



Monique Juergens

Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz

Genetische Analyse und Kartierung einer
Turnip yellows virus (TuYV)-Resistenz
in Winterraps (*Brassica napus* L.)



Kontakt:

Monique Juergens
Auenbüttel 2
25724 Schmedeswurth

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.jki.bund.de Bereich Veröffentlichungen.

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-930037-50-6

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2009.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

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

**Genetische Analyse und Kartierung einer *Turnip yellows virus*
(TuYV)-Resistenz in Winterraps (*Brassica napus* L.)**

**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
Monique Juergens
aus Paderborn

Giessen 2008

Vorsitzender: Prof. Dr. Günter Leithold
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt
2. Gutachter: PD Dr. Frank Ordon
Prüfer: Prof. Dr. Sylvia Schnell
Prüfer: Prof. Dr. Bernd Honermeier

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Einleitung	5
1 Literaturübersicht	6
1.1 Turnip yellows virus	6
1.1.1 Taxonomische Einordnung	6
1.1.2 Wirtspflanzen und Infektionskreislauf des TuYV.....	7
1.1.3 Differenzierung zwischen BWYV und TuYV	8
1.1.4 Vorkommen des TuYV	9
1.1.5 TuYV-Symptome.....	10
1.1.6 Durch TuYV verursachte Ertragsverluste	11
1.2 Erbliche Virusresistenz.....	12
1.2.1 TuYV-Resistenz in Raps	12
1.2.2 Resistenz gegen Poleroviren	13
1.3 Die Kulturpflanze Raps	15
1.3.1 Entstehung und Herkunft	15
1.3.2 Resynthese-Raps	17
1.3.3 Bedeutung und Verwendung von Raps	20
1.4 Markergestützte Selektion.....	22
1.4.1 Simple Sequence Repeats (SSRs)	23
1.4.2 Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs)	23
1.4.3 Sequence Tagged Sites (STS) und Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)	24
1.4.4 Markergestützte Selektion in der Rapszüchtung	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Phänotypisierung	26
2.1.1 Pflanzenmaterial	26
2.1.2 Aussaat.....	26
2.1.3 Virus-Übertragung.....	27
2.1.4 Probenahme	28
2.1.5 Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) 29	
2.1.6 Nachweis der Resistenzreaktion der DH-Linien mittels DAS-ELISA.....	30
2.2 Identifizierung polymorpher SSRs und Entwicklung molekularer Marker	31
2.2.1 DNA-Extraktion	31
2.2.2 Identifizierung polymorpher SSRs und AFLPs.....	31
2.2.3 Entwicklung von Sequence Tagged Sites (STS)	33
2.2.4 Datenbankvergleich	39
2.2.5 Kartierung	39
2.2.6 Statistische Auswertung.....	39

3	Ergebnisse.....	40
3.1	Phänotypisierung der DH-Linien	40
3.1.1	Betrachtung der Ergebnisse der verschiedenen Versuchsjahre	43
3.2	Entwicklung molekularer Marker	45
3.2.1	Identifizierung polymorpher SSRs und AFLPs.....	45
3.2.2	Entwicklung von Sequence Tagged Sites (STS)	49
3.2.3	Entwicklung von CAPS-Markern	51
3.2.4	Datenbankvergleich	52
3.2.5	Kartierung	53
4	Diskussion	55
4.1	Genetische Analyse der TuYV-Resistenz.....	55
4.1.1	Resistenzmechanismus	58
4.1.2	Betrachtung der Ergebnisse der verschiedenen Versuchsjahre	61
4.2	Entwicklung molekularer Marker und Kartierung	62
4.3	Markergestützte Selektion.....	64
5	Zusammenfassung	66
6	Abstract.....	67
7	Literaturverzeichnis.....	69
8	Abbildungsverzeichnis	84
9	Tabellenverzeichnis	85
10	Anhang	86
10.1	Agrotechnische Maßnahmen, 2003 bis 2007	86
10.2	DAS-ELISA	87
10.3	TBIA – Tissue Blot Immuno Assay	90
10.4	Arbeitsvorschrift DNA-Extraktion	92
10.5	Protokolle SSRs.....	94
10.6	Protokolle AFLPs	96
10.7	Puffer für ALFexpress	99
10.8	Puffer für LI-COR.....	100
10.9	Protokoll Polyacrylamidgel mit Silberfärbung	102
10.10	Puffer für die Herstellung kompetenter Zellen	106
10.11	Alkalische Lyse	107
10.12	Verwendete Puffer für Agarose-Gel-Elektrophorese	109

Einleitung

Turnip yellows virus (TuYV) gehört zur Gruppe der *Poleroviren* in der Familie der *Luteoviridae* und wird persistent durch Blattläuse übertragen. Es ist weltweit verbreitet und stellt aufgrund erheblicher Ertragsverluste, die nach künstlicher Inokulation mit dem Virus durchaus im Bereich von 12-34 % liegen können, ein bedeutendes Pathogen im Rapsanbau dar. Insbesondere vor dem Hintergrund steigender Durchschnittstemperaturen in Verbindung mit milden Wintern und somit einem vermehrten Auftreten der Virusvektoren, gewinnt das TuYV an Bedeutung, und somit auch die Resistenz gegen dieses Virus. Dies gilt insbesondere im Rahmen einer umweltverträglichen Rapsproduktion, da resistente Sorten durch den Wegfall der Vektorenbekämpfung zur Reduktion des Insektizideinsatzes beitragen. Voraussetzung für eine gezielte züchterische Bearbeitung der TuYV-Resistenz sind detaillierte Kenntnisse über die Genetik der Resistenz.

Die für eine erfolgreiche Selektion nötige Vermehrung TuYV-tragender Blattläuse für die künstliche Infektion auf dem Feld, gefolgt von einem serologischen Nachweis der Resistenzreaktion, ist nur schwer in den praktischen Zuchtgang zu integrieren. In diesem Zusammenhang stellen molekulare Marker, welche eine sichere Selektion im Labor in frühen Entwicklungsstadien erlauben, wichtige Hilfsmittel dar. Erstes Ziel dieser Arbeit war es daher anhand doppelhaploider Linien, die eine sichere und wiederholbare Erfassung der Resistenzreaktion ermöglichen, die Vererbung der TuYV-Resistenz aufzuklären. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten molekulare Marker entwickelt werden, die eine sichere markergestützte Selektion gestatten.

Im Einzelnen sollten diese Ziele wie folgt erreicht werden:

- 111 DH-Linien (resistent x anfällig) wurden hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens gegenüber dem TuYV unter Verwendung virustragender Blattläuse und Virusnachweis mittels DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zu den Terminen Dezember, April, Mai/Juni phänotypisiert. Anhand dieser phänotypischen Daten sollten Rückschlüsse über die Vererbung der TuYV-Resistenz gezogen werden.
- Basierend auf den phänotypischen Daten und der Erkenntnisse zur Genetik der TuYV-Resistenz sollten unter Verwendung der 'bulk segregant analysis' (BSA) eng mit der Resistenz gekoppelte Mikrosatelliten und AFLP-Marker entwickelt werden, die eine effektive markergestützte Selektion auf TuYV-Resistenz ermöglichen.

1 Literaturübersicht

1.1 Turnip yellows virus

1.1.1 Taxonomische Einordnung

Das *Turnip yellows virus* (TuYV) gehört zur Gruppe der *Poleroviren* in der Familie der *Luteoviridae*, ebenso wie das sehr eng verwandte *Beet western yellows virus* (BWYV), *Beet chlorosis virus* (BChV), *Beet mild yellowing virus* (BMVYV) und das für die Virus-Gruppe namensgebende **Potato leafroll virus** (PLRV). Ebenso zu den *Poleroviren* gehören *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV), *Cucurbit aphid-borne virus* (CABYV) und *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) (D'ARCY UND DOMIER, 2005).

Poleroviren liegen als einzelsträngige, positiv gerichtete RNA [(+)ssRNA] vor. Die hexagonalen Virionen mit einer ikosahedralen Symmetrie (T=3) weisen eine Größe von 25-30nm Durchmesser auf. Sie besitzen kein *envelope*, d.h. die Proteinhülle (Nukleocapsid) des Virus ist nicht von einer Lipiddoppelschicht umgeben. Die Replikation ist nicht an ein Helfervirus gebunden. Auch kodiert das Genom keine Reverse Transkriptase und integriert sich nicht in das Wirts-Genom (D'ARCY UND DOMIER, 2005).

Das Genom der *Poleroviren* hat eine Größe von etwa 5,5-5,9kb (D'ARCY UND DOMIER, 2005). Für das BWYV, das sehr eng mit TuYV verwandt ist, wurde eine Genomgröße von 5,64kb ermittelt (VEIDT ET AL., 1988). Das Genom enthält sechs offene Leserahmen (open reading frames, ORFs) sowie ein am 5'-Ende der genomischen RNA kovalent gebundenes Protein (VPg) (REUTENAUER ET AL., 1993). Die Anordnung und Größe der ORFs macht eine Unterscheidung der Gruppen innerhalb der Familie der *Luteoviridae* möglich (D'ARCY UND DOMIER, 2005). Für eine Differenzierung der Viren innerhalb entsprechender Gruppen sind dagegen Sequenzvergleiche notwendig (VEIDT ET AL., 1988; GUILLEY ET AL., 1995; MOONAN ET AL., 2000).

Die einzelnen ORFs kodieren für verschiedene Proteine. So die ORFs des 5'-Endes (ORF0, ORF1 und ORF2) vor allem für Proteine, die in die Virusreplikation involviert sind, und die des 3'-Endes (ORF3, ORF4 und ORF5) kodieren für Struktur-Proteine (TERRADOT ET AL., 2001). So ist das von ORF0 kodierte Protein P0 wahrscheinlich verantwortlich für die Symptomentwicklung (VAN DER WILK ET AL., 1997a) und die Unterdrückung des post-transkriptionalen *gene silencing* (PTGS) (PFEFFER ET AL., 2002; FOMITCHEVA ET AL., 2004), sowie die Virusanreicherung (SADOWI ET AL., 2001). ORF1 kodiert bei *Poleroviren* das VPg (VAN DER WILK ET AL., 1997b), während ORF2 das Protein P2 kodiert, welches virale RdRp-Proteinstrukturelemente (RNA-dependent RNA polymerase) trägt sowie möglicherweise eine Helikase-Aktivität

besitzt (DOMIER ET AL., 2002; FOMITCHEVA ET AL., 2004). ORF3 kodiert für das Hüllprotein P3 (CP, coat protein) (ZIEGLER-GRAFF ET AL., 1996; FOMITCHEVA ET AL., 2004; TORRES ET AL., 2005), ORF4 das Transportprotein P4 (*movement protein*, MP) (ZIEGLER-GRAFF ET AL., 1996; FOMITCHEVA ET AL., 2004). Dagegen ist ORF5 für die Aufrechterhaltung der Virionen in der Hämolymphe der Aphiden und ihren Durchgang durch die passierbaren Speicheldrüsen-Zellen und somit für die Blattlausübertragbarkeit des Virus verantwortlich (FOMITCHEVA ET AL., 2004; DREWS ET AL., 2004). Das VPg ist in die RNA-Replikation involviert (D'ARCY UND DOMIER, 2005).

Poleroviren sind auf das Phloem beschränkt, d.h. in anfälligen Wirten wandert das Virus passiv mit dem Assimilat-Fluss über grössere Entfernungen durch die Siebelemente des Phloem (DERRICK UND BARKER, 1997). Nach neueren Erkenntnissen wird für das PLRV beschrieben, dass dieses auch in den Begleitzellen des Phloems, sowie gelegentlich im Zytoplasma der Phloem-Parenchymzellen und auch in Mesophyllzellen in direkter Nachbarschaft zum infizierten Phloem gefunden wird. Allerdings konnte hier bislang keine Zell-zu-Zell-Wanderung nachgewiesen werden (VAN DEN HEUVEL ET AL., 1995).

1.1.2 Wirtspflanzen und Infektionskreislauf des TuYV

Das TuYV, wie *Poleroviren* allgemein, wird persistent-zirkulativ, jedoch nicht propagativ durch Blattläuse übertragen (BRAULT ET AL., 1995), wobei als Hauptvektor *Myzus persicae* (Grüne Pfirsichblattlaus) genannt wird (SCHLIEPHAKE ET AL., 2000).

TuYV ist in der Lage, viele Pflanzarten zu infizieren, so dass an dieser Stelle nur eine Auswahl überprüfter Wirtspflanzen aufgeführt wird (GRAICHEN UND RABENSTEIN, 1996). Zum Kulturarten-Wirtskreis des TuYV zählen viele Arten, Unterarten und Varietäten der Gattungen *Brassica* und *Raphanus*, sowie *Vicia faba* (Ackerbohne), *Lupinus albus* (Weiße Lupine), *Lupinus luteus* (Gelbe Lupine), *Pisum sativum* (Erbsen), *Phacelia tanacetifolia* (Bienenfreund), *Lepidium sativum* (Gartenkresse), *Sinapis alba* (Weißer Senf), *Lactuca sativa* (Salat) und *Valerianella locusta* (Feldsalat). Unter den Wildpflanzen zählen z.B. *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), *Thlaspi arvense* (Ackerhellerkraut), *Stellaria media* (Vogelmiere), *Taraxacum officinale* (Löwenzahn), *Veronica arvensis* (Feld-Ehrenpreis) und *Papaver rhoeas* (Klatschmohn) zum Wirtskreis des TuYV.

Winterraps ist ein Primärwirt des TuYV. Im Herbst, d.h. bereits ab September fliegen infektiöse *M. persicae* die Winterrapsbestände an (STEUDEL, 1952) und übertragen das Virus. Bis zum Frosteintritt entwickeln sich große *M. persicae*-Populationen und verbreiten das TuYV-Virus durch Wanderung in den Winterraps-Beständen. Bis zum Eintreten starker Fröste entwickeln sich die Blattlauspopulationen weiter. Je größer

die Populationsstärke und je später starke Fröste eintreten, um so eher ist die Möglichkeit einer erfolgreichen anholozyklischen Entwicklung im Laufe des Winters gegeben (STEUDEL, 1952). *M. persicae* sind in der Lage kurzzeitige Fröste von -4°C ohne Schaden zu überdauern (HEINZE UND PROFFT, 1938). Bei mehr als zwei Tagen Kälteeinwirkung ab -6°C ist mit einer Schwächung bzw. Letalität der Blattläuse zu rechnen, und Temperaturen von -12°C über mehr als zwei Tage können von *M. persicae* nicht überlebt werden (HEINZE, 1948). Im Falle einer anholozyklischen Überwinterung wandern *M. persicae* im Frühjahr auf die Sommerwirte ab, d.h. auf andere Kulturpflanzenbestände oder auf Wildpflanzen, die ebenfalls mit dem Virus infiziert werden können. Der Zyklus schließt sich im Herbst, wenn von TuYV-infizierten Sommerwirten die Blattläuse wieder in die jungen Winterraps-Bestände einfliegen (PAUL, 2003). Nach älteren Aussagen von GERSDORF (1955), KENNEDY ET AL. (1959), MÜLLER (1954a) und HILLE RIS LAMBERS (1946) ist eine holozyklische Überwinterung von *M. persicae* lediglich auf *Prunus* ssp. und verwandten Gattungen zu beobachten, in aktiven Stadien, d.h. holozyklisch, jedoch unter anderem auch auf vielen *Brassicaceae* (CHAMBERLIN, 1950; LOWE, 1962; HSU, 1963; VAN EMDEN ET AL., 1969), wobei MÜLLER (1954b) die Vermutung äußerte, dass es sich hierbei um eine andere Rasse von *M. persicae* handelt, die generell rein anholozyklisch lebt. Virusinfizierte Winterrapsbestände können daher in Verbindung mit milden Wintern als grüne Brücke für das Virus dienen.

1.1.3 Differenzierung zwischen BWYV und TuYV

Da lange Zeit aufgrund fehlender Möglichkeiten einer Differenzierung auf Genomebene und aufgrund der sehr ähnlichen Hüllprotein-Strukturen eine serologische Unterscheidung schwierig war, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den in der Gattung *Brassica* und auch bei *Beta*-Rüben auftretenden Luteoviren um verschiedene Stämme eines Virus handelt. So zeigten frühe serologische Untersuchungen eine sehr enge Verwandtschaft zwischen Isolaten des BWYV aus Amerika und England zu TuYV-Isolaten aus England und Deutschland (DUFFUS UND RUSSELL, 1972), d.h. die Isolate konnten mit polyklonalen Antisera nicht differenziert werden. Folglich wurden diese Viren zunächst unter dem Namen *Beet western yellows virus* (BWYV) zusammengefasst, und *Turnip yellows virus* (TuYV), *Malva yellows virus*, *Radish yellows virus*, *Beet mild yellowing virus* (BMV) und *Turnip mild yellows virus* (TMV) als Synonyme für das BWYV aufgefaßt (DUFFUS, 1972; D'ARCY, 1986; RANDLES ET AL., 1995).

Erst aufgrund umfangreicher Wirkkreisuntersuchungen konnte nicht nur das BWYV vom sehr eng verwandten BMV unterschieden, sondern auch das BWYV selbst in zwei verschiedene Viren differenziert werden. So wurden europäische Isolate des

BWYV identifiziert, die Pflanzen der Gattung *Brassica* infizieren konnten, jedoch nicht pathogen für die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) sowie sechs weitere Unterarten und Varietäten der Gattung *Beta* waren (GRAICHEN UND RABENSTEIN, 1996). Folglich wurde vorgeschlagen, diese europäischen BWYV-Isolate in das bis dahin nur als Synonym verwendete *Turnip yellows virus* (TuYV) umzubenennen, um von der irreführenden Bezeichnung (*Beet*) Abstand zu gewinnen (GRAICHEN UND RABENSTEIN, 1996). Amerikanische Isolate des BWYV, die neben *Brassica*-Arten auch die Gattung *Beta* infizieren können, behielten die Bezeichnung BWYV, wobei BMVYV dadurch abgegrenzt werden konnte, dass es *Beta*, aber nicht *Brassica* infiziert (GRAICHEN UND RABENSTEIN, 1996).

Spätere Wirkkreisuntersuchungen bestätigten, dass TuYV für *B. vulgaris* und *Chenopodium capitatum* (Ähriger Erdbeerspinat) nicht pathogen ist (HAUSER ET AL. 2002; BEUVE ET AL., 2008). Auch zeigten Vergleiche auf Genomebene Sequenzunterschiede zwischen TuYV und BWYV (VEIDT ET AL., 1988).

Phylogenetische Untersuchungen der Proteinsequenzen bestätigten die einerseits sehr enge Verwandtschaft des TuYV zu BMVYV, BWYV und BChV sowie gleichzeitig die Eigenständigkeit des TuYV als ein Virus innerhalb der Gruppe *Poleroviren* (BEUVE ET AL., 2008; TORRES ET AL., 2005).

Da in vielen Arbeiten unter dem Namen BWYV Ergebnisse veröffentlicht wurden, die unter Umständen jedoch aufgrund des Zusammenhanges (wie z.B. die genannten Wirkkreise) dem TuYV zugeordnet werden können, werden im Folgenden auch Arbeiten zitiert, die das BWYV betreffen, jedoch zusätzlich mit der Bezeichnung „(syn. TuYV)“ versehen, für den Fall, dass der Kontext oder eine vom Autor selbst geäußerte Vermutung auf das TuYV schließen lässt.

1.1.4 Vorkommen des TuYV

Erste Berichte über das Auftreten des BWYV/TuYV erschienen schon vor einem halben Jahrhundert. So wurde schon vor mehr als 5 Jahrzehnten das TuYV unter der Bezeichnung „jaunisse des navets“ (VANDERWALLE, 1950) und wenig später das Vorkommen von *Radish yellows virus* in Kalifornien (USA) beschrieben (DUFFUS, 1960). Ein Jahr später wurde dieses Virus in BWYV umbenannt, da es an Rettich und Beta-Rüben Vergilbungen verursacht (DUFFUS, 1961). Aufgrund fehlender Möglichkeiten zur strikteren Unterscheidung wurden diese Viren indes als ein Virus oder als verschiedene Isolate eines Virus behandelt.

Das TuYV ist weltweit verbreitet. So berichten COUTTS UND JONES (2000) und COUTTS ET AL. (2006) aus Süd-West-Australien von BWYV (syn. TuYV) infiziertem Raps sowie SMITH UND HINCKES (1985), SMITH ET AL. (1996), DUFFUS UND RUSSELL (1970)

und DUFFUS UND RUSSELL (1975) von BWYV (syn. TuYV) aus England. Des Weiteren wird von positiven TuYV-Testungen von Pflanzenproben aus Neuseeland, China und Tansania berichtet (GRAICHEN UND SCHLIEPHAKE, 2000). Auch aus Österreich liegen Meldungen von zum Teil hochgradig mit TuYV infizierten Beständen vor (GRAICHEN ET AL., 2000b).

Die natürliche Infektionsrate im Pflanzenbestand wird mit bis zu 100 % (SMITH UND HINCKES, 1985; GRAICHEN UND SCHLIEPHAKE, 2000; SCHRÖDER, 1994) beziffert. Hierzulande ermittelten GRAICHEN ET AL. (1997) vor allem in mitteldeutschen und nördlichen Bundesländern überwiegend einen hohen natürlichen Befall mit TuYV. Es wurde allerdings auch eine hohe Variation zwischen den Jahren hinsichtlich des natürlichen TuYV-Befalles festgestellt (GRAICHEN UND SCHLIEPHAKE, 2000).

Die beobachteten Schwankungen der natürlichen Infektionsraten zwischen verschiedenen Jahren wurden in einen direkten Zusammenhang mit dem Vektor-Flug gebracht. So begünstigt eine milde Witterung im Herbst und Winter durch den verstärkten Blattlausflug und die mögliche anholozyklische Überwinterung der Vektoren hohe Infektionsraten (GRAICHEN UND SCHLIEPHAKE, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Regionen mit vorherrschend kontinentalem Klima im Gegensatz zu kühleren und feuchteren Lagen vermehrt TuYV infizierte Bestände auftreten (GRAICHEN ET AL., 2000c).

1.1.5 TuYV-Symptome

TuYV verursacht zunächst Anthozyanfärbungen und gelegentlich Rötungen der Blattränder bereits im Herbst, welche jedoch im Frühjahr mit Einsetzen des Pflanzenwachstums wieder zurückgehen (GRAICHEN, 1995b; GRAICHEN, 1999). Mit Beginn wärmerer Witterung und mit Einsetzen der zügigen Pflanzenentwicklung im Frühjahr sind Wuchsminderungen bei infizierten Pflanzen zu beobachten (GRAICHEN, 1995b; GRAICHEN, 1999). Mit Beginn der Blüte treten, verstärkt an den älteren Blättern, Rötungen, Vergilbungen und gelegentlich auch Nekrosen auf (GRAICHEN, 1995b; GRAICHEN, 1999) (Abbildung 1). Die Symptome sind besonders in Randbereichen von Rapsfeldern zu beobachten (GRAICHEN, 1995b; GRAICHEN, 1999). Infizierte Pflanzen reagieren zudem mit erheblichen Ertragsverlusten (GRAICHEN, 1999).

Symptome, die auch das TuYV verursacht, deuten nicht zwangsläufig auf eine Virusinfektion hin (GRAICHEN ET AL., 2000b; SMITH UND HINCKES, 1985; COUTTS UND JONES, 2000). So können die genannten Symptome auch zu einer Verwechslung mit abiotischen Stressfaktoren wie Bodenverdichtung, Staunässe, Kälte oder Nährstoffmangel führen (GRAICHEN, 1995b; GRAICHEN, 1999).



Abbildung 1: TuYV-Symptome - Rote Blattfärbungen, insbesondere an den älteren Blättern [Aschersleben, 22.05.2006 (links oben und rechts), 02.06.2006 (links unten)].

1.1.6 Durch TuYV verursachte Ertragsverluste

Luteoviren zählen zu den ökonomisch wichtigsten Pflanzenviren. Ertragsverluste durch TuYV wurden in zahlreichen Versuchen ermittelt. In einem Versuch über drei Jahre mit künstlicher TuYV-Infektion wurden 12-34 %, bzw. im dreijährigen Mittel 20,4 % Ertragsreduktionen, entsprechend ca. 8dt/ha ermittelt (GRAICHEN, 1997). SCHRÖDER (1994) berichtete von Untersuchungen mit kumulierten Einzelpflanzen, die bedingt durch eine Infektion mit BWYV (syn. TuYV) um 40-50 % geringere Erträge erzielten. JAY UND SMITH (1994) ermittelten insgesamt einen negativen Einfluß auf das Pflanzenwachstum und ermittelten Ertragsverluste von 26 % bei einer künstlichen BWYV (syn. TuYV)-Infektion. In einem zweijährigen Versuch an 10 über ganz Deutschland verteilten Orten mit vier anfälligen Winterrapsorten und künstlicher

TuYV-Infektion wurde im Durchschnitt ein Ertragsverlust von 11,2 % ermittelt, wobei an einigen Standorten signifikante Ertragsminderungen von über 30 % festgestellt wurden (PAETSCH ET AL., 2004). Aus Australien berichten JONES ET AL. (2007) bei einer 96-100 % igen BWYV (syn. TuYV)-Infektion von Ertragsverlusten bei Körner- raps von 37-46 %, sowie einem um 3 % verringerten Ölgehalt, einem um 11 % reduzierten Korngewicht, bis zu 44 % weniger Erucasäure und von einem um 6-11 % reduzierten Proteingehalt. Von einer Reduktion des Öltrages um 13,4 % berichten SMITH UND HINCKES (1985) nach 100 % iger BWYV (syn. TuYV)-Infektion.

Der Zusammenhang zwischen Insektizideinsatz gegen die Vektoren und dem Infektionsniveau wurde von READ UND HEWSON (1988) und WALSH ET AL. (1989) untersucht. Es zeigte sich, dass unter großem Aufwand, d.h. durch wiederholte Insektizid-Behandlungen, durchaus ein positiver Einfluss auf den Ertrag erzielt werden konnte (WALSH ET AL., 1989). Allerdings gestaltet sich ein effektiver Insektizid-Einsatz bei verzetteltem Blattlausflug schwierig und möglicherweise führen erst mehrere Behandlungen zum Erfolg (READ UND HEWSON, 1988).

1.2 Erbliche Virusresistenz

1.2.1 TuYV-Resistenz in Raps

Als ökologisch und ökonomisch sinnvollste Möglichkeit, den durch das TuYV verursachten Ertragsschäden entgegen zu wirken, ist die Züchtung TuYV-resistenter Sorten zu sehen.

Wie in Kapitel 1.3.1 näher beschrieben wird, geht der Raps ursprünglich auf eine spontane Kreuzung der Ausgangsformen Kohl (*B. oleracea*) und Rübsen (*B. rapa*) zurück (GEISLER, 1991; GRAICHEN, 1994). Die Elternarten sind generell anfällig gegenüber TuYV (GRAICHEN, 1994). Hingegen ist in *B. rapa* ssp. *pekinensis* Resistenz gegen TuYV häufig anzutreffen (GRAICHEN, 1994).

Durch Kreuzung der TuYV-anfälligen Kohlsorte 'Stone Head' (*B. oleracea* convar. *capitata* var. *capitata*) mit dem TuYV-resistenten Chinakohl 'Nr. 67' (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) entstand der TuYV-resistente Resynthese-Raps 'R54' (vergl. GIRKE, 2002). Dieser neue Rapsstamm wurde in den 1970er Jahren vor dem Hintergrund der Etablierung der Embryo-Kultur und zur Vergrößerung der genetischen Breite an der Georg-August-Universität in Göttingen erstellt (vergl. GLAND, 1980 und GLAND, 1982) und stellte sich später in speziellen Resistenzprüfungen (GRAICHEN, 1994) als TuYV-resistent heraus.

Versuche zur Klärung des Vererbungsmodus ergaben bisher nur ungesicherte Angaben. So nahm GRAICHEN (1994) an, dass die Vererbung durch ein oder wenige

Gene bedingt sei, während später die Vermutung geäußert wurde, dass die TuYV-Resistenz polygenisch vererbt ist (GRAICHEN, 1998). Vergleichende Versuche im Feld sowie Gewächshaus zeigten einen höheren Anteil TuYV-resistenter Einzelpflanzen unter Freilandbedingungen, wodurch die Annahme gestützt wurde, dass die Resistenzausprägung umweltbeeinflusst ist und höhere Temperaturen eine höhere Zahl anfällig reagierender Einzelpflanzen bewirken (GRAICHEN, 1998). Verminderte Virusgehalte in den Sorten 'Fertödi' und 'Gorzanski' gaben erste Hinweise, dass es sich um eine quantitative Resistenz handelt (GRAICHEN, 1995a).

Im Zuge weiterer Resistenztestungen wurde beobachtet, dass die Resistenz über eine starke Verringerung der Viruskonzentration wirkt, die unter Umständen mit speziellen Nachweismethoden wie TBIA (*Tissue Blot Immuno Assay*) und DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) nicht nachweisbar ist, sehr wohl aber mittels IC-RT-PCR (*Immucature Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), mit der noch geringste Mengen bis ca. 0,05pg/ml nachgewiesen werden können (GRAICHEN ET AL., 1998; GRAICHEN ET AL., 2000a). Auch ergaben Testungen verschiedener Pflanzenorgane, dass ein Virusnachweis in Wurzelmaterial am zuverlässigsten ist, insbesondere wenn in oberirdischen Pflanzenorganen kein Virusgehalt mehr nachweisbar ist (GRAICHEN ET AL., 2000a). Gleiche Beobachtungen machte auch PAETSCH (IN VORBER.), d.h. dass das Virus in der Wurzel noch nachweisbar war, obwohl in Blattmaterial, Stängel, Knospen und Schoten mittels DAS-ELISA kein Virus detektiert werden konnte. Eine extreme Resistenz, bei der alle Pflanzenorgane virusfrei und auch Rückübertragungsversuche negativ blieben, wurde in Material gefunden, das auf eine Kreuzung von Winterraps mit dem resistenten Resyntheseraps 'R54' zurückging (GRAICHEN ET AL., 2000a). Im Widerspruch dazu stellte PAETSCH (IN VORBER.) fest, dass vereinzelt auch im Resyntheseraps 'R54' geringe Virusgehalte, vor allem in der Wurzel, nachgewiesen werden können.

1.2.2 Resistenz gegen Poleroviren

Ähnliches wie für TuYV in Raps berichten WALKEY UND PINK (1990) für BWYV in Salat (*Lactuca sativa*). Hier wurde beobachtet, dass das Resistenz-Niveau je nach Sorte sehr unterschiedlich sein kann und von anfällig bis zu extrem resistent bzw. immun variiert. Auch die Beobachtung, dass eine reduzierte Virusinfektion in Pflanzen nachzuweisen war, die bei niedrigerer Temperatur wuchsen, steht mit Beobachtungen von GRAICHEN (1998) in Einklang.

Gegenüber dem BWYV wiesen DUFFUS UND MILBRATH (1977) einerseits eine extreme Resistenz in Sorten der Soyabohne (*Glycine max*) nach, berichteten aber auch von quantitativer, unvollständig ausgeprägter Resistenz, die auf eine Heterogenität in den

anfälligen Genotypen zurückzuführen sein könnte oder nur eine mittlere Anfälligkeit darstellt, d.h. auf eine quantitative Resistenz hindeutet.

In Spinat (*Spinacia oleracea*) wurde bei einigen Genotypen neben einer schwachen Ausprägung von Krankheitssymptomen auch eine geringere relative Viruskonzentration des BMVYV nachgewiesen und auf einen quantitativen Charakter der Virusresistenz geschlossen (SCHMIDT ET AL., 1989).

Das mit dem TuYV ebenfalls sehr eng verwandte PLRV wurde hinsichtlich Resistenz ausführlich untersucht. So wurde zunächst von einem reduzierten Virusgehalt in resistenten Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) berichtet, verbunden mit der Vermutung, dass es sich bei der Resistenz um eine dominant vererbte, polygenisch kontrollierte Infektionsresistenz handelt, bei der eine Infektion grundsätzlich möglich ist, jedoch die resistenten Genotypen eine stark verringerte Infektionshäufigkeit zeigen (BAERECKE, 1956; ROSS, 1958; BARKER UND HARRISON, 1983). Diese Infektionsresistenz kann durch eine Ausbreitungsresistenz noch verstärkt werden (HAMANN, 1962). Der außergewöhnlich niedrige Gehalt an PLRV-Antigenen im untersuchten Blattextrakt wurde mit einer Verringerung der Anzahl virusinfizierter Phloem-Begleitzellen begründet (BARKER UND HARRISON, 1984). Wie auch bei den Beobachtungen des TuYV in Raps und des BWYV in Salat konnte hinsichtlich des PLRV in Kartoffeln beobachtet werden, dass in einigen der im Feld hoch resistenten Klone Virus nachgewiesen werden konnte, sobald diese im Gewächshaus kultiviert wurden (BARKER UND HARRISON, 1984). Zur selben Zeit wurde bezüglich des Resistenzmechanismus die Vermutung geäußert, dass die PLRV-Resistenz in der Kartoffel durch eine Verlangsamung der Virusvermehrung und eine reduzierte Virussyntese, einen erhöhten Abbau von Virionen oder durch eine Beeinträchtigung der Virusausbreitung bedingt sein könnte. Ebenso wurde vermutet, dass an der Resistenz mehr als nur ein Mechanismus beteiligt ist (BARKER UND HARRISON, 1985). Untermauert wurde diese Vermutung durch die Tatsache, dass bei hoch feldresistenten Pflanzen eine Virus-Invasions-Resistenz nachgewiesen werden konnte, die durch einen polygenisch kontrollierten Mechanismus, der die Virusausbreitung im Phloemsystem unterbindet, bedingt ist (BARKER, 1987). Demgegenüber gehen GASE (1989) und BARKER ET AL. (1994), davon aus, dass die PLRV-Resistenz durch zwei unabhängige, dominante komplementäre Gene, die beide für die Ausprägung von Resistenz benötigt werden, gesteuert wird, wobei die Fähigkeit zur Einschränkung der Virusvermehrung durch ein Hauptgen kontrolliert werden soll (BARKER UND SOLOMON, 1990). Der Resistenz-Mechanismus soll über eine Beeinträchtigung des Kurzstreckentransportes des Virus von den Siebelementen zu den Begleitzellen wirken, d.h. es sind weniger Zellen im externen Phloem infiziert (DERRICK UND BARKER, 1997).

