

3 ERGEBNISSE

3.1 Optimierung der Prüfung auf *Alternaria*-Resistenz

Bei allen Resistenztests wurde, wenn nicht anders erwähnt, standardmäßig eine Konidien suspension von *Alternaria brassicicola*, Isolat 62009 (BBA, im Folgenden Standardisolat genannt) mit einer Sporendichte von 5×10^5 Sporen/ml eingesetzt. Zur vorläufigen Einschätzung der Resistenzausprägung von putativen Resistenzdonoren, interspezifischen Hybriden mit dem Raps und deren Kreuzungs- bzw. Selbstungsnachkommen diente der Blattscheibentest (PLÜMPER 1995). Dieser untersucht das Resistenzniveau an Blattsegmenten und stellte sich im Verlauf der Untersuchungen als nicht ausreichend reproduzierbar dar, um zuverlässig Abstufungen in der Resistenzausprägung in den verschiedenen Kreuzungsgruppen widerzuspiegeln. Es wurde deshalb ein Resistenztest an Blättern entwickelt, der es erlaubt, die intakte Pflanze an mehreren Stellen gleichzeitig hinsichtlich ihrer Reaktion auf das Pathogen zu untersuchen (Feuchtkammertest). Es handelt sich hierbei um eine besonders invasive künstliche Infektion, die einerseits dem Pathogen optimale Bedingungen (Temperaturen um 25 °C bei nahezu 100% Luftfeuchtigkeit, leichtes Eindringen in das pflanzliche Gewebe durch Verletzungen der Kutikula, hoher Infektionsdruck) bietet, andererseits aber auch gewährleistet, dass der Wirt als intakter Organismus imstande bleibt, Resistenzmechanismen zu aktivieren. Jede Pflanze wurde an drei Blättern an jeweils drei Stellen inokuliert. Anhand der Größe der so hervorgerufenen Läsionen konnten resistente und anfällige Pflanzen eindeutig unterschieden werden. Ergebnisse aus dem Feuchtkammertest zeigten außerdem eine gute Reproduzierbarkeit. Der Feuchtkammertest wurde deshalb im Verlauf der Arbeit als Standardtest eingeführt.

Die Ergebnisse aus Blattscheibentests und dem Feuchtkammertest korrelierten nur schwach miteinander. Das Ausmaß der entwickelten Krankheitssymptome war in der Regel im Blattscheibentest größer als im Feuchtkammertest.

Da im Rapsanbau vor allem der Befall von Schoten ertragsrelevant ist, wurden die Ergebnisse aus dem Feuchtkammertest an abgetrennten Schoten *in vitro* überprüft („Schotentest“). Dieser Test wurde zunächst an den Donorarten durchgeführt. Aufgrund der Unterschiede in Größe und Beschaffenheit der Schoten der verschiedenen Arten erwies sich ein direkter Vergleich als schwierig, so dass dieser Test nur einer groben Einschätzung der Resistenz diente. In der Regel stimmten die Ergebnisse des Schotentests mit den Ergebnissen aus dem Feuchtkammertest überein, wobei die Krankheitssymptome an abgetrennten Schoten, ähnlich wie bei Blattscheiben, meist stärker als an der intakten Pflanze ausfielen. Abhängig von der Wuchshöhe bei Fruchtreife konnte die Schotenresistenz zusätzlich an der intakten Pflanze (*in vivo*) in der Feuchtkammer überprüft werden. Da die meisten Hybriden und deren Nachkommen keinen oder nur geringen Schotenansatz nach Selbstung zeigten, konnte der Schotentest erst bei

späteren Rückkreuzungsgenerationen an ausreichend fertilen Pflanzen angewendet werden (Abschnitt 3.3.4.6).

3.2 Putative Resistenzquellen

Acht putative Resistenzdonoren aus der Tribus *Brassiceae* wurden mittels Blattscheibentest und in der Feuchtkammer hinsichtlich ihrer Reaktion auf *A. brassicicola* untersucht. Alle getesteten Arten erhielten im Blattscheibentest eine bessere Bonitur als die anfällige Kontrolle *Brassica napus* cv. ‚Ceres‘ (Tab. 3.1). Auch im Feuchtkammertest zeigten die untersuchten Genotypen signifikant kleinere Läsionsgrößen als *B. napus*, völlige Immunität gegen das Pathogen wurde bei *Diplotaxis eruroides* beobachtet. Die Ergebnisse des Feuchtkammertests sind in den Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt.

Tab. 3.1: Resistenzbonitur von Raps im Vergleich zu sieben putativen Resistenzdonoren im Blattscheibentest (A = Akzession, S = anfällig, R = resistent, Boniturstufen nach Tab. 2.6).

Art	Bonitur
<i>Brassica napus</i>	S
<i>Hirschfeldia incana</i>	S-R
<i>Brassica maurorum</i>	(R)-R
<i>Brassica oxyrrhina</i>	(R)-R
<i>Brassica oxycam</i>	(R)-R
<i>Diplotaxis tenuifolia</i> A _{Indien}	R
<i>Brassica elongata</i> ssp. <i>integrifolia</i>	R
<i>Sinapis alba</i> cv. ‚Emergo‘	R
<i>Diplotaxis eruroides</i> A _{Indien} /A _{IPK}	RR/RR

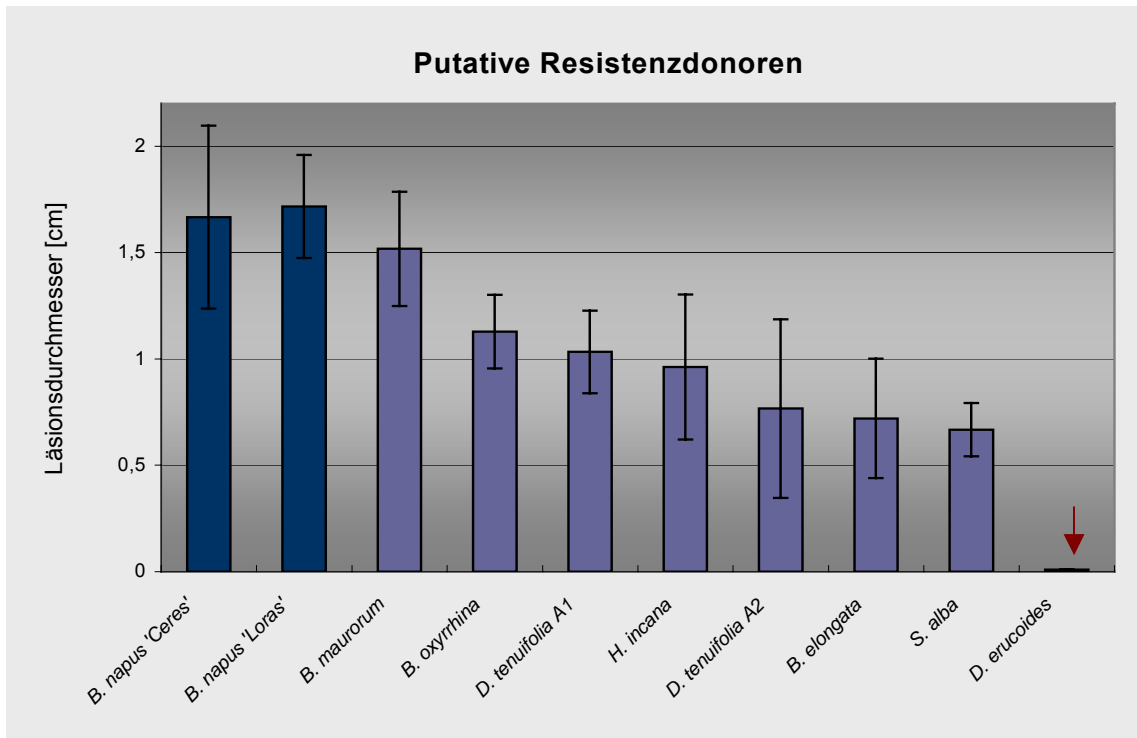


Abb. 3.1: Ergebnisse aus dem Feuchtkammertest: Die Auswertung erfolgte nach sieben Tagen, die Läsionsdurchmesser sind Mittelwerte aus jeweils 36 Läsionen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (A = Akzession). Die Unterschiede zwischen *D. tenuifolia* A1 (= A_{IPK}) und *D. tenuifolia* A2 (= A_{Indien}) sind signifikant (t-Test, $\alpha = 5\%$).



Abb. 3.2: Blattsymptome der vier Arten mit den stärksten Resistenzausprägungen im Vergleich zu *B. napus* (von links nach rechts: *B. napus* cv. 'Ceres', *D. tenuifolia* A_{Indien}, *B. elongata* ssp. *integrifolia*, *S. alba* cv. 'Emergo', *D. erucoides* A_{Indien}). Die Verbräunungen bei *D. erucoides* sind keine Krankheitssymptome, sondern durch die Verletzungen des Blattes bedingt.

3.3 Interspezifische Hybriden aus *B. napus* und verschiedenen putativen Resistenzdonoren

Bei keiner der putativen Donorarten sind bisher die molekulare Basis und die Vererbung der Resistenz bekannt. Unsicher war darüber hinaus, ob und wie die Resistenz durch

interspezifische bzw. intergenerische Kreuzung stabil in das Rapsgenom übertragen werden konnte. Auch ist der Erfolg von Rückkreuzungen nach der Originalkreuzung nicht immer gegeben. Insbesondere die erste Rückkreuzung erweist sich oft als schwierig. Deshalb wurden die vier Arten mit den stärksten Resistenzausprägungen (Abb. 3.2) für die Herstellung von interspezifischen Hybriden mit dem Raps ausgewählt und die Kreuzungsansätze parallel verfolgt (Abb. 3.3).

Bei allen Kreuzungs- und Rückkreuzungskombinationen war die Anwendung von *in vitro*-Kulturtechniken (*embryo rescue*) notwendig. Der optimale Zeitpunkt der Samenpräparation lag spätestens drei Wochen, bei der *D. eruroides*-Gruppe 14 Tage nach der Bestäubung, wenn die Samen noch hellgrün waren. Bei Präparationen zu einem späteren Zeitpunkt kam es häufig zur Verbräunung und Autolyse der unreifen Samen oder zu frühzeitiger Vergilbung der Schoten. In einigen Kreuzungskombinationen wurden Schoten gebildet, in denen jedoch keine Samenanlagen vorhanden waren, in anderen Fällen wurden die Schoten, sofern gebildet, in frühen Stadien (einige Tage nach der Befruchtung) abgestoßen.

In allen vier Kreuzungsgruppen konnten mit Hilfe der *in vitro*-Technik Hybriden und Rückkreuzungs- bzw. Selbstungsnachkommen erzeugt werden (Abb. 3.3).

Bei allen Kreuzungskombinationen waren die mitotischen Metaphase-Chromosomen der jeweiligen Kreuzungspartner morphologisch nicht von denen des Rapses zu unterscheiden.

Asymmetrische somatische Hybriden			
<i>B. napus</i> cv. ‚Ceres‘ (+) <i>S. alba</i> cv. ‚Emergo‘	(Kapitel 3.3.1)	— — ▶	BC ₂
Sexuelle Hybriden (<i>embryo rescue</i>)			
<i>B. napus</i> cv. ‚Loras‘ x <i>B. elongata</i> ssp. <i>integrifolia</i>	(Kapitel 3.3.2)	— — ▶	BC ₂
<i>B. napus</i> cv. ‚Ceres‘ x <i>D. tenuifolia</i> (reziprok)	(Kapitel 3.3.3)	— — ▶	F ₂
<i>B. napus</i> cv. ‚Ceres‘ x <i>D. eruroides</i> (reziprok)	(Kapitel 3.3.4)	— — ▶	BC ₃

Abb. 3.3: Übersicht über die vier parallel erstellten Kreuzungsgruppen (die Zahlen in Klammern verweisen auf den jeweiligen Abschnitt im Text, angegeben ist auch die jeweils zuletzt erstellte Generation).

3.3.1 ***Sinapis alba*-Kreuzungsgruppe: asymmetrische somatische Hybriden aus *B. napus* (+) *S. alba* und deren Rückkreuzungsnachkommen**

3.3.1.1 **Resistenzausprägung des Donorgenotyps *S. alba* cv. ‚Emergo‘**

Der putative Resistenzdonor *S. alba* cv. ‚Emergo‘ zeigte sieben Tage nach Inokulation mit *A. brassicicola* und anschließender Inkubation in der Feuchtkammer eine durchschnittliche Läsionsgröße von 40,1 % verglichen mit der von *B. napus* cv. ‚Ceres‘ (die Läsionsgrößen sind jeweils Mittelwerte aus 36 Läsionen). Dies entsprach den durchschnittlichen Läsionsdurchmessern von $0,67 \pm 0,12$ cm bei *S. alba* und $1,67 \pm 0,4$ cm bei *B. napus* cv. ‚Ceres‘. In unterschiedlichen, unabhängigen Resistenztests wurde jedoch beobachtet, dass die Resistenzausprägung innerhalb der Donorart sehr heterogen war. So konnten *S. alba*-Einzelpflanzen derselben Akzession mit durchschnittlichen Läsionsdurchmessern (Mittelwerte aus jeweils neun Läsionen) von 32 % bis hin zu 93 % der Läsionsgröße von der Referenzsorte *B. napus* cv. ‚Ceres‘ gemessen werden. Für die Erstellung der somatischen Hybriden wurden Einzelpflanzen verwendet, die eine gute Resistenzausprägung aufwiesen.

3.3.1.2 **Test auf Hybridcharakter der Sprossregenerate**

Zur Erstellung asymmetrischer somatischer Hybriden wurden Rapsprotoplasten (*B. napus* cv. ‚Ceres‘, $2n = 38$) mit mittels Röntgenstrahlung inaktivierten Protoplasten von *S. alba* cv. ‚Emergo‘ ($2n = 24$) fusioniert (PLÜMPER 1995). Die 65 Sprossregenerate aus den entstandenen Kallussen wurden mittels RAPD-PCR mit dem Primer OPA-08 auf ihren Hybridcharakter hin untersucht. Bei 59 Hybriden wurde eine prominente *S. alba*-spezifische Bande bei ca. 1500 bp amplifiziert (Abb. 3.4). Bei fünf Sprossregeneraten wurde diese Bande nicht nachgewiesen, es wurde jedoch eine andere, weniger prominente, aber ebenfalls *S. alba*-spezifische Bande von ca. 880 bp Größe beobachtet. Ein Sprossregenerat zeigte das Bandenmuster von *B. napus* cv. ‚Ceres‘ und konnte so als putativ un- bzw. autofusionierter *B. napus* identifiziert werden (Abb. 3.5).

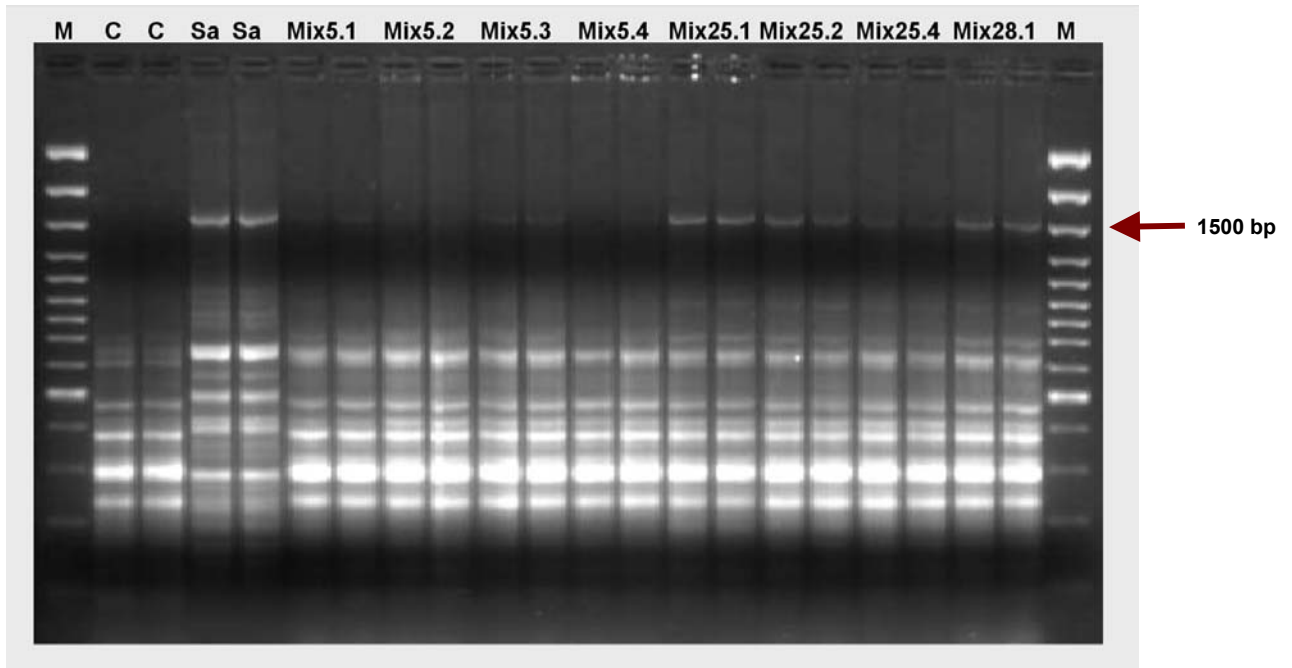


Abb. 3.4: Gelelektrophoretisch aufgetrennte Amplifikationsprodukte aus einer PCR-Reaktion mit dem Zufallsprimer OPA-08. Die Position der *S. alba*-spezifischen Bande (1500 bp) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (C = *B. napus* cv. ‚Ceres‘, Sa = *S. alba* cv. ‚Emergo‘, Mix = somatische Hybride aus *B. napus* und *S. alba*, M = DNA-Marker 100 bp ladder plus).

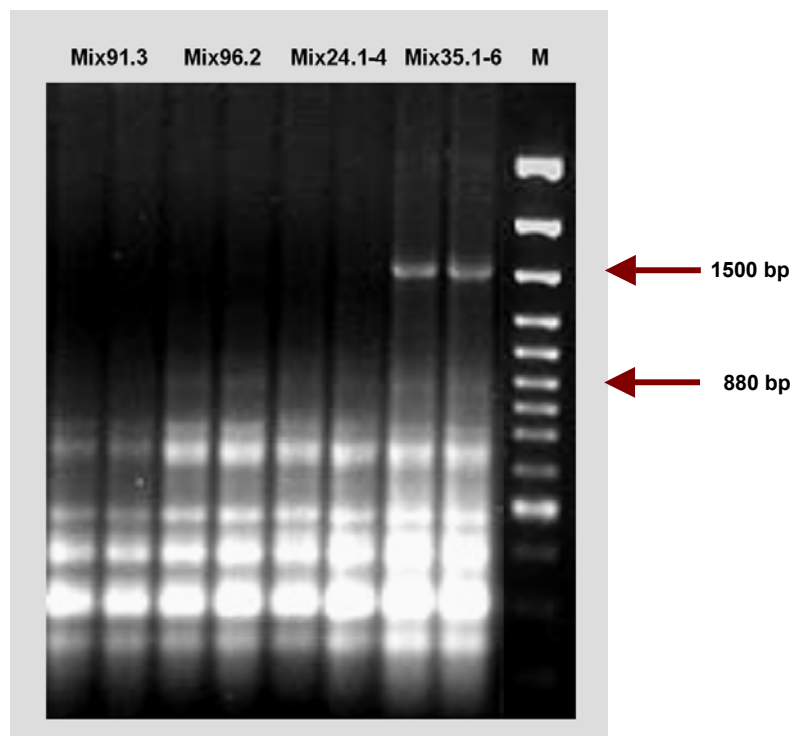


Abb. 3.5: Amplifikationsprodukte aus einer PCR-Reaktion mit dem Primer OPA-08: Bei Mix 96.2 und Mix 24.1-4 wurde die *S. alba*-spezifische Bande bei 1500 bp nicht amplifiziert, aber eine andere, ebenfalls *S. alba*-spezifische Bande bei ca. 880 bp. Mix 91.3 zeigt hingegen das *B. napus*-spezifische Bandenmuster. (Mix = somatische Hybride aus *B. napus* und *S. alba*, M = DNA-Marker 100 bp ladder plus, Elterntypen nicht gezeigt).

3.3.1.3 Charakterisierung der ‚F₁‘-Generation

Die Chromosomenzahlen in der ‚F₁‘-Generation (Originalhybriden) wurden mittels klassischer Chromosomenpräparationen an Wurzelspitzen und/oder Griffeln ermittelt und variierten zwischen 2n = 36 und 2n = 60.

Viele der Hybriden (20 Genotypen) hatten einen rapsähnlichen Habitus mit einer Wuchshöhe im Feld von bis zu 1,80 m. Einige (14) Genotypen zeigten einen strauchartigen Wuchs mit kleinen gesägten Blättern, andere (26) wiesen große gesägte Blätter und einen breiten Wuchs mit Neigung zum Lager bei Fruchtreife auf. Alle Hybriden waren vernalisationsbedürftig und größtenteils selbstinkompatibel (Tab. 3.3). Sie konnten jedoch in den meisten Fällen als weiblicher Elter für Rückkreuzungen mit dem Raps verwendet werden.

