

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

**Nutzung genetischer Diversität in Raps (*Brassica napus*) für
Assoziationsstudien zur Resistenz gegen die Wurzelhals- und
Stängelfäule (*Leptosphaeria maculans*)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

im Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Katrin Link
geboren am 03. Oktober 1974 in Leverkusen

Giessen, 2007

**Dissertation im Fachbereich Agrarwissenschaften,
Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Pflanzenbau & Pflanzenzüchtung I**

Dekan: Prof. Dr. R. Hermann

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzende: Prof. Dr. A. Otte

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Friedt

2. Gutachter: Prof. Dr. K.-H. Kogel

Prüferin: Prof. Dr. S. Schnell

Prüfer: Prof. Dr. B. Honermeier

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2008

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

**Nutzung genetischer Diversität in Raps (*Brassica napus*) für
Assoziationsstudien zur Resistenz gegen die Wurzelhals- und
Stängelfäule (*Leptosphaeria maculans*)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

im Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Katrin Link
geboren am 03. Oktober 1974 in Leverkusen

Giessen, 2007

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Globale Anbaubedeutung von Raps.....	3
2.2 Bedeutung der Phoma-Wurzelhals- und Stängelfäule bei Raps.....	4
2.3 <i>Phoma lingam</i> -Resistenz bei Winterraps	8
2.4 Genetische Analysen und molekulare Marker für Phoma-Resistenz.....	9
2.5 Allel-Merkmal-Assoziationsstudien.....	11
2.6 <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNP).....	14
2.7 Microsatellitenmarker (<i>Simple Sequence Repeats</i> : SSRs).....	16
2.8 Resistenzgen-analoge Sequenzen (RGAs).....	17
2.9 Resistenzgenkandidaten-Sequenzen (<i>Resistance Gene Candidates</i> , RGCs)....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Pflanzenmaterial.....	20
3.2 Phoma-Felddaten.....	21
3.3 DNA-Extraktion.....	22
3.4 Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	22
3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR): Primerentwicklung und Reaktionsbedingungen.....	23

3.5.1	Isolierung von Resistenzgenanalogen Sequenzen (RGAs).....	23
3.5.2	Amplifikation von Sequenzen für Resistenzgenanaloga (RGA) und Resistenzgenkandidaten (RGC).....	25
3.5.3	PCR-Bedingungen für Base-Excision Sequence Scanning (BESS-T).....	26
3.6	Enzymatischer Verdau der PCR-Produkte: BESS-T.....	27
3.7	Klonierungen.....	28
3.8	Sequenzierung.....	28
3.9	<i>Simple sequence repeats</i> (SSRs).....	29
3.10	Statistische Auswertung.....	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Amplifikation von Resistenzgen-Analoga (RGAs) mittels degenerierter Primer für Resistenzgen-Motive.....	30
4.2	Amplifikation von Resistenzgen-Kandidaten (RGCs) mittels Locus- spezifischer Primer.....	31
4.3	Sequenz-unabhängige SNP-Detektion und statistische Auswertung der ermittelten Daten.....	33
4.4	Identifikation von <i>L. maculans</i> -Resistenzgenkandidaten.....	38
4.5	Genomweite Assoziationsstudien mit SSR-Markern.....	41
5	Diskussion	45
6	Zusammenfassung	54
7	Summary	56
8	Literaturverzeichnis	58
9	Anhang	72

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Lebenszyklus von <i>L. maculans</i> ; anamorph: <i>P. lingam</i>	5
Abb. 2 a-e	Symptome der Infektion verschiedener Rapsgewebe mit <i>L. maculans</i>	6
Abb. 3	<i>Linkage disequilibrium</i> um eine Mutation in einem Ahnengen.....	13
Abb. 4	PCR-Produkte der Amplifikationen mit unterschiedlichen degenerierten Primerkombinationen und der Amplifikation mit einzelnen Primern.....	30
Abb. 5	Exemplarisch dargestellter Sequenzvergleich für RGA-Sequenzen.....	31
Abb. 6	Exemplarisch dargestellter Sequenzvergleich der Kandidatengensequenz DH26-20-T7 der Genotypen `Express`, `Jet Neuf`, `Aviso`, `Darmor`, `Erox`, `Maplus`, `Idol` und `Cobra`	33
Abb. 7 a-c	Gelausschnitt eines BESS-T-Scans am Beispiel RGC1, RGC11 und RGC6 über 48 Genotypen des <i>Coresets</i>	34
Abb. 8 a-b	Haplotypen von RGC3 (Homolog zur Blattrost Resistenz Kinase Gen LR1 aus <i>Triticum aestivum</i>) und RGA10 (Homolog zum Resistenzgenalog 18 von Fourmann <i>et al.</i> 2001).....	39
Abb. 9	Korrelation der Phoma-Felddaten an den jeweiligen Züchter-eigenen Standorten.....	40
Abb.10	Cluster von <i>Arabidopsis</i> Sequenzen, die für RGA-Sequenzen kodieren	48
Abb. 11	<i>Arabidopsis</i> -Chromosomenpositionen der nächsten Orthologen zu allen mit Phoma-Resistenz assoziierten RGA- und RGC-Sequenzen zusammen mit über vergleichende Kartierung ermittelten möglichen Links dieser Genomregionen zu <i>B. napus</i> -Kopplungsgruppen.....	53

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über die verwendeten <i>Brassica napus</i> Genotypen: „GABI-BRIDGE <i>Coreset</i> “	20
Tab. 2	Als degenerierte Primer genutzte Oligonukleotide zur Isolierung von Resistenzgenanalogen Sequenzen.....	23
Tab. 3	Übersicht aller von Fristensky <i>et al.</i> (1999) identifizierten, überexprimierten cDNA-Sequenzen aus der der Abwehrreaktion von mit <i>L. maculans</i> infizierten <i>B. napus</i> -Genotypen, die Homologien zu Abwehr, Stress- oder Resistenz-Genen aufweisen.....	32
Tab. 4	Übersicht über die RGA- und RGC-Sequenzen, in denen Polymorphismen detektiert werden konnten.....	35
Tab. 5	Ergebnisse von Assoziationsanalysen zwischen SNP-Allel- und RGA- bzw. RGC-Sequenzen im <i>Coreset</i> und Feld-Resistenzdaten mittels <i>Single-Locus F-Test</i>	36
Tab. 6	Ergebnisse von Assoziationsanalysen zwischen SNP-Allel- und RGA- bzw. RGC-Sequenzen im <i>Coreset</i> und Gewächshaus-Resistenzdaten mittels <i>Single-Locus F-Test</i>	36
Tab. 7	Assoziationsanalysen zwischen SNP-Allel- und RGA- bzw. RGC-Sequenzen im <i>Coreset</i> und Phoma-Resistenzdaten der Keimlingstests mittels <i>Single-Locus F-Test</i>	37
Tab. 8	<i>Haplotype-Trend-Regression</i> signifikant mit Phoma-Resistenz assoziierter RGA- bzw. RGC-Sequenzen der Feldprüfungen.....	37
Tab. 9	<i>Haplotype-Trend-Regression</i> signifikant mit Phoma-Resistenz assoziierter RGA- bzw. RGC-Sequenzen der Gewächshausprüfungen.....	38
Tab. 10	<i>Haplotype-Trend-Regression</i> signifikant mit Phoma-Resistenz assoziierter Sequenzen der Keimlingsresistenzversuche.....	38
Tab. 11	Ergebnisse der <i>Single-Locus F-Tests</i> von 21 SSR-Allelen mit über 10% Allelhäufigkeit im Genotypen- <i>Coreset</i> , die in Feld- sowie Gewächshaus-tests (GWH) mit dem <i>Coreset</i> eine signifikante Assoziation ($p < 0,05$) mit Phoma-Resistenz aufwiesen.....	42
Tab. 12	Bekanntes <i>B. napus</i> -Kartenpositionen von mit Phoma-Resistenz assoziierten SSR-Allelen, für die auch in einem oder mehreren der Züchter-Verifikationssets eine signifikante Assoziation mit Resistenz detektiert werden konnte, sowie potentiell assoziierte <i>quantitative trait loci</i> (QTL) für Phoma-Resistenz.....	43

Abkürzungsverzeichnis

++	Qualitätsbezeichnung für erucasäurehaltigen glucosinolathaltigen Raps
0+	Qualitätsbezeichnung für erucasäurefreien glucosinolathaltigen Raps
00	Qualitätsbezeichnung für erucasäurefreien glucosinolatarmen Raps
A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BESS	<i>Base Excision Sequence Scanning</i>
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CC	<i>Coiled-coil</i>
cDNA	<i>copy</i> DNA
Col	Columbia
dH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DH	Doppelhaploid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	äquivalente Mischung der 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESTs	Expressed Sequence Tags
G	Guanin
HR	hypersensitive Reaktion
HSP	Hitzeschockprotein
ID	Identität
LB	<i>lysogeny broth</i>
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i>
LE	<i>Linkage Equilibrium</i>
Ler	Landsberg erecta
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
LZ	<i>Leucine zipper</i>
M	Molar
Mbp	Mega Basenpaare
Min	Minuten
Mm	Milimolar
NBS	<i>Nucleotide binding site</i>
ng	nanogramm
nm	Nanometer
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PR	<i>pathogenesis related</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
RAR	<i>required for Mla12 resistance</i>
RFLP	<i>Restriktions Fragment Length Polymorphism</i>
RGA	Resistenzgen-analoga Sequenzen
RGC	<i>Resistance Gene Candidates</i>

ROS	<i>Reactive Oxygen Species, ROS</i>
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SGT	<i>suppressor of the G₂ allele of <i>skp1</i></i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ssp	Subspezies
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TIR	Toll/Interleukin-1 Receptor
TNE	Tris/NaCL/EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
μl	mikroliter
μM	mikromolar

1 Einleitung

Winterraps (*Brassica napus* ssp. *napus* L.) gehört zu den wichtigsten Kulturpflanzen in Deutschland. Seit man in den 1970er Jahren begonnen hat, konsequent die Qualität dieser Ölpflanze durch züchterische Maßnahmen zu verbessern, ist die Anbaufläche in Deutschland und Europa kontinuierlich angestiegen. Auch weltweit gehört der Raps wegen seiner hohen Ölerträge und seiner vielfältigen Nutzung als Speiseöl, industrielles Öl und als wichtiger Lieferant von Biodiesel (Rapsölmethylester, RME), zu den wichtigsten Ölsaaten. Das hohe Ertragspotential wird allerdings insbesondere durch pilzliche Krankheitserreger negativ beeinflusst. Hier kommt dem Erreger der allgemein als „Phoma“ bekannten Wurzelhals- und Stängelfäule *Leptosphaeria maculans* (Desm) Ces. & de Not. [anamorph *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm.] die größte Bedeutung im Rapsanbau zu. Aufgrund der hohen Ertragsverluste, die *L. maculans* verursacht, sind neben der Qualitätszüchtung auch die Fortschritte der Resistenzzüchtung für gesicherte, hohe Erträge von großer Bedeutung.

Im derzeitigen Winterraps-Genpool ist eine breite Variation für Phoma-Resistenz vorhanden, jedoch ist es aufgrund der quantitativen Ausprägung der Resistenzreaktion schwierig, effektive Selektionsmarker zu entwickeln oder gar die beteiligten Gene zu identifizieren. Obwohl in den letzten Jahren verschiedene Resistenzloci mittels quantitativ-genetischer Analysen identifiziert worden sind, stehen bisher nur wenige nützliche molekulare Selektionsmarker für die markergestützte Selektion auf Phoma-Resistenz zur Verfügung. Demnach konnten in *B. napus* bisher auch keine Gene identifiziert werden, die für eine ausgeprägte Resistenz gegen *L. maculans* kodieren.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Detektion und Nutzung der genetischen Diversität von Resistenzgen-analogen Sequenzen (RGA) und Resistenzgenkandidaten (RGC) für Assoziationsstudien bzgl. Resistenz gegen *L. maculans* bei Winterraps (*B. napus*). In einem genomweiten Ansatz sollten RGAs mit Hilfe degenerierter PCR-Primer für Resistenzgenmotive aus *nucleotide binding sites* (NBS-Domäne), *Toll/interleucin-1-*

receptors (TIR-Domäne) sowie *leucine-rich repeats* (LRR-Domäne) amplifiziert und sequenziert werden, um Locus-spezifische Primer für einzelne RGA-Loci abzuleiten. Diese Primer sollten zur Detektion von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), die ein Screening einer großen Anzahl von Genotypen im Hochdurchsatzverfahren (*high-throughput*) erlaubt, eingesetzt werden. Die Effektivität dieses Ansatzes für eine Anwendung in der Resistenzzüchtung sollte anhand der Phoma-Resistenz über Allel-Merkmal-Assoziationsstudien demonstriert werden. Für die SNP-Detektion wurde ein Genotypen-Sortiment (*Coreset*) aus 54 genetisch diversen Winterraps-Sorten mit breiter Variation in der Phoma-Resistenzreaktion zusammengestellt. Multiple SNP-Loci innerhalb der ausgesuchten Sequenzen sollten genutzt werden, um in dem *Coreset* Haplotypen zu identifizieren. Durch Assoziationsanalysen zwischen SNP-Allelen bzw. Haplotypen und der Resistenzreaktion der Genotypen gegenüber Phoma sollte die Effizienz des Ansatzes zur Entwicklung RGA-basierter Marker für die Resistenzzüchtung bei Winterraps geprüft werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Globale Anbaubedeutung von Raps

Dank der züchterischen Erfolge bei der Entwicklung von Rapsorten mit sehr geringem Erucasäuregehalt im Samenöl in den frühen 1970er Jahren und mit dem zusätzlich glucosinolatarmen 00-Raps erlebte der Rapsanbau Mitte der 1980er Jahre weltweit einen enormen Aufschwung, vor allem in Kanada, Westeuropa, Australien und China. In Deutschland ist die Anbaufläche für die Rapsernte 2007 auf ca. 1,5 Mio. ha angestiegen, dies entspricht einem durchschnittlichen Anteil von mehr als 10 % an der Ackerfläche in Deutschland (BMELV¹ 2006). Im Vergleich der weltweit wichtigsten zehn Ölsaaten², die im Jahr 2004/2005 zu einer Erntemenge von 378 Mio t führten, liegt der Raps mit 46 Mio t an zweiter Stelle hinter der Sojabohne (216 Mio t; BMELV 2006). Während in Kanada und Australien primär Sommerraps angebaut wird, bieten vor allem die nord- und mitteleuropäischen Klimaverhältnisse beste Voraussetzungen für einen hohen Ertrag von Winterraps.

Die enorme Ausweitung des Winterrapsanbaus, der daraus resultierenden Tendenz zu engeren Fruchtfolgen sowie die ungünstigen Bodenverhältnisse und schlechten Auflaufbedingungen seit den 1990er Jahren führten zum verstärkten Auftreten von Schädlingen und Krankheitserregern (AMELUNG *et al.* 1996, GARBE 1996) und somit zu einer negativen Beeinflussung des hohen Ertragspotentials. Zu den wirtschaftlich wichtigsten Krankheitserregern bei Raps zählen *Leptosphaeria maculans*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Weißstängeligkeit), *Plasmodiophora brassicae* (Kohlhernie) und *Verticillium longisporum* (Verticillium-Welke). Diese wichtigen Rapskrankheiten können hohe Ertragsverluste verursachen (PAUL 1988). Daher sind neben der Qualitätszüchtung

¹ Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz

² Sojabohnen, Baumwollsaat, Raps, Sonnenblumen, Erdnüsse, Sesam, Palmkerne, Kopra, Leinsamen, Rizinusbohne

auch Fortschritte der Resistenzzüchtung von maßgeblicher Bedeutung für hohe und sichere Erträge.

Aufgrund der steigenden Nachfrage nach pflanzlichen Ölen weltweit hat die Rapsproduktion jüngst stark zugenommen (ZEDDIS 2006) Diese Tendenz erfordert eine verbesserte Bewirtschaftung, insbesondere einen effektiveren Pflanzenschutz gegen Schädlinge und Krankheiten. Der Anbau resistenter Sorten ist hierbei eine wichtige Maßnahme im Sinne einer integrierten, umweltverträglichen Pflanzenproduktion.

2.2 Bedeutung der Phoma-Wurzelhals- und Stängelfäule bei Raps

Der Erreger der im deutschsprachigen Raum als „Phoma“-Krankheit bekannten Wurzelhals- und Stängelfäule, *Leptosphaeria maculans* ist ein Ascomycet und ein bedeutendes Pathogen mit einem breiten Wirtskreis, der sich aber vornehmlich auf die Brassicaceen beschränkt. Neben Raps werden alle Kohlarten, Kohlrübe und Stoppelrübe, ferner *B. rapa*, *Raphanus* ssp., *Sinapis alba*, *S. arvensis*, *A Armorica rusticana* und *Cheiranthus cheiri* befallen (PAUL 1988). Die Fähigkeit des Pilzes, sich sowohl asexuell über Pyknidiosporen als auch sexuell über Ascosporen zu vermehren, stellt ein großes Verbreitungspotential dar (PAUL 1988; Abb. 1).

Der Pilz bildet auf abgestorbenem Material Fruchtkörper, die als Pseudothezien (GUGEL & PETRIE 1992, WILLIAMS 1992) bzw. Perithezieren (KIRCHNER 1974, SEIDEL *et al.* 1988) bezeichnet werden. In ihnen reifen Ascosporen heran, die mit dem Wind über größere Entfernung transportiert werden können. Diese stellen eine erste Infektionsquelle dar und können einen frühen Herbstbefall an Blättern und an Wurzelhälsen auslösen (GLADDERS & MUSA 1979). *L. maculans* dringt vorzugsweise über die Stomata oder vorhandene Wunden in die Pflanze ein, wächst in den interzellularen Räumen der Mesophyllzellen und dringt weiter in das Leitgewebe vor, insbesondere ins Xylem (HAMMOND *et al.*, 1985; HAMMOND & LEWIS, 1987), wo es im weiteren Krankheitsverlauf zu Vermorschungen kommt (WILLIAMS 1992). Jedoch führt eine solche Infektion nicht zu den hohen Ertragsverlusten,

die von der frühen Primärinfektion am Wurzelhals bzw. an der Stängelbasis verursacht werden (SCHRAMM 1989).

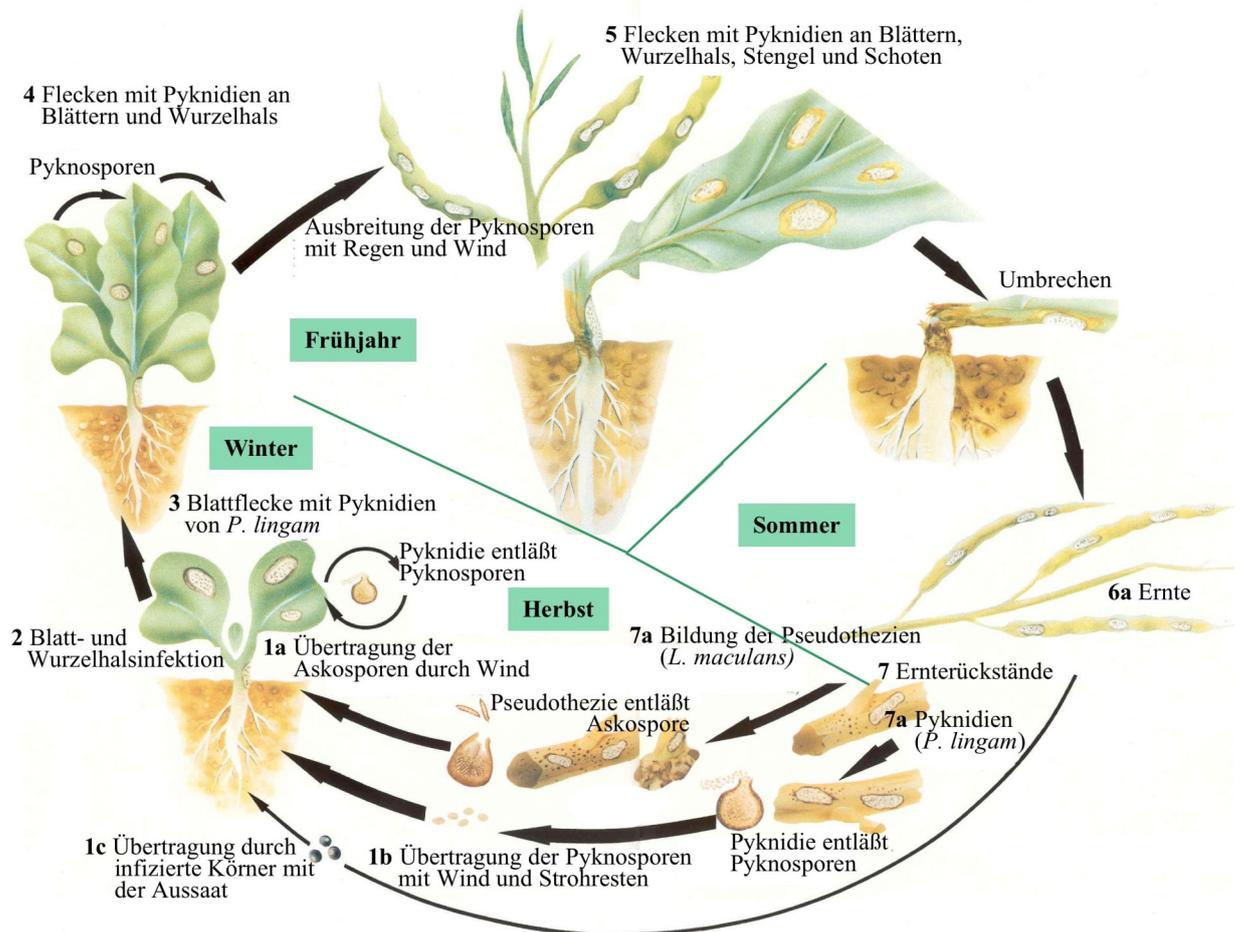


Abb. 1: Lebenszyklus von *L. maculans*; anamorph: *P. lingam* (verändert nach PAUL 1988)

Im Verlauf der Entwicklung bilden sich an befallenen Pflanzenteilen asexuelle Sporenbehälter (Pyknidien). Diese enthalten sogenannte Pykno- oder Pyknidiosporen, die mittels Übertragung durch Regentropfen die Blattoberflächen und den Wurzelhals benachbarter Pflanzen besiedeln können (PETRIE 1979, EVANS 1988). Die Pyknidiosporen werden sowohl mit der frühen Wurzelhalsinfektion als auch mit der weiteren Verbreitung in Verbindung gebracht (FESER 1992).

L. maculans befällt im Raps sämtliche Pflanzenteile in allen Entwicklungsstadien (Abb. 2). In der Auflaufphase kann eine Infektion zu bleichen, unregelmäßigen Flecken mit hellbraunen Rändern an den ersten Kotyledonen und an den Laubblättern führen oder zum Absterben der Sämlinge. Auf den Laubblättern bilden sich bis zu 2 cm große Chlorosen

Sie gehen in graue runde bis ovale Nekrosen über. Die meist von einem dunklen Rand umgeben sind und sich vom gesunden Gewebe deutlich abgrenzen.

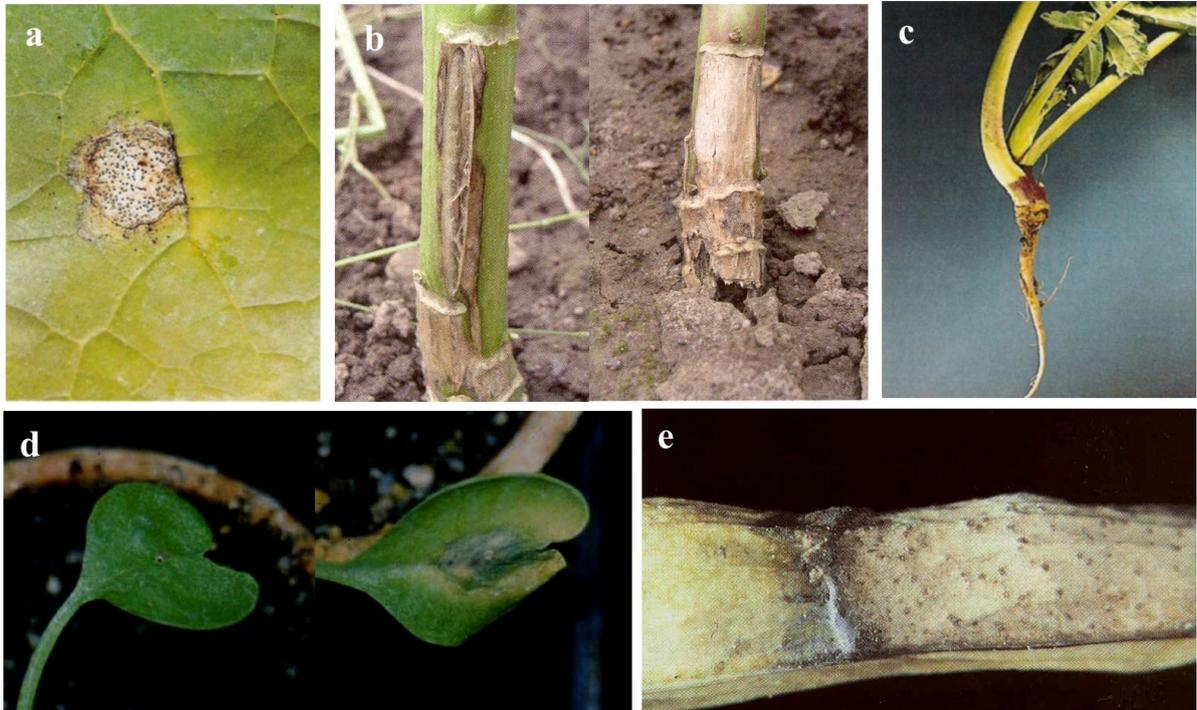


Abb. 2 a-e: Symptome der Infektion verschiedener Rapsgeewebe mit *L. maculans*:

a) Blattflecken mit Pyknidien 1, b) Stängelbasisbefall: der Stängel wird morsch und bricht oberhalb der Bodenoberfläche ab 2, c) Wurzelhalsnekrosen 1, d) gesundes Keimblatt vs. befallenes Keimblatt 3, e) befallene Schote 4; Bildquellen:1: Heitefuß et al. (2000), 2: Christen und Friedt (2007), 3: Snowdon et al. (2000), 4: Paul (1988)

Am Wurzelhals treten im Herbst meist nur wenig auffällige, fleckenartige bis stängelumgreifende dunkle, blaugraue Verfärbungen auf. Teilweise kann das Hypokotyl zu diesem Zeitpunkt jedoch schon so stark vermorscht sein, dass die Pflanzen verkümmern, die unteren Blätter absterben und Blattetagen an den Vermorschungsstellen abbrechen. Im Frühjahr dehnt sich der Befall am Wurzelhals nach oben und unten weiter aus, wodurch das Gewebe immer stärker vermorscht. An jüngeren Blättern setzt ebenfalls die Ausbildung der Schadsymptome ein. Die Läsionen am Stängel ähneln denen am Laubblatt, sind meist aber etwas eingesunken. Weitere Eintrittspforten an der ganzen Pflanze entstehen durch Schädlingsfraß von z.B.: *Psylloides chrysocephalus* (Rapserrdfloh) und *Ceuthorrhynchus napi* (Rapsstängelrüssler) sowie durch Frostrisse und Verletzungen in der Fahrspur (NDIMANDE 1976). Befallene Blütenstände und Schoten bringen meist stark

geschrumpfte und bereits infizierte Samen hervor, die nicht mehr keimfähig sind (BOKOR *et al.* 1975).

Eine späte Frühjahrsinfektion äußert sich in fleckigen Braunverfärbungen der äußeren Markgewebszonen, meist im unteren Stängelbereich oder in Bodennähe. Der für den Ertragsverlust zuständige Wurzelhals- und Stängelbasisbefall führt meistens zur Schwärzung des Gewebes und schließlich zur Trockenfäule. Im Endstadium kann die Wurzel gelegentlich völlig vermorschen. Starke Einschnürungen an der Stängelbasis, führen schließlich zum Umknicken der Pflanzen. Bei einem starken Befall kann es aufgrund des geringen Tausendkorngewichtes und der unterschiedlichen Abreife zu Ertragseinbußen von bis zu 50% kommen (GLADDERS & SYMONDS 1995). Herbst- und Frühjahrsbefall führen in der Regel zu stärkeren Schäden als ein später Stängelbefall. Die Haupternteverluste bei *Phoma lingam* werden durch Stängelgrund- und Blattbefall, durch Minderung des Tausendkorngewichtes, durch Lager und vorzeitige Seneszenz hervorgerufen.