THOMAS UND MINK (1998) berichten von einer Immunität gegen PLRV bei der Tomate, sowie von einer scheinbaren Immunität, bei der weder im Blatt, noch im Stängel Virus mit Rückübertragungen nachgewiesen werden konnte, sehr wohl aber in der Wurzel, wohin das Virus nach der Infektion einwandert und dort über den gesamten geprüften Zeitraum von bis zu einem Jahr verbleibt.

1.3 Die Kulturpflanze Raps

1.3.1 Entstehung und Herkunft

Der zur Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*) zählende Raps (*B. napus* L.) ist nur als Kulturpflanze bekannt, kommt jedoch auch verwildert vor (GLADIS UND HAMMER, 1992). Es handelt sich hierbei um eine relativ junge Kulturpflanze, die wahrscheinlich aus einer spontanen Artkreuzung von Rübsen (*Brassica rapa*, syn. *Brassica campestris*) und Kohl (*Brassica oleracea*) entstand (RÖBBELEN, 1960). RUDORF (1951) und OLSSON (1960) diskutierten die Möglichkeit, dass *B. napus* in der Natur an mehreren Standorten und aus verschiedenen, noch immer existierenden Ausgangsform-Rassen entstanden ist. Da keine Wildform von *B. napus* bekannt ist, äußerte OLSSON (1960) die Vermutung, dass entweder verwilderte Formen der Kulturpflanze *B. napus* nicht von möglichen echten Wildformen unterschieden werden können, oder dass der Ursprung von *B. napus* gar in Hausgärten zu suchen ist, in denen die Ausgangsformen parallel angebaut wurden.

Bereits in den 30er Jahren führten MORINAGA (1934) und U (1935) umfangreiche Untersuchungen durch, in denen nachgewiesen werden konnte, dass der allopolyploide Raps (*B. napus*, $2n=38$, Genome AACC) aus den Genomen der diploiden Arten Rübsen (*B. rapa*, $2n=20$, AA-Genom) und Kohl (*B. oleracea*, $2n=18$, CC-Genom) zusammengesetzt ist und im Abessinischen Senf (*Brassica carniata*, $2n=34$, Genome BBCC) die Genome von *B. oleracea* und des Schwarzen Senfs (*Brassica nigra*, $2n=16$, BB-Genom) sowie im Indischen Senf (*Brassica juncea*, $2n=36$, Genome AABB) die Genome von *B. nigra* und *B. rapa* kombiniert sind. Dass der Karyotyp der Ausgangsformen weitestgehend intakt und vollständig in *B. napus* enthalten ist, wurde molekular auf Genom-Basis über Kopplungsanalysen von PARKIN ET AL. (1995) und physikalisch über Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) von SNOWDON ET AL. (2002) nachgewiesen.

Um die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den diploiden Ausgangsarten *B. rapa*, *B. nigra* und *B. oleracea* sowie die mögliche Entstehungsgeschichte der Gattung *Brassica* zu verstehen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese diploiden Arten von einem Urelter bzw. Urogenom mit der Basiszahl $x=6$ Chromosomen (abcdef)

abstammen müssten (CATCHESIDE, 1934; HAGA, 1938; RÖBBELEN, 1960; TRUCO ET AL., 1996). Die unterschiedlichen Chromosomen-Zahlen der *Brassica*-Arten könnten sich dann zum einen über Polyploidie und Polysomie und zum anderen über strukturelle Änderungen wie Duplikationen, Inversionen oder Deletionen von Chromosom-Abschnitten ausgebildet haben (vergl. GATES, 1938). Diese These stützt sich auf die Aussage, dass nur sechs der Chromosomen hinsichtlich Länge und Symmetrie wirklich verschieden sind, die übrigen Chromosomen jedoch starke Homologien zu dem einen oder anderen dieser sechs Ur-Chromosomen zeigen (RÖBBELEN, 1960). Hinsichtlich der Chromosomenzahl des Urgenoms bestehen jedoch auch abweichende Ansichten. So ging SIKKA (1940) von der Annahme aus, dass das Urgenom eine Basiszahl von $x=5$ Chromosomen aufweist, während QUIROS ET AL. (1988) und WARWICK UND BLACK (1991) von $x=7$ Chromosomen berichten, da die niedrigste genomische Zahl, die in *Brassica* und eng verwandten Arten gefunden wurde 7 beträgt. SONG UND OSBORN (1992) gehen von der Annahme aus, dass *Brassica montana* oder eine vergleichbar eng verwandte Art der gemeinsame Vorfahre von *B. oleracea* und *B. rapa* ist. Nach der Hypothese der Chromosomen-Homoeologie (RÖBBELEN, 1960) leiten sich die diploiden Genome wie folgt ab: *B. rapa* ($x=10$, aabcddeff), *B. nigra* ($x=8$, abcddeff) und *B. oleracea* ($x=9$, abbccdeef).

Zwischen *B. oleracea* und *B. rapa* konnte ein hoher Verwandtschaftsgrad nachgewiesen werden (SONG ET AL, 1988a; WARWICK UND BLACK, 1991; PARKIN ET AL., 1995; TRUCO ET AL., 1996; SNOWDON ET AL., 2002). Große Abschnitte der beiden Genome sind co-linear und Rekombinationen kommen zwischen homologen Abschnitten der Chromosomen beider Genome vor (LYDIATE ET AL., 1995). Jedoch besteht auf chromosomaler Ebene eine sehr deutliche Unterscheidung des B-Genomes zu den Genomen A und C (ATTIA UND RÖBBELEN, 1986; ATTIA ET AL., 1987; CHEVRE ET AL., 1991). SONG ET AL. (1988a), QUIROS ET AL. (1988) und WARWICK UND BLACK (1991) stellten basierend auf molekularen Verwandtschaftsanalysen die Theorie auf, dass sich die Ausgangsformen bereits sehr früh von dem Urgenom trennten und *B. nigra* eine von *B. oleracea* und *B. rapa* gesonderte Abstammungslinie bilden.

Bei der Entstehung der beiden Ausgangsformen *B. oleracea* und *B. rapa* wird davon ausgegangen, dass sich frühe Formen im europäischen Raum weiterentwickelten und schließlich in den beiden Arten ausdifferenzierten, bzw. sich *B. rapa* von *B. oleracea* abspaltete (TRUCO ET AL., 1996). Durch eine weite Verbreitung von *B. rapa* von Europa über Indien bis nach Südchina (SONG ET AL., 1988b; SONG ET AL., 1990) und die örtlich unterschiedliche Domestikation aus den lokalen Wildpopulationen entstand eine große Vielfalt an Unterarten (GLADIS UND HAMMER, 1992). Die Ausbreitung der Wildform von *B. oleracea* erfolgte laut KÖRBER-GROHNE

(1987) vermutlich über das europäische Mittelmeergebiet, die Atlantik-Küsten bis hin zu den Nordsee-Küstengebieten.

Der Ursprung von *B. napus* wird im Mittelmeerraum gesehen, da die Wildarten der Gattung *Brassica* hauptsächlich in diesem Gebiet heimisch sind (SIKKA, 1940; OLSSON, 1960; GLADIS UND HAMMER, 1990; SONG ET AL., 1990). Da beide Elternarten auch an den Küsten des Atlantiks und der Nordsee vorkommen, ist es nicht auszuschließen, dass Rapsformen auch in Nordwesteuropa entstanden sind (SONG ET AL., 1990). Die Möglichkeit, dass beide Annahmen stimmen könnten, wird von SONG UND OSBORN (1992) und NICOLAS ET AL. (2007) diskutiert, da die heutigen Rapsformen durchaus aus verschiedenen Kreuzungsereignissen der Elternarten *B. rapa* und *B. oleracea* stammen könnten.

1.3.2 Resynthese-Raps

Beide Ausgangsformen von *B. napus* sind sehr formenreich, während bei *B. napus* selbst die genetische Diversität eingeschränkt ist (GLADIS UND HAMMER, 1990). Die Ausgangsformen von *B. napus* konnten sich über lange Zeit evolutionär verändern bzw. wurden ebenso wie *B. napus* durch Domestikation weiterentwickelt. Dies ist die Ursache, dass resynthetisierte Raps-Formen häufig sehr verschieden von dem bekannten Raps sind und damit Resynthesen eine Möglichkeit zur Erweiterung der genetischen Diversität darstellen (DOWNEY UND RÖBBELEN, 1989; SONG UND OSBORN, 1992; SOLTIS UND SOLTIS, 1995; SEYIS ET AL., 2001). Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass *B. napus* genetisch weiter von den Ausgangsformen ist als interspezifische Kreuzungen (SONG ET AL., 1993; BECKER ET AL., 1995).

Diese große Variabilität bietet also die Möglichkeit über eine Nutzung verschiedener Ausgangseltern einer Resynthese, züchterisch wichtige Eigenschaften zu variieren und gezielt in die Entwicklung neuer Rapsorten einfließen zu lassen und damit die genetische Diversität zu erweitern (HOSSAIN ET AL., 1990; YAMAGISHI ET AL., 1990). Dies gilt auch im Hinblick auf die TuYV-Resistenz. So zeigte GRAICHEN (1994), dass neben einer hohen Anfälligkeit der Ausgangsarten *B. oleracea* und *B. rapa* ssp. *oleifera* Resistenz in *B. rapa* ssp. *pekinensis* zu finden ist. Es erwiesen sich in den Untersuchungen Genotypen von *B. rapa* ssp. *pekinensis* sehr häufig als TuYV-resistent bzw. reagierten mit verminderten Virustitern, wohingegen Genotypen von *B. rapa* ssp. *oleifera* generell anfällig reagierten (Abbildung 2).

Dass durch die Wahl verschiedener Formen der Ausgangsarten die Eigenschaften der jeweiligen Resynthese bestimmt werden, zeigen u.a. der Befunde von HOSSAIN ET AL. (1990) in verschiedenen interspezifischen Kreuzungen von *B. rapa* mit der *B. oleracea*-Sorte 'Yoshin', aus denen entweder kopfbildende oder rosettenbildende

Typen entstanden. Das Phänomen, dass die amphidiploiden Resynthesen nicht eine einheitliche Morphologie aufweisen, die zwischen den Ausgangsformen liegt, sondern bei Betrachtung individueller Charakteristika (z.B. Kopfbildung) mehr der einen Ausgangsform ähneln, in Summe der Charakteristika jedoch morphologisch zwischen den beiden Ausgangsformen liegen, beschreiben YAMAGISHI ET AL. (1990).

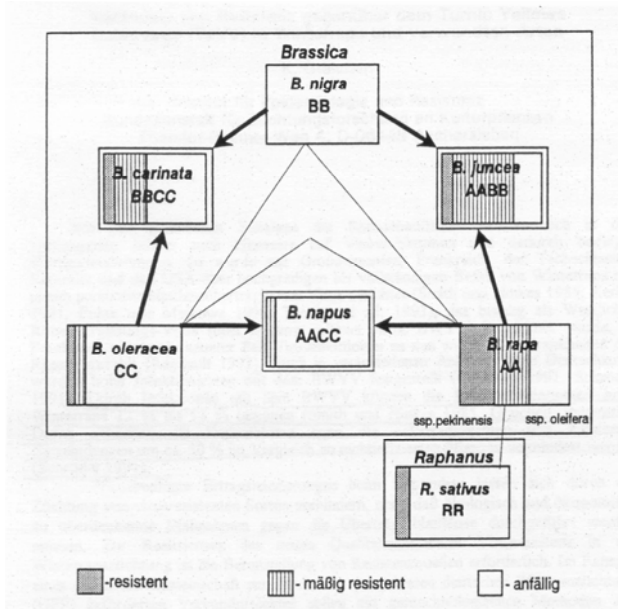


Abbildung 2: Vorkommen von TuYV-Resistenz in den Arten der Gattung *Brassica* (aus GRAICHEN, 1994).

Neben der Erstellung neuer Raps-Formen könnte der Weg über die interspezifische Hybridisierung auch dafür genutzt werden, erwünschte Eigenschaften von einer Art in eine andere, z.B. aus *B. rapa* in *B. oleracea*, zu übertragen (HOSSAIN ET AL., 1990).

Die spezielle Nutzung interspezifischer Kreuzungen reicht von der Resistenzzüchtung, z.B. Kohlhernie- (DIEDERICHSEN UND SACRISTAN, 1996) und Phoma-Resistenz (MITHEN UND MAGRATH, 1992) über die Qualitätszüchtung, beispielsweise Gelbsamigkeit (CHEN UND HENEEN, 1992) und Veränderung des Fettsäuremusters (HANSEN UND EARLE, 1994; HEATH UND EARLE, 1995), bis hin zu Entwicklungsmerkmalen wie frühere Blüte bzw. Frühreife (HANSEN UND EARLE, 1994; AKBAR, 1987; SARLA UND RAUT, 1987). Auch bietet die interspezifische Hybridisierung Möglichkeiten für die Hybridzüchtung, z.B. bei der Herstellung der Maintainer-

Komponente für Hybrid-Züchtungsprogramme wie das CMS-System (cytoplasmatische männliche Sterilität) (CHEN UND HENEEN, 1989).

Zur Synthese des Rapses führen verschiedene Verfahren, die von KOCH UND PETERS (1952) sowie HOFFMANN UND PETERS (1958) zusammenfassend vorgestellt wurden: So kann eine einfache Kreuzung der Ausgangsarten *B. rapa* (AA) und *B. oleracea* (CC) durchgeführt werden. Falls die Bastarde nicht von vornherein unreduzierte Gameten bilden, was gelegentlich vorkommt, kann durch eine Colchicin-Behandlung in der F₁ eine Genomverdopplung ausgelöst werden, um fertile allopoloide Nachkommen (AACC) zu erzeugen (KOCH UND PETERS, 1952; HOFFMANN UND PETERS, 1958; MITHEN UND MAGRATH, 1992). Im Falle des Vorkommens unreduzierter Gameten kann direkt über Selbstbefruchtung bzw. Kreuzung dieser Bastarde eine neue amphidiploide Form (AACC) erstellt werden (RUDORF, 1951; KOCH UND PETERS, 1952; HOFFMANN UND PETERS, 1958; AKBAR, 1989). Auch über die Kreuzung tetraploider Ausgangsformen (AAAA bzw. CCCC) können direkt neue resynthetisierte Rapsformen erzeugt werden (KOCH UND PETERS, 1952; HOFFMANN UND PETERS, 1958; AKBAR, 1989).

Der Weg über die Semisynthese erlaubt es, sowohl die Genome der Ausgangsformen *B. oleracea* und *B. rapa* als auch das Genom einer bereits bestehenden *B. napus* Form zu vereinen. Hierzu werden zunächst durch die Kreuzung von *B. napus* x *B. rapa* bzw. *B. napus* x *B. oleracea* und anschließende Colchicin-Behandlung amphidiploide *Naporapa*- (AAAACC) bzw. *Napoleracea*-Formen (AACCCC) erstellt. Über eine weitere Kreuzung der *Naporapa*-Form x *B. oleracea* bzw. *Napoleracea*-Form x *B. rapa* wird schließlich wieder Raps gewonnen (KOCH UND PETERS, 1952; HOFFMANN UND PETERS, 1958). Diese sog. „Semisynthese“ kann auch über die Nutzung unreduzierter Gameten erfolgen. Hierzu wird z. B. *B. napus* mit *B. oleracea* gekreuzt. Der Bastard (ACC) wird anschließend mit Pollen von *B. rapa* (A) bestäubt und ergibt bei einer Vereinigung mit einer unreduzierten Eizelle die Rapsform AACC. Gleiches Schema gilt für (*B. napus* x *B. rapa*) x *B. oleracea*. Ebenfalls über die Nutzung gelegentlich produzierter unreduzierter Gameten kann die Kreuzung des Bastards *B. rapa* x *B. oleracea* (AC) mit Pollen von *B. napus* (AC) erfolgen (RUDORF, 1951; KOCH UND PETERS, 1952; HOFFMANN UND PETERS, 1958).

Eine weitere Möglichkeit, um über die Kreuzung einer diploiden mit einer tetraploiden Ausgangsform, einer Chromosomenverdopplung durch Colchicinierung und einen weiteren Kreuzungsschritt mit der diploiden Ausgangsform neue *B. napus*-Formen zu erstellen, beschreibt CLAUSS (1975). Allerdings wird die Synthese neuer Rapsformen häufig durch Selbstinkompatibilitäts-Mechanismen erschwert oder verhindert. Erst mit modernen *Embryo rescue*-Methoden können erfolgreich größere Nachkommenzahlen je Kreuzung erstellt werden (FRIEDT, 2007).

1.3.3 Bedeutung und Verwendung von Raps

Raps ist allein schon aus botanischer Sicht eine sehr vielfältige Pflanze. So erlauben es die verschiedenen Formen, dass Raps in fast allen Klimazonen der Erde angebaut wird, sogar in Gebieten mit kühlen oder kurzen Sommern ermöglichen die Sommerraps-Sorten den Anbau dieser Ölfrucht (DOWNEY UND RÖBBELEN, 1989).

Archäologische Funde belegen den Anbau und die Nutzung von Raps in Norddeutschland zur Ölsaaterzeugung bereits im 16. Jahrhundert (KROLL, 1994), wobei die Nutzung von Pflanzen zur Ölgewinnung allgemein schon wesentlich früher einsetzte. So existieren erste Berichte über die Ölgewinnung in Deutschland durch Pressen aus dem Jahr 1100 (SCHUSTER, 1992), und SCHRÖDER-LEMBKE (1976) berichtet von einem fetthaltigen Lebensmittel unter der Bezeichnung „Raepsaet“ um 1366 in den Niederlanden, wobei bemerkt werden muss, dass in jener Zeit noch nicht zwischen *B. napus* und *B. rapa* unterschieden wurde (KÖRBER-GROHNE, 1987). Erst 1833 wurden Raps und Rübsen botanisch unterschieden (SCHRÖDER-LEMBKE, 1976).

Lange Zeit bis in die zweite Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde Raps als Grünfütterpflanze aber auch als Schnittkohl für die menschliche Ernährung angebaut, jedoch vorrangig zur Gewinnung von Ölen, die dann als Brennstoff oder Lampenöl genutzt und aufgrund der hellen und raucharmen Flamme geschätzt wurden (FUSSELL, 1955; KÖRBER-GROHNE, 1987; DOWNEY UND RÖBBELEN, 1989). Auch zur Herstellung von Seifen wurde Rapsöl verwendet (KÖRBER-GROHNE, 1987; DOWNEY UND RÖBBELEN, 1989; SCHRÖDER-LEMBKE, 1989). Aufgrund der besseren Eigenschaften im Vergleich zu Petroleum-Produkten lieferte Raps einen wichtigen Rohstoff für die Industrie als Schmierstoff und auch in der Gerberei als Lederöl (KÖRBER-GROHNE, 1987; DOWNEY UND RÖBBELEN, 1989). Auch in Mischungen mit Mohn- und/oder Leinöl wurde Rapsöl als Speiseöl verwendet (KÖRBER-GROHNE, 1987), wobei bis ins frühe 19. Jahrhundert ungemischtes Leinöl bevorzugt wurde (SCHRÖDER-LEMBKE, 1989). Erst aufgrund steigender Preise für Tran und tierische Fette wick besonders die ärmere Bevölkerung Mittel- und Ostdeutschlands auf pures Rüböl aus (SCHRÖDER-LEMBKE, 1989). Die Nachfrage an Pflanzenölen stieg stetig, besonders als durch die Industrie verstärkt Schmieröle nachgefragt wurden und als die Herstellung von Linoleum ab 1860 begann und Pflanzenöle auch in Form von Margarine für die menschliche Ernährung eingesetzt wurden (KÖRBER-GROHNE, 1987; SCHUSTER, 1992). Auch eine stark zunehmende Bevölkerungszahl beeinflusste die Nachfrage positiv. Erst Ende des 19. Jahrhunderts sanken die Anbauzahlen sowohl durch die Freihandelspolitik und die damit entstehende Konkurrenzsituation mit importierten Ölen tropischer Ölpflanzen der französischen Kolonien, als auch durch die Einführung von Petroleum (SCHRÖDER-LEMBKE, 1989). Bis in die 50er Jahre wurde die Produktion von Ölraps stark beeinflusst durch die Kriegsindustrie und agrarpolitische Maßnahmen zur Sicherung der Versorgung im Krieg (steigende

Anbauzahlen, z.B. bis zu 304.000 ha im Jahr 1944), während zuvor durch die Liberalisierung der Einfuhr die Anbaufläche stark gesunken war (bis 5.000 ha im Jahr 1933). Der Beginn eines echten Aufschwunges des Rapsanbaus setzte ab 1966 mit der Einführung der EG-Markordnung, der Unabhängigkeit der Kolonien und dem Beginn der Qualitätsrapszüchtung ein (SCHRÖDER-LEMBKE, 1989; SCHUSTER, 1992).

Die heutige Rapsanbaufläche und -nutzung ist den großen züchterischen Fortschritten der Rapszüchtung zu verdanken, die Anfang des 20. Jahrhunderts mit systematischen Züchtungsversuchen von Prof. Kurt von Rümker in Breslau begann. Es folgten gezielte Auslesen durch den schlesischen Landwirt Curt Janetzki in Neisse und auf Poel durch den Landwirt Hans Lembke. Die ersten Züchtungsschritte waren auf Winterhärte und anschließend auf Ertragssteigerung gerichtet. Bereits nach dem ersten Weltkrieg wurde auch auf eine bessere Standfestigkeit und platzfestere Schoten selektiert um eine Mechanisierung der Ernte zu ermöglichen, ebenso auf zügigere Jugendentwicklung und gute Regenerationsfähigkeit als züchterische Antwort auf den Befall mit Erdfloh und Rapsglanzkäfer (SCHRÖDER-LEMBKE, 1989).

Den wesentlichen Erfolg brachten dann mit dem Beginn der Qualitätsrapszüchtung (1973) die Einführung des 0-Rapses (erucasäurefreier Raps), mit dem eine starke Verbesserung der Ölqualität und des Geschmacks des Speiseöls erreicht wurde. Es folgte 1986 der 00-Raps, der neben Erucasäurefreiheit auch einen stark verminderten Gehalt an Glucosinolaten, d.h. an antinutritiven Inhaltstoffen und Bitterstoffen aufwies. Rapsschrot konnte somit verstärkt als Eiweiß liefernder Bestandteil in der Tierernährung eingesetzt werden. 1996 wurden Hybridsorten eingeführt, die eine weitere Ertragssteigerung brachten (SCHRÖDER-LEMBKE, 1989). Um die Qualität des Rapsöls als Nahrungsmittel weiter zu verbessern, besteht ein weiteres Zuchtziel darin, die Fettsäurezusammensetzung zu verändern (SCHRÖDER-LEMBKE, 1989).

Die Rapszüchtung fokussierte ab Mitte der 60er Jahre auch die Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten. So begannen französische Züchter hinsichtlich der Wurzelhals- und Stängelfäule, verursacht durch *Phoma lingam*, zu selektieren. Heute nimmt die Resistenzzüchtung neben der Qualität, dem Ertrag und agronomischen Faktoren einen hohen Stellenwert ein. Neben *Phoma lingam* werden vor allem auch Pilzkrankheiten wie die Rapswelke (*Verticillium longisporum*), die Graufleckenkrankheit (*Cylindrosporium concentricum*), Kohlhernie (*Plasmidiophora brassicae*) sowie die Weißstängeligkeit (*Sclerotinia sclerotiorum*) intensiv bearbeitet. Bei den Viruskrankheiten steht die Entwicklung einer Resistenz gegenüber TuYV im Vordergrund (FRAUEN, 2007a; FRAUEN, 2007b).

Rapsöl findet heute sowohl in der Industrie als auch verstärkt in der menschlichen Ernährung als Speiseöl Verwendung. Pressrückstände wie Rapsschrot bzw. Rapskuchen sind als hochwertiges Tierfutter geschätzt. In der Industrie werden vor allem Schmierstoffe, Reinigungsmittel, Kosmetika und Biodiesel aus Raps gewonnen. Einen zusätzlichen Wert wird dem Raps als Bienenweide zugesprochen. In der Energiegewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen wird Raps zur Produktion von Biodiesel verwendet (UFOP, 2006; BRAUER, 2007).

Sehr geschätzt war und ist Raps in der Fruchtfolge, da er als Tiefwurzler durch seine intensive Durchwurzelung von Böden Verdichtungen durchdringen kann und eine Durchlüftung bis in tiefere Bodenschichten ermöglicht. Neben der Verbesserung der Bodenstruktur wird durch die lange Vegetationszeit von gut 11 Monaten und der langen Bodenbedeckung auch der Bodenerosion vorgebeugt. Raps hat einen hohen Stickstoffbedarf und noch im Herbst auch eine entsprechende Stickstoffaufnahme, wodurch Nährstoffe gebunden werden und einer Auswaschung vorgebeugt wird (UNILEVER / UFOP, 2007).

1.4 Markergestützte Selektion

Die Züchtung hinsichtlich ausgewählter Merkmale, wie z.B. Resistenzen gegenüber Viren, wird durch molekulare Markertechniken wesentlich erleichtert (RIBAUT UND HOISINGTON, 1998). Eine Vorselektion über die Identifizierung wichtiger Major-Gene und QTLs (Quantitative Trait Loci) mit molekularen Markern kann dazu beitragen, die Größe der Zuchtpopulationen bereits in einem frühen Stadium des Zuchtprozesses zu verringern (RIBAUT UND HOISINGTON, 1998). Dies würde beispielsweise im Falle der TuYV-Resistenz bedeuten, dass aufwendige und kostspielige Arbeiten zur Phänotypisierung über die künstliche Infektion mit virustragenden Blattläusen im Zuchtgarten und anschließendem arbeitsintensivem serologischem Nachweis stark reduziert werden könnten.

Die markergestützte Selektion bringt noch weitere Vorteile: So ist die Identifizierung erwünschter Genotypen bereits in einem sehr frühen Stadium möglich, ohne dass dabei die Pflanze Schaden nimmt. Im Falle von codominanten Markern können homozygote und heterozygote Pflanzen anhand des Bandenmusters identifiziert und unterschieden werden, wodurch direkt vom Phänotyp auf den Genotyp geschlossen werden kann. Auch ist die Aussage von Markeranalysen von Umwelteinflüssen unbeeinflusst, womit objektive Ergebnisse erzielt werden können (RIBAUT UND HOISINGTON, 1998; SUWABE ET AL., 2002).

1.4.1 Simple Sequence Repeats (SSRs)

Für die markergestützte Selektion stehen verschiedene Markertechniken zur Verfügung. SUWABE ET AL. (2002) beschreiben den Einsatz von SSRs (*Simple Sequence Repeats*), die im ganzen Genom verteilt recht häufig vorkommen. SSRs sind kurze, mehrfach wiederholte Nucleotid-Motive von bis zu 5 bp (Basenpaare), die zumeist mindestens 6 Wiederholungen dieser Motive aufweisen (LAGERCRANTZ ET AL., 1993; KRESOVICH ET AL., 1995). Flankiert werden diese Mikrosatelliten von hoch konservierte Regionen, welche es erlauben Primer zum PCR Nachweis von SSRs abzuleiten (WEBER UND MAY, 1989; KRESOVICH ET AL., 1995).

SSRs sind hochpolymorph, i.d.R. locuspezifisch und ihre codominante Vererbung ermöglicht eine einfache Auswertung (KRESOVICH ET AL., 1995). Die Analyse erfolgt über eine PCR (*Polymerase Chain Reaction*; MULLIS UND FALOONA, 1987), wodurch auch große Mengen an Genotypen problemlos analysiert werden können (SUWABE ET AL., 2002). Die einfache Nutzung in automatisierten Systemen sowie die Möglichkeit mehrere SSRs gleichzeitig zu analysieren (Multiplex PCR), stellen große Vorteile der SSRs hinsichtlich Kosten- und Zeitersparnis dar (KRESOVICH ET AL., 1995).

Besonders für fluoreszenzbasierte Systeme bietet sich die Möglichkeit der Kostenverringerung durch die Modifizierung eines Primers (z.B. Forward-Primer), der mit einem etwa 19bp langem „tail“ versehen wird. Die Länge kann je nach Verwendung unterschiedlicher Tails variieren. Die Sequenz dieses Tails ist identisch mit der Sequenz eines dritten Universal-Primers, der eine Fluoreszenz-Markierung trägt. In einer PCR, in der die drei Primer (getailter forward-Primer, reverse-Primer und markierter Universal-Primer) sowie ggf. veränderte Cycloer-Programme verwendet werden, werden Fragmente amplifiziert, die um die Länge des Universal-Primers größer sind (OETTING ET AL., 1995).

1.4.2 Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs)

Die AFLP-Technik (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*; VOS ET AL., 1995) stellt ebenfalls eine PCR-basierte Methode dar, die zunächst auf dem Verdau der genomischen DNA mit einer häufig und einer selten schneidenden Restriktionsendonuklease basiert. Auf diese Weise werden DNA-Fragmente erzeugt, an welche in einem nächsten Schritt kurze doppelsträngige Adapter ligiert werden. Unter Verwendung von Primern, die komplementär zu den Schnittstellen und den Adaptoren sind, sowie in weiteren Amplifikations-Schritten ein bis drei zusätzlich am 3'-Ende angefügte „selektive“ Basen besitzen, kann die Anzahl amplifizierbarer DNA-Fragmente reduziert werden, d.h. es werden nur DNA-Fragmente amplifiziert, die komplementär zur Sequenz der Adaptoren und den selektiven Basen sind. Schon ein

selektives Nucleotid reduziert die Anzahl amplifizierbarer Fragmente auf 1/16. Da die Amplifikate aus dem ganzen Genom stammen, erlaubt diese Methode eine Einschätzung der genomweiten Variation (MEUDDT UND CLARKE, 2007).

Je nach Analyse-Verfahren kann im letzten Amplifikationsschritt der selektive Primer (zugehörig zum selten-schneidenden Enzym) z.B. mit einer Fluoreszenzfarbstoffmarkierung gewählt werden. Die Auftrennung der Fragmente kann sowohl über Polyacrylamid-Gelelektrophorese als auch über kapillarbasierte Sequenzierer erfolgen. Die AFLP-Technik ist hochreproduktiv, robust, informativ und liefert wenige Reaktions-Artefakte. Mit dieser Technik kann uncharakterisierte DNA analysiert und amplifiziert werden, von der noch keine Sequenzinformationen vorliegen. Da allerdings AFLPs ein überwiegend dominantes Markersystem sind, kann durch dieses Analyse-Verfahren keine Heterozygotie detektiert werden (MEUDDT UND CLARKE, 2007).

1.4.3 Sequence Tagged Sites (STS) und Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)

Eine weitere molekulare Markertechnik stellen sogenannte STSs (*Sequence Tagged Sites*) dar. Das sind auf kurzen DNA-Sequenzen beruhende Marker, die nur einmal im haploiden Genom vorkommen (SEYFFERT, 2003). Ausgehend von einer bekannten Ziel-Sequenz, die z.B. aus einem sequenzierten AFLP-Marker isoliert wurde, können geeignete Primer entwickelt werden, die dieses Fragment in einer PCR-Reaktion amplifizieren. Dieses Verfahren bietet sich an, um aus identifizierten und sequenzierten polymorphen AFLP-Fragmenten einfach zu handhabende Marker zu entwickeln.

Liegt ein Polymorphismus vor, der lediglich auf einen Basenaustausch (SNP, *Single Nucleotide Polymorphisms*) innerhalb der Zielsequenz basiert, können SSR- und STS- Marker kein Ergebnis liefern, es sei denn dieser SNP ist in der Primersequenz lokalisiert. Ist der Basenaustausch jedoch innerhalb einer Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuclease lokalisiert, so kann er in Form eines CAPS-Markers genutzt werden, bei dem das PCR-Produkt zur Identifizierung des Polymorphismus mit entsprechenden Restriktionsendonucleasen geschnitten wird (KONIECZNY UND AUSUBEL, 1993; SEYFFERT, 2003).

1.4.4 Markergestützte Selektion in der Rapszüchtung

In der Rapszüchtung wird die markergestützte Selektion hinsichtlich verschiedener Zuchtziele genutzt. So fasst FRAUEN (2007a) die Ziele in die vier Merkmalkomplexe

Pflanzentyp, Cytoplasmatische männliche Sterilität, Krankheitsresistenz und Samenölqualität zusammen.

