

## 4 DISKUSSION

Die vorgestellten Untersuchungen bilden den vorläufigen Abschluß von Projekten zur Übertragung von Resistenzen gegen *Leptosphaeria maculans* aus verwandten Arten in den Raps, *Brassica napus*. Diese Arbeiten wurden seit nahezu zwei Jahrzehnten am heutigen Institut für Biologie - Angewandte Genetik - der Freien Universität Berlin durchgeführt. Der Ascomycet *L. maculans* (*Phoma lingam*) ist der Erreger der Wurzelhals- und Stengelfäule (*blackleg*, *stem canker*), der weltweit wichtigsten Rapskrankheit. Diese wird im allgemeinen für Ernteverluste zwischen zehn und 20 Prozent verantwortlich gemacht; frühere Epidemien führten jedoch auch zu Totalausfällen der Ernte (Kap. 1.2).

Die Ergebnisse basieren auf der Erstellung der Originalkreuzungen und der Analyse früher Rückkreuzungsnachkommenschaften durch SACRISTÁN & GERDEMANN (1986; Resistenzen aus dem Indischen Senf, *B. juncea*) und PLÜMPER (1995; Resistenzen aus dem Ackersenf, *Sinapis arvensis*, bzw. dem Schnabelsenf, *Coincya monensis*).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Entwicklung rekombinanter adultresistenter Rapslinien mit Resistenzen aus *C. monensis*, *S. arvensis* bzw. *B. juncea*. Diese sollten den Raps-Karyotyp zeigen, cytologisch stabil sein und hinsichtlich der Genetik der Resistenzen analysiert werden. Das Resistenzverhalten wurde gegenüber zwei aggressiven *L. maculans*-Isolaten, W4 aus Deutschland und M1 aus Australien, geprüft. Letzteres gehört zu seit einigen Jahren bekannten Isolaten, die in der Lage sind, die lange Zeit als stabil und absolut geltende Resistenz der B-Genom-Arten, insbesondere die von *B. juncea*, zu durchbrechen. Hier interessierte die Interaktion dieses Isolats mit den am Institut entwickelten *B. napus*-*B. juncea*-Linien, aber auch das diesbezügliche Verhalten der Nachkommen mit Resistenzen aus den Wildcruciferen *C. monensis* und *S. arvensis*. Darüber hinaus bestand ein wesentliches Ziel der Promotion in der Aufklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Resistenz auf Kotyledonenebene und Adultresistenz (im Wurzelhals- und Stengelbereich) der Pflanze. Die umfangreichen Resistenztests wurden stets von cytologischen Untersuchungen begleitet. Dabei diente insbesondere die Methode der Genomischen *in situ*-Hybridisierung (GISH) der Analyse der Genomstruktur der Rückkreuzungslinien. So wurde versucht, mittels GISH detektierte Chromosomen der Donorart im Raps-Hintergrund früher Rückkreuzungsgenerationen mit einem bestimmten Resistenzverhalten in Beziehung zu bringen. Die Feststellung von Rückkreuzungsnachkommen mit Raps-Karyotyp ( $2n=38$ , keine Additions- oder Substitutionschromosomen der verwandten Art) war die Voraussetzung für Kreuzungsexperimente zur Analyse der Genetik der Resistenzen. Desweiteren bestand ein Interesse an der Lokalisation möglicher resistenztragender Introgressionen in Rapschromosomen. PCR-Untersuchungen zur Suche nach RAPD-Markern für Adultresistenzen ergänzten diese Experimente.

### 4.1 Resistenztests, Rückkreuzungsprogramme und Resistenzgenetik

#### 4.1.1 Allgemeines

##### 4.1.1.1 Test mit Doppelinokulation als Methode der Wahl

In der Anfangsphase der Arbeiten an der Promotion wurde zur Klärung einer möglichen Beziehung zwischen Kotyledonen- und Adultresistenz der Test mit Doppelinokulation entwickelt.

Insbesondere nach Inokulation mit dem australischen Isolat M1 erwies sich eine mehrtägige Verweildauer der Jungpflanzen in einem Foliencel mit möglichst konstant hoher Luftfeuchtigkeit im unmittelbaren Anschluß an die Kotyledoneninokulation als erforderlich. Nur so konnte bei anfälligen Genotypen eine gleichmäßige Symptomausprägung über alle Pflanzen hinweg erzielt werden. Durch diesen, an das System Gewächshaus adaptierten und optimierten Test werden umweltabhängige Schwankungen in der Symptomausprägung weitgehend nivelliert. Er ist somit für Studien zur Genetik der Resistenzen besonders geeignet.

Gegenüber den anderen Adulttests unter kontrollierten Bedingungen (Adulttest an kotyledoneninokulierten Pflanzen, Stengelbasistest) konnte im Test mit Doppelinokulation eine verstärkte Symptomausprägung bei anfälligen oder nur moderat-resistenten Genotypen beobachtet werden (Kap. 3.3). Das läßt darauf schließen, daß systemisch erworbene Resistenz (cf. PRELL & DAY 2001, Kap. 1.4) bei guten Testbedingungen im „System Doppelinokulation“ keine Rolle spielt.

Unter deutlich suboptimalen Bedingungen kam es jedoch nur zu einer unzureichenden Symptomentwicklung. Diese Ergebnisse finden sich teilweise in den Tabellen 3.3, 3.4 und 3.7 wieder. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Applikation von Fungiziden (gegen andere Pilze!) und Insektizidbehandlungen in den sensitiven Phasen kurz vor bzw. kurz nach den Kotyledonen- und Stengelbasisinokulationen zu nennen. Die auf mehreren Versuchen begründete Evidenz für eine zu weitgehender Kotyledonen-Symptomlosigkeit führende Interaktion systemischer Fungizide mit *L. maculans* verwundert kaum. So ist zwar beispielsweise für das Bayer-Präparat Baymat flüssig (Wirkstoff: Bitertanol), in zwei Versuchen drei bzw. vier Tage vor der Kotyledoneninokulation angewendet, ein anderes Wirkungsspektrum („gegen Echten Mehltau, Rost- und Sternrußtau an Rosen und gegen Echte Mehltaupilze und Rostkrankheiten im Zierpflanzenbau“) angegeben. Jedoch handelt es sich bei diesen Pilzen ebenfalls um Ascomyceten. Eine durch das Fungizid deutlich verringerte Virulenz der applizierten *L. maculans*-Sporen ist ebenso möglich wie eine chemisch induzierte systemische Resistenz (ähnlich der systemisch erworbenen Resistenz, siehe unten). Jedoch erscheint auch der hemmende Einfluß von Insektizidgaben auf die Ausprägung der Kotyledonensymptome in Gewächshautests naheliegend. Dies betrifft z. B. die Pflanzenschutzmittel Confidor WG 70 (Bayer, Wirkstoff: Imidacloprid) und Danadim Dimethoat 40 (Cheminova Agro., Wirkstoff: Dimethoat), sowohl in vom Autor durchgeführten Versuchen als auch in Untersuchungen, die nicht Teil dieser Doktorarbeit waren (K. STERENBERG/IAG, pers. Mitteilung). Der zunächst verwundernde Einfluß von Insektiziden ist nicht auf eine lediglich verdünnende Wirkung der Pflanzenschutzmittelsuspension zurückführbar. Er könnte auf einer unspezifischen Wirkung auf die auskeimenden Pilzsporen, wahrscheinlicher aber noch auf einer Verringerung des Penetrations- bzw. läsionsbildenden Ausbreitungsvermögens der Hyphen von *L. maculans* im Keimblatt bzw. Stengelbasisbereich der Pflanzen beruhen. Für letztere These und ein Anschalten von Verteidigungsmechanismen in der Pflanze spricht die auf eine mangelnde Kotyledonensymptomatik in der Regel folgende geringere Adultanfälligkeit. In derartigen Fällen zeigten anfällige Genotypen die Charakteristika einer systemisch erworbenen Resistenz, so wie von MAHUKU *et al.* (1996) für eine Co-Infektion von nicht-aggressiven ( $Tox^0$ ) und aggressiven ( $Tox^+$ ) Isolaten von *L. maculans* beschrieben. Das somit zumindest partiell inaktivierte  $Tox^+$ -Isolat dürfte nunmehr, ähnlich wie ein  $Tox^0$ -Isolat, nach Inokulation zu einer inkompatiblen Interaktion mit der eigentlich anfälligen Pflanze führen. Die Antwort der Pflanze entspräche einer

hypersensitiven Reaktion (HR), die zur Bildung einer nekrotischen Läsion und nachfolgend zur lokalen und systemischen Expression von SAR-Genen führt.

Vom gärtnerischen Personal zunächst routinemäßig durchgeführte Anwendungen derartiger Fungizide und Insektizide, denen damals noch keine Aufmerksamkeit geschenkt wurde, könnten auch ursächlich für die im Kapitel 3.1.4.1 beschriebene Symptomarmut an Kotyledonen und adulten Pflanzen bei den frühen Tests in der Klimakammer sein. Eventuell verstärkte die konstant hohe Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer sogar noch die Wirkung auf die Kotyledonen. Auf Klimakammertests wurde später wegen der mangelnden Symptomausprägung zugunsten von Tests im Gewächshaus verzichtet.

Einen ebenfalls hemmenden Einfluß auf die Ausprägung der Symptome im Wurzelhals- und Stengelbereich bei Gewächshaustests hatten Fraßschäden durch Larven des Großen Kohlweißlings (*Pieris brassicae*, Abb. 3.13i). Auch bei vereinzelt Befall durch Fremdpathogene wie *Xanthomonas* spp. (Abb. 3.13j) oder *Plasmodiophora brassicae* (Abb. 3.13k) ist von einer Abschwächung der typischen *L. maculans*-Symptomatik auszugehen. Derartige Effekte dürften ebenso auf einer systemisch erworbenen Resistenz beruhen, wenngleich von Insektenfraß hervorgerufene Schädigungen unter Feldbedingungen auch eine den Befall von *L. maculans* verstärkende Wirkung haben (siehe Kap. 1.2 & 4.1.1.2).

Der hier praktizierte Test mit Doppelinokulation stellt, auch international gesehen, die mit Abstand härteste und invasivste Methode der *L. maculans*-Phytopathologie dar. Zumeist wird lediglich das Resistenzverhalten auf der Ebene der Kotyledonen (CHÈVRE *et al.* 1997, BALESSENT *et al.* 2001, ROUXEL *et al.* 2003) oder der Blätter (DIXELIUS 1999, BOHMAN *et al.* 2002) geprüft. In züchterisch relevanteren Untersuchungen wurde die Adultresistenz bzw. -anfälligkeit der Pflanzen nach Stengelbasisinokulation ermittelt (SACRISTÁN & GERDEMANN 1986, PLIESKE *et al.* 1998, ZHU & RIMMER 2003). Dem stehen die für praktische Anwendungen bedeutendsten Tests unter Feldbedingungen (z. B. WEST *et al.* 2002b) bzw. kombinierte Feld-Gewächshaus-Tests („Winkelmann-Test“: zunächst natürliche Infektion im Feld, nach einigen Wochen Weiterkultivierung einer Pflanzenstichprobe im Gewächshaus; H. WINKELMANN/NPZ, pers. Mitteilung) gegenüber. Wie die hier präsentierten Daten zeigen, erlaubt der Test mit Doppelinokulation eine akkurate vergleichende Einschätzung des Resistenzverhaltens der einzelnen Pflanze auf der Keimlings- (Kotyledonen-) und der Adultebene. Die Ergebnisse bei allen drei Resistenzgruppen verdeutlichen, daß Kotyledonenresistenz kein geeigneter Indikator für Adultresistenz ist. Beide beruhen auf unterschiedlichen Genen. Dieser fehlende Zusammenhang ist schon in der Vergangenheit, wenn auch nicht auf Einzelpflanzenniveau, mehrfach bei *B. napus* gezeigt worden (CARGEEG & THURLING 1979, SACRISTÁN 1982, WITTERN & KRÜGER 1985, PANG & HALLORAN 1996b). Demgegenüber existieren jedoch auch anderslautende Berichte (JOHNSON & LEWIS 1994, KUTCHER *et al.* 1993). Eine intermediäre Position in dieser „Grundsatzfrage“ nehmen ZHU & RIMMER (2003) ein. Ihre Untersuchungen zeigen für die Interaktion des Rapses mit einem weniger virulenten Isolat der Pathogenitätsgruppe 2 eine monogene Vererbung sowohl für Kotyledonen- als auch für Adultresistenz, wobei die Resistenzen zwar auf verschiedenen, aber gekoppelten Genen beruhen.

Da in der vorliegenden Arbeit aber drei verwandte Arten des Rapses als Resistenzdonor fungierten, muß die fehlende Indikatorfunktion der Kotyledonenresistenz für die Adultresistenz

als zentrale Aussage auch hier betont werden. Über mit der Gattung *Brassica* verwandte Arten gibt es bisher kaum Veröffentlichungen, die den Zusammenhang zwischen beiden Resistenzen betreffen. PLÜMPER (1995) konstatierte für *Raphanus sativus* Kotyledonenresistenz gegenüber den Tox<sup>+</sup>-Isolaten 63698 und W4 von *L. maculans* sowie Adultanfälligkeit (Note 2 einer Skala von „0“ bis „4“) gegenüber 63698. Ansonsten betonte der Autor jedoch, daß alle weiteren von ihm untersuchten Kultur- und Wildarten der Tribus keine Unterschiede in ihrem Resistenzverhalten auf Kotyledonen- und Adultebene zeigten. Diese Aussage wird im Abschnitt 4.1.2 am Beispiel von *C. monensis* einer Methodenkritik unterzogen.

Darüber hinaus ist der Test mit Doppelinokulation aufgrund seiner Trennschärfe zwischen resistenten und anfälligen Individuen sowie durch das Einebnen umweltbedingter Differenzen im Resistenzverhalten innerhalb eines Genotyps, wie sie z. B. CARGEEG & THURLING (1979) beschreiben, wertvoll. Nicht zuletzt ist er wegen des weitgehenden Vermeidens von *Escapes*, also von Pflanzen, die aus versuchstechnischen Gründen befallsfrei bleiben, obwohl sie genetisch empfindlich sind (DIEDERICHSEN 1992), als Methode der Wahl anzusehen. Dies gilt sowohl für angewandt-genetische Untersuchungen im Wissenschaftsbereich als auch für Vorprüfungen in Zuchtbetrieben. Jedoch muß berücksichtigt werden, daß mit diesem Test auch spezifische, u. U. wertvolle Resistenzen, z. B. in der Lamina von Kotyledonen bzw. Blättern oder in den Petiolen (HAMMOND & LEWIS 1987, PANG & HALLORAN 1996b) übersehen werden können.

Der Vergleich von Tests in verschiedenen Umwelten (Klimakammer, Gewächshaus, Feld) hinsichtlich der Trennschärfe zwischen resistenten und anfälligen Individuen und der Konstanz der Symptomausprägung fällt deutlich zugunsten der Gewächshaustests aus. Auftretende Probleme bei Resistenztests in der Klimakammer wurden bereits beschrieben (S. 110, oben).

