	<b>22 %</b> 1402 Blüten 211 Keimlinge + 105 Kallusse	38-60 (45)	8 % <b>(1:12)</b>
<b>BC<sub>3</sub></b>	<b>34 %</b> 1195 Blüten 316 Keimlinge + 90 Kallusse	40-50 (45)	7 % <b>(1:14)</b>
<b>BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>xC</b>	<b>18 %</b> 569 Blüten 69 Keimlinge + 35 Kallusse	42-61 (45)	15 % <b>(1:6)</b>

**Tab. 4.2:** Vergleich aller erstellten Selbstungsnachkommen der *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe (R = resistent, S = anfällig).

	<b>Selbstungseffizienz (<i>embryo rescue</i>)</b>	<b>2n resistenter Pflanzen</b>	<b>Resistente Genotypen (R:S)</b>
<b>BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub></b>	<b>14 %</b> 305 Schoten 30 Keimlinge + 12 Kallusse	43-56 (45)	24 % <b>(1:3)</b>
<b>BC<sub>1</sub>S<sub>2</sub></b>	<b>5 %</b> 686 Schoten 19 Keimlinge + 17 Kallusse	50	30 % <b>(1:2)</b>
<b>BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub></b>	<b>6 %</b> 1556 Schoten 80 Keimlinge + 29 Kallusse	40-45	17 % <b>(1:5)</b>

#### 4.5.2 Resistenzausprägung

In allen Generationen der *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe kamen Genotypen vor, deren Resistenzausprägung der des resistenten Elters entsprach (RL = 0). Der Anteil resistenter Pflanzen nahm bei den sukzessiven Rückkreuzungen von Generation zu Generation ab. Da durch die Rückkreuzungen der Anteil an Donorchromatin reduziert wird, besteht bei jeder Rückkreuzung auch das Risiko, die Resistenz zu verlieren. Bei den Selbstungen war dies nicht zwangsläufig der Fall, was die Zahlen in den Tabellen 4.1 und 4.2 zeigen.

Die Gefahr des Verlustes der Resistenz sowie die geringe Ausbeute resistenter Pflanzen mit ausreichend guter Fertilität erfordern das Arbeiten mit einer großen Anzahl von Nachkommen. So wurden in der *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe für jede Rückkreuzungsgeneration durchschnittlich 1133 Blüten bestäubt (Tab. 4.1).

#### 4.5.3 Chromosomenzahlen

Im Gegensatz zu den anfälligen Pflanzen der *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe, die teilweise bereits nach der zweiten Rückkreuzung den Rapskaryotyp mit einem Additionschromosom aus der Donorart aufwiesen, war der Anteil an Donorchromatin bei den resistenten Genotypen schwer zu reduzieren.

Auch in den zuletzt erstellten Selbstungs- und Rückkreuzungsgenerationen (BC<sub>3</sub>, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>xC) wiesen resistente Genotypen noch einen relativ hohen Anteil an Donorchromatin auf (jeweils mindestens drei GISH-Fluoreszenzsignale, bei Chromosomenzahlen von 2n = 40-61, Tab. 4.1 und 4.2). Da auch Selbstungen in das Kreuzungsprogramm eingeschlossen waren und – aufgrund der Chromosomengröße und

der Dominanz metazentrischer Chromosomen – eine morphologische Unterscheidung zwischen homologen und nicht-homologen Chromosomen von *D. eruroides* mittels GISH nicht möglich ist, konnte nicht festgestellt werden, ob es sich bei den Additionschromosomen um drei verschiedene oder um homologe Chromosomen der Donorart handelte. Auch die Rapschromosomen sind aufgrund der ähnlichen Idiogramme schwer voneinander zu unterscheiden (OLIN-FATIH & HENEEN 1992). Deshalb war mittels klassischer Chromosomenpräparate und der genomischen *in situ*-Hybridisierung nicht festzustellen, welche der Rapschromosomen und welche Donorchromosomen jeweils in den Nachkommen vertreten waren. Möglicherweise co-segregieren mehrere *D. eruroides*-Chromosomen, darunter auch das resistenztragende, aufgrund der in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Homöologien zwischen den Kreuzungspartnern und innerhalb der Rapsgenome, die zur Bildung von Multivalenten beitragen.

