

Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt

Verbesserung der Resistenz
von Winterraps (*Brassica napus* L.)
gegen *Verticillium longisporum*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften

– Dr. agr. –

am Fachbereich

Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Ing. agr. Wiebke Rygulla

geboren am 17. März 1979 in Landshut

Gießen, im Januar 2008

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzende:	Prof. Dr. K. Becker
1. Gutachter:	Prof. Dr. Dr. h.c. Friedt
2. Gutachter:	Prof. Dr. A. von Tiedemann
3. Gutachterin:	Prof. Dr. S. Schnell
Prüfer:	Prof. Dr. B. Honermeier
Prüfer:	Prof. Dr. M. Frisch

Tag der mündlichen Prüfung: 17. September 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anbaubedeutung von Raps	1
1.2	<i>Verticillium longisporum</i> an Raps	3
1.3	Bedeutung von Krankheitsresistenzen in der Rapszüchtung und Pyramidisierung von Resistenzgenen	6
1.4	Einsatz molekularer Marker in der Pflanzenzüchtung	7
1.5	Entstehung und Verwandtschaft der <i>Brassica</i> -Arten	9
1.6	Erweiterung der genetischen Diversität und Einsatz von Resynthesen in der Rapszüchtung	10
1.7	Genetische Kartierung von <i>quantitative trait loci</i> (QTL)	15
2	Zielsetzung.....	17
3	Publikationen.....	18
3.1	Broadening the genetic basis of <i>Verticillium longisporum</i> resistance in <i>Brassica napus</i> by interspecific hybridization	18
3.2	Combination of resistance to <i>Verticillium longisporum</i> from zero erucic acid <i>Brassica oleracea</i> and oilseed <i>Brassica rapa</i> genotypes in resynthesized rapeseed (<i>Brassica napus</i>) lines	25
3.3	Identification of quantitative trait loci for resistance against <i>Verticillium</i> <i>longisporum</i> in oilseed rape (<i>Brassica napus</i>)	33
4	Diskussion.....	41

4.1	Erweiterung der genetischen Diversität von <i>Brassica napus</i> und deren Nutzung in der Resistenzzüchtung	41
4.2	Identifikation neuer Resistenzressourcen in den Ausgangsarten von Raps, <i>B. rapa</i> und <i>B. oleracea</i>	42
4.3	Einlagerung von Resistenzen gegen <i>V. longisporum</i> in den <i>Brassica napus</i> -Genpool mittels Resynthese	43
4.4	Kombination von Resistenz- und Qualitätseigenschaften in resynthetisierten Rapslinien	45
4.5	Lokalisierung von Resistenz-QTL in Resyntheseraps-Nachkommen	45
5	Zusammenfassung	48
6	Summary	50
7	Literaturverzeichnis	52
8	Abkürzungsverzeichnis	59

1 Einleitung

1.1 Anbaubedeutung von Raps

Weltweit ist Raps (*Brassica napus* L.) eine der bedeutendsten Ölpflanzen. Die globale Ölsaatenproduktion wird für 2007 mit 406,6 Mio. t beziffert; dabei belegt Rapssaat mit 11,5% der Gesamtproduktion hinter der Sojabohne (58%) den zweiten Platz (TOEPFER INTERNATIONAL GmbH 2006). In Europa und insbesondere auch in Deutschland stellt Winterraps die mit Abstand wichtigste Ölpflanze dar und wurde 2007 auf 1.533.600 ha angebaut. In 2007 wurden insgesamt 5.282.800 t Rapssaat geerntet, was einem Durchschnittsertrag von 34,4 dt/ha entspricht (STATISTISCHES BUNDESAMT 2007).

Während Ölraps noch zu Beginn der 1960er Jahre aufgrund unerwünschter Inhaltsstoffe eine wirtschaftlich relativ unbedeutende Pflanzenart war, konnte Rapssaat innerhalb von 20 Jahren durch die Züchtung von erucasäurefreien und glucosinolatarmen 00-Sorten zu einem hochwertigen Nahrungs- und Futtermittel entwickelt werden. Rapsöl und daraus hergestellte Margarine haben in den letzten Jahren einen deutlichen Imagegewinn erfahren und gelten als gesunde Lebensmittel. Dies kann begründet werden durch hervorragende ernährungsphysiologische Eigenschaften dieses Öles, die sich aus der Zusammensetzung der Fettsäuren ergeben. Der hohe Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren (C18:1) sowie das Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren ist in Rapsöl für die menschliche Ernährung so günstig wie in keinem anderen Pflanzenspeiseöl. Im Gegensatz beispielsweise zu Olivenöl weist es einen hohen Anteil an Alpha-Linolensäure (Omega-3) auf, einer Fettsäure, der – ähnlich wie den langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Fischöl – positive Wirkungen auf den menschlichen Stoffwechsel zugeschrieben werden. Darüber hinaus ist Rapsöl reich an Vitamin E und Carotinoiden. So stuft die DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR

ERNÄHRUNG E.V. (2004) Rapsöl ernährungsphysiologisch günstiger als Olivenöl ein, mit der Empfehlung, Rapsöl in der Speisenzubereitung bevorzugt einzusetzen. Die beim Auspressen der Rapssaat zur Ölherstellung anfallenden Rückstände wie Rapskuchen und Rapsschrot stellen darüber hinaus auch ein hochwertiges Futtermittel für Schweine und vor allem Rinder dar, da sie sich aufgrund des hohen Eiweißanteils bei günstiger Aminosäurezusammensetzung positiv auf den Muskelaufbau und die Milchleistung auswirken.

Die dominierende Stellung von Winterraps ist jedoch nicht allein in der Verbesserung der Ölqualität zur Verwendung als Speiseöl begründet, sondern auch in den vielseitigen Einsatzmöglichkeiten des Rapsöls im Nichtnahrungsbereich als Ausgangs- und Rohstoff für viele chemische und technische Produkte. Vollständig biologisch abbaubare Schmierstoffe aus Rapsöl und Verarbeitungsmöglichkeiten in der Oleochemie – beispielsweise zu Lacken, Tensiden für Wasch- und Reinigungsmittel oder als Basis für Kosmetika – sowie seine Eignung als Treibstoff in Form von Pflanzenöl oder Rapsmethylester (Biodiesel) haben Raps zur heute mit Abstand bedeutendsten Pflanze für die Produktion nachwachsender Rohstoffe in Deutschland gemacht (Abb. 1.1).

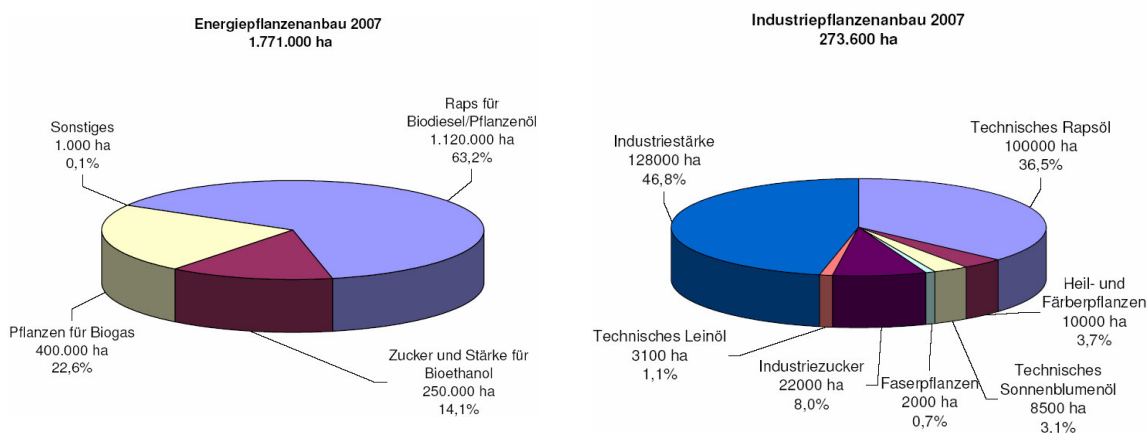


Abb 1.1: Anbau nachwachsender Rohstoffpflanzen untergliedert in Industrie- und Energiepflanzen in Deutschland im Jahre 2007 (Quelle: FNR 2007; vorläufige Schätzung)

Mit dem Ziel, der Überproduktion an Nahrungsmitteln entgegenzuwirken, sind Landwirte in der Europäischen Union bislang verpflichtet, jährlich einen Teil ihrer Anbauflächen stillzulegen. Die Produktion nachwachsender Rohstoffe als Alternative zur Nahrungsmittelherzeugung bietet der Landwirtschaft insofern Vorteile, als Stilllegungsflächen genutzt werden

können, ohne auf Ausgleichszahlungen verzichten zu müssen. Dies hat dazu geführt, dass 2005 ca. ein Drittel des für den Nichtnahrungsbereich angebauten Winterraps auf Stilllegungsflächen produziert wurde. Die gute Ertragsstabilität auf einem Niveau von bis zu 40 dt/ha, hohe Preise über 22 €/dt (ZMP 2006) und mit anderen Kulturen vergleichbare Produktionskosten sichern Landwirten relativ hohe Gewinne. Die obligatorische Stilllegung von Ackerflächen wurde für die Aussaat Herbst 2007 und Frühjahr 2008 jedoch erstmalig seit ihrer Einführung ausgesetzt.

Darüber hinaus wird der Vorfruchtwert von Winterraps positiv bewertet. CHRISTEN (2001) beschreibt beispielsweise eine Erhöhung der Ertragsstabilität von Weizen nach Raps als Vorfrucht. Begründet werden kann dieser Effekt, der mit deutlich höheren Kornträgen bei Winterweizen nach Raps einhergeht, mit der Förderung der Strukturbildung und der Erhöhung der biologischen Aktivität des Bodens. So bildet Winterraps ein tiefgehendes und kräftiges Pfahlwurzelsystem aus, das den Boden lockert, nach der Ernte zusammen mit den Ernterückständen auf dem Feld verbleibt und somit zu einer positiven Humusbilanz führt (HONERMEIER und GAUDSCHAU 2001). Bei normaler Vorwinterentwicklung nimmt der Raps schon im Herbst beträchtliche Stickstoffmengen auf (40-80 kg N/ha). Er ist daher besonders geeignet, Bodennitrat zu binden und somit vor Verlagerung und Auswaschung über Winter zu schützen.

1.2 *Verticillium longisporum* an Raps

Die vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten des Rapsöls haben in den vergangenen Jahren zu einer starken Erhöhung der Anbauintensität und damit auch zu phytosanitären Problemen geführt. So hat sich neben den bedeutenden Rapskrankheiten Wurzelhals- und Stängelfäule, verursacht durch *Leptosphaeria maculans*, und Weißstängeligkeit (*Sclerotinia sclerotiorum*) ein weiteres pilzliches Pathogen flächendeckend etabliert: Die krankhafte Abreife, bewirkt durch das Pathogen *Verticillium longisporum*, ist eine bodenbürtige Krankheit von *B. napus*. Das Auftreten von *V. longisporum* ist hauptsächlich im nördlichen Europa dokumentiert, insbesondere in Deutschland, Schweden, Polen, Frankreich, aber auch in Südrussland und der Ukraine (HEALE and KARAPAPA 1999, HAPSTADIUS et al. 2003) und hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen (DUNKER et al. 2006).

V. longisproum wurde gegen Ende der 1990er Jahre als eigenständige Art klassifiziert, nachdem sowohl morphologische als auch molekulare Unterschiede zu *V. dahliae* identifiziert wurden. So bildet *V. longisporum* längliche Sporen, wohingegen *V. dahliae* signifikant kürzere, rundlich-kompakte Sporen produziert. Ein weiterer Unterschied ist die Bildung von Conidiophoren mit 4-5 Phialiden bei *V. dahliae* und meist nur 3 Phialiden bei *V. longisporum*. Es wird vermutet, dass *V. longisporum* ein diploides Genom besitzt, da der DNA-Gehalt des Zellkerns mit 1,023 pg fast doppelt so hoch ist wie bei *V. dahliae* (DNA-Gehalt 0,575 pg) und durch UV-Bestrahlung keine auxotrophen Mutanten erzeugt werden konnten (KARAPAPA et al. 1997). Nach künstlicher Infektion können nach sieben Tagen signifikant höhere DNA-Gehalte von *V. longisporum* als von *V. dahliae* in den Hypokotylen von Rapspflanzen nachgewiesen werden (Eynck et al. 2007).

Die Infektion von Winterraps durch *V. longisporum* erfolgt vermutlich im Herbst. Es folgt eine langanhaltende Latenzphase, in der der Pilz bis zu beginnenden Reifeprozessen des Wirts im Hypokotyl und unteren Stängelabschnitt verbleibt, ohne dass zunächst typische Symptome sichtbar werden (HEALE and KARAPAPA 1999). Aufgrund der Ausbreitung des Pilzes in der Pflanze wird die Wasser- und Nährstoffversorgung z.T. erheblich gestört, sodass eine vorzeitige „Notreife“ stattfinden kann. Halbseitig vergilbte, schnell nekrotisierende Blätter mit Blattadern, die aufgrund der Mikrosklerotienbildung dunkel erscheinen, werden bei Befall mit *V. longisporum* häufig beobachtet (PAUL 2003). Eine eindeutige Diagnose kann allerdings oftmals erst kurz vor der Ernte erfolgen, wenn im absterbenden Gewebe vermehrt Mikrosklerotien im Stängelmark und unter der Epidermis gebildet werden, stark befallene Rapsstängel dadurch grau-schwarz verfärbt erscheinen und die Epidermis faserig abblättert (DUNKER 2006). Zur Erfassung der Befallshäufigkeit und Befallsschwere in Rapsbeständen wird dieses Symptom nach der Ernte an den Stoppeln bonitiert. Die zu untersuchenden Pflanzen werden Boniturnoten von 1 (gesunde Pflanzen) bis 4 (starker Besatz mit Mikrosklerotien und Ablösung der Epidermis) zugeordnet. Bei einer Befallshäufigkeit von 50-60% ist in Rapsbeständen mit Ernteverlusten zu rechnen (VON TIEDEMANN und STEINBACH 2007).

Die Vermehrung des Pilzes erfolgt über die Produktion von Mikrosklerotien und Konidien. Da die Mikrosklerotien von *Verticillium*-Arten länger als 10 Jahre im Boden überdauern können (KARAPAPA et al. 1997), führt ein in enger Fruchtfolge angebaute Raps zu einer schnellen Anreicherung pilzlicher Dauerorgane im Boden und damit zu einer Zunahme des

Krankheitsauftretens. Da auch andere Kreuzblütler zu den Wirtspflanzen von *V. longisporum* zählen, müssten langwierige Anbaupausen von Kruziferen eingehalten werden, um der Inokulumvermehrung entgegenzuwirken. Weite Fruchtfolgen sind jedoch aufgrund der Bedeutung von Raps für die Produktion von nachwachsenden Rohstoffen und der damit zusammenhängenden Erhöhung der Anbauintensität heute schwer realisierbar.

Eine chemische Bekämpfung des Pathogens ist aufgrund fehlender zugelassener Fungizide nicht möglich. Der aussichtsreichste Lösungsweg für eine nachhaltige Rapsproduktion ist daher die Entwicklung widerstandsfähiger Pflanzen, auch wenn bisher keine Rapssorten mit ausgeprägter Resistenz gegen *V. longisporum* vorhanden sind. Da bisher auch im gesamten Primärgenpool von *B. napus* keine *Verticillium*-Resistenz bekannt ist, muss der sekundäre Genpool, insbesondere die Ausgangsarten von Raps (*B. rapa*, *B. oleracea*) auf potentielle Resistenzquellen untersucht werden.

Es wird vermutet, dass *V. longisporum* auf allen landwirtschaftlich genutzten Flächen vorkommen kann und der Anbau von anfälligen Wirtspflanzen über Jahrzehnte hinweg zu einer Vermehrung der Bodenpopulation geführt hat, bis typische Symptome beobachtet werden können. Die Verbreitung des Pilzes erfolgt mit der Verschleppung infizierter Pflanzenrückstände. Andere Verbreitungsmechanismen werden als epidemiologisch unbedeutsam beschrieben (ZEISE und STEINBACH 2004).

Die durch *V. longisporum* hervorgerufenen Ernteverluste sind schwer zu beziffern. In Inokulationsversuchen an Einzelpflanzen konnten sehr hohe Ertragsverluste bis zu 80% nachgewiesen werden (DUNKER et al. 2006, VON TIEDEMANN und STEINBACH 2007). Diese Zahlen spiegeln jedoch nur das Schädigungspotential des Pathogens wider und können nicht auf die Infektion unter natürlichen Bedingungen übertragen werden, da unter Feldbedingungen die Ernteverluste von infizierten und damit schwächer wüchsigen Pflanzen von benachbarten Pflanzen kompensiert werden können. Schätzungen zufolge kann die Infektion mit *V. longisporum* unter Feldbedingungen zu Ernteeinbußen von 10-50% führen (DUNKER et al. 2006).

1.3 Bedeutung von Krankheitsresistenzen in der Rapszüchtung und Pyramidisierung von Resistenzgenen

Ertragsverluste landwirtschaftlicher Nutzpflanzen durch Beikräuter bzw. Ungräser, Krankheiten und Insekten werden auf 31-42 % der weltweiten Produktion geschätzt, wobei in Entwicklungsländern im Vergleich zu Industrieländern noch wesentlich höhere Verluste zu verzeichnen sind (AGRIOS 2005). Aufgrund von Beobachtungen an mehreren Kulturpflanzen wird das Potential von Pathogenen, Ertragsverluste zu verursachen, auf ca. 16% geschätzt (OERKE 2006) und mit ca. 220 Mrd. \$ beziffert (AGRIOS 2005).

In den industrialisierten Ländern stellen Pilzkrankheiten ein großes Problem in der Landwirtschaft dar, da aufgrund der feucht-gemäßigten Klimabedingungen pilzliches Wachstum relativ besser erfolgen kann als in anderen Regionen. Darüber hinaus kann die hohe Anbauintensität einzelner Kulturpflanzen eine einseitige Förderung einzelner Schaderregergruppen begünstigen.. Während in Entwicklungsländern häufig noch heterogene Landrassen kultiviert werden, kommen in Industrieländern hauptsächlich Hochleistungssorten, die aus genetisch weitgehend einheitlichen Pflanzen bestehen, zum Anbau. Letztere stellen eine ideale Grundlage für die rasche und starke Ausbreitung von Pflanzenkrankheiten dar.

Um trotz des hohen Pathogendrucks stabile Erträge erzielen zu können, müssen entweder die Pathogene durch verstärkten Einsatz von Pflanzenschutzmitteln kontrolliert oder die Kulturpflanzen durch Resistenz widerstandsfähiger gemacht werden.

Im Falle einer inkompatiblen Wirt-Pathogen-Beziehung wird zwischen zwei Formen von Resistenz, der horizontalen und der vertikalen Resistenz, unterschieden (VAN DER PLANK 1968). Die vertikale Resistenz, gekennzeichnet durch eine hypersensitive Reaktion der Wirtspflanze, wird auch als spezifische oder qualitative Resistenz bezeichnet, da sie vollständigen Schutz gegenüber bestimmten Rassen bzw. Pathotypen bewirkt. Sie wird meist monogenisch, seltener auch oligogenisch vererbt, wobei nach der Gen-für-Gen Hypothese von FLOR (1971) jedem Resistenzgen der Pflanze ein Avirulenzgen des Erregers entspricht, so dass es zu einer inkompatiblen Interaktion von Pflanze und Pathogen kommt. Vertikale Resistenzen sind unter intensiven Anbaubedingungen i.d.R. nur eine gewisse Zeit wirksam, da sie von neuen Pathotypen eines Erregers überwunden werden können. Die horizontale Resistenz dagegen, auch als unspezifische oder quantitative Resistenz bezeichnet, beruht

sowohl auf passiven als auch auf aktiven Abwehrmechanismen. Sie wird i.d.R. polygenisch vererbt und wirkt über die Ausprägung verschiedener Abwehrmechanismen, die zusammen zwar meist keine vollständige Resistenz gegen bestimmte Pathotypen vermitteln, jedoch einen breiten Schutz gegenüber allen Rassen eines Pathogens bewirken. Aufgrund der unspezifischen polygenischen Wirkungsweise werden horizontale Resistenzen im Allgemeinen nicht so schnell überwunden wie vertikale Resistenzen.

Horizontale Resistenzen können durch die Kombination einzelner Resistenzgene verschiedener Kreuzungspartner in mehreren Züchtungsschritten entwickelt werden. Diese sog. „Pyramidisierung“ einzelner Resistenzgene kann eine dauerhafte Widerstandsfähigkeit gegen ein Pathogen bewirken und bei Anreicherung von besonders wirksamen Resistenzgenen zu einer Erhöhung des Resistenzniveaus von Linien und Sorten führen (SANCHEZ et al. 2000). Um einen Abfall des Resistenzniveaus im Züchtungsverlauf zu verhindern, ist in jeder Generation eine Überprüfung notwendig, ob alle das Merkmal beeinflussenden Gene noch im Material vorhanden sind (WERNER et al. 2005).

1.4 Einsatz molekularer Marker in der Pflanzenzüchtung

Die Selektion von erwünschten Pflanzen ist bei oligogenisch oder polygenisch vererbten Merkmalen schwieriger als bei monogenischen Eigenschaften. Sichere Rückschlüsse vom Phänotyp auf den Genotyp können meist nur bei monogener Vererbung bzw. hoher Heritabilität gezogen werden. Bei quantitativen Eigenschaften beruht der Phänotyp auf einem Zusammenspiel mehrerer bis vieler Gene, so dass die Beteiligung einzelner Erbkomponenten an der Merkmalsausprägung nicht unmittelbar erkennbar ist. Zudem werden solche Merkmale i.d.R. durch Umwelteffekte modifiziert, so dass die Heritabilität häufig niedrig und der Erfolg phänotypischer Selektion daher oftmals gering ist.

Vom Phänotyp können daher keine Rückschlüsse auf den genetischen Hintergrund gezogen werden. Dieses Informationsdefizit bezüglich der Auslese auf quantitative Eigenschaften kann durch den Einsatz molekularer Marker, die mit wesentlichen Schlüsselgenen für das betreffende Merkmal gekoppelt sind, behoben werden. Mittels molekularbiologischer Methoden können theoretisch für jeden Genlocus, der z.B. eine Resistenz bewirkt, eng gekoppelte Marker entwickelt und unabhängig voneinander nachgewiesen werden. Der Einsatz molekularer Marker in Zuchtprogrammen erlaubt einerseits die Selektion von

erwünschten Pflanzen anhand ihres Genotyps (markergestützte Selektion) sowie andererseits die Identifikation ganz bestimmter, erwünschter Genotypkombinationen in entsprechenden Kreuzungsnachkommenschaften (MELCHINGER und UTZ 2002). Somit wird die Selektion, die bislang nur anhand sicht- oder messbarer Merkmale erfolgen konnte, durch gen- bzw. merkmalsgekoppelte molekulare Marker heute wesentlich unterstützt.

Phänotypisch vermeintlich uninteressante Pflanzen können in der Züchtung von Bedeutung sein, wenn bei rezessiv vererbten Eigenschaften relevante rezessive Allele von dominanten Allelen maskiert werden. Brauchbare heterozygote Pflanzen können in diesem Fall mittels molekularer Marker zur weiteren Verwendung im Zuchtgang selektiert werden, während sie bei ausschließlicher Anwendung von phänotypischer Selektion im Zuchtprozess verworfen worden wären.

Darüber hinaus bieten markergestützte Selektionsverfahren einen weiteren großen Vorteil für die praktische Pflanzenzüchtung: eine Beschleunigung des Zuchtgangs. Viele züchterisch interessante Eigenschaften, wie z.B. die Ölqualität, werden erst in späteren Entwicklungsstadien der Pflanze oder nur unter bestimmten Bedingungen ausgeprägt. Das gilt z.B. für induzierte Resistenzmechanismen infolge von Pathogenbefall. Während der Züchter bei phänotypischer Selektion oftmals Monate auf die Ausprägung des Merkmals warten oder die Merkmalsentwicklung erst induzieren muss, um selektieren zu können, erlauben markergestützte Selektionsverfahren eine Auswahl von Pflanzen bereits im Keimlings- oder Jugendstadium. Die Abkopplung der Selektion vom Entwicklungsstadium der Pflanze bewirkt eine Verkürzung des gesamten Zuchtprozesses, bis schließlich eine neue Sorte mit dem selektierten Merkmal zugelassen werden kann. Neben dem Zeitvorteil kann der Züchter zusätzlich Ressourcen (Versuchsfläche, Arbeit) einsparen, da unerwünschte Pflanzen bereits frühzeitig im Zuchtverlauf verworfen werden können.

DUDLEY (1993) benennt folgende Voraussetzungen, unter denen die markergestützte einer rein phänotypischen Selektion überlegen ist: (1) Wenn das Merkmal nur in der Zielumwelt, nicht jedoch im Gewächshaus oder anderen Umwelten selektiert werden kann, (2) es erst nach der Blüte exprimiert wird, oder (3) die Bonitur der Eigenschaft sehr schwierig oder teuer ist, ist die relative Effizienz der Selektion mit Einsatz molekularer Marker grösser als diejenige konventioneller phänotypischer Selektion.

1.5 Entstehung und Verwandtschaft der *Brassica*-Arten

Raps (*Brassica napus*, n=19) ist durch spontane Kreuzung der beiden diploiden Arten Kohl (*Brassica oleracea*, n=9) und Rübsen (*Brassica rapa*, n=10) entstanden. Der Entstehungszeitpunkt erster Rapspflanzen wird auf ca. 1000 n. Chr. geschätzt. Spätestens seit der Römerzeit wurde *B. oleracea* als Kohlgemüse oder zur Ölgewinnung in Europa genutzt und *B. rapa* in Südostasien angebaut (RÖBBELEN 1999). Mit dem Ausbau transkontinentaler Handelswege könnte Rübsensamen nach Europa gelangt sein und Kreuzungen mit Kohl stattgefunden haben. Es wird vermutet, dass Raps parallel an unterschiedlichen Orten sowie aus verschiedenen Formen der Elternarten entstanden ist (SONG et al. 1992). Urkundliche Belege und archäologische Samenfunde, die als *B. napus* identifiziert werden konnten, deuten darauf hin, dass Raps bereits etwa ab dem 16. Jahrhundert zur Ölproduktion genutzt wurde (KROLL 1994).