Die somatischen Hybriden wurden hinsichtlich ihrer Reaktion auf *A. brassicicola* untersucht: 39 Genotypen waren anfällig, neun intermediär resistent und drei zeigten eine mit der von *S. alba* vergleichbare Resistenzausprägung (Tab. 3.3). Die durchschnittliche Läsionsgröße des Genotyps mit der stärksten Resistenzprägung lag in dieser Generation bei 37,5 % der Läsionsgröße von *B. napus*. Die Resistenz der drei oben genannten Hybriden erwies sich jedoch als instabil, d. h. sie war in verschiedenen Testwiederholungen unterschiedlich stark ausgeprägt und/oder ging nach mehreren *in vitro*-Subkulturen der Pflanzen verloren.

Die Genomzusammensetzungen einiger somatischer Hybriden wurden mittels genomischer *in situ*-Hybridisierung untersucht (Hybridisierung mit genomischer *S. alba*-DNA-Sonde, abgesättigt mit 50fachen Überschuss an Raps-DNA). Es wurden zwischen 45 und 54 Chromosomen ermittelt, von denen jeweils mindestens neun aus der Donorart stammten (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Genomzusammensetzungen ausgewählter somatischer Hybriden aus *B. napus* (+) *S. alba* (S-R = intermediär resistent, R = resistent).

Somatische Hybride	Resistenzausprägung	Chromosomensatz
Mix 2.1	S-R	2n = 52-54 (davon 10-13 aus <i>S. alba</i>)
Mix 5.4	R	2n = 49 (davon 11 aus <i>S. alba</i>)
Mix 35-1.1	S-R	2n = 50 (davon 10-12 aus <i>S. alba</i>)
Mix 91.4	S-R	2n = 45 (davon 9-11 aus <i>S. alba</i>)

3.3.1.4 Erstellung von Rückkreuzungs- und Selbstungsnachkommenschaften und Prüfung auf *Alternaria*-Resistenz in diesen Generationen

Die erste Rückkreuzungsgeneration wurde mittels *embryo rescue* erstellt, wobei *B. napus* cv. ‚Ceres‘ (C) jeweils als Pollenspender und sowohl anfällige, resistente als auch intermediär resistente somatische Hybriden als Mutterpflanzen dienten. Nicht alle Hybriden ließen sich rückkreuzen. Aus insgesamt 693 bestäubten Blüten wurden 452 BC₁-Genotypen generiert. Insgesamt sieben dieser Genotypen zeigten eine schwache (Relativer Läsionsindex RL \cong 0,2) und instabile Resistenzausprägung (Tab. 3.3). Bei einem der BC₁-Genotypen (Mix 5.4 x C 59) wurden $2n = 38 \pm 1$ Chromosomen beobachtet. Bei mehreren anfälligen BC₁-Genotypen aus derselben Rückkreuzungsnachkommenschaft (Mix 5.4 [2n = 49] x C) wurden ebenfalls 38 Chromosomen ermittelt.

Die zweite Rückkreuzung wurde ausschließlich mit den (instabil) resistenten BC₁-Genotypen als Mutterpflanzen durchgeführt: Insgesamt 69 Knospen wurden bestäubt und 196 BC₂-Genotypen generiert. Der Einsatz von *in vitro*-Techniken war an dieser Stelle nicht mehr notwendig, trotzdem wurde die *embryo rescue*-Methode angewandt, um zu gewährleisten, dass jeder Genotyp als Klon in steriler Sprosskultur erhalten blieb. Innerhalb der 196 BC₂-Genotypen wurden keine *Alternaria*-resistenten Pflanzen mehr beobachtet (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Resistenzausprägung in den Generationen ,F₁', BC₁ und BC₂ der *S. alba* (+) *B. napus*-Hybriden (SI = Selbstinkompatibilität, SK = Selbstkompatibilität, S = anfällig, S-R = intermediär resistent, (R) = instabil resistent, C = *B. napus* cv. ,Ceres').

Somatische Hybride	Resistenz	SK/SI	Resistenzausprägung in der BC ₁			Resistenzausprägung in der BC ₂ [BC ₁ (R) x C]		
			S	S-R	(R)	S	S-R	(R)
Mix 2.1	S-R	SI	62	4	1	43	3	0
Mix 2.2	S	SK*	28	4	0			
Mix 2.3	S	SK*	3	1	0			
Mix 2.4	S	SK*	25	6	0			
Mix 2.5	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 4.1	S	SI	0	0	0			
Mix 4.2	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 4.3	S	SI	0	0	0			
Mix 4.4	S	SI	0	0	0			
Mix 5.1	S-R		2	1	0			
Mix 5.2	S-R		-	-	-	-	-	-
Mix 5.3	S	SK*	1	1	0			
Mix 5.4	(R)	SK	76 (2n ≥ 38)	29	3 (2n ≥ 38)	14 24 81	2 2 3	0 0 0
Mix 22.1	S	SK*	14	4	0			
Mix 22.2	S	SI	0	0	0			
Mix 22.3	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 22.4	S		-	-	-	-	-	-
Mix 24-1.1	S-R	SI	6	0	0			
Mix 24-1.2		SI	4	2	0			
Mix 24-1.4	S-R	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 24-1.7	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 24-1.8	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 24-1.9	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 24-1.10	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 25.1	S	SI	0	0	0			
Mix 25.2	S	SI	3	4	0			
Mix 25.3	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 25.4	S	SI	7	1	0			
Mix 28.1	S	SI	1	0	0			
Mix 28.2	S	SI	0	0	0			
Mix 28.5	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 28.6	S-R	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 34.3	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 34.4	S	SI	3	2	0			
Mix 34.5	S	SK*	-	-	-	-	-	-
Mix 35-1.1	S-R	SI	17	4	0			
Mix 35-1.4	S	SI	0	0	0			
Mix 35-1.5	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 35-1.6	S	SI	3	1	0			
Mix 35-1.7	S	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 39.1	S		-	-	-	-	-	-
Mix 39.4	(R)	SK	9	2	2			
Mix 91.1	S	SI	13	3	0			
Mix 91.3	S	SI	1	1	0			
Mix 91.4	S-R	SI	-	-	-	-	-	-
Mix 91.5	(R)	SI	1	1	0			
Mix 91.6	S	SK*	3	0	0			
Mix 94.1	S	SI	3	3	0			
Mix 94.2	S	SI	2	0	0			
Mix 96.1	S	SI	4	2	0			
Mix 96.2	S	SI	6	2	0			
Mix 98	S-R	SI	62	15	1	24	0	0
Σ			359	93	7	186	10	0

- = wurde nicht gekreuzt * Samen vorhanden, aber nicht keimfähig

Zwei der resistenten somatischen Hybriden (Mix 39.4 und Mix 5.4) erwiesen sich als selbstkompatibel, und - mittels Knospenbestäubung und *embryo rescue* - wurden F₂-Nachkommen erzeugt. In einer dieser Generationen wurden zwei Nachkommen mit instabiler Resistenz beobachtet. Auch vier der resistenten BC₁-Genotypen zeigten Ansatz nach Selbstung, und ein BC₁S₁-Nachkomme mit schwacher und instabiler Resistenzausprägung wurde identifiziert. Die Aufspaltungen der Resistenzausprägung in den verschiedenen Selbstungsnachkommenschaften sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tab. 3.4: Resistenzausprägung in den verschiedenen Selbstungsnachkommenschaften der *S. alba* (+) *B. napus*-Kreuzungsgruppe (S = anfällig, S-R = intermediär resistent, (R) = instabil resistent, C = *B. napus* cv. ‚Ceres‘)

Somatische ‚F ₁ ‘-Hybride (R)	Aufspaltung der Resistenzausprägung in der F ₂		
	S	S-R	(R)
Mix 5.4	5	6	2
Mix 39.4	2	0	0
BC ₁ -Genotyp (R)	Aufspaltung der Resistenzausprägung in der BC ₁ S ₁		
	S	S-R	(R)
Mix 5.4 x C 38	9	0	0
Mix 5.4 x C 65	14	1	0
Mix 98 x C Ka4	9	0	1
Mix 98 x C 11	8	1	0

3.3.1.5 Erstellung sexueller Hybriden aus *B. napus* und *S. alba*

Aufgrund der Instabilität der Resistenz in den somatischen Hybriden und der Tatsache, dass bereits die Resistenz der verwendeten Ausgangsart *S. alba* cv. ‚Emergo‘ relativ schwach ausgeprägt war, wurden 18 weitere *S. alba*-Akzessionen (IPK Gatersleben) als putative Resistenzdonoren hinsichtlich ihrer Reaktion auf *A. brassicicola* untersucht. In sechs Akzessionen traten sowohl anfällige, als auch schwach resistente und resistente Einzelpflanzen auf, wobei der Anteil an Genotypen mit schwach ausgeprägter Resistenz überwog (J. MAI, pers. Mitteilung). Jeweils 20 Pflanzen aus den drei Akzessionen mit der durchschnittlich stärksten Resistenzausprägung wurden in der Feuchtkammer auf Resistenz getestet. Die resistenteste Einzelpflanze aus jeder Akzession wurde reziprok mit *B. napus* cv. ‚Ceres‘ gekreuzt. Es wurden Samen gebildet, die aber trotz Anwendung von Ovarien- und Embryokultur nicht zur Keimung kamen (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Kreuzungen resistenter *S. alba*-Einzelpflanzen mit *B. napus* cv. ‚Ceres‘ (die Läsionsdurchmesser von *S. alba* sind Mittelwerte aus jeweils neun, von *B. napus* aus 36 Läsionen).

Kreuzung	Läsionsdurchmesser von <i>S. alba</i> [% von <i>B. napus</i>]	Anzahl bestäubter Knospen	Anzahl Samen	Anzahl Pflanzen
SIN 78/94 1 x <i>B. napus</i>	20,95 ± 8,57	57	0	0
<i>B. napus</i> x SIN 78/94 1		21	4	0
CR 2088/95 1 x <i>B. napus</i>	11,43 ± 3,81	25	1	0
<i>B. napus</i> x CR 2088/95 1		9	12	0
CR 2088/95 2 x <i>B. napus</i>	40,95 ± 16,19	12	0	0
<i>B. napus</i> x CR 2088/95 2		9	21	0

Der Ansatz der *S. alba*-Kreuzungsgruppe wurde an dieser Stelle nicht weitergeführt, da die Resistenz, sofern auf die Nachkommen übertragen, nur schwach ausgeprägt bzw. instabil und in der BC₂-Generation bereits nicht mehr nachweisbar war. Parallel wurde aber mit anderen Kreuzungsgruppen gearbeitet.

3.3.2 *B. elongata*-Kreuzungsgruppe: sexuelle Hybriden aus *B. napus* x *B. elongata* und deren Rückkreuzungsnachkommen

3.3.2.1 Resistenzausprägung der Donorart *B. elongata* ssp. *integrifolia*

Nach Inokulation mit *A. brassicicola* und siebentägiger Inkubation in der Feuchtkammer zeigte *B. elongata* ssp. *integrifolia* Läsionsgrößen von durchschnittlich 0,72 ± 0,28 cm, was 43,2 % der mittleren Läsionsgröße von *B. napus* cv. ‚Ceres‘ entsprach. Innerhalb dieser Donorart wurden keine anfälligen Pflanzen beobachtet.

3.3.2.2 Charakterisierung der F₁-Hybride

Die mittels sexueller Kreuzung und *embryo rescue* erstellte F₁-Hybride aus *B. napus* cv. ‚Loras‘ (2n = 38) und *B. elongata* ssp. *integrifolia* (2n = 22) zeigte eine weitgehend intermediäre Morphologie (PLÜMPER 1995). Die Chromosomenzahl wurde mittels klassischer Chromosomenpräparation an Wurzelspitzen ermittelt und lag bei 2n = 60 Chromosomen, was auf eine spontane Verdopplung des Chromosomensatzes in dieser Generation zurückzuführen ist. Die Resistenzausprägung entsprach der des resistenten Elters (RL = 0).

3.3.2.3 Erstellung der ersten Rückkreuzungsnachkommenschaft

Die F₁-Hybride war vollständig pollensteril, wurde aber als mütterlicher Kreuzungspartner für die erste Rückkreuzung mit dem Raps (*B. napus* cv. ‚Loras‘ und *B. napus* cv. ‚Ceres‘) eingesetzt. Mittels *embryo rescue* konnten 34 BC₁-Genotypen erstellt werden, von denen drei Resistenz gegenüber *A. brassicicola* zeigten. Es handelte sich jedoch auch in dieser Kreuzungsgruppe um eine instabile Resistenz, die sich dadurch auszeichnete, dass verschiedene Klone derselben Pflanze unterschiedlich auf das Pathogen reagierten (Abb. 3.6). Dieses Phänomen betraf teilweise sogar verschiedene gleichwertige Blätter an derselben Pflanze (Abb. 3.7), wurde aber bei der anfälligen Kontrolle *B. napus* cv. ‚Ceres‘ nie beobachtet.

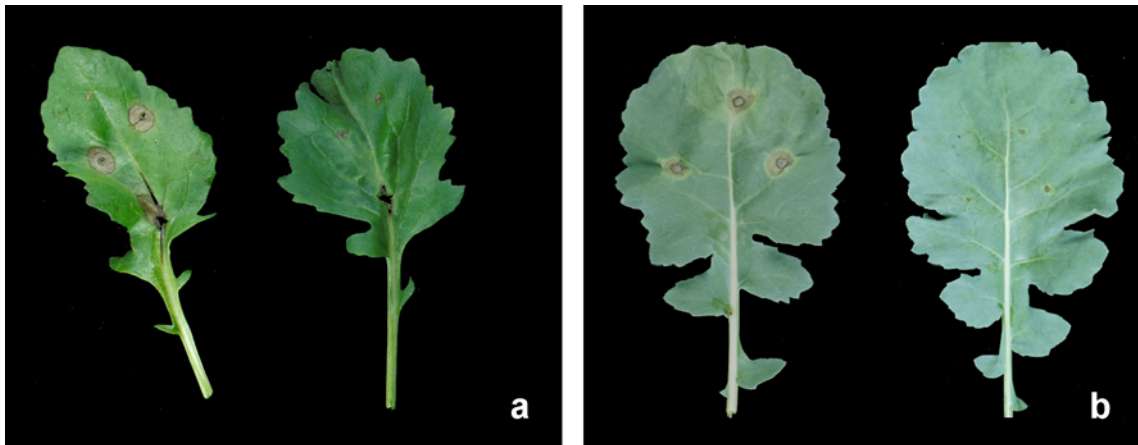


Abb. 3.6: Beispiele für instabile Resistenz: jeweils zwei *in vitro* verklonte Pflanzen mit unterschiedlicher Resistenzausprägung (links jeweils anfällig, rechts resistent, a = BC₁-Genotyp (LoxBe)xLo9b, b = BC₂-Genotyp (LoxBe)xC1/1xC3b); Lo = *B. napus* cv. ‚Loras‘, Be = *B. elongata*, C = *B. napus* cv. ‚Ceres‘).

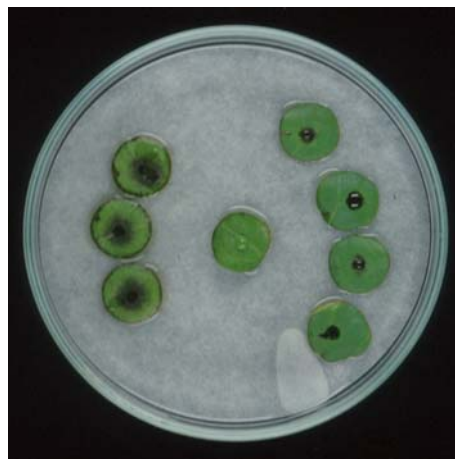


Abb. 3.7: Blattscheibentest an einer BC₁-Nachkomme [(LoxBe)xLo6/1b] mit einem anfälligen (links) und einem resistenten Blatt (rechts). In der Mitte befindet sich eine nicht inokulierte Kontrolle (Lo = *B. napus* cv. ‚Loras‘, Be = *B. elongata*, C = *B. napus* cv. ‚Ceres‘).

Die Chromosomenzahlen der BC₁-Genotypen wurden mittels genomischer *in situ*-Hybridisierung (genomische *B. elongata*-DNA-Sonde) und/oder klassischer Chromosomenpräparationen an Wurzelspitzen ermittelt und variierten zwischen $2n = 44$ und $2n = 80$, wobei die Genotypen mit den stärksten Resistenzausprägungen besonders hohe Chromosomen-zahlen (von $2n \geq 57$) aufwiesen (Tab. 3.6). Jeweils mindestens zehn der Chromosomen dieser Pflanzen stammten aus der Donorart (Abb. 3.8 und 3.9).

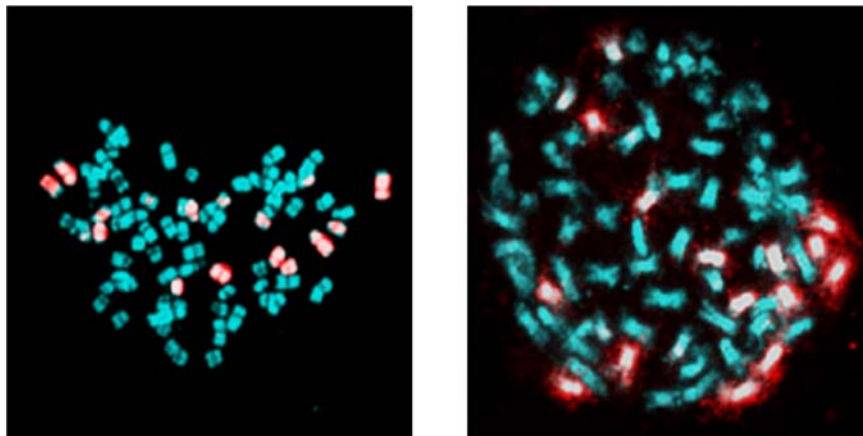


Abb. 3.8: GISH-Analysen an zwei BC₁-Genotypen mit intermediärer Resistenzausprägung. Hybridisiert wurde mit genomischer *B. elongata*-DNA. Rote Fluoreszenzsignale zeigen Additionschromosomen der Donorart; links: Genotyp (LoxBe)xLo2 mit $2n = 70$ Chromosomen, von denen mindestens 14 aus der Donorart stammen; rechts: Genotyp (LoxBe)xLo10 mit $2n = 77$ Chromosomen, von denen 15-16 *B. elongata*-spezifisch sind (Lo = *B. napus* cv. ‚Loras‘, Be = *B. elongata*, C = *B. napus* cv. ‚Ceres‘).

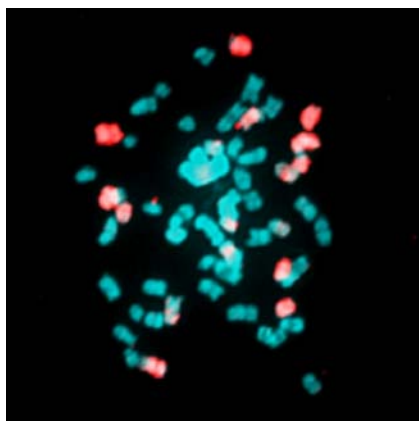


Abb. 3.9: GISH-Analyse eines BC₁-Genotyps [(LoxBe)xLo9b] mit instabiler Resistenzausprägung und $2n = 62$ Chromosomen, von denen mindestens 14 aus *B. elongata* stammen (sichtbar als rot gefärbte Fluoreszenzsignale).

Alle BC₁-Genotypen waren pollensteril und zeigten nach Selbstung geringen Schoten-, aber keinen Samenansatz. Nur etwa ein Viertel der BC₁-Genotypen wies einen rapsähnlichen Habitus auf. Ansonsten wurden häufig leierförmige, fiederspaltige Blätter

oder gestauchte Wuchsformen (≤ 30 cm Pflanzenhöhe) mit kleinen, rapsähnlich geformten Blättern beobachtet.

3.3.2.4 Erstellung der zweiten Rückkreuzungsnachkommenschaft

Unter Einsatz von *embryo rescue* wurden 21 BC₁-Pflanzen mit *B. napus* cv. ‚Ceres‘ rückgekreuzt. Die BC₁-Pflanze mit der stärksten Resistenzausprägung [(LoxBe)xLo9b mit einem RL < 0 und 2n = 62 Chromosomen, von denen mindestens 14 aus *B. elongata* stammen; in Tabelle 3.6 blau unterlegt] zeigte nach der Kreuzung nur geringen Samenansatz (8 Samen bei 119 bestäubten Knospen), aus den vorhandenen Samen entwickelten sich jedoch keine Pflanzen. BC₂-Nachkommen wurden nur von sechs Genotypen mit intermediärer oder schwacher (RL \cong 0,2) Resistenzausprägung und Chromosomenzahlen um 2n = 60 gewonnen. Von insgesamt 40 generierten BC₂-Nachkommen zeigte einer eine instabile Resistenzausprägung (2n = 44 Chromosomen, davon neun aus *B. elongata*, Abb. 3.10, in Tabelle 3.6 grün unterlegt). Diese Pflanze war pollensteril und ließ sich auch als mütterlicher Elter und trotz Einsatz von *in vitro*-Techniken nicht mehr mit dem Raps kreuzen. Die Fertilität dieser Pflanze sollte deshalb mittels Mikrosporenkultur und anschließender Colchizinierung wiederhergestellt werden. Es wurde ein Embryo generiert (J. MAI, pers. Mitteilung), der jedoch *Alternaria*-anfällig war. Aufgrund der Instabilität der Resistenz und der genannten Infertilität relevanter Genotypen wurde auch *B. elongata* als ungeeignet für den Transfer von *Alternaria*-Resistenz eingestuft.