Normalerweise wird in allopolyploiden Spezies wie Raps die homöologe Paarung zwischen den Genomen unterdrückt, wofür ATTIA & RÖBBELEN (1986) und SHARPE *et al.* (1995) eine genetische Kontrolle postulierten. Möglicherweise ist diese Kontrolle in interspezifischen und intergenerischen Hybriden gestört oder aufgehoben.

#### 4.6 Selektion resistenter Pflanzen mittels molekularer Marker

Um bei zukünftigen Rückkreuzungs- und Selbstungsnachkommenschaften die Anwendung des sowohl zeit- als auch platzaufwendigen Resistenztests zu vermeiden, wurde in Zusammenarbeit mit der Saaten-Union Resistenzlabor GmbH (Leopoldshöhe) die Basis für eine markergestützte Selektion resistenter Pflanzen mittels SSR-Marker geschaffen. SSRs (= *simple sequence repeats* = Mikrosatelliten) stellen aus kurzen (1-6 bp) Tandemwiederholungen bestehende DNA-Abschnitte dar. Mikrosatelliten tragen maßgeblich zur Variabilität in Größe und Komplexität pflanzlicher Genome bei (HESLOP-HARRISON 1996 und 2000). Die flankierende Region ist in der Regel konserviert, so dass PCR-Primer entwickelt werden können, die SSRs spezifisch amplifizieren.

Die schnelle Evolution repetitiver DNA führt in verschiedenen Arten oder Individuen zu charakteristischen Unterschieden in der Sequenz und Anzahl der *repeats* (SCHMIDT & HESLOP-HARRISON 1998), was Mikrosatelliten zu geeigneten Markern für die Erstellung genetischer Karten macht. Bei *B. napus* treten SSRs ca. alle 29 kb auf. Zahlreiche SSR-Marker wurden im Raps entwickelt, aber nur wenige wurden bisher veröffentlicht (cf. <http://www.brassica.info/ssr/SSRinfo.htm>). Größtenteils befinden sie sich in privatwirtschaftlichem Besitz und sind nicht öffentlich zugänglich. Aus diesem Grund können die Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten SSR-Marker nicht angegeben werden.

Voraussetzung für die Identifizierung von Markern, die mit der Ausprägung der Resistenz korrelieren, war, dass die im Raps isolierten SSR-Marker auch in der Wildart *D. eruroides* funktional sind, insbesondere weil in der relativ frühen Stufe des Rückkreuzungsprogramms (für die *bulked segregant analysis* wurden BC<sub>2</sub>- bzw. BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>-Nachkommen verwendet) zu erwarten war, dass der Umfang der Introgression noch groß, vermutlich in Form vollständiger Chromosomen, war. Dass die Funktionalität prinzipiell auch in verwandten *Brassicaceae* gegeben ist, zeigten LOWE *et al.* (2002 und 2003). In der Regel ist sie abhängig von der genetischen Distanz der Ausgangsarten und den verwendeten PCR-Bedingungen (PLIESKE & STRUSS 2001). Für *D. eruroides* und die Nachkommen aus der Kreuzung mit *B. napus* wurden Resistenzmarker isoliert, die im für Raps standardmäßig verwendeten PCR-Protokoll (*touch down protocol*) ohne weitere Optimierung funktional waren.

Wie bereits erwähnt besteht zwischen *D. eruroides* und dem C-Genom aus *B. napus* ein hoher Grad an Homologie. Es war daher zu hoffen, dass der resistenzvermittelnde DNA-Abschnitt aus der Donorart auf einem der vier zur Allosyndese mit dem C-Genom befähigten Chromosomen (MIZUSHIMA 1980) lokalisiert ist. Aus diesem Grund wurden zunächst *B. oleracea* (C-Genom)-spezifische SSR-Marker für die Analysen ausgewählt. Tatsächlich konnte der resistenzvermittelnde DNA-Abschnitt aus *D. eruroides* auf den - auf die Rapskarte bezogen - unteren Arm des *B. napus*-Chromosoms N19 (entspricht dem *B. oleracea*-Chromosom O9) bzw. auf ein *D. eruroides*-Chromosom mit Homologien zum Chromosom N19 kartiert werden.