#### 4.1.1.2 Feldversuche

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Feldversuche erbrachten trotz der untenstehenden Einschränkungen wertvolle Erkenntnisse (siehe Kap. 3.2) hinsichtlich des Resistenzverhaltens, morphologischer Besonderheiten (zur Selbstungsnachkommenschaft der BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>DHS<sub>2</sub> 7/10-6 siehe Kap. 4.1.4) und Genotyp-Umwelt-Interaktionen. Die unter kontrollierten Bedingungen ermittelte Resistenz ausgewählter Genotypen aller drei Resistenzgruppen wurde in praxisnahen Verhältnissen nach Inokulation mit dem *L. maculans*-Isolat W4 im wesentlichen bestätigt. So zeigten spaltende Nachkommenschaften adultresistenter Pflanzen der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien, z. B. die der BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 9.10-18/-9 (Mischparzelle), der BC<sub>3</sub> 13.4 und der BC<sub>3</sub> 13.6, eine gegenüber anfälligen Rapsorten wie „Madora“ und „Lesira“ signifikant höhere Adultresistenz (Tab. 3.17 & 3.18). Dies war jedoch nicht in jedem Fall gegenüber dem Rückkreuzungselter *B. napus* „Ceres“ der Fall. Diese Rapsorte besitzt die partielle und moderate Adultresistenz bedingenden (Poly-) Gene der Sorte „Jet Neuf“ (siehe auch Bemerkungen zu den Gewächshausergebnissen der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien im Abschnitt 4.1.3). Die Rückkreuzungsnachkommenschaften mit Resistenz aus *S. arvensis* hatten jedoch kein mit dem Resistenzdonor vergleichbares Resistenzniveau. Hauptgrund dürfte die Tatsache sein, daß die in einer Parzelle angebauten Genotypen stets noch hinsichtlich der Resistenz aufspalteten. Verschiedene dihaploide *B. napus*-*B. juncea*-Linien mit im Gewächshaus gezeigter moderater Adultresistenz gegenüber W4 wiesen in den Feldversuchen ein erstaunlich hohes Resistenzniveau auf. Dies traf u. a. auf die Selbstungs-

nachkommen der BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>DHS<sub>3</sub> 8/10-28 zu. Hingegen war die im Gewächshaus stark anfällige BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>DHS<sub>4</sub> 4/9-1-32-... im Feld noch moderat resistent. Diese Linie verdeutlicht die prinzipielle Problematik der hier durchgeführten Feldversuche. So mußte aufgrund des natürlicherweise geringen Infektionsdrucks eine zuverlässige Inokulationsmethode entwickelt werden. Die im ersten Feldversuch noch praktizierte Sprühapplikation der Sporen mittels einer Pflanzenschutzspritze wurde nachfolgend durch die eine gleichmäßigere und kontinuierlichere Sporenabgabe garantierende Streuinokulation abgelöst. Dennoch hängt das Infektionspotential der von der Streu ausgehenden Pycnidiosporen gegenüber den Keimlingen stark von den herrschenden Wetterbedingungen nach Inokulation ab. Eine feuchte Witterung und Temperaturen um 15 °C im September gelten als förderlich (siehe auch Kap. 1.2). Auch kann eine konstante und reproduzierbare Inokulation über die Ausbringung einer definierten Menge infektiösen Streumaterials nicht hinreichend gewährleistet werden. Ebenfalls dürfte eine unterschiedliche Interaktion der einzelnen Genotypen mit Schadinsekten und Fremdpathogenen zu einer unterschiedlichen Anfälligkeit gegenüber *L. maculans* beitragen (siehe Ausführungen zur systemisch erworbenen Resistenz in Kap. 1.4 & 4.1.1.1). So erbrachten Untersuchungen von SOROKA *et al.* (2003) Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen erhöhten Glucosinolatgehalten (beispielsweise bei vielen Linien von *S. alba*) und Resistenz gegenüber *Phyllotreta* spp. (Kohlerdflöhe) und *Delia* spp. (Kohlfiegen, Wurzelfliegen). Da die in die Berliner Untersuchungen integrierten Linien sich von 00-Sorten ableiten, ist trotz der eingekreuzten verwandten Arten, die einen hohen Glucosinolatgehalt haben dürften, bei den Rückkreuzungsnachkommen ein niedriger Glucosinolatgehalt denkbar. Bei ausgewählten *B. napus*-*C. monensis*-Linien wurde dieser bereits gezeigt (O. SASS/NPZ, pers. Mitteilung). Ein solcher niedriger Glucosinolatgehalt könnte daher für die festgestellten erheblichen Insektenschadsymptome mitverantwortlich sein (Abb. 3.13z). Diese dürften sich, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, fördernd auf die Ausprägung der Schadwirkung der Wurzelhals- und Stengelfäule auswirken. Dies gilt umso mehr, als ANDREASSON *et al.* (2001) in umfangreichen Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen niedrigem Glucosinolatgehalts und Resistenzen gegen *L. maculans* nicht nachweisen konnten.

Um den Einfluß von Faktoren wie Keimverhalten und Entwicklung im Herbst sowie Auswinterungsanfälligkeit zu untersuchen, wurde eine mehrfache Datenaufnahme während der Vegetationsperiode durchgeführt. Eine vergleichende Auswertung des Resistenzverhaltens der verschiedenen Genotypen war nur mittels einer dem Vorgehen im Gewächshaus entsprechenden Einzelpflanzenbonitur im adulten Zustand (innen und außen) möglich. Dieses Vorgehen, dem ein Ausgraben und Waschen der Pflanzen vorausging, garantierte ein hinreichendes Erfassen der Unterschiede zwischen den Linien, Sorten und Akzessionen. Die in Tabelle 3.17 ebenfalls aufgeführte Parzellenbonitur (optischer Eindruck der Gesamtparzelle zum Boniturzeitpunkt) war für diesen Zweck hingegen nur wenig geeignet. Nur die stärkstbefallene Rapsorte „Lesira“ konnte damit ausreichend beschrieben werden. Das extrem arbeitsaufwendige Bonitieren auf Einzelpflanzenebene, in der züchterischen Praxis eher unüblich, erwies sich im hier nötigen Umfang als gerade noch praktikabel. Für künftige Untersuchungen kann man diese Vorgehensweise jedoch kaum empfehlen. Hier sollte eine Beschränkung auf den oben beschriebenen Test mit Doppelinokulation im Gewächshaus erfolgen. Für Feld-Resistenzprüfungen empfehlen sich - in Kooperation mit Pflanzenzüchtern - Untersuchungen an

Standorten mit natürlichem hohem Infektionsdruck. Die NPZ testet ihre Sommergenotypen beispielsweise in Westaustralien. Das im Rahmen dieser Doktorarbeit getestete Sommermaterial umfaßte im wesentlichen die *B. napus-C. monensis*-Linien. Diese standen im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen erst relativ spät zur Verfügung, so daß sie lediglich im Feldversuch 2000/01 untersucht werden konnten. Die Spaltungen in resistente und anfällige Individuen, die auch unter Feldbedingungen sowohl bei den Rückkreuzungslinien als auch beim Resistenzdonor *C. monensis* erkennbar waren, wurden durch die Ergebnisse des unter kontrollierten Bedingungen stark anfälligen Rapselters, *B. napus* „Loras“, relativiert. Dieser ist im Gesamtkontext der Genotypen (Tab. 3.17) im Feldversuch 2000/01 aufgrund lediglich mäßiger Symptomausprägung als moderat-resistent zu klassifizieren. Da auch die ansonsten ebenfalls stark anfälligen Sommerrapslinien NPZ I und II eher moderat reagierten, wurde der „Sommerversuch“ als nur bedingt auswertbar eingestuft. Hierfür werden insbesondere die für die Infektion ungünstigen Witterungsbedingungen (zu trocken) zum Zeitpunkt der Inokulation im Frühjahr 2001 verantwortlich gemacht. Auch waren an diesen Genotypen kaum Kotyledonen- oder Blattsymptome erkennbar. Des weiteren muß betont werden, daß unter natürlichen Bedingungen die von Ernterückständen der Vorsaison ausgehenden und das Primärinokulum an Kotyledonen und Blättern bildenden Ascosporen (Kap. 1.2) als virulenter als die Pycnidiosporen angesehen werden. Sie alleine sind in der Lage, schwere Epidemien hervorzurufen (GLADDERS & MUSA 1980). Darüber hinaus wird in ihnen - zumindest für Großbritannien - die Hauptursache für die üblicherweise auftretenden, nicht-epidemischen Adultschädigungen der Pflanze unter Praxisbedingungen gesehen (monozyklische Krankheit, HAMMOND & LEWIS 1986). In der vorliegenden Arbeit wurden die Pflanzen mittels einer Pycnidiosporensuspension bzw. - erfolgreicher - durch in Gewächshaus-tests anfallende Streu anfälliger Pflanzen inokuliert. Bei letzterer Methode ist aufgrund der heterothallischen und bipolaren Sexualkontrolle des Pilzes (Kap. 1.2) ebenfalls von Pycnidiosporen als Feldversuchsinokulum auszugehen. Die Verwendung dieser, bei Tests unter kontrollierten Bedingungen gebräuchlichen Sporenart (z. B. BADAWY *et al.* 1991) stellt ein Novum bei Feldbedingungen dar (Diskussion auf Blackleg Workshop anlässlich des 11<sup>th</sup> International Rapeseed Congress 2003, Kopenhagen/Dänemark). Aufgrund arbeitsorganisatorischer und methodischer Limitierungen war jedoch keine andere Vorgehensweise praktikabel.

#### 4.1.1.3 Pathogenitätsgruppenanalyse

Die in Tabelle 3.1 dargelegte Kotyledonenanfälligkeit der Differentialrapssorten „Lirabon“, „Quinta“ und „Glacier“ gegenüber den Isolaten W4 und M1 führte zur Zuordnung beider Isolate zur Pathogenitätsgruppe 4 (PG 4, höchste Pathogenität). Diese Einteilung erfolgte gemäß der „Göttinger“ Modifikation des international verwendeten System von MENGISTU *et al.* (1991, siehe auch Kap. 2.2.3.1). Da auch *B. napus* „Jet Neuf“ gegenüber beiden Isolaten kotyledonenanfällig reagierte (Tab. 3.16), gehören diese Isolate darüber hinaus nach BADAWY *et al.* (1991) zur Gruppe A1. Bei dieser höherauflösenden Klassifizierung wird die oben beschriebene PG-Gruppierung der aggressiven Isolate um den Faktor 2 erweitert. Unter den nunmehr sechs Gruppen aggressiver Isolate umfaßt A1 wiederum die virulentesten.

Während auf Kotyledonenebene keine Unterschiede zwischen den Isolaten und Rapssorten feststellbar waren, traten im Resistenzverhalten der adulten Pflanze z. T. erhebliche Differenzen

auf. *B. napus* „Jet Neuf“ reagierte in Tests mit Doppelinokulation gegenüber beiden Isolaten zumeist resistent (Tab. 3.16). Hingegen zeigte die Sorte „Quinta“ ein solches Verhalten nur gegenüber dem Isolat M1. Bei Inokulation mit W4 reagierten alle Pflanzen dieser Sorte adultanfällig. *B. napus* „Glacier“ und „Lirabon“ wiesen dagegen gegenüber beiden Isolaten mehr adultanfällige als adultresistente Pflanzen auf.

Auch anhand der Differentialrapssorten zeigte sich eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen auf Kotyledonen- und Adultebene. Diese verdeutlicht die Richtigkeit der im Abschnitt 4.1.1.1 diskutierten Ergebnisse der Rückkreuzungsnachkommen, die den fehlenden Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen zeigen. Aus diesem Grunde muß die übliche Einteilung der Pathogenität (Virulenz) von Isolaten anhand von Ergebnissen aus Kotyledonentests kritisch betrachtet werden (siehe auch Ausführungen zur Temperaturabhängigkeit der Kotyledonenresistenz in Kap. 4.1.3). Unter Zugrundelegung des Resistenzniveaus der adulten Pflanze als Pathogenitätskriterium zeigen sowohl die Resultate einiger Rückkreuzungsnachkommenschaften [z. B. BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>\* 16/1-3-2.1-..., BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>\* 16/1-3-27.16-... (beide in Tab. 3.3), BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 9.10-... (Tab. 3.7), BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 13.4-2-... (Tab. 3.7), F<sub>1</sub> aus BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>DHS<sub>3</sub> 8/10-28 x BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>DHS<sub>3</sub> 4/9-1-32 (Tab. 3.12)] als auch die von Kontrollgenotypen wie *B. napus* „Quinta“, daß das deutsche Isolat W4 eine höhere Virulenz als das australische Isolat M1 besitzt. Dies ist am engeren, jeweils zugunsten der Adultanfälligkeit (S<sub>A</sub>) verschobenen R<sub>A</sub>:S<sub>A</sub>-Verhältnis (R<sub>A</sub> = Adultresistenz) zu erkennen. Demgegenüber wiesen außer dem Sonderfall *B. juncea* lediglich die Genotypen *C. monensis* „86“ und *C. monensis* „95“ gegenüber dem Isolat M1 mehr adultanfällige Individuen auf als gegenüber W4.

#### 4.1.1.4 Bedeutung von Selbstungen in Rückkreuzungsprogrammen

Die Rückkreuzungsprogramme dieser Arbeit zeichnen sich im Vergleich zu anderen Programmen durch einen hohen Anteil an kontrollierten Selbstungen im Verhältnis zu Rückkreuzungen aus. Diese insgesamt erfolgreiche Strategie - in allen drei Gruppen konnten resistente Pflanzen mit Raps-Karyotyp selektiert werden - ist weniger arbeitsintensiv und war daher angesichts der Fülle des am Anfang bearbeiteten Pflanzenmaterials alternativlos. Jedoch konnte der verstärkte, frühzeitige Einsatz (bereits ab der BC<sub>3</sub>-Generation) von Selbstungen insbesondere im Falle der *B. napus*-*C. monensis*- und der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien nur aufgrund der spontanen Chromosomenverdopplung der jeweiligen F<sub>1</sub> (Abb. 2.1 & 2.2) erfolgen. Dadurch waren alle 38 Rapschromosomen bereits vor der ersten Rückkreuzung in der jeweiligen Hybride vorhanden. Die große Menge an Donorchromatin, z. B. zwölf Extrachromosomen von *C. monensis* in der hochgradig sterilen BC<sub>2</sub> 16/1, konnte dann über Selbstungen relativ schnell reduziert werden. Dabei erwies sich die Annahme als richtig, daß die meisten dieser Fremdchromosomen aufgrund ihres monosomen Vorkommens und der unzureichenden Homöologie sowohl zwischen den art eigenen als auch gegenüber den Rapschromosomen nicht zu auto- bzw. allosyndetischen Paarungen in der Meiose befähigt sind und verloren gehen. Ein geringer Teil der Chromosomen der verwandten Art sollte eingedenk der in den Kapiteln 1.3 und 4.1.2-4.1.4 gezeigten Verwandtschaft zum Raps in der Lage sein, Paarungen mit *B. napus*-Chromosomen einzugehen. Diese bilden die Grundlage für Rekombinationen und stabile Introgressionen von Fremd-DNA in Rapschromosomen. Auch wenn derartige Introgressionen wegen methodischer Limitierungen nicht (zweifels-

frei) gezeigt werden konnten, besteht aufgrund der vorliegenden Ergebnisse in allen drei Gruppen hohe Evidenz für putative Rekombinationslinien mit Resistenzen gegenüber *L. maculans*. Ein zusätzlicher großer Vorteil von Selbstungen gegenüber weiteren Rückkreuzungen in derartigen Programmen ist die Verdopplung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Rekombinationsereignissen. In Selbstungen haben die Extrachromosomen sowohl in der weiblichen als auch in der männlichen Meiose potentielle Rekombinationsmöglichkeiten mit Rapschromosomen, im Falle von Rückkreuzungen besteht diese Chance nur in der Embryosackmutterzelle. Nicht unerwähnt bleiben soll im Zusammenhang mit der erfolgreichen Übertragung der Resistenzen in den Raps die Verteilung von *hot spots* und *cold spots* der Rekombination über das Genom (PETES 2001, GUILLON & DE MASSY 2002). Während die zufällige Verteilung an sich als gegeben betrachtet werden muß, weisen meiotische *hot spots* eine Umweltabhängigkeit der Rekombinationsfrequenz auf (cf. KOREN *et al.* 2002). Obwohl grundlegende Erkenntnisse hierzu meist auf Untersuchungen an Hefen beruhen, könnte dies neben den daraus folgenden Implikationen für Kartierungsexperimente hinsichtlich der Unterschiede zwischen genetischen und physikalischen Distanzen zukünftig auch im Rahmen der Pflanzenzüchtung - z. B. durch die Gewährleistung optimaler Temperaturen im Kreuzungsprozeß - berücksichtigt werden.

#### 4.1.2 *Brassica napus-Coincya monensis*-Linien

Die hier vorgestellten Linien basieren auf den von PLÜMPER (1995) durchgeführten Originalkreuzungen und frühen Rückkreuzungen (Kap. 2.1.1.2, Abb. 2.1). Diesen ging ein umfangreiches Resistenzscreening von Arten der Familie *Brassicaceae* voraus. Im Ergebnis seiner Untersuchungen beschreibt der Autor *Coincya monensis* nach Inokulation mit den Tox<sup>+</sup>-Isolaten 63698 (in Kotyledonen- und Hypokotyltests, letztere ähnlich Stengelbasistests, Kap. 2.2.3.2.3) und W4 (nur in Kotyledonentests) von *L. maculans* als in beiden Entwicklungsstadien resistent. Diese Aussage ist nach umfangreichen Resistenztests im Rahmen dieser Doktorarbeit und begleitenden Untersuchungen (S. GÄRTIG und N. KRONE/jeweils IAG, pers. Mitteilungen; WINTER *et al.* 1999, 2003a & b) nicht mehr haltbar. Die Pflanzen unterschiedlicher Akzessionen der Wildarten umfaßten sowohl auf Kotyledonen- als auch auf Adultebene resistente und anfällige Individuen. Dabei trat Adultresistenz stets häufiger auf als Kotyledonenresistenz. Die anderslautenden Ergebnisse von PLÜMPER (1995) dürften hauptsächlich auf einen zu geringen Stichprobenumfang zurückzuführen sein. Aufgrund der Menge des zu prüfenden Materials war es dem Autor nur möglich, pro Genotyp 20 Individuen in Kotyledonentests und fünf Pflanzen in Hypokotyltests zu untersuchen. Darüber hinaus ist die Darstellung seiner Ergebnisse - Mittelwerte bei Kotyledonentests, häufigste Boniturnote bei Hypokotyltests - zwar übersichtlich, aber nicht geeignet, gegebenenfalls vorhandene und hier relevante Unterschiede zu zeigen. Zudem ist es möglich, daß die von diesem Autor beschriebenen Kotyledonentests nicht unter optimalen Bedingungen für das Infektionspotential des Pilzes stattfanden. Hierauf deutet seine Betonung („sogar“) der Pycnidienbildung an Keimblättern von *B. villosa* hin. Die Bildung von Pycnidien war hingegen im Rahmen der hier zu besprechenden Untersuchungen die Regel (Daten nicht gezeigt). Die Ausnahme davon stellt jedoch ihr Fehlen bei der Mehrzahl der kotyledonenanfälligen *C. monensis*-Genotypen dar. Die Nutzung von Hypokotyltests bei PLÜMPER (1995) zur Einschätzung des Adult-Resistenzverhaltens erscheint demgegenüber trotz ihres im Vergleich zu

Tests mit Doppelinokulation weniger invasiven Charakters unproblematisch. Die wenigen in Tabelle 3.2 aufgeführten Daten von Stengelbasistests, die Adultresistenz und -anfälligkeit zeigen, wurden von anderen Untersuchungen im Rahmen des Projekts (S. GÄRTIG/IAG, pers. Mitteilung) bestätigt. Der zunächst verwendete Genotyp *C. monensis* (ohne Zusatz von „86“ oder „95“), an dem diese Untersuchungen erfolgten, wurde bereits von PLÜMPER (1995) benutzt und ist vermutlich eine ältere Charge der Akzession *C. monensis* „86“. Die Identität konnte jedoch auch von seiten des IPK Gatersleben, von dem das Saatgut stammt, nicht mehr zweifelsfrei geklärt werden. Ausgangspunkt der Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die BC<sub>2</sub>-Pflanze 16/1 (zumeist 2n=50-53, sieben bis zwölf Extrachromosomen von *C. monensis*). Die zunächst angenommene Chromosomenzahl von 2n=42 (siehe Abb. 2.1, bezieht sich auf PLÜMPER/IAG, pers. Mitteilung) konnte nicht bestätigt werden. Sie dürfte auf einer zu geringen Anzahl ausgewerteter Metaphasen und der damit im Zusammenhang stehenden Nichterfassung des mixoploiden Charakters dieses Genotyps beruhen. Die Analyse von Nachkommen zeigte, daß diese Pflanze sowohl über Gene für Kotyledonen- (siehe z. B. Ergebnisse der Selbstungsnachkommenschaft der BC<sub>3</sub> 16/1/2 = BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 16/1/2-...) als auch für Adultresistenz verfügte. Die Adultresistenz fand sich in putativen BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>- (BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>\*-)Pflanzen wieder, die auf das offene Abblühen der postzygotisch weitgehend sterilen BC<sub>2</sub> 16/1 zurückgehen. Auf diese Genotypen mußte zurückgegriffen werden, da es trotz umfangreicher Anwendung von *embryo rescue*-Techniken nicht gelang, adultresistente BC<sub>3</sub>-Pflanzen zu erstellen. Alle Linien, an denen die Vererbung der Adultresistenz studiert wurde, leiten sich von der Gene für Kotyledonen- und Adultresistenz besitzenden BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>\*-Pflanze 16/1-3 (2n=44, vier Extrachromosomen von *C. monensis*, fertil, intermediärer Habitus) ab.

