

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Rapszüchtung gestern und heute - von den Anfängen über „Lembkes Winterraps“ zum 21. Jahrhundert

Raps (*Brassica napus* L. ssp. *napus*), eine Ölsaat der gemäßigten Breiten, gehört zu den weltweit wirtschaftlich bedeutendsten Arten der Familie *Brassicaceae* (Kreuzblütengewächse, Cruciferae; ca. 300 Gattungen und 3000 Arten, GÓMEZ-CAMPO 1999). Er ist amphidiploid (Genom AACC), entstanden aus wahrscheinlich mehreren spontanen Kreuzungen von Vertretern der Verwandtschaft des Kohls, *B. oleracea* L. (Genom CC), und des Rübsens, *B. rapa* L. (= *B. campestris* L.) ssp. *oleifera* (DC.) Metzg. (Genom AA, Abb. 1.9). Sein Ursprung wird in Südeuropa (FRANKE 1989) bzw. West- und Südwest-Europa (VAVILOW 1926: mediterranes Genzentrum) vermutet.

Verglichen mit bereits jahrtausendlang vom Menschen genutzten Pflanzen mit hoher kulturgeschichtlicher Bedeutung wie z. B. dem Weizen (*Triticum aestivum* L.) sind Raps und Rübsen verhältnismäßig junge Nutzpflanzen, wobei der Rübsen die ältere Form ist. Sie sind erst 1833 durch Metzger botanisch sicher unterschieden worden (SCHRÖDER-LEMBKE 1989). Die uneinheitlichen Bezeichnungen in früheren Jahrhunderten erschweren die konkrete Zuordnung (FUCHS 1543, cf. BARANYK & FABRY 1999). Der englische Name *rapeseed* umfaßt auch heute noch diese beiden Arten und *B. juncea* (L.) Czern. (Indischer Senf). Eindeutiger auf Raps verweisen die angelsächsischen Termini *oilseed rape* und *canola*. Bei der Bezeichnung *canola* (ursprünglich abgeleitet von *canadian oil*), in Kanada, den USA und Australien nahezu ausschließlich verwendet, müssen jedoch Einschränkungen gemacht werden. Sie bezieht sich nach der offiziellen Definition lediglich auf eine ursprünglich „aus Raps von kanadischen Pflanzenzüchtern entwickelte“ Pflanze mit hoher Ölqualität (heute 00-Qualität, siehe S. 3): „... an oil that must contain less than 2 % erucic acid, and the solid component of the seed must contain less than 30 micromoles of any one or any mixture of 3-butenyl glucosinolate, 4-pentenyl glucosinolate, 2-hydroxy-3-butenyl glucosinolate, and 2-hydroxy-4-pentenyl glucosinolate per gram of air-dry, oil-free solid“. Als erste *double low*-Sorte, zunächst noch mit etwas höherem Erucasäuregehalt, gilt die kanadische Sorte „Tower“ aus dem Jahre 1974 (CANOLA COUNCIL 2001). Der Umgang mit dem Terminus *canola* ist jedoch auch heute noch keineswegs stringent: So wird der Begriff vielfach für *rapeseed* mit geringem Erucasäuregehalt, z. T. unter Vernachlässigung der Glucosinolate, verwendet (FDA 1988 und CANOLA COUNCIL 2001). Andere Quellen fassen ihn noch weiter: „any *Brassica* plant grown in the United States for the production of an oilseed, the oil of which is used for a food or nonfood use“ (U. S. Code Collection, undatiert). In den letzten Jahren gelang es, auch bei anderen Kultur-Cruciferen wie *B. rapa*, *B. juncea* und *Sinapis alba* L. (Weißer Senf) Genotypen mit *canola*-Qualität zu entwickeln (BROWN *et al.* 1999, RAKOW 2002, RAKOW & RANEY 2003).

Raps und Rübsen liefern in ihren Samen ein seiner Zusammensetzung nach fast identisches Öl (Rüböl), das schon früh zu Beleuchtungszwecken und zur Herstellung von Seifen verwendet wurde. Zunächst wurde Öl aus Samen von Wildformen von *B. rapa* extrahiert; ab dem 13. Jahrhundert wurde Rübsen dann in England im Feldmaßstab angebaut (GUGEL & PETRIE 1992). Die frühesten Belege für den Rapsanbau stammen aus dem Jahre 1366 und betreffen die Niederlande. Von dort aus breitete er sich im 16. und 17. Jahrhundert in das nordwestliche

Deutschland aus (SCHRÖDER-LEMBKE 1989). Im 19. Jahrhundert wurde Raps bereits in weiten Teilen Europas kultiviert (GUGEL & PETRIE 1992).



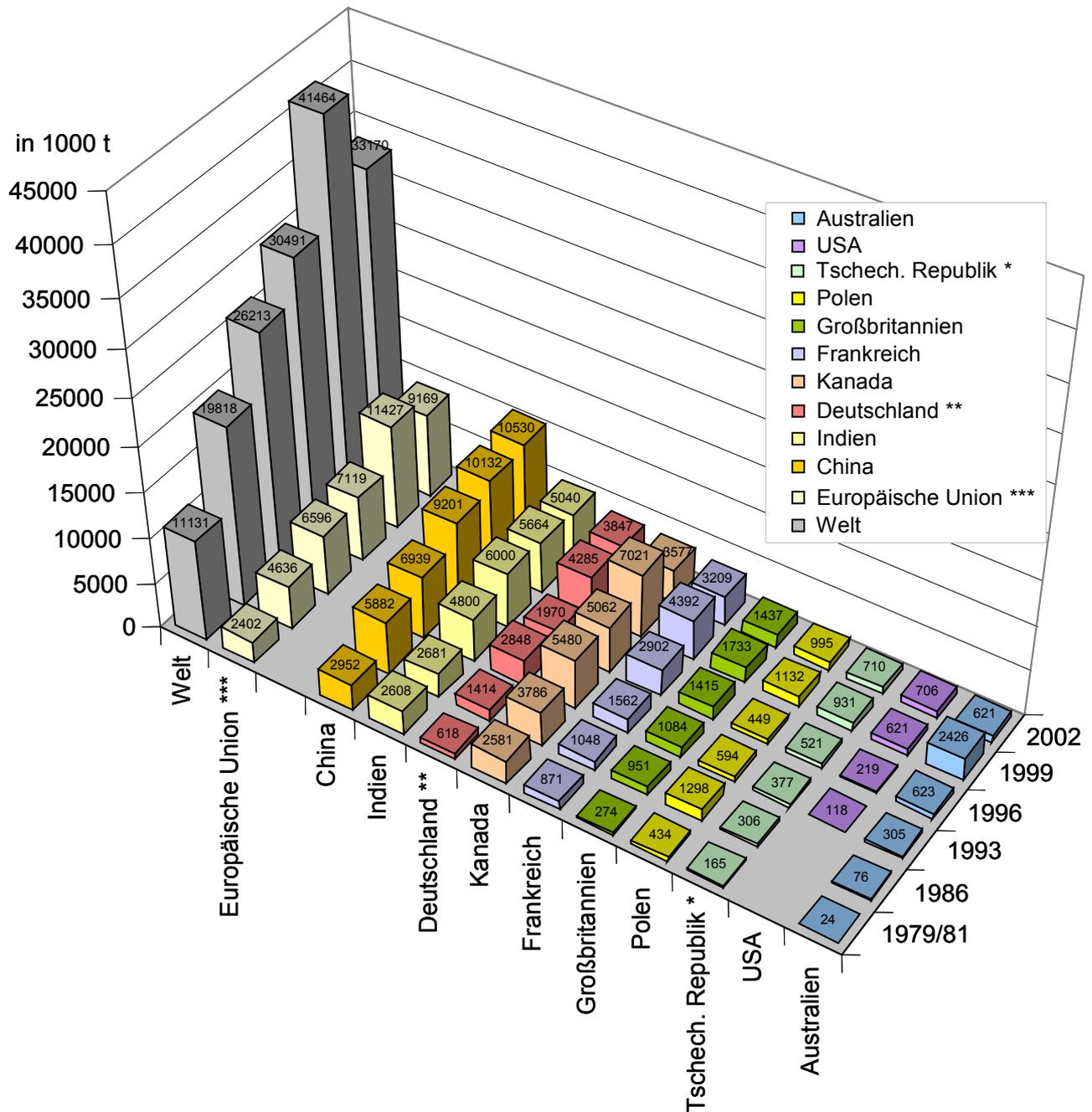
**Abb. 1.1** Bronzeplastik des Gründers der Malchower Saatzucht (heute Norddeutsche Pflanzenzucht, NPZ), Prof. Dr. phil. h.c. Dr. agr. h.c. Hans Lembke (28. Mai 1877 - 07. März 1966), vor seinem Geburtshaus in Malchow/Insel Poel.



**Abb. 1.2** Erzeugung von Hybridraps-Saatgut unter Nutzung der cytoplasmatischen männlichen Sterilität (CMS) bei Malchow/Poel (NPZ), Mai 2002. Die späterblühende CMS-Linie (nahezu grüne Streifen, weiblicher Elter) wird von der der Bestäubung dienenden männlichfertilen Linie (gelbe Streifen) umgeben. Letztere wird z. T. abgeschlegt, damit der Pollen länger verfügbar bleibt.

Die Wiege der deutschen Rapszüchtung stand in Malchow auf der Ostseeinsel Poel. Hans Lembke (1877-1966, Abb. 1.1) begann dort 1897 nach seiner Rückkehr in den elterlichen Betrieb - heute wieder einer von zwei Hauptsitzen der Norddeutschen Pflanzenzucht Hans Georg Lembke KG (NPZ) - mit der Auslese von Winterraps. Aus der „Poeler Landsorte“, die wegen ihres strauchförmigen, auseinanderfallenden Wuchses auch als „Kriechraps“ bezeichnet wurde, gelang es ihm in jahrelanger, zunächst auf Massen-, später auf Individualauslese beruhender akribischer Züchtungsarbeit, „Lembkes Winterraps“ zu entwickeln. Dieser wurde 1911 erstmalig als Originalsorte anerkannt und zeigte sich, kontinuierlich züchterisch verbessert, Vergleichssorten gegenüber in allen wesentlichen Parametern (Korn- und Strohertrag, Frosthärte, Spätfrostverträglichkeit, gewisse Schädlingstoleranz, Platzfestigkeit, Standfestigkeit, Eignung für den Maschinendrill, Öl- und Proteingehalt u. a.) überlegen. Dies führte zu einer jahrzehntelangen Dominanz im deutschen Anbau. In der DDR war Lembkes Sorte bis 1960 auf über 90 % der Anbaufläche vertreten, in der BRD dominierte sie als NPZ-Sorte „Lenora“ noch länger. Darüber hinaus erlangte „Lembkes Winterraps“ als Kreuzungselter in der Rapszüchtung internationale Bedeutung (BAUDIS 1997).

Nach dem Zweiten Weltkrieg stieg aus politischen und ökonomischen Gründen das Interesse am Anbau dieser Nutzpflanze in weiten Teilen der Welt stark an (DOWNEY 1966). So wurden die Volksrepublik China, Kanada und Australien zu führenden Produzenten. Raps hatte 1999 einen Anteil von 15 % an der Ölsaaten-Weltproduktion und steht nach der Sojabohne (41 %) an zweiter Stelle (ANONYMUS 2000). In der Europäischen Union stellt er die bedeutendste Ölsaate dar (54 % der Gesamtanbaufläche für Ölsaaten im Jahre 2000, Sonnenblume 33 %, Soja 6 %, VERHOOG 2002). Die Hauptproduktionsländer von Raps und Rübsen zeigt Abbildung 1.3.