Tab. 3.6: Resistenzausprägung in der ersten und zweiten Rückkreuzungsgeneration der *B. napus*-*B. elongata*-Kreuzungsgruppe (Lo = *B. napus* cv. ‚Loras‘, Be = *B. elongata*, C = *B. napus* cv. ‚Ceres‘, S = Anfälligkeit, R = Resistenz, S-R = intermediäre Resistenz, (R) = instabile Resistenz, die Zahlen in Klammern entsprechen jeweils der Anzahl bestäubter Knospen).

BC ₁ -Genotyp	2n =	Resistenz	BC ₂ -Pflanzen	Resistenzausprägungen in der BC ₂		
				S	S-R	(R)
(LoxBe)xC1a	62	S-R	6 (19)	5	1	
(LoxBe)xC1/1	60	S-R	20 (67)	8	11	1
(LoxBe)xC1/2		S	-			
(LoxBe)xC1/3	60-62	S-R	6 (12)	6		
(LoxBe)xC1/4	60-62	S-R	2 (11)		2	
(LoxBe)xC2/1K		S	-			
(LoxBe)xC2/2		S-R	0 (11)			
(LoxBe)xC2/3		S-R	-			
(LoxBe)xC2/4		S	-			
(LoxBe)xC3/1	44	S	0 (25)			
(LoxBe)xC3/2	44	S-R	0 (39)			
(LoxBe)xC6/1K		S	-			
(LoxBe)xC6/2K		S	-			
(LoxBe)xC6/3K		S	-			
(LoxBe)xC7		S	-			
(LoxBe)xC8/1*		S	0 (20)			
(LoxBe)xC8/2*		S	-			
(LoxBe)xC8/3		S	-			
(LoxBe)xC8/4		S	0 (10)			
(LoxBe)xC8/5		S	-			
(LoxBe)xLo1		S	-			
(LoxBe)xLo2	74±1	S-R	0 (16)			
(LoxBe)xLo3/1		S	0 (29)			
(LoxBe)xLo3/2		S	0 (35)			
(LoxBe)xLo4		S-R	-			
(LoxBe)xLo5	58-62	(R)	2 (87)	1	1	
(LoxBe)xLo5/1	58-62	S-R	0 (15)			
(LoxBe)xLo6/1a	56-59	S-R	0 (27)			
(LoxBe)xLo6/1b	57-59	(R)	1 (39)	1		
(LoxBe)xLo6/2		S	0 (21)			
(LoxBe)xLo7		S-R	3 (12)		3	
(LoxBe)xLo9a	59-76	S-R	0 (30)			
(LoxBe)xLo9b	62	(R)	0 (119)			
(LoxBe)xLo9/1	50	S-R	-			
(LoxBe)xLo10	77-80	S-R	0 (23)			
Σ	44-80		40 (667)	21	18	1

*zwergwüchsig

- = wurde nicht gekreuzt

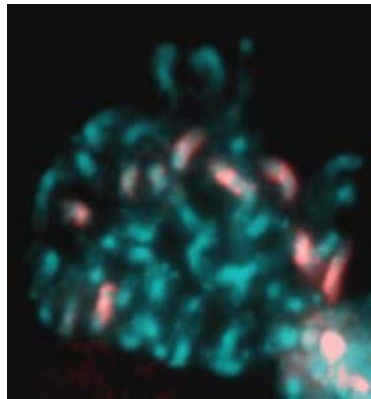


Abb 3.10: GISH-Analyse eines resistenten BC₂-Genotyps (in Tab. 3.6 grün unterlegt) mit $2n = 44$ Chromosomen, von denen neun (in rot als FITC-Signale) aus *B. elongata* stammen.

3.3.3 *Diplotaxis tenuifolia*-Kreuzungsgruppe: sexuelle Hybriden aus *B. napus* und *D. tenuifolia*

3.3.3.1 Resistenzausprägung in der Donorart *D. tenuifolia*

Zwei *Diplotaxis tenuifolia*-Akzessionen (*D. tenuifolia* A_{IPK} und *D. tenuifolia* A_{Indien}) wurden hinsichtlich ihrer Reaktion gegenüber *Alternaria brassicicola* untersucht. Die Unterschiede in den Resistenzausprägungen waren (bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %) signifikant: Akzession A_{IPK} zeigte nach sieben Tagen in der Feuchtkammer eine durchschnittliche Läsionsgröße von $1,03 \pm 0,19$ cm (= 62 % der durchschnittlichen Läsionsgröße von *B. napus* cv. ‚Ceres‘), während der Läsionsdurchmesser von Akzession A_{Indien} im Schnitt bei $0,7667 \pm 0,42$ cm (= 46 % von *B. napus* cv. ‚Ceres‘) lag.

3.3.3.2 Resistenzausprägung in den F₁- bzw F₂-Generationen der reziproken Kreuzung aus *B. napus* und *D. tenuifolia* A_{Indien}

Eine resistente *D. tenuifolia*-Einzelpflanze ($2n = 22$) der Akzession A_{Indien} wurde reziprok mit *B. napus* cv. ‚Ceres‘ gekreuzt.

Wurde Raps als weiblicher Elter verwendet (*B. napus* cv. ‚Ceres‘ x *D. tenuifolia*), waren die 25 F₁-Hybriden homogen anfällig. Mittels klassischer Chromosomenzahlanalysen an Wurzelspitzen konnte eine Entstehung dieser Pflanzen durch diploide Parthenogenese ausgeschlossen werden. Die Nachkommen zeigten den Chromosomensatz von $2n = 30$, was der Addition der haploiden Chromosomensätze der Ausgangsarten entsprach. Anhand dreier dieser (anfälligen) F₁-Hybriden wurden F₂-Generationen erstellt (KLEWER *et al.* 2003). Die Aufspaltungen der Resistenzausprägungen sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

Bei der reziproken Kreuzung (*D. tenuifolia* x *B. napus* cv. ‚Ceres‘) wurde bereits in der F₁-Generation eine Aufspaltung der Resistenzausprägung beobachtet (Tab. 3.7). Die Chromosomenzahlen wurden mittels klassischer Chromosomenzahlanalysen an Wurzelspitzen ermittelt und lagen bei 2n = 28-32.

Die durch *A. brassicicola* hervorgerufenen Läsionen bei resistenten Pflanzen wiesen jeweils ca. 10 % der Läsionsdurchmesser der Referenzsorte *B. napus* cv. ‚Ceres‘ auf.

Tab. 3.7: Aufspaltungen der Resistenzausprägung in den verschiedenen Generationen der reziproken Kreuzungen aus *D. tenuifolia* und *B. napus* (S = anfällig, S-R = intermediär resistent, R = resistent).

Kreuzung (reziprok)	F ₁	F ₂ 1	F ₂ 2	F ₂ 3
<i>D. tenuifolia</i> x <i>B. napus</i>	5 S 8 S-R 2 R	-	-	-
<i>B. napus</i> x <i>D. tenuifolia</i>	25 S	10 S 7 S-R 4 R	2 S 7 S-R 6 R	12 S 12 S-R 8 R

Die Aufspaltungsverhältnisse in den F₁- und F₂-Generationen legen einen komplizierten Vererbungsmodus der Resistenz nahe, so dass diese Kreuzungsgruppe nicht weitergeführt wurde.

3.3.4 *Diplotaxis erucooides*-Kreuzungsgruppe: sexuelle Hybriden aus *B. napus* und *D. erucooides* und deren Rückkreuzungsnachkommen

3.3.4.1 Charakterisierung der Donorart *D. erucooides*

Resistenzausprägung und Isolatspezifität

Von den untersuchten putativen Resistenzdonoren erwies sich *Diplotaxis erucooides* sowohl im Blattscheibentest als auch im Feuchtkammertest mit dem Standardisolat *A. brassicicola* 62009 als die Art mit der stärksten Resistenzausprägung. Bei beiden untersuchten *D. erucooides*-Akzessionen (A_{IPK} und A_{Indien}) wurden auch nach zweiwöchiger Inkubation in der Feuchtkammer keine Blattläsionen gebildet. Selbst bei Erhöhung des Infektionsdrucks durch Inokulation mit Sporendichten von bis zu 3 x 10⁷ Sporen/ml wurden nach sieben Tagen Inkubation in der Feuchtkammer keine Krankheitssymptome sichtbar (Abb. 3.11).

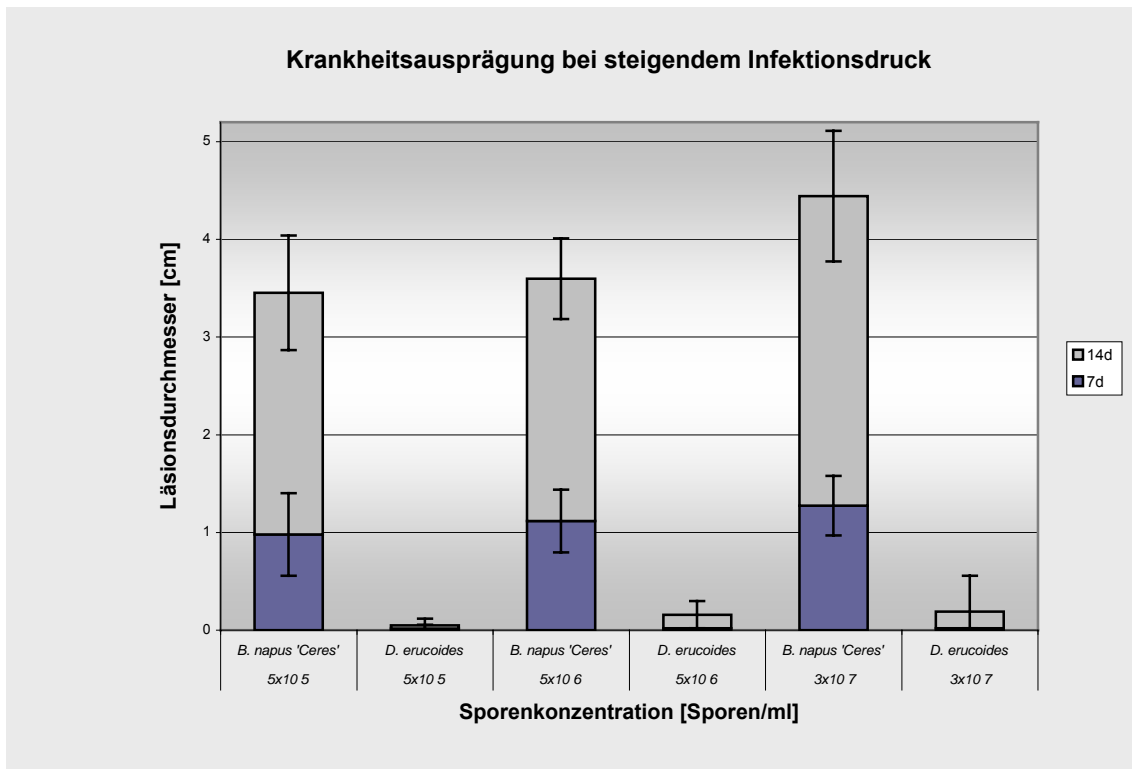


Abb. 3.11: Resistenzausprägungen von *B. napus* cv. ‚Ceres‘ und *D. erucoides* A_{Indien} bei steigendem Infektionsdruck. Die Läsionsdurchmesser sind Mittelwerte aus jeweils 27 Läsionen, die Auswertung erfolgte einmal nach sieben und einmal nach 14 Tagen Inkubation in der Feuchtkammer. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Bei *D. erucoides* wurden nach sieben Tagen Inkubation bei keiner der Sporenkonzentrationen Symptome ausgebildet.

Die Resistenzausprägung der Donorart wurde zusätzlich an abgetrennten Schoten *in vitro* (Schotentest) und an Schoten an der intakten Pflanze in der Feuchtkammer überprüft. In beiden Tests bildete *D. erucoides* keine Krankheitssymptome aus.

Anhand eines weiteren *Alternaria brassicicola*- sowie zweier *A. brassicae*-Isolate wurde außerdem die Isolatspezifität der Resistenz von *D. erucoides* (A_{IPK}) überprüft.

Hierfür wurden mit jedem Isolat sechs *D. erucoides*- und eine Raps-pflanze als Kontrolle inokuliert. Da bei *D. erucoides* auch *Alternaria*-anfällige Pflanzen zu erwarten sind (siehe dazu Abschnitt „Vererbung der Resistenz innerhalb der Art *D. erucoides*“) wurde jede *D. erucoides*-Pflanze zusätzlich mit einer Sporensuspension des Standardisolats *A. brassicicola* 62009 inokuliert, um zu testen, ob die Pflanze gegen dieses Isolat resistent war.

Die Inokulation mit dem Isolat *A. brassicicola* 62008 wurde nach dem Standardprotokoll („Tröpfchenmethode“) durchgeführt. *D. erucoides* zeigte hier eine ähnlich stark ausgeprägte Resistenz wie gegenüber dem Standardisolat 62009 (Abb. 3.12a). Die

Unterschiede zwischen den *A. brassicicola*-Isolaten waren nicht signifikant (t-Test, $\alpha = 5 \%$).

Da Sporensuspensionen von *A. brassicae* sich als nicht ausreichend infektiös erwiesen, wurde das Resistenzverhalten des Donors gegen *A. brassicae*-Isolate anhand von sporulierenden Hyphen auf Filterstückchen („Plättchenmethode“) untersucht. *D. erucoides* erwies sich in diesem Test als resistent gegen die beiden *A. brassicae*-Isolate 63194 und 64878 (Abb. 3.12b). Bedingt durch die bei der Plättchenmethode herrschenden optimalen Bedingungen für das Pathogen (Cellulose im Filterpapier, Reste des Nährmediums auf der Infektionsstelle) und die stark erhöhte Anzahl von Konidien pro Infektionsstelle fielen die durch *A. brassicae*, insbesondere durch das Isolat 63194, hervorgerufenen Symptome relativ stark aus. Zum Vergleich wurde mit dem Standardisolat *A. brassicicola* 62009 ebenfalls nach der Plättchenmethode inokuliert. Die auf diese Weise hervorgerufenen Läsionen fielen sogar größer aus als die durch das Isolat 63194 hervorgerufenen (Tab. 3.8). Die Unterschiede zwischen den bei *B. napus* und den bei *D. erucoides* hervorgerufenen Läsionen waren bei allen Isolaten signifikant (t-Test, $\alpha = 5 \%$).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Donor *D. erucoides* gegen alle getesteten *Alternaria*-Isolate resistent war und dass es sich bei dem Standardisolat um eines der virulenteren von den vier untersuchten *Alternaria*-Isolaten handelt.

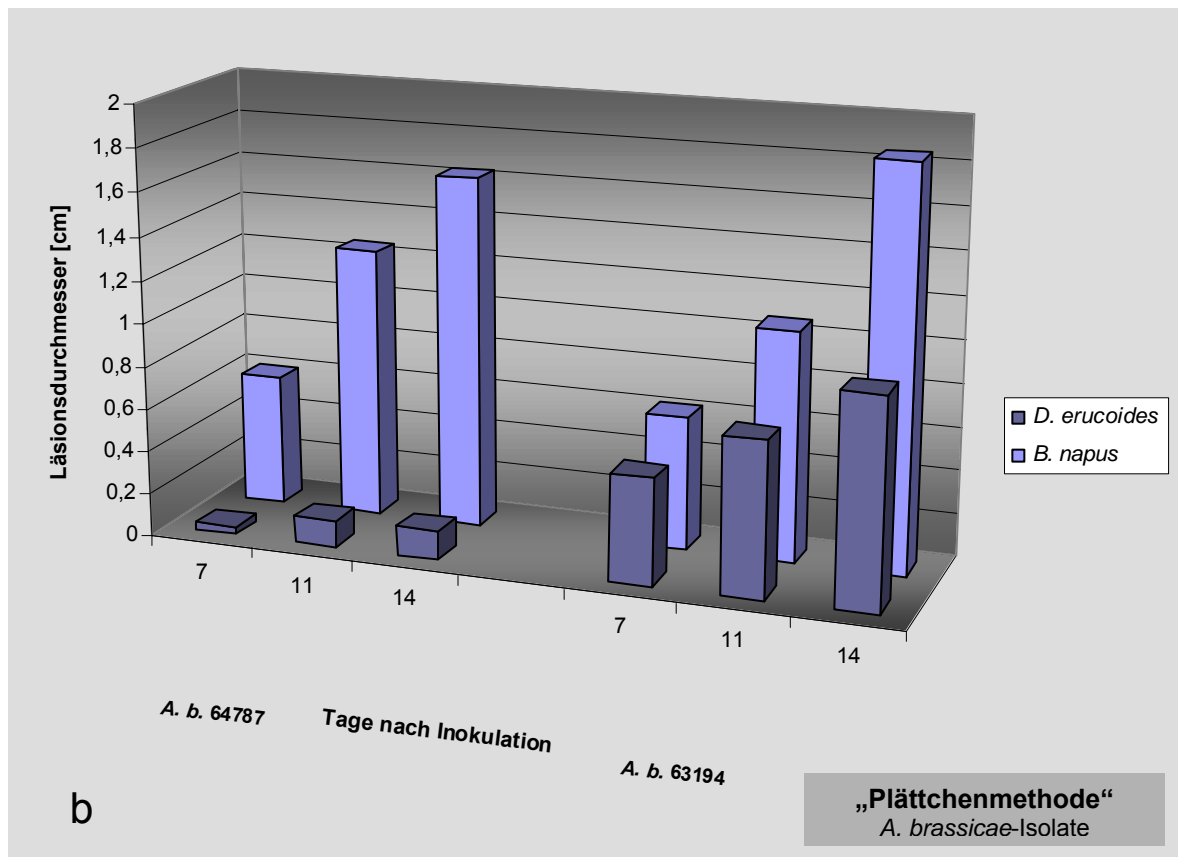
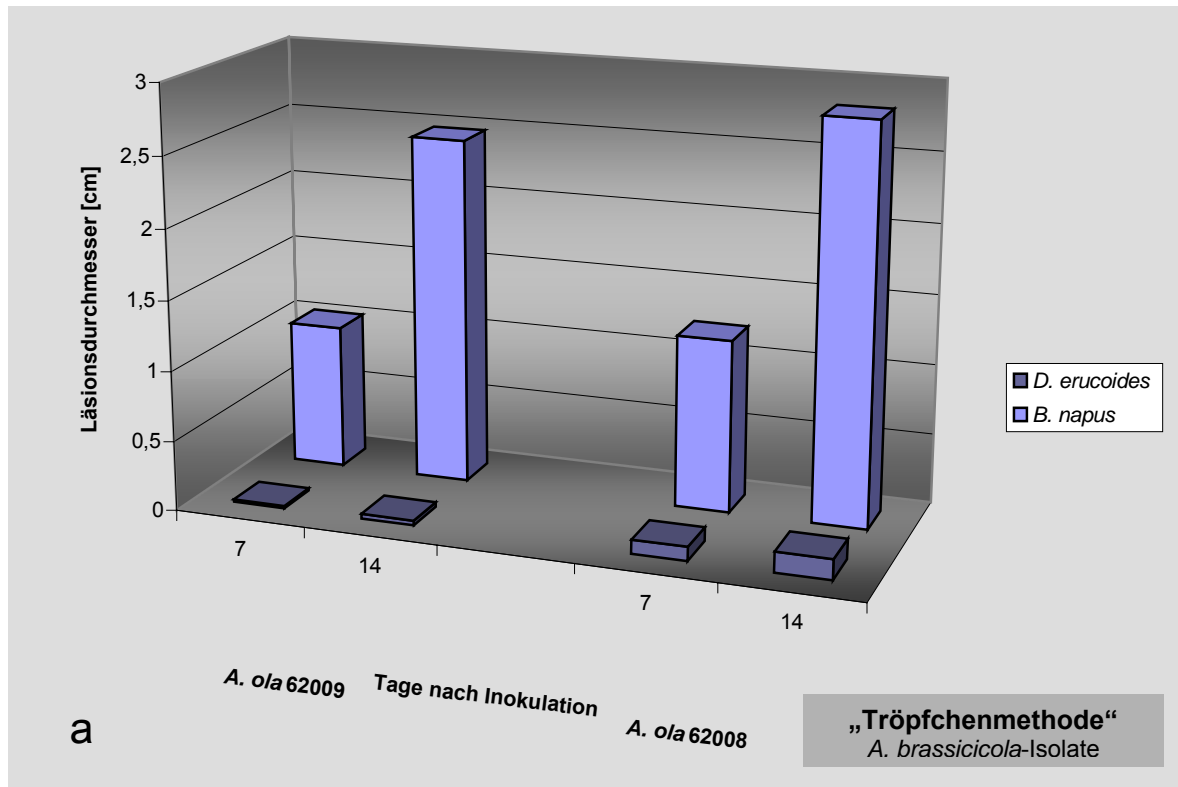


Abb. 3.12: Reaktion von *B. napus* cv. ‚Ceres‘ und *D. erucoides* (IPK) auf jeweils zwei verschiedene *A. brassicicola* (a)- und *A. brassicae* (b)-Isolate zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit unterschiedlichen Inokulationsmethoden (*A. ola* = *A. brassicicola*, „Tröpfchenmethode“, *A. b.* = *A. brassicae*, „Plättchenmethode“). Die Läsionsgrößen sind Mittelwerte aus jeweils neun Läsionen bei *B. napus* und 18 Läsionen bei *D. erucoides*. Die Unterschiede der Läsionsgrößen zwischen *B. napus* und *D. erucoides* waren jeweils signifikant (t-Test, $\alpha = 5\%$).