Die Wurzelhals- und Stängelfäule kommt weltweit vor (FITT *et al.* 2006). In Europa, Australien und Nordamerika tritt der Befall überall im Zusammenhang mit dem Anbau von *Brassicaceae*n auf und ist seit der Einführung erucasäurefreier Sorten besonders bei Winterraps weit verbreitet. (HOFFMANN & SCHMUTTERER 1999). Der Erreger kann zu großen Ertragsverlusten in den Hauptanbaugebieten für Raps führen, trotz Unterschiede der Kulturen, der Vegetationsphase, des Klimas und der landwirtschaftlichen Bearbeitung in diesen Gebieten. Aus bisher nicht bekannten Gründen tritt die Krankheit nur selten in Schottland und in den Hauptanbaugebieten für Ölsaaten im asiatischen Raum (Indien und China) auf (WEST *et al.* 2001). Besonders schwere Epidemien durch *L. maculans* sind nach der Intensivierung des Rapsanbaus in Frankreich (LACOSTA *et al.* 1969), Deutschland (KRÜGER 1979) und England (FITT *et al.* 1997) aufgetreten. Mit der Einführung des Rapsanbaus in Australien wurde innerhalb weniger Jahre auch hier die Krankheit eingeschleppt (MCGEE & EMMETT 1977). In Kanada ist *L. maculans* seit den späten siebziger Jahren für schwerwiegende Ertragsverluste, besonders in den Regionen Saskatchewan und Manitoba verantwortlich (PETRIE 1993).

2.3 *Phoma lingam*-Resistenz bei Winterraps

Eine gezielte und effiziente Maßnahme zur Bekämpfung der Wurzelhals- und Stängelfäule stellt der Anbau von resistenten bzw. toleranten Sorten dar, die Resistenz der auf dem Markt befindlichen 00-Sorten ist jedoch sehr variabel. Nach der Beschreibenden Sortenliste 2006 ist nur 'Caiman' mit der Boniturnote 2 als sehr gering bis gering anfällig für *Phoma* eingetragen. Alle anderen Sorten sind bestenfalls mit der Boniturnote 4 als gering bis mittel anfällig eingetragen. Hierzu zählen unter anderem die Sorten 'Express', 'Alkido' und 'Verona' (BSA¹ 2006). Als Musterfall für eine weniger anfällige Sorte galt vor der Einführung der Doppelnullosorten 'Jet Neuf'. Sie stellte bis dahin eine der weitverbreitetsten Rapsorten in Europa war. Die aus 'Jet Neuf' stammende *Phoma*-Resistenz wird polygenisch vererbt (CARGEEG & THURLING 1980) und ist auch heute noch ein fester Bestandteil der Züchtung *Phoma*-resistenter Rapsorten mit 00-Qualität in Europa.

Isolate von *L. maculans*, die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden, sind schon lange bekannt (CUNNINGHAM 1927, HUGHES 1933). Sie werden heutzutage bezüglich ihrer Virulenz anhand eines *Brassica*-Differentialsortiments in die Pathogenitätsgruppen A1-A6 eingeteilt (BADAWY *et al.* 1999). Isolate der Pathogenitätsgruppe A2 rufen häufig starke Symptome an der Sorte 'Jet Neuf' hervor, die gegenüber zahlreichen anderen Pathogenitätsgruppen Resistenz aufweist (KUSWINANTI 1996). Bisher dominiert die Pathogenitätsgruppe A2 nicht in der *L. maculans*-Population an Winterraps (KUSWINANTI 1999), jedoch kann eine Steigerung des Anteils an A2-Isolaten in der natürlichen *L. maculans*-Population nicht ausgeschlossen werden. Die relativ enge genetische Basis der auf dem Markt befindlichen 00-Sorten birgt daher die Gefahr, dass die Resistenz von der Pathogenitätsgruppe A2 bzw. von neuen Erregerrassen durchbrochen werden könnte. Aus diesem Grund wird in der Sortenzüchtung intensiv nach neuer genetischer Diversität für *Phoma*-Resistenz gesucht.

¹ Bundessortenamt

Die Sommerraps-Sorte 'Surpass 400' besitzt eine dominante A-Genom-Resistenz gegen *L. maculans* bei Keimlingen und ausgewachsenen Pflanzen (LI & COWLING 2003a). Diese durch interspezifische Kreuzung aus dem Wildtyp *B. rapa* ssp. *sylvestris* auf Raps übertragene Resistenz wurde aber im kommerziellen Anbau in Australien schon innerhalb von drei Jahren durch virulente Pathotypen gebrochen (LI *et al.* 2003b). Dieses Beispiel illustriert den wesentlichen Vorteil von quantitativen, polygenen Resistenzen, die im Vergleich zur monogener Resistenz zu dauerhafteren Resistenzen beitragen können.

In früheren Jahren gab es Ansätze, die teilweise beachtliche Resistenz aus den B-Genom-tragenden *Brassica*-Arten *B. nigra*, *B. juncea* und *B. carinata* durch interspezifische Hybridisierung in *B. napus* zu übertragen (u.a. ROY 1984). Zwar sahen die Ergebnisse zunächst vielversprechend aus, jedoch wurde die Entwicklung von Phoma-resistenten Sorten auf diesem Wege durch den Co-Transfer von unerwünschten Eigenschaften, die instabile Vererbung der erwünschten Eigenschaften und die geringe Rekombinationsfrequenz zwischen den Spezies erschwert (CHÈVRE *et al.* 1997, DIXELIUS 1999, BOHMAN *et al.*, 1999; HU *et al.*, 2002). Eine vielversprechende Möglichkeit zur verbesserten, quantitativen Toleranz im Sortenspektrum wäre die Marker-gestützte Kombination positiver Allele verschiedener Resistenzgenloci aus genetisch diversen Raps-Genotypen. Hierzu müssen allerdings zunächst relevante Resistenzgene identifiziert und deren vorhandene allelische Diversität im Sortenspektrum ermittelt werden.

2.4 Genetische Analysen und molekulare Marker für Phoma-Resistenz

Im derzeitigen Winterraps-Genpool ist eine breite Variation für Phoma-Resistenz vorhanden, jedoch ist es aufgrund der quantitativen Eigenschaft der Resistenz schwierig, effektive Selektionsmarker zu entwickeln oder gar die beteiligten Gene zu identifizieren. Bisher wurde die Vererbung von Phoma-Resistenz bei *B. napus* hauptsächlich in klassischen quantitativ-genetischen und Spaltungsanalysen untersucht. In der ersten Analyse von *quantitative trait loci* (QTL) für Phoma-Resistenz in *B. napus* untersuchten beispielsweise DION *et al.* (1995) eine doppelhaploide (DH-) Population aus einer

Kreuzung der Sorten 'Cresor' (Phoma-resistent) und 'Westar' (stark anfällig) mit RFLP Markern und identifizierten einen einzelnen *Major*-Locus (*LmFr₁*) für Freilandresistenz bei ausgewachsenen Pflanzen. MAYERHOFER *et al.* (1997) identifizierten in einer Kreuzung der australischen Sommerrapsorten 'Shiralee' und 'Maluka' einen weiteren Locus (*LmR1*) und in der Kreuzung 'Major' (resistent) x 'Stellar' (anfällig) identifizierten FERREIA *et al.* (1995) durch Inokulation mit einem PG2-Isolat von *L. maculans* (PHW1245) ebenfalls einen einzelnen *Major*-Locus, den sie als *LEM1* bezeichneten. *LEM1* und *LmR1* liegen beide innerhalb der gleichen Kopplungsgruppe, jedoch auf verschiedenen Positionen (MAYERHOFER *et al.* 1997). Im Gegensatz zu *LmFr₁* und *LmR1* ist *LEM1* jedoch für Kotyledonen-Resistenz im Keimlingsstadium zuständig. YU *et al.* (2005) identifizierten zwei weitere Loci für Kotyledonen-Resistenz (*LepR1* und *LepR2*) in zwei DH-Populationen, die auf Resyntheselinien zurückgingen. PILET *et al.* (1998) dokumentierten quantitative Variation von Freiland-Resistenz in einer Kreuzung der resistenten französischen Sorte 'Darmor', die sehr eng mit der oft verwendeten Phoma-Resistenzquelle 'Jet Neuf' verwandt ist, mit der stark anfälligen Sorte 'Samourai'. Obwohl in den letzten Jahren viele Loci mittels QTL-Analysen kartiert wurden, stehen bisher nur wenige nützliche molekulare Selektionsmarker für die Marker-gestützte Selektion auf Phoma-Resistenz zur Verfügung. Demnach konnte in *B. napus* bisher auch keine Gene identifiziert werden, die für die Resistenz gegen *L. maculans* zuständig sind.

Wie bereits erwähnt, besitzt das B-Genom von *B. nigra*, *B. juncea* und *B. carinata* eine effektive *L. maculans*-Resistenz. Laut STRUSS *et al.* (1996) bewirken drei unabhängige Gene die B-Genom-Resistenz im Stängelgewebe. Von CHEVRE *et al.* (1996) wurde auch eine Kotyledonen-Resistenz in interspezifischen Hybriden mit B-Genom-Donoren gefunden, und durch genetische Studien einer aus *B. juncea* abgeleiteten Sorte konnten SAAL *et al.* (2004) diese Resistenz im Keimlingsstadium auf die Wirkung eines rezessiven Gens (*rjlm2*) zurückführen. PLIESKE & STRUSS (2001) wandelten AFLP- und RFLP-Marker, die mit der B-Genom-Resistenz gegen *L. maculans* gekoppelt waren, in STS-Marker um, die für Marker-gestützte Selektion in B-Genom-Resistenz enthaltenden *B. napus*-Rekombinationslinien verwendet werden konnten. CHRISTIANSON *et al.* (2006) identifizierten zwei unabhängige Gene, von denen *LMJR1* dominant und *LMJR2* rezessiv vererbt wird. Die Position von *LMRJI* korrespondiert mit der Position der *B. nigra*-Kopplungsgruppe, auf der WRETBLAD *et al.* (2003) die aus *B. nigra* isolierte *Lm1*-cDNA-

Sequenz kartierten. Hierbei handelt es sich um ein dominantes Gen, das bei einer Überexpression in Raps durch Transformation die Phoma-Resistenz signifikant erhöhte (WRETBLAD *et al.* 2003).

2.5 Allel-Merkmal-Assoziationsstudien

Die klassische Methode der QTL-Lokalisierung beinhaltet immer die Erschaffung einer spaltenden Population aus einer einzelnen Kreuzung; in einer aus dieser Population erstellten genetischen Karte werden Markerintervalle ermittelt, die einen signifikanten Effekt auf den zu untersuchenden Phänotyp aufweisen. Allerdings kann man in einer Kreuzung zweier Eltern nur dann merkmalsrelevante Gene identifizieren, wenn diese in den beiden Eltern der Kreuzung sowohl vorhanden als auch polymorph sind (JANNINK *et al.* 2001). Die Marker für QTLs, die aus einer einzigen Kreuzung stammen, können oft nicht in anderes Material übertragen werden, und in vielen Fällen sind die genetischen Abstände der flankierenden Marker eines QTLs sehr groß (SNOWDON & FRIEDT 2004). Aus diesen Gründen ist die klassische QTL-Lokalisierung oft nicht ausreichend, um effiziente Marker für die Marker-gestützte Selektion in genetisch diversem Zuchtmaterial zu finden.

Eine mögliche Alternative für die Identifizierung von Genregionen oder Genen ist die Assoziationskartierung. Für diese Methode muss keine spaltende Population erstellt werden, sondern man nimmt Allel-Merkmal-Assoziationsstudien in einer nicht-strukturierten Population vor. Die Anzahl der erhaltenen Allele ist somit um ein vielfaches höher als bei einer Kartierungspopulation aus zwei Elterngenotypen. Mittels Assoziationskartierungen kann der Effekt der hohen Rekombinationsfrequenz vieler vergangener Generationen für eine einzelne Analyse genutzt werden (JORDE 2000). Da keine Kartierungspopulation für diese Studie erstellt werden muss, kann die Analyse relativ schnell und kostengünstig durchgeführt werden, solange phänotypische Daten der Genotypen vorliegen. In Assoziationskartierungen kann u.U. auch das ganze Genom nach Genregionen, die mit einem bestimmten Phänotyp assoziieren, untersucht werden (RAFALSKI 2002). Der Ansatz der Assoziationsmethode wurde als erstes in der Humanmedizin benutzt, da hier gezielte Kreuzungen zur Erstellung spaltender

Populationen nicht möglich sind und somit die Identifizierung von QTLs mit der klassischen Methode ausgeschlossen ist. In der Humangenetik wird die Methode der Allel-Merkmal-Assoziationsanalyse z.B. für die Erforschung von komplexen Krankheiten verwendet (u.a. CORDER *et al.* 1994, KEREM *et al.* 1989).

Bei Assoziationsstudien nimmt man an, dass ein Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) auf eine einzige Mutation in einem Gen der Vorfahren der von dieser abstammenden heutigen Population basiert und dass das Chromosom, auf dem das mutierte Gen liegt, ein bestimmtes Set von Allelen besitzt, die einen Haplotyp bilden. Konsequenter Weise kann dieses Original-Set an spezifischen Marker-Allelen verwendet werden, um das Vorhandensein der Mutation im Zielgen nachzuweisen. Nach vielen Generationen entstehen Rekombinationen zwischen dem mutierten Gen und den flankierenden Marker-Allelen. Die Rekombinationen bauen nach und nach das LD zwischen dem Genlocus und den flankierenden Primern ab. Marker-Allele in der unmittelbaren Nähe der Loci sind also in einem stärkeren LD als die weiterentfernten Marker-Allele (siehe Abb. 3) und können mit größerer Erfolgsaussicht zur Nachweis der Mutation herangezogen werden.

Die Wahrscheinlichkeit, die Original-Haplotypen wieder erkennen zu können, ist um so größer, desto kleiner die Anzahl der Vorfahren ist. Populationen mit einer geringen Anzahl an Vorfahren kommen in der Pflanzenzüchtung häufig vor, so dass Sortenmaterial oder Genbankkollektionen von Kulturpflanzen u.U. für die Allel-Merkmal-Assoziationsanalyse sehr gut geeignet sein können. Klassische Beispiele für solche Populationen sind z.B. DH- oder F₂-Populationen, die aus einer Kreuzung zweier Inzuchtlinien abstammen. Da die F₂-Individuen alle vom selben F₁-Genotyp abstammen, kann man die Assoziation zwischen einzelnen Genloci aufgrund ihrer Kartierungsdistanz bestimmen. Das führt aber oft zu einer ungenauen Lokalisierung durch Assoziation, da nicht genügend Rekombinationen stattgefunden haben, um den Grad an LD mit den weiter entfernten Markern zu reduzieren. Die Genauigkeit der Lokalisierung durch Assoziation ist umso wahrscheinlicher, je mehr Meiosen seit der Entstehung einer Mutation stattgefunden haben, damit die Möglichkeit der Rekombination bei den zu untersuchenden Genotypen gegeben ist. Rekombinierte Inzuchtlinien (RILs) eignen sich z.B. bestens für eine genaue Lokalisierung durch Assoziation, weil ihnen mehrere Runden von Rekombination unterliegen.

Mutation(en) in einem QTL, die zu günstigen Phänotypen führt

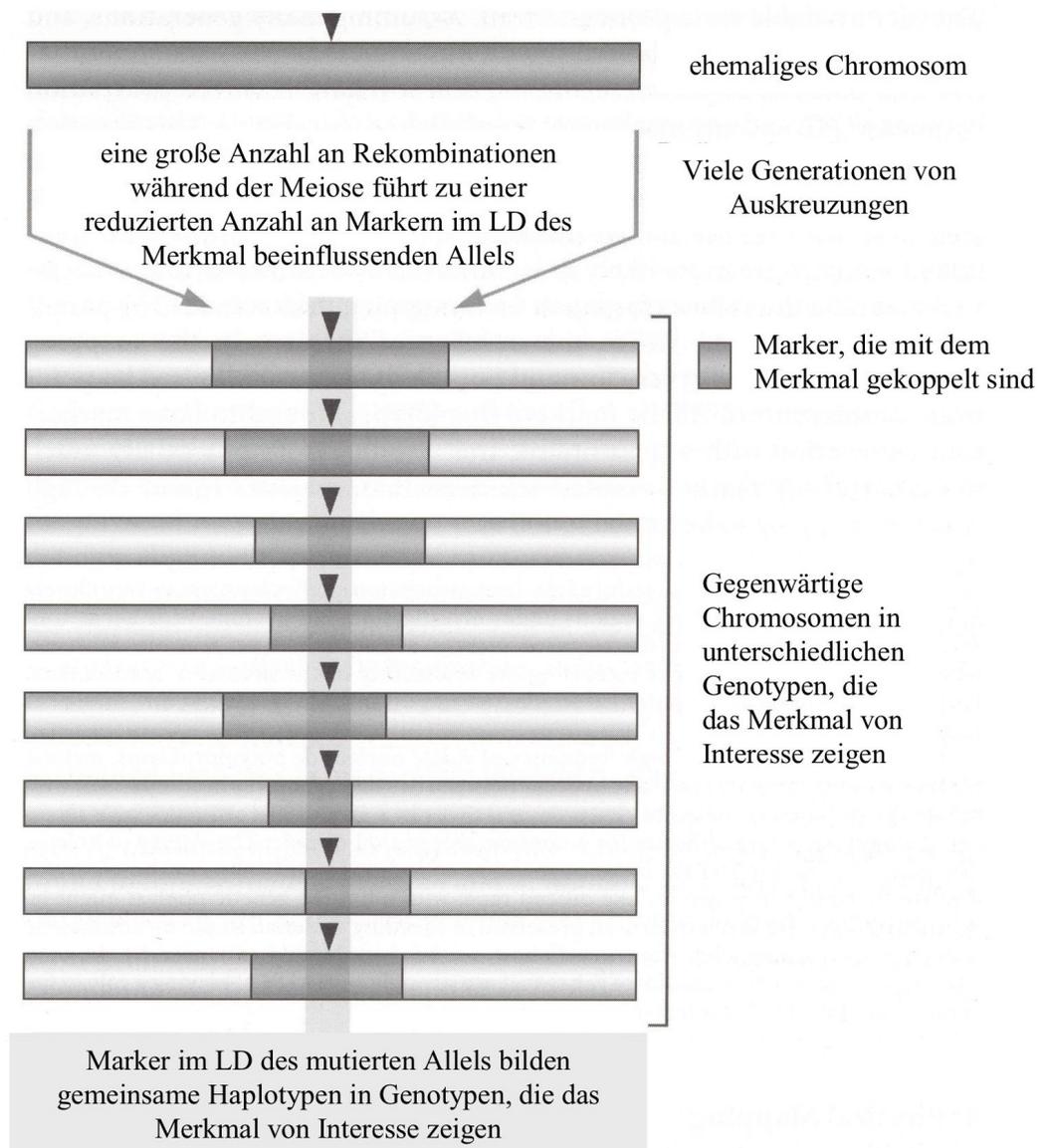


Abb. 3: *Linkage disequilibrium* um eine Mutation in einem Ahnengen (nach Snowdon *et al.* 2004): Assoziationskartierung basiert auf LD zwischen Markern um eine Mutation, die zur allelischen Diversität des quantitativen Merkmals von Interesse beitragen. In allen Genotypen, welche die Mutation(en) besitzen, sind nach vielen Generationen von Rekombinationen (z.B. durch Stammbaumzüchtung) nur noch sehr eng gekoppelte Marker mit dem Merkmal assoziiert

Für die Lokalisierung von Zielgenen muss generell aber kein Ausgangsmaterial geschaffen werden. Es können auch verschiedene Genotypen einer Art untersucht werden. Die Detektion von LD ist abhängig von der Rekombinationsfrequenz und der Anzahl an Generationen, seitdem die Mutation aufgetreten ist. Die Hauptbedingung für eine Lokalisierung durch Assoziation sind mit den beteiligten Genloci sehr eng verbundene

Marker-Allele. Die benötigte Dichte dieser Marker-Allele für eine Assoziationsstudie über ein ganzes Genom ist bis heute noch nicht gegeben, da das Ausmaß des Kopplungsungleichgewichts zwischen Arten und auch innerhalb eines Genoms stark unterschiedlich sein kann. Die Zahl der Markerdaten läßt sich heutzutage aber durch Hochdurchsatz-Genotypisierung enorm steigern. Vor allen SNP-Marker (*single nucleotide polymorphisms*; Kapitel 2.6) könnten in den nächsten Jahren eine wichtige Rolle in Assoziationsstudien spielen, besonders wenn diese in Genen vorkommen, die mit erhöhter Wahrscheinlichkeit bei der Merkmalsausprägung einen Einfluss ausüben. Genomweite Assoziationsstudien mit noch dichteren Karten von SNP-Markern werden es in der Zukunft erlauben, eine große Anzahl an Genen zu detektieren, die mit komplexen komplexen Merkmalen assoziiert sind.

2.6 *Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)*

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) sind Punktmutationen in genomischer DNA. Sie sind die häufigste Form von genomischer Variation und können als einfacher genetischer Marker für Assoziationen zwischen der allelischen Form und dem Phänotyp genutzt werden. Aufgrund ihrer hohen Frequenz, einer niedrigen Mutationsrate, und der Zugänglichkeit zur automatischen Analyse stellen SNPs auch eine nützliche Quelle zur Analyse von komplexen Merkmalen dar (COLLINS *et al.*, 1998). Somit stellen SNPs ein ultimatives Werkzeug für die Aufdeckung von genetischer Diversität dar und bieten die Möglichkeit, in Sequenzen von Kandidatengenen die allelische Variation direkt aufzudecken. SNPs haben sich zunächst als sehr gute Marker für Assoziationsstudien von einfachen Krankheiten beim Menschen erwiesen (BROOKES 1999). Heute wird die SNP-Technologie immer häufiger auch in der Pflanzenforschung eingesetzt, da sie als genetischer Marker vielfältig in Form von Populationsstudien, genetischer Kartierung oder Assoziationsstudien eingesetzt werden können (RAFALSKI 2002)

Innerhalb der Pflanzen gehört Mais zu den hoch polymorphen Spezies mit im Durchschnitt einem SNP je 104 Basenpaare (bp) (TENAILLON *et al.* 2001); bei der Sojabohne liegt der Durchschnitt bei einem SNP je 273 bp (ZHU *et al.* 2003) und bei Weizen je 200 bp (RAVEL

et al. 2004). Bei Raps sind SNPs vergleichsweise selten, aber immer noch der Markertyp mit dem höchsten potentiellen Polymorphiegrad: laut FOURMANN *et al.* (2002) kommt ein SNP im Rapsgenom alle 600 bp vor. *Brassica*-Arten repräsentieren unter den Kulturpflanzen die nächsten Verwandten zur Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana*. In *A. thaliana* tritt ein SNP im Durchschnitt alle 336 bp auf (Col-0; SCHMID *et al.* 2003), jedoch hängt die Häufigkeit stark vom untersuchten Locus ab und kann auch höher sein, wie z.B. in Promoterregionen (MCKHANN *et al.* 2004). Die amphidiploide Art *B. napus* (Genom AACC, $2n = 38$, approx. 1.200 Mbp) entstand durch spontane interspezifische Hybridisierung von *B. oleracea* (CC) und *B. rapa* (AA) und besitzt somit die zwei kompletten, homoeologen Genome der diploiden Ausgangsarten. Da *B. rapa* wie auch *B. oleracea* durch sekundäre Polyploidisierung entstanden und jeweils mehr oder weniger drei Kopien eines dem *Arabidopsis* ähnlichen, ursprünglichen *Brassica*-Grundgenomes beinhalten (LAGERCRANTZ & LYDIATE 1998, LYSAK *et al.* 2006), werden mindestens zwei bis sogar sechs oder mehr Kopien jedes einzelnen Gens oder Markers im *B. napus*-Genom erwartet. Bevor die SNP-Technik bei *B. napus* und ähnlich komplexen polyploiden Arten angewendet werden kann ist es daher notwendig, geeignete Methoden zur SNP-Detektion und -Verifikation bei multiplen Sequenzkopien zu entwickeln.

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten ist der direkte, aber immer noch auch der kostenintensivste Weg, SNPs zu identifizieren. In den letzten Jahren wurden die Techniken der DNA-Sequenzanalysen immer fortschrittlicher und heutzutage finden sich vielfältige Methoden zur SNP-Detektion, zu der u.a. die PCR-basierte Methode BESS-T (*base excision sequence scanning*)-Sequenzierung (HAWKINS & HOFFMAN 1997) zählt. Mit Anwendung von BESS-T können Punktmutationen, die auf einem Austausch von Thymidin beruhen, detektiert und innerhalb der Sequenz lokalisiert werden. Während der PCR-Amplifikation werden limitierte Mengen an dUTP anstelle von dTTP in das PCR-Produkt eingebaut, welches anschließend mit einem Enzymgemisch behandelt wird. Das Enzym Uracil N-Glycosylase trennt das Uracil vom Nukleotid und Endonuclease IV schneidet die Phosphodiester-Bindung. Dies resultiert in definierte Fragmente, die auf Polyacrylamidgelen getrennt werden können. Veränderungen im Bandenmuster (An- oder Abwesenheit von Banden) lassen auf Polymorphismen in der Sequenz schließen.

Die Aufdeckung von Allel-Merkmal Assoziationen kann durch die Ableitung von SNP-Haplotypen in Kandidatengenomen erheblich erweitert werden. Dadurch, dass die Zahl der *B. napus* ESTs ständig steigt und die Sequenzierung des Genoms von *B. rapa* begonnen hat (<http://www.brassica.info>), werden in den nächsten Jahren die Anzahl der identifizierten *Brassica*-SNPs und damit die Anzahl der Kandidatengene für viele agronomische Merkmale steigen. Im Juni 2007 befanden sich insgesamt 148.774 *B. napus*-EST-Sequenzen in der NCBI-EST-Datenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). Diese Zahl wurde im Juli 2007 durch die Veröffentlichung von etwa 600.000 weiteren *B. napus*-ESTs fast verfünffacht (*Multinational Brassica Genome Project*; <http://www.brassica.info/mbgp/mbgp1.htm>). Eine Kombination aus Kandidatengen-Ansatz mit der SNP-Technologie unter Anwendung dieser neuen Sequenzressourcen könnte beispielsweise Auskunft über die genetische Diversität in Resistenzgenkandidaten beim Rapszüchtungsmaterial geben. Assoziationsstudien mit SNPs in Resistenzgenkandidaten für Resistenz gegen *L. maculans* bzw. *P. lingam* können beispielsweise zur Identifikation von Kandidatengenomen für Resistenz gegen diese Krankheit führen.

2.7 Microsatellitenmarker (*Simple Sequence Repeats: SSRs*)

Simple sequence repeats (SSR; GRIST *et al.* 1993) oder Microsatelliten-Marker sind repetitive DNA-Abschnitte, in denen Sequenzmotive von zwei bis sechs Nukleotiden mehrfach blockweise wiederholt werden. SSRs sind in der Mehrheit aller eu- und prokaryotischen Genome sowohl in kodierenden, als auch in nicht kodierenden Regionen vorhanden. (MORGANTE *et al.* 2002, GUR-ARIE *et al.* 2000, PANAUD *et al.* 1995). Die Polymorphismen entstehen aufgrund variierender Anzahl an Wiederholungseinheiten zwischen konservierten Bereichen und können somit mittels Elektrophorese leicht identifiziert werden. Die Frequenz von SSRs variiert signifikant zwischen verschiedenen Organismen. Die häufigsten SSRs in Pflanzen sind di-nukleotide Wiederholungen von (AT)_n, (GT)_n und (GA)_n (GUPTA & VARSHNEY 2000), während (AC)_n-Wiederholungen am häufigsten in SSRs von Säugetieren zu finden sind (TOTH *et al.* 2000).

Da sie relativ gleichmäßig über das Genom verteilt und z.B. in Brassicaceen relativ hochpolymorph sind, eignen sich SSR-Marker neben den SNPs besonders gut für Analysen der genetischen Diversität. Der Vorteil von SSRs liegt in der multi-allelischen Natur, ihrer Reproduzierbarkeit, ihrer meist eindeutigen Bestimmung von Allelen und ihrer Locus-Spezifität. Diese Eigenschaften machen sie zu exzellenten molekularen Markern für Genotypisierungen und genetische Kartierungen (RAFALSKI & TINGEY *et al.* 1993).