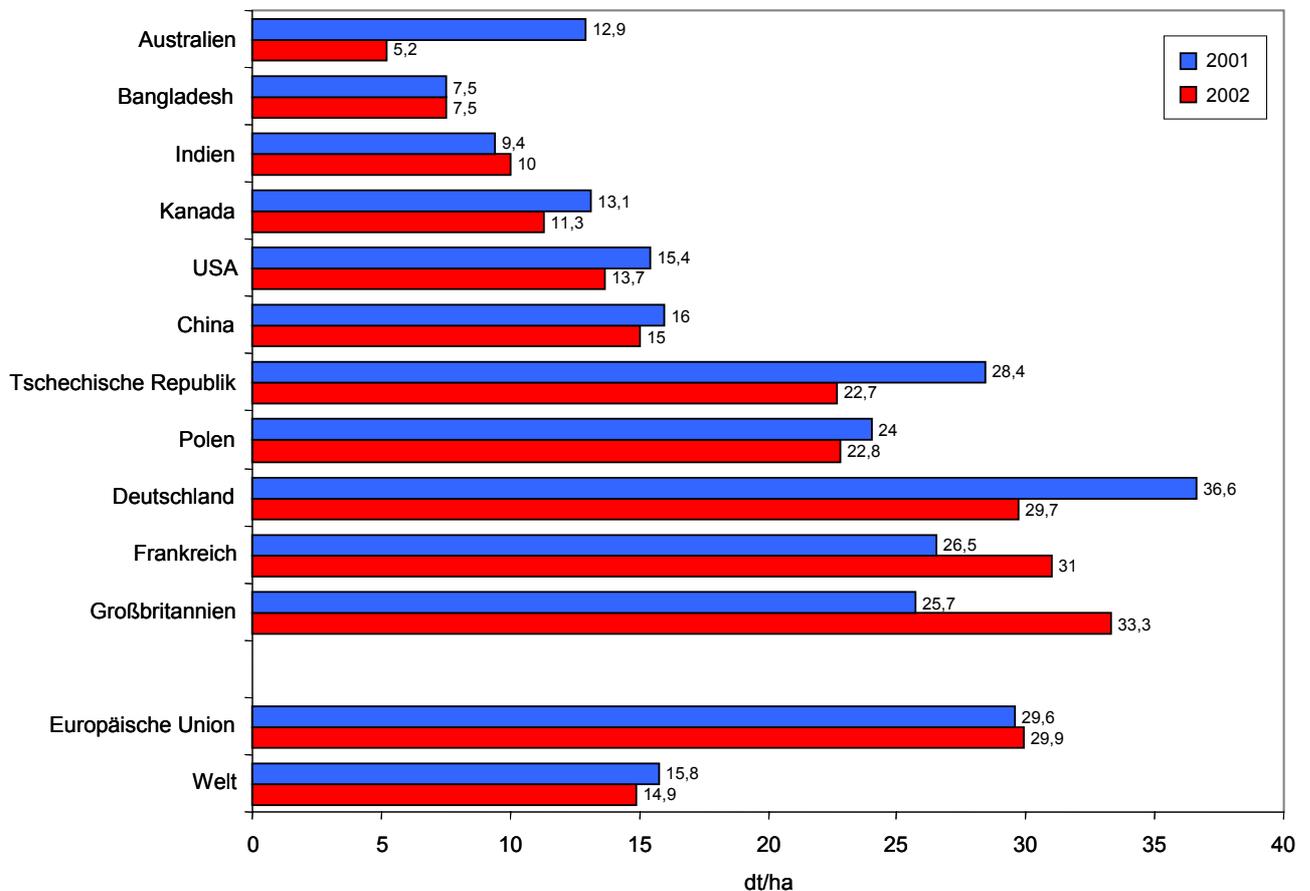
**Abb. 1.3** Produktion von Raps, Rübsen und Indischem Senf (*rapeseed*) in 1000 Tonnen (FAO 2003; Werte für 1979/81 und 1986 z. T. nach FAO 1987, verändert nach FRANKE 1989). \* = bis 1986: ČSSR, \*\* = Werte bis 1986 umfassen BRD und DDR, \*\*\* = Werte beziehen sich stets auf heutige Mitglieder.

Die starke Ausweitung der Rapserezeugung Mitte der sechziger Jahre war in der Bundesrepublik Deutschland mit einer Intensivierung der Züchtungsforschung verbunden (NPZ 1993). Große Fortschritte wurden im Bereich der Verwendbarkeit des Rapsöles zu Speisezwecken (Speiseöle und Margarine) und der des Rapsschrotes (Preßkuchen) als Futtermittel für Schweine, Rinder und Hühner erzielt. So erfolgte 1973 die Einführung der ersten 0-Sorte („Lesira“, erucasäurefrei) und 1987/88 die Umstellung auf die zusätzlich glucosinolatarmen 00-Sorten (BMELF 1995, siehe auch S. 1). Der Anteil leistungsstarker Hybridrapssorten an der Gesamtanbaufläche des Rapses in Deutschland ist von 18 bis 20 % im Jahr 2001 auf aktuell 45 bis 50 % (Ernte 2003 bzw. Aussaat für 2004) gestiegen (FRAUEN *et al.* 2003; W. FRIEDT/Universität Gießen und PAULMANN/ NPZ,



chemischen Industrie ist eine homogene Fettsäurezusammensetzung erwünscht. Möglichst wenig verschiedene und ein hoher Anteil bestimmter Fettsäuren, z. B. Ölsäure oder Erucasäure, werden angestrebt. Derartige Sorten besitzen eine sehr gute Anbaueignung für Deutschland und im Vergleich mit 00-Winterraps, der jedoch auch bei der erneuten Nutzung stillgelegter Flächen die dominierende Fruchtart ist, ein nahezu identisches Ertragspotential (BMELF 1995). Raps als nachwachsender Rohstoff wurde 1999 in Deutschland auf 372722 ha angebaut, dies entspricht ca. 31 % der in Abbildung 1.4 aufgeführten Raps-Gesamtanbaufläche (KAUP 1999).

Die Anbaufläche von Raps in Deutschland überschritt 1992 erstmals die 1-Millionen-Hektar-Grenze (BMELF 1995) und lag im Jahre 2002 bei knapp 1,3 Millionen ha (größte Anbaufläche von *rapeseed* in Europa, viertgrößte der Welt, FAO 2003, Abb. 1.4).



**Abb. 1.5** Erträge von Raps, Rübsen und Indischem Senf (*rapeseed*) in den Jahren 2001 und 2002 in dt/ha (FAO 2003).

Der Rapserttrag lag im Jahre 2002 in Deutschland bei 29,7 dt/ha. Er war damit ungefähr doppelt so hoch wie der durchschnittliche Weltertrag (FAO 2003, Abb. 1.5). Das Ertragsniveau in Deutschland, das zu den höchsten aller *rapeseed*-produzierenden Länder gehört, ist neben der klimatisch bedingten Dominanz des ertragsstärkeren Winterrapses auch auf die agronomische und züchterische Qualität des Rapsanbaus zurückzuführen. Dennoch kommt es auch hierzulande immer wieder zu beachtlichen Ertragsschwankungen. So wurde im Jahre 2001 mit 36,6 dt/ha ein deutlich höherer Ertrag als 2002 erzielt (Abb. 1.5). Solche Schwankungen sind für viele der Hauptanbauländer typisch. Besonders deutlich ist dies am Beispiel Australiens in Abbildung 1.5

zu erkennen. Derartige Unterschiede traten auch schon in den neunziger Jahren in Deutschland auf. Die Abbildungen 1.3 und 1.4 zeigen den deutlichen Rückgang der deutschen Rapsproduktion von 1993 auf 1996 bei einem geringeren Rückgang der Anbaufläche und den danach folgenden disproportionalen Anstieg beider bis 1999.

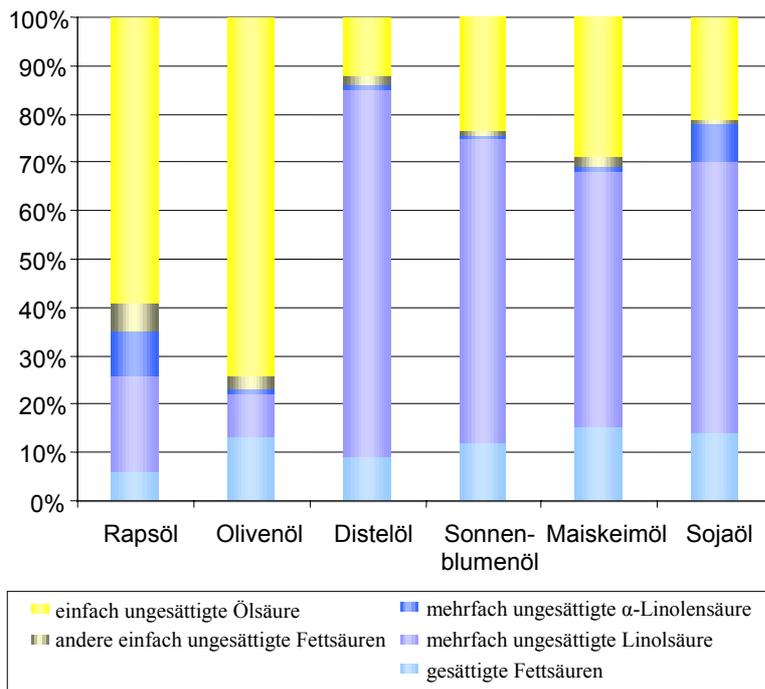
Der Rapsanbau wurde nicht zuletzt aufgrund der Bedeutung des Rapses als nachwachsender Rohstoff von der Europäischen Union stark subventioniert. Für die EU wie auch für Deutschland betrug der Anteil der Subventionen am Produktionswert von Ölsaaten zu Herstellungspreisen im Jahr 2000 rund 50 % (EU: 2,582 Milliarden Euro, VERHOOG 2002). Die EU-Agrar-Subventionen für nachwachsende Rohstoffe insgesamt belaufen sich auf „ca. 13 Mrd. Euro pro Jahr“ (KAUP 1999), bei Gesamt-Agrarausgaben von etwa 44 Milliarden Euro pro Jahr (SCHMID 2002).

Insbesondere der seit den neunziger Jahren (cf. BMELF 1995) vielfach propagierte und geförderte Einsatz von Rapsöl und Rapsmethylester (RME, „Biodiesel“) in Dieselmotoren (Verbrauch von „Biodiesel“ 1991: 200 t, 1997: 100000 t, voraussichtliche Produktionskapazität im Jahr 2003: ca. 1 Mio. t; KAUP 1999, BOCKEY 2002) wird in jüngerer Zeit zunehmend in Frage gestellt. Nach zwei vom Umweltbundesamt in Auftrag gegebenen Gutachten (UBA 2000a) bietet der nur durch Subventionen und Steuererleichterungen marktfähige „Biodiesel“ - ohne staatliche Zuschüsse wäre er etwa doppelt so teuer wie konventioneller Diesel - aus Sicht des Umweltschutzes und eingedenk der notwendigen Intensität des Rapsanbaus keine entscheidenden Vorteile gegenüber der Verwendung von Dieselkraftstoff aus Mineralöl. Zwar ist von einem spezifischen CO<sub>2</sub>-Vorteil von RME von 30-80 % pro Kilogramm Treibstoff auszugehen, doch würde selbst bei vollständiger Ausschöpfung der von der EU eingeräumten Anbauquoten weniger als ein halbes Prozent des Dieselbedarfs in Deutschland mit RME gedeckt werden können. Dem stehen andere Untersuchungen gegenüber, die von einer deutlich positiven Energie- und CO<sub>2</sub>-Bilanz von „Biodiesel“ - u. a. von einem Einsparungseffekt von 5,6 t CO<sub>2</sub>/ha Raps - und damit von einem „substantiellen Beitrag zur Reduzierung der klimawirksamen Treibhausgase“ ausgehen. Hierzu soll, in Übereinstimmung mit einem im November 2001 verabschiedeten EU-Aktionsplan, die zur Produktion von „Biodiesel“ notwendige Raps-Anbaufläche in Deutschland auf etwa 1,3 Millionen Hektar im Jahre 2010 erhöht werden (SCHARMER 2001, BOCKEY 2002). Nicht unerwähnt bleiben soll die aktuelle Kritik an der „Biodiesel“-Qualität, die zunehmend zur Zurückhaltung führender Automobilhersteller in diesem Marktsegment führt (FRANK & NUSSBAUM 2003).