Für die Samenfarbe (Merkmalskomplex Pflanzentyp) konnten zum einen ZHI-WEN ET AL. (2005) und RAHMAN ET AL. (2007) Marker entwickeln, die eine enge Kopplung mit dem Hauptgen für die Gelbsamigkeit bzw. für die Schwarzsamigkeit zeigen. Zum anderen konnten BADANI ET AL. (2006) einen Haupt-QTL sowie weitere Minor-QTLs identifizieren. Hinsichtlich des Merkmals der Platzfestigkeit der Schoten entwickelten MONGKOLPORN ET AL. (2003) RAPD-Marker (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

In Bezug auf das Merkmal „cytoplasmatische männliche Sterilität“ für Hybrid-Züchtungsprogramme konnten z.B. DELOURME ET AL. (1998) mit dem Restorer-Gen eng gekoppelte Marker für das Ogura-INRA System entwickeln. HONG ET AL. (2008) entwickelten Marker für eine dominante kerngenisch bedingte männliche Sterilität (*Dominant Genic Male Sterility*, DGMS).

Hinsichtlich des Merkmalkomplexes Krankheitsresistenz wurden für die *Phoma lingam*-Resistenz eng gekoppelte Marker entwickelt (PLIESKE UND STRUSS, 2001), sowie Resistenzgene in *B. rapa* für die Introgression in *B. napus* kartiert (LEFLON ET AL., 2007). Für eine Resistenz gegenüber *Verticillium longisporum* konnten bisher zwei QTL-Regionen identifiziert werden (RYGULLA ET AL., 2007).

Ferner wurden in Bezug auf die Ölqualität Marker entwickelt, die eng mit dem Gehalt an Öl- und Linolensäure gekoppelt sind (JAVIDFAR ET AL., 2006). Für den Linolen- und Erucasäure entwickelten RAJCAN ET AL. (1999) brauchbare Marker, und hinsichtlich des Glucosinolatgehaltes konnten HOWELL ET AL. (2003) mehrere QTLs identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Phänotypisierung

2.1.1 Pflanzenmaterial

Als Grundlage der Arbeiten für die Entwicklung molekularer Marker sowie für die genetische Analyse und die Kartierung dienten 111 DH-Linien aus drei verschiedenen Kreuzungen „TuYV-anfällig x TuYV-resistent“, die freundlicherweise von Herrn Dr. Lutz Brahm (SW Seed Hadmersleben) zur Verfügung gestellt wurden. Die DH-Linien wurden in dreijährigen Feldversuchen angebaut, wobei im ersten Jahr neben der Überprüfung der Resistenzreaktion parallel eine Saatgutvermehrung stattfand. Hierzu wurden anhand erster ELISA-Daten je Linie drei repräsentative Pflanzen ausgewählt und in der 17. und 18. Kalenderwoche 2005 geselbstet.

Einzelheiten zu den Kreuzungskombinationen und der jeweils zur Verfügung stehenden Anzahl an DH-Linien sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Kreuzungen und Anzahl DH-Linien (Aussaat 2004), sowie Anzahl Selbstungsnachkommen der DH-Linien der Kreuzungen (Aussaat 2005 und 2006)

	SW01T5128 (Res. B) x SW01T1000 (Anf. B)	'Caletta' (Res. A) x SW01T1000 (Anf. B)	'Caletta' (Res. A) x SW01T4065 (Anf. A)
Aussaat 2004	63	37	11
Ernte Selbstungen 2005	63	37	11
Aussaat 2005, Wdh. 1	63	37	11
Aussaat 2005, Wdh. 2	62	37	11
Aussaat 2005, Wdh. 3	61	37	11
Aussaat 2006, Wdh. 1	63	37	11
Aussaat 2006, Wdh. 2	62	37	11

2.1.2 Aussaat

Die Aussaat erfolgte in randomisierten Blockanlagen mit einem Anteil TuYV-anfälliger Standards (Sorte 'Express') von 10 % zur Kontrolle des Infektionserfolges. Es wurde stets in einer Reihenlänge von 2,5m im Seedmaticverfahren gedreht mit einer Saatmenge von 0,1g/m (Abbildung 3).



Abbildung 3: Ansicht der Versuchsanlage; Quedlinburg, 10.12.2006.

Mitte November wurde in den Reihen auf einen Pflanzenabstand von mindestens 10cm per Hand vereinzelt, um für die ELISA Untersuchungen die Pflanzen eindeutig zuordnen zu können.

Die Aussaat erfolgte für die DH-Linien am 24.08.2004 im ersten Versuchsjahr, am 17.08.2005 im zweiten Versuchsjahr und am 24.08.2006 im letzten Versuchsjahr. Im ersten Versuchsjahr wurde das vom Züchter bereitgestellte Saatgut in einer Wiederholung ausgesät, im zweiten und dritten Versuchsjahr dann die Selbstungsnachkommen dieser DH-Linien in drei (2005/2006) bzw. zwei Wiederholungen (2006/2007). Je Wiederholung wurden in Abhängigkeit des verfügbaren Saatgutes 109 - 111 DH-Linien ausgesät (vergleiche Tabelle 1).

2.1.3 Virus-Übertragung

Die Virus-Übertragung erfolgte in allen Jahren mittels virustragender Blattläuse.

Für diesen Zweck wurden *Myzus persicae* (Grüne Pfirsichblattlaus) in großer Anzahl herangezogen. Zunächst wurden *M. persicae* auf virusfreien Paprika-Pflanzen vermehrt, anschließend zur Virusaufnahme auf das TuYV-Isolat BN5 (GRAICHEN UND RABENSTEIN, 1996) tragende Rapspflanzen übertragen und mit diesen TuYV-anfällige Rapspflanzen (Sorte 'Express') im Keimblattstadium infiziert. Diese infizierten Rapspflanzen wurden dann zunächst blattlausfrei in Folienzellen und Kalthäusern kultiviert. Mit fortschreitender Blatentwicklung der Rapspflanzen wurden erneut *M. persicae* auf diese Rapspflanzen gebracht und dort in Massen vermehrt. Anfang Oktober standen auf diese Weise genügend TuYV-tragende *M. persicae* für die Infektion der Rapspflanzen auf dem Feld zur Verfügung.

Im Feld erfolgte die Virusübertragung durch diese TuYV-tragenden *M. persicae* (mindestens 10 *M. persicae* je Pflanze), die auf die zu infizierenden Pflanzen gepinselt wurden (Abbildung 4).



Abbildung 4: Blattlaus-Besiedelung von Rapspflanzen im Feld; Quedlinburg, 09.10.2006.

Die DH-Linien wurden im ersten Jahr im Zeitraum vom 11.10.2004 bis 15.10.2004, etwa zu einem Entwicklungszeitpunkt mit 7-9 entfalten Laubblättern (BBCH 17-19) mit TuYV-tragenden *M. persicae* besiedelt. Im zweiten Versuchsjahr erfolgte die Besiedelung im Zeitraum vom 08.10.2005 bis zum 11.10.2005 auf sehr wüchsige Pflanzen, mit bereits mehr als acht entfalten Laubblättern (BBCH 19). Im dritten Jahr erfolgte die Besiedelung am 09.10.2006 auf vergleichsweise kleine Pflanzen mit nur 6-8 entfalten Laubblättern (BBCH 16-18).

2.1.4 Probenahme

Je DH-Linie sowie je Wiederholung und Jahr wurden zugeordnet 10 aufeinander folgende Pflanzen jeder Reihe beprobt. Für die Probenahme wurden Multitopfplatten (150er) verwendet, in die das Pflanzenmaterial der Reihe nach gesteckt wurde. Es wurden stets Blattproben aus den mittleren Pflanzenabschnitten genommen. Das Pflanzenmaterial wurde bis zur weiteren Verarbeitung in diesen Multitopfplatten mit deionisiertem Wasser angefeuchtet bei 4-6°C in Tüten eingeschlagen gelagert.

2.1.5 Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immonosorbent Assay (DAS-ELISA)

Für den Nachweis der Resistenzreaktionen der DH-Linien wurden stets im DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immonosorbent Assay) polyklonale Antikörper (IgG 70 und Konjugat 70) verwendet, welches freundlicherweise von Herrn Dr. Frank Rabenstein (Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik) zur Verfügung gestellt wurde (RABENSTEIN, 1998). Der DAS-ELISA wurden in Anlehnung an CLARK UND ADAMS (1977) durchgeführt (Anhang 10.2).

Die Auswertung der gefärbten ELISA-Platten erfolgte mit einem an einen PC angeschlossenen ELISA-Reader (OpsysMR, ThermoLabsystems) bei einer Wellenlänge von 405nm. Durch Umrechnung dieser Absorbtiions-Werte in einen optischen Dichte-Wert und durch die Einbeziehung der Blank-Werte (Hintergrundfärbung der Platte und des Puffers) stehen letztendlich Werte zur Verfügung, die eine Aussage über den Virus-Gehalt der einzelnen Proben ermöglichen. Anhand der stets mitgeführten Negativ-Kontrolle kann eine Aussage über die Absorbtiion getroffen werden, die allein durch das Pflanzenmaterial verursacht wurde. Die Positiv-Kontrolle dient zur Überprüfung des Testverlaufes.

Das in dieser Arbeit bearbeitete Pflanzenmaterial wurde anhand eines von GRAICHEN (1994) festgelegten Schwellenwertes von $E_{405}=0,1$ in „resistent“ bzw. „anfällig“ eingeteilt. Des weiteren wurden die Extinktionswerte unterteilt, so dass sich eine stufenweise Einteilung der ELISA-Werte ergab (Tabelle 2).

Es wurden Mittelwerte aus den je Linie getesteten 10 Pflanzen und aus den Wiederholungen gebildet.

Tabelle 2: Unterteilung der Extinktionswerte.

Extinktionswert E_{405}	
0,000-0,099	virusfrei
0,100-0,499	anfällig
0,500-0,999	
1,000-1,499	
1,500-1,999	
2,000-2,499	

2.1.6 Nachweis der Resistenzreaktion der DH-Linien mittels DAS-ELISA

Eine Überprüfung der Viruskonzentration und somit der Resistenzreaktion der DH-Linien erfolgte wie beschrieben mittels DAS-ELISA. Hierzu wurden im ersten Versuchsjahr in einer Wiederholung zu drei Terminen (Anfang Dezember 2004, d.h. 6-8 Wochen nach Inokulation, Anfang April 2005, Mitte Juni 2005) Blattproben von 10 Pflanzen je Linie (zugeordnet) genommen und zu einem zusätzlichen Termin (11.05.2005) lediglich von den für die Selbstung ausgewählten Pflanzen.

Der Nachweis der Resistenzreaktion der Selbstungsnachkommen der DH-Linien erfolgte im zweiten Versuchsjahr in drei Wiederholungen Anfang Dezember 2005, in gleicher Weise wie im Vorjahr mittels DAS-ELISA, sowie Ende April 2006 und Ende Mai 2006. Hierzu wurden ebenfalls Blattproben von 10 Pflanzen je Linie (zugeordnet) genommen. Auch im dritten Versuchsjahr erfolgte dieser Nachweis mittels DAS-ELISA in zwei Wiederholungen Anfang Dezember 2006, im April 2007 sowie zu einem letzten Termin Ende Mai 2007. Die genauen Termine sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Generell erfolgte die erste Testung ab 6-8 Wochen nach Inokulation, die zweite Testung sobald die Pflanzen nach dem Winter Wachstum zeigten (d.h. etwa mit Beginn des Längenwachstums, BBCH 30), die dritte und letzte Testung im BBCH-Makrostadium 7 – Fruchtentwicklung.

Tabelle 3: Probenahme-Termine für den Nachweis der Resistenzreaktion.

	1. Testung	2. Testung	3. Testung
DH-Linien, 2004/2005	02.12.2004-08.12.2004	06.04.2005-12.04.2005	16.06.2005-21.06.2005
DH-Linien, 2005/2006	24.11.2005-13.12.2005	20.04.2006-26.04.2006	22.05.2006-29.05.2006
DH-Linien, 2006/2007	04.12.2006-05.12.2006	03.04.2007-09.04.2007	18.05.2007-23.05.2007

Die Aussaat 2004, die Infektion dieser DH-Linien mit TuYV-tragenden *M. persicae* sowie die Überprüfung der Resistenzreaktion im Dezember 2004 wurde dankenswerterweise in einem Vorprojekt von Claudia Paetsch – Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz – durchgeführt.

2.2 Identifizierung polymorpher SSRs und Entwicklung molekularer Marker

2.2.1 DNA-Extraktion

Im April und Mai 2005 (21.04.2005 bis 10.05.2005) wurde Blattmaterial von den drei repräsentativ ausgewählten und im ersten Versuchsjahr geselbsteten Pflanzen je Linie sowie den Eltern geerntet und gefriergetrocknet. Je Linie wurde jeweils von der ersten dieser drei Pflanzen DNA nach einer modifizierten CTAB-Methode (MURRAY UND THOMPSON, 1980) isoliert (Anhang 10.4).

2.2.2 Identifizierung polymorpher SSRs und AFLPs

2.2.2.1 Zusammenstellung der Bulks für die Bulk Segregant Analysis

Die Identifikation polymorpher Marker erfolgte unter Verwendung der 'bulk segregant analysis' (MICHELMORE ET AL., 1991). Zu diesem Zweck wurden Bulks entsprechend der ELISA-Daten zusammengestellt für die Kreuzung Res. B (SW01T5128) x Anf. B (SW01T1000) sowie für die Kreuzung Res. A ('Caletta') x Anf. B (SW01T1000) (Tabelle 4). Aufgrund der geringen Anzahl DH-Linien der Kreuzung Res. A ('Caletta') x Anf. A (SW01T4065) wurde diese Kreuzungskombination zunächst nicht in die 'bulk segregant analysis' einbezogen. Da sich im Verlauf der Vegetationsperiode eine Erhöhung des Virustiters bei einem Teil der im Dezember als resistent eingestuften Pflanzen zeigte (s.u.), wurden drei verschiedene Bulks für die im Dezember als resistent eingestuften DH-Linien entsprechend der Virustiterentwicklung zusammengestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Merkmale und Zusammenstellung der Bulks

	Res. B x Anf. B	Res. A x Anf. B	Beschreibung
Bulk A:	6 Pflanzen	8 Pflanzen	Linien virusfrei,
Bulk B:	7 Pflanzen	4 Pflanzen	Linien „spät anfällig“
Bulk C:	7 Pflanzen	7 Pflanzen	Linien anfällig

2.2.2.2 SSRs

Basierend auf den in Anhang 10.5 genannten Protokollen wurden 200 SSRs im Hinblick auf Polymorphismen zwischen den genannten Bulks analysiert. Um eine Detektion mit fluoreszenzbasierten Verfahren zu ermöglichen, wurden alle SSRs mit

einem M13-Tail versehen (vergl. OETTING ET AL., 1995) und in der PCR-Reaktion wurde mit einem Cy5-markierten M13-Primer gearbeitet.

Ein Set mit Mikrosatelliten-Primern, der M13-Primer, das PCR-Protokoll sowie die dazugehörigen Amplifikationsbedingungen (Anhang 10.5) wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Rod Snowdon, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, Universität Giessen, zur Verfügung gestellt. Eine Modifikation erfolgte lediglich hinsichtlich der eingesetzten DNA-Menge, die auf 50ng je 10µl-Ansatz erhöht wurde.

Die Analyse erfolgte auf dem Kapillarsystem Beckman Coulter CEQ 8000 mit 0,3µl 400bp-Standard und 0,1-0,2µl PCR-Produkt (je nach Signalstärke) in einem 30µl Mix.

Nach der Identifikation von Polymorphismen zwischen resistenten und anfälligen Bulks wurden zunächst die entsprechenden SSRs auf den Eltern überprüft. Es folgte eine Überprüfung auf den Einzelpflanzen der Bulks und in einem letzten Schritt auf den nicht in den Bulks vertretenen Einzelpflanzen. Aus der Region um die identifizierten polymorphen SSRs wurden anhand einer in PIQUEMAL ET AL. (2005) veröffentlichten Karte weitere SSRs ausgewählt, um die Region weiter mit Markern abzusättigen. Diese SSRs stammten zum einen aus der öffentlich zugänglichen Datenbank BRASSICADB (2006-2007) und zum anderen von einem privaten Konsortium (Celera AgGen Consortium) und wurden in LOWE ET AL. (2004) und PIQUEMAL ET AL. (2005) veröffentlicht.

2.2.2.3 AFLPs

Neben Mikrosatelliten wurde zur Identifikation weiterer Marker die AFLP-Technik (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) unter Verwendung des selten schneidenden Enzyms *EcoRI* (Erkennungssequenz 5'-G↓AATTC-3') und des häufig schneidenden Enzyms *MseI* (Erkennungssequenz 5'-T↓TAA-3') eingesetzt. Es wurde mit dem AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen) gearbeitet und insgesamt 256 *EcoRI*+ANN / *MseI*+CNN Primerkombinationen analysiert, bei denen jeweils der *EcoRI*-Primer mit einer Cy5-Markierung versehen war. Nach der +1 Preamplifikation wurden Bulks zusammengestellt, die denen in der Mikrosatelliten-Analyse entsprachen.

Für die Schritte „Restriktionsverdau“ und „Ligation der Adapter“ wurde das mitgelieferte Protokoll zum AFLP Core Reagent Kit von Invitrogen genutzt. Die +0/+1 Preamplifikation und die +3 Amplifikation wurde modifiziert nach SCHIEMANN ET AL. (1999) und VOS ET AL. (1995) (Anhang 10.6) durchgeführt. Die Analyse der Bulks erfolgte auf dem automatischen Sequenzierer ALFexpress™ (Pharmacia Biotech/GE Healthcare) im Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik und wurde wie folgt durchgeführt.

Hierzu wurden 2µl PCR-Produkt in 3µl Loadingpuffer (5mg Blue Dextran 2000, [Pharmacia Biotech AB] in 1ml deionisiertem Formamid) verdünnt, 2 Minuten bei 95°C denaturiert und komplett aufgetragen. Als Gelmatrix wurde ReproGel™ - High Resolution (GE Healthcare) verwendet. Das Gel wies eine Trennstrecke von 200mm bei einer Stärke von 0,3mm auf. Es wurde stets ein Taschenkamm mit 40 Taschen verwendet. Als Ladepuffer wurde 1xTBE verwendet (Anhang 10.7).

Die Probenauftrennung erfolgte bei 1500V / 60mA / 30W und einer Temperatur von 50°C über 400 Minuten. Die Banden wurden bei 632,8nm fluorometrisch erfasst.

Nach Identifikation polymorpher AFLP-Kombinationen in den Bulks wurden entsprechend der Vorgehensweise bei den SSRs zunächst die Eltern und die Einzelpflanzen der Bulks mit diesen Kombinationen überprüft und bei gegebener Übereinstimmung der Phänotyp-Daten mit den AFLP-Daten wurden abschließend die nicht in den Bulks vertretenen Einzelpflanzen analysiert. Diese Auftrennungen erfolgten auf dem LI-COR 4300 DNA-Analyzer (LI-COR Biosciences). Die Pufferzusammensetzungen sind Anhang 10.8 zu entnehmen.

Die Auftrennung auf dem LI-COR erfolgte in 25cm Gelen mit einer Stärke von 0,25mm unter Verwendung eines 48er Haifisch-Kamms. Nach einem Pre-Run (20 Minuten, Spannung 1500V, Stromstärke 40 mA, Leistung 40W, Temperatur 48°C) wurde 1µl je Probe (0,5µl Ladepuffer + 0,5µl PCR-Produkt, 3 Minuten bei 94°C denaturiert, dann sofort in Eis) und (ebenfalls 3 Minuten denaturiert) 1,2µl Sizer™ 50-500 aufgetragen und die Elektrophorese für 5h 30min (Spannung 1500V, Stromstärke 40 mA, Leistung 40W, Temperatur 48°C) durchgeführt. Die Läufe mit den übrigen Einzelpflanzen wurden entsprechend der erwarteten Fragmentgröße zeitlich verkürzt.

2.2.3 Entwicklung von Sequence Tagged Sites (STS)

2.2.3.1 Vorbereitung der Fragmente für die Klonierung

AFLP-Kombinationen mit enger Kopplung zur Resistenz wurden zunächst auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Silberfärbung (Anhang 10.9) sichtbar gemacht (Abbildung 5). Die differenzierenden Fragmente wurden ausgeschnitten und in 40µl TE-Puffer (mit 10mM Tris, 1mM EDTA, pH8) gelöst. Der Gelrest wurde abzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

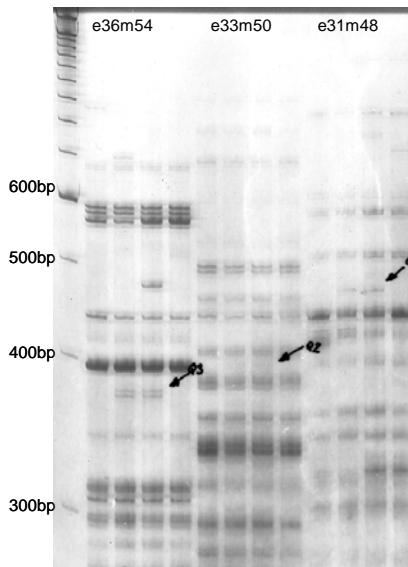


Abbildung 5: Polyacrylamid-Gel mit Silberfärbung. Die Pfeile kennzeichnen zwischen resistenten und anfälligen Genotypen differenzierende Fragmente in den AFLP-Kombinationen E36M54 (links), E33M50 (Mitte) und E31M48 (rechts).

Mit 5µl des Überstandes wurde eine Reamplifikation nach dem Protokoll der +3 Amplifikation durchgeführt. Hierzu wurden adapterspezifische Primer verwendet, welche am Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsanstalt für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz von Herrn Dr. Marc Zahn entwickelt wurden. Dieses Verfahren erlaubt eine sehr kostengünstige Klonierung von AFLP-Fragmenten und führt zu mehr rekombinanten Klonen im Vergleich zur TA-Klonierung.

Es wurden die folgenden Primer verwendet:

MSE-BamHI 5'-CGG↓GATCCGATGAGTCCTGAGTAA-3'

ECO-EcoRI 5'-GG↓AATTCGACTGCGTACCAATTC-3'

Die Sequenz des *Mse*I-AFLP-Primers (unterstrichen) wurde um eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle (fett) und die Sequenz des *Eco*RI-AFLP-Primers (unterstrichen) um eine *Eco*RI-Restriktionsschnittstelle (fett) verlängert. Beide Primer wurden am 5'-Ende durch einen Basen-Überhang verlängert um die Aktivität der Restriktionsenzyme zu optimieren.

Der genaue Vorgang, ausgehend von der Ausgangs-DNA über die AFLP-Reaktionen bis zur Anlagerung der Schnittstellen, ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Anlagerung

der Schnittstellen erfolgte, um die Insertion der Fragmente in den Klonierungsvektor, der ebenfalls über diese beiden Schnittstellen verfügt, zu ermöglichen.

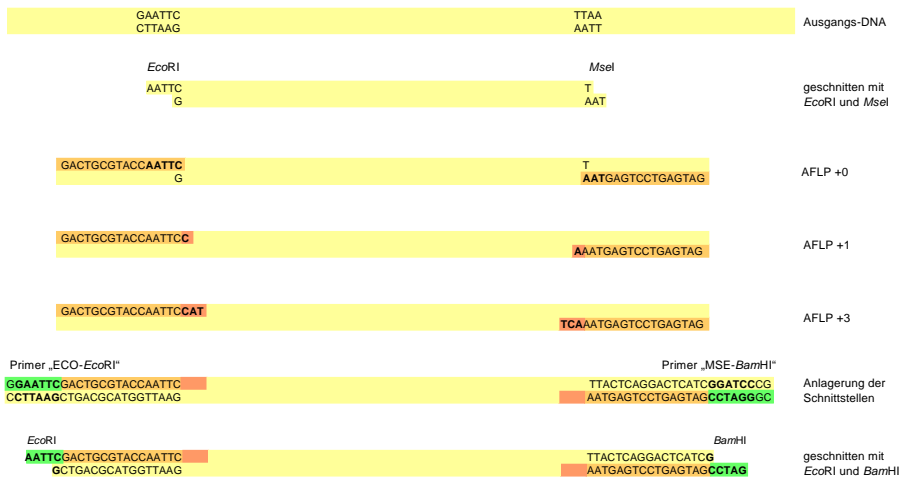


Abbildung 6: Von der Ausgangs-DNA über die AFLP-Reaktionen zur Anlagerung der Schnittstellen.

Es wurden 15pmol in einem 50µl-Ansatz je Primer eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden über eine Membran aufgereinigt.

2.2.3.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung der für die Klonierung benötigten kompetenten Zellen erfolgte nach INOUE ET AL. (1990), modifiziert nach M. Zahn - Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz. Es wurde der Bakterienstamm XL2 (Stratagene) mit Tetracyclin-Resistenz verwendet.

Die Bakterien wurden zunächst auf einer LB-Platte (Anhang 10.10) mit 10µg/ml Tetracyclin (Stratagene) ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert, und ausgehend von einer Einzelkolonie 300ml LB-Medium (Anhang 10.10) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180rpm wachsen gelassen. Mit 2,5ml dieser Bakterienkultur wurden 250ml SOB-Medium (Anhang 10.10) in einem 1000ml-Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 18°C und 70rpm kultiviert bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Die Zentrifugationsschritte wurden in einer Hettich Universal 30RF Zentrifuge bei

2500 x g durchgeführt und die Bakterienpellets nach dem ersten Zentrifugationsschritt in 80ml bzw. nach dem zweiten in 20ml TB gelöst (Anhang 10.10). Die zweite Bakteriensuspension wurde mit 1,4ml DMSO (Duchefa) versetzt und die kompetenten Zellen nach 10 Minuten in Eis in 200µl-Aliquots aufgeteilt.

Zur Überprüfung der Transformations-Effizienz wurde eine Transformation mit einer definierten Menge Plasmid-DNA durchgeführt. Hierfür wurden die kompetenten Zellen in Eis aufgetaut und 5µl pUC19-DNA (10pg/µl, Invitrogen) zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation im Eisbad und 30 Sekunden Hitzeschock bei 42°C wurden 200µl SOC (Invitrogen) zugefügt und 1 Stunde bei 180rpm und 37°C inkubiert. Ausplattiert wurde in verschiedenen Mengen (25µl, 50µl, 100µl und 200µl) auf LB-Platten mit 2 % (w/v) Agar Noble (Difco) und 0,1mg/ml Ampicillin und die Kolonien über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Anhand der Anzahl Transformanten je LB-Platte, der Ausgangs-DNA und der Auftragsmenge wurde die Zahl Transformanten je µg DNA, d.h. die Transformations Effizienz errechnet.

2.2.3.3 Klonierung

Für die Klonierung wurde mit dem Plasmid pBluescript SK+ (Stratagene) gearbeitet. Hierzu wurden zunächst 2,5ml LB-Medium mit 0,1mg/ml Ampicillin versetzt, mit dem *E. coli*-Bakterienstamm, der XL2 pBlueskript sk+ enthält, angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Es wurde anschließend eine alkalischen Lyse verändert nach BIRNBOIM UND DOLY (1979) durchgeführt (Anhang 10.11).

Es wurde sowohl mit dem Plasmid als auch mit den um die Restriktionsschnittstellen erweiterten AFLP-Fragmenten ein Doppelverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI (beide Fermentas) entsprechend der Empfehlung des Herstellers durchgeführt. Die Produkte wurden auf ein Agarosegel (Anhang 10.12) aufgetragen, die Fragmente ausgeschnitten und mit dem QiaQuick-Gelextraction-Kit (Qiagen) aufgereinigt. Eine Ligation der Fragmente in das Plasmid wurde entsprechend dem Ligationsprotokoll der T4 DNA Ligase (USB Corporation) durchgeführt.

Wie bereits für die Überprüfung der Transformations Effizienz beschrieben, wurden die rekombinanten Plasmide (10-75ng) per Hitzeschock bei 42°C in die kompetenten Zellen transformiert und auf je zwei LB-Platten mit 2 % (w/v) Agar Noble (Difco) und 0,1mg/ml Ampicillin, beschichtet mit je 1,6mg X-Gal (Roth) und 0,8mg IPTG (Roth) für eine Farbselektion, aufgetragen. Je Transformationsansatz wurden auf einer Platte 40µl und auf einer zweiten Platte die restlichen ca. 355µl der Zellsuspension ausplattiert und die Kolonien über Nacht bei 37°C wachsen gelassen.

Es wurden zunächst die Kolonien ausgezählt und je Klonierung zur Überprüfung möglicher falsch-positiver mit mindestens 10 weißen Kolonien eine Kolonie-PCR

durchgeführt. Die Pipettenspitzen mit den gepickten Kolonien verblieben ca. 5 Minuten im PCR-Ansatz und bildeten auf diese Weise das Template. Aus den Kolonien mit einem positiven Signal wurden Übernachtskulturen in 2,5ml LB-Medium und 0,1mg/ml Ampicillin angesetzt und bei 37°C und 180rpm inkubiert. Die Plasmide wurden zunächst mittels alkalischer Lyse aufgereinigt, um dann einen Probeverdau mit dem Enzym *Bam*HI (Fermentas) entsprechend der Empfehlungen von Fermentas zur Überprüfung der klonierten Fragmente durchzuführen.

Zur Langzeitlagerung der Klone wurden Glycerinkulturen erstellt [Übernachtskultur 1:1 gemischt mit Glycerin (C₃H₈O₃, Roth, M 92,1g/mol, 99,5 %, wasserfrei) und bei -80°C gelagert] und die Plasmidpreparationen wurden für die Sequenzierung weiterverwendet.

2.2.3.4 Sequenzierung und Entwicklung von STS

Die Sequenzierung erfolgte mit dem 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) nach modifizierten Protokollen des „BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems).

Für die Sequenzierreaktion wurde „BigDye Terminator Cycle v1.1“ 1:8 verdünnt angewendet und 200ng Plasmidpreparation eingesetzt.

Die Reinigung der Sequenzierreaktion erfolgte in einer „MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate“ (Applied Biosystems) durch eine Ethanol-fällung. Die erste Zentrifugation erfolgte bei 2500 x g für 30 Minuten und die kürzeren Zentrifugationsschritte für 1 Sekunde bei 160 x g. Nach Zugabe von 60µl 70 %igem Ethanol wurde 15 Minuten bei 1600 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 15µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems).

Je isoliertem Plasmid wurde je eine Sequenzierreaktion mit dem Forward- und je eine mit dem Reverse-Primer durchgeführt. Es wurden je Fragment fünf Klone sequenziert. Die genomischen Sequenzen wurden, wie in Abbildung 7 dargestellt, aus der Gesamtsequenz des Plasmids, der Klonierungs-Primer und der Adapter herausgesucht und die genomischen Sequenzen mit Hilfe der Programme GENEIOUS 2.5.4 (2007) und MEGA4 (2007) hinsichtlich möglicher homologer Sequenzabschnitte verglichen (alignment).

Anhand der Sequenzen wurden unter Verwendung von primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) Primer abgeleitet, die zum Teil mit einem an den Forward-Primer angehängten M13-Tail erweitert wurden, um eine fluoreszenzbasierte Auftrennung generell zu ermöglichen.

In Abhängigkeit des ermittelten GC-Gehaltes der abgeleiteten Primer wurde ein Cycler-Programm mit einem ersten Denaturierungsschritt von 3 Minuten bei 94°C, dann über 45 Cycles 1 Minute bei 94°C Denaturierung, 1 Minute bei 60°C Annealing und 2 Minuten bei 72°C Elongation und einem finalen Extensionsschritt für 10 Minuten bei 72°C verwendet.

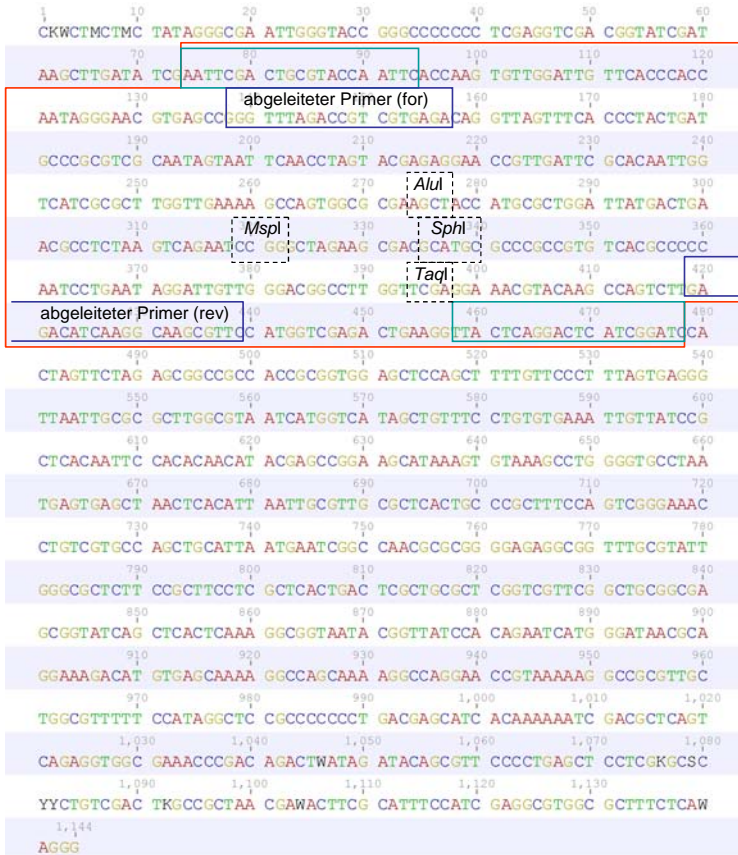


Abbildung 7: Sequenz von e36m54-363bp - rot eingezeichnet die in das Plasmid eingefügte genomische Sequenz, die der AFLP-Klonierungs-Primer (hellblau), die abgeleiteten Primer (dunkelblau) und die überprüften Restriktionsschnittstellen (schwarz gestrichelt).