Bei interspezifischen Kreuzungen enthalten die Zygoten bzw. Embryonen nach Fusion der Gameten je einen haploiden Chromosomensatz ihrer Eltern, so dass die primären Artbastarde i.d.R. nicht zur sexuellen Fortpflanzung imstande sind. Durch spontane Diploidisierung entstehen Zellen und daraus Pflanzen, die je einen vollständigen diploiden Chromosomensatz beider Elternarten enthalten. Differenzieren diese weiter Blütenanlagen und Blüten aus, so bilden sie Gameten mit je einem haploiden Chromosomensatz. Bei einer Befruchtung zwischen solchen Gameten entsteht eine Zygote, die je ein diploides Genom beider Eltern beinhaltet. Dieser Zustand wird als Amphidiploidie oder auch Allopolyploidie bezeichnet (HENNIG 1998). Die Diploidisierung kann auch künstlich, durch Behandlung mit dem Kernspindelgift Colchicin, erreicht werden. Amphidiploide Pflanzen zeigen i.d.R. wie diploide eine normale Fertilität. Viele wichtige Kulturpflanzenarten, neben Raps z.B. Weizen, Hafer, Baumwolle und Tabak, sind allopolyploid (BECKER 1993).

Da die Genome der beiden Elternarten von Raps nur partiell homolog bzw. homoeolog sind, findet nur in sehr geringem Maße intergenomische Rekombination statt, so dass die beiden Genome intakt nebeneinander bestehen können (HENNIG 1998). LYDIATE et al. (1995) bezifferten die Häufigkeit von Rekombinationsereignissen zwischen den beiden Genomen mit 0,2%.

Die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Rübsen (*B. rapa*, AA), Schwarzem Senf (*B. nigra*, BB) und Kohl (*B. oleracea*, CC), sowie den drei natürlich vorkommenden

allopolyploiden Bastarden *B. juncea* (AABB), *B. napus* (AACC) und *B. carinata* (BBCC) wurden bereits 1935 von dem Koreaner U aufgedeckt (Abb. 1.2), und später auf cytogenetischer sowie biochemisch-molekularer Ebene genauer beschrieben (PRAKASH und CHOPRA 1993, SONG et al. 1995).

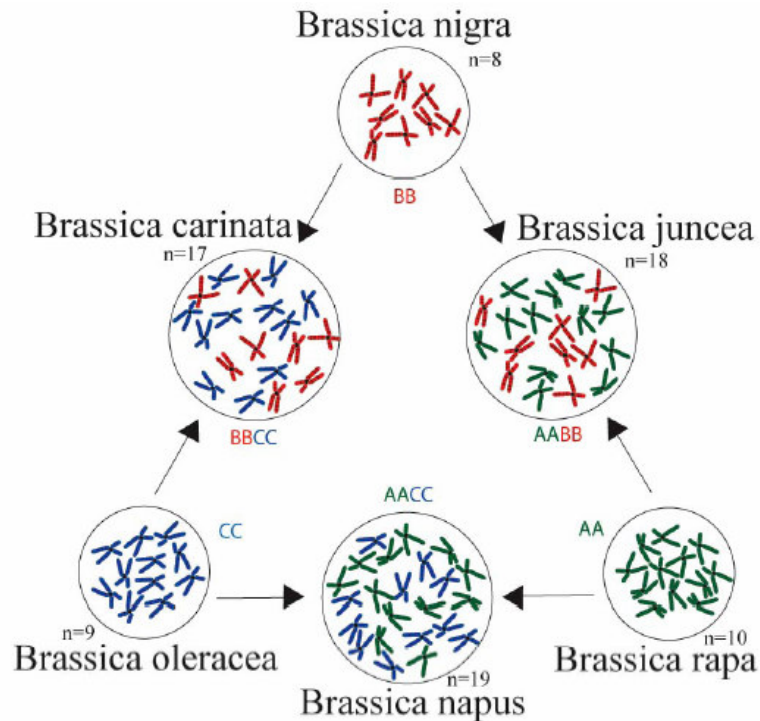


Abb. 1.2: Verwandtschaftsbeziehungen der *Brassica*-Arten nach U (1935)

1.6 Erweiterung der genetischen Diversität und Einsatz von Resynthesen in der Rapszüchtung

Im Vergleich zu anderen ackerbaulichen Kulturpflanzen ist Raps eine relativ junge Art. Die parallele Entstehung von Raps an unterschiedlichen Orten und aus verschiedenen Formen der Ausgangsarten (KIMBER and MCGREGOR 1995) haben zwar zu einer gewissen genetischen Varianz innerhalb der Art geführt, jedoch konnte aufgrund der kurzen Zeitspanne zwischen der Entstehung der Art und ihrer Domestizierung kaum eine Weiterentwicklung stattfinden, welche mit der Zeit durch Mutation und Anpassung an neue Umwelten die genetische Diversität hätte erweitern können.

Die Qualitätszüchtung, die für die erfolgreiche Vermarktung von Körnerraps in jüngster Zeit essentiell war, hat die genetische Basis vermutlich zusätzlich eingeengt. So wiesen herkömmliche Rapsorten einen hohen Anteil an Erucasäure (C22:1) im Samenöl auf, das für die Verwendung im Nahrungsmittelbereich als Salatöl oder zur Margarineherstellung aufgrund der herzmuskelschädigenden Wirkung nachteilig ist. Darüber hinaus führten hohe Gehalte an Glucosinolaten zu einer Einschränkung der Verwendung des Koppelproduktes Rapsschrot in der Tierfütterung. Nachdem 1962 in der deutschen Sommerrapssorte ‚Liho‘ Erucasäurefreiheit (0+-Qualität) entdeckt wurde und nur wenige Jahre später (1967) glucosinolatarmer Pflanzen in der polnischen Sommerrapssorte ‚Bronowski‘ identifiziert werden konnten, wurde 1981 ‚Librador‘, die erste deutsche Sorte, die beide Qualitätsmerkmale vereint (00-Sorte), vom Bundessortenamt für den Anbau und Verkehr zugelassen (MAKOWSKI 2000). Somit sind die heutigen 00-Sorten auf wenige in den 1960er Jahren selektierte Pflanzen zurückzuführen. Dies hat zur Folge, dass für aktuelle, wichtige Zuchtziele die genetische Variation im Genpool von 00-Raps begrenzt ist, d.h. für bestimmte Merkmale die erwünschten Ausprägungsstufen, z.B. bezüglich Resistenz nicht vorhanden sind.

Mit dem Ziel, die genetische Diversität zu erweitern und die neu erstellte Variabilität in der Rapszüchtung zu nutzen, wurden vielfach durch interspezifische Kreuzungen von Kohl und Rüben neue Rapsformen experimentell synthetisiert oder Kreuzungen von Raps mit verwandten *Brassica*-Arten durchgeführt. Aufgrund der vielfach beschriebenen, unerwünschten agronomischen Eigenschaften, wie z.B. schlechte Fertilität, ungünstige Veränderung des Blütezeitpunktes und geringe Ertragsleistung der Resynthesen, die häufig nur ca. 60-70% des Kornertrags von angepassten Zuchtmaterial erreichen (GIRKE et al. 1999), werden Resynthesen hauptsächlich für Rückkreuzungen mit Elitezuchtmaterial und Sorten zur gezielten Verbesserung spezifischer Zuchtziele verwendet. Die direkte Verwendung von Resynthesen in semi-synthetischen Sorten, wie z.B. ‚Rapol‘ und ‚Norde‘ (LÜHS und FRIEDT 1999), stellen Ausnahmen dar. Trotz der geringen Ertragsleistung sind Resynthesen für die Ertragszüchtung interessant. Anhand der Neukombination der *Brassica* A- und C-Genome können neue Genpools entwickelt werden, die in der Hybridzüchtung durch Kreuzung mit anderen genetisch diversen Formenkreisen in einer Erhöhung der potentiellen Heterosis resultieren können (GIRKE 2002).

Ein weiteres wichtiges Ziel, das durch interspezifische Kreuzungen erreicht werden soll, ist der Transfer von Resistenz gegen verschiedene Rapskrankheiten. CROUCH et al. (1994) haben Kreuzungen zwischen sechs verschiedenen *B. rapa*-Akzessionen und einer *B. oleracea*-Linie durchgeführt und die Nachkommenschaften hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens nach Infektion mit *Leptosphaeria maculans* untersucht: Es konnten signifikante Unterschiede im Resistenzphänotyp zwischen den Linien festgestellt werden, wobei eine Linie sowohl im Gewächshaus nach künstlicher Infektion als auch unter Feldbedingungen hervorragende Resistenzeigenschaften zeigte. Für die *Phoma*-Resistenz der aus dieser Linie entwickelten und im Jahre 2000 zugelassenen Sorte ‚Surpass 400‘ postulierten LI und COWLING (2003) eine dominante Vererbung. Dabei soll ein aus *B. rapa* ssp. *sylvestris* stammendes Resistenzallel, welches im Keimlingsstadium und in der adulten Pflanze exprimiert wird, für die Ausprägung der Resistenzeigenschaften verantwortlich sein. LI und SIVASITHAMPARAM (2003) berichteten vom „Zusammenbruch“ der monogenischen Resistenz von ‚Surpass 400‘. So konnten bereits ein Jahr nach der Sortenzulassung Pflanzen mit ausgeprägten Krankheitssymptomen beobachtet werden. Weiterführende Versuche mit Einzelisolaten von *L. maculans* führten zu dem Ergebnis, dass bereits 4 von 18 getesteten Pilzisolaten in der Lage waren, die monogenische Resistenz zu überwinden.

Resistenzen aus *B. rapa* und *B. oleracea* gegenüber *Plasmodiophora brassicae* (Kohlhernie) wurden von DIEDERICHSEN und SACRISTAN (1996) mittels Resynthese in *B. napus* kombiniert und zwei Linien mit einem sehr hohen Resistenzniveau identifiziert. Vererbungsstudien mit diesen Linien lassen vermuten, dass dort zwei dominante, ungekoppelte Hauptgene für die Resistenz gegen Kohlhernie wirksam sind (DIEDERICHSEN et al. 1996). Zwei daraus entwickelte Winterrapssorten, ‚Mendel‘ und ‚Tosca‘, weisen jeweils eine rassenspezifische Resistenz auf.

Resynthesen können ebenfalls für die Züchtung virusresistenter Rapslinien eingesetzt werden. DREYER et al. (2001) haben eine Resyntheselinie als Resistenzdonor zur Erstellung einer für das Rübsenvergilbungsvirus (TuYV) spaltenden DH-Population erstellt und einen Major-QTL nachgewiesen, welcher offenbar bis zu 50% der phänotypischen Varianz hinsichtlich Virusresistenz erklärt.

Da im Genpool von Raps bislang keine Resistenz gegen die von *Alternaria brassicae* und *A. brassicola* verursachte Rapsschwärze nachgewiesen werden konnten, hat KLEWER (2005) ein umfangreiches Screening in acht verwandten *Brassicaceae*-Arten durchgeführt, um putative

Resistenzdonoren zu identifizieren. Interspezifische Kreuzungen zwischen *B. napus* und den vier Arten mit den besten Resistenzphänotypen (*Brassica elongata*, *Sinapis alba*, *Diplotaxis tenuifolia* und *D. eruroides*) wurden entwickelt und die Nachkommen sowie die erstellten Rückkreuzungsgenerationen hinsichtlich ihres Resistenzphänotyps untersucht. Nur Kreuzungen mit *D. eruroides* zeigten ein deutlich ausgeprägtes und stabiles Resistenzverhalten. Variable Spaltungsverhältnisse und variierende Chromosomenzahlen in allen Generationen sowie die geringe Fertilität dieses Materials verdeutlichen die Schwierigkeit des Einsatzes weiterer Kreuzungen in der praktischen Züchtung. Bei der Nutzung von Resyntheseraps dagegen treten solche Schwierigkeiten nicht auf, da bei Vorhandensein der vollständigen Chromosomensätze von *B. rapa* und *B. oleracea* i.d.R. eine vollständige Kompatibilität mit herkömmlichem Raps (*B. napus*) besteht.

Nachdem ein umfangreiches Screening auf Resistenz gegenüber *V. longisporum* im Genpool von Raps erfolglos geblieben war, haben HAPSTADIUS et al. (2003) insgesamt 307 *B. oleracea*-Akzessionen untersucht und Resynthesen aus Kreuzungen mit den besten Kohl-Herkünften regeneriert. Drei der sechs untersuchten Resynthesen zeigten signifikant weniger Krankheitssymptome als die als tolerant geltende Winterrapssorte ‚Express‘.

Neben der Introduktion von Krankheitsresistenzen ist die Erstellung von Raps-Resynthesen auch hinsichtlich anderer Merkmale wie z. B. der Samenfarbe von Interesse. SLOMINSKI et al. (1999) haben gezeigt, dass der Futterwert von Rapsmehl aus gelbsamigem Raps wegen des geringeren Faseranteils im Vergleich zu Mehl aus braun- oder schwarzsamigem Raps in der Geflügelproduktion signifikant erhöht ist. Mittels gezielter Kreuzung zweier Resynthesen, die sowohl im A- als auch im C-Genom Gene für Gelbsamigkeit trugen, und anschließender Selbstung, konnten gelbsamige Rapslinien identifiziert werden, deren Samenfarbeloci sowohl im A- als auch im C-Genom mit den jeweils rezessiven Allelen für Gelbsamigkeit homozygot vorlagen (RAHMAN 2001).

Hinsichtlich der Qualitätszüchtung von Raps wurden mehrfach Resynthesen entwickelt, um die Fettsäurezusammensetzung des Rapsöls zu verändern. SEYIS et al. (2005) haben gezeigt, dass die genetische Diversität auch unter Berücksichtigung von Qualitätseigenschaften erweitert werden kann. Aus Kreuzungen zwischen erucasäurefreien Pflanzen der *B. oleracea*-Varietäten ‚Ladozhskaya‘ und ‚Kashirka‘ und der erucasäurefreien *B. rapa*-Sorte ‚Asko‘ wurden Resynthesen mit 0-Qualität (Erucasäurefreiheit) regeneriert. Ein weiteres Qualitätskriterium für 00-Raps – insbesondere in Kanada und den USA – ist der Gehalt an

gesättigten Fettsäuren (SCARTH und TANG 2006). RANEY et al. (1999) konnten in Zuchtpopulationen verringerte Anteile an gesättigten Fettsäuren von <6% identifizieren und nachweisen, dass der reduzierte Gehalt mit einer Reduktion aller gesättigter Fettsäuren einhergeht. Zur Verwendung als Nahrungsmittel ungeeignet, finden Öle mit hohen Gehalten an Erucasäure und Erucasäurederivaten in mehr als 200 technischen Anwendungen Verwendung (SCARTH und TANG 2006); MIETKIEWSKA et al. (2004) berichten sogar, dass mehr als 1000 Anwendungen von Erucasäure oder deren Derivaten patentiert wurden. Der natürliche Gehalt an Erucasäure im ursprünglichen Rapsöl liegt bei ca. 50%. Eine Steigerung dieses Gehalts dürfte auf ca. 67% limitiert sein, da die native sn-1-Acylglycerin-3-phosphat-acyltransferase (LPAAT) von Raps die C22:1-Fettsäure nicht als Substrat akzeptiert und so die Besetzung aller drei Glycerinpositionen mit Erucasäure normalerweise nicht möglich ist (FRENTZEN und WOLTER 1999). FRIEDT und LÜHS (1998) beschreiben, dass die Erucasäuregehalte in den Elternarten von Raps zwischen 30-61% (*B. rapa*) und 28-63% (*B. oleracea*) variieren; die Autoren konnten anhand der Resynthese neue Rapslinien mit einem Erucasäuregehalt von bis zu 60% entwickeln.

Während in den diploiden *Brassica*-Arten ein Selbstinkompatibilitätssystem wirksam ist, sind aktuelle Rapssorten normalerweise selbstkompatibel und daher zur Selbstbefruchtung in der Lage. RAHMAN (2005) hat die Kombination der Selbstinkompatibilitätsallele aus *B. oleracea* und *B. rapa* in Raps untersucht und mehrere Resynthesen mit einer deutlich ausgeprägten, dominanten Selbstinkompatibilität beobachtet, die untereinander kreuzbar waren. Die Nutzung dieser Linien zur Hybridsaatguterzeugung kann nur über einen Ramsch zweier aus unterschiedlichen Mutterlinien entwickelten Einfachhybriden [(AxB)+(CxD)] erfolgen, da die beiden Einfachhybriden (single crosses) AxB und CxD jeweils selbstinkompatibel, jedoch miteinander kreuzbar sind.

Die neue Variation in der Merkmalsausprägung von Resynthesen ist nicht allein in der Kombination des Kohl- und Rübsengenoms begründet. Vielmehr entwickeln Polyploide oftmals neuartige, von ihren Eltern abweichende Phänotypen. So wiesen Rapslinien, die durch Selbstbestäubung derselben Primärresynthese entwickelt wurden und somit genetisch identisch sein sollten, signifikante Unterschiede in mehreren Merkmalen auf (SCHRANZ und OSBORN 2004). Die genetischen Mechanismen, die diese phänotypische Variation bewirken, sind noch nicht genau geklärt, es wird jedoch vermutet, dass umfangreiche genomische Neuordnungen, wie z.B. nicht-reziproke Transpositionen (OSBORN et al. 2003, UDALL et al.

2005), der Ursprung bzw. mit verantwortlich für phänotypische Veränderungen sind (PIRES et al. 2004).

1.7 Genetische Kartierung von *quantitative trait loci* (QTL)

Viele agronomisch relevante Eigenschaften, wie z.B. Ertrag, Qualität und Krankheitsresistenzen, sind polygenisch vererbt (ASINS 2002; COLLARD et al. 2005). Die an der Ausprägung eines bestimmten Phänotyps beteiligten Gene können bekanntlich miteinander, mit anderen Genen oder mit „der Umwelt“ interagieren. Da Gene bei Polyploidien in mehr als zwei Zustandsformen vorliegen und somit multiple Allelie herrscht, führt die unterschiedliche Kombination von Allelen zu einer quantitativen Merkmalsausprägung und nicht wie bei monogenisch vererbten Eigenschaften zu deutlich unterscheidbaren Phänotypklassen.

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass quantitative Merkmale durch eine größere Zahl von Genen mit geringer Wirkung und von wenigen identifizierbaren Genen mit großem Effekt beeinflusst werden. Die einzelnen Genorte, die gemeinsam ein quantitatives Merkmal bestimmen, werden als *quantitative trait loci* (QTL) bezeichnet. Die Detektion und Lokalisierung von Loci mit nachweislichem Effekt sowie die Bestimmung der Effektstärke wird als QTL-Analyse bezeichnet. Hierbei werden genetische Daten aus einer Kopplungsanalyse gemeinsam mit den phänotypischen Merkmalsdaten verrechnet und so Zusammenhänge zwischen polymorphen Markern und dem Merkmal sowie Umwelteffekte aufgedeckt. Die Genauigkeit einer QTL-Analyse ist abhängig von der Anzahl polymorpher Marker, der Größe der Kartierungspopulation, der Qualität (Markerdichte und -verteilung) der genetischen Kopplungskarte und der Aussagekraft der statistischen Datenanalyse. Grundsätzlich können drei Methoden zur Detektion von QTL unterschieden werden. Die einfachste Methode (*single point analysis*) kann unabhängig von Kopplungskarten durchgeführt werden. Bei dieser Analyse wird lediglich die Assoziation der genutzten Marker mit der untersuchten Eigenschaft überprüft und diese auf Signifikanz getestet. Kopplungsdaten können sowohl im Falle des *simple interval mapping* (SIM) als auch bei dem *composite interval mapping* (CIM) in die QTL-Berechnung einbezogen werden. Dies hat den Vorteil, dass bestehende Kopplungsbeziehungen zwischen den Markern mit in die Verrechnung eingehen, wodurch im Gegensatz zur Einzelmarkeranalyse Rekombinations-

ereignisse zwischen den Markern kompensiert werden können und dadurch eine höhere Güte des Tests erreicht wird. Die QTL-Analyse mittels CIM-Methode kombiniert die beschriebene Intervallanalyse mit einer linearen Regression, wodurch eine präzisere und effektivere Detektion von QTL möglich ist (COLLARD et al. 2005).

Die Resistenz gegenüber Krankheiten und Schädlingen spielt eine wichtige Rolle in der Pflanzenzüchtung. Jedoch wird die QTL-Analyse von Resistenzeigenschaften oftmals durch spezielle Interaktionen zwischen Pflanze und Pathogen erschwert. So erfolgt die Bonitur der Krankheitssymptome bzw. der Resistenzausprägung i.d.R. ordinalskaliert anhand weniger Kategorien, d.h. eine Phänotypisierung des natürlichen, fließenden Übergangs von ‚anfällig‘ bis ‚resistent‘ ist nicht möglich. Darüber hinaus kann die Infektion mit verschiedenen Rassen oder Isolaten unterschiedliche Phänotypen und entsprechende QTL-Profile bewirken, was eine allgemeingültige Aussage über das Resistenzverhalten von Pflanzen gegenüber einer Krankheit erschwert. Auch kann die Inokulationsmethode und der Zeitpunkt der Inokulation das Auftreten von QTL beeinflussen (ASINS 2002). Trotz dieser Einschränkungen stellt die QTL-Analyse von quantitativen Resistenzen ein sehr leistungsfähiges Werkzeug zur Identifizierung und Charakterisierung von Resistenzgenen dar, das letztendlich auch die Pyramidierung und damit die Entwicklung von dauerhaften Resistenzen ermöglichen kann (YOUNG 1996).

Für *B. napus* wurden bereits zahlreiche Kopplungskarten erstellt und QTL zur Lokalisierung verschiedener Gene berechnet. SNOWDON et al. (2007) geben einen Überblick zu QTL-Analysen, die an Raps und verwandten *Brassica*-Arten durchgeführt wurden. Neben QTL-Analysen zu Samen-, Öl- und Mehlqualität sowie hinsichtlich morphologischer und ertragsbezogener Eigenschaften ist die Analyse quantitativer Resistenzeigenschaften von großer Bedeutung für die Züchtung. So wurden mittels dieser Technik Resistenzgene gegen verschiedene Pilzkrankheiten, wie z.B. die Wurzelhals- und Stängelfäule (CROUCH et al. 1994) und die Kohlhernie (DIEDERICHSEN und SACRISTAN 1996) lokalisiert und gekoppelte Marker identifiziert. Dagegen wurden Arbeiten zur Aufklärung der Resistenz gegen *V. longisporum* bislang noch nicht durchgeführt bzw. waren vor dieser Arbeit in der Literatur noch nicht dokumentiert.

2 Zielsetzung

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *V. longisporum*-resistente *B. napus*-Linien zu erstellen, die als Basismaterial Eingang in die praktische Züchtung finden können. Zur Identifizierung neuer Resistenzquellen wurden verschiedene *B. rapa*- und *B. oleracea*-Linien für Resistenztests am Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität Göttingen bereitgestellt. Anhand interspezifischer Kreuzungen zwischen partiell *V. longisporum*-resistenten *B. rapa*- und *B. oleracea*-Linien und anschließende Regeneration mittels *Embryo rescue*-Verfahren sollten neue, potentiell resistente *B. napus*-Linien entwickelt werden. Nach Diploidisierung und Vermehrung der Rapsresynthesen sollten die Linien hinsichtlich *V. longisporum*-Resistenz phänotypisiert werden und somit eine Validierung, ob die Resistenzgene der Elternspezies auch in den Resyntheserapslinien wirksam sind, erfolgen.

Für die Entwicklung von DH-Populationen, die für das Merkmal *V. longisporum*-Resistenz spalten, sollten verschiedene RS-Linien mit unterschiedlicher genetischer Basis ausgewählt werden, um in Zukunft ein möglichst vielseitig verwendbares Set von molekularen Selektionsmarkern für die Züchtung entwickeln zu können.

Darüber hinaus sollte eine erste QTL-Analyse bezüglich *V. longisporum*-Resistenz in Raps (*B. napus*) durchgeführt werden. Die Lokalisierung und Charakterisierung der in Raps relevanten Resistenzloci sollte zu einem besseren Verständnis der *V. longisporum*-Resistenz beitragen. Auf diese Weise sollten die Voraussetzungen für die spätere Entwicklung von molekularen Selektionsmarkern für die praktische Resistenzzüchtung geschaffen werden. Hiermit könnte in Zukunft das in den Ausgangsarten von Raps vorhandene Resistenzpotential in der Rapszüchtung gezielter genutzt und zur Erhöhung der Widerstandskraft kommerzieller Winterrapsorten gegen *V. longisporum* eingesetzt werden.

3 Publikationen

3.1 Broadening the genetic basis of *Verticillium longisporum* resistance in *Brassica napus* by interspecific hybridization

Rygulla, W.¹, R.J. Snowdon¹, C. Eynck², B. Koopmann, A. von Tiedemann², W. Lühs¹ und W. Friedt¹

¹Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, Justus Liebig Universität, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen

²Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Fachgebiet Allgemeine Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Georg-August-Universität Göttingen, Grisebachstrasse 6, D-37077 Göttingen

Manuskript publiziert in *Phytopathology*, Vol. 97, Nr. 11, Seiten 1391-1396, November 2007

Broadening the Genetic Basis of *Verticillium longisporum* Resistance in *Brassica napus* by Interspecific Hybridization

W. Rygulla, R. J. Snowdon, C. Eynck, B. Koopmann, A. von Tiedemann, W. Lühs, and W. Friedt

First, second, sixth, and seventh authors: Department of Plant Breeding, Research Center for BioSystems, Land Use and Nutrition, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany; and third, fourth, and fifth authors: Department of Crop Sciences, Division of Plant Pathology and Crop Protection, Georg-August-University, Grisebachstrasse 6, D-37077 Göttingen, Germany. Accepted for publication 16 July 2007.

ABSTRACT

Rygulla, W., Snowdon, R. J., Eynck, C., Koopmann, B., von Tiedemann, A., Lühs, W., and Friedt, W. 2007. Broadening the genetic basis of *Verticillium longisporum* resistance in *Brassica napus* by interspecific hybridization. *Phytopathology* 97:1391-1396.

