

1 EINLEITUNG

1.1 Raps - wichtigste Öl-liefernde Pflanze Deutschlands

Raps (*Brassica napus* L.) gehört zur Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*, *Cruciferae*) und ist vermutlich erst vor wenigen Jahrhunderten im Mittelmeerraum (FRANKE 1989) aus der spontanen Bastardisierung zwischen dem wilden Gemüse Kohl (*B. oleracea* L.) und Rübsen (*B. rapa* L.) entstanden. Wahrscheinlich sind Rapstypen nicht nur einmal, sondern mehrfach an verschiedenen Standorten und aus verschiedenen Formen der diploiden Elternarten entstanden (SONG & OSBORN 1992). Das Genom des amphidiploiden Rapses besteht aus $2n = 38$ Chromosomen und setzt sich aus den Genomen der beiden Ausgangsformen zusammen. Die Verwandtschaftsverhältnisse der kultivierten *Brassica*-Arten wurden anhand der Karyotypen postuliert (MORINAGA 1928, U 1935) und durch molekularbiologische Analysen bestätigt (PALMER *et al.* 1983). Die in Abb. 1.1 gezeigten amphidiploiden Arten Raps (Genom AACC), Indischer Senf [*B. juncea* (L.) Czern., $2n = 36$, Genom AABB] und Abessinischer/Äthiopischer Senf (*B. carinata* A. Braun, $2n = 34$, Genom BBCC) resultieren jeweils aus Genomkombinationen der diploiden Arten *B. nigra* (L.) Koch ($2n = 16$, Genom BB), *B. oleracea* ($2n = 18$, Genom CC) und *B. rapa* ($2n = 20$, Genom AA), die alle von einer gemeinsamen, vermutlich hexaploiden Grundart abstammen (PRAKASH & HINATA 1980, LAGERCRANTZ 1998, GRANT *et al.* 1998). Von den kultivierten *Brassica*-Ölsaaten wird *B. napus* als die Art mit dem größten Erntepotential angesehen (MENDHAM & SALISBURY 1995).

Bei Raps werden Winter- und Sommergebieten unterschieden: Winterraps wird hauptsächlich in Europa und China, Sommerraps nahezu ausschließlich in Gebieten mit extremeren Klimaten wie Australien und Kanada angebaut (POUZET 1995). Im europäischen Raum stellt Winterraps heute die wichtigste und weltweit - nach der Sojabohne - die zweitwichtigste Öl-liefernde Pflanze dar (ANONYMUS 2000, RAYMER 2002, FAO 2004). Innerhalb der EU war Deutschland 2004 mit einer Anbaufläche von 1,28 Mio. ha (davon fallen 99 % auf den Anbau von Winterraps) und einer Rekordenernte von 5,21 Mio. t Rapssaat führendes Rapserzeugerland (Quelle: BMVEL Oktober 2004).

Rapssamen enthalten 40-44 % Öl und 36-37 % proteinreiches Schrotmehl. Die Nutzungspalette des aus den Rapssamen gewonnenen Öls reicht heute je nach Sorte vom cholesterinfreien Speiseöl und hochwertigen Brat- und Backfett bis hin zum Rohstoff für Biodiesel, abbaubare Schmiermittel, Hydrauliköle, Tenside, Farben, Lacke, Kosmetika, Weichmacher oder auch Pflanzenschutzmittel. Das Rapsschrot findet als proteinreiches Futtermittel für Schweine, Rinder und Hühner Verwendung. Aktuell werden in Deutschland ca. 90 % der Anbaufläche zur Rapsproduktion für den Nahrungsmittelsektor verwendet.

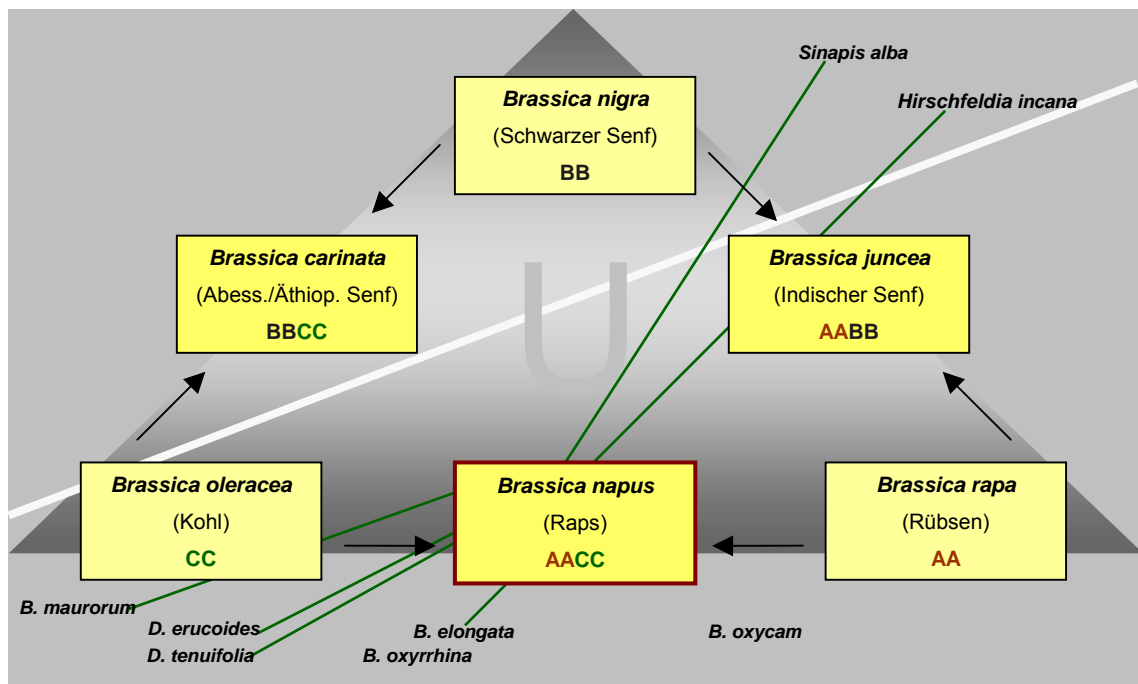


Abb. 1.1: Verwandtschaftsbeziehungen in der Gattung *Brassica* nach U (1935) und phylogenetische Einordnung ausgewählter, für diese Arbeit relevanter Kreuzblütler (nach PALMER & HERBON 1988, SONG *et al.* 1988 und 1990, WARWICK & BLACK 1991, GLIMELIUS *et al.* 1991). Die weiße Linie trennt die *nigra*-Gruppe von der *rapa/oleracea*-Gruppe. Die grünen Verbindungslinien stellen auf sexuellem Weg durchgeführte Art- und Gattungskreuzungen mit dem Raps dar.

Die modernen Rapsorten sowie der stetige signifikante Aufwärtstrend in Anbau und Ertrag der letzten 25 Jahre sind das Ergebnis intensiver züchterischer Arbeit, in deren Mittelpunkt vornehmlich Qualität (Ölgehalt und -zusammensetzung sowie Schrotqualität) und Ertragssteigerung, aber auch Standfestigkeit und Krankheitsresistenz standen (HOFFMANN *et al.* 1985, SPECHT 2005).

