

Aus dem Institut für Biologie
- Angewandte Genetik -
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Introgression von
Resistenzen gegen die Wurzelhals- und Stengelfäule
[*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not.]
aus verwandten Arten in den Raps (*Brassica napus* L.)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hendrik Winter
aus Berlin

Berlin, 2003

1. Gutachterin: Prof. Dr. Maria Dolores Sacristán
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Schuster

Tag der Disputation: 20. Januar 2004

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Thema	Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Rapszüchtung gestern und heute - von den Anfängen über „Lembkes Winterraps“ zum 21. Jahrhundert.....	1
1.2	Die Wurzelhals- und Stengelfäule (<i>Leptosphaeria maculans</i>), die wichtigste Krankheit des Rapses	8
1.3	Interspezifische Hybridisierungen, Resistenzquellen und Resistenzgene in der Tribus <i>Brassicaceae</i> (Familie <i>Brassicaceae</i>).....	13
1.4	Resistenzmechanismen bei Pflanze-Pathogen-Interaktionen	17
1.5	Anwendungen molekular-cytogenetischer Methoden bei Pflanzen	18
1.6	Zielsetzung der Arbeit	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Untersuchungsmaterial	21
2.1.1	Pflanzenmaterial	21
2.1.1.1	Allgemeines	21
2.1.1.2	<i>Brassica napus</i> - <i>Coincya monensis</i> -Linien	22
2.1.1.3	<i>Brassica napus</i> - <i>Sinapis arvensis</i> -Linien	24
2.1.1.4	<i>Brassica napus</i> - <i>Brassica juncea</i> -Linien.....	24
2.1.2	Pilzpathogene.....	28
2.2	Methoden	28
2.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	28
2.2.1.1	Pflanzenanzucht aus Saatgut	28
2.2.1.2	Pflanzliche <i>in vitro</i> -Kultur (<i>in ovulo</i> -Embryokultur)	29
2.2.1.3	Kultur der Pilzpathogene und Gewinnung von Inokulum.....	30
2.2.2	Kreuzungen, Rückkreuzungen und Selbstungen	31
2.2.3	Resistenztests.....	31
2.2.3.1	Kotyledonentest und Einordnung der Isolate in Pathogenitätsgruppen	31
2.2.3.2	Adulttests	33
2.2.3.2.1	Test mit Doppelinokulation	34
2.2.3.2.2	Adulttest an kotyledoneninokulierten Pflanzen.....	35
2.2.3.2.3	Stengelbasistest.....	35
2.2.3.2.4	Feldversuche	35
2.2.3.3	Resistenzgenetik und statistische Auswertungen	37
2.2.4	Klassische Cytologie und molekular-cytogenetische Untersuchungen.....	37
2.2.4.1	Klassische Mitose-Untersuchungen	37

2.2.4.2	Klassische Meiose-Untersuchungen.....	38
2.2.4.3	Genomische <i>in situ</i> -Hybridisierung (GISH).....	39
2.2.4.4	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	44
2.2.5	Analyse mittels molekularer Marker - <i>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</i>	45
2.2.5.1	Isolierung von DNA	45
2.2.5.1.1	CTAB-Methode (Maxipräparation).....	45
2.2.5.1.2	EDWARDS-Methode (Minipräparation).....	46
2.2.5.2	<i>Bulk segregant analysis</i>	47
2.2.5.3	RAPD-PCR.....	47
2.2.5.4	Gelelektrophorese	49
2.2.6	Sonstiges	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Resistenztests unter kontrollierten Bedingungen sowie cytologische und PCR-Untersuchungen.....	50
3.1.1	Pathogenitätsgruppenanalyse der Isolate W4 und M1 von <i>L. maculans</i>	50
3.1.2	<i>Brassica napus-Coincya monensis</i> -Linien	50
3.1.2.1	Charakterisierung aneuploider BC ₂ -, BC ₃ - und BC ₂ S ₁ *-Genotypen sowie daraus abgeleiteter früher Selbstungsnachkommenschaften	50
3.1.2.2	Selbstungen putativ rekombinanter Rückkreuzungsnachkommen (2n=38) zur Analyse der Genetik der Adultresistenz (BC ₂ S ₃ *-BC ₂ S ₅ *)......	55
3.1.2.3	Suche nach RAPD-Markern mittels <i>bulk segregant analysis</i>	61
3.1.2.4	Kreuzungsexperimente mit <i>C. monensis</i> -Genotypen - Beiträge zum Studium der Genetik der Kotyledonenresistenz.....	62
3.1.2.5	Zusammenfassende Bemerkungen zur Cytologie	64
3.1.3	<i>Brassica napus-Sinapis arvensis</i> -Linien	67
3.1.3.1	Charakterisierung von BC ₃ -, BC ₃ S ₁ -, BC ₄ - und BC ₄ S ₁ -Generationen - Identifikation monosomer Additionschromosomen von <i>S. arvensis</i> im Zusammenhang mit dem Resistenzverhalten	67
3.1.3.2	Erstellung weiterer Selbstungsnachkommenschaften zur Erzeugung von Pflanzen mit Raps-Karyotyp	71
3.1.3.3	PCR-Analysen	78
3.1.3.4	Temperaturabhängigkeit der Kotyledonenresistenz	79
3.1.3.5	Zusammenfassende Bemerkungen zur Cytologie	80
3.1.4	<i>Brassica napus-Brassica juncea</i> -Linien.....	82
3.1.4.1	Untersuchungen an dihaploiden Sublinien und Auswahl geeigneter Kreuzungspartner zur Analyse der Genetik der Adultresistenz	82
3.1.4.2	Charakterisierung von Nachkommen (F ₁ , F ₂ und BC ₁) aus Kreuzungen resistenter und anfälliger dihaploider Pflanzen	85