2.2.3.5 Entwicklung von CAPS-Marker

Die Sequenzen der mit der TuYV-Resistenz cosegregierenden abgeleiteten Primer wurden mit Hilfe des NEBcutter V2.0 (NEW ENGLAND BIOLABS, 2007) hinsichtlich Schnittstellen für Restriktionsenzyme analysiert (ein Beispiel in Abbildung 7

dargestellt) und ein Verdau der PCR-Produkte der Eltern über 2 Stunden mit 5U Restriktionsenzym in einem 20 μ l-Ansatz durchgeführt. In Abhängigkeit der Sequenz wurden über die Sequenzlänge verteilt die Restriktionsenzyme *AluI* (Fermentas), *BamHI* (MBI), *DpnI* (Fermentas), *HindIII* (MBI), *HpaII* (Fermentas), *MnlI* (Fermentas), *MspI* (Fermentas), *PvuI* (Promega), *RsaI* (Fermentas), *SphI* (Promega), *TaqI* (Fermentas) und *XbaI* (Fermentas) eingesetzt.

2.2.4 Datenbankvergleich

Um Anhaltspunkte über mögliche Funktionen der sequenzierten Abschnitte zu gewinnen, wurden die Sequenzen der mit der Resistenz eng gekoppelten AFLP-Fragmente gegen die Datenbanken von NCBI, TAIR und TIGR geblastet (blast n) (ALTSCHUL ET AL., 1997; GISH, 1996-2005).

2.2.5 Kartierung

Für die Kartierung wurde die Software JoinMap 4.0 (VAN OOIJEN, 2006) unter Verwendung der Kosambi-Transformation (KOSAMBI, 1944) eingesetzt (Rekombinationsfrequenz $<0,375$, LOD $>3,00$)

2.2.6 Statistische Auswertung

Um die Vergleichbarkeit der phänotypischen Daten der DH-Linien statistisch abzusichern, wurden Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Dazu wurden die phänotypischen Daten der DH-Linien über die drei Versuchsjahre, wie in LOZÁN UND KAUSCH (2007) beschrieben, mit der Software Excel (Microsoft Corporation 2003) verrechnet. Signifikanzen wurden anhand der Formel für die Spearman-Rangkorrelation mit $n \geq 30$ berechnet (LOZÁN UND KAUSCH, 2007).

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung der DH-Linien

Unter Annahme des von GRAICHEN (1994) festgelegten Schwellenwertes von $E_{405}=0,1$ zeigte sich im Dezember 2004 eine Anpassung an eine 1r:1s Spaltung ($\text{Chi}^2_{1r:1s} = 2,6$), wobei jedoch innerhalb der anfälligen Genotypen eine erhebliche Variation des Virustiters auftrat (Abbildung 8). Eine kontinuierliche Erhöhung des Virustiters, d.h. bei Beibehaltung des Schwellenwertes eine Zunahme anfälliger Pflanzen, war bereits ab April festzustellen, wobei jedoch i.d.R. der Virustiter im April nicht den der bereits im Dezember als anfällig eingestuften Pflanzen erreichte.

Im Dezember 2005 zeigten die DH-Linien vergleichbare Resistenz-Reaktionen ($\text{Chi}^2_{1r:1s} = 0,73$) wie im Dezember 2004, jedoch war insgesamt eine Tendenz zu geringeren Extinktionswerten festzustellen: Die Extinktionswerte der anfälligen Linien betragen im Dezember 2004 zumeist bis $E_{405}=1,499$, wobei einige wenige auch einen Wert von $E_{405}=2,000$ überschritten. Dem gegenüber erreichten die Werte im Dezember 2005 lediglich $E_{405}=0,999$. Die Resistenztestungen Ende April 2006 sowie Ende Mai 2006 wiesen, verglichen mit den Werten aus 2005, ebenfalls tendentiell geringere Extinktionswerte auf. Die Ergebnisse der Testung Ende April 2006 zeigte noch eine Anpassung an eine 1r:1s Spaltung ($\text{Chi}^2_{1r:1s} = 0,01$), bevor sich das Verhältnis resistent : anfällig zur letzten Testung Ende Mai 2006, wie dies auch im Vorjahr der Fall war, verschob.

Das Ergebnis der dritten Vegetationsperiode wich stark von den Ergebnissen der beiden Vorjahre ab. So zeigte sich im Dezember 2006 ein Virustiter und eine Verteilung virusfreier zu virustragender Linien, die dem Bild von Ende Mai 2006 entsprach. Die Entwicklung setzte sich entsprechend fort. Zur letzten Testung Ende Mai 2007 wiesen alle DH-Linien erhöhte Virustiter auf (Abbildung 9), wie auch die resistenten Eltern der DH-Linien (Abbildung 10).

Aus diesen Ergebnissen ist daher zu schließen, dass es sich bei der Resistenz nicht um eine absolute, sondern um eine quantitative Resistenz handelt, bei der vermutlich die Ausprägung des Hauptgens, das für die in der Regel wiederholbare und bis zum Frühjahr gültige 1r:1s Spaltung verantwortlich ist, umweltabhängig ist.

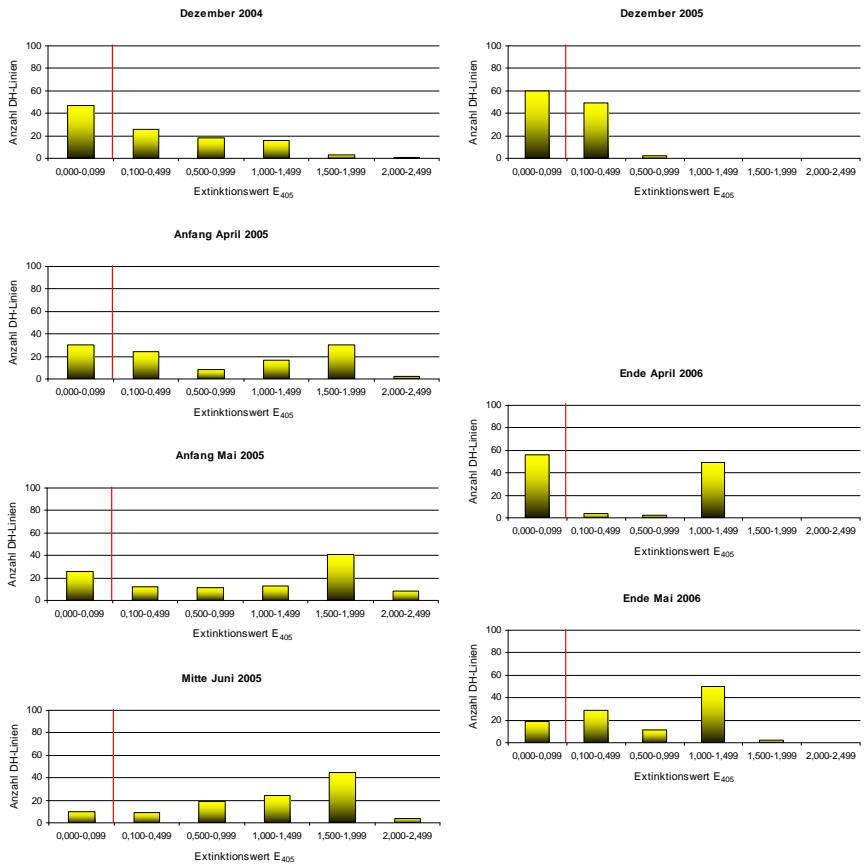


Abbildung 8: Extinktionswerte der 111 DH-Linien in den Vegetationsperioden 2004/2005 (links) und 2005/2006 (rechts).

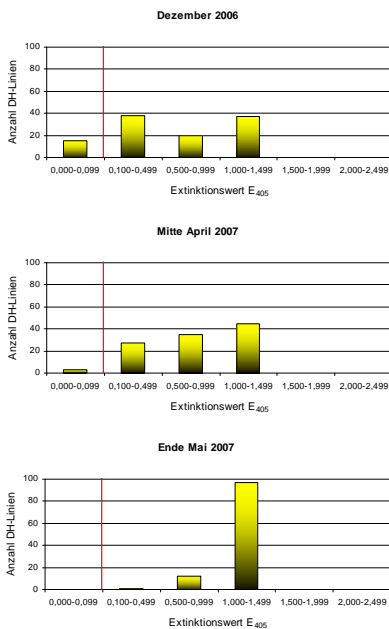


Abbildung 9: Extinktionswerte der 111 DH-Linien in der Vegetationsperiode 2006/2007.

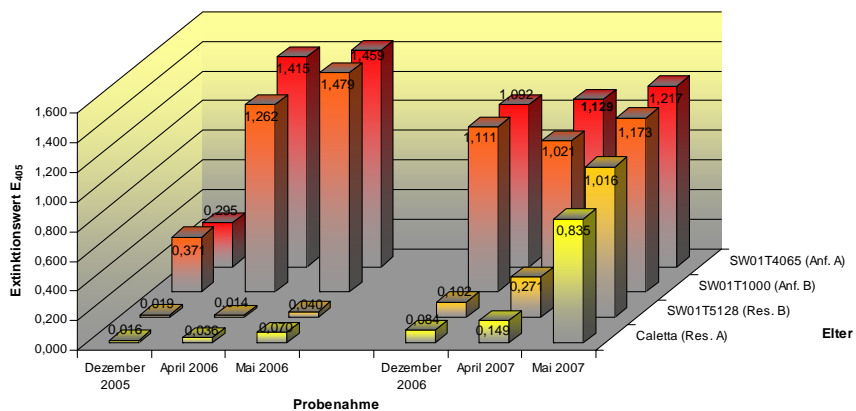


Abbildung 10: Extinktionswerte der Eltern in den Vegetationsperioden 2005/2006 und 2006/2007.

3.1.1 Betrachtung der Ergebnisse der verschiedenen Versuchsjahre

Die Spearman'sche Rangkorrelation ergab besonders für den zweiten Probenahmetermin im April eine hohe Korrelation ($r_s = 0,841$) der drei Versuchsjahre (Tabelle 5). Nur leicht geringer war die Korrelation zum ersten Probenahmetermin im Dezember ($r_s = 0,733$). Eine eher schlechte Korrelation zeigte sich zum letzten Termin im Mai/Juni ($r_s = 0,524$). Die berechneten Signifikanzen der Ergebnisse der Rangkorrelation bestätigen, dass eine abgesicherte Abhängigkeit bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % vorliegt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Rangkorrelation nach Spearman für die drei Versuchsjahre und die drei Probenahme-Termine.

	Termin 1	Termin 2	Termin 3
Jahr 2004/2005 zu Jahr 2005/2006	$r_s = 0,688^*$	$r_s = 0,861^*$	$r_s = 0,561^*$
Jahr 2004/2005 zu Jahr 2006/2007	$r_s = 0,771^*$	$r_s = 0,832^*$	$r_s = 0,557^*$
Jahr 2005/2006 zu Jahr 2006/2007	$r_s = 0,741^*$	$r_s = 0,830^*$	$r_s = 0,454^*$
Mittelwert über die drei Versuchsjahre	$r_s = 0,733$	$r_s = 0,841$	$r_s = 0,524$

* $\alpha=0,05$

In den folgenden grafischen Darstellungen sind die Rangkorrelationen der Ergebnisse des DAS-ELISA zu den drei Probenahmeterminen Dezember (Abbildung 11), April (Abbildung 12) und Mai/Juni (Abbildung 13) dargestellt. Um zu verdeutlichen, dass trotz des hohen Virus-Niveaus im Versuchsjahr 2006/07 die DH-Linien hinsichtlich ihres Resistenz-Verhaltens gleich reagierten, sind die Grafiken der Rangkorrelation des Versuchsjahres 2004/05 zu 2005/06 und der Rangkorrelation des Versuchsjahres 2004/05 zu 2006/07 nebeneinander gestellt.

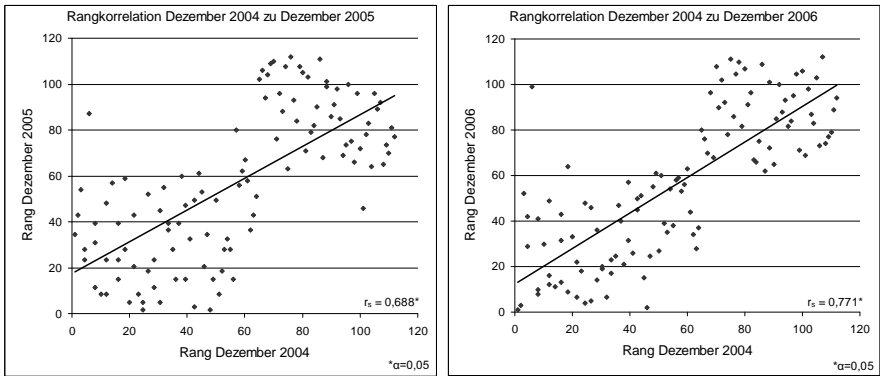


Abbildung 11: Rangkorrelation der Extinktionswerte zum Probenahmetermin Dezember 2004 gegenüber Dezember 2005 (links) sowie Dezember 2004 gegenüber Dezember 2006 (rechts).

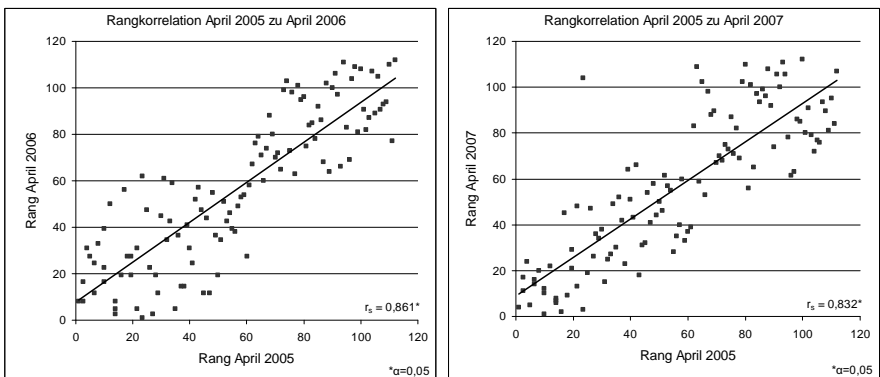


Abbildung 12: Rangkorrelation der Extinktionswerte zum Probenahmetermin April 2005 gegenüber April 2006 (links) sowie April 2005 gegenüber April 2007 (rechts).

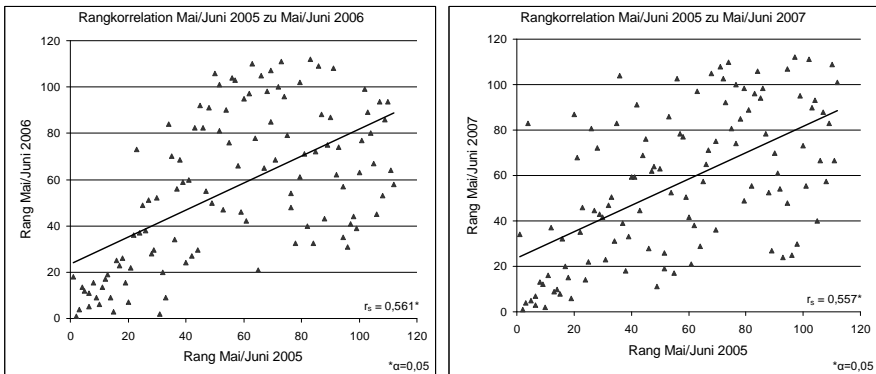


Abbildung 13: Rangkorrelation der Extiktionswerte zum Probenahmetermin Mai/Juni 2005 gegenüber Mai/Juni 2006 (links) und Mai/Juni 2005 gegenüber Mai/Juni 2007 (rechts).

Besonders deutlich ist die Aufspaltung in anfällige und resistente DH-Linien in der Abbildung 11 zu sehen: Hier finden sich zwei getrennte Punktwolken, einmal im unteren (resistenten) und einmal im oberen (anfälligen) Bereich der Grafik. Die Punktwolken „verschmelzen“ mit einem Fortschreiten der Entwicklung, d.h. mit einer allmählichen Erhöhung der Virustiter einiger DH-Linien (Abbildung 12).

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass die DH-Linien hinsichtlich ihrer ermittelten phänotypischen Daten in den drei Versuchsjahren in der Regel gleich reagierten, d.h. die Ergebnisse sich als wiederholbar erwiesen.

3.2 Entwicklung molekularer Marker

3.2.1 Identifizierung polymorpher SSRs und AFLPs

3.2.1.1 SSRs

Von den auf Polymorphismen untersuchten 200 SSRs konnte zunächst ein deutlich zwischen den Bulks und den Eltern 'Caletta' (Res. A) x 'SW01T1000' (Anf. B) differenzierender SSR (Na10-D09) identifiziert werden, wobei der resistente Elter 'Caletta' und die Bulks resistenter DH-Linien ein Fragment von 299bp aufweisen und der anfällige Elter und Bulk ein Fragment von 307bp (Abbildung 14). Eine Analyse dieses Markers auf den DH-Linien der Kreuzung 'Caletta' (Res. A) x 'SW01T1000' (Anf. B) ergab eine Kosegregation mit der Resistenzreaktion gegenüber TuYV. In der Kreuzung 'Caletta' (Res. A) x 'SW01T4065' (Anf. A) war dieser Marker ebenfalls polymorph, jedoch wurden hier zwei Rekombinationen mit dem Resistenzgen

nachgewiesen. In der Kreuzung 'SW01T5128' (Res. B) x 'SW01T1000' (Anf. B) war Na10-D09 monomorph.

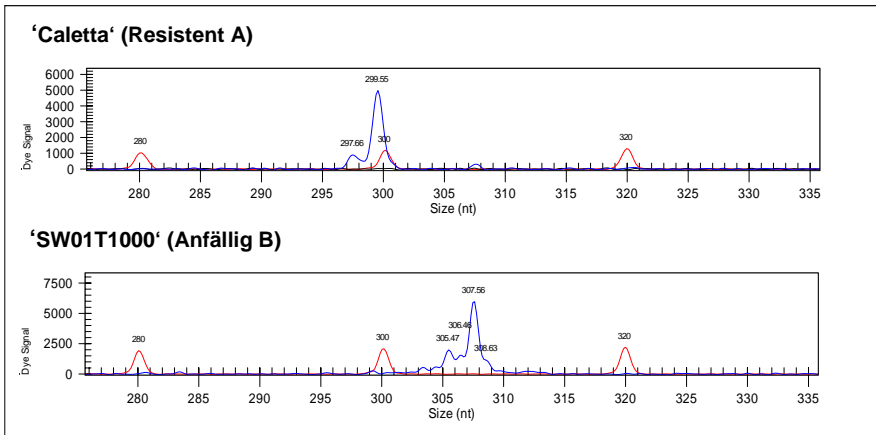


Abbildung 14: Zwischen resistenten und anfälligen Genotypen differenzierender SSR1 Na10-D09, Beckman Coulter CEQ 8000.

Ein weiterer SSR (CB10347) konnte identifiziert werden, der für die gesamten getesteten Populationen polymorph ist und eine enge Kopplung zu der TuYV-Resistenz aufweist. Dieser SSR zeigt ein Fragment von 223bp in den resistenten Eltern, dem resistenten Bulk A sowie dem spät anfälligen Bulk B einerseits und ein Fragment von 213bp in den anfälligen Eltern und dem anfälligen Bulk C andererseits (Abbildung 15).

Beide SSRs ermöglichen eine Differenzierung von „resistent“ bzw. „spät anfällig“ zu „anfällig“.

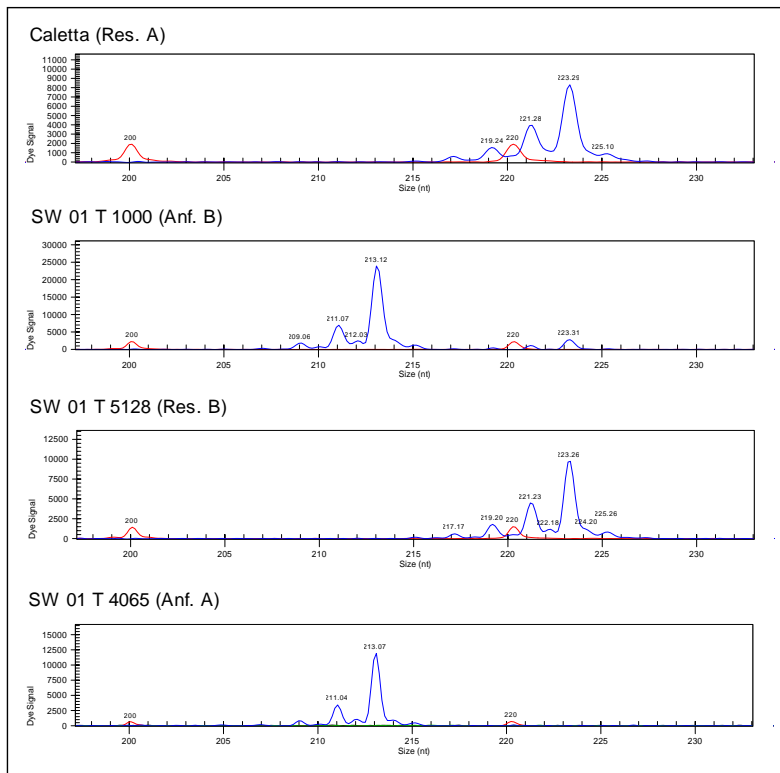


Abbildung 15: Zwischen resistenten und anfälligen Genotypen differenzierender SSR2 CB10347, Beckman Coulter CEQ 8000.

Die Primer-Sequenzen der identifizierten SSR-Marker sowie der verwendete „dritte Primer“ (M13uniFi) sind in Tabelle 6 dargestellt. Der verwendete an den Forward-Primer angehängte M13-Tail ist hier unterstrichen dargestellt. Dieser Tail ermöglichte die Verwendung des dritten Primers, der am 5'-Ende eine Cy5-Markierung trug.

Tabelle 6: Primer-Sequenzen der identifizierten SSRs und des M13uniFi (M13-Tail unterstrichen dargestellt).

Primerbezeichnung	Primer-Sequenz
CB10347 for:	5'- <u>TTTCCCAGTCACGACGTT</u> ATCTGAACACTTTCGGCA-3'
CB10347 rev:	5'-GGAAGCACCATGTCAGC-3'
Na10-D09 for:	5'- <u>TTTCCCAGTCACGACGTT</u> AAGAACGTCAAGATCCTCTGC-3'
Na10-D09 rev:	5'-ACCACCACGGTAGTAGAGCG-3'
M13uniFi	5'-AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT-3'

Für den SSR CB10347 wurde das Cycler-Programm „td60“ und für den SSR Na10-D09 das Cycler-Programm „td68“ verwendet (Anhang 10.5).

3.2.1.2 AFLPs

Im Zuge des AFLP-screenings konnten 42 zwischen den resistenten und anfälligen Bulks differenzierende AFLP-Kombinationen identifiziert werden. Neun Kombinationen dieser 42 Kombinationen zeigten nach Überprüfung auf den Einzel-DH-Linien eine sehr enge Kopplung zur Resistenz, drei von diesen cosegregierten mit der Resistenz.

In Tabelle 7 sind die neun AFLP-Marker aufgeführt sowie die Zahl ausgeschnittener Fragmente, die daraus entwickelten polymorphen STS-Marker und die Anzahl Rekombinationen zum Resistenzlocus.

Tabelle 7: Zusammenfassung AFLP- und STS-Marker.

Nr.	AFLP	Zahl ausgeschnittener Fragmente	ca. Größe	sequenzierte Größen	Primerbez.	Rekombinationen
1	E31M48 ₁₇₀	1	470bp	436bp/435bp/216bp/437bp/177bp	e31m48-437bp	0
2	E31M53 ₃₄₀	1	340bp	294bp/294bp	-	4
3	E32M50 ₃₅₀	1	450bp	447bp	e32m50-447-320	1
4	E33M50 ₃₀₀	1	400bp	365bp/358bp	-	0
5	E35M52 ₂₄₀	1	240bp	203bp/205bp/205bp/201bp/201bp	-	1
6	E36M54 ₃₈₀	2	380bp/375bp	343bp/363bp	-	0
7	E43M56 ₁₁₀	0	110bp	-	-	2
8	E44M50 ₃₈₀	2	380bp/375bp	346bp	-	3
9	E44M52 ₃₅₀	3	350bp/345bp/340bp	314bp/301bp	-	1

3.2.2 Entwicklung von Sequence Tagged Sites (STS)

3.2.2.1 Überprüfung der Transformations-Effizienz der kompetenten Zellen

Als Grundlage für die Entwicklung von STS wurden kompetente Zellen für die Klonierung erstellt, deren Effektivität zunächst beurteilt wurde. Zu diesem Zweck wurde mit einer definierten Menge Ausgangs-DNA eine Klonierung durchgeführt.

Es konnte eine mittlere Transformations-Effizienz von $1,4 \times 10^8$ Transformanten je μg Kontroll-DNA ermittelt werden, was einer nur unwesentlich geringeren Effizienz im Vergleich zu kommerziell angebotenen kompetenten Zellen entspricht, die mit etwa 1×10^9 angeboten werden. Es konnte damit eine ausreichend hohe Effizienz für die Klonierungen erreicht werden.

In den durchgeführten Klonierungen zeigte sich ein hoher Anteil erfolgreicher Transformationen (Klonierungs-Effizienz), d.h. ein hoher Anteil weißer Kolonien im Verhältnis zur Anzahl blauer Kolonien (Tabelle 8). Im Durchschnitt kann hier, zwar mit einer hohen Variation, von 88 % Klonierungs-Effizienz ausgegangen werden.

Tabelle 8: Auflistung Anzahl blauer bzw. weißer Kolonien je Transformation sowie der Anteil weißer Kolonien an der Gesamtanzahl, aufgeteilt in die Ausplattierungs-Varianten 40 μl bzw. ca.355 μl Transformationsprodukt.

	40 μl -Variante				355 μl -Variante			
	Summe Kolonien	nur blaue Kolonien	nur weiße Kolonien	Anteil weißer Kolonien an der Summe	Summe Kolonien	nur blaue Kolonien	nur weiße Kolonien	Anteil weißer Kolonien an der Summe
01b	2	0	2	100	45	2	43	96
02a	8	1	7	88	44	8	36	82
03b	8	0	8	100	116	7	109	94
04a	17	0	17	100	203	20	183	90
04b1	0	0	0	-	27	1	26	96
05a	35	0	35	100	272	8	264	97
06b	6	3	3	50	85	27	58	68
07a	11	0	11	100	89	7	82	92
08a	13	0	13	100	103	30	73	71
09a	3	1	2	67	27	4	23	85
10a	2	0	2	100	86	22	64	74
10b	6	1	5	83	60	7	53	88
11b	100	5	95	95	762	29	733	96

3.2.2.2 Entwicklung von STS- Markern

Die AFLP-Kombinationen E32M50₄₄₇ und E31M48₄₇₀ konnten in STS-Marker (STS3-e32m50-447-320 und STS1-e31m48-437bp) konvertiert werden (Tabelle 9). In Abbildung 17 ist die Sequenz des STS1-e31m48-437bp, sowie der für die Klonierung verwendeten und der abgeleiteten STS-Primer dargestellt.

Tabelle 9: Primer-Sequenzen der STS-Marker. STS3 mit M13-Tail (unterstrichen dargestellt), STS1 ohne M13-Tail.

STS-Marker	Primer Sequenz
STS3-e32m50-447-320 for:	5'- <u>TTTCCCAGTCACGACGTTGATCCGTTTGGGTCTTGGTA</u> -3'
STS3-e32m50-447-320 rev:	5'-TTGATGTGAAACGCACATTG-3'
STS1-e31m48-437bp for:	5'-ATCGGACATTGGTCAGGTTCC-3'
STS1-e31m48-437bp rev:	5'-CATACCCCCTGGTTCTTGG-3'

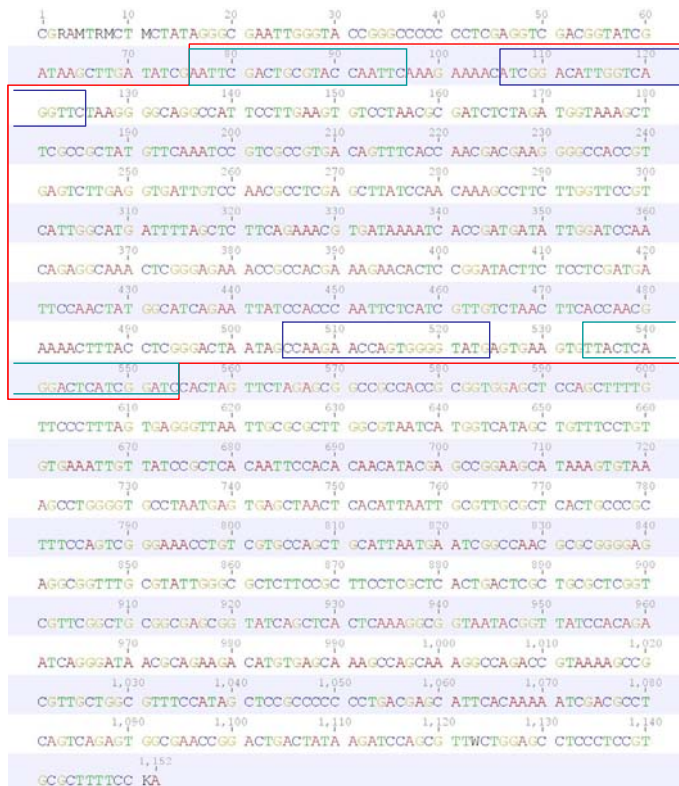


Abbildung 16: Sequenz von STS1 - rot eingezeichnet die in das Plasmid eingefügte genomische Sequenz, die der AFLP-Klonierungs-Primer (hellblau) und der abgeleiteten STS-Primer (dunkelblau).

Es wurde das Cyclerprogramm, wie in Kapitel 2.2.3.4 Sequenzierung und Entwicklung von STS beschrieben, verwendet.

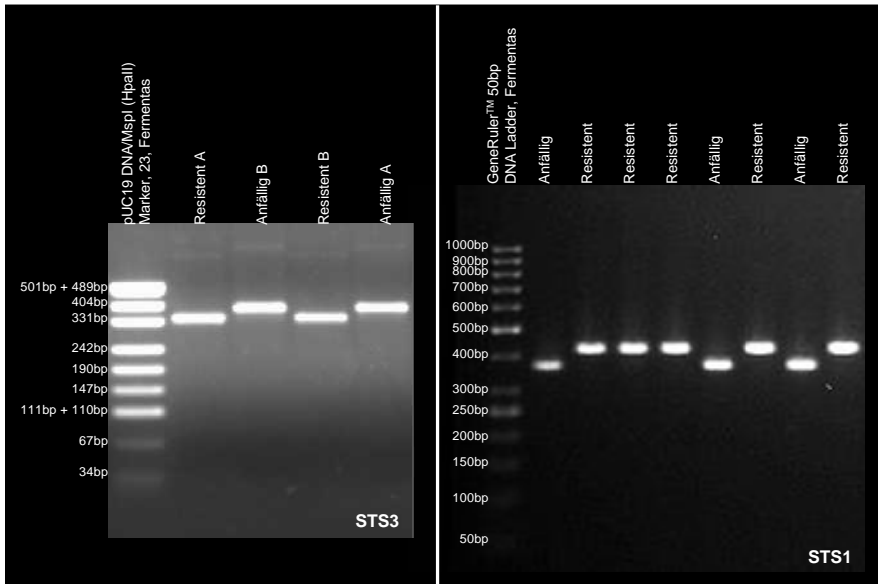


Abbildung 17: Zwischen resistenten und anfälligen Genotypen differenzierende STS-Marker. STS3-e32m50-447-320 (links, Fragmentgrößen von 344bp für resistente und 385bp für anfällige Genotypen), STS1-e32m48-437bp (rechts, Fragmentgrößen von 437bp für resistente und 376bp für anfällige Genotypen). Jeweils 10 μ l Probe in 1,5 % Agarose-Gel (1xTBE).

STS3-e32m50-447-320 ist eine Rekombination von der TuYV-Resistenz entfernt und weist ein Fragment von 344bp für die resistenten und ein Fragment von 385bp für die anfälligen Genotypen auf (Abbildung 17, links). STS1-e31m48-437bp cosegregiert mit der TuYV-Resistenz und weist ein Fragment bei 437bp für die resistenten und ein Fragment bei 376bp für die anfälligen Genotypen auf (Abbildung 17, rechts).