In Mitteleuropa lassen sich die Anfänge des Rapsanbaus bis in das 14. Jahrhundert zurückverfolgen (SCHUSTER 1992). Seitdem wurde Rapsöl in erster Linie als Lampen- und Schmieröl oder zur Herstellung von Seife eingesetzt. Erste Züchtungsmaßnahmen wurden im 19. Jahrhundert, als Raps bereits in weiten Teilen Europas kultiviert wurde (GUGEL & PETRIE 1992), begonnen und in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts intensiviert. Ein entscheidender Züchterfolg wurde 1974 erzielt, indem die erste erucasäurefreie Rapsorte (so genannter 0-Raps) auf den Markt gebracht wurde. Erucasäure wurde im Fütterungsversuch bei Ratten wegen Verursachung pathologischer Veränderungen des Herzmuskels, Herzverfettung und Wachstumsverzögerungen als gesundheitlich bedenklich eingestuft. In 0-Rapsorten ist der für die Verlängerung der Kohlenwasserstoffkette der Fettsäure verantwortliche Syntheseweg genetisch blockiert, so dass die einfach ungesättigte Erucasäure (C22:1) gegen die ebenfalls einfach ungesättigte Ölsäure (C18:1) ausgetauscht ist. Das Fettsäuremuster des so entstandenen neuen Rapsöls mit 5-8 %

gesättigten Fettsäuren, 60-65 % einfach und 30-35 % mehrfach ungesättigten, teilweise essentiellen Fettsäuren (z. B. Alpha-Linolensäure, C18:3) wird ernährungsphysiologisch für den Menschen als nahezu ideal angesehen. Hoch-Erucasäure-Sorten werden für technische Zwecke als Rohstoff zur Herstellung von Biodiesel, Schmiermitteln, Plastik und Parfums dennoch weiterhin entwickelt (FEIL & STAMP 1993).

Eine weitere wichtige Qualitätsverbesserung in der Rapszüchtung gelang 1985 mit der Einführung des 00-Rapses: Der Anteil an den bitter schmeckenden, für monogastrische Lebewesen toxischen Glucosinolaten im Schrotmehl konnte durch klassische Züchtung auf unter 10 % des Ausgangswertes gesenkt werden (HOFFMANN 1985). Das Protein im Schrot von 00-Raps hat eine ähnlich hohe ernährungsphysiologische Wertigkeit wie Sojaprotein (FEIL & STAMP 1993) und ist daher gut für die Tierfütterung geeignet. Heute wird für Ernährungszwecke ausschließlich 00-Raps angebaut, der 1987 in der BRD als Standardqualität eingeführt wurde (RÖBBELEN 1999).

Aktuell (zur Ernte 2004) besteht der in Deutschland angebaute Raps zu knapp 50 % aus Hybridsorten (*restored hybrids*), bei denen der Heterosiseffekt der F₁-Hybriden (größere Wüchsigkeit und Ertragssteigerung gegenüber den Eltern, erstmals beschrieben bei SHULL 1908) ausgenutzt wird. Grundlage für die Erzeugung von Hybridsaatgut bilden jeweils zwei leistungsfähige Inzuchtlinien mit möglichst großer genetischer Distanz, die miteinander gekreuzt werden, sowie ein verlässliches Sterilitätssystem wie CMS (cytoplasmatisch induzierte männliche Sterilität), das zuvor in die eine Elternlinie eingekreuzt wurde. Die andere Linie enthält die Gene für die Restauration der Pollenfertilität. Seit der Einführung von Lembkes Winterraps 1997 wurden Hybridsorten soweit verbessert, dass sie den offen abgeblühten Liniensorten (*open pollinated varieties*) in ihrem Ölgehalt gleichwertig sind.

Der Raps ist Wirtspflanze für zahlreiche tierische und mikrobielle Erreger, die qualitäts- und ertragsmindernde Krankheiten verursachen. Wichtigste Ursache für Ertragsverluste stellt der Befall durch phytopathogene Pilze dar (RIMMER & BUCHWALDT 1995, TEWARI & MITHEN 1999). Die enorme Ausweitung des Winterrapsanbaus seit den 90er Jahren und die daraus resultierende Tendenz zu engeren Fruchtfolgen führten zum verstärkten Auftreten von Rapskrankheiten (AMELUNG *et al.* 1996, GARBE 1996), was den Einsatz von Insektiziden und Fungiziden notwendig macht (SPECHT 2005). Um den pflanzenbaulichen Aufwand so gering wie möglich zu halten, rückt neben Qualitäts- und Ertragssteigerung die Entwicklung krankheitsresistenter oder -toleranter Rapsorten immer mehr in den Vordergrund.

1.2 Die Rapsschwärze – eine bedeutende Krankheit des Rapses

Die Rapsschwärze (*Alternaria* spp., erstmals von KÜHN 1855 als Rapsverderber *Sporidesmium exitiosum* beschrieben) ist eine weltweit verbreitete, sporadisch auftretende Krankheit bei *Brassicaceae* (HUMPHERSON-JONES & PHELPS 1989). In Deutschland, wo sie Ernteverluste von bis zu 30 % bedingen kann (DAEBELER & SEIDEL 1989), zählt sie neben der Wurzelhals- und Stängelfäule [*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.], der Rapswelke (*Verticillium* spp., z. B. *V. dahliae* Kleb.) und der Weißstängeligkeit [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary] zu den wirtschaftlich bedeutendsten pilzparasitären Rapskrankheiten. Die Krankheit kann alle überirdischen Pflanzenorgane in jedem Wachstumsstadium betreffen. Wirtschaftliche Bedeutung hat die Rapsschwärze vor allem in feuchtwarmen Regionen und Sommern. Begünstigt wird sie durch Temperaturen über 20 °C und eine relative Luftfeuchte von 95-100 % (DEGENHARDT *et al.* 1982, HONG & FITT 1995). Von stärkeren Schäden sind besonders häufig windgeschützte Lagen mit hoher Luftfeuchte betroffen. Ertragsverluste treten meist auf, wenn vor der Reife längere feuchtwarme mit trockenwarmen Perioden abwechseln (LOUVET & BILLOTTE 1964). KOLTE *et al.* beschreiben 1987 die Rapsschwärze als wichtigste Krankheit der Öl-liefernden Kulturcruciferen in Indien, mit durchschnittlichen Ertragsverlusten von 35-40 %.

Verursacht wird die Krankheit durch *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. und *A. brassicicola* (Schwein.) Wiltshire. Beide Arten gehören zur Gruppe der Deuteromyceten (*Fungi imperfecti*), von diesen Erregern ist ausschließlich die asexuelle Form der Vermehrung über Konidiosporen bekannt. Neben Raps befallen die Erreger praktisch jede wichtige Art der Gattung *Brassica* (NEERGAARD 1945, MAUDE & HUMPHERSON-JONES 1980, DILLARD *et al.* 1998, PATTANAMAHAKUL & STRANGE 1999, WESTMAN *et al.* 1999, OTANI *et al.* 2001).

Die genetische Variabilität der Pathogene ist vergleichsweise gering. Innerhalb verschiedener Einsporisolate wurden genetische Unterschiede (COOKE *et al.* 1998, BOCK *et al.* 2002) und Abstufungen in der Aggressivität (ATKINSON 1950, MRIDHA 1983, KOLTE *et al.* 1991) verzeichnet, eine starke Spezialisierung wie bei anderen *Alternaria*-Arten konnte aber bisher nicht gezeigt werden.

Das Pathogen zeichnet sich durch einen kurzen Entwicklungszyklus aus, eine Massenvermehrung und Ausbreitung im Bestand ist daher schnell möglich. Der Lebenszyklus der Rapsschwärze-Erreger ist in Abb. 1.2 detailliert dargestellt.