Die ermittelte Kotyledonenresistenz der adultresistenten BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub>\*-Pflanze 16/1-3-27 (2n=39 u. a., ein *C. monensis*-Chromosom, fertil, erstmaliges Auftreten eines Raps-Habitus') gegenüber dem Isolat M1 konnte in aufeinanderfolgenden Selbstungsnachkommenschaften sowohl gegenüber dem Isolat W4 als auch gegenüber M1 nicht bestätigt werden. Die naheliegendste Erklärung ist eine Kotyledonen-Fehlbonitur (*Escape*) bei besagter BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub>\*-Pflanze. Dies ist angesichts der Schwierigkeiten, in den frühen, noch nicht optimierten Tests mit Doppelinokulation hinreichende Kotyledonensymptome mit M1 zu erzielen, wahrscheinlich. Dafür spricht auch die zumeist nicht bei „Null“ liegende Zahl als kotyledonenresistent klassifizierter Individuen in den in Tabelle 3.3 aufgeführten Selbstungsnachkommenschaften von gegenüber W4 kotyledonenanfälligen Individuen. Nicht ganz ausgeschlossen werden kann jedoch auch eine bereits im Kapitel 3.1.2.2 für die Adultresistenz thematisierte mögliche andere Resistenzgenetik auch auf Kotyledonenebene gegenüber dem Isolat M1. So könnte beispielsweise in den nachfolgend weitergeführten Selbstungsnachkommenschaften, die sich von der BC<sub>2</sub>S<sub>3</sub>\*-Pflanze 16/1-3-27.18 (2n=38) ableiten, das nunmehr fehlende Additionschromosom von *C. monensis* in einem Zusammenhang mit Kotyledonenresistenz gestanden haben. Die Präsenz dieses meta- oder submetacentrischen Chromosoms führte jedoch zumindest in der BC<sub>2</sub>S<sub>3</sub>\* 16/1-3-27.9<sub>VII</sub> (2n=39) in der Interaktion mit dem Isolat W4 nicht zur Ausprägung eines kotyledonenresistenten Phänotyps (Resistenzverhalten: S<sub>C</sub>/R<sub>A</sub>). Die ausschließliche Manifestation von für Kotyledonenresistenz verantwortlichem genetischen Material in einem oder mehreren der 38 Rapschromosomen erscheint angesichts des Verhaltens der Selbstungsnachkommen der BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub>\* 16/1-3-27 gegenüber M1 (R<sub>C</sub>:S<sub>C</sub>-Verhältnis 1:49) sehr unwahrscheinlich. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, daß das monosome Additions-

chromosom dieser BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub>\*-Pflanze zusätzliches genetisches Material für die Ausprägung der Adultresistenz trug. Hierfür spricht die ungewöhnlich hohe Anzahl adultresistenter Selbstungsnachkommen dieser Pflanze (Tab. 3.2, Abb. 3.2) Nach dem Verlust dieses Chromosoms in der nächsten Generation zeigten mit einer Ausnahme alle BC<sub>2</sub>S<sub>5</sub>\*-Nachkommenschaften, die sich von Pflanzen mit Raps-Karyotyp (2n=38, keine GISH-Signale) ableiten, hinsichtlich der Interaktion mit dem Isolat W4 Spaltungsverhältnisse, die mit dem dargelegten digenen Erbgang (*Rlmca1*, *Rlmca2*) erklärbar sind (Kap. 3.1.2.2, Tab. 3.4).

Die von PLÜMPER (1995) durchgeführten Kreuzungen *B. napus* x *C. monensis* führten zur ersten Hybridisierung dieser hinsichtlich eines Merkmalstransfers fast vollständig unbeachteten Wildcrucifere mit dem Raps. Darüber hinaus gibt es auch kaum Berichte über cytologische Untersuchungen an Nachkommen aus Kreuzungen mit anderen Arten der *Brassica*-Verwandtschaft. Lediglich HARBERD & MCARTHUR (1980) beobachteten das Auftreten von sieben Bivalenten in der Meiose von Hybriden aus *B. oleracea* (Genom CC) x *C. monensis* (dort als *Hutera cheiranthos*). Diese vermutlich zumindest in Teilen allosyndetischen Paarungen sprechen für die Möglichkeit intergenomischer Rekombinationen auch mit den Rapsgenomen (AACC).

Wie im Kapitel 3.1.2.2 dargelegt, kann insbesondere für die Interaktion der Rückkreuzungslinien mit dem Isolat M1 die Existenz eines dritten Gens im Zusammenhang mit Adultresistenz angenommen werden. Darüber hinaus könnte die für die BC<sub>2</sub>S<sub>3</sub>\* 16/1-3-2.1 festgestellte Mixoploidie (Tab. 3.3 & 3.6) die Spaltungsergebnisse davon abgeleiteter Selbstungsnachkommenschaften beeinflussen und zu den in Tabelle 3.4 beschriebenen Abweichungen einiger Linien von der oben dargelegten Resistenzgenetik beitragen. Des Weiteren sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 einige im Detail fragliche Resultate gekennzeichnet. Die betreffenden Linien zeigten in einigen Versuchen, verglichen mit den in Tabelle 3.4 aufgeführten theoretischen Spaltungsverhältnissen, eine Verschiebung des R<sub>A</sub>:S<sub>A</sub>-Verhältnisses hin zu mehr adultresistenten Individuen. Hierfür werden suboptimale Testbedingungen während einiger Versuche verantwortlich gemacht. Dazu zählen in erster Linie eine unabgestimmte Applizierung von Pflanzenschutzmitteln und ein Befall durch Larven des Großen Kohlweißlings. Diese schränken, wie in Kapitel 4.1.1.1 dargestellt, die Aussagekraft der normalerweise sehr stringenten Tests mit Doppelinokulation ein.

Das Resistenzverhalten zweier Linien, die auf die BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub>\*-Pflanze 16/1-3-2 zurückgehen, erbrachte zunächst Hinweise auf eine homozygote Fixierung der Adultresistenz in BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>\*-Genotypen. Die daraus erstellten BC<sub>2</sub>S<sub>5</sub>\*-Nachkommenschaften spalteten in einigen Versuchen hinsichtlich dieses Merkmals nicht mehr auf. Dies betraf die Selbstungsnachkommen der BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>\* 16/1-3-2.6.13, für die eine homozygote Präsenz des dominanten Gens (*Rlmca1*) angenommen wurde. Ebenso lag für die Selbstungsnachkommen der BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>\* 16/1-3-2.1.5 die homozygote Fixierung des zweiten, rezessiven Gens nahe. Die in nachfolgenden Tests festgestellte Adultanfälligkeit weniger Individuen dieser beiden Nachkommenschaften kann jedoch aufgrund der deutlichen Symptome nicht auf Boniturschärfen zurückgeführt werden. Vielmehr erscheint der oben beschriebene Einfluß eines dritten, bisher nicht näher charakterisierten Resistenzgens auf die Interaktion mit beiden Isolaten naheliegender.

Resistenztests an Nachkommenschaften aus Selbstungen und Kreuzungen kotyledonenresistenter (R<sub>C</sub>) und -anfälliger (S<sub>C</sub>) *C. monensis*-Pflanzen ermöglichten die im Kapitel 3.1.2.4 getroffenen Aussagen zur Genetik der Kotyledonenresistenz. Anhand der Ergebnisse dieser Tests (Tab. 3.5)

konnten zwei Gene (*Rlmcc1*, *Rlmcc2*) identifiziert werden, die Kotyledonenresistenz gegenüber dem Isolat W4 bewirken. Da bei keiner der untersuchten Nachkommenschaften mit Hilfe des  $\chi^2$ -Anpassungstests signifikante Abweichungen von der 2-Gen-Hypothese (Nullhypothese) festgestellt wurden, kann diese Genetik als wahrscheinlich betrachtet werden. Dies gilt trotz des teilweise begrenzten Stichprobenumfangs, dessen Relevanz durch die Vielzahl untersuchter Nachkommenschaften weitestgehend relativiert wird. Gegenüber dem australischen Isolat M1 zeigte sich *C. monensis* auf Kotyledonenebene sowohl bei Betrachtung der als Kontrollgenotypen dienenden Akzessionen (Tab. 3.2) als auch hinsichtlich der Mehrzahl der Selbstungs- und Kreuzungsnachkommen (Tab. 3.5) tendenziell anfälliger. Dies ist unter Evolutionsgesichtspunkten insofern erwähnenswert, da *C. monensis* in Australien nicht natürlicherweise vorkommt. Die isolatabhängigen Unterschiede hinsichtlich Kotyledonenresistenz deuten trotz des teilweise sehr geringen Stichprobenumfangs auf eine gegenüber der Interaktion mit W4 abweichende Genetik hin. Aufgrund des hohen Kreuzungsaufwands und der Besonderheiten des Genotyps *C. monensis* war es oftmals nicht möglich, größere Mengen an Saatgut zu gewinnen. Viele der zu kreuzenden bzw. zu selbstenden Pflanzen reagierten nach der Kotyledonenbonitur in Adulttests an der im Vergleich zum Raps deutlich fragileren Stengelbasis anfällig. Diese adultanfälligen Individuen waren oft nicht lange am Leben zu halten. Die im Kapitel 2.2.1.1 beschriebene Technik, die das Weiterwachsen vieler adultanfälliger Pflanzen ermöglichte, blieb bei *C. monensis* erfolglos. Auch adultresistente Pflanzen standen oft nur kurz für Kreuzungen zur Verfügung. Darüber hinaus erschwerte die für viele Wildarten typische Keimruhe von *C. monensis* (Kap. 2.2.1.1) das sofortige Prüfen der Nachkommenschaften in Resistenztests.

#### 4.1.3 *Brassica napus-Sinapis arvensis*-Linien

Die Anwendung der GISH-Methode erbrachte bei diesem Pflanzenmaterial, soweit bekannt, die erste klare Evidenz für monosome und doppelt monosome Additionschromosomen in Nachkommen aus Kreuzungen von Arten der Gattungen *Brassica* und *Sinapis*. Dies ist besonders zu betonen, weil Kreuzungen zwischen beiden Gattungen - oft unter Einbeziehung von *S. arvensis* - bereits sehr häufig durchgeführt wurden (cf. WARWICK *et al.* 2000 & Kap. 1.3). Frühzeitig konnten BC<sub>3</sub>- und BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>-Pflanzen identifiziert werden, deren Adultresistenz mit dem Vorhandensein eines acrocentrischen Additionschromosoms von *S. arvensis* einherging. Individuen, die nur eine metacentrische Addition oder Substitution aufwiesen, waren adultanfällig. Darüber hinaus sprechen die hier vorgestellten Resultate für intergenomische Rekombinationen, die zu Pflanzen mit normalem *B. napus*-Karyotyp (2n=38; kein Chromatin von *S. arvensis* mittels GISH detektiert) führten. Deren Resistenz gegenüber *L. maculans* dürfte auf Introgression(en) aus dem Donorgenom beruhen, die aufgrund der in Kapitel 4.2 dargelegten methodischen Limitierungen mittels GISH nicht sichtbar sind (cf. SNOWDON *et al.* 2000).

Derartige Introgressionen dürften aufgrund verschiedener Veröffentlichungen seltene, aber mögliche Ereignisse sein. MIZUSHIMA (1950) untersuchte intergenerische Hybriden zwischen *S. arvensis* und den drei diploiden *Brassica*-Arten, die das A-, B- bzw. C-Genom enthalten. Er berichtet von drei allosyndetischen Bivalenten in ASar- und CSar-Hybriden sowie sieben in BSar-Hybriden. Das stimmt mit Daten von KERLAN *et al.* (1993) und CHEVRE *et al.* (1996) überein, die

auf (nur) wenige gepaarte Chromosomen in ACSar-Hybriden verweisen. Die enge Verwandtschaft zwischen *S. arvensis* und den *Brassica*-Arten mit dem B-Genom, insbesondere mit *B. nigra*, wurde bereits im Abschnitt 1.3 verdeutlicht. Die dort erwähnten Analysen, die die Grundlage der Abbildung 1.9 bildeten, wurden durch Untersuchungen mit chemotaxonomischen Markern (TSUKAMOTO *et al.* 1993) und mittels RFLP-Analyse (SONG *et al.* 1988) bestätigt. Molekulare Hybridisierungen zeigten ebenfalls, daß *B. nigra* auf Genom-Ebene *S. arvensis* näher steht als *B. oleracea* oder *B. rapa* (KAPILA *et al.* 1996). An dieser Stelle sei auf die Ausführungen zum vertikalen Gentransfer zwischen Raps und Wildcruciferen im Kapitel 4.4 verwiesen.

Das selektierte Pflanzenmaterial dieser Resistenzgruppe ist von besonderem Wert für die züchterische Praxis. Es vereint die moderate, partielle und polygene Adultresistenz der Rapsorte „Ceres“, die sich von „Jet Neuf“ ableitet, mit der „absoluten“ (bisher - mit Ausnahme eines alten, unbestätigten Berichts von HUGHES 1933 - noch von keinem Isolat durchbrochenen, in allen Entwicklungsstadien der Pflanze wirksamen), wohl oligogenen Resistenz von *S. arvensis*. Dieser Vorteil führt allerdings z. T. zu Problemen bei der Festlegung der Resistenzgrenzen. Unter Verwendung der in Tabelle 2.6 beschriebenen Adult-Resistenzgrenze - als anfällig gelten Pflanzen ab Außen-Boniturnote 3 - traten bei moderat anfälligen Genotypen wie *B. napus* „Ceres“, aber auch bei der anfälligeren Sorte „Madora“ und einigen Rückkreuzungsnachkommenschaften (z. B. BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 31.2-3-... mit 2n=38) als resistent klassifizierte Individuen auf (Tab. 3.7 & 3.8 und Abb. 3.6). Diese Unschärfen werden jedoch durch den Test mit Doppelinokulation verringert (siehe Kap. 3.3 & 4.1.1.1).