Die Erfassung informativer, d. h. mit der Ausprägung der Resistenz korrelierender Marker, erfolgte zunächst an DNA-Pools resistenter und anfälliger BC<sub>2</sub>- und BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>-Genotypen aus verschiedenen Kreuzungslinien (*bulked segregant analysis*, MICHELMORE *et al.* 1991). Bei der Einteilung der Pflanzen in die Pools wurden strenge Kriterien angewendet: In den resistenten Pool wurden ausschließlich Pflanzen einbezogen, die auch nach 14 Tagen Inkubation in der Feuchtkammer keine Krankheitssymptome ausbildeten (RL = 0). Für den anfälligen Pool wurde nur DNA von Pflanzen mit Symptomen, die denen der anfälligen Kontrolle (*B. napus* cv. ‚Ceres‘) entsprachen, verwendet. Um umweltbedingte physiologische Effekte weitestgehend ausschließen zu können, wurden außerdem nur Genotypen verwendet, die in mindestens drei unabhängigen Wiederholungen mit eindeutig reproduzierbaren Ergebnissen auf Resistenz getestet worden waren.

Polymorphe (d. h. Unterschiede innerhalb der DNA-Pools anzeigende) Marker wurden auf Einzelpflanzenebene getestet und putativ Resistenz-gekoppelte Marker anschließend an insgesamt 63 in Bezug auf die Resistenz spaltenden Rückkreuzungs- und Selbstungsnachkommen einer BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>- sowie zweier BC<sub>2</sub>- Pflanzen überprüft.

Sowohl unter den BC<sub>2</sub>- und BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>-Genotypen als auch unter den BC<sub>3</sub>-, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>xC-, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>- und BC<sub>1</sub>S<sub>2</sub>-Genotypen wurden jeweils anfällig getestete Pflanzen, die die Resistenz-gekoppelte PCR-Bande zeigten, sowie resistent bonitierte Pflanzen, die die Resistenz-

gekoppelte PCR-Bande nicht zeigten, beobachtet. Diese Diskrepanz zwischen Resistenzbonitur und Markeranalyse (im Folgenden als „Rekombination“ bezeichnet) zeigte, dass die ermittelten Marker noch relativ weit weg vom Resistenzloкус liegen.

Die am engsten mit der Ausprägung der Resistenz gekoppelten Marker (Marker HMR 878, HMR 880, HMR 744 und HMR 1003) zeigten noch eine Rekombinationsfrequenz von 13 %, wobei die Mehrzahl der „rekombinanten“ Pflanzen laut Resistenzbonitur anfällig waren, aber dennoch in den Markeranalysen die Resistenz-gekoppelte PCR-Bande aufwiesen. Es wäre denkbar, dass in diesen Pflanzen das resistenzvermittelnde Gen aus *D. eruroides* vorhanden, aber aufgrund von Positionseffekten oder *gene silencing* „maskiert“ bzw. inaktiviert war. Dass aber vereinzelt auch resistent bonitierte Pflanzen, in denen das Resistenz-spezifische PCR-Produkt nicht amplifiziert wurde, auftraten, kann als Hinweis auf Rekombination zwischen dem Rapsgenom und Chromosomen der Donorart gewertet werden. Ebenfalls ein Hinweis auf die Integration von Donor-DNA in ein Rapschromosom stellt die innerhalb verschiedener „rekombinanter“ Nachkommen beobachtete Variation in der Größe des putativ intergrierten *Diplotaxis*-Fragments dar. In zwei BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>xC-Genotypen - {(CxDe9)xC1b[S]7}xC36K4 und {(CxDe9)xC1b[S]7}xC47b - wurde ein kleineres Fragment beobachtet als bei anderen „rekombinanten“ Pflanzen der vorangegangenen Generation (siehe hierzu auch Tab. A2 im Anhang). Aus züchterischer Sicht sind die putativ rekombinanten Pflanzen besonders wertvoll, da hier ein DNA-Segment, das die Resistenz trägt, möglicherweise bereits fest in ein Rapschromosom integriert wurde. Erwünscht für die praktische Züchtung ist die Introgression eines kleinstmöglichen *D. eruroides*-Segments. Ob es sich bei dem detektierten *Diplotaxis*-Fragment um einen fest in das Rapsgenom integrierten DNA-Abschnitt handelt, der durch meiotische Rekombination weiter reduziert wurde, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Denkbar wäre auch ein extrachromosomales Fragment aus der Donorart, von dem ein Stück „abgebrochen“ wäre. Von einem extrachromosomalen, meiotisch und mitotisch weitergegebenen chromosomalen Fragment wurde in interspezifischen Kreuzungen aus der Zuckerrübe *Beta vulgaris* und der Wildart *B. procumbens* berichtet (DE JONG *et al.* 1986, BRANDES *et al.* 1987).