Der Pilz überdauert saprophytisch in Form von Sporen oder Myzel auf Pflanzenrückständen oder als latente Infektion in Samen (RANGEL 1945, ROTEM 1994). Im Falle einer samenbürtigen Verbreitung infiziert der Pilz die Pflanze unmittelbar nach der Keimung (SHRESTHA *et al.* 2000). Ansonsten werden Konidiosporen des Erregers gebildet bzw. unter trockenen Bedingungen freigesetzt und über Spritzwasser oder mit dem Wind, bei Trockenheit oft über große Entfernungen, verbreitet. Für die Keimung der Sporen und

die Infektion der Pflanze ist freies Wasser notwendig (HUMPHERSON-JONES 1992). Die Penetration in das pflanzliche Gewebe erfolgt in der Regel über Stomata und Verletzungen, aber auch direkt durch die Kutikula (ROTEM 1994). Bei *A. brassicicola* wurden z. B. Cutinase- (YAO & KÖLLER 1994 und 1995, FAN & KÖLLER 1998) und Lipase-Gene (BERTO *et al.* 1997 und 1999) als Virulenzfaktoren nachgewiesen.

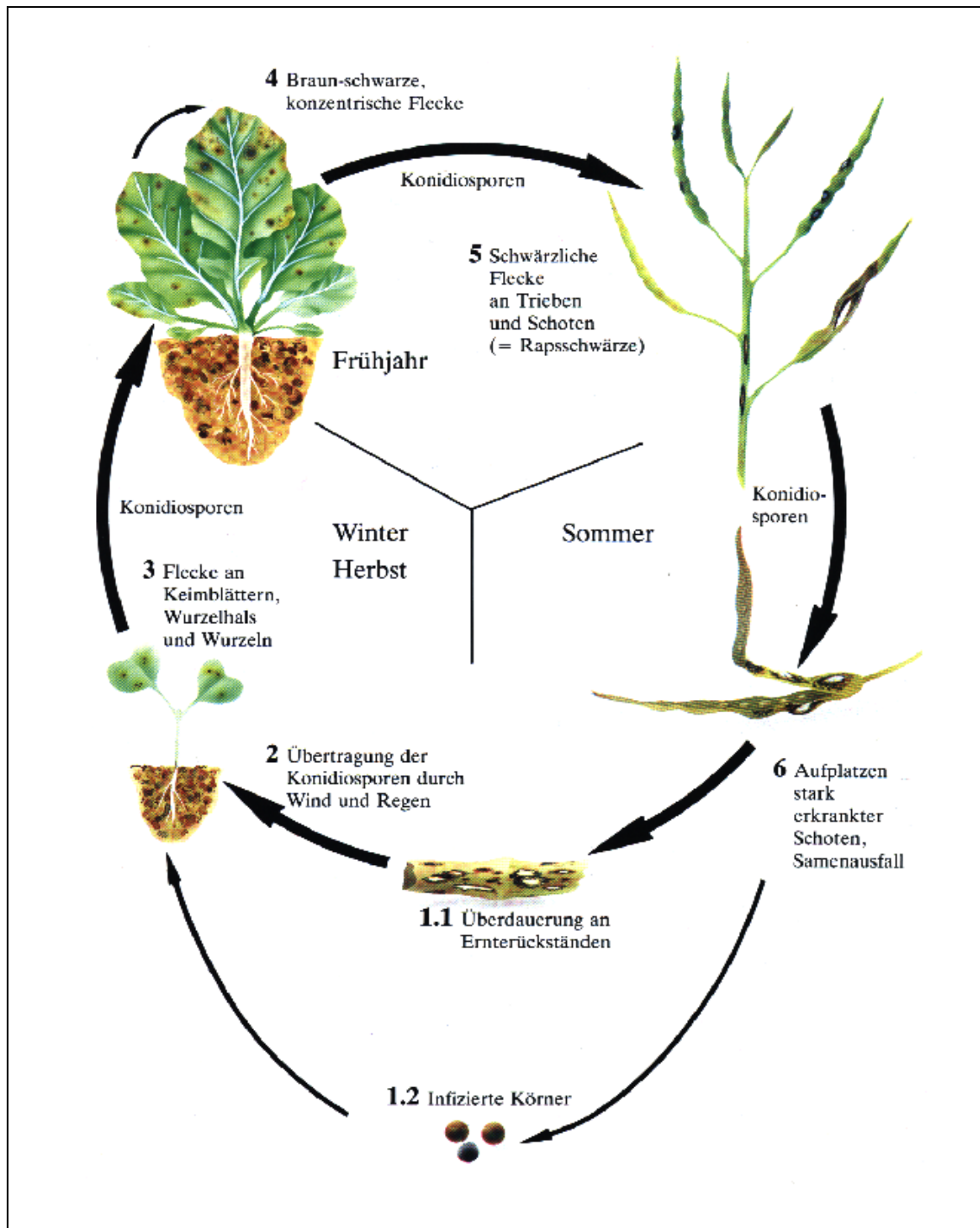


Abb. 1.2: Lebenszyklus von *Alternaria* spp. (aus PAUL 1988).

Erste makroskopisch sichtbare Symptome treten im Herbst oder Frühling, drei Tage nach Penetration des Gewebes in Form von schwarzen Mikroläsionen an Kotyledonen und Hypokotyl auf. Die Infektion greift auf adulte, meist bodennahe Blätter über, wo sich kreisförmige, braune, 0,5-2 cm große nekrotische Läsionen mit konzentrischen alternierend hellen und dunklen Zonen bilden. Diese sind, bedingt durch die Abgabe pilzlicher Toxine (TEWARI 1983), häufig von einem chlorotischen Hof umgeben. Bei starkem Befall fließen die Läsionen ineinander über, das Blatt vergilbt, stirbt und fällt vorzeitig ab. Ertragsrelevant bei Raps ist vor allem der Befall von Schoten. Dort bilden sich schmale, längliche oder kreisförmige schwarze Läsionen, die sich später über die gesamte Schote ausbreiten. Die Folgen sind Notreife, Verminderung der Tausendkornmasse und Keimfähigkeit der Samen, frühzeitiges Aufplatzen der Schote sowie Samenausfall, der zu Ertragsverlusten bis zu 60 % führen kann (DAEBELER *et al.* 1986).

Dem Keimlingsbefall kann durch Fungizidbehandlung des Saatguts vorgebeugt werden (SHRESTHA *et al.* 2000). Der Einsatz von Fungiziden an adulten Pflanzen ist bei für den Pilz günstigen Bedingungen notwendig, aber nicht immer wirtschaftlich interessant, da das Befallsgeschehen der Rapsschwärze in besonderem Maße von der Witterung bestimmt wird (HUMPHERSON-JONES & PHELPS 1989) und es bisher noch nicht gelungen ist, eine ausreichend sichere Befallsprognose zu entwickeln. Als Alternative zum stetig steigenden Einsatz von Fungiziden, die eine erhebliche Belastung für Mensch und Umwelt darstellen, bietet sich die Nutzung der erblichen biotischen Resistenz im Wirt, d. h. in der Kulturart oder in verwandten Arten, an.

Die Aufklärung der molekularen Grundlagen der pflanzlichen Pathogenerkennung und -abwehr steht daher im Mittelpunkt des Interesses der Phytopathologie und ist Gegenstand intensiver Forschung.

1.3 Resistenzmechanismen bei Pflanzen: Wirt-Parasit-Interaktionen

Um die Interaktion zwischen Pflanze und Pilz sowie potentiell aktivierte Resistenzmechanismen nach einer Infektion mit *Alternaria* zu verdeutlichen, werden im Folgenden zunächst einige grundlegende Konzepte der pflanzlichen Pathogenabwehr erläutert. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Interaktion zwischen Pflanze und pilzlichem Erreger.