Die in Tabelle 3.8 gezeigten Ergebnisse der sich ebenfalls von doppelt-anfälligen (S<sub>C/A</sub>) BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>-Pflanzen ableitenden BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 13.4-8-... (2n=38) und BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 13.6-19-... (2n=39) deuten hingegen auf einen Erbgang hin, an dem mindestens zwei Gene beteiligt sind. Diese umfassen, verglichen mit der vollständig adultanfälligen BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 31.2-... (2n=36 bzw. 38; Tab. 3.7, Abb. 3.6) und der oben erwähnten BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 31.2-3-... (ein adultresistenter Nachkomme gegenüber W4 bei dreizehn anfälligen), wesentlich mehr adultresistente Individuen. Ihre Tabelle 3.8 entnehmbaren Spaltungsverhältnisse von ca. 1:3 legen eine ähnliche Formalgenetik nahe, wie sie für die Kotyledonenresistenz bei *C. monensis* (Kap. 3.1.2.4) beschrieben wurde (R<sub>A</sub>: R1\_R2\_ bzw. R1R1\_\_). Adultresistenz (R<sub>A</sub>) würde dann bei gleichzeitigem Vorliegen eines dominanten Allels beider Gene bzw. bereits bei alleiniger homozygot-dominanter Konstellation des ersten Gens entstehen. Hierbei muß jedoch beachtet werden, daß die BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>-Pflanze 13.6-19 zusätzlich zu den 38 Chromosomen noch ein metacentrisches Additionschromosom von *S. arvensis* besitzt. Da die vorliegende Arbeit jedoch die Irrelevanz dieser Addition bezüglich der Ausprägung der Resistenzen zeigt, sollte es auch keinen Einfluß auf die Spaltungsverhältnisse in der darauf folgenden Selbstungsnachkommenschaft (BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 13.6-19-...) haben. Die hier postulierte Genetik der Adultresistenz wird durch Resultate der Selbstungsnachkommenschaften doppelt-resistenter (R<sub>C/A</sub>) Pflanzen mit Raps-Karyotyp bestätigt. So weisen beispielsweise die Spaltungsverhältnisse der BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 13.4-... (Tab. 3.7), der BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 13.4-7... (Tab. 3.8) und der BC<sub>3</sub>S<sub>3</sub> 13.6-11.9... (Tab. 3.8) keine signifikante Abweichung von der dem oben dargelegten Erbgang folgenden 5:3-Spaltung (R<sub>A</sub>:S<sub>A</sub>) auf (Ergebnisse der  $\chi^2$ -Tests nicht gezeigt). Aufgrund des modifizierenden Einflusses der „Jet Neuf“-Gene im Rückkreuzungselter *B. napus* „Ceres“ und der daraus folgenden Boniturunschärfen wurde trotz des umfangreichen Datenmaterials auf die Zuordnung von

postulierten Resistenzgenen zu jedem in Frage kommenden Genotypen verzichtet. In Übereinstimmung mit dieser von den beiden anderen Resistenzgruppen abweichenden Vorgehensweise wurde auch auf die statistische Prüfung von Nullhypothesen im Ergebnisteil verzichtet. Für zukünftige, detailliertere Studien zur Genetik der Adultresistenz sollten insbesondere die Pflanzen der gegenüber beiden Isolaten vollständig adultresistenten BC<sub>3</sub>S<sub>3</sub> 13.6-7.2... (Tab. 3.8) genutzt werden. Bei den sieben Pflanzen dieser Nachkommenschaft, die in GISH-Untersuchungen den Raps-Karyotyp zeigten, kann gemäß der oben dargelegten Genetik die Präsenz des ersten Resistenzgens in homozygot-dominanter Form erwartet werden (Genotyp: R1R1). Ein weiteres Individuum wies zusätzlich zu den 38 Rapschromosomen noch das acrocentrische, in frühen Stadien des Rückkreuzungsprogramms (bis zur BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub> gezeigt) als resistenzrelevant angesehene Additionschromosom von *S. arvensis* auf (2n=39). Der letztgenannte Karyotyp dürfte auch für die Vorgängerpflanze BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 13.6-7.2 charakteristisch sein. Dieser müßte auch die genetische Konstellation R1R1 besitzen. GISH-Analysen an diesem Genotyp konnten aufgrund der mangelnden Qualität zur Verfügung stehender Wurzelspitzen nicht durchgeführt werden.

Insbesondere bei den *B. napus*-*S. arvensis*-Linien empfiehlt es sich aufgrund der „Jet Neuf“-Gene, zur Erfassung der maximalen Symptomausprägung die Pflanzen zukünftig grundsätzlich nach Adultbonitur und Vernalisation ein zweites Mal zu bonitieren. Dies erscheint vor allem bei Studien zur Genetik der Resistenz ratsam. Eine derartige Nachbonitur, ca. 16-18 Wochen nach Stengelbasisinokulation, wurde nur am Anfang der Untersuchungen praktiziert (Daten nicht gezeigt). Sie führte zumeist zu einer eindeutigeren Zuordnung von Pflanzen, deren Note der Erstbonitur im Bereich der Resistenzgrenze lag. In der Regel prägten Individuen, die zunächst nur als mäßig anfällig eingestuft wurden, zum Zeitpunkt der Nachbonitur größere und eindeutigere Symptome aus. Das war zu erwarten, da auch unter natürlichen Bedingungen das Schadensmaximum erst im Zeitraum zwischen dem späten Blühen und dem frühen Fruchten auftritt. Als resistent bonitierte Genotypen zeigten gewöhnlich auch zur zweiten Bonitur keine oder nur geringe Schädigungen. Zum Teil wurden die Boniturnoten resistenter Pflanzen von der Erst- zur Zweitbonitur sogar kleiner. Dies verwundert aufgrund der Zunahme des Stengelumfangs (Kriterium für Boniturnotenvergabe, Tab. 2.6) nicht. Aus organisatorischen und Zeitgründen wurde im Rahmen dieser Arbeit zumeist auf die Nachbonitur verzichtet.

Die Spaltungsmuster der Selbstungsnachkommenschaften verschiedener doppelt-resistenter Pflanzen zeigten, ebenso wie bei den *B. napus*-*C. monensis*-Linien, daß Adultresistenz stärker vererbt wird als Kotyledonenresistenz. Dabei war es unerheblich, ob die Selbstungsmutterpflanze aneuploid war und zumindest das acrocentrische Additionschromosom besaß oder bereits den Raps-Karyotyp aufwies. Diese typischen Aufspaltungen könnten darauf beruhen, daß das *S. arvensis*-Genom mehr Gene für Adult- als für Kotyledonenresistenz besitzt. Andererseits ist es auch möglich, daß die beiden Eigenschaften auf Additionschromosomen mit unterschiedlichen Transmissionsraten genetisch lokalisiert sind. Bezüglich des acrocentrischen Additionschromosoms wurde eine überraschend hohe Transmissionsrate festgestellt.

Selbstverständlich kann nicht mit absoluter Gewißheit davon ausgegangen werden, daß es sich beim vielfach detektierten acrocentrischen Additionschromosom stets um dasselbe Chromosom handelt. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der zumeist sehr kleinen Chromosomen der *Brassica*-Verwandtschaft und wegen des Mangels an cytogenetischen Markern muß dies offen bleiben.

FISH-Analysen mit 45S rDNA zeigten keine Hybridisierungssignale an diesem Chromosom; ähnliche Untersuchungen hinsichtlich 5S rDNA-Loci sind geplant. Jedoch spricht die Morphologie dieses Chromosoms und der festgestellte Zusammenhang mit Adultresistenz für die Annahme. Es kann auch nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß die jeweiligen Resistenzgene schon in frühen Rückkreuzungsgenerationen auf einer oder mehreren, mit GISH nicht detektierbaren Translokationen liegen und das acrocentrischen Additionschromosom nur zufällig ebenfalls präsent war. Diese Hypothese wird jedoch als unwahrscheinlich eingeschätzt.

Insbesondere in den BC<sub>3</sub>-Pflanzen (Tab. 3.7, Abb. 3.7c), sehr viel seltener auch in einigen späteren Selbstungsnachkommen, wurden Hinweise auf mitotische Instabilitäten gefunden. Diese führten zu Variationen in der somatischen Chromosomenzahl (Mixoploidien). Diese Phänomene (siehe auch Kap. 4.2) erlauben die Interpretation einer Unstimmigkeit, die das frühe Rückkreuzungsprogramm dieser Gruppe betrifft. PLÜMPER (1995) schreibt der BC<sub>1</sub>-Pflanze, von der sich alle in der vorliegenden Doktorarbeit besprochenen BC<sub>3</sub>- und nachfolgenden Generationen ableiten, unter Nutzung klassischer Mitose-Untersuchungen eine Chromosomenzahl von  $2n=37-39$  zu. Dies kann angesichts der abgesicherten Chromosomenzahlen in Tabelle 3.7 aufgeführter Pflanzen lediglich in einigen Zellen möglich gewesen sein. Die höheren Chromosomenzahlen z. B. der BC<sub>3</sub>-Pflanzen 13.6 und 16.3 (jeweils mit acro- und metacentrischer Addition) sind nur erklärbar, wenn bereits die BC<sub>1</sub> aufgrund ihrer mixoploiden Natur Zellen mit höheren Chromosomenzahlen hatte (mindestens  $2n=40$ , inklusive der beiden verschiedenen Additionschromosomen).

Erste Untersuchungen zum Paarungsverhalten des acrocentrischen Additionschromosoms in der Meiose wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Beispiel der BC<sub>3</sub>-Pflanze 9.10 (monosome Addition) durchgeführt. Trotz des geringen Stichprobenumfangs auswertbarer Pollenmutterzellen fanden sich in drei Zellen Hinweise auf eine allosyndetische Paarung dieses Chromosoms von *S. arvensis* mit Rapschromosomen. Ob es sich bei Konfigurationen wie in Abbildung 3.7f um Trivalente handelte, muß vorerst offen bleiben.

Die relativ hohe Transmissionsrate des acrocentrischen Chromosoms spricht ebenfalls für die Möglichkeit der Paarung dieses Chromosoms mit Rapschromosomen und für damit im Zusammenhang stehende intergenomische Rekombinationen. So wiesen beispielsweise vier von fünf mit GISH untersuchte adultresistente ( $R_A$ ) Selbstungsnachkommen der BC<sub>3</sub> 13.6 (diese Pflanze besaß ein meta- und ein acrocentrisches Additionschromosom) die acrocentrische Addition auf, lediglich eine dieser vier Pflanzen besaß zusätzlich noch das metacentrische Additionschromosom. Der fünfte adultresistente Nachkomme ( $S_C/R_A$ ) zeigte bereits den Raps-Karyotyp ( $2n=38$ , keine GISH-Signale). Von den drei mittels GISH untersuchten adultanfälligen ( $S_A$ ) Pflanzen besaß eine die metacentrische Addition; die beiden anderen zeigten den Raps-Karyotyp. Die GISH-Analysen spiegelten quantitativ ungefähr das  $R_A:S_A$ -Verhältnis in der Gesamtheit der in Tests mit Doppelinokulation gegenüber dem Isolat W4 geprüften Selbstungsnachkommen (37:19) wider.

Die Temperaturabhängigkeit der Kotyledonenresistenz konnte nur in der Gruppe mit *S. arvensis* als Resistenzdonor gezeigt werden; vermutlich, weil lediglich in dieser Gruppe Linien mit aufspaltender Kotyledonenresistenz bis zum Abschluß der Arbeiten relevant waren. Interessant ist, daß das Resistenzverhalten auf Kotyledonenebene lediglich gegenüber dem deutschen Isolat W4 temperatursensitiv war. Auch waren nicht alle Linien gleichartig betroffen. Die temperatursensi-

tiven Linien zeigten diese Eigenschaft gegenüber dem australischen Isolat M1 jedoch nicht. Diese isolatabhängigen Differenzen sind wahrscheinlich auf eine besser an extreme Bedingungen (z. B. hohe Temperatur und Luftfeuchtigkeit) angepasste Virulenz von M1 im Vergleich zu W4 zurückzuführen. Diese ökologische Implikation könnte im Sinne der Gen-für-Gen-Hypothese (Kap. 1.4) pilzseitig mit der Deaktivierung von Avirulenzgenen bei W4 in Verbindung gebracht werden. Des Weiteren ist auch eine andere Genetik der Kotyledonenresistenz im Resistenzdonor gegenüber W4 bzw. M1, wie bei *C. monensis* evident (Kap. 3.1.2.4 & 4.1.2), denkbar.

Der Verlust von Resistenzen bei hohen Temperaturen ist ein bekanntes Phänomen. Ein derartiger Zusammenhang mit Adultresistenz, von PLIESKE *et al.* (1998) bei *B. napus*-B-Genom-Arten-Linien beschrieben, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

#### 4.1.4 *Brassica napus*-*Brassica juncea*-Linien

Die Interaktion mit dem Isolat W4 zeigt, daß die Adultresistenz in den dihaploiden *B. napus*-*B. juncea*-Linien monogen-dominant vererbt wird. Die in Tabelle 3.12 dargelegten Ergebnisse von Kreuzungsexperimenten verdeutlichen jedoch für viele Nachkommenschaften Abweichungen von der erwarteten vollständigen Adultresistenz der F<sub>1</sub>-Generationen sowie den 3:1- bzw. 1:1-Spaltungen (F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>). Diese Diskrepanzen dürften vor allem auf zwei Ursachen beruhen. Zum einen werden Abweichungen vom Regelfall der dihaploiden (DH) Linien dafür verantwortlich gemacht. Zum anderen spielt der subjektive Charakter der festgelegten Resistenzgrenzen eine nicht unwichtige Rolle.

Bereits in Untersuchungen im Vorfeld der Promotion wurden Abweichungen vom Regelfall der DH-Linien an früheren Generationen dieses Materials festgestellt (WINTER & SACRISTÁN 1998). Diese betrafen die Chromosomenzahl, das Bandenmuster verschiedener Isoenzyme und das Blühverhalten (Blühen mit bzw. ohne Vernalisationsbedarf). Hinsichtlich des Resistenzverhaltens wurden derartige genetische Einflüsse vermutet. Im Rahmen dieser Doktorarbeit zeigten die zur Auswahl der Kreuzungspartner durchgeführten phytopathologischen Tests verhältnismäßig große Unterschiede im Resistenzverhalten von DH-Sublinien (Tab. 3.11), die sich von der gleichen Mikrospore (Abb. 2.3) ableiten. Diese traten dann, wie erwartet, auch noch in einigen der in Tabelle 3.12 verzeichneten Kreuzungsnachkommen besonders deutlich auf. Während keine eindeutigen Abweichungen von der Chromosomenzahl 2n=38 gefunden wurden, zeigten verschiedene DH-Pflanzen derselben Linie differierende RAPD-Bandenmuster (Kap. 3.1.4.6). Inwieweit derartige, in kleinen Stichproben gefundenen Unterschiede trotz zunächst fehlender Hinweise darauf mit einem abweichenden Resistenzverhalten in Zusammenhang gebracht werden können, muß offenbleiben. Besonders eindrucksvoll ist der in Feldversuchen mehrerer Jahre festgestellte Größenpolymorphismus bei Pflanzen der BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>DHS<sub>3</sub> 7/10-6-... bzw. der Vorgängerlinie BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>DHS<sub>2</sub> 7/10-... Diese Genotypen umfaßten viele Pflanzen, die (genetisch bedingt) bald nach dem Keimen abstarben. Die wenigen zum Boniturzeitpunkt noch vorhandenen Individuen konnten in drei Größenklassen eingeteilt werden, wobei die kleinsten Pflanzen zumeist die geringsten Symptome aufwiesen.

Eine Erklärung dieser Abweichungen vom Regelfall der DH-Linien sind irreguläre Meiosen. Diese konnten jedoch (noch) nicht detektiert werden. Dies lag möglicherweise an dem begrenzten Stichprobenumfang meiotischer Untersuchungen und der zeitweilig starken Konzentration auf die

beiden anderen Resistenzgruppen. Obwohl nur wenig Grundlegendes zu diesem Thema publiziert wurde, sind solche Meiose-Anomalien auch bei Weizen-Roggen-Translokationslinien, klassisch gezüchteten und dihaploiden Weizen-Linien (DE BUYSER *et al.* 1985) sowie amphidiploiden Weizen-Resynthesen (LINNERT 1982) beschrieben worden. Der trigenomische Weizen *Triticum aestivum* (AABBDD), seine Verwandtschaft zum Roggen *Secale cereale* (RR) und das ähnliche meiotische Verhalten dihaploider und klassisch erzeugter Linien legen eine generelle Verantwortung homöologer Chromosomen für irreguläre Meiosen in Allopolyploiden nahe. Natürliche Allopolyploide verhalten sich hingegen genetisch in der Regel wie Diploide und bilden in der Meiose fast ausschließlich Bivalente (cf. LINNERT 1982 & 1991).

Auch bei *Brassica*-Artbastarden ist denkbar, daß sich in der Prophase der ersten meiotischen Teilung nicht ausschließlich zwei homologe Chromosomen zusammenlagern. Neben der Bildung von Univalenten ist auch eine Paarung homöologer Chromosomen in Form von Tri-, Quadri- oder Multivalenten höherer Ordnung möglich, die dann in der Anaphase I mit hoher Wahrscheinlichkeit ungleichmäßig verteilt werden. Stichprobenartige Meiose-Analysen der französischen Kooperationspartner an Linien aus der zweiten und dritten Rückkreuzung des auch hier verwendeten Materials (siehe Abb. 2.3) untermauern diese theoretische Ableitung (A.M. CHÉVRE/INRA Le Rheu, pers. Mitteilung). Diese Darlegung und die oben beschriebenen Untersuchungen am Weizen werden von LU & KATO (2001) gestützt. Sie fanden in AAC-Hybriden aus Kreuzungen von Pflanzen einer natürlichen *B. napus*-Akzession mit *B. rapa* (AA) weniger Variationen in der Chromosomenzahl und eine stärkere Tendenz der Gameten hin zu einer euploiden Chromosomenzahl als in AAC-Hybriden, die unter Nutzung von Raps-Resynthesen entstanden. Daher sollte in artifiziiellen pflanzlichen Systemen, wie den hier vorgestellten Rückkreuzungsnachkommenschaften, mit zunehmender Anzahl homöologer Chromosomen, die wiederum bei den *B. napus*-*B. juncea*-Linien aufgrund der engeren Verwandtschaft (Kap. 1.3, Abb. 1.9) größer als in den beiden anderen Gruppen sein dürfte, die Wahrscheinlichkeit irregulärer Meiosen steigen.