Anhand der Chromosomendarstellung durch genomische *in situ*-Hybridisierung konnte keine der beiden Hypothesen favorisiert werden. Hinweise auf integrierte Donorfragmente gab es zwar, aber aus den in Kapitel 4.4 angeführten Gründen konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob Rekombination stattgefunden hat, oder ob die nicht FITC-markierten Bereiche auf einen Mangel an heterochromatischen Sequenzen zurückzuführen waren.

Die Pflanzen, die die kleineren DNA-Fragmente aus der Donorart zeigten, sollen schwerpunktmäßig für weitere Rückkreuzungen eingesetzt werden. Mit Hilfe der identifizierten Resistenz-gekoppelten SSR-Marker sollte in den nächsten Generationen bereits eine markergestützte Selektion resistenter Pflanze möglich sein.

#### 4.7 Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* als alternativer Resistenzdonor

Im Jahr 2000 wurde die Sequenzierung des Genoms der Wildcrucifere *Arabidopsis thaliana* abgeschlossen. Alle bisher untersuchten *Arabidopsis*-Ökotypen sind resistent gegen *A. brassicicola* (VAN WEES *et al.* 2003, vgl. Kapitel 1.4), und das *Arabidopsis-Alternaria*-Pathosystem wird oft als Modell für die Interaktion zwischen Pflanze und pilzlichem Erreger herangezogen. Durch Mutationsanalysen wurden zahlreiche Gene identifiziert, die bei der Abwehrreaktion gegenüber dem Pathogen eine Rolle spielen (Kapitel 1.4). Das Genom von *Arabidopsis* wird auf ca. 26.000 Gene geschätzt. Alleine 2.055 davon sind in der pflanzlichen Pathogenabwehr involviert (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000), was die Komplexität der Abwehrreaktion deutlich macht.

Die Grundlagenforschung an *A. thaliana* ist auch für die praktische Züchtung von großem Interesse. Raps ist eine der nächsten verwandten Kulturpflanzen von *Arabidopsis*.

Es wird geschätzt, dass sich die Abstammungslinie von *Brassica* und *Arabidopsis* vor 12,2-19,2 Mio. Jahren verzweigt hat (CAVELL *et al.* 1998). Zwischen den Genomen bestehen ausgedehnte Homologien (die Gene von *Brassica*-Spezies sind zu ca. 90 % identisch mit denen von *Arabidopsis*) und Syntenien (SADOWSKI *et al.* 1996, OSBORN *et al.* 1997, SADOWSKI & QUIROS 1998, CONNER *et al.* 1998). Allerdings zeigen bereits die diploiden *Brassica*-Genome grob drei Kopien jedes *Arabidopsis*-Segments (BANCROFT 2001). Auf die Verdreifachung sind wahrscheinlich weitreichende Chromosomenreorganisationen (Deletionen, Translokationen) und Veränderungen in der Genomstruktur gefolgt (LAGERCRANTZ 1998).

Aufgrund des hohen Homologiegrades ermöglichen es die in *Arabidopsis* gewonnenen Erkenntnisse über den Mechanismus der Resistenz gegen *A. brassicicola*, orthologe Gene in verwandten Spezies zu identifizieren. Die Studien an *Arabidopsis* erlauben ebenfalls die Abschätzung des Nutzens der experimentellen Expressionsänderung regulatorischer Proteine, um die Krankheitsresistenz in Kulturpflanzen zu erhöhen. Raps ist eine der Transformation sehr gut zugängliche Kulturpflanze (RADCHUK *et al.* 2000, WANG *et al.* 2003, CARDOZA & STEWART 2003, KHAN *et al.* 2003, JONOUBI *et al.* 2005). Die meisten der in *A. thaliana* identifizierten Gene, die in der *Alternaria*-Abwehrreaktion involviert sind, sind an der Biosynthese des Phytoalexins Camalexin oder an Signaltransduktionswegen beteiligt, aber auch Chitinasen wurden als resistenzauslösende Faktoren genannt (Kapitel 1.4). Es ist fraglich, ob die Überexpression oder der Transfer solcher in *Arabidopsis* identifizierten Gene in *B. napus* zu einer befriedigenden Resistenzausprägung führen. Für einen Gentransfer würde sich ein klassisches, für eine Rezeptor-Elizitor-Bindung erforderliches R-Gen eignen. Bisher wurde jedoch kein *Alternaria*-spezifisches R-Gen bei *Arabidopsis* identifiziert.