Zwei Arten der Wirt-Parasit-Interaktion werden unterschieden: Kann ein bestimmtes Pathogen einen Wirt befallen, kommt es zur Krankheitsausprägung, und man spricht von einer kompatiblen Interaktion. Die Pflanze ist anfällig (suszeptibel) und das Pathogen virulent. Hindert die Pflanze den Erreger daran, sich zu vermehren, liegt Resistenz des Wirts und Avirulenz des Pathogens vor (inkompatible Interaktion).

Die meisten Pflanzen sind gegen die meisten Erreger resistent. Die am weitesten verbreitete Form der Resistenz ist die **Nichtwirtsresistenz**, bei der unspezifisch induzierte, vor allem aber konstitutive oder präformierte Resistenzbarrieren die Bildung von Infektionsstrukturen durch ein Pathogen verhindern (HEATH 2000). Barrieren struktureller Art stellen vor allem der Wachsbelaag und die Behaarung von Pflanzenteilen, die Dicke und chemische Zusammensetzung von Zellwand und Kutikula sowie Morphologie und Öffnungszustand von Stomata und Lentizellen dar. Chemische Barrieren beruhen auf dem Fehlen oder der Gegenwart verschiedener Faktoren. Oft handelt es sich hierbei um in der Vakuole akkumulierte toxische Sekundärmetabolite aus der Klasse der Phenole, Lactone und Saponine (OSBOURNE 1996, FILIPPONE *et al.* 1999). Die hauptsächlich in Cruciferen vorhandenen Glucosinolate (RASK *et al.* 2000) haben einen Einfluss auf das Resistenzverhalten von Pflanzen gegenüber Insekten (KORITSAS *et al.* 1989, ROESSINGH *et al.* 1992, SOROKA *et al.* 2003), der Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Glucosinolaten sowie deren Abbauprodukten und der Resistenz gegen pilzliche Erreger wird diskutiert (GIAMOUSTARIS & MITHEN 1997, MANICI *et al.* 1997, ANDREASSON *et al.* 2001).

Eine weitere Form der Resistenz ist die Pathogen-induzierte **Wirtsresistenz**, bei der strukturelle und chemische Barrieren erst als Antwort auf eine Infektion durch ein bestimmtes Pathogen gebildet werden. Die Wirtsresistenz wird in eine horizontale, rassenunspezifische und eine vertikale, rassenspezifische Resistenz unterteilt (VANDERPLANK 1978). Horizontale Resistenz wird meist polygen vererbt und hängt von abiotischen Faktoren sowie von dem jeweiligen genetischen Hintergrund der resistenten Pflanze ab. Sie verleiht einen Teilschutz gegen mehrere Rassen (Pathotypen) eines Pathogens. Der Erreger kann diese quantitative Resistenz nicht vollständig überwinden. Im Gegensatz dazu wirkt die vertikale Resistenz gegen einen bestimmten Pathotypen eines Erregers vollständig und gegen einen anderen gar nicht. Diese Art der Resistenz [auch Gen-für-Gen-Resistenz nach FLOR (1971) genannt] wird in der Regel monogen vererbt. Verfügt der Wirt über ein bestimmtes Resistenzgen (R-Gen) und der Erreger über ein entsprechendes Avirulenzgen (avr-Gen), kommt es zu einer Abwehrreaktion (Inkompatibilitätsreaktion). Wenn aber bei dem Zusammentreffen von Wirt und Erreger entweder das avr-Gen des Pathogens oder das komplementäre R-Gen der Pflanze fehlt, führt dies zu einer kompatiblen Reaktion und zur Ausprägung der Krankheit (KEEN 1990, DE WIT 1992, DANGL & JONES 2001). Die „Gen-für-Gen-Hypothese“ wird durch ein biochemisches Signal-Rezeptor-Modell interpretiert.

Zahlreiche R- und avr-Gene wurden in den letzten Jahren isoliert und charakterisiert (HAMMOND-KOSACK & JONES 1996, BENT 1996, DE WIT 1997, GRANT & MANSFIELD 1999, DANGL & JONES 2001, HOLUB 2001, HULBERT *et al.* 2001, JONES 2001, BONAS & LAHAYE 2002, McDOWELL & WOFFENDEN 2003). R-Genprodukte fungieren in der Regel, direkt oder

indirekt, als Rezeptoren für die pathogenspezifischen avr-Genprodukte. Dies sind vom Pathogen freigesetzte, strukturell verschiedenartige Elizitoren wie Proteine (SHOLTENS-TOMA & DE WIT 1988), Glykoproteine (PARKER *et al.* 1991), Fettsäuren (BOSTOCK *et al.* 1982), Lipopolysaccharide, Poly- und Oligosaccharide (SHARP *et al.* 1984). Die pflanzlichen Rezeptoren werden aufgrund ihrer strukturellen Merkmale in fünf Klassen unterteilt (DE WIT 1997, ELLIS & JONES 1998, ELLIS *et al.* 2000, COHN *et al.* 2001), von denen sich die größte Klasse (NB-LRR-Klasse) durch carboxyterminale, in ihrer Anzahl variierenden *leucine rich repeats* (LRRs) und eine putative Nukleotid-bindende Domäne (*NB-site*) auszeichnet. LRRs sind an der Rezeptor-Elizitor-Interaktion beteiligt und somit für die rassenspezifische Erkennung des Pathogens verantwortlich (MARTIN 1999, ELLIS *et al.* 1999), während die *NB-site* für die Signaltransduktion zuständig ist (MARTIN 1999). Rassenspezifische Resistenz kann vom Pathogen über eine Veränderung des avr-Gens durch Mutation überwunden werden. Die Pflanze reagiert auf solche genetischen Veränderungen mit der Bildung von Genclustern verschiedener R-Loci (MICHELMORE 2000, RICHTER & RONALD 2000). Neue Spezifität kann durch ungleiche Rekombination und Genkonversion generiert werden.

Nach dem Erkennen des Pathogens über die Rezeptor-Elizitor-Bindung wird der aufgenommene Reiz durch eine Signaltransduktionskaskade weitergeleitet. Es kommt zu Änderungen im Membranpotential, verursacht durch H^+ - und Ca^{2+} -Einstrom sowie K^+ - und Cl^- -Ausstrom (MATHIEU *et al.* 1991, BACH *et al.* 1993, TAVENIER *et al.* 1995, ATKINSON *et al.* 1996). Diese Ionenströme sind Voraussetzung für Proteinaktivierung durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, für die Aktivierung spezifischer MAP-Kinasen (LIGTERINK *et al.* 1997, YANG *et al.* 2001, ASAI 2002) und für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch einen membrangebundenen NADPH-Oxidase-Komplex oder eine apoplastisch lokalisierte Peroxidase (*oxydative burst*, DANGL *et al.* 1996, LAMB & DIXON 1997, DANGL & JONES 2001). ROS ($\bullet OH$, $\bullet O_2^-$, H_2O_2) wirken toxisch auf Pathogene und sind beim oxidativen *crosslinking* von Zellwandbestandteilen (als Barriere gegen Mikroorganismen) beteiligt (BRADLEY *et al.* 1992, BRISSON *et al.* 1994, MCDOWELL & DANGL 2000). Außerdem fungieren sie als *second messenger* in der Signaltransduktion (LAMB & DIXON 1997, MCDOWELL & DANGL 2000) und sind am Auslösen des Zelltods bei der hypersensitiven Reaktion (GLAZENER *et al.* 1996), an der systemisch erworbenen Resistenz (ALVAREZ *et al.* 1998) und an der Produktion von Phytoalexinen beteiligt. Darüber hinaus erfolgt eine Aktivierung von Phospholipasen, möglicherweise über G-Proteine (KAWASAKI *et al.* 1999). Die Wirkungsweise der Phospholipase ist dabei eng mit einer Freisetzung von Linolensäure verbunden, die eine Vorstufe für die Jasmonsäure-Biosynthese darstellt.