SSR-basierte genetische Karten wurden bisher für Kulturpflanzen wie Gerste (RAMSAY *et al.* 2000, LI *et al.* 2003), Weizen (SOMERS *et al.* 2004), Mais (SHAROPOVA *et al.* 2002), Reis (MCCOUCH *et al.* 2002) erstellt. Spezifische Primer müssen für die jeweilige Spezies entwickelt werden, jedoch gibt es für *Brassica*-Spezies eine wachsende Zahl öffentlich verfügbarer SSR-Primer (<http://www.brassica.info/ssr/SSRinfo.htm>) und die derzeit stattfindende genomische Sequenzierung von *B. rapa* (http://www.brassica.info/b_rapa_sequencing_project/mbrsp.htm) bietet zunehmend auch die Möglichkeit einer Sequenz-basierten SSR-Markerentwicklung. Auch wenn die Zahl der derzeit frei verfügbaren SSR-Marker bei Raps im Gegensatz zu anderen wichtigen Kulturarten bisher noch relativ gering ist, so konnten dennoch schon Konsensuskarten (z.B. LOMBARD UND DELOURME 2001) und genomabdeckende Karten für *B. napus* (PIQUEMAL *et al.* 2005) auf Basis von SSR-Markern erstellt werden.

2.8 Resistenzgen-analoge Sequenzen (RGAs)

Mechanismen, die bei der Resistenzreaktion von Raps- und anderen dikotylen Kulturpflanzen eine Rolle spielen, können teilweise sehr gut an der Modellpflanze *A. thaliana* untersucht werden. Die Genome von *B. napus* und *A. thaliana* weisen eine Homologie von etwa 87% auf DNA- und Proteinebene auf (Schmidt 2002), so dass die Kenntnisse aus der Modellspezies eine besonders hohe Relevanz für die Rapsgenomforschung und -züchtung besitzen. Allerdings sind nicht alle wichtige Krankheitserreger von *B. napus* auch pathogen bei *Arabidopsis* bzw. die Symptomausprägung in der Modellpflanze lässt nicht immer auf ähnliche Resistenzmechanismen wie in der Kulturart schließen. Außerdem reicht die *Brassica*-*Arabidopsis*-Sequenzhomologie nicht aus, um Daten von SNPs in Gensequenzen von

Arabidopsis auf Raps zu übertragen. Deshalb müssen geeignete Sequenzen ausgewählt werden, die für Assoziationsstudien in *B. napus* genutzt werden können.

In Pflanzengenomen existieren viele anonyme Resistenzgen-analoge Sequenzen, mit vielfältigen Strukturen, die Homologien zu bekannten Sequenzmotiven von Resistenzgenen aufweisen und an einer Resistenz beteiligt sein können. Zu diesen hochkonservierten Motiven zählen die *nucleotide binding sites* (NBS-Domäne), die *leucine-rich repeats* (LRR-Domäne) und die *Toll/Interleukin-1-Rezeptoren* (TIR-Domäne). Neben diesen hochkonservierten Elementen existieren weitere Motive wie die *Coiled-coil* (CC-) Struktur, die anstelle der TIR-Domäne vorliegen kann, und die *leucine zippers* (LZ-Motive). Bei der 175 Aminosäuren langen, N-terminalen TIR-Domäne sind drei verschiedene konservierte Regionen bekannt (TIR-1, TIR-2 und TIR-3; MEYERS *et al.* 2002). Innerhalb der N-terminalen NBS-Domäne wurden acht konservierte Regionen identifiziert (MEYERS *et al.* 1999), von denen der *P-Loop* die am stärksten konservierte Struktur darstellt. Die Gesamtlänge der NBS-Domäne beträgt ungefähr 300 Aminosäuren. Die C-terminale LRR-Domäne ist in der Länge sehr variabel. Typisch ist eine 10- bis 40-fache Wiederholung einer ungefähr 24 Aminosäuren lange Region. Die LRR-Domäne kann die Spezifität der Pathogenerkennung determinieren (Ellis *et al.* 1999), während die NBS-Domäne Funktionen zur Signaltransduktion besitzt (Belkhadir *et al.* 2004).

Aufgrund der konservierten Strukturmerkmale ist es möglich, neue potentielle Resistenzgene aus Pflanzen mit Hilfe einer PCR-gestützten Klonierung zu identifizieren. In den letzten Jahren wurden etliche Resistenzgene in den verschiedensten Pflanzenarten identifiziert. So identifizierten MEYERS *et al.* (2003) aus dem Genom von *A. thaliana* insgesamt 94 kodierende Gene mit TIR-NBS-LRR-Strukturen und 55 mit CC-NBS-LRR-Motiven. Außerdem identifizierten sie 58 Resistenzprotein-kodierende Gene, bei denen die LRR-Domäne fehlt. FOURMANN *et al.* (2001) isolierten anhand derartiger Sequenzmotiven in *B. napus* ein Set von 44 RGA-Sequenzen. In der Gruppe der NBS-LRR-Sequenzen wurden Resistenzgene gegenüber Viren (WHITHAM *et al.* 1994), Pilzen (PARKER *et al.* 1997), Bakterien (GRANT *et al.* 1995), Blattläusen (ROSSI *et al.* 1998) und Nematoden (CAI *et al.* 1997) gefunden. Einige RGAs zeigten hierbei eine Kopplung zu bereits kartierten Resistenzgenen bzw. Genregionen (MOHLER *et al.* 2002).

2.9 Resistenzgenkandidaten-Sequenzen (*Resistance Gene Candidates, RGCs*)

Die Molekularbiologie von Resistenzgenen der Brassicaceen wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben. RASMUSSEN *et al.* (1992) klonierten z.B. eine Chitinase, die nach *L. maculans*-Befall stärker bei resistenten Sorten exprimiert wurde als im Vergleich zu anfälligen, während NEWMAN *et al.* (1996) die Induktion einer Beta-1,3-glucanase in *B. rapa* durch *Xanthomonas campestris* beschrieben. Bei *Sinapis arvensis* wird die Beteiligung von Phytoalexinen an der Resistenzantwort gegenüber *L. maculans* diskutiert (STORCK & SACRISTÀN 1995). PEDRAS *et al.* (2003) entdeckten, dass der Phytoalexin-Stoffwechsel an der Abwehrreaktion gegen *L. maculans* beteiligt ist, und dass *Thlaspi arvense*, ein weiterer Vertreter der Brassicaceen, dadurch resistent gegen *L. maculans* ist.

Als weitere potentielle Kandidatengene für die Phoma-Resistenz in Raps kommen 277 EST-Sequenzen in Betracht, die im Rahmen der Abwehrreaktion nach künstlicher Inoculation mit *L. maculans* in *B. napus* eine Überexpression zeigten (FRISTENSKY *et al.* 1999). Die überexprimierten ESTs zeigten Homologien sowohl zu Abwehr-, Resistenz- und Stressgenen als auch zu solchen Genen, die mit anderen Funktionen assoziiert sind und nicht unbedingt etwas mit der Pathogenabwehr zu tun haben, wie z.B. Photosynthese und Stoffwechsel. Unter den identifizierten Abwehrgenen fanden sich zwei cDNA-Sequenzen mit Homologien zu Chitinasen und sieben Sequenzen, die Homologien zur Beta-1,3-Glucanase aufwiesen; somit werden die Ergebnisse von RASMUSSEN *et al.* (1992) bzw. PERAS *et al.* (2003) unterstützt, die auf eine Beteiligung dieser Gene bzw. Genfamilien an der *L. maculans*-Abwehr hindeuten. Einige der in dieser Studie identifizierten Resistenzgene zeigten keine Homologien zu den konservierten Regionen von RGA-Sequenzen auf, so dass sie eine interessante alternative Quelle für potentielle Kandidatengene (RGCs) für die Abwehrreaktion gegen *L. maculans* bei *B. napus* darstellen.

3 Material und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde Blattmaterial von 54 *B. napus*-Genotypen verwendet, die hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften im Bezug auf Phoma eine große genetische Diversität aufweisen. Die Genotypen stammten aus einem *B. napus*-Coreset, welches im Rahmen des GABI-BRIDGE Projektes (*B. napus*: Allelic Diversity in Candidate Genes) von den Zuchtunternehmen Deutsche Saatveredelung AG (DSV, Lippstadt-Bremen), KWS Saat AG (KWS, Einbeck), Raps GbR (Grundhof), Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ, Hohenlieth) und SW Seed GmbH (Hadmersleben) im Jahre 2003 zusammengestellt wurde. Eine Auflistung und Beschreibung der Genotypen des GABI-BRIDGE *B. napus*-Coresets befindet sich in Tabelle 1.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten *B. napus* Genotypen: „GABI-BRIDGE Coreset“

<i>ID</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Qualität</i>	<i>ID</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Qualität</i>	<i>ID</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Qualität</i>
02	Express	00	33	Magnum	00	53	Duell	00
04	Mansholt	++	34	Erox	+0	54	Flip	00
05	Samourai	00	35	Maplus	00	55	Idol	00
06	Sollux	++	36	Falstaff	00	56	Vivol	00
12	Gö H048	0+	37	Jessica	00	57	Zenith	00
14	Gö S4	++	38	Lenora	++	58	Bristol	00
15	Gö 226	++	39	Askari	++	59	Lirajet	00
19	Campari	00	41	Bienvenu	0+	60	Phil	00
20	Akela	++	42	Lirabon	00	61	Ascona	00
22	Caramba	00	43	Glacier	00	64	Leopard	00
24	Licapo	00	44	Darmor	00	66	Lisabeth	00
25	Prince	00	45	JetNeuf	0+	67	Lipid	00
26	Orlando	00	46	Quinta	0+	69	Lisek	00
27	Aviso	00	47	Cobra	00	70	Contact	00
28	Musette	00	49	Falcon	00	71	Columbus	00
29	Milena	00	50	Capitol	00	72	Lion	00
30	Pollen	00	51	Mohican	00	79	DH7 AxM	00
32	Wotan	00	52	Amor	00	80	DH1 AxM	00

3.2 Phoma-Felddaten

Die für die Arbeit verwendeten Phoma-Felddaten wurden im Rahmen des GABI-BRIDGE Projektes von den beteiligten Züchterunternehmen für die Jahre 2003 und 2004 auf verschiedenen Standorten erhoben. Die Feldbonituren der Wurzelhäse auf Phomabefall erfolgte gemäß den „Richtlinien für die Durchführung von landwirtschaftlichen Wertprüfungen und Sortenversuchen“ des Bundessortenamtes unmittelbar nach dem Schwadlegen. Im Jahr 2003 wurden die Feldversuche auf den Standorten Einbeck, Seligenstadt, Lundsgaard, Kirchlengern und Levroux (Frankreich) mit jeweils zwei Wiederholungen durchgeführt. Im Jahr 2004 wurden die Versuche wiederholt in Einbeck, Kirchlengern, Lundsgaard und Levroux (Frankreich) durchgeführt. Als zusätzliche Standorte kamen in 2004 Thüle, Schwalheim und Teendorf hinzu. Weiterhin standen von der Norddeutschen Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (NPZ, Hohenlieth) Resistenzdaten für das Coreset zur Verfügung, die durch Inokulation der Pflanzen im Gewächshaus erhoben wurden. Zur Ermittlung der Resistenz gegen Phoma unter kontrollierten Bedingungen wurde bei NPZ eine einjährige Versuchsanlage des Core Sets in 2 Wiederholungen im Kaltgewächshaus durchgeführt. Von jedem Genotyp wurden je Wiederholung 80 Einzelpflanzen nach EC65 bonitiert. Nach erfolgter Anpassung an die Wachstumsbedingungen wurden die Pflanzen am Wurzelhals verletzt und anschließend eine Sporensuspension (Fa. Prophyta, bestehend aus einem Gemisch von 3 – 4 Rassen/Feldisolaten) ausgebracht. SW Seed Hadmersleben GmbH führte zusätzlich Resistenztests an Keimlingen durch. Im Cotyledonen-Test wurden je Isolat und Genotyp 3 x 8 Pflanzen getestet. Alle erhobenen Daten sind dem Anhang zu entnehmen (Tab. A1-A4).

Weiterhin standen Resistenz- und Genotypendaten aus vier Verifikationssets von insgesamt 127 Zuchtlinien von jedem der beteiligten Züchterunternehmen zur Verfügung, die zur Verifikation der Assoziationsstudien genutzt wurden. Die Daten sind ebenfalls dem Anhang zu entnehmen (Tab. A5).

3.3 DNA-Extraktion

Die Blattproben wurden in einem zuvor im Gefrierschrank tiefgekühlten Mörser überführt. Unter Verwendung von flüssigem Stickstoff wurden die tiefgekühlten Proben gründlich gemörsert, um einen guten ersten mechanischen Aufschluss der Zellstruktur zu erzielen. Die DNA-Extraktion wurde mit dem DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen (Hildesheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.4 Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten und gelösten DNA wurde fluorometrisch mit Hilfe eines DNA-Fluorometers (Dyna Quant 200, Hoefer Scientific Instruments) unter Verwendung des Farbstoffes Hoechst 33528 (1mg/ml) bestimmt; hierbei emittiert eine DNA-haltige Lösung nach Anregung mit einer Wellenlänge von 365 nm bei 460 nm eine Fluoreszenzlichtmenge, welche direkt mit dem DNA-Gehalt korreliert ist.

Für jeweils 10 Proben wurden 2 ml 10 x TNE (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 1M NaCl) mit 2 µl H33258 gemischt und auf 20 ml mit dH₂O (steril filtriert) aufgefüllt. Zur Kalibrierung des Geräts wurden 2 ml Messpuffer in eine Quarzküvette pipettiert und als Nullwert vermessen. Zu den 2 ml Messpuffer wurden 2 µl Kalbsthymus-DNA (100 ng/µl) gegeben und als Eichwert vermessen. Nach Verwerfen der Probe wurde die Küvette mehrmals mit destilliertem Wasser gespült. Für die Messung der DNA-Proben wurde erneut 2 ml Messpuffer in die Küvette gegeben, der Nullwert bestimmt und zur Konzentrationsbestimmung 2 µl DNA-Lösung zum Messpuffer pipettiert, kurz gemischt und gemessen. Die DNA- Konzentration konnte direkt vom Gerät in ng/µl abgelesen werden. Für die weiteren Arbeitsschritte wurde eine DNA-Verdünnung von 5 ng/µl angelegt

3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR): Primerentwicklung und Reaktionsbedingungen

Die PCR-Amplifikation der RGA- und RGC-Sequenzen erfolgte in einem Applied Biosystems Thermocycler (Applied Biosystems, Darmstadt). Für die PCR wurde Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Alle PCR-Primer für die RGA- und RGC-Sequenzen wurden mit einem Web-Primer Programm (<http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/web-primer>) erstellt.

3.5.1 Isolierung von Resistenzgenanalogen Sequenzen (RGAs)

Für die NBS- und LRR-Motive wurden bereits veröffentlichte Primersequenzen (FOURMANN *et al.* 2001) verwendet, für das TIR-Motiv wurden geeignete Primer von Konsensus-Regionen der Aminosäuresequenz aus veröffentlichten Daten abgeleitet (MEYERS *et al.* 2002). Die als Primer genutzten Oligonukleotide (MWG, Ebersberg) sind in Tabelle 2 beschrieben.

Tab. 2: Als degenerierte Primer genutzte Oligonukleotide zur Isolierung von Resistenzgenanalogen Sequenzen (* nach veröffentlichten Primersequenzen aus Fourmann *et al.* 2001; ** abgeleitet von Konsensus-Regionen der Aminosäuresequenz der konservierten TIR-Regionen nach Meyers *et al.* 2002)

<i>Primer-bezeichnung</i>	<i>5'-3'-Primersequenz¹</i>	<i>Aminosäure-Motiv</i>	<i>T_{an} (°C)</i>
GB1*	GGI GGI GTI GGI AAI ACI AC	GGVGGKT	55.3
GB2*	IAG IGC IAG IGG IAR ICC	GLPLAL	54.8
GB3*	GGI GGI ATI GGI AAI ACI AC	GGIGGKT	53.2
GB4**	SI TTY MGI GGI GAR GAY	FRGED	50.4
GB5**	GG TGY YTI GAY GAR YTI	WCLDEL	49.2
GB6*	ATG GGC GGT TCA GGN AAR AC	GGVGGKT	59.4
GB7*	GGG AAA AGA GAA CAA TAN ARR AAR	CFLY	55.9
GB8*	GGT GGG GTT GGG AAR CAN AC	GGVGGKT	61.4
GB9*	CAA CGC TAG TGG NAR NCC	GLPLAL	57.1

¹ I= Inosin, R = A oder G, S = C oder G, Y = C oder T, M = A oder C, N = A, C, G oder T

Die Primer wurden unterschiedlich kombiniert. Der *reverse*-Primer GB2 wurde mit den *forward*-Primern GB1, GB3, GB4 und GB5 kombiniert. Weiterhin wurden die Primerkombinationen GB6/GB7 und GB8/GB9 zur Amplifikation von RGAs genutzt.

Die Amplifikation der RGAs erfolgte mit DNA eines resistenten und eines anfälligen Raps-Genotyps, die anhand bereits vorhandener Kenntnisse bzw. der Ergebnisse einer ersten Feldprüfung des *B. napus-Coresets* durch die beteiligten Züchterhäuser ausgewählt wurden. Als resistenter Genotyp wurde die Sorte ‚Express‘ verwendet, als anfälliger die Sorte ‚Cobra‘. Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Mengen und Konzentrationen mit einem Volumen von 20 µl eingesetzt:

DNA- <i>Template</i>	25 ng
dNTP, je	25 µM
10x PCR-Puffer	2,0 µl
MgCl ₂	2,5 mM
<i>Primer</i> , je	1,0 µM
Polymerase	2,5 units
dH ₂ O	ad 20 µl

Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz mit jeweils einem Primer. Die Volumendifferenz wurde durch dH₂O ersetzt. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

1. Einleitende Denaturierung	94°C	10 Min
2. Denaturierung	94°C	1 Min
3. <i>Primer Annealing</i>	variabel	1 Min
4. Extension	72°C	2 Min
5. letzte Extension	72°C	30 Min

Der Zyklus der Schritte 2- 4 erfolgte 35 mal. Die *Annealing*-Temperatur war von der individuellen Oligonukleotidsequenz abhängig. Bei Primerkombinationen mit GB2 als *reverse*-Primer wurde das *Primer-Annealing* bei 42°C durchgeführt, bei den weiteren Primerkombinationen bei 47°C.

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 1,0% (w/v) 0,5x TBE-Agarosegele verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Danach wurde das Gel in 2 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt und die PCR-Amplifikate mittels eines UV-B-Transilluminators visualisiert. Die Amplifikationsprodukte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Fragmente wurden anschließend wie unter Kapitel 3.8 beschrieben kloniert, um spezifische Primerkombinationen für die Sequenzierung aus den anonymen Fragmenten abzuleiten.

3.5.2 Amplifikation von Sequenzen für Resistenzgenanaloga (RGA) und Resistenzgenkandidaten (RGC)

Um unter den RGCs aus den Arbeiten von FRISTENSKY *et al.* (1999) einzigartige Sequenzen unter den anonymen cDNAs zu identifizieren, wurden alle verfügbaren cDNA-Sequenzen bezüglich der *L. maculans*-Abwehrreaktion von *B. napus* zunächst mit dem Computerprogramm Vector NTI miteinander verglichen und analysiert. Für die BESS-T-Analysen wurden die *forward*-Primer mit einem der Fluoreszenzfarbstoffe IRD700 bzw. IRD800 am 5'-Ende markiert. Detaillierte Informationen zu den als Primer genutzten Oligonukleotiden sind dem Anhang zu entnehmen. Für die weiteren Arbeitsschritte wurden Verdünnungen von 5 ng/µl angelegt.

Bevor die PCR mit den einzelnen Primerkombination im *Coreset* durchgeführt wurden, mussten zunächst die Bedingungen für jede einzelne Primerkombination getestet werden. Die Amplifikation anhand dieser Primer erfolgte zunächst mit DNA aus insgesamt acht Genotypen: Neben 'Express' wurden zusätzlich 'Jet Neuf', 'Aviso' und 'Darmor' als resistente Sorten ausgewählt. Als anfällige Sorten kamen 'Erox', 'Maplus' und 'Idol' zu 'Cobra' hinzu. Es wurden folgende Mengen und Konzentrationen mit einem Volumen von 25 µl in einen Reaktionsansatz eingesetzt:

DNA-Template	20 ng
dNTP, je	25 μ M
10 x PCR-Puffer	2,5 μ l
MgCl ₂	x mM
Primer, je	0,05 μ M
Taq-Polymerase	0,5 units
dH ₂ O	ad 25 μ l

Die Magnesiumkonzentrationen variierte je nach Primerkombination zwischen 2,0 und 3,0 mM. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

1. Einleitende Denaturierung:	94°C	5 min
2. Denaturierung	94°C	1 min
3. Primer <i>Annealing</i>	variabel	1 min
4. Extension	72°C	1 min
5. letzte Extension	72°C	5 min

Abhängig von der Probe wurden 30-35 Wiederholungen des Zyklus (Schritte 2-4) durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur war von den individuellen Oligonuklotidsequenzen abhängig. Die getesteten Bedingungen wurden für die SNP-Detektion im *Coreset* auf die PCR-Bedingungen für BESS-T übertragen. Detaillierte Informationen zu Magnesiumkonzentrationen und *Annealing*-Temperaturen sind dem Anhang zu entnehmen (Tab. A5-A8). Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden ebenfalls 1,0% (w/v) 0,5x TBE-Agarosegele verwendet.

3.5.3 PCR-Bedingungen für Base-Excision Sequence Scanning (BESS-T)

Die RGA- und RGC-Sequenzen wurden in den Genotypen des *Coresets* amplifiziert. Statt der herkömmlichen dNTPs (100 μ M) wurden die dNTP-Lösung aus dem BESS-T *Reader Kit* der Firma Epicentre (Madison, WI, USA) eingesetzt. Diese enthält neben den herkömmlichen Nukleotiden (jeweils 200 μ M) zusätzlich auch 16 μ M dUTP. Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Mengen und Konzentrationen mit einem Volumen von 25 μ l eingesetzt:

DNA-Template	20 ng
dNTP-Mix (Fa. Epicentre)	216 μ M
10x PCR-Puffer	2,5 μ l
MgCl ₂	x μ M
Primer	0,05 μ M, je
Taq-Polymerase	0,5 units
dH ₂ O	ad 25 μ l

Die Amplifikation erfolgte unter den Bedingungen, wie sie unter 3.5.2 beschrieben sind, mit den zuvor getesteten *Annealing*-Temperaturen und Magnesiumkonzentrationen.

3.6 Enzymatischer Verdau der PCR-Produkte: BESS-T

Der enzymatische Verdau erfolgte laut Protokoll des BESS-T *Scan Kits* (Epicentre, Madison, WI, USA). Abweichend vom Protokoll wurde nur die halbe Menge an Enzym-Mix eingesetzt. Es wurden folgende Mengen in einem Reaktionsansatz mit einem Volumen von 10 μ l eingesetzt:

BessT PCR-Produkt	5,0 μ l
10 x Base Excision Enzym Puffer	1,0 μ l
Bess-T Excision Enzym Mix	0,5 μ l
dH ₂ O	ad 10 μ l

Die Reaktionssätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und die erhaltenen BESS-T *Scan*-Spaltprodukte mittels Polyacrylamidgelen analysiert. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen mit 5 μ l Fuchsin versetzt und bei 94 °C für 2 min in einem Thermocycler denaturiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines Licor 4200 *DNA Analyser*-Systems (Licor Biosciences, Lincoln, NB, USA).

3.7 Klonierungen

Klonierungen erfolgten mit dem TOPO TA-System der Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) nach Herstellerangaben. Nach der PCR wurde die Klonierungsreaktion sofort fortgesetzt. Für einen 6 μ l Ansatz wurde das Reaktionsgemisch wie folgt zusammengesetzt:

PCR-Produkt	0,5 – 4 μ l
Salzlösung	1 μ l
TOPO [®] Vektor	1 μ l
dH ₂ O	ad 6 μ l

Die Reaktion wurde vorsichtig gemischt, bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert und anschließend auf Eis gesetzt. Die Transformation erfolgte nach Herstellerangaben mit chemisch kompetenten *Escherischia coli*-Bakterien (Stamm TOP10).

Der Nachweis positiver Klone erfolgte zum einen mittels Blau-Weiß-Selektion und zum anderen über Kolonie-PCR. Dabei wurde eine einzelne weiße Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und in 50 μ l dH₂O aufgenommen. Davon wurden 25 μ l bei 99°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend abzentrifugiert. 10 μ l des Überstands dienten als PCR-Template. Die weiteren 25 μ l wurden in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht vermehrt. Aus der 5 ml Übernacht-Kultur der positiven Klone wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep *Spin Miniprep Kit* (Fa. Qiagen, Hildesheim) nach Herstellerangaben extrahiert.

3.8 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma Seqlab (Göttingen) vorgenommen. Die DNA-Proben wurden dafür vorher mit Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Es wurden entweder Plasmide (QIAprep Spin Miniprep Kit) oder PCR-Produkte (QIAquick PCR-Purification-Kit) sequenziert.

3.9 Simple sequence repeats (SSRs)

Für eine genomweite Assoziationsanalyse mit PCR-Markern standen Daten in Form einer 0/1-Matrix für 559 SSR-Allele aus 104 SSR-Primerkombinationen zur Verfügung, die von den beteiligten Zuchtunternehmen im *B. napus-Coreset* erfasst wurden.

Die PCR-Primer für die Datenerstellung gehören den jeweiligen Unternehmen, so dass die Primersequenzen nicht zur Verfügung gestellt werden konnten.

3.10 Statistische Auswertung

Die ermittelten SNP-Polymorphismusdaten und die SSR-Daten wurden mit dem frei erhältlichen statistischen Softwarepaket „PowerMarker“ ausgewertet (<http://statgen.ncsu.edu/powermarker/>). Mit Hilfe der Powermarker-Software wurden Assoziationen zwischen Resistenzgensequenzen und Phoma-Resistenz an den SNP-Markern mit den Bonitur-Mittelwerten aus allen Jahren und Standorten und den Daten der Gewächshaus- und Keimlingstests ermittelt.

Für SNP-Merkmal-Assoziationen mit quantitativen Phänotypdaten bietet sich im ersten Schritt der *Single-Locus F-Test* an. Ähnlich zu einer Varianzanalyse ermöglicht dieser einen gleichzeitigen Test mehrerer Loci auf Assoziationen mit den Phänotypdaten. Wurde in den signifikanten Sequenzen mehr als ein Polymorphismus gefunden, so folgte als zweiter Schritt die *Haplotype-Trend-Regression* mit den Phänotypdaten durchgeführt. Bei dieser werden Assoziationen zwischen Haplotypen mehrerer SNPs innerhalb eines Gens bzw. einer Sequenz geprüft. Im vorliegenden Fall wurden zusätzliche Berechnungen mit dem *Genetic analysis package* (gap) im Softwarepaket „R“ angestellt (<http://www.r-project.org/>). In diesen Analysen lieferte „PowerMarker“ die Frequenz und das Bonitur-Mittel eines Haplotyps, während die F-Statistik und die Signifikanz (p-Wert) mit „R“ berechnet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Amplifikation von Resistenzgen-Analoga (RGAs) mittels degenerierter Primer für Resistenzgen-Motive

Die Amplifikation der resistenzgen-analogen (RGA) Sequenzen erfolgte zunächst mit DNA eines resistenten und eines anfälligen Raps-Genotyps, die anhand bereits vorhandener Kenntnisse bzw. der Ergebnisse einer ersten Feldprüfung des *B. napus-Coresets* durch die beteiligten Züchterunternehmen ausgewählt wurden. Als resistenter Genotyp wurde die Sorte 'Express' verwendet, als anfälliger die Sorte 'Cobra'. Für beide Genotypen ergaben sich Amplifikate im Größenbereich von 100 bis 1000 bp (Abb. 4).

Alle PCR-Fragmente der Primerkombinationen mit GB2 als *reverse*-Primer wurden kloniert und sequenziert, ebenso wie die Primerkombination GB6/GB7. Bei der Primerkombination GB8/GB9 zeigte die Primerkontrolle mit GB8 das gleiche Bandenmuster wie bei der Amplifikation in der Kombination. Weitere Modifikationen in der Amplifikation führten zum gleichen Resultat. Aufgründessen wurden diese Fragmente nicht kloniert. Positive Klone wurden sequenziert. Durch Datenbankanalysen und Sequenzvergleiche (Abb. 5) konnten spezifische Primer für isolierte RGAs zur Sequenz-unabhängigen SNP-Detektion mittels BESS-T entwickelt werden.