Der Versuch der Übertragung einer Resistenz gegen *Leptosphaeria maculans* aus *A. thaliana* in *B. napus* wurde 2002 durch BOHMAN *et al.* unternommen. Wie die Resistenz gegen *A. brassicicola* basiert auch die Resistenz gegen *L. maculans* bei *Arabidopsis* auf dem Phytoalexin Camalexin. Die Resistenz konnte durch Protoplastenfusion auf *B. napus* übertragen werden. Analysen an BC<sub>1</sub>S<sub>4</sub>-Nachkommen zeigten, dass das *Arabidopsis*-Chromosom 3 mit der Resistenz co-segregierte. Auf Chromosom 3 liegt unter anderem auch das PAD3-Gen. Interessanterweise wurde in den Hybriden dennoch kein Camalexin produziert, was wahrscheinlich auf das Fehlen von Substrat für den Camalexin-Syntheseweg im *B. napus*-Hintergrund zurückzuführen war. Die Arbeiten von BOHMAN *et al.* (2002) zeigten außerdem, dass zwar einzelne Chromosomen aus *A. thaliana* auf *B. napus* übertragen werden können, aber keine Rekombination zwischen den Genomen stattgefunden hat. Ein stabiler Einbau der resistenzvermittelnden DNA-Abschnitte war demnach - wahrscheinlich aufgrund mangelnder Homöologien zwischen den relevanten Chromosomen - nicht möglich.

Bei *Arabidopsis* ist offensichtlich nicht nur Camalexin für die Resistenz gegenüber *L. maculans* erforderlich; vielmehr sind hier verschiedene Resistenzmechanismen beteiligt (BOHMAN *et al.* 2004). Auch ein transgener Ansatz zur Übertragung der Resistenz aus *Arabidopsis* in *B. napus* dürfte sich daher schwierig gestalten, da im *Arabidopsis-Alternaria*-Pathosystem scheinbar mehrere, noch nicht vollständig charakterisierte Gene an der Abwehrreaktion beteiligt sind. Einfacher zu übertragen sind monogen vererbte Resistenzen wie die in *D. erucoides* identifizierte.

Im Fall von *Alternaria* lassen sich also die bei *Arabidopsis* gewonnenen Erkenntnisse über den Mechanismus der Resistenz gegen *Alternaria* nicht ohne Weiteres auf die wesentlich komplexere Kulturart Raps übertragen. Bei der Wildart *D. erucoides* basiert die Resistenz nicht auf der Synthese von Camalexin. Die dominant vererbte Resistenz deutet auf die Präsenz eines R-Gens hin. Denkbar wären aber auch Enzyme, die bei der Detoxifizierung wirtsspezifischer *Alternaria*-Toxine eine Rolle spielen.

#### 4.8 Übertragbarkeit von Resistenzen, die auf R-Genen basieren

Eine elegante Art, Resistenzen aus einer Donorart in eine andere Pflanze zu übertragen, stellt der Transfer eines spezifischen R-Gens dar. Die monogen-dominant vererbte Resistenz innerhalb der Donorart *D. erucoides* könnte auf einem *Alternaria*-spezifischen R-Gen basieren, das Resistenz gegen verschiedene Isolate des Erregers verleiht (Kapitel 3.3.4.1). Die *Alternaria*-Resistenz aus *D. erucoides* erwies sich als wirksam gegen alle getesteten *A. brassicae*- und *A. brassicicola*-Isolate. Dass R-Gene auch Breitspektrum-Resistenz (gegen viele Rassen eines Pathogens) vermitteln können, zeigen die Beispiele des RPW8-Gens, das alle *Arabidopsis*-infizierenden Mehltau-Isolate erkennt (XIAO *et al.*

2001), und des RPG1-Gens, das Getreiderost bei Gerste kontrolliert (BRUEGGEMANN *et al.* 2002). Möglicherweise sind diese Gene nicht direkt an der Pathogenerkennung beteiligt, sondern agieren weiter *downstream* in der Resistenzantwort. Da ein einziges R-Gen komplette Resistenz gegen einen oder mehrere Stämme eines bestimmten Pathogens bedingen kann, wenn es in eine verwandte Art übertragen wird, sind R-Gene seit Jahrzehnten Ziele für klassische Züchtungsprogramme (PINK 2002). Auch Berichte darüber, dass die Überexpression von R-Genen zu erhöhter Resistenz führte, liegen vor (OLDROYD & STASKAWICZ 1998, TANG *et al.* 1999, STOKES *et al.* 2002).