Neben der Jasmonsäure (ANDERSEN *et al.* 1992, SCHWEIZER *et al.* 1997) wurde die Beteiligung von Ethylen (KIEBER 1997, LUND *et al.* 1998) und Salicylsäure (WARD *et al.* 1991, MALAMY & KLESSIG 1992) an der Pathogenantwort beschrieben. Diese endogenen

Signalmoleküle regulieren auf verschiedenen, aber überlappenden Signaltransduktionswegen die Genexpression (REYMOND & FARMER 1998, FEYS & PARKER 2000, SCHENK *et al.* 2000, DEVADAS *et al.* 2002, DEVOTO & TURNER 2003).

Die Gesamtheit aller ausgelösten Signale resultiert in einer Änderung von Enzymaktivitäten (Aktivierung oder Inhibierung), was letztendlich zu einer veränderten Genexpression und damit zur Abwehrreaktion führt.

Die R-Gen-spezifische Resistenz ist häufig verbunden mit einer schnellen, auf die Infektionsstelle begrenzten Nekrotisierung von Pflanzenzellen, der sogenannten hypersensitiven Reaktion (JI *et al.* 1998, PRELL & DAY 2001). Diese tritt innerhalb von 8-12 Stunden nach dem ersten Kontakt mit dem Pathogen ein. Dem Erreger wird die Nahrungsgrundlage entzogen und eine weitere Ausbreitung des Pathogens im Gewebe verhindert (LEVINE *et al.* 1994, DOREY *et al.* 1998). Gleichzeitig wird die Produktion antimikrobieller Substanzen (z. B. Phytoalexine, s. u.) induziert (NARUSAKA *et al.* 2003).

Ausgehend von dieser lokal induzierten Resistenz kann, verbunden mit einem Anstieg von Salicylsäure (GAFFNEY *et al.* 1993, DELANEY *et al.* 1994, MCDOWELL & DANGL 2000) und der Induktion zahlreicher *pathogenesis related proteins* (PR-Proteine, WARD *et al.* 1991, VAN LOON *et al.* 1994, KOMBRINK & SOMSSICH 1995, KOMBRINK & SOMSSICH 1997, KITAJIMA & SATO 1999) eine systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR) für die gesamte Pflanze vermittelt werden. SAR führt in der Regel zu einer Multipathogen-Resistenz, die wirksam gegen Pilze, Viren und Bakterien ist (RYALS *et al.* 1994 und 1996). PR-Proteine werden in 14 Familien unterteilt (PR 1-PR 14, VAN LOON & VAN STRIEN 1999). Zu ihnen gehören unter anderem Enzyme der Phytoalexin-Biosynthese, fungitoxische Proteine mit chitinbindenden Domänen (BROEKAERT *et al.* 1989, VAN PARIJS *et al.* 1991) und hydrolytische Enzyme wie Chitinasen und β -(1,3)-Glucanasen (HENNIG *et al.* 1993, BUCHTER *et al.* 1997, HONG *et al.* 2000, JUNG & HWANG 2000), die Komponenten der pilzlichen Zellwand degradieren (SCHRODER *et al.* 1992).

Eine andere Form der systemischen Resistenz stellt die durch nicht-pathogene Stämme eines Erregers ausgelöste *induced systemic resistance* (ISR) dar. ISR ist Salicylsäure-unabhängig (PIETERSE *et al.* 1998) und nicht mit der Induktion von PR-Proteinen verbunden. Involviert sind hingegen Signaltransduktionswege, die Ethylen und Jasmonsäure erfordern.

Relevant bei der Antwort auf phytopathogene Pilze ist insbesondere die postinfektionelle Produktion von Phytoalexinen (MÜLLER & BÖRGER 1940, MÜLLER *et al.* 1976, CONN *et al.* 1988). Diese niedermolekularen, strukturell sehr heterogenen, speziestypischen Sekundärstoffe (Isoflavonoide, Stilbene, Polyacetylene, Sesquiterpene und andere, DIXON 2001), werden in der Vakuole oder der Zellwand akkumuliert und haben fungitoxische

Wirkung. Resistente Pathogene sind in der Lage, diese Metabolite enzymatisch zu detoxifizieren (PEDRAS 2004).

Ebenfalls zu den R-Gen-vermittelten Abwehrreaktionen zählen strukturelle Veränderungen wie Lignifikation, Suberisation und Kallosebildung (KAUSS *et al.* 1989, FRIC & TAMAS 1993).

Die einzelnen Komponenten der Pathogenabwehr kommen bei Kontakt mit verschiedenen Pathogenen unterschiedlich zur Ausprägung (GLAZEBROOK & AUSUBEL 1994, THOMMA *et al.* 1998, MALECK & DIETRICH 1999). Sie können miteinander interagieren, konvergent oder überlappend sein (FEY & PARKER 2000). Die verschiedenen Signalmoleküle haben teilweise synergistische, teilweise antagonistische Effekte (SCHENK *et al.* 2000, GLAZEBROOK *et al.* 2003). Noch sind nicht alle Einzelheiten in der Pathogenantwort (Signaltransduktion, SAR-Weg) geklärt, die letztendlich zu der sichtbaren Resistenzreaktion führen. Übersichtsartikel und Modelle wurden u. a. von SCHEEL (1998), GLAZEBROOK (2001), DIXON *et al.* (2002) und HAMMOND-KOSACK & PARKER (2003) vorgestellt.

1.4 Resistenzantworten auf Infektionen mit *A. brassicae* bzw. *A. brassicicola*

Die pflanzlichen Abwehrmechanismen im Zusammenhang mit den Erregern der Rapsschwärze sind noch nicht vollständig geklärt.

Verantwortlich für die Ausbildung von Nekrosen und Chlorosen auf Blättern nach Infektion mit *A. brassicae* sind die wirtsspezifischen, zyklischen Phytotoxine Destruxin B und Homodestruxin B (BAINS & TEWARI 1987, PEDRAS *et al.* 2002, WOLPERT *et al.* 2002), die dem Pilz die Penetration in das pflanzliche Gewebe erleichtern. Auch bei *A. brassicicola* konnten phytotoxische Metabolite nachgewiesen werden (HODGKIN & McDONALD 1986), insbesondere das wirtsspezifische AB-Toxin (OTANI *et al.* 1998a), das (ausschließlich) nach Interaktion des Pathogens mit einer Wirtspflanze freigesetzt wird (OTANI *et al.* 1998b und 2001). Die Wirtsspezifität von Destruxin B bzw. Homodestruxin B basiert auf einer schnellen Detoxifizierung durch Hydroxylierung und anschließender Glykosylierung in resistenten Pflanzen (z. B. *Sinapis alba*, PEDRAS *et al.* 2001; *Camelina sativa*, PEDRAS *et al.* 1999; *Capsella bursa-pastoris* und *Eruca sativa*, PEDRAS *et al.* 2003). Bei anfälligen Pflanzen finden diese Reaktionen ebenfalls statt, jedoch mit geringerer Geschwindigkeit (PEDRAS *et al.* 2001). Das Produkt der Hydroxylierungsreaktion (Hydroxydestruxin B) induziert bei resistenten Pflanzen zusätzlich die Synthese von Phytoalexinen [Sinalexin und Sinalbin A bei *S. alba*, PEDRAS *et al.* 2001; Camalexin bei *C. sativa* (JEJELOWO *et al.* 1991) und *C. bursa-pastoris* (PEDRAS *et al.* 2003)]. Auf Seiten des Erregers verhindern Camalexin und dessen Derivate die Synthese von Destruxin B (PEDRAS *et al.* 1998) und wirken

fungitoxisch (THOMMA *et al.* 1999b). Camalexin hat eine ähnliche Struktur wie das synthetische, systemisch wirkende Fungizid Thiabendazole, was extensiv als Pflanzenschutzmittel eingesetzt wird (BROWNE *et al.* 1991).