3.2.3 Entwicklung von CAPS-Markern

Da basierend auf den obengenannten AFLP-Fragmenten bereits zwei eng gekoppelte STS-Marker entwickelt werden konnten, wurde auf eine weitere allelspezifische Sequenzierung verzichtet, so dass keine Information hinsichtlich Sequenzunterschieden zwischen resistenten und anfälligen Genotypen vorlag. Um jedoch die vorliegenden Sequenzen für eine mögliche Markerentwicklung zu nutzen, wurden diese im Hinblick auf Restriktions-Schnittstellen untersucht und auf anfälligen

und resistenten Genotypen amplifizierte Fragmente mit vorhandenen Restriktionsenzymen verdaut.

Der Verdau der PCR-Produkte zeigte zumeist monomorphe Fragmente. Lediglich aus der Kombination des abgeleiteten Primers e36m54-363bp (abgeleitet aus einem 363bp-großen AFLP-Fragment der Kombination E36M54) und dem Restriktionsenzym *SphI* sowie aus der Kombination des abgeleiteten Primers e36m54-343bp (abgeleitet aus einem 343bp-großem AFLP-Fragment der gleichen Kombination) mit dem Restriktionsenzym *PvuI* zeigten einen Polymorphismus, jedoch nur einen Elter betreffend – 'Caletta' im ersten Fall, den anfälligen Elter 'SW01T1000' im zweiten Fall (Abbildung 18). Da hier aufgrund einer monomorphen Reaktion in der Kreuzung um 'SW01T5128' im ersten Fall und im zweiten Fall in der Kreuzung um den anfälligen Elter 'SW01T4065', keine informativeren und enger gekoppelten Marker als die obengenannten zu erwarten waren, wurden diese Arbeiten nicht weitergeführt.

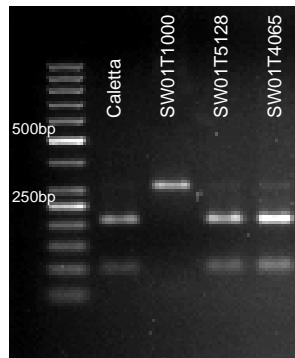


Abbildung 18: PCR-Produkte des abgeleiteten monomorphen Primers e36m54-343bp, geschnitten mit *PvuI* (Polymorphismus für SW01T1000).

3.2.4 Datenbankvergleich

In einem Datenbankvergleich der sequenzierten Fragmente mit der NCBI- und TIGR-Datenbank (ALTSCHUL ET AL., 1997; GISH, 1996-2005) zeigten sich sehr hohe Homologien zu nicht weiter spezifizierten Sequenzen genomischer DNA- oder mRNA-Sequenzen von *B. rapa* ssp. *pekinensis*, *B. oleracea* und *B. napus* sowie Homologien zu genomischen Sequenzen von *Arabidopsis thaliana*. Eine Auswahl der Ergebnisse aus dem Datenbankvergleich sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Auswahl der Ergebnisse des Datenbankvergleiches.

AFLP-Fragment	sequenzierte Größe	Ergebnis		Sequenz-Übereinstimmung	e-Wert	Gaps
E31M48 ₄₇₀	177bp	<i>A. thaliana</i>	Leucin-reiches Familien Protein/Extensin Familien Protein	88%	6e-57	0%
E31M48 ₄₇₀	177bp	<i>B. napus</i>	mRNA Sequenz	97%	3e-79	0%
E31M48 ₄₇₀	177bp	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i>	komplette Sequenz	92%	9e-67	0%
E31M48 ₄₇₀	216bp	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i>	mRNA Sequenz	96%	2e-76	0%
E31M48 ₄₇₀	436bp	<i>A. thaliana</i>	Karbohydrat-Kinase Familien Protein, mRNA	92%	4e-39	0%
E31M48 ₄₇₀	436bp	<i>A. thaliana</i>	komplette Sequenz	85%	8e-101	1%
E31M48 ₄₇₀	436bp	<i>B. napus</i>	mRNA Sequenz	99%	7e-118	0%
E31M48 ₄₇₀	437bp	<i>A. thaliana</i>	Dehydroaskorbat Reduktase, putative mRNA	78%	1e-95	0%
E31M48 ₄₇₀	437bp	<i>A. thaliana</i>	komplette Sequenz	78%	7e-96	0%
E31M48 ₄₇₀	437bp	<i>B. napus</i>	mRNA Sequenz	70%	2e-43	3%
E31M53 ₃₄₀	294bp	<i>B. napus</i>	komplette Sequenz	83%	4e-36	0%
E31M53 ₃₄₀	294bp	<i>B. oleracea</i>	komplette Sequenz	88%	1e-42	2%
E31M53 ₃₄₀	294bp	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i>	komplette Sequenz	83%	4e-36	0%
E33M50 ₄₀₀	365bp	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i>	komplette Sequenz	96%	2e-46	10%
E33M50 ₄₀₀	365bp	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i>	komplette Sequenz	76%	4e-56	0%
E35M52 ₂₄₀	203bp	<i>B. napus</i>	mRNA Sequenz	100%	2e-70	0%
E35M52 ₂₄₀	203bp	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i>	komplette Sequenz	100%	2e-70	0%
E35M52 ₂₄₀	205bp	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i>	komplette Sequenz	99%	1e-97	0%
E36M54 ₃₇₅	363bp	<i>A. thaliana</i>	komplette Sequenz	98%	5e-122	0%
E36M54 ₃₇₅	363bp	<i>B. napus</i>	mRNA Sequenz	99%	2e-123	0%
E36M54 ₃₇₅	363bp	<i>B. oleracea</i>	mRNA Sequenz	99%	2e-123	0%
E36M54 ₃₇₅	363bp	<i>B. rapa ssp. pekinensis</i>	mRNA Sequenz	99%	2e-123	0%
E36M54 ₃₈₀	343bp	<i>B. napus</i>	mRNA Sequenz	94%	9e-84	0%
E44M50 ₃₈₀	346bp	<i>B. napus</i>	mRNA Sequenz	94%	2e-130	2%
E44M52 ₃₄₀	301bp	<i>B. napus</i>	mRNA Sequenz	97%	6e-142	0%
E44M52 ₃₄₀	301bp	<i>B. oleracea</i>	komplette Sequenz	98%	1e-143	0%

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich keine Homologien zu ESTs zeigten, welche im Zusammenhang mit Genen stehen, die in Virusresistenz involviert sind.

3.2.5 Kartierung

Die SSRs Na10-D09 und CB10347 - beide in PIQUEMAL ET AL. (2005) auf Chromosom N9 lokalisiert – sowie die neun AFLP-Marker und die zwei STS-Marker bilden gemeinsam mit dem weiter entfernten SSR CB10196, der von PIQUEMAL ET AL. (2005) auf Chromosom N4 lokalisiert wurde, eine Kopplungsgruppe mit der TuYV-Resistenz. Unter Einbeziehung aller 111 DH-Linien ergibt sich die in Abbildung 19 dargestellte Karte.

Die verhältnismäßig große Entfernung des Markers SSR1-Na10-D09 zur TuYV-Resistenz (4,78 cM) trotz der an sich bestehenden engen Kopplung zur Resistenz, kommt dadurch zustande, dass dieser SSR nur in den Kreuzungen um den Resistenzdonor 'Caletta' polymorph ist, d.h. nur in 48 DH-Linien von den 111 DH-Linien, auf denen diese Karte basiert. Der SSR2-CB10347 ist 0,91 cM distal zur TuYV-Resistenz lokalisiert während der SSR CB10196 13,18 cM proximal der TuYV-Resistenz lokalisiert ist. Die AFLP-Marker flankieren den TuYV-Resistenz- Locus in einem maximalen Abstand von 3,73 cM und drei AFLP-Marker cosegregieren mit der

Resistenz. Der STS1-e31m48-437bp cosegregiert ebenfalls mit der Resistenz, während der STS3-e32m50-447-320 eine Entfernung von 0,91 cM aufweist.

Eine Kopplung mit weiteren von PIQUEMAL ET AL. (2005) auf Chromosom N9 oder N4 lokalisierten SSRs konnte nicht nachgewiesen werden.

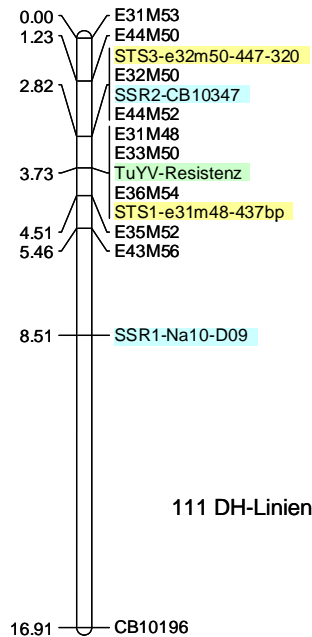


Abbildung 19: Genetische Karte der für TuYV-Resistenz relevanten Kopplungsgruppe, basierend auf der Analyse von 111 DH-Linien.

4 Diskussion

4.1 Genetische Analyse der TuYV-Resistenz

In den beiden ersten Versuchsjahren zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Resistenzreaktion der einzelnen DH-Linien (vergl. Abbildung 8). Im Vergleich zur Vegetationsperiode 2004/2005 wurden die Pflanzen jedoch im Herbst 2005 (Anbaujahr 2005/2006) zu einem fortgeschrittenen Stadium (Entwicklungsstadium BBCH 19) mit TuYV-tragenden *M. persicae* besiedelt. Dies war auf höhere Niederschläge, die bis zum Zeitpunkt der Infektion stattfanden, zurückzuführen, wodurch eine beschleunigtere Entwicklung der Pflanzen im Herbst 2005 stattfand (Abbildung 20). Dieser Unterschied sowie Unterschiede in den Witterungsverhältnissen (vergleichsweise längerer Winter) kann als Grund für die tendenziell niedrigeren Extinktionswerte in der Vegetationsperiode 2005/2006 angesehen werden.

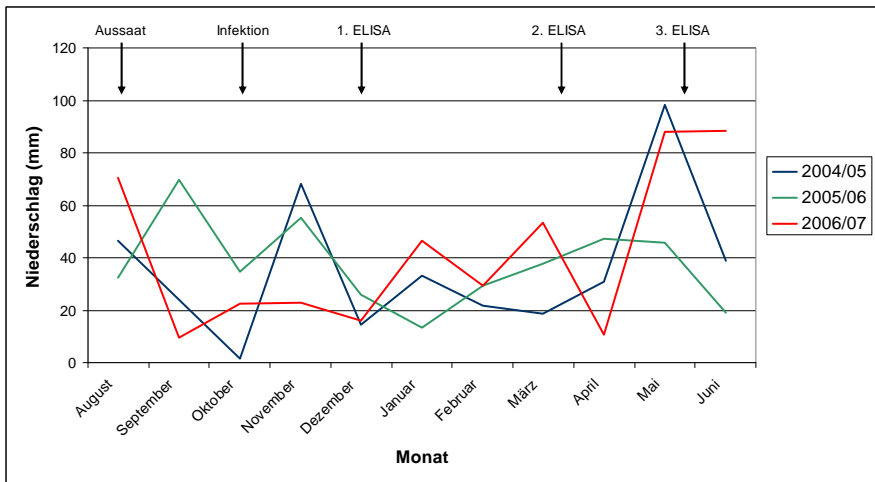


Abbildung 20: Mittlere Niederschläge (in mm) in den drei Versuchsjahren 2004/05, 2005/06 (Aschersleben) und 2006/07 (Quedlinburg); Wetterstation des Julius Kühn-Instituts, Quedlinburg.

Generell wurden im ELISA bis zum Juni 2005 höhere Extinktionswerte, z.T. bis 2,5 erreicht, als in den folgenden Jahren, in denen die Maximal-Werte unter $E_{405}=2,0$ lagen. Diese Unterschiede in den höheren Bereichen der Extinktionswerte sind auf unterschiedliche Chargen von Konjugat und IgG zurückzuführen. Diese wurden vor der Anwendung im Labor von Herrn Dr. F. Rabenstein (Julius Kühn-Institut,

Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik) besonders hinsichtlich möglichst geringer Hintergrundfärbung und einheitlich geringen Werten in virusfreiem Material überprüft und auf die geeignete Konzentration eingestellt. Mit diesem Vorgehen wurde sichergestellt, dass keine resistenten Pflanzen als positiv eingestuft werden.

Aus den zweijährigen Ergebnissen, bei denen sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Jahren zeigte, ist der Schluss zu ziehen, dass die Resistenz gegenüber TuYV einem monogenischen Erbgang folgt. I.d.R. ist jedoch auch bei im Dezember zunächst als resistent ($E_{405} < 0,1$) eingestuften Pflanzen im Verlauf der Vegetationsperiode eine Erhöhung des Virustiters festzustellen. Der im Verlauf der Vegetationsperiode ansteigende Virustiter kann einerseits durch Umweltfaktoren (Temperatur) bedingt sein, aber auch mit der fortschreitenden Pflanzenentwicklung im Zusammenhang stehen.

Im dritten Versuchsjahr waren infolge der besonderen Witterungsverhältnisse, d.h. sehr milde Temperaturen im Herbst / Winter 2006/2007 und fehlende Fröste bis Ende Dezember (Abbildung 21), schon im Dezember 2006 eine erhöhte Anzahl von Pflanzen mit einer Extinktion $E_{405} > 0,1$ festzustellen. Ein möglicher Einfluss der Temperatur auf die Virusentwicklung in infizierten Pflanzen bzw. eine mögliche Wirkung von Temperatur-Stress auf ein Einbrechen der TuYV-Resistenz wurde bereits in DREYER ET AL. (2001) beobachtet. Ebenso berichteten GRAICHEN ET AL. (1998) von einem starken Einfluss der Umweltbedingungen - speziell hoher Temperaturen - auf eine höhere Anfälligkeit. Dies erklärt auch im dritten Versuchsjahr die generell höhere Anzahl DH-Linien mit Extinktionen $E_{405} > 0,1$. Dies betraf vor allem die als „spät anfällig“ eingestuften Genotypen, die durch die fortgeschrittenere Virusentwicklung wesentlich früher den Schwellenwert überschritten sowie die zuvor wiederholt als durchgehend resistent eingestuften DH-Linien, die zur letzten Testung im Sommer 2007 ebenfalls erhöhte Virustiter aufwiesen. Parallelen zu einem möglichen Temperatureinfluss auf die Virusentwicklung sind auch bei anderen Poloroviren z.B. hinsichtlich der BWYV-Resistenz in Salat (WALKEY UND PINK, 1990) und der PLRV-Resistenz in Kartoffeln (BARKER UND HARRISON, 1984) beschrieben.

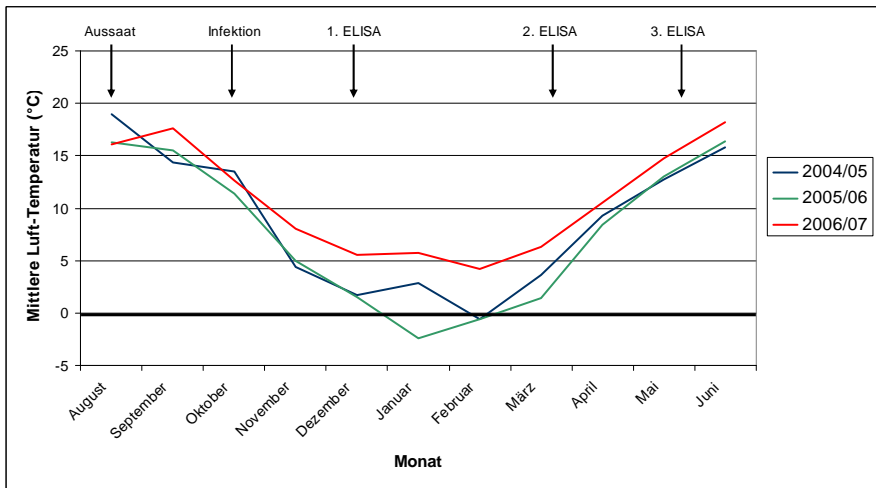


Abbildung 21: Temperaturverlauf (mittlere Monatstemperatur in °C) in den drei Versuchsjahren 2004/05, 2005/06 (Aschersleben) und 2006/07 (Quedlinburg); Wetterstation des Julius Kühn-Instituts, Quedlinburg.

Die im Herbst beobachtete genetische Spaltung (1r:1s) dürfte durch ein dominantes Hauptgen bedingt sein (PAETSCH IN VORBER.). Aber aufgrund der Ergebnisse der ersten zwei Jahren in Verbindung mit den Ergebnissen des dritten Versuchsjahres kann insgesamt geschlossen werden, dass es sich bei der Resistenz nicht um eine absolute, sondern um eine partielle oder quantitative Resistenz handelt, die durch Umwelteffekte moduliert wird. Diese Befunde stehen in Einklang mit Ergebnissen von GRAICHEN (1996), der ebenfalls davon ausging, dass die TuYV-Resistenz im wesentlichen durch ein oder wenige Gene kontrolliert wird.

Quantitative Resistenzen sind auch gegenüber anderen Poleroviren, wie z.B. im Falle der PLRV-Resistenz der Kartoffel bekannt. So berichteten schon BARKER ET AL. (1994) von zwei unabhängigen dominanten Genen, die gemeinsam eine starke Resistenz von Kartoffeln gegen das PLRV bewirken, einzeln jedoch entweder nur die Virusvermehrung oder den Kurzstreckentransport kontrollieren, so dass sich daraus Abstufungen der Resistenzwirkung ergeben (BARKER UND SOLOMON, 1990; DERRICK UND BARKER, 1997). Basierend auf diesen Berichten und den in vorliegender Arbeit gemachten Beobachtungen kann folgende Hypothese zur Vererbung der TuYV-Resistenz formuliert werden

- a) „Resistenz“: Bedingt durch das identifizierte Hauptgen und dem Vorhandensein aller positiven Allele von Minorgenen, die an der Resistenz beteiligt sind, kommt

es zu einer extremen Resistenz, wie sie z.B. im Resyntheseraps 'R54' beobachtet wird. Diese Resistenz ist bis zum Ende der Vegetationsperiode wirksam.

- b) „Späte Anfälligkeit“: Es wirkt nur noch das Hauptgen, welches in einem Jahr mit durchschnittlichen Temperatur- und Witterungsverhältnissen die Virusvermehrung in den Pflanzen bis zum Entwicklungsabschnitt Ende Schotenbildung / Anfang Abreife unterdrückt.

Darüber hinaus gibt es

- c) verschiedene Abstufungen zwischen der extremen Resistenz und der späten Anfälligkeit, die besonders in Jahren mit außergewöhnlich milden Wintern zum Tragen kommen. Hier zeigt sich dann, ob eine zuvor in einem Durchschnittsjahr als „extrem resistent“ eingestufte Pflanze tatsächlich die volle Resistenz und damit alle an der Resistenz beteiligten Gene besitzt. Je später eine Pflanze in einem solchen Jahr positiv hinsichtlich TuYV getestet werden kann, um so mehr positive Allele der an der kompletten Resistenz beteiligten Gene liegen vor. So würde aufgrund dieser Hypothese die als resistent bekannte Sorte 'Caletta' nicht als extrem resistent gelten, da sie in Jahren mit besonders milder Witterung im Winter unter Umständen gegen Ende Schotenbildung/Reifebeginn mit erhöhten Virustitern reagiert. Jedoch wäre zu vermuten, dass hier ein besonders großer Anteil positiver Allele der für die extreme Resistenz benötigten „Minorgene“ vorliegt.

Neben den Beobachtungen, die bezüglich PLRV hinsichtlich der Resistenz-Ausprägung gemacht wurden, sind ähnliche Abstufungen von extremer Resistenz bis hin zu partiellen Resistenzen, die sich über eine deutliche Verminderung des Virusgehaltes bemerkbar machen, bei der BWYV-Resistenz in Salat (WALKEY UND PINK, 1990) und in Soyabohnen (DUFFUS UND MILBRATH, 1977) bekannt.

4.1.1 Resistenzmechanismus

Bisher liegen keine gesicherten Erkenntnisse zum Mechanismus der TuYV-Resistenz in Winterraps vor. Eine Scheinresistenz, die über eine Blattlausresistenz wirkt, kann ausgeschlossen werden. So führte SCHLIEPHAKE (IN VORBER.) bereits Untersuchungen über das Saugverhalten von Blattläusen an verschiedenen Genotypen (u. a. auch 'R54' und 'Caletta' als Vertreter der resistenten Genotypen und 'Express' als anfälligen Standard) durch und konnte keine signifikanten Unterschiede im Saugverhalten der Virusvektoren auf den verschiedenen Genotypen feststellen.

Weitere Untersuchungen erfolgten hinsichtlich der Virusausbreitung über die Testung verschiedener Pflanzenorgane von anfälligen und resistenten DH-Linien. Zum einen

wurden diese Untersuchungen mittels DAS-ELISA (PAETSCH, IN VORBER.) und auch im Rahmen dieser Arbeit stichprobenartig an je drei Pflanzen der anfälligen Sorten 'Express' und 'Ladoga' sowie der resistenten Sorte 'Caletta' ein TBIA (*Tissue Blot Immuno Assay*; Anhang 10.3) durchgeführt. Es zeigte sich in den Arbeiten von PAETSCH (IN VORBER.) eine Virusausbreitung in anfälligen Genotypen in jedem Pflanzenorgan. In den resistenten Genotypen jedoch konnte höchstens zu einem späten Termin in der Wurzel geringe Mengen Virus nachgewiesen werden bei gleichzeitig negativ getestetem oberirdischem Pflanzenmaterial (PAETSCH, IN VORBER.). Auch im durchgeführten TBIA war in den anfälligen Sorten 'Express' und 'Ladoga' in allen Pflanzenorganen eine Virusausbreitung nachzuweisen (Abbildung 22). In der resistenten Sorte 'Caletta' zeigten sich lediglich in der Wurzel versprengte Färbungen, die eventuell punktuell auf TuYV-Partikel schließen lassen (Abbildung 23). Dies würde die Beobachtung erklären, dass in manchen Jahren, wie z.B. im Jahr 2006/07, auch in resistenten Pflanzen Virus nachweisbar ist.

Aus diesen Ergebnissen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass das Virus durch den Blattlausspeichel in die Pflanze abgegeben wird, sich jedoch zunächst nicht oder nur sehr gering in der resistenten Pflanze vermehren kann. Dies würde erklären, dass im Herbst bzw. je nach Resistenz-Ausprägung in einem Durchschnittsjahr bis zur letztmöglichen Testung kein Virusnachweis mittels DAS-ELISA oder TBIA möglich ist. Im Herbst würden die wenigen vorhandenen Viruspartikel mit dem Phloemstrom in die Wurzel transportiert werden, wo sie sich ggf. mit fortschreitender Pflanzenentwicklung gehemmt vermehren können – die leicht erhöhten Virustiter in den Wurzeln von Pflanzen, in deren oberirdischen Organen kein Virus nachgewiesen werden konnte, würden diese Vermutung unterstützen. Neben der Hemmung der Virusvermehrung müsste auch eine Hemmung der Virusausbreitung von der Wurzel in die oberirdischen Pflanzenorgane gegeben sein, da sich das Virus auch im Frühjahr mit verstärktem Phloemstrom von der Wurzel in die oberirdischen Pflanzenorgane nicht in dem Maße ausbreitet wie in anfälligen Pflanzen (vergl. Ergebnisse PAETSCH, IN VORBER.). Erst durch Umwelteinflüsse, wie z.B. überdurchschnittliche Einwirkung von höheren Temperaturen einerseits und andererseits möglicherweise auch das Altern der Pflanze, wird eine Virusvermehrung und -ausbreitung ermöglicht. Diese These wird durch den langsam ansteigenden Virustiter in zuvor als resistent eingestuften Pflanzen gestützt.

Ähnliches wurde hinsichtlich der PLRV-Ausbreitung bei Tomaten beobachtet, bei der bei gleichzeitig virusfreiem oberirdischem Pflanzenmaterial in der Wurzel PLRV nachweisbar ist (THOMAS UND MINK, 1998). Auch hier wurde beobachtet, dass in zuvor als resistent eingestuften Pflanzen von der Wurzel aus eine systemische Virusausbreitung erfolgen kann und zwar im Zusammenhang eines Verbringens der Pflanzen aus dem Gewächshaus in Folienzelte (THOMAS UND MINK, 1998). Es ist zu

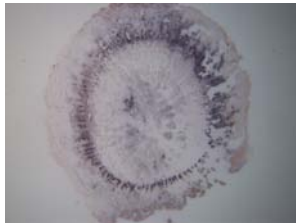
vermuten, dass in den Folienzelten u.U. höhere Temperaturen als im Gewächshaus geherrscht haben.

Da 'R54' i.d.R. durchgehend resistent bleibt und auch mit weitaus empfindlicheren Methoden wie IC-RT-PCR oder mit Rückübertragungsversuchen (GRAICHEN ET AL., 1998) bewiesen werden konnte, dass kein Virus in den Pflanzen vorhanden ist, kann angenommen werden, dass für die extreme Resistenz vorwiegend eine Vermehrungsresistenz verantwortlich ist, die in den abgestuften Resistenzen, wie sie z.B. in 'Caletta' oder auch den als „spät anfällig“ gekennzeichneten Genotypen vorliegt, jedoch nicht vollständig ausgeprägt ist. Generell müsste das beschriebene Majorgen eine Ausbreitungsresistenz betreffen, da in der Resistenz wie sie z.B. in 'Caletta' zu finden ist, vermutlich Virus in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze von DAS-ELISA und TBIA in der Wurzel vorliegt und das Virus erst unter besonderen Voraussetzungen (z.B. Umwelteinfluss oder alterndes Pflanzengewebe) diese wieder verlassen kann. Diese These wird gestützt durch Ergebnisse aus dem Pathosystem PLRV in Kartoffeln, in dem ebenfalls von einer Kontrolle der Virusvermehrung und des Kurzstreckentransportes von verschiedenen Genen berichtet wird (BARKER UND SOLOMON, 1990; BARKER ET AL., 1994; DERRICK UND BARKER, 1997).

'Ladoga'



'Express'



'Caletta'



Abbildung 22: *Tissue Blot Immuno Assay (TBIA)* eines Wurzelquerschnittes der anfälligen Sorten 'Ladoga' (links) und 'Express' (Mitte), sowie der resistenten Sorte 'Caletta' (rechts) mit violett angefärbten TuYV-Partikeln, Datum: 27.02.2008.

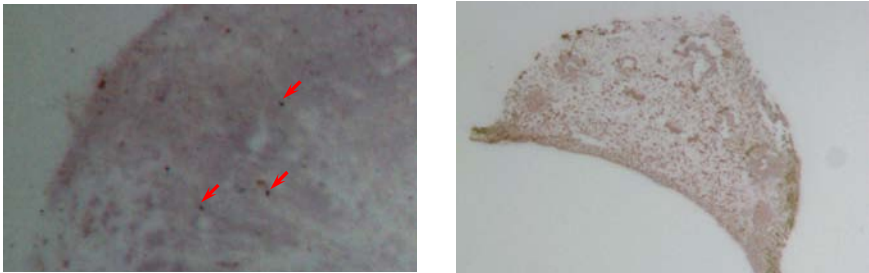


Abbildung 23: Ausschnitt des TBIA eines Wurzelquerschnitts (vergl. Abbildung 22, rechts) der resistenten Sorte 'Caletta', mit roten Pfeilen mögliche Reaktionen aufgrund von Viruspartikeln markiert; rechts TBIA der gleichen Pflanze, Blattstielquerschnitt, hier kein Virusnachweis möglich; Aufnahme: 27.02.2008.

4.1.2 Betrachtung der Ergebnisse der verschiedenen Versuchsjahre

Die relativ geringere Korrelation zum ersten Termin hängt mit der Rangverteilung zusammen. So häuften sich sowohl im Bereich „virusfrei“, als auch im Bereich „anfällig“ DH-Linien mit teilweise gleichen oder oft sehr ähnlichen Extinktionswerten, die eine eindeutige und in den Jahren gleiche Rangverteilung erschwerten und somit zu einer Punkte-Wolkenbildung einmal im Bereich der resistent reagierenden und einmal im Bereich der anfällig reagierenden DH-Linien führte.

Die gute Korrelation zum zweiten Termin im April kommt dadurch zustande, dass sich die DH-Linien relativ gleichmäßig mit den ermittelten Virustitern von virusfrei bis zu hochanfällig (Virustiter $E_{405} > 1,5$) verteilen und somit klare Ränge vergeben werden konnten.

Durch die hohe Anzahl anfällig getesteter DH-Linien zum letzten Termin und der Tatsache, dass auch hier wieder viele Extinktionswerte sehr dicht beieinander lagen, ergab sich auch hier eine schlechtere Korrelation der Jahre.

Aus diesen Ergebnissen der Rangkorrelation ist zu schließen, dass i.d.R. in jedem Versuchsjahr die als resistent und auch als „spät anfällig“ eingestuft DH-Linien gleich reagierten, die Resistenzreaktion also wiederholbar ist. Die geringere Korrelation zum letzten Probenahmetermin kann in diesem Zusammenhang vernachlässigt werden, da das Hauptaugenmerk auf der Wiederholbarkeit der resistenten Reaktionen der DH-Linien lag und nicht auf der Wiederholbarkeit unterschiedlich hoher Virustiter im Bereich der anfälligen Reaktionen.

Wie bereits im Kapitel 4.1 Genetische Analyse der TuYV-Resistenz angesprochen, wird in anderen Arbeiten ebenso von einem Umwelteinfluss (Temperatur) auf die

Resistenzreaktion berichtet (BARKER UND HARRISON, 1984; WALKEY UND PINK, 1990; GRAICHEN ET AL., 1998; DREYER ET AL., 2001), allerdings wurden keine Analysen hinsichtlich eines Vergleiches der Virusentwicklung über das Jahr bzw. zwischen den Jahren durchgeführt.

Vergleichbar mit den bei TuYV gemachten Beobachtungen wurden bei dem ebenfalls zu den *Luetoviridae* gehörendem *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) in Bezug auf das Resistenzgen *Ryd2* der Gerste Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsjahren hinsichtlich einer Verringerung des Resistenzniveaus festgestellt, die mit hoher Temperatur bzw. Trockenheit in Verbindung gebracht wurden (ŠIP ET AL., 2004).

4.2 Entwicklung molekularer Marker und Kartierung

Die entwickelten SSR-, AFLP- und STS-Marker zeigen eine enge Kopplung zur TuYV-Resistenz und sind somit für die praktische Rapszüchtung nutzbar. Besonders die codominanten STS-Marker STS3-e32m50-447-320 und STS1-e31m48-437bp ermöglichen auch eine Analyse über einfach zu handhabende Agarosegele, ebenso der SSR-Marker SSR2-CB10347. Der SSR-Marker SSR1-Na10-D09 benötigt für eine Auftrennung der Fragmente dagegen höher auflösende Verfahren wie Polyacrylamid-Gele.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, konnte eine Kopplung der TuYV-Resistenz zu SSRs von Chromosom N9 (PIQUEMAL ET AL., 2005) nur zu CB10347 und Na10-D09, d.h. zur Telomerregion des kurzen Arms der veröffentlichten Karte nachgewiesen werden ebenso besteht eine Kopplung zu dem SSR CB10196 (Abbildung 24) auf Chromosom N4 (PIQUEMAL ET AL., 2005). Weitere SSRs von Chromosom N9 mit Kopplung zur TuYV-Resistenz konnten nicht kartiert werden. Andererseits werden in aktuelleren Literaturstellen die SSRs Na10-D09 (OREGIN, 2005; KIM ET AL., 2006) und CB10347 (BASUNANDA ET AL., 2007; RADOEV, 2007; SUN ET AL., 2007) statt Chromosom N9 dem Chromosom N4 zugeordnet, jedoch konnte auch unter Verwendung weiterer SSRs von Chromosom N4 keine Kopplungen mit weiteren SSRs von Chromosom N4 mit Ausnahme von CB10196 nachgewiesen werden (Abbildung 24). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die TuYV-Resistenz dem Chromosom N4 zuzuordnen ist, da zum einen keine weitere Kopplung mit anderen SSRs von Chromosom N9 der in PIQUEMAL ET AL. (2005) veröffentlichten Karte nachgewiesen werden konnte und zum anderen die beiden eng mit der TuYV-Resistenz gekoppelten SSRs selbst nicht eindeutig dem Chromosom N9 zugeordnet werden, sondern in verschiedenen neuen

Veröffentlichungen dem Chromosom N4. Der SSR CB10196 wird stets auf Chromosom N4 kartiert (BASUNANDA ET AL., 2007; RADOEV, 2007).