Aufgrund derartiger Kontroversen und der aktuell diskutierten möglichen Veränderungen in der EU-Subventionspolitik ist für die Länder der Europäischen Union die weitere Entwicklung der Anbauflächen für Raps als nachwachsendem Rohstoff schwer vorhersehbar. Demgegenüber bietet die Verwendung von Rapsöl zu Speisezwecken in jedem Fall noch große Entwicklungschancen. Verstärkte Marketing-Aktivitäten sind notwendig, um auch in Deutschland Handelsketten und Verbraucher auf die hohe ernährungsphysiologische Qualität des Rapsöles aufmerksam zu machen. Dieses nahezu ideal zusammengesetzte Nahrungsmittel zeichnet sich durch einen hohen Anteil und ein ausgewogenes Verhältnis einfach ungesättigter (z. B. Ölsäure) und mehrfach ungesättigter Fettsäuren (z. B. enges Verhältnis von Linolsäure- zu  $\alpha$ -Linolensäure-Gehalt bei sehr hohem Anteil an  $\alpha$ -Linolensäure) aus (Abb. 1.6) und wird insbesondere zur Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen empfohlen (siehe weitere Ansätze zur Qualitätsverbesserung in Projekten wie *NAPUS 2000*: LECKBAND 2002, siehe Kap. 4.4).

Darüber hinaus hat der Anbau von Cruciferen, auch als Zwischenfrüchte in Getreidefruchtfolgen, aufgrund biozider Komponenten wie Isothiocyanaten eine große Bedeutung bei der Unterdrückung bodenbürtiger Pathogene und Schädlinge (*biofumigation*, KIRKEGAARD *et al.* 1999). Demgegenüber wird das allergene Potential des Rapses unterschiedlich beurteilt (MURPHY 1999, TORIYAMA *et al.* 1999).

Neben der beschriebenen vielfältigen wirtschaftlichen Bedeutung des Rapses kommt dem Anbau dieser Kulturpflanze zweifellos auch ein hoher landeskultureller Wert zu. Weite blühende Rapsfelder im Mai sind aus dem Landschaftsbild Deutschlands nicht mehr wegzudenken.



**Abb. 1.6**

Fettsäurezusammensetzung verschiedener Pflanzenöle (verändert nach FIEBIG, undatiert, und UFOP, undatiert).

Aus diesem Grunde sind die Aussichten einer gesellschaftlichen Akzeptanz von blütenblattlosem Raps, dessen Züchtungsrelevanz in jüngerer Zeit verstärkt in der Diskussion ist (RAKOW & SEGUIN-SWARTZ 1999, JIANG & BECKER 2001, ZHAO *et al.* 2002), trotz Vorteilen hinsichtlich Ertrag und *Sclerotinia*-Resistenz, skeptisch zu beurteilen.

Auf gentechnische Veränderungen des Rapses wird aufgrund der (indirekten) Relevanz des Themas im Zusammenhang mit dieser Arbeit im Kapitel 4.4 eingegangen.

Zu den wirtschaftlich bedeutendsten Krankheiten des Rapses zählen die von pilzlichen Erregern verursachte Wurzelhals- und Stengelfäule [*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.], die Gegenstand dieser Arbeit ist (siehe Kap. 1.2 ff.), die Weißstengeligkeit [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary], die Rapsschwärze [*Alternaria* spp.; z. B. *A. brassicae* (Berk.) Sacc. und *A. brassicicola* (Schw.) Wilts.] und die Rapswelke (*Verticillium* spp.; z. B. *V. dahliae* Kleb.). Lokal können darüber hinaus die Kohlhernie, hervorgerufen durch den Protozoen *Plasmodiophora brassicae* Wor., sowie Krankheiten, die von bakteriellen Erregern wie *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson verursacht werden, bedeutsam sein.

Tierische Schädlinge sind im Rapsanbau ebenfalls relevant, so der Rapserdflor (*Psylliodes chrysocephala* L.) und der Rapsglanzkäfer (*Meligethes aeneus* Fabr.). Insbesondere Rüsselkäferarten wie der Schwarze Kohltriebrübler (*Ceuthorrhynchus picitarsis* Gyll.) und der Rapsstengelrübler (*Ceuthorrhynchus napi* Gyll.) können gebietsweise zu starken Schädigungen führen (KIRCHNER 1974, PAUL 1988).

## 1.2 Die Wurzelhals- und Stengelfäule (*Leptosphaeria maculans*), die wichtigste Krankheit des Rapses

*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. ist die Hauptfruchtform des Erregers der Wurzelhals- und Stengelfäule bei *Brassica napus* L. (Raps) und anderen Kultur- und Wildcruciferen. Der Pilz ist das mit Abstand weltwirtschaftlich wichtigste Rapspathogen (HOWLETT *et al.* 2001). Aus diesem Grunde unterliegt er auch seit Jahrzehnten intensiver wissenschaftlicher Bearbeitung. Für umfassendere Informationen sei auf die *Reviews* von GUGEL & PETRIE (1992), WILLIAMS (1992), RIMMER & VAN DEN BERG (1992), WILLIAMS & FITT (1999), WEST *et al.* (2001) und HOWLETT *et al.* (2001) verwiesen.

Die Bezeichnung *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm., erst 1927 von CUNNINGHAM eingeführt und auch heute noch häufig verwendet, bezieht sich auf die ungeschlechtliche Form des Pilzes. Diese wurde erstmals 1791 von TODE an abgestorbenem Rotkohl als *Sphaeria lingam* beschrieben. Der taxonomisch richtige Name *Plenodomus lingam* (Tode ex Fr.) Höhn (BOEREMA & van KESTEREN 1964, REDDY *et al.* 1998) hat sich nie durchgesetzt. SMITH (1956) erkannte die Zugehörigkeit von *Phoma lingam* zum Teleomorph *L. maculans* (von ihm noch als *L. napi* geführt), was durch MÜLLER & TOMASEVIC (1957) sowie SMITH & SUTTON (1964) bestätigt wurde. *L. maculans* ist ein Ascomycet (nach SEIDEL *et al.* 1988: Unterklasse Ascoloculomycetidae, Ordnung Pseudosphaeriales, Familie Pleosporaceae; nach BERBEE 2001: Subphylum Pezizomycotina = Euascomycetes, Klasse Dothidiomycetes = Teile der Loculoascomycetes) mit einer heterothallischen, bipolaren (1 Gen, 2 Allele) Sexualkontrolle (VENN 1979, BOUDARD 1981, SOMDA *et al.* 1997). Seine Genomgröße beträgt ca. 34 Mb; die 16 Chromosomen (zwischen 0,7 und 3,5 Mb) sind für eine elektrophoretische Karyotypisierung optimal auflösbar (HOWLETT *et al.* 2001). Darüber hinaus ist der Pilz gut transformierbar (cf. RUIZ-DÍEZ 2002); SEXTON & HOWLETT (2001) konnten mit Hilfe des *green fluorescent protein* (GFP) die Transkription des Cyanid-Hydratase-Gens in Kotyledonen- und Stengelläsionen zeigen. IDNURM & HOWLETT (2001) gelang mit dem im Mycel in hohem Maße transkribierten Opsin-Gen die Klonierung des ersten *L. maculans*-Gens.

In totem Blatt-, Stengel- und Wurzelgewebe bilden sich, verbunden mit Plasmogamie, schwarze, rundliche Fruchtkörper (Durchmesser 300-500 µm) mit hyalinen, septierten Pseudoparaphysen (WILLIAMS 1992). Dieses erfolgt gewöhnlich an auf dem Feld verbliebenen Ernterückständen bei feuchtem Wetter und Durchschnittstemperaturen von 15 °C (KIRCHNER 1974). Die Fruchtkörper werden zumeist als Pseudothecien (GUGEL & PETRIE 1992, WILLIAMS 1992), zuweilen auch als Perithezien (KIRCHNER 1974, SEIDEL *et al.* 1988, CRAMER 1990) bezeichnet. Ein neutraler, beide Fruchtkörpertypen einschließender Begriff ist *ascocarp* (WILLIAMS 1992). Die Karyogamie in den dikaryontischen Hyphen findet im Proascus (Ascus-Anlage) statt. In keulenförmigen bis zylindrischen, bitunicaten Ascii (80-125 x 15-22 µm) bilden sich unter Meiose jeweils acht zweireihige, fünfmal septierte, zylindrische bis ellipsoide, gelb-braune, haploide Ascosporen (35-70 x 5-8 µm). Die Ascosporen dienen als primäres Inokulum an Neuaussaaten, wo sie graue bis schmutzig-weiße Läsionen an Kotyledonen und Primärblättern hervorrufen.

Im Verlauf der Entwicklung bilden sich an befallenen Blättern oder Stengeln braune bis schwarze, kugelige und mit einer Mündung versehene asexuelle Sporenbhälter (Pycnidien). Darin

entstehen einzellige, hyaline, zylindrische, haploide Conidien, die Pycnidiosporen (= Pycnosporen; 3-5 x 1,5-2 µm, WILLIAMS 1992), die unter Mitwirkung von Spritzwasser und Wind der weiteren Ausbreitung der Krankheit dienen (sekundäres Inokulum).