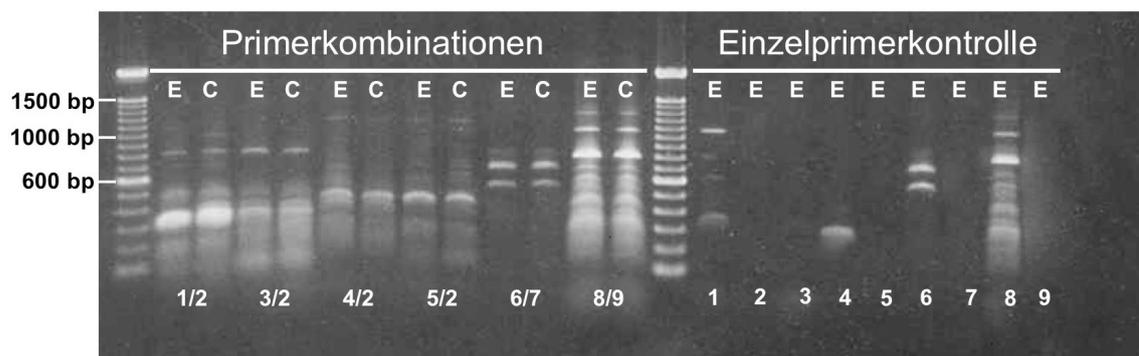


Abb. 4: PCR-Produkte der Amplifikationen mit unterschiedlichen degenerierten Primerkombinationen und der Amplifikation mit einzelnen Primern; E: Genotyp 'Express' (resistent), C: Genotyp 'Cobra' (anfällig)

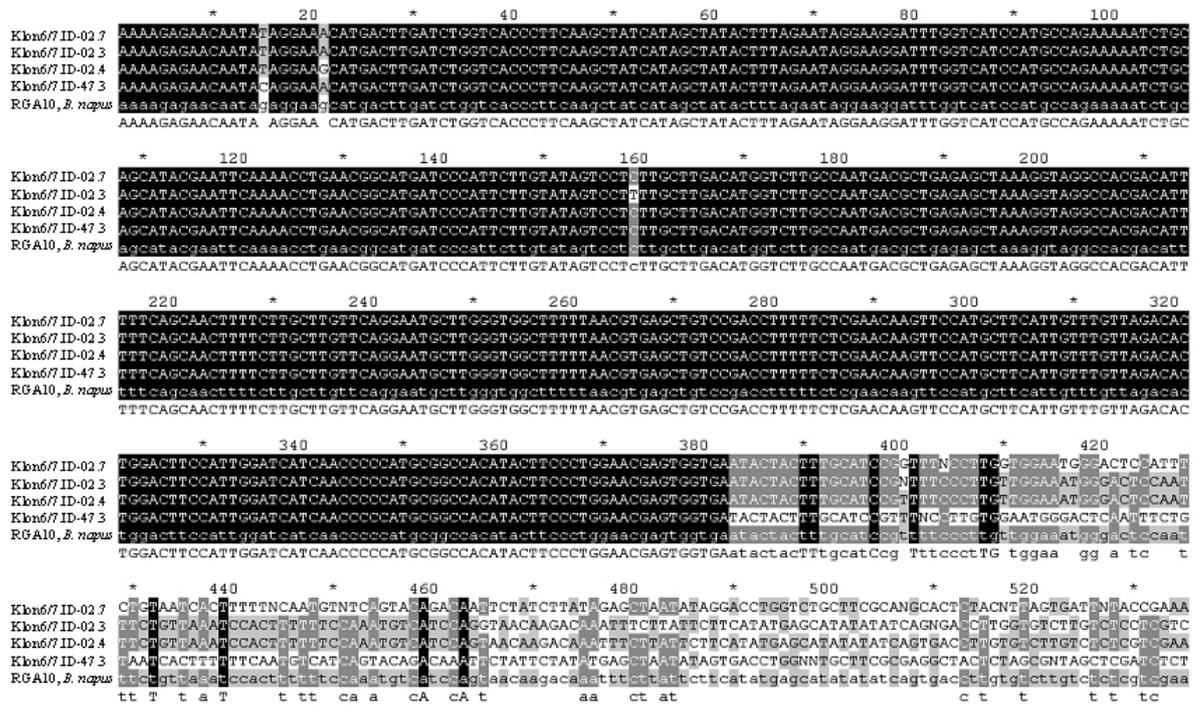


Abb. 5: Exemplarisch dargestellter Sequenzvergleich für RGA-Sequenzen: Die hier dargestellten Sequenzen wurden mit der Primerkombination GB6/GB7 isoliert und weisen Homologien zu RGA 10 aus *B. napus* (FOURMANN *et al.* 2001) auf

4.2 Amplifikation von Resistenzgen-Kandidaten (RGCs) mittels Locus-spezifischer Primer

Aus Arbeiten an der University of Manitoba, Winnipeg, Kanada sind 277 EST-Sequenzen in den öffentlichen Sequenzdatenbanken verfügbar, die bei der Abwehrreaktion von mit *L. maculans* infizierten *B. napus*-Genotypen eine Überexpression zeigten (FRISTENSKY *et al.* 1999). Etwa 30% dieser Sequenzen weisen Homologien zu Abwehr-, Stress- oder Resistenzgenen auf (Tab. 3). Durch Sequenzvergleiche konnten innerhalb dieser ESTs insgesamt 46 spezifische PCR-Primerkombinationen identifiziert werden, die nicht in Konsensussequenz-Regionen liegen. Die Amplifikation anhand dieser Primer erfolgte mit DNA aus insgesamt acht Genotypen: 'Express', 'Jet Neuf', 'Aviso' und 'Darmor' wurden als resistente Sorten verwendet, als anfällige Sorten 'Erox', 'Maplus', 'Idol' und 'Cobra'. Die durch PCR entstandenen Fragmente wurden wie bereits beschrieben aufgereinigt und sequenziert.

Tab. 3: Übersicht aller von FRISTENSKY *et al.* (1999) identifizierten, überexprimierten cDNA-Sequenzen aus der Abwehrreaktion von mit *L. maculans* infizierten *B. napus*-Genotypen, die Homologien zu Abwehr, Stress- oder Resistenz-Genen aufweisen

Funktion	Beschreibung der cDNA	Anzahl an identifizierten cDNAs	Organismus mit stärkster Homologie
Abwehr	CXc750, Pathogenese-verwandtes Protein	24	<i>B. napus</i> , <i>A. thaliana</i>
	hin1, an hypersensitiven Antwort beteiligtes Gen	1	<i>Nicotiana tabacum</i>
	Unspezifisches Lipid-Transfer-Protein	9	<i>B. napus</i> , <i>Medicago truncatula</i>
	Pal1, Phenylalanin Ammoniaklyase	1	<i>A. thaliana</i>
	PGIP, Polygalacturonase Inhibitorprotein	2	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	PR1, Pathogenese-verwandtes Protein	5	<i>B. napus</i>
	PR2, Beta-1,3-Glucanase	7	<i>A. thaliana</i>
	PVPR3, Pathogenese-verwandtes Protein	1	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	Chia1, Chitinase Klasse II	1	<i>Arachis hypogaea</i>
	Chia4, Endochitinase Klasse IV	1	<i>B. napus</i>
Resistenz	Mehltau Resistenzgen RPP5	3	<i>A. thaliana</i>
	Blattrost Resistenz Kinase Lr10	2	<i>Triticum aestivum</i>
	Betain Aldehyd Dehydrogenase	1	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
Stress	Cat0, Katalase	2	<i>B. napus</i> , <i>Raphanus sativus</i>
	Kälte-reguliertes SRC2 Gen	1	<i>A. thaliana</i>
	Kältesakklimatisations-spezifisches Protein CAS15	1	<i>Medicago sativa</i>
	GST, Glutathione S-Transferase	5	<i>A. thaliana</i>
	Hitzeschockprotein SB100	1	<i>Glycine max</i>
	HEVER, Ethylen- und Salicylsäure-induziertes Protein	1	<i>Hevea brasiliensis</i>
	Hitzeschockprotein HSP81-3	1	<i>A. thaliana</i>
	Metallothionein-ähnliches Protein	4	<i>B. napus</i> , <i>B. juncea</i> , <i>Carica papaya</i>
	Monodehydroascorbat Reduktase	1	<i>Cucumis sativus</i>
	PDR5 - ABC Transporter	1	<i>Spirodela polyrrhiza</i>
	pEARLI 1	3	<i>A. thaliana</i>
	wali7, Aluminium-induziertes Protein	2	<i>Triticum aestivum</i>
	WSI 724, bei wasserstress induziertes Protein	1	<i>Oryza sativa</i>

Durch Sequenzvergleiche innerhalb der acht Genotypen konnten sowohl zahlreiche SNPs als auch mehrere Indels (Insertionen/Deletionen) nachgewiesen werden (Abb. 6). Insgesamt fanden sich 58 SNPs und 14 Indels innerhalb dieser Sequenzen. Davon waren 27

SNPs und 11 InDels in jeweils einer Sequenz zu finden, alle anderen Unterschiede fanden sich immer gleichzeitig in mehreren Genotypen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die cDNA-Sequenzen neben den RGAs eine alternative Quelle für potentielle Kandidatengene (RGC) für die Abwehrreaktion gegen *L. maculans* bei *B. napus* darstellen. Daher wurden alle potentiell an der Resistenz beteiligten RGC-Sequenzen ebenfalls mit BESS-T zur Sequenz-unabhängigen SNP-Detektion untersucht.

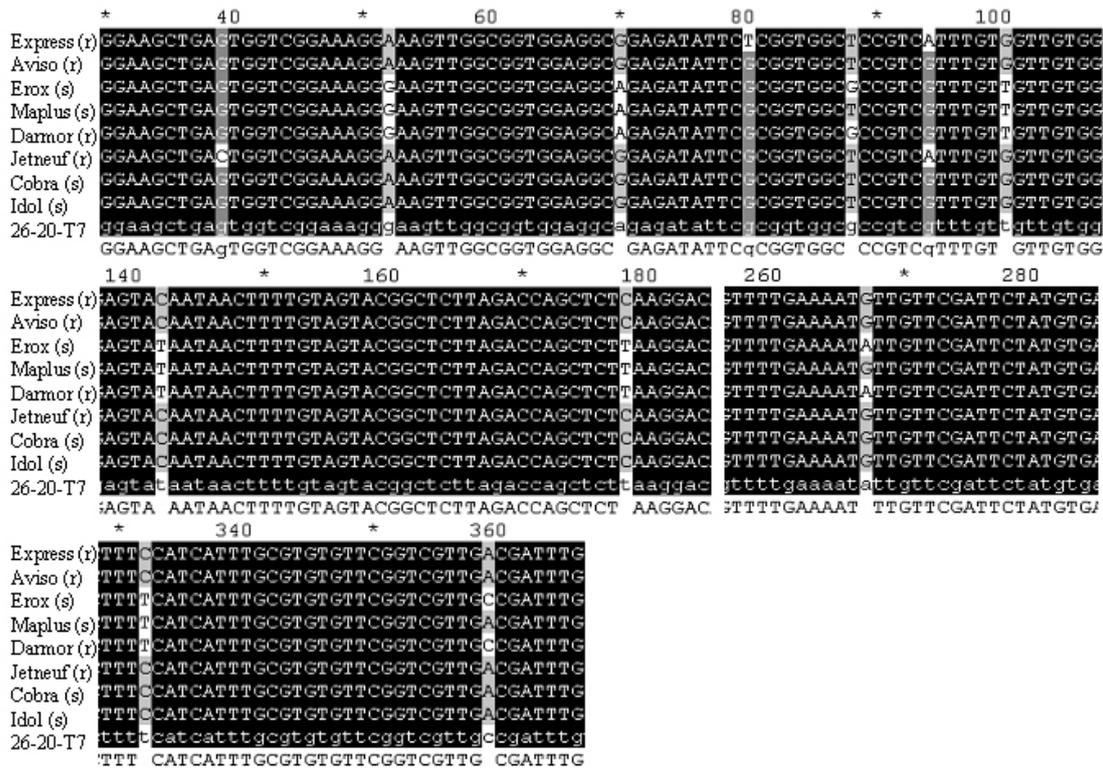


Abb. 6: Exemplarisch dargestellter Sequenzvergleich der Kandidatengensequenz DH26-20-T7 der Genotypen 'Express', 'Jet Neuf', 'Aviso', 'Darmor', 'Erox', 'Maplus', 'Idol' und 'Cobra'. Dargestellt sind Sequenzabschnitte, in denen SNPs zu finden sind. r = Phoma-resistent; s = Phoma-anfällig)

4.3 Sequenz-unabhängige SNP-Detektion und statistische Auswertung der ermittelten Daten

Insgesamt wurden Primerkombinationen für 46 RGA- und 29 RGC-Sequenzen untersucht, die ein spezifisches Fragment durch Auftrennung auf Agarosegele zeigten, um potentiell nützliche Kombinationen für die SNP-Analysen zu identifizieren. Die

Primerkombinationen wurden im *Coreset* mittels Sequenz-unabhängiger BESS-T nach Sequenzpolymorphismen gescreent (Abb. 7). Dabei wurden in 32 Sequenzen insgesamt 58 Polymorphismen detektiert (Tab. 4). Neben SNPs wurden auch Doppel- bzw. Dreifachbanden und Längenunterschiede ausgewertet, falls das Muster an Banden in einzelnen Genotypen variierte. Die untersuchten Sequenzen zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse im Bezug auf die Anzahl der SNPs innerhalb der Sequenz und der SNP-Häufigkeit innerhalb des *Coresets*.

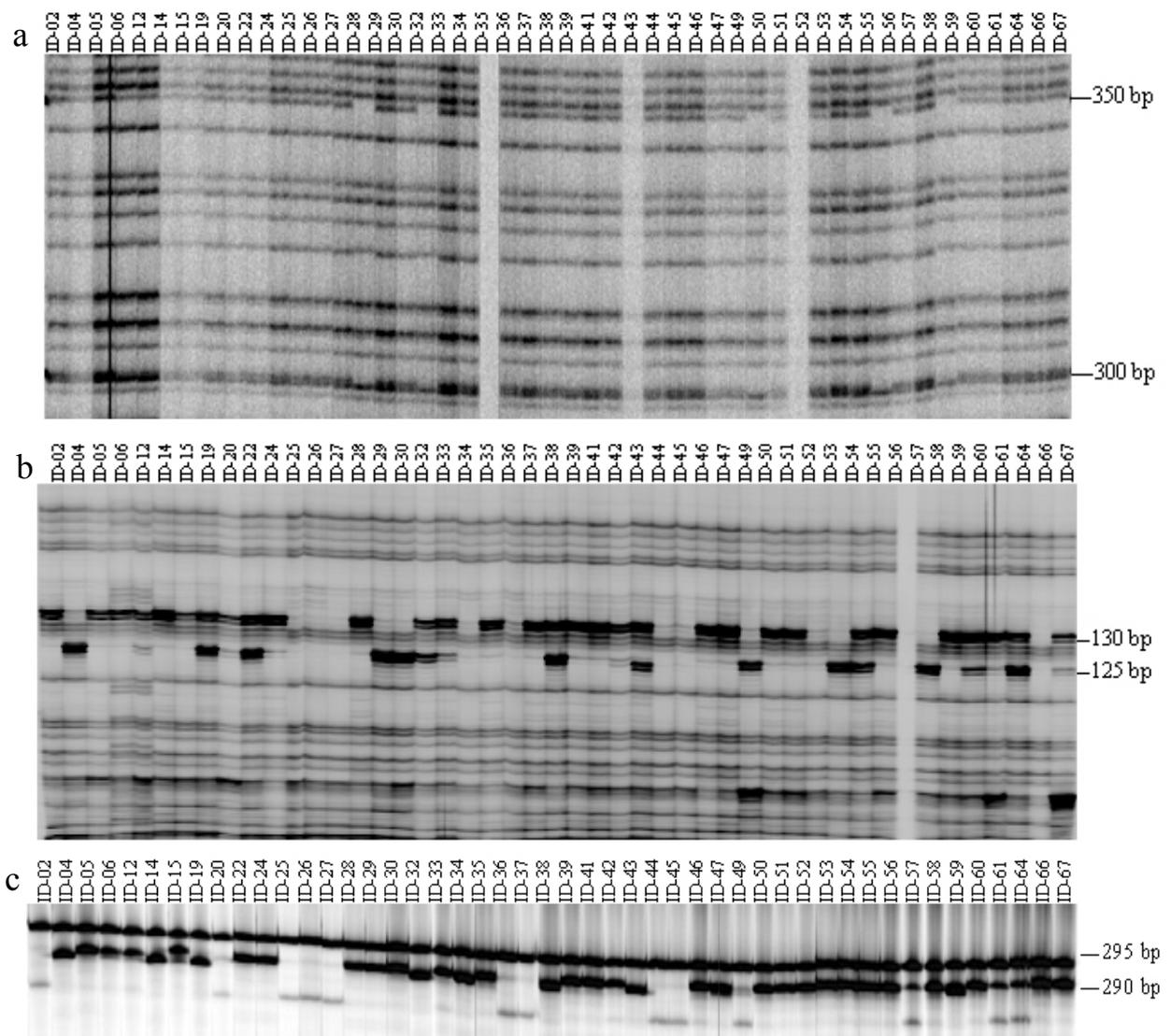


Abb. 7 a- c: Gelausschnitt eines BESS-T-Scans am Beispiel RGC1, RGC11 und RGC6 über 48 Genotypen des *Coresets*. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei RGC1 (a) an den Basenpaarpositionen 300 und 350, bzw. bei RGC11 (b) an den Basenpaarpositionen 125 und 130 eine Bande in diesem RGC-Fragment bei manchen Genotypen nicht vorhanden ist, weil ein T-Austausch an diesen Positionen vorliegt. Bei RGC6 (c) ist bei den meisten Genotypen eine doppelte Bande des PCR-Produkts vorhanden, bei einigen jedoch nicht

Tab. 4: Übersicht über die RGA- und RGC-Sequenzen, in denen Polymorphismen detektiert werden konnten. Angegeben sind jeweils die Sequenzbezeichnung und die Häufigkeit des gefundenen Polymorphismus im *B. napus* Genotypen-*Coreset*. (detailliertere Angaben zu den einzelnen Sequenzen finden sich im Anhang in Tab. A6-A9)

<i>Sequenz</i>	<i>Häufigkeit</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Häufigkeit</i>
RGC1 pos1	2	RGC16 pos1	6
RGC2 pos1	13	RGC16 pos2	12
RGC2 pos2	19	RGC16 pos3	12
RGC2 pos3	23	RGA2 pos1	15
RGC3 pos1	11	RGA2 pos2	8
RGC3 pos1	12	RGA2 pos3	11
RGC3 pos2	15	RGA3 pos1	10
RGC3 pos3	21	RGA4 pos1	23
RGC3 pos4	20	RGA5 pos1	10
RGC4 pos1	3	RGA6 pos1	4
RGC5 pos1	11	RGA6 pos2	11
RGC6 pos1	17	RGA7 pos1	12
RGC7 pos1	9	RGA7 pos2	10
RGC8 pos1	8	RGA8 pos1	14
RGC9 pos1	5	RGA9 pos1	13
RGC10 pos1	6	RGA9 pos2	9
RGC10 pos2	7	RGA10 pos1	1
RGC10 pos3	5	RGA10 pos2	2
RGC10 pos4	4	RGA10 pos3	12
RGC11 pos1	17	RGA10 pos4	23
RGC11 pos2	11	RGA10 pos5	16
RGC11 pos3	2	RGA11 pos1	11
RGC12 pos1	14	RGA12 pos1	2
RGC13 pos1	2	RGA13 pos1	8
RGC14 pos1	11	RGA14 pos2	9
RGC14 pos2	8	RGA15 pos1	16
RGC14 pos3	9	RGA16 pos1	13
RGC15 pos1	7	RGA16 pos2	10

Mit Hilfe der Powermarker-Software wurden Assoziationen zwischen Resistenzsequenzen und Phoma-Resistenz an den 58 SNP-Markern mit den Bonitur-Mittelwerten aus allen Jahren und Standorten und den Daten der Gewächshaus- und Keimlingstests ermittelt

Mittels *Single-Locus F-Test* erwiesen sich sechs Sequenzen als signifikant assoziiert ($p < 0,05$) mit dem Feldresistenz-Daten (Tab. 5). Sieben Sequenzen zeigten positive Assoziationen mit Phoma-Resistenz in den Gewächshaus-Resistenzdaten (Tab. 6), wobei die Sequenzen RGA1 und RGA10 sowohl mit Feld- als auch mit Gewächshausresistenz signifikante Assoziationen aufwiesen. Insgesamt sechs Sequenzen zeigten beim *Single-Locus-F-Test* signifikante Assoziationen mit den Resistenzdaten der Keimlingstests (Tab. 7), wobei der Locus RGA14 pos2 sowohl in den Keimlingsresistenzdaten als auch im Gewächshaustest eine signifikante Assoziation mit den Phänotypdaten aufwies.

Tab. 5: Ergebnisse von Assoziationsanalysen zwischen SNP-Alleldaten in RGA- bzw. RGC-Sequenzen im *Coreset* und Feld-Resistenzdaten mittels *Single-Locus F-Test*

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>F-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>
RGC3 pos2	DH26-20-T7 (Blattrost Resistenz Kinase Gen LR1)	4,049	0,051
RGC6 pos1	MB41-20 (Glutathione S-Transferase)	6,401	0,015
RGC11 pos2	MB67-5G (Hitzeschockprotein 81-3)	7,733	0,008
RGA1 pos1	Resistenzgenalog 6 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	4,486	0,040
RGA4 pos1	Resistenzgenalog 1 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	4,141	0,048
RGA10 pos4	Resistenzgenalog 18 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	11,379	0,002

Tab. 6: Ergebnisse von Assoziationsanalysen zwischen SNP-Alleldaten in RGA- bzw. RGC-Sequenzen im *Coreset* und Gewächshaus-Resistenzdaten mittels *Single-Locus F-Test*

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>F-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>
RGA1 pos1	Resistenzgenalog 6 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	4,713	0,035
RGA2 pos2	Resistenzgenalog 9 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	6,550	0,014
RGA6 pos1	Resistenzgenalog 11 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	5,079	0,029
RGA9 pos1	Resistenzgenalog 17 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	5,975	0,019
RGA10 pos3	Resistenzgenalog 18 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	4,607	0,038
RGA10 pos5	Resistenzgenalog 18 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	8,026	0,007
RGA14 pos2	Resistenzgenalog JLU Gießen	4,214	0,047

Tab. 7: Assoziationsanalysen zwischen SNP-Allelenden in RGA- bzw. RGC-Sequenzen im Coreset und Phoma-Resistenzdaten der Keimlingstests mittels Single-Locus F-Test

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>F-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>
RGC2 pos1	DH26-20-T3 (Blattrost Resistenz Kinase Gen LR1)	4,733	0,036
RGC15 pos1	MB74-12D (pEARLI 1)	4,222	0,046
RGC15 pos3	MB74-12D (pEARLI 1)	6,078	0,018
RGA11 pos1	Resistenzgenalog 20 von FOURMANN <i>et al.</i> 2001	8,814	0,005
RGA13 pos1	Resistenzgenalog JLU Gießen	4,268	0,046
RGA14 pos2	Resistenzgenalog JLU Gießen	5,194	0,029

Die Ergebnisse der *Haplotype-Trend-Regression* für Sequenzen, in denen mehr als ein Polymorphismus zu finden waren, sind in den Tabellen 8-10 dargestellt. Dabei fällt insbesondere auf, dass die RGA-Sequenzen RGA1 und RGA10 wieder durch signifikante Haplotype-Assoziationen mit Phoma-Resistenz sowohl im Feld als auch im Gewächshaustest auffallen.

Tab. 8: *Haplotype-Trend-Regression* signifikant mit Phoma-Resistenz assoziierter RGA- bzw. RGC-Sequenzen der Feldprüfungen

<i>Sequenz</i>	<i>Haplotyp</i>	<i>Frequenz</i>	<i>Mittel-Bonitur</i>	<i>F-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>
RGA1	1-0	0,150	2,666	5,956	0,019
	0-0	0,800	3,267	6,703	0,014
RGA10	1-1-0-1-0	0,050	4,817	27,069	0,000
	1-1-1-1-1	0,125	2,570	5,935	0,020
RGC3	1-1-1-1-1	0,125	3,759	6,267	0,017
	0-0-0-1-1	0,150	2,685	3,960	0,054
RGC11	0-1-0	0,400	3,425	7,027	0,012
	0-0-0	0,225	2,804	4,506	0,040

Tab. 9: *Haplotype-Trend-Regression* signifikant mit Phoma-Resistenz assoziierter RGA- bzw. RGC-Sequenzen der Gewächshausprüfungen

<i>Sequenz</i>	<i>Haplotyp</i>	<i>Frequenz</i>	<i>Mittel-Bonitur</i>	<i>F-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>
RGA1	0-0	0,761	4,556	5,597	0,022
RGA2	1-1-1	0,156	3,750	6,550	0,014
RGA6	1-0	0,089	6,133	5,079	0,029
RGA9	0-1	0,701	4,526	5,975	0,019
RGA10	1-1-0-1-0	0,044	1,667	17,635	0,000
	1-1-1-0-1	0,118	5,052	5,637	0,030
	1-1-1-0-0	0,247	4,778	4,479	0,040
RGA14	1-0	0,738	5,065	6,369	0,016

Tab. 10: *Haplotype-Trend-Regression* signifikant mit Phoma-Resistenz assoziierter Sequenzen der Keimlingsresistenzversuche

<i>Sequenz</i>	<i>Haplotyp</i>	<i>Frequenz</i>	<i>Mittel-Bonitur</i>	<i>F-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>
RGC2	0-1-1	0,157	7,437	4,955	0,032
	1-1-0	0,049	5,619	4,053	0,051
RGC15	1-0-0	0,690	6,511	9,522	0,004
RGA13	1-0	0,711	7,036	6,541	0,015
	0-1	0,026	4,589	7,604	0,009

4.4 Identifikation von *L. maculans*-Resistenzgenkandidaten

Für die jeweiligen Haplotypen wurden die PCR-Fragmente einzelner Genotypen amplifiziert, kloniert und sequenziert. Dadurch konnten für die zwei Sequenzen RGA10 (Homolog zum Resistenzgenalog 18 von FOURMANN *et al.* 2001) und RGC3 (Homolog zur Blattrost Resistenz Kinase Gen LR1 aus *Triticum aestivum*) Locus-spezifische Primer entwickelt werden, die zur Sequenzierung in den Core- und Verifikationssets genutzt

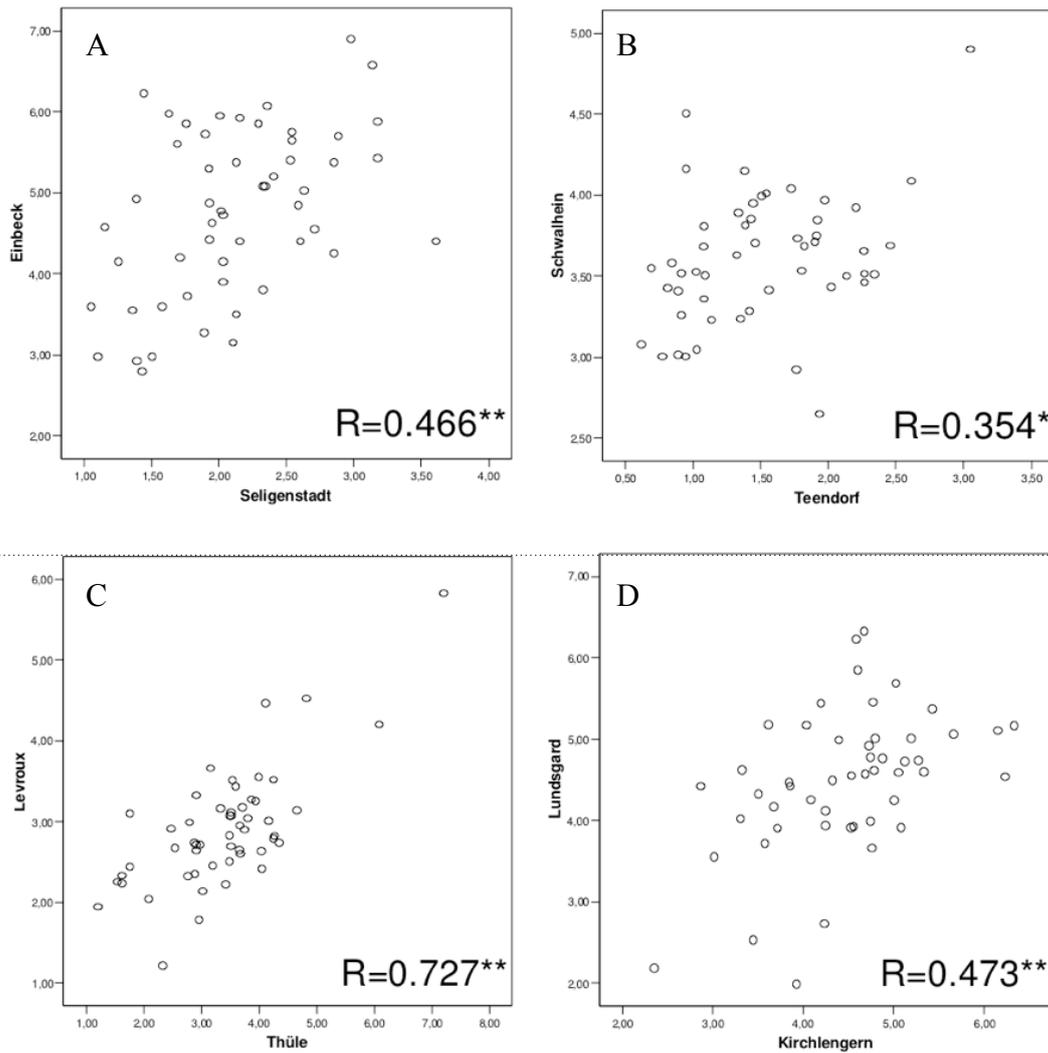


Abb. 9: Korrelation der Phoma-Felddaten an den jeweiligen Züchter-eigenen Standorten. A: KWS, B: SW Seed, C: DSV, D: Raps GbR, R =Korrelationskoeffizient

In den Analysen, in denen das *Coreset* und das Verifikationsset in einer Gesamtanalyse zusammengefasst wurden, konnte die Assoziation für RGA10 anhand der Gewächshausdaten der NPZ bestätigt werden. Für vier Sequenzen (RGA1, RGA2, RGA14, RGC11) wurden bis zu 11 weitere orthologe Kopien mit neuen Primern entdeckt, so dass hier eine Entwicklung von Locus-spezifischen Primer nicht praktikabel bzw. nicht möglich war. Für drei Sequenzen wurden zwar Locus-spezifische Primer entwickelt, aber die hier durch Sequenzierung gefundenen Sequenzpolymorphismen im *Coreset* entsprachen nicht den BESS-T-Polymorphismen (RGA4, RGA6, RGC6). Dies deutet darauf hin, dass die Sequenz-unabhängige SNP-Detektion bei hoher Kopienzahl im PCR-Amplifikat keine zuverlässige bzw. wiederholbare Identifizierung von SNPs in einzelnen Loci ermöglicht. Bei der Sequenz RGA9 wurde durch die Entwicklung der neuen Primer ein kürzeres

Fragment amplifiziert, so dass die Sequenzspezifität verloren ging und als Folge eine Doppelbande amplifiziert wurde.