Auch in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, die ebenfalls zur Familie der *Brassicaceae* gehört, wurde die Produktion von Camalexin nach Infektion mit *A. brassicicola* nachgewiesen (THOMMA *et al.* 1999b). Verschiedene *pad* (*phytoalexin deficient*)-Mutanten wurden charakterisiert (GLAZEBROOK *et al.* 1997, ZHOU *et al.* 1998 und 1999 THOMMA *et al.* 1999b, RUSTÉRUCCI *et al.* 2001). Die einzige Nullmutation stellte hierbei die *pad3*-Mutation dar. PAD3 spielt eine Rolle in der Camalexinbiosynthese (GLAZEBROOK & AUSUBEL 1994), wahrscheinlich in Form einer Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenase (ZHOU *et al.* 1999). Die Mutante erwies sich als anfälliger gegenüber *A. brassicicola* als der Wildtyp (ZHOU *et al.* 1999, THOMMA *et al.* 1999b). Die phytoalexinbedingte Abwehr in *A. thaliana* ist ROS-induzierbar (ZHAO *et al.* 1998, NARUSAKA *et al.* 2003) und Salicylsäure-, Ethylen- und Jasmonsäure-unabhängig (THOMMA *et al.* 1999b). Sie reicht jedoch nicht aus, um Resistenz gegen *A. brassicicola* zu vermitteln (KAGAN & HAMMERSCHMIDT 2002). Vielmehr sind mindestens zwei verschiedene Pathogen-induzierte Effektormoleküle an der *Alternaria-Arabidopsis*-Interaktion beteiligt, die durch verschiedene, miteinander interagierende Signalwege kontrolliert werden (FEYS & PARKER 2000, SCHENK *et al.* 2000). Resistenz gegen *A. brassicicola* erfordert neben dem Camalexin-bedingten Abwehrweg den Jasmonsäure- und Ethylen-Signaltransduktionsweg (THOMMA *et al.* 1998, KACHROO *et al.* 2003). Die Jasmonsäure-insensitive Mutante *coi1* und die Ethylen-insensitive Mutante *ein2* zeigen höhere Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit *A. brassicicola* als der Wildtyp Col-0 (THOMMA *et al.* 1998 und 1999a). Beide Mutationen verhindern die Expression des pflanzlichen Defensins PDF1.2 sowie der basischen Chitinase PR-3 und des sauren *hevein-like protein* PR-4 (THOMMA *et al.* 1998 und 1999b). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl der Jasmonsäure- als auch der Ethylen-abhängige Signalweg in die Abwehrantwort involviert sind. Vorausgesetzt, dass die phytoalexinbedingte Abwehr intakt ist, reicht der Jasmonsäure-Signalweg jedoch aus, um eine Resistenz zu vermitteln, die der des Wildtyps weitgehend entspricht. (THOMMA *et al.* 1998 und 1999a, VAN WEES *et al.* 2003). Die (leicht) erhöhte Anfälligkeit der *ein2*-Mutante weist darauf hin, dass der Jasmonsäure- und der Ethylen-Signalweg modulierend aufeinander einwirken. Auch in von der Infektionsstelle entfernten Blättern wurde ein Jasmonsäure-Anstieg, verbunden mit der Expression von PDF1.2 beobachtet (PENNINCKX *et al.* 1996). Weiterhin wird vermutet, dass es *downstream* von PAD3 zu einem Austausch von Signalen zwischen den Salicylsäure-, Jasmonsäure- und Ethylen-Wegen mit anschließender Aktivierung von PR-Genen kommt (NARUSAKA *et al.* 2003). In Abb. 1.3 ist ein Modell zu den verschiedenen Signalwegen und deren Interaktionen bei *A. thaliana* nach Infektion mit *A. brassicicola* dargestellt.

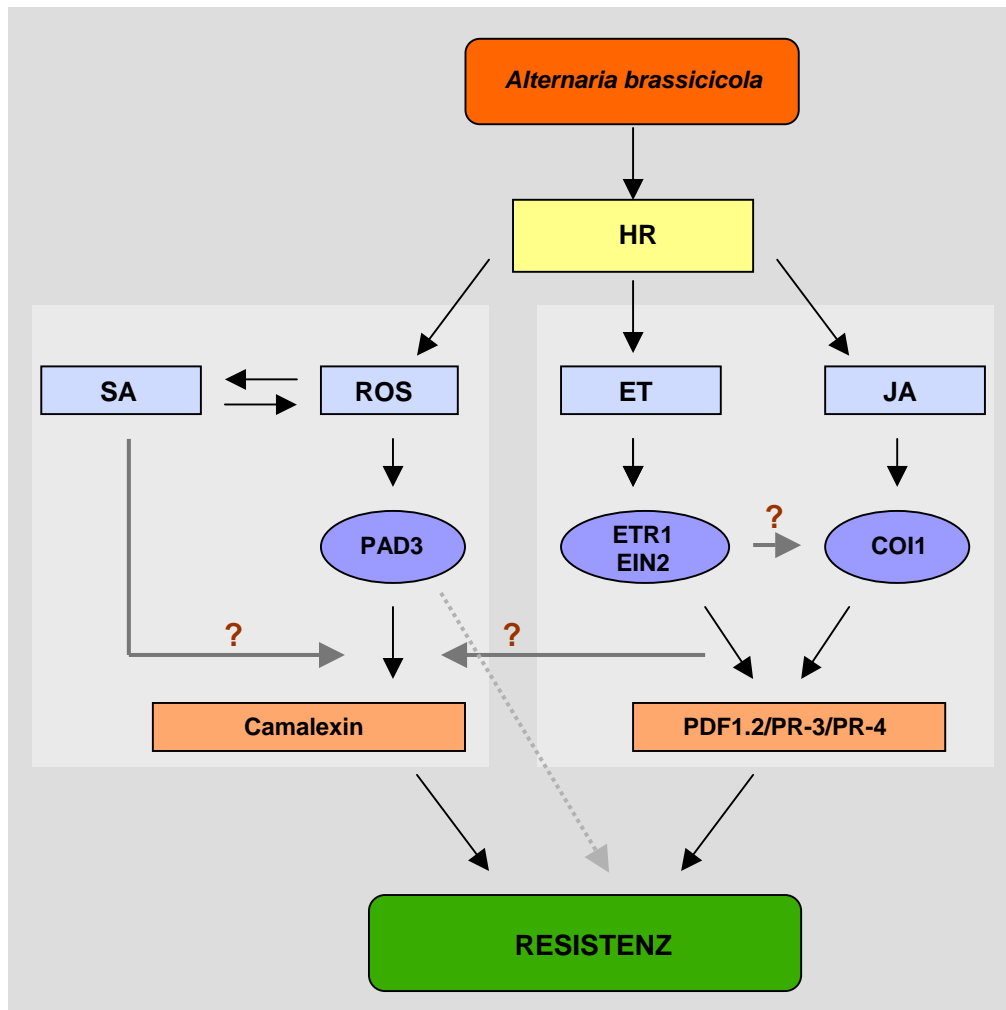


Abb. 1.3: Mögliche Signalwege bei *A. thaliana* nach Infektion mit *A. brassicicola* (zusammengefasst nach PENNINGCKX *et al.* 1996, FEYS & PARKER 2000, SCHENK *et al.* 2000 und NARUSAKA *et al.* 2003). HR = Hypersensitive Reaktion, SA = Salicylsäure, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, ET = Ethylen, JA = Jasmonsäure, ETR1 = Ethylenrezeptor (CHANG *et al.* 1993).