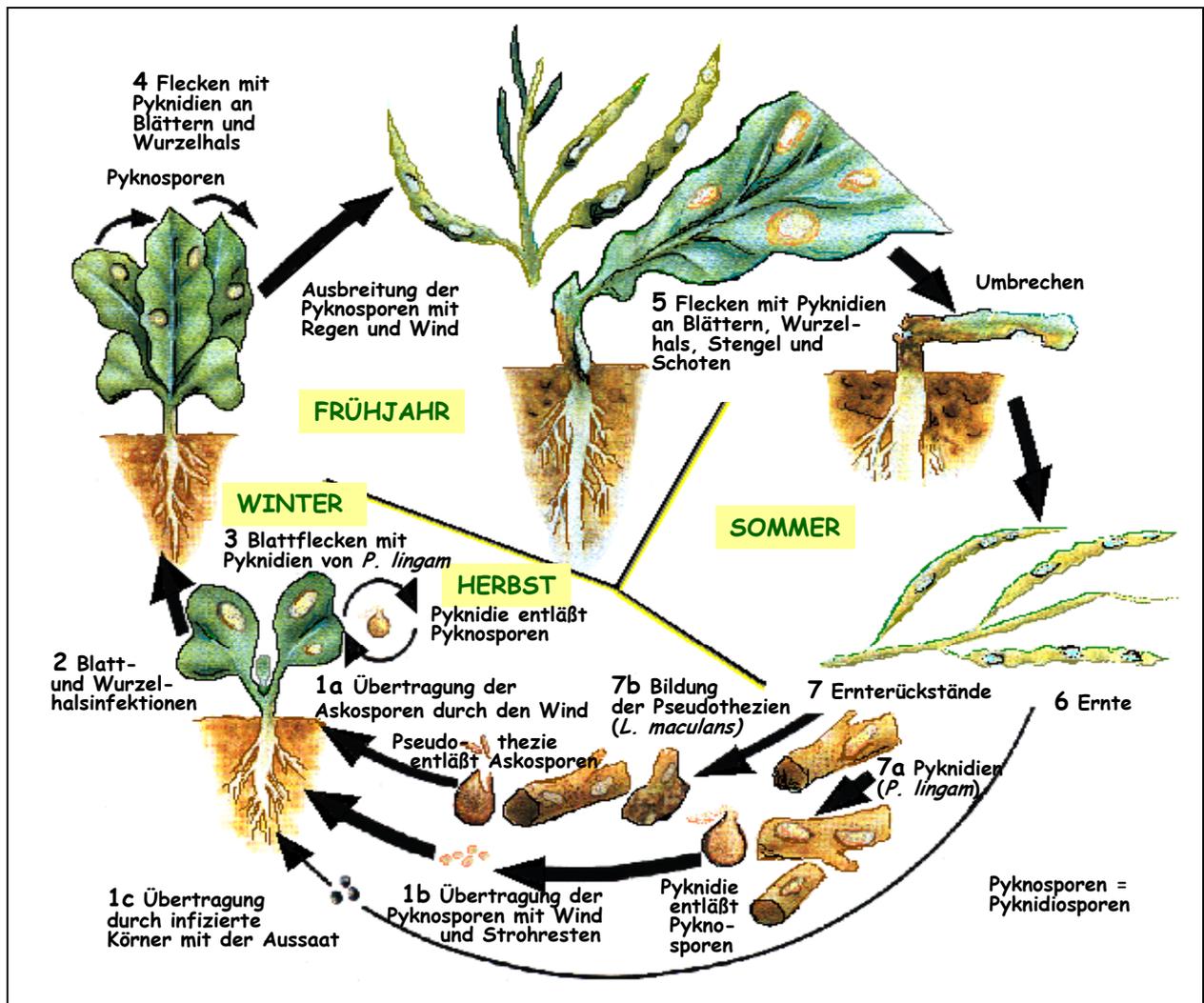
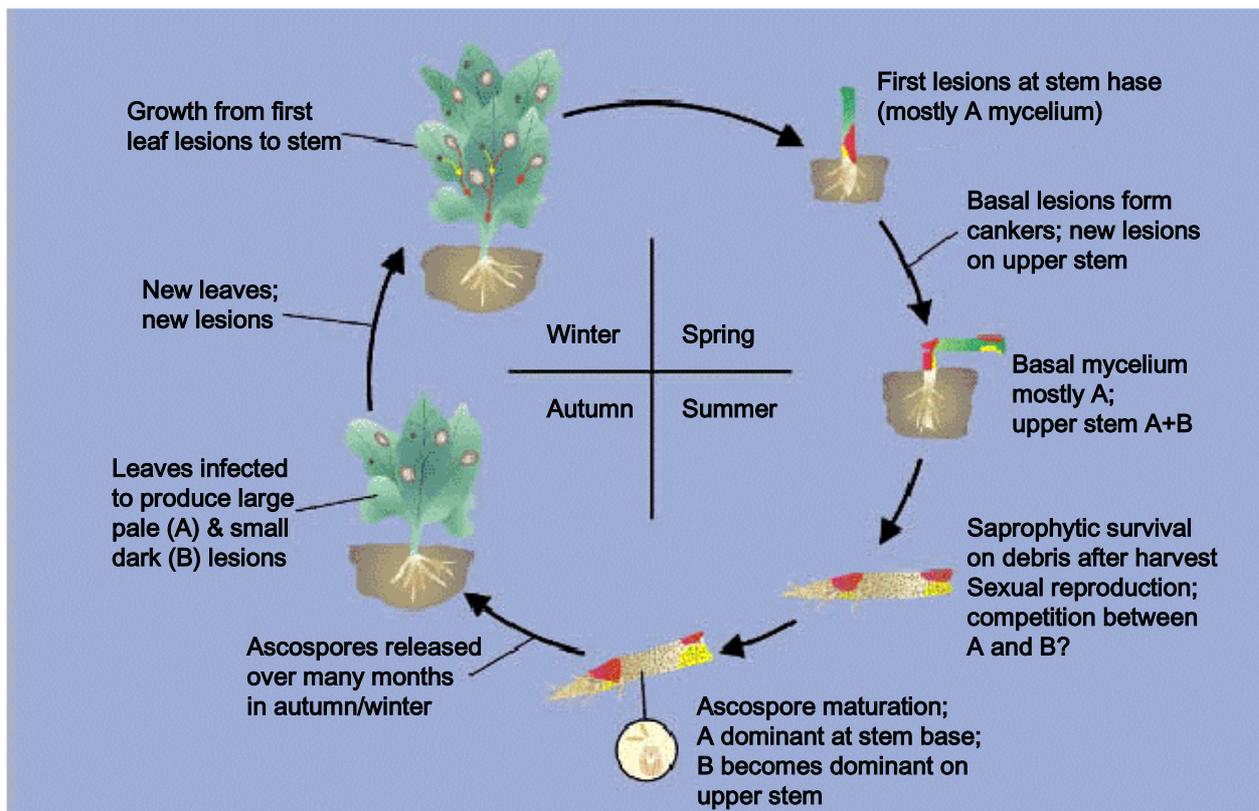


Abb. 1.7 Lebenszyklus von *Leptosphaeria maculans* (verändert nach PAUL 1988).

Im allgemeinen wird von einer Initialinfektion an Blättern bzw. Kotyledonen ausgegangen. Daraufhin kolonisiert der Pilz die Interzellularräume zwischen den Mesophyllzellen, gefolgt von einem Abwärtswachstum in den Petiolen. Dieses erfolgt im Xylem oder zwischen Xylem und Cortex. Die interzelluläre systemische Wachstumsphase ist biotroph und symptomlos. Letztlich dringt der Pilz in die Rindenzellen des Stengels ein, die daraufhin absterben (HAMMOND *et al.* 1985, HOWLETT *et al.* 2001). Erkrankte Winterrapspflanzen weisen im Frühjahr dunkel verfärbte, nekrotische Stellen an der Stengelbasis bzw. Wurzelhalsregion auf („Halsnekrose“, KIRCHNER 1974). Die Nekrosen sind i. d. R. ins pflanzliche Gewebe eingesunken und haben eine schwarze bis violette Umrandung. Die Symptome können sich auch an einer Blattansatzstelle ausprägen (GUGEL & PETRIE 1992). Stengelläsionen sind in Abhängigkeit von ihrem Ausmaß in der Lage, nicht nur den Wasser- und Nährstofftransport zu begrenzen und zu vorzeitigen Reifungserscheinungen infizierter Pflanzen zu führen, sondern auch das Absterben derselben zu bewirken. Neben

Blättern sind auch Stengel, Schoten und Wurzeln (SOSNOWSKI *et al.* 2001) des Rapses als primäre Infektionsorte beschrieben. So ist der Pilz z. B. in der Lage, von Schotenläsionen ausgehend die Samen zu infizieren. Nach der Aussaat können daraus infizierte Keimlinge entstehen (GUGEL & PETRIE 1992, WILLIAMS 1992). Abbildung 1.7 zeigt den Lebenszyklus von *L. maculans*.

Das Eindringen des Pilzes in die Pflanzen wird durch tierische Schädlinge wie die Larven des Rapserrdflohs und des Schwarzen Kohltriebrüblers (Kap. 1.1) begünstigt. Der Erreger kann jedoch auch ohne Fraßschäden, z. B. über die großen Parenchymzellen, die die nach dem Abfallen der Kotyledonen am Stengel verbleibenden Keimblattschuppen besitzen, in die Pflanze eindringen (KIRCHNER 1974).



**Abb. 1.8** Jahreszeitliche Veränderungen in der Verteilung von  $Tox^+$ - (A-) und  $Tox^0$ - (B-)Isolaten von *L. maculans* auf Winterraps in Frankreich und England: Blattläsionen im Herbst/Winter, Mycel im Stengel im Frühling/Sommer und Ascosporenproduktion auf Ernterückständen (nach WEST *et al.* 2002a).

Unterschiede in der Pathogenität verschiedener Isolate von *L. maculans* sind seit langem bekannt (CUNNINGHAM 1927). Die bis heute übliche Einteilung in aggressive und nicht-aggressive Stämme ist terminologisch verwirrend und unpräzise (cf. WILLIAMS & FITT 1999, SÉGUIN-SWARTZ 2000, HOWLETT *et al.* 2001). Abbildung 1.8 verdeutlicht die Unterschiede der von aggressiven (auch als A-Gruppen-,  $Tox^+$ -, hoch virulente bzw. virulente Isolate bezeichnet) bzw. nicht-aggressiven (B-Gruppen-,  $Tox^0$ -, schwach virulenten, avirulenten) Isolaten im Jahresverlauf hervorgerufenen Symptome an verschiedenen Bereichen der Pflanze (cf. WEST *et al.* 2002a).

Befall durch nicht-aggressive Isolate führt bei Raps z. B. zu kleineren, dunkleren und pycnidienarmen Läsionen an Blättern, die im Gegensatz zu denen, die von den aggressiven Isolaten hervorgerufen werden, oft erst im Verlaufe des Winters deutlich werden. Auch Stengel­läsionen erschei-

nen in der Regel später als bei Tox<sup>+</sup>-Isolaten, ungefähr zum Zeitpunkt der Seneszenz der Pflanze. Sie sind eher klein und durch die Begrenzung des Pilzwachstums auf den Rindenbereich oft nur oberflächlich; die Pflanze wird kaum geschädigt (GUGEL & PETRIE 1992, WEST *et al.* 2002a). Bis auf Australien [fast nur Tox<sup>+</sup>-Isolate, zu Ausnahmen cf. PLUMMER *et al.* (1994) und SOSNOWSKI *et al.* (1999)] und China (nur Tox<sup>0</sup>, WEST *et al.* 2000) kommen jeweils beide Subgruppen in unterschiedlichen Proportionen in allen wichtigen Rapsanbaugebieten (siehe Kap. 1.1, Abb. 1.3-1.5) vor (WEST *et al.* 2001). In Europa dominieren, je weiter westlich man kommt, die aggressiven Isolate. Ihre „Ostausdehnung“ schreitet jedoch schnell voran, was auch Untersuchungen an deutschen Standorten (KOOPMANN *et al.* 1999, THÜR WÄCHTER *et al.* 1999) belegen. Auch in Schweden herrschen Tox<sup>+</sup>-Isolate vor (KUUSK *et al.* 2002). Besiedeln beide Isolat-Gruppen gleichzeitig dieselbe Pflanze, so konnte in Europa eine eindeutige Dominanz von Tox<sup>+</sup>-Isolaten an Wurzel und Stengelbasis gefunden werden, während von höheren Sproßpartien und Blättern beide Gruppen ähnlich häufig isoliert wurden (THÜR WÄCHTER *et al.* 1999, WEST *et al.* 2002a).