Insgesamt erwies sich die Mehrzahl der amplifizierten Sequenzen als zu kurz, um in den auftretenden hohen Kopienzahlen einen ausreichenden Polymorphismus für die Entwicklung von wirklich Locus-spezifischen Primern zu ermöglichen. Die Entwicklung von funktionierenden Locus-spezifischen Primern war daher leider nur in den wenigsten Fällen möglich.

4.5 Genomweite Assoziationsstudien mit SSR-Markern

Für eine genomweite Assoziationsanalyse mit PCR-Markern standen Daten 559 SSR-Allele aus 104 SSR-Primerkombinationen zur Verfügung, die von den beteiligten Zuchtunternehmen im *B. napus-Coreset* bzw. im eigenen Verifikationsset erfasst wurden. Auf Grund dessen wurden die SSR-Alleldaten ebenfalls mittels „PowerMarker“ auf Assoziationen mit Resistenz (Feld-, Gewächshaus- und Keimlingsresistenzdaten) analysiert. Eine *Haplotyp-Trend-Regression*-Analyse war in diesem Fall nicht möglich, weil es sich um Multilocus-Marker mit in den meisten Fällen nur geringem bzw. unbekanntem Kopplungsungleichgewicht handelt.

Aufgrund des *Single-Locus F-Tests* konnten signifikante Assoziationen mit Phoma-Resistenz für Allele aus 63 SSR-Primerkombinationen identifiziert werden. Darunter befanden sich 35 Allele mit über 10% Allelhäufigkeit im Genotypen-*Coreset*, die in Feld- sowie Gewächshaus-Tests (GWH) eine signifikante Assoziation ($p < 0,05$) mit Phoma-Resistenz im *Coreset* aufwiesen (Tab. 11). Um falsche Assoziationen, die durch Populationsstruktur unter den *Coreset*-Genotypen hervorgerufen werden könnten, möglichst auszuschließen, wurden die positiv assoziierten Marker alle in den Züchter-Verifikationssets erneut auf Assoziation mit Resistenz geprüft. So ließen sich die Assoziationen von 21 der SSR-Allele, welche eine Allelfrequenz im *Coreset* von über 10% aufzeigten, in einem oder mehreren der Verifikationssets bzw. in der Gesamtanalyse aus Core- und Verifikationsset bestätigen.

Tab. 11: Ergebnisse der *Single-Locus F-Tests* von 35 SSR-Allelen mit über 10% Allelhäufigkeit im Genotypen-*Coreset*, die in Feld- sowie Gewächshaustests (GWH) mit dem *Coreset* eine signifikante Assoziation ($p < 0,05$) mit Phoma-Resistenz aufwiesen

Nr.	Marker	Allel	Häufigkeit	Feld		GWH		Mittel Phoma-Befall	
				F-Statistik	p-Wert	F-Statistik	p-Wert	Feld	GWH
1	BRAS029	189	15	7,127	0,010	6,154	0,016	2,820	5,473
2	BRAS039	191	7	10,284	0,002	9,812	0,003	3,187	2,907
3	BRAS039	202	24	9,651	0,003	14,115	0,000	2,753	5,467
4	BRAS051	131	7	5,486	0,023	3,692	0,060	3,535	3,971
5	BRAS065	213	16	6,667	0,013	8,713	0,005	3,387	4,113
6	BRAS067	143	22	11,639	0,001	13,607	0,001	2,843	5,507
7	BRAS067	144	33	4,965	0,030	3,930	0,053	3,051	4,255
8	BRAS078	113	31	9,798	0,003	1,200	0,279	3,299	4,639
9	BRAS084	114	30	8,424	0,006	1,432	0,237	3,312	4,597
10	BRAS116	212	37	10,027	0,003	4,845	0,032	2,8846	4,942
11	CB10010	245	11	8,503	0,005	4,235	0,045	3,508	4,118
12	CB10027	285	7	6,309	0,015	9,673	0,003	3,569	3,614
13	CB10028	175	8	9,273	0,004	2,964	0,091	2,657	5,456
14	CB10030	80	19	6,169	0,016	10,955	0,002	3,346	3,858
15	CB10041	245	43	7,409	0,009	9,351	0,004	2,876	4,831
16	CB10041	248	19	5,400	0,024	4,797	0,033	3,337	4,324
17	CB10065	163	21	11,260	0,001	12,168	0,001	2,836	5,502
18	CB10065	164	34	4,610	0,036	5,523	0,023	3,048	4,229
19	CB10065	175	21	11,260	0,001	12,168	0,001	2,836	5,502
20	CB10065	176	33	8,342	0,006	8,341	0,006	3,084	4,147
21	CB10079	168	49	8,053	0,006	10,279	0,002	2,916	4,811
22	CB10101	174	42	4,533	0,038	4,952	0,031	3,035	4,908
23	CB10199	150	45	10,120	0,002	6,421	0,014	3,144	4,402
24	CB10266	226	22	11,643	0,001	13,607	0,001	2,843	5,507
25	CB10266	227	25	4,775	0,033	7,482	0,009	3,028	4,144
26	CB10311	125	10	4,229	0,045	7,356	0,009	3,421	3,865
27	CB10320	255	24	4,009	0,051	4,174	0,046	3,120	4,094
28	CB10364	176	20	9,813	0,003	11,952	0,001	2,864	5,485
29	CB10364	177	35	6,948	0,011	8,253	0,006	3,085	4,169
30	CB10536	138	24	11,216	0,002	10,848	0,002	2,738	5,198
31	CB10536	139	33	8,189	0,006	7,512	0,008	3,176	4,312
32	CB10587	153	13	9,916	0,003	5,110	0,028	3,237	3,792
33	CB10587	166	24	8,346	0,006	9,766	0,003	2,639	5,169
34	CB10627	224	21	9,711	0,003	8,454	0,005	2,840	5,519
35	MR21	182	21	9,297	0,004	10,349	0,002	2,860	5,467

Diese SSR-Allele sind größtenteils kartiert (z.B. PIQUEMAL *et al.* 2005, BASUNANDA *et al.* 2007, RYGULLA *et al.* 2007), so dass deren Kartenpositionen in Relation zu bekannten QTL für Phoma-Resistenz zum Teil verglichen werden konnten (Tab. 12). In einigen Fällen kommen die Marker in Genomregionen vor, in denen signifikante Resistenz-QTL bekannt sind, so dass diese Marker auch aussichtsreiche Kandidaten für die Selektion auf Phoma-Resistenz darstellen.

Tab. 12: Bekannte *B. napus*-Kartenpositionen von in Feld- und Gewächshaus-tests mit Phoma-Resistenz assoziierten SSR-Allelen, für die auch in einem oder mehreren der Züchter-Verifikationssets eine signifikante Assoziation mit Resistenz detektiert werden konnte, sowie potentiell assoziierte *quantitative trait loci* (QTL) für Phoma-Resistenz

SSR	Bezeichnung	Allel	Kartenposition(en) in		Zahl der Verifizierungen	Bekannte QTL für Phoma-Resistenz in Markerregion
				<i>B. napus</i> (falls bekannt)		
1	BRAS039	202		N8 , N13	4	
2	BRAS067	143		N11	2	Pilet <i>et al.</i> 1998
3	CB10010	245		N16	2	
4	CB10027	285		N15	2	
5	CB10030	080		N6	4	Pilet <i>et al.</i> 1998
6	CB10065	163		N6	2	Pilet <i>et al.</i> 1998
7	CB10065	164		N6	2	Pilet <i>et al.</i> 1998
8	CB10065	175		-	2	
9	CB10065	176		-	2	
10	CB10199	150		N4	2	
11	CB10266	226		N19	2	
12	CB10266	227		N19	3	
13	CB10364	176		N8	2	
14	CB10364	177		N8	2	
15	CB10502	273		N16	3	
16	CB10536	138		N11	3	Pilet <i>et al.</i> 1998
17	CB10536	139		N11	2	Pilet <i>et al.</i> 1998
18	CB10587	153		N11	1	Pilet <i>et al.</i> 1998
19	CB10587	166		N11	4	Pilet <i>et al.</i> 1998
20	CB10627	224		-	2	
21	MR21	182		N1, N13	3	Pilet <i>et al.</i> 1998

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in 32 RGA- bzw. RGC-Sequenzen insgesamt 58 Polymorphismen detektiert werden konnten, von denen sich sechs Sequenzen als signifikant assoziiert ($p < 0,05$) mit dem Feldresistenz-Daten erwiesen. Ebenso fanden sich signifikante Assoziationen in den Gewächshaus-Resistenzdaten und in den Resistenzdaten der Keimlingstests. Unter den gebildeten Haplotypen fanden sich jeweils drei als signifikant assoziiert mit den Resistenzdaten der Keimlingstests und Feldresistenz-Daten, sechs als signifikant assoziiert mit dem Gewächshaus-Resistenzdaten. Für die zwei Sequenzen RGA10 (Homolog zum Resistenzgenalog 18 von FOURMANN *et al.* 2001) und RGC3 (Homolog zum Blattrost-Resistenz-Kinase-Gen *LR1* aus *Triticum aestivum*) konnten Locus-spezifische Primer entwickelt werden, die zur Sequenzierung in den Core- und Verifikationssets genutzt wurden. Zusätzlich konnten 21 von in Feld- und Gewächshausstests mit Phoma-Resistenz assoziierten SSR-Allele ermittelt werden, die größtenteils kartiert sind (z.B. PIQUEMAL *et al.* 2005, BASUNANDA *et al.* 2007, RYGULLA *et al.* 2007) und zum Teil in Genomregionen vorkommen, in denen bereits signifikante QTL für Phoma-Resistenz aus der Literatur bekannt sind.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, die allelische Diversität im aktuellen europäischen Rapszuchtmaterial für das Merkmal Phoma-Resistenz zu erfassen und neue molekulare Werkzeuge für die züchterische Verbesserung dieses Merkmals zu entwickeln. Dabei wurde zum ersten Mal versucht, SNP-Marker aus *B. napus*-Resistenzgenkandidaten bzw. resistenzgen-analogen Sequenzen zu entwickeln und für eine Allel-Merkmal-Assoziationsstudie mit Phoma-Resistenz einzusetzen.

SNPs kommen in allen Genomen sehr zahlreich vor und sind in den meisten Organismen die häufigste Form von Polymorphismen. Aufgrund der Eigenschaften der SNPs (z.B. hohe Frequenz, niedrige Mutationsrate) stellen sie eine nützliche Quelle zur Analyse von komplexen Merkmalen da. Die SNP-Technologie wurde zuerst für Assoziationsstudien beim Menschen verwendet (BROOKES 1999). Heute wird die SNP-Technologie auch sehr häufig in der Pflanzenforschung eingesetzt. Bei *Brassica*-Spezies sind bisher nur wenige Assoziationsstudien durchgeführt worden. TANHUANPÄÄ *et al.* (1998) identifizierten eine Assoziation des FAD2 Gens mit einem QTL für Ölsäuregehalt in *B. rapa*. Für diesen Locus wurden Allel-spezifische PCR-Marker entwickelt, die auf einen SNP im FAD2 Gen basieren. OSTERBERG *et al.* (2002) kartierten ein Kandidatengen für die Kontrolle des Blühzeitpunktes (COL1) in *B. nigra*. Hier zeigte ein Indel in diesem Gen eine signifikante Assoziation mit diesem Merkmal. Assoziationsstudien, die sich mit Resistenzen in *B. napus* befassen, sind bis heute nicht bekannt, so dass diese Arbeit für die Resistenzzüchtung einen neuen, innovativen Ansatz darstellt.

Obwohl der Infektionsstoffwechsel von *L. maculans* umfangreich beschrieben ist, ist nur wenig über die molekulare Interaktion zwischen dem Erreger und seinem Wirt und somit über den Resistenzmechanismus gegen dem Erreger der Phoma-Krankheit bekannt. Genetische Studien der Phoma-Resistenz in *Brassica*-Spezies sind langwierig und zeitintensiv. Trotz bestätigter Gen-für-Gen-Interaktion wurde bisher noch kein Resistenzgen oder LmA_{vr}-Gen in Raps kloniert (HOWLETT, 2004). Typische Antworten auf eine Infektion, die in *B. napus* auf zellulärer Ebene beobachtet werden konnten, sind Ablagerungen von Lignin-ähnlichen

Strukturen, die Kalzium- und Pektin-Akkumulation in den Gefäßen, die Ablagerung von dunklem Material und die Kallose-Produktion (CHEN & HOWLETT, 1996; HAMMOND *et al.*, 1985; JOHNSON & LEWIS, 1994; ROUSSEL *et al.*, 1999). PEDRAS *et al.* (2003) entdeckten, dass in *Thlaspi arvense*, ein weiterer Vertreter der Brassicaceen, der Phytoalexin-Stoffwechsel an der Abwehrreaktion gegen *L. maculans* beteiligt ist. Weiterhin wurde die unterschiedliche Expression von PR (*pathogenesis-related*) -Proteinen wie Chitinasen und 1,3- β -Glucanasen in Blättern von resistenten und anfälligen *Brassica*-Genotypen beobachtet (DIXELIUS *et al.*, 1994; HENNIN *et al.*, 2001; RASMUSSEN *et al.*, 1992). Zum Verständnis des Resistenzmechanismus gegen das Pathogen hat sich *Arabidopsis* als geeignetes Modell für dieses Wirtssystem gezeigt. BOHMAN *et al.* (2004) berichteten über einen multiplen Abwehrmechanismus gegen *L. maculans* in *Arabidopsis* mit mehrfachen Loci, die für die funktionale Resistenz nötig sind. Dabei wird der Verlust von zwei ungekoppelten *L. maculans* Resistenz Loci (RLM1 und RLM2) in den Nachkommenschaften einer Kreuzung zwischen zwei resistenten Akzessionen Col-0 (RLM1Col/ rlm2Col) und Ler-0 (rlm1Ler/ RLM2Ler) impliziert. Die Ergebnisse ließen weiterhin auf einen bisher nicht bekannten Resistenzmechanismus schließen, der unabhängig vom Stoffwechsel von Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen zu sein scheint. Dies deckt sich mit anderen *Arabidopsis*-Pathosystemen, wie *Phytophthora porri* (ROETSCHI *et al.* 2001) oder *Erysiphe cichoracearum* (VOGEL *et al.* 2002). Scheinbar spielt jedoch bei *Arabidopsis* die Produktion von Camalexin und der programmierte Zelltod eine Rolle (BOHMAN *et al.* 2004).

Aussichtsreiche Kandidatengene für Resistenz gegen Phoma in Raps standen zum Beginn des Vorhabens nicht zur Verfügung. Daher sollten, um potentielle Resistenzkandidaten zu identifizieren, RGA- und RGC-Sequenzen in einem genomweiten Ansatz auf Assoziationen mit Phoma-Resistenz geprüft werden. Insgesamt erwiesen sich sechs Sequenzen als signifikant assoziiert mit den von Züchterseite erhobenen Feldresistenz-Daten. Ebenso fanden sich positive Assoziationen in Gewächshaus-Resistenzdaten und in Resistenzdaten aus Keimlingstests. Unter den gebildeten Haplotypen zeichneten sich jeweils drei als signifikant assoziiert mit den Resistenzdaten der Keimlingstests und Feldresistenz-Daten aus, sechs als signifikant assoziiert mit dem Gewächshaus-Resistenzdaten.

Da für die Mehrzahl der signifikant mit Phoma-Resistenz assoziierten RGA- und RGC-Sequenzen die Identifizierung von Locus-spezifischen Primern wegen einer unerwartet sehr hohen Kopienzahl nicht möglich war, konnten nur die beiden Sequenzen RGA10 (Homolog

zum Resistenzgenalog 18 von FOURMANN *et al.* 2001) und RGC3 (Homolog zur Blattrost-Resistenz-Kinase-Gen LR1 aus *T. aestivum*) eine genetische Kartierung in *B. napus* aufgrund von Sequenzpolymorphismen in vorhandenen spaltenden Populationen durchgeführt werden. Die genetische Kartierung erfolgte durch vergleichende Sequenzierung von DH-Linien entsprechender Populationen durch den Projektpartner KWS Saat AG. Die signifikant mit Phoma-Resistenz im Feld assoziierten Sequenzen RGA10 bzw. RGC3 wurden auf den *B. napus* Chromosomen N16 bzw. N3 lokalisiert. In den entsprechenden Chromosombereichen befinden sich keine bekannten QTL für Phoma-Resistenz, so dass es sich bei diesen Sequenzen evtl. um allelische Variation in bisher unbekanntem Resistenzloci handelt.

Die Funktion von RGAs ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, jedoch sind genetisch definierte Cluster aus RGAs bekannt. Molekulare Studien haben demonstriert, dass diese Cluster aus Duplikationen von paralogen Sequenzen resultierten (MEYERS *et al.* 2003, MICHELMORE & MEYERS 1998, RICHLY 2002, ZHU *et al.* 2002). Solch ein Clustering ist ein bekanntes Phänomen, das an vielen Resistenzgenloci beobachtet wird. Rpp1, Rpp5, Rpp8, und Rps4 gehören zu dieser Kategorie in *Arabidopsis* (BOTELLA *et al.* 1998; MCDOWELL *et al.* 1998; GASSMANN *et al.* 1999; NOEL *et al.* 1999), Cf9/4 in Tomate (PARNISKE *et al.* 1997) und RGC2 in Salat (KUANG *et al.* 2004). Die Gene sind üblicherweise Mitglieder von Multigenfamilien und ihre Sequenzen können stark divergieren. An einigen Loci wurden diese Genfamilien durch Duplikationen erweitert. Die duplizierten Sequenzen unterschieden sich durch akkumulierte Mutationen und führten dadurch zu einer erhöhten Komplexität innerhalb von Resistenzgenen (BAUMGARTEN *et al.* 2003, LEISTER 2004).

Das mit Phoma-Resistenz signifikant assoziierte RGA 10 wurde auf dem *B. napus*-Chromosom N16 kartiert. Bisher wurde in dieser Region kein QTL für Phoma-Resistenz kartiert, jedoch zeigen mittels Datenbank-gestützte Syntänieabgleiche, dass für die DNA-Sequenz von RGA10 eine Homologie auf Chromosom 1 (22,57 Mbp) in *Arabidopsis* vorliegt. Diese Position stimmt auch bei der vergleichenden Genomanalyse vom *B. napus* und *Arabidopsis* überein (PARKIN *et al.* 2005). In dieser Region ist bei *Arabidopsis* ein größeres Cluster von RGA-Sequenzen zu finden (vgl. Abb. 10). STAAL *et al.* (2006) identifizierten in *Arabidopsis* mittels rekombinanter Inzuchtlinien aus Col-4 8 (resistent) und Ler-0 (anfällig) zwei signifikante Loci (RLM1 und RLM2). RLM1 kartiert auf Chromosom 1. In der Region des Col-Resistenz-Locus sind 76 Gene zu finden, von denen sieben für putative Gene aus der

TIR-NB-LRR Familie codieren. Zusätzlich enthält der Locus diverse Abwehr-assoziierte Gene. Analysen zeigten, dass die Sequenz At1g64070 für die Resistenz verantwortlich ist und es sich hier um ein *L. maculans*-spezifisches Resistenzgen handelt. At1g64070 liegt auf Chromosom 7 bei 23,75 Mbp und somit in der näheren Umgebung von der bei 22,75 Mbp positionierten RGA10-Sequenz. Zusätzlich weist die Chromosomenregion um RGA10 Mikrosyntentien mit einer Region in *B. napus* auf, die den Resistenzlocus LmR1 beinhaltet (MAYERHOFER *et al.* 2005). MAYERHOFER *et al.* (2005) konnten weiterhin intergenomische Duplikationen des A-Genom Loci N7 auf N16 des C-Genoms aufdecken, so dass es sich bei RGA 10 um eine genomische Duplikation eines kartierten Locus für Phoma-Resistenz handeln kann.

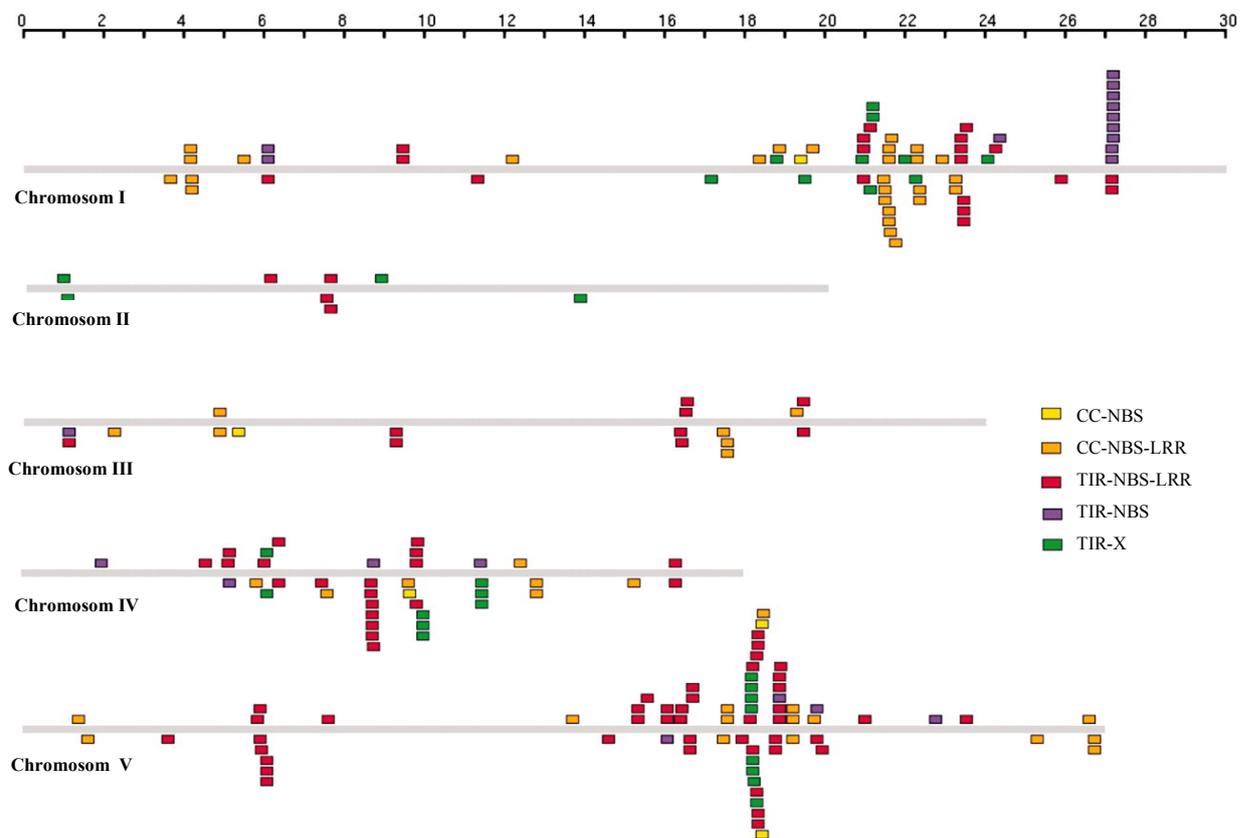


Abb.10: Cluster von *Arabidopsis* Sequenzen, die für RGA-Sequenzen kodieren. Die farblichen Markierungen über und unter jedem *Arabidopsis* Chromosom (grau) kennzeichnen die ungefähre Position der Gene. Die Chromosomenlänge ist in Mbp angegeben (aus MEYERS *et al.* 2003)

Die mit Phoma-Resistenz assoziierte Resistenzgenkandidatensequenz RGC3 wurde auf N3 kartiert und zeigt Homologien zu Lr10, einer Rezeptor-ähnlichen Kinase, die bei der Resistenzausprägung in Weizen involviert ist (FEUILLET *et al.* 1997). Bisher wurde – wie bei RGA10 auf N16 – in dieser Region kein QTL für Phoma-Resistenz kartiert, jedoch zeigten

Datenbank-gestützte Syntänieabgleiche, dass eine Homologie auf Chromosom 4 (15,06 Mbp) in *Arabidopsis* vorliegt. Auf Chromosom 4 wurde von STAAL et al (2006) der *L. maculans*-Resistenzlocus RLM2 kartiert, jedoch ist die Position weniger gut definiert wie bei RLM1. Es wird jedoch von einer Position zwischen 9,9 und 11,4 Mbp ausgegangen. Diese Position entspricht nicht der Position von RGC3, so dass es sich beim RGC3-Locus auf Chromosom N3 vermutlich um einen weiteren *B. napus*-Locus für Phoma-Resistenz handelt.

FOURMANN et al. (2001) isolierten 47 RGA-Sequenzen aus *B. napus*. 18 RGAs wurden auf zehn der 19 *B. napus* Kopplungsgruppen kartiert, jedoch wurde nur bei RGA24 eine Co-Lokalisation mit einem *B. napus* QTL für Feldresistenz von *L. maculans* gefunden. Ob es sich bei der RGA24-Sequenz von FOURMANN et al. um ein Phoma-Resistenzgen handelt, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Es fand sich in dieser Sequenz (in dieser Arbeit als RGA12 bezeichnet) zwar ein Polymorphismus, jedoch nur in zwei der 54 Genotypen. Die Felddaten dieser zwei Genotypen ließen sich nicht signifikant mit den BESS-T Daten assoziieren.

Die Arbeiten von STAAL et al. (2006) stellen die erste Identifikation von Genen dar, die an der Resistenz gegen Phoma in dem Genus *Brassica* beteiligt sind. Der Modellorganismus *Arabidopsis* wird schon länger als Quelle für Resistenzgenkandidaten bei Raps diskutiert (SILLITO et al. 2000), so dass die Kenntnisse dieser Modellspezies eine besonders hohe Relevanz für die Raps genomforschung und –züchtung besitzen. Konservierte Genom-Regionen zwischen *A. thaliana* und *B. napus* sind bekannt (CAVELL et al. 1998; SCHEFFLER et al. 1997, PARKIN et al 2005) und es konnte gezeigt werden, dass Gene von *A. thaliana* die gleichen Funktionen in *B. napus* aufwiesen (FRAY et al. 1997; LAGERCRANTZ et al. 1996). Trotzdem wird es auch in Zukunft schwierig sein, die beschriebenen RLM1 und RLM2, die in *Arabidopsis* an der Resistenzantwort auf *L. maculans*-Befall beteiligt sind, in *B. napus* zu identifizieren. Die Genome von *B. napus* und *A. thaliana* weisen zwar eine Homologie von etwa 87% auf DNA- und Proteinebene auf (Schmidt 2002), jedoch wird die Identifizierung durch die starken Sequenzhomologien von RGAs untereinander und die vorhandenen Gen-Cluster erschwert. Hinzu kommt, dass es sich bei *B. napus* um einen Organismus mit einer komplexen polyploiden Genomstruktur handelt, der aus einer spontanen Hybridisierung zweier eng verwandten und bereits polyploidisierten Spezies (*B. rapa* und *B. oleracea*) entstanden ist. (U 1935) In polyploiden Organismen liegen daher häufig mehrere Kopien eines Kandidatengens oder eines Markers vor. Zusätzlich liegen im Genom von Raps extensive Chromosomenduplikationen vor (PARKIN et al. 2003, MAYERHOFER et al. 2005).