Nach dem allgemein angenommenen Modell der Rassenspezifität (VANDERPLANK 1968) sind monogen vererbte (auf R-Genen basierende) Resistenzen vertikal, d. h. wirksam gegen einen bestimmten Pathotypen eines Erregers. Mit der Pflanze co-evoluierende Pathogene können die Resistenz durchbrechen, diese wird deshalb als wenig dauerhaft eingestuft (PINK 2002). Ein aktuelles praktisches Beispiel für das Durchbrechen einer monogenen Resistenz gegen *L. maculans* aus *B. rapa* in australischen Sommerrapsorten beschreiben LI *et al.* (2003). Dass R-Gen-basierte Resistenzen dennoch stabil sein können, zeigen die Beispiele des BS2-Gens aus Paprika, das für ein NB-LRR-Protein kodiert und Resistenz gegen den bakteriellen Erreger *Xanthomonas campestris* verleiht (TAI *et al.* 1999), und das aus Gerste klonierte RPG1-Gen (BRUEGGEMAN *et al.* 2002, HORVATH *et al.* 2003), das eine bereits seit Jahrzehnten dauerhafte Resistenz gegen Getreiderost (*Puccinia graminis*) verleiht. Zahlreiche andere Beispiele für dauerhafte Resistenzen wurden bereits bei JOHNSON (1984) zusammengefasst.

Im Fall von *D. erucoides* konnte gezeigt werden, dass die Resistenz monogen vererbt wird und sich als wirksam gegen alle untersuchten *Alternaria*-Stämme erwies. Dies lässt auf Dauerhaftigkeit der Resistenz im Feld hoffen. Ob bei *D. erucoides* eine Art horizontaler Resistenz vorliegt, muss durch weitere Analysen mit anderen Isolaten geklärt werden. PLÜMPER (1995) beobachtete an verschiedenen *Brassicaceae*-Arten, dass es innerhalb von *A. brassicae* und *A. brassicicola* keine Variation in Pathogenität oder Virulenz gab. Differentielle Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen traten bei keinem der untersuchten Isolate auf.

Es ist denkbar, dass die Abwehrreaktion bei *D. erucoides* auf der Detoxifizierung wirtsspezifischer Toxine des Erregers beruht. Eine Antwort auf die Frage nach der Dauerhaftigkeit der *D. erucoides*-vermittelten Resistenz kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben werden. Feldversuche in Gegenden mit für den Pilz günstigen Bedingungen, wie sie z. B. bei BRAZAUSKIENE & PETRAITIENE (2004) beschrieben sind, können diese Frage jedoch klären.

Teilweise sind die in einer Art erzielten Erkenntnisse, insbesondere über Signaltransduktionskomponenten *downstream* der R-Gene, auch auf weiter entfernte Arten übertragbar: Die in der R-Gen-vermittelten Resistenz involvierten Regulator-Proteine RAR1

und SGT1 wurden beispielsweise in *Arabidopsis*, Tabak und Gerste (AZEVEDO *et al.* 2002, AUSTIN *et al.* 2002, LIU *et al.* 2002, MUSKETT *et al.* 2002, TÖR *et al.* 2002) nachgewiesen.

Dennoch ist es fraglich, ob sich die in einer Art identifizierten R-Gene auch als funktional in anderen Spezies erweisen. Dass dies nicht immer der Fall ist, zeigten die Arbeiten von TAI *et al.* (1999). Die Funktionalität ist wahrscheinlich abhängig von der Fähigkeit des R-Gens, mit Komponenten der Signaltransduktion von heterologen Wirten zu interagieren (VAN DER BIEZEN & JONES 1998, ELLIS *et al.* 2000).

Um letztendlich Aufschluss über die Natur des resistenzvermittelnden Gens in *D. eruroides* zu erhalten, könnte das verantwortliche Gen unter Einbeziehung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten SSR-Marker in der Donorart identifiziert und kloniert werden (*map based cloning*). Darüber hinaus wäre mit dem isolierten Gen auch die Möglichkeit eines transgenen Ansatzes zur Übertragung der Resistenz gegeben.