Die Einteilung in die beiden Pathotypengruppen bezog sich ursprünglich auf die Fähigkeit der aggressiven Isolate, die typischen Krankheitssymptome im Wurzelhals- und Stengelbereich (*stem canker*) an *B. napus* hervorzurufen und darüber hinaus das wirtsunspezifische Phytotoxin Sirodesmin PL zu produzieren (Tox<sup>+</sup>); analog dazu wurden die nicht-aggressiven Isolate (Tox<sup>0</sup>) charakterisiert (HOWLETT *et al.* 2001). Beide Gruppen sind zwar morphologisch nahezu gleich, können aber auch durch Pigmentbildung und Wachstumsverhalten *in vitro* (CUNNINGHAM 1927, KOCH *et al.* 1989, SIPPEL & HALL 1995, zu Einschränkungen siehe WILLIAMS & FITT 1999) sowie durch Isoenzymmuster (BALESDENT *et al.* 1992, BONDE *et al.* 1993, SIPPEL & HALL 1995, SOMDA *et al.* 1997), sekundäre Metabolite (KOCH *et al.* 1989, PEDRAS *et al.* 1990, PEDRAS & SÉGUIN-SWARTZ 1990, BALESDENT *et al.* 1992, PEDRAS *et al.* 2000) und serologische Methoden (WERRES & STEFFENS 1994, TORRANCE 1995) unterschieden werden (cf. WILLIAMS & FITT 1999, HOWLETT *et al.* 2001). Darüber hinaus fanden HASSAN *et al.* (1991) Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der Aktivität extrazellulärer Enzyme, die in einem Zusammenhang mit der Besiedlung der Wirtspflanze stehen könnten, und der elektrophoretischen Muster von Proteinen der Hyphen-Oberfläche und stellten RFLP-Polymorphismen fest. Weitere Untersuchungen auf DNA-Ebene (cf. BULAT & MIRONENKO 1996) wie RFLP- (JOHNSON & LEWIS 1990, KOCH *et al.* 1991), RAPD-PCR- (SCHÄFER & WÖSTEMEYER 1992, SCHLEIER *et al.* 1997) und AFLP-Analysen (COZIJSSEN *et al.* 2000), *electrophoretic karyotyping* mittels Pulsfeldgelelektrophorese (TAYLOR *et al.* 1991, MORALES *et al.* 1993, HOWLETT 1997, COZIJSSEN *et al.* 2000) sowie PCR-basierte Methoden zur Amplifizierung spezifischer repetitiver Elemente [z. B. von ITS- (*internal transcribed spacer*; XUE *et al.* 1992, TAYLOR 1993, MAHUKU *et al.* 1996) und rep- (*repetitive element based*; JEDRYCZKA *et al.* 1999) Sequenzen] zeigten die große genetische Distanz zwischen aggressiven und nicht-aggressiven Isolaten. Da auch Kreuzungen zwischen Isolaten beider Gruppen bisher nicht gelungen sind (SOMDA *et al.* 1997), geht man nunmehr von mindestens zwei verschiedenen Arten aus. Der *L. maculans species complex* (HOWLETT *et al.* 2001) besteht zum einen aus der kompakten, eng verwandten Gruppe der aggressiven Isolate (*L. maculans s. str.*), die nach ihrer Interaktion mit Kotyledonen der Differentialrapsorten „Westar“ (bzw. „Lirabon“), „Quinta“ und „Glacier“ nochmals in drei Pathogenitätsgruppen (PG 2-4, Kapitel 2.2.3.1) unterteilt werden (KOCH *et al.* 1991, MENGISTU *et al.* 1991). Innerhalb der PG 4-Isolate werden seit einigen

Jahren noch die australischen „*B. juncea*-attackierenden“ Isolate, zu denen das für diese Arbeit relevante Isolat M1 gehört, von den den „Normalfall“ darstellenden Isolaten unterschieden (z. B. PURWANTARA *et al.* 1998, siehe auch Kap. 1.3 & 2.1.2). Letztere sind nicht in der Lage, Schäden an *B. juncea* und den anderen *Brassica*-Arten mit dem B-Genom (Kap. 1.3) hervorzurufen („*B. juncea*-nicht-attackierende Isolate“). Den aggressiven Isolaten steht die genetisch heterogenere Gruppe der nicht-aggressiven Isolate gegenüber, die nach SHOEMAKER & BRUN (2001) nunmehr als *Leptosphaeria biglobosa* sp. nov. bezeichnet werden. Diese nicht-aggressiven Isolate (= PG 1), die wahrscheinlich mehrere Arten umfassen (ROUXEL *et al.* 1994, WEST *et al.* 2002a) werden ebenfalls unterteilt (NA1-NA3, KOCH *et al.* 1991, GALL *et al.* 1995). Die NA1-Isolate entsprechen nach HOWLETT *et al.* (2001, bezieht sich auf persönliche Mitteilung von H. BRUN) *Leptosphaeria biglobosa*, was WEST *et al.* (2002a) für noch nicht gesichert halten. In Europa wurden bisher ausschließlich diese NA1-Genotypen an *B. napus* isoliert (WEST *et al.* 2002a). Neuerdings wird, basierend auf der Produktion von Indolyldioxopiperazinen, innerhalb dieser NA1-Gruppe eine weitere Subgruppe unterschieden (PEDRAS & BIESENTHAL 2000). PEDRAS *et al.* (1995) konnten anhand von Sekundärmetabolit-Profilen die enge Verwandtschaft der in Kanada weit verbreiteten NA2-Isolate (GALL *et al.* 1995) zu *Phoma wasabiae* zeigen. Darauf deuten auch Ergebnisse von REDDY *et al.* (1998) hin. Bei NA3 liegt lediglich der Bericht über ein Isolat vor (cf. HOWLETT *et al.* 2001). Zuweilen werden die nicht-aggressiven Isolate auch nach der Wildart, von der sie isoliert wurden, benannt (z. B. der „*Thlaspi*“-Stamm nach *Thlaspi arvense* L., cf. SÉGUIN-SWARTZ 2000; cf. *forma specialis*, PRELL & DAY 2001).

Ertragsausfälle durch die Wurzelhals- und Stengelfäule sind seit mehr als 100 Jahren bekannt (HENDERSON 1918). Aufgrund der Intensivierung der Rapsproduktion, der Markteinführung empfindlicher Sorten und des weltumspannenden Saatgutaustausches wurde die Krankheit in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts in allen Hauptanbauländern (Abb. 1.3-1.5) zunehmend zum Problem und zum Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Bearbeitung. Während in der Regel von Mindererträgen von unter 10 % (WEST *et al.* 2001) bis zu 20 % (KRÜGER 1980, SCHUSTER *et al.* 1980, GUGEL & PETRIE 1992) berichtet wird, kann schwerer Befall zu Schäden von 30-50 % (HALL *et al.* 1993, ZHOU *et al.* 1999, BARBETTI & KHANGURA 1999) sowie bei Epidemien in früheren Jahren auch zum Totalausfall der Ernte führen (z. B. Frankreich 1950 und 1966, Australien 1972; cf. GUGEL & PETRIE 1992). In Deutschland waren in manchen Jahren über 70 % der Pflanzen befallen. Untersuchungen aus den Jahren 1977 und 1978 zeigten, daß die Krankheit in allen Rapsanbaugebieten der alten Bundesländer vorhanden war; hingegen spielte sie in der DDR nicht diese Rolle (KRÜGER 1978 und 1979, SEIDEL *et al.* 1984).

Neben der Vernichtung aller Rückstände befallener Kohl- und Rapspflanzen (KIRCHNER 1974) besteht die wichtigste Maßnahme zur konventionellen Kontrolle der Krankheit in einer entsprechend weiten Fruchtfolge. Im allgemeinen wird empfohlen, Raps erst vier Jahre nach sich selber wieder anzubauen. In der Zwischenzeit nimmt die Zahl der von einer gegebenen Menge Ernterückstände freigesetzten Ascosporen (saprophytische Phase des Pilzes) ab. Da auch diese Rückstände selber fortschreitendem Abbau unterliegen, reduziert sich die Menge an Ascosporen-Inokulum in Abwesenheit eines empfindlichen Wirts von Jahr zu Jahr beträchtlich. Die Kontrolle von Raps-Durchwuchs und von gegenüber *L. maculans* empfindlichen Wildcruciferen in der Nachfrucht oder der Brache ist ebenfalls bedeutsam. In diese Überlegungen sind aufgrund des

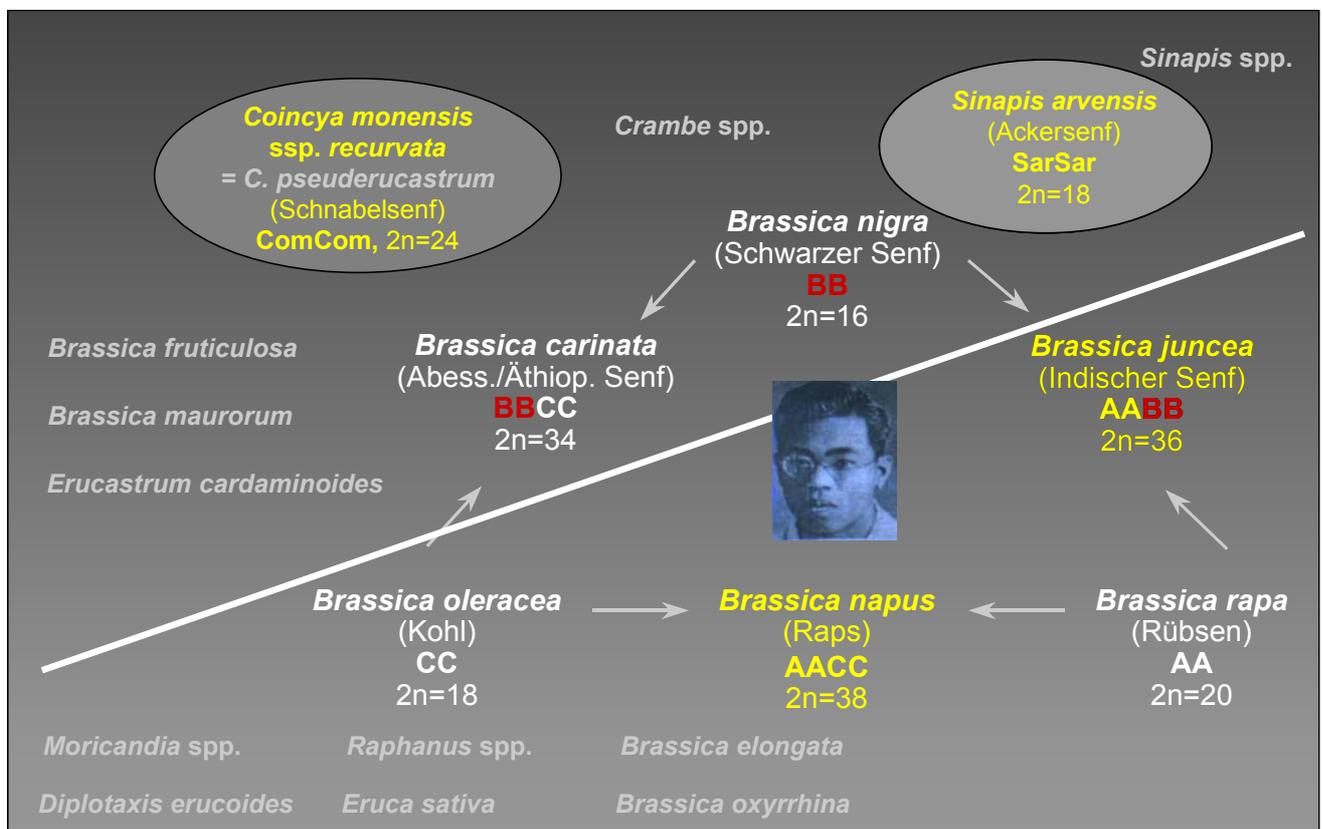
Potentials der Ascosporen zur kilometerweiten Ausbreitung auch benachbarte Felder miteinzubeziehen (cf. GUGEL & PETRIE 1992). Einwandfreies Saatgut mit guter Keimfähigkeit und Triebkraft mindert die Krankheitsgefahr. Zu dichter Stand der Jungpflanzen und zu hohe Feuchtigkeit sind nach Möglichkeit zu vermeiden. Saatgutbeizungen (in Europa mit Thiram oder Iprodion) und der Einsatz von Fungiziden (in Europa als Blatt-Sprays: Difenoconazol + Carbendazim oder Flusilazol + Carbendazim) erfolgen in Ländern mit intensiver Rapsproduktion und hohen Erträgen (WEST *et al.* 2001). In weiten Teilen der Welt ist eine chemische Bekämpfung des Krankheitserregers aufgrund unzureichender Kosten-Nutzen-Relationen nicht sinnvoll. In Regionen wie Westeuropa muß der Fungizideinsatz, dessen Wirksamkeit oft als begrenzt beschrieben wird (RAMSBOTTOM & THOMAS 1999), mit genauen Vorhersagesystemen hinsichtlich der Schwere der sich entwickelnden Krankheitssituation optimiert werden (FITT *et al.* 1997, WEST *et al.* 1999). Auch die Entwicklung von „Biofungiziden“ - KHARBANDA *et al.* (1999) zeigten die inhibierende Wirkung des PKB1-Stammes des Bakteriums *Paenibacillus polymyxa* gegenüber *L. maculans* - ist noch weit von einer praktischen Bedeutung entfernt. Aus diesen Gründen kommt der Resistenzzüchtung eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Krankheit zu.