Die Komplexität des Rapsgenoms spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wieder. So wurden für drei RGA-Sequenzen (RGA1, RGA2, RGA14) bis zu 11 weitere orthologe Kopien entdeckt. Zusätzlich wurden für drei Sequenzen zwar Locus-spezifische Primer entwickelt, aber die hier durch Sequenzierung gefundenen Sequenzpolymorphismen im *Coreset* entsprachen nicht den BESS-T-Polymorphismen (RGA4, RGA6, RGC6). Dies deutet darauf hin, dass die Sequenz-unabhängige SNP-Detektion bei hoher Kopienzahl im PCR-Amplifikat keine zuverlässige bzw. wiederholbare Identifizierung von SNPs in einzelnen Loci ermöglicht. Dies liegt sehr wahrscheinlich ebenfalls daran, dass es sich hier um ein komplexes polyploides Genom handelt, in dem sowohl mehrere orthologe Genkopien als auch potentiell zahlreiche paraloge Sequenzen in hohen Kopienzahlen vorliegen (LAGERCRANTZ & LYDIATE 1998, LYSAK *et al.* 2006). Hier bietet sich an, jede Sequenz zu klonieren, um für alle möglichen Kopien Locus-spezifische Primer zu entwickeln. Dieses Vorgehen ist jedoch nur geeignet, wenn eine überschaubare Zahl sehr aussichtsreicher Kandidatengene vorliegt. Im Vorfeld dieser Arbeit standen keine bekannte Kandidatengene für Phoma-Resistenz zur Verfügung, so dass eine Vielzahl potentiell an einer Resistenz-beteiligten Sequenzen gescreent werden mussten, statt eine tiefgründige Analyse einiger weniger Sequenzen zu unternehmen.

Trotz allem stellen einige der hier ermittelten Resistenzgenkandidaten jedoch interessante Quellen für weitere Forschungsansätze dar, da die auf den BESS-T Daten beruhende signifikante Assoziation mit den Resistenzdaten auf einer unterschiedlichen Anzahl von Kopien beruhen könnte. Die Sequenzen zeigen zum Teil Homologien zu Sequenzen, bei denen nachgewiesen ist, dass sie an dem pflanzlichen Abwehrmechanismus beteiligt sind. Hierzu zählt z.B. auch die Sequenz RGC6, die Homologien zu einer Gluthation-S-Transferase aufweist bzw. RGC11, die Homologien zum Hitzeschockprotein HSP81-3 aufweist (FRISTENSKY *et al.* 1999).

Pflanzliche Abwehrmechanismen können in unterschiedliche Vorgänge unterteilt werden. Neben der systemischen Resistenz als sehr langsame und der Synthese von Phytoalexinen als schnelle Reaktion, spielt die hypersensitive Reaktion (HR) als ein sehr schneller Abwehrmechanismus eine wichtige Rolle. Diese Abwehrreaktion wird auch bei Raps als wichtiger Mechanismus gegen den Befall von Phoma diskutiert (ROUSSEL *et al.* 1999). Die HR spielt eine ursächliche Rolle bei der Resistenz gegen pilzliche Pathogene (HEATH, 1980). Man versteht darunter einen frühen, lokalen Abwehrmechanismus, der das Eindringen des Pathogens in die Pflanze unterbinden bzw. auf einen kleinen Gewebebereich beschränken

soll. Hierbei entstehen lokale Nekrosen, die vermutlich aus einem programmierten Zelltod resultieren. Dabei spielen reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) aufgrund ihrer hohen Reaktivität als Auslöser von Zelltod eine Rolle. Sie stellen wichtige Komponenten von Abwehrreaktionen und Signalketten dar (LAMB & DIXON 1997, RAO *et al.* 2000) und besitzen in der Abwehrreaktion gegen Pathogene eine antimikrobielle Eigenschaft. ROS induzieren die Expression von unterschiedlichen Abwehrgenen. Unter anderem konnte die Induktion einer Glutathion-S-Transferase durch ROS während der HR nachgewiesen werden (LEVINE *et al.* 1994). In einem ähnlichen Zusammenhang könnte beispielsweise die mit Phoma-Resistenz assoziierte Glutathion-S-Transferase-ähnliche Sequenz RGC6 an der Resistenzreaktion gegen Phoma beteiligt sein.

Neben der hypersensitiven Reaktion ist die induzierte bzw. systemisch erworbene Resistenz (SAR; *systemic acquired resistance*) von Bedeutung. Sie ist durch die koordinierte Expression mehrerer Gene gekennzeichnet, zu denen die PR (*pathogen related*)-Proteine gehören. Diese stellen eine Gruppe von Proteinen dar, die eine toxische Wirkung auf das Pathogen ausüben. Hierbei wurde ebenfalls eine Rolle der Glutathion-S-Transferase nachgewiesen. HAHN & STRITTMATTER (1994) zeigten, dass es sich bei dem PRP1-1-Protein der Kartoffel, welches eine antioxidative Funktion in der Zelle erfüllt, um eine Glutathion-S-Transferase handelt.

Ebenfalls viele Kopien in *B. napus* wurden bei der Sequenz RGC11 gefunden, die Homologien zum Hitzeschockprotein HSP81-3 aufweist. Hitzeschockproteine (HSPs) werden unter physiologisch kritischen Bedingungen aktiviert und stellen somit eine generelle Stressantwort dar. Bisher ist nur wenig über die Beteiligung von HSPs an pflanzlichen Abwehrmechanismen bekannt und das generelle Wissen über Funktion und Regulation von HSPs ist limitiert; jedoch gibt es Forschungsansätze, die eine Rolle der HSPs an Resistenzmechanismen nicht ausschließen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass HSP90 sowohl mit RAR (*required for Mla12 resistance*), als auch mit SGT1 (*suppressor of the G₂ allele of skp1*) interagiert (TAKAHASHI *et al.* 2003). RAR1 fungiert als eine Komponente im pflanzlichen Abwehrmechanismus für multiple Resistenzantworten (SHIRASU *et al.* 1999, TORNERO *et al.* 2002, MUSKETT *et al.* 2002). In Gerste zeigten *rar1*-Mutanten das Fehlen von ROS-Akkumulation oder einer HR (SHIRASU *et al.* 1999). Gleichmaßen zeigten *Arabidopsis*-Mutanten einen Defekt in Protein-vermittelter Resistenz gegen bakterielle und pilzlichen Pathogene (TORNERO *et al.* 2002, MUSKETT *et al.* 2002). Die präzise Funktion von RAR1, der mit SGT1 interagiert (KITAGAWA *et al.* 1999, AZEVEDO *et al.* 2002), ist noch unklar. Es konnte bei *Arabidopsis*, Gerste und *Nicotiana benthamiana* nachgewiesen werden,

dass SGT1 ebenfalls für die vermittelte Resistenz von diversen Resistenzproteinen zuständig ist (AUSTIN *et al.* 2002, PEART *et al.* 2002, LIU *et al.* 2002, TÖR *et al.* 2002). Des Weiteren konnte anhand von *hsp90*-Mutanten gezeigt werden, dass die durch RPS2-bedingte Resistenz, die einen Zelltod durch HR auslöst, abgeschwächt wird (TAKAHASHI *et al.* 2003). Dies impliziert eine essentielle Rolle von HSP90 zusammen mit RAR1 and SGT1 an einer Resistenzantwort.

Mittels Datenbank-gestützter Syntänieabgleiche konnten die Genompositionen der jeweils nächsten *Arabidopsis*-Orthologen zu allen signifikant mit Phoma-Resistenz assoziierten RGA- und RGC-Sequenzen und daraufhin über vergleichende *Arabidopsis-B. napus* Karten (z.B. PARKIN *et al.* 2005) die potentiellen Links zu *B. napus*-Kopplungsgruppen ermittelt werden (Abb. 11). Obwohl wegen der weitgehenden Paleohexaploidisierung im Genom von *B. napus* für alle Sequenzen mehrere homoeologe Regionen ermittelt wurden, in denen orthologe Loci zu den RGA- und RGC-Sequenzen vermutet werden können, konnten auf dieser Weise in manchen Fällen *B. napus*-Chromosomenregionen identifiziert werden, die möglicherweise mehrere signifikant mit Phoma-Resistenz assoziierten RGA- bzw. RGC-Sequenzen beinhalten. Teilweise sind in den entsprechenden Genomregionen auch bekannte Resistenzloci vorhanden, die in klassischen QTL-Studien identifiziert werden. In mehreren Fällen kartierten SSR-Marker, die ebenfalls mit Phoma-Resistenz signifikant assoziiert waren, in der gleichen Chromosomenregion (PILET *et al.* 1998). Dies deutet stark darauf hin, dass die entsprechenden Genomregionen bedeutende Resistenzgene beinhalten, die einen Effekt auf Phoma-Resistenz bewirken.

Vor allem die drei RGC-Sequenzen, die aus der Abwehrreaktion von *B. napus* auf Phoma stammen und positiv mit Resistenz assoziiert zu sein scheinen, stellen aussichtsreiche Kandidaten für weitere Verarbeitung in Richtung Marker-gestützte Selektion dar. Die sieben mit Resistenz assoziierten RGA-Sequenzen sind zwar ebenfalls für die Marker-Entwicklung interessant, allerdings kann es sein, dass diese selber nichts mit der Resistenz zu tun haben, sondern lediglich in RGA-Clustern vorkommen und somit eine genetische Kopplung mit einem eigentlichen Resistenzgen besitzen. In diesem Fall eignen sich die mit signifikanten Assoziationen zu Resistenz ermittelten SSR-Marker stärker für eine Marker-gestützte Selektion, da hier bereits spezifische Primer und Allel-Daten für aktuelles Zuchtmaterial vorliegen. Diese Marker sowie die beiden Locus-spezifischen Sequenzen RGC3 und RGA10 stehen nun den an diesen Arbeiten beteiligten Zuchtunternehmen für Integration in ihre

Züchtungsprogramme für die Identifizierung und Nutzung allelischer Diversität für Phoma-Resistenz zur Verfügung.

Sequenz	p-Wert	Position in At	mögliche Links zu Bn-Gruppen																
			N1	N3	N4	N5	N6	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16	N17	N18	N19
RGC 6	0.015	At1, 0.59 Mbp						u				m		o					
RGA 1	0.04	At1, 4.09 Mbp						u	u									u	
RGA 6	0.029	At1, 4.22 Mbp					o	u	u					o				u	
RGA 10	0.002	At1, 22.57 Mbp	m		o				m		m			u				u	m
RGA 14	0.029	At2, 10.15 Mbp			o				u					u					u
RGA 2	0.014	A5, 17.53 Mbp	o				u	m	m		o	u	u	m			m		m
RGA 9	0.019	At4, 13.20 Mbp	m			m					o	m	m	m					
RGC 3	0.051	At4, 15.06 Mbp		u							o		u					u	
RGA 4	0.048	At5, 17.44 Mbp			o		u		u	o		u		m		o			m
RGC 11	0.008	At5, 22.72 Mbp		o										o					

Assoziierte SSR-Marker	2 21		10		6 7	1 13 14			2 16 17 18 19		1 21		4	3 15				11 12
bekannte Phoma-QTL-Position	o	m			m	u			o	o								

Abb. 11: *Arabidopsis*-Chromosomenpositionen der nächsten Orthologen zu allen mit Phoma-Resistenz assoziierten RGA- und RGC-Sequenzen zusammen mit über vergleichende Kartierung ermittelten möglichen Links dieser Genomregionen zu *B. napus*-Kopplungsgruppen. Die potentiellen Positionen der *B. napus*-Orthologen auf den entsprechenden Chromosomen ist mit o (oben), m (Mitte) oder u (unten) angegeben. Regionen einer *B. napus*-Kopplungsgruppe, in denen sowohl mehr als eine mit Phoma assoziierte RGA- bzw. RGC-Sequenz sowie assoziierte SSR-Marker oder Phoma-Resistenz-QTL vorkommen, sind in der Abbildung mit der gleichen Farbe gekennzeichnet. Die Bezeichnungen der nummerierten SSR-Marker sind in Tabelle 12, Ergebnisse angegeben

Die in dieser Arbeit entwickelten SNP- bzw. SSR-Assays können nun in Resistenzzüchtungsprogrammen genutzt werden, um Genotypen mit vorteilhaften Allelkombinationen bzgl. Phoma-Resistenz zu identifizieren. Dies sollte zum einen zu einer Zeitersparnis und zum anderen zu einer Reduktion der benötigten Feldprüfungen führen. Somit kann bei reduziertem Aufwand weiterhin ein Zuchtfortschritt in Bezug auf Phoma-Resistenz erzielt werden. Zusätzlich können die Marker dazu genutzt werden, genetische Ressourcen auf das Vorhandensein neuer, im vorhandenen Zuchtmaterial nicht vorhandener Allele zu prüfen und vorteilhaftere Allele zu identifizieren. Diese können anschließend in das aktuelle Zuchtmaterial integriert werden. Somit werden die Marker künftig nicht allein zur markergestützten Selektion, sondern auch für eine effizientere Identifizierung und Nutzung von züchterisch wertvollen genetischen Ressourcen im Sinne eines nachhaltigen Rapsanbaus verwendet werden.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Detektion und Nutzung von genetischer Diversität in resistenzgenanalogen Sequenzen (RGA) und Resistenzgenkandidaten (RGC) für Assoziationsstudien bzgl. Resistenz gegenüber *Leptosphaeria maculans* (anamorph *Phoma lingam*), dem Erreger der Phoma-Wurzelhals- und Stängelfäule beim Raps (*Brassica napus* ssp. *napus* L.). Diese Pilzkrankung stellt weltweit eine der wichtigsten Krankheiten beim Raps dar. Der Pilz befällt nicht nur Stängel und Wurzeln, sondern auch Blätter, Kotyledonen und Schoten. Eine quantitative Resistenz bezüglich *L. maculans*-Resistenz ist im aktuellen Zuchtmaterial in einer breiten Variation vorhanden, jedoch ist diese nicht näher charakterisiert. Für eine praktische Nutzung dieser quantitativen Resistenz ist die Entwicklung von effektiven Selektionsmarkern erwünscht.

In einem genomweiten Ansatz wurden RGA-Sequenzen mit Hilfe degenerierter Primer für Resistenzgenmotive (NBS, TIR, LRR) amplifiziert und sequenziert, um Locus-spezifische Primer für einzelne RGA-Loci abzuleiten. Darüber hinaus standen eine Reihe von exprimierten Sequenzen (ESTs), die bei der Abwehrreaktion von *B. napus* nach Phoma-Befall eine deutliche Überexpression zeigten, als potentielle Resistenzgenkandidaten zur Verfügung. Alle RGA- und RGC-Sequenzen wurden mittels Sequenz-unabhängiger *Base-Excision-Sequence-Scanning* (BESS-T) zur Detektion von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in einem Sortiment (*Coreset*) aus 54 Genotypen genetisch diversen Winterölraps-Sorten mit breiter Variation in der Phoma-Resistenzreaktion gescreent. *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) sind die häufigste Form genomischer Variation und können als einfache genetische Marker für die Feststellung von Assoziationen zwischen der allelischen Form und dem Phänotyp genutzt werden. Sie stellen ein sehr nützliches Werkzeug für die Aufdeckung genetischer Diversität dar und bieten die Möglichkeit, in Sequenzen von Kandidatengen die allelische Variation direkt aufzudecken. Durch Allel-Merkmal-Assoziationsanalysen zwischen SNP-Loci bzw. Haplotypen und dem Resistenzverhalten der Genotypen gegenüber Phoma konnten in dieser Arbeit RGA- bzw. RGC-basierte Marker identifiziert werden, die eine für die markergestützte Züchtung potentiell nutzbare Assoziation mit Phoma-Resistenz

aufweisen. Einige der hier ermittelten Resistenzgenkandidaten stellen aussichtsreiche Ansatzpunkte für weitere Forschungsansätze dar, da sie in *B. napus* an unterschiedlichen Abwehrmechanismen, wie der hypersensitiven Reaktion oder der systemisch erworbenen Resistenz (*systemic acquired resistance*), beteiligt sein könnten.

Des Weiteren wurden auch zahlreiche Mikrosatelliten-Marker (*Single Sequence Repeats*, SSR) identifiziert, die ebenfalls eine signifikante Assoziation mit Phoma-Resistenz im Genotypen-*Coreset* sowie in unterschiedlichen Verifikationssets von aktuellem Zuchtmaterial zeigten. Viele dieser SSR-Allele wurden in *B. napus* bereits genetisch kartiert, so dass deren Genompositionen in Relation zu bekannten *quantitative trait loci* (QTL) für Phoma-Resistenz zum Teil verglichen werden konnten. Dabei zeigte sich, daß die Marker in einigen Fällen in Genomregionen vorkommen, in denen bereits signifikante Resistenz-QTL lokalisiert worden sind. Solche Marker sind daher ebenfalls aussichtsreiche Kandidaten für die Selektion auf Phoma-Resistenz und stehen nun für die markergestützte Erfassung allelischer Diversität für die Züchtung von Phoma-resistenten Zuchtlinien bzw. Rapssorten zur Verfügung.

7 Summary

The work described in this thesis aimed at detection and exploitation of genetic diversity in resistance gene candidate sequences associated with resistance to blackleg disease (*Leptosphaeria maculans*) in *Brassica napus*. Blackleg is one of the most important diseases of *B. napus* worldwide, with yield losses of up to 50% in epidemic years. The pathogen attacks leaves, stems, roots, cotyledons and pods of oilseed rape. A broad variation for *L. maculans* resistance is present in the *B. napus* gene pool, however due to the quantitative nature of the resistance it is difficult to develop effective selection markers. For practical breeding the development of effective selection markers is desirable.

In a genome-wide approach, resistance gene analogue (RGA) sequences were amplified in *B. napus* genotypes using degenerate primers for resistance gene motifs (TIR, NBS, LRR). In addition to these anonymous sequences, further primer combinations were developed using potential resistance gene candidates (RGCs) selected from publicly available ESTs derived from the *B. napus* defence reaction to inoculation with *L. maculans*. Allele-trait association studies were performed in a core set of 54 genetically diverse winter oilseed rape genotypes showing a broad spectrum of resistance/susceptibility to blackleg disease, and verified in independent breeding lines provided by participating breeding companies. Sequence-independent SNP-detection using specific primers was carried out via base-excision sequence scanning (BESS-T). SNPs are the most abundant form of genome variation. They can be used as simple genetic markers and are suitable for detection of associations between the allelic form and the phenotype. Therefore SNPs represent a powerful tool for fine genetic mapping, detection and exploitation of genetic diversity; in particular they offer the opportunity to uncover allelic variation directly within sequences of candidate genes. In this study SNP data were used for association studies with *L. maculans* resistance/susceptibility data from field and greenhouse tests. Cloning of RGA and RGC sequences with significant associations to resistance data allowed the development of locus-specific PCR primers for interesting genes that could potentially be involved in different pathogen defense mechanisms, including hypersensitive reactions or systemic acquired resistance.

In addition to the SNP data a set of 101 simple sequence repeat (SSR) markers were also screened for association to blackleg resistance. Numerous SSR markers were found to be significantly associated to blackleg resistance in the genotype corset, as well as in different verification sets provided by participating rapeseed breeders. Many of the trait-associated SSR markers have been localised previously in *B. napus* genetic maps, so that their positions in the genome could be compared with known quantitative trait loci (QTL) for blackleg resistance. In some cases the resistance-associated SSR markers were found to be located in genome regions containing significant resistance QTL, therefore they represent promising candidates for marker-assisted selection of blackleg resistance. The resistance-associated SNP and SSR markers are suitable for high-throughput marker assisted selection in order to broaden the gene pool of winter oilseed rape by integration of novel allelic diversity for resistance against blackleg disease.

8 Literaturverzeichnis

- Amelung D, Schulz RR, Daebler F (1996) Einfluß der Fruchtfolge auf Rapskrankheiten. Raps 14: 52-55
- Austin MJ, Muskett P, Kahn K, Feys BJ, Jones JD, Parker JE (2002) Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. Science 295: 2077– 80
- Azevedo C, Sadanandom A, Kitagawa K, Freialdenhoven A, Shirasu K, Schulze-Lefert P (2002) The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. Science 295: 2073– 76
- Badawy HMA, Hoppe HH, Koch E (1991) Differential reactions between the genus *Brassica* and aggressive single spore isolates of *Leptosphaeria maculans*. Journal of Phytopathology 131: 109-119
- Basunanda P, Spiller TH, Hasan M, Gehringer A, Schondelmaier J, Lühs W, Friedt W, Snowdon RJ (2007) Marker-assisted increase of genetic diversity in a double-low seed quality winter oilseed rape genetic background. Plant Breeding (in press)
- Baumgarten A, Cannon S, Spangler R, May G (2003) Genome-level evolution of resistance genes in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 165: 309-319
- Belkhadir Y, Subramanian R & Dangl JL (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. Curr. Opin. Plant. Biol. 7: 391-399
- Bohman, S., Forsberg, J., Glimelius, K. and Dixelius, C. (1999) Inheritance of Arabidopsis DNA in offspring from *Brassica napus* and *A. thaliana* somatic hybrids. Theor. Appl. Genet. 98: 99-106.
- Bohman S, Staal J, Thomma BP, Wang M, Dixelius C. 2004. Characterisation of an Arabidopsis-*Leptosphaeria maculans* pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. Plant J. 37: 9–20
- Bokor A, Barbetti MJ, Brown AGP, MacNish GC, Wood P (1975) Blackleg of rapeseed. J. Agric. Western Australia 16: 7-10

- Botella MA, Parker JE, Forst LN, Bittner-Eddy PD, Beynon JL, Daniels MJ, Holub EB, Jones JD (1998) Three genes of the Arabidopsis RPP1 complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *Plant Cell* 10: 1847–1860
- Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186
- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff HJ, Sandal NN, Marker KA, Klein-Lankhorst RM, Salentijn EMJ, Langa W, Stiekema WJ, Wyss U, Grundler FMW & Jung C (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275: 832-834
- Cargeeg, LA & Thurling, N (1980) Contribution of host-pathogen interactions to the expression of the blackleg disease of spring rape (*Brassica napus* L.) caused by *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. *Euphytica* 29: 465-476
- Cavell AC, Lydiate DJ, Parkin IAP, Dean C, Trick M (1998) Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome. *Genome* 41: 62–69
- Chen CY, Howlett BJ (1996) Rapid necrosis of guard cells is associated with the arrest of fungal growth in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) inoculated with avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48: 73–81
- Chèvre AM, Eber F, This P, Barret P, Tanguy X, Brun H, Delseny M & Renard M (1996) Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus*-*B. nigra* addition lines. *Plant Breed* 115: 113-118
- Chèvre AM, Barret P, Eber F, Dupuy P, Brun H, Tanguy X & Renard M (1997) Selection of stable *Brassica napus*-*B. juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1104-1111
- Christen O und Friedt W (2007) *Winterraps, das Handbuch für Profis*. DLG-Verlags GmbH Frankfurt (Main)
- Christianson JA, Rimmer SR, Good AG, Lydiate DJ (2006) Mapping genes for resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica juncea* *Genome* 49: 30-41
- Collins FS, Brooks LD & Chakravarti A (1998) A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 8: 1229-1231
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Rimmer JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, Small GW, Roses AD, Haines JL and

- Pericak-Vance MA (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genet.* 7: 180–184 (1994)
- Bundessortenamt (2006) Beschreibende Sortenliste "Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen und Hackfrüchte 2006". ISSN 0948-4167
- Cunningham GH (1927) Dry-rot of swedes and turnips: Its cause and control. New Zealand Department of Agriculture Bulletin, 133
- Dion Y, Gugel RK, Rakow G, Séguin-Swartz G & Landry BS (1995) RFLP mapping of resistance to the blackleg disease [causal agent, *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et de Not.] in canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 91: 1190-1194
- Dixelius C (1994) Presence of the pathogenesis-related proteins 2, Q and S in stressed *B. napus* and *B. nigra* plantlets. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44: 1–8.
- 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
- Evans IR (1988) Blackleg of canola. *Alberta Agriculture Agrifax, Agdex 149: 623-633*
- Ferreira ME, Rimmer SE, Williams PH & Osborn TC (1995) Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. *Phytopathology* 85: 213-217
- Feser M (1992) Die Integration chemischer Pflanzenschutzmaßnahmen gegen *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et Not. (Imperfektstadium *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm.), dem Erreger der Wurzelhals- und Stängelfäule an Winterraps. Diss. TU München-Weihenstephan
- Fitt BDL, Gladders P, Turner JA, Sutherland KG, Welham SL, Davies JM (1997) Prospects for developing a forecasting scheme to optimise use of fungicides for disease control on winter oilseed rape in the UK. *Aspects of Appl. Biol.* 48: 135-142
- Fitt B, Brun H, Barbetti M and Rimmer S (2006) World-wide importance of Phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 3-15
- Fourmann M, Charlot F, Froger N, Delourme R, Brunel D (2001) Expression, mapping, and genetic variability of *Brassica napus* disease resistance gene analogues. *Genome* 44: 1083-1099

- Fourmann M, Barret P, Froger N, Baron C, Charlot F, Delourme R, Brunel D (2002) From *Arabidopsis thaliana* to *Brassica napus*: development of amplified consensus genetic markers (ACGM) for construction of a gene map. *Theor. Appl. Genet.* 105:1196–1206
- Fray, M.J., Puangsomlee, P., Goodrich, J., Coupland, G., Evans, E.J., Arthur, A.E., and Lydiate, D.J. 1997. The genetics of stamenoid petal production in oilseed rape (*Brassica napus*) and equivalent variation in *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.* 94: 731–736
- Fristensky B, Balcerzak M, He D, Zhang P (1999) Expressed sequence tags from the defense response of *Brassica napus* to *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Plant Pathol.* Online: <http://www.bspp.org.uk/mppol/1999/0301/Fristensky>
- Garbe V (1996) Krankheiten im Raps – Was tun? *Raps* 14: 156-159
- Gassmann W, Hinsch ME and Staskawicz BJ (1999) The *Arabidopsis* RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J.* 20: 265–277.
- Gladders P & Musa TM (1979) The development of *Leptosphaeria maculans* in winter oilseed rape and its implication for disease control. *Br. Crop Protection Conf.– Pests and Diseases* 129-136
- Gladders, P & Symonds, BV (1995) Occurrence of canker (*Leptosphaeria maculans*) in winter rape in eastern England, 1977-1993. *IOBC/WPRS Bulletin* 18: 1-11
- Grant MR, McDowell JM, Sharpe AG, De Torres Zabala M, Lydiate DJ & Dangl JL (1998) Independent deletions of a pathogen-resistance gene in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 15843-15848
- Grist SA, Firgaira FA & Morley AA (1993) Dinucleotide repeat polymorphism isolated by the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 15: 304-309.
- Gugel RK, Petrie GA (1992) History, occurrence, impact and control of blackleg of rapeseed. *Can J Plant Pathol* 14:36-45
- Gupta PK & Varshney RK (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185
- Gur-Arie R, Cohen CJ Eitan, Y, Shelef L, Hallerman, EM and KashiY (2000) Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Res.* 10:62-71.