Die Komplexität der Abwehrreaktion gegenüber *A. brassicicola* zeigen auch umfangreiche cDNA-Microarray-Analysen bei *A. thaliana* (SCHENK *et al.* 2000, NARUSAKA *et al.* 2003). Neben den an der Signaltransduktion beteiligten Genen (inklusive R-Genen und PR-Genen) wurden nach Infektion mit *A. brassicicola* zahlreiche Gene für die Zellerhaltung und Entwicklung (insbesondere der β -Oxidation von Fettsäuren) und Gene für Zellwandsynthese, -abbau und -modifikation reguliert. Bisher konnte diesen Genen aber noch keine präzise Rolle in der Antwort auf eine *Alternaria*-Infektion zugeordnet werden. SCHENK *et al.* (2000) postulieren aufgrund des Vergleichs zwischen der Genregulation nach Infektion mit *A. brassicicola* und der nach Jasmonsäure-, Salicylsäure- bzw. Ethylen-Behandlung, dass alle genannten Signalwege miteinander interagieren.

Vergleichende Microarray-Analysen zwischen dem Wildtyp Col-0 und der *pad3*-Mutante nach Infektion mit *A. brassicicola* geben Hinweise darauf, dass PAD3 nicht nur die Akkumulation von Camalexin bewirkt, sondern auch eine zeitlich veränderte Expression von zahlreichen *defence related genes* bedingt (NARUSAKA *et al.* 2003).

A. thaliana wird in der Literatur als resistent beschrieben, wobei, abhängig vom Ökotyp, eine Variation in der Resistenzausprägung gezeigt wurde. Die Vererbung erfolgt quantitativ über mehrere Minorgene, wobei ein dominantes Gen (Majorgen) maßgeblich beteiligt ist (C. LAWRENCE, pers. Mitteilung). Anders als bei einigen anderen resistenten Cruciferen kommt es nach Infektionen mit dem Pathogen zu einer hypersensitiven Reaktion, verbunden mit der Bildung von kleinen schwarzen Nekrosen nahe der Infektionsstelle (THOMMA *et al.* 1998, 1999a und 1999b). Es muss also noch geklärt werden, ob die bei *A. thaliana* gewonnenen Erkenntnisse über die Abwehrmechanismen gegen *Alternaria* auch auf andere Arten der *Brassicaceae* übertragen werden können.

1.5 Wildcruciferen als potentielle Resistenzdonoren

Aufgrund des Fehlens von Wild- und Primitivformen ist der Genpool von *B. napus* - im Gegensatz zu anderen Kulturpflanzen - begrenzt. Bisher ist keine Resistenz gegen *Alternaria* bei Raps bekannt. Bei unzureichender Variation innerhalb einer Art besteht jedoch die Möglichkeit, genetische Merkmale durch interspezifische (z. T. auch intergenerische) Kreuzung bzw. somatische Hybridisierung (SJÖDIN 1992, WARWICK & BLACK 1993, WAARA & GLIMELIUS 1995, RIEGER *et al.* 1999) oder durch gezielten Gentransfer aus nah oder fern verwandten Spezies über Art- und Gattungsgrenzen hinweg zu übertragen. Bei sexuellen Kreuzungen hängt das Gelingen weitestgehend vom Verwandtschaftsgrad der Ausgangsarten ab, der gezielte Gentransfer setzt die Kenntnis über das oder die verantwortliche(n) Gen(e) für das gewünschte Merkmal voraus. Denkbare Ansätze wären z. B. das Einbringen von R-Genen oder für die Detoxifikation von Pathogenitätsfaktoren verantwortliche Gene. Da der Mechanismus und die Vererbung der Resistenz gegen *Alternaria* jedoch nicht vollständig geklärt sind (bisher wurde z. B. noch kein gegen *A. brassicicola* bzw. *A. brassicae* wirksames R-Gen identifiziert), ist die Erzeugung resistenter Pflanzen mittels gentechnischer Verfahren nur unzureichend möglich. Verschiedene transgene Ansätze an *Brassicaceae* wurden dennoch verfolgt, basierend auf dem Einbringen oder der Überexpression von (Endo)chitinase-Genen (MORA & EARLE 2001, MONDAL *et al.* 2003). Die resultierenden transgenen Pflanzen zeigten jedoch nur eine Reduktion des Befalls (kleinere Läsionen, längere Inkubationszeiten), aber keine vollständige Resistenz gegenüber dem Pathogen. Limitierend für den Anbau transgener Pflanzen kommt außerdem hinzu, dass genetisch veränderte Kulturpflanzen

besonders in Deutschland bei weiten Teilen der Bevölkerung aufgrund mangelnder Sicherheitsabschätzungen noch immer auf geringe Akzeptanz stoßen (LÜHS & FRIEDT 1997, SPAHL & DEICHMANN 2001).

Die Introgression der Resistenz durch Hybridisierungen mit resistenten verwandten Arten stellt daher vorerst die Methode der Wahl dar. Weitgehende Syntenien und Homöologien zwischen den Genomen der Arten der *Brassicaceae* (LAGERCRANTZ & LYDIATE 1996, PARKIN & LYDIATE 1997, PARKIN *et al.* 1997, LAGERCRANTZ 1998, GRANT *et al.* 1998, SADOWSKI *et al.* 1996) stellen gute Voraussetzungen für die stabile Introgression resistenzvermittelnder DNA-Abschnitte aus der Donorart in den Raps *via* homologer Rekombination dar.

Die Familie *Brassicaceae* beinhaltet 365 Gattungen und mehr als 3.250 Arten. Allein die Gattung *Brassica* umfasst etwa 50 Arten. Über 200 werden wie *B. napus* der Tribus *Brassicaceae* zugeordnet (WARWICK 1993). Innerhalb der Arten der *Brassicaceae* sind die Kreuzungsbarrieren nicht sehr stark ausgeprägt, aber oft verhindern Unverträglichkeitsmechanismen eine ungestörte Samenentwicklung (NISHIYAMA *et al.* 1991). Hierbei kommt es zu präzygotischer Inkompatibilität aufgrund von gehemmtem Pollenschlauchwachstum und Kallosebildung im Narbengewebe oder zu postzygotischer Inkompatibilität in Folge von Unverträglichkeitsreaktionen zwischen dem Nährgewebe und dem heranwachsenden Embryo. Solche Kreuzungsbarrieren können durch eine Samenentwicklung *in vitro* (*embryo rescue*, INOMATA 1993) oder durch Umgehung der Befruchtung mittels Protoplastenfusion oder somatischer Hybridisierung (JOURDAN 1994, EARLE 1994) überwunden werden.