Verticillium wilt caused by the vascular fungal pathogen *Verticillium longisporum* is one of the most important pathogens of oilseed rape (*Brassica napus* sp. *oleifera*) in northern Europe. Because production of this major oilseed crop is expanding rapidly and no approved fungicides are available for *V. longisporum*, long-term control of the disease can only be achieved with cultivars carrying effective quantitative resistance. However, very little resistance to *V. longisporum* is available within the gene pool of oilseed rape, meaning that interspecific gene transfer from related species is the only possibility for broadening levels of resistance in current varieties. The amphidiploid species *B. napus* can be resyn-

thesized by crossing the two progenitor species *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*, hence resistant accessions of these two diploid species can be used as resistance donors. In this study a total of 43 potential *B. rapa* and *B. oleracea* resistance donors were tested with regard to their reaction to a mixture of two aggressive *V. longisporum* isolates, and resistances from diverse lines were combined by embryo rescue-assisted interspecific hybridization in resynthesized rapeseed lines. Progenies from crosses of the two *B. rapa* gene bank accessions 13444 and 56515 to the *B. oleracea* gene bank accessions BRA1008, CGN14044, 8207, BRA1398, and 7518 showed a broad spectrum of resistance in pathogenicity tests. Of 45 tested resynthesized lines, 41 lines exhibited a significantly higher level of resistance than the moderately *V. longisporum*-tolerant oilseed rape cultivar Express. These lines represent a promising basis for the combination of different resistance resources in new varieties.

Verticillium wilt caused by the fungal pathogen *Verticillium longisporum* (13) is one of the most important pathogens of oilseed rape (*Brassica napus* sp. *oleifera*) in northern Europe. The disease is especially prominent in northern Germany and Sweden, but it has also been reported to occur in Poland, France, southern Russia, and Ukraine (12). The fungus infects oilseed rape by colonizing the xylem vessels. Due to the production of fungal material and host reaction products the vascular system becomes blocked, meaning that heavily infected plants die due to water stress. At the same time microsclerotia are produced in the plant, causing symptomatic blackening of leaf veins or stems. With the decomposition of dead plant material the microsclerotia are released to the soil, where the fungus can survive for many years in this dormant form (19).

Oilseed rape is the most important oilseed crop in Europe and the production area is continuing to rise dramatically due to the high demand for oilseed rape oil, both as a healthy vegetable oil, and a renewable resource for the oleochemical industry. Because no approved fungicides are available for *V. longisporum*, long-term control of the disease can only be sustained with cultivars carrying effective quantitative resistance. Up to 70% yield loss due to disease-induced premature ripening has been observed in individual plants (9), and yield losses in the field can also be severe. Currently available commercial varieties are generally susceptible or exhibit only slight tolerance to *V. longisporum*.

Intensive screening of available *B. napus* germplasm failed to identify resistance resources within the primary gene pool (11). On the other hand, because *B. napus* (genome AACC, 2n = 38) is an amphidiploid species that is derived from interspecific hybridizations between turnip rape (*Brassica rapa* L., syn. *campestris*; AA, 2n = 20) and cabbage (*Brassica oleracea* L.; CC, 2n = 18), the diverse gene pools of these two progenitor species can also be used as potential gene donors to broaden the resistance spectrum of the amphidiploid species. Nothing is known about the inheritance of *Verticillium* resistance in the diploid progenitor species. Due to the self-incompatibility system, self-fertilization is prevented and homozygous lines cannot be produced for inheritance studies.

With the help of embryo rescue techniques it is possible to generate novel, resynthesized (RS) oilseed rape lines comprising the intact genomes of the respective *B. rapa* and *B. oleracea* donor lines. Such RS *B. napus* represents an important source of novel genetic variation for specific traits in oilseed rape. In previous investigations this strategy has been adopted for introduction of resistance genes into *B. napus* against Turnip yellows virus (TuYV) (8), Turnip mosaic virus (TMV) (22), and also important fungal pathogens including *Phoma lingam* (3) and *Plasmiodiophora brassicae* (5). A similar strategy has great promise for *V. longisporum*-resistance breeding, since numerous *B. oleracea* gene bank accessions are known with a high level of resistance to this pathogen, and their transfer to *B. napus* was found to improve the resistance of some of the resulting RS oilseed rape lines (11).

Widespread use of specific resistances from single donor sources induces a strong selection pressure on the pathogen that can result in the resistance being rapidly overcome. This has been shown previously for some of the above mentioned resistances

Corresponding author: R. J. Snowdon
E-mail address: Rod.Snowdon@agrar.uni-giessen.de

derived only from *B. rapa* or *B. oleracea* sources (10,20). It is therefore desirable to combine different resistance resources with potentially different mechanisms to generate long-term resistance, and to avoid the formation of new pathotypes with enhanced aggressiveness. The aim of the present study was to identify new resistance sources against *V. longisporum* among *B. rapa* gene bank material, and to combine these with known *B. oleracea* resistance sources in novel RS *B. napus* lines via sexual interspecific hybridization with the help of embryo rescue. The material that was developed is discussed regarding the potential for resistance breeding in oilseed rape and further investigations in *Verticillium* research.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials. Twenty-nine *B. oleracea* and 12 *B. rapa* gene bank accessions (Table 1) obtained from eight different gene banks and a commercial seed supplier, were screened for their resistance response to *V. longisporum* in order to identify resistant genotypes for combination of potentially different resistances in RS *B. napus*. Parallel to the resistance screening of the diploid progenitors, a set of potentially resistant RS *B. napus* genotypes were generated by interspecific hybridizations. The parents of these crosses were different plants belonging to two *B. rapa* accessions that were chosen based on prior observations which indicated that these accessions could contain potential resistance to *V. longisporum*, and five *B. oleracea* gene bank accessions that were reported by Happstadius et al. (11) to have a high level of resistance to *V. longisporum*. The origins of the diploid accessions

used for the interspecific crosses along with the pedigrees of the resulting RS lines are shown in Table 2.

The *B. rapa* genotypes were emasculated and hand-pollinated 2 days later with pollen from the respective *B. oleracea* parent, except in one case where the *B. oleracea* accession was used as the maternal parent and pollinated by *B. rapa*. To enhance the efficiency of the interspecific crossing, the embryo rescue technique was used to regenerate haploid plants in vitro. Immature pods were harvested 2 weeks after pollination and surface sterilized with NaOCl (3%) for 10 min and washed with sterile water. Ovules were dissected and cultivated on Murashige and Skoog (MS) media with sucrose (10 g/liter) (15) in a growth chamber at 20°C, 75% humidity and a day length of approximately 16 h. Ovules that did not germinate after 6 weeks were transferred to new media, while germinated ovules that had already developed into a small plant were transferred to MS media containing saccharose (30 g/liter). Regenerated, vigorous plants were transferred to soil, and cuttings from the haploid hybrids were treated with colchicine (0.05% colchicine, 0.15% dimethyl sulfoxide) for 12 h in the dark in order to obtain amphidiploid *B. napus* plants. All resulting RS plants were self-pollinated for seed multiplication by bagging with super-micro perforated Crispac bags (Baumann Saatgutbedarf, Waldenburg, Germany) before the onset of flowering. A total of 45 RS plants derived from 8 different *B. rapa* × *B. oleracea* cross combinations produced sufficient seeds (>50) for the resistance screening.

Resistance screening. Resistance tests were performed using the *V. longisporum* isolates VL 43 and VL 40, which originate from *B. napus* grown in northern Germany (23). Long-term

TABLE 1. Accession numbers and sources of *Brassica rapa* and *B. oleracea* gene bank accessions that were phenotyped for identification of potential resistance to *Verticillium longisporum*

Species	Accession names	Source ^a
<i>B. rapa</i>	13444, 56429, 56515	BAZ
	G454 (Chinese cabbage 'Granat'), G684 ('Runde weiße rotköpfige Herbstrüben')	Cultivars
	YS Pb-24 (Yellow Sarson cultivar)	HAU
	Q3F, 'Reward', SWSP, 00 <i>B. rapa</i>	NPZ
	03-510001 ('Salut'), 03-510002 ('Credit')	SW
<i>B. oleracea</i>	2398, 2808, 3775, 4250, 4622, 4707, 5085, 5394, 6206, 6704, 7518, 7799, 8207, 10590, 10618	HRI
	BRA504, BRA544, BRA723, BRA809, BRA1008, BRA1355, BRA1398, BRA1427	IPK
	CGN07069, CGN07089, CGN14044	CGN
	1227	Li et al. 2001 (14)
	1428, 2070	NIV

^a BAZ: Gene bank of the Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants, Braunschweig, Germany; CGN: Centre for Genetic Resources, Wageningen, Netherlands; HAU: Haryana Agricultural University, Hisar, India; HRI: Horticulture Research International Genetic Resources Unit, Warwick, UK; IPK: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany; NIV: Gene bank of the NI Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), St. Petersburg, Russia; NPZ: Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG, Hohenlieth, Germany; SW: Svalöf Weibull AB, Svalöf, Sweden.

TABLE 2. Origin of resynthesized oilseed rape lines and progenitor species with resistance to *Verticillium longisporum*

Parental species accession designations	Botanical names
13444	<i>B. rapa</i> sp. <i>pekinensis</i>
56515	<i>B. rapa</i> sp. <i>chinensis</i>
8207	<i>B. oleracea</i> convar. <i>acephala</i>
BRA1398	<i>B. oleracea</i> sp. <i>oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i>
BRA1008	<i>B. oleracea</i> convar. <i>acephala</i> var. <i>sabellica</i>
7518	<i>B. oleracea</i> sp. <i>oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>alboglabra</i>
CGN14044	<i>B. oleracea</i> sp. <i>oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>italica</i>
Resynthesized oilseed rape lines	♀ × ♂
K160.1.1, K160.1.2, K160.6.1, K160.6.2, S160.7.1, K160.7.2, S160.5.1	13444 × 8207
K242.2.1, K242.2.2, S175.5.1, S175.5.2, S237.20.1, S237.23.1	13444 × BRA1398
K147.34.1, K239.42.2, K241.20.2	13444 × BRA1008
K162.2.2	13444 × 7518
K195.1.2, K208.1.2, K208.4.1, K208.4.2, K228.5.1, K228.9.2, K233.2.1, K233.2.2, K233.4.1, K233.4.2, S189.3.1, S219.3.2, S228.8.1, S228.9.1, S228.10.2, S233.1.2, S228.13.1, S228.13.2, S228.21.2, S233.1.1, S233.5.1	56515 × 8207
K199.8.2, K199.16.1, K199.16.2	56515 × BRA1398
K138.1.1	BRA1008 × 56515
K142.2.2, S194.6.1	56515 × CGN14044

storage was performed as conidial suspensions in a concentration of 1 to 3×10^6 conidia/ml in Czapek-Dox medium (4,7) supplemented with 25% glycerol. Inoculum was produced by adding 500 μ l of spore stock solutions to 250 ml of potato dextrose broth. The cultures were subsequently incubated for 7 days at 23°C on a rotary shaker (100 RPM). The resulting suspension was filtered through sterile gauze. Spore concentration was determined with a hemacytometer and diluted to give 1×10^6 spores ml⁻¹.

The winter oilseed rape cultivars, 'Express' (moderately tolerant) and 'Falcon' (highly susceptible), were used as controls in all experiments. Seeds of the control and test plants were surface-sterilized by immersion in 70% ethanol for 15 min. Subsequently, the seeds were washed in sterilized tap water before being sown in double-autoclaved silica sand. Seedlings appeared after 3 to

7 days, and 7 days later the roots were carefully washed out of the sand. Inoculations were performed by cutting 2 cm off the root apex and submerging the capped roots for 30 min in a mixed conidial suspension (10^6 ml⁻¹) of both *V. longisporum* isolates VL 43 and VL 40. Roots of control plants were also cut and submerged in tap water for the same length of time. A total of 24 inoculated seedlings and 24 control plants of each accession were transferred into a mixture of sand, peat, and compost (1:1:2) in pots containing two plants each. Plants were grown at 23°C in a greenhouse with a lighting regime of 14/10 h (light/dark). Plants were not fertilized during the investigations. Each plant was scored weekly for disease symptoms over a 4-week time period using an assessment key (Table 3) slightly modified from Zeise (24).

Statistical analysis of data. For each accession tested, the area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated from the disease severity values according to the following formula from Campbell and Madden (1): $AUDPC = \sum (y_i + y_{i+1}/2) \times (t_{i+1} - t_i)$, where y_i is the disease severity value for observation number i , t_i is the number of days after inoculation at the time point of observation number i , and n is the number of observations. To compensate for a fluctuating infection level between the trials a correction of the AUDPC value for each accession was made based on the reaction of the internal controls. The corrected value ($AUDPC_{corr}$) was calculated as follows:

$$AUDPC_{corr} = \frac{AUDPC}{(AUDPC_{Express} + AUDPC_{Falcon})/2}$$

TABLE 3. Assessment key for scoring disease severity of *Verticillium longisporum* in *Brassica* species using the root dip inoculation method

Score	Symptom development
1	No symptoms
2	Symptoms (yellowing, black veins) on the youngest leaves
3	Symptoms on the next older leaves
4	≤50% of leaves show symptoms
5	>50% of leaves show symptoms
6	≤50% of leaves are dead
7	Only shoot meristem still alive
8	Plant is dead

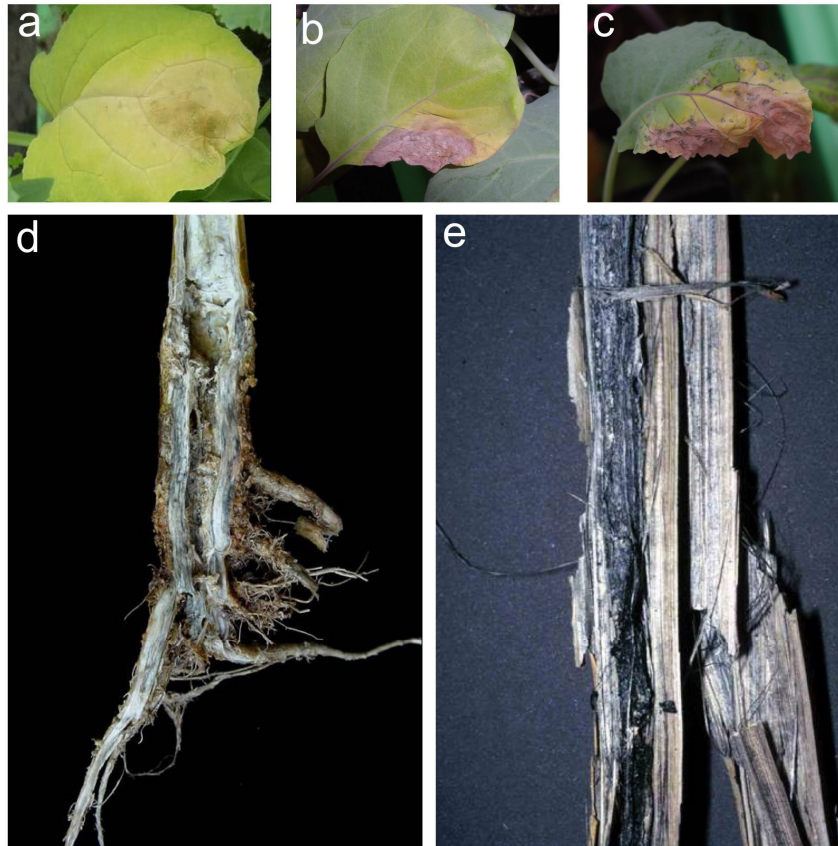


Fig. 1. Typical *Verticillium longisporum* disease symptoms on A, B, and C, young leaves, D, roots, and E, stem of *Brassica napus* plants.

Phenotype data of RS lines was statistically analyzed with the software package SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC). A general linear model procedure was used to identify RS lines with a significantly lower AUDPC_{corr} value than cultivar Express, which in comparison to other currently available European winter oilseed rape cultivars shows a relatively high tolerance to *V. longisporum* (11).

RESULTS

Resistance screening. A broad range of resistance was observed among the tested materials. Examples of disease symptoms in susceptible oilseed rape plants are shown in Figure 1. Resistance responses of the tested *B. rapa* and *B. oleracea* genotypes, along with the oilseed rape controls, 'Express' and 'Falcon', measured by AUDPC_{corr} value, are shown in Figure 2. The tested plants of the *B. oleracea* accessions showed predominantly good resistance. With the exception of five accessions, the resistance phenotype was verified in all of the *B. oleracea* lines that were reported as *V. longisporum*-resistant by Happstadius et al. (11). In addition, two new resistant *B. oleracea* genotypes were identified, namely accession 1428 (white cabbage 'Kashirka 202') and accession 2070 (white cabbage 'Ladozhskaya'). The tested plants of both of these accessions showed consistently good resistance, with mean AUDPC_{corr} values comparable to the most resistant cabbage accessions identified by Happstadius et al. (11).

In comparison to the relatively high level of resistance among the *B. oleracea* accessions, the *B. rapa* accessions exhibited a predominantly susceptible or only moderately resistant phenotype. The highest level of susceptibility was observed in the Indian

Yellow Sarson cv. YS Pb-24. On the other hand, the accessions 13444 and G454 'Granat' showed moderate resistance phenotypes. However, of these two potentially promising *B. rapa* resistance donors, only the accession 13444 gave rise to RS plants that produced sufficient seed for resistance screening. A total of 18 RS lines with sufficient seed were produced from *B. rapa* accession 13444, crossed with various resistant *B. oleracea* accessions. The remaining 27 RS lines that produced sufficient seed for pathogenicity testing all derived from the moderately susceptible *B. rapa* accession 56515, suggesting that the other *B. rapa* accessions that were used may have a negative effect on fertility or fecundity of the resulting RS genotypes.

The 45 RS lines that were tested in the pathogenicity screening showed a large variation in their response to *V. longisporum* infection (Fig. 3). This reflects the heterozygous nature of the *B. rapa* and *B. oleracea* gene bank accessions, which were in most cases self-incompatible. Statistical data analysis of AUDPC_{corr} values of all RS lines in relation to the control cultivar Express, confirmed that 37 RS lines (82%) showed significantly lower symptom scores ($P \leq 0.0194$) than the moderately tolerant control. Unexpectedly, the RS lines derived from the moderately susceptible *B. rapa* accession 56515 showed significantly higher resistance ($P = 0.001$) than RS lines derived from crosses with the more resistant *B. rapa* accession 13444, irrespective of the *B. oleracea* resistance donor. This implies that the resistance factors from the respective *B. oleracea* donors are more effective in combination with resistance from the *B. rapa* accession 56515. The seven most resistant RS lines were derived from crosses between plants of *B. rapa* accession 56515 and *B. oleracea* accession 8207. Interestingly, none of the RS lines derived from

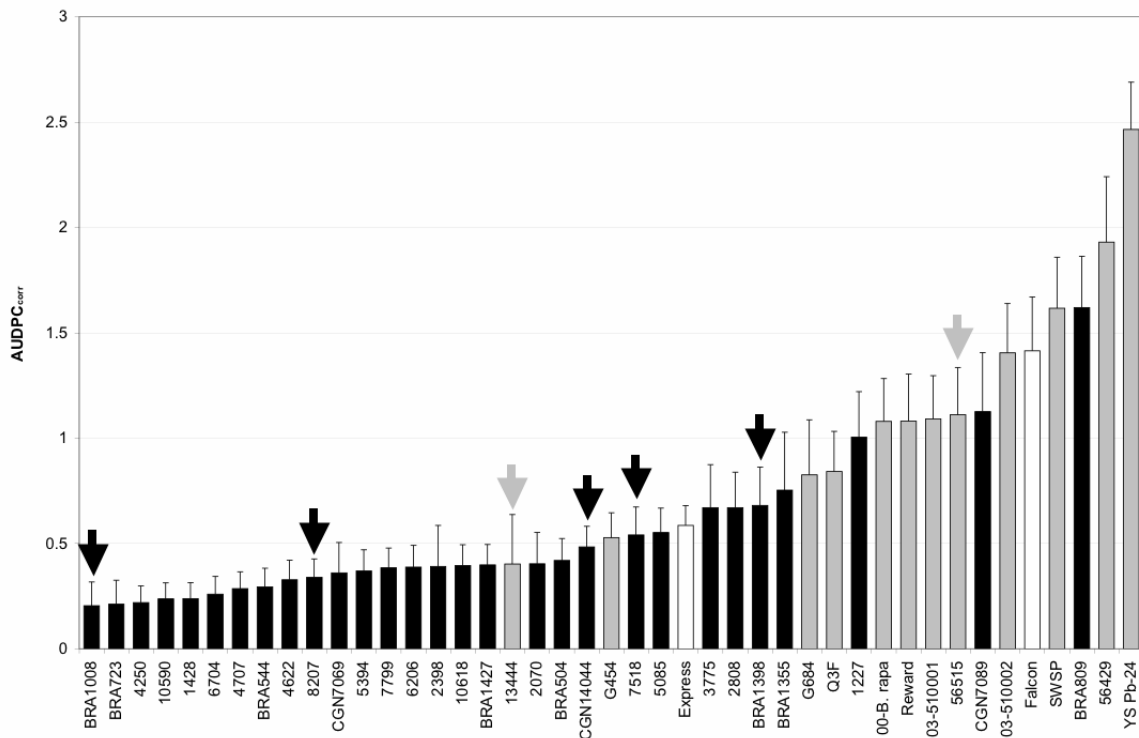


Fig. 2. *Verticillium longisporum* resistance responses measured by area under the disease progress curve (AUDPC_{corr}) for *Brassica rapa* (gray) and *B. oleracea* (black) accessions compared to the reference oilseed rape cultivars Express and Falcon (white). Columns and bars represent mean values and standard errors, respectively, from 20 infected plants of each accession. Arrows show accessions from which resistant resynthesized *B. napus* lines were successfully regenerated via embryo rescue-assisted interspecific hybridization.

the cross *B. rapa* 13444 × *B. oleracea* 8207 showed a high level of resistance, suggesting a possible antagonism between the respective resistance mechanisms of these two donors. On the other hand, the high resistance of the RS lines from *B. rapa* 56515 × *B. oleracea* 8207 in comparison to the lines from *B. rapa* 13444 × *B. oleracea* 8207 appears to confirm that we have succeeded in effectively combining two different *B. oleracea* and *B. rapa* resistance sources in RS oilseed rape genotypes with a high level of quantitative resistance.

DISCUSSION

Broadening the narrow genetic basis of *B. napus* through interspecific or intergeneric hybridization is an important strategy for resistance breeding. The *Brassica* B-genome species *B. juncea*, *B. carinata*, and *B. nigra* have been used in many studies to transfer resistance against *Leptosphaeria maculans* to oilseed rape (2,6,17,18,21), however the development of new oilseed rape cultivars with B-genome resistance has proved difficult in many cases. On the other hand the use of *B. rapa* and *B. oleracea* genotypes as resistance donors can circumvent this problem because these are the ancestral parents of *B. napus* and their chromosomes have remained more or less intact in the amphidiploid genome (16). Crouch et al. (3) and Diederichsen and Sacristan (5) successfully transferred resistance against *L. maculans* and *Plasmodiophora brassicae*, respectively, from *B. rapa* to *B. napus*. These two studies led to the development of new winter oilseed rape cultivars carrying resistance to blackleg and clubroot disease, respectively. However, in both cases the resistance was overcome in a relatively short time by virulent pathogen races. On the other hand, the identification of genetically diverse resistance sources in different *B. rapa* and *B. oleracea* accessions opens the possibility for direct combination of different resistance genes. Combination or pyramiding of resistance sources can potentially provide a more durable and sustainable resistance.

In the present study two previously unknown *B. oleracea* sources of *Verticillium* resistance (accessions 1428 and 2070) were identified and the resistance phenotypes of other cabbage accessions were verified. Moreover, a resistance screening of *B. rapa* accessions led to the discovery of two lines (accessions 13444 and G545) with moderate resistance to *V. longisporum*. The combination of different *B. oleracea* and *B. rapa* resistance in RS *B. napus* resulted in a high level of resistance that in some cases surpassed the expectation based on the resistance levels observed in the respective parental lines. The best-performing interspecific hybrids showed considerably higher resistance than the variety Express, one of the most *V. longisporum*-tolerant cultivars available in Germany. Particularly high resistance was achieved in RS lines derived from combination of *B. rapa* accession 56515 and *B. oleracea* 8207, although other *B. rapa* parents showed higher levels of resistance.

Standard errors of the means were clearly higher in the resistance experiment of the *B. rapa* and *B. oleracea* lines, which can be explained by the heterogeneous condition of the material. Diploid *Brassica* species possess a sporophytic homomorphic self-incompatibility system that prevents self-fertilization and promotes outbreeding. For this reason it can be assumed that many of the donor plants that were used for the interspecific hybridizations may have been heterozygous at the relevant resistance gene loci. This suggestion is supported by the large variation of resistance response among the RS lines derived from the same resistant accessions. By crossing these heterozygous plants, many different combinations of resistance sources are possible in the progenies. The most resistant RS phenotypes can be expected to represent an accumulation of the most effective genes in a single homozygous *B. napus* genotype. The sporophytic self-incompatibility common in the diploid *Brassica* species is generally suppressed in the amphidiploid *B. napus*. However, we observed a great variation among the RS plants in their self-fertility and fecundity. The resistant lines described here, how-

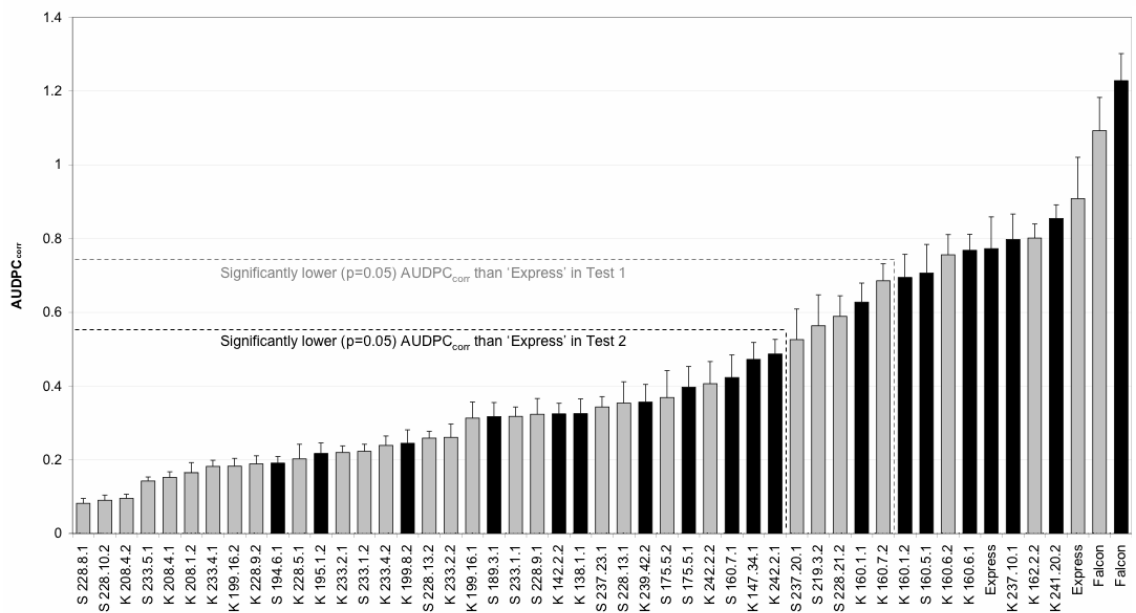


Fig. 3. *Verticillium longisporum* resistance responses of 45 resynthesized oilseed rape lines, along with the reference oilseed rape cultivars Express and Falcon, measured by normalized areas under the disease progress curve (AUDPC_{corr}). The light and dark bars represent results from two independent resistance experiments (test 1 and 2) along with the respective controls from each of the two tests. Columns and bars represent mean values and standard errors, respectively, from 20 infected plants of each accession. The dashed horizontal lines show the significance levels ($P = 0.05$) in each of the two tests for significantly lower AUDPC_{corr} than Express in the respective resistance tests.

ever, showed a good self-fertility and high seed-set, hence they are useful candidates for backcross breeding towards introgression of the resistances into elite oilseed rape lines.