#### **4.9 Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse und Ausblick**

In den zuletzt erstellten Generationen der *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe (BC<sub>3</sub>, BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>xC) wurden drei resistente Pflanzen mit weitgehend rapsähnlichem Habitus und vergleichsweise guter Fertilität identifiziert. Die Chromosomenzahlen der resistenten und fertileren Pflanzen lagen bei  $2n = 40-44$  (Abb. 3.32), wobei jeweils mindestens drei donorspezifische GISH-Fluoreszenzsignale gezeigt wurden. Mittels SSR-Marker wurden darüber hinaus zwei putativ rekombinante Pflanzen identifiziert, die vergleichsweise kleine resistenzvermittelnde DNA-Abschnitte aus der Donorart zeigten. Eine dieser Pflanzen zeichnete sich durch eine für Rückkreuzungen ausreichende Fertilität aus. Die vier oben genannten Genotypen stellen die Basis für zukünftige Rückkreuzungen dar, durch die die Chromosomenzahlen und der Anteil an Donorchromatin weiterhin reduziert werden sollen. Für die Rückkreuzungen soll neben der Ausgangsrapsorte ‚Ceres‘ auch ein Resynthese-Raps zum Einsatz kommen. Resynthese-Raps wird durch Kreuzung der ursprünglichen Eltern *B. rapa* (Genom AA) und *B. oleracea* (Genom CC) und anschließender Verdopplung des Chromosomensatzes hergestellt. Rückkreuzungen mit solch einem chromosomal und genetisch noch wenig balancierten Raps (PIKAARD 2001) sollten zu mehr allosyndetischen Paarungen zwischen dem Raps- und dem Donorgenom, aber auch innerhalb des A- und des C-Genoms von Raps führen. Es wird erhofft, dass auf diese Weise die Rekombinationsfrequenz zwischen den Ausgangsarten erhöht und die - möglicherweise in Form von Multivalenten co-segregierenden - Donorchromosomen getrennt werden.

Bei der Erstellung der nächsten Generationen sollte auf den Einsatz von *in vitro*-Kulturtechniken bereits verzichtet werden können. Auch der Resistenztest kann durch die

im Rahmen dieser Arbeit etablierte markergestützte Selektion resistenter Pflanzen weitgehend ersetzt werden.

Es ist zu erwarten, dass nach wenigen Rückkreuzungen und Selbstungen der Anteil an Donorchromatin so weit reduziert und die Fertilität wiederhergestellt sein wird, dass das Material in Form von mono- oder disomen Additionslinien bzw. mit einer stabilen Introgression an einen Zuchtbetrieb abgegeben werden kann.

Durch die vorliegende Arbeit wurde demnach, in Form eines *pre-breeding*-Programms, eine monogen-dominant vererbte Resistenz in das *B. napus*-Genom transferiert und das Ausgangsmaterial für die Züchtung einer Rapsorte mit einer starken Resistenzausprägung gegen *Alternaria* und Potential für eine gute Feldresistenz geschaffen.

Neben Raps befallen die *Alternaria*-Erreger praktisch jede wichtige Art der Gattung *Brassica* (NEERGAARD 1945, MAUDE & HUMPHERSON-JONES 1980, DILLARD *et al.* 1998, PATTANAMAHAKUL & STRANGE 1999, WESTMAN *et al.* 1999, OTANI *et al.* 2001). Wirtschaftliche Bedeutung hat die Krankheit insbesondere bei Gemüsearten der Familie *Brassicaceae*. Hier verursacht *Alternaria* spp. Flecken, die an Frisch- und Lagergemüse zu erheblichen Beeinträchtigungen des Marktwertes und bei Auftreten an Schoten im Samenbau zu erheblichen Ertragsverlusten führen können. Da eine erfolgreiche Bekämpfung dieser Schaderreger mit Pflanzenschutzmitteln, insbesondere bei Kopfkohl (*B. oleracea*), nicht möglich ist, besteht auch hier das langfristige Ziel der Etablierung einer dauerhaften Resistenz (SCHOLZE *et al.* 2003). Es ist davon auszugehen, dass die Resistenz aus *D. erucoides* leicht auch für den Transfer in andere verwandte Arten, insbesondere Arten mit dem C-Genom, nutzbar gemacht werden kann.