Für viele agronomisch relevante Merkmale, unter anderem auch für Krankheitsresistenzen, existiert eine große genetische Variation innerhalb der *Brassicaceae* (WARWICK 1993). Nur wenige Kreuzblütler wurden bisher jedoch als *Alternaria*-resistent beschrieben: Bei den Kulturarten der Gattung *Brassica*, *B. rapa*, *B. juncea*, *B. carinata*, *B. napus* und *B. oleracea*, konnte bisher keine Resistenzquelle gefunden werden. Eine hypersensitive Reaktion als Antwort auf ein kanadisches *A. brassicae*-Isolat wurde bei *Eruca sativa* beobachtet (CONN & TEWARI 1986, TEWARI 1991). Auch die Resistenz von *S. alba* wurde vielfach, jedoch als moderat, beschrieben (KOLTE 1985, BRUN *et al.* 1987, TEWARI *et al.* 1987, RIPLEY *et al.* 1992, SHARMA & SINGH 1992, PLÜMPER 1995, HANSEN *et al.* 1995, HANSEN & EARLE 1997, SHARMA *et al.* 2002). Etliche Experimente zur Übertragung der Resistenz dieser Donorart auf *B. napus* (RIPLEY & ARNISON 1990, RIPLEY *et al.* 1992, CHÈVRE *et al.* 1994b, BROWN *et al.* 1997), *B. oleracea* (NOTHNAGEL *et al.* 1996, HANSEN & EARLE 1997) und *B. juncea* (MOHAPATRA & BAJAJ 1987) mittels interspezifischer bzw. -generischer (sowohl somatischer als auch sexueller) Hybridisierungen wurden durchgeführt.

Eine stark ausgeprägte Resistenz gegen *A. brassicicola* (bei der es nach der Infektion zu keinen sichtbaren Krankheitssymptomen kommt) wurde nur in Wildarten außerhalb der Gattung *Brassica* gefunden (WESTMAN *et al.* 1999). Auch gegen *A. brassicae* wurde

vollständige Resistenz - mit Ausnahme von *B. desnottesii* (SHARMA *et al.* 2002) – zunächst nur bei den taxonomisch weit entfernten Arten *Camelina sativa* (SHARMA *et al.* 2002), *Capsella bursa-pastoris* (CONN *et al.* 1988), *Coincya pseuderucastrum* (SHARMA *et al.* 2002), *Erucastrum gallicum* (SHARMA *et al.* 2002) und *Neslia paniculata* (TEWARI & CONN 1993) beschrieben. Der Transfer der Resistenz aus diesen Arten in Kulturbrassicaceen konnte nur über somatische Hybridisierungen erreicht werden, wobei die Herstellung bewurzelter Hybriden in Erde entweder schwierig (SIGAREVA & EARLE 1999) oder unmöglich (NARASIMHULU *et al.* 1994, HANSEN 1998) war. Stark ausgeprägte Resistenzen gegen *A. brassicae* zeigten auch verschiedene Vertreter der Gattung *Diplotaxis* (*D. catholica*, *D. tenuifolia*, *D. berthautii*, *D. erucooides*; SHARMA *et al.* 2002), von denen einige auf sexuellem Weg mit Hilfe der Ovarien- und Embryokultur intergenerisch mit *B. napus* hybridisiert werden konnten (HARBERD & MCARTHUR 1980, QUIROS *et al.* 1986, RINGDAHL *et al.* 1987, DELOURME *et al.* 1989, CHÈVRE *et al.* 1994a, VYAS *et al.* 1995, BIJRAL & SHARMA 1998). Bis auf wenige Ausnahmen (CHÈVRE *et al.* 1994a, VYAS *et al.* 1995) wurden nur die Originalhybriden hergestellt. Bei Kreuzungen wurde stets *D. erucooides* oder die Hybride als Mutterpflanze verwendet, d. h. dass die Hybriden und Rückkreuzungsnachkommen das möglicherweise cytoplasmatisch männliche Sterilität (CMS) induzierende Plasmon aus der Wildart *D. erucooides* (MALIK *et al.* 1999) tragen. Moderate Resistenzen gegen *Alternaria* spp. wurden außerdem bei *Hirschfeldia incana* (resistent gegenüber *A. brassicae*, SCHOLZE & HAMMER 1998), *Brassica maurorum* (CHRUNGU *et al.* 1999), *Brassica elongata* (PLÜMPER 1995), *B. oxyrrhina* (SRINIVASAN *et al.* 1998), sowie bei einigen Akzessionen von *Diplotaxis tenuifolia* (WESTMAN *et al.* 1999) beschrieben. Interspezifische bzw. intergenerische sexuelle Kreuzungen mit dem Raps waren erfolgreich bei *B. maurorum* (BIJRAL *et al.* 1995), *H. incana* (HARBERD & MCARTHUR 1980, LEFOL *et al.* 1995, CHADOEUF *et al.* 1998) und *D. tenuifolia* (HEYN 1977).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung von in der praktischen Pflanzenzüchtung nutzbarem Basismaterial für die Entwicklung einer genetisch stabilen rekombinanten Rapslinie mit Resistenz gegen *Alternaria brassicae* bzw. *A. brassicicola*. Da im primären und sekundären Genpool von Raps keine Resistenz gegen diese Pathogene bekannt ist, sollten resistenzvermittelnde chromosomale Abschnitte aus verwandten Cruciferen durch somatische oder sexuelle Hybridisierungen in das Rapsgenom übertragen werden. Die durch Kartierungsergebnisse gezeigten Homöologien und Syntenien zwischen den Genomen von Arten der Familie *Brassicaceae* lassen sowohl die Möglichkeit der sexuellen Kreuzung als auch die spätere stabile Integration der resistenzvermittelnden DNA-Abschnitte im Rapsgenom durch Rekombinationsereignisse realistisch erscheinen.

Ausgangsmaterial für die Versuche bildeten zunächst sexuelle und somatische Hybriden aus *B. napus* und den resistenten Arten *Brassica elongata* und *Sinapis alba* (PLÜMPER 1995). Das *Alternaria*-Resistenzscreening sollte durch die Etablierung einer sicher reproduzierbaren und gut differenzierenden Prüfmethode an der intakten Pflanze bei hohem Infektionsdruck optimiert werden. Weitere putative Resistenzdonoren aus der Familie der *Brassicaceae* sollten anhand dieses Testverfahrens identifiziert und jeweils Einzelpflanzen mit gut ausgeprägter Resistenz mit *B. napus* gekreuzt werden. Durch sukzessive Rückkreuzungen sollte der Anteil an Donorchromatin weitestgehend eliminiert werden, so dass eine resistente Linie entsteht, die sich von der Ausgangsart – im Idealfall – nur noch durch das Vorhandensein eines oder weniger resistenzvermittelnder Gene aus der Donorart unterscheidet.

Um die Resistenz, die infolge cytologischer Inbalancen vielfach verloren geht, stabil zu erhalten und gleichzeitig die unerwünschten Merkmale weitgehend zu eliminieren, sollten die Rückkreuzungspartner jeweils nach guter Resistenzausprägung, rapsähnlichem Habitus und Karyotyp, Fertilität sowie geringem Anteil an Donorchromatin selektiert werden. Die Genomzusammensetzung und der Anteil an Donorchromatin interessanter Genotypen aus allen Generationen der unterschiedlichen Kreuzungsgruppen sollten hierbei jeweils mittels genomischer *in situ*-Hybridisierung (GISH) ermittelt werden.

Darüber hinaus sollte die Genetik der Resistenz in ausgewählten Donorarten durch Segregationsstudien nach *intraspezifischen* Kreuzungen zwischen anfälligen und resistenten Einzelpflanzen (vorausgesetzt diese waren innerhalb der Spezies vorhanden) untersucht werden. Mittels *bulked segregant analysis* (BSA) an DNA-Pools von jeweils resistenten und anfälligen Rückkreuzungsnachkommen der *interspezifischen* Kreuzungen mit dem Raps sollten in Zusammenarbeit mit der Saaten-Union Resistenzlabor GmbH (Leopoldshöhe) Mikrosatelliten-Marker identifiziert werden, die mit der Ausprägung der Resistenz korrelieren. Aussagekräftige Marker sollten im Anschluss an Einzelpflanzen aus verschiedenen Generationen überprüft werden.