Eine weitere denkbare Ursache dieser Abweichungen sind spontane Punktmutationen in bestimmten DH-Pflanzen, die dann in der jeweiligen Nachkommenschaft zu Aufspaltungen hinsichtlich der untersuchten Merkmale führen. Die oben beschriebenen Größenpolymorphismen, die innerhalb der BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>DHS<sub>3</sub> 7/10-6-.... und der Vorgängerlinie nur unter Feldbedingungen auftraten, lassen auch umweltinduzierte Mutationen und die umweltabhängige Aktivierung von *hot spots* für Rekombinationen (siehe Kapitel 4.1.1.4) in den Nachkommenschaften möglich erscheinen. Darüber hinaus könnten Abweichungen vom Regelfall der DH-Linien zumindest anteilig auch auf epigenetischen Phänomenen beruhen. Neuere Untersuchungen zeigten in verschiedenen pflanzlichen Systemen, daß sowohl synthetisch als auch natürlich bedingte Allopolyploidie oft mit schnellen und manchmal evolutionär konservierten epigenetischen Veränderungen einhergeht. Hierzu gehören Veränderungen in den Cytosin-Methylierungsmustern, schnelles *silencing* von rRNA- und Protein-kodierenden Genen und die Derepression inaktiver Transposons. Diese epigenetische Anpassungsfähigkeit dürfte auch zum evolutionären Erfolg der Allopolyploidie beigetragen haben (cf. LIU & WENDEL 2003).

Die Subjektivität der Festsetzung der Resistenzgrenzen läßt sich besonders anschaulich am Beispiel der aus der DH-F<sub>1</sub> (7/10-6 x 4/9-1-32)<sub>GISH II/V</sub> erstellten DH-F<sub>2</sub> verdeutlichen. Die F<sub>2</sub> zeigte gegenüber beiden Isolaten keine signifikante Abweichung von der 3:1-Spaltung (R<sub>A</sub>:S<sub>A</sub>), obwohl

die zugrundeliegende F<sub>1</sub>-Pflanze mit einer Außenboniturnote von „4“ gegenüber W4 als deutlich adultanfällig klassifiziert wurde. Aufgrund derartiger Phänomene erfolgte die in Tabelle 2.6 aufgeführte leichte Abschwächung der Resistenzkriterien bei den *B. napus*-*B. juncea*-Linien.

Die Interaktion der *B. napus*-*B. juncea*-Linien mit dem Isolat M1 wird ebenfalls durch die beiden oben diskutierten Einschränkungen beeinflusst. Jedoch zeigte sich nach Inokulation mit diesem Isolat oftmals eine eindeutiger Reaktion hinsichtlich Adultresistenz- bzw. -anfälligkeit (Abb. 3.11a & b) als bei W4. Die Ursachen dafür bleiben vorerst unklar.

Die Versuche mit M1 waren durch die überraschende Konstellation gekennzeichnet, daß trotz der Anfälligkeit beider Eltern der Originalkreuzung, *B. napus* „Liropa“ und *B. juncea*, die gegenüber W4 adultresistenten DH-Linien dieses Resistenzverhalten auch gegenüber M1 zeigten. Nach der Bestätigung dieses Phänomens in umfangreichen Untersuchungen wurde die in Kapitel 3.1.4.4 beschriebene Epistasie-Hypothese aufgestellt. Danach wirkt ein epistatisches Gen (*E*) im Falle der Interaktion mit dem Isolat M1 auf das eigentliche Resistenzgen (*R*) modifizierend ein. Zur Bestätigung dieser formalgenetisch gewagt erscheinenden Hypothese - Adultresistenz wird nur ausgeprägt wenn entweder mindestens ein rezessives Allel von *E* vorhanden ist oder wenn *R* heterozygot vorliegt - wurden interspezifische reziproke Rückkreuzungen von DH-F<sub>1</sub>-Pflanzen (2n=38) mit *B. juncea* (2n=36) durchgeführt. Die Ergebnisse von Resistenztests an diesen Nachkommen befanden sich ausnahmslos im Einklang mit dieser Hypothese. Alle untersuchten Pflanzen zeigten die erwartete Adultresistenz. Zur abschließenden Untermauerung der postulierten Vererbung und zum Ausschluß von Matromorphien - die bei *Brassica*-Kreuzungen aufgrund unreduzierter Gameten häufiger auftreten (HEYN 1977) - konnte der Hybridcharakter der Nachkommen cytologisch (2n=37, acht B-Genom-Chromosomen) und morphologisch bestätigt werden.

Epistasie wurde im Zusammenhang mit *Brassica*-Arten mit dem B-Genom und insbesondere bei *B. juncea* bereits häufiger gezeigt. KERI (1991) beobachtete nach Kotyledoneninokulation mit kanadischen Isolaten von *L. maculans* häufigen Wurzelbefall und zeigte, daß die Resistenz von *B. juncea* auf zwei epistatischen Genen beruht und wahrscheinlich nicht absolut ist. PANG & HALLORAN (1996a) betonen die Bedeutung von Epistasie in resistenten *B. napus*-*B. juncea*-Linien, bei denen sie drei Gene für Resistenzen gegen *L. maculans* beschreiben. In aktuellen Untersuchungen an *B. napus*-*B. nigra*-Linien fanden OGBONNAYA *et al.* (2003) ebenfalls ein epistatisches resistenzrelevantes Gen.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen an weiteren Kontrollgenotypen zeigen, daß *B. juncea* gegenüber dem Isolat M1 deutlich adultanfälliger als die beiden anderen *Brassica*-Arten mit dem B-Genom, *B. carinata* und *B. nigra*, reagiert. Dies bestätigt die wenigen diesbezüglich vorliegenden Berichte anderer Autoren (B. HOWLETT/University of Melbourne, pers. Mitteilung). Aufgrund dieses Virulenzverhaltens kann davon ausgegangen werden, daß M1 auch unter den hier vorliegenden Kulturbedingungen seinen isolattypischen Charakter beibehalten hat.

Im Gegensatz zur Situation bei den anderen beiden Resistenzgruppen wurde die Eignung der *Brassica*-Arten mit dem B-Genom für den Transfer und die Introgression von Resistenzen gegen *L. maculans* in den Raps schon mehrfach gezeigt (Kap. 1.3). Cytologische Analysen sprechen für eine im Vergleich zu den oben beschriebenen Wildcruciferen höhere Wahrscheinlichkeit für allo-syndetische Chromosomenpaarungen als Voraussetzung für intergenomische Rekombinationen. Obwohl ATTIA & RÖBBELEN (1986) und BELLIN (1988) im Vergleich zu Paarungen von

Chromosomen der Genome A und C von deutlich limitierten Chromosomenassoziationen in AB-Amphihaploiden bzw. *B. napus*-B-Genom-Additionslinien berichten, sind diese dennoch möglich. So fanden CHOUDHARY *et al.* (2000) in 44,8 % der Pollenmutterzellen von ABC-Hybriden (aus *B. carinata* x *B. rapa*,  $2n=27$ ) Multivalente in der Form von Tri- (0-2) und Quadrivalenten (0-1). Diese dürften auf einer Kombination aus Auto- und Allosyndesis beruhen. Darüber hinaus führen CHOUDHARY *et al.* (2002) das Vorhandensein von Tri- bis Pentavalenten und einer anaphasischen Brücken-Fragment-Konfiguration in AAB-Hybriden (aus *B. juncea* x *B. rapa*,  $2n=28$ ) auch auf die Homöologie zwischen den A- und B-Genomen zurück. Mit der auch in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Anwendung der GISH-Technik auf meiotische Zellen detektierten BELLIN & DOS SANTOS (2002) in ABCC-Hybriden B-Genom-Chromosomen als Uni- bzw. Bivalente. In klassischen Meiose-Analysen an AABC-Hybriden fanden sie durchschnittlich 11,7 statt der theoretisch zu erwartenden 17 Univalente. Damit liegen sie etwas über den auf einer geringen Stichprobengröße beruhenden Beobachtungen an ähnlichem Material, die im Rahmen dieser Arbeit zur Bestätigung des Hybridcharakters der zur Verifizierung der Epistasie-Hypothese erstellten DH-F<sub>1</sub>-Pflanzen erfolgten (Kap. 3.1.4.5, Abb. 3.11o).

Intergenomische Paarungen von Chromosomen der drei *Brassica*-Genome und Analysen mit Hilfe molekularer Marker bei vergleichender Kartierung des Rapsgenoms und des Genoms der Modellcrucifere *Arabidopsis thaliana* stützen die weitgehend akzeptierte Hypothese, daß die drei diploiden *Brassica*-Arten auf eine gemeinsame hexaploide Vorläuferart zurückführbar sind (LAGERCRANTZ 1998). Eine Vielzahl von Genomregionen von *A. thaliana* findet sich in jeweils drei Kopien in den durch Syntenien und Kolinearität charakterisierten diploiden *Brassica*-Arten wieder (cf. PARKIN *et al.* 2003).

## 4.2 Klassische und molekulare Cytologie

Cytologische Analysen in der *Brassica*-Verwandtschaft und insbesondere bei Raps werden stets durch die große Anzahl der Chromosomen erschwert. Der wesentlichste hemmende Faktor ist jedoch die geringe Größe der mitotischen Rapschromosomen. Diese sind selbst in der Prometaphase mit Ausnahme zweier Paare kaum mehr als 5 µm groß. Aufgrund ihrer sehr ähnlichen Idiogramme sind sie mit konventionellen Methoden, z. B. *banding*-Techniken, nur schwer zu karyotypisieren (OLIN-FATIH & HENEEN 1992).

Die hier gezeigten Untersuchungen an den *B. napus*-*C. monensis*- und *B. napus*-*S. arvensis*-Linien verdeutlichen, daß die Genomische *in situ*-Hybridisierung (GISH) eine sehr effektive Methode zur Detektion von Additionschromosomen in Nachkommen intergenerischer Hybriden aus *Brassica*-Arten und Arten verwandter Gattungen ist. Dies bestätigt die im Kapitel 1.5 dargelegten Ergebnisse anderer Autoren (SKARZHINSKAYA *et al.* 1998, SNOWDON *et al.* 1998).

Die Eignung zur Lokalisierung kleiner Translokationen bzw. Rekombinationen in derartigem Pflanzenmaterial erscheint jedoch auch nach den hier gezeigten Resultaten fraglich. Chromosomenarme in der *Brassica*-Verwandtschaft enthalten eine ungewöhnlich niedrige Kopienanzahl von über das Genom verteilten Sequenzwiederholungen (*dispersed repeat sequences*, HESLOP-HARRISON & SCHWARZACHER 1996). Diese *dispersed repeats* bilden die Basis der GISH-Signale. Aus diesem Grunde ist GISH in *Brassica* und verwandten Arten

normalerweise durch starke Signale im Bereich des centromerischen Heterochromatins und eine demgegenüber nur sehr schwache Hybridisierung an den Chromosomenarmen charakterisiert. Dies wird besonders an den etwas größeren Wurzelspitzenchromosomen deutlich (z. B. Abb. 3.4f-h); an den in der Regel stärker kondensierten Griffelchromosomen ist es jedoch auch meist erkennbar (z. B. Abb. 3.1i). Translokationen in nicht-heterochromatischen Regionen dürften aufgrund dieser Einschränkungen unterhalb der Auflösungsgrenze dieser Technik in der *Brassica*-Verwandtschaft liegen. Die zweite Limitierung dieser Methode betrifft die Größe möglicher Introgressionen aufgrund der zur Verfügung stehenden optischen Hilfsmittel. Als ungefähre Richtwert bei GISH-Analysen wird im allgemeinen eine Mindest-Introgressionsgröße von 10 kb angegeben (R.J. SNOWDON/Universität Gießen, pers. Mitteilung). Untersuchungen mittels FISH waren auch bei kleineren Transgenen (z. B. 8 kb T-DNA in *Vicia faba*, SNOWDON *et al.* 2001) und rDNA-Inserts (z. B. 3,7 kb großes 45S rDNA-Fragment im für die vorliegende Arbeit verwendeten rDNA-Plasmid-Klon VER 17, Kap. 2.2.4.4) erfolgreich.

Die beschriebenen Limitierungen aufgrund der Lage und der Größe der Introgressionen sind vermutlich der Grund dafür, daß die Lokalisierung von Introgressionen in *Brassica*-Chromosomen mittels GISH, soweit bekannt, bisher nur zweimal gezeigt wurde. NIELEN (1999) berichtet bei aneuploiden Rückkreuzungsnachkommen aus *B. napus* (+) *B. nigra* von rekombinanten Chromosomen. Er betont insbesondere die Präsenz eines Chromosoms, das abwechselnd mehrere, mit GISH darstellbare Segmente von Chromosomen beider Eltern („Zebra-Chromosom“) aufweist. Der Autor macht für die Entstehung dieses „Zebra-Chromosoms“ Chromosomenbrüche und anschließende Fusionen der Bruchstücke verantwortlich. Er führt die von ihm detektierte relativ hohe Zahl intergenomischer Translokationen auf Bestrahlungseffekte und die Protoplastenkultur zurück. Dies erscheint aufgrund der Ableitung der Linien von asymmetrischen somatischen Hybriden wahrscheinlich. Somatische Hybridisierungen dürften insbesondere bei asymmetrischem Charakter - bei NIELEN (1999) durch Röntgen-Bestrahlung des Donor-Genotyps *B. nigra* - zu weitaus höheren Rekombinations- und Translokationsfrequenzen als bei sexuellen Hybridisierungen führen. Einen Zusammenhang des „Zebra-Chromosoms“ mit in diesem Kontext ebenfalls untersuchten Resistenzen gegenüber *L. maculans* bzw. *Plasmadiophora brassicae* konnte NIELEN (1999) jedoch nicht zeigen. In Untersuchungen zur Übertragung von Nematodenresistenzen detektierten SNOWDON *et al.* (1999) in einer Pflanze einer sexuell entstandenen *B. napus*-*Raphanus sativus*-Rückkreuzungsnachkommenschaft eine Translokation. Dieses Individuum war jedoch gegenüber dem Schädling anfällig.

Bei den während der Promotion bearbeiteten *B. napus*-*B. juncea*-DH-Linien wurden anfangs mehrfach GISH-Signale unterschiedlicher Größe auf mehr als 20 Chromosomen bei Hybridisierung mit B-Genom-Sonden detektiert. Diese zunächst auf viele Rekombinations- bzw. Translokationsereignisse hindeutenden, aber stets angezweifelte Ergebnisse (Kap. 3.1.4.2 & 4.1.4) beruhten eventuell auf einer unvollständigen Blockierung durch die Raps-Kompetitor-DNA bzw. zu wenig stringenten Hybridisierungsbedingungen. In späteren Untersuchungen wurden keine derartigen GISH-Signale mehr festgestellt. Dies gilt auch für die zu Kontrollzwecken miteinbezogene *B. napus*-*B. juncea*-Rekombinationslinie (98 MDB 23 self) mit homozygoter Kotyledonenresistenz gegen PG 3- und PG 4-Isolate von *L. maculans*. Bezüglich letzterer haben die französischen Kooperationspartner eine in den nächsten Monaten erscheinende interessante Publikation

angekündigt. Diese verdeutlicht in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen, daß die resistenztragende, relativ große *B. juncea*-Introgression, die mit RAPD-Markern charakterisiert wurde (Kap. 1.3 & 4.3), aufgrund ihrer centromerfernen, distalen Lage in einem Rapschromosom nicht mittels GISH sichtbar ist (cf. Abb. 3.9f). Hingegen kündigte die gleiche Arbeitsgruppe die Detektion einer deutlich kleineren *B. nigra*-Introgression in Centromernähe in *B. napus*-*B. nigra*-Linien mittels GISH an (A.M. CHÈVRE/INRA Le Rheu, pers. Mitteilung). Dies zeigt noch einmal die Bedeutung der Lage des Integrationsortes auf dem Rapschromosom.

Auch in den Gruppen mit Resistenz aus *C. monensis* bzw. *S. arvensis* wurde eine Vielzahl resistenter Pflanzen mit Raps-Karyotyp identifiziert. Bei den *B. napus*-*C. monensis*-Linien gehörten dazu ab der BC<sub>2</sub>S<sub>3</sub>\*-Generation nahezu alle Pflanzen, die sich von den BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub>\*-Pflanzen 16/1-3-27 bzw. 16/1-3-2 ableiteten (Tab. 3.6). Bei den *B. napus*-*S. arvensis*-Nachkommen betraf das vor allem die BC<sub>3</sub>-Pflanze 13.4 mit Kotyledonen- und Adultresistenz (R<sub>C/A</sub>) sowie sich von ihr bzw. der BC<sub>3</sub> 13.6 (R<sub>C/A</sub>, noch zwei Additionschromosomen) ableitende BC<sub>3</sub>S<sub>1</sub>-, BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub>- und BC<sub>3</sub>S<sub>3</sub>-Individuen. Diese Ergebnisse sprechen für eine Introgression eines kleinen Stücks „Resistenzchromatin“ unterhalb der GISH-Nachweisgrenze (siehe SNOWDON *et al.* 2000).