3.1.4.3	Genetik der Adultresistenz gegenüber dem Isolat W4	89
3.1.4.4	Hypothese über den Einfluß eines epistatischen Gens in der Interaktion der <i>B. napus</i> - <i>B. juncea</i> -Linien mit dem Isolat M1	90
3.1.4.5	Kreuzungsexperiment zur Verifizierung der Epistasie-Hypothese	92
3.1.4.6	Zusätzliche Bemerkungen	96
3.1.5	Untersuchungen weiterer Kontrollgenotypen.....	97
3.2	Feldversuche	99
3.3	Schlußbemerkungen zu den Resistenztests	103
4	DISKUSSION	108
4.1	Resistenztests, Rückkreuzungsprogramme und Resistenzgenetik	108
4.1.1	Allgemeines	108
4.1.1.1	Test mit Doppelinokulation als Methode der Wahl.....	108
4.1.1.2	Feldversuche	111
4.1.1.3	Pathogenitätsgruppenanalyse	113
4.1.1.4	Bedeutung von Selbstungen in Rückkreuzungsprogrammen.....	114
4.1.2	<i>Brassica napus</i> - <i>Coincya monensis</i> -Linien	115
4.1.3	<i>Brassica napus</i> - <i>Sinapis arvensis</i> -Linien	118
4.1.4	<i>Brassica napus</i> - <i>Brassica juncea</i> -Linien.....	122
4.2	Klassische und molekulare Cytologie	125
4.3	RAPD-PCR und <i>bulk segregant analysis</i>	130
4.4	Gentechnik und Raps unter besonderer Berücksichtigung des Risikos der Hybridisierung mit Wildcruciferen	133
4.5	Fazit, kommerzielle Verwertbarkeit und Ausblick.....	137
5	ZUSAMMENFASSUNG	139
6	ABSTRACT	141
7	LITERATURVERZEICHNIS	143

TABELLENANHANG (ausgewählte Resistenztests)

I	Test mit Doppelinokulation („GISH-Start-Versuch“, Isolat W4, ab 11/1998)
II	Test mit Doppelinokulation („GV VIII“, Isolate W4 und M1, ab 10/2001)
III	Feldversuch 2000/2001 (Isolat W4, ab 08/2000)

WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

Abkürzungen

-...	bezeichnet die Gesamtheit der Pflanzen einer Selbstungsnachkommenschaft (z. B. BC ₃ S ₁ 13.6-... = Selbstungsnachkommenschaft der BC ₃ -Pflanze 13.6)
0-Raps	erucasäurefreier Raps
00-Raps	erucasäurefreier und glucosinolatärmer Raps
I	tiefgestellte römische Zahl bezeichnet Univalente in der Meiose
IV-IX	tiefgestellte römische Zahlen: Versuchsbezeichnung, siehe GV
α	Irrtumswahrscheinlichkeit, Signifikanzschwelle
A	<i>adult plant</i> (engl.) = Adult- (in Zusammensetzungen)
AA	<i>Brassica-A-Genom</i>
AAFC	<i>Agriculture and Agri-Food Canada</i> (hier: Saskatoon)
<i>A. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i> (lat.) = doppelt destilliertes Wasser
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> (lat.) = destilliertes Wasser
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> (engl.) = künstliches Bakterienchromosom
BB	<i>Brassica-B-Genom</i>
BC ₁	erste Rückkreuzungsgeneration, von <i>backcross</i> (engl.) = Rückkreuzung
BC _x	x-te Rückkreuzungsgeneration, von <i>backcross</i> (engl.) = Rückkreuzung
BMELF	ehemaliges Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
bp	<i>base pairs</i> (engl.) = Basenpaare
BRC	<i>Blackleg Resistance Consortium</i>
C	<i>cotyledon</i> (engl.) = Kotyledonen- (in Zusammensetzungen)
CC	<i>Brassica-C-Genom</i>
cf.	<i>confer</i> (lat.) = vergleiche
cM	centi-Morgan (1 cM = Rekombinationsfrequenz von 1 %)
cms	cytoplasmatische männliche Sterilität (auch: cytoplasmatisch-männliche Sterilität)
ComCom	<i>Coincya monensis-Genom</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid = Hexadecyltrimethylammoniumbromid
cv.	<i>cultivar</i> (lat.) = Sorte
Cy3	FluoroLink™Cy3-dUTP = Cy3-AP3-dUTP = 5-Aminopropargyl-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat gekoppelt an Cyanin-3-Fluoreszenzfarbstoff
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DH	dihaploid = doppelhaploid
Dig	Digoxigenin-11-dUTP
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (engl.) = Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dpi	<i>dies post inoculationem</i> (lat.)/ <i>days post inoculation</i> (engl.) = Tage nach Inokulation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EV	Epistasie-Versuch
F ₁	erste Filialgeneration
F ₂	zweite Filialgeneration
FAO	<i>Food and Agriculture Organisation</i> = Organisation für Ernährung und Landwirtschaft (Spezialorganisation der Vereinten Nationen)
FG	Freiheitsgrad
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GISH	Genomische <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH mit genomischer Gesamt-DNA als Sonde)
GV	Großversuch (Versuchsbezeichnung in römischen Zahlen angegeben; z. B. BC ₃ S ₁ 13.6-7 _{IX} = BC ₃ S ₁ -Pflanze 13.6-7 aus Großversuch IX)
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
HR	<i>hypersensitive reaction/hypersensitive response</i> (engl.) = hypersensitive Reaktion
HS-TE	<i>high salt TRIS EDTA buffer</i> (engl.) = TRIS-EDTA-Puffer mit hohem Salzgehalt