Tab. 3.8: Läsionsdurchmesser [cm] nach verschiedenen Inokulationsmethoden mit dem Standardisolat *A. brassicicola* 62009. Die Läsionsgrößen sind Mittelwerte aus jeweils neun Läsionen bei *B. napus* und 18 Läsionen bei *D. erucoides*.

Tage nach Inokulation	Art	Läsionsdurchmesser [cm]		
		Tröpfchenmethode	Plättchenmethode	Differenz
7	<i>B. napus</i>	1,03 ± 0,34	2,73 ± 0,41	1,70
	<i>D. erucoides</i>	0,02 ± 0,04	0,97 ± 0,59	0,95
14	<i>B. napus</i>	2,48 ± 0,58	4,1 ± 1,03	1,62
	<i>D. erucoides</i>	0,03 ± 0,07	1,58 ± 0,8	1,55

Vererbung der Resistenz innerhalb der Art *D. erucoides*

Um die Vererbung der Resistenz innerhalb der Donorart zu klären, wurden intraspezifische Kreuzungen zwischen anfälligen und resistenten Einzelpflanzen (Abb. 3.13) durchgeführt. Unter den Nachkommen wurden nach siebentägiger Inkubation in der Feuchtkammer nicht nur Pflanzen mit Läsionsgrößen von 1,3-1,5 cm (S) und Pflanzen ohne Krankheitssymptome (R) beobachtet, sondern auch Pflanzen mit Läsionsgrößen von 0,5-0,7 cm (S-R). Selbstungsexperimente an den S-R-Pflanzen zeigten jedoch, dass diese Nachkommen keine eigene Klasse bilden, sondern der Klasse S zugeordnet werden müssen (R. SCHEUNEMANN, pers. Mitteilung).

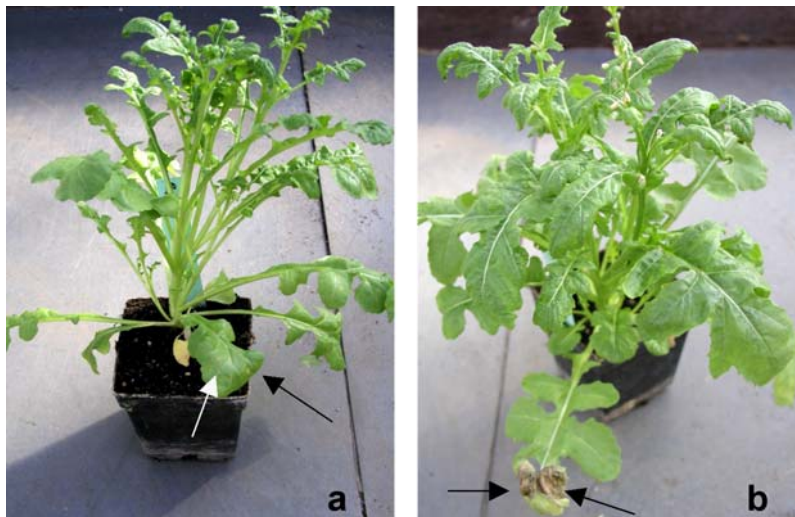


Abb. 3.13: Aufspaltung innerhalb einer Akzession (A_{IPK}) der Donorart *D. erucoides* (a: resistente Pflanze, b: anfällige Pflanze; die Pfeile markieren die Infektionsstellen).

Eine resistente und eine anfällige Einzelpflanze derselben Akzession (A_{IPK}) wurden reziprok miteinander gekreuzt und jeweils geselbstet. Die Ergebnisse der Feuchtkammertests an den Nachkommen sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

Aufgrund der Aufspaltungsverhältnisse in den verschiedenen Nachkommenschaften wurde angenommen, dass der verwendete resistente Genotyp heterozygot für die Resistenz war

(Rr), und die Hypothese aufgestellt, dass *Alternaria*-Resistenz bei *D. erucooides* monogen-dominant vererbt wird. Die Hypothese wurde mittels χ^2 -Test geprüft und mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % angenommen (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Aufspaltung der Nachkommenschaft aus intraspezifischen Kreuzungen und Selbstungen resistenter und anfälliger *D. erucooides*-Einzelpflanzen sowie statistische Überprüfung (R_1 = resistenter Genotyp, S_1 = anfälliger Genotyp, [S] = Selbstung).

Kreuzung bzw. Selbstung	Anzahl resistenter Pflanzen (R)	Anzahl anfälliger Pflanzen (S)	erwartete Aufspaltung (R:S)	χ^2 -Werte bei $\chi^2_{\alpha} = 3,84$ und $\alpha = 0,05$
$R_1 \times S_1$	23	22	1:1	0,02
$S_1 \times R_1$	40	38	1:1	0,05
R_1 [S]	21	9	3:1	0,4
S_1 [S]	0	64	uniform S	0

Bei einem monogen-dominanten Erbgang sollten in der Nachkommenschaft aus der Selbstung R_1 (in Tabelle 3.9 grau unterlegt) sowohl heterozygot als auch homozygot resistente Pflanzen auftreten. Um die Hypothese zu überprüfen, wurden deshalb resistente und anfällige Nachkommen aus dieser Selbstung jeweils mit anfälligen Pflanzen gekreuzt. Erwartungsgemäß wurden in den Folgegenerationen entweder eine 1:1-Aufspaltung resistenter zu anfälliger Pflanzen (wenn der resistente Elter heterozygot war) oder eine homogen resistente Nachkommenschaft (wenn der resistente Elter homozygot war) beobachtet.

Ähnliche Kreuzungsexperimente innerhalb der *D. erucooides*-Akzession indischer Herkunft zeigten, dass auch hier die Resistenz monogen-dominant vererbt wird (R. SCHEUNEMANN, pers. Mitteilung).

3.3.4.2 Kreuzung von *B. napus* mit der Donorart *D. erucooides* und Test auf Hybridcharakter der putativen F_1 - Nachkommen

Mit Hilfe der *embryo rescue*-Methode konnte *Brassica napus* cv. ‚Ceres‘ ($2n = 38$, Genom AACC) reziprok mit *Diplotaxis erucooides* A_{Indien} ($2n = 14$, De-Genom) gekreuzt werden. Da bei interspezifischen Kreuzungen mit dem Raps häufig diploid parthenogenetische Nachkommen gebildet werden (EENINK 1974), insbesondere bei der Verwendung von Raps als Mutterpflanze, wurden die putativen F_1 -Genotypen zunächst mittels RAPD-PCR-Analysen auf ihren Hybridcharakter hin untersucht.

Die zwölf Zufallsprimer der Firma Roth E 7, E 11, E 12, E 17, E 18, E 19, F 5, F 7, F 15, H 12, H 4 und I 11 amplifizierten jeweils Banden, mit deren Hilfe zwischen dem *D. eruroides* und dem *B. napus*-Genom differenziert werden konnte. Die Banden korrelierten nicht mit der Ausprägung der Resistenz, was an DNA-Pools resistenter und anfälliger BC₁-Pflanzen gezeigt werden konnte. Die F₁-Nachkommen (Tab. 3.10) aus den reziproken Kreuzungen wurden mit dem Primer Roth-I 11 untersucht. Sieben Nachkommen aus der Kreuzung mit Raps als Mutterpflanze zeigten das PCR-Bandenmuster von *B. napus* cv. ‚Ceres‘ und konnten so als matromorphe (diploid parthenogenetische) Pflanzen identifiziert und aus dem *pre-breeding* Programm herausgenommen werden (Abb. 3.14).

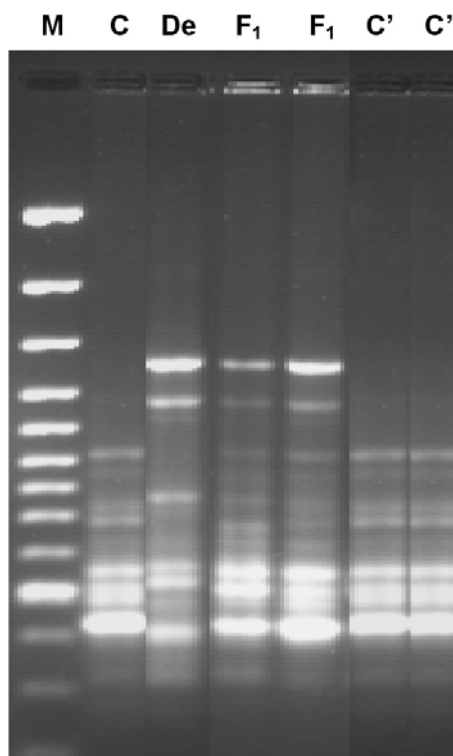


Abb. 3.14: RAPD-PCR mit dem Primer Roth-I 11 an putativen F₁-Hybriden aus der reziproken Kreuzung von *B. napus* und *D. eruroides* (M = DNA-Marker 100 bp ladder plus, C = *B. napus* cv. ‚Ceres‘, De = *D. eruroides*, C' = diploid parthenogenetischer Raps). F₁-Hybriden zeigen die Addition der PCR-Banden beider Eltern, während matromorphe Pflanzen das Bandenmuster von *B. napus* aufweisen.

3.3.4.3 Cytologische und morphologische Charakterisierung der F₁

Mittels klassischer Chromosomenzahlanalysen an Wurzelspitzen der F₁-Generation konnten die Ergebnisse aus den RAPD-PCR-Analysen bestätigt werden. Die als matromorph identifizierten Nachkommen zeigten den Rapskaryotyp ($2n = 38$, AACC), während Hybriden in der Regel die Addition der haploiden Genome beider Eltern ($2n = 26$, ACDe) aufwiesen (Tab. 3.10, Abb. 3.15) und einen intermediären Phänotyp zeigten (Abb. 3.16 und 3.17).

Tab. 3.10: Reziproke Kreuzungen aus *B. napus* cv. ‚Ceres‘ (C) und *D. erucoides* (De). Als matromorph identifizierte Nachkommen sind grau unterlegt.

Kreuzung	RAPD-Bandenmuster	2n =
<i>B. napus</i> cv. ‚Ceres‘ x <i>D. erucoides</i>		
CxDe1		25-28
CxDe2		32-34
CxDe3	C	38
CxDe4	C	38
CxDe5	C	38
CxDe6	C	38
CxDe7	C	38
CxDe8	C	38
CxDe9	C+De	26
CxDe10	C+De	26
CxDe11	C+De	26
CxDe13	C+De	26 (52*)
CxDe14	C+De	26
CxDe18	C	38
<i>D. erucoides</i> x <i>B. napus</i> cv. ‚Ceres‘		
DexC1		52-55/26
DexC3		26
DexC4K		26
DexC6	C+De	28
DexC7	C+De	26
DexC8	C+De	26
DexC9**	C+De	26
DexC10K**	C+De	38-42
DexC11 (Abb. 3.18)		26
DexC12	C+De	26
DexC13**	C+De	
DexC14	C+De	26
DexC16	C+De	26
DexC17K	C+De	
DexC18K	C+De	
DexC19K	C+De	
DexC20K	C+De	
DexC21 (Abb. 3.15)	C+De	26

* in einer Zelle

** Zwergwuchs

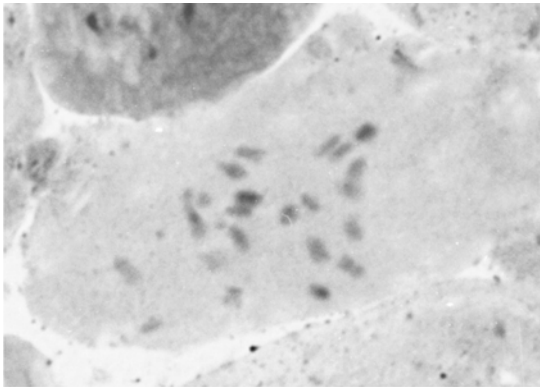


Abb. 3.15: Wurzelspitzenpräparat einer F₁-Hybride (DexC21) aus der Kreuzung *D. erucoides* x *B. napus* mit 2n = 26.

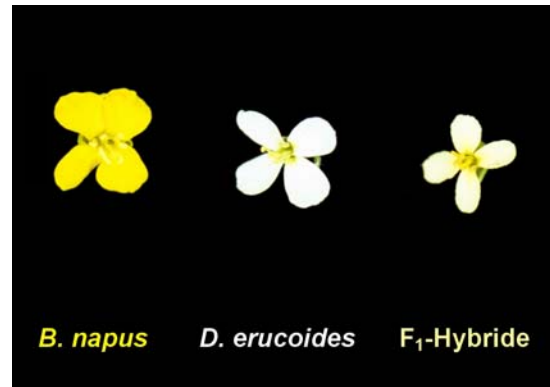


Abb. 3.16: Blütenfarbe der Eltern sowie einer F₁-Hybride aus der Kreuzung *D. erucoides* x *B. napus*.

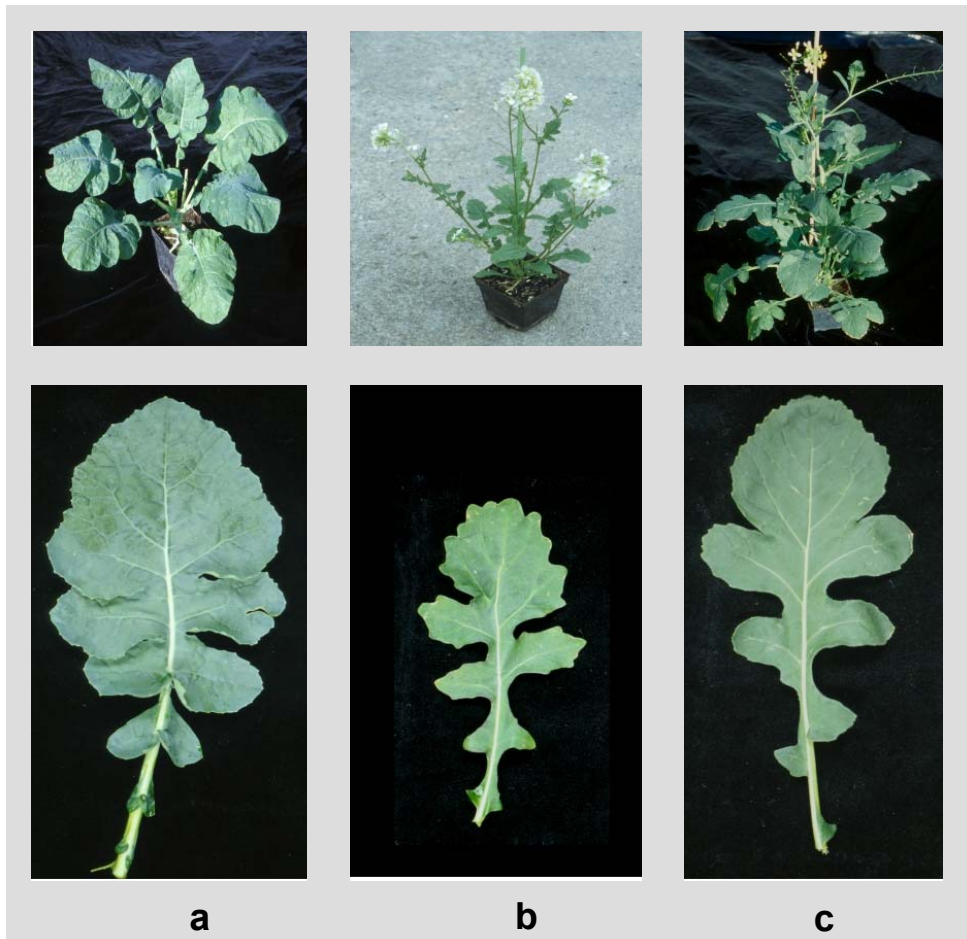


Abb. 3.17: Habitus und Blattmorphologie von *B. napus* cv. 'Ceres' (a), *D. erucoides* (b) und einer F₁-Hybride (c).

Eine Hybride mit 2n = 26 (DexC11) wurde mittels genomischer *in situ*-Hybridisierung (*D. erucoides*-Sonde, abgesättigt mit 50fachen Überschuss an Raps-DNA) untersucht.

Erwartungsgemäß hybridisierten sieben Chromosomen mit der genomischen *D. erucooides*-Sonde (Abb. 3.18).

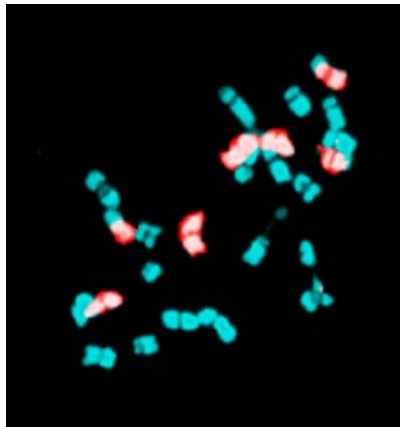


Abb. 3.18: Genomische *in situ*-Hybridisierung an einer F₁-Hybride aus der Kreuzung *D. erucooides* x *B. napus* mit 2n = 26: Die sieben Chromosomen der Donorart hybridisieren mit der genomischen *D. erucooides*-Sonde und sind als FITC-Signale (mittels Bildbearbeitung rot gefärbt) sichtbar.

3.3.4.4 Resistenzausprägung in der F₁-Nachkommenschaft

Die als Hybriden identifizierten Kreuzungsnachkommen waren homogen resistent. Nach Infektion mit *A. brassicicola* und 14tägiger Inkubation in der Feuchtkammer wurden keine Krankheitssymptome beobachtet (RL = 0, Abb. 3.19c). Die Resistenzausprägung erwies sich als stabil, d. h. alle Klone eines Genotyps reagierten (mit wenigen Ausnahmen) in verschiedenen unabhängigen Feuchtkammertests einheitlich auf das Pathogen. Die Resistenz blieb auch nach mehreren Subkulturen *in vitro* erhalten. Alle sieben matromorphen Kreuzungsnachkommen zeigten erwartungsgemäß *Alternaria*-Anfälligkeit.

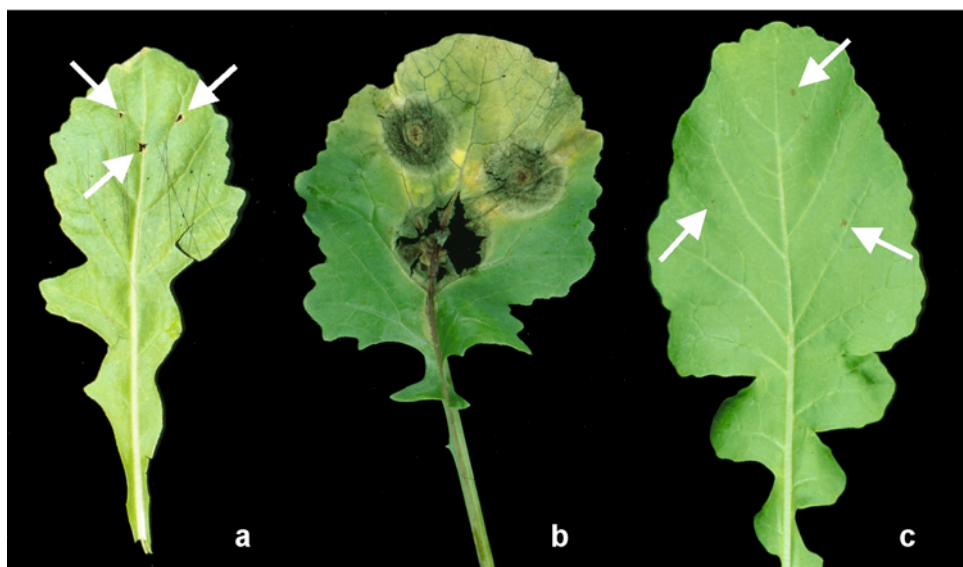


Abb. 3.19: Resistenzausprägung in der *D. erucooides*-Kreuzungsgruppe nach Inokulation mit *A. brassicicola* und siebentägiger Inkubation in der Feuchtkammer (a = *D. erucooides*, b = *B. napus* cv. ‚Ceres‘, c = F₁). Die Pfeile zeigen die Infektionsstellen.