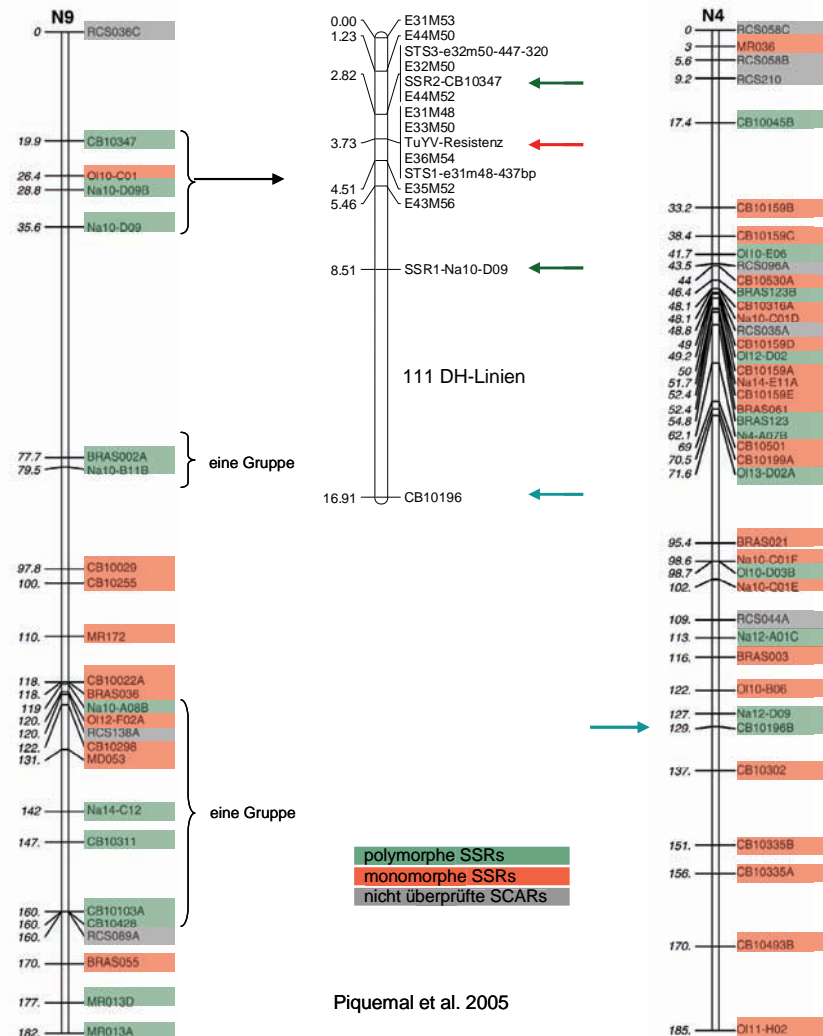


Abbildung 24: Vergleich der eigenen Kopplungskarte (JoinMap 4.0) basierend auf 111 DH-Linien (Mitte) mit der Karte von PIQUEMAL ET AL. (2005) zu den Chromosomen N9 (links) und N4 (rechts). Der blaugrüne Pfeil deutet auf die Position des CB10196 (Chromosom N4) hin, die dunkelgrünen Pfeile auf die beiden SSRs von N9 und der rote Pfeil auf die TuYV-Resistenz.

Eine weitere Möglichkeit zur chromosomalen Lokalisation der TuYV-Resistenz besteht in der Nutzung der Syntenie zur Modellpflanze *A. thaliana*.

Hierfür wurden alle AFLP-Sequenzen gegen eine BAC-Bibliothek geblastet (BRASSICA RAPA GENOME PROJECT, 2007) und die hoch-homologen Regionen wiederum anhand der THE ARABIDOPSIS THALIANA INTEGRATED DATABASE (2007) im *A. thaliana* Genom gesucht. Homologe Sequenzen wurden auf allen fünf *Arabidopsis*-Chromosomen lokalisiert. Diese Positionen wurden auf die *Arabidopsis*-Karte von PARKIN ET AL. (2005) übertragen. Die in dortigen Regionen befindlichen RFLP-Marker wurden wiederum in Karten von *B. napus* (PARKIN ET AL., 2005) überführt um homologe Sequenzen in *B. napus* zu lokalisieren. Da syntänische Regionen auf fast allen Chromosomen von *B. napus* identifiziert werden konnten, war ein Rückschluss auf eine chromosomale Lokalisierung der TuYV-Resistenz mit dieser Methode nicht möglich.

4.3 Markergestützte Selektion

In der herkömmlichen praktischen Pflanzenzüchtung führt der Weg zu neuen Sorten über die zeitaufwendige phänotypische Analyse einer Vielzahl von Individuen hinsichtlich der gewünschten Merkmale (SUWABE ET AL., 2002). Im Beispiel der TuYV-Resistenz würde dies bedeuten, dass nach der arbeitsintensiven künstlichen Infektion mit virustragenden Blattläusen ebenso aufwendige serologische Überprüfungen durchzuführen wären. Um resistente Genotypen zu identifizieren, ist es notwendig, das Pflanzenmaterial über die gesamte Vegetationsperiode zu beobachten, um auch in späteren Testungen mögliche viruspositive Genotypen zu identifizieren.

An dieser Stelle bieten die entwickelten Marker den enormen Vorteil, bereits in einem sehr frühen Entwicklungsstadium indirekt auf Resistenz selektieren zu können. Auf diese Weise kann schon frühzeitig eine markergestützte Selektion durchgeführt und die zu testende Anzahl an Individuen reduziert werden (RIBAUT UND HOISINGTON, 1998). Die enge Kopplung der entwickelten Marker zur TuYV-Resistenz ermöglicht eine zuverlässige Identifizierung TuYV-resistenter Genotypen anhand einer PCR und einfachen Auswertung der Bandenmuster aus Agarose-Gelen.

Liegen codominante Marker vor, wie die hier entwickelten SSR- und STS-Marker, können sowohl homozygote als auch heterozygote elterliche Allele identifiziert werden (KONIECZNI UND AUSUBEL, 1993). Es ist daher schon in einem frühen Stadium des Zuchtprogramms und des jeweiligen Pflanzenmaterials sowie unabhängig vom Heterozygotie-Grad des Materials möglich, das Vorhandensein oder Fehlen eines elterlichen Allels nachzuweisen, das für eine Merkmalsausprägung verantwortlich ist.

Dieses kann ohne den Einsatz von molekularen Markern erst in einem späteren Entwicklungsstadium bzw. einem fortgeschrittenen Stadium des Züchtungsprozesses beurteilt werden.

Ein weiteres Beispiel für die Möglichkeiten der markergestützten Selektion stellt die eindeutige Identifikation der Lokalisation der betreffenden Genloci (Chromosomenposition) beispielsweise mittels SSRs dar. Dadurch kann im Einzelfall ein QTL mit Kartenpositionen aus anderen Studien verglichen werden, wie für das Merkmal Glucosinolat-Gehalt von BASUNANDA ET AL. (2007) gezeigt wurde. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, positive Allele für das betreffende (quantitative) Merkmal gezielt zu kombinieren, was mit phänotypischer Selektion allein nur zufällig erreicht wird. Locus-spezifische SSR-Marker können generell als Anker-Marker genutzt werden, um Karten aus verschiedenen Populationen zu vergleichen (UZUNOVA UND ECKE, 1999).

5 Zusammenfassung

Insgesamt 111 DH-Linien aus drei Kreuzungen des Typs „resistent x anfällig“ wurden hinsichtlich ihrer Resistenzreaktion gegenüber *Turnip yellows virus* (TuYV) phänotypisiert. Unter Annahme eines Schwellenwertes von $E_{405}=0,1$ zeigten die Ergebnisse der Vegetationsperioden 2004/2005 und 2005/2006 eine Anpassung an eine genetische Spaltung von 1 (resistent) : 1 (anfällig), so dass im Prinzip von einer monogenischen Vererbung der TuYV-Resistenz ausgegangen werden kann. In beiden Jahren zeigte sich im Vegetationsverlauf eine kontinuierliche Erhöhung des Virustiters resistenter Pflanzen im Dezember, der jedoch nicht die Höhe des Virustiters anfälliger Pflanzen erreichte.

Das letzte Versuchsjahr 2006/2007 zeigte – abweichend von den Vorjahren 2004/2005 und 2005/2006 – aufgrund der extremen Witterung im Herbst und Winter bereits im Dezember eine derartig weit fortgeschrittene Virusentwicklung, dass bis zur letzten Testung keine DH-Linien virusfrei blieben.

Ausgehend von den ermittelten Phänotyp-Daten ist daher davon auszugehen, dass es sich bei der TuYV-Resistenz um eine quantitative Resistenzreaktion handelt, bei der neben einem dominanten Hauptgen, welches für den geringen Virustiter im Dezember verantwortlich ist, weitere Minorgene wirksam sind.

Basierend auf den phänotypischen Daten konnten unter Verwendung der Bulk Segregant Analysis zwei sehr eng mit Resistenz gekoppelte SSR-Marker sowie neun ebenfalls sehr eng mit der TuYV-Resistenz gekoppelte AFLP-Marker identifiziert werden. Zwei AFLP-Marker konnten in STS-Marker konvertiert werden, die somit als diagnostische Marker eine effektive markergestützte Selektion erlauben.

Basierend auf einer vorliegenden genetischen Karte wurde die TuYV-Resistenz zunächst auf Chromosom N9 (A-Genom) vermutet. Die Lokalisierung auf N9 konnte jedoch mit weiteren SSRs nicht bestätigt werden. Ausgehend von neueren Erkenntnissen, nach denen die mit der TuYV-Resistenz eng gekoppelten SSR-Marker dem Chromosom N4 zugeordnet werden, konnte anhand weiterer N4-spezifischer SSRs Kopplung mit einem weiteren SSR auf diesem Chromosom nachgewiesen werden. Da die beiden eng mit der TuYV-Resistenz gekoppelten SSRs in mehreren aktuelleren Arbeiten ebenfalls N4 zugeordnet werden, kann von einer Lokalisation auf diesem Chromosom ausgegangen werden.

6 Abstract

Turnip yellows virus (TuYV) belongs to the Poleroviruses within the *Luteoviridae* family. TuYV is transmitted in a persistent manner by aphids – mainly *M. persicae* (SCHLIEPHAKE ET AL., 2000; D'ARCY UND DOMIER, 2005) - and is widespread worldwide (GRAICHEN AND RABENSTEIN, 1996; THOMAS ET AL., 1993; SMITH AND HINCKES, 1985). The infection rate is depending on the vector activity, which increases with mild autumn and winter temperatures. Therefore, it is assumed that this virus will become even more important in the future due to global warming. Chemical measures against the vector i.e. insecticide sprayings or seed treatment are neither acceptable for ecological reasons nor very efficient (READ AND HEWSON, 1988; WALSH ET AL., 1989).

Yield losses caused by TuYV have been estimated to range from 12 to 34 % (GRAICHEN, 1997). Therefore, resistance to TuYV is an important goal of winter rapeseed breeding. This holds true in particular in the frame of an environmentally friendly winter rapeseed production, since resistant cultivars will considerably reduce insecticide treatments. Besides this, red or violet discolorations of leaves and growth reductions resemble symptoms of nutrient deficiency, leading to the additional application of fertilizer which cannot be taken up by infected plants (GRAICHEN, 1999).

A prerequisite for successfully integrating resistance to TuYV from wild or basic material into adapted cultivars is detailed knowledge on the inheritance of resistance and the availability of molecular markers, because rearing of virus infested aphids needed for artificial inoculation cannot be integrated efficiently into applied rapeseed breeding. Therefore, the goals of this study were (i) to achieve detailed information on the mode of inheritance of resistance to TuYV, and (ii) to develop molecular markers suited for marker based selection procedures.

In order to obtain detailed information on the genetics of resistance derived from the resynthesized rapeseed line 'R54' and to identify segregating molecular markers a total of 111 DH-lines were analysed.

In three years field trials a monogenic mode of inheritance (1 resistant : 1 susceptible segregation) was detected in December of the first two years after artificial inoculation of DH-lines using virus bearing aphids and assuming a threshold for resistance of $E_{405}=0.1$. With the progressing growing season a continuous increase of the virus titre was observed also in the plants classified as resistant in December. However, the virus titre of these plants never reached the level of the susceptible ones. In contrast to these results much higher virus concentrations were already observed in December 2007 due to the extremely mild autumn.

The phenotype data give hint that the TuYV-resistance is inherited by one dominant major-gene, which is responsible for the low virus titres in December until spring,

complemented by further minor genes for resistance. Additionally, pronounced effects of environment (temperature) are assumed.

Based on these phenotypic data marker development using bulked segregant analysis (BSA) was started and two closely linked SSR marker, six closely linked and three cosegregating AFLP marker and two cosegregating diagnostic STS marker have been developed.

Due to the SSRs identified the TuYV-resistance was first supposed to be located on chromosome N9 (A-Genome) based on the map by PIQUEMAL ET AL. (2005). However, this localization could not be confirmed with further SSRs of chromosome N9. In more recent studies the linked SSRs were assigned to chromosome N4, and the analysis of additional SSRs from N4 led to the identification of one N4-derived SSR. Therefore, it is concluded that the TuYV-resistance is most likely located on chromosome N4.

7 Literaturverzeichnis

Akbar, M. A. (1987): Artificial *Brassica napus* flowering in Bangladesh. Theor Appl Genet 73, 465-468.

Akbar, M. A. (1989): Resynthesis of *Brassica napus* aiming for improved earliness and carried out by different approaches. Hereditas 111, 239-246.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhyng, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-PLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res Vol. 25, 3389-3402.

Attia, T., Röbbelen, G. (1986): Cytogenetic relationship within cultivated *Brassica* analyzed in amphihaploids from the three diploid ancestors. Can J Genet Cytol 28, 323-329.

Attia, T., Busso, C., Röbbelen, G. (1987): Digenomic triploids for an assessment of chromosome relationships in the cultivated diploid *Brassica* species. Genome 29, 326-330.

Badani, A. G., Snowdon, R. J., Wittkop, B., Lipsa, F. D., Baetzel, R., Horn, R., De Haro, A., Font, R., Lühs, W., Friedt, W. (2006): Colocalization of a partially dominant gene for yellow seed colour with a major QTL influencing acid detergent fibre (ADF) content in different crosses of oilseed rape (*Brassica napus*). Genome 49, 1499-1509.

Baerecke, M.-L. (1956): Ergebnisse der Resistenzzüchtung gegen das Blattrollvirus der Kartoffel. Z Pflanzenzüchtung 36, 395-412.

Barker, H. (1987): Multiple components of the resistance of potatoes to *potato leafroll virus*. Ann Appl Biol 111, 641-648.

Barker, H., Harrison, B. D. (1983): Polygenic resistance to *potato leafroll virus* (PLRV). Annual Report Scottish Crop Research Institute 1983, 194.

Barker, H., Harrison, B. D. (1984): Polygenic resistance to *potato leafroll virus* (PLRV). Annual Report Scottish Crop Research Institute 1984, 194-195.

Barker, H., Harrison, B. D. (1985): Restricted multiplication of *potato leafroll virus* in resistant potato genotypes. Ann appl Biol 107, 205-212.

Barker, H., Solomon, R. M. (1990): Indication of simple genetic control of one aspect of multigenic resistance to *potato leafroll virus*. Abstr. 11th Trien. Conf. EAPR, Edinburgh, 473.

Barker, H., Solomon-Blackburn, R. M., McNicol, J. W., Bradshaw, J. E. (1994): Resistance to *potato leaf roll virus* multiplication in potato is under major gene control. Theor Appl Genet 88, 754-758.

- Basunanda, P., Spiller, T. H., Hasan, M., Gehringer, A., Schondelmaier, J., Lühs, W., Friedt, W., Snowdon, R. J. (2007): Marker-assisted increase of genetic diversity in a double-low seed quality winter oilseed rape genetic background. *Plant Breeding* 126, 581-587.
- Becker, H. C., Engqvist, G. M., Karlsson, B. (1995): Comparison of rapeseed cultivars and resynthesized lines based on allozyme and RFLP markers. *Theor Appl Genet* 91, 62-67.
- Beuve, M., Stevens, M., Liu, H.-Y., Wintermantel, W. M., Hauser, S., Lemaire, O. (2008): Biological and molecular characterization of an American sugar beet-infecting *Beet western yellows virus* isolate. *Plant Dis* 92, 51-60.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Brassica DB (2006-2007): <http://ukcrop.net/perl/ace/search/BrassicaDB>
- Brassica rapa Genome Project (2007): <http://www.brassica-rapa.org/BGP/blast.jsp>
- Brauer, D. (2007): Geschichte des Rapsanbaus. In Christen, O., Friedt, W. (Hrsg.): *Winterraps, das Handbuch für Profis*. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt a.M., S. 9-16.
- Brault, V., van den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Garaud, J.-C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. (1995): Aphid transmission of *beet western yellows luteovirus* requires the minor capsid read-through protein P74. *The EMBO Journal* Vol. 14 (4), 650-659.
- Casper, R., Meyer, S. (1981): Die Anwendung des ELISA-Verfahrens zum Nachweis pflanzenpathogener Viren. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 33 (2), 49-54.
- Catcheside, D. G. (1934): The chromosomal relationships in the swede and turnip groups of *Brassica*. *Ann Bot Lond* 48, 601-633.
- Chamberlin, F. S. (1950): Source of early aphid infestations in shade-grown tobacco. *Florida Entomologist* 33, 16-17.
- Chen, B. Y., Heneen, W. K. (1989): Resynthesized *Brassica napus* L.: A review of its potential in breeding and genetic analysis. *Hereditas* 111, 255-263.
- Chen, B. Y., Heneen, W. K. (1992): Inheritance of seed colour in *Brassica campestris* L. and breeding for yellow-seeded *B. napus* L. *Euphytica* 59, 157-163.
- Chevre, A. M., This, P., Eber, F., Deschamps, M., Renard, M., Delseny, M., Quiros, C. F. (1991): Characterization of disomic addition lines *Brassica napus*-*Brassica nigra* by isozyme, fatty acid, and RFLP markers. *Theor Appl Genet* 81, 43-49.

- Clark, M. F., Adams, A. N. (1977): Characteristics of the Microtiterplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J gen Virol* 34, 475-483.
- Clauss, E. (1975): Methoden der Artbastardierung innerhalb der Gattung *Brassica* zur Schaffung neuen Ausgangsmaterials für die Züchtung. Tag.-Ber., Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, Berlin, 145, S. 83-98.
- Coutts, B. A., Jones, R. A. C. (2000): Viruses infecting canola (*Brassica napus*) in south-west Australia: incidence, distribution, spread, and infection reservoir in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Aust J Agric Res* 51, 925-936.
- Coutts, B. A., Hawkes, J. R., Jones, R. A. C. (2006): Occurrence of *Beet western yellows virus* and its aphid vectors in over-summering broad-leaved weeds and volunteer crop plants in the grainbelt region of south-western Australia. *Aust J Agric Res* 57, 975-982.
- D'Arcy, C. J. (1986): Current problems in the taxonomy of luteoviruses. *Microbiological Sciences* 3, 309-313.
- D'Arcy, C. J., Domier, L. L. (2005): Family: Luteoviridae. In *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses; eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Virus*, Edited by Fauquet, C. M. Elsiveier, Amsterdam, 891-900.
- Delourme, R., Foisset, N., Horvais, R., Barret, P., Champagne, G., Cheung, W. Y., Landry, B. S., Renard, M. (1998): Characterisation of the radish introgression carrying the *Rfo* restorer gene for the *Ogu*-INRA cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 97, 129-134.
- Derrick, P. M., Barker, H. (1997): Short and long distance spread of *potato leafroll luteovirus*: effects of host genes and transgenes conferring resistance to virus accumulation in potato. *J Gen Virol* 78, 243-251.
- Diederichsen, E., Sacristan, M. D. (1996): Disease response of resynthesized *Brassica napus* L. lines carrying different combinations of resistance to *Plasmodiophora brassicae* Wor. *Plant Breeding* 115, 5-10.
- Domier, L. L., McCoppin, N. K., Larsen, R. C., D'Arcy, C. J. (2002): Nucleotide sequence shows that *Bean leafroll virus* has a Lutovirus-like genome organization. *J Gen Virol* 83, 1791-1798.
- Downey, R. K., Röbbelen, G. (1989): *Brassica* Species. In: Röbbelen, G., Downey, R. K., Ashri, A. (Eds.): *Oil crops of the world*. McGraw-Hill, Inc., USA. pp. 339-362.
- Drews, G., Adam, G., Heinze, C. (2004): *Molekulare Pflanzenvirologie*. Springer, Berlin, 157-166.

- Dreyer, F., Graichen, K., Jung, C. (2001): A major quantitative trait locus for resistance to *Turnip Yellow Virus* (TuYV, syn. *beet western yellows virus*, BWYV) in rapeseed. *Plant Breeding* 120, 457-462.
- Duffus, J. E. (1960): *Radish Yellows*, a Disease of Radish, Sugar Beet, and Other Crops. *Phytopathology* 50, 389-394.
- Duffus, J. E. (1961): Economic significance of *beet western yellows (radish yellows)* on sugar beet. *Phytopathology* 51, 605-607.
- Duffus, J. E. (1972): *Beet western yellows virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 89.
- Duffus, J. E., Milbrath, G. M. (1977): Susceptibility and immunity in soybean to *beet western yellows virus*. *Phytopathology* 67, 269-272.
- Duffus, J. E., Russell, G. E. (1970): Serological and host range evidence for the occurrence of *Beet western yellows virus* in Europe. *Phytopathology* 60, 1199-1202.
- Duffus, J. E., Russell, G. E. (1972): Serological Relationship *Between Beet Western Yellows and Turnip Yellow Viruses*. *Phytopathology* 62, 1274-1277.
- Duffus, J. E., Russell, G. E. (1975): Serological relationship between *Beet western yellows* and *Beet mild yellowing viruses*. *Phytopathology* 65, 811-815.
- Fomitcheva, V. W., Sukhacheva, E. A., Schubert, J. (2004): Detection of *Turnip Yellow Virus*-encoded RNA-dependent RNA polymerase using monoclonal antibodies. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 37, 9-17.
- Frauen, M. (2007a): Zuchtziele. In Christen, O., Friedt, W. (Hrsg.): *Winterraps, das Handbuch für Profis*. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt a.M., S. 25-29.
- Frauen, M. (2007b): Resistenzzüchtung unter veränderten Rahmenbedingungen - Raps. Resistenztagung Fulda, Fortschritte in der Krankheitsbekämpfung und Resistenzzüchtung bei landwirtschaftlichen Kulturpflanzen 10. Dez. 2007, Fulda.
- Friedt, W. (2007): Biotechnologische Verfahren. In Christen, O., Friedt, W. (Hrsg.): *Winterraps, das Handbuch für Profis*. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt a.M., S. 30-38.
- Fussell, G. E. (1955): History of cole (*Brassica* sp.). *Nature* 176, 48-51.
- Gase, G. (1989): Merkmale und Bewertung der quantitativen Resistenz der Kartoffel gegenüber dem *potato leafroll virus* (PLRV). Dissertation A, AdL DDR, Berlin, 110 S.
- Gates, R. R. (1938): The species concept in the light of cytology and genetics. *Am Naturalist* 72 (741), 340-349.
- Geisler, G. (1991): *Farbatlas Landwirtschaftliche Kulturpflanzen*. Ulmer Verlag, Stuttgart.

Geneious 2.5.4 (2007): <http://www.geneious.com/>

Gersdorf, E. (1955): Beiträge zur holozyklischen Überwinterung von *Myzodes persicae* Sulzer im Bereich des Pflanzenschutzamts Hannover im Winterhalbjahr 1953/54. Z Pflanzenkrankh Pflanzenschutz 62, 1-11.

Girke, A. (2002): Neue Genpools aus resynthetisiertem Raps (*Brassica napus* L.) für die Hybridzüchtung. Dissertation, Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen.

Gish, W. (1996-2005): <http://blast.wustl.edu>

Gladis, T., Hammer, K. (1990): Die Gaterslebener *Brassica*-Kollektion - eine Einführung. Kulturpflanze 38, 121-156.

Gladis, T., Hammer, K. (1992): Die Gaterslebener *Brassica*-Kollektion - *Brassica juncea*, *B. napus*, *B. nigra* und *B. rapa*. Feddes Repertorium 103 (7-8), 469-507.

Gland, A. (1980): Glucosinolatgehalt und -muster in den Samen resynthetisierter Rapsformen. Dissertation, Landw. Fak. Univ. Göttingen.

Gland, A. (1982): Gehalt und Muster der Glucosinolate in Samen von resynthetisierten Rapsformen. Z Pflanzenzüchtg 88, 242-254.

Graichen, K. (1994): Nachweis von Resistenz gegenüber dem *Turnip Yellow*s *Luteovirus* (TuYV) in Winterraps und verwandten Arten. Vortr Pflanzenzüchtung 30, 132-143.

Graichen, K. (1995a): Quantitative und qualitative Resistenz in Winterraps und seinen Ausgangsformen gegenüber dem *Turnip Yellow*s *Luteovirus*. Phytomedizin (Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft e.V.) 25 (1), 13-15.

Graichen, K. (1995b): Zur Bedeutung von Virusbefall für den Anbau von Winterraps und Leindotter. Mitt a d Biol Bundesanst 310, 102-108.

Graichen, K. (1996): Befunde zum Auftreten und zur Schädigung des Wasserrübenvergilbungsvirus (*turnip yellows virus*) am Winterraps im Anbaujahr 1994/1995. Phytomedizin 26 (4), 21-22.

Graichen, K. (1997): Wasserrübenvergilbungsvirus - Ertrags- und Qualitätsminderungen beim Winterraps. Raps 4, 156-159.

Graichen, K. (1998): Einfluß von Umweltbedingungen auf die Symptom- und Resistenzausprägung von Winterraps nach Inokulation mit dem *turnip yellows virus*. Mitt a d Biol Bundesanst 357, 291-292.

Graichen, K. (1999): Häufig verkannt: Die Wasserrübenvergilbung an Winterraps. Der Pflanzenarzt 9-10, 8-11.

- Graichen, K., Rabenstein, F. (1996): European isolates of *beet western yellows virus* (BWYV) from oilseed rape (*Brassica napus* L. ssp. *napus*) are non-pathogenic on sugar beet (*Beta vulgaris* L. var. *Altissima*) but represent isolates of *turnip yellows virus* (TuYV). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 103 (3), 233-245.
- Graichen, K., Schliephake, E. (2000): Virusauftreten im Winterraps. *Raps* 18 (4), 190-194.
- Graichen, K., Schliephake, E., Rabenstein, F. (1997): Epidemischer Befall von Winterraps durch das Wasserrübenvergilbungsvirus (Syn. Westliches Rübenvergilbungsvirus) im Anbaujahr 1995/96. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 49 (10), 241-246.
- Graichen, K., Schubert, J., Richter, K., Rabenstein, F. (1998): Sensitivitätsvergleich von Nachweismethoden für das *turnip yellows luteovirus*. *Mitt a d Biol Bundesanst* 357, 292-293.
- Graichen, K., Peterka, H., Rabenstein, F., Schubert, J. (2000a): Untersuchungen zur Entwicklung von Basismaterial bei Winterraps mit extremer Resistenz gegen das *Turnip yellows luteovirus*. *Mitt Biol Bundesanst Land- Forstwirtsch* 376, 197-198.
- Graichen, K., Rabenstein, F., Kurtz, E. (2000b): Auftreten des Wasserrübenvergilbungs-Virus (*Turnip yellows virus*) an Winterraps in Österreich. *Pflanzenschutzberichte* 59 (1), 35-46.
- Graichen, K., Schliephake, E., Rabenstein, F. (2000c): Auftreten des *Turnip yellows luteovirus* an Winterraps in verschiedenen deutschen Anbauregionen. *Mitt Biol Bundesanst Land- Forstwirtsch* 376, 196-197.
- Guilley, H., Richards, K. E., Jonard, G. (1995): Nucleotide sequence of *beet mild yellowing virus* RNA. *Arch Virol* 140, 1109-1118.
- Haga, T. (1938): Relationship of genome to secondary pairing in *Brassica* (a preliminary note). *Jpn J Genet* 13, 277-284.
- Hamann, U. (1962): Die Prüfung der Blattrollvirusresistenz von Kartoffelzuchtmaterial durch Laboratoriumsmethoden. *Nachrichtenbl Dt Pflanzenschutz* 16, 134-139.
- Hansen, L. N., Earle, E. D. (1994): Novel flowering and fatty acid characters in rapid cycling *Brassica napus* L. resynthesizing by protoplast fusion. *Plant Cell Rp* 14, 151-156.
- Hauser, S., Stevens, M., Beuve, M., Lemaire, O. (2002): Biological properties and molecular characterization of *beet chlorosis virus* (BChV). *Arch Virol* 147, 745-762.

- Heath, D. W., Earle, E. D. (1995): Synthesis of highererucic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) somatic hybrids with improved agronomic characters. *Theor Appl Genet* 91, 1129-1136.
- Heinze, K. (1948): Die Überwinterung der grünen Pfirsichlaus *Myzodes persicae* (Sulzer) und die Auswirkung der Überwinterungsquellen auf den Massenwechsel im Sommer. *Nachrbl Dtsch Pflschdienst Berlin N.F. 2 (7/8)*, 105-112.
- Heinze, K., Profft, J. (1938): Zur Lebensgeschichte und Verbreitung der Blattlaus *Myzus persicae* (Sulzer) in Deutschland und ihre Bedeutung für die Verbreitung von Kartoffelvirosen. *Ldw Jahrb* 86, 483-500.
- Hille Ris Lambers, D. (1946): The hibernation of *Myzus persicae* Sulzer and some related species, including a new one. *Bull Entomol Res* 37, 197-199.
- Hoffmann, W., Peters, R. (1958): Versuche zur Herstellung synthetischer und semisynthetischer Rapsformen. *Züchter* 28, 40-51.
- Hong, D. F., Liu, J., Yang, G. S., He, Q. B. (2008): Development and characterization of SCAR markers associated with a dominant genic male sterility in rapeseed. *Plant Breeding* 127, 69-73.
- Hossain, M. M., Inden, H., Asahira, T. (1990): Seed vernalized interspecific hybrids through in vitro ovule culture in *Brassica*. *Plant Sci* 68, 95-102.
- Howell, P. M., Sharpe, A. G., Lydiate, D. J. (2003): Homoeologous loci control the accumulation of seed glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome* 46, 454-460.
- Hsu, Y. (1963): Observations on the Overwintering Habits of Some Species of Aphids in Chungking. *Acta Entomologica Sinica* 12 (5-6) 658-663.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Javidfar, F., Ripley, V. L., Roslinsky, V., Zeinali, H., Abdmishani, C. (2006): Identification of molecular markers associated with oleic and linolenic acid in spring oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Breeding* 125, 65-71.
- Jay, C. N., Smith, H. G. (1994): The Effect of *Beet Western Yellows Virus* on the Growth and Yield of Winter Oilseed Rape. Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases, 7D-6, 941-942.
- Jones, R. A. C., Coutts, B. A., Hawkes, J. (2007): Yield-limiting potential of *Beet western yellows virus* in *Brassica napus*. *Aust J Agric Res* 58, 788-801.
- Kennedy, J. S., Booth, C. O., Kershaw, W. J. S. (1959): Host finding by aphids in the field I. Gynoparae. *Appl Biol* 47, 410-423.

- Kim, J. S., Chung, T. Y., King, G. J., Jin, M., Yang, T.-J., Jin, Y.-M., Kim, H.-I., Park, B.-S. (2006): A Sequence-Tagged Linkage Map of *Brassica rapa*. *Genetics* 174, 29-39.
- Koch, H., Peters, R. (1952): Neue Gesichtspunkte der Rapszüchtung. *Wissenschaftl Zeitschr der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg* 2, 363-367.
- Körper-Grohne, U. (1987): *Nutzpflanzen in Deutschland - Kulturgeschichte und Biologie*. Konrad Theiss Verl., Stuttgart, 490 S.
- Konieczny, A., Ausubel, F. M. (1993): A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant Journal* 4, 403-410.
- Kosambi, D. D. (1944): The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics* 12, 172-175.
- Kresovich, S., Szewc-McFadden, A. K., Blied, S. M., McFerson, J. R. (1995): Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor Appl Genet* 91, 206-211.
- Kroll, K. (1994): Ein archäologischer Rapsfund des 16. Jahrhunderts, entdeckt in Heide in Holstein, Norddeutschland. *J Agron Crop Sci* 173, 17-21.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res* 21, 1111-1115.
- Leflon, M., Brun, H., Eber, F., Delourme, R., Lucas, M. O., Vallée, P., Ermel, M., Balesdent, M. H., Chèvre, A. M. (2007): Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. *Theor Appl Genet* 115, 897-906.
- Lowe, A. D. (1962): The overwintering of *Myzus persicae* Sulz. In Canterbury (a note). *New Zealand J Agr Res* 5, 364-367.
- Lowe, A. J., Moule, C., Trick, M., Edwards, K. J. (2004): Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theor Appl Genet* 108, 1103-1112.
- Lozán, J. L., Kausch, H. (2007): *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*. Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg.
- Lydiate, D., Sharpe, A. G., Parkin, I (1995): Collinearity and homoeologous recombination between the A and C genomes of *Brassica napus*. *Proc. 9th Intern. Rapeseed Congress (GCIRC)*, Cambridge, United Kingdom, Vorl. 4, pp. 1122-1124.

MEGA4 (2007): <http://www.megasoftware.net/features.html>

Meudt, H. M., Clarke, A. C. (2007): Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.*, doi:10.1016/j.tplants.2007.02.001

Michelmore, R. W., Paran, I., Kesseli, R. V. (1991): Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9828-9832.

Mithen, R. F., Magrath, R. (1992): Glucosinolates and resistance to *Leptosphaeria maculans* in wild and cultivated *Brassica* species. *Plant Breeding* 108, 60-68.