Simultaneous introgression of numerous different resistance loci can be difficult, particularly in the case of quantitative resistance. To ensure that resistant genotypes have as many contributing resistance loci as possible, the development of molecular markers for pyramiding of different A- and C-genome resistances (with potentially complementary resistance mechanisms) is desirable. For this purpose the different RS *B. napus* lines identified in the current study are presently being crossed to susceptible lines for the generation of segregating mapping populations. By testing such material both in greenhouse tests and under field conditions this should allow us to (i) study and compare the genetic basis of the different resistances, (ii) map quantitative trait loci for identification of selection markers closely linked to major resistance loci, and (iii) to select promising resistant oilseed rape lines for the development of new cultivars with resistance to *V. longisporum*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Association for Promotion of Private German Plant Breeding (GFP) and the Agency for Renewable Resources (FNR) of the Federal Ministry for Nutrition, Agriculture, and Consumer Protection (BMELV). We thank R. Kürschner, S. Sahnner, and J. Schaper for excellent technical assistance.

LITERATURE CITED

- Campbell, C. L., and Madden, L. V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley, New York.
- Chèvre, A. M., Eber, F., This, P., Barret, P., Tanguy, X., Brun, H., Delseny, M., and Renard, M. 1996. Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus*-*B. nigra* addition lines. Plant Breed. 115:113-118.
- Crouch, J. H., Lewis, B. G., and Mithen, R. F. 1994. The effect of A genome substitution on the resistance of *Brassica napus* to infection by *Leptosphaeria maculans*. Plant Breed. 112:265-278.
- Czapek, F. 1902. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Pflanzen. Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 2:540-560.
- Diederichsen, E., and Sacristan, M. D. 1996. Disease response of resynthesized *Brassica napus* L. lines carrying different combinations of resistance to *Plasmodiophora brassicae*. Wor. Plant Breed. 115:5-10.
- Dixelius, C. 1999. Inheritance of the resistance to *Leptosphaeria maculans* of *Brassica nigra* and *B. juncea* in near-isogenic lines of *B. napus*. Plant Breed. 118:151-156.
- Dox, A. W. 1910. The intracellular enzymes of *Penicillium* and *Aspergillus* with special references to those of *P. camemberti*. U.S. Dep. Agric. Bur. Anim. Ind. Bull. 120:1-170.
- Dreyer, F., Graichen, K., and Jung, C. 2001. A major quantitative trait locus for resistance to Turnip yellows virus (TuYV, syn. beet western yellows virus, BWYV) in rapeseed. Plant Breed. 120:457-462.
- Dunker, S., Keunecke, H., and von Tiedemann, A. 2006. *Verticillium longisporum* in winter oilseed rape—Impact on plant development and yield. Integrated Control Oilseed Crops 29:365-374.
- Fähling, M., Graf, H., and Siemens, J. 2003. Pathotype separation of *Plasmodiophora brassicae* by the host plant. J. Phytopathol. 151:425-430.
- Happstadus, I., Ljungberg, A., Kristiansson, B., and Dixelius, C. 2003. Identification of *Brassica oleracea* germplasm with improved resistance to *Verticillium* wilt. Plant Breed. 122:30-34.
- Heale, J. B., and Karapapa, V. K. 1999. The *Verticillium* threat to Canada's major oilseed crop: Canola. Can. J. Plant Pathol. 21:1-7.
- Karapapa, V. K., Bainbridge, B. W., and Heale, J. B. 1997. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. Nov. pathogenic to oilseed rape. Mycol. Res. 101:1281-1294.
- Li, L., Paolillo, D. J., Parthasarathy, M. V., DiMuzio, E. M., and Garvin, D. F. 2001. A novel gene mutation that confers abnormal patterns of β -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Plant J. 26:59-67.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497.
- Parkin, I. A. P., Sharpe, A. G., Keith, D. J., and Lydiate, D. J. 1995. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). Genome 38:1122-1131.
- Roy, N. N. 1978. A study on disease variation in the populations of an interspecific cross of *Brassica juncea* L. $\times$ *B. napus* L. Euphytica 27:145-149.
- Sacristán, M. D., and Gerdemann, M. 1986. Different behavior of *Brassica juncea* and *B. carinata* as sources of *Phoma lingam* resistance in experiments of interspecific transfer to *B. napus*. Z. Pflanzenzücht. 97:304-314.
- Schnathorst, W. 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. Pages 81-111 in: Fungal Wilt Diseases of Plants. M. E. Mace, A. A. Bell, and C. H. Beckmann, eds. Academic Press, London, UK.
- Sprague, S. J., Balesdent, M. H., Brun, H., Hayden, H. L., Marcroft, S. J., Pinochet, X., Rouxel, T., and Howlett, B. J. 2006. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. Eur. J. Plant Pathol. 114:33-40.
- Struss, D., Quiros, C. F., Plieske, J., and Röbbelen, G. 1996. Construction of *Brassica* B genome synteny groups based on chromosomes extracted from three different sources by phenotypic, isozyme and molecular markers. Theor. Appl. Genet. 93:1026-1032.
- Walsh, J. A., Sharpe, A. G., Jenner, C. E., and Lydiate, D. J. 1999. Characterization of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of TuRB01. Theor. Appl. Genet. 99:1149-1154.
- Zeise, K., and von Tiedemann, A. 2001. Morphological and Physiological Differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *V. longisporum*. J. Phytopathol. 149:469-475.
- Zeise, K. 1992. Gewächshaustest zur Resistenzprüfung von Winterraps (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) gegen den Erreger der Rapswelke *Verticillium dahliae* Kleb. Nachrichtenbl. Deutscher Pflanzenschutz 44:125-128.

3.2 Combination of resistance to *Verticillium longisporum* from zero erucic acid *Brassica oleracea* and oilseed *Brassica rapa* genotypes in resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines

Rygulla, W.¹, W. Friedt¹, F. Seyis¹, W. Lühs¹, C. Eynck², A. von Tiedemann² und R.J. Snowdon¹

¹Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, Justus Liebig Universität, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen

²Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Fachgebiet Allgemeine Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Georg-August-Universität Göttingen, Grisebachstrasse 6, D-37077 Göttingen

Manuskript publiziert in *Plant Breeding*, Vol. 126, Nr. 6, Seiten 596-602, Dezember 2007

Combination of resistance to *Verticillium longisporum* from zero erucic acid *Brassica oleracea* and oilseed *Brassica rapa* genotypes in resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines

W. RYGULLA¹, W. FRIEDT¹, F. SEYIS¹, W. LÜHS¹, C. EYNCK², A. VON TIEDEMANN² and R. J. SNOWDON^{1,3}

¹Department of Plant Breeding, Research Centre for BioSystems, Land Use and Nutrition, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany; ²Institute of Plant Pathology and Plant Protection, Georg August University, Grisebachstrasse 6, D-37077 Göttingen, Germany; ³Corresponding author, E-mail: rod.snowdon@agrar.uni-giessen.de

With 2 figures and 2 tables

Received January 5, 2007/Accepted March 20, 2007

Communicated by A. M. Chevre

Abstract

Resynthesized (RS) forms of rapeseed (*Brassica napus* L.; genome AACC, 2n = 38) generated from interspecific hybridization between suitable genotypes of its diploid progenitors *Brassica rapa* L. (syn. *campestris*; genome AA, 2n = 20) and *Brassica oleracea* L. (CC, 2n = 18) represent a potentially useful resource to introduce resistance against the fungal pathogen *Verticillium longisporum* into the gene pool of oilseed rape. Numerous cabbage (*B. oleracea*) accessions are known with resistance to *V. longisporum*; however, *B. oleracea* generally has high levels of erucic acid and glucosinolates in the seed, which reduces the suitability of resulting RS rapeseed lines for oilseed rape breeding. In this study resistance against *V. longisporum* was identified in the cabbage accession Kashirka 202 (*B. oleracea* convar. *capitata*), a zero erucic acid mutant, and RS rapeseed lines were generated by crossing the resistant genotype with two spring turnip rape accessions (*B. rapa* ssp. *olerifera*) with zero erucic acid. One of the resulting zero erucic acid RS rapeseed lines was found to have a high level of resistance to *V. longisporum* compared with both parental accessions and with *B. napus* controls. A number of other zero erucic acid RS lines showed resistance levels comparable to the parental accessions. In the most resistant RS lines the resistance and zero erucic acid traits were combined with variable seed glucosinolate contents. Erucic acid-free RS rapeseed with moderate seed glucosinolate content represents an ideal basic material for introgression of quantitative *V. longisporum* resistance derived from *B. oleracea* and *B. rapa* into elite oilseed rape breeding lines.

Key words: *Brassica napus* — *B. rapa* — *B. oleracea* — *Verticillium longisporum* — resistance — resynthesized rapeseed — erucic acid

One of the most important pathogens of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*, genome AACC) in Europe is *Verticillium longisporum*, a soil-borne, vascular fungal pathogen that attacks rapeseed roots and causes premature ripening of the seeds (Karapapa et al. 1997). Chemical control of the disease is not possible because no approved fungicides are available, and, once established in a field, the fungus can survive for 10–15 years in the form of microsclerotia (Heale and Karapapa 1999). At present, no resistant oilseed rape cultivars are available, meaning that yield losses can be high on infested locations. The identification of new resistances and their introgression into elite oilseed rape lines are therefore important current breeding objectives.

Oilseed rape (*Brassica napus* L.; genome AACC, 2n = 38) is a relatively young species that originated through spontaneous

interspecific hybridizations between turnip rape (*B. rapa* L., syn. *campestris*; AA, 2n = 20) and cabbage (*B. oleracea* L.; CC, 2n = 18). After intensive breeding for oil and seed quality traits, the annual (spring rapeseed, canola) and biennial (winter rapeseed) oilseed forms of *B. napus* now represent one of the most important sources of vegetable oil worldwide. Due to this intensive selection process, however, current breeding lines have a narrow genetic basis (Becker et al. 1995, Girke et al. 1999, Seyis et al. 2003, Hasan et al. 2006). In particular, the availability of novel germplasm for resistance breeding is often extremely limited. For example, current European cultivars possess only a low level of tolerance against *V. longisporum*, meaning that heavy infection can cause major yield losses.

One option to enlarge the available gene pool for oilseed rape breeding is the use of interspecific crosses between diverse *B. rapa* and *B. oleracea* genotypes. This strategy of resynthesizing novel *B. napus* genotypes from the two diploid progenitors has been adopted in the past for introduction of resistance genes against turnip yellows virus (TuYV; Dreyer et al. 2001), turnip mosaic virus (TMV; Walsh et al. 1999) and also important fungal pathogens including *Phoma lingam* (Crouch et al. 1994) and *Plasmiodiophora brassicae* (Diederichsen and Sacristan 1996). The two latter studies led to the development of new winter oilseed rape cultivars carrying resistance to blackleg and clubroot disease, respectively. In all these cases the introduced resistance alleles derived from the *B. rapa* donor. More recently, Happstadius et al. (2003) reported on resistance to *V. longisporum* in different cabbage accessions and generated resynthesized (RS) rapeseed lines containing the resistance from the *B. oleracea* genome donor. Because of their substandard agronomic performance, e.g. 20–30% lower seed production in comparison with standard varieties (Ahmadi 1988, Engqvist and Becker 1994), introduction of germplasm from RS lines into elite breeding material requires extensive backcrossing to reduce linkage drag. Furthermore, RS rapeseed genotypes almost always contain high amounts of undesired seed erucic acid and glucosinolates and are therefore not broadly used in breeding programmes. On the other hand, a systematic selection of desired attributes within the parental species and subsequent combination via interspecific crosses could reduce the degree of linkage drag in the primary RS

lines and therefore significantly reduce the subsequent breeding effort.

Seed erucic acid (C22:1) content in diploid *Brassica* species is controlled by additive dominant alleles of the *fatty acid elongase* gene *FAE1* (Das et al. 2003). In *B. napus* two homologous copies of this gene are contributed from *B. rapa* and *B. oleracea*, respectively, and four recessive alleles are necessary for the absence of erucic acid. This article describes a *B. oleracea* accession containing zero erucic acid mutants that were found to display a high level of resistance against *V. longisporum*. Through interspecific crosses with spring turnip rape (*B. rapa* ssp. *oleifera*) genotypes possessing 00 quality (zero erucic acid, low glucosinolate content) and 0 quality (zero erucic acid, high glucosinolate content), respectively, a number of RS rapeseed progenies were developed that exhibit moderate to strong resistance to *V. longisporum* in a 0+ quality background (zero erucic acid, variable glucosinolate content). These were compared with resistance in RS lines from crosses including a *B. rapa* with ++ quality (high erucic acid, high glucosinolate content). The new material is discussed regarding the potential for resistance breeding in oilseed rape.

Materials and Methods

Plant materials: Resynthesized lines of rapeseed, *B. napus*, were generated from interspecific crosses of different plants belonging to the white cabbage accession Kashirka 202 (*B. oleracea* convar. *capitata*, Accession No. 1428, Vavilov Research Institute Gene Bank, St. Petersburg, Russia) with the following three *B. rapa* parents: (1) an apetalous yellow-seeded spring turnip rape with 00 quality (*B. rapa* ssp. *oleifera*; kindly provided by Norddeutsche Pflanzenzucht GmbH, Hohenlieth, Germany); (2) the 0+ quality spring turnip rape cultivar 'Asko' (*B. rapa* ssp. *oleifera*, BAZ Genebank, Braunschweig, Germany, Accession No. 54595); and (3) the ++ quality yellow-seeded Indian *B. rapa* ssp. *trilocularis* (Yellow Sarson) variety 'YSPb-24' (seed obtained from Haryana Agricultural University, Hisar, India). Because the Kashirka 202 accession showed segregation for fatty acid contents indicating heterozygosity, the genotypes used as parents for the RS lines were raised from half-seeds after determination of their individual fatty acid compositions by gas chromatography on the basis of half-seed analysis (Thies 1971). Production of the RS lines was described previously by Seyis et al. (2005). To enhance the efficiency of interspecific crossing, the embryo rescue technique was used to regenerate *in vitro* haploid plants. Cuttings from the hybrids were treated with colchicine in order to obtain amphidiploid *B. napus* plants that were self-pollinated for at least one generation for seed multiplication. Absolute fatty acid compositions of the RS lines were also determined by gas chromatography and seed glucosinolate contents were estimated by near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS).

Confirmation of hybridity: Chromosome preparations of all RS lines were generated from root-tip preparations treated with 2 mM 8-hydroxyquinoline using the procedure described for *Brassica* chromosomes by Schelfhout et al. (2004), and after staining with the blue fluorescent dye DAPI the mitotic chromosomes were counted in 10 metaphases from each line under a fluorescence microscope.

The amphidiploid genome composition of the RS rapeseed lines was confirmed by PCR with a set of simple sequence repeat (SSR) markers from the collection available in the public domain (Lowe et al. 2002, 2004; see <http://www.brassica.info/ssr/SSRinfo.htm>). Markers were selected to distinguish homologous loci derived from the *B. rapa* and *B. oleracea* parents. For the three RS lines with best resistance phenotype FS B1/3.3, FS 94.3 and FS 32.2.1 six primer combinations that amplified different alleles in the two diploid genomes were used to verify the presence of alleles from both diploid parents. A standard

CTAB extraction protocol (Doyle and Doyle 1990) was used to isolate DNA from young leaves of the *B. napus* RS lines and the parental genotypes. PCR reactions were carried out in a volume of 12 µl containing 16 ng of DNA template, 0.75 pmol of each primer, 0.2 mM dNTP mix, 1 mM MgCl₂, 1× PCR reaction buffer (with 15 mM MgCl₂; Eppendorf) and 0.25 U of Taq DNA polymerase (Eppendorf). PCR products were labelled with the M13-tailing technique described by Berg and Olaisen (1994). PCR was performed in a GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler using a standard touchdown PCR procedure, and amplification products were separated and visualized using a LI-COR GeneReader 4200 DNA Analyzer (MWG Biotech, Ebersberg, Germany).

Resistance screening: Resistance tests were performed using the *V. longisporum* isolates VL 43 and VL 40, which originate from *B. napus* grown in the North of Germany (Zeise and von Tiedemann 2001, 2002a,b). Long-term storage was performed as conidial suspensions in a concentration of 1–3 × 10⁶ conidia/ml in Czapek-Dox medium supplemented with 25% glycerol. Inoculum was produced by adding 500 µl of spore stock solutions to 250 ml potato dextrose broth. The cultures were subsequently incubated for 7 days at 23°C on a rotary shaker (100 r.p.m.). The resulting suspension was filtered through sterile gauze. Spore concentration was determined with a haemocytometer and diluted to give 1 × 10⁶ spores/ml.

Seeds of *B. napus* RS lines and the control varieties 'Express' and 'Falcon', along with *B. oleracea* and *B. rapa* accessions including the parents of the RS lines, were surface-sterilized by immersion in 70% ethanol for 15 min. Subsequently, the seeds were washed in sterilized tap water before being sown in double-autoclaved silica sand. Seedlings appeared after 3–7 days, and 7 days later the roots were carefully washed out of the sand. Inoculation was performed by cutting 2 cm off the root apex and submerging the shortened roots in a mixed conidial suspension (10⁶/ml) of both *V. longisporum* isolates VL 43 and VL 40 for 30 min. Roots of control plants were also cut and submerged in tap water for the same length of time. Subsequently, 24 inoculated plants and 24 control plants of each accession were transferred into a sand-peat-compost (1 : 1 : 2) mixture in pots containing two plants each. Plants were grown at 23°C in a greenhouse with a lighting regime of 14/10 h (light/dark). Plants were not fertilized until the end of the investigations. Each plant was scored weekly for disease symptoms over a time period of 4 weeks using an assessment key (Table 1) slightly modified from Zeise (1992). Area under the disease progress curve (AUDPC) values were calculated from the disease severity values according to the following formula from Campbell and Madden (1990):

$$\text{AUDPC} = \sum \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times t_{i+1} - t_i,$$

where y_i is the disease severity value for observation number i , t_i is the number of days after inoculation at the time point of observation number i , and n is the number of observations. Because infection with *V. longisporum* results in stunted growth, the difference in plant height between infected and non-infected plants was also documented in the

Table 1: Assessment key for scoring of *Verticillium longisporum* disease severity in virulence tests with root dip inoculation of *Brassica* species

Score	Symptom development
1	No symptoms
2	Symptoms (yellowing, black veins) on the youngest leaves
3	Symptoms on the next older leaves
4	≤50% of leaves show symptoms
5	> 50% of leaves show symptoms
6	≤50% of leaves are dead
7	Only shoot meristem still alive
8	Plant is dead

fourth week after inoculation. Data were statistically analysed with the software package SAS 9.1 (SAS Institute Inc.). A general linear model procedure was used to identify RS lines with a significantly lower AUDPC value than the cultivar 'Express', which in comparison with other currently available European winter oilseed rape varieties shows a relatively high tolerance to *V. longisporum* (Happstad et al. 2003). The relationship between AUDPC values and plant height was characterized by analysis of correlation.

Results

Hybridity of RS lines

A chromosome number of $2n = 38$ was confirmed in all mitotic metaphases observed from each of the lines tested and no aneuploids were observed. In addition, the analysis of the three RS lines and their progenitor species with SSR primers enabled the detection of A and C genome-specific microsatellite loci with different-sized alleles that could be used to verify the amphidiploid genome composition of the RS lines. All RS lines were confirmed as amphidiploid synthetic *B. napus* by the presence of a combination of all expected A and C genome loci. Examples of the SSR screening are shown in Fig. 1.

Seed quality

Fatty acid composition and glucosinolate contents of seeds from the RS rapeseed lines and their progenitors are summarized in Table 2. Half-seed analysis of the four different Kashirka 202 plants used as parents in the RS lines showed that three displayed zero erucic acid content. The half-seed from which one of the plants originated had an intermediate erucic acid content, however, indicating heterozygosity at the FAE1 gene locus. The RS lines that were derived from crosses between the zero erucic acid Kashirka 202 genotypes and the two different zero erucic acid *B. rapa* parents all displayed the expected zero erucic acid phenotype. This corresponds to the presence of four recessive alleles ($e_A e_A e_C e_C$) at the two *B. napus* FAE1 loci. The line HKSF1/2.1, derived from a cross between a zero erucic acid Kashirka 202 plant and 'YSPb-24', exhibits an intermediate erucic acid content (genotype $E_A E_A e_C e_C$) because 'YSPb-24' is homozygous for high erucic acid content. On the other hand, the line FS D4/1 has high erucic acid content, indicating that the Kashirka 202 parent of this line which, based on the half-seed fatty acid analysis, was heterozygous at FAE1, contributed a dominant allele (E_C) to

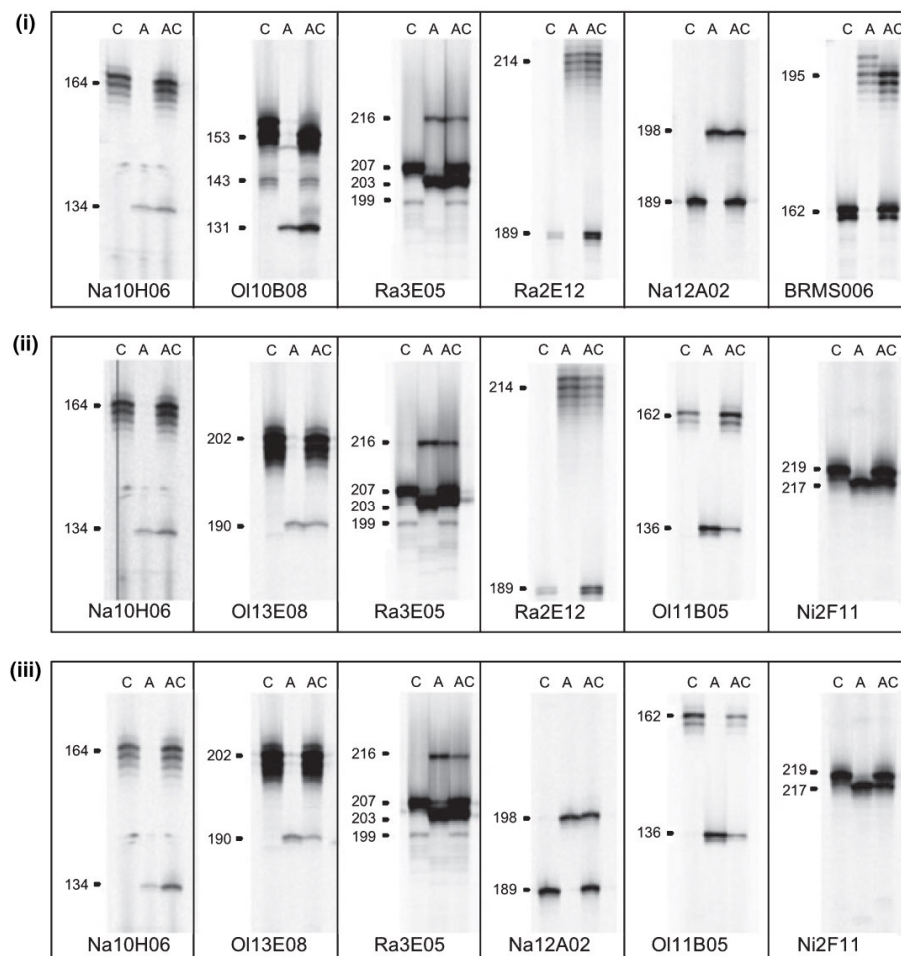


Fig. 1: PCR amplification products of *Brassica rapa*, *B. oleracea* and the three *Verticillium longisporum*-resistant resynthesized rapeseed lines (i) FS B1/3.3, (ii) FS 94.3 and (iii) FS 32.2.1 with simple sequence repeat (SSR) primers that amplify specific loci for the *Brassica* A and C genomes. Lengths of DNA fragments are given and marked with arrowheads

Table 2: Origin, seed fatty acid composition and glucosinolate contents of resynthesized rapeseed lines with resistance to *Verticillium longisporum* and their respective parental lines. Glucosinolate contents for two of the half-seed (HK) plants of *Brassica oleracea* Kashirka 202 could not be determined because insufficient seed was obtained from the self-pollinated plants

	Accession name	Species	Origin ¹	Absolute seed fatty acid content (% of total)						
				CI8:1	CI8:2	CI8:3	C22:1	Other	GSL (μmol/mg)	
Parental accessions	Kashirka 202 Hk CCBI	<i>B. oleracea</i> convar. capitata	NIV, Accession No. 1428	58.0	20.7	13.9	0.1	4.9	–	
	Kashirka 202 Hk CCC4	<i>B. oleracea</i> convar. capitata	NIV, Accession No. 1428	61.6	19.2	11.4	0.5	7.3	63.2	
	Kashirka 202 Hk CCC6	<i>B. oleracea</i> convar. capitata	NIV, Accession No. 1428	57.7	23.6	12.2	0.0	6.5	63.9	
	Kashirka 202 Hk CCD5	<i>B. oleracea</i> convar. capitata	NIV, Accession No. 1428	27.1	16.3	9.7	20.8	26.1	–	
RS lines	Apetalous <i>B. rapa</i> 'YSPb-24'	<i>B. rapa</i> ssp. <i>oleifera</i>	NPZ	60.2	25.4	9.2	0.0	5.2	14.0	
	'Askö'	<i>B. rapa</i> ssp. <i>trilocularis</i>	HAU	13.4	9.1	6.5	56.2	14.8	130.8	
	FS B1/3.3	<i>B. rapa</i> ssp. <i>oleifera</i>	BAZ, Accession No. 54595	56.5	19.5	17.8	0.1	6.1	71.8	
	FS B1/4	Resynthesized <i>B. napus</i>	Kashirka 202 Hk CCBI × 'Askö'	65.5	17.1	9.9	0.0	7.5	90.4	
	FS 7.2	Resynthesized <i>B. napus</i>	Kashirka 202 Hk CCC1 × 'Askö'	57.6	22.0	13.2	0.1	7.1	111.6	
	FS 94.3	Resynthesized <i>B. napus</i>	Apet. <i>B. rapa</i> × Kashirka 202 Hk CCC4	60.4	23.6	7.5	0.1	8.4	91.4	
	FS 31.2.1	Resynthesized <i>B. napus</i>	Apet. <i>B. rapa</i> × Kashirka 202 Hk CCC6	46.7	28.6	16.9	0.1	7.7	86.6	
	FS 54.1.1	Resynthesized <i>B. napus</i>	Apet. <i>B. rapa</i> × Kashirka 202 Hk CCC6	51.9	21.2	19.8	0.0	7.1	96.4	
	HK sf 1/2.1	Resynthesized <i>B. napus</i>	Apet. <i>B. rapa</i> × Kashirka 202 Hk CCC6	58.6	22.9	10.8	0.0	7.7	77.8	
	FS D4/1	Resynthesized <i>B. napus</i>	Kashirka 202 Hk CCC6 × 'YSPb-24'	26.0	8.9	11.0	31.5	22.6	134.1	
			Kashirka 202 Hk CCD5 × 'YSPb-24'	10.3	11.3	9.5	57.0	11.9	124.4	

¹NIV: Genebank of the NI Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), St. Petersburg, Russia; BAZ: Genebank of the Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants, Braunschweig, Germany; NPZ: Norddeutsche Pflanzenzüchtung Hans-Georg Lembke KG, Hohenlieth, Germany; HAU: Haryana Agricultural University, Hissar, India.

the haploid hybrid. In the RS line FS B1/3.3 the zero erucic acid trait was combined with an oleic acid (C18:1) level of 65.5% accompanied by 17.1% linoleic (C18:2) and 9.9% linolenic acid (C18:3).