In allen drei Resistenzgruppen wurden Pflanzen mit 2n=38 analysiert, die keine ganzen Chromosomen des Resistenzdonors mehr aufwiesen, jedoch nach Hybridisierung mit der genomischen DNA der verwandten Art kleine Signale in unterschiedlicher Anzahl zeigten (Abb. 3.7f & 3.11e). Diese Signale markieren wahrscheinlich rDNA-Loci (R.J. SNOWDON/Universität Gießen, pers. Mitteilung), jedoch erscheint auch das Vorhandensein kleiner Introgressionen trotz nicht immer gegebener Reproduzierbarkeit nicht ausgeschlossen. Da diese Signale sowohl in resistenten als auch in anfälligen Individuen (jedoch keineswegs in allen Pflanzen einer in einem GISH-Durchgang untersuchten Nachkommenschaft) auftraten, kann kein Zusammenhang mit einem bestimmten Resistenzverhalten angenommen werden. Eine Veränderung der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen (Kap. 2.2.4.3) könnte zur Klärung dieser Phänomene beitragen.

Die Arbeit verdeutlicht den Wert der GISH-Methode zum Studium der Genomstrukturen intergenerischer Hybriden des Rapses mit verwandten Arten und der sich davon ableitenden Rückkreuzungsnachkommen. Dies gilt hinsichtlich der Analyse mitotischer Chromosomen mindestens bis zur Stufe des Raps-Karyotyps (2n=38, keine GISH-Signale). Aufgrund der beschriebenen Limitierungen bei der Detektion von Introgressionen, die im wesentlichen die Größe, aber vor allem die Lage derselben auf dem Chromosom betreffen, sollten ab dem Erreichen des 38-chromosomigen Zustands ergänzende Methoden angewendet werden.

Zur Lokalisierung von (resistenzrelevanten) Introgressionen dürften GISH-Untersuchungen an meiotischen Prophasen hilfreich sein. Pachytän-Chromosomen sind gegenüber mitotischen Chromosomen (siehe oben) fünfzehn- bis zwanzigmal größer (ZIOLKOWSKI & SADOWSKI 2002; siehe auch Abb. 3.7d). In der vorliegenden Arbeit wurden in Meiose-GISH-Untersuchungen ausgewählter aneuploider Pflanzen der *B. napus*-*C. monensis*- und der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien die in mitotischem Gewebe detektierten Additionschromosomen erneut gefunden. Darüber hinaus erbrachten diese Analysen erste Hinweise auf allosyndetische Chromosomenpaarungen. Diese bilden die Grundlage der für spätere, sich davon ableitenden Linien postulierten Rekombinationsereignisse. Auch wurden des öfteren zurückhängende Additionschromosomen (*lagger*) gezeigt. Dennoch wurden die Extrachromosomen letztendlich häufig korrekt auf die Pole

verteilt. Während Untersuchungen späterer Meiose-Stadien stets auch Aussagen zur Stabilität der Linien erlauben (BELLIN & DOS SANTOS 2002), sind GISH-Analysen des Pachytäns (cf. ARMSTRONG *et al.* 1998), mit Einschränkungen auch des Diplotäns und der Diakinese, als Methode der Wahl zur Lokalisierung kleiner Introgressionen anzusehen. Hierzu sollte die in Meiose-Studien bei *Brassica* und verwandten Gattungen noch immer relativ selten verwendete GISH-Technik optimiert und variiert werden. Dies betrifft u. a. Protoplastierung, Denaturierung, Hybridisierung und Stringenz der Post-Hybridisierungs-Waschschritte (Kap. 2.2.4.3).

Neben der Anwendung der Genomischen *in situ*-Hybridisierung auf meiotische Zellen sind in späteren Stadien auch weitere molekular-cytogenetische Methoden hilfreich. Hierzu könnte in Anlehnung an *fibres*-FISH-Techniken (cf. SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON 2000; FRANZ *et al.* 1996, TSUCHIYA *et al.* 2002 u. a.) eine Hybridisierung mit genomischen Sonden an durch mechanische Manipulation in die Länge gezogenen einzelnen DNA-Strängen („*fibres*-GISH“) gehören.

Zur groben Abschätzung, ob in Rückkreuzungsnachkommen mit  $2n=38$ , die keine GISH-Signale zeigten, der Raps-Karyotyp (cf. SNOWDON *et al.* 2002) auch im Sinne des vollständigen Vorhandenseins der - mit herkömmlichen Methoden schwer unterscheidbaren (siehe oben) - 19 Chromosomenpaare konstatiert werden kann, wurden Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen (FISH) durchgeführt. FISH an Nachkommen aller drei Rückkreuzungsgruppen erbrachten bei Nutzung klonierter Gene für die 45S rRNA (45S rDNA) als Sonde stets ca. zwölf reproduzierbare Signale unterschiedlicher Größe. Darüber hinaus traten oftmals auch sehr kleine zusätzliche Signale auf. Der hier verwendete rDNA-Plasmid-Klon VER 17 enthält 5,8S, 18S und Teile der 25S rDNA. Die Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von MALUSZYNSKA & HESLOP-HARRISON (1993), SNOWDON *et al.* (1997b) und SCHRADER *et al.* (2000) überein, die jeweils sechs verschiedene Loci für 5,8S-18S-25S rDNA (also 12 Signale) bei *B. napus* beschreiben. Bei Berücksichtigung der Tatsache, daß in der vorliegenden Arbeit aufgrund der Plasmid-Zusammensetzung nicht alle 25S rDNA-Loci erfaßt werden konnten, kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß die 19 verschiedenen Rapschromosomen auch in den betrachteten Rückkreuzungsnachkommen vorhanden sind. Zumindest theoretisch wären aufgrund der Vielzahl an Rückkreuzungen und Selbstungen und unter Beachtung der zeitweiligen Präsenz von mehr als 38 Rapschromosomen in einigen Genotypen, z. B. der wichtigen BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>\*-Pflanze 16/1-3 der *B. napus-C. moensis*-Linien, auch Verluste ganzer Chromosomenpaare bei gleichzeitiger Vervielfachung anderer möglich. Darüber hinaus ist die gegenwärtige Erkenntnislage hinsichtlich der Zahl der rDNA-Loci bei *B. napus* keinesfalls als endgültig zu betrachten. So berichten KAMISUGI *et al.* (1998) von sieben 25S rDNA-Loci bei *B. napus*. Die Differenz zu den Resultaten der oben erwähnten Arbeitsgruppen könnte ihre Ursache in unterschiedlichen Hybridisierungsbedingungen haben. Darüber hinaus sind derartige Abweichungen bei *Brassica* auf der Ebene von Unterarten und Varietäten durchaus nicht ungewöhnlich (cf. SNOWDON *et al.* 2002).

Die Existenz aller 19 „Originalpaare“ an Rapschromosomen in den Rückkreuzungsnachkommen ist für wesentliche Eigenschaften der Pflanze (u. a. Resistenz gegen *L. maculans*, Habitus und - mit Einschränkungen - Fertilität) aufgrund der Plastizität und des Pufferungsvermögens von Polyploiden gegenüber Genomveränderungen sicherlich nicht essentiell. Sie ist jedoch beispielsweise hinsichtlich der meiotischen Stabilität sowie für spätere Kartierungen und züchterische

Anwendungen wünschenswert. Der in diesem Kontext unternommene Versuch, mit genomischer *B. cretica*-DNA eine differentielle Markierung des *Brassica*-C-Genoms gegenüber dem A-Genom zu erreichen, blieb ohne Erfolg. Die untersuchten Zellen zeigten jeweils nur ca. drei Signale (Kap. 3.1.5, Abb. 3.13h). Dies läßt den Schluß zu, daß auch diese Art des *B. oleracea*-Cytodems (Kap. 1.3) phylogenetisch nicht weit genug vom A-Genom bzw. *B. rapa* entfernt ist bzw. - was unwahrscheinlicher ist - zu starke Genomunterschiede gegenüber *B. oleracea* aufweist.

Durch die Anwendung von GISH in Kombination mit klassischen Chromosomenzählungen konnte bei den *B. napus*-*C. monensis*- und *B. napus*-*S. arvensis*-Linien die zunehmende cytologische Stabilität in sukzessiven Rückkreuzungsgenerationen anhand abnehmender Mixoploidieraten demonstriert werden. Diese korrespondieren mit einer Reduktion des Extrachromatins.

Die in den frühen Rückkreuzungsgenerationen häufig festgestellten Mixoploidien dürften ihre Ursache in unterschiedlichen Längen bzw. einer Asynchronität der Zellzyklen der Elternarten haben (FEDAK 1985). Für einen aktuellen Überblick über die komplexe Regulation des Zellzyklusses, in der Cyclin-abhängige Kinasen eine zentrale Rolle spielen, sei auf das *Review* von DE VEYLDER *et al.* (2003) verwiesen. Darüber hinaus wurden im Zusammenhang mit Mixoploidien Phänomene wie eine unvollständige DNA-Synthese während der S-Phase und Spindelabnormalitäten beschrieben (KASHA 1974, BENNETT *et al.* 1976). Diese dürften in den hier vorgestellten Fällen das Verhalten der Chromosomen von *B. napus* bzw. der verwandten Art in der Mitose beeinflussen. Auf Unterschiede in der somatischen Chromosomenzahl wird in der Literatur zumeist im Zusammenhang mit interspezifischen und intergenerischen Kreuzungen hingewiesen. So zeigten LI & HENEEN (1999) und CHENG *et al.* (2002) dieses Phänomen beispielsweise bei intergenerischen Hybriden zwischen *Brassica*-Arten und *Orychophragmus violaceus*. Darüber hinaus wurde von Mixoploidien im Mais (CAETANO-PEREIRA *et al.* 1998) und in der viele polyploide Arten umfassenden Gattung *Musa* (MARIE & BROWN 1993) berichtet. Dennoch scheint - nach Auswertung der Literatur und angesichts ihrer in dieser Arbeit gezeigten Präsenz - Mixoploidien als limitierendem Faktor bei interspezifischen Transfers von Merkmalen bisher nur eine unzureichende Aufmerksamkeit zuteil geworden zu sein. Sie erschweren die cytogenetische Selektion resistenter Individuen mit einer möglichst geringen Zahl an Donorchromosomen und verdeutlichen die Notwendigkeit, eine große Anzahl an Metaphasen auszuwerten.

Im Zusammenhang mit Mitose-Anomalien sei noch auf Abbildung 3.7k verwiesen. Diese zeigt anhand von Metaphasen aus Griffelgewebe einer für diese Arbeit wichtigen BC<sub>3</sub>S<sub>3</sub>-Pflanze der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien neben 38 vollständigen Chromosomen ein Chromosomenfragment, daß als Präparationsartefakt, wahrscheinlich ein Satellitenchromosom betreffend, interpretiert wird (links). Derartige Artefakte sind bei akkurater und vergleichender Betrachtung verschiedener Metaphaseplatten aufgrund der besonders geringen Größe jedoch kaum mit ganzen Chromosomen zu verwechseln. Die Chromosomenzahl von  $2n \sim 76$  der rechts davon befindlichen Zelle ist wahrscheinlich auf eine C-Mitose zurückzuführen; eine Erscheinung, die nach Behandlung mit Hydroxychinolin oder anderen Spindelgiften als nicht selten gilt, im Rahmen dieser Untersuchungen jedoch kaum auftrat. Darüber hinaus ist jedoch auch eine natürlich bedingte Endomitose möglich. Solche Endopolyploidien (cf. SUGIMOTO-SHIRASU & ROBERTS 2003), die häufig als gewebespezifisch gelten (KUDO & KIMURA 2001), wurden ansonsten bei den sehr umfangreichen Mitose-Untersuchungen an Griffel-Gewebe ebenfalls nicht gefunden. Soweit beide

Gewebetypen einer Pflanze analysiert wurden, stimmten die Chromosomenzahlen aus Griffeln mit denen aus Wurzelspitzen überein.

### 4.3 RAPD-PCR und *bulk segregant analysis*

Die Suche nach molekularen Markern für die verschiedenen Resistenzen erfolgte im Rahmen dieses Projekts anhand von RAPD-Analysen. Diese auf unspezifischen Primern beruhende PCR-Methode wurde wegen ihrer leichten, auch für Pflanzenzuchtunternehmen geeigneten Handhabbarkeit gewählt. Die Ergebnisse der Untersuchungen bestätigten jedoch ihre mangelnde Reproduzierbarkeit, sowohl innerhalb des Labors als auch erst recht zwischen verschiedenen Laboren. Darüber hinaus zeigte sich die lediglich begrenzte Eignung dieser Methode aufgrund der weiträumigen Verteilung von RAPD-Markern im Genom (cf. PLIESKE *et al.* 1998; siehe unten).

Die PCR-Untersuchungen erfolgten im wesentlichen mittels *bulk segregant analysis* (MICHELMORE *et al.* 1991), bei der der Schwerpunkt auf der Analyse von DNA-Pools resistenter und anfälliger Pflanzen liegt. Auf diese Weise wurden im Rahmen der Doktorarbeit drei Selbstungsnachkommenschaften auf RAPD-Marker für Adultresistenz getestet. Diese Nachkommenschaften leiteten sich von einer aneuploiden (BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>\*-Pflanze 16/1-3 der *B. napus*-*C. monensis*-Linien) bzw. putativ rekombinanten Pflanzen mit 2n=38 (BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>\* 16/1-3-27.18.1 der *B. napus*-*C. monensis*- sowie BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 13.6-11.9 der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien) ab.

Die Prüfung von 80 RAPD-Primern an der Selbstungsnachkommenschaft der aneuploiden BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>\*-Pflanze 16/1-3 (2n=44, vier Additionschromosomen von *C. monensis*) erbrachte keine RAPD-PCR-Marker für Adultresistenz. In anderen Untersuchungen im Rahmen des Projekts (N. KRONE/IAG, pers. Mitteilung; WINTER *et al.* 2003a & b) wurden in der gleichen Selbstungsnachkommenschaft 320 RAPD-Primer ebenfalls ohne positives Ergebnis bezüglich Markereigenschaften für Kotyledonenresistenz getestet. Die vergebliche Suche nach RAPD-Markern für die Resistenzen ist als weiterer Hinweis für die Richtigkeit der oben dargelegten Genetik anzusehen, da sowohl für Kotyledonen- als auch für Adultresistenz aus *C. monensis* von jeweils mindestens zwei Genen auszugehen ist (Kap. 3.1.2.2 & 3.1.2.4).

Gegen Ende des Untersuchungszeitraums wurden hinsichtlich der Adultresistenz aufspaltende *B. napus*-*C. monensis*-Linien (2n=38, keine GISH-Signale) identifiziert, für die die alleinige Präsenz des dominanten Resistenzgens postuliert wurde (Genotyp der Selbstungsmutterpflanze: Rlmca1 rlmca1 rlmca2 rlmca2, Tab. 3.4). So wurde auch die Selbstungsnachkommenschaft der BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>\*-Pflanze 16/1-3-27.18.1 auf RAPD-Marker hin getestet. Mit Hilfe der *bulk segregant analysis* erfolgte die Prüfung von 83 Primern. Diese aufgrund der wahrscheinlich einfacheren Genetik zunächst erfolgversprechendere Suche führte ebenfalls zu keinem Marker. Auch für diese Nachkommenschaft kann jedoch das zusätzliche Vorhandensein des zweiten Resistenzgens, wie für die BC<sub>2</sub>S<sub>5</sub>\* 16/1-3-27.18.13-... in Tabelle 3.4 gezeigt, nicht ausgeschlossen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit zur Poolbildung im Falle der Nachkommenschaft der BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>\*-Pflanze 16/1-3 verwendete Anzahl von zwölf adultresistenten und acht adultanfälligen Pflanzen (Tab. 2.11) entspricht der üblichen Vorgehensweise bei solchen Untersuchungen. So integrierten z. B. MICHELMORE *et al.* (1991) 14-20 resistente und anfällige Pflanzen, CHÈVRE *et al.* (1997) acht bzw. fünf resistente und fünf bzw. neun anfällige Individuen, MAYERHOFER *et al.* (1997)

zwölf resistente und 20 anfällige Pflanzen und PONNAMPALAM *et al.* (1999) zehn resistente und acht bzw. fünf anfällige Individuen in die jeweilige Pool-DNA.

Zunächst gefundene Polymorphismen zwischen den Pools konnten in weiteren PCR-Durchgängen bzw. auf Einzelpflanzenebene nicht bestätigt werden. Insbesondere bei der Selbstungsnachkommenschaft der BC<sub>2</sub>S<sub>4</sub>\*-Pflanze 16/1-3-27.18.1 dürften neben der schlechten Reproduzierbarkeit der RAPD-Methode auch falsch positive Ergebnisse aufgrund einer zu kleinen Pflanzenanzahl zur Bildung der Pools (MICHELMORE *et al.* 1991) beigetragen haben. Die strengen Resistenzkriterien berücksichtigend, denen „Poolpflanzen“ genügen mußten (Kap. 2.2.5.2), konnten in die PCR-Analysen nur drei anfällige Rückkreuzungsnachkommen einbezogen werden (Tab. 2.11).