Mongkolporn, O., Kadkol, G. P., Pang, E. C. K., Taylor, P. W. J. (2003): Identification of RAPD markers linked to recessive genes conferring silique shatter resistance in *Brassica rapa*. *Plant Breeding* 122, 479-484.

Moonan, F., Molina, J., Mirkov, T. E. (2000): *Sugarcane Yellow Leaf Virus*: An Emerging Virus That Has Evolved by Recombination between Luteoviral and Poleroviral Ancestors. *Virology* 269, 156-171.

Morinaga, T. (1934): Interspecific Hybridization in *Brassica* - VI. The cytology of F1 hybrids of *B. juncea* and *B. nigra*. *Cytologia* 6, 62-67.

Müller, F. P. (1954a): Die Populationsdynamik der Grünen Pfirsichblattlaus *Myzodes persicae* (Sulz.). *Wissenschaftliche Zeitschrift der Universität Rostock* 3 (5), 379-385.

Müller, F. P. (1954b): Holozyklie und Anholozyklie bei der Grünen Pfirsichblattlaus *Myzodes persicae* (Sulz.). *Z ang Ent* 36 (4), 369-380.

Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987): Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.

Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8 (19), 4321d-4325.

New England BioLabs (2007): <http://www.neb.com>

Nicolas, S. D., Le Mignon, G., Eber, F., Coriton, O., Monod, H., Clouet, V., Huteau, V., Lostanlen, A., Delourme, R., Chalhoup, B., Ryder, C. D., Chèvre, A. M., Jenczewski, E. (2007): Homologous Recombination Plays a Major Role in Chromosome Rearrangements That Occur During Meiosis of *Brassica napus* Haploids. *Genetics* 175, 487-503.

Oetting, W. S., Lee, H. K., Flanders, D. J., Wiesner, G. L., Sellers, T. A., King, R. A. (1995): Linkage Analysis with Multiplexed Short Tandem Repeat Polymorphisms Using Infrared Fluorescence and M13 Tailed Primers. *Genomics* 30, 450-458.

- Olsson, G. (1960): Species crosses within the genus *Brassica*. II. Artificial *Brassica napus* L. *Hereditas* 46, 351-386.
- Oregon, 2005: <http://www.oregin.info/Stakeholders/meetings/220305/pres/teakle220305.pdf>
- Paetsch, C., Duchscherer, P., Frauen, M., Hauska, D., Hemker, R., Koch, J., Stiewe, G. (2004): Zweijährige Ergebnisse mehrortiger Versuche zur Ertragsrelevanz des Wasserrübenvergilbungsvirus (*Turnip yellows virus*, TuYV) an Winterraps. Proc. 10th Int. Conf. For Renewable Resources and Plant Biotechnology.
- Parkin, I. A. P., Sharpe, A. G., Keith, D. J., Lydiate, D. J. (1995): Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome* 38, 1122-1131.
- Parkin, I. A. P., Gulden, S. M., Sharpe, A. G., Lukens, L., Trick, M., Osborn, T. C., Lydiate, D. J. (2005): Segmental Structure of the *Brassica napus* Genome Based on Comparative Analysis With *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 171, 765-781.
- Paul, V. H. (2003): Raps - Krankheiten, Schädlinge, Schadpflanzen. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, S. 20-22.
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G., Ziegler-Graff, V. (2002): P0 of *Beet western yellows virus* is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Virology* 76, 6815-6824.
- Piquemal, J., Cinquin, E., Couton, F., Rondeau, C., Seignoret, E., Doucet, I., Perret, D., Villegier, M.-J., 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 linked to *Phoma* resistance genes of the *Brassica* B-genome revealed sequence homology between *Brassica nigra* and *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 102, 483-488.
- Quiros, C. F., Ochoa, O., Douches, D. (1988): Exploring the role of $x = 7$ species in *Brassica* evolution: Hybridization with *B. nigra* and *B. oleracea*. *J Heredity* 79, 351-358.
- Rabenstein, F. (1998): Entwicklung serologischer und molekularbiologischer Methoden zur Differenzierung von Luteoviren bei Raps und Zuckerrübe und zur Selektion auf Virusresistenz. *Jahresbericht BAZ 1998*, 75-77.
- Radoev, M. (2007): Genetic Analysis of Heterosis in Rapeseed (*B. napus* L.) by QTL Mapping. Dissertation, Faculty of Agricultural Sciences, Georg-August-Universität Göttingen.

- Rahman, M., McVetty, P. B. E., Li, G. (2007): Development of SRAP, SNP and Multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L.. Theor Appl Genet 115, 1101-1107.
- Rajcan, I., Kasha, K. J., Kott, L. S., Beversdorf, W. D. (1999): Detection of molecular markers associated with linolenic and erucic acid levels in spring rapeseed (*Brassica napus* L.). Euphytica 105, 173-181.
- Randles, J. W.; Rathjen, J. P. (2000): Genus Luteovirus. In: Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., Summers, M. D. (eds): Virus Taxonomy, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag Wien, New York, pp. 379-383 (1995).
- Read, M. A., Hewson, R. T. (1988): Prevention of *Beet Western Yellows Virus* (BWYV) in Winter Oilseed Rape by Control of Aphid Vectors with Deltamethrin. Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases, 8C-22, 989-997.
- Reutenauer, A., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. (1993): Identification of *Beet Western Yellows Luteovirus* Genes Implicated in Viral Replication and Particle Morphogenesis. Virology 195, 692-699.
- Ribaut, J.M., Hoisington, D. (1998): Marker-assisted selection: new tools and strategies. Trends Plant Sci 3, 236-239.
- Röbbelen, G. (1960): Beiträge zur Analyse des *Brassica*-Genoms. Chromosoma 11, 205-228.
- Ross, H. (1958): Virusresistenzzüchtung an der Kartoffel. European Potato Journal 1 (4), 1-19.
- Rudorf, W. (1951): Über die Erzeugung und die Eigenschaften synthetischer Rapsformen. Z Pflanzenzüchtg 29, 35-54.
- Rygulla, W., Snowdon, R. J., Friedt, W., Happstadius, I., Cheung, W. Y., Chen, D. (2008): Identification of Quantitative Trait Loci for Resistance Against *Verticillium longisporum* in Oilseed Rape (*Brassica napus*). Phytopathology 98 (2), 215-221.
- Sadowy, E., Maasen, A., Juszczuk, M., David, C., Zagórski-Ostoja, W., Gronenborn, B., Hulanicka, D. (2001): The ORF0 product of *Potato leafroll virus* is indispensable for virus accumulation. Journal of General Virology 82, 1529-1532.
- Sarla, N., Raut, R. N. (1987): Cytomorphological studies in a *Brassica campestris* x *B. oleracea* hybrid. Indian J Genet 47, 343-345.
- Schiemann, A., Dauck, V., Friedt, W., Streng, S., Graner, A., Ordon, F. (1999): Establishment of a fluorescence-based AFLP technique and rapid marker detection for the resistance locus *rym5*. Barley Genetics Newsletter 29, 5-8.

- Schliephake, E., Graichen, K., Rabenstein, F. (2000): Investigations on the vector transmission of the *Beet mild yellowing virus* (BMVY) and the *Turnip yellows virus* (TuYV). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 107 (1), 81-87.
- Schmidt, H. E., Meyer, U., Briest, E., Haack, I., Eisbein, K. (1989): Multiple resistance of spinach (*Spinacia oleracea*) to *cucumber mosaik* and *beet mild yellowing viruses*. *Zentralbl Mikrobiol* 144, 13-18.
- Schröder, M. (1994): Untersuchungen zur Anfälligkeit des Rapses (*Brassica napus* L. ssp. *napus*) gegenüber verschiedenen Viruskrankheiten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101 (6), 576-589.
- Schröder-Lembke, G. (1989): Die Entwicklung des Raps- und Rübsenanbaus in der deutschen Landwirtschaft. Verl. Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer, 35 S.
- Schuster, W. (1992): Ölpflanzen in Europa. DLG-Verlag, Frankfurt a. M., 9-31.
- Seyffert, W. (2003): Rekombination von Eukaryoten. in Seyffert, W. (Hrsg.): *Lehrbuch der Genetik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.S. 365-366.
- Seyis, F., Friedt, W., Lühs, W. (2001): Resynthese-Raps (*Brassica napus* L.) als genetische Ressource für die Qualitäts- und Ertragszüchtung. In *Schriften zu Genetischen Ressourcen*, Band 16: Nutzung genetischer Ressourcen - ökologischer Wert der Biodiversität. Symposium der AG Genetische Ressourcen der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung am 23./24. November 2000 in Witzenhausen. Hrsg Hammer, K., Gladis, T., ZADI, Bonn, 91-112.
- Sikka, S. M. (1940): Cytogenetics of *Brassica* hybrids and species. *J Genet* 40, 441-509.
- Šip, V., Chrpová, J., Vacke, J., Ovesná, J. (2004): Possibility of exploiting the Yd2 resistance to BYDV in spring barley breeding. *Plant Breeding* 123, 24-29.
- Smith, H. G., Hinckes, J. A. (1985): Studies on *beet western yellows virus* in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *Oleifera*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). *Ann appl Biol* 107, 473-484.
- Smith, H. G., Barker, I., Brewer, G., Stevens, M., Hallsworth, P. B. (1996): Production and evaluation of monoclonal antibodies for the detection of *beet mild yellowing luteovirus* and related strains. *European Journal of Plant Pathology* 102, 163-169.
- Snowdon, R. J., Friedrich, T., Friedt, W., Köhler, W. (2002): Identifying the chromosomes of the A- and C-genome diploid *Brassica* species *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. *Theor Appl Genet* 104, 533-538.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S. (1995): The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8089-8091.

- Song, K., Osborn, T. C. (1992): Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. *Genome* 35, 992-1001.
- Song, K., Tang, K., Osborn, T. C. (1993): Development of synthetic *Brassica* amphidiploids by reciprocal hybridization and comparison to natural amphidiploids. *Theor Appl Genet* 86, 811-821.
- Song, K., Osborn, T. C., Williams, P. H. (1988a): *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor Appl Genet* 75, 784-794.
- Song, K., Osborn, T. C., Williams, P. H. (1988b): *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 2. Preliminary analysis of subspecies within *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea*. *Theor Appl Genet* 76, 593-600.
- Song, K., Osborn, T. C., Williams, P. H. (1990): *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 3. Genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. *campestris*). *Theor Appl Genet* 79, 497-506.
- Steudel, W. (1952): Untersuchungen zur anholozyklischen Überwinterung der Grünen Pfirsichblattlaus (*Myzodes persicae* Sulz.) an *Brassicaceen*. *Mitt Biol Bundesanst Land- Forstwirtschaft Berl-Dahlem* 73, 5-32.
- Sun, Z., Wang, Z., Tu, J., Zhang, J., Yu, F., McVetty, P. B. E., Li, G. (2007): An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers. *Theor Appl Genet* 114, 1305-1317.
- Suwabe, K., Iketani, H., Nunome, T., Kage, T., Hirai, M. (2002): Isolation and characterisation of microsatellites in *Brassica rapa* L.. *Theor Appl Genet* 104, 1092-1098.
- Terradot, L., Souchet, M., Tran, V., Ducray-Bourdin, D. G. (2001): Analysis of a Three-Dimensional Structure of *Potato leafroll virus* Coat Protein Obtained by Homology Modeling. *Virology* 286, 72-82.
- The *Arabidopsis thaliana* Integrated Database (2007): <http://atidb.org/cgi-perl/gbrowse/atibrowse/>
- Thomas, P. E., Mink, G. I. (1998): Tomato hybrids with nonspecific immunity to viral and mycoplasma pathogens of potatoes and tomatoes. *Hort Sci* 33, 764-765.
- Thomas, P. E., Hang, A. N., Reed, G., Gilliland, G. C., Reisenauer, G. (1993): Potential Role of Winter Rapeseed Culture on the Epidemiology of Potato Leaf Roll Disease. *Plant Disease* 77 (4), 420-423.

- Torres, M. W., Corrêa, R. L., Schrago, C. G. (2005): Analysis of differential selective forces acting on the coat protein (P3) of the plant virus family *Luteoviridae*. *Genetics and Molecular Research* 4 (4), 790-802.
- Truco, M. J., Hu, J., Sadowski, J., Quiros, C. F. (1996): Inter- and intra-genomic homology of the *Brassica* genomes: implication for their origin and evolution. *Theor Appl Genet* 93, 1225-1233.
- U, N. (1935): Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany* 7, 389-452.
- UFOP (2006): Biodiesel und pflanzliche Öle als Kraftstoffe - aus der Nische in den Kraftstoffmarkt, Stand und Entwicklungsperspektiven. UFOP Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V., Berlin.
- Unilever / UFOP (2007): Nachhaltiger Rapsanbau. Unilever N. V., Netherlands / UFOP Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V., Berlin.
- Uzunova, M. I., Ecke, W. (1999): Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding* 118, 323-326.
- Van den Heuvel, J. F. J. M., de Blank, C. M., Peters, D., van Lent, J. W. M. (1995): Localization of *potato leafroll virus* in leaves of secondarily-infected potato plants. *European Journal of Plant Pathology* 101, 567-571.
- van der Wilk, F., Houterman, P., Molthoff, J., Hans, F., Dekker, B., Van den Heuvel, J., Huttinga, H., Goldbach, R. (1997a): Expression of the *potato leafroll virus* ORF0 induces viral disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Mol Plant-Microbe Interact* 10, 153-159.
- van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A. M., van den Heuvel, J. F. J. M. (1997b): The Genome-Linked Protein of *Potato Leafroll Virus* Is Located Downstream of the Putative Protease Domain of the ORF1 Product. *Virology* 234, 300-303.
- van Emden, H. F., Eastop, V. F., Hughes, R. D., Way, M. (1969): The ecology of *Myzus persicae*. *Ann Rev Entomol* 14, 197-270.
- Van Ooijen, J. W. (2006): JoinMap © 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.
- Vanderwalle, R. (1950): La jaunisse des navets. *Parasitica* 6 (4), 111-112.
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. (1988): Nucleotide sequence of *Beet western yellows virus* RNA. *Nucleic Acids Res* 16, 9917-9932.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23 (21), 4407-4414.
- Walkey, D. G. A., Pink, D. A. C. (1990): Studies on resistance to *beet western yellows virus* in lettuce and the occurrence of field sources of the virus. *Plant Pathol* 39, 141-155.
- Walsh, J. A., Perrin, R. M., Miller, A., Laycock, D. S. (1989): Studies on *beet western yellows virus* in winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) and the effect of insecticidal treatment on its spread. *Crop Protection* 8, 137-143.
- Warwick, S. I., Black, L. D. (1991): Molecular systematics of *Brassica* and allied genera (Subtribe *Brassicinae*, *Brassicaceae*) - chloroplast genome and cytodeme congruence. *Theor Appl Genet* 82, 81-92.
- Weber, J. L., May, P. E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44, 388-396.
- Yamagishi, H., Yoshikawa, H., Yui, S. (1990): Leaf morphology and soft rot resistance in offspring of a somatic hybrid between Chinese cabbage and kale (*Cruciferae*). *Euphytica* 47, 215-221.
- Zhi-wen, L., Ting-dong, F., Jin-xing, T., Bao-yuan, C. (2005): Inheritance of seed colour and identification of RAPD and AFLP markers linked to the seed colour gene in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 110, 303-310.
- Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J. D., Simonis, M.-T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K. E., Jonard, G. (1996): The Coat Protein of *Beet Western Yellows Luteovirus* is Essential for Systemic Infection but the Viral Gene Products P29 and P19 are Dispensable for Systemic Infection and Aphid Transmission. *Mol Plant-Microbe Interact* 9 (6), 501-510.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TuYV-Symptome - Rote Blattfärbungen, insbesondere an den älteren Blättern [Aschersleben, 22.05.2006 (links oben und rechts), 02.06.2006 (links unten)].....	11
Abbildung 2: Vorkommen von TuYV-Resistenz in den Arten der Gattung <i>Brassica</i> (aus GRAICHEN, 1994).	18
Abbildung 3: Ansicht der Versuchsanlage; Quedlinburg, 10.12.2006.....	27
Abbildung 4: Blattlaus-Besiedelung von Rapspflanzen im Feld; Quedlinburg, 09.10.2006. ..	28
Abbildung 5: Polyacrylamid-Gel mit Silberfärbung. Die Pfeile kennzeichnen zwischen resistenten und anfälligen Genotypen differenzierende Fragmente in den AFLP-Kombinationen E36M54 (links), E33M50 (Mitte) und E31M48 (rechts).	34
Abbildung 6: Von der Ausgangs-DNA über die AFLP-Reaktionen zur Anlagerung der Schnittstellen.....	35
Abbildung 7: Sequenz von e36m54-363bp - rot eingezeichnet die in das Plasmid eingefügte genomische Sequenz, die der AFLP-Klonierungs-Primer (hellblau), die abgeleiteten Primer (dunkelblau) und die überprüften Restriktionsschnittstellen (schwarz gestrichelt).....	38
Abbildung 8: Extinktionswerte der 111 DH-Linien in den Vegetationsperioden 2004/2005 (links) und 2005/2006 (rechts).	41
Abbildung 9: Extinktionswerte der 111 DH-Linien in der Vegetationsperiode 2006/2007.	42
Abbildung 10: Extinktionswerte der Eltern in den Vegetationsperioden 2005/2006 und 2006/2007.	42
Abbildung 11: Rangkorrelation der Extinktionswerte zum Probenahmetermin Dezember 2004 gegenüber Dezember 2005 (links) sowie Dezember 2004 gegenüber Dezember 2006 (rechts).	44
Abbildung 12: Rangkorrelation der Extinktionswerte zum Probenahmetermin April 2005 gegenüber April 2006 (links) sowie April 2005 gegenüber April 2007 (rechts).	44
Abbildung 13: Rangkorrelation der Extinktionswerte zum Probenahmetermin Mai/Juni 2005 gegenüber Mai/Juni 2006 (links) und Mai/Juni 2005 gegenüber Mai/Juni 2007 (rechts).	45
Abbildung 14: Zwischen resistenten und anfälligen Genotypen differenzierender SSR1 Na10-D09, Beckman Coulter CEQ 8000.	46
Abbildung 15: Zwischen resistenten und anfälligen Genotypen differenzierender SSR2 CB10347, Beckman Coulter CEQ 8000.....	47
Abbildung 16: Sequenz von STS1 - rot eingezeichnet die in das Plasmid eingefügte genomische Sequenz, die der AFLP-Klonierungs-Primer (hellblau) und der abgeleiteten STS-Primer (dunkelblau).	50
Abbildung 17: Zwischen resistenten und anfälligen Genotypen differenzierende STS-Marker. STS3-e32m50-447-320 (links, Fragmentgrößen von 344bp für resistente und 385bp für anfällige Genotypen), STS1-e32m48-437bp (rechts, Fragmentgrößen von 437bp für resistente und 376bp für anfällige Genotypen). Jeweils 10µl Probe in 1,5 % Agarose-Gel (1xTBE).	51
Abbildung 18: PCR-Produkte des abgeleiteten monomorphen Primers e36m54-343bp, geschnitten mit <i>PvuI</i> (Polymorphismus für SW01T1000).	52
Abbildung 19: Genetische Karte der für TuYV-Resistenz relevanten Kopplungsgruppe, basierend auf der Analyse von 111 DH-Linien.....	54
Abbildung 20: Mittlere Niederschläge (in mm) in den drei Versuchsjahren 2004/05, 2005/06 (Aschersleben) und 2006/07 (Quedlinburg); Wetterstation des Julius Kühn-Instituts, Quedlinburg.....	55
Abbildung 21: Temperaturverlauf (mittlere Monatstemperatur in °C) in den drei Versuchsjahren 2004/05, 2005/06 (Aschersleben) und 2006/07 (Quedlinburg); Wetterstation des Julius Kühn-Instituts, Quedlinburg.	57

Abbildung 22: <i>Tissue Blot Immuno Assay</i> (TBIA) eines Wurzelquerschnittes der anfälligen Sorten 'Ladoga' (links) und 'Express' (Mitte), sowie der resistenten Sorte 'Caletta' (rechts) mit violett angefärbten TuYV-Partikeln, Datum: 27.02.2008.	60
Abbildung 23: Ausschnitt des TBIA eines Wurzelquerschnittes (vergl. Abbildung 22, rechts) der resistenten Sorte 'Caletta', mit roten Pfeilen mögliche Reaktionen aufgrund von Viruspartikeln markiert; rechts TBIA der gleichen Pflanze, Blattstielquerschnitt, hier kein Virusnachweis möglich; Aufnahme: 27.02.2008.	61
Abbildung 24: Vergleich der eigenen Kopplungskarte (JoinMap 4.0) basierend auf 111 DH-Linien (Mitte) mit der Karte von PIQUEMAL ET AL. (2005) zu den Chromosomen N9 (links) und N4 (rechts). Der blaugrüne Pfeil deutet auf die Position des CB10196 (Chromosom N4) hin, die dunkelgrünen Pfeile auf die beiden SSRs von N9 und der rote Pfeil auf die TuYV-Resistenz.	63
Abbildung 25: Nach CLARK UND ADAMS (1977) verändertes Standard-Protokoll zur Durchführung des DAS-ELISA. Links Abbildung aus CLARK UND ADAMS (1977), rechts die durchgeführten Schritte. Ein kurzer Waschschrift bedeutet, dass die Platten mit Waschpuffer befüllt und sofort wieder entleert wurden; ein langer Waschschrift bedeutet, dass die Platten etwa 3 Minuten mit Waschpuffer befüllt stehen gelassen wurden.	87

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kreuzungen und Anzahl DH-Linien (Aussaart 2004), sowie Anzahl Selbstungsnachkommen der DH-Linien der Kreuzungen (Aussaart 2005 und 2006)	26
Tabelle 2: Unterteilung der Extinktionswerte.	29
Tabelle 3: Probenahme-Termine für den Nachweis der Resistenzreaktion.	30
Tabelle 4: Merkmale und Zusammenstellung der Bulks.	31
Tabelle 5: Rangkorrelation nach Spearman für die drei Versuchsjahre und die drei Probenahme-Termine.	43
Tabelle 6: Primer-Sequenzen der identifizierten SSRs und des M13uniFi (M13-Tail unterstrichen dargestellt).	48
Tabelle 7: Zusammenfassung AFLP- und STS-Marker.	48
Tabelle 8: Auflistung Anzahl blauer bzw. weißer Kolonien je Transformation sowie der Anteil weißer Kolonien an der Gesamtanzahl, aufgeteilt in die Ausplattierungs-Varianten 40µl bzw. ca.355µl Transformationsprodukt.	49
Tabelle 9: Primer-Sequenzen der STS-Marker. STS3 mit M13-Tail (unterstrichen dargestellt), STS1 ohne M13-Tail.	50
Tabelle 10: Auswahl der Ergebnisse des Datenbankvergleiches.	53

10 Anhang

10.1 Agrotechnische Maßnahmen, 2003 bis 2007

2003/2004 F1-Hybriden

Datum	Zweck	Mittel	Aufwandmenge
26.08.2003	Unkraut	Nimbus	2,4 l/ha
28.08.2003	Unkraut	Nimbus	2,4 l/ha
25.09.2003	Wachstumsregler und Fungizid	Folicur	1 l/ha
12.03.2004	N-Düngung	KAS	225 kg KAS = 60kg N/ha
01.04.2004	Wachstumsregler und Fungizid	Folicur	1 l/ha
14.04.2004	Rüßler	Fastac	130 ml/ha

2004/2005 DH-Linien

Datum	Zweck	Mittel	Aufwandmenge
27.08.2004	Unkraut	Nimbus	2,66 l/ha
06.09.2004	Ausfallgetreide	Fusilade	1,5 l/ha
08.09.2004	Erdflöhen	Fastac	0,1 l/ha
01.10.2004	Wachstumsregler und Insektizid	Folicur	1 l/ha
04.04.2005	Rüßler	Fastac	0,2 l/ha
06.04.2005	Fungizid	Folicur	1 l/ha

2005/2006 DH-Linien

Datum	Zweck	Mittel	Aufwandmenge
18.08.2005	Unkraut	Nimbus	2,66 l/ha
20.09.2005	Wuchshemmer und Fungizid	Folicur	1 l/ha
19.04.2006	Wuchshemmer und Fungizid	Folicur	1 l/ha
19.04.2006	Rüßler	Fastac SC Super Contact	0,13 l/ha
26.04.2006	Rüßler	Fastac SC Super Contact	0,13 l/ha

2006/2007 DH-Linien und F1-Hybriden

Datum	Zweck	Mittel	Aufwandmenge
20.09.2006	Wuchshemmer und Fungizid	Folicur	1 l/ha
13.03.2007	Rüßler	Fastac SC Super Contact	0,13 l/ha
27.03.2007	Wuchshemmer und Fungizid	Folicur	1 l/ha
03.04.2007	Rapsglanzkäfer	Biscaya	0,3 l/ha
16.04.2007	Rapsglanzkäfer	Biscaya	0,3 l/ha

10.2 DAS-ELISA

Für den DAS-ELISA wurde die „ELISA-Plate, Mikrolon, 96 K, F-Form, Bindungskapazität: Hoch, Kaminausführung“ der Firma Greiner bio-one verwendet. Das in CLARK UND ADAMS (1977) und CASPER UND MEYER (1981) beschriebene Standard-Protokoll zur Durchführung des DAS-ELISAs wurde wie in Abbildung 25 dargestellt verändert.

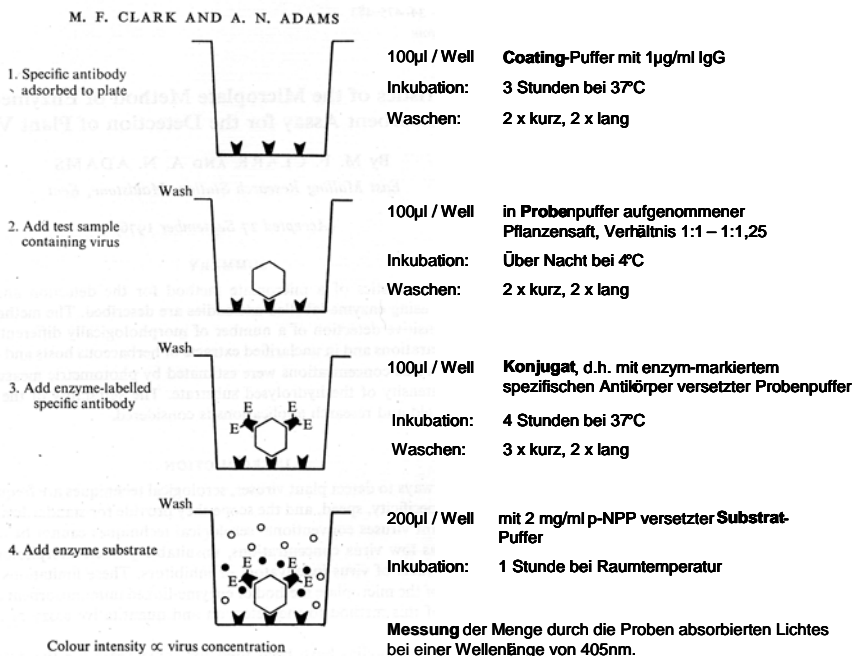


Fig. 1. Principle of the ELISA technique for plant viruses.

Abbildung 25: Nach CLARK UND ADAMS (1977) verändertes Standard-Protokoll zur Durchführung des DAS-ELISA. Links Abbildung aus CLARK UND ADAMS (1977), rechts die durchgeführten Schritte. Ein kurzer Waschschrift bedeutet, dass die Platten mit Waschpuffer befüllt und sofort wieder entleert wurden; ein langer Waschschrift bedeutet, dass die Platten etwa 3 Minuten mit Waschpuffer befüllt stehen gelassen wurden.

Verwendete Puffer und Lösungen

Coating-Puffer (pH 9,6)

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Natriumcarbonat, wasserfrei, Na ₂ CO ₃ (Roth, M 105,99g/mol, 99,8 %)	15mM	1,59g
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃ (Roth, M 84,01g/mol, 99 %)	34,9mM	2,93g
H ₂ O _{dest.}		1 Liter

frisch zugegeben:

Reagenzien	Endkonzentration	für 10ml
Coating-Puffer		10ml
IgG 1:100	1µg/ml	100µl

Phosphate-buffered saline – PBS (pH 7,4)

Reagenzien	Endkonzentration	für 6 Liter
Natriumchlorid, NaCl (Roth, M 58,44g/mol, 99,5 %)	136,9mM	48g
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄ (Roth, M 136,09g/mol, 99 %)	1,47mM	1,2g
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat, Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Roth, M 177,99g/mol, 99,5 %)	8,1mM	8,64g
Kaliumchlorid, KCl (Roth, M 74,56g/mol, 99,5 %)	2,68mM	1,2g
H ₂ O _{dest.}	add to	6 Liter

Waschpuffer

Reagenzien	Endkonzentration	für 5 Liter
PBS		5 Liter
Tween 20 (Serva, M ca.1200)	0,01 % (v/v)	0,5ml

Probenpuffer

Reagenzien	Endkonzentration	für 100ml
Polyvinylpyrrolidone 25, PVP, (C ₆ H ₉ NO) _n (Serva, Mr ca. 29000)	2 % (w/v)	2g
Trockenmilch	0,2 % (w/v)	0,2g
Tween 20 (Serva, M ca.1200)	0,00005 % (v/v)	0,05µl bzw. 1 Tr.

Der Pflanzensaft aus dem gepressten Pflanzenmaterial wurde mit dem Probenpuffer in einem Verhältnis Puffer zu Pflanzensaft 1:1-1,25 verdünnt.

Positiv- und Negativ-Kontrolle

Die verwendeten Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden aus hochinfizierten bzw. virusfreien Pflanzenproben erstellt [200µl Pflanzensaft + 800µl Probenpuffer + 0,2mg Natriumsulfit (Na_2SO_3 , Roth, M 126,04 g/mol, 98 %)] und gefriergetrocknet gelagert. Für die Verwendung wurden diese Proben mit 1ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst.

Konjugat

Die zu verwendende Verdünnung des Konjugates wurde mit jeder Charge im Labor von Herrn Dr. Frank Rabenstein (JKI-IEP) neu anhand virusfreiem Pflanzenmaterial und Material mit verschiedenen TuYV-Isolaten in Abhängigkeit vom IgG ermittelt und das Konjugat auf eine zu verwendende Verdünnung von 1:2000 eingestellt.

Substrat(-Puffer) (pH 9,8):

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$		800ml
Diethanolamine, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$ (Sigma, M 105,14g/mol, 98 %)	9,5 % (v/v)	97ml
Natriumazid, NaN_3 (Roth, M 65,01g/mol, 99 %)	3mM	0,2g
pH 9,8 mit Salzsäure, HCl (Roth, 0,1mol/l - 0,1N Maßlösung)		
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	add to	1 Liter
Magnesiumchlorid-6-hydrat, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Roth, M 203,3g/mol, 99 %)	1mM	203mg
frisch zugegeben:		
Reagenzien	Endkonzentration	für 20ml
Substrat Puffer		20ml
4-Nitrophenyl Phosphat Na_2 -salz (p-NPP), $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_6\text{P} \cdot \text{Na}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Serva, Mr 371,15)	2,7mM bzw. 2mg/ml	0,02g

10.3 TBIA – Tissue Blot Immuno Assay

Das Pflanzenmaterial (Wurzel, Haupttrieb, Stängel, Blätter) wurde auf einer desinfizierten Glasfläche angeschnitten und die glatte Schnittstelle für etwa 1-2 Sekunden auf die Membran (Hybond-C, Amersham LIFESCIENCE) gedrückt.

Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach einem 15-Minütigen Waschschrift in „Puffer A“ folgten 60 Minuten Inkubation in „Puffer A“ mit 5 % (w/v) Trockenmilch und 1µl/ml des Serums IgG 70 (RABENSTEIN, 1998).

Es folgte ein weiterer Waschschrift von 15 Minuten in „Puffer A“ mit 5 % (w/v) Trockenmilch und weitere 60 Minuten Inkubation mit ZAKAG (Ziege Anti-Kaninchen IgG) 1:2000 in „Puffer A“ gelöst.

Nach weiteren 10 Minuten waschen in „Puffer A“ folgten 10 Minuten waschen in „Puffer B“.

Zur Färbung wurde die Membran 2-5 Minuten in der „Substratlösung A+B“ inkubiert. Es folgten 5 Minuten Entfärbung in Natriumhypochlorit, 1:5 verdünnt in H₂O_{dest.} zur Entfernung noch anhaftendem Chlorophylls.

Abschließend folgten 2x10 Minuten Waschen in H₂O_{dest.}

Die Luftgetrocknete Membran wurde mikroskopisch ausgewertet.