### 1.3 Interspezifische Hybridisierungen, Resistenzquellen und Resistenzgene in der Tribus *Brassicaceae* (Familie *Brassicaceae*)

Grundlegende Erkenntnisse über die Verwandtschaftsverhältnisse in der Gattung *Brassica* wurden bereits in den dreißiger Jahren gewonnen (MORINAGA 1934, U 1935). Analog zu den in Kapitel 1.1 geschilderten Verhältnissen beim amphidiploiden Raps, *B. napus* L. (Genom AACCC,  $2n=38$ ; MORINAGA & FUKUSHIMA 1930) sind die ebenfalls digenomischen Arten *B. carinata* A. Br. (BBCC) und *B. juncea* (L.) Czern. (AABB) aus *B. nigra* (L.) Koch (BB) und *B. oleracea* (CC) bzw. *B. rapa* (AA) entstanden. Abbildung 1.9 zeigt die Abstammung der *Brassica*-Arten (nach U 1935) im phylogenetischen Zusammenhang mit nahe verwandten Arten (Tribus *Brassicaceae*, JANCHEN 1942; nach SOMERS & DEMMON 2002: 51 Gattungen und 217 Arten, davon 35 *Brassica*-Arten). Letzterer basiert auf Analysen konservierter Bereiche der Chloroplasten-DNA (WARWICK & BLACK 1991 & 1996; D.J. LYDIATE/AAFC Saskatoon, pers. Mitteilung von 1999; OSHIMA 2000). Die durch das U-Schema verlaufende Diagonale trennt die *nigra*-Gruppe [mit *Sinapis arvensis* L. und *Coincya monensis* (L.) Greuter & Burdet] von der *rapa-oleracea*-Gruppe (mit *B. napus* und *B. juncea*). Ähnliches zeigen Untersuchungen von INABA & NISHIO (2002) am *SLR1*-Gen, einem *S-locus related gene*.

Die genetische Basis der in den aktuellen Rapssorten vorhandenen Resistenz gegenüber *Leptosphaeria maculans* ist sehr eng. Sie geht, nahezu weltweit, auf die 1977 eingeführte französische Sorte „Jet Neuf“ zurück, die lediglich eine partielle, wohl polygen kontrollierte Adultresistenz (ab dem 5-Blatt-Stadium) zeigt, während die Keimlinge anfällig reagieren (CARGEEG & THURLING 1979 und 1980, HANACZIWSKYJ & DRYSDALE 1984). Vorhandene Keimlingsresistenzen sind häufig pathotypenspezifisch (cf. RIMMER & VAN DEN BERG 1992, ROUXEL *et al.* 2003). Deshalb liegt ein Resistenztransfer aus verwandten Arten nahe. Interspezifische Hybridisierungen sind innerhalb der *Brassicaceae* relativ leicht möglich. WARWICK *et al.* (2000) berichten über ca. 1000 somatische und sexuelle Hybridisierungen, die hier nur grob referiert werden.

Für Wildformen von *B. rapa* liegen Berichte über Resistenzen gegen *L. maculans* vor (ROUXEL *et al.* 1991, CROUCH *et al.* 1994, FALAK *et al.* 1999). Dabei besitzt insbesondere die von zwei unabhängigen Genen vermittelte *complete resistance* (CR) von *B. rapa* ssp. *sylvestris* (BRC 2001, CANOLA COUNCIL 2002 und ADVANTA 2003) Anbaubedeutung, wenngleich auch diese Resistenz bereits durchbrochen wurde (LI *et al.* 2003, SOSNOWSKI *et al.* 2003). Hingegen erscheinen *B. oleracea* und die Vielzahl von Arten des *B. oleracea*-Cytodems, die ebenfalls als C-Genom-Arten gelten (z. B. *B. cretica*), als Resistenzquelle ungeeignet (FERREIRA *et al.* 1993, PLÜMPER 1995). Raps-Resynthesen durch interspezifische Hybridisierung zwischen *B. rapa* und *B. oleracea* führten zu neuer Variabilität in züchterisch wichtigen Merkmalen (z. B. AKBAR 1989, CHEN & HENEEN 1989). Die Entwicklung von Krankheitsresistenzen mittels Resynthese, wie von CROUCH *et al.* (1994) gegenüber *L. maculans* und DIEDERICHSEN & SACRISTÁN (1994) für *Plasmodiophora brassicae* gezeigt (heute NPZ-Sorte „Mendel“), spielte dabei jedoch eine untergeordnete Rolle.



**Abb. 1.9** Verwandtschaftsverhältnisse in der Gattung *Brassica* (nach U 1935, zentral: Bild dieses Autors) im phylogenetischen Zusammenhang mit verwandten Arten (Familie *Brassicaceae*, Tribus *Brassiceae*; nach WARWICK & BLACK 1991 & 1996, D.J. LYDIATE/AAFC Saskatoon, pers. Mitteilung von 1999 und OSHIMA 2000). Die für diese Arbeit besonders relevanten Genotypen (gelb) und das Resistenzen tragende *Brassica*-B-Genom (rot) sind hervorgehoben. Die Diagonale trennt die *nigra*-Gruppe (mit *Sinapis arvensis* und *Coincya monensis*) von der *rapa-oleracea*-Gruppe (mit *B. napus* und *B. juncea*).

### ***Brassica juncea* und die *Brassica*-Arten mit dem B-Genom**

Von besonderer Bedeutung für die Resistenzzüchtung gegen die Wurzelhals- und Stengelfäule sind die dem Raps nahe verwandten *Brassica*-Arten, die das B-Genom besitzen. So weisen die meisten Genotypen von *B. nigra*, *B. carinata* und *B. juncea* eine sehr effektive Resistenz auf, die

auch im Keimlingsstadium wirksam ist (SACRISTÁN & GERDEMANN 1986). Sie wird mono- oder oligogen vererbt (ROY 1978, PANG & HALLORAN 1996a, PLIESKE *et al.* 1998, DIXELIUS 1999). Anhand von *B. napus*-*B. nigra*-Additionslinien konnten bedeutende Fortschritte beim Verständnis der Genetik dieser Resistenz gemacht werden (CHÈVRE *et al.* 1991). So wurde auf drei verschiedenen Chromosomen je ein Resistenzgen gefunden, wobei lediglich ein „Resistenzchromosom“ zur Ausprägung des gleichen Resistenzniveaus wie bei *B. nigra* ausreichte (ZHU *et al.* 1993). Eines der Resistenzgene konnte auf Chromosom 4 (Chromosomenbezeichnung unterschiedlich bei verschiedenen Arbeitsgruppen) von *B. nigra* lokalisiert werden, wobei die Beteiligung weiterer Loci an der Resistenz vermutet wird (CHÈVRE *et al.* 1995). Vielfach wurden auch Nachkommenschaften aus Kreuzungen des Rapses mit den beiden anderen B-Genom-Arten, *B. juncea* und *B. carinata*, analysiert (ROY 1978 und 1984, SACRISTÁN & GERDEMANN 1986, PANG & HALLORAN 1996a). Mit Hilfe solcher Linien konnte eine ähnliche Resistenzgensituation wie bei *B. nigra* gefunden werden (CHÈVRE *et al.* 1997, PLIESKE *et al.* 1998). PLIESKE & STRUSS (2001a) berichten, daß die Introgression der B-Genom-lokalisierten Resistenzgene sehr wahrscheinlich in das A-Genom der *B. napus*-B-Genom-Rekombinationslinien bzw. des Rapses erfolgte. Darüber hinaus wurden in *B. napus*-*B. juncea*-Rekombinationslinien RAPD-Marker für eine aus *B. juncea* in ein Rapschromosom integrierte Kotyledonenresistenz gegen *L. maculans* (PG 3 und 4) gefunden (CHÈVRE *et al.* 1997, BARRET *et al.* 1998). Mit Hilfe dieser Studien konnte auch gezeigt werden, daß bei unterschiedlichem Material, das auf zwei verschiedene *B. napus* x *B. juncea*-Originalkreuzungen (Herkünfte: M.D. Sacristán, IAG/Berlin bzw. N.N. Roy, Department of Agriculture South Perth, Australien) zurückgeht, die Introgression des resistenztragenden Chromosomenstücks stets in einen bestimmten Bereich des gleichen Rapschromosoms erfolgte (A.M. CHÈVRE/INRA, Le Rheu, pers. Mitteilung; LOMBARD & DELOURME 2001). Daher ist von bestimmten *hot spots* für Rekombinationen (cf. PETES 2001) zwischen den Genomen der beiden beteiligten Arten auszugehen. Die Resistenzeigenschaften von *B. juncea* (Indischer Senf, Rutenkohl;  $2n=36$ , KARPETCHENKO 1924) bilden auch den Hintergrund einer der nachfolgend (Kap. 2.1.1.4 ff.) beschriebenen Gruppe von Linien aus interspezifischen Kreuzungen. *B. juncea* kommt in der ssp. *integrifolia* (West) Thell. (Indischer Braunsenf) und in der ssp. *juncea* (Rumänischer Sareptasenf) vor. Die bis zu einem Meter große, einjährige Sommerpflanze ist weltweit verbreitet (Euro-Sibirische und Irano-Turanische Florenregion, Entstehungszentrum wohl Naher Osten, möglicherweise mehrfache Ursprungshybridisierungen zwischen Elterntaxa; WARWICK *et al.* 2000). *B. juncea* tritt bei uns als Neophyt an Ruderalstellen auf und ist in Kanada, Asien und Australien eine wichtige ölliefernde Pflanze (Zuchtziel Canola-Qualität, Kap. 1.1). Sie wird auch zur Mostrichbereitung und medizinisch genutzt (FRANKE 1989, ROTHMALER 1987). Als Alternative zu bisherigen Resistenzen, die sich hauptsächlich von der französischen Rapsorte „Jet Neuf“ und *Brassica*-Arten mit dem B-Genom ableiten, nimmt die Bedeutung von Wildarten der Familie *Brassicaceae* zu. Deren oft hoher Resistenzgrad ist von besonderem Wert, da seit einigen Jahren australische Isolate, wie z. B. M1, bekannt sind (siehe Abschnitt 1.2), die die bisher als weitgehend stabil und absolut geltende B-Genom-Resistenz, insbesondere die von *B. juncea*, durchbrechen können (SALISBURY & BALLINGER 1993, PURWANTARA *et al.* 1998). Für diese Arbeit sind vor allem Resistenzen aus *C. monensis* und *S. arvensis* relevant.