3.3.4.5 Erstellung, Charakterisierung und Resistenzausprägung der ersten Rückkreuzungsnachkommenschaft

Resistente F₁-Hybriden aus der reziproken Kreuzungen zwischen *B. napus* und *D. erucoides* wurden sowohl als weiblicher als auch als männlicher Elter für die erste Rückkreuzung mit *B. napus* cv. ‚Ceres‘ eingesetzt. Nicht alle Hybriden ließen sich mit dem Raps rückkreuzen, so dass die erste Rückkreuzungsnachkommenschaft anhand von insgesamt 18 verschiedenen F₁-Genotypen erstellt wurde (Tab. 3.11). Trotz der Anwendung von *embryo rescue* war die Kreuzungseffizienz gering: Insgesamt wurden 1298 Knospen bestäubt, um 271 Samen zu präparieren, aus denen 46 Genotypen aus jeweils einem Samen und 31 Kallusse entstanden (dies entspricht einer Kreuzungseffizienz von 5,9 %). Aus den 31 Kallussen wurden insgesamt 241 potentiell genetisch unterschiedliche Sprosse (verschiedene Sprossregenerate desselben Kallusses können sich aufgrund von somaklonalen Variationen unterscheiden) regeneriert, wie in Tabelle 3.11 gezeigt. Alle Nachkommen wurden auf ihre Reaktion gegenüber *Alternaria* getestet: 141 Genotypen waren anfällig, 60 intermediär resistent und 85 resistent (Tab. 3.11). Die Genotypen mit der stärksten Resistenzausprägung wiesen einen Relativen Läsionsindex von 0 auf (was in der *D. erucoides*-Kreuzungsgruppe der Symptommfreiheit entspricht, Abb. 3.20a). Die Resistenzausprägung war auch in dieser Generation stabil.

Tab. 3.11: Erstellung der BC₁: verwendete F₁-Genotypen und deren Rückkreuzungsnachkommen (C = *B. napus* cv. ‚Ceres‘, De = *D. erucoides*, KE = Kreuzungseffizienz, Sa: aus jeweils einem Samen entstandener Genotyp; nK: Sprossregenerate, die aus n verschiedenen Kallussen generiert wurden).

F ₁ -Genotyp x C/ C x F ₁ -Genotyp	Anzahl bestäubter Knospen	Anzahl Samen	Anzahl BC ₁ - Genotypen	KE [%]	Resistente Genotypen
(CxDe)xC					
(CxDe9)xC	125	5	6 (2K)	1,6	- 2 (1K)
(CxDe10)xC	50	11	2 (Sa) 34 (2K)	8	2 (Sa) 10 (2K)
(CxDe11)xC	10	6	2 (Sa) 14 (2K)	40	1 (Sa) 4 (1K)
(CxDe13)xC	7	0	0	0	0
(CxDe14)xC	9	1	0	0	0
(DexC)xC					
(DexC1)xC	31	0	0	0	0
(DexC3)xC	58	13	4 (Sa) 17 (4K)	13,8	3 (Sa) 3 (1K)
(DexC4K)xC	129	13	1 (Sa) 2 (1K)	1,6	1 (Sa) -
(DexC6)xC	70	8	1 (Sa)	1,4	0
(DexC7)xC	72	11	1 (Sa) 3 (2K)	4,2	1 (Sa) 1 (1K)
(DexC8)xC	89	17	3 (Sa) 11 (1K)	4,5	0
(DexC11)xC	60	0	0	0	0
(DexC12)xC	53	9	5 (Sa) 14 (3K)	15,1	1 (Sa) 1 (1K)
(DexC14)xC	121	47	4 (Sa) 63 (7K)	9,1	1 (Sa) 17 (5K)
(DexC16)xC	72	12	4 (Sa) 1 (1K)	6,9	2 (Sa) 0
(DexC17K)xC	21	3	2 (Sa)	9,5	1 (Sa) -
(DexC18K)xC	27	7	3 (Sa)	11,1	2 (Sa) -
(DexC19K)xC	103	3	1 (Sa) 11 (2K)	2,9	0
(DexC20K)xC	68	83	5 (Sa) 12 (1K)	8,8	4 (Sa) 5 (1K)
(DexC21)xC	79	11	3 (Sa) 53 (3K)	7,6	3 (Sa) 18 (1K)
Cx(DexC)					
Cx(DexC11)	27	4	4 (Sa)	14,8	2 (Sa) -
Cx(DexC19K)	10	7	1 (Sa)	10	0
Cx(DexC21)	7	0	0	0	0
Σ	1298	271	46 (Sa) 241 (31K)	5,9	24 (Sa) 61 (14K)

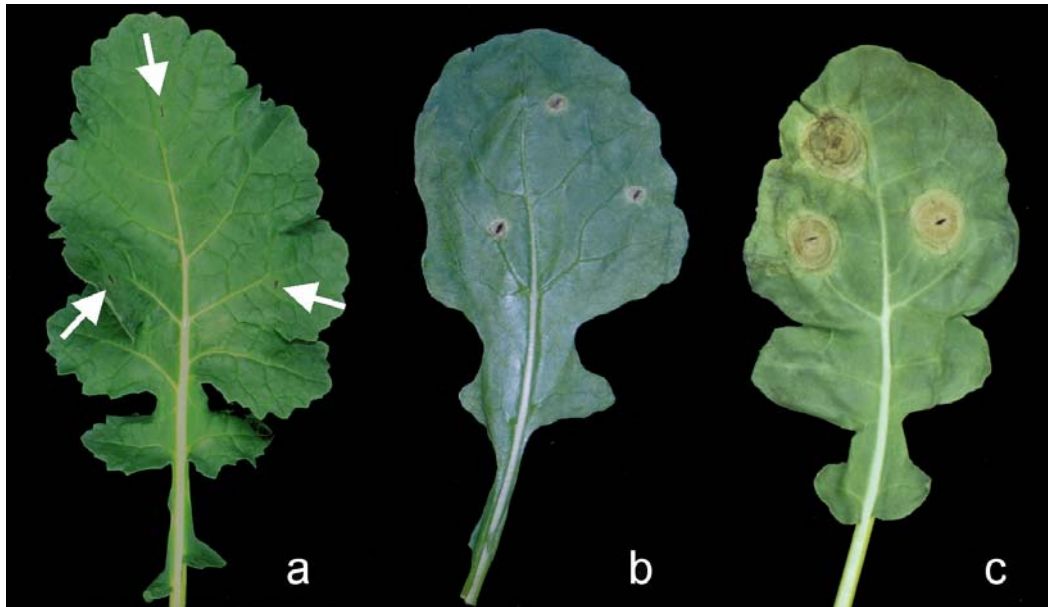


Abb. 3.20: Resistenzausprägung in der BC₁ der *D. eruroides*-Kreuzungsgruppe (a: resistenter, b: intermediär resistenter, c: anfälliger BC₁-Genotyp; die Pfeile markieren die Infektionsstellen).

Eine F₁-Hybride (DexC14) konnte mittels Knospenbestäubung und anschließender *in vitro*-Kultur geselbstet werden. Die zwei resultierenden F₂-Pflanzen waren *Alternaria*-resistent, aber zeigten einen stark vom Raps abweichenden Habitus mit gestörter Blütenentwicklung (Vertrocknen der geschlossenen Knospen).

Die Chromosomenzahlen sowie die Genomzusammensetzungen ausgewählter resistenter BC₁-Genotypen wurden mittels klassischer Wurzelspitzenpräparate (Abb. 3.21a-c) und/oder genomischer *in situ*-Hybridisierung untersucht (Tab. 3.12, Abb. 3.22a-l). Es wurde mit genomischer *D. eruroides*-DNA, abgesättigt mit 50fachem Überschuss an Raps-DNA, hybridisiert. Die zwischen $2n = 29$ und $2n = 69$ variierenden Chromosomenzahlen zeigen, dass sowohl hypo- als auch hyperploide Gameten bei der Zygotenbildung beteiligt waren. Viele Pflanzen in dieser Generation (insbesondere diejenigen mit Raps als Vater) besaßen jedoch Chromosomenzahlen um $2n = 45$ (Tab. 3.12), was auf das Ausbleiben der Reduktionsteilung bei der Bildung weiblicher Gameten von F₁-Pflanzen hindeutet. In diesem Fall würde aus der Verschmelzung einer unreduzierten Eizelle ($2n = 26$, ACDe) mit dem Rapspollen ($n = 19$, AC) eine Zygote mit $2n = 45$ (AACCD_e) entstehen. Einige BC₁-Genotypen zeigten ein mixoploides Wurzelmeristem (in den Tabellen 3.12 und 3.13 gelb unterlegt).

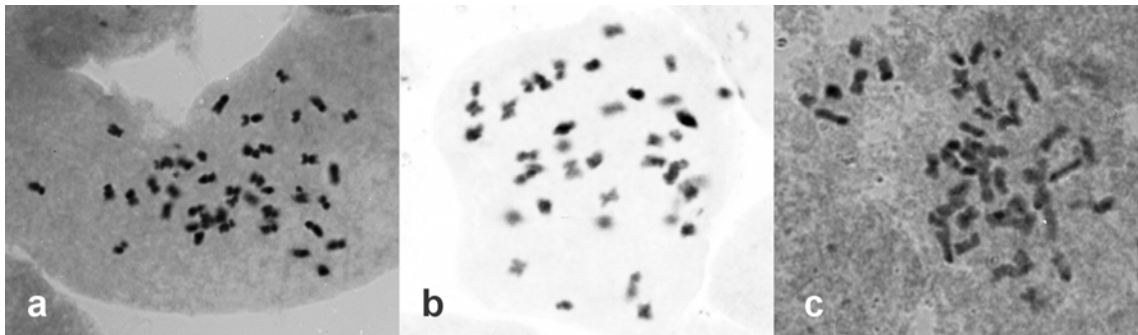


Abb. 3.21: Klassische Wurzelspitzenpräparate von BC₁-Genotypen der *D. erucoides*-Kreuzungsgruppe [a: Cx(DexC11)4 mit 2n = 44, b: Cx(DexC11)3 mit 2n = 38, c: (DexC14)xC4 mit 2n = 45].

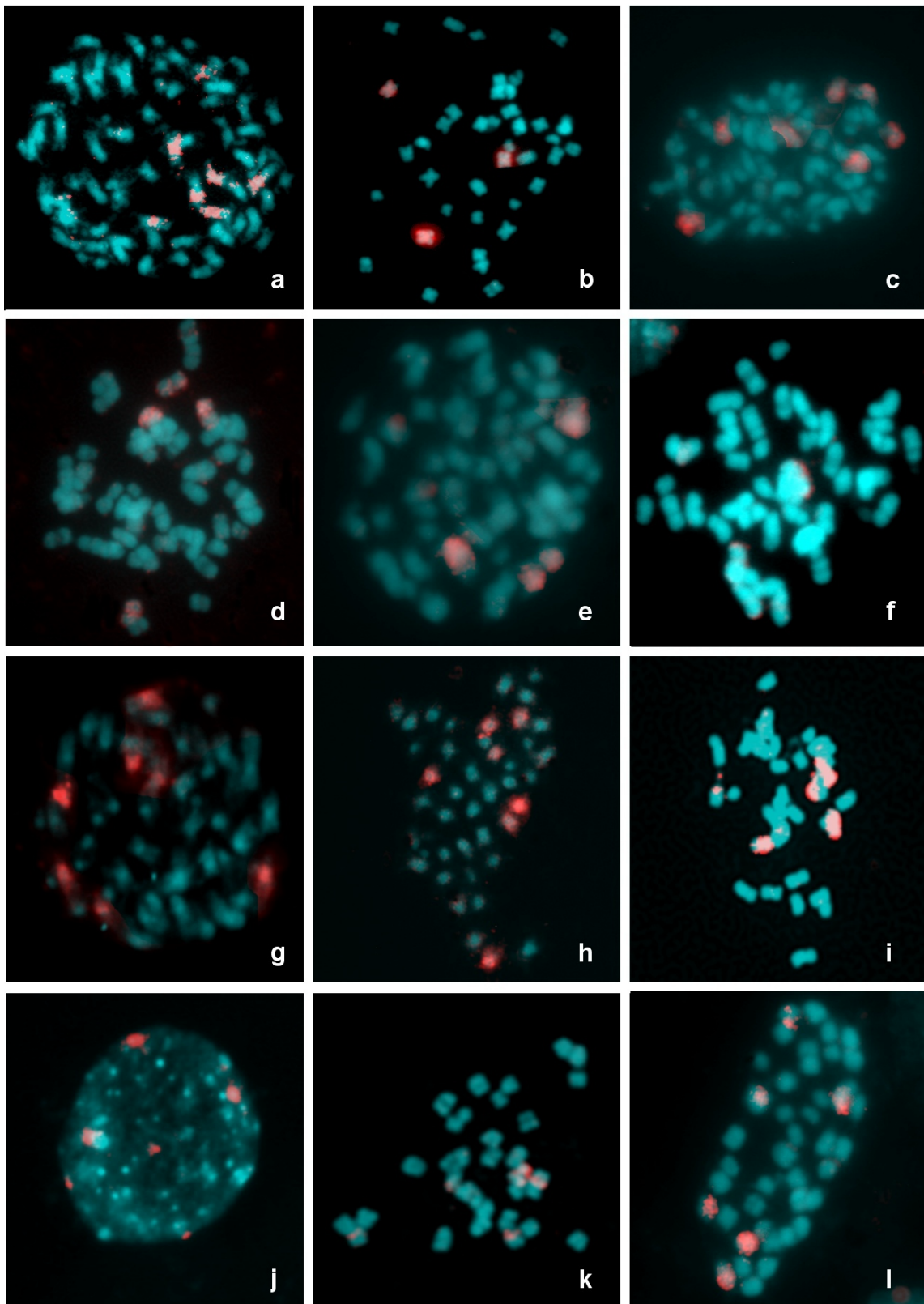


Abb. 3.22: Ergebnisse aus genomischer *in situ*-Hybridisierung an BC₁-Pflanzen der *D. erucoides*-Kreuzungsgruppe [a: (DexC14)xC3b, b + c: (DexC21)xCK4.20, d: (CxDe9)xC1a, e: (CxDe9)xC1b, f: (CxDe10)xC1, g + h: (CxDe10)xC3g, i-k: (CxDe11)xC4a, l: Cx(DexC11)3; vgl. auch Tabelle 3.12]. Der Anteil an Donorchromatin (in rot als FITC-Signale sichtbar) variierte zwischen drei und sieben Additionschromosomen.

3.3.4.6 Erstellung, Charakterisierung und Resistenzausprägung der zweiten Rückkreuzungsnachkommenschaft

BC₁-Genotypen mit gut ausgeprägter Resistenz (RL = 0), rapsähnlichem Habitus, Chromosomenzahlen nahe an der des Rapses und möglichst wenig Donorchromatin wurden für die Erstellung der zweiten Rückkreuzungsnachkommenschaft ausgewählt. Die BC₁-Pflanze wurde jeweils als Mutterpflanze, *B. napus* cv. ‚Ceres‘ als Pollenspender eingesetzt. Die durchschnittliche Kreuzungseffizienz war ca. viermal höher als bei der Erstellung der BC₁-Generation und lag bei 22,5 %: 1402 Knospen wurden bestäubt und 1120 Samen präpariert, aus denen 211 Genotypen aus jeweils einem Samen sowie 105 Kallusse entstanden. Von den Kallussen wurden insgesamt 685 Sprosse regeneriert. Von den 896 BC₂-Genotypen erwiesen sich 74 als *Alternaria*-resistent, 668 als *Alternaria*-anfällig und 154 zeigten eine intermediäre Resistenzausprägung. Auch in dieser Generation war die Resistenz teilweise stark ausgeprägt (RL = 0) und stabil. Die Resistenzausprägung wurde an abgetrennten Schoten der fertileren Genotypen überprüft; die Ergebnisse stimmten mit wenigen Ausnahmen mit den Ergebnissen aus der Feuchtkammer überein. Es kam jedoch vor, dass kleine schwarze Läsionen um die Verletzung gebildet wurden (Abb. 3.23).



Abb. 3.23: Resistenztest an abgetrennten Schoten fertiler BC₂-Genotypen der Kreuzung *B. napus* cv. ‚Ceres‘ x *D. erucoides* sieben Tage nach Inokulation mit *A. brassicicola* (a: anfälliger BC₂-Genotyp, b + c: resistente BC₂-Genotypen, d: *B. napus* cv. ‚Ceres‘, e: *D. erucoides*).

Tab. 3.12: Erstellung der BC₂: verwendete BC₁-Genotypen (grau unterlegte Genotypen sind jeweils Sprossregenerate eines Kallusses) und deren Rückkreuzungsnachkommen (De: *D. erucoides*, C: *B. napus* cv. ‚Ceres‘, KE = Kreuzungseffizienz, Sa: aus jeweils einem Samen entstandener Genotyp; nK: Sprossregenerate, die aus n verschiedenen Kallussen generiert wurden; GISH-Signale entsprechen in der Regel Extrachromosomen aus der Donorart; mehrere Chromosomenzahlen pro Genotyp weisen auf mixoploides Wurzelgewebe hin).

BC ₁ -Genotyp	2n =	Abb.	Anzahl bestäubter Knospen	Anzahl Samen	Anzahl BC ₂ -Genotypen	KE [%]	Anzahl resistenter Pflanzen
(DexC3a)xC1a			6	14	1 (Sa) 6 (1K)	33,3	0
(DexC12)xC8	34		41	4	0	0	0
(DexC14)xC3b	≥ 64 7-8 GISH-Signale	3.22a	7	8	3 (Sa)	42,9	1 (Sa) -
(DexC14)xC4	ca. 45 (42-47) 6 GISH-Signale	3.21c	85	17	27 (3K)	3,5	0
(DexC14)xC9a(K)	62-69 5-7 GISH-Signale		42	65	1 (Sa) 89 (9K)	23,8	- 6 (3K)
(DexC16)xC3	60-62/30 5 GISH-Signale		38	2	0	0	0
(DexC18K)xCU1b			8	6	2 (Sa)	25	0
(DexC20K)xC1K3			8	5	2 (1K)	12,5	0
(DexC21)xCK4.7	ca. 40		91	13	28 (3K)	3,3	- 9 (2K)
(DexC21)xCK4.9	43-44		35	5	0	0	0
(DexC21)xCK4.10	43-44		20	4	3 (1K)	5	0
(DexC21)xCK4.11	43-44		83	3	0	0	0
(DexC21)xCK4.20	38-40/48-52 3-7 GISH-Signale	3.22b+c	30	7	3 (Sa)	10	3 (Sa) -
(CxDe9)xC1a	ca. 50 (48-54) 4-7 GISH-Signale	3.22d	53	106	25 (Sa) 78 (12K)	69,8	2 (Sa) 8 (2K)
(CxDe9)xC1b	ca. 44 (41-47) 2-4/6 GISH-Signale	3.22e	125	201	64 (Sa) 163 (23K)	69,6	1 (Sa) 10 (2K)
(CxDe10)xC1	43-45 3-6 GISH-Signale	3.22f	53	45	1 (Sa) 56 (13K)	26,4	0
(CxDe10)xC3d	43 5-6 GISH-Signale		232	225	36 (Sa) 63 (9K)	19,4	1 (Sa) 5 (2K)
(CxDe10)xC3f	43 4-6 GISH-Signale		124	169	38 (Sa) 33 (7K)	36,3	2 (Sa) -
(CxDe10)xC3g	43-45 7 GISH-Signale	3.22g+h	99	106	21 (Sa) 19 (8K)	29,3	2 (Sa) -
(CxDe11)xC1	44-45 5-6 GISH-Signale		102	54	7 (Sa) 85 (12K)	18,6	0
(CxDe11)xC4a	ca. 40 (38-53) 4-6 GISH-Signale	3.22i-k	36	14	2 (Sa) 9 (1K)	8,3	1 (Sa) -
Cx(DexC11)3	ca. 40 (38-44) 5-6 GISH-Signale	3.22l 3.21b	71	33	5 (Sa) 24 (2K)	9,9	- 9 (1K)
Cx(DexC11)4	44-45 4 GISH-Signale	3.21a	13	14	2 (Sa)	15,4	0
Σ	30-69		1402	1120	211 (Sa) 685 (105K)	22,5	10 (Sa) 52 (13K)

Einige BC₂-Pflanzen zeichneten sich durch einen bereits sehr rapsähnlichen Habitus aus, allerdings wurde die charakteristische gelbe Blütenfarbe des Rapses nur vereinzelt, und dann bei anfälligen BC₂-Genotypen beobachtet. Die Blütenstände verschiedener BC₂-Genotypen sind in der Abbildung 3.24 dargestellt. Die Größe der nach freiem Abblühen

gebildeten Schoten und die Anzahl der darin enthaltenen Samen konnten von Genotyp zu Genotyp stark schwanken (Abb. 3.25).

Die Größe der Samen der fertileren Genotypen reichte in etwa an die der Rapssamen heran (Abb. 3.26).