Daß trotz des Testens von bis zu 320 RAPD-Primern in diesem Projekt kein Marker für die jeweiligen Resistenzen gefunden wurde, ist jedoch bei dieser Methode nicht ungewöhnlich. So fanden CHÈVRE *et al.* (1997) in *B. napus*-*B. juncea*-Rückkreuzungslinien bei 400 untersuchten RAPD-Primern lediglich drei nicht sehr eng gekoppelte Marker für Kotyledonenresistenz gegenüber *L. maculans*. Untersuchungen von PONNAMPALAM *et al.* (1999) an Nachkommen einer Kreuzung zwischen der anfälligen Rapsorte „Tower“ und einer Rapslinie mit hoher, aus *B. juncea* stammender Resistenz gegen *L. maculans* zeigten bei 297 untersuchten RAPD-Primern keinen Polymorphismus zwischen den Pools.

In den hier vorgestellten Untersuchungen zunächst gefundene Polymorphismen können jedoch auch auf weniger enger Kopplung der Gene für Resistenzen gegen *L. maculans* beruhen. Durch Rekombinationsprozesse im Bereich des Resistenzgens, die den potentiellen Marker aber nicht einbeziehen, kann es zum Fehlen oder Auftreten der Banden bei nur einigen Pflanzen der Nachkommenschaft kommen (MICHELMORE *et al.* 1991, PLIESKE *et al.* 1998).

Banden im resistenten (Abb. 3.1o) oder anfälligen Pool, die bei keinem der beiden Eltern auftraten, wurden auch von MICHELMORE *et al.* (1991) gefunden. Eine mögliche Erklärung sind Rekombinationsprozesse, bei denen Chromatin der verwandten Art so in Rapschromatin integriert wurde, daß der neu kombinierte Chromosomenbereich, nicht aber der der Ausgangseltern mit dem Primer amplifiziert werden kann. Da die ursprünglichen Elternpflanzen der Kreuzung nicht bekannt sind, wurden stellvertretende Pflanzen als Kontrolle bei der PCR verwendet. Dementsprechend ist es möglich, daß Selbstungsnachkommen der BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>\* 16/1-3 im PCR-Amplifikationsmuster Banden zeigen, die für die ursprünglichen, nicht aber für die stellvertretenden Ausgangseltern typisch sind. In diesem Zusammenhang ist auch eine Poolbildung von resistenten bzw. anfälligen *C. monensis*-Pflanzen ratsam. Diese könnte Aufschluß darüber geben, ob die interessanten Banden der in dieser Arbeit verwendeten resistenten *C. monensis*-Pflanzen repräsentativ sind. Die Tatsache, daß die in der PCR erhaltenen Amplifikationsprodukte verstärkt *B. napus*-spezifische Banden zeigten, läßt sich durch die fortgeschrittenen Rückkreuzungen und Selbstungen erklären, bei denen der Anteil von *C. monensis*-Chromatin erwartungsgemäß reduziert wurde.

Die vergebliche Suche nach RAPD-Markern für Adultresistenz bei den Nachkommen der BC<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 13.6-11.9 der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien war durch ähnliche Phänomene wie die oben diskutierten gekennzeichnet. Sie erhärtet auch die Richtigkeit der im Kapitel 4.1.3. postulierten Genetik, da für Adultresistenz dieser Nachkommenschaft ebenfalls zwei Gene verantwortlich sein dürften.

Darüber hinaus erfolgten im Rahmen des Gesamtprojekts Prüfungen bereits beschriebener RAPD-Marker für eine mit Kotyledonenresistenz verbundene Introgression eines Chromosomenabschnitts von *B. juncea* in ein Rapschromosom (CHÈVRE *et al.* 1997; A.M. CHÈVRE/INRA Le Rheu, pers. Mitteilung) an den hier untersuchten adultresistenten, aber kotyledonenanfälligen *B. napus*-*B. juncea*-DH-Linien. Das Fehlen dieser Marker in den DH-Linien unterstreicht auch für diese Gruppe, daß Kotyledonen- und Adultresistenz auf unterschiedlichen Genen beruhen. An der auf frühe Stadien des Berliner Rückkreuzungsprogramms zurückgehenden französischen Kontrolllinie 98 MDB self 23 mit homozygoter Kotyledonenresistenz gegenüber PG 3- und PG 4-Isolaten, die dem oben erwähnten Material mit der charakterisierten Introgression weitgehend entspricht, wurde der Markercharakter dieser RAPD-Primer hingegen auch im Berliner Labor bestätigt. Des Weiteren konnten für die DH-Linien hinsichtlich Adultresistenz gegenüber dem Isolat M1 trotz des Testens von 96 Primern keine Marker gefunden werden (K. STERENBERG/IAG, pers. Mitteilung; WINTER *et al.* 2003b). Das spricht auch in diesem Fall für die Richtigkeit der dargelegten Genetik, die zwei Gene (Resistenzgen + epistatisches Gen) umfaßt.

Über die erwähnten Marker für die *B. juncea*-Introgression in einem Rapschromosom und weitere Anwendungen bei der Lokalisierung von Resistenzgenen hinaus erwiesen sich RAPD-Marker in vergleichbarem Material als durchaus wertvoll. So fanden JANEJA *et al.* (2003) in *B. napus*-*Enarthrocarpus lyratus*-Introgressionslinien nach dem Testen von 215 RAPD-Primern mittels *bulk segregant analysis* zwei Marker. Diese flankieren den aus der Wildart integrierten Locus für ein Fertilitätsrestorerogen in Abständen von 8,2 bzw. 2,5 cM. KENKO *et al.* (2001) beschreiben RAPD-Marker für verschiedene Monosomien in *Raphanus sativus*-*B. rapa*-Additionslinien.

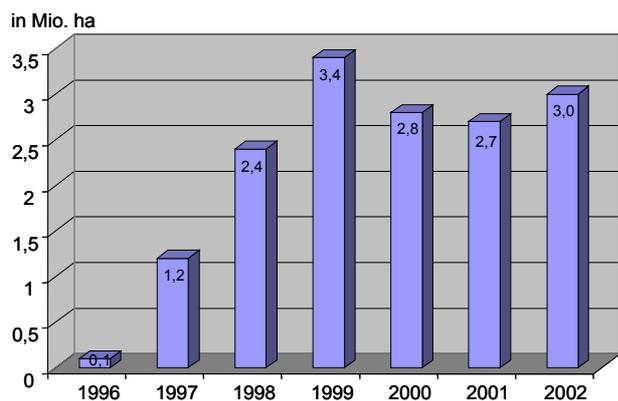
An dieser Stelle soll noch auf feiner differenzierende und besser reproduzierbare Analysemethoden verwiesen werden, die zur Markierung von Genen, die Resistenzen gegenüber *L. maculans* bewirken, dienen. So fanden z. B. PONNAMPALAM *et al.* (1999) im auf Seite 131 beschriebenen Pflanzenmaterial bei weiteren Untersuchungen neun AFLPs (*amplified fragment length polymorphism*), für die die Untersuchung auf Einzelpflanzenebene allerdings noch ausstand. Derartige Methoden sind jedoch aufwendig und teuer. In dieser Hinsicht stellt die Nutzung der PCR-basierten STS-Marker (STS = *sequence tagged sites*) zur Markierung von *L. maculans*-Resistenzen im *Brassica*-B-Genom durch PLIESKE & STRUSS (2001a) einen modernen, einfachen und effektiven Ansatz in der Marker-gestützten Selektion dar.

PLIESKE & STRUSS (2001b) nutzten darüber hinaus die sehr polymorphen Mikrosatelliten zur Genomanalyse in *B. napus* und anderen Arten der Familie *Brassicaceae*. Die Verwendung von Mikrosatelliten wird auch für weitere Untersuchungen zur Lokalisierung von Resistenzgenen in dem im Rahmen der Promotion bearbeiteten Pflanzenmaterial erwogen.

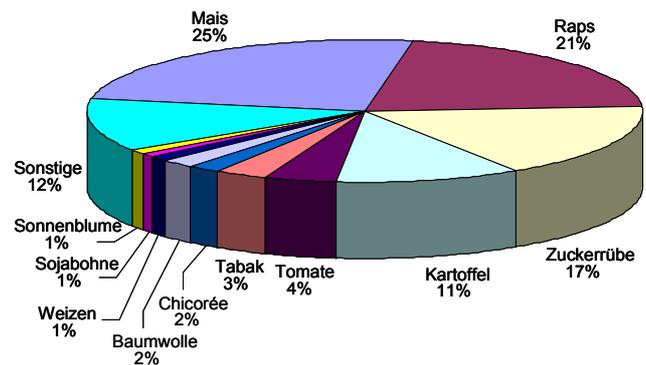
SOMERS & DEMMON (2002) konnten für verschiedene Cruciferen Genom-spezifische Sonden entwickeln und die entsprechenden Fragmente klonieren. Dieser auf der direkten PCR-Amplifikation von Minisatelliten-DNA beruhende Ansatz führte z. B. zur Isolierung spezifischer Sonden für die *Brassica*-A- und -B-Genome sowie das *Sinapis alba*-Genom. Auch hier zeigte sich jedoch eine Kreuzhybridisierung von A-Genom-Sonden mit dem C-Genom. Diese Genome können also wie bei GISH auch mit dieser Methode nicht unterschieden werden.

#### 4.4 Gentechnik und Raps unter besonderer Berücksichtigung des Risikos der Hybridisierung mit Wildcruciferen

Die Freisetzung und kommerzielle Nutzung gentechnisch veränderter Kulturpflanzen („grüne Gentechnik“) ist ein seit Jahren kontrovers diskutiertes Thema. Es ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit aus mindestens zwei Gründen von Bedeutung. Zum einen eröffnet die nicht wissenschaftlich fundierte, sondern politisch bedingte Chancenlosigkeit kommerzieller gentechnischer Anwendungen in weiten Teilen der Welt auf absehbare Zeit neue Perspektiven für klassisch gezüchtete Sorten aus interspezifischen Kreuzungen. Dies betrifft im Falle der *B. napus*-*L. maculans*-Interaktion insbesondere Europa und Australien. Auf die viele Aspekte umfassende wissenschaftliche Debatte kann an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden (cf. UBA 1998, CANDOLFI *et al.* 1999, CONWAY & TOENNIENSEN 1999, TREWAVAS 1999, RAFI 2000, RKI 2001, DALE *et al.* 2002, JAYARAMAN 2002, GOULD *et al.* 2002, EDITOR NATURE 2002, ARNTZEN *et al.* 2003, HAILS & KINDERLERER 2003; aber auch SCHUBERT 2002a & b). Zum anderen gibt es inzwischen eine Vielzahl an Untersuchungen zum vertikalen Gentransfer aus gentechnisch veränderten Kulturpflanzen in Wildarten. Diese sind im Rahmen dieser Promotion von großem Wert hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit von Introgressionen in umgekehrter Richtung (Kap. 4.1.2-4.1.4).



**Abb. 4.1** Entwicklung der globalen Anbauflächen von transgenem Raps 1996-2002 (in Mio. ha; nach JAMES 2002).



**Abb. 4.2** Anteile der einzelnen Kulturpflanzen an Freisetzungen transgener Pflanzen in der Europäischen Union (Stand Juni 2002, UBA 2002a).

Da diese Auseinandersetzungen nicht zuletzt auch vielfach den Raps betreffen, soll zunächst ein aktueller Überblick zu transgenen Anwendungen bei dieser Kulturpflanze gegeben werden. Im Jahre 2002 wurden auf 58,7 Mio. Hektar Kulturpflanzen angebaut, die als gentechnisch veränderte Organismen (GVO) gelten (JAMES 2002). Dies entspricht einer Zunahme von 11,6 % gegenüber dem Vorjahr. Obwohl in insgesamt 16 Ländern GVO-Sorten angebaut wurden, entfallen 99 % des GVO-Anbaus auf vier Länder: USA (39,0 Mio. ha), Argentinien (13,5 Mio. ha), Kanada (3,5 Mio. ha) und die VR China (2,1 Mio. ha). Seit Jahren dominieren vier verschiedene Kulturpflanzen den GVO-Anbau: Soja (2002: 36,5 Mio. ha), Mais (12,4 Mio. ha), Baumwolle (6,8 Mio. ha) und Raps (3,0 Mio. ha). Die Entwicklung der Welt-Anbauflächen von transgenem Raps ist in Abbildung 4.1 dargestellt; sie ist nach ihrem Höhepunkt 1999 und einem darauffolgenden Rückgang im Jahr 2002 wieder leicht angestiegen (JAMES 2002). Im Jahr 2002

wuchsen transgene Sorten weltweit auf 12 % der Raps-Anbaufläche (Soja: 51 %; JAMES 2002). Jedoch wurden bereits im Jahr 2001 allein in Kanada 65 % und in den USA 50 % der Rapsanbauflächen mit gentechnisch veränderten Sorten bestellt (TRANSGEN 2003a, Angaben differieren gegenüber FAO 2003).

Deutlich anders ist die Situation im Bereich der Europäischen Union. Hier findet zur Zeit aufgrund der politischen und gesamtgesellschaftlichen Situation kein kommerzieller Anbau transgener Pflanzen statt (*de facto*-Moratorium seit 1998, cf. BIOSCOPE 2003). Bis Juni 2002 gab es in der EU 394 Freisetzungen von transgenem Raps. Dies entspricht ca. 21 % der insgesamt freigesetzten Pflanzen in der EU (UBA 2002a, Abb. 4.2). Die Mehrzahl der Freisetzungsanträge wurden in der zweiten Hälfte der 90er Jahre gestellt. Danach ging ihre Zahl stark zurück (UBA 2002b).

Anträge auf Inverkehrbringen gentechnisch veränderten Rapses in der Europäischen Union bezogen sich i. d. R. auf Herbizidresistenz (Wirkstoffe Glufosinat/Liberty bzw. Glyphosat/Roundup), der auch weltweit klar dominierenden Eigenschaft transgenen Rapses. Darüber hinaus spielte in einigen dieser EU-Anträge auch männliche Sterilität (siehe Abb. 1.2 sowie S. 3 & 4) eine Rolle (UBA 2002c, TRANSGEN 2003b). Außerhalb Europas besitzt Raps mit einem aus dem Kalifornischen Lorbeer (*Umbellularia californica*) eingeführten Gen bereits praktische Bedeutung. Dieses Gen bewirkt eine Erhöhung des Gehalts an Laurinsäure (kurzkettige Fettsäure mit zwölf C-Atomen; zur Herstellung von Detergenzien, Schokolade, Kaffee weißer u. a.) im Samen von 0 % auf 40 % (High-Laurat-Öl). Lauratrap (Laurical) wurde 1999 in den USA auf 100000 ha angebaut. Noch im Forschungsstadium befindliche gentechnische Veränderungen in Rapssamen (ANONYMUS 2000, UBA 2000b, LECKBAND 2002) sollen nur kurz erwähnt werden: das High-Eruca-Öl (deutlich über 66 % Erucasäuregehalt, Kunststoff- und Fotoindustrie), die Übertragung von Genen zur Synthese von Caprinsäure (im Speicherfett des Lanzettblättrigen Köcherblümchens - Fam. *Lythraceae* - ist diese kurzkettige Fettsäure zu 80 % enthalten, Anwendung u. a. bei Waschmittelherstellung), die Anreicherung und Qualitätsverbesserung von Antioxydanzien wie Tocopherol (Verbesserung der Öl-Stabilität während der Lagerung und der Verarbeitung,  $\alpha$ -Tocopherol ist Vitamin E) und Resveratrol (Phytoalexin, anticancerogen, antisklerotisch, natürlicherweise vor allem im Rotwein vorkommend) sowie die Erzeugung von sehr langkettigen, hoch ungesättigten Fettsäuren (mindern das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, in Mitteleuropa und Nordamerika unzureichend in der Nahrung), z. B. im Projekt *NAPUS 2000*, die Produktion von Polyhydroxyalkanoaten (biologisch abbaubare Kunststoffe) und die Verbesserung der Rapsschrot-Qualität durch einen erhöhten Lysin-Gehalt (Viehfutter). Besondere Bedeutung hinsichtlich der öffentlichen Akzeptanz „grüner Gentechnik“ könnten Projekte zur gentechnischen Herstellung von Rapslinien haben, deren Öl einen hohen Provitamin-A-Anteil ( $\beta$ -Carotin) aufweist (ANONYMUS 2000). Damit kann zur Minderung von Vitamin-A-Mangel und ihren Folgen (Nachtblindheit; bei hochgradigem Mangel, wie bei ca. 200 Millionen Menschen in Entwicklungsländern, Blindheit und Tod) beigetragen werden. Dieses Vorhaben erinnert an den *Golden Rice* (POTRYKUS *et al.* 1995, YE *et al.* 2000), der seit Jahren öffentlichkeitswirksam diskutiert wird (cf. GREENPEACE 2001, SPAHL & DEICHMANN 2001).