### ***Coincya monensis***

Die Gattung *Coincya* Rouy (cf. GÓMEZ-CAMPO *et al.* 2001) umfaßt zahlreiche Wildarten, deren Verbreitungsschwerpunkt in Westeuropa liegt. Sie besteht aus 14 Taxa, die sechs Arten, fünf Unterarten und drei Varietäten beinhalten (LEADLAY & HEYWOOD 1990). *C. monensis* (L.) Greuter & Burdet (Schnabelsenf, hier gewählte Genombezeichnung: ComCom) ist aufgrund der Vielzahl auch noch in der jüngeren Literatur verwendeter Synonyme [z. B. *Brassica monensis* (L.) Hudson, *Erucastrum monensis* (L.) Link, *Sinapis monensis* (L.) Bab., *Rhynchosinapis monensis* (L.), *Hutera monensis* (L.) Gómez-Campo; LEADLAY & HEYWOOD 1990, PLÜMPER 1995, MORISAWA 2000] ein gutes Beispiel für den stetigen, oft verwirrenden Wandel in der Taxonomie der *Brassicaceae*. Für die fünf Unterarten von *C. monensis* werden nochmals ca. 130 Synonyme verwendet (MARTIN 2002). Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf *C. monensis* ssp. *recurvata* (All.) Leadlay [syn. *C. pseuderucastrum* (Brot.) Greuter & Burdet, *Brassicella erucastrum* O. E. Schulz, *C. cheiranthos* (Vill.) Greuter & Burdet, *Rhynchosinapis cheiranthos* (Vill.) Dandy u. a.; LEADLAY & HEYWOOD 1990]. *C. monensis* (annuell bis perennierend, Euro-Sibirische Florenregion; WARWICK *et al.* 2000) kommt hauptsächlich in West- und Südeuropa, aber auch im Norden Marokkos und seit den 50er Jahren in den USA (hauptsächlich im Osten, NACZI & THIERET 1996) vor (LEADLAY & HEYWOOD 1990, WARWICK *et al.* 2000). Die Pflanzen sind überwiegend an Feldern, Wegen und Straßen, aber auch entlang sandiger Flüsse und in felsigen Gebieten in Höhen von 0-3200 Metern zu finden (MARTIN 2002). Von *C. monensis* sind neben der diploiden ( $2n=24$ ) auch tetraploide Formen ( $2n=48$ ) bekannt (WRIGHT 1936, KÜPFER 1969, QUEIRÓS 1973, VIOQUE & PASTOR 1995, cf. LEADLAY & HEYWOOD 1990). Die oft sehr unterschiedlich geformten Blätter und der Stamm der etwa 30-100 cm hohen Pflanze sind fein behaart und bläulich-grün bis grau-grün. Die hellgelben Blüten, die schwach braune bis violette Äderungen aufweisen, sind traubenförmig angeordnet und entsprechen in ihrem Aufbau denen des Rapses (NACZI & THIERET 1996). Die 4-7 cm langen Schoten setzen 15-20 Samen an (LEADLAY & HEYWOOD 1990). Im Vergleich zu den Schoten der Gattung *Brassica*, die nur eine Äderung aufweisen, haben die Schoten von *C. monensis* 3-5 Äderungen (MARTIN 2002).

Bisher wurde *C. monensis* als Genressource und Partner in interspezifischen Kreuzungen nur wenig beachtet. HARBERD & MCARTHUR (1980) berichten von Kreuzungen mit *B. oleracea* bzw. *Diplotaxis tenuifolia*, die auch bei Anwendung der Embryokultur nur im Fall von *C. monensis* (als *Hutera cheiranthos*) als Pollenelter zu Hybriden führten. Eine ebenfalls sexuelle Hybridisierung von *C. monensis* (als *Rhynchosinapis cheiranthos*) x *B. nigra* beschreibt MATTSON (1988).

OSHIMA (2000) zeigte die phylogenetische Zugehörigkeit von *C. monensis* ssp. *recurvata*, bei ihm als *C. pseuderucastrum* bezeichnet, zur *nigra*-Gruppe (Abb. 1.9).

### ***Sinapis arvensis***

Der Ackersenf, *Sinapis arvensis* L. [syn. *Brassica arvensis* (L.) Rabenh., *B. sinapistrum* Boiss., *B. kaber* (DC.) L.C. Wheeler u. a.; WARWICK *et al.* 2000;  $2n=18$ , KARPETCHENKO 1924, Genom SarSar], eine annuelle, kosmopolitisch verbreitete Wildcrucifere der Mediterranen, Irano-Turanischen und Saharo-Sindischen (fraglich: Euro-Sibirischen, Amerikanischen) Florenregion (WARWICK *et al.* 2000), bevorzugt nährstoffreiche, lehmige Äcker und mäßig trockene bis frische Ruderalstellen (ROTHMALER 1987). Die Samen dieser alten Arzneipflanze enthalten Senföl und

sind reich an Erucasäure (BETTACH *et al.* 1996). Untersuchungen auf den verschiedensten Ebenen, auf die im Kapitel 4.1.3 näher eingegangen wird, untermauern die in Abbildung 1.9 dargestellte nahe Verwandtschaft zwischen *S. arvensis* und *B. nigra*.

WARWICK *et al.* (2000) geben über 40 verschiedene, zumeist sexuelle Hybridisierungen von *S. arvensis* mit Arten der Tribus *Brassiceae* an. Mittels *embryo rescue* erzielte Hybriden aus *B. napus* x *S. arvensis* beschreiben u. a. HARBERD & MCARTHUR (1980), INOMATA (1988), KERLAN *et al.* (1992 und 1993), BING *et al.* (1991 und 1995), LEFOL *et al.* (1996) und MOYES *et al.* (1999); INOMATA (1997) berichtet von einer BC<sub>1</sub>, erstellt aus einer solchen Hybride (Rückkreuzung mit *B. napus*). Die von PLÜMPER (1995) mit *C. monensis* bzw. *S. arvensis* durchgeführten Kreuzungen sind Grundlage von Teilen dieser Arbeit (Kap. 2.1.1.2 ff., cf. WINTER *et al.* 1999, 2003a & b, SNOWDON *et al.* 2000).

Weitere Resistenzen gegen *L. maculans* sind u. a. für Arten der Gattungen *Diplotaxis* DC. und *Raphanus* L., *Hirschfeldia incana* (L.) Lagrèze-Fossat (SALISBURY 1987, PLÜMPER 1995, CHEN & SÉGUIN-SWARTZ 1999) sowie für *Eruca vesicaria* (L.) Cav., *E. pinnatifida* (Desf.) Pomel (PLÜMPER 1995, TEWARI *et al.* 1996), *Sinapis alba* L. (GUGEL & SÉGUIN-SWARTZ 1997) und *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (BRUN & TRIBODET 1995, CHEN & SÉGUIN-SWARTZ 1999, BOHMAN *et al.* 2002) beschrieben.

## 1.4 Resistenzmechanismen bei Pflanze-Pathogen-Interaktionen

Die Resistenzmechanismen im Zusammenhang mit dem Erreger der Wurzelhals- und Stengelfäule sind noch nicht hinreichend verstanden. Die Ausprägung der Resistenz in den Blättern wird durch eine schnelle Nekrose der Zellen im Bereich der Kontaktstelle mit dem Pathogen (CHEN & HOWLETT 1996) vermittelt. Die Akkumulation von Kalzium (ANNIS & GOODWIN 1997) bzw. Lignin (HAMMOND & LEWIS 1987) dürfte im Zusammenhang mit Stengelresistenz stehen. XI & MORRALL (1993) beobachteten in frühen Entwicklungsstadien in der Epidermis und im Cortex symptomloser Pflanzen auffällig dünne Hyphen (Durchmesser 2,1 µm); hingegen wiesen Genotypen mit Symptomen in späten Stadien dicke Hyphen (Durchmesser 5,7 µm) auf.

Erkennungs- und Abwehrreaktionen in Pflanze-Pathogen-Interaktionen sind Gegenstand intensiver Forschung. Aktuelle *Reviews* finden sich z. B. bei GLAZEBROOK (1999), DANGL & JONES (2001), DIXON (2001), HEITEFUSS (2001), PRELL & DAY (2001) und DIXON *et al.* (2002). An dieser Stelle soll lediglich kurz auf grundlegende Konzepte und Begriffe eingegangen werden (siehe auch Kap. 4). Einen wenig spezifischen, passiven Infektionsschutz bieten physikalische Barrieren wie epicuticuläre Wachsschichten oder Zellwandverstärkungen. Bei letzteren kommt es zur Akkumulation phenolischer Substanzen, z. B. von Lignin, oder von Kallose. Sowohl bei der Resistenz der *Brassica*-Arten mit dem B-Genom als auch bei der der Wildarten ist von einer hypersensitiven Reaktion (HR) auszugehen. Diese ist die verbreitetste, schnellste (schon nach wenigen Stunden wirksam) und radikalste Resistenzreaktion gegen biotrophe Pathogene (PRELL & DAY 2001). Durch die oben beschriebene Nekrose wird der Erreger von der Nährstoffzufuhr abgeschnitten und kann sich nicht weiter im Wirt verbreiten. Der HR liegt entweder eine Art von programmiertem Zelltod zugrunde, oder aber die Freisetzung giftiger Substanzen oder freier Radikale führt zum Absterben der Zellen.

Ein aktuelles Thema der Phytopathologie und der Resistenzzüchtung ist die systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR). Hierbei zeigt die Pflanze bei weiteren Infektionen eine erhöhte Resistenz, die auch in anderen Bereichen der Pflanze wirksam sein kann. Ein solcher Schutz kann sechs Wochen oder länger andauern. Die SAR ist entweder Folge einer inkompatiblen Interaktion oder einer HR. Hierbei ist notwendig, daß das erstinfizierende Pathogen eine nekrotische Läsion bewirkt. Die SAR-Gene, z. B. die PR- (*pathogenesis related*) Gene, werden infolge der Primärinfektion eingeschaltet und sowohl lokal als auch systemisch exprimiert. Während der SAR steigt in der Pflanze der Gehalt an Salicylsäure an, diese breitet sich vom Ort der HR in andere Bereiche aus (GLAZEBROOK 1999, PRELL & DAY 2001). TOAL & JONES (1999) induzierten eine SAR gegen *Sclerotinia sclerotiorum* im Raps durch Spray-Behandlung des untersten Blattes (5-Blatt-Stadium) mit 1 ml 20 mM Oxalsäure.

STORCK & SACRISTÁN (1995) vermuteten bei *S. arvensis* die Beteiligung von Phytoalexinen an der Resistenzantwort gegenüber *L. maculans*, da diese bei der Wildart, verglichen mit *B. napus*, sehr schnell nach der Infektion synthetisiert wurden. PEDRAS & OKANGA (2000) zeigten Unterschiede im Metabolismus der Detoxifikation des Phytoalexins Brassinin zwischen aggressiven und nicht-aggressiven Isolaten von *L. maculans* sowie *Alternaria brassicae* und betonten die antifungale Aktivität der Dithiocarbamate.