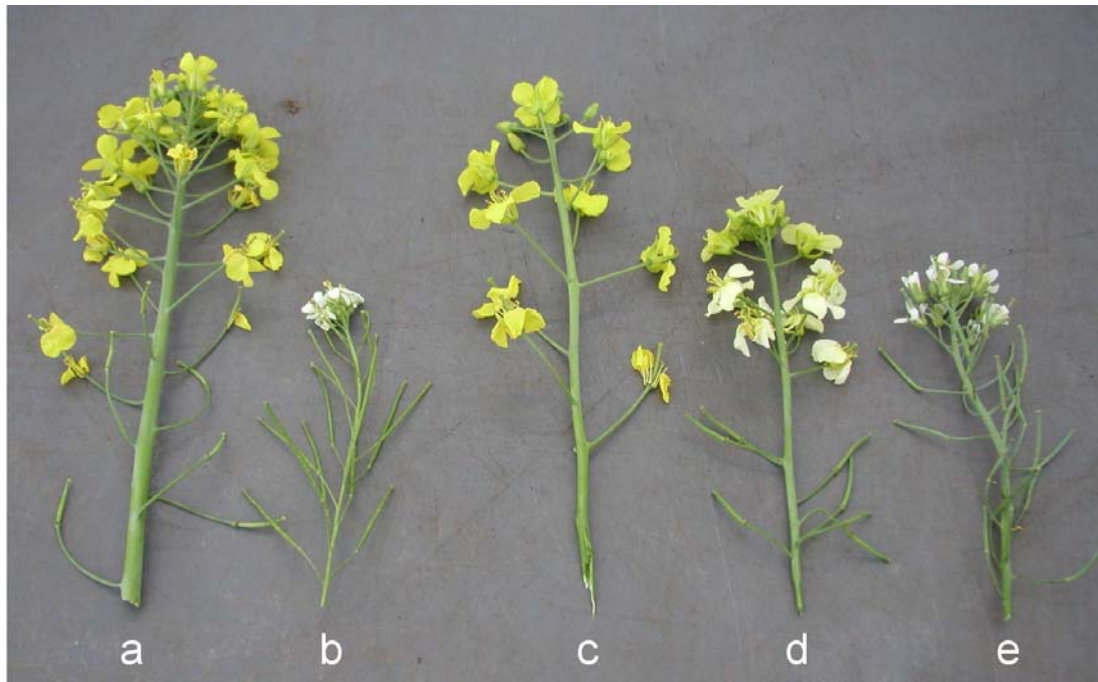


Abb. 3.24: Blütenstände von *B. napus* und *D. erucoides* sowie verschiedener Rückkreuzungsnachkommen (a: *B. napus* cv. ‚Ceres‘, b: *D. erucoides*, c-e: BC₂-Nachkommen).



Abb. 3.25: Schotenmorphologie von *B. napus* und *D. erucoides* sowie verschiedener Rückkreuzungsnachkommen nach freier Abblüte (a: *B. napus* cv. ‚Ceres‘, b: *D. erucoides*, c-f: fertile BC₂-Nachkommen, g-l: sterile BC₂-Nachkommen).

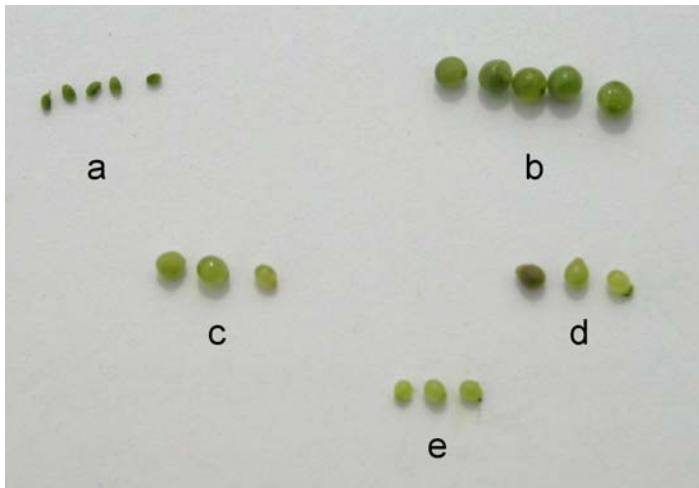


Abb. 3.26: Samengrößen von *B. napus* und *D. erucoides* sowie verschiedener fertiler Rückkreuzungsnachkommen nach freier Abblüte (a: *D. erucoides*, b: *B. napus* cv. ‚Ceres‘, c-e: BC₂-Nachkommen).

Die Chromosomenzahlen ausgewählter resistenter BC₂-Genotypen und deren Genomzusammensetzungen wurden mittels genomischer *in situ*-Hybridisierung (genomische *D. erucoides*-DNA-Sonde) untersucht. Fast alle Genotypen zeichneten sich durch mixoploide Wurzelmeristeme aus. Die Chromosomenzahlen lagen auch in dieser Generation oft bei 2n = ca. 45, vereinzelt und jeweils nur in wenigen Zellen wurden Zahlen von 2n = 38 bis 2n = 60 beobachtet. Die Ergebnisse sind detailliert in den Tabellen 3.16 und 3.17 und in der Abbildung 3.27 dargestellt.

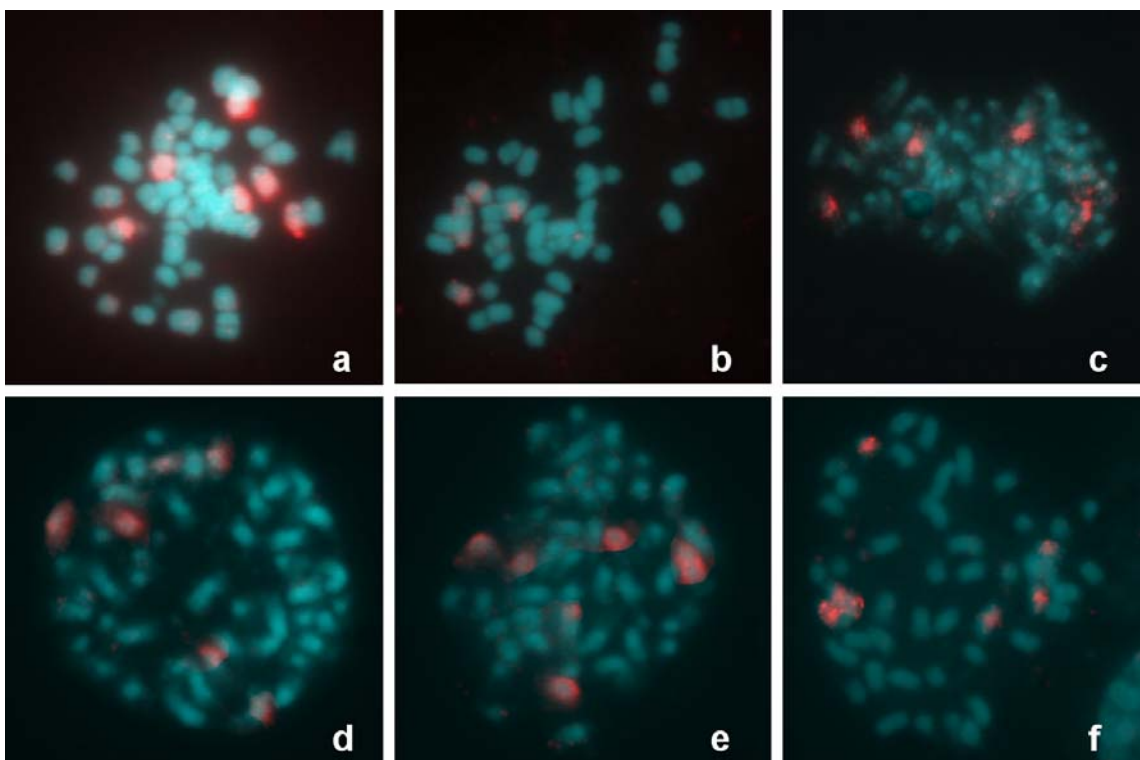


Abb. 3.27: Genomische *in situ*-Hybridisierung an BC₂-Genotypen der *D. erucoides*-Kreuzungsgruppe. Der Anteil an Donorchromatin ist sichtbar durch die rot gefärbte Fluoreszenzmarkierung, a: [(CxDe9)xC1a]xC3.4, b: [(CxDe10)xC3d]xC17b, c: [Cx(DexC11)3]xC7K1, d: [(CxDe9)xC1b]xC83K1.1, e: [(DexC21)xCK4.20]xC2, f: [(CxDe9)xC1a]xC33.

3.3.4.7 Erstellung der ersten Selbstungsnachkommenschaft der BC₁ (BC₁S₁) und Prüfung auf Resistenz

Alle resistenten BC₁-Genotypen wurden mittels Knospenbestäubung geselbstet. Nur wenige Genotypen waren selbstkompatibel (Tab. 3.13). Der in dieser Generation maximal erreichte Samenansatz nach Selbstung lag bei SA_[Selbstung] = 2,0 Samen pro Schote für den Genotyp (CxDe9)xC1b. Die Samen desselben Genotyps wiesen außerdem die höchste *in vitro*-Keimungsrate (19,1 %) auf. Insgesamt wurden 72 Selbstungsnachkommen generiert, von denen sich 15 im Feuchtkammertest als resistent (RL = 0), 6 als intermediär resistent und 51 als anfällig erwiesen (Tab. 3.13).

Tab. 3.13: Erstellung der BC₁S₁: verwendete BC₁-Genotypen (grau unterlegte Genotypen sind jeweils Sprossregenerate eines Kallusses) und deren Selbstungsnachkommen (De: *D. erucoides*, C: *B. napus* cv. ‚Ceres‘, SE = Selbstungseffizienz, Sa: aus jeweils einem Samen entstandener Genotyp; nK: Sprossregenerate, die aus n verschiedenen Kallussen entstanden; mehrere Chromosomenzahlen pro Genotyp weisen auf mixoploides Wurzelgewebe hin).

BC ₁ -Genotyp	2n =	Abb.	Anzahl Schoten	Anzahl Samen	Anzahl BC ₁ S ₁ -Genotypen	SE [%]	Anzahl resistenter Pflanzen
(DexC14)xC4	ca. 44 (42-47) 6 GISH-Signale		9	1	0	0	0
(CxDe9)xC1a	ca. 50 (48-54) 4-7 GISH-Signale	3.22d	14	25	1 (Sa)	7,1	0
(CxDe9)xC1b	ca. 44 (41-47) 2-4/6 GISH-Signale	3.22e	44	89	12 (Sa) 15 (5K)	38,6	6 (Sa) -
(CxDe10)xC1	43-45 3-6 GISH-Signale	3.22f	20	16	1 (Sa)	5	1 (Sa) -
(CxDe10)xC3d	43 5-6 GISH-Signale		78	49	3 (Sa) 8 (3K)	7,7	1 (Sa) -
(CxDe10)xC3f	43 4-6 GISH-Signale		60	85	6 (Sa) 1 (1K)	11,7	0
(CxDe10)xC3g	43-45 7 GISH-Signale	3.22g+h	64	63	7 (Sa) 18 (4K)	17,2	- 6 (2K)
Cx(DexC11)3	ca. 40 (38-44) 5-6 GISH-Signale	3.22i 3.21b	16	2	0	0	0
Σ	38-54		305	330	30 (Sa) 32 (12K)	13,8	8 (Sa) 6 (2K)

Chromosomenzahl und Genomzusammensetzung ausgewählter resistenter BC₁S₁-Genotypen sind in den Tabellen 3.14 und 3.15 und in der Abbildung 3.28 dargestellt.

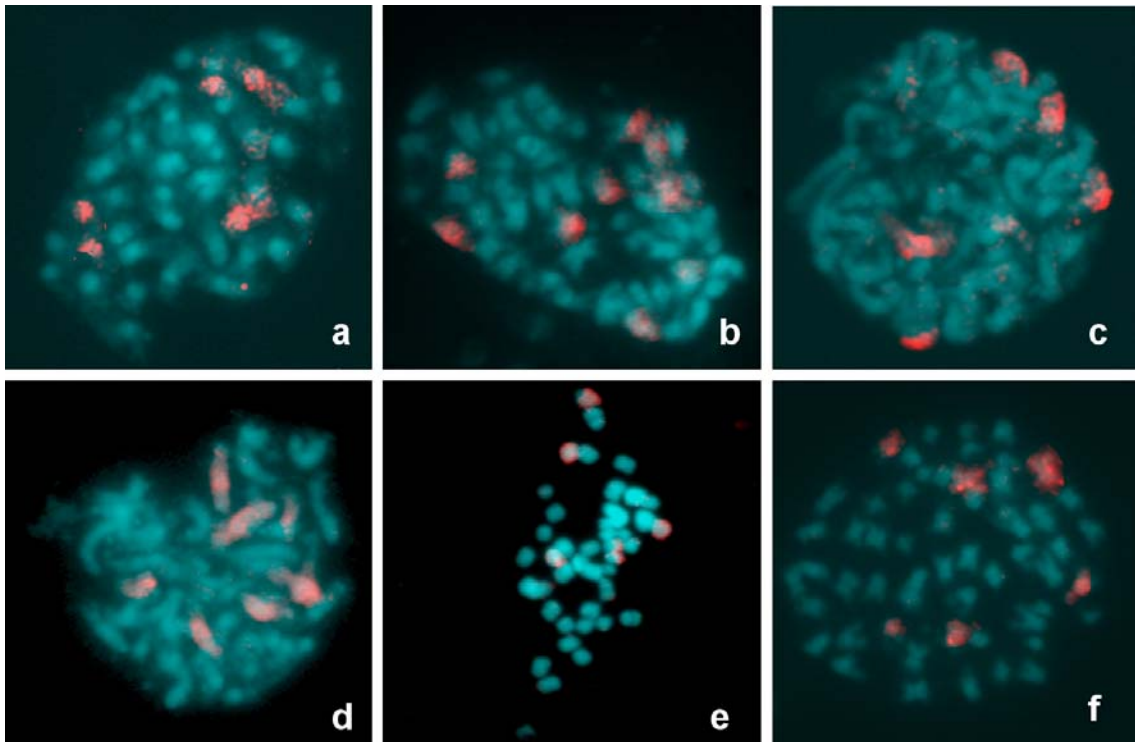


Abb. 3.28: Genomische *in situ*-Hybridisierung an BC₁S₁-Genotypen (a+b: Mixoploidie bei dem BC₁S₁-Genotyp (CxDe9)xC1b[S]7, c: (CxDe9)xC1a[S]1, d: (CxDe10)xC3g[S]8K4.1, e: (CxDe10)xC3g[S]9K1, f: (CxDe9)xC1b[S]5).

3.3.4.8 Erstellung der zweiten Selbstungsnachkommenschaft der BC₁ (BC₁S₂) und Test auf Resistenz

Resistente BC₁S₁-Nachkommen wurden einer zweiten Selbstung (Knospenbestäubung) unterzogen. Die meisten Genotypen waren weitreichend selbstinkompatibel (durchschnittliche Selbstungseffizienz aller Genotypen: 5,2 %), aber es konnten insgesamt 106 BC₁S₂-Genotypen erzeugt werden. Die Anzahl der Genotypen bezieht sich auf die aus jeweils einem Samen entstandenen Genotypen zuzüglich aller Sprossregenerate aus verschiedenen Kallussen. Einige BC₁S₁-Pflanzen zeigten bereits vergleichsweise gute Fertilität. Der maximal erreichte Samenansatz nach Selbstung lag bei SA_[Selbstung] = 4 Samen/Schote (Genotyp (CxDe9)xC1b[S]5, in Tabelle 3.14 blau unterlegt), wobei die Keimungsrate der Samen trotz Einsatz von *embryo rescue* nur bei maximal 10 % lag (Genotyp (CxDe9)xC1b[S]12 als Mutterpflanze, in Tabelle 3.14 grün unterlegt). Im Vergleich dazu wies *B. napus* cv. ‚Ceres‘ nach Selbstung 20-30 Samen pro Schote mit einer Keimungsrate von 99 % auf. Von den erstellten BC₁S₂-Genotypen zeigten 38 eine starke und stabile Resistenzausprägung (RL = 0, Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Erstellung der BC₁S₂: verwendete BC₁S₁-Genotypen und deren Selbstungsnachkommen (De: *D. erucoides*, C: *B. napus* cv. ‚Ceres‘, [S] = Selbstung, SE = Selbstungseffizienz, Sa: aus jeweils einem Samen entstandener Genotyp; nK: Sprossregenerate, die aus n verschiedenen Kallussen generiert wurden; mehrere Chromosomenzahlen pro Genotyp weisen auf mixoploides Wurzelgewebe hin; gelb unterlegter Genotyp: mixoploid, vgl. auch Abb. 3.28a+b).

BC ₁ S ₁ -Genotyp	2n =	Abb.	Anzahl Schoten	Anzahl Samen	Anzahl BC ₁ S ₂ -Genotypen	SE [%]	Anzahl resistenter Pflanzen
(CxDe9)xC1b[S]5	52-56 3-5 GISH-Signale	3.28f	40	159	2 (Sa) 24 (5K)	17,5	- 14 (4K)
(CxDe9)xC1b[S]7	44-53 5-9 GISH-Signale	3.28a+b	232	322	12 (Sa) 24 (5K)	7,3	3 (Sa) 12 (1K)
(CxDe9)xC1b[S]10K			24	35	0	0	0
(CxDe9)xC1b[S]12			41	89	4 (Sa) 26 (5K)	22	1 (Sa) 8 (2K)
(CxDe10)xC1a[S]1	≥45 5-7 GISH-Signale	3.28c	145	68	- 13 (2K)	1,4	0
(CxDe10)xC3d[S]2			42	17	1(Sa) -	2,4	0
(CxDe10)xC3g[S]8K4	45 6-7 GISH-Signale	3.28d	40	0	0	0	0
(CxDe10)xC3g[S]9K1	43-45 2-6 GISH-Signale	3.28e	122	7	0	0	0
Σ	43-56		686	697	19 (Sa) 87 (17K)	5,2	4 (Sa) 34 (7K)

3.3.4.9 Rückkreuzung der ersten Selbstungsnachkommenschaft der BC₁(BC₁S₁xC) und Test auf Resistenz

Resistente Pflanzen der BC₁S₁-Generation wurden außerdem mit *B. napus* cv. ‚Ceres‘ rückgekreuzt (Tab. 3.15). Von 250 erstellten Genotypen erwiesen sich 41 als resistent, wobei auch in dieser Generation RL-Werte von 0 erreicht wurden. Den besten Samenansatz nach Kreuzung zeigte der Genotyp (CxDe9)xC1b[S]5 mit SA_[Kreuzung] = 3 Samen/Schote (in Tabelle 3.15 blau unterlegt). Die maximal erreichte Keimungsrate der Samen lag in dieser Generation bei 30 %, so beim Genotyp (CxDe9)xC1b[S]7, in Tabelle 3.15 grün unterlegt.

Tab. 3.15: Erstellung der BC₁S₁xC: verwendete BC₁S₁-Genotypen (grau unterlegte Genotypen sind jeweils Sprossregenerate eines Kallusses) und deren Rückkreuzungsnachkommen (De: *D. erucoides*, C: *B. napus* cv. ‚Ceres‘, [S] = Selbstung, KE = Kreuzungseffizienz, Sa: aus jeweils einem Samen entstandener Genotyp; nK: Sprossregenerate, die aus n verschiedenen Kallussen generiert wurden; gelb unterlegter Genotyp: mixoploid, vgl. auch Abb. 3.28a+b).

BC ₁ S ₁ -Genotyp	2n =	Abb.	Anzahl Blüten	Anzahl Samen	Anzahl BC ₁ S ₁ xC-Genotypen	KE [%]	Anzahl resistenter Pflanzen
(CxDe9)xC1b [S]5	52-56 3-5 GISH-Signale	3.28f	26	89	3 (Sa) 21 (5K)	30,8	0 4 (1K)
(CxDe9)xC1b [S]7	44-53 5-9 GISH-Signale	3.28a+b	151	270	58 (Sa) 99 (22K)	53	6 15 (5K)
(CxDe9)xC1b [S]10K			17	35	3 (Sa) 41 (6K)	53	0 9 (1K)
(CxDe9)xC1b [S]12			22	39	2 (Sa) -	9,1	0
(CxDe10)xC1a [S]1	≥45 5-7 GISH-Signale	3.28c	54	66	3 (Sa) 20 (2K)	9,3	2 5 (2K)
(CxDe10)xC3g [S]8K1.3			99	3	0	0	0
(CxDe10)xC3g [S]8K4	45 6-7 GISH-Signale	3.28d	126	5	0	0	0
(CxDe10)xC3g [S]9K1	43-45 2-6 GISH-Signale	3.28e	74	21	0	0	0
Σ	43-56		569	528	69 181 (35K)	18,3	8 33 (8K)

3.3.4.10 Erstellung der dritten Rückkreuzungsnachkommenschaft (BC₃) und Resistenzausprägung in dieser Generation

Resistente BC₂-Genotypen mit rapsähnlichem Habitus, Chromosomenzahlen möglichst nahe an der des Rapses und wenig Donorchromatin wurden für die Erstellung der dritten Rückkreuzungsnachkommenschaft eingesetzt. Einige interessante Genotypen konnten nicht gekreuzt werden, was teilweise auf degenerierte Blütenknospen (Abb. 3.29) und insbesondere auf Griffeldeformationen (in den Tabellen 3.16 und 3.17 orange unterlegte Genotypen, Abb. 3.30) zurückzuführen war. Solche Genotypen eigneten sich auch nicht als männlicher Kreuzungspartner; die Pollenvitalität dieser Pflanzen lag bei nur ca. 30 % der Pollenvitalität der Referenzsorte *B. napus* cv. ‚Ceres‘ (R. SCHEUNEMANN, pers. Mitteilung).



Abb. 3.29: Degenerierte Blütenknospen bei der resistenten BC₂-Pflanze [(DexC14)xC9aK]xC3K2.4.



Abb. 3.30: Deformierter Griffel einer sterilen BC₂-Pflanze aus der Kreuzung *D. erucoides* x *B. napus* cv. ‚Ceres‘: [(DexC21)xCK4.20] xC2.