Verwendete Puffer und Lösungen

„Puffer A“

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth, M 121,14g/mol, 99,9 %)	10mM	1,211g
Natriumchlorid, NaCl (Roth, M 58,44g/mol, 99,8 %)	100mM	5,844g
pH 8,0 mit Salzsäure, HCl (Roth, 0,1mol/l - 0,1N Maßlösung)		
H ₂ O _{dest.}	add to	1 Liter

„Puffer B“

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth, M 121,14g/mol, 99,9 %)	100mM	12,114g
Natriumchlorid, NaCl (Roth, M 58,44g/mol, 99,8 %)	100mM	5,844g
pH 9,0 mit Salzsäure, HCl (Roth, 0,1mol/l - 0,1N Maßlösung)		
H ₂ O _{dest.}	add to	1 Liter

Substratlösung A

Reagenzien	Endkonzentration	für 26ml
4-Nitroblau tetrazolium chlorid, C ₄₀ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀ O ₆ (Loewe, M 817,65g/mol)	423mM	0,009g
Puffer B	add to	26ml

Substratlösung B

Reagenzien	Endkonzentration	für 4ml
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz, C ₁₅ H ₁₅ N ₂ O ₄ BrClP (Roth, M 433,64g/mol, 99,5 %)	2,88mM	0,005g
Puffer B	add to	4ml

„Substratlösung A+B“

Reagenzien	Endkonzentration	für 30ml
Substratlösung A	87 % (v/v)	26ml
Substratlösung B	13 % (v/v)	4ml

10.4 Arbeitsvorschrift DNA-Extraktion

Es wurden 4ml Extraktionspuffer auf etwa 500mg gemahlenes Pflanzenmaterial gegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte für 90 Minuten bei 65°C gefolgt von einer anschließenden Inkubation für 5 Minuten im Eisbad.

Nach Zugabe von 0,5 Volumen Chloroform (CHCl_3 , Roth, M 119,38g/mol, 99 %) / Isoamylalkohol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$, Roth, M 88,15g/mol, 98,5 %) (24:1) und 30 Minuten langsamer Inversion wurde 20 Minuten bei 2350 x g zentrifugiert (Sorvall RC 5 mit Swinging Bucket Rotor HS-4, 3500 rpm). Dieser Schritt wurde dann mit dem Überstand und 1 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) wiederholt.

Der klare Überstand der zweiten Zentrifugation wurde mit 0,3mg RNaseA (Qiagen) behandelt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Inkubationsschritt von 5 Minuten im Eisbad durchgeführt.

Die DNA-Fällung erfolgte mit 0,7 Volumen der Proben eiskaltem Isopropanol (Roth, M 60,10g/mol, 99,8 %). Anschließend wurde die DNA nach invertieren mittels Pasteurpipette gefischt.

Eine Nachbehandlung der DNA erfolgte zunächst 15 Minuten in 1ml Waschpuffer I und anschließend 5 Minuten in Waschpuffer II. Nach Trocknung der DNA wurde diese in 100µl TE-Puffer (10mM Tris, 1mM EDTA) gelöst.

Die Konzentration der DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt (Spectra Max 190, Molecular Devices) und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf 25ng/µl verdünnt.

Verwendete Puffer und Lösungen

1,0M Tris

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (Roth, M 121,14g/mol, 99,9 %)	1M	121,14g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	add to	1 Liter
pH 8 mit 2N Salzsäure, HCl (Roth, 2mol/l - 2N Maßlösung)		
20 Minuten bei 121°C autoklaviert		

0,5M EDTA

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Roth, M 372,24g/mol, 99 %)	0,5M	186,12g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	add to	1 Liter
pH 8,01 mit 4N Natronlauge, NaOH (Roth, 4mol/l - 4N Maßlösung)		
20 Minuten bei 121°C autoklaviert		

Natriumacetat 3M

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Natriumacetat, NaAc, C ₂ H ₃ NaO ₂ (Roth, M 82,03g/mol, 99 %)	3M	246,09g
H ₂ O _{dd}	add to	1 Liter
pH 5		

Extraktionspuffer – 1,3xCTAB+BME

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Hexadecyltrimethylammoniumbromid, CTAB, C ₁₉ H ₄₂ BrN (Roth, M 364,46g/mol, 98 %)	1,3 % (w/v)	13g
„1,0M Tris“	130mM	130ml
„0,5M EDTA“	13mM	26ml
Natriumchlorid, NaCl (Roth, M 58,44g/mol, 99,8 %)	900mM	52,65g
Polyvinylpyrrolidone K30, PVP, (C ₆ H ₉ NO) _x (Roth, M ca. 40000g/mol, reinst)	0,65 % (w/v)	6,5g
H ₂ O _{dd}	add to	1 Liter
frisch zugeben:		
2-Mercaptoethanol, BME, C ₂ H ₆ OS (Roth, M 78,13g/mol, 99 %)	180mM	13ml

Waschpuffer I

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
g/mol, 99,8 %)	75,85 % (v/v)	760ml
„Natriumacetat 3M“	200mM	66,7ml
H ₂ O _{dd}	add to	1000ml

Waschpuffer II

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Ethanol, C ₂ H ₆ O (Roth, M 46,07g/mol, 99,8 %)	75,85 % (v/v)	760ml
Ammoniumacetat, C ₂ H ₇ NO ₂ (Roth, M 77,08g/mol, 97 %)	10mM	0,771g
H ₂ O _{dd}	add to	1000ml

TE-Puffer

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
1,0M Tris	10mM	10ml
0,5M EDTA	1mM	2ml
H ₂ O _{dd}	add to	1000ml

10.5 Protokolle SSRs

Reaktions-Ansatz für PCR, 10µl (R. Snowdon, pers. Mitteilung):

Reagenzien	Stammlösung	Endkonzentration	für 10µl-Ansatz
Puffer	10x		1,00µl
dNTPs	10mM	0,2mM	0,20µl
MgCl ₂ aus Puffer		1,5mM	
MgCl ₂	25mM	1,0mM	0,40µl
Summe MgCl ₂		2,5mM	
F-Primer*	5pmol/µl	0,5µM	0,10µl
R-Primer	5pmol/µl	0,5µM	0,10µl
M13**	10pmol/µl	0,5µM	0,05µl
Taq DNA Polymerase (Qiagen)	5U/µl	0,25U	0,05µl
DNA	25ng/µl	50ng	2,00µl
h ₂ O _{dd}			6,10µl

** M13uniFi: 5'-AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT-3' (mit 5'-Markierung je nach Detektionssystem)

*Die M13-Sequenz 5'-TTTCCAGTCACGACGTT-3' wird vor jedem Forward-Primer angehängt (Primer werden 18 bp länger)

Cycler-Programme (R. Snowdon, pers. Mitteilung):

td68		
95 °C	2:00	
95 °C	0:45	5 Zyklen
68 °C	5:00	-2°C pro Zyklus
72 °C	1:00	
95 °C	0:45	5 Zyklen
58 °C	1:00	-2°C pro Zyklus
72 °C	1:00	
95 °C	0:45	27 Zyklen
47 °C	0:30	
72 °C	1:00	
72 °C	10:00	
4 °C	∞	

td60

95 °C	2:00		
95 °C	0:45		5 Zyklen
60 °C	5:00		-2°C pro Zyklus
72 °C	1:00		
95 °C	0:45		5 Zyklen
50 °C	1:00		-2°C pro Zyklus
72 °C	1:00		
95 °C	0:45		27 Zyklen
39 °C	0:30		
72 °C	1:00		
72 °C	10:00		
4 °C	∞		

td55

95 °C	2:00		
95 °C	0:45		5 Zyklen
55 °C	5:00		-2°C pro Zyklus
72 °C	1:00		
95 °C	0:45		5 Zyklen
45 °C	1:00		-2°C pro Zyklus
72 °C	1:00		
95 °C	0:45		27 Zyklen
34 °C	0:30		
72 °C	1:00		
72 °C	10:00		
4 °C	∞		

td50

95 °C	2:00		
95 °C	0:45		5 Zyklen
50 °C	5:00		-2°C pro Zyklus
72 °C	1:00		
95 °C	0:45		5 Zyklen
40 °C	1:00		-2°C pro Zyklus
72 °C	1:00		
95 °C	0:45		27 Zyklen
29 °C	0:30		
72 °C	1:00		
72 °C	10:00		
4 °C	∞		

10.6 Protokolle AFLPs

Restriktionsverdau

Reagenzien	Stammlösung	Endkonzentration	für 25µl-Ansatz
5x reaction buffer	5x		5,00µl
<i>EcoRI</i> / <i>MseI</i>	1,25U	2,5U	2,00µl
AFLP-grade water			12,00µl
DNA	25ng/µl	150ng	6,00µl

Ligation der Adapter

Reagenzien	Stammlösung	Endkonzentration	für 50µl-Ansatz
Adapter ligation solution			24,00µl
T4 DNA ligase	1U	1U/µl	1,00µl
Restriktionsverdau			25,00µl

+0 Preamplifikation

Reagenzien	Stammlösung	Endkonzentration	für 50µl-Ansatz
Puffer	10x		5,00µl
dNTPs	10mM	0,2mM	1,00µl
MgCl ₂ aus Puffer		1,5mM	
<i>EcoRI</i> +0	50ng/µl	75ng	1,50µl
<i>MseI</i> +0	50ng/µl	75ng	1,50µl
Taq DNA Polymerase (Qiagen)	5U/µl	1U	0,20µl
H ₂ O _{dd}			35,80µl
1:10-Verd. der Ligation			5,00µl

+1 Preamplifikation

Reagenzien	Stammlösung	Endkonzentration	für 50µl-Ansatz
Puffer	10x		5,00µl
dNTPs	10mM	0,2mM	1,00µl
MgCl ₂ aus Puffer		1,5mM	
<i>EcoRI</i> +A	50ng/µl	75ng	1,50µl
<i>MseI</i> +C	50ng/µl	75ng	1,50µl
Taq DNA Polymerase (Qiagen)	5U/µl	1U	0,20µl
H ₂ O _{dd}			35,80µl
1:10-Verd. der +0 Preamplifikation			5,00µl

+3 Amplifikation (für ALFexpress)

Reagenzien	Stammlösung	Endkonzentration	für 10µl-Ansatz
Puffer	10x		1,00µl
dNTPs	10mM	0,2mM	0,20µl
MgCl ₂ aus Puffer		1,5mM	
MgCl ₂	25mM	1,0mM	0,40µl
Summe MgCl ₂		2,5mM	
EcoRI -Primer+3, Cy5-Markiert	50ng/µl	19ng	0,38µl
MseI -Primer+3	50ng/µl	56ng	1,12µl
Taq DNA Polymerase (Qiagen)	5U/µl	0,2U	0,04µl
1:10-Verd. der 1+-Preamplifikation			2,50µl
H ₂ O _{dd}			4,36µl

+3 Amplifikation (für LI-COR und Silbergel)

Reagenzien	Stammlösung	Endkonzentration	für 10µl-Ansatz
Puffer	10x		1,00µl
dNTPs	10mM	0,2mM	0,20µl
MgCl ₂ aus Puffer		1,5mM	
MgCl ₂	25mM	1,0mM	0,40µl
Summe MgCl ₂		2,5mM	
EcoRI -Primer+3, Cy5-Markiert	50ng/µl	10ng	0,20µl
MseI -Primer+3	50ng/µl	28,75ng	0,575µl
Taq DNA Polymerase (Qiagen)	5U/µl	0,2U	0,04µl
1:10-Verd. der 1+-Preamplifikation			2,50µl
H ₂ O _{dd}			5,085µl

Cycler-Programme:**Restriktionsverdau (Invitrogen)**

37 °C	2:00:00
70 °C	0:15:00
4 °C	∞

Ligation der Adapter (Invitrogen)

20 °C	2:00:00
4 °C	∞

+0/+1 Preamplifikation (Vos ET AL., 1995)

94 °C	3:00		
94 °C	0:30		20 Zyklen
56 °C	1:00		
72 °C	1:00		
72 °C	10:00		
4 °C	∞		

+3 Amplifikation (Vos ET AL., 1995)

94 °C	3:00		
94 °C	0:30		12 Zyklen
65 °C	0:30		-0,7°C pro Zyklus
72 °C	1:00		
94 °C	0:30		22 Zyklen
56 °C	0:30		
72 °C	1:00		
72 °C	10:00		
4 °C	∞		

10.7 Puffer für ALFexpress

10x TBE ALFexpress (Laufpuffer 1xTBE)

Reagenzien	Endkonzentration	für 1l
Tris, $C_4H_{11}NO_3$ (Roth, M 121,14g/mol, 99,9 %)	1M	121,14g
Borsäure, H_2BO_3 (Roth, M 61,83g/mol, 99,8 %)	830mM	51,32g
EDTA, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ (Roth, M 372,24g/mol, 99 %)	10mM	3,72g
	H_2O_{dd}	add to
		1 Liter

Größenstandard:

ALFexpressTMSizerTM 50-500 (Amersham Biosciences) - Cy5-Standard 50-500bp

Reagenzien	Endkonzentration	für 10ml
ALFexpress Sizer		1 μ l
TE-Puffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH7,6)		3 μ l
Loading Dye		3 μ l

ebenfalls 2 Minuten bei 95°C denaturiert und vollständig aufgetragen.

10.8 Puffer für LI-COR

10x TBE Long Run (Laufpuffer 1xTBE)

Reagenzien	Endkonzentration	für 2l
Tris, $C_4H_{11}NO_3$ (Roth, M 121,14g/mol, 99,9 %)	1340mM	324,66g
Borsäure, H_3BO_3 (Roth, M 61,83g/mol, 99,8 %)	450mM	55,62g
EDTA, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ (Roth, M 372,24g/mol, 99 %)	25mM	18,61g
	H_2O_{dd}	add to
	pH 8,5 (mit HCl)	

Gellösung 8 % Long Ranger

Reagenzien	Endkonzentration	für 200ml
Long Ranger Gel Solution 50 % (Cambrex Bio Science Rockland)		32ml
Harnstoff, CH_4N_2O (Roth, M 60,06g/mol, 99,5 %)	6993mM	84g
	10xTBE Long Run	20ml
	H_2O_{dd}	add to
		200ml

10 % APS - Ammoniumperoxodisulfat

Reagenzien	Endkonzentration	für 10ml
APS - Ammoniumperoxodisulfat, $(NH_4)_2S_2O_8$ (Roth, M 228,2g/mol, 98 %)	438mM	1g
	H_2O_{dd}	add to
		10ml

bei -20°C lagern. Bei 4°C maximal 7 Tage verwendbar

Polyacrylamidgel

Reagenzien	Endkonzentration	für ein Gel (25cm, 0,25mm)
Gellösung 8 % Long Ranger		20ml
Temed, $C_8H_{16}N_2$ (Roth, M 116,21g/mol, 99 %)	0,1 % (v/v)	20µl
	10 % APS	140µl

Ladepuffer

Reagenzien	Endkonzentration	für 10ml
Formamid deionisiert, CH ₃ NO (Roth, M 45,04 g/mol, 99,5 %)	95 % (v/v)	9,5ml
EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ 2H ₂ O (Roth, M 372,24g/mol, 99 %)	10mM	0,03g
Fuchsin basisch	0,1 %	0,01g
Bromphenolblau Na-Salz, C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa (Roth, M 691,9g/mol)	0,01 %	0,001g
H ₂ O _{dd}	add to	10ml
pH 9		

Sizer™ 50-500 (Amersham Biosciences) - Cy5-Standard 50-500bp

Reagenzien	Endkonzentration	für 10ml
ALFexpress Sizer		0,5µl
TE-Puffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH7,6)		3µl
Loading Dye		3µl

10.9 Protokoll Polyacrylamidgel mit Silberfärbung

Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen auf Vorrat:

10xTBE (Laufpuffer 1xTBE)

Reagenzien	Endkonzentration	für 1l
Tris, $C_4H_{11}NO_3$ (Roth, M 121,14g/mol, 99,9 %)	891mM	108g
Borsäure, H_3BO_3 (Roth, M 61,83g/mol, 99,8 %)	889mM	55g
EDTA, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ (Roth, M 372,24g/mol, 99 %)	25mM	9,3g
	H_2O_{dd}	add to 1 Liter

Gel 30

Rotiphorese Gel 30 mit 30 % igem Acrylamid / Bisacrylamid - Stammlösung im Verhältnis 37,5:1 - fertige Lösung, Lagerung bei 4°C in dunkler Flasche.

gelöster Harnstoff

Reagenzien	Endkonzentration	für ca. 500ml
Harnstoff, CH_4N_2O (Roth, M 60,06g/mol, 99,5 %)	ca. 8391mM	252g
	10xTBE	56,1ml
	H_2O_{dd}	220,1ml

im Becherglas anrühren (ergibt ca. 500ml) in Flasche füllen und bei RT stehen lassen.

30 % APS - Ammoniumperoxodisulfat

Reagenzien	Endkonzentration	für 10ml
APS - Ammoniumperoxodisulfat, $(NH_4)_2S_2O_8$ (Roth, M 228,2g/mol, 98 %)	1314mM	3g
	H_2O_{dd}	add to 10ml

bei -20°C lagern. Aufgetautes maximal 7 Tage verwendbar.

Ladepuffer / Stoppsolution

Reagenzien	Endkonzentration	für 20ml
Formamid deionisiert, CH_3NO (Roth, M 45,04 g/mol, 99,5 %)	98 % (v/v)	19,6ml
EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Roth, M 372,24g/mol, 99 %)	10mM	0,074g
Xylencyanol, $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$ (Roth, M 538,6g/mol)	0,025 % (w/v)	0,005g
Bromphenolblau Na-Salz, $\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{O}_5\text{SNa}$ (Roth, M 691,9g/mol)	0,025 % (w/v)	0,005g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	add to	20ml

Standard:

99µl Ladepuffer

1µl 100bp DNA Ladder (Invitrogen)

Puffer und Lösungen, frisch angesetzt:

Verdünnung Binde Silan:

Reagenzien	Endkonzentration	für 10ml
BindingSilan (plusone)		20µl
Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (Roth, M 46,07g/mol, 99,8 %)	49,9 % (v/v)	5ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$		5ml

mindestens 30 Minuten bei RT stehen/rühren lassen.

Gel Herstellung:

Reagenzien	Endkonzentration	für 70ml
gelöster Harnstoff		60ml
Gel 30		10ml
30 % APS		130µl
Temed, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$ (Roth, M 116,21g/mol, 99 %)	0,07 % (v/v)	50µl

Fixierlösung / Stopplösung (10 % Essigsäure):

Reagenzien	Endkonzentration	für 2 Liter
Essigsäure, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (Roth, M 60,05g/mol, 100 %)	10 % (v/v)	200ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$		1800ml

Färbelösung:

Reagenzien	Endkonzentration	für 2 Liter
Silbernitrat, AgNO ₃ (Roth, M 169,88g/mol, 99,9 %)	5,89mM	2g
Formaldehyd, CH ₂ O (Roth, M 30,03g/mol, 37 %)	0,05 % (v/v)	3ml
H ₂ O _{dd}	add to	2000ml

Lösung erst kurz vor der Färbung ansetzen!

Entwicklerlösung:

Reagenzien	Endkonzentration	für 2 Liter
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃ (Roth, M 105,99g/mol, 99,8 %)	283mM	60g
H ₂ O _{dd}	add to	2000ml
auf unter 10°C kühlen. Erst direkt vor Verwendung zugeben:		
Formaldehyd, CH ₂ O (Roth, M 30,03g/mol, 37 %)	0,05 % (v/v)	3ml
Natriumthiosulfat, Na ₂ S ₂ O ₃ (Sigma, FW 158,1, 99 %)	63mM	20g

Silberfärbung mit Taschenkamm

Vorbereitung der Platten (Plattengröße 50cm Lauflänge, 0,4mm Gelstärke):

Die Pufferplatte wurde zuerst in H₂O_{dest.} gereinigt, anschließend mit 100 %igem Ethanol abgerieben, mit Kimwipes fusselfrei getrocknet und dann mit Glasreiniger fusselfrei gereinigt. Abschließend wurde sie mit BlueSlick (Serva) besprüht, kurz mit Kimwipes fusselfrei verteilt und luftgetrocknet. Die Glasplatte wurde ebenfalls zuerst in H₂O_{dest.} gereinigt, dann mit Glasreiniger eingesprüht und mit Kimwipes fusselfrei abgerieben. Abschließend wurde verdünntes BindingSilan mit Kimwipes fusselfrei verteilt und ca. 1 Stunde luftgetrocknet. Beide Platten wurden vor dem Zusammenbau mit Methanol (CH₄O, Roth, M 32,04g/mol, 99,9 %) leicht abgerieben.

Laufbedingungen:

Der Vorlauf wurde bei 100W, 60 Minuten und mit 50°C durchgeführt. Nach Beladung wurden für 10 Minuten bei 40W und 50°C zum Einlaufen der Proben in das Gel eingestellt und dann der Lauf für 90 Minuten bei 100W und 50°C durchgeführt.

Vorbereitung der Proben:

Die PCR-Produkte wurden mit gleicher Menge Ladepuffer (je 3µl) versetzt und diese sowie der Standard 5 Minuten bei 95°C denaturiert, anschließend bis zum Auftragen in Eis gelagert. Aufgetragen wurden 6-8µl mit Ladepuffer versetzte Probe und 4µl Standard.

Färbung:

Nach Abkühlen der Pufferplatte wurde die Glasplatte vorsichtig von der Pufferplatte getrennt und die Unterseite gereinigt. Für die Färbung wurde die Glasplatte mit der Gelseite nach oben in einer Wanne mit Fixierlösung 10 Minuten leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Glasplatte drei mal 3 Minuten ebenfalls unter leichtem Schütteln in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen und 30 Minuten in Färbelösung leicht geschüttelt. Alsdann wurde die Glasplatte maximal 10 Sekunden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen und unter leichtem Schütteln in Entwicklerlösung eine Sichtentwicklung durchgeführt. Die Entwicklung wurde unter Zugabe der Stopplösung abgebrochen, in der die Glasplatte weitere 10 Minuten leicht geschüttelt wurde. Abschließend wurde die Glasplatte drei mal 3 Minuten ebenfalls unter leichtem Schütteln in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen und zum Trocknen aufgestellt.

10.10 Puffer für die Herstellung kompetenter Zellen

LB-Medium

Reagenzien	Endkonzentration	für 1000ml
LB-Medium (Luria/Miller, Roth), pH 7	2,5 % (w/v)	25g

autoklaviert bei 121°C, mind. 20 Minuten.

LB-Medium für Petrischalen

Reagenzien	Endkonzentration	für 1000ml
LB-Medium (Luria/Miller, Roth), pH 7	2,5 % (w/v)	25g
Agar Noble (Difco)	2 % (w/v)	20g

autoklaviert bei 121°C, mind. 20 Minuten.

Nach Abkühlung auf 55°C 100mg Ampicillin auf 1000ml LB-Medium zugegeben und auf Petrischalen verteilt.

TB (Transformation Buffer)

Reagenzien	Endkonzentration	für 200ml
Pipes, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₆ S ₂ (Roth, M 302g/mol, ≥99 %)	10mM	0,605g
Calciumchlorid, CaCl ₂ (Roth, M 110,99g/mol, ≥98 %)	15mM	0,333g
Kaliumchlorid, KCl (Roth, M 74,56g/mol, 99,5 %)	250mM	3,728g
pH 6,7 mit NaOH		
Mangan (II)-chlorid-Tetrahydrat, MnCl ₂ ·4H ₂ O (Merck, M 197,91g/mol, ≥99 %)	55mM	2,177g

Steril filtrieren mit sterilen Rotilabo-Spitzenfilter, 0,22µm PVDF.

SOB

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Bacto tryptone (Difco)	2 % (w/v)	20,000g
Yeast extract SERVABACTER (Serva)	0,5 % (w/v)	5,000g
Natriumchlorid, NaCl (Roth, M 58,44g/mol, ≥99 %)	10mM	0,584g
Kaliumchlorid, KCl (Roth, M 74,56g/mol, 99,5 %)	2,5mM	0,186g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, MgCl ₂ ·6H ₂ O (Roth, M 203,3g/mol, ≥99 %)	10mM	2,033g
Magnesiumsulfat, MgSO ₄ ·xH ₂ O (Roth, M 120,4xH ₂ O, reinst)	10mM	1,383g
pH 6,7-7,0		

autoklaviert bei 121°C, mind. 20 Minuten.

10.11 Alkalische Lyse

Die alkalischen Lyse wurde verändert nach BIRNBOIM UND DOLY (1979) mit 1,5ml Bakterienkultur durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte stets mit 16000 x g. Der erste Zentrifugationsschritt zur Sedimentation der Bakterien wurde über 1 Minute durchgeführt. Die Denaturierung erfolge mit GTE-Puffer (Puffer 1) bei Raumtemperatur für 5 Minuten, anschließend die Lyse mit Puffer 2 (NaOH mit 1 % SDS). Nach Zugabe des PAS-Puffer (Puffer 3) erfolgte eine Neutralisierung für 5 Minuten. Die darauf folgende Zentrifugation wurde für 2 Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde mit 0,05mg RNaseA (Qiagen: 100mg/ml, 7000units/ml, solution) behandelt und ein Inkubationsschritt von 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Die Ethanol-Fällung mit 1ml 96 %igem Ethanol (C₂H₆O, Roth, M 46,07g/mol, 96 %) wurde für 5 Minuten in Eis durchgeführt und der darauf folgende Waschschritt für 4 Minuten in Eis mit 1ml 70 %igem Ethanol (C₂H₆O, Roth, M 46,07g/mol, 70 %). Das Pellet wurde nach Trocknung in 25µl TE-Puffer (10mM Tris und 1mM EDTA) aufgenommen.

0,1M TrisHCl, pH 8

Reagenzien	Endkonzentration	für 500ml
Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Roth, M 121,14g/mol, 99,9 %)	0,1mM	6,057g
H ₂ O _{dd}	add to	500ml
pH 8 mit 2N Salzsäure, HCl (Roth, 2mol/l - 2N Maßlösung)		
autoklaviert bei 121°C, mind. 20 Minuten, Lagerung bei 4°C		

0,5 M EDTA-Lösung, pH8

Reagenzien	Endkonzentration	für 500ml
EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ 2H ₂ O (Roth, M 372,24g/mol, 99 %)	500mM	93,06g
H ₂ O _{dd}	add to	500ml
pH 8 mit NaOH		

GTE (=„Puffer 1“)

Reagenzien	Endkonzentration	für 250ml
Glucose, C ₆ H ₁₂ O ₆ (Roth, M 180,16g/mol, 98 %)	54,99mM	2,477g
0,1M TrisHCl, pH 8	25mM	62,5ml
0,5M EDTA	10mM	5ml
H ₂ O _{dd}	add to	250ml

autoklaviert bei 121°C, mind. 20 Minuten, Lagerung bei 4°C

SDS

Reagenzien	Endkonzentration	für 100ml
Sodiumdodecylsulfate Na-salt, SDS $C_{12}H_{25}O_4S \cdot Na$ (Serva, Mr 288,4, 99 %)	10 % (w/v)	10g
H_2O_{dd}	add to	100ml

0,2 N NaOH

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Natriumhydroxid, NaOH (Roth, M 40,01g/mol, 99 %)	0,2M	8,002g
H_2O_{dd}	add to?	1 Liter
Lagerung bei 4°C		

NaOH mit 1 % SDS (=„Puffer 2“)

Reagenzien	Endkonzentration	für 10ml
0,2 N NaOH	0,2M	9ml
SDS	1 % (v/v)	1ml

Immer frisch herstellen

PAS (=„Puffer 3“)

Reagenzien	Endkonzentration	für 100ml
Essigsäure, $C_2H_4O_2$ (Roth, M 60,05g/mol, 99 %)	29,2 % (v/v)	29,5ml
KOH-Plättchen/Kaliumhydroxid, KOH (Roth, M 56,11g/mol, 85 %)		bis pH 4.8
H_2O_{dd}	add to	100ml

Lagerung bei RT

10.12 Verwendete Puffer für Agarose-Gel-Elektrophorese

10xTBE (Laufpuffer 1xTBE)

Reagenzien	Endkonzentration	für 1 Liter
Tris	891,5mM	108g
Borsäure	889mM	55g
H ₂ O _{dd}	add to	1000ml
0,5 M EDTA-Lösung, pH8	20mM	40ml

autoklaviert bei 121°C, mind. 20 Minuten

6xLoading

Reagenzien	Endkonzentration	für 100ml
10xTBE		60ml
Glycerin wasserfrei, C ₃ H ₈ O ₃ (Roth, M 92,1g/mol, 99,5 %)	39,8 % (v/v)	40ml
Bromphenolblau Na-Salz, C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa (Roth, M 691,9g/mol)	0,1 % (w/v)	0,1g
Xylencyanol, C ₂₅ H ₂₇ N ₂ NaO ₆ S ₂ (Roth, M 538,6g/mol)	0,1 % (w/v)	0,1g
OrangeG, C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂ (Roth, M 452,37g/mol)	0,2 % (w/v)	0,2g

1 %iges Gel

Reagenzien	Endkonzentration	für 100ml
1xTBE		100ml
Agarose (LOW-EEO, Applichem oder Electrophoresis grade, Invitrogen)	1 % (w/v)	1g
Ethidiumbromidlösung 1 % (Roth, 1 %ige Lösung in Wasser, 10mg/ml)	0,00005 % (w/v)	5µl

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt für die Überlassung des Themas und die Betreuung aus der Ferne, die Beratung bei allen Fragen und die stets offene Tür. Ganz besonders möchte ich Prof. und Direktor Dr. Frank Ordon meinen Dank aussprechen für die Unterstützung, die wissenschaftliche Begleitung, die vielen Anregungen und noch mehr Geduld in den zahlreichen Diskussionen. Prof. Dr. Sylvia Schnell und Prof. Dr. Bernd Honermeier möchte ich danken, dass sie sich so bereitwillig als Prüfer zur Verfügung gestellt haben.

Für die unkomplizierte Betreuung des Projektes möchte ich der Raps GbR, Saatzucht Lundsgaard und hier ganz besonders Dr. Peter Duchscherer danken. Nicht nur für die Bereitstellung der ELISA-Seren sondern auch für die zahlreichen Diskussionen, die Zeit für meine Fragen und deren ausführliche Beantwortung möchte ich Dr. Frank Rabenstein danken. Dr. Rod Snowdon möchte ich meinen Dank aussprechen für die Bereitstellung eines Startsets von SSRs sowie der Amplifikationsbedingungen. Für die Finanzierung sei der Gesellschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung (GFP, Bonn, Projekt: ÖE 128/05) und der AiF, sowie für die Bereitstellung der DH-Linien Dr. Lutz Brahm (SW Seed Hadmersleben) gedankt.

Die folgenden Personen haben zum erfolgreichen Gelingen der Arbeiten im Feld und Labor beigetragen und ich möchte ihnen hiermit persönlich danken:

- Silke Hänsch: Sowohl für die Blattlauszucht, die Übermittlung ihrer Erfahrungen hinsichtlich der Arbeiten mit dem DAS-ELISA und mit allen Arbeiten im Feld (Ausbringung der Blattläuse, Probenahme), als auch für ihre engagierte Mithilfe bei Arbeitsspitzen auf dem Feld und im ELISA-Labor.
- Claudia Paetsch: Für die Vorbereitung des ersten Versuchsjahres, d.h. die Aussaat, künstliche Infektion mit Blattläusen und die Durchführung des ersten ELISA im Dezember 2004.
- Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Dr. Edgar Schliephake - Evi Betke und Kerstin Welzel - von Dr. Ilona Krämer - Ilona Renneberg, Katja Schröder und Christine Hoppe - sowie der Arbeitsgruppe von Dr. Klaus Richter - Susi Woschnitzka und Ellen Gierz: Für die fleißige und humorvolle Mithilfe bei den Arbeitsspitzen auf dem Feld zum Ausbringen der Blattläuse, die Vereinzelnung der Pflanzen und der Probenahme und auch im ELISA-Labor für stundenlanges Pressen von Blattproben. Ohne diese Unterstützung wäre die termingerechte Bearbeitung der Pflanzenmassen nicht möglich gewesen.

Bei der Arbeitsgruppe „Molekulare Marker“ (Ilona Renneberg, Marlis Weilepp, Renate Adam, Bea Knüpfer, Christine Hoppe und Katja Schröder) möchte ich mich für die

freundliche Aufnahme trotz der beengten Platzverhältnisse in Aschersleben bedanken und für die schöne und oft auch recht lustige Zeit im Labor – besonders nach dem Umzug des Instituts nach Quedlinburg in neue und vor allem geräumigere Laborräume.

Für die unendliche Geduld und die Beantwortung unzähliger Fragen möchte ich besonders Dr. Ilona Krämer meinen Dank aussprechen, sie hat entscheidend dazu beigetragen, dass ich trotz geringer praktischer Vorkenntnisse im Bereich der molekularen Arbeiten zügig die wichtigen Techniken anwenden konnte. Dr. Edgar Schliephake wurde es nie leid, mir statistisch „auf die Sprünge“ zu helfen, wofür ich ihm danken möchte, aber ganz besonders auch für die anregenden Diskussionen zum Thema der Virusübertragung und -ausbreitung. Dr. Marc Zahn sei für die Anleitung bei allen Arbeiten im Zusammenhang mit der Klonierung und für die geduldige Beantwortung meiner Fragen gedankt.

Für ein allzeit offenes Ohr und gute Ratschläge möchte ich Nina Meyer danken und mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Heinrich Busch (Deutsche Saatveredelung, DSV) für die ersten Schritte zum Projekt und damit zur Doktorarbeit.

Abschließend möchte ich herzlichst auch meinen Eltern meinen Dank aussprechen. Sie unterstützten meine Ideen jederzeit und kompromisslos, auch wenn sie hinsichtlich meiner Berufswahl eine andere Vorstellung vertraten. Ihr Motto:

„MACH WIE DU DENKST, ABER MACH!“

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich: 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.“

Monique Juergens