Die Genetik der Wirt-Pathogen-Interaktion wird mit der Gen-für-Gen-Hypothese (FLOR 1956) beschrieben. Danach kommt es zur Inkompatibilitätsreaktion (Resistenz), wenn der Wirt über ein bestimmtes Resistenzgen (*R*-Gen) und der Erreger über das entsprechende Avirulenzgen (*avr*-Gen) verfügt. In allen anderen Fällen, so beim Vorliegen eines Virulenzgens beim Pathogen, bricht die Krankheit aus (kompatible Interaktion). Die Gen-für-Gen-Interaktion beschreibt eine rassenspezifische Resistenz und wird mit dem Elicitor-Rezeptor-Modell (GABRIEL & ROLFE 1990) erklärt. Dieses besagt, daß das Resistenzgen für ein Transmembran-Protein (Rezeptor) kodiert, das einen vom komplementären Avirulenzgen gebildeten Elicitor sehr spezifisch bindet. Der Rezeptor-Elicitor-Komplex setzt dann eine Signaltransduktionskaskade in Gang, die die zur Resistenzreaktion führenden Gene aktiviert.

Ein alternatives Konzept betont, Erkenntnisse aus tierischen Systemen auf die Phytopathologie (GILCHRIST 1998) und insbesondere auf die *B. napus*-*L. maculans*-Interaktion (COWLING *et al.* 2003) übertragend, die Rolle der Apoptose bei der Ausprägung der Anfälligkeit. Danach stimulieren nekrotrophe Bakterien und Pilze einen Enzymweg, die Caspase-Kaskade, der zu Kern-Desintegration und Zellkollaps, dem programmierten Zelltod führt. Dies wird als Voraussetzung für die Infektion des Wirtsgewebes angesehen. Caspasen gehören zu einer konservierten Familie von Cystein-Proteasen mit Aspartat-Spezifität. COWLING *et al.* (2003) zeigten, daß Applikationen von tierischen Caspase-Inhibitoren im Zusammenhang mit *L. maculans*-Inokulationen zu verringerten Blattläsionen bei *B. napus* führten. Caspase-Inhibitoren werden als Apoptose-Hemmer angesehen, die neue Perspektiven für die Resistenzzüchtung eröffnen.

## 1.5 Anwendungen molekular-cytogenetischer Methoden bei Pflanzen

Der Wert der Genomischen *in situ*-Hybridisierung (GISH) zur Charakterisierung intergenerischer *Brassica*-Hybriden ist in den letzten Jahren mehrfach verdeutlicht worden. Sie wurde

beispielsweise von SKARZHINSKAYA *et al.* (1998) an somatischen Hybriden aus *B. napus* (+) *Lesquerella fendleri* sowie von SNOWDON *et al.* (1998 & 2000) an *B. napus-Raphanus sativus*-Hybriden bzw. *B. napus-S. arvensis*-Rückkreuzungsnachkommen angewendet. Die Analysen der letztgenannten Nachkommenschaften sind auch Teil dieser Arbeit. Die Erzeugung rekombinanter Rapslinien ( $2n=38$ ) mit Introgressionen, die z. B. Resistenzgene tragen, aus verwandten Arten ist jedoch bisher weitestgehend auf interspezifische Hybridisierungen innerhalb der Gattung *Brassica* beschränkt (ROY 1978, SACRISTÁN & GERDEMANN 1986, CHÈVRE *et al.* 1997, BARRET *et al.* 1998, WINTER & SACRISTÁN 1998). Die Lokalisierung solcher Introgressionen mittels GISH oder FISH (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) wurde bisher kaum gezeigt. Die wenigen Ausnahmen werden im Zusammenhang mit den Limitierungen derartiger Techniken im Kapitel 4.2 diskutiert. Intergenerische Rückkreuzungsprogramme verbleiben hingegen oft auf der Stufe von Additionslinien (KANEKO *et al.* 2001), wobei die Extrachromosomen durch *in situ*-Hybridisierungen identifiziert werden konnten (FAHLESON *et al.* 1997, SNOWDON *et al.* 1998, BUDAHN *et al.* 2000). Als effektive FISH-Marker, nicht nur für *Brassica*-Chromosomen, haben sich klonierte Gene für verschiedene rRNAs erwiesen (SCHRADER *et al.* 2000, HASTEROK *et al.* 2001, SNOWDON *et al.* 2002). Die Unterscheidung der Chromosomen der monogenomischen Ausgangsarten in den amphidiploiden (allotetraploiden) *Brassica*-Arten mit dem B-Genom, *B. juncea* und *B. carinata* (siehe Kapitel 1.4), mittels GISH und FISH ist inzwischen Standard der molekularen Cytogenetik (SNOWDON *et al.* 1997a). Dies dient auch als Kontrolle in Untersuchungen an Rekombinations-, Additions- oder Substitutionslinien, die sich von interspezifischen Kreuzungen ableiten, wie beispielsweise in der vorliegenden Arbeit. Hingegen gilt aufgrund der größeren Homöologie zwischen dem A- und dem C-Genom eine klare Unterscheidung der jeweiligen Chromosomen in *B. napus* (Abschnitt 1.1) mit GISH als unmöglich. SNOWDON *et al.* (2002) konnten anhand vergleichender FISH-Analysen der 5S- und 25S-rDNA-Loci unter Einbeziehung von *B. rapa* (Genom AA) und *B. oleracea* (CC) eine derartige Zuordnung der Rapschromosomen zum A- bzw. C-Genom vornehmen.

GISH-Studien zur Identifizierung meiotischer B-Genom-Chromosomen in *Brassica*-Arthybriden und ihres Paarungsverhaltens (BELLIN & DOS SANTOS 2002) zeigen neue Chancen zur Analyse der cytologischen Stabilität von Rekombinationslinien und zum Verhalten von Extrachromosomen in Additionslinien auf. Beiträge zur physikalischen Kartierung von *Brassica*-Chromosomen erbrachten FISH-Untersuchungen mit repetitiven bzw. *low copy*-Sequenzen aus *Arabidopsis*-BAC-Klonen an Pachytän-Chromosomen (ARMSTRONG *et al.* 1998, ZIOLKOWSKI & SADOWSKI 2002).

Darüber hinaus liegen insbesondere für die Familien *Poaceae*, *Liliaceae* und *Solanaceae* viele Berichte über FISH- und GISH-Analysen vor. Dies dürfte im Zusammenhang mit den auch in diesen Familien vielfach vorkommenden Phänomenen wie Polyploidie und Fähigkeit zu interspezifischen Hybridisierungen stehen. An somatischem Gewebe erfolgten GISH-Untersuchungen u. a. in partiellen Weizen-*Thinopyrum*-Amphiploiden (FEDAK *et al.* 2000), in somatischen Mais-Weizen-Hybriden (SZARKA *et al.* 2002) sowie zur taxonomischen Analyse des genomischen Zusammenhangs von Arten der Gattung *Allium* (FRIESEN & KLAAS 1998). HOU & PEFFLEY (2000) konnten rekombinante Chromosomen aus *Allium cepa*-*A. fistulosum*-Rückkreuzungen mittels GISH identifizieren. FALISTOCCO *et al.* (2002) nutzten sowohl GISH als auch FISH mit rDNA-Sonden zur Verwandtschaftsanalyse in der Gattung *Medicago*. Die gleiche Methodik erlaubte

GARRIGA-CALDERÉ *et al.* (1998) Aussagen zur Transmissionsrate von sieben verschiedenen monosomen Tomatenchromosomen in BC<sub>1</sub>- und BC<sub>2</sub>-Nachkommenschaften aus *Solanum tuberosum* (+) *Lycopersicon esculentum*. GISH-Studien ermöglichten die Unterscheidung parentaler Genome in interspezifischen somatischen *Solanum*-Hybriden (GAVRILENKO *et al.* 2002), in der amphidiploiden Art *Coffea arabica* (RAINA *et al.* 1998) und in der synthetischen Getreideart *Triticale* (Weizen- und Roggenchromosomen; z. B. eigene, unveröffentlichte Arbeiten). FISH-Analysen unter Nutzung telomerischer und centromerischer *repeats* sowie von rDNA-Loci dienten HIZUME *et al.* (2002) zur Karyotypenanalyse bei vier *Pinus*-Arten. Die Lokalisierung von Transgenen durch FISH konnte von SNOWDON *et al.* (2001) bei *Vicia faba* gezeigt werden. Analysen von Pachytän-Chromosomen führten z. B. zur Erstellung physikalischer Karten bei *Medicago truncatula* (KULIKOVA *et al.* 2001) und zur Kartierung eines Gens der Tomate (TÖR *et al.* 2002). Meiotische Chromosomenpaarungen in intergenerischen Hybriden aus *Festuca mairei* x *Lolium perenne* untersuchten CAO *et al.* (2000) mit GISH. LIM *et al.* (2001) fanden bei GISH- und FISH-Analysen der Mikrosporogenese interspezifischer *Lilium*-Hybriden einen neuen Mechanismus der Restitutionskernbildung und Evidenz für intergenomische Rekombinationen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel des Promotionsvorhabens bestand in der Entwicklung genetisch stabiler rekombinanter Rapslinien (*Brassica napus*, 2n=38) mit wirksamen, möglichst züchterisch relevanten (Adult-) Resistenzen gegen die weltweit wichtigste Rapskrankheit, die Wurzelhals- und Stengelfäule. Diese wird durch den Ascomyceten *Leptosphaeria maculans* hervorgerufen. Die Arbeiten basieren auf ursprünglich von PLÜMPER (1995) bzw. SACRISTÁN & GERDEMANN (1986) durchgeführten interspezifischen Kreuzungen des Rapses mit den Resistenzdonoren *Coincya monensis* (Schnabelsenf, 2n=24), *Sinapis arvensis* (Ackersenf, 2n=18) bzw. *B. juncea* (Indischer Senf, 2n=36). Das Resistenzverhalten wurde mit zwei aggressiven (Tox<sup>+</sup>-)Isolaten des Pilzes, W4 aus Deutschland und M1 aus Australien, geprüft. Hierbei interessierte, ob ein Zusammenhang zwischen Kotyledonen- und Adultresistenz besteht, der gegebenenfalls einen Schnelltest zur hinreichenden Abschätzung der Resistenzsituation ermöglicht. Darüber hinaus wurde versucht, weitestmögliche Aussagen zur Genetik der jeweiligen Resistenzen in den drei Rückkreuzungsgruppen zu treffen. Ebenfalls bestand ein Interesse daran, einige der entwickelten Linien sowie Kontrollgenotypen in Feldversuchen nach Inokulation mit dem Isolat W4 zu testen. Desweiteren sollten mittels Genomischer *in situ*-Hybridisierung (GISH) Aussagen zur Genomstruktur der Rückkreuzungslinien und zur chromosomalen Lokalisation der Resistenzen ermöglicht werden. Mit Hilfe der Methode der *bulk segregant analysis* wurde versucht, RAPD-PCR-Marker für Adultresistenzen zu finden. Meiose-Analysen dienten der Einschätzung der cytologischen Stabilität der Linien.

Ausgewählte Ergebnisse der *B. napus*-*C. monensis*- und der *B. napus*-*B. juncea*-Linien wurden beispielsweise bereits bei WINTER *et al.* (1999, 2003a & b), die der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien darüber hinaus auch bei SNOWDON *et al.* (2000) veröffentlicht.