- Hahn C and Strittmatter G (1994) Pathogen-defense gene *prp7-7* from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase. *Eur. J. Biochem.* 226, 619-626
- Hammond K, Lewis B and Musa T (1985) A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.* 14: 36-45.
- Hammond K and Lewis B (1987) The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.* 36: 135-157
- Hawkins GA & Hoffmann LM (1997) Base excision sequence scanning. *Nat. Biotechnol.* 15: 803-804
- Heath MC (1980) Reaction of nonsusceptors to fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18: 211-236
- Heitefuß R, König K, Obst A und Reschke M (2000) Pflanzenkrankheiten und Schädlinge im Ackerbau. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, DLG-Verlag Frankfurt (Main)
- Hennin C, Höfte M and Diedrichsen E (2001) Functional expression of Cf9 and Avr9 genes in *Brassica napus* induces enhanced resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1075–1085
- Hoffmann GM und Schmutterer H (1999) Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen 2. erweiterte und ergänzte Auflage, Stuttgart, Ulmer
- Howlett B (2004) Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Plant Pathol.* 26, 245–252
- Hu Q, Hansen L, Laursen J, Dixelius C and Andersen S (2002) Intergenic hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding. *Theor. Appl. Genet.* 105: 834-840
- Hughes W (1933) A study of *Phoma lingam* (Tode) Desm. and of the dry-rot it causes, particularly in swede turnips. *Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society, N.S.* 29: 495-530
- Jannink JL, Bink MCAM & Janssen RC (2001) Using complex plant pedigrees to map valuable genes. *Trends Plant Sci.* 6: 337-342
- Johnson RD and Lewis BG (1994) Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.* 43: 269–277
- Jorde LB (2000) Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res.* 10: 1435-1444

- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M and Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080
- Kirchner HA (1974) Krankheiten und Schädlinge von Raps, Rüben und Senf. In: Klinkowski M., Mühle E, Reinmuth E und Bochow H (Hrsg.). *Phytopathologie und Pflanzenschutz, Band II, Krankheiten und Schädlinge landwirtschaftlicher Kulturpflanzen*. Akademie-Verlag, Berlin, 711 S.
- Kitagawa K, Hieter P (2001) Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 678– 87
- Krüger W (1979) Verbreitung der Wurzelhals- und Stängelfäule (verursacht durch *Phoma lingam*) bei Raps in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 31: 145-148
- Krüger W (1982) Die Wurzelhals- und Stängelfäule des Rapses, verursacht durch *Phoma lingam* (stat. Gen. *Leptosphaeria maculans*), eine schwer bekämpfbare Krankheit. *Z. PflKrankh. PflSchutz* 89: 498-507
- Kuang HS, Woo S, Meyers BC, Nevo and Michelmore RW (2004) Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. *Plant Cell* 16: 2870–2894
- Kuswinanti T, Koopmann B & Hoppe H-H (1999) Virulence patterns of aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* on an extended set of Brassica differentials. *Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 106: 12-20
- Kuswinanti T (1996) Die Population von *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. (teleomorph: *Leptosphaeria maculans* Desm.) Ces. et de Not), dem Erreger der Wurzelhals- und Stängelfäule an Rapses: Virulenzunterschiede auf einem erweiterten Testsortiments, Kreuzungstypen, Physiologische Eigenschaften und geographische Verbreitung. Diss. Uni Göttingen
- Lacosta L, Louvet J, Anselme C, Alabouvette C (1969) Role de *Phoma lingam* (Tode) Desm. Et de sa forme parfaite, *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. Dans les epidemies de necrose du collet de colza (*Brassica napus* L. var. oleifera Metzger). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie d'Agriculture de France* 55: 981-989

- Lagercrantz U, Lydiate D (1996) Comparative mapping in *Brassica*. Genetics 144:1903–1910
- Lagercrantz U, Putterill J, Coupland G and Lydiate DJ (1996) Comparative mapping in *Arabidopsis* and *Brassica*, fine scale genome collinearity and congruence of genes controlling flowering time. Plant J. 9: 13–20
- Lamb C and Dixon RA(1997) The oxidative burst in plant disease resistance. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48: 251–275
- Leister D (2004) Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. Trends Genet. 20:116-122.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R and Lamb C (1994) H2O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell 79: 583-593.
- Li CX & Cowling W (2003) Identification of a single dominant allele for resistance to blackleg in *Brassica napus* „Surpass 400“. Plant breeding 122: 485-488
- Li H, Sivasithamparam K and Barbetti MJ (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
- Li JZ, Sjakste TG, Röder MS & Ganai MW (2003) Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. Theor. Appl. Genet. 170: 1021-1027
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP. 2002. Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPRI/NIMI* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. Plant J. 30: 415– 29
- Lombard V & Delourme R (2001) A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations Theor. Appl. Genet. 104: 491-507
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K & Schubert I (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.103: 5224-5229
- Mayerhofer R, Bansal VK, Thiagarajah MR, Stringam GR & Good AG (1997) Molecular mapping of resistance to *Leptosphaeria maculans* in Australian cultivars of *Brassica napus*. Genome 40: 294-301

- Mayerhofer R, Wilde K, Mayerhofer M, Lydiate D, Bansal VK, Good AG and Parkin IAP (2005) Complexities of Chromosome Landing in a Highly Duplicated Genome: Toward Map-Based Cloning of a Gene Controlling Blackleg Resistance in *Brassica napus*. *Genetics* 171: 1977–1988
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D & Stein L (2002) Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.) *DNA Research* 9: 199-207
- McDowell JM, Dhandaydham M, Long TA, Aarts MG, Goff S, Holub EB, Dangl JL (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to evolution of Downy Mildew resistance at RPP8 locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1861–1874
- McGee DC & Emmett RW (1977) Blackleg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.)) Ces. et de Not. of rapeseed in Victoria: Crop losses and factors which affect disease severity. *Austr. Agric. Res.* 28: 47-51
- McKhann HI, Camilleri C, Berard A, Bataillon T, David JL, Reboud X, Le Corre V, Caloustian C, Gut IG, Brunel D (2004) Nested core collections maximizing genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 38:193–202
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW & Young ND (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal*. 20: 317-332
- Meyers BC, Morgante M & Michelmore RW (2002) TIR-X and TIR-NBS: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *The Plant Journal*. 32: 77-92
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H & Michelmore RW (2003) Genome-wide Analysis of NBS-LRR-Encoding Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, Vol. 15: 809-834
- Michelmore RW, Meyers BC (1998): Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res* 1998, 8:1113-1130.
- Mohler V, Klahr A, Wenzel G & Schwarz G (2002) A resistance gene analog useful for targeting disease resistance genes against different pathogens on group 1S chromosomes of barley, wheat and rye. *Theor Appl Genet* 105: 364–368
- Morgante M, Hanafer M & Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 30: 194-200

- Muskett PR, Kahn K, Austin MJ, Moisan LJ, Sadanandom A, et al. (2002) *Arabidopsis* RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *Plant Cell* 14: 979–92
- Ndimande, B (1976) Studies on *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. And dry rot on oilseed rape, *Brassica napus* (L.) var. *oleifera* Metzger. Thesis Agric. College of Sweden, Uppsala, Sweden
- Newmann MA, Conrads-Strauch J, Scofield G, Daniels MJ & Dow JM (1994) Defense-related gene induction in *Brassica campestris* in response to defined mutants of *Xanthomonas campestris* with altered pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 553-563
- Noel L, Moores TL, van der Biezen EA, Parniske M, Daniels MJ Parker JE and Jones JDG (1999) Pronounced intraspecific haplotype divergence at the RPP5 complex disease resistance locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2099–2111
- Osterberg MK, Lascoux M, Lagercrantz U (2002): Naturally occurring indel variation in the *Brassica nigra* COL1 gene is associated with variation in flowering time. *Genetics* 161:299-306
- Panaud O, Chen X & McCouch SR (1995) Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* 38: 1170-1176
- Parniske M, Hammond-Kosack KE, Golstein C, Thomas CM Jones DA, Harrison K, Wulff BBH and Jones JDG (1997) Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. *Cell* 91: 821–832.
- Parker JE, Coleman MJ, Szabò V, Frost LN, Schmidt R, van der Biezen E, Moores T, Dean C, Daniels MJ & Jones JDG (1997) The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell* 9: 879-894
- Parkin IA, Sharpe AG and Lydiat DJ (2003) Patterns of genome duplication within the *Brassica napus* genome. *Genome* 46: 291–303.
- Parkin IA, Gulden SM, Sharpe AG, Lukens L, Trick M, Osborn TC, Lydiat DJ (2005) Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 171: 765-781

- Paul VH (1988) Krankheiten und Schädlinge des Rapses. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer
- Peart JR, Lui R, Sadanandom A, Malcuit I, Moffett P, Brice DC, Schauser L, Jaggard DAW, Xiao S, Coleman MJ, Dow M, Jones JD, Shirasu K, Baulcombe DC (2002) The ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Acad Natl Sci U.S.A.* 99: 10865–10869
- Pedras MSC, Chumala PB & Suchy M (2003) Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptosphaeria maculans*: structures, syntheses and antifungal activity. *Phytochemistry* 64: 949-956
- Petrie GA (1993) Distribution of virulent blackleg on standing rapeseed/canola crops in Saskatchewan, 1982-1991. *Can. Plant Dis. Surv.* 73: 117-121
- Petrie GA (1979) Prevalence of a high virulent strain of *Leptosphaeria maculans* (Blackleg) in seed samples of rape and turnip rape produced on Western Canada in 1976 and 1977. *Can. J. Plant Sci.* 59: 899-901
- Pilet ML, Delourme R, Foisset N & Renard M (1998) Identification of loci to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et de Not., in Winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 96: 23-30
- Piquemal J, Cinquin E, Couton F, Rondeau C, Seignoret E, Doucet I, Perret D, Villeger MJ, Vincourt P & Blanchard P (2005) Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1514-1523
- Plieske J & Struss D (2001) STS markers to Phoma resistance genes of the *Brassica* B-genome revealed sequence homology between *Brassica nigra* and *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 102: 483-488
- Rafalski A (2002) Application of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 94– 100
- Rafalski A & Tingey SV (1993) Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends. Genet.* 9: 275-280
- Ramsay L, Macaulay M, Degli Ivanissevich S, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuveesson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmioli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W & Waugh R (2000) A Simple Sequence Repeat-Based Linkage Map of Barley *Genetics* 156: 1997-2005

- Rao MV, Koch JR, Davis KR (2000) Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Mol Biol* 44:346-358
- Rasmussen U, Bojsten K & Collinge DB (1992) Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* 20: 277-287
- Ravel C, Praud S, Canaguier A, Dufour P, Giancola S, Balfourier F, Chalhoub B, Brunel D, Linossier L, Dardevet M, Beckert M, Rousset M, Murigneux A, Charmet G (2004) DNA sequence polymorphism and their application in bread wheat. In: Vollmann J, Grausgruber H, Ruckebauer P (eds) Genetic variation for plant breeding. Eucarpia: Tulln, Austria, pp 177–181
- Richly E, Kurth J, Leister D: Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol Biol Evol* 2002, 19:76-84.
- Rygulla W, Snowdon RJ, Friedt W, Happstadius I, Cheung W, Chen D (2007) Identification and characterisation of quantitative trait loci related to *Verticillium* wilt resistance in *Brassica napus* L. *Phytopathology* (in press)
- Roetschi A, Azeddine S, Lassaâd B, Mauch F and Mauch-Mani B (2001) Characterization of an *Arabidopsis*-*Phytophthora* pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signaling. *Plant J.* 28: 293–305.
- Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE & Williamson VM (1998) The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 9750-9754
- Roussel S, Nicole M, Lopez F, Ricci P, Geige JP, Renard M and Brun H (1999) *Leptosphaeria maculans* and cryptogin induce similar vascular responses in tissues undergoing the hypersensitive reaction in *Brassica napus*. *Plant Sci*: 144, 17–28
- Roy NN (1984) Interspecific transfer of *Brassica juncea*-type high blackleg resistance to *Brassica napus*. *Euphytica* 33: 295-303
- Rygulla W, Friedt W, Seyis F, Lühs W, Eynck C, von Tiedemann A and Snowdon RJ (2007) Combination of resistance to *Verticillium longisporum* from zero erucic acid *Brassica oleracea* and oilseed *Brassica rapa* genotypes in resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines: *Plant Breeding*, Published online 10-Jul-2007

- Saal B, Brun H, Glais I, Struss D (2004) Identification of a Brassica juncea- derived recessive gene conferring resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. Plant breeding 123: 505-511
- Scheffler JA, Sharpe AG, Schmidt H, Sperling P, Parkin IAP, Lydiate, DJ and Heinz E (1997) Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication. Theor. Appl. Genet. 94: 583–591
- Schmid KJ, Sorensen TR, Stracke R, Torjek O, Altmann T, Mitchell-Olds T, Weisshaar B (2003) Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. Genome Res 13:1250–1257
- Schmidt R (2002) Plant genome evolution: lessons from comparative genomics at the DNA level. Plant Mol Biol 48: 21-37
- Schramm H (1989) Zur Epidemiologie von *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces et de Not: (Imperfektstadium *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm.), dem Erreger der Wurzelhals- und Stängelfäule an Winterraps als Grundlage eines integrierten Pflanzenschutzes. Diss. TU München-Weihenstephan
- Seidel D, Daebeler F, Amelung D, Engel KH und Lücke W (1984) Auftreten, Schadwirkung und Bekämpfung von *Phoma lingam* an Winterraps. Nachrichtenblatt Pflanzenschutz DDR 38: 120-123
- Sharopova N, McMullen MD, Schultz L, Schroeder S, Sanchez-Villeda H, Gardiner J, Bergstrom D, Houchins K, Melia-Hancock S, Musket T, Duru N, Polacco M, Edwards K, Ruff T, Register JC, Brouwer C, Thompson R, Velasco R, Chin E, Lee M, Woodman-Clickeman W, Long MJ, Liscum E, Cone K, Davis G & Coe EH (2002) Development and mapping of SSR markers for maize. Plant Mol Biol 48: 463-481
- Shirasu K, Lahaye T, Tan MW, Zhou F, Azevedo C, Schulze-Lefert P (1999) A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. Cell 99: 355– 66
- Sillito D, Parkin IA, Mayerhofer R, Lydiate DJ and Good AG (2000) *Arabidopsis thaliana*: a source of candidate disease resistance genes for *Brassica napus*. Genome 43: 452–460
- Snowdon RJ, Winter H, Diestel A and Sacristán MD (2000) Development and characterisation of *Brassica napus*-*Sinapis arvensis* addition lines exhibiting resistance to *Leptosphaeria maculans* Theor Appl Genet 101:1008–1014

- Snowdon R, Friedt W (2004) Review Molecular markers in Brassica oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding* 123: 1-8
- Somers DJ, Isaac P & Edwards K (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109: 1105-1114
- Staal J, Kaliff M, Bohman S, Dixelius C (2006) Transgressive segregation reveals two *Arabidopsis* TIR-NB-LRR resistance genes effective against *Leptosphaeria maculans*, causal agent of blackleg disease. *Plant J* 46: 218–230
- Storck M & Sacristán MD (1995) The role of phytoalexins in the seedling resistance to *Leptosphaeria maculans* in some crucifers. *Z. Naturforsch. C* 50: 15-20
- Struss D, Quiros CF, Plieske J & 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
- Tanhuanpää P, Vilkki J and Vihinen M (1998) Mapping and cloning of FAD2 gene to develop allele-specific PCR for oleic acid in spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp.oleifera). *Mol. Breeding* 4: 543–550
- Takahashi, A, Casais C, Ichimura K & Shirasu K (2003) HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 11777–11782
- Tenaillon MI, Sawkins MC, Long AD, Gaut LR, Doebley JF & Gaut BS (2001) Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 9161-9166
- Tör M, Gordon P, Cuzick A, Eulgem T, Sinapidou E, et al. 2002. *Arabidopsis* SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 14: 993– 1003
- Tornero P, Chao RA, Luthin WN, Goff SA, Dangl JL. 2002. Large-scale structure-function analysis of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *Plant Cell* 14: 435– 50
- Tóth G, Gáspári Z & Jurka J (2000) Analysis Microsatellites in Different eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Res.*10: 967-981
- U, N (1935). Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jap. J. Bot.* 7: 389-452

- Vogel, JP, Raab TK, Schiff C and Somerville SC (2002) PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: 14, 2095–2106
- West J, Kharbanda P, Barbetti M, Fitt B (2001) Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (Phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* 50: 10-27
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C & Baker B (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and interleukin-1 receptor. *Cell* 78: 1101-1115
- Williams PH (1992) Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 30-35
- Wretblad S, Bohman S & Dixelius C (2003) Overexpression of a *Brassica nigra* cDNA gives enhanced resistance to *Leptosphaeria maculans* in *B. napus*. *MPMI* Vol. 16/ 6: 477-484
- Yu F, Lydiate DJ, Rimmer SR (2005) Identification of two novel genes for blackleg resistance in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet* 110: 969-979
- Zeddies J (2006) in: I. Darnhofer, C. Walla und H.K. Wytrzens (Hrsg.). *Alternative Strategien für die Landwirtschaft*. Wien: Facultas, S. 123-134.
- Zhu YJ, Song QJ, Hyten DL, Van Tassell CP, Matukumalli Lk, Grimm DR, Hyatt SM, Fickus EW, Young ND & Cregan PB (2003) Single-Nucleotide Polymorphisms in Soybean. *Genetics* 163: 1123-1134
- Zhu H, Cannon SB, Young ND, Cook DR (2002): Phylogeny and genomic organization of the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene family in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact*, 15:529-539.

9 Anhang

Tab. A1: Resistenzdaten für das Jahr 2003 von den Standorten Einbeck, Seligenstadt, Lundsgaard, Kirchlengern und Levroux (Frankreich) mit jeweils einer Wiederholung (Wdh.) pro Standort; Bonitur von 1 (voll resistent) bis 9 (stark anfällig)

Wdh.	Einbeck		Seligenstadt		Lundsgaart		Kirchlengern		Lexroux	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
ID-02	1,40	1,15	6,40	4,90	3,28	4,08	2,60	3,28	1,50	1,60
ID-04	1,50	1,65	5,70	6,10	3,68	4,56	3,80	3,08	4,40	5,40
ID-05	5,00	4,40	8,10	8,70	3,96	4,28	4,20	3,88	3,70	3,50
ID-06	6,05	6,55	7,10	7,90	3,80	3,88	3,56	4,04	4,00	2,90
ID-12	3,05	2,85	6,10	6,60	3,24	3,36	2,88	3,80	2,90	1,70
ID-14	2,15	2,15	6,50	6,00	3,64	3,92	3,36	3,80	1,90	2,10
ID-15	2,15	2,50	6,90	7,00	3,60	4,00	4,68	4,28	6,80	5,40
ID-19	3,10	2,30	8,00	8,30	3,84	3,88	4,84	4,48	3,80	3,60
ID-20	4,35	6,10	7,90	7,80	3,68	3,76	5,36	4,56	4,00	3,10
ID-22	3,80	2,65	7,80	7,30	3,28	3,84	3,40	3,80	2,60	2,70
ID-24	1,85	2,70	6,30	7,00	3,08	3,20	2,48	4,24	3,40	2,00
ID-25	3,25	3,55	5,10	6,30	3,40	3,68	3,92	3,20	2,70	2,60
ID-26	1,95	2,75	6,90	7,50	2,60	3,80	5,20	4,96	2,90	2,20
ID-27	1,95	1,30	5,30	7,00	2,76	2,92	2,44	2,44	1,10	1,40
ID-28	3,40	2,75	7,10	6,00	2,96	3,80	3,56	3,64	3,30	2,10
ID-29	3,75	5,00	7,40	7,20	3,40	3,76	3,84	3,48	2,70	3,40
ID-30	3,05	4,65	7,10	6,30	2,92	3,04	3,16	2,84	3,90	0,60
ID-32	3,20	2,70	7,60	7,20	3,60	3,76	3,92	4,00	4,10	3,30
ID-33	2,60	2,30	6,60	6,80	3,32	3,40	3,92	3,12	4,80	5,20
ID-34	5,20	5,85	7,70	7,20	3,04	3,36	4,72	4,56	6,20	4,50
ID-35	3,10	3,80	7,50	7,50	3,36	3,48	5,16	3,44	3,90	3,40
ID-36	3,55	4,10	7,50	7,60	3,00	3,04	3,92	3,24	2,50	3,40
ID-37	3,15	3,35	7,10	6,70	2,88	3,24	3,36	3,56	4,40	3,70
ID-39	5,75	4,00	6,90	6,80	-	-	-	-	4,70	3,40
ID-41	3,30	3,15	6,40	6,10	3,28	3,92	3,68	3,16	3,30	2,90
ID-42	4,35	5,65	6,70	7,80	3,20	3,40	4,60	3,80	6,20	5,60
ID-44	-	-	6,70	6,80	3,56	3,92	4,44	3,20	1,40	0,90
ID-45	1,40	1,40	6,60	6,50	2,56	2,88	3,16	2,68	1,00	1,10
ID-46	7,35	6,25	6,40	6,10	-	-	-	-	-	-
ID-47	6,10	4,80	6,50	6,90	-	-	-	-	3,70	3,20
ID-49	3,60	2,60	7,30	7,30	3,24	3,48	3,40	2,96	3,80	3,00
ID-50	4,75	5,40	6,70	7,50	-	-	-	-	5,10	5,20
ID-51	3,75	3,30	6,40	7,60	3,16	3,32	4,36	3,88	5,20	5,20
ID-52	2,05	3,40	6,10	6,80	3,08	3,32	4,80	3,56	2,20	3,20
ID-53	3,55	3,20	7,20	7,60	3,16	3,36	5,64	3,92	2,60	3,10
ID-54	4,30	4,80	6,00	6,40	3,60	4,24	5,52	3,40	4,20	3,70
ID-55	3,25	3,75	6,60	6,90	2,32	3,64	5,32	4,04	3,30	2,50
ID-56	2,90	2,25	6,30	6,10	3,48	3,80	4,84	3,48	2,60	4,00
ID-57	3,10	2,55	7,10	7,10	3,04	3,24	5,16	3,12	1,90	2,10
ID-58	3,15	3,20	7,00	8,00	3,28	4,04	5,60	3,48	2,50	2,80
ID-59	3,30	4,60	7,80	7,30	3,12	3,56	4,84	3,60	3,10	4,40
ID-60	5,50	5,35	6,50	7,70	3,40	3,52	5,24	5,04	4,40	5,10
ID-61	2,90	3,55	6,50	7,20	2,80	3,44	4,04	3,24	3,20	4,20
ID-62	2,30	1,95	6,20	5,70	3,16	3,16	4,20	3,60	3,20	5,70
ID-64	1,80	1,35	6,70	5,90	3,08	3,36	2,96	3,00	1,20	0,80
ID-66	3,70	3,05	5,80	6,30	3,12	3,32	4,80	3,68	5,90	5,50
ID-67	4,25	3,00	6,90	7,40	3,20	3,76	3,44	3,88	4,00	3,60
ID-68	3,65	4,90	6,60	6,70	3,32	3,48	4,24	3,64	5,00	4,10
ID-69	1,85	2,50	5,80	6,50	3,40	3,64	3,64	2,80	2,30	2,70
ID-70	2,25	3,35	6,80	7,10	3,80	3,84	5,64	4,48	2,70	3,00
ID-71	2,45	2,05	6,50	6,40	3,48	3,84	3,84	3,08	1,20	1,40
ID-72	2,10	1,70	7,40	6,80	2,96	4,12	4,64	3,56	2,70	3,80
ID-79	5,00	4,05	6,60	7,80	3,44	3,60	3,40	3,60	1,80	1,20
ID-80	2,35	2,50	7,40	7,30	3,00	3,40	3,72	3,60	3,20	3,50

Tab. A2: Resistenzdaten für das Jahr 2004 an den Standorten Thüle, Levroux (Frankreich), Einbeck, Kirchlengern, Schwalheim, Teendorf und Lundsgaard mit jeweils einer Wiederholung (Wdh.) pro Genotyp. Bonitur von 1 (voll resistent) bis 9 (stark anfällig)

Wdh.	Thüle		Lexroux		Einbeck		Kirchlengern		Schwalheim		Teendorf		Lundsgaard	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
ID-2	2,05	1,65	1,24	1,24	1,00	1,00	2,6	3,24	3,21	3,25	0,72	0,56	2,88	4,45
ID-4	2,75	1,95	1,44	1,48	1,90	1,40	3,12	3	2,20	3,17	0,92	1,80	2,00	-
ID-5	3,40	2,25	2,52	1,48	2,30	1,40	4,08	3,76	2,58	3,35	2,44	0,76	2,20	3,71
ID-6	1,50	1,70	1,16	1,04	3,50	2,90	2,64	2,56	2,65	3,32	0,72	0,44	2,38	2,00
ID-12	2,45	1,75	1,80	1,44	4,20	3,50	4,00	2,64	3,10	4,00	2,60	1,00	4,00	3,11
ID-14	1,90	1,85	1,76	2,12	2,10	1,90	2,84	3,4	2,60	2,94	0,64	1,20	2,62	2,46
ID-15	3,05	1,95	1,44	2,40	3,90	3,40	4,00	4,08	2,95	3,20	1,00	2,16	2,00	3,47
ID-19	2,80	2,55	2,48	2,36	2,50	2,40	4,48	4,48	2,85	3,40	0,96	1,76	-	-
ID-20	3,75	2,75	3,24	3,20	2,30	1,80	4,92	6,16	4,10	4,60	3,92	3,44	5,22	5,00
ID-22	3,15	2,05	2,68	2,20	1,60	1,40	3,84	3,96	3,65	4,55	0,80	1,08	-	4,00
ID-24	2,55	2,25	1,24	1,72	2,00	1,84	3,84	5,00	3,47	3,47	0,84	0,58	-	-
ID-25	2,70	2,00	1,40	1,76	1,70	1,80	4,68	3,56	3,10	4,11	1,50	0,88	3,33	4,00
ID-26	1,75	1,85	1,48	1,80	1,30	1,40	4,12	4,52	3,80	4,50	1,36	0,46	4,29	4,80
ID-27	1,25	1,25	1,20	1,12	1,00	1,21	2,36	2,64	3,04	3,43	0,44	0,36	4,71	2,87
ID-28	2,20	1,85	1,32	1,88	1,90	1,70	4,4	5,12	3,10	3,80	1,23	1,32	3,50	3,43
ID-29	3,05	2,35	1,52	2,20	2,20	2,60	5,00	5,52	3,25	3,35	1,00	1,04	4,25	4,18
ID-30	1,75	1,55	1,12	1,24	1,70	1,60	3,72	3,32	3,30	3,50	0,88	0,76	3,50	2,00
ID-32	2,15	1,60	1,40	1,96	3,40	2,90	3,16	4,24	3,39	3,45	0,44	0,94	-	-
ID-33	2,55	1,90	2,52	2,24	3,30	2,10	3,28	3,84	3,16	3,55	1,52	1,32	5,43	3,00
ID-34	2,40	2,55	2,04	3,60	3,60	3,10	4,84	4,96	3,37	3,76	1,72	2,20	-	4,25
ID-35	3,05	2,45	2,16	2,44	1,63	2,00	4,88	3,96	3,10	3,39	1,88	2,92	4,00	3,33
ID-36	2,45	2,00	1,72	2,24	2,20	2,05	5,2	4,16	3,33	3,50	2,44	1,48	-	4,67
ID-37	2,20	1,80	1,44	2,72	1,90	1,70	5,04	4,52	3,25	3,32	1,88	2,20	3,00	3,80
ID-39	2,05	1,75	1,16	1,68	2,20	1,70	-	-	-	-	-	-	-	-
ID-41	2,55	2,25	1,88	2,72	2,20	1,50	5,40	3,24	3,20	3,82	2,16	2,52	4,50	4,50
ID-42	2,35	2,20	2,28	1,68	2,20	3,70	4,72	4,24	3,35	3,48	1,81	2,36	3,75	4,11
ID-44	1,50	1,50	1,60	1,32	1,30	1,40	3,52	3,44	2,58	2,70	1,40	1,04	3,00	7,00
ID-45	1,85	1,60	1,32	2,36	1,20	1,50	-	-	2,60	2,85	1,40	1,04	-	-
ID-46	3,15	2,40	2,88	1,80	4,40	3,10	-	-	-	-	-	-	-	-
ID-47	2,15	2,60	1,52	1,76	2,40	1,60	-	-	-	-	-	-	-	-
ID-49	2,50	2,15	1,60	2,60	1,74	1,50	4,36	4,28	3,00	3,47	0,76	1,68	2,50	-
ID-50	2,55	1,70	1,76	1,92	3,70	3,80	2,64	2,84	3,63	4,33	2,08	1,04	3,60	4,29
ID-51	1,90	1,80	1,64	2,24	2,50	1,80	3,68	2,88	2,95	3,47	0,72	0,88	5,43	-
ID-52	1,75	1,85	2,16	2,32	1,90	1,63	4,36	3,00	3,42	3,44	1,44	1,24	4,80	3,80
ID-53	2,50	2,00	1,76	2,08	2,30	2,20	4,88	5,00	2,86	3,80	1,68	2,32	4,00	4,00
ID-54	2,70	2,40	2,48	1,84	4,00	2,60	6,16	6,04	3,40	4,11	1,44	1,56	-	4,50
ID-55	2,20	2,30	1,60	2,04	2,90	2,00	4,88	5,68	3,50	3,52	1,96	0,44	3,00	3,43
ID-56	1,55	1,65	1,52	1,84	2,10	2,68	3,52	4,16	3,45	3,55	0,90	1,21	3,11	3,33
ID-57	1,75	1,90	1,28	1,96	2,30	1,40	4,00	2,84	2,95	3,38	0,96	0,92	4,22	3,92
ID-58	2,75	1,85	1,52	2,00	1,30	1,30	3,88	4,24	3,05	3,22	1,12	0,72	3,38	2,88
ID-59	2,55	2,15	1,60	2,36	2,10	2,30	4,12	4,04	3,48	3,74	1,27	1,60	4,10	3,67
ID-60	4,80	2,65	2,92	2,12	2,70	3,63	6,36	6,56	3,50	4,31	1,48	3,56	3,67	-
ID-61	2,95	2,15	2,04	1,80	1,60	1,20	4,24	4,48	3,47	3,50	0,73	1,84	6,38	-
ID-62	2,45	2,10	1,64	1,16	1,40	1,32	3,84	4,64	3,60	3,81	0,40	1,12	-	6,00
ID-64	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	1,42	3,40	3,80	3,53	3,63	0,24	0,88	3,15	4,00
ID-66	1,90	2,45	1,28	2,08	1,74	1,80	3,88	4,76	3,55	3,68	2,08	2,52	5,00	4,88
ID-67	1,50	1,80	1,80	2,36	2,60	1,90	3,28	3,36	3,17	3,24	2,56	1,64	-	2,00
ID-68	2,00	1,50	2,12	1,64	2,50	1,70	5,92	5,44	3,60	3,88	1,72	1,03	3,50	-
ID-69	1,50	1,55	1,60	1,96	1,60	1,70	3,56	3,52	2,76	3,05	0,76	0,84	3,50	2,00
ID-70	2,25	2,80	1,88	1,36	2,40	2,20	4,36	3,92	2,90	3,75	1,08	2,19	4,92	3,58
ID-71	1,60	1,25	1,36	2,84	1,30	1,20	3,00	3,56	2,85	3,28	0,72	1,28	3,00	3,25
ID-72	2,25	2,55	2,28	1,52	1,40	1,11	4,60	5,64	3,45	3,60	1,04	1,28	4,71	4,58
ID-79	1,65	1,60	1,12	1,32	1,70	1,11	3,64	3,76	3,05	3,11	1,08	1,04	4,00	3,60
ID-80	1,55	1,55	1,32	1,40	1,10	1,20	4,04	4,24	3,10	3,42	0,80	0,68	3,80	2,45