Tab. 3.16: Erstellung der BC₃: verwendete BC₂-Genotypen (grau unterlegte Genotypen sind jeweils Sprossregenerate eines Kallusses, orange unterlegte Pflanzen wiesen Griffeldeformationen auf) und deren Rückkreuzungsnachkommen (De: *D. erucoides*, C: *B. napus* cv. „Ceres“, KE = Kreuzungseffizienz, Sa: aus jeweils einem Samen entstandener Genotyp; nK: Sprossregenerate, die aus n verschiedenen Kallussen entstanden; mehrere Chromosomenzahlen pro Genotyp weisen auf mixoploides Wurzelgewebe hin).

BC ₂ -Genotyp	2n =	Abb.	Anzahl Blüten	Anzahl Samen	Anzahl BC ₃ -Genotypen	KE [%]	Anzahl resistenter Pflanzen
[(DexC14)xC9a(K)]xC1K	52 4-5 GISH-Signale		22	5	1 (Sa) 2 (1K)	9,1	- 1 (1K)
[(DexC21)xCK4.20]xC1	45 4-6 GISH-Signale		27	0	0	0	0
[(DexC21)xCK4.20]xC2	45 4-6 GISH-Signale	3.27e	50	0	0	0	0
[(DexC21)xCK4.7]xC1			33	0	0	0	0
[(CxDe9)xC1a]xC3			59	74	14 (Sa) 37 (7K)	35,6	1 (Sa) 3 (1K)
[(CxDe9)xC1a]xC3.4	44-46 5-7 GISH-Signale	3.27a	137	166	42 (Sa) 69 (13K)	40,1	3 (Sa) 5 (2K)
[(CxDe9)xC1a]xC3.8			66	134	29 (Sa) 27 (4K)	50	2 (Sa) -
[(CxDe9)xC1a]xC33	45 5-6 GISH-Signale	3.27f	71	10	1 (Sa) -	1,4	0
[(CxDe9)xC1b]xC83K1			96	77	13 (Sa) 28 (4K)	17,7	1 (Sa) -
[(CxDe9)xC1b]xC83K1.1	45 4-5 GISH-Signale	3.27d	29	25	3 (Sa) -	10,3	0
[(CxDe9)xC1b]xC83K1.2	44		36	50	2 (Sa) 10 (2K)	11,1	1 (Sa) -
[(CxDe9)xC1b]xC83K3			40	5	2 (Sa)	5	0
[(CxDe9)xC1b]xC83K4.6			55	45	7 (Sa) 7 (1K)	14,5	1 (Sa) -
[(CxDe9)xC1b]xC83K7.2	45? 4-5 GISH-Signale		27	12	0	0	0
[(CxDe9)xC1b]xC61K4			43	92	27 (Sa) 64 (13K)	93	- 1 (1K)
[(CxDe9)xC1b]xC61K6			49	25	2 (Sa) 7 (1K)	6,1	0
[(CxDe9)xC1b]xC60			11	3	1 (Sa) 13 (2K)	27,3	0
[(CxDe10)xC3d]xC17a			26	1	0	0	0
[(CxDe10)xC3d]xC17b	Ca. 40 (38-44) 3-5 GISH-Signale	3.27b	71	139	49 (Sa) 77 (12K)	85,9	3 (Sa) 3 (1K)
[(CxDe10)xC3f]xC40K1.4			20	14	0	0	0
(CxDe10)xC3g]xC5			12	7	- 6 (2K)	16,7	0
[Cx(DexC11)3]xC7K1	44-47/60 4-5 GISH-Signale	3.27c	74	163	40 (Sa) 22 (5K)	60,8	2 (Sa) -
[Cx(DexC11)3]xC7K3			14	25	2 (Sa) 10 (3K)	35,7	1 (Sa) -
[Cx(DexC11)3]xC7K5			45	106	19 (Sa) 17 (6K)	55,6	1 (Sa) -
[Cx(DexC11)3]xC7K7			13	15	1 (Sa) 16 (2K)	23,1	1 (Sa) -
[Cx(DexC11)3]xC7K8			69	174	61 (Sa) 53 (12K)	106	5 (Sa) 7 (1K)
Σ	38-60		1195	1367	316 (Sa) 465 (90K)	34	22 (Sa) 20 (6K)

Die Kreuzungseffizienz bei der Erstellung der BC₃ (KE_{BC3}) war höher als in den vorangegangenen Rückkreuzungsgenerationen (KE_{BC1} = 6 %, KE_{BC2} = 22 %) und lag bei 34 % (1195 bestäubte Knospen, 316 aus Samen generierte Genotypen und 90 entstandene Kallusse). Einige BC₂-Pflanzen zeigten vergleichsweise guten Samenansatz nach Rückkreuzung (bis zu SA_[Kreuzung] = 2,5 Samen/bestäubte Knospe beim Genotyp [Cx(DexC11)3]xC7K8, in Tabelle 3.16 blau unterlegt). Jedoch wurden auch in dieser Generation, trotz Einsatz von *embryo rescue*, geringe Keimungsraten verzeichnet. Die maximale Keimungsrate lag bei 44 %, so wenn der Genotyp [(CxDe10)xC3d]xC17b (in Tabelle 3.16 grün unterlegt) als Mutterpflanze verwendet wurde.

Von insgesamt 781 erzeugten BC₃-Genotypen zeigten 42 eine gute Resistenzausprägung (RL = 0).

3.3.4.11 Erstellung der ersten Selbstungsnachkommenschaft der BC₂ (BC₂S₁) und Test auf Resistenz

Interessante BC₂-Genotypen wurden zusätzlich mittels Knospenbestäubung geselbstet. Die Selbstungseffizienz war im Durchschnitt schlecht (6,3 %), der maximal erreichte Samenansatz nach Selbstung lag bei SA_[Selbstung] = 3,1 Samen/Schote, die maximale Keimungsrate bei 35 % (jeweils Genotyp [(CxDe10)xC3gxC5, in Tabelle 3.17 blau unterlegt).

Von insgesamt 310 BC₂S₁-Nachkommen waren 58 *Alternaria*-resistent (Tab. 3.17).

Tab. 3.17: Erstellung der BC₂S₁: verwendete BC₂-Genotypen (grau unterlegte Genotypen sind jeweils Sprossregenerate eines Kallusses, aufgrund von Griffeldeformationen sterile Pflanzen sind orange unterlegt) und deren Selbstungsnachkommen (De: *D. erucoides*, C: *B. napus* cv. 'Ceres', SE = Selbstungseffizienz, Sa: aus jeweils einem Samen entstandener Genotyp; nK: Sprossregenerate, die aus n verschiedenen Kallussen entstanden; mehrere Chromosomenzahlen pro Genotyp weisen auf mixoploides Wurzelgewebe hin).

BC ₂ -Genotyp	2n =	Abb.	Anzahl Schoten	Anzahl Samen	Anzahl BC ₂ S ₁ -Genotypen	SE [%]	Anzahl resistenter Pflanzen
[(DexC21)xCK4.20]xC1	45 4-6 GISH-Signale		32	0	0	0	0
[(DexC21)xCK4.20]xC2	45 4-6 GISH-Signale	3.27e	64	0	0	0	0
[(DexC21)xCK4.7]xC1			17	0	0	0	0
[(CxDe9)xC1a]xC3			32	17	2 (Sa) 12 (1K)	9,3	0
[(CxDe9)xC1a]xC3.4	44-46 5-7 GISH-Signale	3.27a	360	442	14 (Sa) 73 (9K)	6,4	1 (Sa) 1 (1K)
[(CxDe9)xC1a]xC3.8			102	33	5 (1K)	1	0
[(CxDe9)xC1a]xC33	45 5-6 GISH-Signale	3.27f	23	1	0	0	0
[(CxDe9)xC1b]xC83K1			19	2	0	0	0
[(CxDe9)xC1b]xC83K1.1	45 4-5 GISH-Signale	3.27d	144	47	3 (Sa)	1,4	0
[(CxDe9)xC1b]xC83K1.2	44		64	7	0	0	0
[(CxDe9)xC1b]xC83K3			82	19	1 (Sa)	1,2	0
[(CxDe9)xC1b]xC83K4.6			31	6	0	0	0
[(CxDe9)xC1b]xC83K7.2	45? 4-5 GISH-Signale		21	3	0	0	0
[(CxDe9)xC1b]xC61K4			4	6	1 (Sa)	25	0
[(CxDe9)xC1b]xC61K6			19	3	0	0	0
[(CxDe9)xC1b]xC60			5	14	1 (Sa) 22 (3K)	80	- 8 (1K)
[(CxDe10)xC3dniE]xC9			7	11	6 (Sa)	85,7	1 (Sa) -
[(CxDe10)xC3d]xC17b	ca. 40 (38-44) 3-5 GISH-Signale	3.27b	94	14	2 (Sa)	2,2	0
[(CxDe10)xC3f]xC16b			0	0	0	0	0
[(CxDe10)xC3f]xC40K1.4			7	0	0	0	0
[(CxDe10)xC3fniE]xC27			10	15	6 (Sa) -	60	0
[(CxDe10)xC3g]xC5			21	66	20 (Sa) 13 (3K)	110	3 (Sa) -
[(CxDe10)xC3g]xC23			32	19	0	0	0
[Cx(DexC11)3]xC7K1	44-47/60 4-5 GISH-Signale	3.27c	227	453	16 (Sa) 100 (11K)	11,9	4 (Sa) 38 (5K)
[Cx(DexC11)3]xC7K3			93	143	3 (Sa) -	3,2	2 (Sa) -
[Cx(DexC11)3]xC7K5			152	179	4 (Sa) 4 (1K)	3,3	0
[Cx(DexC11)3]xC7K7			19	10	1 (Sa)	5,3	0
[Cx(DexC11)3]xC7K8			61	46	1 (Sa)	1,6	0
Σ	38-60		1742	1556	81 (Sa) 229 (29K)	6,3	11 (Sa) 47 (7K)

3.3.4.12 Vorläufige Zusammenfassung und Vergleich der verschiedenen Generationen innerhalb der *D. erucoides*-Kreuzungsgruppe

In der Tabelle 3.18 sind die Resistenzausprägung, die Kreuzungs- und Selbstungseffizienzen (jeweils durchschnittliche und maximale) sowie die maximalen Samenansätze und Keimungsraten bis zur Erstellung der BC₃-, BC₂S₁-, BC₁S₂- und BC₁S₁xC-Generationen vergleichend dargestellt. ‚Maximal‘ bezieht sich hierbei stets auf Einzelpflanzen der jeweiligen Generation. Alle Werte beziehen sich auf Daten aus *embryo rescue*-Versuchen. Der Samenansatz war jedoch in der Regel bei freier Abblüte zwei- bis dreimal höher.

Tab. 3.18: Übersicht über die verschiedenen Generationen der *D. erucoides*-Kreuzungsgruppe (max. = maximal erreichter Wert, bezogen auf eine Einzelpflanze der jeweiligen Generation). Alle Angaben beziehen sich auf mittels *embryo rescue* erstellte Nachkommenschaften. Verschiedene resistente Pflanzen, die aus demselben Kallus generiert wurden, zählen als ein Genotyp. Die Klasse S-R stellt keine genetische Klasse dar, sondern basiert auf der Beobachtung schwacher Krankheitssymptome bei einigen Pflanzen. KE und SE beziehen sich jeweils auf die Genotypen zur Erstellung der genannten Generation.

	Generation								
	F ₁	F ₂	BC ₁	BC ₁ S ₁	BC ₂	BC ₂ S ₁	BC ₁ S ₂	BC ₁ S ₁ xC	BC ₃
Resistenz- ausprägung [%]	100 R	100 R (1 Pflanze)	49 S 21 S-R 30 R	71 S 8 S-R 21 R	75 S 17 S-R 8 R	86 S 5 S-R 18 R	24 S 1 S-R 11 R	81 S 7 S-R 16 R	341 S 37 S-R 28 R
Kreuzungs- effizienz gesamt [%]	26		5,9		22,5			18,3	34
Kreuzungs- effizienz max. [%]			40		69,8			53	106
SA _[Kreuzung] max. [Samen/Knospe]			1,2		2,3			3,4	2,5
Selbstungs- effizienz gesamt [%]				13,8		6,3	5,2		
Selbstungs- effizienz max. [%]				38,6		109,5	22		
SA _[Selbstung] max. [Samen/Schote]				2		3,1	4		
Keimungsrate gesamt [%]	26		28	13	28	7	5	20	30
Keimungsrate max. [%]			100	19	43	35	10	30	44

3.3.4.13 Aufspaltung der Resistenz in den zuletzt erstellten Generationen

In Tabelle 3.19 sind die Verhältnisse von resistenten zu anfälligen Pflanzen in den vier zuletzt erstellten Generationen dargestellt. Die stark von den klassischen Spaltungsverhältnissen monogen-dominanter Erbgänge nach Rückkreuzung bzw. Selbstung abweichenden Zahlen zeigen, dass auch bei der Erstellung dieser späteren Generationen noch erhebliche Meiose-Unregelmäßigkeiten auftraten.

Tab. 3.19: Aufspaltung resistenter und anfälliger Genotypen der zuletzt erstellten Generationen aus der Kreuzung *B. napus* x *D. erucoides* (Sa: aus jeweils einem Samen entstandener Genotyp, nK: Sprossregenerate aus n verschiedenen Kallussen).

Generation	Anzahl resistenter Genotypen (R)	Anzahl anfälliger Genotypen (S)	Aufspaltung (R:S)
BC₁S₂	4 (Sa) 34 (7K)	15 (Sa) 53 (10K)	~ 1:2
BC₂S₁	11 (Sa) 47 (7K)	69 (Sa) 182 (22K)	~ 1:5
BC₁S₁xC	8 (Sa) 33 (8K)	61 (Sa) 148 (27K)	~ 1:6
BC₃	22 (Sa) 20 (6K)	296 (Sa) 445 (84K)	~ 1:14

3.3.4.14 Charakterisierung der resistenten Genotypen aus den zuletzt erstellten Generationen (BC₃, BC₂S₁, BC₁S₂ und BC₁S₁xC)

Morphologie und Fertilität

Die Genotypen der zuletzt erstellten Generationen (BC₃, BC₂S₁, BC₁S₂ und BC₁S₁xC) wurden hinsichtlich ihrer Morphologie und Fertilität untersucht. Die resistenten Genotypen (45 aus jeweils einem Samen und 134 Regenerate aus insgesamt 28 Kallussen) zeichneten sich durch hellgelbe, intermediäre Blütenfarbe aus, ca. 80 % der Nachkommen zeigten einen rapsähnlichen Habitus. Einige Nachkommen fielen durch aberrante Phänotypen auf, insbesondere durch Verzweigung, unregelmäßigen Wuchs, Verdickung der Blätter, deformierte Griffel und Entwicklungsstörungen im Bereich der Blüten [Auswachsen zusätzlicher Blütenstände aus Schoten (Abb. 3.31), Degeneration oder vollständiges Ausbleiben der Blüte].

Zur Bestimmung der Fertilität der resistenten Pflanzen (bezogen auf den Samenansatz nach Knospenbestäubung sowie die Keimungsrate der gewonnenen Samen) wurden an jedem Genotyp mindestens vier Blütenstände mittels Knospenbestäubung geselbstet. Der Samenansatz war in diesen Generationen insgesamt schlecht: Innerhalb der 179 resistenten Nachkommen wurde bei 93 Genotypen kein Samenansatz beobachtet (Selbstinkompatibilität, im Folgenden SI). 40 Nachkommen zeigten mit maximal sieben

Samen pro behandeltem Blütenstand (bestehend aus ca. zehn Schoten) schwache Fertilität [(Selbstkompatibilität), im Folgenden (SK)]. Bei drei Pflanzen wurden mehr als sieben Samen/Blütenstand gezählt (Selbstkompatibilität, SK): Der BC₁S₁xC-Genotyp [(CxDe9)xC1b][S]7xC11 hatte im Schnitt sechs und die BC₂S₁-Genotypen [(CxDe10)xC3gxC5][S]4b und [(CxDe10)xC3gxC5][S]11 drei Samen pro Schote (d. h. ca. 60 respektive 30 Samen/Fruchtstand). Die Keimungsrate lag jeweils bei ungefähr 30 %. Im Vergleich dazu weist die Referenzsorte *B. napus* cv. ‚Ceres‘ ca. 30 Samen/Schote mit einer Keimungsrate von 99 % auf.



Abb. 3.31: Häufig beobachtete Entwicklungsstörung im Bereich der Blüten: Nach dem Blühen wächst die Narbe zu einem neuen Blütenstand aus, es kommt in der Regel zu keinem Samenansatz.

Chromosomenzahl und Genomzusammensetzung

Einige resistente Genotypen aus den vier zuletzt erstellten Generationen wurden mittels klassischer Chromosomenzahlanalysen an Wurzelspitzen bzw. mittels genomischer *in situ*-Hybridisierung untersucht. Die Chromosomenzahlen lagen bei $2n = 40-61$, wobei auch in diesen Generationen einige Genotypen $2n = \text{ca. } 45$ aufwiesen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.32 und 3.33 zusammengefasst.

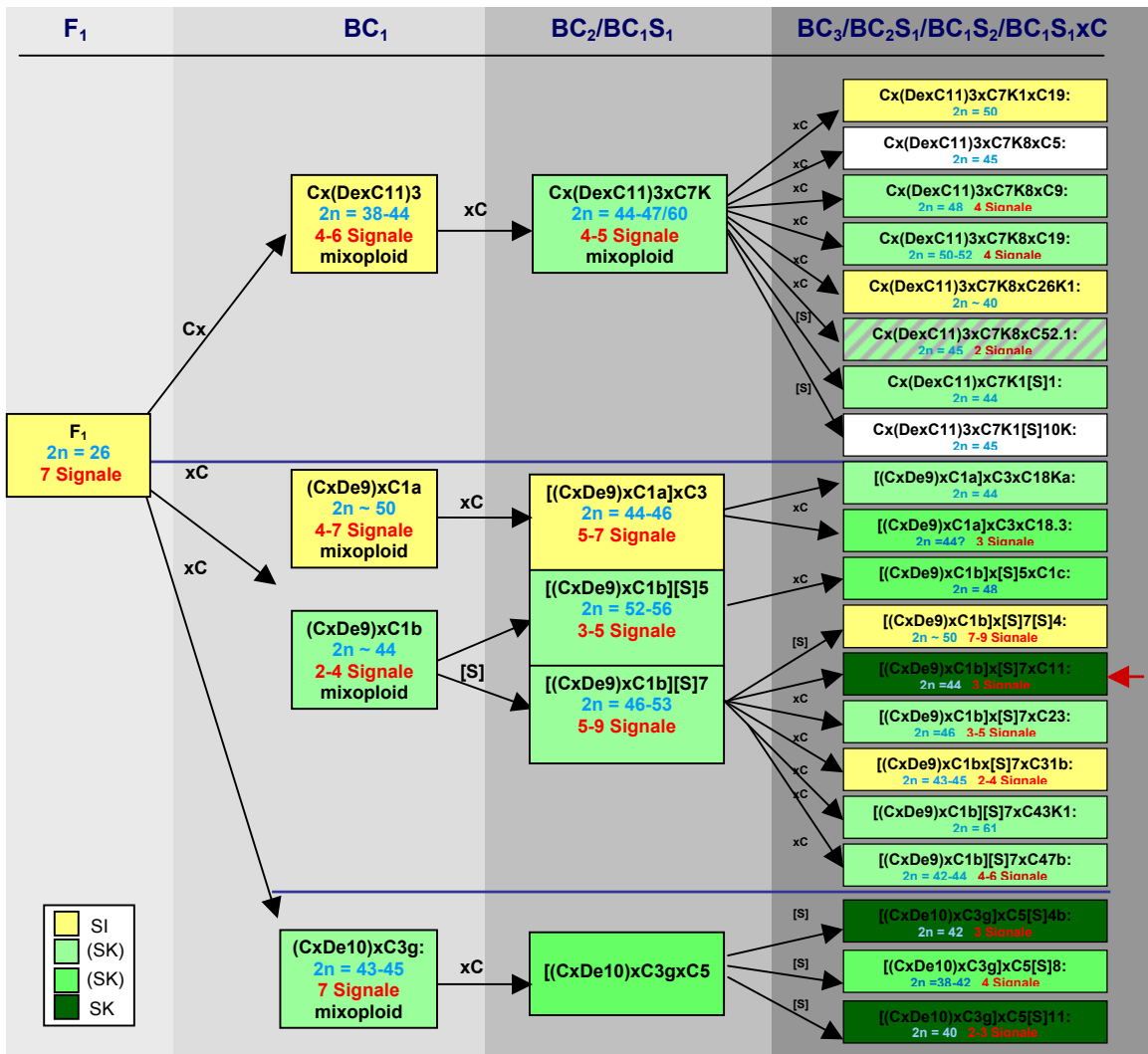


Abb. 3.32: Entwicklung der Chromosomenzahlen in ausgewählten resistenten Nachkommen aus der *D. erucoides*-Kreuzungsgruppe. Die Fertilität ist in Farbe dargestellt: je dunkler das grün, desto fertiler zeigte sich der Genotyp. Der Nachkomme mit der besten Fertilität ist zusätzlich durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der gestreift unterlegte Genotyp war *Alternaria*-anfällig, bei weiß unterlegten Genotypen wurde die Fertilität nicht bestimmt (Signale = Donorchromatin, das als rot gefärbtes FITC-Signal sichtbar gemacht wurde).