IAG	Institut für Biologie - Angewandte Genetik - (ehemals: Institut für Angewandte Genetik) der Freien Universität Berlin
INRA	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i> (in Frankreich, hier: Le Rheu)
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben
kb	<i>kilo base pairs</i> (engl.) = Kilobasenpaare
λ	Wellenlänge
λ -DNA	DNA des Bakteriophagen λ
M1	australisches Tox ⁺ -Isolat von <i>Leptosphaeria maculans</i>
Mb	<i>mega base pairs</i> (engl.) = Megabasenpaare
MgAc ₂	Magnesiumacetat
NAA	<i>α-naphthaleneacetic acid</i> (engl.) = α -Naphthalenessigsäure
n.b.	nicht bestimmt/bestimmbar
NPZ	Norddeutsche Pflanzenzucht, Hans Georg Lembke KG, Hohenlieth, Malchow/Poel
(Einheitserde) P	→ Pikieren
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (engl.) = Phosphatpuffer
PCK	<i>Phoma-Coincya</i> -Kreuzungsversuch
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (engl.) = Polymerase-Kettenreaktion
pers.	persönliche
PG	Pathogenitätsgruppe
R	<i>resistance, resistant</i> (engl.) = Resistenz, resistent (in Zusammensetzungen)
r _K	Anzahl regenerierter Pflanzen in Keimversuchen (Samen aus Abreife)
r _O	Anzahl regenerierter Pflanzen (aus <i>in ovulo</i> -Embryokultur)
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i> (engl.)
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> (engl.)
RKI	Robert-Koch-Institut
RME	Rapsmethylester („Biodiesel“)
RT	Raumtemperatur
S	<i>susceptibility, susceptible</i> (engl.) = Anfälligkeit, anfällig (in Zusammensetzungen)
S	Sedimentationskoeffizient in Svedberg-Einheit (→ 45S rDNA)
S ₁	erste Selbstungsgeneration
s _K	Anzahl Samen aus Abreife in Keimversuchen
s _O	Anzahl Samen bzw. Samenanlagen (in <i>in ovulo</i> -Embryokultur)
S _x	x-te Selbstungsgeneration
SAR	<i>systemic acquired resistance</i> (engl.) = systemisch erworbene Resistenz
SarSar	<i>Sinapis arvensis</i> -Genom
spp.	Plural von <i>species</i> (lat.) = Arten (einer Gattung)
SSC	<i>standard saline citrate buffer</i> (engl.) = Standard-Salz-Citrat-Puffer
ssp.	<i>subspecies</i> (lat.) = Unterart
s. str.	<i>sensu stricto</i> (lat.) = im engeren Sinne
(Einheitserde) T	→ Topfen
TE	TRIS-EDTA-Puffer
Tox ⁰	nicht-aggressive Isolate von <i>Leptosphaeria maculans</i> , nicht Sirodesmin-produzierend
Tox ⁺	aggressive Isolate von <i>Leptosphaeria maculans</i> , Sirodesmin-produzierend
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett (Strahlung)
var.	<i>varietas</i> (lat.) = Varietät
Vol.	Volumenäquivalent
VV	Vorversuch (Versuchsbezeichnung: römische Zahlen)
v/v	<i>volume per volume</i> (engl.) = Volumen pro Volumen
W4	deutsches Tox ⁺ -Isolat von <i>Leptosphaeria maculans</i>
w/v	<i>weight per volume</i> (engl.) = Masse pro Volumen
x g	mal Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
Zus.	Zusammensetzungen