Demgegenüber fällt auf, daß relativ wenig Berichte über praxisrelevante gentechnische Ansätze zur Übertragung von Krankheits- und Schädlingsresistenzen in den Raps vorliegen. Gentechnisch wird beispielsweise versucht, mittels eingeführter Chitinase- oder  $\beta$ -1,3-Glucanasegene, die den

Pflanzen eine Pilzabwehr ermöglichen, Rapspflanzen resistent gegen *L. maculans* und/oder *S. sclerotiorum* zu machen (ANONYMUS 2000). HENNIN *et al.* (2001 und 2002) beschreiben Experimente, bei denen der Transfer von Genen, die bei der Tomate eine hypersensitive Resistenzreaktion (siehe Kap. 1.4) bewirken, zu Rapslinien mit erhöhter Resistenz gegen diese beiden Krankheiten führte. WANG & FRISTENSKY (2001) erzielten eine erhöhte Resistenz gegen *L. maculans* in transgenem Raps, der das *defense gene* DRR206 aus *Pisum sativum* L. exprimiert. Überexpressionen weiterer Gene für antimikrobielle Proteine (*defense products*), die bei transgenem Reis zu erhöhter Resistenz gegen Krankheitserreger führten (z. B. Stilben-Synthase: STARK-LORENZEN *et al.* 1997, Thaumatin-ähnliches Protein: DATTA *et al.* 1999), erscheinen auch für den Raps vielversprechend. Darüber hinaus arbeitet man daran, auch Raps, so wie bei Baumwolle und Mais schon üblich, mit Hilfe des bakteriellen Bt-Gens (aus *Bacillus thuringiensis*) gegen tierische Schädlinge zu schützen (ANONYMUS 2000, HALFHILL *et al.* 2001). Ein ernst zu nehmendes Problem beim Anbau von gentechnisch verändertem Raps stellen potentielle Auskreuzungen in nicht-transgene Pflanzen der gleichen Art bzw. in verwandte Arten (vertikaler Gentransfer) dar. Die nachfolgend gezeigten - meist geringen - Hybridisierungsrisiken sind sowohl als Chancen für den erwünschten interspezifischen Gentransfer als auch als Verdeutlichung der Schwierigkeit anzusehen, mit Hilfe erzwungener Kreuzungen Merkmale über Artgrenzen hinweg zu übertragen.

In diesem Zusammenhang ist neben der Problematik des Auftretens vereinzelter, aufgrund von ausgefallenen Samen in späteren Vegetationsperioden nachwachsender Pflanzen (*Volunteers*) die Fähigkeit des Pollens relevant, Entfernungen von bis zu 3 Kilometern (RIEGER *et al.* 2002) zu überwinden. So kann es sowohl mit anderen, z. B. konventionellen Rapspflanzen als auch mit verwandten Wildarten potentiell zu Hybridisierungen kommen (UBA 1998, SNOW 2002). Untersuchungen von RIEGER *et al.* (2002) verdeutlichen jedoch, daß der Genfluß von herbizidresistentem Raps auf Rapspflanzen benachbarter Felder mit durchschnittlich 0,07 % „kontaminierten“ Samenproben deutlich unter dem auch für die EU diskutierten Schwellenwert von 1 % liegt. Untersuchungen zur Auskreuzungswahrscheinlichkeit mit Wildcruciferen unter agronomischen Bedingungen zeigten im Falle von *Raphanus raphanistrum* L. sehr geringe Hybridisierungsfrequenzen: bei *B. napus* x *R. raphanistrum*  $2 \times 10^{-5}$  -  $5 \times 10^{-4}$  (CHÈVRE *et al.* 2000) bzw.  $4 \times 10^{-8}$  (RIEGER *et al.* 2001), bei *R. raphanistrum* x *B. napus*  $10^{-7}$  -  $3 \times 10^{-5}$  (eine Hybride, CHÈVRE *et al.* 2000) bzw. keine Hybriden (RIEGER *et al.* 2001). Demgegenüber sind häufige Hybridisierungen zwischen den nahe verwandten Arten *B. napus* und *B. rapa* beschrieben (JØRGENSEN & ANDERSEN 1994, BING *et al.* 1996). So gehen WILKINSON *et al.* (2003) nach Auswertung einer großangelegten Studie davon aus, daß es im Vereinigten Königreich jährlich zu 32000 Hybriden zwischen beiden Arten in wilden *B. rapa*-Populationen entlang der Flüsse und Kanäle kommt. Dies entspricht einer Hybridisierungsfrequenz von weniger als 0,01 %. Den Autoren zufolge kreuzen sich Pflanzen aus den seltener vorkommenden Unkrautbeständen von *B. rapa* in Rapsfeldern jedoch zu mehr als 2 % mit *B. napus*, was zu jährlich 17000 Hybriden führt.

Auf künstliche Bastardisierungen mit für diese Arbeit relevanten Wildarten sowie mit *B. juncea* wurde in den Kapiteln 1.3 und 4.1.2-4.1.4 eingegangen. Hierbei muß jedoch betont werden, daß Introgression, obwohl auf Hybridisierung basierend, nicht mit Hybridisierung und Genfluß synonym ist (STEWART JR *et al.* 2003). Unter Introgression verstehen die letztgenannten Autoren

die permanente Inkorporation von Genen eines Satzes differenzierter Populationen (Arten, Unterarten, Rassen u. s. w.) in einen anderen. Da diese Definition jedoch auch stabile Aneuploidien, z. B. disome Substitutionen oder Additionen, einschließen könnte, wird der Begriff der Introgression in der vorliegenden Arbeit enger gefaßt. Bezogen auf die konkrete Thematik ist damit der stabile Einbau von Wildarten-Genen in Rapschromosomen gemeint. Auch in diesem Kontext gilt es stets, den Einfluß der Kreuzungsrichtung zu beachten (DOEBLEY *et al.* 1987 und DOEBLEY 1990; siehe Erstellung von Nachkommen aus reziproken interspezifischen Kreuzungen zur Verifizierung der Epistasie-Hypothese im Rahmen dieser Arbeit, Kap. 3.1.4.5).

Die bis hierher referierten Ergebnisse zur Auskreuzungswahrscheinlichkeit in Wildarten basieren auf Studien mit nicht-transgenen Pflanzen. Dem stehen aktuelle Untersuchungen von WARWICK *et al.* (2003) in Rapsfeldern in Kanada gegenüber. Diese zeigen erstmalig Evidenz für eine Transgen-Introgression aus einer kommerziell angebauten genetisch modifizierten Kulturpflanze in eine verwandte Wildart. Die Autoren entdeckten Glyphosat-resistente Wildart x *B. napus*-Hybriden. Dies betraf hauptsächlich F<sub>1</sub>-Pflanzen aus *B. rapa* x *B. napus* (Genom AAC, 2n=29, morphologisch wie *B. rapa*). Die Hybridisierungen zwischen *B. rapa* und *B. napus* wurden in Feldexperimenten (Frequenz ungefähr 7 %) und in Wildpopulationen in kommerziellen Feldern (ca. 13,6 %) detektiert. Demgegenüber wurde nur eine *Raphanus raphanistrum* x *B. napus*-Hybride unter 32821 Keimlingen eines Feldexperiments mit herbizidresistentem Raps gefunden. Deren genomische Struktur deutet auf die Fusion eines unreduzierten Gameten von *R. raphanistrum* mit einem reduzierten Gameten von *B. napus* (RrRrAC, 2n=37) hin. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen kommerzieller Rapsfelder nach Analyse von 42828 bzw. 21841 Keimlingen keinerlei Hybriden mit *Sinapis arvensis* bzw. *Erucastrum gallicum*. Die Wahrscheinlichkeit eines Genflusses von transgenem Raps hin zu *R. raphanistrum*, *S. arvensis* oder *E. gallicum* wird demzufolge von WARWICK *et al.* (2003) mit weniger als  $2-5 \times 10^{-5}$  als sehr gering eingeschätzt. Hingegen befindet sich *B. rapa* mit Introgressionen für Herbizid-Toleranz in einem Evolutionsprozeß und könnte in freilebenden Populationen persistieren. Dies zeigt, daß neben der Fertilität auch die Fitneß für den Genfluß relevant ist (cf. STEWART JR *et al.* 2003).

Aufgrund der dargelegten geringen Hybridisierungswahrscheinlichkeiten zählen STEWART JR *et al.* (2003) Raps wie auch Luzerne, Zuckerrübe, Weizen und Sonnenblume hinsichtlich (unerwünschter) Introgressionen zu den *moderate risk crops*. Dies gilt trotz der vielen Wildarten der Tribus *Brassicaceae*, die als freilebende Populationen und als Agrarunkräuter vorkommen. Dem stehen *low risk* (Mais, Reis, Baumwolle) und *high risk crops* (*Sorghum*-Hirse) gegenüber. Die Verbreitung von Pollen gentechnisch veränderten Rapses läßt sich z. B. durch einen Mischanbau von transgenen, männlich-sterilen Pflanzen mit konventionell gezüchteten männlich-fertilen Pflanzen ausschalten (FEIL & STAMP 2001, cf. Abb. 1.2).

Die Anbaubedeutung des Rapses und sein Zukunftspotential verdeutlichen die Notwendigkeit, ihn optimal gegen Krankheiten und Schädlinge zu schützen. Aufgrund der beschriebenen Limitierungen sind gentechnische Methoden vom Züchtungsprozeß zumindest in Europa und Australien (cf. CONDIT 2001, BIOSCOPE 2002) auf absehbare Zeit ausgeschlossen. Somit gewinnt die konventionelle Züchtung mit Kreuzungen und Rückkreuzungen bei Nutzung verwandter Arten und Anwendung moderner molekularer Analysemethoden, wie in dieser Arbeit beschrieben, wieder an Bedeutung. Dies geschieht jedoch keinesfalls als Ausdruck eines „Anti-Gen-Raps-

Trends“ (SPAHL & DEICHMANN 2001). Im Gegenteil: Die angestrebte Lokalisierung von *L. maculans*-Resistenzgenen der verschiedenen Rückkreuzungslinien eröffnet die Möglichkeit, diese zukünftig zu klonieren und für Transformationsexperimente mit dem Raps zu nutzen. Damit könnte wertvolles zusätzliches Material für die Resistenzzüchtung geschaffen werden. Aufgrund des Vorkommens resistenter und anfälliger Individuen ist im Falle von *C. monensis* auch die direkte Nutzung der Wildart für die Klonierung von Resistengenen möglich.

#### 4.5 Fazit, kommerzielle Verwertbarkeit und Ausblick

Im Rahmen der Promotion wurden Rückkreuzungsnachkommen der drei Resistenzgruppen und Kontrollgenotypen zur Prüfung ihres Resistenzniveaus auf Kotyledonen- und Adultebene umfangreichen phytopathologischen Untersuchungen unterzogen. Allein in die besonders aussagekräftigen Tests mit Doppelinokulation waren mehr als 10000 Pflanzen integriert.

Die Ergebnisse zeigen die Eignung der Wildcruciferen *Coincya monensis* (Schnabelsenf) und *Sinapis arvensis* (Ackersenf) als Donorgenotypen für den Transfer von Resistenzen gegen *Leptosphaeria maculans* in den Raps. Bei beiden Gruppen wurden in langjährigen Rückkreuzungsprogrammen aus aneuploiden Pflanzen mit einer teilweise hohen Anzahl an Chromosomen der Wildart euploide Pflanzen putativer Rekombinationslinien entwickelt. Die Genomische *in situ*-Hybridisierung (GISH) ist von großem Wert in cytologischen Analysen intergenerischer Hybriden des Rapses mit verwandten Arten und der sich davon ableitenden Rückkreuzungsnachkommen. Nach Erreichen des Stadiums des Raps-Karyotyps ( $2n=38$ , keine GISH-Signale) sollten ergänzende molekular-cytogenetische Methoden zur Lokalisierung von Introgressionen verstärkt angewendet werden.

In der Gruppe mit Resistenzen aus *C. monensis* konnten wertvolle Linien selektiert werden, deren Adultresistenz auf einem dominanten Gen beruht. Andere Linien besitzen zusätzlich ein weiteres Resistenzgen. Bedingt durch den Rückkreuzungselter *B. napus* „Loras“ brauchen die *B. napus*-*C. monensis*-Linien zum Eintritt in die generative Phase nicht vernalisiert zu werden; sie entsprechen also Sommerraps. Trotz gegenüber *B. napus* „Loras“ etwas verzögerter Reife und unter Feldbedingungen festgestellter Heterogenität hinsichtlich des Blühbeginns, der Morphologie (insbesondere Pflanzenhöhe) und teilweise auch hinsichtlich der Fertilität bietet dieses Material beste Voraussetzungen für ein Einkreuzen in Raps-Hochleistungsmaterial. Aus diesem Grunde hat mit der Norddeutschen Pflanzenzucht (NPZ) ein leistungsstarkes mittelständisches Pflanzenzuchtunternehmen diese Linien übernommen. Das hier erstellte Material ist eine wertvolle Ergänzung des im Ausbau befindlichen Sommerrapsprogramms der NPZ und wurde zunächst in Tests in Westaustralien und Dänemark miteinbezogen. Weitere Analysen und die Suche nach Markern für Adultresistenz mittels Mikrosatelliten befinden sich in der Vorbereitungsphase.

Eine vermutlich ebenfalls oligogen bedingte Adultresistenz findet sich in den *B. napus*-*S. arvensis*-Linien. Diese Linien besitzen aus mindestens zwei Gründen besondere züchterische Bedeutung. Zum einen existieren bisher keine relevanten Berichte über ein Durchbrechen der Kotyledonen- und Adultresistenz von *S. arvensis* gegenüber *L. maculans*. Die also nach wie vor als absolut zu bezeichnende Resistenz dieser Wildcrucifere zeigte sich auch in den Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit gegenüber zwei Tox<sup>+</sup>-Isolaten der Pathogenitätsgruppe 4 durchgeführt wurden. Zum anderen vereinen sie die oligogene Adultresistenz von *S. arvensis*

(wahrscheinlich ein bis zwei Gene in den jeweiligen Linien) mit der partiellen, polygenen Adultresistenz von *B. napus* „Jet Neuf“, die sich in der für die Rückkreuzungen verwendeten Rapssorte „Ceres“ befindet, in sich. Dies befindet sich also in Übereinstimmung mit dem modernen Züchtungskonzept der Pyramidisierung von Resistenzgenen. Durch die Kombination derartig verschiedener Resistenzen und wahrscheinlich auch unterschiedlicher Resistenzmechanismen - hypersensitive Reaktion durch *S. arvensis*-Resistenz + schnelle Stengelverholzung (Lignin-Akkumulation) aufgrund der „Jet Neuf“-Gene; cf. Kap. 1.3 & 1.4 - erschwert das so entstandene Zuchtmaterial die Adaptation des als schnell evolvierend bekannten Pathogens (KUSWINANTI *et al.* 1999) *L. maculans*. Das für die zunächst sehr wirksamen monogenen Resistenzen bekannte rassen- (hier: isolat-)spezifische schnelle Durchbrechen derselben (vertikale Resistenz) sollte daher durch die moderate, rassenunspezifische horizontale Resistenz des Raps-Hintergrunds gedämpft oder sogar verhindert werden. Die Mehrzahl der vorgestellten *B. napus*-*S. arvensis*-Linien befindet sich momentan im Besitz von Bayer CropScience. Zur Zeit laufen abschließende Prüfungen des Materials seitens dieser Firma.

Die dritte Resistenzgruppe umfaßt dihaploide *B. napus*-*B. juncea*-Linien. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Linien mit Resistenzen aus den beiden Wildarten wurden bereits vielfach putativ rekombinante *B. napus*-*B. juncea*-Rückkreuzungsnachkommen mit Resistenzen gegen die Wurzelhals- und Stengelfäule erstellt. Dennoch ist das hier selektierte und analysierte Material von besonderem Wert, zeigt es doch, daß die monogene Adultresistenz gegenüber dem deutschen Isolat W4 im Falle der Inokulation mit dem australischen Isolat M1 von einem epistatischen Gen modifiziert wird. Dies führte trotz zweier adultanfälliger Eltern-Genotypen der Originalkreuzung, *B. napus* „Liropa“ und *B. juncea*, zur zunächst unerwarteten Ausprägung des resistenten Phänotyps in einigen DH-Linien. Diese Linien zeigen, daß auch eine weitere Ausbreitung *Brassica*-B-Genom-Arten- und insbesondere *B. juncea*-attackierender Isolate wie M1 nicht notwendigerweise den interspezifischen Transfer von Resistenzen aus *B. juncea* in den Raps in seiner Bedeutung einzuschränken braucht.

Bei allen drei Resistenzgruppen besitzt die Kotyledonenresistenz keine Indikatorfunktion für eine Adultresistenz. Beide Eigenschaften beruhen auf unterschiedlichen Genen. Dies ist auch für praktische Anwendungen zu beachten.

Geplante, zukünftige Untersuchungen, auch unter Einbeziehung des Verfassers dieser Arbeit, konzentrieren sich auf die Frage, ob etwaige (resistenzrelevante?) Introgressionen in Pflanzen mit Raps-Karyotyp nicht doch mittels umfangreicherer bzw. zusätzlicher molekular-cytogenetischer Methoden lokalisiert werden können. Hierzu gehören GISH-Untersuchungen an Pachytän- und meiotischen Metaphase I-Chromosomen, die auch detailliertere Aussagen zu allosyndetischen Chromosomenpaarungen erbringen dürften, ebenso wie *fibres*-FISH-Techniken (Kap. 4.2). Darüber hinaus sollen mittels geeigneterer molekularer Marker ausgewählte Resistenzen chromosomal lokalisiert werden. Diese könnten dann auch kloniert und zu Transformationen von anderem Zuchtmaterial genutzt werden.

Die Erschließung neuer Resistenzquellen bleibt angesichts der globalen Bedeutung des Rapsanbaus (Kap. 1.1 & 4.4) und seiner ständigen Bedrohung durch die Wurzelhals- und Stengelfäule (*L. maculans*, Kap. 1.2) eine der wichtigsten aktuellen Aufgaben der Rapszüchtung.