Tab. A3: Resistenzdaten aus Keimlingsversuchen: Die Genotypen wurden mit einem Gemisch unterschiedlicher *L. maculans*-Isolate in je vier Wiederholungen (Wdh.) behandelt. Bonitur von 1 (voll resistent) bis 9 (stark anfällig)

Genotyp	Anzahl Pflanzen				Bonitur			
	Wdh1	Wdh2	Wdh3	Wdh4	Wdh1	Wdh2	Wdh3	Wdh4
ID-02	23	23	22	24	6,7	7,1	5,8	7,0
ID-04	24	24	23	23	8,3	8,2	8,1	7,8
ID-05	24	24	22	23	5,9	7,1	7,4	7,6
ID-12	24	23	24	22	6,0	7,3	7,1	7,4
ID-14	24	24	24	24	5,2	5,7	6,0	4,1
ID-15	23	23	24	24	6,8	5,4	5,8	4,6
ID-19	19	22	17	21	4,3	3,5	4,6	5,1
ID-20	18	23	21	23	7,5	4,9	7,1	6,1
ID-22	23	23	24	24	5,4	4,4	7,0	5,9
ID-24	10	19	15	21	6,3	7,0	6,8	6,9
ID-25	21	23	19	22	7,2	8,0	8,1	8,2
ID-26	23	24	24	24	8,1	8,3	8,6	8,4
ID-27	18	24	19	24	7,4	6,9	7,9	7,4
ID-28	20	23	23	23	5,4	6,6	5,7	6,2
ID-29	23	24	23	23	5,8	6,3	6,3	6,0
ID-30	23	22	22	22	4,9	5,2	6,4	4,2
ID-32	22	24	22	23	8,0	7,8	7,6	7,3
ID-33	7	10	8	14	7,3	8,1	6,6	7,0
ID-34	12	19	20	22	6,9	7,7	7,4	7,0
ID-35	21	24	21	24	5,7	6,8	7,4	5,6
ID-36	23	24	24	22	5,6	5,3	6,3	4,4
ID-37	23	24	23	24	8,0	7,8	8,2	8,2
ID-41	9	18	10	15	5,1	8,1	7,9	8,0
ID-42	2	5	4	4	9,0	8,3	7,5	7,0
ID-45	24	21	23	22	7,1	6,8	7,7	5,6
ID-49	21	24	23	22	7,9	7,7	7,5	7,4
ID-50	18	23	21	21	5,0	7,4	4,2	6,1
ID-51	24	23	22	22	7,0	8,4	8,1	8,0
ID-52	14	15	16	14	6,4	7,7	6,5	7,2
ID-53	8	10	16	16	8,2	8,6	8,1	8,3
ID-54	21	24	20	23	6,8	7,2	6,4	5,6
ID-55	9	19	11	12	7,2	7,7	8,6	8,3
ID-56	14	21	18	20	4,4	7,5	4,8	6,0
ID-57	6	12	5	8	7,2	7,7	8,8	7,8
ID-58	3	8	6	6	8,5	8,3	7,7	7,7
ID-59	21	24	23	23	6,7	8,0	8,0	7,1
ID-60	16	19	15	18	6,7	7,5	6,3	6,8
ID-61	9	20	13	12	8,0	8,3	5,2	7,3
ID-62	19	22	20	22	7,3	7,9	7,9	7,1
ID-64	22	24	23	23	6,8	8,4	7,8	7,4
ID-66	20	23	22	22	4,8	7,7	6,3	6,6
ID-67	6	14	15	17	5	4,1	4,6	3,5
ID-68	18	24	15	24	5,3	8,2	7,9	6,3
ID-69	4	20	11	16	6,5	8,0	7,7	6,9
ID-70	8	24	7	20	7,6	8,6	6,7	7,6
ID-71	2	4	0	0	1,5	6,0	-	-
ID-72	21	22	19	22	7,2	8,2	8,0	8,1
ID-79	23	23	21	23	5,6	7,9	7,6	7,9
ID-80	23	23	23	23	6,1	8,6	8,0	8,2

Tab. A4: Resistenzdaten aus Gewächshausversuchen: Die Genotypen wurden mit einem Gemisch unterschiedlicher *L. maculans*-Isolate behandelt. Bonitur von 9 (voll resistent) bis 1 (stark anfällig)

<i>ID</i>	<i>Wdh 1</i>	<i>Wdh 2</i>	<i>ID</i>	<i>Wdh 1</i>	<i>Wdh 2</i>
ID-02	6,9	6,3	ID-44	5,8	5,6
ID-04	5,2	3,6	ID-45	5,1	5,2
ID-05	5	4,3	ID-46	1,3	1,1
ID-06	6,2	6,6	ID-47	4,3	4,6
ID-12	5,3	5,8	ID-49	5,1	4,8
ID-14	4,4	5,5	ID-50	5,4	5
ID-15	3,2	5,2	ID-51	5,9	5,3
ID-19	2,6	2,6	ID-53	5	3,8
ID-20	1,7	2,5	ID-54	3,9	3,2
ID-22	3,9	3,3	ID-55	6,1	5,5
ID-24	3,3	3,6	ID-56	5,8	4,8
ID-25	5,6	5,8	ID-57	5,9	5,7
ID-26	5,6	5,3	ID-58	5,9	5,4
ID-27	7,3	6,9	ID-59	4,9	4,3
ID-28	4,1	4,8	ID-60	2,3	1,8
ID-29	6,2	6,6	ID-61	4,7	4,7
ID-30	6,3	6,1	ID-62	5,1	4,9
ID-32	5,4	5,1	ID-64	6,1	6,2
ID-33	6,3	6,7	ID-66	5,1	4,2
ID-34	4,5	3,7	ID-67	6,7	5,1
ID-35	2,5	2,4	ID-68	5,5	4
ID-36	4,9	4	ID-69	3,7	3
ID-37	5,2	5,2	ID-70	5,4	4,6
ID-39	3,1	3,8	ID-71	4,3	5
ID-41	6,7	6	ID-72	4,5	4,7
ID-42	3,8	3,7	ID-79	5,8	5,4
ID-43	4,6	3,8	ID-80	6,7	6,2

Tab. A5: Resistenzdaten aus vier Verifikationssets der beteiligten Züchterunternehmen von insgesamt 127 Zuchtlinien, die zur Verifikation der Assoziationsstudien genutzt wurden.

*= Resistenzdaten, die im Gewächshaus ermittelt wurden, Bonitur von 9 (voll resistent) bis 1 (stark anfällig)

**= Resistenzdaten aus Feldversuchen, Bonitur von 1 (voll resistent) bis 9 (stark anfällig)

<i>NPZ- Zuchtlinie</i>	<i>Bonitur*</i>	<i>DSV- Zuchtlinie</i>	<i>Bonitur**</i>	<i>KWS- Zuchtlinie</i>	<i>Bonitur**</i>	<i>SW Seed- Zuchtlinie</i>	<i>Bonitur**</i>	<i>Raps GBR- Zuchtlinie</i>	<i>Bonitur**</i>
1	5.40	1	2.45	1	5.11	4003	3.68	3451	4.03
2	4.40	2	2.29	2	3.96	9801	2.92	3452	4.25
3	4.40	3	3.21	3	3.63	9802	3.14	3455	4.37
4	6.20	4	3.35	4	3.56	9803	2.61	3459	3.27
5	4.00	5	3.65	5	4.01	9804	2.06	3460	4.37
6	4.70	6	2.70	6	3.04	9805	2.31	3462	3.81
7	4.70	7	1.93	7	3.41	9806	2.62	3463	4.76
8	3.50	8	2.58	8	3.51	9807	3.12	3465	3.99
9	4.70	9	2.36	9	3.96	9808	2.61	3467	4.60
10	2.30	10	2.13	10	3.56	9809	2.45	3470	3.86
11	2.40	11	2.66	11	3.19	9810	3.19	3472	3.76
12	6.30	12	2.18	12	3.77	9811	2.24	3474	3.66
13	4.40	13	2.52	13	3.64	9812	3.07	3479	3.84
14	4.60	14	2.16	14	4.56	9813	2.16	3481	4.66
15	4.40	15	1.83	15	5.35	9814	2.86	3483	4.64
16	4.60	16	2.43	16	4.55	9815	2.49	3485	3.87
17	6.60	17	1.91	17	5.62	9816	2.75	3486	4.88
18	7.20	18	2.23	18	4.81	9817	2.32	3490	4.39
19	4.05	19	2.42	19	4.22	9818	3.35	3497	4.24
20	5.21	20	1.96	20	6.49	9819	3.45	3499	4.30
21	6.84	21	1.42	21	4.88	9820	3.10		
22	6.64	22	1.61	22	5.47	9821	3.22		
23	6.45	23	1.51	23	4.56	9822	3.52		
24	5.30	24	1.33	24	3.89	9823	3.21		
25	5.40	25	3.00	25	3.72	9824	2.85		
26	5.49	26	2.95	26	4.42	9825	2.14		
27	5.06	27	2.72	27	3.30	9826	2.72		
28	4.54	28	2.41	28	3.11	9827	3.00		
29	5.06	29	2.11	29	4.49	9828	2.82		
30	4.75	30	4.35	30	3.43	9829	3.00		
31	5.57	31	2.50	31	4.05	9830	1.87		
32	3.82	32	2.26	32	3.10	9831	3.63		
33	3.62	33	2.39	33	3.79	9832	2.58		
34	3.93	34	2.25	34	5.24	9833	3.24		
35	4.96	35	2.34	35	3.75	9834	3.19		
36	5.16	36	1.88	36	4.18	9835	3.13		
37	1.19	37	2.05	37	4.16	9836	2.66		
38	1.83	38	2.08	38	3.83	9837	2.47		
39	6.37	39	2.77	39	3.84	9838	2.98		
40	3.65	40	3.09	40	3.15	9839	2.70		
41	4.04	41	2.87	41	4.50	9840	2.65		
42	3.78	42	2.56	42	3.33	9841	3.47		
43	1.83	43	2.75	43	3.63	9842	1.99		
44	2.61	44	2.82	44	3.91	9843	2.18		
45	4.81	45	2.38	45	3.77	9844	2.78		
46	4.69	46	2.59	46	4.48	9845	2.84		
47	4.69	47	2.89	47	3.67	9846	2.20		
48	5.46	48	2.47	48	2.96	9847	3.55		
49	5.07	49	2.32			9848	2.38		
50	3.13	50	2.63						

Tab. A6: PCR-Primersequenzen und Reaktionsbedingungen zur Amplifikation von RGCs, die Homologien zu Genen mit Resistenzfunktionen aufweisen. (T_{an} : Annealingtemperatur (°C), Mg: Magnesiumkonzentration (mM) im PCR-Ansatz; * nach FRISTENSKY *et al.* 1999)

<i>Sequenz</i>	<i>Stärkste Homologie*</i>	<i>forward-Sequenz 5'-3'</i>	<i>reverse-Sequenz 5'-3'</i>	<i>T_{an}</i>	<i>Mg</i>	<i>Bezeichnung</i>
DH26-20-T3	Blattrost Resistenzkinase Lr10	CTACTTCGCCATGGAG CTAGTACGAG	GGTAAGGTACCCAGCG AGAAGCACG	60	2,5	RGC2
DH26-20-T7	Blattrost Resistenzkinase Lr10	GAAGCGGCGAGGGTT GGGG	GAAAGAGACATCGAAA ATGCATAC	50	2,5	RGC3
DH26-23-T7	Mehttau Resistenz-protein RPP5	CATCGAAAACGGACG GAAAATATTAATATAG	GAAGTTTGATTTTTCTC TTTTGGGTTTTATTAG G	55	3,0	RGC16
DH26-24	Mehttau Resistenz-protein RPP5	CTTTCTTCAAACCTCTC TTTTGCTCTATC	GAAGTTTGATTTTTCTC TTTTGGG	50	2,5	
MB61-10D	LRR- enthaltendes extrazelluläres Glycoprotein	GAGAGAGAGAGAGAG AGAGAG	CCAAGCTGAGGAGATT TTAAGG	50	2,5	

Tab. A7: Primer zur Amplifikation von RGCs, die Homologien zu Genen mit Abwehrfunktionen aufweisen. (T_{an} : Annealingtemperatur ($^{\circ}C$), Mg: Magnesiumkonzentration (mM) im PCR-Ansatz; * nach FRISTENSKY *et al.* 1999)

<i>Sequenz</i>	<i>Stärkste Homologie*</i>	<i>forward-Sequenz 5'-3'</i>	<i>reverse-Sequenz 5'-3'</i>	<i>Tan</i>	<i>Mg</i>	<i>Bezeichnung</i>
DH26-2-T3	Polygalakturonase Inhibitor	GGAGTTCTATCTTCATG GGTTGG	GGACCAGAGAGAGAGT TTCGAG	55	2,0	RGC1
MB46-57	unspezifisches Lipid Transferprotein	GGACCAATTGTGGCATT ACTAAAAATC	GGATATTAAGTAAGT AAATAACACAATGG	55	2,5	RGC4
DH27-11	Phenylalanin Ammonialyase	GTGATCCGTTACGCACC AAGTCCATC	CTTGGCGACTTGAGAG ACTGTGTTT	60	3,5	RGC5
MB56-1G	Gen für hypersensitive Antwort	CGGATCCGGAACCCTAA CCGCCGC	GCAAGGAAAAACTATT TTATTTACATGGAACC	55	2,5	RGC8
MB58-5G	Pathogenesis-verwandtes Protein	CTACGCCGACCGACTAA GAGG	GTAAACACGTCCACAT AATTGCAC	55	2,5	RGC9
MB59-6D	unspezifisches Lipid Transferprotein	GGACCAATTGTGGCATT ACTAAAAATC	GGACAAAAACAGTAATT TATTGGATTTATT	55	2,5	RGC10
MB72-6D	Pathogenesis-verwandtes Protein	CAGTCCACAAAACACTA TGTAACGC	CAACATAATTTTCCCCG AGGATC	50	2,5	RGC13
DH26-2-T7	Polygalakturo-nase Inhibitor	GGAGTCATACCTCAGAG TTTAGG	GATGGAAACAGAAGTA TACAAGTAG	55	2,5	
MB46-29	PR3 Endochitinase Klasse IV	GGGAGCCGTCTCTAAGC GTG	GGTTCAACAGGGGTAA TTAAGG	55	3,5	
MB56-2E	Beta-1,3-Glukanase	GCGATCTCCTCTGCTCGT G	CAAGAAGTCTCTCCAA GGAG	50	2,5	
MB57-7G	Pathogenesis-verwandtes Protein	CTTGCAACTATGATCCTC GGG	GTACCATTGATATTTAT TTATTTTAAATATTG	50	3,0	
MB58-1G	Pathogenesis-verwandtes Protein	CAACATGTGTCAGAAAT GTTTCAACGC	GACCGTCTTCGCCGCT TGACACC	47	2,5	
MB59-12D	Pathogenesis-verwandtes Protein	GCTTGGAAATAGCACTT ATAAAATACG	GGTACGGTAATTAGTA ACCATGG	50	2,0	
MB59-1C	Beta-1,3-Glukanase	GGAAAGCTATAGAGAAT TATATATT	AATTAACCACTCTCCT TATATATA	45	2,5	
MB61-11H	Beta-1,3-Glukanase	GTTAGCATCATCACCAA TGTTGC	GGGGACGGGAGGATAA GTGTC	50	2,5	
MB72-6G	Beta-1,3-Glukanase	CTTTCTCCAACCGTTAT AGG	GGAGAAAACATCCCCC AGTAATT	50	2,5	
MB72-7F	Beta-1,3-Glukanase	CCTACTACTAAACAGCT TAAATATG	CATTCAATTATTGAAACA TACGAAG	50	2,5	
MB73-1E	Beta-1,3-Glukanase	CAGGGGGACTTTCTCTT CC	CCAACCGTTTCCGACAC CA	50	2,5	
MB74-4A	Chia1, Chitinase Klasse II	GCTACCACAATCACGCG TTTGG	CCCAAAAGCGCTTTTGA AAGCTAATCACT	55	3,0	

Tab. A8: Primer zur Amplifikation von RGCs, die Homologien zu Genen mit Stressfunktionen aufweisen. (T_{an} : Annealingtemperatur ($^{\circ}C$), Mg: Magnesiumkonzentration (mM) im PCR-Ansatz; * nach FRISTENSKY *et al.* 1999)

Sequenz	Stärkste Homologie*	forward-Sequenz 5'-3'	reverse-Sequenz 5'-3'	Tan	Mg	Bezeichnung
MB41-20	Glutathion S-Transferase	CCACCAAGAACTCTTCAC CG	GAAGAGCTTGAAGATTA GATAG	50	2,5	RGC6
MB46-4	Glutathion S-Transferase	GTTGAGCAATGGCTCGAC G	GGGAGGCATAACAGTTC C	50	2,5	RGC7
MB67-5G	Hitzeschockprotein HSP81-3	GAGCAAGAAGGCTGTG AGAACTCTCC	CAACATCCTGGGGATCC GGTTCC	60	2,5	RGC11
MB70-10C	Metallothionein-ähnliches Protein	CAAAAATACAACATATTT AAATC	CTTAATTAGGTTACAAAT GG	45	2,0	RGC12
MB73-12G	Ethylen und SA-induziertes Protein	GAGGTGCTGACCTCGCC TCCG	CCGCTCTGAAGATACC GGAACC	60	2,0	RGC14
MB74-12D	pEARLI 1	ATTGTGGTTGACGCCAA T	TTGCAGAGGAAACTGTT TGTTG	50	2,5	RGC15
MB47-17	Glutathion S-Transferase	GGCTTGACCACAGACCA AGCCG	GGGGGTTTAAAAGGGTT AGGATAG	55	2,5	
MB47-37	Metallothionein-ähnliches Protein	CACACACACACAAGAAA AGAACTC	GTATTAGGAGGGATAAG GGGACC	55	2,0	
MB56-5A	ABC Transporter-ähnlich	GAGAGAGCAAGGAGTTA CAG	CCCAGATGAGTCCTTCA AGAC	50	2,5	
MB57-3G	Hitzeschockprotein SB100	CGGATACGCGAGTGAGA GACTTCC	CTTCAACACCACTACTCA GCCAGC	60	2,5	
MB58-11F	Kälteakklimation-spezifisches Protein	CTCGTTCTTCTCTACCA CAATGCAG	CATGCAGAGAGACAACC ACCTAAGTG	60	2,5	
MB58-4B	Glutathion S-Transferase	CAAAGAGTTTCTTTTGTA ATAAAA	ACATCAAGGACCGGGG	45	2,5	
MB59-7G	Betain-Aldehyd Dehydrogenase	GCGACGGCAGCTCTTCAT	ACAGTTTACCCATTGG CA	45	2,5	
MB67-8F	Katalase	CACCCATGACATCTCCAA CC	GCCGCAGGATCCATTGT CTG	55	2,5	
MB68-2A	wali7, induced by aluminium	GAGAGAGCACTAGTCTC GGAG	CAAGCACTTTTAGCAAC TCAATATC	55	3,0	
MB68-4G	Monodehydroascorbat Reduktase	GAGAAGGGTCGAGCATG TTGACC	CCACAGTCAATATAAAA TCACATTATC	55	3,0	
MB69-3C	Metallothionein-ähnliches Protein	CTTCATTAAGACAAGTTA ATAACTTTC	GATCTTCATTTGCAGGGC AAGGG	50	2,5	
MB69-3F	pEARLI 1	CTTTTGAGAAAAGAGAAT GGC	CAAAACCAGACGGAAC TC	45	2,5	
MB72-5E	wali7, induced by aluminium	GTCCGATATCTAACAGAA AAAG	CCTTAACCTTTCTGGTT CAGG	50	2,5	
MB72-7B	Katalase	GACAGATACAGATCATG GGC	GTCCCAATTATTATTTTC ATTG	45	2,5	
MB74-8A	durch Wasserstress induziertes Protein	CACCCATAAAAGAGTGA TTAAATTTAATAG	GATACCAAAAGGAAGAC AGATGCACC	55	2,5	
MB75-2C	Glutathion S-Transferase	CCAAGTGTGACCGCAGGT TT	CCAAGTCAGCCAAGCTC AAG	55	3,0	

Tab. A9: Primer zur Amplifikation von RGAs (T_{an} : Annealingtemperatur (°C), Mg: Magnesiumkonzentration (mM) im PCR-Ansatz)

<i>Sequenz</i>	<i>forward-Sequenz 5'-3'</i>	<i>reverse-Sequenz 5'-3'</i>	<i>Tan</i>	<i>Mg</i>	<i>Bezeichnung</i>
RGA1.3/2	GGGGGGATGGGGAAGACGAC	GAGGGCGAGGGGGGGGCC	60	2,0	
RGA1.6/7	GGTCACCCTTCAAGCTATCATA GC	GGAGTTAGGCCTTCGACGAG	55	2,0	RGA15
RGA2.6/7	GCAAGATTGACATTTTCACCT TCAAG	GGGGTTTTCATAGTCATTTGG G	55	2,0	
RGA4.6/7	GGAAAGGAGTTTAATTAATGA	CGATCATGTGCATCGTCTACT	55	2,5	RGA14
RGA5.6/7	GGTCACCCTTCAAGCTATCATA GC	CCAGGTCCTATATTAGCTCTA TAAAG	55	2,0	
Fou_RGA1	GTGGGGAAGACGACCCTCTTA	GAGAAATTCGGATCCTTCTT	55	2,5	RGA4
Fou_RGA2	GGTGGGGAAGACGACAATTCT	GCTGGAGGATCTTTGGATCA T	55	2,5	RGA3
Fou_RGA4	CTTTTGACATTGTGGTTTGGGA	GCAAGCTCTGGTATCTTTGG A	50	2,0	RGA16
Fou_RGA3	GTGGGGAAGACGACCCTCTTA	GGGAATATCTGGATGCCCT T	50	2,5	
Fou_RGA5	GGGAAGACGACACTTCTCACG	CTCAGCGACTTGTCTTGCGA	50	2,5	
Fou_RGA 6	CTGCTCACACAGATCACCAAT	CGGCATTCCTAGCGACTTTT	50	2,0	RGA1
Fou_RGA7	GGTGGGGAAGACGACACTTCT	GTTTTGCTAGCTCGAGGATCT	55	2,5	
Fou_RGA8	GGCGGTTCAGGAAAAGACA	GAGGAAGCATGACTTGATGT G	55	2,0	
Fou_RGA9	CAGATCAGCAAAAGGTTTCG	GAAGGATTCGGTCTTCCATG	50	2,0	RGA2
Fou_RGA1 2	GGGCGGTTTCAGGAAAACTA	CTCCAACCTTCTTTCAAACG	50	2,5	
Fou_RGA1 4	CACTGGCAAGAAAAGTTTCA	GTTTAAGCATCTCCATGCCG A	50	2,5	
Fou_RGA1 0	GGTTGAGAAGATTCGAGCTGA	GCATGACTTGATCTGGTCAC C	50	2,5	RGA5
Fou_RGA1 1	CAACACAGGATTGGCAACAA	CCTTCACGTCATAAAATCC G	50	2,5	RGA6
Fou_RGA1 3	GTGTGTATGAGCGAAACTTGG	CCATGTACTTGCCATGTTGT	50	2,5	RGA7
Fou_RGA1 5	CAAGCCATCAGTGATCTCGAA	CTTCCCAGACATCATCAAGC A	50	2,5	RGA8
RGA3.6/7	GTGTTCACTCTTCAAGTTGTCAT AGC	GAAGTTAGGCCTCCGCG	50	2,0	RGA13
Fou_RGA1 7	GGGAAGACGACCCTCTTAGGT	CGAATCCTTTAGTCGGACTTC	55	3,0	RGA9
Fou_RGA1 8	CTCTTCTTGACCAACTCAGCA	CATGGCATTTTCTGCCACT	50	2,5	RGA10
Fou_RGA2 0	GGGAAGACGACTCTTCTCACA	GCAACTTTTCTTGCAAGTTCG	50	2,5	RGA11
Fou_RGA2 1	GGGGGGGTTGGGAAAACTA	CAACGCTAGTGGAAACCCAT A	55	2,5	
Fou_RGA2 4	TGGAGAGAGAGATAAAGAAGC	CGATAACTTCAGAAACTCAT G	50	3,0	RGA12
FouRGA25	GGTGGGGTTGGGAAAACTACA	CAACGCTAGTGGGAGACCAT	55	3,0	
FouRGA27	GGGAAGACTACAATCGCAAGA	CGTGTGCAACTTAAGAAGC	50	2,5	

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: die vorgelegte Dissertation habe ich selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Giessen, den 30. November 2007

Danksagung

Bei Herrn Prof. Wolfgang Friedt möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Promotionsthemas bedanken, sowie für die Möglichkeit, am Institut für Pflanzenbau- und Pflanzenzüchtung I in Gießen arbeiten zu können.

Herrn Prof. Karl-Heinz Kogel als zweiten Gutachter danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

Für die wissenschaftliche und persönliche Betreuung dieser Arbeit möchte ich mich bei Dr. Rodney John Snowdon bedanken, der mich mit seiner engagierten Betreuung, Hilfsbereitschaft und vertrauensvollen Art bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit bestens begleitete.

Den Pflanzenzuchtunternehmen Deutsche Saatveredelung AG (Lippstadt-Bremen), KWS Saat AG (Einbeck), Raps GbR (Grundhof), Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG (Hohenlieth), SW Seed GmbH (Hadmersleben) und dem Saaten Union Resistenzlabor (Leopoldshöhe) danke ich für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials, die Durchführung der Feldversuche, die Bereitstellung der erhobenen Resistenzdaten bzw. die Daten-Erfassung bezüglich der SSR-Marker.

Weiterhin möchte ich mich bei Bashir Hosseini bedanken, der mich für kurze Zeit beim „Kampf mit den BESS-T-Arbeiten am Licor“ unterstützte.

In Fragen zur statistischen Auswertung der Daten unterstützte mich Dr. Jörn Pons-Kühnemann vom hiesigen Lehrstuhl für Biometrie und Populationsgenetik.

Meinen Bürokollegen und Freunden möchte ich für angeregte und anregende Diskussionen, fachliche Auseinandersetzungen, aufbauende Worte und regelmäßige Ablenkung danke sagen. Ganz besonders und von Herzen: „Danki Anki“.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich von ganzem Herzen für ihre Liebe, ihre Unterstützung, ihre Geduld und vor allem für ihren Glauben an mich.

Lebenslauf

Name: Katrin Link
Geburtsdatum: 03. Oktober 1974
Geburtsort: Leverkusen
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981 - 1987 Peter-Petersen-Grundschule, Köln
1987 - 1991 Realschule am Stadtpark, Leverkusen
1991 - 1995 Landrat-Lucas-Gymnasium, Leverkusen

Freiwilliges Ökologisches Jahr

1995 - 1996 Umweltzentrum Oldenburger Münsterland, Cloppenburg

Hochschulbildung

1996 - 1999 Studium der Biologie, Universität zu Köln
1999 - 2003 Studium der Biologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

Berufliche Erfahrungen

seit Mai 2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbau & Pflanzenzüchtung I der Justus-Liebig-Universität, Gießen