The seed glucosinolate contents of the parental *B. rapa* genotypes varied from around 14 μmol/mg dry matter in the 00 quality apetalous turnip rape up to around 130 μmol/mg in 'YSPb-24'. Glucosinolate levels of around 63 μmol/mg were obtained in self-pollinated seed from two of the Kashirka 202 plants used as cross parents for the RS lines; in the other two plants insufficient seed was obtained for NIRS measurements. The glucosinolate contents of the RS lines generally reflected the variation in the respective *B. rapa* parents, with the lines derived from 'YSPb-24' (HK sf 1/2.1 and FS D4/1) showing very high levels. As expected, two of the RS lines derived from the apetalous *B. rapa* parent with 00 quality showed the lowest seed glucosinolate levels. However, one of the two RS lines derived from *B. rapa* 'Askö' also showed moderate levels of glucosinolates.

Resistance screening

Resistance responses of the parental genotypes, RS lines and the rapeseed controls 'Express' and 'Falcon', measured by AUDPC on the one hand and relative plant height in comparison with non-infected controls on the other, are shown in Fig. 2a and b, respectively. Unfortunately no resistance data could be obtained for *B. rapa* 'Askö' because the available seeds failed to germinate in the resistance tests. The plants of the *B. oleracea* accession tested showed consistently good resistance with a mean AUDPC value comparable to other cabbage accessions with resistance to *V. longisporum* (Happstad et al. 2003, W. Rygulla, C. Eynck, unpublished results). In comparison with the relatively tolerant oilseed rape variety 'Express', all of the RS rapeseed lines tested had significantly lower average AUDPC values. The *B. rapa* parent 'YSPb-24' showed extremely high susceptibility to *V. longisporum*, with both the AUDPC and the level of growth stunting being comparable to the highly susceptible *B. napus* control variety 'Falcon'. Despite the absence of resistance in the *B. rapa* parent the two RS lines FS D4/1 and HK sf 1/2.1 derived from Kashirka 202 × 'YSPb-24' showed moderate and high resistance, respectively. The difference in resistance between these two lines indicates that the different Kashirka 202 plants used as cross parents for FS D4/1 and HK sf 1/2.1 may have donated different resistance alleles. Similarly, the two RS lines FS B1/3.3 and FS B1/4 with 'Askö' as *B. rapa* parent show very high and high resistance, respectively. The resistance level of FS B1/4 is comparable to that of Kashirka 202, whereas FS B1/3.3 has a considerably higher resistance level than the cabbage parent. This may indicate a contribution of resistance alleles from the untested *B. rapa* parent 'Askö'. The four RS rapeseed lines derived from the apetalous *B. rapa* parent showed high (FS 94.3 and FS 31.2.1) to moderate (FS 54.1.1 and FS 7.2) resistance, and the apetalous *B. rapa* line showed significantly higher resistance than the *B. napus* controls and Yellow Sarson 'YSPb-24'.

A highly significant negative correlation ($r = -0.86$; $P = 0.0002$) was found between *V. longisporum* resistance levels, assessed by calculation of AUDPC values from symptom scores, and the relative difference in plant height between infected and non-infected plants. The relationship between AUDPC and relative plant height among the parental genotypes, RS lines and *B. napus* controls is shown in Fig. 2. The

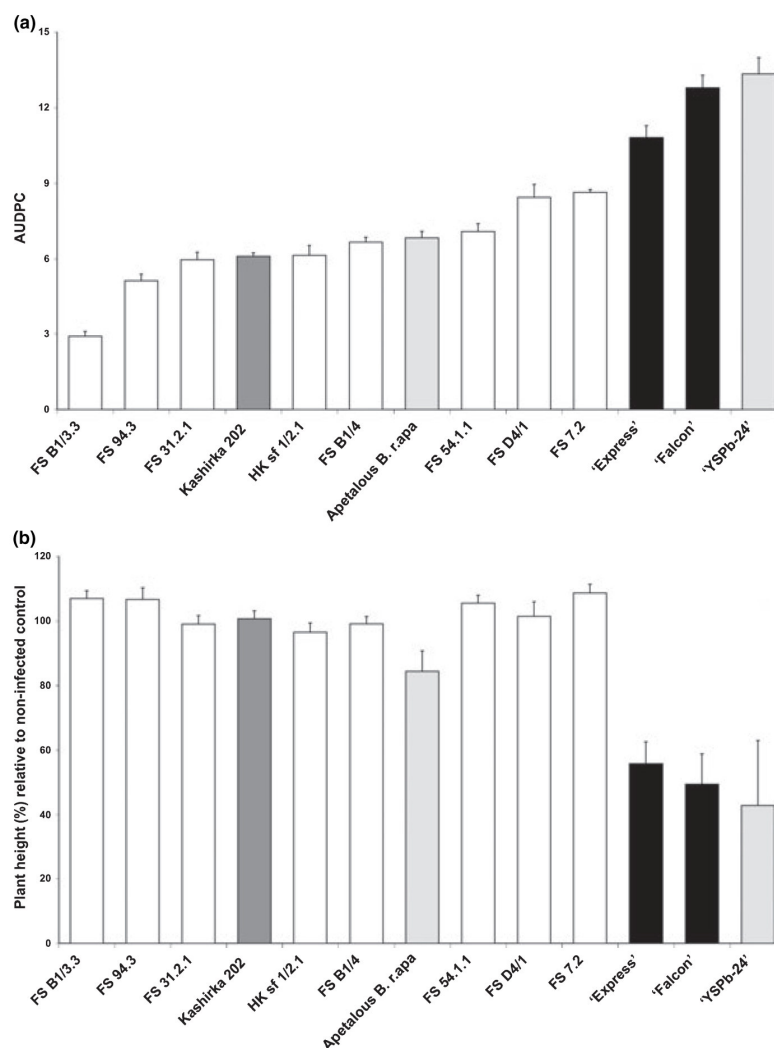


Fig. 2: *Verticillium longisporum* resistance responses of *Brassica rapa* (light grey) and *B. oleracea* (dark grey) parental accessions, resynthesized rapeseed lines (white) and reference rapeseed cultivars 'Express' and 'Falcon' (black) measured by (a) area under the disease progress curve (AUDPC), and (b) relative plant height at 28 days post-inoculation compared to non-infected control plants of the respective accession. Columns and whiskers represent mean values and standard errors from 20 infected plants of each accession

mean height of infected plants from the highly susceptible *B. rapa* parent 'YSPb-24' was significantly reduced ($P = 0.0002$) on average to 42.88% relative to non-infected plants, whereas the apetalous *B. rapa* showed only a minor and non-significant ($P = 0.166$) reduction in plant height to 84.4% after infection. The *B. napus* varieties 'Express' and 'Falcon' were stunted by *V. longisporum* infection to 49.47% (significant at $P < 0.0001$) and 55.83% (significant at $P < 0.0001$) of their non-infected controls, respectively. The resistant RS lines had relative plant heights ranging from 96.53% to 108.72% of their non-infected controls. The two lines FS B1/3.3 and FS 7.2 responded to infection with a significant increase in plant height ($P = 0.0356$ and 0.0362 , respectively), whereas in all other RS lines and *B. oleracea* Kashirka 202 no significant effect of infection on plant height was observed.

Discussion

Novel *B. napus* genotypes developed through interspecific crosses between diverse *B. rapa* and *B. oleracea* genotypes,

assisted by embryo rescue techniques, have the potential to significantly increase the available gene pool and provide important basic germplasm for further improvements to seed yield, seed quality traits, disease and pest resistance. A number of *B. oleracea* gene-bank accessions were identified by Happstadius et al. (2003) that include plants with high levels of resistance to the important oilseed rape pathogen *V. longisporum*. Such genotypes represent interesting new germplasm for the development of resistant oilseed rape varieties. However, introgression of resistance genes from interspecific hybrids generally requires extensive backcrossing to elite material to reduce linkage drag for negative quality and yield characters. In the present study, a new *B. oleracea* source of resistance to *V. longisporum* was identified in the cabbage accession Kashirka 202, and in some genotypes the resistance was combined with absence of seed erucic acid, a trait that is uncommon in *B. oleracea*. Furthermore, novel *B. rapa* resistances were identified for the first time in a 0+ quality oilseed turnip rape and potentially in another oilseed turnip rape with 00 seed quality. By combining these different A and C genome

resistance sources in new *RS B. napus* genotypes material has been generated that should be extremely interesting for the introgression of genetic variation for quantitative resistance to *V. longisporum* into elite oilseed rape breeding material.

Erucic acid biosynthesis in *B. napus* is controlled by two homologous codominant genes (Jönsson 1977, Ecke et al. 1995, Barret et al. 1998), one each from the respective diploid A and C donor genomes. On the other hand, seed glucosinolate content is a complex trait, with major homoeologous quantitative trait loci (QTL) on four chromosomes from both the A and the C genomes contributing substantially to the phenotype along with further minor contributing QTLs (Howell et al. 2003). In backcrossing programmes aiming at the transfer of resistance traits from *RS* rapeseed into elite 00-quality oilseed rape breeding lines, a large degree of linkage drag for erucic acid and glucosinolate content can be expected due to the numerous loci involved in these two traits. On the other hand, the *RS* lines generated in the present study contain A-genome loci derived either from a 0- or 00-quality *B. rapa* parent combined with C-genome loci from an erucic acid-free cabbage mutant. Hence no linkage drag is present for erucic acid content, and the A-genome chromosomes of the four *RS* lines derived from the 00 quality apetalous *B. rapa* carry alleles free of linkage drag for high glucosinolate content. The most resistant *RS* line FS B1/3.3 has a fatty acid profile comparable to conventional winter oilseed rape cultivars. Recurrent selection from crosses with elite oilseed rape lines can therefore be expected to rapidly give rise to genotypes containing high levels of resistance combined with 00 seed quality.

The combination of C-genome resistance from Kashirka 202 with *V. longisporum* tolerance from the A-genome donors can be expected to result in *RS* lines with a quantitative and therefore potentially more durable polygenic resistance. The availability of a broad spectrum of genetic variation for resistance against this important pathogen will have considerable advantages for breeding towards integrated crop protection in coming decades. The potential benefits of resynthesis for rapeseed breeding demonstrated in the present study underline the importance of efforts dealing with germplasm conservation and well-directed use of *B. rapa* and *B. oleracea* genetic resources.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Society for Promotion of Private German Plant Breeding (GFP and the Agency for Renewable Resources (FNR) of the Federal Ministry for Nutrition, Agriculture and Consumer Protection (BMELV). The authors thank Sonja Sahner and Roland Kürschner for excellent technical assistance.

References

Ahmadi, M. R., 1988: Charakterisierung der genetischen Variabilität von amphidiploiden resynthetischen Rapsformen und deren Ausgangseltern. Dissertation, Universität Göttingen, Göttingen.

Barret, P., R. Delourme, M. Renard, F. Domergue, R. Lessire, M. Delseny, and T. J. Roscoe, 1998: A rapeseed gene is linked to the E1 locus associated with variation in the content of erucic acid. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 177–186.

Becker, H. C., G. M. Engqvist, and B. Karlsson, 1995: Comparison of rapeseed cultivars and resynthesized lines based on allozyme and RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **91**, 62–67.

Berg, E. S., and B. Olaisen, 1994: Hybrid PCR sequencing – sequencing of PCR products using a universal primer. *Biotechniques* **17**, 896.

Campbell, C. L., and L. V. Madden, 1990: Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley, New York.

Crouch, J. H., B. G. Lewis, and R. F. Mithen, 1994: The effect of A genome substitution on the resistance of *Brassica napus* to infection by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Breeding* **112**, 265–278.

Das, S., T. J. Roscoe, M. Delseny, P. S. Srivastava, and M. Lakshmikanarayanan, 2003: Cloning and molecular characterization of the Fatty Acid Elongase 1 (FAE 1) gene from high and low erucic acid lines of *Brassica campestris* and *Brassica oleracea*. *Plant Sci.* **162**, 245–250.

Diederichsen, E., and M. D. Sacristan, 1996: Disease response of resynthesized *Brassica napus* L. lines carrying different combinations of resistance to *Plasmodiophora brassicae* Wor. *Plant Breeding* **115**, 5–10.

Doyle, J. J., and J. L. Doyle, 1990: Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13–15.

Dreyer, F., K. Graichen, and C. Jung, 2001: A major quantitative trait locus for resistance to Turnip Yellowing Virus (TuYV, syn. beet western yellows virus, BWYV) in rapeseed. *Plant Breeding* **120**, 457–462.

Ecke, W., M. Uzunova, and K. Weissleder, 1995: Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). 2. Localization of genes controlling erucic acid synthesis and seed oil content. *Theor. Appl. Genet.* **91**, 972–977.

Engqvist, G. M., and H. C. Becker, 1994: What can resynthesized *Brassica napus* offer to plant breeding? *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift* **104**, 87–92.

Girke, A., H. C. Becker, and G. Engqvist, 1999: Resynthesized Rapeseed as a New Genepool for Hybrid Breeding. Proc. 10th Int. Rapeseed Congr., September 1999, Canberra, Australia. <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/359.htm> last accessed: 18.05.07.

Happstadius, I., A. Ljungberg, B. Kristiansson, and C. Dixelius, 2003: Identification of *Brassica oleracea* germplasm with improved resistance to Verticillium wilt. *Plant Breeding* **122**, 30–34.

Hasan, M., F. Seyis, A. G. Badani, J. Pons-Kuhnemann, W. Lühs, W. Friedt, and R. J. Snowdon, 2006: Surveying genetic diversity in the *Brassica napus* gene pool using SSR markers. *Genet. Res. Crop Evol.* **53**, 793–802.

Heale, J. B., and V. K. Karapapa, 1999: The verticillium threat to Canada's major oilseed crop: canola. *Can. J. Plant Pathol.* **21**, 1–7.

Howell, P. M., A. G. Sharpe, and D. J. Lydiate, 2003: Homoeologous loci control the accumulation of seed glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome* **46**, 454–460.

Jönsson, R., 1977: Erucic acid heredity in rapeseed (*Brassica napus* L. and *Brassica campestris* L.). *Hereditas* **86**, 159–170.

Karapapa, V. K., B. W. Bainbridge, and J. B. Heale, 1997: Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov. pathogenic to oilseed rape. *Mycol. Res.* **101**, 1281–1294.

Lowe, A. J., A. E. Jones, A. F. Raybould, M. Trick, C. L. Moule, and K. J. Edwards, 2002: Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. *Mol. Ecol. Notes* **2**, 7–11.

Lowe, A. J., C. L. Moule, M. Trick, and K. J. Edwards, 2004: Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theor. Appl. Genet.* **108**, 1103–1112.

Schelfhout, C. J., R. J. Snowdon, W. A. Cowling, and J. M. Wroth, 2004: A PCR based B-genome specific marker in *Brassica* species. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 917–921.

Seyis, F., R. J. Snowdon, W. Lühs, and W. Friedt, 2003: Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars. *Plant Breeding* **122**, 473–478.

Seyis, F., W. Friedt, and W. Lühs, 2005: Development of resynthesized rapeseed (*Brassica napus* L.) forms with low erucic acid content through in *ovulum* culture. *Asian J. Plant Sci.* **4**, 6–10.

- Thies, W., 1971: Schnelle und einfache Analysen der Fettsäurezusammensetzung in einzelnen Rapskotyledonen I. Gaschromatographische und papierchromatographische Methoden. Z. Pflanzenzüchtg. **65**, 181—202.
- Udall, J. A., P. A. Quijada, and T. C. Osborn, 2005: Detection of chromosomal rearrangements derived from homoeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. Genetics **169**, 967—979.
- Walsh, J. A., A. G. Sharpe, C. E. Jenner, and D. J. Lydiate, 1999: Characterisation of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of TuRB01. Theor. Appl. Genet. **99**, 1149—1154.
- Zeise, K., 1992: Gewächshaustest zur Resistenzprüfung von Winter-raps (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) gegen den Erreger der Rapswelke *Verticillium dahliae* Kleb. Nachrichtenbl. Deutscher Pflanzenschutz. **44**, 125—128.
- Zeise, K., and A. von Tiedemann, 2001: Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *V. longisporum*. J. Phytopathol. **149**, 469—475.
- Zeise, K., and A. von Tiedemann, 2002a: Host specialization among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *Verticillium longisporum*. J. Phytopathol. **150**, 112—119.
- Zeise, K., and A. von Tiedemann, 2002b: Application of RAPD-PCR for virulence type analysis within *Verticillium dahliae* and *Verticillium longisporum*. J. Phytopathol. **150**, 557—563.

3.3 Identification of quantitative trait loci for resistance against *Verticillium longisporum* in oilseed rape (*Brassica napus*)

Rygulla, W¹., R.J. Snowdon¹, W. Friedt¹, I. Happstadius², W. Y. Cheung³ und D. Chen³

¹Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, Justus Liebig Universität, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen

²Svalöf Weibull AB, S-268 81 Svalöv, Sweden

³DNA Landmarks. Inc., Saint-Jean-sur-Richelieu 84, Quebec, Canada

Manuskript publiziert in *Phytopathology*, Vol. 98, Nr. 2, Seiten 215-221, Februar 2008

Identification of Quantitative Trait Loci for Resistance Against *Verticillium longisporum* in Oilseed Rape (*Brassica napus*)

W. Rygulla, R. J. Snowdon, W. Friedt, I. Happstadius, W. Y. Cheung, and D. Chen

First, second, and third authors: Department of Plant Breeding, Research Centre for BioSystems, Land Use and Nutrition, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, D-35392 Giessen, Germany; fourth author: Svalöf Weibull AB, S-268 81 Svalöv, Sweden; and fifth and sixth authors: DNA Landmarks Inc., Saint-Jean-sur-Richelieu 84, Quebec, Canada.
Accepted for publication 19 September 2007.

ABSTRACT

Rygulla, W., Showdon, R. J., Friedt, W., Happstadius, I., Cheung, W. Y., and Chen, D. 2008. Identification of quantitative trait loci for resistance against *Verticillium longisporum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytopathology* 98:215-221.

Verticillium longisporum is one of the major pathogens of oilseed rape (*Brassica napus*; genome AACC, $2n = 38$) in Europe. Current European cultivars possess only a low level of resistance against *V. longisporum*, meaning that heavy infection can cause major yield losses. The aim of this study was to identify quantitative trait loci (QTL) for resistance against *V. longisporum* as a starting point for marker-assisted breeding of resistant cultivars. Resistance QTL were localized in a segregating oilseed rape population of 163 doubled haploid (DH) lines derived by microspore culture from the F_1 of a cross between two *B. napus* breeding lines, one of which exhibited *V. longisporum* resistance derived by pedigree selection from a resynthesized *B. napus* genotype. A genetic map was constructed comprising 165 restriction fragment length polymorphism, 94 amplified fragment length polymorphism and 45 simple sequence repeats (SSR)

markers covering a total of 1,739 cM on 19 linkage groups. Seedlings of the DH lines and parents were inoculated with *V. longisporum* isolates in four greenhouse experiments performed in Sweden during autumn 1999. In three of the experiments the DH lines were inoculated with a mixture of five isolates, while in the fourth experiment only one of the isolates was used. The intention was to simulate four different environments with variable disease pressure, while still maintaining uniform conditions in each environment to enable reliable disease scoring. The disease index (DI) was calculated by scoring symptoms on a total of 21 inoculated plants per line in comparison to 21 noninoculated plants per line. Using the composite interval mapping procedure a total of four different chromosome regions could be identified that showed significant QTL for resistance in more than one environment. Two major QTL regions were identified on the C-genome linkage groups N14 and N15, respectively; each of these QTL consistently exhibited significant effects on resistance in multiple environments. The presence of flanking markers for the respective QTL was associated with a significant reduction in DI in the inoculated DH lines.

Verticillium wilt caused by *Verticillium longisporum* (ex. *Verticillium dahliae* var. *longisporum* Stark) is one of the major diseases of oilseed rape ($2n = 38$, genome AACC) in Europe. Current European cultivars possess only a low level of resistance against *V. longisporum*, meaning that heavy infection can cause major yield losses (9,34). Because long-term crop rotation is not always possible and no efficient chemical control is available, the disease is becoming a serious problem in some areas of Germany, France, Sweden, and other major European rapeseed-producing countries (14). The fungus infects the plant via the roots by penetrating the root epidermis in the root hair zone, and establishes itself in the xylem (10,35). Once it has reached the xylem vessels it forms conidiospores, which spread inside the xylem throughout the vegetative parts of the plant. Symptoms usually appear late in the growing season on mature plants, when diseased plants wilt and often die. The fungus produces microsclerotia in plant debris that can survive in the soil for long periods of time.

Brassica napus is a young species that originated through spontaneous interspecific hybridizations between *B. rapa* L. (syn. *campestris*; genome AA, $2n = 20$) and *B. oleracea* L. (CC, $2n = 18$) (26). After intensive breeding for oil and seed quality traits, the spring and winter oilseed forms of *B. napus* now represent one of the most important sources of vegetable oil worldwide. Due to an extremely strong bottleneck selection for zero seed erucic acid

and low seed glucosinolate content, current oilseed rape cultivars have a comparably narrow genetic basis (12); in particular, the availability of novel germplasm for resistance breeding is often extremely limited. On the other hand, sources of *Verticillium* resistance that can potentially be used in rapeseed breeding have been identified in *B. oleracea* and *B. rapa* (6,11,24,25). For example, Happstadius et al. (11) selected the most resistant *B. oleracea* accessions identified in a greenhouse screening and demonstrated that their resistance was effective against *V. longisporum* when introduced into resynthesized (RS) *B. napus* breeding lines by interspecific hybridization. We have produced further RS rapeseed breeding lines with high levels of resistance from cabbage accessions combined with oilseed turnip rape (24,25), while Debode et al. (6) identified resistance in cauliflower cultivars and were able to show that resistant cultivars can prevent the pathogen from spreading systemically inside the plant. The genetic basis of these resistance sources is not known, however, and molecular markers linked to resistance loci and therefore exploitable for marker-assisted selection have not previously been described for this disease. The aim of this study was to identify quantitative trait loci (QTL) for resistance against *V. longisporum* in order to gain information on the genetics of new, resistant *B. napus* breeding lines. The study represents a first step towards marker-assisted breeding of resistant oilseed rape cultivars and, in the long term, towards the map-based cloning of the responsible resistance genes.

Corresponding author: R. J. Snowdon
E-mail address: Rod.Snowdon@agr.uni-giessen.de

MATERIALS AND METHODS

Resistance donor and mapping population. The original resistance donor for the mapping population used in the QTL

doi:10.1094/PHYTO-98-2-0215
© 2008 The American Phytopathological Society

analysis was a tetraploid white cabbage (*B. oleracea* convar. *capitata*; genome CCCC, $2n = 4x = 36$), which was crossed with a tetraploid, low erucic acid winter turnip rapeseed (*B. rapa* ssp. *olerifera*; genome AAAA, $2n = 4x = 40$) to generate a synthetic *B. napus*. This breeding line was produced in Sweden in 1975 to 1976 with the aim of increasing the genetic variability in *B. napus* germplasm, and the resistance was subsequently transferred to oilseed rape breeding lines by pedigree selection. The parents of the mapping population were homozygous doubled haploid (DH) breeding lines that were identified by greenhouse screenings of two DH populations for resistance to *V. longisporum*. The parental line 307-406-1 was found to be susceptible to Verticillium wilt, while the parental line 307-230-2 was considered to be resistant/tolerant to the disease. Three F_1 donor plants were used for microspore cultivation as described in Zhou et al. (36). A total of 3,453 in vitro embryos were induced, 478 shoots were regenerated, and 398 plants were transplanted to soil. At the three- to four-leaf stage the ploidy number of each plant was analyzed by flow cytometry using standard methods (33). In 40% of the plantlets, the genome had doubled spontaneously, 6% were polyploids, and 54% were still haploid and consequently treated with colchicine to induce diploidization. After vernalization, 329 plants were transferred to the greenhouse and selfed by bagging. One hundred and sixty-three randomly chosen DH lines were used for the QTL mapping study.