Die Pflanze mit dem besten Samenansatz nach Selbstung – Genotyp [(CxDe9)xC1b][S]7xC11, 2n = 44 – zeichnete sich durch die Präsenz dreier Chromosomen der Donorart aus, von denen es sich bei einem möglicherweise um ein rekombinantes Chromosom handelte (in Abb. 3.33a+b durch Pfeile gekennzeichnet). Alternativ wäre auch ein akrozentrisches Chromosom denkbar.

Die GISH-Analysen zeigen, dass auch bei der Erstellung dieser späteren Generationen noch Gameten mit variablen Chromosomensätzen an der Zygotenbildung beteiligt waren. Die Anzahl der Chromosomen korrelierte nicht mit dem Grad der Fertilität eines Genotypen (Abb. 3.32).

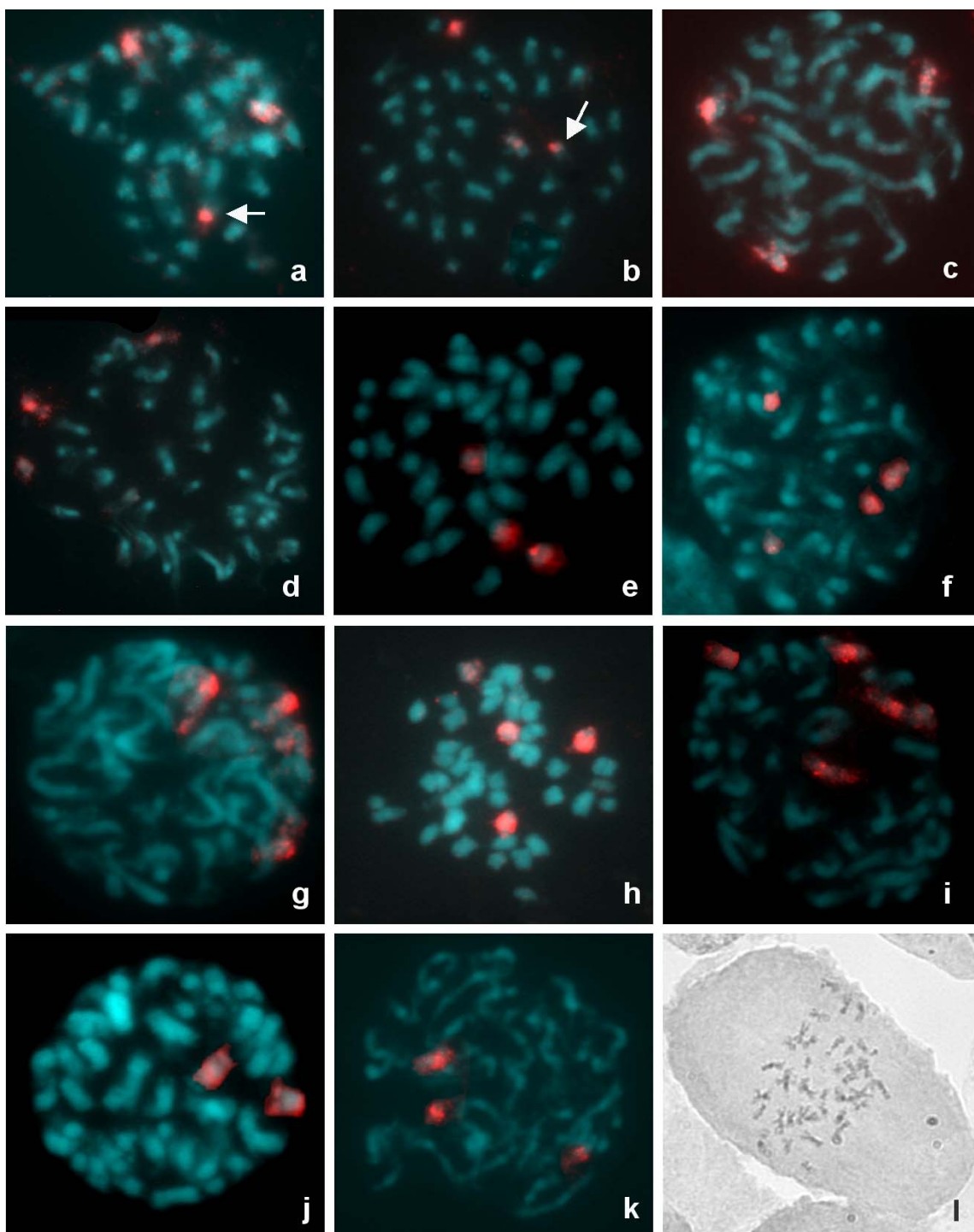


Abb. 3.33: Chromosomenzahlen und Genomzusammensetzungen ausgewählter resistenter (außer j = anfällig) Genotypen der zuletzt erstellten Generationen: a-d: [(CxDe9)xC1b] [S] 7xC11, 2n = 44, drei GISH-Signale; e: [(CxDe9)xC1b] [S] 7xC23, 2n = 42, drei GISH-Signale; f+g: [(CxDe9)xC1b] [S] 7xC47b, 2n = 42, vier GISH-Signale; h: {[Cx(Dex11)3]xC7K8}xC9, 2n = 44, vier GISH-Signale; i: {[Cx(Dex11)3]xC7K8}xC19, 2n = 50, fünf GISH-Signale; j: {[Cx(Dex11)3]xC7K8}xC52.1, anfälliger Genotyp mit 2n = 45 und zwei GISH-Signalen; k: {[CxDe10]xC4g]xC5 [S] 11, 2n = 43, drei GISH-Signale; l: {[CxDe9]xC1a}xC3}xC18Ka, klassisches Chromosomenpräparat, 2n = 44.

Die aus den Knospenbestäubungen der fertileren Genotypen hervorgegangenen Samen wurden ausgelegt und die daraus resultierenden Pflanzen auf Resistenz getestet: Von insgesamt 73 untersuchten Nachkommen (davon 48 aus der Selbstung [(CxDe9)xC1b][S]7xC11[S]) zeigten sieben eine schwach ausgeprägte Resistenz, von denen ein Genotyp einen rapsähnlichen Habitus aufwies.

3.4 Vergleich der Resistenzausprägungen bei den Nachkommen der verschiedenen Kreuzungsgruppen

In der Tabelle 3.20 ist die Stärke der Resistenzausprägung in den verschiedenen Kreuzungsgruppen vergleichend dargestellt. Die BC₁S₂⁻, BC₁S₁x⁻C⁻, BC₂S₁⁻ und BC₃- Generationen der *D. eruroides*-Gruppe sind in der Tabelle nicht aufgeführt, der Läsionsdurchmesser der jeweils besten Genotypen lag in diesen Generationen ebenfalls bei 0 % der Läsionsgröße von *B. napus* cv. ‚Ceres‘.

Eine Liste der BC₁S₂⁻, BC₁S₁x⁻C⁻, BC₂S₁⁻ und BC₃-Nachkommen mit Angaben zur Resistenzausprägung, zum Habitus, zu Chromosomenzahlen und zur Fertilität befindet sich im Anhang (Tab. A1).

Tab. 3.20: Läsionsdurchmesser der verschiedenen Resistenzdonoren und deren Kreuzungsnachkommen (LD: Läsionsdurchmesser in Prozent des durchschnittlichen Läsionsdurchmessers von *B. napus* cv. ‚Ceres‘).

<i>B. napus</i> (+)/x	LD ¹ des Resistenz- donors	LD ² des besten Genotyps in der Generation				
		F ₁	F ₂	BC ₁	BC ₁ S ₁	BC ₂
<i>S. alba</i>	40,1	37,5	13,3	32,4	51,7	56,6
<i>B. elongata</i>	43,2		-	19,7	-	32,9
<i>D. tenuifolia</i>	46,0	9,7	11,4		-	-
<i>D. eruroides</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

¹Die Läsionsdurchmesser sind Mittelwerte aus 36 Läsionen

²Die Läsionsdurchmesser sind Mittelwerte aus 18-27 Läsionen

3.5 SSR-Markeranalysen

3.5.1 Screening nach Resistenz-gekoppelten SSR-Markern anhand von BC₂- und BC₁S₁-Genotypen

Mit dem Ziel, eine markergestützte Selektion resistenter Genotypen in zukünftigen Rückkreuzungs- bzw. Selbstungsnachkommen zu etablieren, wurden von 196 C-Genom-spezifischen Raps-Mikrosatelliten-Markern aus privatwirtschaftlichem Besitz solche identifiziert, die mit der Ausprägung der Resistenz korrelieren [Dr. J. Schondelmaier, Saaten-Union Resistenzlabor GmbH, Leopoldshöhe, Deutschland; das Projekt wurde freundlicherweise von der Norddeutschen Pflanzenzucht, Hohenlieth (NPZ) finanziert]. Hierfür wurde zunächst die DNA von jeweils 16 anfälligen und 14 resistenten BC₂- bzw. BC₁S₁-Genotypen zusammengefasst (*bulked segregant analysis*, eine Liste der hierfür verwendeten Genotypen befindet sich in Tabelle A3 im Anhang) und 16 polymorphe (d. h. Unterschiede innerhalb der DNA-Pools anzeigende) Marker anschließend auf Einzelpflanzenebene überprüft. Bezogen auf die 16 anfälligen und 14 resistenten BC₂- bzw. BC₁S₁-Einzelpflanzen sowie auf die resistenten und anfälligen Eltern wurden acht putativ Resistenz-gekoppelte Marker identifiziert und der resistenzvermittelnde Abschnitt auf Chromosom N19 von *B. napus* (vermutlich zentral auf dem unteren Chromosomenarm, bezogen auf die Rapskarte) bzw. auf einem chromosomalen Abschnitt der Donorart mit Homologien zu Chromosom N19 lokalisiert. Die Marker zeichnen sich durch kodominante Vererbung aus und zeigten jeweils eine *D. erucooides*-spezifische, Resistenz-gekoppelte Bande (im Folgenden R-Bande genannt) und eine *B. napus*-spezifische Bande (im Folgenden S-Bande genannt). Alle resistenten Genotypen zeigten das heterozygote Bandenmuster (R-Bande und S-Bande). Drei der anfällig bonitierten Genotypen wiesen jedoch auch dieses Bandenmuster auf. Die Diskrepanz zwischen der Resistenzbonitur und den Markeranalysen (im Folgenden als Rekombination bezeichnet) bei anfällig bonitierten Pflanzen kann entweder durch den - noch zu großen - Abstand zwischen dem Resistenzgen und dem Marker (verbunden mit Rekombinationsereignissen zwischen dem resistenzvermittelnden DNA-Abschnitt aus *D. erucooides* und dem Rapsgenom) oder durch physiologische Effekte bzw. *gene silencing* erklärt werden. Der Resistenz-gekoppelte SSR-Marker HMR 997 erwies sich als gut geeignet zur Bandenauftrennung in hochprozentigen Agarose-Gelen (der Größenunterschied zwischen der R- und der S-Bande liegt hier bei ca. 8 bp) und wurde freundlicherweise von Dr. J. Schondelmaier für Analysen an den nächsten Generationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.5.2 Überprüfung des SSR-Markers HMR 997 an ausgewählten BC₃-, BC₂S₁-, BC₁S₂- und BC₁S₁xC-Genotypen

Anhand von spaltenden Rückkreuzungs- und Selbstungsnachkommenschaften von einem resistenten BC₁S₁- und zwei resistenten BC₂-Genotypen wurde die Eignung des Resistenz-Markers HMR 997 an insgesamt 81 Nachkommen überprüft. Einige Genotypen stellten verschiedene Regenerate von Kallussen dar (in den Tabellen 3.21 und 3.22 durch graue Schriftfarbe gekennzeichnet). Die untersuchten unterschiedlichen Regenerate eines Kallusses verhielten sich sowohl in der Resistenzbonitur als auch in den Markeranalysen einheitlich und wurden bei der Berechnung der Rekombinationsrate jeweils als nur ein Genotyp gewertet.

Die für die Markeranalysen ausgewählten Nachkommen sowie die PCR-Ergebnisse sind in den Tabellen 3.21 und 3.22 sowie exemplarisch in der Abbildung 3.34 dargestellt.

Tab. 3.21: Vergleich der Ergebnisse aus Resistenztests und Markeranalysen (SSR-Marker) an Rückkreuzungs- (BC₁S₁xC) und Selbstungsnachkommen (BC₁S₂) einer resistenten BC₁S₁-Pflanze (grau unterlegt) aus der Kreuzung *D. erucoides* x *B. napus*: rr = zeigt homozygotes, „anfälliges“ Bandenmuster, Rr = heterozygot in Bezug auf den SSR-Marker. Genotypen, bei denen die Ergebnisse aus Resistenztest und Markeranalyse nicht korrelieren, sind rot bzw. orange unterlegt.

Resistenzbonitur	Genotyp	SSR-Marker	
R	BC ₁ S ₁ [(CxDe9)xC1b] [S] 7	Rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC11	Rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC15	Rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC23	rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC30K1	Rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC31b	Rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC36K4	rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC43K1	Rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC45K3	Rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC47b	rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC54K1	Rr	
	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC66	rr	
	BC ₁ S ₂ [(CxDe9)xC1b] [S] 7][S] 4	Rr	
	BC ₁ S ₂ [(CxDe9)xC1b] [S] 7][S] 12	Rr	
	BC ₁ S ₂ [(CxDe9)xC1b] [S] 7][S] 14K1	Rr	
	BC ₁ S ₂ [(CxDe9)xC1b] [S] 7][S] 14K2	Rr	
	BC ₁ S ₂ [(CxDe9)xC1b] [S] 7][S] 14K9	Rr	
	BC ₁ S ₂ [(CxDe9)xC1b] [S] 7][S] 14K11	Rr	
	S	BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC28K1	rr
		BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC37K2.1	rr
BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC57K9		Rr	
BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC33b		rr	
BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC64K1		rr	
BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC78		rr	
BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC69		rr	
BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC79K		Rr	
BC ₁ S ₁ xC [(CxDe9)xC1b] [S] 7)xC80.2		rr	
BC ₁ S ₂ [(CxDe9)xC1b] [S] 7][S] 10K3		Rr	
BC ₁ S ₂ [(CxDe9)xC1b] [S] 7][S] 16		Rr	

Tab. 3.22: Vergleich der Ergebnisse der Resistenzbonitur und der Markeranalysen an Rückkreuzungs- (BC₃) und Selbstungsnachkommen (BC₂S₁) zweier resistenter BC₂-Pflanzen (jeweils grau unterlegt) aus der Kreuzung *D. erucoides* x *B. napus*: rr = zeigt homozygotes „anfälliges“ Bandenmuster, Rr = heterozygot in Bezug auf den SSR-Marker. Genotypen, bei denen die Ergebnisse aus Resistenztest und Markeranalyse nicht korrelierten, sind rot unterlegt.

Resistenzbonitur	Genotyp	SSR-Marker
R	BC₂ [Cx(DexC11)3]xC7K1*	Rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 15	Rr
	BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 1	Rr
	BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 3K1	Rr
	BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 4K3	Rr
	BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 7K10	Rr
	BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 14	Rr
	BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 15	Rr
	BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 17	Rr
	BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 10K16.1	Rr
	S	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 4
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 6		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 8		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 11		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 12b		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 13		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 24K1		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 24K2		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 25.7		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 25.11		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 27		rr
BC₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 28		Rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 31		rr
BC₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 36		Rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 37		rr
BC₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 40		Rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 41.3		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 42.1		rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}xC 44		rr
BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 5K1.5		rr
BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 12K1		rr
BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 25	rr	
BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 27K3.3	rr	
BC ₂ S ₁ {[Cx(DexC11)3]xC7K1}[S] 27K4	rr	
R	BC₂ [Cx(DexC11)3]xC7K8*	Rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC5	Rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC9	Rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC19	Rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC26K2	Rr
	BC₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC46	rr
S	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC1	rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC10b	rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC12K2	rr
	BC₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC18	Rr
	BC₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC26K7	Rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC27K5a	rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC29	rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC40	rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC50.1	rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC52.1	rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC54.1	rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC55K	rr
	BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC55K3	rr
	BC₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC65	Rr
BC ₃ {[Cx(DexC11)3]xC7K8}xC71K4	rr	

* Die BC₂-Genotypen [Cx(DexC11)3]xC7K1 und [Cx(DexC11)3]xC7K8 wurden aus demselben Kallus regeneriert.

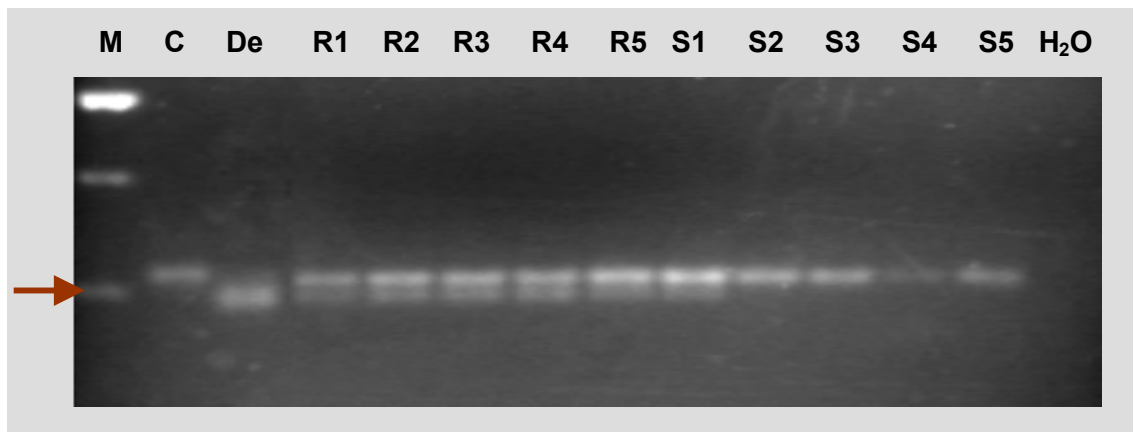


Abb. 3.34: Gelelektrophoretisch (in 3%igem Agarosegel) aufgetrennte PCR-Produkte mit dem Primerpaar HMR 997 (M = Marker 100 bp+, C = *B. napus* cv. ‚Ceres‘, De = *Diplotaxis erucoides*, R = resistent bonitierter Genotyp, S = anfällig bonitierter Genotyp). Der Pfeil markiert die Laufhöhe der Resistenz-gekoppelten Bande. Der anfällig bonitierte Genotyp S1 zeigt die Resistenz-gekoppelte Bande.

In den untersuchten Nachkommenschaften traten sowohl resistent bonitierte Pflanzen auf, die nicht die Resistenz-gekoppelte Bande zeigten, als auch anfällig bonitierte Pflanzen, die die Resistenz-gekoppelte Bande zeigten (insgesamt 15 Rekombinanten, Tab. 3.21 und 3.22, Abb. 3.34). Dies macht deutlich, dass Rekombinationsereignisse zwischen dem Rapsgenom und dem der Donorart grundsätzlich möglich sind. Die „Rekombinationsrate“ zwischen dem verwendeten Marker und Resistenzbonitur lag bei den untersuchten Nachkommen im Schnitt bei ca. 20 %.

Die Markeranalysen zeigten außerdem, dass unter den getesteten Pflanzen bis zu diesem Stadium des Kreuzungsprogramms noch keine für den Resistenzlocus homozygoten Selbstungsnachkommen auftraten.

Anhand von insgesamt 63 in Bezug auf die Resistenz spaltenden Einzelpflanzen (30 BC₁S₁- und BC₂-Pflanzen sowie 34 BC₃-, BC₁S₁xC-, BC₂S₁-, und BC₁S₂-Pflanzen, vgl. Tab. A1-A3 im Anhang) wurden im Anschluss sieben weitere in der Saaten-Union Resistenzlabor GmbH. evaluierte, Chromosom N19-spezifische Resistenz-Marker auf den jeweiligen Grad der Kopplung getestet (Dr. J. Schondelmaier). Die Marker HMR 878, HMR 880, HMR 744 und HMR 1003 zeigten die wenigsten Rekombinationen (13 %). Unter den untersuchten Nachkommen konnten Genotypen identifiziert werden, die wahrscheinlich kleine resistenzvermittelnde, fest in das Rapsgenom integrierte DNA-Abschnitte aus der Donorart tragen. Indizien hierfür waren zwei Einzelpflanzen, die ein kleineres *Diplotaxis*-DNA-Fragment auf dem Rapschromosom N19 zeigten als die anderen. Es handelte sich hierbei um die BC₁S₁xC-Genotypen $\{(C_xDe9)xC1b\}[S7]xC36K4$ und $\{(C_xDe9)xC1b\}[S7]xC47b$ (in Tab. 3.21 und 3.22 orange unterlegt). Beide (resistenten) Genotypen zeigten das anfällige Bandenmuster beim Marker HMR 997. Bei den näher am Resistenzlocus

liegenden Markern HMR 1002, HMR 878, HMR 880, HMR 744 und HMR 1003 wurde hingegen das heterozygote Bandenmuster beobachtet. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei dem BC₁S₁-Genotypen [(CxDe9)xC1b][S]7 beobachtet. Letzterer diente zur Erstellung der beiden oben genannten Nachkommen. Das integrierte DNA-Stück war bei dem BC₁S₁-Genotypen jedoch noch größer als bei den rückgekreuzten BC₁S₁xC-Genotypen. Eine detaillierte Tabelle über die Ergebnisse aller getesteter Marker befindet sich im Anhang (Tab. A2).