Resistance screening. Seedlings of the DH lines and parents were inoculated with *V. longisporum* isolates in four separate greenhouse experiments during autumn 1999 at Svalöf Weibull AB, Sweden. The intention was to simulate four different environments with variable disease pressure, while still maintaining uniform conditions in each environment to enable reliable disease scoring. Since the resistance was expected to be quantitative in nature, this strategy was used to enable more reliable identification of QTL that were stable over different environments.

In three of the experiments a mixture of the Swedish *V. longisporum* isolates Vd1, Vd4, Vd11, Vd12, and Vd13 in equal densities was used for the inoculation. The characteristics of these five isolates, which show a similar virulence spectrum and moderate to high aggressiveness, have been described in detail previously (27,28). In the fourth experiment, the inoculation was performed with the single-spore isolate Vd13, in order to determine if any identified QTL might be explained by a race-specific resistance. Vd13 shows consistent, moderate disease symptoms, disease severity, and DI with different inoculation techniques in susceptible *B. napus* cultivars (28). The same overall inoculum density (2×10^6 spores/ml + mycelium fragments) was used for the inoculations with the isolate mixture and for the single-spore isolate.

Each experiment included a total of 21 inoculated and 21 noninoculated plants for each of the DH lines, along with 10 repetitions of 21 inoculated and 21 noninoculated plants of each of the parental lines. Furthermore, 21 inoculated and 21 noninoculated plants of the susceptible *B. napus* 'Libraska' were included in each experiment as an infection control, making a total of 3,654 inoculated and 3,654 noninoculated plants in each of the four experiments. The plants were grown in individual pots with the genotypes arranged in a completely random design. The inoculations were carried out using a root-dip inoculation method that was shown in a comparison of different *Verticillium* inoculation techniques to give the most consistent results (15): Bottom-broken peat pots containing 14-day-old seedlings were dipped into 40 ml of inoculum. The pots were left in the inoculum suspension for 30 min and then replaced at the original position in a planting tray. The remaining inoculum was recovered with rinsing water and poured into the container with the inoculated seedlings. The seedlings were then grown at 20°C in a greenhouse with a light regime of 16 h day/8 h night; the relative humidity was not controlled in order to allow environmental variation

between the four experiments in the interests of the QTL analysis. Disease scoring was carried out between 8 to 10 weeks after inoculation, when 80 to 90% of the inoculated plants from *B. napus* Libraska showed wilting symptoms.

Disease severity scores (0 to 5) for each inoculated plant followed a scale (28) based on the percentage of leaves showing wilting and chlorosis, along with the degree of stunted growth (height in mm) in comparison to the mean of the noninoculated plants of the same genotype: 0 = no symptoms, 1 = wilting and/or stunting <25%, 2 = wilting and/or stunting 25 to 50%, 3 = wilting and/or stunting 51 to 90%, 4 = wilting and stunting ≥91%, and 5 = dead plant. From the number of plants in each class, DI was calculated as follows for each of the DH lines and parents, as described by Hapstad et al. (11):

$$DI = \frac{(0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4) + (5 \times N_5)}{(N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5)}$$

$$(DI_{n, \text{control}} - DI_{\text{total, control}})$$

where N_n is the number of plants in the respective class, $DI_{n, \text{control}}$ represents the mean symptom score of the noninoculated control plants in the n th trial, and $DI_{\text{total, control}}$ is the mean symptom score of the noninoculated controls over all trials.

Statistical analyses of the data were performed using the software package SAS 9.1. Analysis of variance (ANOVA) was performed using the general linear model procedure in order to estimate differences within the population and among the four different experiments (environments). ANOVA was also used to analyze genotype-environment interactions of the two parental lines, for which 10 DI values (each calculated from 21 inoculated and 21 noninoculated plants) per line per experiment were available. Variation in DI within and among the four experiments was further quantified by calculation of least significant differences among the means of the parents and the DH lines, along with Pearson's correlation coefficients for the individual genotypes in the four different environments.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) probes and Southern analysis. Plant genomic DNA was extracted for RFLP analysis as described by Cheung et al. (4). Three restriction enzymes (*EcoRI*, *EcoRV*, and *HindIII*) were applied to digest the genomic DNA. The DNA digests were separated in 0.8% agarose gels and transferred to nylon membranes (H-bond N+). Six sets of DNA membranes for each enzyme digest were prepared for Southern analysis. DNA probes coded DLM2 to DLM372 correspond to anonymous clones from a seedling cDNA library of *B. napus*. Procedures for Southern analysis were described by Cheung et al. (4). Duplicated loci detected by a single clone were designated by the same name followed by a different lowercase letter, as described by Landry et al. (17).

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and simple sequence repeats (SSR) analysis. Marker saturation of the genetic map was achieved using AFLP markers, while previously mapped loci from publicly-available SSR primer combinations were also included in the map to enable identification of linkage groups. For the polymerase chain reaction (PCR) marker analyses new genomic DNA samples were isolated from dry frozen leaf material according to Doyle and Doyle (8). AFLP amplification products were generated using the *EcoRI-MseI*-based AFLP kit of Invitrogen (AFLP Core Reagent Kit, Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. *EcoRI* primers were fluorescently labeled with IRD700 or IRD800. DNA from DH lines and their parents were amplified with a set of 10 AFLP primer combinations known either from the literature (18) or from previous mapping studies (1,2) to reveal a high polymorphism rate in oilseed rape.

A total of 127 SSR primer combinations for which genetic map positions of one or more loci in *B. napus* are known (2,19,23), were screened for polymorphism among the mapping parents. Of

these primer combinations 65 (51.2%) amplified at least one polymorphic locus and were screened in the DH lines. For all SSR analyses the M13-tailing procedure described by Berg and Olaisen (3) was used. In this method the fluorescently labeled universal M13 primer 5'-AGGGTTTCCAGTCACGACGTT-3' is added to the PCR reaction, and the forward primer of each SSR is appended with the sequence 5'-TTCCAGTCACGACGTT-3'. After the first cycle of amplification the PCR fragments are subsequently amplified by the labelled universal primer. All AFLP and SSR amplification products were separated using a LI-COR 4200 DNA Analyzer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) and scored visually.

Segregation analysis and map construction. A genetic map was constructed using the program JoinMap 3.0 (31). The fit of allelic segregation to the expected 1:1 segregation ratio was tested for each marker by a chi-square test, and map construction was performed in three steps based on the suggestions of Cloutier et al. (5) for *B. napus* mapping. (i) Selection of loci whose segregation fit the expected ratio ($P < 0.01$) to identify linkage groups with high confidence; these markers were anchored as "fixed orders". (ii) Addition of markers with segregation other than the expected 1:1 ratio ($P \geq 0.01$) using a minimum logarithm of odds (LOD) threshold of 2.0. These markers were only added when they did not influence the grouping of the fixed-order markers and did not form noticeable clusters with other skewed markers. (iii) Identification of linkage groups based on SSR markers from consensus maps (1,2,23). Map distances measured in cM between markers were derived from the Kosambi function (16).

Composite interval mapping of resistance QTL. QTL conferring resistance to *V. longisporum* in the DH lines were localized by composite interval mapping with cofactors, using the computer software PLABQTL (30) Version 1.2. All markers proposed by the default option SELECT were used as cofactors. Phenotype data from each of the four experiments were first analyzed separately, then the data from the three experiments with the isolate mixture were averaged to compare the locations of QTL detected over different environments under the same infection conditions. Initially, all putative QTL for resistance were identified using an LOD threshold of 3.0. From these putative QTL, the ones exhibiting a significant likelihood ratio that a QTL is present versus absent were identified based on the multiple regression of the final simultaneous fit function of PLABQTL. After a further regression analysis based on the phenotypic variance, only QTL that showed a significant LOD score in combination with a significant phenotypic effect ($\theta = 0.02$) were selected, and we considered these to be trait-relevant QTL only when the confidence intervals overlapped in two or more of the four experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenotypic evaluation of the mapping population. Figure 1 shows the distribution of DI values for the DH lines in the four experiments. In all cases, a continuous distribution was observed, with the majority of DH lines having an intermediate DI between the two parents; this indicates a quantitative resistance for both the isolate mixture and the single-spore isolate. For both the isolate mixture and the isolate mixture, a number of DH lines showed a lower DI than the resistant parent, or a higher susceptibility than the susceptible parent, suggesting a transgressive segregation with some resistance alleles also being contributed by the susceptible parent. In the experiment with the single-spore isolate, the DI values in the DH population showed a more or less normal distribution, with the majority of the DH lines showing an intermediate resistance phenotype and few lines being highly susceptible or highly resistant. On the other hand, in the three experiments with the isolate mixture, both the distribution and the mean DI values of the two parents were strongly skewed towards

greater susceptibility. This indicates that the isolate mixture raises the disease pressure and may overcome part of the resistance against the single-spore isolate.

Considerable variation was sometimes observed among the symptom scores of individual plants within the same DH line,

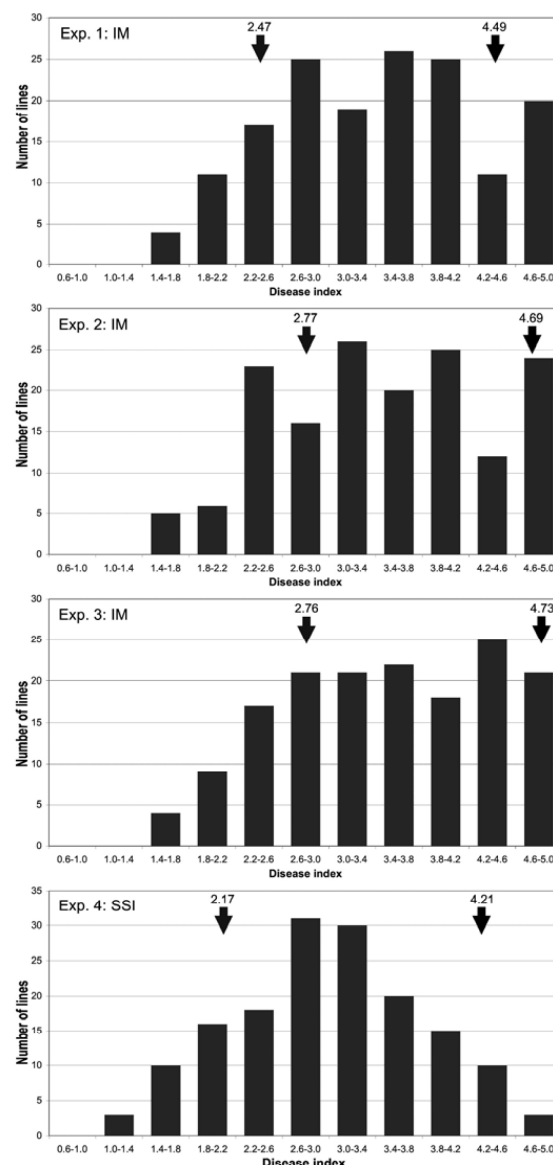


Fig. 1. Distributions of *Verticillium longisporum* disease index (DI) values in a population of 163 doubled-haploid *Brassica napus* lines derived from a single F_1 individual from the population 307-230-2 (resistant)/307-406-1 (susceptible). The disease index was calculated from symptom scores on 21 plants per line after root-dip inoculation, compared to 21 noninoculated plants per line, in four greenhouse experiments in autumn 1999. In experiments 1 to 3, an isolate mixture was used, while experiment 4 was performed by inoculation with a single spore isolate. The left and right arrows show the mean DI values of the resistant and susceptible parents, respectively; parental means were calculated from 10 repetitions of 21 inoculated and 21 noninoculated plants in each of the four experiments. Exp.: experiment; IM: isolate mixture; SSI: single-spore isolate.

possibly indicating that variable amounts of inoculum may be taken up during the disease screening. Despite this variation at a single-plant level, statistical analysis of the DI data showed that a reliable and reproducible quantitative estimate of the disease score was still obtained by calculating the DI from 21 inoculated plants, compared to 21 noninoculated plants in each experiment. Since the mean DI values of the parents and the DH lines showed high reproducibility over the three different experiments with the isolate mixture, we decided to also include the DI values from the inoculation with the single-spore isolate in the QTL analysis, even though only one experimental repetition was available in this case. In the ANOVA, the DI values of the parents and the DH lines were significantly lower ($P < 0.01$) after inoculation with the single-spore isolate than after the inoculations with the isolate mixture; this difference can be clearly seen in the distributions shown in Figure 1 and was confirmed by the results of the least significant difference (LSD) test (Table 1). Despite this difference in overall symptom level, however, the mean DI values of the individual genotypes infected with the single-spore isolate were still significantly correlated ($P < 0.01$) to the mean DI values after the inoculations with the isolate mixture (Table 2). This is presumably because a large number of DH lines were resistant against both the single-spore isolate and the isolate mixture. The ANOVA also revealed that there was no significant genotype $\times$ environment interaction ($P = 0.96$) over the four experiments.

Linkage map. A total of 96 polymorphic SSR markers, 247 polymorphic AFLP markers, and 346 polymorphic RFLP markers were scored in the DH population 307-230-2/307-406-1. Due to the allopolyploid nature of the *B. napus* genome a large proportion of duplicated loci are expected, which can distort the marker segregation and lead to mapping errors (5); these can be recognized because the marker segregation ratios deviate significantly from the expected 1:1 ratio in a DH population. In order to obtain the best possible map, we therefore performed a stringent selection for markers with correct or only moderately skewed segregation, and to facilitate the composite interval mapping of QTL we further removed mapped markers with less than 1 cM intervals. Overall these measures resulted in the exclusion of 53.1% of the available SSR markers, 61.1% of the AFLP markers, and 52.3% of the RFLP markers from the mapping. The resulting genetic map comprised 165 RFLP, 94 AFLP, and 45 SSR markers on 19 linkage groups (LG) covering 1,739 cM, with an average marker distance of 5.7 cM (Fig. 2). A total of 68 markers (22%) with moderately skewed distribution ($P < 0.01$) were included in the map, but only when they did not

form noticeable clusters. Based on comparisons to other maps, all linkage groups could be associated to defined *B. napus* chromosomes based on the accepted N1-N19 nomenclature for *B. napus* (22). The size of the groups varied between 46.3 and 158.1 cM, while the number of molecular markers per group ranged from 3 to 35. A maximum of seven SSR markers were identified for each linkage group.

QTL for *V. longisporum* resistance. Four chromosome regions were identified that contained significant QTL for resistance to *V. longisporum* (defined as significant LOD scores after multiple regression combined with significant phenotypic effects at a threshold of $\theta = 0.02$) in at least two of the four experiments (Fig. 2). In all cases the resistance alleles at the detected QTL were derived from the resistant parent 307-230-2. The relative degree of differentiation in disease response within this mapping population was comparatively low, however together the four significant QTL explained a total of 45.7% (sum of partial R^2) of the phenotypic variance in the *V. longisporum* DI. To our knowledge this is the first report of QTL for resistance to *V. longisporum* in *B. napus*, hence these results represent an important first step in the investigation of the genetic basis of currently available resistance sources.

On N15, a QTL region with overlapping confidence intervals was detected in two of the three experiments with the isolate mixture, and also with the mean data for the three experiments with the isolate mixture (Table 3). A QTL whose confidence interval was adjacent to this region was detected in the other experiment with the isolate mixture. No significant QTL was detected at this position in the experiment with the single spore isolate, however the marker BRMS030 flanking the QTL had significant effects (t test, $P < 0.05$) on the mean DI for the single-spore isolate. The power of QTL detection may have been lower in the experiment with the single-spore isolate, since the majority of the DH lines showed an intermediate resistance response; this could explain why no significant QTL was detected in this case.

On N14 another QTL region was found with overlapping QTL confidence intervals for one of the three experiments with the isolate mixture, the mean data over all environments with the isolate mixture, and for the experiment with the single-spore isolate. Although no significant QTL were detected at this position in the other two experiments with the isolate mixture, the flanking markers (DLM138b and CB10079) still both had significant effects on the mean DI in these replications (t test, $P < 0.01$), suggesting that this region also contains one or more genes with a significant effect on the resistance reaction. The QTL for the experiment with the single-spore isolate was at a slightly different position to the QTL from the experiments with the isolate mixture, which might indicate a race-specific resistance gene that was no longer effective against the isolate mixture.

In the mean data from the three experiments with the isolate mixture, the two QTL on N14 and N15 accounted for 9.9 and 12.5% of the phenotypic variation (partial R^2), respectively. Because these two QTL had consistently significant effects on the

TABLE 1. Comparison of mean least significant differences in *Verticillium longisporum* disease index values in a population of 163 doubled haploid *Brassica napus* lines, and their parents 307-230-1 (susceptible) and 307-230-2 (resistant), after root-dip inoculation in four experiments performed in the greenhouse in autumn 1999

Experiment	Mean disease index ^y			LSD ^x ($\alpha = 0.05$)
	DH ^w lines	307-230-1	307-406-2	
Exp. 1: IM ^y	3.45 ^a	2.47 ^c	4.49 ^c	0.63
Exp. 2: IM ^y	3.50 ^a	2.77 ^c	4.69 ^c	0.64
Exp. 3: IM ^y	3.53 ^a	2.76 ^c	4.73 ^c	0.63
Exp. 4: SSI ^z	3.00 ^b	2.17 ^d	4.21 ^f	0.66
LSD ^x ($\alpha = 0.05$)	0.30	0.37	0.25	

^y The disease index for each doubled haploid line in each experiment was calculated from the symptom scores of 21 inoculated and 21 noninoculated plants per genotype, while the mean disease index of the parental lines was calculated from 10 repetitions of 21 inoculated and 21 noninoculated plants in each experiment. Different mean values that show nonsignificant differences are assigned the same superscript letter.

^w Doubled-haploid.

^x Least significant difference.

^y Isolate mixture.

^z Single spore isolate.

TABLE 2. Pearson's correlation coefficient for comparisons among *Verticillium longisporum* disease index values of 163 doubled haploid *Brassica napus* lines and their population parents tested by root-dip inoculation in three greenhouse experiments performed in autumn 1999 with an isolate mixture and in one experiment with a single-spore isolate^x

Experiment	Exp. 1-3: Mean			
	Exp. 2: IM ^y	Exp. 3: IM ^y	Exp. 1-3: Mean	Exp. 4: SSI ^z
Exp. 1: IM ^y	0.64	0.68	0.87	0.64
Exp. 2: IM ^y		0.76	0.90	0.57
Exp. 3: IM ^y			0.91	0.57
Exp. 1-3: Mean				0.66

^x All correlations were significant with $P < 0.01$.

^y Isolate mixture.

^z Single spore isolate.

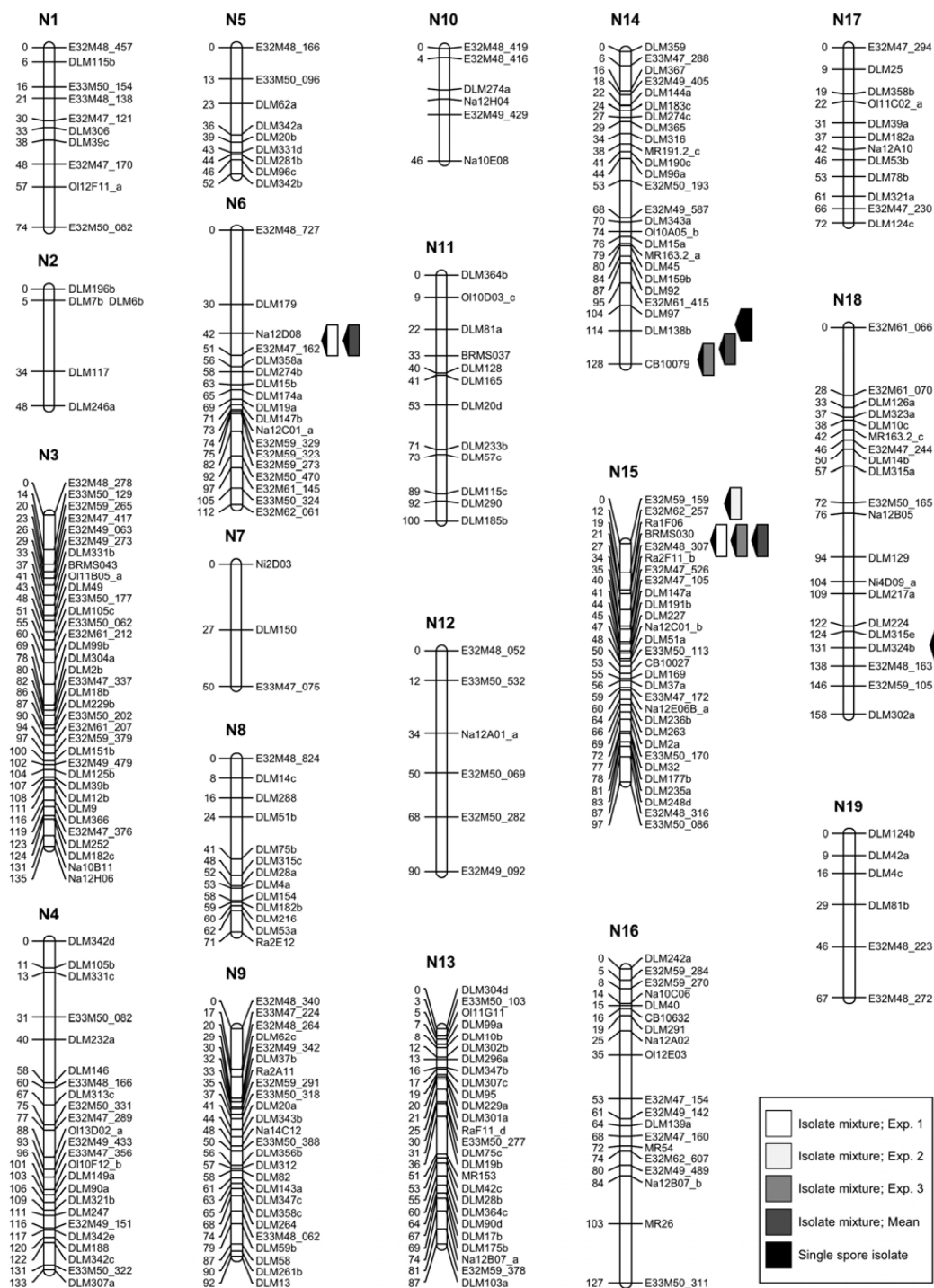


Fig. 2. Genetic linkage map (1,739 cM) for an oilseed rape mapping population (163 doubled haploid lines) derived from the population 307-230-2/307-406-1. The shaded boxes show quantitative trait loci for *Verticillium longisporum* disease index measured in the greenhouse in autumn 1999 after three root-dip inoculation experiments with a *V. longisporum* isolate mixture and one experiment with the single-spore isolate VD13. The map contains 165 restriction fragment length polymorphism, 94 amplified fragment length polymorphism and 45 simple sequence repeat markers. Genetic distances are given in centimorgans.

resistance phenotype in multiple experiments with controlled but not identical inoculation and environmental conditions, we considered these to be environmentally stable QTL with potential for utilization in breeding. The *B. napus* chromosomes N14 and N15 are both derived from the *Brassica* C-genome (22), which is consistent with the origin of the resistance from a *B. oleracea* donor.

On the other hand, linkage groups N6 and N18 each contained one QTL region that showed significant phenotypic effects on resistance in a single experiment with the isolate mixture. Although the genetic effects of these QTL are apparently lower than for the QTL on N14 and N15, they nevertheless represent chromosomal regions of interest for future studies of *V. longisporum* resistance in oilseed rape. The QTL on N6, which accounted for 12.4% of the phenotypic variation (partial R^2) in the resistance reaction in the three experiments with the isolate mixture, is of particular interest because chromosome N6 in *B. napus* is derived from the A genome of *B. rapa* (21) rather than the C-genome of the original *B. oleracea* resistance donor. This could be due to a homoeologous or nonhomoeologous translocation between A and C genome chromosomes, which are known to occur commonly in newly synthesised *B. napus* (29), or alternatively it could indicate a further resistance locus contributed by the *B. rapa* parent of the original RS *B. napus* resistance donor.

Expanding the genetic basis for resistance breeding in oilseed rape. The addition of new sources of resistance against *V. longisporum* to the germplasm of *B. napus* is vital for the sustainable production of oilseed rape in Europe, since there is only limited resistant germplasm currently available for breeding and Verticillium wilt is becoming increasingly important in some rapeseed production areas. Introgression of germplasm from *B. rapa* and *B. oleracea* via RS rapeseed is a breeding strategy that has been successfully used in the past to generate new genetic variation for resistance against important diseases of oilseed rape. For example, protoplast fusion has been successfully used to transfer resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) from *B. rapa* to *B. napus* (7). Through advanced backcrossing a race-specific resistance was subsequently transferred from RS rapeseed to elite winter oilseed rape germplasm, and the winter oilseed rape cultivars Mendel and Tosca derived from this material were released in the early 2000s to specifically combat this disease in affected areas of Britain and Germany. Synthetic lines of *B. napus* carrying resistance to blackleg derived from *B. rapa* were generated via embryo culture (20). The resistance

was subsequently introgressed into spring canola, resulting in the release of 'Surpass' in the late 1990s.

The introgression of novel resistance genes normally requires extensive backcrossing accompanied by effective resistance screening. However, selection for *V. longisporum* resistance in the field can be difficult due to a high environmental influence on the symptom development, and symptom scoring is further complicated by the frequent co-occurrence of blackleg disease caused by *Leptosphaeria maculans* (Desm) Ces. & de Not. [anamorph *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm.] on plants showing *V. longisporum* symptoms (I. Happstad, personal observation, 2007). As shown in Table 4, the combination of *V. longisporum* resistance alleles from different QTL in the present study was associated with increased resistance in the DH lines. This underlines the potential for a marker-assisted pyramiding strategy to assist the effective transfer of polygenic *V. longisporum* resistance from RS rapeseed donors into elite breeding lines.

TABLE 4. Numbers and mean *Verticillium longisporum* disease index values of doubled haploid *Brassica napus* lines containing zero, one, two, three, or four resistance alleles at the four quantitative trait loci (QTL) on *B. napus* chromosomes N6, N14, N15, and N18, compared with the disease index values of the susceptible 307-230-1 and the resistant 307-230-2^z

Genotypes	Number of resistance alleles present	Number of DH ^w lines ^x	Mean DI ^y value
(307-230-2 / 307-230-1)	0	1	4.62
	1	58	3.69
	2	47	3.39
	3	15	2.74
	4	4	2.36
307-230-1	0	–	4.64 ^z
307-230-2	4	–	2.66 ^z

^y The disease index values were calculated from the symptom scores of 21 inoculated and 21 noninoculated plants per genotype. Data is from three root-dip inoculation experiments with an isolate mixture. Thirty-eight double haploid lines contained alleles from both parents at the QTL-flanking markers and were not counted.

^w Doubled haploid.

^x Lines were counted as containing a resistance allele when the alleles for both markers flanking the QTL were derived from 307-230-2. The resistance allele was counted as absent when the alleles for both markers flanking a QTL were derived from 307-406-1.

^y Disease index.

^z Mean DI values for the parental lines were calculated from 10 repetitions of 21 inoculated and 21 noninoculated plants in each experiment.

TABLE 3. Details of significant quantitative trait loci for resistance against *Verticillium longisporum* estimated from mean disease index data in a population of 163 doubled-haploid lines from the *Brassica napus* population 307-230-2/307-406-1

Experiment ^t	Linkage group	Peak position (cM) ^u	LOD ^v at QTL ^w position	Confidence interval (cM) ^u	Flanking markers ^x	Partial R^2 (%)	Additive effects
Exp. 1: IM ^y	N6	50	6.32	46–56	Na12D08 (41.8) – E32M47_162 (51.2)	9.5	0.29
	N15	22	4.98	18–24	BRMS030 (21.4) – E32M48_307 (26.6)	6.6	0.24
Exp. 2: IM ^y	N15	2	3.08	0–8	E32M59-159 (0) – E32M62_257 (11.8)	7.6	0.30
Exp. 3: IM ^y	N14	128	6.64	120–128	DLM138b (114.3) – CB10079 (128.5)	8.6	0.24
	N15	22	6.68	18–24	BRMS030 (21.4) – E32M48_307 (26.6)	9.7	0.27
	N18	130	3.30	126–136	DLM315e (124.3) – DLM324b (131.5)	7.3	0.23
Exp. 1-3: Mean	N6	50	4.87	46–56	Na12D08 (41.8) – E32M47_162 (51.2)	12.4	0.27
	N14	124	8.46	118–128	DLM138b (114.3) – CB10079 (128.5)	9.9	0.24
	N15	22	10.06	20–24	BRMS030 (21.4) – E32M48_307 (26.6)	12.5	0.27
	N18	130	4.20	124–134	DLM315e (124.3) – DLM324b (131.5)	10.9	0.24
Exp. 4: SSI ^z	N14	112	6.50	104–122	DLM97 (102.5) – DLM138b (112.9)	7.1	0.25

^t The population was evaluated in four experiments representing different environments. Disease index of each genotype in each experiment was calculated by comparing disease symptoms of 21 plants inoculated by a root-dip procedure with 21 noninoculated plants. Only resistance loci with significant logarithm of odds scores after regression analysis in combination with significant phenotypic effects in more than one experiment are shown.

^u Centimorgan.

^v Logarithm of odds.

^w Quantitative trait loci.

^x In all cases, the marker alleles associated with increased resistance were derived from the resistant parent 307-230-2.

^y Isolate mixture.

^z Single spore isolate.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by the Society for Promotion of Private German Plant Breeding (GFP) and the Agency for Renewable Resources (FNR) of the Federal Ministry for Nutrition, Agriculture and Consumer Protection (BMELV). We thank D. Baetzel for excellent technical assistance and four anonymous reviewers for constructive comments on an earlier version of this manuscript.

LITERATURE CITED

- Badani, A. G., Snowdon, R. J., Baetzel, R., Lipsa, F. D., Wittkop, B., Horn, R., De Haro, A., Font, R., Lühs, W., and Friedt, W. 2006. Co-localization of a partially dominant gene for yellow seed color with a major QTL influencing acid detergent fiber (ADF) content in different crosses of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome* 49:1499-1509.
- Basunanda, P., Spiller, T. H., Hasan, M., Gehringer, A., Schondelmaier, J., Lühs, W., Friedt, W., and Snowdon, R. J. 2007. Marker-assisted increase of genetic diversity in a double-low seed quality winter oilseed rape genetic background. *Plant Breed.* 126:581-587.
- Berg, E. S., and Olaisen, B. 1994. Hybrid PCR sequencing – sequencing of PCR products using a universal primer. *Biotechniques* 17:896.
- Cheung, W. Y., Champagne, G., Hubert, N., and Landry, B. S. 1997. Comparison of the genetic maps of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 94:569-582.
- Cloutier, S., Cappadocia, M., and Landry, B. S. 1997. Analysis of RFLP mapping inaccuracy in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* 95:83-91.
- Debode, J., Declercq, B., and Höfte, M. 2005. Identification of cauliflower cultivars that differ in susceptibility to *Verticillium longisporum* using different inoculation methods. *J. Phytopathol.* 153:257-263.
- Diederichsen, E., and Sacristan, M. D. 1996. Disease response of resynthesized *Brassica napus* L. lines carrying different contributions of resistance to *Plasmodiophora brassicae* Wor. *Plant Breed.* 115:5-10.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Dunker, S., Keunecke, H., and von Tiedemann, A. 2006. *Verticillium longisporum* in winter oilseed rape – Impact on plant development and yield. *Integrated Control in Oilseed Crops* 29:365-374.
- Eynck, C., Koopmann, B., Grunewaldt-Stoecker, G., Karlovsky, P., and von Tiedemann, A. 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *Eur. J. Plant Pathol.* 118:259-274.
- Happstadius, I., Ljungberg, A., Kristiansson, B., and Dixelius, C. 2003. Identification of *Brassica oleracea* germplasm with improved resistance to *Verticillium* wilt. *Plant Breed.* 122:30-34.
- Hasan, M., Seyis, F., Badani, A. G., Pons-Kuhnemann, J., Lühs, W., Friedt, W., and Snowdon, R. J. 2006. Surveying genetic diversity in the *Brassica napus* gene pool using SSR markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 53:793-802.
- Johansson, A., Staal, J., and Dixelius, C. 2006. Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:958-969.
- Karapapa, V. K., Bainbridge, B. W., and Heale, J. B. 1997. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycol. Res.* 101:1281-1294.
- Koike, S. T., Subbarao, K. V., Davis, R. M., Gordon, T. R., and Hubbard, J. C. 1994. *Verticillium* wilt of cauliflower in California. *Plant Dis.* 78:1116-1121.
- Kosambi, D. D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12:172-175.
- Landry, B. S., Hubert, N., Etoh, T., Harrada, J. J., and Lincoln, S. E. 1991. A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome* 34:543-552.
- Lombard, V., Baril, C. P., Dubreuil, P., Blouet, F., and Zhang, D. 2000. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: Consequences for varietal registration. *Crop Sci.* 40:1417-1425.
- Lowe, A. J., Moule, C. L., Trick, M., and Edwards, K. J. 2004. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theor. Appl. Genet.* 108:1103-1112.
- Mithen, R. F., and Magrath, R. 1992. Glucosinolates and resistance to *Leptosphaeria maculans* in wild and cultivated *Brassica* species. *Plant Breed.* 108:60-68.
- Parkin, I. A. P., Sharpe, A. G., Keith, D. J., and Lydiate, D. J. 1995. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome* 38:1122-1131.
- Parkin, I. A. P., Sigrun, M. G., Sharpe, A. G., Lukens, L., Trick, M., Osborn, T. C., and Lydiate, D. J. 2005. Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 171:765-781.
- Piquemal, J., Cinquin, E., Couton, F., Rondeau, F., Seignoret, E., Doucet, I., Perret, D., Villegier, M. J., Vincourt, P., and Blanchard, P. 2005. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 111:1514-1523.
- Rygulla, W., Seyis, F., Eynck, C., Friedt, W., Lühs, W., Snowdon, R., and von Tiedemann, A. 2007. Generation of zero erucic acid resynthesized rapeseed lines with resistance to *Verticillium longisporum*. *Plant Breed.* 126:596-602.
- Rygulla, W., Snowdon, R. J., Eynck, C., von Tiedemann, A., Lühs, W., and Friedt, W. 2007. Broadening the genetic basis of *Verticillium longisporum* resistance in *Brassica napus* by interspecific hybridization. *Phytopathology* 97:1391-1396.
- Snowdon, R. J., Lühs, W., and Friedt, W. 2006. Oilseed rape. *Genome Mapping and Molecular Breeding*, Vol. 2. Pages 55-114 in: *Oilseeds*. C. Kole, ed. Springer Verlag, Heidelberg, New York, Berlin, Tokyo.
- Stevenson, L. A., Fahleson, J., Hu, Q., and Dixelius, C. 2002. Identification of the causal agent of *Verticillium* wilt of winter oilseed rape in Sweden, *V. longisporum*. *Mycol. Res.* 106:570-578.
- Stevenson, L. A., Happstadius, I., Okori, P., and Dixelius, C. 2002. Development of a rapid technique for the evaluation of the response of *Brassica napus* to *Verticillium* wilt. *Plant Dis.* 86:854-858.
- Udall, J. A., Quijada, P. A., and Osborn, T. C. 2005. Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics* 169:967-979.
- Utz, H. F., and Melchinger, A. E. 1996. PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. *J. Quant. Trait Loci* 2:1.
- Van Ooijen, J. W., and Voorrips, R. E. 2001. JoinMap 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International*, Wageningen, The Netherlands.
- Voronese, P., Narasimhan, M. L., Stevenson, R. L., Zhu, J. K., Weller, S. C., Subbarao, K. V., and Bressan, R. A. 2003. Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 35:574-587.
- Weber, S., Ünker, F., and Friedt, W. 2005. Production of *Brassica napus* (L.) doubled haploids by microspore in vitro colchicine treatment and determination of ploidy by flow cytometry. *Plant Breed.* 124:511-513.
- Zeise, K., and von Tiedemann, A. 2002. Host specialization among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *Verticillium longisporum*. *J. Phytopathol.* 150:112-119.
- Zhou, L., Hu, Q., Johansson, A., and Dixelius, C. 2006. *Verticillium longisporum* and *V. dahliae*: Infection and disease in *Brassica napus*. *Plant Pathol.* 55:137-144.
- Zhou, W. J., Tang, G. X., and Hagberg, P. 2002. Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus*. *Plant Growth Regul.* 37:185-192.

4 Diskussion

4.1 Erweiterung der genetischen Diversität von *Brassica napus* und deren Nutzung in der Resistenzzüchtung

Bedingt durch die züchterischen Fortschritte hinsichtlich der Samenqualität ist der Rapsanbau hierzulande in den letzten Jahren auf bis zu 1,5 Mio. ha gestiegen. Vermutlich aufgrund des verstärkten Anbaus konnte sich das Pathogen *Verticillium longisporum* als neue bedeutende Rapskrankheit, der sog. krankhaften Abreife, etablieren. Trotz eines intensiven Resistenzscreenings im Genpool von Raps konnten bis dato keine Linien mit ausgeprägter Resistenz gegen diese Krankheit identifiziert werden (HAPPSTADIUS et al. 2003). Abgesehen von dem direkten Ertragsausfall ist die fehlende Resistenz hier als besonders kritisch zu beurteilen, da das Pathogen durch den Anbau anfälliger Sorten im Boden angereichert wird. Für eine nachhaltige Rapsproduktion ist daher die Erweiterung des Genpools um Resistenzressourcen gegen *V. longisporum* dringend erforderlich, da die Befallshäufigkeit und –stärke besonders in traditionellen Rapsanbaubereichen zunimmt, und die verursachten Ernteverluste ein nicht kalkulierbares Risiko für den Landwirt darstellen.

Der Genpool von *B. napus* kann durch interspezifische Kreuzung zwischen ausgewählten Genotypen der Ausgangsarten *B. rapa* L. und *B. oleracea* L. effektiv erweitert werden (Raps-Resynthese). Dies ist für die Rapszüchtung von besonderem Interesse, da der Ölraps aufgrund seiner Entstehungsgeschichte im Vergleich zu anderen Kulturarten nur eine geringe genetische Diversität aufweist und somit die Variation für einige Merkmale gering ist. Daher ist eine Erweiterung der genetischen Ressourcen erforderlich, um Merkmale wie Ertrag, Qualität und Resistenz gegen Krankheiten und Schaderreger weiter zu verbessern.

4.2 Identifikation neuer Resistenzressourcen in den Ausgangsarten von Raps, *B. rapa* und *B. oleracea*

Die Einlagerung von Resistenzen aus verwandten *Brassica*-Arten anhand intergenerischer Kreuzungen bzw. die experimentelle „Resynthese“ von Raps mittels interspezifischer Hybridisierung resistenter Elternlinien stellen eine wichtige Strategie zur Erweiterung der engen genetischen Basis von *B. napus* in der Resistenzzüchtung dar.

Die *Brassica*-Arten *B. nigra*, *B. juncea* und *B. carinata*, die das B-Genom allein oder in Kombination mit anderen Genomen enthalten, wurden vielfach für die Übertragung von Resistenz gegen *Leptosphaeria maculans* (anamorph *Phoma lingam*) auf Raps genutzt (CHÈVRE et al. 1996, DIXELIUS 1999, ROY 1978, SACRISTAN UND GERDEMANN 1986, STRUSS et al. 1996). Dabei hat sich jedoch die weitere züchterische Entwicklung von Rapslinien mit B-Genom Resistenz in vielen Fällen als schwierig herausgestellt. Dieses Problem stellt sich bei Verwendung von *B. rapa* und *B. oleracea* als Resistenzdonoren nicht, da die Genome der beiden Ausgangsarten von Raps im amphidiploiden Genom von *B. napus* enthalten sind (PARKIN et al. 1995). Autoren wie CROUCH et al. (1994) sowie DIEDERICHSEN und SACRISTAN (1996) haben Resistenzen gegen *L. maculans* bzw. *Plasmodiophora brassicae* erfolgreich aus *B. rapa* in *B. napus* übertragen und so zur Entwicklung neuer Winterrapssorten mit Resistenz gegen die Wurzelhals- und Stängelfäule (*L. maculans*) bzw. die Kohlhernie (*Plasmodiophora brassicae*) beigetragen. In beiden genannten Fällen wurde die Resistenz jedoch in kurzer Zeit von neuen virulenten Rassen des jeweiligen Pathogens überwunden. Andererseits ermöglicht die Identifizierung genetisch diverser Resistenzressourcen in verschiedenen *B. rapa*- und *B. oleracea*-Genotypen die Kombination unterschiedlicher Resistenzgene. Durch Kombination von mehreren, verschiedenen Resistenzgenen (sog. Pyramidisierung) kann der Überwindung der Resistenz gezielt entgegengewirkt werden, da anhand des Zusammenspiels verschiedener aktiver und passiver Abwehrmechanismen ggf. eine umfassende und dauerhafte Widerstandsfähigkeit gegen eine Krankheit vermittelt wird. Die Identifizierung von resistenten *B. rapa*- und *B. oleracea*-Genotypen und die anschließende Kombination von Resistenzgenen aus beiden Genomen in Resyntheselinien stellt einen ersten Schritt für diese Pyramidisierung dar. Zur weiteren Entwicklung einer besonders effektiven und dauerhaften Resistenz müssten jeweils die wirksamsten Allele der einzelnen Gene in einer Linie akkumuliert werden (SANCHEZ et al. 2000).

Anhand eines umfangreichen Materialscreenings von *B. oleracea*- und *B. rapa*-Genbankakzessionen zur Analyse der Resistenzreaktion gegenüber *V. longisporum* konnten in beiden Arten bisher unbekannte Resistenzquellen identifiziert werden. Die untersuchten *B. oleracea*-Herkünfte 1428 (Kashirka 202) und 2070 (Ladozhskaya) zeigten nach künstlicher Infektion eine ausgeprägte Resistenz. Kashirka 202 spaltet für Erucasäuregehalt im Samenöl, und einzelne Genotypen dieser Herkunft kombinieren *Verticillium*-Resistenz mit Erucasäurefreiheit. Im *B. rapa*-Genpool scheint *Verticillium*-Resistenz deutlich seltener vorzukommen, jedoch konnten moderat resistente Genotypen in den *B. rapa*-Akzessionen 13444 und G454 (Chinakohl ‚Granat‘) identifiziert werden. Darüber hinaus wurden Resistenzen in erucasäurefreien und glucosinolatarmen *B. rapa*-Genotypen identifiziert. Die Kombination dieser A- und C-Genom Resistenzen in resynthetisierten Rapslinien stellt ein sehr wertvolles Ausgangsmaterial für die Erweiterung der genetischen Variation bezüglich quantitativer *V. longisporum* Resistenz in Körnerölraps dar.

4.3 Einlagerung von Resistenzen gegen *V. longisporum* in den *Brassica napus*-Genpool mittels Resynthese

Die Kombination verschiedener Resistenzen aus beiden *B. napus*-Ausgangsarten resultierte in einer Vielzahl resistenter RS-Linien, deren Resistenz signifikant besser war als das der Sorte ‚Express‘, welche als die toleranteste aktuelle Winterrapssorte gilt. Die Resyntheselinien, die aus interspezifischen Kreuzungen zwischen resistenten Individuen der Rüben-Akzession 56515 und der Kohl-Herkunft 8207 entwickelt wurden, wiesen im Resistenztest die besten Ergebnisse auf, aber auch Individuen aus anderen *B. rapa*-Akzessionen zeigten im Resistenztest partiell resistente Phänotypen.

Es wurde beobachtet, dass der Standardfehler der Mittelwerte der *B. rapa*- und *B. oleracea*-Akzessionen deutlich größer war als derjenige der Resyntheselinien. Das lässt auf Heterozygotie der Genbankakzessionen schließen. In den diploiden *Brassica*-Arten ist ein sporophytisches, homomorphes Selbstinkompatibilitätssystem wirksam, das Selbstbefruchtung verhindert und daher Auskreuzung fördert. Es ist daher anzunehmen, dass die Pflanzen, die für die interspezifischen Hybridisierungen verwendet wurden, an den relevanten Resistenzgenloci heterozygot waren. Diese Annahme wird durch die große Variation hinsichtlich der Resistenzantwort von Resyntheselinien mit den gleichen resistenten

Elternlinien unterstützt. Die Kreuzung solcher heterozygoter Pflanzen führt zu unterschiedlichen Kombinationen von Resistenz- bzw. Anfälligkeitsallelen in den Nachkommenschaften und somit, je nach Vorhandensein effektiver oder ineffektiver Allele, zu einem resistenten oder anfälligen Phänotyp. Demzufolge sind die resistentesten Resyntheselinien auf eine maximale Anreicherung (Kombination) effektiver Allele zurückzuführen. Das sporophytische Selbstinkompatibilitätssystem der diploiden *Brassica*-Arten ist im amphidiploiden Raps i.d.R. nicht wirksam, jedoch konnte in den Resyntheselinien eine breite Variation hinsichtlich der Selbstfertilität beobachtet werden. Die in der vorliegenden Arbeit für die weiterführende Resistenzzüchtung ausgewählten Resyntheselinien zeichneten sich durch eine hohe Fertilität und guten Selbstungssamenansatz aus, was sie zu brauchbaren Kandidaten für Rückkreuzungsprogramme macht, um die Resistenzen in Elitezuchtmaterial zu übertragen.

Die simultane Introgression verschiedener Resistenzgene ist insbesondere bei quantitativen Resistenzen schwierig, wenn die Selektion nur anhand einer Phänotypisierung des Resistenzverhaltens durchgeführt werden kann. Daher ist die Entwicklung molekularer Marker zur Pyramidisierung unterschiedlicher Resistenzgene aus den A- und C-Genomen wünschenswert, um sicherzustellen, dass resistente Genotypen so viele effektive Resistenzallele wie möglich besitzen. Hierfür wurden zur Entwicklung von spaltenden Kartierungspopulationen die identifizierten resistenten Resyntheselinien unterschiedlicher Herkünfte mit *V. longisporum*-anfälligen Eliterapssorten gekreuzt. Eine Phänotypisierung der resultierenden spaltenden Populationen bzgl. Resistenz sowohl im Gewächshaus als auch im Feld wird es ermöglichen, Rückschlüsse auf die genetische Basis der verschiedenen Resistenzen zu ziehen. Darüber hinaus wird mittels QTL-Analyse ein erster Schritt in Richtung Entwicklung von Selektionsmarkern (SSRs), die mit den wirksamsten Resistenzgenen eng gekoppelt sind, gemacht. Anhand dieser Marker können viel versprechendene resistente Rapslinien für die weitere Entwicklung *V. longisporum*-resistenter Rapssorten selektiert werden.

4.4 Kombination von Resistenz- und Qualitätseigenschaften in resynthetisierten Rapslinien

Mit den aus interspezifischen Kreuzungen zwischen verschiedenen *B. rapa* und *B. oleracea*-Herkünften hervorgegangenen neuartigen Rapsformen kann der Raps-Genpool erweitert und damit die erforderliche genetische Grundlage für die Verbesserung wichtiger Eigenschaften wie Kornertrag, Samenqualität sowie Krankheits- und Schädlingsresistenz geschaffen werden. In der Regel sind neue Resistenzgene aus Basismaterialien wie Resyntheseraps mit einer großen genetischen Last (*linkage drag*) behaftet, die unerwünschte Eigenschaften wie schlechte Fertilität, geringe Ertragsleistung und mangelhafte Saatgutqualität mit sich bringt. Die Einführung spezifischer Merkmale aus neuartigen Rapsformen in die praktische Züchtung erfordert daher eine intensive Bearbeitung des Materials, wobei durch aufwändige Rückkreuzungen die gewünschten Merkmale von Resynthesen auf Elitezuchtmaterial übertragen und *linkage drag*-Effekte minimiert werden. Sofern mehrere positive Eigenschaften im Basisgenotyp bereits kombiniert vorliegen, können Rückkreuzungsprogramme ggf. erheblich erleichtert werden.

Die resistenteste Linie dieser Studie, FS B1/3.3, trägt durch die Kombination der C-Genom Resistenz aus der *B. oleracea*-Sorte Kashirka 202 mit der *V. longisporum*-Toleranz der A-Genom Donoren vermutlich eine polygenische und damit potentiell dauerhafte, quantitative Resistenz. Darüber hinaus weist FS B1/3.3 ein Fettsäureprofil auf, das vergleichbar mit dem konventioneller Winterrapssorten ist. Vor allem die weitgehende Erucasäurefreiheit dieser Linie und der hohe Ölsäure-Anteil im Samenöl sind für Resyntheseraps selten vorkommende Qualitätseigenschaften. Somit stellt FS B1/3.3 ein besonders wertvolles Erbmaterial für eine rekurrente Selektion zur schnellen Übertragung der Resistenz auf Elitezuchtmaterial mit 00-Qualität dar.

4.5 Lokalisierung von Resistenz-QTL in Resyntheseraps-Nachkommen

In einer QTL-Kartierung wurden Loci für *V. longisporum*-Resistenz aus einer resynthetisierten Rapslinie identifiziert. Obwohl die Unterschiede im Resistenzgrad innerhalb der verwendeten DH-Population relativ gering waren, konnten vier signifikante QTL, die

insgesamt 45,7% der phänotypischen Varianz des Krankheitsindex erklären, in verschiedenen Umwelten detektiert werden. Genotypen, in denen die flankierenden Marker aller vier identifizierten Resistenz-QTL aus dem resistenten Elter stammten, zeigten eine stark verbesserte Resistenz gegenüber solchen Linien, bei denen die QTL-Allele aus dem anfälligen Elter stammten. Zwar variierte der Beitrag zum Resistenzphänotyp der einzelnen signifikanten QTL nur zwischen 6,6 und 12,5%, jedoch konnten die QTL auf N14 und N15 konsistent in verschiedenen Experimenten, welche unterschiedliche Infektions- und Umweltbedingungen aufwiesen, bestätigt werden. Somit scheinen diese beiden Loci eine wichtige Rolle in der Resistenzantwort gegen *V. longisporum* zu spielen. Drei der detektierten QTL wurden auf N14, N15 und N18 im C-Genom lokalisiert, wodurch *B. oleracea* als Resistenzquelle bestätigt wird. Zusätzlich konnte allerdings auch ein vierter QTL auf dem A-Genom-Chromosom N6 identifiziert werden. Dies deutet entweder darauf hin, dass dieses Resistenzallel vom *B. rapa*-Elter der hier eingesetzten resistenten Resyntheselinie stammt, oder dass dieses Gen mittels homoeologer oder nicht-homoeologer Rekombination bzw. Translokation vom C- ins A-Genom verlagert wurde. Letzteres Phänomen kommt in neu-synthetisierten Rapsformen häufig vor (UDALL et al. 2005).

Die Einführung neuer Resistenzgene in Elitezuchtmaterial erfordert ein effektives Resistenzscreening sowie intensive Rückkreuzungsprogramme. Eng mit einem Resistenzgen gekoppelte Marker können hierbei den Arbeitsaufwand und die erforderliche Zeitspanne, die für den Transfer der Resistenz, die Kombination verschiedener Resistenzgene und die Entwicklung neuer Sorten benötigt wird, erheblich verringern. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die phänotypische Selektion resistenter Pflanzen sehr arbeitsintensiv, unzuverlässig oder zeitaufwändig ist. Die in dieser Arbeit identifizierten QTL stellen einen Ausgangspunkt für die nachfolgende Entwicklung eng gekoppelter Marker dar, welche die Introgression der *V. longisporum*-Resistenz aus den Resyntheselinien in Elitezuchtmaterial maßgeblich unterstützen werden. Die flankierenden Marker der vier Resistenz-QTL stellen darüber hinaus einen Ausgangspunkt für eine karten- oder syntäniegestützte Klonierung der beteiligten Resistenzgene dar. Die Möglichkeit, Informationen und Kandidatengene aus der mit Raps eng verwandten Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zu nutzen, verbessert sich stetig mit dem Voranschreiten der Sequenzierung von *B. rapa* und der Aktualisierung der Syntanie zwischen den *Brassica*- und *Arabidopsis*-Genomen. Die Genomsequenzierung von *A. thaliana* wurde im Jahre 2000 abgeschlossen und es liegen umfangreiche Daten über die Funktion der ca. 28000 identifizierten Gene vor. *Arabidopsis* und *Brassica* sind eng

miteinander verwandt, allerdings sind genomanalytische Ansätze wegen des kleinen Genoms, der bekannten Genomsequenz sowie der bereits vorliegenden, umfangreichen Transkriptom- und Expressionsdaten in *A. thaliana* wesentlich einfacher als in *B. napus*. Die Homologie zwischen *Arabidopsis* und *Brassica* wird auf 80-90% geschätzt (SCHMIDT 2002), wodurch die Identifizierung orthologer *Brassica*-Kopien von aussichtsreichen *Arabidopsis*-Kandidatengen gut möglich ist. Der Vergleich der physischen Karten von *Brassica* und *Arabidopsis* und die bereits vorhandenen Kenntnisse über bestehende Syntänien stellen sehr gute Voraussetzungen für die Feinkartierung, die Genklonierung und die Entwicklung molekularer Marker für markergestützte Selektion dar (SNOWDON et al. 2007).

Bisher ist nur wenig über *Verticillium*-Resistenz in *A. thaliana* und deren Vererbung bekannt. Jedoch wurden einige Loci identifiziert, die das Resistenzverhalten gegenüber *V. longisporum* und der nah verwandten Art *V. dahliae* beeinflussen. Das Gen RFO1, welches in *Arabidopsis* Resistenz gegen *Fusarium oxysporum* vermittelt, ist auch in die Resistenzantwort gegen *V. longisporum* involviert (JOHANSSON et al. 2006), während der Locus VET1 (*Verticillium tolerance 1*) zur Resistenz gegen *V. dahliae* beiträgt (VERONESE et al. 2003). Bei einigen Ökotypen von *A. thaliana* scheint VET1 eine veränderte Pflanzenentwicklung zu bewirken, welche mit der durch das Pathogen verursachten Zerstörung des Gewebes und der Freilassung von Mikrosklerotien in späten Stadien der Infektion interagieren. RFO1 wurde auf Chromosom 1 von *A. thaliana* lokalisiert, während VET1 auf Chromosom 4 kartiert wurde (VERONESE et al. 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Markerdaten gestatten es noch nicht, detaillierte Schlüsse über potentielle Syntänien zwischen den identifizierten QTL und den entsprechenden Regionen im *A. thaliana*-Genom zu ziehen. Die Klonierung und Kartierung von *B. napus*-Sequenzen mit Homoeologie zu den *Arabidopsis*-Chromosomenbereichen um die Gene RFO1 und VET1 würde aber Auskunft geben, ob diese Regionen mit relevanten Resistenz-QTL in *B. napus* korrespondieren. Darüber hinaus könnte eine vergleichende Genomanalyse weitere homoeologe Resistenzgenloci in den Genomen von *B. oleracea* und *B. rapa* aufdecken und damit die Möglichkeit zur Generierung zusätzlicher genetischer Diversität für Resistenz gegenüber *V. longisporum* eröffnen. Langfristig betrachtet dürfte die Identifizierung sowie die markergestützte Kombination mehrerer Resistenzen die Entwicklung von neuen Rapsgenotypen mit polygenischer Resistenz gestatten und damit zu einer nachhaltigen Kontrolle von *Verticillium longisporum* im Rapsanbau beitragen.

5 Zusammenfassung

Der in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegene Bedarf an Rapsöl im Food- und Non-Food-Bereich und die damit verbundene Ausweitung des Winterrapsanbaus hat in Mittel- und Nordeuropa zu einem verstärkten Auftreten des bodenbürtigen Pathogens *Verticillium longisporum* geführt, wodurch sich die sog. krankhafte Abreife als neue wichtige Krankheit im Rapsanbau etablieren konnte. Im Genpool von *Brassica napus* ist bislang keine Resistenz gegen *V. longisporum* bekannt. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst *B. rapa*- und *B. oleracea*-Genbankherkünfte hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens gegenüber *V. longisporum* untersucht werden, um resistente Eltern für interspezifische Hybridisierungen auszuwählen. Über Kreuzungen zwischen resistenten *B. rapa*- und *B. oleracea*-Genotypen sollten anschließend die in den Ausgangsarten identifizierten Resistenzen in neuartige Rapsformen (Resyntheseraps) und somit in den *B. napus*-Genpool transferiert werden. Mithilfe von Resistenztests konnte bei den *B. rapa*-Akzessionen 13444, G454 (beides Chinakohl) und einer blütenblattlosen Rübsenlinie ein moderat-resistenter Phänotyp festgestellt werden. Zusätzlich zu einigen bereits in der Literatur beschriebenen resistenten *B. oleracea*-Akzessionen wurde die russische Weißkohlsorte Kashirka 202 (Akzessionsnummer 1428) als neue C-Genom-Quelle für *V. longisporum*-Resistenz identifiziert. Nach interspezifischen Kreuzungen dieser putativ resistenten Ausgangslinien konnten zahlreiche Resynthesen identifiziert werden, die nach künstlicher Inokulation mit *V. longisporum* signifikant weniger Krankheitssymptome zeigten als die tolerant eingestufte Referenzsorte ‚Express‘. Insbesondere zeichneten sich einige weitere Resyntheselinien aus der Kreuzung *B. rapa* 56515 (Chinakohl ‚He Tou Zao‘) x *B. oleracea* 8207 (syrische Wildkohlsammlung) durch eine ausgeprägte Resistenz aus. Eine sehr gute *V. longisporum*-Resistenz wurde ebenfalls in Resynthesen aus Kreuzungen zwischen Kashirka 202 und Ölrübsenlinien mit 00- bzw. 0+-Qualität festgestellt. Aufgrund genetischer Variation für Erucasäuregehalt in Kashirka 202 zeichneten sich einige dieser Resistenzträger auch durch weitgehend

erucasäurefreies Öl, manche zusätzlich durch einen moderaten Samenglucosinolatgehalt aus. Diese Kombination von *Verticillium*-Resistenz mit 0+-Qualität stellt ausgesprochen wertvolles Material für Rückkreuzungen mit Elitezuchtmaterial dar.

Um die genetische Basis der Resistenz zu beleuchten und einen ersten Schritt zur Entwicklung von Werkzeugen für eine markergestützte Selektion zu machen, wurde erstmals eine QTL-Analyse (*quantitative trait loci*) für *V. longisporum*-Resistenz in *B. napus* durchgeführt. Hierfür wurde in einer für *V. longisporum*-Resistenz spaltenden doppelhaploiden (DH) Population eine genetische Kopplungskarte anhand von AFLP- (*amplified fragment length polymorphism*), SSR- (*simple sequence repeat*) und RFLP- (*restriction fragment length polymorphism*) Markern erstellt und signifikante Resistenz-QTL aufgrund von Daten aus künstlichen Inokulationen der DH-Linien mit *V. longisporum*-Isolaten in vier Gewächshausexperimenten ermittelt: Insgesamt konnten vier signifikante QTL identifiziert werden, die zusammen 45,7% der phänotypischen Varianz für *V. longisporum*-Reaktion in dieser Kreuzung erklärten. Für die Entwicklung von molekularen Markern zum Einsatz für eine markergestützte Selektion eignen sich insbesondere zwei Resistenz-QTL auf den Chromosomen N14 und N15, die in mehreren unabhängigen Experimenten detektiert wurden und offenbar eine nur geringe Umweltinteraktion aufweisen. Die entsprechenden Genomregionen und die mit den QTL eng gekoppelten Marker sollen in weiterführenden Arbeiten als Ausgangspunkt für vergleichende Analysen verschiedener Resistenzquellen verwendet werden. Ferner können sie für eine karten- und syntäniegestützte Klonierung der beteiligten Gene sowie zur Pyramidisierung unterschiedlicher Resistenzallele in neuen Winterrapssorten dienen.

6 Summary

Increasing demand for rapeseed oil in recent decades has led to intensified cultivation of oilseed rape (*Brassica napus*) in Northern Europe. This in turn has resulted in multiplication of the soil borne pathogen *Verticillium longisporum* and consequently in a serious expansion of wilt disease on rapeseed. In the gene pool of existing *B. napus* cultivars no resistance resources for *Verticillium* wilt are known. In this work *B. rapa* and *B. oleracea* gene bank accessions were screened for resistance to *V. longisporum* in order to identify resistance sources for potential use in oilseed rape breeding. Interspecific hybridisation of resistant *B. rapa* and *B. oleracea* genotypes was then used to produce resynthesised *B. napus* lines, with the aim of introducing the new resistances into the gene pool of elite oilseed rape.

Pathogen tests with artificial inoculation and visual scoring of the infection resulted in the identification of the *B. rapa* accessions 13444, G454 (both Chinese cabbage) and an apetalous *B. rapa* genotype which exhibited a moderate resistance to *V. longisporum*. In addition to previously described resistant *B. oleracea* germplasm, the Russian white cabbage variety Kashirka 202 (accession no. 1428) was identified as a new source of *V. longisporum* resistance. Interspecific hybridisations of these putative resistant genotypes resulted in numerous resynthesised rapeseed lines that exhibited significantly reduced disease symptoms in comparison to the tolerant winter oilseed rape reference variety 'Express'. Resynthesised rapeseed lines developed from hybridisations between *B. rapa* accession 56515 (Chinese cabbage 'He Tou Zao') and *B. oleracea* accession 8207 (a Syrian wild cabbage collection) showed a particularly strong resistance phenotype. Very good *V. longisporum* resistance was also observed in resynthesised rapeseed lines derived from crosses of Kashirka 202 with oilseed *B. rapa* varieties exhibiting 00 or 0+ seed quality. Because Kashirka 202 was found to segregate for the presence/absence of erucic acid in the seed oil, many of the resistant

resynthesised rapeseed lines were free of erucic acid, and some also possessed only moderate levels of seed glucosinolates. This combination of *V. longisporum* resistance with 0+ seed quality represents extremely valuable material for backcrossing with elite oilseed rape breeding lines.

In order to investigate the genetics of *V. longisporum* resistance in *B. napus*, and as a first step towards the development of tools for marker-assisted selection, the first analysis of quantitative trait loci (QTL) for *V. longisporum* resistance in *B. napus* was performed. For this purpose a genetic linkage map was generated in a doubled haploid (DH) population segregating for the resistance, using amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. Resistance QTL were calculated using disease index data obtained from inoculations of the DH lines in four separate greenhouse experiments. Four QTL could be identified, which explain in total 45.7% of the phenotypic variance observed in the DH population. Two QTL on chromosomes N14 and N15 are of particular interest for further use in marker assisted breeding programs, because they were detected in several independent experiments and seem to exhibit only very few genotype-environment interactions. These two genome regions, and the markers that are closely linked to the respective QTL, will now form a basis for further studies aimed at comparative analyses of different resistance sources, map-based and syntenic-based cloning of the responsible resistance genes, and for pyramiding of different resistance alleles in new winter oilseed rape varieties.

7 Literaturverzeichnis

- AGRIOS, G.N. 2005: Plant Pathology. Fifth Edition, Elsevier Academic Press
- ASINS, M.J. 2002: Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. Plant Breeding 121, 281-291
- BECKER, H.C. 1993: Pflanzenzüchtung. Ulmer-Verlag, Stuttgart
- CHÈVRE, A. M., F. EBER, P. THIS, P. BARRET, X. TANGUY, H. BRUN, M. DELSENY und M. RENARD 1996: Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus* – *B. nigra* addition lines. Plant Breeding 115, 113-118
- CHRISTEN, O. 2001: Ertrag, Ertragsstruktur und Ertragsstabilität von Weizen, Gerste und Raps in unterschiedlichen Fruchtfolgen. Pflanzenbauwissenschaften 5, 33-39
- CROUCH, J.H., B.G. LEWIS und R.F. MITHEN, 1994: The effect of a genome substitution on the resistance of *Brassica napus* to infection by *Leptosphaeria maculans*. Plant Breeding 112, 265-278
- COLLARD, B.C.Y., M.Z.Z. JAHUFER, J.B. BROUWER und E.C.K. PANG 2005: An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142, 169-196
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG E.V. 2004: Ernährungsbericht. ISBN: 3-88749-183-1
- DIEDERICHSEN, E. und M.D. SACRISTAN 1996: Disease response of resynthesized *Brassica napus* L. lines carrying different combinations of resistance to *Plasmodiophora brassicae* Wor. Plant Breeding 115, 5-10
- DIEDERICHSEN, E., B. WAGENBLATT, V. SCHALLEHN, U. DEPPE und M. SACRISTAN 1996: Transfer of clubroot resistance from resynthesised *Brassica napus* into oilseed rape -

- Identification of race-specific interactions with *Plasmodiophora brassicae*. Acta Hort. (ISHS) 407, 423-430
- DIXELIUS, C. 1999: Inheritance of the resistance to *Leptosphaeria maculans* of *Brassica nigra* and *B. juncea* in near-isogenic lines of *B. napus*. Plant Breeding 118, 151-156
- DREYER F., K. GRAICHEN und C. JUNG 2001: A major quantitative trait locus for resistance to Turnip Yellow Virus (TuYV, syn. beet western yellows virus, BWYV) in rapeseed. Plant Breeding 120, 457-462
- DUDLEY, J.W. 1993: Molecular markers in plant improvement: Manipulation of genes affecting quantitative traits. Crop. Sci. 33, 660-668
- DUNKER, S. 2006: *Verticillium longisporum* – für den Rapsanbau eine neue Herausforderung. Raps 2, 12-14
- DUNKER, S., H. KEUNECKE und A. VON TIEDEMANN 2006: *Verticillium longisporum* in winter oilseed rape – Impact on plant development and yield. Integrated Control in Oilseed Crops 29, 365-374
- EYNCK, C., B. KOOPMANN, G. GRUNEWALDT-STOECKER, P. KARLOVSKY und A. VON TIEDEMANN 2007: Differential interactions of *Verticillium longisporum* und *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. Europ. J. Plant Path. 118, 259-274
- FLOR, E.E. 1971: Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9-275-296
- FNR (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.) 2007; <http://www.fnr.de>
- FRENTZEN, M. und F.P. WOLTER 1999: Rapsöl mit sehr hohem Erucasäuregehalt. Vortr. Pflanzenzüchtg. 45, 93-113
- FRIEDT, W. und W. LÜHS 1998: Recent developments and perspectives of industrial rapeseed breeding. Fett/ Lipid 100, 219-226
- GIRKE, A. 2002: Neue Genpools aus resynthetisiertem Raps (*Brassica napus* L.) für die Hybridzüchtung. Dissertation, Universität Göttingen
- GIRKE, A., H.C. BECKER und G. ENGQVIST 1999: Resynthesized rapeseed as a new genepool for hybrid breeding. Proc. 9th Int. Rapeseed Cong., Cambridge, UK

- HAPPSTADIUS, I., A. LJUNGBERG, B. KRISTIANSSON und C. DIXELIUS 2003: Identification of *Brassica oleracea* germplasm with improved resistance to Verticillium wilt. Plant Breeding 122, 30-34
- HEALE, J.B. und V.K. KARAPAPA 1999: The verticillium threat to Canada's major oilseed crop: canola. Can. J. Plant Pathol. 21, 1-7
- HENNIG, W. 1998: Genetik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- HONERMEIER, B. und M. GAUDSCHAU 2001: Vorfruchtwert von Winterraps, UFOP Praxisinformationen; <http://www.ufop.de>
- JOHANNSON, A., J. STAAL und C. DIXELIUS 2006: Early responses in the *Arabidopsis*-*Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on *NDRI*, JA-and ET-associated signals via Cytosolic NPR1 and *RFO1*. Mol. Plant Microbe Interactions 19, 958-969
- KARAPAPA, V.K., B.W. BAINBRIDGE und J.B. HEALE 1997: Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. Mycol. Res. 101, 1281-1294
- KIMBER, D.S. und D.I. MCGREGOR 1995: The species and their origin, cultivation and world production. In: D. Kimber and D.I. McGregor (Hrsg.) Brassica Oilseeds: Production and Utilization, 1-9. CABI Publishing, Wallingford, UK
- KLEWER, A. 2005: Übertragung von Resistenzen gegen die *Alternaria*-Rapsschwärze aus verwandten Arten in *Brassica napus* L. Dissertation, Freie Universität Berlin
- KROLL, H. 1994: Ein archäologischer Rapsfund des 16. Jahrhunderts, entdeckt in Heide in Holstein, Norddeutschland. J. Agron. Crop Sci. 173, 17-21
- LI, C.-X. und W.A. COWLING 2003: Identification of a single dominant allele for resistance to blackleg in *Brassica napus* 'Surpass 400'. Plant Breed. 122, 485-488
- LI, H. und K. SIVASITHAMPARAM 2003: Breakdown of a *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* single dominant blackleg resistance gene in *B. napus* rapeseed by *Leptosphaeria maculans* field isolates in Australia. Plant Disease 87, 752
- LÜHS, W. und W. FRIEDT 1999: Entwicklung von neuartigem Ausgangsmaterial für die Züchtung von Raps (*Brassica napus* L.) durch experimentelle Resynthese. Vortr. Pflanzenzüchtg. 45, 43-61

- LYDIATE, D., A.G. SHARPE und I. Parkin 1995: Collinearity and homeologous recombination between the A and C genomes of *Brassica napus*. Proc. 9th Int. Rapeseed Cong. Cambridge, UK
- MAKOWSKI, N. 2000: Winterraps (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (Metzg.) Sinsk.). In: LÜTKE-ENTRUP, N. und J. OEHMICHEN (Hrsg.) Lehrbuch des Pflanzenbaues, Band 2: Kulturpflanzen, Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen
- MELCHINGER, A.E. und H.F. UTZ 2002: Einsatz von Markern für die Selektion in der Pflanzenzüchtung: Theorie und praktische Beispiele. Vortr. Pflanzenzüchtg. 54, 11-21
- MIETKIEWSKA, E., E.M. GIBLIN, S. WANG, D.L. BARTON, J. DIRPAUL, J.M. BROST, V. KATAVIC und D.C. TAYLOR 2004: Seed-specific heterologous expression of a nasturium FAE gene in *Arabidopsis* results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid. Plant Physiol. 136, 2665-2675
- MITHEN, R.F. und R. MAGRATH 1992: Glucosinolates and resistance to *Leptosphaeria maculans* in wild and cultivated *Brassica* species. Plant Breeding 108, 60-68
- NELSON, R.R. 1978: Genetics of horizontal resistance to plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 16:359-378
- OERKE, E.-C. 2006: Crop losses to pests. J. Agricult. Sci. 144, 31-43
- OSBORN, T.C., D.V. BUTRULLE, A.G. SHARPE, K.J. PICKERING, I.A.P. PARKIN, J.S. PARKER, und D.J. LYDIATE 2003: Detection and effects of a homeologous reciprocal transposition in *Brassica napus*. Genetics 165, 1569-1577
- PARKIN, I.A.P., A.G. SHARPE, D.J. KEITH und D.J. LYDIATE 1995: Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). Genome 38, 1122-1131
- PAUL, V.H. 2003: Raps-Krankheiten, Schädlinge, Schadpflanzen. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen
- PIRES, J. C., J. ZHAO, M.E. SCHRANZ, E.J. LEON, P.A. QUIJADA, L.N. LUKENS und T.C. OSBORN 2004: Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (Brassicaceae). Biol. J. Linnean Society 82, 675-688
- PRAKASH, S. und V.L. CHOPRA 1993: Genome manipulation. In: K.S. LABANA, S.S. BANGA und S.K. BANGA (Hrsg.): Breeding Oilseed *Brassicas*. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 19, 108-133. Springer-Verlag, Heidelberg, New York

- RAHMAN, M.H. 2001: Production of yellow-seeded *Brassica napus* through interspecific crosses. Plant Breeding 120, 463-472
- RAHMAN, M.H. 2005: Resynthesis of *Brassica napus* L. for self-incompatibility: self-incompatibility reaction, inheritance and breeding potential. Plant Breeding 124, 13-19
- RANEY, J.P., G.F.W. RAKOW und T.V. OLSEN 1999: Identification of *Brassica napus* germplasm with seed oil low in saturated fat. Proc. 10th Int. Rapeseed Cong., Canberra, Australia
- RÖBBELEN, G. 1999: Einführung. Vortr. Pflanzenzüchtung 45, 9-27
- ROY, N.N. 1978: A study on disease variation in the populations of an interspecific cross of *Brassica juncea* L. x *B. napus* L. Euphytica 27, 145-149
- SACRISTÁN, M.D. und M. GERDEMANN 1986: Different behavior of *Brassica juncea* and *B. carinata* as sources of *Phoma lingam* resistance in experiments of interspecific transfer to *B. napus*. Z. Pflanzenzüchtg 97, 304-314
- SANCHEZ, A.C., D.S. BRAR, N. HUANG, Z. LI und G.S. KHUSH 2000: Sequence tagged site marker assisted selection for three bacterial blight resistance genes in rice. Crop. Sci. 40, 792-797
- SCARTH, R. und J. TANG 2006: Modification of *Brassica* oil using conventional and transgenic approaches. Crop Sci. 46, 1225-1236
- SCHMIDT, R. 2002: Plant genome evolution: Lessons from comparative genomics at the DNA level. Plant Mol Biol 48, 21-37
- SCHRANZ, M.E. und T.C. OSBORN 2004: *De novo* variation in life-history traits and responses to growth condition of resynthesized polyploid *Brassica napus* (Brassicaceae). Am. J. Botany 91, 174-183
- SEYIS, F., W. FRIEDT und W. LÜHS 2005: Development of resynthesized rapeseed (*Brassica napus* L.) forms with low erucic acid content through *ovulum* culture. Asian J. Plant Sci. 4, 6-10
- SLOMINSKI, B.A., J. SIMBAYA, L.D. CAMPBELL, G. RAKOW und W. GUENTER 1999: Nutritive value for broilers of meals derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola. Anim. Feed Sci. Technol. 78, 249-262

- SNOWDON, R.J., W. LÜHS and W. FRIEDT 2007: Oilseed rape (*Brassica napus* L.). In: C. Cole (Hrsg.) Genome mapping and molecular breeding in plants. Springer Verlag, Berlin
- SONG, K., K. TANG und T.C. OSBORN 1992: Phylogenetic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP-analysis. *Genome* 35, 992-1001
- SONG, K., K. TANG und T.C. OSBORN 1995: Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implication for polyploid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7719-7723
- STATISTISCHES BUNDESAMT, Fachserie 3, R 3.2.1, Feldfrüchte August/September 2007; <http://www.destatis.de>
- STRUSS, D., C. F. QUIROS, J. PLIESKE und G. RÖBBELEN 1996: Construction of *Brassica* B genome syntenic groups based on chromosomes extracted from three different sources by phenotypic, isozyme and molecular markers. *Theor Appl Genet* 93, 1026-1032
- TIEDEMANN, A. VON und P. STEINBACH 2007: Krankheiten durch pilzliche Pathogene. In: O. CHRISTEN, W. FRIEDT (Hrsg.), Winterraps, das Handbuch für Profis. DLG-Verlag, Frankfurt
- TOEPFER INTERNATIONAL GMBH: Statistikbroschüre Marktbericht Oktober 2007; <http://www.acti.de>
- U, N. 1935: Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* an pelicular mode of fertilisation. *Jap. J. Bot.* 7, 389-452
- UDALL, J.A., P.A. QUIJADA, T.C. OSBORN 2005: Detection of chromosomal rearrangements derived from homoeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. *Genetics* 169, 967-979
- VAN DER PLANK, J.E. 1968: Disease resistance in plants. Academic Press, New York/London, 206
- VERONESE, P., M. L. NARASIMHAN, R. A. STEVENSON, J. K. ZHU, S.C. WELLER, K. V. SUBBARO und R. A. BRESSAN 2003: Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 35, 574-587
- WERNER K., W. FRIEDT und F. ORDON 2005: Strategies for pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). *Molecular Breeding* 16, 45-55

- YOUNG, N.D. 1996: QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. Annu. Rev. Phytopathol. 34, 479-501
- ZEISE, K. und P. STEINBACH 2004: Schwarze Rapswurzeln und der Vormarsch der Verticillium-Rapswelke. Raps 4, 170-174
- ZMP (Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft), Das aktuelle Preisbarometer, 2006; <http://www.zmp.de>

8 Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>Brassica A-Genom</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AUDPC	<i>Area Under the Disease Progress Curve</i>
CC	<i>Brassica C-Genom</i>
CIM	<i>Composite Interval Mapping</i>
cM	centiMorgan
DH	Doppelhaploid
DI	<i>Disease Index</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
F	Filialgeneration
LOD	<i>Logarithm of Odds</i>
n	Anzahl der Chromosomen im haploiden Genom
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
R ²	Bestimmtheitsmaß
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RS	Resyntheseraps
SIM	<i>Simple Interval Mapping</i>

ssp. *Subspecies*

SSR *Simple Sequence Repeat*

0+ Qualitätsbezeichnung für erucasäurefreien glucosinolathaltigen Raps

00 Qualitätsbezeichnung für erucasäurefreien glucosinolatarmen Raps

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung der Universität Giessen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt angefertigt, dem ich für die Überlassung des interessanten Themas herzlich danken möchte. Der gewährte Freiraum zur Bearbeitung des Themas sowie die Unterstützung zur rechten Zeit waren wohl proportioniert und haben mich zielorientiert durch die Promotionszeit geführt.

Herrn Prof. Dr. Andreas von Tiedemann möchte ich für die jederzeit gewährte, hilfreiche Unterstützung im Rahmen unseres Verbundprojektes und die spontane Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens vielmals danken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Rod Snowdon, der mich bei der Projektorganisation, der Erstellung der drei Manuskripte sowie der Verfassung dieser Arbeit exzellent betreut hat.

Meiner Projektpartnerin Christina Eynck und ihrer technischen Assistentin Jutta Schaper danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, den regelmäßigen Austausch sowie für die Organisation und Durchführung der Resistenztests in Göttingen.

Ohne tatkräftige Unterstützung hätte dieses Projekt nicht in dem durchgeführten Umfang stattfinden können. Deshalb möchte ich an dieser Stelle unserem Gärtner Roland Kürschner danken, der sich mit viel Engagement, Geduld und Verantwortungsbewusstsein um meine Pflanzen gekümmert hat und mit seiner herzlichen warmen Art stets für angenehme Arbeitsatmosphäre im Gewächshaus gesorgt hat.

Meiner guten Freundin Sonja Sahner möchte ich für ihre ausgezeichnete technische Assistenz danken. Ihr großes Interesse an dem Projekt sowie die Fülle ihrer Erfahrungswerte hat sie zu einer wertvollen Diskussionspartnerin für die technische Projektplanung gemacht. Durch ihre hervorragende Hilfe bei Kreuzungen und Selbstungen im Gewächshaus und bei *in vitro*-Arbeiten im Labor hat sie erheblich zum Gelingen des Projekts beigetragen.

Ich möchte Liane Renno und Daniela Baetzel danken, die mich bei den molekularen Arbeiten unterstützt haben.

Meinen Institutskollegen möchte ich herzlich für die gute Stimmung sowie die gemeinsame Freizeitgestaltung danken.

Bei meinen NPZ-Kollegen, insbesondere bei meiner Korrekturleserin Dörte Kruse, möchte ich mich für das Interesse und die Anteilnahme an meiner Doktorarbeit bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Gesellschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP) und dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV).