

**Selektion und Vermehrung selbstinkompatibler
Winterrapslinien (*Brassica napus* L.)
im Hinblick auf die Entwicklung von Hybridsorten**

Von dem Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover
zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Gartenbauwissenschaften

- Dr. rer. hort. -

genehmigte
Dissertation

von

Dipl.-Ing. agr. Silke Möhring
geboren am 21.2.1969, in Stolzenau / Weser

2001

Referent: Prof. Dr. G. Wricke
Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Tag der Promotion: 10. Juli 2000

KURZFASSUNG

Selektion und Vermehrung selbstinkompatibler Winterrapslinien (*Brassica napus* L.) im Hinblick auf die Entwicklung von Hybridsorten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Selbstinkompatibilität in *Brassica napus* hinsichtlich ihrer Nutzung in der Hybridzüchtung untersucht. Es konnten drei selbstinkompatible Linien aus aktuellem Zuchtmaterial mit 00-Qualität zu einer Häufigkeit von ca. 0,03 % selektiert werden. Nach diallelen Kreuzungen von sieben selbstinkompatiblen Linien wurde das Vorliegen vier verschiedener S-Allele festgestellt. In Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen selbstinkompatiblen Linien zeigte sich der modifizierende Einfluß des genetischen Hintergrundes. In Kombination mit einer Linie, die ein dominantes S-Allel trug, welches aus *Brassica campestris* stammte, war eine gegenseitige Abschwächung der Allele zu beobachten. Testhybriden, die in einer Dreiwegkreuzung unter Nutzung verschiedener Selbstinkompatibilitätsallele, darunter das dominante S-Allel, hergestellt wurden, bestanden zu $\frac{3}{4}$ aus selbstfertilen Pflanzen.

Die Ausprägung der Selbstinkompatibilität wurde von Umweltfaktoren beeinflusst. In einer Topcrossanlage wurden mit selbstinkompatiblen Linien unabhängig ihrer Abstammung von Pflanzen mit geringem bzw. hohem Samenansatz Hybriden mit einer außerordentlich hohen Auskreuzungsrate von annähernd 100 % erzeugt.

Mit Hilfe von Primern, welche von hochkonservierten S-Locussequenzen verschiedener *Brassica*-Arten abgeleitet waren, gelang es zwei CAPS-Marker zu etablieren, die absolut mit der Selbstinkompatibilität gekoppelt sind. Mit Hilfe solcher molekularer Marker lassen sich Rückkreuzungsprogramme ökonomisch durchführen. Mit einem der CAPS-Marker konnten zudem drei der vier verschiedenen S-Allele auf molekulargenetischer Ebene unterschieden werden.

Zur Verwendung selbstinkompatibler Linien in der Hybridzüchtung müssen diese vermehrbar sein. Sowohl eine Kochsalz- als auch eine Kohlendioxidbehandlung führten zur zeitweisen Überwindung der Selbstinkompatibilität. Zur Vermehrung selbstinkompatibler Linien im begrenztem Umfang erscheint eine Bestäubung von Hand nach manueller NaCl-Applikation auf die Narbe geeignet. Die Produktion größerer Mengen an Saatgut erfordert einen ausgeweiteten Anbau der Linien. In einem Freilandversuch in isolierter Lage zeigte eine selbstinkompatible Linie unabhängig von einer Salzspritzung einen hohen Samenansatz. In Abwesenheit von Fremdpollen neigte dieses Pflanzenmaterial demnach zu Pseudokompatibilität. Bei hohem Angebot an Fremdpollen war die Selbstinkompatibilität jedoch stark ausgeprägt; die resultierenden Hybriden zeigten fast keine Selbstung.

In faktoriellen Kreuzungen wurden 75 Testhybriden hergestellt und in Leistungsprüfungen in mehreren Jahren und an mehreren Orten untersucht. Es handelte sich dabei um Einfachhybriden. Rezessiv selbstinkompatible Mutterlinien sind mit selbstkompatiblen Bestäubern kombiniert worden. In Folge der Dominanz der Selbstinkompatibilität über die Selbstinkompatibilität waren die Hybriden vollkommen selbstfertil. Die besten Hybriden hatten einen Mehrertrag von bis zu 22 % im Vergleich zu aktuellen Hochleistungssorten. Bei zwei Hybriden war eine Heterosis von 55 und 60 % vorhanden. Die Auskreuzungsraten einiger Hybriden wurden mit Hilfe von Isoenzym- und RAPD-Markern bestimmt und erreichten Höchstwerte von 80 bis 99 %.

Verschiedene Systeme zur Herstellung von Hybriden werden diskutiert. Von großem Vorteil erscheint die Produktion von Mehrweghybriden. Aufgrund der hohen Vermehrungsrate von Raps werden dafür geringere Mengen an Saatgut der Hybrideltern benötigt als zur Herstellung von Einfachhybriden. Die selbstinkompatiblen Linien könnten durch Salzbehandlung im Gewächshaus vermehrt werden. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß es möglich ist verschiedene S-Allele aus hochleistungsfähigem Rapszuchtmaterial zu selektieren. Unterschiedliche S-Allele können zur Produktion von Mehrweghybriden im Mischanbau dienen, welcher eine hohe Auskreuzungsrate begünstigt. S-Allele, die sich gegenseitig abschwächen sind von großem Vorteil, da bei ihrer Nutzung selbstfertile Hybriden entstehen. Nach Testkreuzung unter Nutzung sich gegenseitig abschwächender S-Allele wurden hier Hybriden erhalten, deren Fertilität zu 75 % wiederhergestellt war.

Schlagworte: *Brassica napus*, Selbstinkompatibilität, Hybridzüchtung

ABSTRACT

Selection and propagation of self-incompatible rapeseed (*Brassica napus* L.) lines with regard to the development of hybrid varieties

In the present study the self-incompatibility in *Brassica napus* was investigated with regard to the use as a pollination control mechanism in hybrid breeding. Three self-incompatible lines were selected in breeding material with high quality at a frequency of 0.03 %. Four different S alleles were detected in diallel crosses of seven self-incompatible lines. The modifying influence of genetic factors was found in examinations of the interaction within different self-incompatible lines. A mutual weakening between some S alleles in combination with a dominant *Brassica campestris* S allele occurred. Three-way hybrids were produced using different S alleles, the dominant allele inclusive. $\frac{3}{4}$ of the hybrid plants regained self-fertility.

The expression of self-incompatibility was influenced by environmental factors. Hybrids were produced in a topcross design using self-incompatible lines. They showed high hybridity levels independent of the descent of the self-incompatible lines from plants with low and high seed set respectively.

Two CAPS marker absolutely linked to the S locus were detected using primers derived from conserved S locus sequences of several *Brassica* species. Backcross programs can be effectively facilitated with the aid of such molecular markers. Furthermore it was possible to distinguish between three of four studied S alleles using one of the CAPS marker.

Overcoming self-incompatibility was conceived by using salt solution or carbon dioxide treatment. Propagation of self-incompatible lines in limited amounts for breeding purposes could be realised with sodium chloride stigma treatment. In field trials an isolated self-incompatible line showed high self seed setting independent of salt treatment. The investigated plant material showed a certain level of pseudocompatibility in absence of compatible pollen but high hybridity levels when compatible pollen was sufficiently available.

75 hybrids were produced in a factorial mating design and examined in field trials in different years and several environments. The one-way hybrids were made by crossing self-incompatible female inbreds and self-compatible male lines. Hybrids fully regained self-fertility in fact of the dominance of self-compatibility versus self-incompatibility. Best hybrids exceeded topical hybrid varieties up to 22 %. Two hybrids conferred a heterosis of 55 and 60 % respectively. The hybridity levels of several hybrids were determined using isozyme and RAPD markers. They reached a maximum about 80 to 99 %.

Different hybrid production systems are discussed. The production of multiple cross hybrids keeps several conveniences. Due to the high multiplication rate of *Brassica napus*, seed amount of parental lines to produce such hybrids is much lower than for single cross hybrids. Therefore inbred lines could be propagated with salt treatment in the greenhouse. Using different S alleles, hybrids could be produced with blended seed for higher pollination efficiency. S alleles showing mutual weakening are suitable to restore fertility in the hybrids. In test crosses using such alleles hybrids were gained comprising 75 % self-fertile plants.

Keywords: *Brassica napus*, self-incompatibility, hybrid breeding

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	13
2	SELEKTION	15
2.1	SELEKTION SELBSTINKOMPATIBLER GENOTYPEN AUS ZUCHTMATERIAL.....	15
2.1.1	<i>Einleitung</i>	15
2.1.2	<i>Material und Methoden</i>	17
2.1.3	<i>Ergebnisse</i>	18
2.1.4	<i>Diskussion</i>	23
2.2	WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN SELBSTINKOMPATIBLEN LINIEN.....	26
2.2.1	<i>Einleitung</i>	26
2.2.2	<i>Material und Methoden</i>	28
2.2.3	<i>Ergebnisse</i>	33
2.2.4	<i>Diskussion</i>	41
2.3	SELEKTION VON GENOTYPEN MIT STABIL AUSGEPRÄGTER SI.....	47
2.3.1	<i>Einleitung</i>	47
2.3.2	<i>Material und Methoden</i>	47
2.3.3	<i>Ergebnisse</i>	51
2.3.4	<i>Diskussion</i>	58
2.4	ENTWICKLUNG MOLEKULARER MARKER FÜR DIE SELBSTINKOMPATIBILITÄT	62
2.4.1	<i>Einleitung</i>	62
2.4.2	<i>Material und Methoden</i>	65
2.4.3	<i>Ergebnisse</i>	69
2.4.4	<i>Diskussion</i>	72
2.5	ZUSAMMENFASSUNG	76
3	VERMEHRUNG VON INZUCHTLINIEN	78
3.1	EINLEITUNG.....	78
3.2	MATERIAL UND METHODEN	79
3.2.1	<i>Salzbehandlung</i>	79
3.2.2	<i>Kohlendioxidbehandlung</i>	83

3.3	ERGEBNISSE.....	84
3.3.1	<i>Salzbehandlung</i>	84
3.3.2	<i>Kohlendioxidbehandlung</i>	91
3.4	DISKUSSION.....	92
3.4.1	<i>Salzbehandlung</i>	92
3.4.2	<i>Kohlendioxidbehandlung</i>	94
3.5	ZUSAMMENFASSUNG	95
4	HERSTELLUNG UND PRÜFUNG VON HYBRIDEN.....	97
4.1	EINLEITUNG.....	97
4.2	MATERIAL UND METHODEN	99
4.2.1	<i>Faktorielle Kreuzungen</i>	99
4.2.2	<i>Bestimmung der Auskreuzungsrate von Hybriden</i>	101
4.3	ERGEBNISSE.....	105
4.3.1	<i>Faktorielle Kreuzungen</i>	105
4.3.2	<i>Bestimmung der Auskreuzungsrate von Hybriden</i>	110
4.4	DISKUSSION.....	113
4.5	ZUSAMMENFASSUNG	116
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
	ANHANG.....	121
	LITERATURVERZEICHNIS.....	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACP	Saure Phosphatase
ANOVA	Varianzanalyse
bp	Basenpaare
C	Crosslinker-Anteil im Acrylamidgel
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCAPS	derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIA	Diaphorase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Testgröße in der Varianzanalyse
FG	Freiheitsgrad
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FK	Faktorielle Kreuzungen
gca	Allgemeine Kombinationseignung
GD	Grenzdifferenz
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
h^2	Heritabilität
$I_{x/y}$	y. Inzuchtgeneration aus der x. Generation entstanden (nach Wricke und Weber 1986)
i	inkompatibel
(i)	unvollständig inkompatibel
k	kompatibel
(k)	partiell kompatibel
LAP	Leucin-Aminopeptidase
M	Molar
MQ	Mean squares
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PS	Pollenschläuche

PVP 400	Polyvinyl-Pyrrolidon MW = 400000
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
S	Den Selbstinkompatibilitätslocus betreffend
SAE	S locus anther expressed
sca	Spezifische Kombinationseignung
SCR	S locus cystein rich
SDS	Natriumdodecylsulfat
si	selbstinkompatibel
(si)	unvollständig selbstinkompatibel
SI	Selbstinkompatibilität
sk	selbstkompatibel
(sk)	partiell selbstkompatibel
SLA	S locus anther
SLG	S-Locus Glykoprotein
SLL	S locus linked
SLR	S locus related
SRK	S-Locus Rezeptorkinase
T	Gesamtanteil an Acrylamid im Gel
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	thermostabile DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur der DNA
TR	Trockenertrag
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	Units
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
V _A	Additive Varianz
V _D	Dominanzvarianz
V _G	Genotypische Varianz

1 EINLEITUNG

Raps ist eine bedeutende Kulturpflanzenart in Deutschland und gehört weltweit zu den am häufigsten angebauten Ölpflanzen. Durch die Züchtung von erucasäurefreien und glucosinolatarmen Formen (00-Qualität) kann Raps zu hochwertigen Nahrungs- und Futtermitteln, dem Rapsöl und Rapsschrot, verarbeitet werden. Der hohe Gehalt an ungesättigten Fettsäuren macht das Rapsöl aus ernährungsphysiologischer Sicht besonders wertvoll. Durch gezielte Züchtung soll die Qualität der Rapsorten erhalten, sowie deren Krankheitsresistenz gesteigert werden. Ein weiteres wichtiges Zuchtziel ist die Ertragssteigerung. Diese läßt sich vor allem durch die Entwicklung von Hybridsorten erreichen. Bislang wurden in der Regel Liniensorten angebaut. Erst in den letzten Jahren sind auch Hybridsorten zugelassen worden. Dabei wurden als Bestäubungsmechanismen in erster Linie männliche Sterilitätssysteme genutzt. Insbesondere das Ogura-System, eine cytoplasmatische männliche Sterilität, wird vielfach angewandt, um Rapshybriden herzustellen. Die Nutzung eines weiteren Bestäubungsmechanismus zur Herstellung von Winterrapshybriden, der Selbstinkompatibilität, wird in der vorliegenden Arbeit behandelt.

Winterraps, *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* Metzg., ist eine allotetraploide Art ($2n = 38$, aacc), die aus den Ausgangsarten *Brassica oleracea* ($2n = 18$, cc) und *Brassica campestris* ($2n = 20$, aa) entstanden ist (U 1935). Die beiden Ausgangsarten sind überwiegend obligate Fremdbefruchter, die eine Selbstbefruchtung durch ihr homomorphes, sporophytisches Selbstinkompatibilitätssystem verhindern. Die homomorphe Selbstinkompatibilität weist im Gegensatz zur heteromorphen keine morphologischen Unterschiede im Blütenbau auf. Die Selbstinkompatibilitätssysteme unterschiedlicher Pflanzenarten sind eingehend von DENETTANCOURT (1977) beschrieben worden. Die Selbstinkompatibilität in den Brassicaceen wird von einem Locus mit multiplen Allelen, dem S-Locus, kontrolliert. BATEMAN (1955) fand 22 S-Allele in *Iberis amara*, SAMPSON (1967) bis zu 34 Allele in *Raphanus raphanistrum*. STEVENS und KAY (1989) entdeckten 52 Allele in *Sinapis arvensis*, OCKENDON (1974) 60 Allele in *Brassica oleracea* und NOU et al. (1993) fanden mehr als 30 Allele in *Brassica campestris*. Das

Selbstinkompatibilitätssystem der Ausgangsart *Brassica oleracea* wird erfolgreich als Fremdbefruchtungssystem in der Hybridzüchtung eingesetzt. *B. napus* dagegen ist in der Regel selbstkompatibel (OLSSON 1960). Die Selbstinkompatibilität kann durch Rückkreuzung oder Resynthese aus den Ausgangsarten wieder in *B. napus* eingelagert werden. Eine Selektion von selten auftretenden selbstinkompatiblen Typen in bestehenden Rapspopulationen ist ebenso möglich und wird in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Die aus glucosinolatarmem und erucasäurefreiem Rapszuchtmaterial selektierten S-Allele wurden hinsichtlich ihrer Vererbung zur Selbstkompatibilität und ihrer Wechselwirkungen untereinander untersucht. Bei der sporophytischen Selbstinkompatibilität wird die Wirkungsweise des Pollenkorns durch das diploide Genom des Sporophyten bestimmt. Zwischen verschiedenen S-Allelen können deshalb kodominante und/oder dominante Interaktionen bestehen, die den Phänotyp von Narbe und Pollen bestimmen (BATEMAN 1955). Die S-Allele werden in zwei Hauptklassen eingeteilt (NASRALLAH et al. 1991). Die S-Allele, die hoch auf der Dominanzskala stehen und dominant zur Selbstkompatibilität vererbt werden (Klasse I), führen zur Ausprägung einer starken Selbstinkompatibilität. Rezessiv zur Selbstkompatibilität vererbte Allele (Klasse II) zeigen sich in der Regel in einem nur schwach ausgeprägten SI-Phänotyp. Die Ausprägung der Selbstinkompatibilität wird vor allem bei rezessiven Allelen durch den genetischen Hintergrund, physiologische Faktoren und Umwelteinflüsse, insbesondere durch die Temperatur beeinflusst. In den vorliegenden Untersuchungen sollten geeignete Selektionskriterien zur Entwicklung von Linien mit stark ausgeprägter Selbstinkompatibilität gefunden werden. Die molekulargenetischen Grundlagen der Selbstinkompatibilität sind gut untersucht und wurden hier zur Entwicklung eines molekularen Markers für die Selbstinkompatibilität genutzt. Der Einsatz der Selbstinkompatibilität als Fremdbefruchtungssystem in der Hybridzüchtung setzt die Vermehrbarkeit von selbstinkompatiblen Linien voraus. Zu diesem Aspekt werden Gewächshaus- und Freilandversuche vorgestellt, in denen eine Kochsalz- oder Kohlendioxidbehandlung von blühenden Rapspflanzen zur Überwindung der Selbstinkompatibilität führte. Ingezüchtete selbstinkompatible Linien wurden mit selbstkompatiblen Rapslinien zur Herstellung erster Hybriden kombiniert. Die Ertragsleistung der Hybriden wurde in Leistungsprüfungen untersucht.

2 SELEKTION

2.1 Selektion selbstinkompatibler Genotypen aus Zuchtmaterial

2.1.1 Einleitung

Es bestehen unterschiedliche Möglichkeiten die Selbstinkompatibilität auch in *Brassica napus* als Fremdbefruchtungsmechanismus in der Hybridzüchtung zu nutzen. Zum einen kann die in den Ausgangsarten vorhandene Selbstinkompatibilität in Raps übertragen werden. MACKAY (1977a) und FU et al. (1995) lagerten Selbstinkompatibilitätsallele durch wiederholte Rückkreuzung mit *Brassica campestris* in *Brassica napus* ein. KOTT (1995) selektierte Pflanzen sowohl aus *B. campestris*- als auch aus *B. oleracea*-Populationen, die dominant zur Selbstkompatibilität vererbte S-Allele trugen. Diese Allele wurden durch Rückkreuzung in *B. napus* eingeführt. RIPLEY und BEVERSDORF (1991) gelang die Einkreuzung von S-Allelen aus *B. oleracea* in Raps. HODGKIN (1986) und RUDLOFF (1991) stellten jedoch fest, daß das Einkreuzen von S-Allelen aus *B. oleracea* in *B. napus* schwierig ist, da *B. oleracea*-Pollen gewöhnlich inkompatibel mit *B. napus*-Narben ist. Umgekehrt dagegen ist *B. napus*-Pollen kompatibel mit *B. oleracea*-Narben. Die Inkompatibilität könnte durch interspezifische Kompatibilitätsfaktoren bedingt sein. HINATA und OKASAKI (1986) vermuten, daß das Einkreuzen von funktionsfähigen S-Allelen vorher unentdeckte S-Allele aktivieren könnte, die interspezifische Inkompatibilität bedingen.

Eine weitere Möglichkeit selbstinkompatible Rapspflanzen zu erzeugen, ist die Resynthese von *Brassica napus* aus seinen Ausgangsarten. Die Fusionsexperimente von SUNDBERG et al. (1987) und ROSÉN et al. (1988) führten zu somatischen Hybriden mit verminderter Fertilität. OZMINKOWSKI und JOURDAN (1993) gelang es, somatische Hybriden zwischen selbstinkompatiblen *B. campestris*- und selbstkompatiblen *B. oleracea*-Genotypen zu erzeugen, die hohe Vitalität und Fruchtbarkeit aufwiesen. Diese Hybriden waren allotetraploid. Es traten auch allopolyploide Hybriden auf, welche sich jedoch zu sterilen Pflanzen entwickelten. PLÜMPER (1991) stellte zahlreiche resynthetisierte *Brassica napus*-Linien durch sexuelle Kreuzungen zwischen neun *B. oleracea* und sechs *B. campestris*-Linien mit definierten S-Allelen her. BESCHORNER (1993) untersuchte das Selbstinkompatibilitätsverhalten dieser resynthetisierten

Rapslinien und stellte fest, daß alle *B. campestris*-S-Allele und die dominanten *B. oleracea*-S-Allele auch in den resynthetisierten Linien in den meisten Kombinationen aktiv waren. Bei den rezessiven *B. oleracea*-S-Allelen kam es in einigen Kombinationen zu kompatiblen oder partiell kompatiblen Reaktionen.

Der Nachteil von resynthetisierten als auch mit den Ausgangsarten rückgekreuzten Rapslinien besteht darin, daß ihre Ertrags- und Qualitätseigenschaften stark verbessert werden müssen, damit sie mit bestehenden Rapssorten konkurrieren können. Dieses Manko kann durch die Selektion von selbstinkompatiblen Genotypen aus hochgezüchtetem Rapsmaterial umgangen werden. RUDLOFF (1991) gelang es 30 selbstinkompatible Linien aus Einzelpflanzen zu entwickeln, die er aus Zuchtmaterial von Winterraps ausgelesen hatte. Er konnte jedoch keine selbstinkompatiblen Pflanzen aus Zuchtmaterial mit 00-Qualität selektieren. BESCHORNER (1993) versuchte ebenfalls selbstinkompatible Pflanzen aus bestehenden *B. napus*-Linien zu selektieren. Als Ausgangsmaterial dienten fortgeschrittene Generationen von Winterrapslinien, die aus einem Selektionsprogramm auf niedrige Selbstfertilität stammten. Es war ihr nicht möglich eindeutig selbstinkompatible Pflanzen zu selektieren. ESCH (1994) untersuchte Winterrapslinien mit 00-Qualität auf das Vorkommen von selbstinkompatiblen Pflanzen. Es gelang ihr, vier selbstinkompatible Linien aus dem Material auszulesen. In diallelen Kreuzungen zeigte sich, daß mindestens zwei verschiedene S-Allele in diesen Linien aktiv waren, wobei es sich um rezessive Allele handelte. ESCH (1995) stellte fest, daß etwa 0,08 % der Pflanzen in dem von ihr untersuchten Zuchtmaterial mit 00-Qualität die Erbanlagen für das Merkmal Selbstinkompatibilität trugen. Auch FU et al. (1995) versuchten selbstinkompatible Linien aus *B. napus* zu selektieren. Sie konnten lediglich eine selbstinkompatible Linie nach wiederholter Selbstung von *B. napus* isolieren. Nach Behandlung von *B. napus*-Populationen mit γ -Strahlen traten mehrere selbstinkompatible Linien auf. KUÇERA et al. (1995) fanden mit einer Häufigkeit von circa 0,1 % selbstinkompatible Linien in Winterraps, die ein rezessives S-Allel besaßen und deren Selbstinkompatibilität nicht sehr stark ausgeprägt war. Der Selbstinkompatibilitätsgrad konnte auch nach sechs Inzuchtgenerationen mit strenger Selektion nicht verbessert werden. Dies gelang erst durch die Entwicklung von doppelhaploiden Linien durch Mikrosprorenkultur.

2.1.2 Material und Methoden

Winterrapszuchtmaterial der Deutschen Saatveredelung (DSV) Lippstadt-Bremen GmbH wurde in den Jahren 1997 und 1998 auf das Vorkommen von Genotypen mit geringem Samenansatz nach isolierter Abblüte unter Tüten geprüft. Das selektierte Pflanzenmaterial wurde in Hannover angezogen. Das Selbstinkompatibilitätsverhalten ist anhand des Pollenschlauchwachstums und des Samenansatzes der Pflanzen untersucht worden.

Zur Beurteilung des Samenansatzes wurden zehn Blüten kurz nach der Anthese kastriert und mit Eigenpollen bestäubt. Die dabei benutzte Pinzette wurde in 70 %igem Alkohol gereinigt, um eine Verschleppung von Pollen zu vermeiden. Die Blütenstände sind außerdem eingetütet worden, um eine nachfolgende Befruchtung durch Insekten auszuschließen. Die Schoten wurden nach dem Ausreifen geerntet und die mittlere Samenzahl pro Schote für jede Pflanze bestimmt.

Drei der zehn pro Pflanze geselbtesten Narben wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Narben sind mit einem kurzen Teil des Griffels 24 h nach der Bestäubung abgeschnitten worden. Die Samenanlagen verblieben dabei an der Pflanze, so daß sich die Samen nach erfolgter Befruchtung normal weiterentwickeln konnten. Die Narben wurden in einem Gemisch aus zwei Teilen 96 %igem Ethanol und einem Teil 90 %iger Milchsäure fixiert (ESCH 1994). Diese Fixierlösung kann auch zur Aufbewahrung der Narben genutzt werden. Anschließend folgte eine Fluoreszenzfärbung nach KHO und BAER (1968). Die Narben wurden nach Absaugen der Fixierlösung und einmaligem Spülen in Aqua dest. in 1 N NaOH-Lösung für 50 min bei 60 °C im Wasserbad mazeriert. Danach ist die NaOH-Lösung abgesaugt und durch Anilinblau-Färbelösung (0,1 % Anilinblau gelöst in 0,1 N K_3PO_4) ersetzt worden. Die Färbezeit betrug mindestens 15 min und höchstens 24 h. Die Narben wurden in einen Tropfen Glycerin auf einem Objektträger gelegt, um ein vorzeitiges Austrocknen der Präparate zu verhindern. Nach dem Auflegen eines Deckgläschens ist das Präparat nach Bedarf so gequetscht worden, daß eingewachsene Pollenschläuche gut zu erkennen waren. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Zeiss Axioskop 20 mit Auflicht-Fluoreszenz (Quecksilberhöchstdrucklampe Osram HB050W) und mit dem

Filtersatz 487909 (Anregungsfilter BP 450-490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 520). Die photographischen Aufnahmen entstanden mit einer Zeiss Mikroskopkamera MC 80. Bestäubung und Färbung wurden wiederholt, wenn in den mikroskopischen Untersuchungen kein einziges Pollenkorn auf der Narbe gefunden wurde oder die drei Narben sehr widersprüchlich reagierten. Narben, in die im Mittel weniger als fünf Pollenschläuche eingewachsen waren, wurden als selbstinkompatibel eingeordnet. Narben, die dicht mit einwachsenden Pollenkörnern bedeckt waren, sind als selbstkompatibel angesehen worden. Dementsprechend wurden Schoten mit einer mittleren Samenzahl von weniger als fünf als selbstinkompatibel bonitiert und Schoten mit 20 oder mehr Samen als selbstkompatibel.

Zur Bestimmung der Vererbung der SI wurden selbstinkompatible Genotypen mit selbstkompatiblen Sorten bestäubt. Jeweils acht Pflanzen der Nachkommenschaft aus diesen Kreuzungen sind auf ihr Selbstkompatibilitätsverhalten hin geprüft worden. Es wurden zehn Blüten pro Pflanze geselbstet, drei Narben mikroskopisch untersucht und der mittlere Samenansatz pro Schote bestimmt.

Sämtliche Pflanzen sind im Gewächshaus bei 20/18 °C und 16 h Zusatzlicht kultiviert worden.

2.1.3 Ergebnisse

Im Jahre 1997 wurden 12 Linien mit geringem Selbstungssamenansatz aus erucasäurefreiem und glucosinolatarmen Zuchtmaterial selektiert. Sechs bzw. drei dieser Linien waren Vollgeschwister. In der Nachkommenschaft der drei Genotypen der Linie 391 (391/1, 391/2, 391/3) und der Linie Myb sind Pflanzen gefunden worden, die eine selbstinkompatible Reaktion in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung und einen Samenansatz von bis zu fünf Samen pro Schote zeigten. 1998 wurden zehn Linien mit geringem Selbstungssamenansatz aus Zuchtmaterial mit 00-Qualität selektiert. Unter diesen Linien zeigten wiederum zwei Linien (224 und 236) selbstinkompatible Nachkommen. Der Selbstungssamenansatz nach selbstinkompatibler und selbstkompatibler Reaktion ist in den Abbildungen 2.1 und 2.2 dargestellt.



Abb. 2.1: Samenansatz nach selbstinkompatibler Reaktion



Abb. 2.2: Samenansatz nach selbstkompatibler Reaktion

Die Linien 391, 224 und 236 sind jeweils aus einer durch Eintüten geselbsteten F₁-Generation entstanden. Die Linie Myb dagegen entstammt der Selbstung einer zugelassen Hybridsorte, die mit Hilfe der Selbstinkompatibilität hergestellt wurde. Diese Linie kann also bei den folgenden Berechnungen nicht berücksichtigt werden. Die Linien mit geringem Samenansatz wurden 1997 aus ca. 8000 Linien und 1998 aus etwa 10000 Linien ausgelesen. Im Zuchtmaterial waren selbstinkompatible Linien demnach zu einer Häufigkeit von ca. 0,0375 %, bzw. 0,02 % zu finden.

In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen waren selbstinkompatible und selbstkompatible Reaktionen deutlich unterscheidbar. Die Zellwand der Pollenschläuche enthält Kallose, die in den Zellen des umliegenden Narbengewebes fehlt. Die Kallose bindet den Farbstoff Anilinblau selektiv und fluoresziert gelbgrün, wenn sie mit ultraviolettem Licht angeregt wird. Die Pollenschläuche, die in die selbstkompatible Narbe einwachsen, treten durch die Anfärbung der Kallose in den Zellwänden und der

Kallosepfropfen, die in unregelmäßigen Abständen in den Pollenschläuchen gebildet werden, hervor (KHO und BAER, 1968).

Auch die Gefäße enthalten Kallose, fluoreszieren aber nur schwach, enthalten keine Kallosepfropfen und sind sehr gut von den Pollenschläuchen abzugrenzen. Bei selbstkompatibler Reaktion war die Narbe dicht von Pollen bedeckt (Abbildung 2.3 a), dessen Pollenschläuche deutlich sichtbar durch das Narbengewebe wuchsen (Abbildung 2.3 b). Bei inkompatibler Reaktion konnten nur wenige Pollen auf der Narbe haften. Einige Papillenzellen der Narbe waren mit Kallose angereichert und erschienen unter dem Fluoreszenzmikroskop hell leuchtend (Abbildung 2.4 a). Das Auskeimen der auf der Narbe haftenden Pollen wurde gehemmt, so daß entweder keine oder nur in typischer Weise verdrehte Pollenschläuche gebildet wurden, die nicht in die Narbe einwachsen konnten (Abbildung 2.4 b). Wenige mikroskopische Untersuchungen zeigten eine pseudokompatible Reaktion (Abbildung 2.5, S. 22). Es konnten einige Pollenschläuche in die Narbe einwachsen, deren Anzahl mitunter ausreichte, um alle Samenanlagen zu befruchten. Diese Reaktion ist deutlich von einer selbstkompatiblen Reaktion zu unterscheiden, bei der die Narbe dicht mit eingewachsenen Pollen bedeckt ist. Die Bestäubungen, die eine mikroskopisch pseudokompatible Reaktion zeigten, wurden wiederholt. Anhand dieser Wiederholungen in Verbindung mit dem Samenansatz konnten die Pflanzen, die pseudokompatible Reaktionen zeigten, letztlich als selbstinkompatibel oder selbstkompatibel eingeordnet werden. Lediglich eine Pflanze in der Nachkommenschaft der Linie Myb zeigte auch in der Wiederholung eine pseudokompatible Reaktion und einen mittleren Samenansatz von 16,4 Samen pro Schote. Sie wurde in der Spaltungsuntersuchung den selbstinkompatiblen Pflanzen zugeordnet, in späteren Untersuchungen jedoch nicht mehr berücksichtigt. Ansonsten stimmten Samenansatz und Pollenschlauchwachstum sehr gut überein. In den mikroskopischen Untersuchungen selbstinkompatibel erscheinende Pflanzen hatten im Mittel nie mehr als fünf Samen pro Schote entwickelt mit Ausnahme einer Pflanze, die zehn Samen pro Schote bildete. Die Pflanzen mit selbstkompatibler mikroskopischer Reaktion hatten im Mittel 20 bis 30 Samen pro Schote gebildet, lediglich vier selbstkompatible Pflanzen hatten einen mittleren Samenansatz von 14 bis 18 Samen pro Schote.

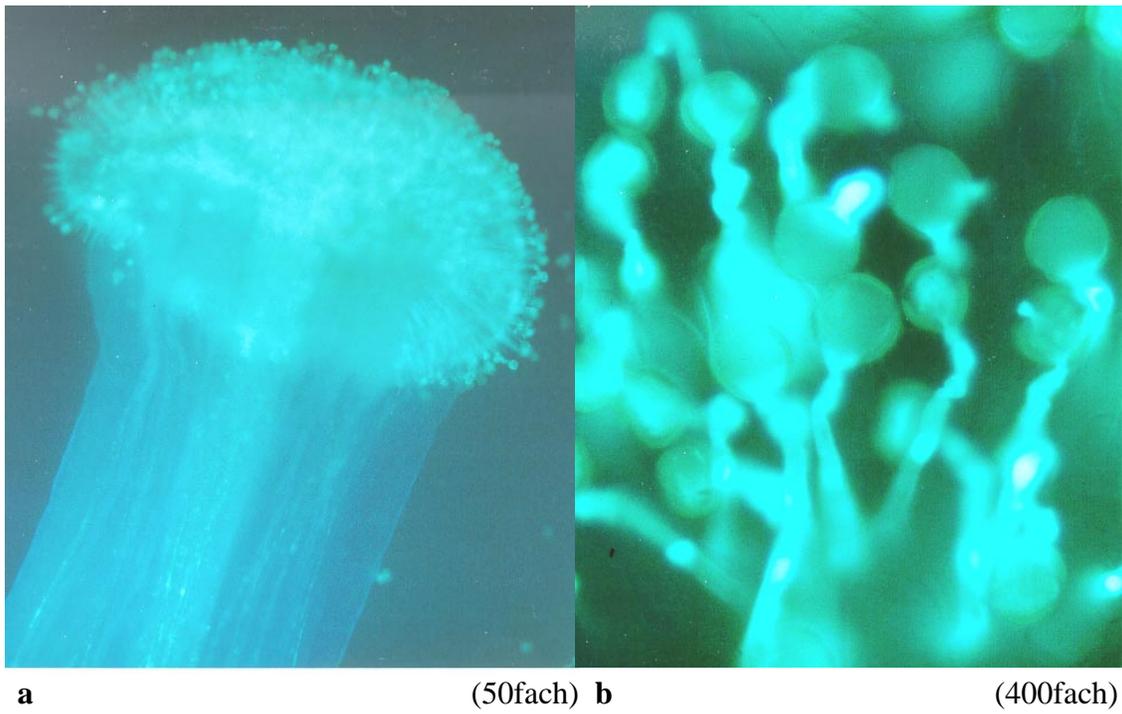


Abb. 2.3: Selbstkompatible Reaktion in fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung

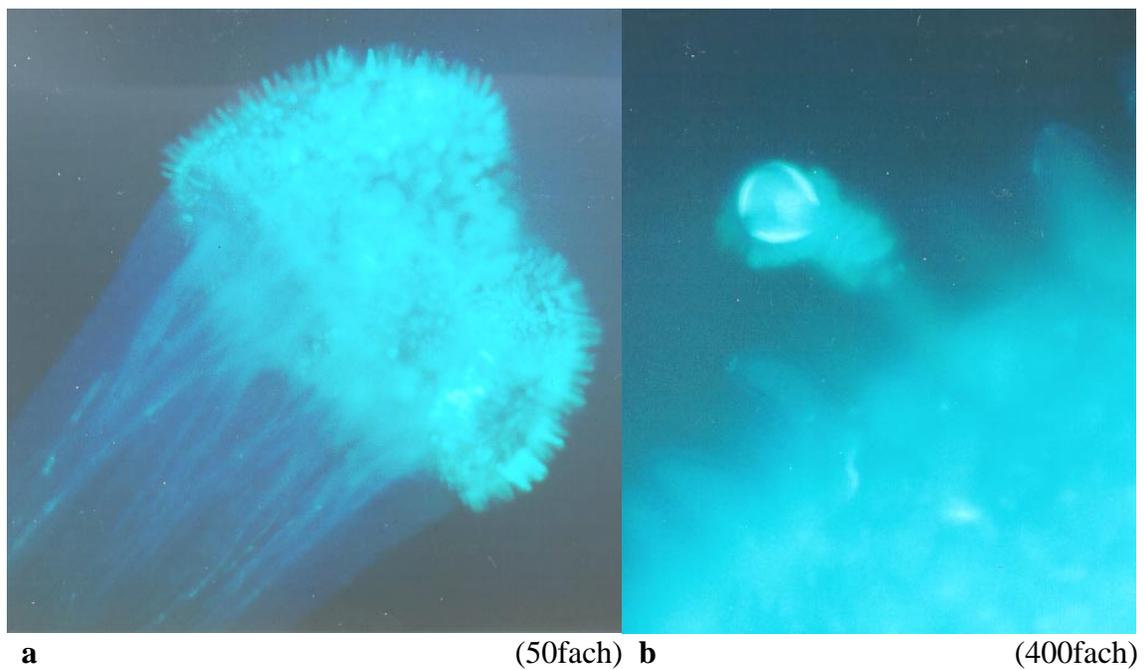
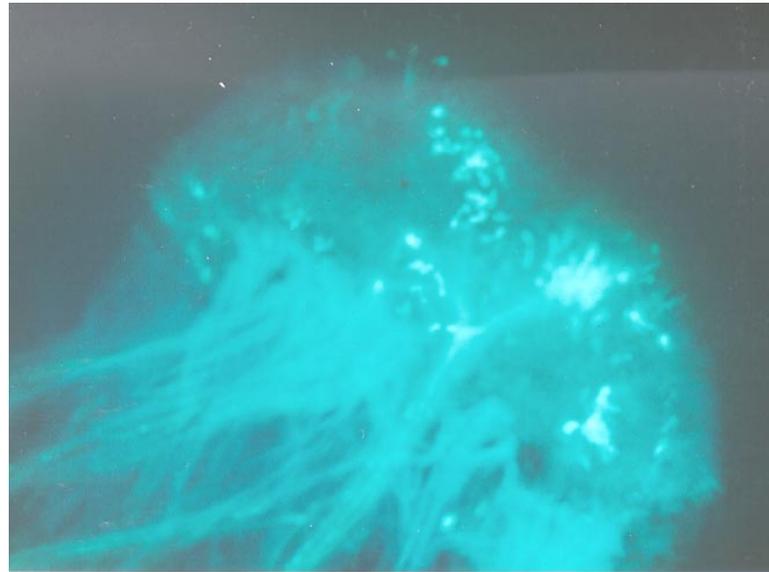


Abb. 2.4: Selbstinkompatible Reaktion in fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung



(50fach)

Abb. 2.5: Pseudokompatible Reaktion in fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung

Die Nachkommenschaften der Pflanzen 391/2, 391/3, Myb, 224 und 236 zeigten nach der Selbstung durch Eintüten eine Spaltung in selbstinkompatible und selbstkompatible Genotypen (Tabelle 2.1).

Tab. 2.1: Aufspaltung für Selbstinkompatibilität in Selbstungsnachkommenschaften

Linie	Spaltungsverhältnis si : sk
391/2	10 : 2
391/3	7 : 2
Myb	5 : 5
224	4 : 1
236	3 : 7

si: selbstinkompatibel sk: selbstkompatibel

Die Vererbung der Selbstinkompatibilität wurde in den beiden 1997 selektierten Linien 391 und Myb überprüft. Alle acht Nachkommen aus der Kreuzung eines

selbstinkompatiblen Myb-Genotypes mit einer selbstkompatiblen Rapssorte zeigten selbstkompatibles Pollenschlauchwachstum und selbstkompatiblen Samenansatz. In der Nachkommenschaft der Kreuzung mit einem selbstinkompatiblen 391-Genotyp waren sieben Pflanzen selbstkompatibel und eine Pflanze zeigt im Mittel nur 2,3 eingewachsene Pollenschläuche und 17 Samen/Schote.

2.1.4 Diskussion

Die hier angewandten Methoden, die Bestimmung des Selbstungssamenansatzes in Verbindung mit mikroskopischer Narbenuntersuchung, machten die eindeutige Charakterisierung von selbstinkompatiblen und selbstkompatiblen Pflanzen möglich. Die cytologischen Abläufe zwischen den Pollen und der Narbenoberfläche bei selbstinkompatibler und selbstkompatibler Reaktion wurden von GAUDE und DUMAS (1987) eingehend beschrieben. Bei selbstkompatibler Reaktion kommt es wenige Minuten nach dem Auftreffen des Pollens auf der Narbenoberfläche zur Adhäsion und schließlich zur Hydratation der Pollenkörner. Nach erfolgter Hydratation keimt das Pollenkorn aus, der Pollenschlauch wächst durch die Papillenzellen in die Narbe und gelangt durch das Griffelgewebe in die Samenanlagen. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung erscheint die Narbe von hell leuchtenden Pollenkörnern bedeckt. Die gebündelt durch das Griffelgewebe wachsenden Pollenschläuche fluoreszieren ebenfalls sehr stark und sind gut zu erkennen (Abbildung 2.3 a, S. 21). Bei selbstinkompatibler Reaktion erscheint die Narbe unter dem Fluoreszenzmikroskop blasser als nach selbstkompatibler Bestäubung. Wird ein Pollenkorn auf der Narbe als inkompatibel erkannt, erfolgt in der Regel keine Adhäsion. Einige Pollenkörner haften trotzdem auf der Narbe, ihre Hydratation ist jedoch gestört und sie keimen nicht aus oder aber die ausgekeimten Pollenschläuche können nicht in das Narbengewebe eindringen. Diese winden sich in typischer Weise auf der Narbenoberfläche (Abbildung 2.4 b, S. 21). Desweiteren treten bei der Selbstinkompatibilitätsreaktion häufig in Folge von Kalloseanreicherung hell leuchtende Papillenzellen auf (Abbildung 2.5, S. 22). Entgegen vorheriger Vermutungen in der

Literatur ist die Kalloseanreicherung nicht als Folge der Selbstinkompatibilitätsreaktion anzusehen. SULAMAN et al. (1997) bewiesen in Transformationsexperimenten an *Brassica napus*, daß die Selbstinkompatibilitätsreaktion auch bei Pflanzen, die keine Kallose bilden konnten, einwandfrei funktionierte. Die Kallosebildung scheint ein grundsätzliches Phänomen zu sein, daß bei vielen Pflanzenarten durch Berührung, Verwundung und durch Pathogene hervorgerufen werden kann. Auch bei selbstinkompatibler Reaktion kann es vorkommen, daß einige Pollenschläuche in die Narbe einwachsen. In den vorliegenden Untersuchungen wurden im Mittel bis zu fünf eingewachsene Pollenschläuche bei selbstinkompatibler Reaktion toleriert. Auch RUDLOFF (1991) bezeichnete nur Rapsnarben, die weniger als sechs eingewachsenen Pollenschläuche zeigten als selbstinkompatibel. HATAKEYAMA et al. (1998) bewerteten in Untersuchungen an *B. campestris* weniger als fünf eingewachsene Pollenschläuche als selbstinkompatibel, fünf bis zehn als partiell kompatibel und mehr als 20 als kompatible Reaktion. OCKENDON (1980) ordnete *B. oleracea*-Narben mit weniger als 20 eingewachsenen Pollenschläuchen als selbstinkompatibel und Narben mit mehr als 70 Pollenschläuchen als selbstkompatibel ein. NASRALLAH et al. (1991) bezeichneten Narben mit 10-30 eingewachsenen Pollenschläuchen von Kohlpflanzen, die eine rezessiv vererbte Selbstinkompatibilität trugen noch als selbstinkompatibel. Narben mit einem Pollenschlauchwachstum in diesem Umfang wurden in der vorliegenden Arbeit als pseudokompatibel bezeichnet.

Die Ausprägung der Selbstinkompatibilität von rezessiven Allelen kann durch den genetischen Hintergrund, physiologische Faktoren und Umwelteinflüsse, insbesondere hohe Temperatur, beeinflußt werden. In den vorliegenden Untersuchungen scheinen die pseudokompatiblen Reaktionen durch Umwelteinflüsse bedingt gewesen zu sein, da sich in den Wiederholungen der mikroskopischen Untersuchungen eindeutig selbstinkompatible oder selbstkompatible Reaktionen nachweisen ließen. Lediglich eine Pflanze aus der Nachkommenschaft der Linie Myb zeigte immer eine pseudokompatible Reaktion, was durch den genetischen Hintergrund hervorgerufen sein könnte. Ohne mikroskopische Untersuchung blieben solche pseudokompatiblen Reaktionen, die einen vollen Samenansatz aufweisen können, unentdeckt und würden als selbstkompatibel angesehen. Andererseits läßt sie auch die Unterscheidung zwischen Fertilitätsstörungen

und Selbstinkompatibilität zu, die beide einen geringen Samenansatz bedingen können. Darin begründet sich der Nutzen einer mikroskopischen Untersuchung bei der Selektion von selbstinkompatiblen Linien. Außerdem liefert die mikroskopische Untersuchung bereits einen Tag nach der Bestäubung Ergebnisse über das Selbstinkompatibilitätsverhalten einer Pflanze. Die Samenzahl pro Schote kann erst nach einigen Wochen bestimmt werden. Der Samenansatz konnte hier zur Bestätigung der mikroskopischen Untersuchungen herangezogen werden. RUDLOFF (1991) legte bezüglich des Samenansatzes ein strengeres Selektionskriterium fest als es in der vorliegenden Arbeit geschehen ist. Er bewertete nur Pflanzen, die höchstens einen Samen pro Schote bildeten, als selbstinkompatibel. Eine Selektion auf starke Ausprägung der Selbstinkompatibilität wurde bei den vorliegenden Auslesen aus Zuchtmaterial außer acht gelassen. Experimente zur Entwicklung geeigneter Selektionskriterien für die Auslese von Linien mit stark ausgeprägter Selbstinkompatibilität werden im Abschnitt 2.3 beschrieben.

In den vorliegenden Untersuchungen wird die Möglichkeit der Selektion von selbstinkompatiblen Linien in Rapszuchtmaterial mit 00-Qualität, wie bereits von ESCH (1994) gezeigt, bestätigt. Die beobachtete Häufigkeit selbstinkompatibler Linien von ca. 0,03 % ist geringer als das von ESCH (1994) (0,08 %) und KUČERA et al. (1995) (0,1 %) berichtete Vorkommen von selbstinkompatiblen Genotypen in Rapspopulationen. RUDLOFF (1991) und BESCHORNER (1993) konnten keine selbstinkompatiblen Genotypen in glucosinolatarmen und erucasäurefreiem Rapszuchtmaterial finden. OLSSON (1960) selektierte 31 selbstinkompatible Typen in einer Population von 515 Pflanzen der alten Rapsorte mit geringer Qualität ‚Matador‘. Auch GOWERS (1989) und GEMELL et al. (1989) fanden selbstinkompatible Pflanzen in der Sorte ‚Matador‘. Die geringe Häufigkeit von selbstinkompatiblen Genotypen in Winterraps mit 00-Qualität könnte in der Zuchtmethodik zur Entwicklung dieser Sorten, welche durch starke genetische Einengung und wiederholte Selbstungen charakterisiert ist, begründet sein (BESCHORNER 1993). Zwei der in dieser Arbeit selektierten S-Allele zeigten eine rezessive Vererbung zur Selbstinkompatibilität. Auch ESCH (1994) und KUČERA et al. (1995) fanden rezessive S-Allele. Das Vorkommen von rezessiven S-Allelen in einer Population ist durchaus wahrscheinlicher als das von dominanten. Die rezessiven S-Allele stehen unter dem

Schutz der dominant vererbten Selbstkompatibilität und können so über eine große Zahl von Generationen in einer Population bestehen bleiben (WRICKE 1972). Die Nachkommenschaften der aus Zuchtmaterial selektierten selbst-inkompatiblen Linien zeigten bis auf eine Ausnahme eine Aufspaltung in selbstinkompatible und selbstkompatible Genotypen. Dies war nicht zu erwarten, da das selektierte Einzelpflanzensaatgut von Pflanzen der F₂-Generation stammte, welche bezüglich des S-Locus homozygot sein sollten. Bei rezessiver Vererbung der Selbstinkompatibilität sind alle selbstinkompatiblen Genotypen homozygot. Es läßt sich vermuten, daß die für die Selbstung verwendeten Isoliertüten wider Erwarten nicht absolut pollendicht waren und Fremdeinstäubungen von Nachbarpflanzen erfolgten. Eine solche Fremdeinstäubung trotz Isoliertüte wurde auch bei männlich sterilen Pflanzen im Zuchtgarten beobachtet (BOCKHOLT persönliche Mitteilung).

2.2 Wechselwirkungen zwischen selbstinkompatiblen Linien

2.2.1 Einleitung

Die Wechselwirkungen zwischen S-Allelen wurden in den Ausgangsarten von Raps, *Brassica oleracea* (BATEMAN 1955, THOMPSON und TAYLOR 1966, OCKENDON 1975, HODGKIN 1978, WALLACE 1979a und VISSER et al. 1982) und *Brassica campestris* (BATEMAN 1955, MACKAY 1977 und HATAKEYAMA et al. 1998) eingehend untersucht. Auch über natürlich in Raps vorkommende S-Allele sowie Allele, die nach Resynthese in *Brassica napus* auftraten, wird in der Literatur berichtet (GOWERS 1989, GEMMEL et al. 1989, OZMINKOWSKI und JOURDAN 1993, BESCHORNER et al. 1995 und RIPLEY et al. 1995). In allen diesen Untersuchungen zeigte sich, daß die Beziehungen zwischen den S-Allelen nicht-linear verlaufen, d.h. die Allele ließen sich nicht in eine Dominanzreihe einordnen. Vielmehr zeigen viele Allele Kodominanz oder partielle Dominanz. S-Allele können in Narbe und Pollen unterschiedlich reagieren. In manchen Allelkombinationen wurde die Selbstinkompatibilität abgeschwächt oder verstärkt. In vielen Untersuchungen wird über den Einfluß modifizierender Faktoren auf die Ausprägung der

Selbstinkompatibilität berichtet. Diese modifizierenden Faktoren können wiederum in ihrer Wirkung von Umweltfaktoren abhängig sein. HARUTA (1962), NASRALLAH und WALLACE (1968) und RICHARDS und THURLING (1973) haben eine Modifikation der Stärke der Ausprägung der Selbstinkompatibilität in *Brassica oleracea* und *Brassica campestris* beobachtet. THOMPSON und TAYLOR (1971) und NASRALLAH (1974) berichten über ein Gen, dessen dominantes Allel die Ausprägung der Inkompatibilität in Kohl abschwächt. MACKAY (1977) fand in der Untersuchung von diallelen Kreuzungen zwischen Rübsenpflanzen einer Inzuchtnachkommenschaft partielle Kompatibilität und Pseudokompatibilität. Er begründet dies mit dem Vorhandensein modifizierender Effekte: dem genetischen Hintergrund, der Umwelt und dem Pflanzenalter. HODGKIN (1978) untersuchte diallele Kreuzungen zwischen fünf nicht verwandten Kohlinzuchtlinien, die das gleiche rezessive S-Allel (S_{15}) homozygot trugen. Er beobachtete additive Effekte bei der Untersuchung der Stärke der Selbstinkompatibilität und begründete dies durch die Wirkung modifizierender Gene. Aktivitätsverluste der Selbstinkompatibilität von Rosenkohlzuchtmaterial erklärten VISSER *et al.* (1982) mit dem Einfluß modifizierender Faktoren. HINATA *et al.* (1983) untersuchten eine selbstkompatible *B. campestris*-Linie („Yellow Sarson“), eine indische, gelbsamige Sorte. Sie entdeckten ein modifizierendes Gen *m*, dessen Existenz als Ursache der Variation der Selbstinkompatibilität und deren Beeinflussung durch die Umwelt schon von NASRALLAH und WALLACE (1968) vermutet wurde. Das rezessive modifizierende Gen *m* ist nicht mit dem S-Locus gekoppelt und unterdrückt die Wirkung der S-Allele in der Narbe, aber nicht im Pollen. BANKS und BEVERSDORF (1994) und GOWERS (1989) fanden einen signifikanten Hintergrundeinfluß in *B. napus*, wobei die weniger dominanten S-Allele zu einem höheren Grad beeinflußt wurden. WERNER *et al.* (1995) entdeckten einen unbekanntem modifizierenden Effekt im Genom von *B. napus*-Linien. Die rezessiven S-Allele dieser Linien zeigten eine Variation in der Stärke ihrer Ausprägung. Die Autoren vermuteten, daß in diesen konventionellen Rapslinien ein unabhängiger Faktor enthalten ist, der die Ausprägung mancher S-Allele, nicht aber aller, unterdrückt. EKUERE *et al.* (1995) definieren diesen unabhängigen Faktor noch genauer. Neben den beiden S-Loci der Ausgangsarten existiert in *B. napus* zusätzlich ein Supressor-Locus (P), der nicht mit dem S-Locus gekoppelt ist. Das P-Allel (P_2) in

B. napus zeigt eine dominante epistatische Reaktion über S-Allele in *B. napus* und über rezessive S-Allele, die aus *B. campestris* oder *B. oleracea* eingekreuzt wurden. Dadurch wird die Selbstinkompatibilitäts-Aktivität dieser S-Allele unterdrückt. Das P-Allel (P_1) am P-Locus in *B. oleracea* ist epistatisch über P_2 . Selten ist auch das P-Allel (P_3) in *B. oleracea* oder *B. campestris* zu finden, welches rezessiv zu P_2 ist.

Die Kenntnis der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen S-Allelen ist sehr wichtig im Hinblick auf ihre Nutzung in der Hybridzüchtung. So wären S-Allele, die sich gegenseitig abschwächen zur Wiederherstellung der Fertilität einer Hybride ideal. Werden mehrere kodominante S-Allele ohne gegenseitige Abschwächung in einer Hybride kombiniert, so sind einige der selbstinkompatiblen Hybridpflanzen auch untereinander inkompatibel, was die Fertilität der Hybridsorte beeinträchtigen kann.

2.2.2 Material und Methoden

Diallele Kreuzungen der selbstinkompatiblen Linien

Die Beziehungen zwischen den sieben selbstinkompatiblen Linien 8-1, 11-9, Myb, 391, 2065, 224 und 236 wurden in drei verschiedenen diallelen Kreuzungen mit unterschiedlichen Genotypen untersucht. Die Linien 8-1 und 11-9 wurden von ESCH (1994) aus Zuchtmaterial mit 00-Qualität selektiert. Die Herkunft der Linien Myb, 391, 224 und 236 wird in Abschnitt 2.1 erläutert. Das Selbstinkompatibilitätsverhalten der Linie 2065 wurde von MÖHRING (1996) untersucht. Diese Linie trägt ein S-Allel, das durch Rückkreuzung aus *Brassica campestris* in *B. napus* eingelagert wurde. Für die Untersuchung der S-Allel-Wechselwirkungen wurden nur Genotypen mit stabil ausgeprägter Selbstinkompatibilität verwendet. In den beiden diallelen Testkreuzungen mit den fünf Linien 8-1, 11-9, Myb, 391 und 2065 in den Jahren 1997 (Diallel I) und 1999 (Diallel II) wurden zehn Blüten pro Kombination behandelt. Das Pollenschlauchwachstum ist an drei Narben mikroskopisch untersucht worden. Nach Abreife der Schoten wurde der mittlere Samenansatz pro Schote bestimmt. Die diallelen Kreuzungen II sind von WITTHAUS (2000) durchgeführt worden. 1999 wurden die neu selektierten selbstinkompatiblen Linien 224 und 236 mit den fünf übrigen Linien diallel

gekreuzt (Diallel III) und in der gleichen Weise wie in den anderen beiden Diallelen untersucht.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit dem Pflanzenmaterial durchgeführt, welches aus den diallelen Kreuzungen I und II entstanden ist. Den beteiligten fünf verschiedenen Ausgangslinien wurden zur Vereinfachung Bezeichnungen für die mutmaßlichen S-Allele, die sie tragen könnten, zugeordnet: 8-1 (S_x), 11-9 (S_y), Myb (S_v), 391 (S_w) und 2065 (S_z). Dies dient lediglich dem besseren Verständnis. Aus den Untersuchungen sollte sich letztendlich ergeben, ob in diesen Linien verschiedene S-Allele existieren und um wie viele es sich handelt. Aus diesem Grunde werden die vermeintlich verschiedenen S-Allele mit Anführungsstrichen versehen. Bei den heterozygoten Genotypen steht das S-Allel, das von der Mutter stammt immer an erster, das vom Vater an zweiter Stelle. Es gibt also immer zwei verschiedene Heterozygote pro Allel-Kombination: S_aS_b und S_bS_a , diese werden im folgenden auch als ‚reziproke Heterozygote‘ bezeichnet. In Kreuzungen steht die Mutterpflanze immer an erster, der Bestäuber an zweiter Stelle: z.B. ♀ S_aS_b x ♂ S_bS_b .

Selbstungen der F_1 -Heterozygoten

Das Selbstkompatibilitätsverhalten der aus den diallelen Kreuzungen I und II hervorgegangenen F_1 -Pflanzen wurde in den Jahren 1998 und 1999 getestet. Es wurden pro F_1 -Pflanze drei Blüten geselbstet, mikroskopisch untersucht und der Samenansatz bestimmt. Die Pflanzen aus dem Diallel II sind von WITTHAUS (2000) geprüft worden.

Kreuzungen der F_1 -Pflanzen mit den Eltern genotypen und untereinander

Die F_1 -Pflanzen wurden reziprok mit den Elternlinien gekreuzt. Bei den zu untersuchenden Linienkombinationen 8-1 (S_x) / 2065 (S_z) und 11-9 (S_y) / 2065 (S_z) sind zusätzlich vollständige Diallele der Elternlinien und F_1 -Heterozygoten mit unterschiedlichen Genotypen durchgeführt worden. Das Pollenschlauchwachstum und der Samenansatz wurden an drei Blüten erfaßt. Diese Arbeiten hat WITTHAUS (2000) durchgeführt.

Kreuzungen zwischen den F₁-Heterozygoten

Weiterhin wurden Kreuzungen zwischen mehreren F₁-Heterozygoten und homozygoten Linien und von F₁-Heterozygoten untereinander im Hinblick auf mögliche Kreuzungskombinationen, die bei der Nutzung verschiedener S-Allele für die Herstellung von Dreiweghybriden entstehen, durchgeführt. Es wurden die möglichen Kreuzungskombinationen der Dreiweghybriden A: (S_xS_x x S_yS_y) x S_zS_z, B: (S_yS_y x S_wS_w) x S_zS_z und C: (S_wS_w x S_vS_v) x S_zS_z untersucht. In diesen Testkreuzungen wurde der mittlere Samenansatz von zehn Blüten bestimmt.

Pflanzenanzucht, Bestäubungen, Auswertung

Die Pflanzen sind im Gewächshaus bei 20/18 °C und 16 h Zusatzlicht kultiviert worden. Zur Durchführung der Kreuzungen wurden eben geöffnete Blüten von Blütenblättern und Antheren befreit. Blüten, auf deren Narben Eigenpollen geriet, wurden verworfen. Die in dieser Weise freigelegten Narben wurden mit Pollen des entsprechenden Kreuzungspartners bestäubt indem frisch aufgeplatzte Antheren über sie gestrichen wurden. Die Selbstungen erfolgten in gleicher Art und Weise unter Verwendung jungen Eigenpollens.

Bis auf die Kreuzungen zwischen den F₁-Heterozygoten sind in allen Versuchen drei Narben mikroskopisch untersucht worden. Die Narben wurden 24 h nach der Bestäubung entfernt, fixiert, gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet (siehe 2.1.2). Das Pollenschlauchwachstum wurde folgendermaßen bonitiert: die Anzahl der eingewachsenen Pollenschläuche (PS) wurde gezählt (bis ca. 30 PS), bzw. geschätzt (ab 30 PS). Narben, die ungefähr zur Hälfte mit kompatiblen Pollen bedeckt waren, wurden als Narben mit 50 PS bezeichnet und vollständig bedeckte Narben als Narben mit 100 PS eingeordnet. Neben eindeutig kompatiblen und inkompatiblen Reaktionen (siehe 2.1.3) wurden Zwischentypen als unvollständig inkompatibel oder partiell kompatibel bezeichnet. Waren die mikroskopischen Ergebnisse widersprüchlich, so wurden nochmals drei Blüten untersucht. Zusätzlich zum Pollenschlauchwachstum ist die mittlere Anzahl Samen pro Schote in die Zuordnung zu den Reaktionstypen einbezogen worden (Tabelle 2.2).

Die Kreuzungen der F₁-Heterozygoten mit den Elterngenotypen wurden nach zwei Verfahren ausgewertet. Zunächst erfolgte die Zuordnung zu den vier oben genannten Reaktionstypen. Dabei wurde der Reaktionstyp zunächst jeweils für das Pollenschlauchwachstum und den Samenansatz bestimmt. Entsprachen sich diese Typen nicht, so wurde wenn möglich der dazwischen liegende Typ gewählt. Wurden die Typen i und (i) gefunden, so wurde der Reaktionstyp als inkompatibel festgelegt und bei den Typen (k) und k als kompatibel betrachtet. In der weiteren Auswertung ist die relative Aktivität der potentiell verschiedenen S-Allele in den F₁-Heterozygoten nach WALLACE (1979a) errechnet worden. Die fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Narben wurden anhand ihres Pollenschlauchwachstums sieben verschiedenen Klassen zugeordnet (Tabelle 2.3).

Tab. 2.2: Inkompatibilitäts-Reaktionstypen

Reaktionstyp	Anzahl Pollenschläuche	Samen/Schote
i = inkompatibel	< 5	< 5
(i) = unvollständig inkompatibel	6 – 29	6 – 10
(k) = partiell kompatibel	30 – 69	11 – 15
k =kompatibel	> 70	> 16

Tab. 2.3: Sieben definierte Pollenschlauchklassen

Pollenschlauch- klasse	Anzahl eingewachsener Pollenschläuche
0	0
1	1-5
2	6-12
3	13-19
4	20-49
5	50-99
6	100

Der prozentuale Anteil der Summe aus gefundener mittlerer Samenzahl pro Schote und der Pollenschlauchklasse an der Summe aus der möglichen maximalen Samenzahl pro Schote und der Pollenschlauchklasse wurde errechnet und von 100 abgezogen, um die prozentuale S-Allel-Aktivität zu bestimmen (Formel 2.1.). Der maximal erreichbare Samenansatz wurde von den Narben mit 100 PS abgeleitet und betrug im Mittel 24,41 Samen/Schote. Die höchste Pollenschlauchklasse war sechs (Tabelle 2.3).

$$\text{S-Allel-Aktivität [\%]} = 100 - \frac{B + Q}{T + N} \times 100 \quad (2.1.)$$

B: gefundene mittlere Anzahl Samen pro Schote
 Q: gefundene mittlere Pollenschlauchklasse
 T: möglicher maximaler Samenansatz
 N: höchste Pollenschlauchklasse

verändert nach WALLACE (1979a)

Zur Verdeutlichung der Bestimmung der S-Allel-Aktivität sollen folgende Beispiele dienen. Die Kreuzung $S_x S_y \times S_x S_x$ reagierte inkompatibel: die Pollenschlauchklasse (Q) und die mittlere Samenzahl pro Schote (B) betragen null. Demnach ergab sich für den Quotienten in der Formel 2.1 der Wert null. Die S-Allel-Aktivität des S_x -Allels in der heterozygoten Mutter betrug folglich 100 %. Die Aktivität des S_y -Allels auf der Narbenseite wurde in der Kreuzung $S_x S_y \times S_y S_y$ bestimmt. Hier wurde die gleiche Reaktion wie bei der Aktivitätsbestimmung des S_x -Allels gefunden, das S_y -Allel ist also ebenfalls zu 100 % aktiv. Bei der Untersuchung der S-Allel-Aktivität von S_x auf der Pollenseite in der Kreuzung $S_x S_x \times S_x S_y$ ergab sich bei $Q = 1,67$ und $B = 2,67$ eine Aktivität von 85,73 %. War die gefundene Pollenschlauchklasse gleich sechs und die gefundene mittlere Samenzahl pro Schote größer als 24,41, so ergab sich ein negativer Wert in der Formel, dieser wurde gleich null gesetzt. Das geteste S-Allel zeigte also keinerlei Aktivität (0 %). Für die Wiederholungen wurden die S-Allel-Aktivitäten getrennt berechnet. Die Aktivitätsvergleiche wurden folgendermaßen durchgeführt: trat in der Aktivität der beiden S-Allele einer Heterozygoten eine Differenz von mehr als

20 % auf, so wurde dies als Aktivitätsunterschied angesehen und mit einem Pfeil dargestellt, wobei die Pfeilspitze auf das weniger aktive S-Allel zeigt. Lag die Aktivitätsdifferenz unter 20 % wurden diese S-Allele als gleich aktiv bezeichnet und mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Zeigten gleich aktive S-Allele jedoch eine Aktivität unter 50 %, so wurde dies als gegenseitige Abschwächung bezeichnet und mit einer gestrichelten Linie mit zwei Pfeilspitzen versehen.

2.2.3 Ergebnisse

Diallele Kreuzungen der selbstinkompatiblen Linien

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und der mittlere Samenansatz pro Schote in den diallelen Kreuzungen der sieben selbstinkompatiblen Linien sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Die Kombinationen an denen die Linien 236 und 2065 beteiligt waren, reagierten fast immer kompatibel (dunkelgraue Tabellenfelder), die verschiedenen Wiederholungen einer Kreuzungskombination wichen aber auch teilweise in ihrer Reaktion voneinander ab. In den Kreuzungen mit der Linie 11-9 zeigten sich sehr häufig widersprüchliche Reaktionen zwischen den Genotypen einer Kreuzungskombination (hellgraue Tabellenfelder). Die Kreuzungen der Linien 8-1, Myb, 391 und 224 untereinander verhielten sich in den meisten Fällen inkompatibel.

Tab. 2.4: Inkompatibilitätsverhalten selbstinkompatibler Linien in diallelen Kreuzungen

♀ \ ♂		8-1 S_xS_x	11-9 S_yS_y	Myb S_vS_v	391 S_wS_w	2065 S_zS_z	224	236
8-1	a		(k)	i	i	(k)		
	b	(i)	(k)	(i)	k	k	i	k
11-9	a	(k)		(i)	k	k		
	b	(i)	i	i	(i)	(k)	i	i
Myb	a	(i)	k		(i)	(k)		
	b	i	i	i	(i)	(i)	i	(k)
391	a	i	k	i		k		
	b	i	i	i	i	(i)	i	k
2065	a	k	k	k	k			
	b	(k)	i	k	k	i	k	k
224	a							
	b	i	i	i	i	(k)		(k)
236	a							
	b	k	(k)	k	k	k	k	

a: Diallele Kreuzungen I 1997
b: Diallele Kreuzungen II und III 1999

i: inkompatible Reaktion
k: kompatible Reaktion
(i): unvollständig inkompatible Reaktion
(k): partiell kompatible Reaktion

Selbstungen der F_1 -Heterozygoten

Die aus den diallelen Linienkreuzungen stammenden F_1 -Heterozygoten zeigten in der Regel selbstinkompatibles Verhalten. Die Hälfte der Heterozygoten, die das dominante S_z -Allel enthielten, waren jedoch selbstkompatibel (graue Tabellenfelder) (Tabelle 2.5).

Tab. 2.5: Selbstkompatibilitätsverhalten der F₁-Heterozygoten

F ₁ -Linie		SI-Verhalten	F ₁ -Linie		SI-Verhalten
S _x S _y	a	si	S _y S _x	a	-
	b	si		b	si
S _x S _v	a	(sk)	S _v S _x	a	-
	b	(sk)		b	si
S _x S _w	a	si	S _w S _x	a	-
	b	(si)		b	(sk)
S _x S _z	a	sk	S _z S _x	a	si
	b	sk		b	si
S _y S _v	a	(sk)	S _v S _y	a	si
	b	(sk)		b	si
S _y S _w	a	si	S _w S _y	a	si
	b	si		b	-
S _y S _z	a	si	S _z S _y	a	sk
	b	si		b	(sk)
S _v S _w	a	-	S _w S _v	a	si
	b	(si)		b	si
S _v S _z	a	si	S _z S _v	a	sk
	b	si		b	(sk)
S _w S _z	a	sk	S _z S _w	a	si
	b	sk		b	si

a: Selbstungen 1998
b: Selbstungen 1999

si: selbstinkompatible Reaktion
sk: selbstkompatible Reaktion
(si): unvollständig selbstinkompatible Reaktion
(sk): partiell selbstkompatible Reaktion

Kreuzungen der F₁-Heterozygoten mit den Eltern genotypen und untereinander

Zunächst werden die Wechselwirkungen auf der Basis der Reaktionstypen behandelt. In jedem einzelnen Abschnitt der Tabelle 2.6 auf der folgenden Seite sind die Wechselwirkungen zwischen zwei ‚S-Allelen‘ in Kreuzungen der Heterozygoten mit den entsprechenden Eltern genotypen dargestellt. Einige Kreuzungen wurden in mehreren Wiederholungen in verschiedenen Jahren durchgeführt. Die einzelnen Wiederholungen sind durch die Hochzahlen ¹, ² und ³ gekennzeichnet (siehe auch Legende der Tabelle 2.6).

Tab. 2.6: Kreuzungen der F1-Heterozygoten mit den Eltern genotypen und untereinander - Reaktionstypen

♀ \ ♂	$S_x S_x$	$S_x S_y$	$S_y S_x$	$S_y S_y$
$S_x S_x$		(i) ¹	(i) ¹	
$S_x S_y$	i ¹			i ¹
$S_y S_x$	i ¹			(k) ¹
$S_y S_y$		(k) ¹	i ¹	
	$S_x \text{-----} S_y$			

♀ \ ♂	$S_x S_x$	$S_x S_v$	$S_v S_x$	$S_v S_v$
$S_x S_x$		i ¹	i ¹	
$S_x S_v$	(i) ¹			(i) ¹
$S_v S_x$	i ¹			(k) ¹
$S_v S_v$		i ¹	(i) ¹	
	$S_x \text{-----} S_v$			

♀ \ ♂	$S_x S_x$	$S_x S_w$	$S_w S_x$	$S_w S_w$
$S_x S_x$		i ¹	(i) ¹	
$S_x S_w$	i ¹			(i) ¹
$S_w S_x$	i ¹			(i) ¹
$S_w S_w$		i ¹	(k) ¹	
	$S_x \text{-----} S_w$			

♀ \ ♂	$S_x S_x$	$S_x S_z$	$S_z S_x$	$S_z S_z$
$S_x S_x$	$i^{2;3}$	$k^1 k^2 k^3$	$k^1 k^2 k^3$	$k^2 k^3$
$S_x S_z$	(i) ¹ (i) ^{2;3}	$k^2 k^2 k^3$	$k^2 k^2 k^3$	$k^1 k^2 k^3$
$S_z S_x$	$i^1 (i)^{2;3}$	$k^2 k^2 k^3$	$i^2 i^2 k^3$	$i^1 i^2 (k)^3$
$S_z S_z$	$k^2 (k)^3$	$k^1 k^2 k^3$	$i^1 i^2 k^3$	$i^1 i^3$
	$S_x \text{<----->} S_z \quad S_z \text{----->} S_x$			

♀ \ ♂	$S_y S_y$	$S_y S_v$	$S_v S_y$	$S_v S_v$
$S_y S_y$		i ¹	(k) ¹	
$S_y S_v$	i ¹			i ¹
$S_v S_y$	i ¹			(k) ¹
$S_v S_v$		i ¹	(i) ¹	
	$S_y \text{-----} S_v$			

♀ \ ♂	$S_y S_y$	$S_y S_w$	$S_w S_y$	$S_w S_w$
$S_y S_y$		i ¹	(i) ¹	
$S_y S_w$	i ¹			(k) ¹
$S_w S_y$	i ¹			i ¹
$S_w S_w$		i ¹	i ¹	
	$S_y \text{-----} S_w$			

♀ \ ♂	$S_y S_y$	$S_y S_z$	$S_z S_y$	$S_z S_z$
$S_y S_y$	i^2	(i) ¹ i^2	(k) ¹ k^2	k^2
$S_y S_z$	$i^1 (i)^2$	$i^2 i^2$	$k^2 k^2$	$i^1 i^2$
$S_z S_y$	$i^1 i^2$	$k^2 k^2$	$k^2 k^2$	(k) ¹ (k) ²
$S_z S_z$	k^2	$i^1 k^2$	(k) ¹ k^2	i^2
	$S_y \text{-----} S_z \quad S_z \text{<----->} S_y$			

♀ \ ♂	$S_v S_v$	$S_v S_w$	$S_w S_v$	$S_w S_w$
$S_v S_v$		(i) ¹	(k) ¹	
$S_v S_w$	i ¹			(k) ¹
$S_w S_v$	(i) ¹			(i) ¹
$S_w S_w$		i ¹	i ¹	
	$S_v \text{-----} S_w$			

♀ \ ♂	$S_v S_v$	$S_v S_z$	$S_z S_v$	$S_z S_z$
$S_v S_v$		(k) ¹	(k) ¹	
$S_v S_z$	i ¹			i ¹
$S_z S_v$	(i) ¹			(k) ¹
$S_z S_z$		i ¹	(k) ¹	
	$S_v \text{-----} S_z$			

♀ \ ♂	$S_w S_w$	$S_w S_z$	$S_z S_w$	$S_z S_z$
$S_w S_w$		(k) ¹	(k) ¹	
$S_w S_z$	(i) ¹			k^1
$S_z S_w$	(k) ¹			i ¹
$S_z S_z$		(k) ¹	i ¹	
	$S_w \text{----->} S_z \quad S_z \text{-----} S_w$			

i: inkompatible Reaktion
 k: kompatible Reaktion
 (i): unvollständig inkompatible Reaktion
 (k): partiell kompatible Reaktion

¹: Kreuzungsserie 1998
²: 1. Kreuzungsserie 1999
³: 2. Kreuzungsserie 1999

—————> Dominanz
 ----- Kodominanz
 <-----> Gegenseitige Abschwächung

Bei kompatibler Reaktion sind die entsprechenden Tabellenfelder dunkelgrau unterlegt, bei partiell kompatibler oder widersprüchlicher Reaktion hellgrau. Die Pfeile stellen das Dominanzverhältnis der beiden untersuchten ‚S-Allele‘ zueinander dar. Der obere Pfeil charakterisiert die S-Allel-Wechselwirkung auf der Pollenseite, der untere Pfeil auf der Narbenseite. Bei der Festlegung der Dominanzverhältnisse wurden die Reaktionstypen (i) und (k) in Tabelle 2.6 als inkompatibel betrachtet. Die häufiger ausgeprägte Reaktion wurde in der Auswertung berücksichtigt. Trat eine partiell kompatible Reaktion jedoch in Verbindung mit einem kompatiblen Typ auf, so wurde die Kombination insgesamt als kompatibel betrachtet.

Die F₁-Heterozygoten, in denen nur die potentiell verschiedenen Allele S_x, S_y, S_v und S_w, nicht aber S_z, enthalten waren, reagierten in der Regel mit den entsprechenden Eltern genotypen inkompatibel. Es traten auch die Zwischentypen (i) und (k) auf. Wurden diese vernachlässigt, konnten die vier Allele als kodominant zueinander eingeordnet werden. In den Kombinationen mit dem S_z-Allel traten ebenfalls häufig kodominante Reaktionen auf. Insbesondere in Verbindung mit dem S_x-Allel zeigten sich jedoch vielfältige Wechselwirkungen mit reziproken Unterschieden. Die verschiedenen untersuchten Pflanzen reagierten in der gleichen Kombination ebenfalls manchmal unterschiedlich.

In der F₁-Heterozygoten S_xS_z war im Pollen eine gegenseitige Abschwächung der S-Allele zu beobachten: S_xS_z als Vater war mit allen vier Genotypen des Diallels kompatibel. Wären die beiden S-Allele kodominant ausgeprägt worden, so hätten die Reaktionen mit den heterozygoten Müttern inkompatibel sein müssen. Eine solche gegenseitige Abschwächung war auch in der Heterozygoten S_zS_y auf der Pollenseite zu finden. In den diallelen Kreuzungen zwischen S_y und S_z entsprach die Kombination S_zS_y × S_yS_z nicht dem Ergebnis, daß aus den Kreuzungen dieser Heterozygoten mit den Eltern genotypen abzuleiten war. Demnach wirkten die S-Allele in S_zS_y auf der Narbenseite und in S_yS_z auf der Pollenseite kodominant, die Kreuzung zwischen diesen beiden Genotypen hätte also inkompatibel sein müssen, reagierte jedoch tatsächlich kompatibel. Diese Kreuzungskombination ist durch ein fett umrandetes Tabellenfeld kenntlich gemacht.

Die Bestimmung der S-Allel-Aktivität zeigte vielfältige Aktivitätsunterschiede aller ‚Allele‘ (Tabellen 1 bis 10 im Anhang, S. 135ff.). In zwei Kombinationen trat gleich starke Aktivität der ‚S-Allele‘ sowohl in der Narbe als auch im Pollen auf (S_xS_v , S_yS_v). Bei zwei weiteren Heterozygoten (S_wS_x , S_zS_w) waren gleich gerichtete Aktivitätsunterschiede in Narbe und Pollen zu finden. Oft existierte nur in der Narbe oder im Pollen eine gleich starke Aktivität der beiden ‚S-Allele‘. Insgesamt war eine gleich starke Aktivität der ‚S-Allele‘ acht mal auf Narben- und neun mal auf Pollenseite zu finden. In vier Fällen in Kombination mit dem S_z -Allel lag die Aktivitätsgleichheit auf Pollenseite unter 50 %. Dies wurde als gegenseitige Abschwächung der ‚S-Allele‘ interpretiert. In drei Kombinationen war die Reaktion im Pollen genau umgekehrt zur Narbenreaktion. In sechs Fällen unterdrückte ein ‚S-Allel‘ die Aktivität des anderen Allels vollkommen (die unterdrückten ‚S-Allele‘ zeigten 0 % Aktivität). In vier dieser Kombinationen war das S_z -Allel beteiligt. Die beiden ‚reziproken Heterozygoten‘ mit dem gleichen ‚S-Allel‘-Paar reagierten in keinem Fall in der gleichen Weise. Drei Heterozygotenpaare unterschieden sich nur auf Pollen- oder Narbenseite, sieben reagierten in beiden Organen verschieden. Die Zahl der Kombinationen in denen ein ‚Allel‘ aktiver, weniger aktiv oder gleich aktiv im Verhältnis zu den übrigen ‚S-Allelen‘ war, ist in Tabelle 2.7 zusammengefaßt. Das Aktivitätsverhalten wurde folgendermaßen gewichtet und zusammengefaßt (kursive Zahlen in Tabelle 2.7): die Fälle in denen ein ‚S-Allel‘ aktiver als die anderen war wurde dreifach, wenn es weniger aktiv war doppelt mit negativem Vorzeichen und bei gleicher Aktivität einfach gewertet.

Tab. 2.7: Aktivitätsverhalten der einzelnen ‚S-Allele‘
im Vergleich zu allen anderen ‚S-Allelen‘

Aktivitätsverhalten	S_x	S_z	S_y	S_v	S_w
aktiver (a)	7	5	4	3	4
weniger aktiv (b)	2	4	5	5	7
gleich aktiv (c)	7	7	7	8	5
<i>3a-2b+c</i>	<i>24</i>	<i>14</i>	<i>9</i>	<i>7</i>	<i>3</i>

Die ‚Allele‘ ließen sich anhand dieser Ergebnisse in eine Aktivitätsreihenfolge einordnen, in der das S_x -Allel in den meisten Kombinationen eine höhere Aktivität und in den wenigsten Fällen eine geringere Aktivität als die übrigen ‚Allele‘ zeigte.

$$S_x \longrightarrow S_z \longrightarrow S_y \longrightarrow S_v \longrightarrow S_w$$

Kreuzungen zwischen den F_1 -Heterozygoten

Die Testkreuzungen, die das Fertilitätsverhalten der Dreiweghybriden A und C vorhersagen sollten (Tabellen 2.8 und 2.10) konnten nicht vollständig durchgeführt werden, da die Genotypen S_yS_x und S_vS_w fehlten. Bei kompatibler Reaktion sind die entsprechenden Tabellenfelder grau unterlegt. Die getesteten Kombinationen von S_xS_y und S_wS_v reagierten kompatibel mit S_zS_z . Bei der Dreiweghybride B waren die Einfachhybriden S_yS_w und S_wS_y in allen Kombinationen mit dem S_zS_z -Genotyp kompatibel und untereinander inkompatibel. Die Kreuzungen zwischen den F_1 -Heterozygoten, die in der Dreiweghybride schließlich vorkommen, sollen das Fertilitätsverhalten dieser Hybriden vorhersagen. Bei diesen Testkreuzungen zeigte sich ein einheitliches Schema: die selbstinkompatiblen Genotypen reagierten untereinander immer inkompatibel. War ein selbstkompatibler Kreuzungspartner beteiligt, so kam es zur kompatiblen Reaktion.

Tab. 2.8: Dreiweghybride A: ($S_xS_x \times S_yS_y$) \times S_zS_z $S_xS_y \times S_zS_z$ k $S_zS_z \times S_xS_y$ (k)

$\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{♀} \end{array} \begin{array}{c} \text{♂} \\ \diagup \end{array}$	S_zS_y	S_yS_z	S_zS_x	S_xS_z
S_zS_y	sk	k	(k)	(k)
S_yS_z	k	si	i	k
S_zS_x	k	i	si	k
S_xS_z	k	(k)	k	sk

i: inkompatible Reaktion
 k: kompatible Reaktion
 (k): partiell kompatible Reaktion

si: selbstinkompatible Reaktion
 sk: selbstkompatible Reaktion
 (sk): partiell selbstkompatible Reaktion

Tab. 2.9: Dreiweghybride B: ($S_yS_y \times S_wS_w / S_wS_w \times S_yS_y$) \times S_zS_z $S_yS_w \times S_zS_z$ (k) $S_zS_z \times S_yS_w$ k $S_wS_y \times S_zS_z$ k $S_zS_z \times S_wS_y$ k $S_yS_w \times S_wS_y$ i $S_wS_y \times S_yS_w$ i

$\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{♀} \end{array} \begin{array}{c} \text{♂} \\ \diagup \end{array}$	S_zS_y	S_yS_z	S_zS_w	S_wS_z
S_zS_y	sk	k	k	k
S_yS_z	k	si	i	k
S_zS_w	k	i	si	k
S_wS_z	(k)	k	k	sk

i: inkompatible Reaktion
 k: kompatible Reaktion
 (k): partiell kompatible Reaktion

si: selbstinkompatible Reaktion
 sk: selbstkompatible Reaktion
 (sk): partiell selbstkompatible Reaktion

Tab. 2.10: Dreiweghybride C: ($S_w S_w \times S_v S_v$) \times $S_z S_z$ $S_w S_v \times S_z S_z$ k $S_z S_z \times S_w S_v$ k

$\begin{matrix} \diagup & \sigma \\ \diagdown & \text{♀} \end{matrix}$	$S_z S_v$	$S_v S_z$	$S_z S_w$	$S_w S_z$
$S_z S_v$	(sk)	k	k	(k)
$S_v S_z$	(k)	si	i	(k)
$S_z S_w$	k	i	si	k
$S_w S_z$	k	k	k	sk

i: inkompatible Reaktion
 k: kompatible Reaktion
 (k): partiell kompatible Reaktion

si: selbstinkompatible Reaktion
 sk: selbstkompatible Reaktion
 (sk): partiell selbstkompatible Reaktion

2.2.4 Diskussion

Diallele Kreuzungen der selbstinkompatiblen Linien

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Linien 236 und 2065 jeweils ein von allen anderen Linien verschiedenes S-Allel tragen, da sie in fast allen Kreuzungskombinationen kompatibel reagierten. Widersprüchliche Reaktionen zeigten sich besonders häufig bei den Kreuzungen an denen 11-9 beteiligt war. Die widersprüchlichen Ergebnisse mit dieser Linie könnten durch Fertilitätsstörungen bedingt gewesen sein, die bei der Linie 11-9 auch in anderen Versuchen auftraten (siehe Abschnitt 2.3.3). In den vorhergehenden Untersuchungen von ESCH (1994) wurde nachgewiesen, daß die Linie 11-9 ein anderes S-Allel trägt als die Linie 8-1. Es tauchte auch Inkompatibilität bei Kreuzungen von 11-9 mit den Linien 236 und 2065 auf, ganz im Gegensatz zu den übrigen vier Linien, die mit 236 und 2065 fast in jedem Fall partiell kompatible bis kompatible Reaktionen zeigten. Die vier Linien 8-1, Myb, 391 und 224 haben wahrscheinlich dasselbe S-Allel, da sie miteinander fast immer unvollständig inkompatibel bzw. vollkommen inkompatibel reagierten. In den in Abschnitt 2.4

aufgeführten Untersuchungen zur Unterscheidung der selbstinkompatiblen Linien mit Hilfe eines CAPS-Markers können die Linien 11-9 und 2065 jeweils deutlich von allen weiteren Linien unterschieden werden. Das unterstützt die hier erzielten Ergebnisse, daß sie andere S-Allele tragen. Die übrigen Linien zeigten keine Unterschiede in der Bandenzahl, Myb und 236 zeigten jedoch Unterschiede in der Bandengröße. Das spricht dafür, daß auch 236 ein anderes S-Allel trägt, steht jedoch im Widerspruch dazu, daß Myb das gleiche S-Allel wie 8-1, 391 und 224 besitzt. Letztendlich erscheinen die Ergebnisse hinsichtlich der Funktion der S-Allele, also der Fähigkeit innerhalb der Kompatibilitätsreaktion zwischen verwandtem und Fremdpollen zu unterscheiden als ausschlaggebend und werden als relevant betrachtet.

Die diallelen Kreuzungen lassen demnach darauf schließen, daß die selbstinkompatiblen Linien 8-1, Myb, 391 und 224 ein identisches S-Allel tragen. Trotzdem wurden die Linien 8-1, Myb und 391 in den weiteren Untersuchungen unter der entsprechenden S-Allel-Bezeichnung (S_x , S_v und S_w) mitgeführt, um zu prüfen ob die Ausprägung dieses Allels durch den genetischen Hintergrund modifiziert wird.

Selbstungen der F_1 -Heterozygoten

Die Mehrzahl der F_1 -Heterozygoten reagierte erwartungsgemäß selbstinkompatibel (Tabelle 2.5, S. 35). Das Auftreten der vier selbstkompatiblen F_1 -Heterozygoten S_xS_z , S_wS_z , S_zS_y und S_zS_v war überraschend, vor allem weil die jeweils ‚reziproke Heterozygote‘ selbstinkompatibel reagierte. Bemerkenswert ist ebenso, daß die identischen Allele S_x , S_v und S_w mit mütterlicher bzw. väterlicher Herkunft in Kombination mit dem S_z -Allel nicht immer gleichartig reagierten. So waren z. B. S_xS_z und S_wS_z selbstkompatibel, S_vS_z jedoch selbstinkompatibel.

THOMPSON und TAYLOR (1971) und THOMPSON (1972) fanden selbstkompatible Pflanzen in *Brassica oleracea* Populationen, welche heterozygot am S-Locus waren. Die Pflanzen, die homozygot für die entsprechenden S-Allele waren, reagierten selbstinkompatibel. Die Autoren vermuten, daß nicht eine Mutation am S-Locus die Selbstkompatibilität bedingt hat, sondern eine gegenseitige Abschwächung der S-Allele. Diese gegenseitige Abschwächung wurde von einem modifizierendem Gen beeinflusst. RICHARDS und

THURLING (1973) beobachteten das Auftreten von Selbstkompatibilität in *Brassica campestris*. Sie führten dies ebenfalls auf die Interaktion zwischen S-Genotypen und den Einfluß modifizierender, temperatursensitiver Faktoren zurück. Eine gegenseitige Abschwächung von S-Allelen wurde auch von WALLACE (1979a) und VISSER et al. (1982) in *Brassica oleracea* beobachtet.

Die mögliche Ursache für die Selbstkompatibilität in Raps wird von GORING et al. (1993) dargelegt. Sie entdeckten eine 1 bp-Deletion im SRK-Gen (A10-Allel) von selbstkompatiblen Rapslinien, die zu einer Verschiebung des Leserasters führt, so daß nur eine verkürzte, nicht funktionale SRK gebildet werden kann. Diese Mutation bewerten GORING et al. (1993) als Ursache für den Verlust der Selbstinkompatibilität in *Brassica napus*. Das A10-Allel konnte in mehreren Rapsorten wie Ceres, Regent, Westar und Topas nachgewiesen werden. In Testkreuzungen mit selbstinkompatiblen Rapslinien, die bekannte S-Allele aus den beiden Ausgangsarten trugen ergab sich, daß das A10-Allel mit dem *B. oleracea*-S-Locus gekoppelt ist. Den *B. campestris*-S-Locus konnten GORING et al. (1993) nicht näher charakterisieren.

Welcher S-Locus, oder ob beide S-Loci in dem hier untersuchten Pflanzenmaterial aktiv sind, ist nicht bekannt. Es ist lediglich bekannt, daß die Linie 2065 ein *B. campestris*-S-Allel trägt. RIPLEY et al. (1995) untersuchten die Wechselwirkungen zwischen S-Allelen aus *B. campestris* und *B. oleracea*, die in *B. napus* eingekreuzt worden waren. Sie fanden Interaktionen, wie sie auch innerhalb der beiden Arten bestehen. Am häufigsten war Dominanz in Narbe und Pollen zu finden. In beiden Organen kam ebenfalls oft Kodominanz vor. Eine gegenseitige Abschwächung, von der KOTT (1995) und GOWERS (1989) in *Brassica napus* berichten, beobachteten sie nicht.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Selbstkompatibilität ist vermutlich durch modifizierende genetische Faktoren verursacht worden. Die ‚reziproken Unterschiede‘ der F₁-Heterozygoten und die ungleich reagierenden Genotypen sprechen für einen großen Einfluß des genetischen Hintergrundes auf die Ausprägung der Selbstinkompatibilität, wobei im allotetraploiden Raps auch interspezifische Faktoren eine Rolle spielen könnten.

Kreuzungen der F₁-Pflanzen mit den Eltern genotypen und untereinander

Aus den Kreuzungen der F₁-Pflanzen mit den Eltern genotypen ist nach der Zuordnung zu den Reaktionstypen (Tab. 2.6, S. 36) auf Kodominanz des S-Allels in der Linie 11-9 zum S-Allel in den Linien 8-1, 391 und Myb zu schließen. In der Aktivitätsuntersuchung waren auch zwischen den drei selbstinkompatiblen Linien mit identischem S-Allel und zwischen diesen und der Linie 11-9 Unterschiede in der Wirkung der ‚S-Allele‘ zu erkennen. Sie deuten auf einen Einfluß des genetischen Hintergrundes hin. In dieser Arbeit werden die Beobachtungen, die in der Literatur erwähnt werden, daß Kodominanz und partielle Dominanz sehr häufig vorkommen (THOMPSON und TAYLOR 1966, OCKENDON 1975, WALLACE 1979a, BESCHORNER et al. 1995 und HATAKEYAMA et al. 1998), bestätigt. Die Autoren berichten, daß die vollständige Dominanz eines Alleles über ein anderes sehr selten vorkommt. In der vorliegenden Untersuchung unterdrückte dagegen relativ häufig ein S-Allel die Aktivität eines anderen S-Alleles vollkommen und zwar in sechs von vierzig Kombinationen. Dies trat erstaunlicherweise auch zwischen den beiden identischen Allelen S_v und S_w auf (Tab. 8, S. 139), ein weiterer Hinweis auf eine die Selbstinkompatibilität modifizierende Wirkung anderer Faktoren. Die Beobachtung, daß Kodominanz häufiger in der Narbe als im Pollen auftritt bestätigte sich in den vorliegenden Untersuchungen nicht. Die beobachteten reziproken Aktivitätsunterschiede (Dominanzumkehr in Narbe und Pollen) sind auch von WALLACE (1979b), HODGKIN (1986), GOWERS (1989) und BESCHORNER et al. (1995) erwähnt worden.

Die Wechselwirkungen mit dem S_z-Allel sind insbesondere im Hinblick auf die S-Allel-Aktivität sehr vielfältig. Die vier Fälle von gegenseitiger Abschwächung von S-Allelen, die bei den Selbstungen der F₁-Heterozygoten auftraten, fanden sich hier bestätigt. Diese gegenseitige Abschwächung konnte mit der Bestimmung der S-Allel-Aktivität noch genauer charakterisiert werden: sie trat immer nur auf der Pollenseite auf. In den Untersuchungen auf Basis der Reaktionstypen wurde die gegenseitige Abschwächung auf Pollenseite in S_xS_z und S_zS_y beobachtet. Diese Heterozygoten wurden in einem vollständigem Diallel untersucht. Die anderen beiden Heterozygoten S_zS_v und S_wS_z sind lediglich mit ihren Eltern genotypen gekreuzt worden. Sie zeigten in diesen Kombinationen eine partiell kompatible Reaktion. In weiteren Wiederholungen dieser Kreuzungen und in Kombinationen der Heterozygoten untereinander hätte sich

möglicherweise auch bei diesen beiden Heterozygoten eine gegenseitige Abschwächung im Pollen gezeigt. In den vier F_1 -Heterozygoten, in denen immer auch das S_z -Genom enthalten war, trafen offenbar genetische Faktoren zusammen, die die S-Allel-Spezifität der Pollenkörner abschwächen oder vollständig aufheben.

Die Bestimmung der Aktivität ergab ebenfalls Unterschiede im Inkompatibilitätsverhalten der Linien mit identischem S-Allel. Diese Linien reagierten keinesfalls immer in gleicher Weise in Bezug auf das S_z -Allel, was wiederum auf den Einfluß modifizierender genetischer Faktoren auf die Ausprägung der Selbstinkompatibilität hindeutet. Anhand dieser vielfältigen Wechselwirkungen ließen sich die potentiellen ‚S-Allele‘ einer Aktivitätsreihenfolge zuordnen, in der S_x in den meisten Kombinationen aktiver als alle anderen ‚S-Allele‘ war. Es wäre zu erwarten gewesen, daß das zur Selbstinkompatibilität dominant vererbte S_z -Allel aktiver ist als die rezessiv vererbten Allele und nicht erst an zweiter Stelle in der Skala erscheint. Auch SMITH et al. (1977) berichteten von rezessiven S-Allelen in *Brassica oleracea* mit stark ausgeprägter Selbstinkompatibilität. Auf der anderen Seite finden JOHNSON und BLYTON-CONWAY (1976) dominante S-Allele mit nur schwach ausgeprägter Selbstinkompatibilitätsreaktion. Die häufig beobachtete allgemeine Beziehung zwischen einer stärkeren Inkompatibilität und Dominanz der Allele ist, wie die Beispiele zeigen, nicht durchgängig vorhanden.

Kreuzungen zwischen den F_1 -Heterozygoten

Die getesteten F_1 -Heterozygoten, die in die Dreiweghybride eingingen, waren in jedem Fall selbstinkompatibel, untereinander inkompatibel und kompatibel zu S_z . Die Voraussetzungen zur Hybridproduktion im Mischbau waren demnach gegeben. Die Fertilität der Dreiweghybriden war weitgehend wiederhergestellt, da $\frac{3}{4}$ der möglichen Kreuzungskombinationen zwischen den in der Hybride vorkommenden Genotypen kompatibel waren. LEWIS und WOODS (1993) beobachteten, daß der Ertrag von Rapshybriden, die je zur Hälfte aus selbstkompatiblen und selbstinkompatiblen Pflanzen zusammengesetzt waren nicht beeinträchtigt war. Diese Hybriden blühten jedoch länger, was auf ein Pollendefizit deuten läßt.

Es ließ sich die Gesetzmäßigkeit erkennen, daß die Kombinationen, an denen die selbstkompatiblen Heterozygoten beteiligt waren, immer kompatibel reagierten. In der S-Allel-Aktivitätsuntersuchung wurde festgestellt, daß die gegenseitige Abschwächung der Allele nur auf der Pollenseite zu finden war. So läßt sich annehmen, daß die S-Allele in den selbstkompatiblen Vaterlinien nicht zur Wirkung kamen und diese Linien mit allen Partnern kompatibel reagierten. Die selbstkompatiblen Mutterlinien waren jedoch ebenfalls mit allen Genotypen kompatibel. In diesen Kombinationen wären in Folge der auf Narbenseite der selbstkompatiblen Pflanzen nicht bestehenden gegenseitigen Abschwächung der S-Allele auch inkompatible Reaktionen zu erwarten gewesen.

Das Auftreten der gegenseitigen Abschwächung von S-Allelen in Verbindung mit dem S_z -Genom ist sehr schwer zu interpretieren. Zum einen reagierten die ‚reziproken Heterozygoten‘ unterschiedlich in ihrer Selbstkompatibilitätsreaktion. Zum anderen wurde die gegenseitige Abschwächung der S-Allele als Ursache der Selbstkompatibilität in den S-Allel-Aktivitätsuntersuchungen nur auf der Pollenseite beobachtet. Weitergehende Untersuchungen könnten neue Ergebnisse zur Erklärung dieser Phänomene bringen. Die Berichte in der Literatur, daß modifizierende genetische Faktoren die Ausprägung der Selbstinkompatibilität stark beeinflussen können, lassen sich in diesen Untersuchungen vielfach bestätigen. Zur Nutzung der Selbstinkompatibilität als Bestäubungsmechanismus in der Hybridzüchtung werden Linien mit einem genetischen Hintergrund benötigt, der zur stabilen und starken Ausprägung der Selbstinkompatibilität beiträgt. Weiterhin sind S-Allele, die sich gegenseitig abschwächen, für die Produktion von Hybriden sehr interessant. Werden sie in einer Hybride kombiniert, so ist deren Fertilität wieder hergestellt. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mehrfachhybriden waren $\frac{3}{4}$ der Pflanzen selbstfertil. Die gegenseitigen Wechselwirkungen unterschiedlicher S-Allele sollten demnach gut untersucht werden, um diese S-Allele optimal in verschiedenen Strategien in der Hybridzüchtung einzusetzen.

2.3 Selektion von Genotypen mit stabil ausgeprägter Selbstinkompatibilität

2.3.1 Einleitung

Wie von vielen Autoren berichtet wird, können vor allem rezessiv zur Selbstinkompatibilität vererbte S-Allele von modifizierenden Genen in ihrer Ausprägung beeinflusst werden (siehe Abschnitt 2.2.1). Diese Gene sind umweltabhängig, so kann die Selbstinkompatibilität z.B. bei hoher Temperatur abgeschwächt werden (NASRALLAH und WALLACE 1968). Ein Einfluß des genetischen Hintergrundes auf die Selbstinkompatibilität wurde in der vorliegenden Arbeit auch in den Untersuchungen der S-Allel-Wechselwirkungen in Kreuzungen verschiedener selbstinkompatibler Linien festgestellt. Das Ziel der im folgenden beschriebenen Untersuchungen war die Entwicklung eines Selektionskriteriums, anhand dessen Genotypen mit stark ausgeprägter, temperaturstabiler Selbstinkompatibilität aus einer Population ausgelesen werden können. Solche Genotypen sind unerlässlich für das Erreichen einer hohen Auskreuzungsrate bei der Produktion von Hybriden. Hier werden Selektionsexperimente im Gewächshaus und im Freiland beschrieben, wobei das Hauptaugenmerk auf die Vererbung der Ausprägung der Selbstinkompatibilität gelegt wurde. Zum einen sollte die Stärke der Selbstinkompatibilität von Nachkommen verschiedener Inzuchtlinien in einem Gewächshausversuch anhand des Selbstungssamenansatzes bestimmt werden, zum anderen die Auskreuzungsrate von Kreuzungsnachkommen dieser Linien mit einem selbstkompatiblen Bestäuber ermittelt werden. Die Kreuzungsnachkommen sind in einer Topcrossanlage im Freiland hergestellt worden.

2.3.2 Material und Methoden

In einem Vorversuch wurden 186 selbstinkompatible Pflanzen der vierten, bzw. fünften Inzuchtgeneration, die von elf verschiedenen Genotypen abstammten, im Gewächshaus bei einer Temperatur von 16/18 °C und 16 h Zusatzlicht durch Eintüten der oberen sechs Triebe geselbstet. Aus der Nachkommenschaft der sechs verschiedenen Genotypen 2-3,

6-9, 8-1, 9-9, 10-1 und 11-9 wurde jeweils eine Pflanze mit besonders hohem und eine Pflanze mit sehr niedrigem Samenansatz selektiert (Tabelle 2.11) und in den folgenden Versuchen analysiert.

Tab. 2.11: Samenansatz der im Vorversuch selektierten Linien und deren neue Linienbezeichnung

Im Vorversuch selektierte Pflanzen	Samenansatz nach Selbstung im Vorversuch [g]	Neue Linienbezeichnung	
		Linie	Abstammung
2-3/3	0,92	2	N
2-3/5	4,00	2	H
6-9/3	1,00	6	N
6-9/5	1,80	6	H
8-1/3	1,10	8	N
8-1/4	3,20	8	H
9-9/5	0,96	9	N
9-9/6	5,10	9	H
10/1/6	0,80	10	N
10/1/4	3,50	10	H
11-9/4	0,50	11	N
11-9/2	8,20	11	H

Selektionsversuch/Gewächshaus

Es wurde eine Nachkommenschaft von zwölf Individuen von den im Vorversuch selektierten Pflanzen angezogen. Sechs dieser Pflanzen blühten bei niedrigen Temperaturen (18/16 °C), die anderen sechs bei hohen Temperaturen für 8 h am Nachmittag (18/25/16 °C) unter 16 h Zusatzlicht. Die Pflanzen sind innerhalb der beiden Temperaturstufen zufällig verteilt worden.

Jede Pflanze wurde vier verschiedenen Behandlungen unterzogen. Jeweils zehn Blüten dieser Pflanzen wurden von Hand geselbstet (Selbstung), fünf Blüten wurden 1 h nach einer Kochsalzbehandlung der Narben geselbstet (NaCl-Behandlung) und drei Blüten wurden mit kompatibelem Pollen der Rapssorte Capitol bestäubt (Narben-Fertilitätskontrolle). Zusätzlich wurde je eine Capitolblüte mit dem Pollen der getesteten

Pflanzen bestäubt (Pollen-Fertilitätskontrolle). Die Selbstungen und Kreuzungen erfolgten nach den in den Abschnitten 2.1.2 und 2.2.2 beschriebenen Verfahren. Die Durchführung der manuellen Salzbehandlung wird im folgenden Kapitel unter 3.2.1 erklärt. Jede Behandlung wurde an einem zufällig ausgewähltem Nebetrieb erster Ordnung durchgeführt. Nach der Behandlung ist jeder Trieb einzeln eingetütet worden. Nach Abreife der Schoten wurde die Samenzahl pro Schote für jede Behandlung bestimmt und mit Ausnahme der Pollenfertilitätskontrolle in einer dreifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unter Nutzung der Prozedur GLM des SAS Softwaresystems verrechnet. Die Korrelation zwischen dem Samenertrag der im Vorversuch selektierten Pflanzen und dem mittleren Samenansatz ihrer Nachkommenschaft im Gewächshaus-Selektionsversuch wurde mit Hilfe der Prozedur CORR bestimmt.

Topcross/Freiland

Die im Gewächshaus untersuchten Linien sind im Jahre 1999 auch im Freiland in einer Isolierung in der Rapssorte Capitol geprüft worden. Dabei wurden zwei räumlich voneinander getrennte Versuche in Herrenhausen und Ruthe angelegt. In Herrenhausen wurden die Linien 11 H und 11 N geprüft, die ein von allen anderen Linien verschiedenes S-Allel trugen. Beide Versuchsfelder lagen in ausreichender Entfernung (mind. 5 km) von anderen Rapsschlägen, so daß eine Fremdeinstäubung ausgeschlossen werden konnte. Die zwölf Linien wurden in dreifacher Wiederholung in zufällig verteilten Parzellen von 6 x 6 Pflanzen geprüft. Die Bestäubersorte Capitol war Ende August 1998 gesät worden. Die zu testenden Pflanzen wurden im September 1998 in frisch umgegrabene 1,5 x 1,5 m²-Parzellen in den Capitolbestand gepflanzt. Der Abstand zwischen den einzelnen Parzellen betrug in Ruthe 10 m und in Herrenhausen 10 bzw. 8 m. Die maximale Tagestemperatur ist während der Blütezeit mit einem Temperaturschreiber im Schatten direkt im Bestand aufgezeichnet worden. Kurz vor der Vollreife im Juni wurden die inneren vier Pflanzen der 6 x 6-Parzellen geerntet. Bei Fehlstellen ist auf benachbarte Pflanzen zurückgegriffen worden. Die geernteten Pflanzen wurden im Gewächshaus getrocknet und das Saatgut schließlich von Hand ausgerieben. Von jeder Parzelle ist eine gut durchmischte Saatgutprobe ausgesät worden. Die Auskreuzungsrate der Topcrosslinien ist in jeder Wiederholung an 44 Pflanzen mit Hilfe

des Isoenzym ACP (Saure Phosphatase) oder eines von der DSV bereitgestellten Mikrosatelliten-Markern bestimmt und in einer einfaktoriellen ANOVA verrechnet worden.

Isoenzymuntersuchung

Die Methoden zur Untersuchung der ACP sind in Kapitel 4 unter Abschnitt 4.2 aufgeführt. Hier wurde jedoch ein ca. 20 mm² großes Blattstückchen direkt in der Mikrotiterplatte mit Hilfe eines Multistempels (Replica Plater, Fa. Sigma) nach Zugabe von 100 µl 5 %-Saccharoselösung homogenisiert und anschließend 2 min bei 2000 upm zentrifugiert.

Untersuchung mit Hilfe eines Mikrosatelliten-Markern

DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte in der Mikrotiterplatte in Anlehnung an eine Schnellmethode von DÖRNTE (persönliche Mitteilung). Ein 20 mm² großes Stück eines Keimblattes der zu untersuchenden Pflanzen wurde in je eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte auf Eis gegeben. Nach dem Zufügen von 50 µl 0,25 M NaOH auf jede Blattprobe wurde die Mikrotiterplatte 100 s in kochendem Wasser erhitzt. Anschließend sind die Blattstückchen mit einem Multistempel (Replica Plater, Fa. Sigma) gründlich homogenisiert worden. Nach Zugabe von 150 µl 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 pro Vertiefung wurde die Mikrotiterplatte kurz zentrifugiert (2 min bei 2000 upm). Dadurch setzte sich das Blattmaterial am Boden der Mikrotiterplatte ab und der Extrakt konnte problemlos entnommen werden. Der in dieser Weise gewonnene Extrakt kann direkt für die PCR verwendet oder bei +4 °C oder -20 °C für mehrere Wochen in der Mikrotiterplatte gelagert werden.

PCR-Reaktion

Die Amplifikation genomischer Sequenzen erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l.

	75	mM	Tris/HCl pH9
	20	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
je	90	μ M	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
	1	U	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (Eurogentec)
	0,8	mM	MgCl ₂
	250	pM	Forward-Primer
	250	pM	Backward-Primer
	25	μ l	DNA-Extrakt

Der PCR-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Fa. Perkin Elmer Cetus unter folgenden Bedingungen:

1 Zyklus	1 min	94°C
45 Zyklen	1 min	94°C
	1 min	60°C
	2 min	72°C
1 Zyklus	7 min	72°C

Elektrophorese und Auswertung

Die PCR-Produkte wurden in einem 2 %igem Agarosegel nach den in 2.4.2 aufgeführten Methoden elektrophoretisch getrennt und ausgewertet.

2.3.3 Ergebnisse

Selektionsversuch/Gewächshaus

Es bestand keine Korrelation ($r = -0,156$) zwischen dem Samenertrag der im Vorversuch selektierten Pflanzen und dem Samenansatz ihrer Nachkommenschaften im nachfolgenden Selektionsversuch. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis hatte die

Abstammung der Linien von Pflanzen mit hohem bzw. niedrigem Samenertrag in den Varianzanalysen der verschiedenen Behandlungen in keinem Fall einen signifikanten Effekt.

Bei der varianzanalytischen Untersuchung zeigte sich jedoch ein hoch signifikanter Effekt der Linie auf den Selbstungssamenansatz (Tabelle 2.12). Die Linien 6 und 10 hatten im Vergleich zu den übrigen Linien einen signifikant erhöhten Samenansatz und waren auch voneinander signifikant verschieden (Abbildung 2.6). Die Temperatur zeigte keine Wirkung auf den Selbstungsansatz.

Tab. 2.12: Mittlere Abweichungsquadrate und F-Werte des Samenertrags nach Selbstung

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Temperatur	1	2,63	0,76
Linie	5	88,47	25,59***
Abstammung innerhalb Linie	6	1,51	0,44
Temperatur*Linie	5	57,82	16,72***
Abstammung*Temperatur innerhalb Linie	6	1,19	0,34
Fehler	111	3,46	

*** signifikant bei $p < 0,001$

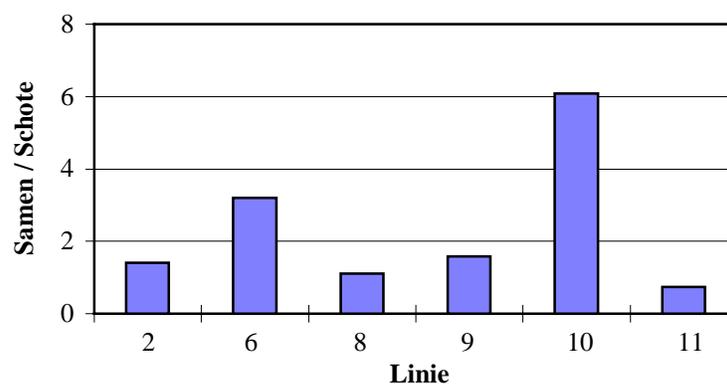


Abb. 2.6: Samenansatz nach Selbstung in Abhängigkeit von der Linie

Bei der Kochsalzbehandlung hatte die Temperaturerhöhung einen signifikanten Effekt: sie führte bei allen Linien, mit Ausnahme der Linie 9 zu einer Erniedrigung des Samenansatzes (Tabelle 2.13 und Abbildung 2.7). Die linke Säule für eine Linie stellt in Abbildung 2.7 den Samenertrag bei niedriger Temperatur und die rechte Säule bei hoher Temperatur am Nachmittag dar. Die verschiedenen Linien waren nach der Salzbehandlung, wie zuvor auch nach Selbstung, signifikant voneinander verschieden (Tabelle 2.13). Die Linie 11 zeigte einen zu allen anderen Linien signifikant niedrigeren Samenertrag von im Mittel 2,43 Samen/Schote (Abbildung 2.7).

Tab. 2.13: Mittlere Abweichungsquadrate und F-Werte des Samenertrags nach NaCl-Behandlung

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Temperatur	1	315,03	10,08**
Linie	5	524,03	16,76***
Abstammung innerhalb Linie	6	19,75	0,63
Temperatur*Linie	5	78,86	2,52*
Abstammung*Temperatur innerhalb Linie	6	49,54	1,58
Fehler	104	31,27	

* signifikant bei $p < 0,05$ ** signifikant bei $p < 0,01$ *** signifikant bei $p < 0,001$

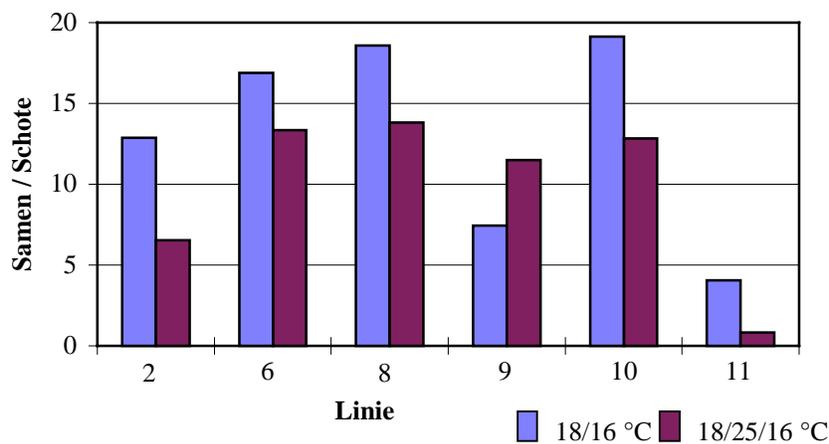


Abb. 2.7: Samenansatz nach NaCl-Behandlung in Abhängigkeit von der Linie und der Temperatur

Die Untersuchung der Narbenfertilität ergab ebenfalls eine signifikante Beeinflussung des Samenertrages durch die Linie (Tabelle 2.14). Die Linie 11 unterschied sich abermals signifikant von allen anderen Linien (Abbildung 2.8). Die übrigen Linien zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse der Pollenfertilitätsuntersuchung, die nicht varianzanalytisch verrechnet wurden, sind zum Vergleich ebenfalls in Abbildung 2.8 als rechte Säule aufgeführt. Sie stimmten sehr gut mit den Werten der Narbenfertilität überein. Die Narben- und Pollenfertilität ist in Abbildung 2.9 getrennt für die Linien 11 N und 11 H dargestellt. Die linke Säule beschreibt die Narbenfertilität, die rechte die Pollenfertilität. Daraus wird ersichtlich, daß die Linie 11 N weniger fertil als 11 H war, wobei besonders die Pollenfertilität betroffen war. Die Linie 11 N zeigte verbräunte Antheren und stäubte gewöhnlich sehr schlecht.

Tab. 2.14: Mittlere Abweichungsquadrate und F-Werte des Samenertrags
in Bezug auf die Narbenfertilität

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Temperatur	1	15,55	0,83
Linie	5	307,34	16,44***
Abstammung innerhalb Linie	6	21,31	1,14
Temperatur*Linie	5	67,63	3,62**
Abstammung*Temperatur innerhalb Linie	6	19,48	1,04
Fehler	113	18,69	

** signifikant bei $p < 0,01$ *** signifikant bei $p < 0,001$

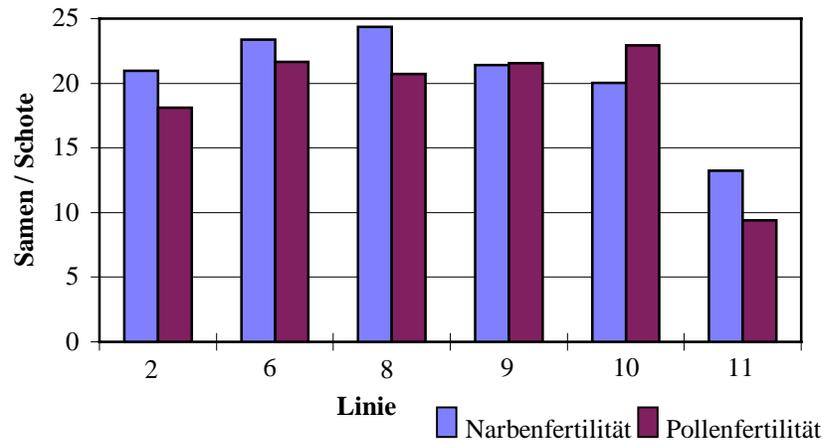


Abb. 2.8: Samenansatz in Abhängigkeit von der Narben- und Pollenfertilität und der Linie

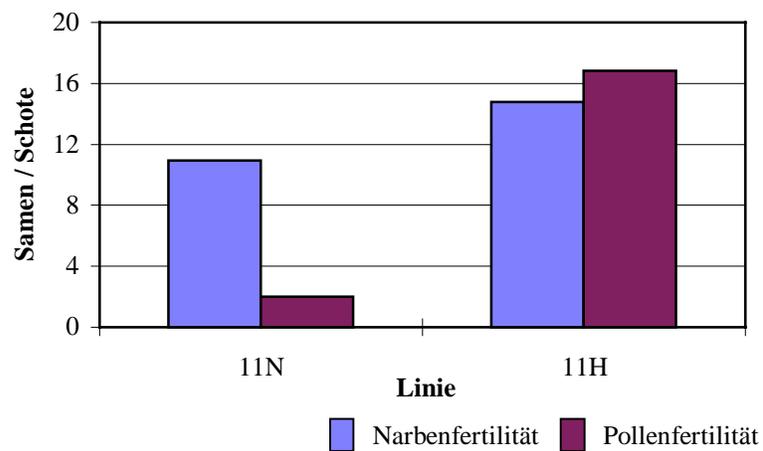


Abb. 2.9: Samenansatz der Linien 11 N und 11 H in Abhängigkeit von der Narben- und Pollenfertilität

Topcross/Freilandversuch

Die Blütezeit der selbstinkompatiblen Pflanzen korrelierte sehr gut mit der Bestäubersorte Capitol. Lediglich die Linie 11 N, die bereits im Keimlingsstadium einen kümmerlichen Wuchs zeigte, begann erst spät zu blühen und blühte noch 14 Tage nachdem Capitol bereits verblüht war. Der Temperaturverlauf zur Blütezeit ist in Abbildung 2.10 dargestellt. Zum Vergleich ist die in der Wetterstation Herrenhausen gemessene maximale Tagestemperatur ebenfalls aufgeführt.

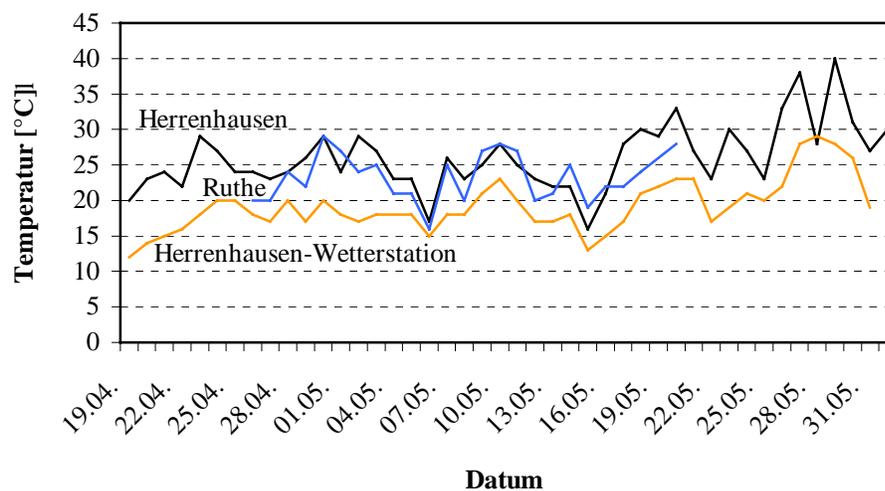
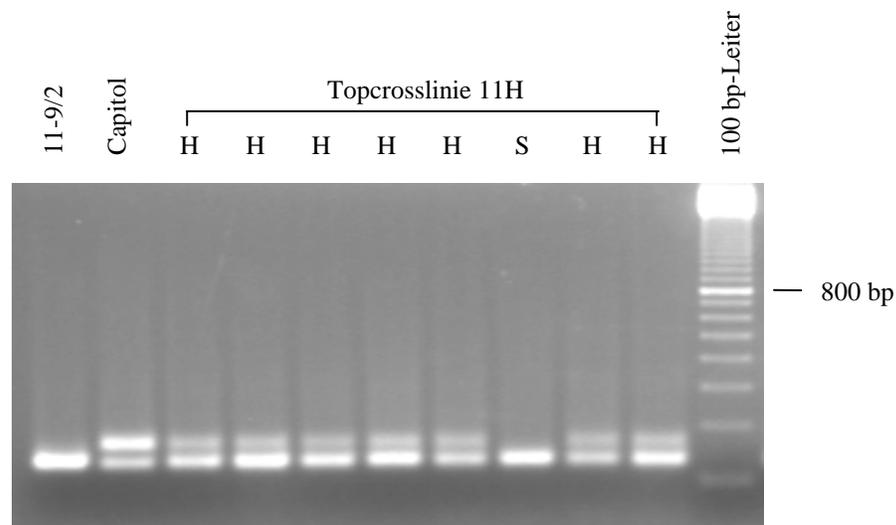


Abb. 2.10: Maximale Tagestemperaturen zur Blütezeit der Topcrosslinien

Die Rapssorte Capitol wurde als Bestäubersorte ausgewählt, da sie nach der Bestimmung des Isoenzym Diaphorase (DIA) in einer Voruntersuchung von allen zu untersuchenden selbstinkompatiblen Linien unterschieden werden konnte. Bei der Bestimmung der Auskreuzungsraten der Topcrosslinien nach der Ernte waren keine Unterschiede zwischen dem Bestäuber und den selbstinkompatiblen Linien im DIA-Bandenmuster mehr zu finden. Deshalb konnte dieser Marker zur Bestimmung der Auskreuzungsrate nicht genutzt werden und die Untersuchungen wurden jeweils zur Hälfte mit der ACP und dem Mikrosatelliten-Marker durchgeführt. Der Bestäuber Capitol zeigte das gleiche ACP-Bandenmuster wie die selbstinkompatiblen Vaterlinien L 1, L 6 und L 7, die bei der Hybridherstellung verwendet worden sind (siehe Abbildung 4.2, S.111). Dem-

entsprechend konnte hier die Auskreuzungsrate der Kreuzungen der Linien 9, 10 und 11 mit Capitol mit Hilfe der ACP bestimmt werden. Die Bandenmuster der Topcrosshybriden entsprachen denen der in Kapitel 4 untersuchten Hybriden (Abbildung 4.2, S. 111). Die Kreuzungsnachkommen konnten zweifelsfrei von den aus Selbstung der selbstinkompatiblen Linien entstandenen Pflanzen, den sogenannten ‚sibs‘, unterschieden werden.

Nach Amplifikation genomischer DNA mit den Mikrosatelliten-Primern zeigte Capitol eine zusätzliche Bande im Vergleich zu allen selbstinkompatiblen Linien. In Abbildung 2.11 ist als Beispiel die Topcrosshybride 11 H mit ihren Eltern aufgeführt. Die Auskreuzungsraten der Kreuzungsnachkommenschaften aus den Linien 2, 6 und 8 wurden mit diesem Marker bestimmt. Außerdem wurden die Auskreuzungsraten dreier zufällig gewählter Topcrosslinien jeweils einer Wiederholung, die mit der ACP bestimmt wurden, mit dem Mikrosatelliten-Marker überprüft. Die beiden Methoden brachten exakt übereinstimmende Ergebnisse.



H: Hybride S: ‚sib‘

Abb. 2.11: Mikrosatelliten-Bandenmuster einer Topcrosslinie und ihrer Eltern

Die mit diesen beiden molekularen Markern erhaltenen, über die Wiederholungen gemittelten Auskreuzungsraten der Topcrosslinien sind in Tabelle 2.15 aufgeführt. Sämtliche Linien zeigten eine sehr hohe Auskreuzungsrate von mehr als 95 %. Lediglich die Linie 11 H hatte, wie sich im Tukey-Test nach der Varianzanalyse zeigte, eine gegenüber der Linie 11 N signifikant niedrigere Auskreuzungsrate.

Tab. 2.15: Linienmittel der Auskreuzungsrate im Topcross

Linie	Auskreuzungsrate [%]	
	Saure Phosphatase	Mikrosatellit
2 N		99,2
2 H		99,2
6 N		98,5
6 H		97,7
8 N		98,5
8 H		99,2
9 N	97,7	
9 H	96,0	
10 N	98,4	
10 H	96,8	
11 N	98,5	
11 H	86,4	

2.3.4 Diskussion

Sowohl im Selektionsversuch im Gewächshaus als auch in der Topcrossanlage hatte die Abstammung der untersuchten Linien von Pflanzen mit hohem bzw. niedrigem Samenansatz keinen Effekt auf den Samenertrag und die Auskreuzungsrate mit Ausnahme der Linie 11 im Topcross. Dort zeigte sich, daß die Linie 11 H, die von einer Pflanze mit hohem Selbstungssamenansatz abstammte, eine im Vergleich zur Linie 11 N signifikant niedrigere Auskreuzungsrate hatte. Die Linie 11 N zeigte starken Kümmerwuchs im Topcross. Diese Linie hatte sich bereits nach der Aussaat langsamer als die anderen Linien entwickelt, konnte diese und den Bestäuber in ihrem Wachstum

nicht mehr einholen und hatte eine verzögerte Blüte. Im Gegensatz dazu entwickelten sich die Pflanzen der Linie 11 N im Gewächshaus im Wuchs normal, zeigten jedoch eine verminderte Pollenfertilität. Bemerkenswert ist letztendlich, daß 11 N in der Topcrossanlage trotz kümmerlichen Wuchses, verzögerter Blüte und geringem Samenansatz eine hohe Auskreuzungsrate von 98,5 % zeigte.

Die Differenz des Samenansatzes der beiden Ausgangspflanzen der Linie 11 war die größte von allen Differenzen der untersuchten Vollgeschwister (Tabelle 2.11, S. 48). Die Pflanze 11-9/2, von der die Linie 11 H abstammte, hatte mit 8,2 g Samen den höchsten Samenansatz von allen im Vorversuch getesteten 186 selbstinkompatiblen Pflanzen. Im Selektionsversuch im Gewächshaus zeigte sie nach Selbstung jedoch einen sehr geringen Samenansatz (Abbildung 2.6, S. 52). Er konnte auch durch die Salzbehandlung, die bei den übrigen Linien einen mittleren Ertrag von 10-15 Samen/Schote bewirkte, kaum erhöht werden (Abbildung 2.7, S. 53). Das läßt auf eine verminderte Fruchtbarkeit dieser Linie schließen, was sich in den Fertilitätskontrollen bestätigte. Beide Abstammungen der Linie 11 zeigten eine verminderte Fertilität sowohl auf der Narben- als auch auf der Pollenseite, wobei die Linie 11 N nahezu sterile Pollen hatte. Dies war bereits optisch sichtbar: die Antheren waren verbräunt und stäubten sehr schlecht oder gar nicht. Aufgrund dieser verminderten Fertilität der Linie 11 sollten die Ergebnisse des Gewächshausversuches geringer bewertet werden als der signifikante Unterschied in der Auskreuzungsrate im Topcross. Die niedrige Auskreuzungsrate der Linie 11 H läßt vermuten, daß sie einen genetischen Hintergrund hat, der die Ausprägung der Selbstinkompatibilität abschwächt. Bei den übrigen Linien wurde kein signifikanter Einfluß der Abstammung gefunden. Die Unterschiede im Samenansatz der Vollgeschwister der übrigen Linien im Vorversuch wurden wahrscheinlich in erster Linie durch Umwelteinflüsse bedingt, da sie in der Nachkommenschaft nicht mehr auftraten.

Bei der Untersuchung im Gewächshaus konnten signifikante Unterschiede im Selbstungssamenansatz zwischen den sechs Linien gefunden werden. Die Linien reagierten auch unterschiedlich auf die NaCl-Behandlung, der Samenansatz wurde jedoch bei allen beträchtlich erhöht. Die Linien 2, 6 und 8 sowie 9 und 10 sind jeweils eng miteinander verwandt. Auch hier hatte demzufolge der genetische Hintergrund einen gewissen Einfluß auf die Ausprägung der Selbstinkompatibilität. Die hohe Fertilität der

SI-Linien bestätigte sich in den Kreuzungen mit Capitol. Die Temperaturerhöhung hatte bei der Mehrzahl der Linien eine Erniedrigung des Samenansatzes zur Folge, lediglich die Linie 9 zeigte einen höheren Samenertrag (Abbildung 2.7, S. 53). In der Literatur werden ebenfalls unterschiedliche Reaktionen auf verschiedene Temperaturen beschrieben. OCKENDON (1978) und OKASAKI und HINATA (1987) berichten von der Abschwächung der Selbstinkompatibilität bei hohen Temperaturen. RICHARDS und THURLING (1973) erwähnen die Selbstinkompatibilität beeinflussende, modifizierende Polygene, welche temperatursensitiv sind und sich möglicherweise in ihren Temperaturansprüchen unterscheiden. Selbstinkompatible Pflanzen können offenbar abhängig von ihrem genetischen Hintergrund eine individuelle Reaktion auf bestimmte Temperaturbedingungen zeigen.

Im Topcross im Freiland war die maximale Tagestemperatur im Pflanzenbestand höher als die in der Wetterstation gemessene Temperatur (Abbildung 2.10, S. 56). Sie betrug zur Blütezeit in Ruthe nie mehr als 30 °C, in Herrenhausen wurden jedoch Ende Mai bis zu 40 °C im Bestand erreicht. Zu dieser Zeit blühte allerdings nur noch die Linie 11 N. Die hohen Auskreuzungsraten zeigen, daß die zeitweise relativ hohe Temperatur das Auftreten von Pseudokompatibilität nicht gefördert hat.

WALLACE (1979b) schlägt zur Selektion stark ausgeprägter Selbst- und ‚sib‘-Inkompatibilität in *Brassica*-Arten zur Nutzung in der Hybridzüchtung neben der Selbstung über mehrere Generationen auch die Knospenselbstung zur Fortführung der Linien sowie reziproke Kreuzungen mit nicht verwandten Pflanzen als Fertilitätstest vor. Diese beiden Eigenschaften sind ebenfalls eine Voraussetzung für die Verwendung in der Züchtung als Selektionskriterium zur Auslese von Genotypen mit stark ausgeprägter Selbstinkompatibilität. In der vorliegenden Arbeit erscheint die Selbstung von zehn Blüten pro Pflanze von Hand in Verbindung mit einer Vermehrung und Fertilitätsprüfung der Pflanze durch Kochsalzbehandlung einiger Blüten als ausreichend. Die Linien, die gut stäubten, zeigten eine hohe Fertilität und sprachen auf die NaCl-Behandlung an. Die schlecht stäubende 11 N zeigte erwartungsgemäß eine geringe Pollenfertilität. Mit der Kochsalzbehandlung ließe sich sowohl die Fertilität der selbstinkompatiblen Pflanzen prüfen, als auch Saatgut für weitere Selektionszyklen und andere Untersuchungen gewinnen. Die Selbstung von Hand ist einer Tütenselbstung vorzuziehen, da sie die

Bestäubung jeder einzelnen getesteten Blüte sichert, die zu untersuchenden Pflanzen folglich alle gleich behandelt und Ernte und Auswertung vereinfacht werden.

Auf die mikroskopische Beurteilung der SI, die bei der Selektion selbstinkompatibler Linien aus Zuchtmaterial genutzt wurde (Abschnitt 2.1), ist in diesen Versuchen verzichtet worden. Zum Auffinden selbstinkompatibler Pflanzen ist sie unerlässlich, um auszuschließen, daß geringer Samenansatz durch eine Fertilitätsstörung bedingt ist. Bei der Auslese auf stark ausgeprägte Selbstinkompatibilität sollte die Bestimmung des Samenansatzes jedoch ausreichend sein.

Die Auskreuzungsrate der Topcrosslinien konnte mit zwei verschiedenen molekularen Markern für alle Linien bestimmt werden. Sowohl die Isoenzym- als auch die Mikrosatelliten-Untersuchung ist einfach und schnell durchführbar, vor allem bedingt durch die direkte Gewinnung des Blatt- bzw. DNA-Extraktes in der Mikrotiterplatte. Mit Hilfe dieser Schnellmethoden können 96 Blattproben in 1-1,5 h verarbeitet werden.

Die Prüfung der Auskreuzungsrate der selbstinkompatiblen Pflanzen mit selbstkompatiblen Bestäubern erbringt zusätzlich wertvolle Informationen über die Ausprägung der Selbstinkompatibilität. Sie ist ausschlaggebend für die Eignung von selbstinkompatiblen Linien in der Hybridproduktion und sollte bei der Prüfung von Testhybriden immer berücksichtigt werden (siehe auch Kapitel 4). Die in dieser Untersuchung gefundenen hohen Auskreuzungsraten wurden wahrscheinlich durch die geringe Parzellengröße der geprüften selbstinkompatiblen Linien begünstigt. Bei ausreichendem Angebot kompatiblen Pollens, können demzufolge auch mit Linien, die rezessiv vererbte Selbstinkompatibilitätsallele tragen, sehr hohe Auskreuzungsraten erzielt werden.

2.4 Entwicklung molekularer Marker für die Selbstinkompatibilität

2.4.1 Einleitung

BATEMAN (1955) untersuchte die Selbstinkompatibilität der *Brassicaceae Iberis amara* und entwickelte daraus folgendes genetisches Modell, welches auf drei Hauptaussagen beruht: die Selbstinkompatibilität wird durch einen einzigen multiallelen Locus, den S-Locus, kontrolliert, der Pollenphänotyp wird sporophytisch durch den diploiden Genotyp der Elternpflanzen bestimmt und zwischen den verschiedenen S-Allelen bestehen kodominante und/oder dominante Interaktionen, die den Phänotyp von Narbe und Pollen bestimmen.

STEIN et al. (1991) haben in molekulargenetischen Analysen gezeigt, daß zwei transkribierte Gene am S-Locus liegen, die zusammen die Selbstinkompatibilität bewirken. Diese beiden Gene verhalten sich wie ein einziger Locus, welcher auch als S-Haplotyp bezeichnet wird (NASRALLAH und NASRALLAH 1993). Eines der beiden Gene ist das S-Locus Glycoprotein- (SLG) Gen. Es kodiert für ein primäres Protein von 431 Aminosäuren, das ein Signalpeptid einschließt und für eine Sequenz von 400 Aminosäuren, die dem sezernierten Glycoprotein entspricht. SLGs wurden durch elektrophoretische Untersuchungen von Narbenproteinen entdeckt (NASRALLAH et al. 1970 und NISHIO und HINATA 1977). NASRALLAH et al. (1985) gelang erstmals die Klonierung einer cDNA, die für ein S-spezifisches Glycoprotein von *B. oleracea* codiert. Die Aminosäuren- und DNA-Sequenzen vieler SLGs sind heute bekannt. Das andere Gen ist das S-Locus-Rezeptorkinase- (SRK) Gen, welches für ein membrangebundenes Protein kodiert (STEIN et al. 1991). Das SRK-Protein besteht aus einer potentiell glycosylierten extrazellulären Domäne, welche große Sequenzhomologien zum SLG aufweist. Diese S-Domäne ist durch eine transmembrane Domäne mit einer cytoplasmatischen Region verbunden, welche Sequenzübereinstimmungen mit Proteinkinasen zeigt und zwar besonders mit einer Serin/Threonin-Kinase. Diese beiden Gene spielen auf der Narbenseite die zentrale Rolle in der Inkompatibilitätsreaktion. NASRALLAH (1997) veranschaulichte deren Wirkungsweise: die SLG-Domäne der membrangebundenen S-Rezeptorkinase und die sezernierten SLGs bilden mit einem

pollenbürtigen Liganden einen Komplex. Diese Komplexbildung führt zur Aktivierung der Kinasedomäne der SRK, worauf eine auf Phosphorylierungsereignissen basierende Signalübermittlung folgt. Diese wirkt möglicherweise auf ein Membranprotein, daß einem wassertransportierendem Aquaporin ähnelt. Selbstinkompatible *B. campestris*-Pflanzen, in denen die Bildung dieses Tunnelproteins gestört war, zeigten eine Hydratation des eigenen Pollens (IKEDA et al. 1997). GU et al. (1998) fanden ein Narbenprotein (ARC1), das in vitro mit der Kinasedomäne der SRK reagierte und phosphoryliert wurde. STONE et al. (1999) zeigten, daß bei gestörter Expression dieses Proteins die Selbstinkompatibilität in *Brassica napus* teilweise zusammenbrach. Sie vermuteten, daß das ARC1-Protein eine Komponente der Signaltransduktionskette ist, die der SRK nachgeschaltet ist. Lange Zeit war der männliche, die Selbstinkompatibilität bestimmende Faktor unbekannt. Pollenhüllenproteine (PCPs) (STEPHENSON et al. 1997 und DOUGHTY et al. 1998) und die S-Locus gekoppelten antherenspezifischen Gene SLL₁ und SLL₂ (YU et al. 1996) wurden mit der SI-Erkennungsreaktion in Verbindung gebracht. Ihnen wurden jedoch eher allgemeine Funktionen bei der Kompatibilitätsreaktion zugeordnet. WATANABE et al. (1999) beschreiben ein mit dem S₉-Locus gekoppeltes Gen, welches nur in den Antheren expremiert wird, das 'S locus Anther Expressed 1'- (SAE1) Gen. Sie vermuten, daß es eine wichtige Rolle in der SI-Erkennungsreaktion auf der Pollenseite spielt. Dem 'S locus anther'- (SLA) Gen konnte die Bestimmung der S-Spezifität im Pollen von *B. oleracea*-Pflanzen nur in S₂-Haplotypen zugeschrieben werden (BOYES und NASRALLAH, 1995). SCHOPFER et al. (1999) fanden ein Gen im S₈-Haplotyp von *Brassica campestris*, welches die Anforderungen an den männlichen Liganden erfüllt. Das 'S locus cystein-rich'- (SCR) Gen ist mit dem S-Locus gekoppelt, ist hoch polymorph und wird antherenspezifisch expremiert. In Transformationsexperimenten wurde mit dem SCR-Gen auch die S-Spezifität des Pollens übertragen. TAKAYAMA et al. (2000) detektierten ein identisches Gen in S₈-, S₁₂- und S₅₂-Haplotypen, welches in der flankierenden Region der SRK lokalisiert ist, in den Tapetumzellen der Antheren expremiert wird und S-Allel-Spezifität zeigt; sie nannten das Gen 'S locus protein 11' (SP11). Insgesamt ist aber festzustellen, daß auf der Pollenseite der Inkompatibilitätsreaktion die vorliegenden Informationen

noch bestätigt bzw. erweitert werden müssen, um ein eindeutiges Bild der molekularbiologisch ablaufenden Reaktionen zu erhalten.

Die *Brassica*-S-Locus-Gene werden ausschließlich in reproduzierendem Gewebe expremiert. Gene der S-Locus-Familie, die nicht mit dem S-Locus gekoppelt sind, werden als „S-Locus-Related“- (SLR) Gene beschrieben. SLR1 und SLR2 gehören zum Glycoprotein-sezernierenden Typ und sind im Reproduktionsgewebe aktiv (LALONDE et al. 1989 und BOYES et al. 1991). Da die SLR-Gene nicht mit dem S-Locus gekoppelt sind, nehmen LALONDE et al. (1989) an, daß sie eine allgemeine Funktion bei der Befruchtung haben.

Das Selbstinkompatibilitätssystem der *Brassicaceae* ist gut charakterisiert, es sind viele Nukleotidsequenzen von SLG- und SRK-Genen verschiedener S-Allele bekannt (TRICK und FLAVELL 1989, CHEN und NASRALLAH 1990, DWYER et al. 1991, GORING und ROTHSTEIN 1992 und YAMAKAWA et al. 1994). Um verschiedene S-Allele in *B. oleracea* und *B. campestris* molekulargenetisch voneinander zu unterscheiden, nutzten BRACE et al. (1993 und 1994) und NISHIO et al. (1996 und 1997) erfolgreich eine PCR-RFLP-Methode, mit der Polymorphismen aufgedeckt werden können. Sie amplifizierten genomische DNA mit Hilfe von Primern, die von S-Locus-Sequenzen abgeleitet waren und verdauten die PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen. Diese Markerklasse wird heute als ‚Cleaved Amplified Polymorphic Sequences‘ (CAPS) bezeichnet und wurde in den im folgenden beschriebenen Untersuchungen zur Charakterisierung der Selbstinkompatibilität genutzt.

Mit Hilfe molekularer Marker, die eng mit der SI gekoppelt sind, lassen sich selbstinkompatible Genotypen bereits im Keimlingsstadium aus Zuchtmaterial selektieren. Rückkreuzungsprogramme können dadurch sehr viel ökonomischer durchgeführt werden. Weiterhin ist anzustreben, verschiedene selbstinkompatible Linien auf molekularem Niveau mit Markern unterscheiden zu können.

2.4.2 Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Untersuchung einer spaltenden Population

Zur Entwicklung eines mit der Selbstinkompatibilität gekoppelten CAPS-Markers wurde auf eine bestehende, bereits von ESCH (1994) charakterisierte F₂-Population (P 2) zurückgegriffen. Es sind 91 Individuen dieser F₂-Population untersucht worden, die aus der Kreuzung der selbstinkompatiblen Linie 3875/3/3 mit der selbstkompatiblen Sorte Lirajet entstanden ist. Die Linie 3875/3/3 ist mit den Linien 1-9, 2-3, 4-4, 6-9, 7-8 und 8-1 eng verwandt und trägt das gleiche S-Allel. Der Genotyp von sechs F₂-Pflanzen wurde durch die Untersuchung ihrer Selbstungsnachkommenschaft überprüft. Vier bis vierzehn Pflanzen pro F₃-Generation (je nach verfügbarer Saatgutmenge) wurden im Gewächshaus bei 18/20 °C und 16 h Zusatzlicht angezogen. Ihr Selbstinkompatibilitätsverhalten ist nach der in 2.1 beschriebenen Methode durch die Bestimmung des mittleren Selbstungssamenansatzes von 10 Schoten pro Pflanze getestet worden. Außerdem wurden sie molekulargenetisch mit dem CAPS-Marker charakterisiert.

Untersuchung verschiedener selbstinkompatibler Linien

Die in 2.1 und 2.2 beschriebenen Linien 8-1, 11-9, Myb, 391, 224, 236 und 2065 sind mit Hilfe von CAPS-Markern untersucht worden, um sie auf molekularem Niveau unterscheiden zu können. Zum Vergleich wurde die selbstkompatible Sorte Lisabeth mitgeführt. Zunächst ist eine Pflanze pro Linie getestet worden. Sind Polymorphismen gefunden worden, so wurden diese in zehn weiteren Pflanzen einer Linie überprüft.

DNA-Isolierung

Zur Untersuchung der spaltenden Population P 2 lagen DNA-Proben vor, die bereits von ESCH (1994) isoliert wurden und bei -20 °C aufbewahrt worden sind. Von einigen Pflanzen der P 2-Population (deren Blattmaterial bei -80 °C aufbewahrt wurde) mußte

nachträglich DNA isoliert werden. Diese DNA-Isolierung, sowie auch die DNA-Gewinnung aus den F₃-Pflanzen und den selbstinkompatiblen Linien 8-1, 11-9, Myb, 391, 224, 236 und 2065 erfolgte nach der Methode von EDWARDS et al. (1991). Ein Blattstück wurde mit dem Deckel eines sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßes ausgestanzt und im selben Gefäß gemörsert. Nachdem 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) zugefügt worden sind, wurde dieser mit dem Blattmaterial gut vermischt und die Probe 2 min bei 15000 upm zentrifugiert. 300 µl des Überstandes sind mit dem gleichen Volumen Isopropanol gemischt und nach 2 minütiger Fällung bei Raumtemperatur für 5 min bei 15000 upm zentrifugiert worden. Das DNA-Pellet wurde im Heizblock bei 40 bis 50 °C getrocknet und schließlich in 100 µl 1x TE-Puffer resuspendiert. Diese DNA-Lösung kann bei +4 oder -20 °C gelagert werden.

PCR-Reaktion und Restriktionsverdau

Die Amplifikation genomischer Sequenzen erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem Reaktionsvolumen von 25 µl unter Nutzung S-Locus-spezifischer Primer nach NISHIO *et al.* 1996:

75	mM	Tris/HCl pH 9
20	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
je 200	µM	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
0,5	U	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (Eurogentec)
2	mM	MgCl ₂
2	µM	pro Primer
ca. 50	ng	genomische DNA

Der PCR-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Fa. Perkin Elmer Cetus unter folgenden Bedingungen:

30 Zyklen	1 min	93°C
	2 min	* °C
	3 min	72°C
1 Zyklus	5 min	72°C

* Die Annealingtemperatur wurde primerspezifisch gewählt, in Anlehnung an die Formel 2.2 verändert nach IBELGAUBTS (1990) zur Berechnung der Schmelztemperatur T_m für Primer mit mehr als 10 Basen.

$$T_m = 62,5 + 34 [\% \text{ GC-Gehalt}] - [395/\text{Basengesamtzahl}] \quad (2.2)$$

verändert nach IBELGAUBTS (1990)

In der PCR wurden 15 unterschiedliche Primer von BRACE et al. (1993), NISHIO et al. (1996 und 1997) und NIKURA und MATSUURA (1998) genutzt. Diese Primer zeigen Homologien zu SLG-, SRK- oder SLR-Sequenzen. Herkunft und Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2.16 aufgeführt. Die Annealingtemperatur der genutzten Primerpaare und die in der Literatur angegebene Größe des von ihnen amplifizierten PCR-Produktes sind der Tabelle 2.17 zu entnehmen.

Der Restriktionsverdau der PCR-Produkte erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen *MspI*, *MseI*, *DdeI*, *BamHI*, *HinfI*, *HindIII* (Gibco BRL), *MboI*, *SalI*, *StyI* und *XhoI* (MBI Fermentas). 5 μ l der PCR-Produkte wurden mit 1 U Restriktionsendonuklease im entsprechenden Reaktionspuffer (Reaktionsvolumen = 10 μ l) ca. 2 h lang bei 37 °C verdaut.

Elektrophorese und Auswertung

5-10 μ l der DNA-Extrakte, PCR-Produkte und restringierten PCR-Produkte wurden mit 2 μ l Ladepuffer (50 % Glycerin, 0,4 % Bromphenolblau, 1 mM EDTA pH 8,0) versetzt und in einem Agarosegel (Life Technologies) elektrophoretisch bei 5 V/cm aufgetrennt. DNA-Extrakte und PCR-Produkte wurden in einem 0,8 %igem und restringierte PCR-Produkte in einem 2 %igem Agarosegel in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA pH 8,0) aufgetrennt. Zur DNA-Konzentrationsbestimmung diente λ Phagen-DNA und als Größenmarker eine 100 bp-Leiter (Fa. Pharmacia). Durch Zugabe von 0,1 μ g

Ethidiumbromid pro ml Agarosegel-Lösung wurde die DNA angefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

Tab. 2.16: Herkunft und Sequenz der S-Locus-spezifischen Primer

Primer	Herkunft	Sequenz (5' → 3')
a	BRACE et al. 1993, <i>B. oleracea</i>	AGAACACTTGTATCTCCCGGT
b	BRACE et al. 1993, <i>B. oleracea</i>	CAATCTGACATAAAGATCTTG
d	BRACE et al. 1993, <i>B. oleracea</i>	AAGGTCAGCAG(G/C)AGCCAATC
e	BRACE et al. 1993, <i>B. oleracea</i>	CAGCATCTACTCGAGATTGAC
f	BRACE et al. 1993, <i>B. oleracea</i>	AAA(A/C/G)CCATCTCCACTGCAGCT
PS3	NISHIO et al. 1996, <i>B. campestris</i>	ATGAAAGGGGTACAGAACAT
PS5	NISHIO et al. 1996, <i>B. campestris</i>	ATGAAAGGCGTAAGAAAAACCTA
PS15	NISHIO et al. 1996, <i>B. campestris</i>	CCGTGTTTTATTTTAAGAGAAAGAGCT
PS18	NISHIO et al. 1996, <i>B. campestris</i>	ATGAAAGGTGTACGAAACATCTA
PS21	NISHIO et al. 1996, <i>B. campestris</i>	CTCAAGTCCCCTGCTGCGG
PK1	NISHIO et al. 1997, <i>B. oleracea</i>	CTGCTGATCATGTTCTGCCTCTGG
PK4	NISHIO et al. 1997, <i>B. oleracea</i>	CAATCCCAAATCCGAGATCT
PK5	NISHIO et al. 1997, <i>B. oleracea</i>	AGACAAAAGCAAGCAAAAGCA
NM1	NIKURA und MATSUURA 1998, <i>R. sativus</i>	ACAGAACACTTGTATCTCCAGG
NM2	NIKURA und MATSUURA 1998, <i>R. sativus</i>	AGCCAATCTGACATAAAGATC

Tab. 2.17: Annealingtemperatur und PCR-Produktgröße der Primerpaare

Primerpaar	Annealing-temp. [°C]	PCR-Produktgröße [bp]
a + b	58	1150
a + d	60	1150
e + f	60	280
PS3 + PS21	55	1000
PS5 + PS15	55	1300
PS15 + PS18	55	1300
PK1 + PK4	58	900-1000
PK5 + PK4	55	900-1000
NM1 + NM2	58	1160

2.4.3 Ergebnisse

Untersuchung einer spaltenden Population

Zur Charakterisierung der F₂-Population P 2 wurden zunächst jeweils ein mütterlicher, ein väterlicher und ein F₁-Genotyp untersucht. In diesem Material konnten mit allen neun Primerpaaren genomische Sequenzen amplifiziert werden. Die Reaktionen mit den Primerpaaren PS3 + PS21 und PK5 + PK4 waren sehr unspezifisch, es wurden mehrere PCR-Fragmente unterschiedlicher Größe gebildet. Die Reaktionen mit den übrigen Primerpaaren waren dagegen spezifischer. Unter Verwendung von a + b und a + d wurde jeweils ein einzelnes PCR-Fragment amplifiziert, diese Reaktionen waren jedoch nicht immer reproduzierbar. Oftmals wurden zwei zusätzliche Fragmente in geringer Menge gebildet. Die Primerpaare PS5 + PS15 und NM1 + NM2 zeigten neben einem PCR-Fragment immer auch einen gewissen unspezifischen Hintergrund. Bei der Nutzung des Primerpaares PK1 + PK4 wurde nur bei den selbstkompatiblen Genotypen ein PCR-Produkt gebildet, es traten teilweise auch hier unspezifische Reaktionen auf. Alle diese mehr oder weniger unspezifischen PCR-Reaktionen konnten auch nach Variation der PCR-Bedingungen nicht verbessert werden. Bei spezifischer Reaktion entsprachen die PCR-Fragmente in ihrer Größe den in der Literatur berichteten Werten (Tabelle 2.17). Lediglich die Fragmente, die mit den Primerpaaren PS5 + PS15 und PS15 + PS18 amplifiziert worden sind, bilden eine Ausnahme. Im Gegensatz zu den erwarteten 1300 bp-Produkten wurde mit PS5 + PS15 ein 1000 bp- und mit PS15 + PS18 ein 370 bp-Fragment gebildet. Allein unter Verwendung des Primerpaares e + f wurde eine spezifische und zuverlässig reproduzierbare Amplifikation eines 280 bp großen Fragmentes erzielt. Nach Restriktion des e + f-PCR-Produktes mit den Enzymen *Mbo*I, *Dde*I, *Sal*I und *Xho*I wurden Polymorphismen zwischen den verschiedenen Genotypen der spaltenden Population entdeckt. Nach der Restriktion mit *Mbo*I konnten alle drei Genotypen voneinander unterschieden werden. Die Restriktion mit *Dde*I, *Sal*I und *Xho*I ließ die Differenzierung der selbstinkompatiblen von den selbstkompatiblen Genotypen zu. Die gesamte F₂-Population wurde unter Nutzung des Primerpaares e + f in Verbindung mit der Restriktion durch *Mbo*I und *Dde*I untersucht (Abbildungen 2.14 und 2.15). Im Falle von *Mbo* I wurde das gesamte Experiment wiederholt.

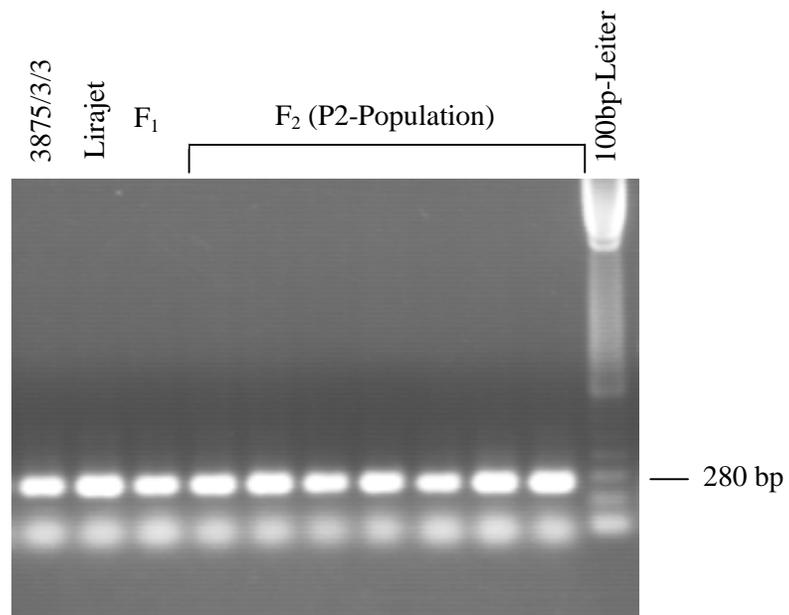


Abb. 2.14: PCR-Produkte nach Amplifikation mit dem Primerpaar e + f

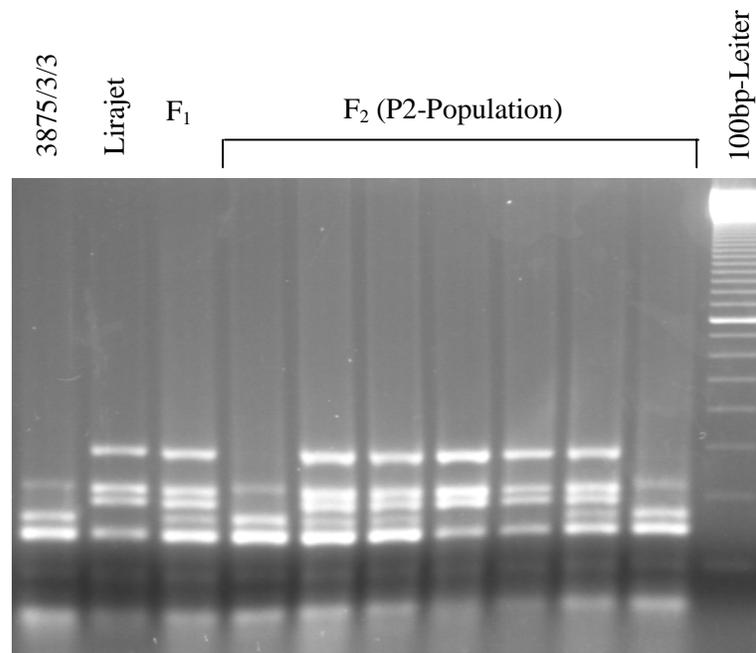


Abb. 2.15: *Mbo*I-restringierte PCR-Produkte nach Amplifikation mit dem Primerpaar e + f

Zunächst wurden sechs rekombinante Genotypen gefunden. Dies war in Anbetracht der Nutzung von S-Locus-spezifischen Primern nicht zu erwarten. Aus diesem Grunde wurde die Inkompatibilitätsreaktion der F₃-Nachkommen dieser sechs Genotypen untersucht, um die Ergebnisse zu überprüfen. Diese Untersuchung ergab für vier zuvor als selbstkompatibel eingestufte Pflanzen, daß sie selbstinkompatibel waren. In ihren F₃-Nachkommenschaften mit einem Umfang von 6-14 Pflanzen trat kein einziger selbstkompatibler Phänotyp auf. Dieses Ergebnis wurde hinsichtlich des Genotypes durch die Markeruntersuchung der F₃-Pflanzen bestätigt. Alle Pflanzen der vier Nachkommenschaften zeigten das für selbstinkompatible Pflanzen spezifische Bandenmuster. Die beiden anderen F₂-Pflanzen waren ursprünglich als selbstinkompatibel bonitiert worden. Deren F₃-Nachkommenschaften zeigten jedoch eine Aufspaltung in selbstinkompatible und selbstkompatible Phänotypen. Die Markeruntersuchung der F₃-Pflanzen bestätigte die Aufspaltung. Diese beiden F₂-Ausgangsgenotypen müssen demnach heterozygot am S-Locus gewesen sein und einen selbstkompatiblen Phänotyp gehabt haben. Die Selbstinkompatibilitätsphänotypen der Population P2 wurden entsprechend dieser Ergebnisse berichtigt. Es traten demnach keine Rekombinanten in dieser Population auf: die beiden CAPS-Marker *efMboI* und *efDdeI* sind absolut mit dem Selbstinkompatibilitätslocus gekoppelt. Während mit dem dominant/rezessiven Marker *efDdeI* die homozygot selbstinkompatible Genotypen von den übrigen unterschieden werden können, sind mit dem kodominanten Marker *efMboI* alle drei Genotypenklassen voneinander zu differenzieren.

Untersuchung verschiedener selbstinkompatibler Linien

Mit dem Primerpaar e + f konnte in den sieben untersuchten selbstinkompatiblen Linien sowie der selbstkompatiblen Vergleichslinie ein 280 bp-Fragment amplifiziert werden. Nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym *MboI* ergaben sich unterschiedliche Bandenmuster (Abbildung 2.16). Die Linien 8-1, 391, Myb, 224 und 236 zeigten drei Fragmente gleicher Größe in unterschiedlicher Intensität. Während sich die Muster von 8-1, 391 und 224 sehr ähneln, ist bei den Linien Myb und 236 das größte Fragment intensiver ausgebildet. Die Linie 11-9 ist deutlich von allen anderen Linien zu unterscheiden, sie zeigte auch nach dem Verdau nur ein einziges Fragment. Die Linie

2065 entsprach in ihrem Bandenmuster genau dem der selbstkompatiblen Linie. Diese in jeweils einem Genotyp pro Linie gefundenen Bandenmuster konnten von HORSTMANN (2000) für die Linien 8-1, 11-9, Myb, 391 und 2065 in zehn weiteren Genotypen bestätigt werden. Für die Linien 224 und 236 erfolgte eine Bestätigung lediglich in zwei bis drei weiteren Genotypen. In den hier behandelten sieben Linien konnte HORSTMANN (2000) auch mit den Primerpaaren a + b, PS5 + PS15 und PS15 + PS18 genomische DNA spezifisch amplifizieren. Nach der Restriktion mit unterschiedlichen Enzymen konnte sie zuvor erzielte Ergebnisse bestätigen, fand jedoch keine zusätzlichen Unterscheidungsmöglichkeiten.

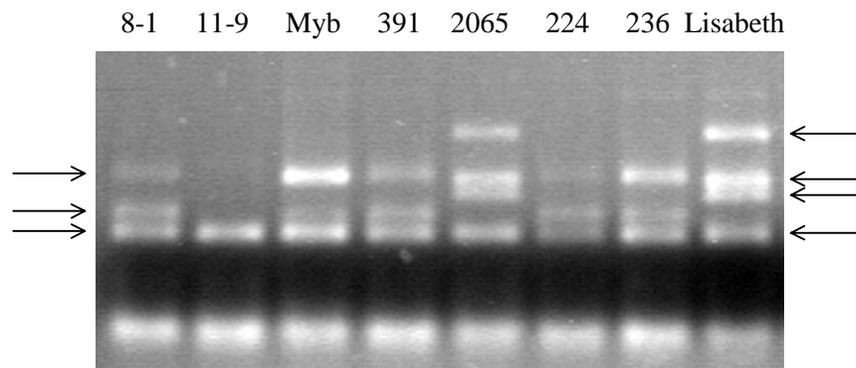


Abb. 2.16: *Mbo*I-restringiertes PCR-Produkt nach Amplifikation mit dem Primerpaar e + f

2.4.4 Diskussion

Untersuchung einer spaltenden Population

In den Untersuchungen wurde gezeigt, daß es möglich ist, genomische Sequenzen in *Brassica napus* unter Nutzung von S-Locus-spezifischen Primern, die aus den Ausgangsarten von Raps entwickelt wurden, zu amplifizieren. Es traten jedoch unspezifische Reaktionen auf. BRACE et al. (1993) leiteten ihre Primer aus Sequenzvergleichen zwischen veröffentlichten Daten von SLG-, SLR1- und SLR2-Genen ab. Die

Primer a und b wurden aus hochkonservierten Regionen der SLG-, SLR1- und SLR2-Gene abgeleitet, der Primer d dagegen stammt aus einer konservierten SLG-Region, zeigte jedoch einen hohen Grad an Fehlpaarung zu SLR1-Sequenzen. BRACE *et al.* (1993) gelang es mit den Primerpaaren a + b und a + d ein einzelnes PCR-Fragment in *B. oleracea* zu produzieren. Die Ursache für die hier mit diesen Primern oftmals amplifizierte drei Fragmente könnte durch die Affinität der Primer a, b und d zu SLG- und SLR-Sequenzen bedingt sein. Die Primer e und f zeigen Homologien zu verschiedenen Regionen von SLG- und SLR-Genen (BRACE *et al.* 1993). Dieses Primerpaar zeigte in den vorliegenden Untersuchungen eine hohe Spezifität. Die Primer PS5 und PS18 stammen aus *B. campestris*, PS15 stammt aus *B. oleracea*. Sie wurden als SLG-spezifisch bezeichnet (PS5 → SLG₈, PS18 → SLG₉, PS15 → SLG₆), wobei es sich um Klasse I-SLGs handelt (NISHIO *et al.* 1996). Mit ihnen konnten jedoch auch S-Locus-Sequenzen von den hier untersuchten Pflanzen, die ein rezessives, folglich Klasse II-S-Allel tragen, amplifiziert werden. Die erhaltenen Fragmente wichen allerdings von der erwarteten Größe der PCR-Produkte ab. Die Primer PS3 und PS21 haben eine zu Klasse II-SLG_{2a} (*B. oleracea*) homologe Nukleotidsequenz. Mit ihnen konnte hier nur eine sehr unspezifische Reaktion erreicht werden. NISHIO *et al.* (1997) fanden mit den SRK-spezifischen Primern PK1, PK4 (SRK₆) und PK5 (SRK₂) nur bei S-Haplotypen der Klasse I eine Amplifikation, nicht aber bei Klasse II-Haplotypen. Auch in den vorliegenden Untersuchungen zeigten die selbstinkompatiblen Pflanzen, deren S-Allel der Klasse II angehört, keine Amplifikation mit dem Primerpaar PK1 + PK4. Die Primer lagerten sich nur an Sequenzen der dominant selbstinkompatiblen Linie 2065 und der selbstkompatiblen Pflanzen an. Mit den Primern NM1 und NM2, die aus hochkonservierten Regionen der SLG₆, SLG₁₃ und SLG₁₄-Gene in *B. oleracea* abgeleitet wurden, konnte hier ebenfalls genomische DNA amplifiziert werden. Diese Primer wurden erfolgreich zur Unterscheidung von S-Allelen in *Raphanus sativus* genutzt (NIIKURA und MATSUURA 1998). Darin läßt sich besonders gut erkennen, daß hochkonservierte S-Locus-Sequenzen in der Familie der *Brassicaceae* weit verbreitet sind. Die hier genutzten Primer stammen hauptsächlich aus *B. oleracea*, lediglich PS5 und PS18 stammen aus *B. campestris*. Alle Primer konnten erfolgreich zur Amplifikation von S-Locus-Sequenzen in selbstinkompatiblen, aus Zuchtmaterial selektiertem *B. napus*

sowie auch der selbstkompatiblen Rapssorte ‚Lirajet‘ genutzt werden. Es ist nicht bekannt, ob dieses Rapsmaterial S-Sequenzen von beiden oder nur von einer Ausgangsart trägt. Es ist jedoch durchaus wahrscheinlich, daß Primer, die aus konservierten Regionen am S-Locus der *Brassicaceae* abgeleitet worden sind, in *Brassica*-Arten generell die Amplifikation genomischer DNA ermöglichen. So fanden DWYER et al. (1991) und KUSABA et al. (1997), daß S-Allele aus den beiden verschiedenen Arten *B. oleracea* und *B. campestris* eine höhere Sequenzübereinstimmung aufweisen als innerhalb einer Art. Dies läßt CHARLESWORTH und AWADALLA (1998) vermuten, daß der S-Locus-Polymorphismus bereits vor der Artenaufteilung der Brassicaceen bestand. Es handelt sich demnach bei dem Selbstinkompatibilitätssystem um einen sehr alten phylogenetischen Mechanismus. Neue S-Allele haben zunächst einen starken Selektionsvorteil und bleiben schließlich für lange Zeit in einer Population erhalten (WRIGHT 1939).

In unseren Untersuchungen gelang es, zwei mit der Selbstinkompatibilität absolut gekoppelte CAPS-Marker zu etablieren. Die Überprüfung der F₃-Nachkommenschaften von F₂-Pflanzen mit fraglichem Phänotyp machte die eindeutige Charakterisierung der P 2-Population möglich. Der von ESCH (1994) gefundene RFLP-Marker mit einem Austauschwert von 9,9 % zeigte in der hier phänotypisch korrigierten P 2-Population nun ebenfalls eine absolute Kopplung. Sie führte die Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde aus dem SLG-Gen des dominanten S₂₉-Allels durch. Ihr gelang es mit einem RFLP und einem RAPD eine Markerklammer um den *B. napus*-S-Locus zu bilden. CAMARGO et al. (1997) erstellten eine Kopplungskarte in Kohl mit Hilfe von RFLP- und RAPD-Markern. Sie konnten den S-Locus ebenfalls mit einem absolut gekoppelten RFLP lokalisieren. MARSHALL et al. (1994) entdeckten gekoppelte RAPD-Marker für zwei verschiedene S-Allele in *Brassica napus*. NOKAZAKI et al. (1997) fanden in Rübsen einen RAPD-Marker, der mit dem S-Locus mit einem Austauschwert von 20,2 % gekoppelt ist. Durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) konnten IWANO et al. 1998 die Region des Selbstinkompatibilitätsgens in *B. campestris* und KAMISUGI et al. (1998) den S-Locus in *B. napus* mikroskopisch sichtbar machen.

Untersuchung verschiedener selbstinkompatibler Linien

Die sieben selbstinkompatiblen Linien tragen nach den Ergebnissen in Abschnitt 2.2.3 vier verschiedene S-Allele. Die Linie 2065 trägt ein aus *B. campestris* stammendes dominantes S-Allel und zeigte nach Untersuchung mit dem Marker *efMboI* ein von allen anderen Linien abweichendes Bandenmuster. Dieses entsprach dem der selbstkompatiblen Rapssorte ‚Lisabeth‘. Dieser Marker könnte dementsprechend nicht zur Selektion selbstinkompatibler Genotypen aus Kreuzungsnachkommenschaften der Linie 2065 mit selbstkompatiblen Rapssorten oder zur Bestimmung von Auskreuzungsraten in Hybriden genutzt werden. Die Linie 11-9 zeigte nach der Restriktion ein einzelnes Fragment und konnte von den übrigen Linien klar unterschieden werden. Die Aussage in 2.2.3, daß diese Linie ein anderes S-Allel trägt, wird durch dieses Ergebnis bestätigt. Die Linien 8-1, 391 und 224 tragen nach den Resultaten aus den diallelen Kreuzungen dasselbe S-Allel. Dies bestätigt sich in den vorliegenden Markeruntersuchungen. Diese Linien zeigten gleiche Bandenmuster nach der Restriktion. Die Linie Myb trägt den Ergebnissen in 2.2.3 zufolge das gleiche S-Allel wie die drei Linien 8-1, 391 und 224. Sie zeigte hier auch die gleiche Anzahl von Banden, jedoch eine abweichende Bandenintensität. Die Linie 236 reagierte ähnlich wie Myb. Sie trägt nach den diallelen Kreuzungen zu schließen ein anderes S-Allel. Bei den beiden Linien Myb und 236 könnten weitere molekulargenetische Untersuchungen genauere Ergebnisse bringen. So könnten bereits erprobte Primer/Enzym-Kombinationen optimiert und zusätzliche getestet werden. Ein weitere Möglichkeit wäre, die Sequenzierung der bei diesen Linien erhaltenen PCR-Produkte, um zusätzliche SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) zu detektieren. Liegen diese nicht an einer Schnittstelle für Restriktionsenzyme, kann mittels fehlpaarender Primer eine Schnittstelle, die den SNP beinhaltet, in das PCR-Produkt eingeführt werden. Diese sogenannten dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) wurden von NEFF et al. (1998) und MICHAELS und AMASINO (1999) beschrieben.

In den vorliegenden Untersuchungen war es möglich drei von vier S-Allelen zu unterscheiden, bzw. fünf von sieben selbstinkompatiblen Linien zu charakterisieren. BRACE et al. (1994) konnten 48 selbstinkompatible Kohllinien einer S-Allel-Referenzsammlung mit dem Primerpaar a + b in Kombination mit fünf verschiedenen

Restriktionsendonukleasen hinsichtlich der S-Allele unterscheiden. Der Nachteil des Primerpaares a + b ist, daß dessen PCR-Produkt neben SLG-Sequenzen auch SLR-Sequenzen repräsentieren kann. Die SLR-Gene sind jedoch nicht mit dem S-Locus gekoppelt, so daß gefundene Unterschiede nicht unbedingt auf S-Locus-Sequenzen basieren müssen. NISHIO *et al.* (1997) konnten mit zwei SRK-spezifischen Primerpaaren in Verbindung mit vier Restriktionsenzymen (teilweise im Doppelverdau) 30 von 42 S-Haplotypen (*B. oleracea*-S-Testerlinien) unterscheiden. Sie schlagen vor, SLG- (NISHIO *et al.* 1996) und SRK-spezifische Primer zu nutzen, um so viele verschiedene S-Allele wie möglich charakterisieren zu können. Die so gewonnenen Daten könnten weltweit Wissenschaftlern und Züchtern zur Typisierung von S-Allelen in *Brassica*-Arten dienen.

2.5 Zusammenfassung

Die Ausgangsarten von Raps, Kohl und Rüben besitzen ein Selbstinkompatibilitätssystem, Raps dagegen reagiert selbstkompatibel. Es traten jedoch auch in Rapspopulationen selbstinkompatible Genotypen auf. In den vorliegenden Untersuchungen gelang es, in zwei Jahren insgesamt drei selbstinkompatible Linien in Zuchtmaterial auszulesen, das entsprach einer Häufigkeit von ca. 0,03 %. Bei zwei dieser selbstinkompatiblen Linien wurde eine rezessive Vererbung zur Selbstkompatibilität festgestellt. Das Selbstinkompatibilitätsverhalten ist anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen und der Bestimmung des Samenansatzes charakterisiert worden. Die durch Selektion aus aktuellem Zuchtmaterial gewonnenen selbstinkompatiblen Linien zeichnen sich durch hohe Leistung und Qualität aus, ein entscheidender Vorteil gegenüber der Einlagerung von S-Allelen in Rapspflanzen aus den Ausgangsarten durch Rückkreuzungen oder Resynthese.

Die selektierten selbstinkompatiblen Linien sind mit bereits vorhandenen selbstinkompatiblen Linien diallel gekreuzt worden. Es wurde festgestellt, daß die sieben verschiedenen Linien vier unterschiedliche S-Allele tragen. In weiterführenden Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den selbstinkompatiblen Linien wurde

der modifizierende Einfluß genetischer Faktoren auf die Selbstinkompatibilität beobachtet. Zwischen den getesteten rezessiven Allelen und einem dominanten S-Allel, welches aus *Brassica campestris* in *Brassica napus* eingelagert wurde, bestand in manchen Kombinationen eine gegenseitige Abschwächung; die resultierenden Pflanzen reagierten selbstkompatibel. Unter Beteiligung dieses S-Allels wurden Testkreuzungen zur Herstellung von Dreiwegehybriden aus selbstinkompatiblen Linien durchgeführt; diese Hybriden bestanden zu $\frac{3}{4}$ aus selbstkompatiblen Pflanzen.

In den Untersuchungen zur Selektion von Genotypen mit stabil ausgeprägter Selbstinkompatibilität zeigten sich im Gewächshaus teilweise signifikante Unterschiede im Selbstungssamenansatz verschiedener Linien. Deren Abstammung von Pflanzen mit hohem bzw. niedrigem Samenertrag, hatte jedoch keinen signifikanten Einfluß. Ein solcher wurde allein bei der Linie 11 in der Topcrossanlage festgestellt. Die Hybridkombinationen mit den übrigen Linien hatten unabhängig von der Abstammung eine sehr hohe Auskreuzungsrate von annähernd 100 %. Als Selektionskriterium zur Auslese von Genotypen mit stabil ausgeprägter Selbstinkompatibilität erscheint die Selbstung von Hand von z.B. zehn Blüten und eine manuelle Kochsalzbehandlung einiger Blüten sinnvoll. Durch die NaCl-Behandlung wird sowohl die Fertilität der Pflanzen geprüft als auch Saatgut für weitere Untersuchungen erzeugt. Die Bestimmung der Auskreuzungsrate von Hybriden mit selbstinkompatiblen Linien erbringt zusätzlich wertvolle Informationen über die Ausprägung der Selbstinkompatibilität und ist ausschlaggebend für die Eignung selbstinkompatibler Linien zur Herstellung von Rapshybriden.

Die molekularen Grundlagen der Selbstinkompatibilität sind in der Literatur eingehend beschrieben. Viele S-Locus-Sequenzen sind bereits bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden Primer genutzt, die von hoch konservierten S-Locus-Regionen unterschiedlicher Brassicaceen abgeleitet worden sind, um einen molekularen Marker für die Selbstinkompatibilität zu finden. Zwei CAPS-Marker konnten etabliert werden, die absolut mit dem S-Locus gekoppelt sind. Mittels solcher molekularer Marker lassen sich Rückkreuzungsprogramme wesentlich erleichtern. Mit Hilfe eines der CAPS-Marker ließen sich ebenfalls drei der vier untersuchten S-Allele auf molekulargenetischer Ebene unterscheiden.

3 VERMEHRUNG VON INZUCHTLINIEN

3.1 Einleitung

Zur Produktion von Hybridsorten mit Hilfe der Selbstinkompatibilität wird von den selbstinkompatiblen Mutterlinien Saatgut in ausreichender Menge benötigt. Die Selbstinkompatibilität der Inzuchtlinien muß daher überwunden werden, um sie vermehren zu können. Es sind mehrere Mechanismen bekannt, die zu einer Abschwächung oder vollständigen Überwindung der Selbstinkompatibilität bei *Brassicaceen* führen.

Die sporophytische Selbstinkompatibilität bei den *Brassica*-Arten ist erst ein bis zwei Tage vor der Anthese wirksam. Dieses entwicklungsphysiologische Phänomen kann bei der Vermehrung durch Knospenselbstung genutzt werden.

MONTEIRO et al. (1988) konnten die Selbstinkompatibilität in *Brassica campestris* mit Hilfe einer Kochsalzbehandlung der Narben überwinden. FU et al. (1992) und ESCH (1994) vermehrten selbstinkompatiblen *Brassica napus* durch das Besprühen der Blüten mit 5-8 %iger NaCl-Lösung. CARAFA und CARRATU (1997) bestätigen die Wirkung von Kochsalz auf die Selbstinkompatibilität von *Brassica oleracea*. Sie zeigten, daß die Applikation anderer Salze (KCl, KBr und NaBr) ebenfalls zur Überwindung der Selbstinkompatibilität führen kann.

NAKANISHI und HINATA (1975) und PALLOIX et al. (1985) konnten den Selbstungssamenansatz von *Brassica oleracea* durch eine Kohlendioxidbehandlung erhöhen. Eine 4-6 %ige CO₂-Atmosphäre, der die geselbsteten Pflanzen 5 bis 8 Stunden ausgesetzt waren, erwies sich als optimal.

Hohe Temperaturen schwächen die Selbstinkompatibilitätsreaktion in *Brassica*-Arten ab (OKASAKI und HINATA, 1987). Eine Temperatur von 40 °C tötet jedoch den Pollen in geplatzten Antheren. Den Einfluß der Temperatur fand zuvor auch OCKENDON (1978) bei *Brassica oleracea*.

Außerdem entdeckte OCKENDON (1978) eine große Variation der Selbstinkompatibilitätsreaktion zwischen verschiedenen Genotypen in Bezug auf die Wirkung von hoher Luftfeuchtigkeit, dem Blütenalter und der Behandlung mit Hexan. Weitere Substanzen

wie Phytohormone, Aminosäuren und Vitamine (MATSUBARA 1984), Lectin und Zucker (SHARMA et al. 1985), Cycloheximide (SARKER et al. 1988) und Okadasäure (SCUTT et al. 1993) können die Selbstinkompatibilität in *Brassicaceen* nach Narbenbehandlung abschwächen oder überwinden. ROGGEN et al. (1972) erleichterten die Selbstbefruchtung selbstinkompatiblen Rosenkohles durch das Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen Narbe und Pollen, wobei im Augenblick der Bestäubung ein geringer elektrischer Strom floß.

Für eine wirtschaftliche Vermehrung selbstinkompatibler Inzuchtlinien ist eine wirksame, einfache und vom Aufwand vertretbare Methode erforderlich. Die Spritzung von Rapsbeständen im Feld mit Kochsalzlösung wäre einfach und kostengünstig. Die Zuchtfirma Marner GZG Saaten AG vermehrt selbstinkompatible Kohllinien erfolgreich durch Kohlendioxid-Begasung (LÖPTIEN, pers. Mitteilung). Diese beiden Methoden wurden im Hinblick auf die Entwicklung einer praxisfähigen Vermehrungstechnik untersucht.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Salzbehandlung

Wirksamkeit verschiedener Salzlösungen

Der Samenansatz von zwei selbstinkompatiblen Linien mit dem gleichen S-Allel wurde in Abhängigkeit von einer Salzbehandlung untersucht. Die Linien waren in der dritten Generation ingezüchtet. Sechs Pflanzen, drei der Linie 5-15 und drei der Linie 3-7, wurden pro Prüfglied in zweifacher Wiederholung untersucht. Die Kontrollpflanzen blühten ohne Behandlung ab. Die drei verschiedenen Lösungen Kochsalz (NaCl, 8 %), Kalisalpeter (KNO₃, 8 %, Haifa Chemicals) und Kalksalpeter (CaNO₃, 8 %, Hoechst) sowie Leitungswasser wurden montags, mittwochs und freitags mit einer Sprühflasche von Hand ausgebracht. Die einzelnen Prüfglieder waren durch Folienvorhänge voneinander getrennt, um das Abdriften der Sprühlösung zu verhindern. Es wurde keine manuelle Bestäubung durchgeführt. Eine Insektenbestäubung hätte zur Verschleppung

von behandeltem Pollen geführt. Die Pflanzen blühten bei einer Temperatur von 20/18 °C und bekamen 16 h Zusatzlicht. Bei der Auswertung wurden die Triebzahl, Trieblänge, Anzahl Samen enthaltender Schoten und Samenzahl pro Schote erfaßt sowie die Samenzahl pro 100 cm Trieblänge berechnet. Dieses Merkmal wurde in einer einfaktoriellen ANOVA unter Nutzung der Prozedur GLM des SAS Softwaresystems untersucht. Bei vier zufällig ausgewählten Prüfgliedern sind zusätzlich die Schoten pro Trieb gezählt worden, um die Korrelation zwischen Trieblänge und Schotenzahl zu bestimmen. Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient wurde mit Hilfe der Prozedur CORR bestimmt.

Direkte NaCl-Applikation auf die Narbe

In diesem Versuch wurde der Samenansatz der Linie 1-9 in Abhängigkeit von der Bestäubung mit eigenem Pollen in Form von Selbstung und Knospenselbstung und Selbstung nach NaCl-Behandlung, sowie der Bestäubung mit kompatibelem Fremdpollen untersucht. Die Linie war in der vierten Generation ingezüchtet. Der einfaktorielle Versuch wurde in drei Wiederholungen durchgeführt, wobei eine Pflanze eine Wiederholung darstellte. Jede der vier Behandlungen wurde an 25 Blüten eines Triebes dieser Pflanze ausgeführt. Dabei wurden die Triebe (Haupttrieb und Nebentriebe erster Ordnung) zufällig ausgewählt. Die Selbstung erfolgte durch Bestäubung frisch erblühter Blüten mit dem eigenen Pollen und diente als Kontrolle. Bei der Knospenselbstung wurden Knospen, die ungefähr drei bis vier Tage vor der Anthese standen, von Kelch-, Blütenblättern und Antheren befreit und mit dem Pollen bereits aufgeblühter Blüten derselben Pflanze bestäubt. Für die NaCl-Behandlung ist nach MONTEIRO et al. (1988) eine 8 %ige Kochsalzlösung mit einem Wattestäbchen auf die Narbe frisch erblühter und von Blütenblättern und Antheren befreiter Blüten getupft worden. Nach einer Stunde ist die Narbe dann mit Eigenpollen bestäubt worden. In einem Vorversuch, in dem mit dieser Methode die Wirkung von NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration auf die Selbstinkompatibilität getestet wurde, führte eine 8 %ige Lösung zum höchsten Samenertrag. Die Wartezeit bis zur Bestäubung wurde in diesem Vorversuch ebenfalls variiert. Sie sollte mindestens eine Stunde betragen, damit die Salzlösung auf der Narbe trocknet, was die Bestäubung erleichtert. Die Bestäubung mit kompatibelem Pollen

erfolgte mit Hilfe einer selbstkompatiblen Rapssorte, wobei eine frisch erblühte und von Blütenblättern und Antheren befreite Blüte mit dem Fremdpollen bestäubt wurde. Die Pflanzen blühten bei einer Temperatur von 20/18 °C und bekamen 16 h Zusatzlicht. Die unterschiedlich behandelten Triebe sind einzeln eingetütet worden. Nach der Ernte wurde die Samenzahl pro Schote bestimmt. Dieses Merkmal wurde in einer einfaktoriellen ANOVA verrechnet.

Salzspritzung im Freiland 1997

Im Freilandversuch 1997 ist die Abhängigkeit des Samenansatzes einer selbstinkompatiblen Linie von der Behandlung mit Kochsalz- und Kalksalpeterlösung bei unterschiedlichen Spritzhäufigkeiten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen untersucht worden. Pflanzen der Linie 10-1 wurden im Gewächshaus angezogen und im April 1997 ins Freiland in Herrenhausen in 12 Parzellen von 1,75 m x 1,75 m gepflanzt. Der Pflanzabstand betrug 25 cm, der Abstand zwischen den Parzellen 4 bis 5 m. Die Bereiche zwischen den Parzellen wurden unkrautfrei gehalten. Es wurde darauf geachtet, daß keine weiteren *Brassica*-Pflanzen in der näheren Umgebung des Versuchsfeldes wuchsen, um jegliche Fremdeinstäubung zu verhindern. Die Versuchspflanzen blühten im Juni. Im Herbst gesäte Raps-Feldbestände waren zu dieser Zeit bereits verblüht. Die Prüfglieder wurden in zwei Wiederholungen zufällig verteilt. Der Versuchsplan ist in Abbildung 3.1 zu sehen. In der Auswertung sind nur die inneren 25 der 49 Pflanzen pro Parzelle berücksichtigt worden.

Die 8 %igen Kochsalz- und Kalksalpeterlösungen wurden mit einer tragbaren Kübelspritze während der Hauptblütezeit von 26 Tagen am späten Vormittag ausgebracht. Die Hälfte der Prüfglieder sind täglich, die andere Hälfte drei mal wöchentlich besprüht worden. An fünf Tagen konnte die Spritzung wegen hohen Windaufkommens nicht durchgeführt werden. So kam es zu fünf Fehltagen bei der täglichen Spritzung und einem Fehltag bei der drei mal wöchentlichen Spritzung. Die maximale Tagestemperatur ist in der Wetterstation Herrenhausen des Institutes für Meteorologie und Klimatologie aufgezeichnet worden. Es wurde der Samenertrag pro Pflanze bestimmt und in einer zweifaktoriellen ANOVA ausgewertet.

Block I		Block II	
Kontrolle <i>täglich</i>	NaCl <i>3 x wöchentlich</i>	Ca(NO ₃) ₂ <i>3 x wöchentlich</i>	Kontrolle <i>täglich</i>
Ca(NO ₃) ₂ <i>3 x wöchentlich</i>	Ca(NO ₃) ₂ <i>täglich</i>	NaCl <i>3 x wöchentlich</i>	NaCl <i>täglich</i>
Kontrolle <i>3 x wöchentlich</i>	NaCl <i>täglich</i>	Kontrolle <i>3 x wöchentlich</i>	Ca(NO ₃) ₂ <i>täglich</i>

Abb. 3.1: Versuchsplan - Freilandspritzversuch 1997

Salzspritzungen im Freiland 1998

Im August 1997 wurden Ackerflächen in Ruthe (2500 m²) und Hannover-Herrenhausen (220 m²) mit der selbstinkompatiblen Linie 10-1 bestellt. Das Saatgut stammte aus dem vorherigen Freilandversuch. Der Bestand in Ruthe bluhete vom 12.4. bis zum 6.6. ohne Behandlung ab, während die Pflanzen in Herrenhausen in der Blütezeit zwei bis drei mal wöchentlich, je nach Witterung, mit einer 8 %igen Kochsalzlösung behandelt wurden. Die Blütezeit in Herrenhausen erstreckte sich vom 1.4. bis zum 20.5. Die Pflanzen wurden in dem Zeitraum vom 9.4. bis zum 12.5. an 15 Tagen behandelt. Die NaCl-Lösung wurde am späten Vormittag mit einer Kubelspritze ausgebracht. Die maximale Tagestemperatur ist in den Wetterstationen des Institutes für Meteorologie und Klimatologie in Herrenhausen und Ruthe aufgezeichnet worden. Da eine großflächige Ernte der Rapsschläge an beiden Orten nicht möglich war, wurden acht Parzellen in der

Größe von einem Quadratmeter zufällig aus den Flächen geerntet und der Samenertrag in g/m^2 bestimmt. Um eine Untersuchung auf Fremdeinstäubung durchzuführen, wurde festgestellt, ob und in welcher Entfernung Rapsschläge in der Nähe der Versuchsflächen existierten. Von diesen Rapsfeldern wurde eine Saatgutprobe entnommen und ausgesät. Die Pflanzen wurden auf Unterschiede im Isoenzym-Muster zur Linie 10-1 untersucht (Material und Methoden siehe Abschnitt 4.2.2). 90 Pflanzen aus der Nachkommenschaft der behandelten Linie 10-1 in Herrenhausen, bzw. 108 aus der Nachkommenschaft in Ruthe wurden angezogen. Die ACP wurde an Pflanzen im Keimlingsstadium untersucht, die Pflanzen wurden weiterkultiviert. Später wurden zehn Blüten pro Pflanze von Hand geselbstet, eingetütet und der mittlere Samenansatz pro Schote bestimmt.

3.2.2 Kohlendioxidbehandlung

Der Samenansatz der beiden verwandten Linien 9-9 und 10-1 wurde in Abhängigkeit von einer Kohlendioxidbehandlung und der Bestäubung überprüft. Die beiden Linien trugen das gleiche S-Allel und konnten sich somit nicht gegenseitig befruchten. Jede Linie wurde als Wiederholung betrachtet. Pro Wiederholung sind zwei Pflanzen getestet worden, wobei eine Pflanze als Kontrolle in normaler Atmosphäre bei 20/18 °C und 16 h Zusatzlicht kultiviert wurde. Die andere Pflanze wurde einer 6 %igen CO_2 -Atmosphäre ausgesetzt. Diese ist durch Verdampfen von Trockeneis in einer Klimakammer erzeugt worden, in der eine 80 %ige relative Luftfeuchtigkeit und 20/18 °C herrschten sowie 16 h Zusatzlicht gegeben wurde. Die benötigte Menge an Trockeneis wurde nach den Gasgesetzen berechnet. Bei einer Temperatur von 20 °C (293,15 K) und einem Druck von 101,3 hPa nimmt ein Mol eines Gases ein Volumen von 24,1 l ein. Das Volumen der Klimakammer betrug 2,2 m x 1,81 m x 2,42 m, also 9,64 m^3 oder 9640 l. Soll nun der Volumenanteil von Kohlendioxid in der Klimakammer 6 % betragen, so entspricht das 578,4 l. Dieses Volumen wird bei 293,15 K und 101,3 hPa von 24 Mol CO_2 eingenommen. 24 Mol CO_2 entsprechen 1056 g Trockeneis. Diese Menge wurde in die Klimakammer gelegt. Das verdampfende Kohlendioxid ist durch Ventilatoren verteilt worden. Der geringe CO_2 -Gehalt der Luft ist bei der Berechnung nicht berücksichtigt

worden. Der Druckanstieg in der Klimakammer bedingt durch das Zufügen von Kohlendioxid wurde ebenfalls nicht mit einbezogen, was jedoch kaum Abweichungen verursacht haben sollte, da die Klimakammer nicht absolut luftdicht war. Da Insekten die 6 %ige CO₂-Atmosphäre nicht überlebten, wurde die Selbstbestäubung von Hand ausgeführt. Dabei wurden an einem Trieb einer Pflanze 30 Blüten bestäubt. An einem anderen Trieb blühten 30 Blüten ohne Bestäubung ab. Die Blüten der Pflanzen, die mit CO₂ begast wurden, sind kurz vor der Behandlung geselbstet worden. Die Kohlendioxidbehandlung erfolgte dreimal pro Woche, jeweils Montags, Mittwochs und Freitags. In der Zwischenzeit wurde die Klimakammer nicht geöffnet.

Die Samenzahl pro Schote wurde in einer zweifaktoriellen ANOVA ausgewertet.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Salzbehandlung

Wirksamkeit verschiedener Salzlösungen

Der Korrelationskoeffizient zwischen Trieblänge und Schotenzahl betrug 0,9049. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 und Abbildung 3.2 dargestellt. Die Behandlung mit Leitungswasser hatte keinen Einfluß auf den Samenansatz. Die Salzbehandlungen erhöhten die Anzahl der Samen pro 100 cm Trieblänge signifikant im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle. Die Kochsalzbehandlung zeigte die beste Wirkung bei der Überwindung der Selbstinkompatibilität .

Tab. 3.1: Mittlere Abweichungsquadrate und F-Werte der Samenzahl pro Trieblänge

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Behandlung	4	34,59	10,58***
Wiederholung	1	15,49	4,74*
Fehler	50	3,27	

* signifikant bei $p < 0,05$

*** signifikant bei $p < 0,001$

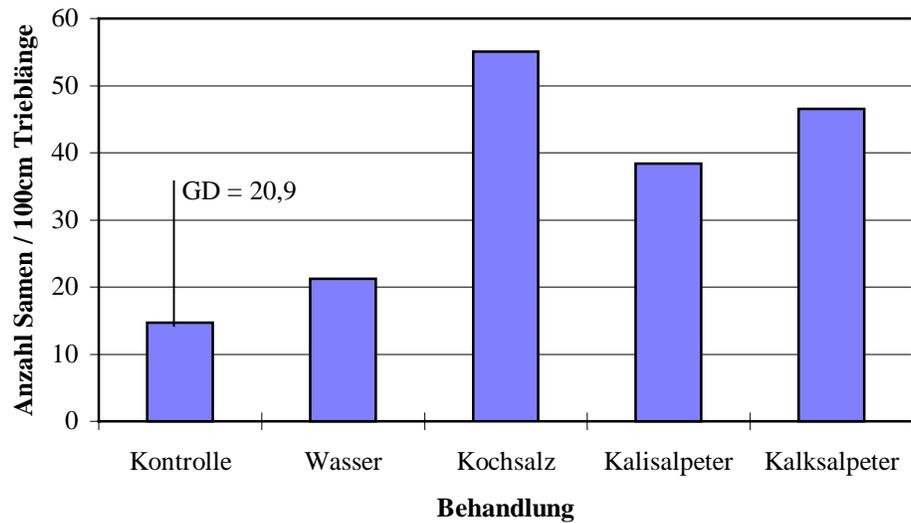


Abb. 3.2: Samenansatz in Abhängigkeit von der Behandlung

Die prozentuale Verteilung der mit einer bestimmten Anzahl von Samen besetzten Schoten bei den fünf verschiedenen Behandlungen ist in Abbildung 3.3 zu sehen. Es wurde eine Klasseneinteilung für die Samenanzahl je Schote vorgenommen. Die Mehrzahl der Schoten enthielten nur ein bis drei Samen. In den salzbehandelten Varianten waren weniger Schoten mit ein bis drei Samen, aber vermehrt Schoten mit einer Samenzahl von zehn und mehr zu finden.

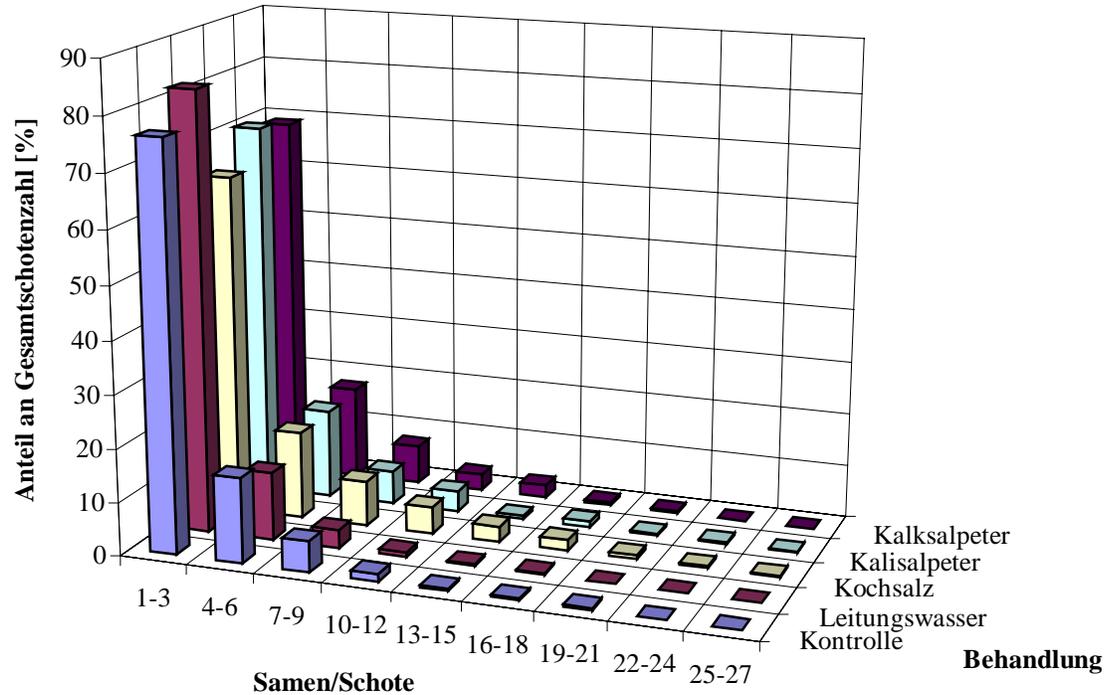


Abb. 3.3: Prozentualer Anteil der mit bestimmter Anzahl Samen besetzten Schoten an der Gesamtzahl besetzter Schoten

Direkte NaCl-Applikation auf die Narbe

In diesem Versuch zeigte sich eine signifikante Variation des Samenansatzes zwischen den vier verschiedenen Behandlungen ($p < 0,001$) (Tabelle 3.2).

Tab. 3.2: Mittlere Abweichungsquadrate und F-Werte der Samenzahl pro Schote der Linie 1-9

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Behandlung	3	3831,90	70,94***
Wiederholung	2	75,21	1,39
Fehler	288	54,02	

*** signifikant bei $p < 0,001$

Der Tukey-Test zeigte, daß alle Behandlungen signifikant voneinander abwichen. Die Grenzdifferenz (GD) betrug 3,1. Abbildung 3.4 zeigt den geringen Samenansatz der Kontrollpflanzen von im Mittel 3,3 Samen/Schote. Durch Knospenselbstung konnte der Samenansatz auf 10,1 Samen/Schote, nach NaCl-Behandlung sogar auf 19,6 Samen/Schote gesteigert werden, was die Bestäubung mit kompatibelem Fremdpollen (15,9 Samen/Schote) noch übertraf.

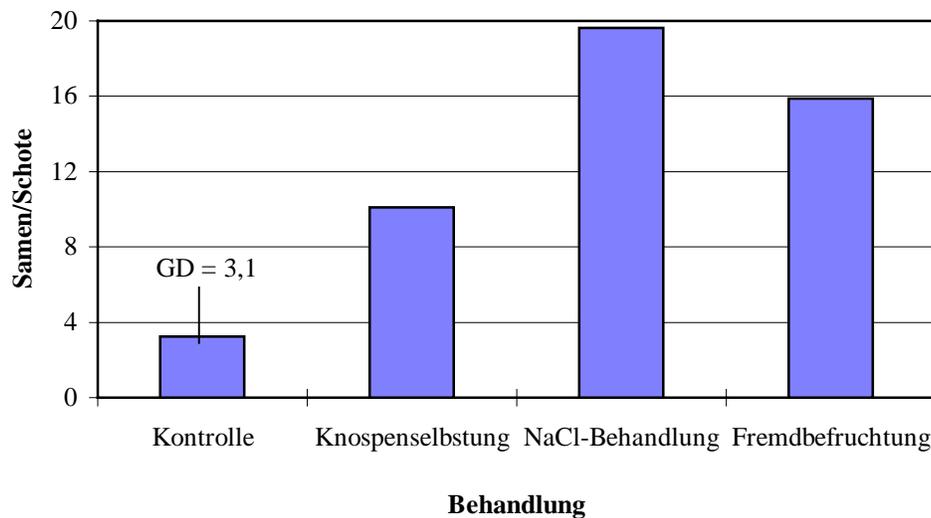


Abb. 3.4: Samenansatz der Linie SI 1-9 nach Selbstung, Knospenselbstung, NaCl- Behandlung und Bestäubung mit kompatibelem Fremdpollen

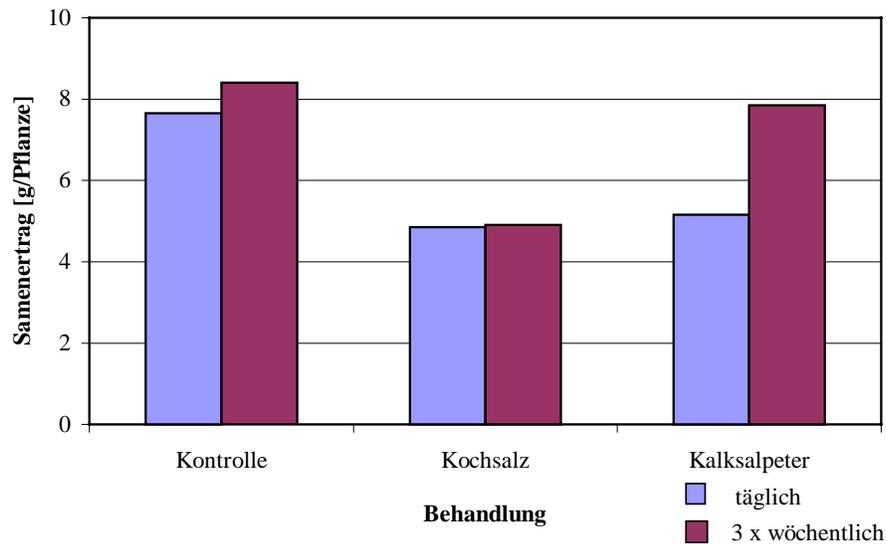
Salzspritzungen im Freiland 1997

Sowohl die unterschiedlichen Salzbehandlungen als auch die Spritzhäufigkeiten hatten einen signifikanten Effekt auf den Samenertrag (Tabelle 3.3). Die Salzbehandlungen verringerten den Samenansatz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei beiden Spritzhäufigkeiten (Abbildung 3.5).

Tab. 3.3: Mittlere Abweichungsquadrate und F-Werte des Samenertrags pro Pflanze

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Behandlung	2	235,52	16,93***
Spritzhäufigkeit	3	65,09	4,68*
Wiederholung	1	250,21	17,98***
Fehler	288	13,91	

* signifikant bei $p < 0,05$ *** signifikant bei $p < 0,001$

**Abb. 3.5.:** Samenertrag in Abhängigkeit von der Salzbehandlung und der Spritzhäufigkeit

Die mit Kochsalz besprühten Varianten hatten den geringsten Samenertrag. Eine dreimalige Salzspritzung pro Woche führte zu einem erhöhtem Samenansatz in den Kalksalpeterparzellen. Die Spritzung mit Kalksalpeterlösung hatte einen düngenden Effekt auf die behandelten Pflanzen. Sie wuchsen üppiger und blühten länger als die

Pflanzen in den übrigen Parzellen. Die maximalen Tagestemperaturen waren in den ersten beiden Juniwochen relativ hoch (Abbildung 3.6).

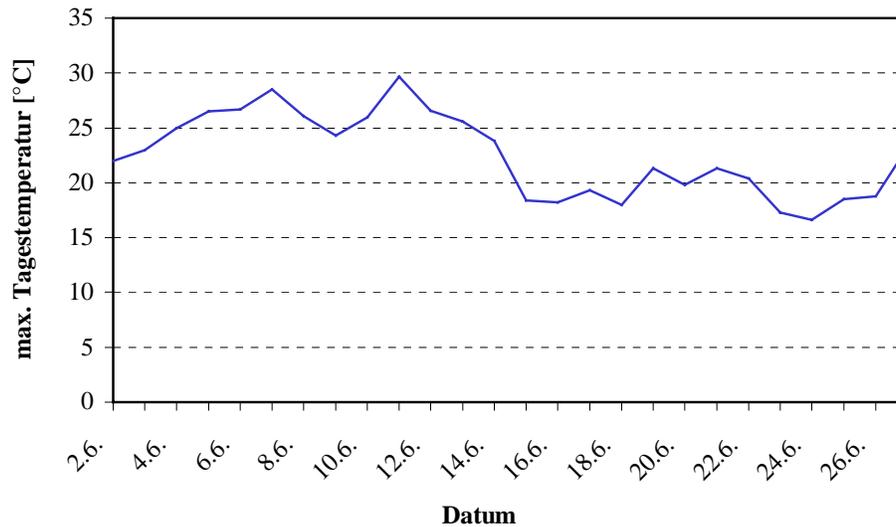


Abb. 3.6: Temperaturverlauf während des Freilandspritzversuches 1997

Salzspritzversuch im Freiland 1998

Der Samenertrag in Herrenhausen betrug im Mittel 217 g/m^2 (Spannweite: $160,7 - 311,6 \text{ g/m}^2$). In Ruthe wurde ein Ertrag von 267 g/m^2 (Spannweite: $203,9 - 370,8 \text{ g/m}^2$) erreicht. Die maximalen Tagestemperaturen waren besonders im Mai und Juni relativ hoch (Abbildung 3.7).

In der Umgebung der Versuchsfläche in Herrenhausen lagen vier Rapsfelder in einer Entfernung von 4,5 bis 5,1 km (F1, F2, F3, F4). Die vier Rapsschläge F5, F6, F7 und F8 waren 7,5 bis 9,75 km von dem Bestand in Ruthe entfernt. Einige der Nachkommen der Bestände der Flächen F1, F4, F5, F7 und F8 zeigten Polymorphismen im ACP-Bandenmuster, die sich von dem der Linie 10-1 unterschieden (Abbildung 3.8).

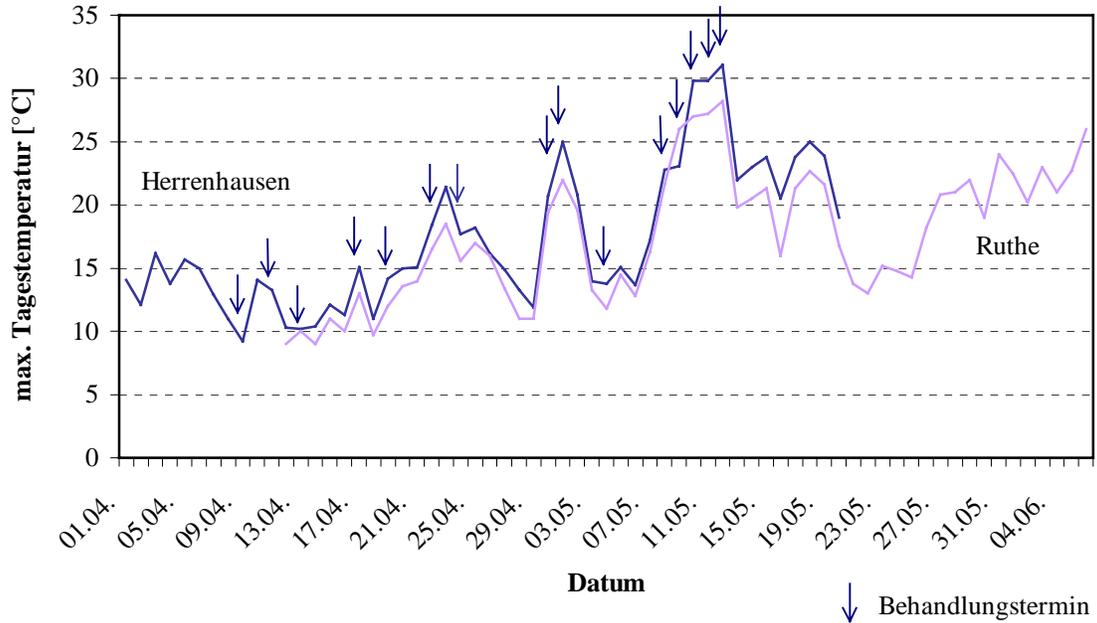


Abb. 3.7: Temperaturverlauf während des Freilandspritzversuches 1998

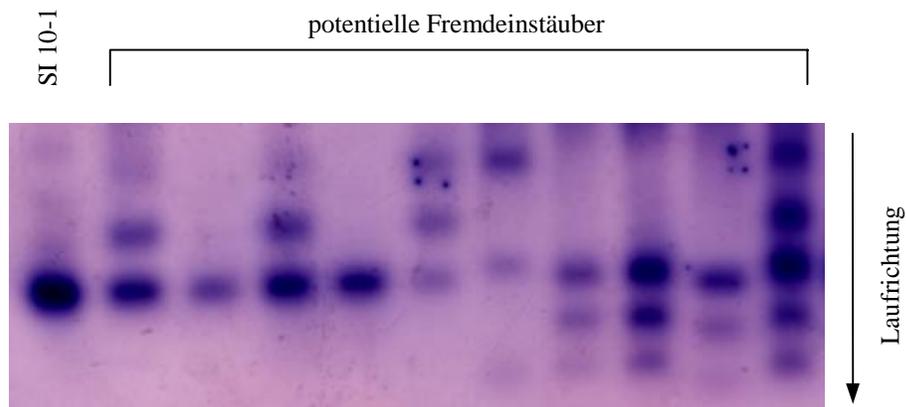


Abb. 3.8: ACP-Bandenmuster der potentiellen Fremdeinstäuber

In der Nachkommenschaft der Linie 10-1 aus Herrenhausen wurden unter 90 Pflanzen keine mit abweichendem ACP-Muster gefunden. Unter den 108 Pflanzen der Nachkommenschaft aus Ruthe wurde eine Pflanze mit einem anderen ACP-

Bandenmuster entdeckt. Diese Pflanze war auch die einzige, die später einen selbstkompatiblen Ansatz von 33 Samen pro Schote hatte. Sie ist demnach aus einer Fremdeinstäubung der benachbarten Rapsschlägen entstanden. Die übrigen Pflanzen sowohl aus der Herrenhäuser- als auch der Ruthe-Nachkommenschaft waren selbstinkompatibel. In Ruthe war demnach eine Fremdeinstäubungsrate von 0,93 % zu finden während in Herrenhausen wahrscheinlich keine Fremdeinstäubung stattfand.

3.3.2 Kohlendioxidbehandlung

Die Kohlendioxid-Behandlung und die Bestäubung von Hand hatten eine signifikante Wirkung auf den Samenansatz der Linien 9-9 und 10-1 (Tabelle 3.4). Eine Bestäubung von Hand erhöhte den Samenertrag sowohl in der Kontrolle als auch in der mit Kohlendioxid behandelten Variante. Der Samenansatz nach Kohlendioxidbehandlung ist hoch signifikant verschieden von der Kontrolle. Hier wurden nach Bestäubung im Mittel 18,5 Samen/Schote gebildet, bei den Kontrollpflanzen dagegen 2,65 (Abbildung 3.9).

Tab. 3.4: Mittlere Abweichungsquadrate und F-Werte des Samenertrags pro Pflanze

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Behandlung	1	3784,20	348,67***
Bestäubungsart	1	6479,20	596,98***
Wiederholung	1	1,20	0,11
Fehler	232	10,85	

*** signifikant bei $p < 0,001$

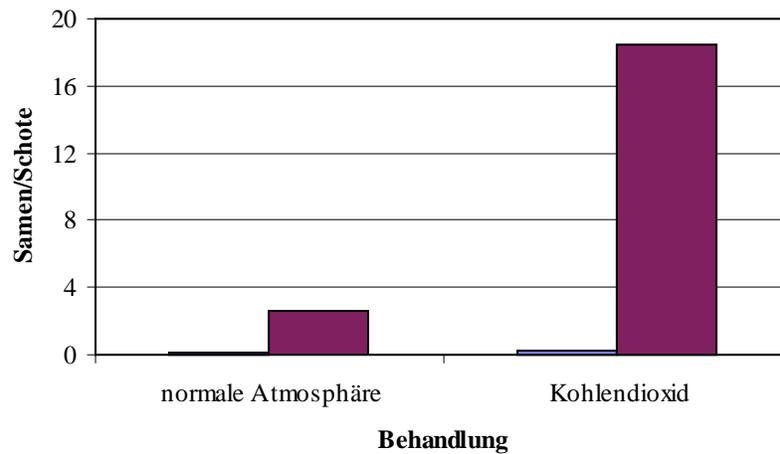


Abb. 3.9: Samenansatz in Abhängigkeit von einer CO₂-Behandlung und der Bestäubungsart

3.4 Diskussion

3.4.1 Salzbehandlung

Wirksamkeit verschiedener Salzlösungen

Zwischen der Schotenzahl und der Trieblänge bestand eine enge Korrelation. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß die Schotenzahl pro Trieblänge relativ konstant und demnach die Samenzahl pro Trieblänge aussagekräftig ist. Nicht nur die NaCl-Spritzung, sondern auch die KNO₃- und Ca(NO₃)₂-Behandlungen führten zur signifikanten Abschwächung der Selbstinkompatibilität. Folglich scheint die Überwindung der Selbstinkompatibilität nicht von bestimmten Ionen abhängig zu sein, sondern von der Wirkung von Salzen im eigentlichen Sinn. Sowohl FU et al. (1992) als auch CARAFA und CARRATU (1997) vermuten, daß die S-Erkennungsproteine der Narbe durch eine Salzbehandlung denaturiert und somit in ihrer Funktion gestört werden. Die Selbstinkompatibilität konnte auch durch Abwaschen mit destilliertem Wasser der mit

Salzlösung behandelten Narben nicht wiederhergestellt werden (CARAFA und CARRATU, 1997). Die Wirkung von Salzen ist demzufolge irreversibel.

Die Mehrzahl der Samen enthaltenden Schoten trug bei allen Behandlungen nur ein bis drei Samen. Es waren wenige Schoten zu finden, die nach Salzbehandlung mehr als zehn Samen enthielten. Dies könnte durch die fehlende Bestäubung im Gewächshaus bedingt sein. Dennoch ließ sich der signifikante Einfluß von Salzen auf die Selbstinkompatibilität nachweisen.

Direkte NaCl-Applikation auf die Narbe

Die hohe Wirksamkeit von Kochsalz im Hinblick auf die Überwindung der Selbstinkompatibilität wurde in diesem Versuch bestätigt (Abbildung 3.4, S.87). Die NaCl-Behandlung war selbst der Knospenselbstung und der Bestäubung mit kompatiblen Fremdpollen überlegen. Die in diesem Versuch angewandte Technik des Auftupfens der NaCl-Lösung auf die Narbe mit Hilfe eines Wattestäbchen wurde für die Vermehrung selbstinkompatibler Linien, von denen Saatgut in größeren Mengen für weitere Versuche benötigt wurden, genutzt. Dabei wurde nach Behandlung von ca. 100 Schoten ein mittlerer Samenertrag von 16,6 g pro Pflanze erzielt, was einem guten Schotenbesatz entspricht. Diese Behandlung ist einfacher zu handhaben als eine Knospenselbstung. Bei der Knospenselbstung kann es leicht zu Verletzungen der jungen Narben kommen, die dann abfallen können. Solche manuelle Methoden sind für eine Vermehrung von selbstinkompatiblen Linien im großen Stil jedoch zu aufwendig. Für eine Linienvermehrung in der Praxis erscheint die Salzspritzung im Freiland eher geeignet.

Salzspritzungen im Freiland 1997

Im Gegensatz zum Salzspritzversuch im Gewächshaus führte die Salzbehandlung in diesem Freilandversuch überraschenderweise zu einer Verringerung des Samenertrages vor allem bei den mit Kochsalz behandelten Varianten. Bienen war es möglich von Parzelle zu Parzelle zu fliegen. Sie könnten auf diese Weise behandelten Pollen auf unbehandelte Pflanzen getragen haben. Dies war unter Umständen die Ursache für den hohen Samenansatz der Kontrollparzellen. Eventuell haben die Insekten die mit Salz behandelten Parzellen gemieden, so daß dort weniger bestäubt wurde und deshalb der

Samenertrag verringert war. Eine hohe Temperatur kann die Stärke der Selbstinkompatibilität abschwächen. Die Temperaturbedingungen waren für alle Varianten gleich, können jedoch im ganzen zu einer Steigerung des Ertragsniveau geführt haben.

In Freilandversuchen ist es demzufolge wichtig, unterschiedliche Behandlungen räumlich ausreichend voneinander zu trennen, um eine Pollenverschleppung und die gegenseitige negative Beeinflussung der Prüfglieder zu verhindern.

Salzspritzungen im Freiland 1998

Die mit Kochsalzlösung gespritzten Pflanzen der Linie 10-1 zeigten einen geringeren Ertrag als die unbehandelten Pflanzen. Dies könnte durch den fruchtbaren Lößboden in Ruthe im Gegensatz zum sandigen Boden in Herrenhausen bedingt sein. Die Linie 10-1 erbrachte einen Ertrag von 21,7 dt in Herrenhausen und 26,7 dt in Ruthe bezogen auf einen Hektar. Sie reichte damit annähernd an den Ertrag von selbstkompatiblen Sorten heran. In Herrenhausen wurde keine Fremdeinstäubung festgestellt, im Bestand in Ruthe fand zu ca. 1 % Fremdeinstäubung statt. Der Samenansatz wurde folglich nicht durch Fremdpollen verursacht, sondern ist auf Pseudokompatibilität zurückzuführen. Diese scheint beim Fehlen von kompatiblen Pollen im Freiland besonders ausgeprägt zu sein und war in diesem Versuch möglicherweise begünstigt durch teilweise recht hohe Temperaturen zur Blütezeit. Die Vermehrung von Inzuchtlinien, die eine rezessiv vererbte Selbstinkompatibilität tragen, erscheint demnach durch einen Anbau in isolierter Lage ohne jegliche Salzbehandlung realisierbar.

3.4.2 Kohlendioxidbehandlung

Der Samenansatz der selbstinkompatiblen Pflanzen konnte durch eine CO₂-Behandlung in Verbindung mit einer Bestäubung beträchtlich erhöht werden. Auch diese Methode zeigte somit eine große Wirksamkeit bei der Überwindung der Selbstinkompatibilität.

Der Vorteil einer CO₂-Behandlung gegenüber einer Salzspritzung ist, daß das Kohlendioxid zu allen Narben der geöffneten Blüten vordringen kann. Der Nachteil

besteht jedoch darin, daß die Methode unter großem technischen Aufwand nur im Gewächshaus praktikabel ist. Zudem muß für eine ausreichende Insektenbestäubung gesorgt werden. Dabei darf die CO₂-Konzentration nicht zu hoch sein, andernfalls muß die Bestäubung durch Insekten vor der Begasung erfolgen.

In der Marner GZG Saaten AG wird die Kohlendioxidbehandlung erfolgreich zur Vermehrung von selbstinkompatiblen Kohllinien genutzt (LÖPTIEN, persönliche Mitteilung). Die unterschiedlichen Inzuchtlinien werden in einzelnen Gewächshäusern kultiviert und von einem kleinen Bienenvolk, das im Haus verbleibt, bestäubt. Zwei bis drei mal pro Woche nach einem sonnigen Tag, an dem die Bienen sehr aktiv waren, werden die Fenster des Gewächshauses geschlossen und es wird für einige Zeit über ein Rohrsystem CO₂-Gas eingeleitet. Das Haus bleibt über Nacht geschlossen, die Konzentration des Gases wird nicht überprüft. Die Bienen überstehen diese Behandlung während der gesamten Blühperiode von vier bis sechs Wochen ohne Schaden zu nehmen. Auf diese Weise wurde die selbstinkompatible Rapslinie 8-1/2 bei der GZG-Marne vermehrt. Die behandelten 29 Pflanzen hatten einen Samenertrag von 529,8 g. Das entspricht einem mittleren Samenertrag von 18,3 g pro Pflanze und liegt somit ungefähr in der Größenordnung des Samenertrages von 16,6 g, der durch eine NaCl-Behandlung erzielt werden könnte (siehe 3.3.1).

3.5 Zusammenfassung

Zur Nutzung selbstinkompatibler Linien in der Hybridzüchtung ist deren effektive Vermehrung erforderlich. Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, die bei *Brassica*-Arten zur Überwindung der Selbstinkompatibilität führen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Vermehrung mit Hilfe einer Kochsalz- und einer Kohlendioxidbehandlung untersucht. Beide Verfahren führten zur signifikanten Erhöhung des Samenansatzes. Die Bestäubung der Blüten sollte durch Insekten oder von Hand gesichert sein, um einen hohen Samenansatz zu gewährleisten.

Für die Vermehrung selbstinkompatibler Linien in begrenztem Umfang im Gewächshaus erscheint die Selbstung nach manueller NaCl-Behandlung sinnvoll. Sie erbrachte einen höheren Samenertrag als eine Knospenselbstung und ist zudem leichter zu handhaben.

Die Vermehrung selbstinkompatibler Linien in größeren Mengen wurde in NaCl-Spritzversuchen im Freiland in isolierter Lage untersucht. Die Spritzbehandlung hatte keinen Effekt auf den Samenansatz. Im Freilandversuch 1998 hatten sowohl die gespritzte als auch die unbehandelte Variante einen annähernd vollen Samenertrag. Eine Fremdeinstäubung konnte ausgeschlossen werden. In Abwesenheit von kompatiblen Fremdpollen zeigte die untersuchte Linie einen hohen Grad an Pseudokompatibilität. Die Vermehrung von rezessiv selbstinkompatiblen Linien erscheint demnach durch einen Anbau in isolierter Lage ohne jegliche Behandlung möglich. Eine ausreichende Entfernung zu potentiellen Fremdeinstäubern ist allerdings unerlässlich. Die hier gefundene hohe Pseudokompatibilität steht im Widerspruch zur der in der Hybridproduktion gewünschten starken Ausprägung der Selbstinkompatibilität. In einer Topcrossanlage (siehe Abschnitt 2.3) zeigte sich jedoch, daß bei ausreichendem Angebot an kompatiblen Pollen auch mit rezessiv selbstinkompatiblen Pflanzenmaterial sehr hohe Auskreuzungsraten von 96 bis 100 % erreicht werden können.

4 HERSTELLUNG UND PRÜFUNG VON HYBRIDEN

4.1 Einleitung

Die Hybridzüchtung erlaubt die Auslese leistungsfähiger Sorten, die sich durch große Uniformität auszeichnen. Die Eltern der Hybride sollten weitgehend homozygot und genetisch verschieden sein. Ein hoher Grad an Homozygotie kann durch wiederholte Inzucht erreicht werden. Inzuchtlinien können mangelnde Fertilität und Vitalität zeigen, die sogenannte Inzuchtdepression. Diese wird durch die Kreuzung von zwei Inzuchtlinien wieder aufgehoben. Die F₁-Hybriden übertreffen die Eltern an Wüchsigkeit und in den Leistungseigenschaften: sie zeigen einen Heterosiseffekt. Diese Heterosis kann nicht zur Konstanz gezüchtet werden und ist als natürlicher Sortenschutz von großem Vorteil für den Züchter. Zur Herstellung einer Hybridsorte muß die gegenseitige Befruchtung der Hybrideltern gewährleistet sein. Verschiedene Bestäubungsmechanismen, die zur Produktion von Hybriden in unterschiedlichen Kulturpflanzenarten genutzt werden können, wurden von WRICKE (1994) zusammenfassend beschrieben. Es sind im Wesentlichen die Pollensterilität, die Selbstinkompatibilität und die Geschlechtsvererbung, die in der Praxis genutzt werden. Kosten- und arbeitsintensive Handbestäubungen sind nur bei Zier- und Gemüsepflanzen, die einen hohen Erlös bringen, wirtschaftlich vertretbar. Weiterhin gibt es gentechnische Verfahren einen Sterilitätsmechanismus in Pflanzen einzuführen. MARIANI et al. (1990, 1992) entwickelten das SEEDLINKTM-System, wobei nach Transformation von Raps- oder Tabakpflanzen genisch männlich sterile Linien und die Fertilität restaurierende Linien entstanden. Das Ribonuklease-Gen ‚Barnase‘ induziert die Pollensterilität und das Inhibitor-Gen ‚Bastar‘ vermag diese Sterilität wieder aufzuheben. KRIETE et al. (1996) entwickelten einen gentechnischen Sterilitätsmechanismus bei dem nur der mütterliche Kreuzungspartner transformiert werden muß. Das Transgen argE wird nach der Induktion durch von außen appliziertes N-acetyl-Phosphinothricin (N-ac-Pt) in den Tapetumzellen expremiert, führt zum Zelltod und somit zur Pollensterilität.

In der Rapsybridzüchtung wird vorwiegend die männliche Sterilität als Bestäubungsmechanismus genutzt. Die CMS-Systeme basieren auf zwei genetischen Komponenten:

einem männlich sterilen Cytoplasma und einem Kerngen, das die Fertilität erhält (Maintainer) oder wiederherstellt (Restorer). Neben dem *pol* (Polima)- wird hauptsächlich das *ogu* (Ogura)-System bei der Entwicklung kommerzieller Hybriden genutzt. Weiterhin kann das MSL (Männliche Sterilität Lemke) -System zur Hybridproduktion dienen. Bei diesem Mechanismus können konventionelle Rapslinien als Restorer verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Linien mit rezessiv zur Selbstkompatibilität vererbten S-Allelen zur Herstellung von Rapsybriden genutzt. Es sind Einweghybriden zwischen selbstinkompatiblen Mutterlinien und selbstkompatiblen Bestäubern hergestellt worden. Der Vorteil der Nutzung rezessiver S-Allele gegenüber dominanten Allelen ist die vollständige Wiederherstellung der Selbstfertilität der Hybriden. Von Nachteil sind die nach Rückkreuzungen mit selbstkompatiblen Material erforderlichen Nachkommenschaftsuntersuchungen, um selbstinkompatible Linien selektieren zu können. In diesem Fall ist ein molekularer Marker für die Selbstinkompatibilität, wie er in der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde, von großem Nutzen (Abschnitt 2.4).

In der Literatur werden verschiedene Produktionsweisen zur Hybridherstellung beim Raps erwähnt. THOMPSON (1978) schlägt neben der Entwicklung von Einfachhybriden beim Raps mit Hilfe der rezessiven Selbstinkompatibilität auch die Herstellung von Dreiweghybriden vor. Zunächst werden zwei Linien, die unterschiedliche S-Allele tragen im Mischanbau kombiniert, die resultierende selbstinkompatible Heterozygote wird schließlich mit einem selbstkompatiblen Bestäuber im Streifenanbau vermehrt. Die in dieser Weise produzierten Hybriden reagieren vollkommen selbstkompatibel. Der Vorteil von Mehrweghybriden ist der geringere Saatgutbedarf der Hybrideltern. Bei der dominant vererbten Selbstinkompatibilität ist die Herstellung von Mehrweghybriden sogar notwendig, um die Fertilität der Hybridsorte zu gewährleisten. Mit dieser Produktionsmethode kann die Selbstfertilität dennoch nur in einem Teil der Hybriden wiederhergestellt werden. GOWERS (1975) verwendete dominant zur Selbstkompatibilität vererbte S-Allele zur Herstellung von Doppelhybriden beim Raps. Als Ausgangsmaterial dienten selbstinkompatible Linien, die verschiedene S-Allele trugen und jeweils mit einem selbstkompatiblen Bestäuber im Streifenanbau kultiviert wurden. Die daraus entstandenen Einfachhybriden sind im Mischanbau vermehrt worden. Die resultierende

Doppelhybride enthielt zu einem Viertel selbstkompatible Pflanzen, die übrigen Hybridpflanzen waren auf Fremdbestäubung angewiesen. GERTZ (1991) schlägt die Produktion von Dreiweghybriden beim Raps mit Hilfe der dominant vererbten Selbstinkompatibilität vor. Nach Kreuzung einer selbstinkompatiblen mit einer selbstkompatiblen Linie entsteht eine selbstinkompatible Einfachhybride. Diese wird erneut im Streifenanbau mit einer selbstkompatiblen Linie vermehrt, woraus eine Dreiweghybride entsteht, die zu 50 % aus selbstkompatiblen Pflanzen besteht. Die übrigen 50 % der Pflanzen sind auf die Bestäubung durch Insekten mit Pollen der selbstkompatiblen Hybriden angewiesen.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Faktorielle Kreuzungen

In drei Jahren wurden 75 Testhybriden in drei faktoriellen Kreuzungen hergestellt und in Leistungsprüfungen getestet. Fünf ingezüchtete selbstinkompatible Linien sind mit fünf selbstkompatiblen Bestäubern in allen Kombinationen gekreuzt worden. Die selbstinkompatiblen Mütter wurden aus einer begrenzten Population von elf Linien zufällig ausgewählt. Die Väter sind nach dem Kriterium gewählt worden, nicht mit den Müttern verwandt zu sein. Zur Herstellung der Hybriden wurden die Elternlinien in den ersten beiden faktoriellen Kreuzungen (FK I und FK II) zusammen in Isolierkabinen im Freiland angebaut, größtenteils in der DSV-Zuchtstation Thüle, teilweise in Hannover. Die Bestäubung wurde zur Blütezeit mit Hilfe von Fliegen gesichert. Das Hybridsaatgut ist von den selbstinkompatiblen Linien geerntet worden. Im dritten faktoriellen Kreuzungsschema (FK III) sind die Hybriden in einer offen blühenden Freilandanlage hergestellt worden, wobei einige Reihen der selbstinkompatiblen Linien in Bestäuberparzellen isoliert wurden.

Die in dieser Weise hergestellten Hybriden sind in Leistungsprüfungen in Parzellen von 13 m² in einer 6x6-Gitteranlage an den drei DSV-Prüfstandorten Thüle, Boldebeck und

Leutewitz angebaut worden. Die Anzahl an Orten, Jahren und Wiederholungen für die einzelnen faktoriellen Kreuzungen sind der Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Tab. 4.1: Prüfbedingungen der faktoriellen Kreuzungen

Faktorielle Kreuzung	Orte	Jahre	Wiederholungen
FK I	1	2	2
FK II	3	1	2
FK III	1	1	2

Neben dem Trockenertrag pro Parzelle sind unter anderem der Protein-, Öl- und Glucosinolatgehalt erfaßt worden. Der relative Trockenertrag wurde im Vergleich zum Mittel von drei bis vier Standardsorten bestimmt. Der Trockenertrag wurde varianzanalytisch mittels der Prozedur GLM des SAS Softwaresystems nach fixem Modell ausgewertet. Fehlwerte in den FK I wurden iterativ geschätzt. Mit Hilfe der Varianzkomponenten sind die additive Varianz (V_A) (Formel 4.1) und die Dominanzvarianz (V_D) (Formel 4.2) in Anlehnung an WRICKE und WEBER (1986) geschätzt worden.

$$V_A = 4 \frac{(1+F_f) \sigma_f^2 + (1+F_m) \sigma_m^2}{(1+F_f)^2 + (1+F_m)^2} \quad (4.1)$$

$$V_D = 4 \frac{\sigma_{fm}^2}{(1+F_f)(1+F_m)} \quad (4.2)$$

V_A : additive Varianz
 V_D : Dominanzvarianz
 F_f : Inzuchtkoeffizient der Mütter
 F_m : Inzuchtkoeffizient der Väter

σ_f^2 : Varianzkomponente Mutter
 σ_m^2 : Varianzkomponente Vater
 σ_{fm}^2 : Varianzkomponente Mutter*Vater

Die Heritabilität ist in Anlehnung an BECKER (1993) geschätzt worden (Formel 4.3), wobei die Formel an die jeweiligen Bedingungen der faktoriellen Kreuzungen in Abhängigkeit von der Prüfung an verschiedenen Orten oder in unterschiedlichen Jahren angepaßt worden ist.

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_{go/o}^2 + \sigma_{gj/j}^2 + \sigma_{goj/(oj)}^2 + \sigma_e^2 / (ojr)} \quad (4.3)$$

σ_g^2 : Varianzkomponente Genotyp	σ_e^2 : Fehler
σ_{go}^2 : Varianzkomponente Genotyp*Ort	o: Anzahl der Orte
σ_{gj}^2 : Varianzkomponente Genotyp*Jahr	j: Anzahl der Jahre
σ_{goj}^2 : Varianzkomponente Genotyp*Ort*Jahr	r: Anzahl der Wiederholungen

Die Bestimmung der allgemeinen (gca) und spezifischen Kombinationseignung (sca) ist von BECKER (1993) beschrieben worden. Die allgemeine Kombinationseignung einer Linie berechnet sich aus der Differenz zwischen dem Mittel aller Kreuzungen mit dieser Linie und dem allgemeinen Mittelwert. Der sca-Effekt einer Kreuzung ist die Differenz zwischen dem Wert dieser Kreuzung und der Summe aus Mittelwert und den gca-Effekten der beiden Eltern.

In den Leistungsprüfungen 1999 wurde die Eigenleistung von vier selbstinkompatiblen Linien und drei selbstkompatiblen Vätern bestimmt. Die relative Größe der Heterosis der Hybriden wurde in Bezug auf das Elternmittel bestimmt.

4.2.2 Bestimmung der Auskreuzungsrate von Hybriden

Die Bestimmung der Auskreuzungsrate wurde an einer Stichprobe von jeweils 96 Pflanzen der untersuchten Hybriden durchgeführt.

Isoenzyme

Die Enzymsysteme GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), ACP (Saure Phosphatase) und LAP (Leucin-Amino-Peptidase), für die von ESCH (1994)

Polymorphismen in Rapsmaterial gefunden wurden, sind auch in diesen Untersuchungen verwendet worden. Da die Methode zur Untersuchung der LAP nicht etabliert werden konnte, waren nur die ACP und GOT zur Bestimmung der Auskreuzungsraten von Hybriden nutzbar.

Extraktion

Zur Gewinnung eines Extraktes aus dem Blattmaterial der zu untersuchenden Pflanzen wurden ca. 400 mg frische junge Laubblätter mit einer Blattpresse unter Zugabe von 400 µl 5 %-Saccharoselösung homogenisiert. Der Extrakt wurde 10 min bei 4 °C und 15000 U/min zentrifugiert und der Überstand in Mikrotiterplatten überführt. Dieser Pflanzenextrakt konnte direkt auf die Gele zur elektrophoretischen Trennung aufgetragen werden. Die Bestimmung der ACP war auch mit zuvor eingefrorenem Pflanzenextrakt möglich, zur GOT-Untersuchung konnte nur frischer Extrakt verwendet werden.

Elektrophorese

Zur Trennung der Isoenzyme GOT und ACP wurde die vertikale Polyacrylamidgелеlektrophorese (PAGE) genutzt. Sie erfolgte in Desaphor-VA-Kammern (Fa. Desaga) mit einer Trennstrecke von 15 cm. Zur Untersuchung der GOT diente als Gel- und Elektrodenpuffer 125 mM Tris/19 mM Borsäure pH 8,9 zur Bestimmung der ACP ein 10 mM Tris/ 200 mM Borsäure pH 7,1 Puffer (beide nach STEGEMANN et al. 1983). Für die GOT wurden 8 % T - 3 % C- und für die ACP 6 % T - 3 % C-Polyacrylamidgele verwendet (T: Gesamtacrylamidkonzentration, C: Konzentration von N,N'-Methylbisacrylamid am Gesamtacrylamid). Die Polyacrylamidlösung wurde mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Polymerisation erfolgte nach Zugabe von 6,6 % Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin in Gelpuffer) und 6,6 % Ammoniumperoxodisulfat. Jeweils 15 µl Blattextrakt wurden in die 24 Taschen eines Gels aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter Kühlung (4 °C) bei 50 mA pro Gel und einer maximalen Spannung von 400 V für die GOT und 360 V für die ACP. Die Trenndauer betrug zur Bestimmung der GOT 4 h und für die ACP 2,5 h.

Färbung

GOT (verändert nach JAASKA 1981)

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele 20 min in gekühltem 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 umgepuffert und dann in einer Substratlösung bei 37 °C im Wasserbad für 10-15 min inkubiert.

Substratlösung:	68 ml	0,1 M Tris/HCL pH 7,5
	1 g	PVP-40
	17 ml	0,2 M L-Asparaginsäure pH 7,5
	5 ml	0,2 M α -Ketoglutarat pH 7,5
	10 ml	0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Diese Substratlösung wurde abgegossen und durch die Färbelösung ersetzt, in der die Gele bis zum Abschluß der Färbung bei 37°C verblieben.

Färbelösung:	150 mg	o-Dianisidin tetrazotiert
	75 ml	0,1 M Tris/HCl pH 7,5

ACP (verändert nach JAASKA 1978)

Nach 25 minütigem Umpuffern in gekühltem 0,1 M Acetat/HCl pH 5,0 erfolgte die Färbung bei 37°C im Wasserbad.

Färbelösung:	100 mg	β -Naphthylacidphosphat
	50 mg	o-Dianisidin tetrazotiert
	1 g	PVP-40
	50 mg	MgCl_2
	100 ml	0,05 M Acetat/HCl pH 5,0

Auswertung

Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte direkt nach der Färbung. Die Gele wurden zur Dokumentation in einer 70 % Ethanol/1% Glycerin-Lösung entwässert und zwischen Cellophanfolien getrocknet.

RAPD

DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung aus dem zu untersuchenden Pflanzenmaterial wurde gemäß der in 2.4.2 beschriebenen Schnellmethode nach EDWARDS et al. (1991) durchgeführt.

PCR-Reaktion

Die Amplifikation genomischer Sequenzen erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem Reaktionsvolumen von 20,1 µl nach ESCH (1994) unter Nutzung von Decamer-Oligonucleotiden mit zufälliger Sequenz aus den Kits M, N, O, P, Q, R, S und Z der Fa. Operon Technologies, Alameda:

93,3	mM	Tris/HCl pH 9
24,9	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
je 124	µM	dATP, dTTP, dGTP, dCTP
1	U	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (Eurogentec)
2,5	mM	MgCl ₂
15	ng	pro Primer
10-20	ng	genomische DNA

Der PCR-Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet, um Evaporation zu vermeiden. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Fa. Perkin Elmer Cetus unter folgenden Bedingungen:

40 Zyklen	1 min	92°C
	1 min	35°C
	2 min	72°C

Elektrophorese und Auswertung

Die Elektrophoresebedingungen und Methoden zur Auswertung entsprachen den in 2.4.2 aufgeführten Verfahren. Die PCR-Produkte wurden allerdings in einem 2 %igem Agarosegel aufgetrennt.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Faktorielle Kreuzungen

Die mittleren Trockenerträge der Hybriden und die daraus abgeleiteten allgemeinen Kombinationseignungen der Eltern sowie die spezifischen Kombinationseignungen der Hybriden sind für die drei faktoriellen Kreuzungen in den Tabellen 4.2, 4.3 und 4.4 aufgeführt. Der Trockenertrag ist oben links in den Tabellenfeldern und die Kombinationseignung in kursiver Schrift unten rechts dargestellt.

Tab. 4.2: Trockenerträge und Kombinationseignungen der Hybriden der FK I

TR <i>sca</i>	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	Mittelwert <i>gca</i>
11-9	4,26 <i>- 0,27</i>	4,06 <i>- 0,03</i>	4,94 <i>1,07</i>	3,82 <i>- 0,09</i>	2,77 <i>- 0,68</i>	3,97 <i>- 0,75</i>
10-1	5,25 <i>0,002</i>	4,80 <i>0,003</i>	4,58 <i>0,003</i>	4,35 <i>- 0,27</i>	4,44 <i>0,27</i>	4,68 <i>- 0,04</i>
8-1	6,11 <i>0,43</i>	5,14 <i>- 0,10</i>	4,74 <i>- 0,27</i>	5,02 <i>- 0,04</i>	4,58 <i>- 0,02</i>	5,12 <i>0,40</i>
6-9	5,64 <i>0,25</i>	5,15 <i>0,20</i>	3,96 <i>- 0,76</i>	4,77 <i>- 0,001</i>	4,63 <i>0,32</i>	4,83 <i>0,11</i>
2-3	5,16 <i>- 0,41</i>	5,06 <i>- 0,07</i>	4,87 <i>- 0,04</i>	5,35 <i>0,40</i>	4,62 <i>0,12</i>	5,01 <i>0,29</i>
Mittelwert <i>gca</i>	5,29 <i>0,56</i>	4,84 <i>0,12</i>	4,61 <i>- 0,11</i>	4,66 <i>- 0,06</i>	4,21 <i>- 0,51</i>	4,72

TR: Trockenertrag [kg/Parzelle]
sca: spezifische Kombinationseignung
gca: allgemeine Kombinationseignung

Tab. 4.3: Trockenerträge und Kombinationseignungen der Hybriden der FK II

TR <i>sca</i>	L 6	L 7	L 8	L 9	L 10	Mittelwert <i>gca</i>
11-9	3,11 0,07	3,52 0,06	3,43 - 0,02	2,85 - 0,42	3,50 0,31	3,28 - 0,87
10-1	4,29 0,10	4,48 - 0,14	4,48 - 0,12	4,78 0,35	4,15 - 0,19	4,44 0,28
8-1	3,64 - 0,42	4,70 0,21	4,48 0,003	4,42 0,12	4,31 0,10	4,31 0,15
9-9	4,35 0,10	4,73 0,06	4,47 - 0,19	4,37 - 0,11	4,54 0,14	4,49 0,34
1-9	4,16 0,15	4,25 - 0,19	4,75 0,33	4,32 0,07	3,80 - 0,36	4,26 0,10
Mittelwert <i>gca</i>	3,91 - 0,25	4,34 0,18	4,32 0,17	4,15 - 0,01	4,06 - 0,10	4,16

TR: Trockenertrag [kg/Parzelle]
sca: spezifische Kombinationseignung
gca: allgemeine Kombinationseignung

Tab. 4.4: Trockenerträge und Kombinationseignungen der Hybriden der FK III

TR <i>sca</i>	L 11	L 12	L 13	L 14	L 15	Mittelwert <i>gca</i>
11-9	3,90 - 0,27	5,40 0,99	3,99 - 0,34	3,68 - 0,20	4,19 - 0,18	4,23 - 0,53
10-1	4,78 - 0,01	4,26 - 0,77	5,16 0,21	4,90 0,40	5,16 0,17	4,85 0,08
8-1	5,61 0,49	5,05 - 0,31	5,38 0,10	5,00 0,17	4,87 - 0,45	5,18 0,41
7-8	4,84 0,32	5,01 0,25	4,75 0,07	4,27 0,04	4,05 - 0,67	4,58 - 0,18
4-4	4,40 - 0,52	5,01 - 0,15	5,05 - 0,03	4,22 - 0,41	6,25 1,13	4,99 0,22
Mittelwert <i>gca</i>	4,71 - 0,06	4,95 0,18	4,87 0,10	4,41 - 0,35	4,90 0,14	4,77

TR: Trockenertrag [kg/Parzelle]
sca: spezifische Kombinationseignung
gca: allgemeine Kombinationseignung

Tabelle 4.5 zeigt den relativen Trockenertrag der besten Hybriden der faktoriellen Kreuzungen im Vergleich zum Mittel der Standardsorten. Die Ergebnisse der Hybriden aus der ersten faktoriellen Kreuzung sind für die beiden Prüfjahre getrennt aufgeführt, da unterschiedliche Standardsorten verwendet wurden.

Tab. 4.5: Relativer Trockenertrag der besten Hybriden der drei faktoriellen Kreuzungen

Hybriden der FK I / 1996

Standardsorte/ Hybride	relativer Trocken- ertrag [%]
Synergy	107
Joker	90
Capitol	106
Lisabeth	98
8-1 x L 1	120
10-9 x L 1	119
2-3 x L 1	113
6-9 x L 1	113

Hybriden der FK I / 1999

Standardsorte/ Hybride	relativer Trocken- ertrag [%]
Artus	91
Life	98
Panther	111
8-1 x L 1	111
11-9 x L 3	106
6-9 x L 1	101
2-3 x L 4	91

Hybriden der FK II

Standardsorte/ Hybride	relativer Trocken- ertrag [%]
Mohican	95
Capitol	94
Joker	102
Life	109
9-9 x L 7	109
10-1 x L 9	110
1-9 x L 8	109
8 x L 7	108

Hybriden der FK III

Standardsorte/ Hybride	relativer Trocken- ertrag [%]
Artus	97
Life	101
Panther	101
4-4 x L 15	122
8-1 x L 11	109
11-9 x L 12	105
8-1 x L 13	105

Die relative Heterosis von zwölf Hybriden in Bezug auf das Elternmittel wird in Tabelle 4.6 gezeigt. Unter den Elternlinien ist deren Eigenleistung aufgeführt, oben links in den Tabellenfeldern ist der Trockenertrag der Hybriden dargestellt und unten rechts in

kursiver Schrift die relative Heterosis. Es war sowohl negative als auch positive Heterosis zu beobachten. Die drei besten Hybriden 2-3 x L 1, 8-1 x L 1 und 11-9 x L 3 zeigten eine Heterosis von 28 bis 60 %.

Tab. 4.6: Relative Heterosis in % (als Differenz zum Elternmittel)
von Hybriden der faktoriellen Kreuzungen I (1999)

TR <i>Heterosis [%]</i>	L 1	L 2	L 3
	3,55	4,39	4,06
11-9 2,53	2,93 - 3,62	3,42 - 1,16	5,23 60,39
10-1 3,82	3,87 4,98	3,98 - 3,17	3,71 5,84
8-1 3,61	5,56 55,31	4,13 3,25	3,73 2,87
2-3 2,81	4,06 27,67	4,15 15,28	3,8 10,48

TR: Trockenertrag [kg / Parzelle]

In den Varianzanalysen ergab sich bei allen drei faktoriellen Kreuzungen ein signifikanter Effekt sowohl der Mütter als auch der Väter (gca-Effekt) sowie eine signifikante Interaktion zwischen Müttern und Vätern (sca-Effekt) (Tabellen 4.7, 4.8 und 4.9). In den faktoriellen Kreuzungen I und II wurde ein hoch signifikanter Einfluß der Jahre, bzw. Orte festgestellt.

Tab. 4.7: Varianzanalytische Auswertung des Trockenertrags der Hybriden der FK I

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Mutter	4	4,1036	8,74***
Vater	4	3,0556	6,51***
Mutter*Vater	16	0,8154	1,74*
Jahr	1	85,5625	182,30***
Fehler	73	0,4694	

* signifikant bei $p < 0,05$ *** signifikant bei $p < 0,001$

Tab. 4.8: Varianzanalytische Auswertung des Trockenertrags der Hybriden der FK II

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Mutter	4	8,6649	35,20***
Vater	4	1,1348	4,61**
Mutter*Vater	16	0,4938	2,01*
Ort	2	35,7223	145,11***
Fehler	146	0,2462	

* signifikant bei $p < 0,05$ ** signifikant bei $p < 0,01$ *** signifikant bei $p < 0,001$

Tab. 4.9: Varianzanalytische Auswertung des Trockenertrags der Hybriden der FK III

Varianzursache	FG	MQ	F-Wert
Mutter	4	1,3589	24,03***
Vater	4	0,4728	8,36***
Mutter*Vater	16	0,6284	11,11***
Fehler	24	0,0566	

*** signifikant bei $p < 0,001$

Die Schätzwerte der Varianzen und der Heritabilität für den Trockenertrag sind in Tabelle 4.10 aufgeführt. Während in den faktoriellen Kreuzungen I und II mehr additive Varianz als Dominanzvarianz geschätzt wurde, hatte die Dominanzvarianz in den FK III den größten Anteil an der genotypischen Varianz.

Tab. 4.10: Schätzwerte der Varianzen und der Heritabilität für den Trockenertrag

Varianzen/Heritabilität-Ertrag	FK I	FK II	FK III
Additive Varianz (V_A)	0,3208	0,2270	0,0768
Dominanzvarianz (V_D)	0,1161	0,0505	0,3776
Genotypische Varianz (V_G)	0,4369	0,2775	0,4544
Heritabilität (h^2)	0,5808	0,7770	0,9219

4.3.2 Bestimmung der Auskreuzungsrate von Hybriden

Mit Hilfe der Isoenzymssysteme ACP und GOT wurde die Auskreuzungsrate von elf Hybriden der faktoriellen Kreuzungen I und II bestimmt. Die Eltern wurden zuvor auf Unterschiede im Isoenzymbandenmuster untersucht. Bei der Untersuchung der GOT zeigten die Väter L 3 und L 4 im Gegensatz zu den selbstinkompatiblen Müttern 2-3 und 6-9 zwei zusätzliche Banden in einem komplexen Bandenmuster (Abbildung 4.1a). Diese Banden waren auch in den Hybriden zu finden nicht aber in den Selbstungsnachkommen der Mutterlinie, den ‚sibs‘, wobei die schnellere Banden meist nur sehr schwach ausgeprägt war (Abbildung 4.1b).

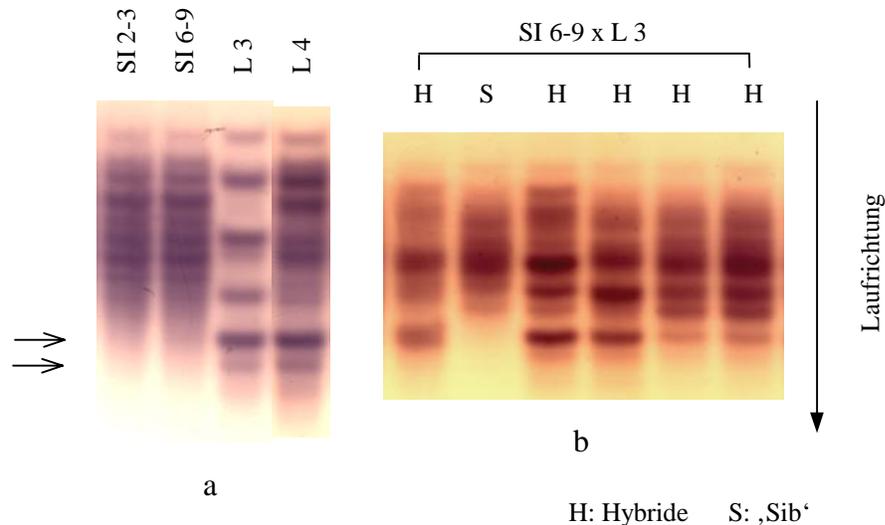


Abb. 4.1: Bandenmuster nach Bestimmung des Isoenzym GOT

Bei der Bestimmung der ACP zeigten die Väter L 1, L 6 und L 7 drei Banden gleicher Intensität. Die Linien 9-9, 10-1 und 11-9 hatten abweichende Bandenmuster, die Linien 9-9 und 10-1 zeigten nur eine Bande, die der langsamsten Bande der Väter entsprach, die Linie 11-9 hatte zwei zusätzliche noch langsamere Banden (Abbildung 4.2). Die Hybriden zwischen den selbstinkompatiblen Linien und den selbstkompatiblen

Bestäubern hatten demnach immer auch die zwei zusätzlichen Banden väterlichen Ursprungs und konnten so zweifelsfrei von ‚sibs‘ unterschieden werden (Abbildung 4.2).

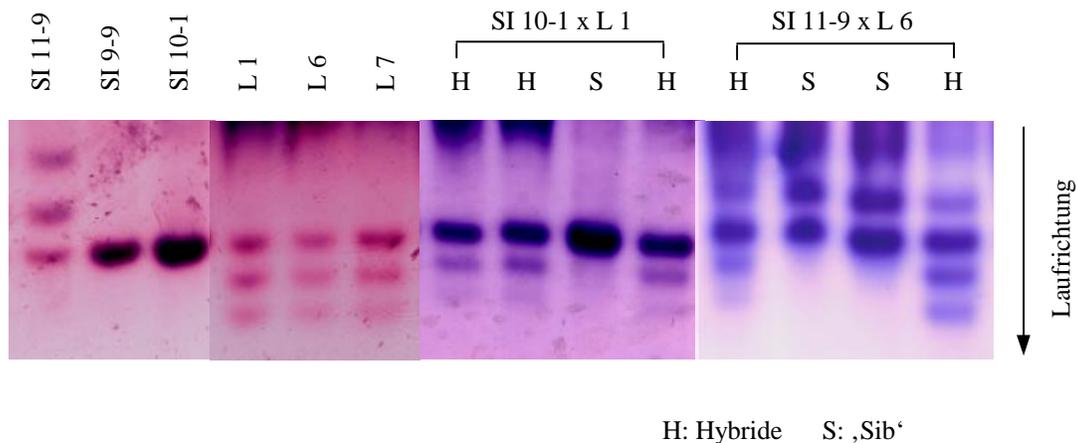


Abb. 4.2: Bandenmuster nach Untersuchung des Isoenzym ACP

Die Auskreuzungsrate der Hybride 8-1 x L 1 mit der besten Ertragsleistung in den faktoriellen Kreuzungen I konnte nicht mit Hilfe von Isoenzymen bestimmt werden. Deshalb wurden die beiden Elternlinien mit RAPD-Markern untersucht. Nach Amplifikation genomischer DNA mit dem Operon-Primer Z 11 konnten Unterschiede zwischen den Eltern festgestellt werden. Der Vater und somit auch die Hybriden zeigten zwei zusätzliche Bande (Abbildung 4.3).

Die Werte der Auskreuzungsraten der untersuchten Hybriden sind in Tabelle 4.11 aufgeführt.

4.4 Diskussion

Die varianzanalytische Auswertung des Trockenertrages zeigte in allen faktoriellen Kreuzungen signifikante gca- und sca-Effekte (Tabellen 4.7, 4.8 und 4.9, S. 108, 109). Bei der Schätzung der genotypischen Varianz ergab sich für die faktoriellen Kreuzungen I und II ein höherer Anteil an additiver als an Dominanzvarianz (Tabelle 4.10, S. 109). In der FK II war nur ein geringer Anteil an Dominanzvarianz vorhanden. Im Gegensatz dazu zeigte die faktorielle Kreuzung III einen sehr hohen Anteil von Dominanzvarianz an der genotypischen Varianz. Die Heritabilität war in der FK III mit 0,9219 ungewöhnlich hoch. Diese Überschätzung der genotypischen Varianz, insbesondere der Dominanzvarianz ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß die faktorielle Kreuzung III nur in einem Jahr und an einem Ort geprüft wurden. Die FK I und II, die in mehreren Jahren, bzw. an mehreren Orten geprüft wurden, zeigten eine geringere Heritabilität von 0,5808 und 0,777. Die Heritabilität in der FK II ist jedoch ebenfalls relativ hoch. Diese faktorielle Kreuzung zeigte außerdem eine geringe Dominanzvarianz. Die Ergebnisse der FK II lassen vermuten, daß auch in diesem Fall ungünstige Versuchsbedingungen zu Fehlschätzungen geführt haben könnten. Nur eine Prüfung an vielen Orten in mehreren Jahren läßt annähernd exakte Schätzungen der genetischen Varianzen zu.

BRANDLE und MCVETTY (1989) fanden in diallelen Kreuzungen zwischen Linien, die von drei Rapsorten abstammten, lediglich signifikante gca-Effekte. Trotz fehlender spezifischer Kombinationseignung stellten sie eine Heterosis von bis zu 20 % in Bezug auf den besten Elter fest. Bei Untersuchungen von Rapslinien verschiedener geographischer Herkunft beruhte die Variabilität innerhalb einer Herkunftsgruppe in der Hauptsache auf additiven Effekten, in der gemischten Gruppe waren auch die sca-Effekte signifikant und annähernd so groß wie die gca-Effekte (LEFORT-BUSON et al. 1987). GRANT und BEVERSDORF (1985) fanden in Hybriden zwischen kanadischen und europäischen Linien ebenfalls signifikante sca-Effekte jedoch keine signifikanten gca-Effekte.

Die Heterosis für den Trockenertrag wurde in der vorliegenden Arbeit nur für einige Hybriden geschätzt (Tabelle 4.6, S. 108). Die beiden Hybriden mit der größten Heterosis von 55 % (8-1 x L 1) bzw. 60 % (11-9 x L 3) hatten auch eine hohe spezifische

Kombinationseignung. Die Linie 8-1 zeigte über die Jahre hinweg immer eine gute allgemeine Kombinationseignung, sie hatte in den faktoriellen Kreuzungen I und III die höchste gca von allen Müttern, in den FK II war sie an dritter Stelle. Die Hybriden mit dieser Linie zeigten Mehrerträge von bis zu 20 % im Vergleich zu den Standardsorten. Die hohe Heterosis der Linie 11-9 in Kombination mit L 3 ist um so bemerkenswerter, als daß diese Linie in allen faktoriellen Kreuzungen die schlechteste gca von sämtlichen Linien hatte. In der richtigen Kombination konnte selbst diese Linie Hybriden mit akzeptablen Erträgen hervorbringen. In den FK I (1999) zeigte eine Hybride mit 11-9 5 % und in den FK III 6 % Mehrertrag im Vergleich zum Standardmittel. Als Standardsorten dienten im jeweiligen Prüfljahr aktuelle Hochleistungssorten, darunter viele Hybridsorten, die mit Hilfe der männlichen Sterilität hergestellt worden sind (Synergy, Joker, Artus, Panther und Life). Die hier getesteten Hybriden, die mit selbstinkompatiblen Linien produziert wurden, welche nicht der Linienleistung des aktuellen Zuchtmaterials entsprachen, waren also in zwei faktoriellen Kreuzungen mindestens so gut wie die besten Standardsorten (FK I/99 und FK II) und übertrafen diese in den übrigen beiden faktoriellen Kreuzungen sogar um 13 bis 21 % (Tabelle 4.5, S. 107). Auch was die Qualitätseigenschaften angeht zeigten die SI-Hybriden eine sehr gute Leistung. Sie entsprachen im Öl- und Proteingehalt dem Niveau der Standardsorten. Die Glucosinolatwerte der Mehrzahl der Hybriden lagen unter 18 µmol/g.

In der Literatur wird vielfach von Heterosis für den Kornertrag in Winter- und Sommerraps berichtet (BARTKOWIAK-BRODA 1983, SERNYK und STEFANSSON 1983, LÉON 1991, RUDLOFF 1991 und BANKS und BEVERSDORF 1994). Insbesondere Hybridkombinationen deren Eltern eine gewisse genetische Distanz aufweisen, zeigen einen hohen Grad an Heterosis. ALI et al. (1995) stellten ausgehend von 30 Winterrapsorten eine positive, hoch signifikante Korrelation zwischen der Heterosis des Samenertrages und der genetischen Distanz der Eltern, basierend auf morphologischen Ertragsmerkmalen, fest. Die größte Heterosis betrug 33 %. Auch DIERS et al. (1996) fanden eine signifikante Korrelation sowohl der genetischen Distanz, basierend auf RFLP-Markern, als auch der allgemeinen Kombinationseignung mit dem Ertrag von Winterraps. Es wurden außerdem mehrfach Linien unterschiedlicher geographischer Herkunft untersucht. SHIGA (1976) beobachtete, daß Kreuzungen zwischen japanischen

und europäischen Linien einen höheren Ertrag zeigten als Kreuzungen innerhalb japanischen Pflanzenmaterials. GRANT und BEVERSDORF (1985) fanden ähnliche Ergebnisse in Sommerrapsmaterial: Hybriden zwischen kanadischen und europäischen Linien waren ertragreicher als Hybriden kanadischer Linien. LEFORT-BUSON et al. (1987) untersuchten diallele Kreuzungen innerhalb europäischer und asiatischer Herkunftsgruppen und faktorielle Kreuzungen zwischen diesen Gruppen. Die Hybriden der Linien verschiedener geographischer Herkunft waren den anderen Hybriden im Samenertrag überlegen und zeigten eine Heterosis von bis zu 45 %.

Hohe Auskreuzungsraten sind grundlegend für leistungsfähige Hybriden. GOWERS (1975) stellte bei Rapsybriden, die mit Hilfe der Selbstinkompatibilität hergestellt wurden, Auskreuzungsraten von 97,4 bis 99,6 % fest. FU et al. (1995) fanden ähnlich hohe Werte von mehr als 96 % und WERNER et al. (1995) von 90 bis 97 %. Die Linie 8-1 zeigte in den vorliegenden Untersuchungen in Kombination mit L 1 eine Auskreuzungsrate von annähernd 90 % (Tabelle 4.11, S. 112). Eine besonders hohe Auskreuzungsrate von 99 % hatte die Hybride 6-9 x L 3. Die untersuchten Hybriden der FK II hatten insgesamt niedrigere Auskreuzungsraten als die der FK I. Auffallend schlecht waren die Hybriden mit 11-9 als Mutter. Sie enthielten zu ca. 70 % ‚sibs‘. Unter Berücksichtigung des normalerweise auftretenden Fremdbefruchtungsanteils von selbstkompatiblen Raps von ca. 33 % (BECKER 1992) scheint durch die Selbstinkompatibilität demnach kaum eine Erhöhung des Fremdbefruchtungsanteils stattgefunden zu haben. Auch die in den FK I untersuchte Hybride mit 11-9 hatte die schlechteste Auskreuzungsrate. Diese Linie hat wahrscheinlich eine weniger stark ausgeprägte Selbstinkompatibilität als die übrigen selbstinkompatiblen Linien. In den Untersuchungen zur Selektion von Genotypen mit stabil ausgeprägter Selbstinkompatibilität zeigte eine der 11-9-Linien im Topcross als einzige eine signifikant niedrigere Auskreuzungsrate (Abschnitt 2.3, Tabelle 2.15, S. 58). Die übrigen Linien hatten unabhängig von der Abstammung von Pflanzen mit hohem bzw. niedrigem Samenansatz eine außerordentlich hohe Auskreuzungsrate von 95 bis 100 %. Das ist ein Hinweis darauf, daß Linien, die rezessiv vererbte S-Allele tragen, durchaus zur Herstellung von Hybriden mit hoher Auskreuzungsrate dienen können. Ein ausreichendes Pollenangebot scheint eine Grundvoraussetzung für hohe Auskreuzungsraten zu sein. In diesem Zusammenhang wäre ein Mischanbau der

Hybrideltern die ideale Produktionsweise. Ein solcher ließe sich mit Linien, die unterschiedliche S-Allele tragen, verwirklichen. KOTT (1995) schlägt die Nutzung von sich gegenseitig abschwächenden S-Allelen der beiden verschiedenen S-Loci der Ausgangsarten vor. Die Selbstinkompatibilität in diesen interspezifischen Hybriden wäre folglich abgeschwächt und der Grad der Selbstung der Hybriden erhöht, was den Ertrag auch bei schlechter Witterung sichert. Die Abschwächung zwischen unterschiedlichen S-Allelen wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet und könnte bei der Herstellung weiterer Hybriden berücksichtigt werden.

In den Untersuchungen der faktoriellen Kreuzungen wurden Linien mit hoher allgemeiner Kombinationseignung gefunden. Insbesondere 8-1 war eine der leistungsfähigsten selbstinkompatiblen Linien. Sie zeigte in Kombination mit L 1 eine außerordentliche Heterosis von 55 % und Spitzenertäge von bis zu 120 % im Vergleich zu aktuellen Hochleistungssorten. Diese Linie hatte eine stabil ausgeprägte Selbstinkompatibilität, die sich in einer hohen Auskreuzungsrate von 90 % äußerte. Die vielversprechenden Ergebnisse mit dieser Linie sind ein Beleg dafür, daß sich auch mit rezessiven S-Allelen Linien entwickeln lassen, die eine stabile Selbstinkompatibilität zeigen und mit denen es möglich ist, leistungsstarke Hybriden mit der Selbstinkompatibilität als Bestäubungsmechanismus herzustellen.

4.5 Zusammenfassung

Es wurden 75 Einfachhybriden in drei faktoriellen Kreuzungen hergestellt und in Leistungsprüfungen in mehreren Jahren und an mehreren Orten getestet. Selbstinkompatible Mutterlinien wurden mit selbstkompatiblen Bestäubern kombiniert. In Folge der in den Hybriden bestehenden Dominanz der Selbstkompatibilität über die Selbstinkompatibilität, waren diese vollkommen selbstfertil.

Die besten Hybriden hatten einen Mehrertrag von 10 bis 20 % im Vergleich zu aktuellen Hochleistungssorten. Bei zwei Hybriden war eine Heterosis von 55 und 60 % vorhanden. In allen drei faktoriellen Kreuzungen bestanden sowohl signifikante additive Effekte als auch signifikante Dominanzeffekte für den Ertrag. Die Auskreuzungsraten einiger

Hybriden wurden mit Hilfe von Isoenzym- und RAPD-Markern bestimmt und erreichten Höchstwerte von 80 bis 99 %.

Besonders hervorzuheben unter den selbstinkompatiblen Linien ist die Linie 8-1. Sie hatte in allen drei faktoriellen Kreuzungen eine außerordentlich gute allgemeine Kombinationseignung. In Verbindung mit dem Vater L 1 zeigte sie einen Mehrertrag von bis zu 20 % gegenüber aktuellen Sorten, eine Heterosis von 55 % und eine Auskreuzungsrate von annähernd 90 %.

Anhand dieser vielversprechenden Ergebnisse hinsichtlich der Heterosis und der Auskreuzungsrate von Testhybriden wird die Eignung der rezessiv vererbten Selbstinkompatibilität als Bestäubungsmechanismus bei der Herstellung hochleistungsfähiger Rapshybridsorten bestätigt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Selbstinkompatibilität in *Brassica napus* hinsichtlich ihrer Nutzung in der Hybridzüchtung. Dabei wurde die Auslese neuer S-Allele, die Selektion auf stabile Ausprägung der Selbstinkompatibilität und die markergestützte Selektion selbstinkompatibler Linien untersucht. Desweiteren wurden Methoden zur Vermehrung von selbstinkompatiblen Inzuchtlinien geprüft und Testhybriden auf ihre Leistung und ihre Auskreuzungsrate hin analysiert.

In zwei Jahren konnten drei selbstinkompatible Linien aus aktuellem Zuchtmaterial mit 00-Qualität ausgelesen werden. Die selbstinkompatiblen Pflanzen traten zu einer Häufigkeit von ca. 0,03 % auf. Bei zwei selbstinkompatiblen Linien konnte eine rezessive Vererbung in Bezug auf die Selbstkompatibilität nachgewiesen werden. Die selektierten selbstinkompatiblen Linien wurden mit vorhandenen Linien diallel gekreuzt. Dabei wurde festgestellt, daß die sieben geprüften Linien vier verschiedene S-Allele hatten. In Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen selbstinkompatiblen Linien zeigte sich ein modifizierender Einfluß des genetischen Hintergrundes. In Kombination mit einer Linie, die ein dominantes S-Allel hatte, war gegenseitige Abschwächung der Allele zu finden. Testhybriden, die in einer Dreiwegkreuzung unter Nutzung drei verschiedener S-Allele, darunter das dominante Allel, hergestellt wurden, waren zu 75 % selbstfertil.

Die Ausprägung der Selbstinkompatibilität wurde von Umweltfaktoren beeinflusst. In einer Topcrossanlage hatten selbstinkompatible Linien unabhängig von ihrer Abstammung von Pflanzen mit geringem bzw. hohem Samenansatz eine außerordentlich hohe Auskreuzungsrate von annähernd 100 %.

Es gelang mit Hilfe von in der Literatur beschriebenen Primern, welche von hochkonservierten S-Locus-Sequenzen verschiedener *Brassica*-Arten abgeleitet waren, einen kodominanten CAPS-Marker zu etablieren, der absolut mit der Selbstinkompatibilität gekoppelt ist. Ein weiterer dominant/rezessiver CAPS-Marker zeigte ebenfalls eine 100 %ige Kopplung. Mit Hilfe solcher molekularer Marker lassen sich Rückkreuzungsprogramme mit selbstinkompatiblen Linien ökonomisch durchführen.

Unter Nutzung des kodominanten CAPS-Markers konnten zudem drei von vier untersuchten S-Allelen auf molekulargenetischem Niveau unterschieden werden.

Um selbstinkompatible Linien für die Nutzung in der Hybridzüchtung zu vermehren, muß deren Selbstinkompatibilität zeitweise überwunden werden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Methoden einer Kochsalz- und einer Kohlendioxidbehandlung führten beide zu einer signifikanten Erhöhung des Samenansatzes. Zur Vermehrung selbstinkompatibler Linien in begrenztem Umfang erscheint eine Bestäubung von Hand nach manueller NaCl-Applikation auf die Narbe geeignet. Zur Produktion von Hybridsorten werden größere Mengen an Saatgut benötigt. In einem Freilandversuch in isolierter Lage zeigte eine selbstinkompatible Linie unabhängig von einer Salzspritzung einen hohen Samenansatz. In Abwesenheit von Fremdpollen neigte diese Linie demnach zu Pseudokompatibilität. Bei hohem Angebot an Fremdpollen wie im Topcross war die Selbstinkompatibilität jedoch stark ausgeprägt, die resultierenden Hybriden hatten eine sehr hohe Auskreuzungsrate.

In faktoriellen Kreuzungen wurden 75 Testhybriden hergestellt und in Leistungsprüfungen in mehreren Jahren und an mehreren Orten untersucht. Es handelte sich dabei um Einfachhybriden, wobei rezessiv selbstinkompatible Mutterlinien mit selbstkompatiblen Bestäubern kombiniert worden waren. In Folge der Dominanz der Selbstkompatibilität über die Selbstinkompatibilität waren die Hybriden vollkommen selbstfertil. Die besten Hybriden hatten einen Mehrertrag von 10 bis 20 % im Vergleich zu aktuellen Hochleistungssorten. Bei zwei Hybriden war eine Heterosis von 55 und 60 % vorhanden. Die Auskreuzungsraten einiger Hybriden wurden mit Hilfe von Isoenzym- und RAPD-Markern bestimmt und erreichten Höchstwerte von 80 bis 99 %. Besonders hervorzuheben unter den selbstinkompatiblen Linien ist die Linie 8-1. Sie hatte in allen drei faktoriellen Kreuzungen eine außerordentlich gute allgemeine Kombinationseignung. In Verbindung mit dem Vater L 1 zeigte sie einen Mehrertrag von bis zu 20 % gegenüber aktuellen Sorten, eine Heterosis von 55 % und eine Auskreuzungsrate von annähernd 90 %. Verschiedene Systeme zur Herstellung von Hybriden werden diskutiert. Von großem Vorteil erscheint die Produktion von Mehrweghybriden. Aufgrund der hohen Vermehrungsrate von Raps werden für diese Produktionsweise geringere Mengen an Saatgut der Hybrideltern benötigt als zur

Herstellung von Einfachhybriden. Die selbstinkompatiblen Linien könnten demnach durch Salzbehandlung im Gewächshaus vermehrt werden. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß es möglich ist, verschiedene S-Allele aus hochleistungsfähigem Rapszuchtmaterial zu selektieren. Unterschiedliche Selbstinkompatibilitätsallele können zur Produktion von Mehrweghybriden dienen, wobei sich gegenseitig abschwächende Allele von großem Vorteil sind, da bei ihrer Nutzung selbstfertile Hybriden entstehen. Nach Testkreuzung unter Verwendung sich gegenseitig abschwächender S-Allele wurden Hybriden gewonnen, deren Fertilität zu 75 % wiederhergestellt war. Die vielversprechenden Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen bekräftigen die Eignung der rezessiv vererbten Selbstinkompatibilität als Bestäubungsmechanismus bei der Herstellung leistungsfähiger Rapsybridsorten.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALI, M., L. O. COPELAND, S. G. ELIAS und J. D. KELLY 1995: Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in winter canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **91**, 118-121.
- BANKS, P. R. und W. D. BEVERSDORF 1994: Self-incompatibility as a pollination control mechanism for spring oilseed rape, *Brassica napus* L. *Euphytica* **75**, 27-30.
- BARTKOWIAK-BRODA, I. 1983: Evaluation of heterosis and combining ability in some inbred lines of swede rape free of erucic acid. *Plant Breed. Abstr.* **53**, 6634.
- BATEMAN, A. J. 1955: Self-incompatibility systems in angiosperms (III). Cruciferae. *Heredity* **9**, 52-68.
- BECKER, H. C. 1993: Pflanzenzüchtung. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- BECKER, H. C., C. DAMGAARD und B. KARLSSON 1992: Environmental variation for outcrossing rate in rapeseed (*Brassica napus*). *Theor. Appl. Genet.* **84**, 303-306.
- BESCHORNER, M. 1993: Selbstinkompatibilität in natürlichen und resynthetisierten Rapsformen (*Brassica napus* L.). Dissertation, Freie Universität Berlin.
- BESCHORNER, M., P. PLÜMPER und W. ODENBACH 1995: Analysis of self-incompatibility interactions in 30 resynthesized *Brassica napus* lines. I. Fluorescence microscopic studies. *Theor. Appl. Genet.* **90**, 665-670.
- BOCKHOLT, H., Deutsche Saatveredelung Bremen-Lippstadt GmbH.
- BOYES, D. C. und J. B. NASRALLAH 1993: Physical linkage of the SLG and SRK genes at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 369-373.
- BOYES, D. C., C. H. CHEN, T. TANTIKANJANA, J. J. ESCH, M. E. NASRALLAH und J. B. NASRALLAH 1991: Isolation of a second S locus related cDNA from *Brassica oleracea*: Genetic relationships between the S locus and two related loci. *Genetics* **127**, 221-228.

- BRACE, J., D. J. OCKENDON und G. J. KING 1993: Development of a method for the identification of S alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases. *Sex. Plant. Reprod.* **6**, 133-138.
- BRACE, J., G. J. KING und D. J. OCKENDON 1994: A molecular approach to the identification of S alleles in *Brassica oleracea*. *Sex. Plant. Reprod.* **7**, 203-208.
- BRANDLE, J. E. und P. B. E. MCVETTY 1989: Heterosis and combining ability in hybrids derived from oilseed rape cultivars and inbred lines. *Crop Science* **29**, 1191-1194.
- CAMARGO, L. E. A., L. SAVIDES, G. JUNG, J. NIENHUIS und T. C. OSBORN 1997: Location of the self-incompatibility locus in an RFLP and RAPD map of *Brassica oleracea*. *The Journal of Heredity* **88** (1), 57-60.
- CARAFA, A. M. und G. CARRATU 1997: Stigma treatment with saline solutions: A new method to overcome self-incompatibility in *Brassica oleracea* L. *Journal of Horticultural Science* **72** (4), 531-535.
- CHARLESWORTH, D. und P. AWADALLA 1998: Flowering plant self-incompatibility: the molecular population genetics of *Brassica* S-loci. *Heredity* **81**, 1-9.
- CHEN, C.-H. und J. B. NASRALLAH 1990: A new class of S sequences defined by a pollen recessive self-incompatibility allele of *Brassica oleracea*. *Mol. Gen. Genet.* **222**, 241-248.
- DIERS, B. W., P. B. E. MCVETTY und T. C. OSBORN 1996: Relationship between heterosis and genetic distance based on restriction fragment length polymorphism markers in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Crop Science* **36**: 79-83.
- DÖRNTE, J., Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben.
- DOUGHTY, J., S. DIXON, S. J. HISCOCK, A. C. WILLIS, I. A. P. PARKIN und H. G. DICKINSON 1998: PCP-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *The Plant Cell* **10**, 1333-1347.

- DWYER, K. G., M. A. BALENT, J. B. NASRALLAH und M. E. NASRALLAH 1991: DNA sequences of self-incompatibility genes from *Brassica campestris* and *Brassica oleracea*: Polymorphism predating speciation. *Plant Mol. Biol.* **16**, 481-486.
- EDWARDS, K., C. JOHNSTONE und C. THOMPSON (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19** (6) 1349
- ESCH, E. 1994: Untersuchungen zur Selbstinkompatibilität bei *Brassica napus* L. im Hinblick auf die Züchtung von Hybridsorten. Dissertation, Universität Hannover.
- ESCH, E. und G. WRICKE 1995: Investigations on self-incompatibility in *Brassica napus* L. towards hybrid breeding. Proceedings of the **9th** International Rapeseed Congress, Cambridge, 83-85.
- FU, T. D., P. SI, X. YANG und G. YANG 1992: Overcoming self-incompatibility of *Brassica napus* by salt (NaCl) spray. *Plant Breeding* **109**, 255-258.
- FU, T. D., X. N. YANG, G. S. YANG und C. Z. MA 1995: Heterosis breeding of self-incompatibility in *Brassica napus*. Proc. **9th** Int. Rapeseed Cong., Cambridge, 86-88.
- GAUDE, T. und C. DUMAS 1987: Molecular and cellular events of self-incompatibility. *Int. Rev. Cytol.* **107**, 333-366.
- GEMMELL, D. J., J. E. BRADSHAW, T. HODGKIN und S. GOWERS 1989: Self-incompatibility in *Brassica napus*: Seed set on crossing 19 self-incompatible lines. *Euphytica* **42**, 71-77.
- GERTZ, A. 1991: Breeding hybrid varieties in oilseed rape *Brassica napus* using self-incompatibility. Proc. **8th** Int. Rapeseed Cong., Saskatoon, 113-116.
- GORING, D. R. und S. J. ROTHSTEIN 1992: The S locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell* **4**, 1273-1281.

- GORING, D. R., T. L. GLAVIN, U. SCHAFER und S. J. ROTHSTEIN 1993: An S receptor kinase gene in self-compatible *Brassica napus* has a 1 bp deletion. *The Plant Cell* **5**, 531-539.
- GOWERS, S. 1975: Methods of producing F₁ hybrid swedes (*Brassica napus* ssp. *rapifera*). *Euphytica* **24**, 537-541.
- GOWERS, S. 1989: Self-incompatibility interactions in *Brassica napus*. *Euphytica* **42**, 99-103.
- GRANT, I. und W. D. BEVERSDORF 1985: Heterosis and combining ability estimates in spring-planted oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Can. J. Genet. Cytol.* **27**, 472-478.
- GU, T., M. MAZZURCO, W. SULAMAN, D. D. MATIAS und D. R. GORING 1998: Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 382-387.
- HARUTA, T. 1962: Studies on the genetics of self- and cross-compatibility in cruciferous vegetables. Res. Bull. No. 2, Takii Pl. Breeding Exp. Sta., Kyoto, Japan. (zitiert in WALLACE 1979b)
- HATAKEYAMA, K., M. WATANABE, T. TAKASAKI, K. OJIMA und K. HINATA 1998: Dominance relationships between S alleles in self-incompatible *Brassica campestris* L. *Heredity* **80**, 241-247.
- HINATA, K. und K. OKASAKI 1986: Role of stigma in the expression of self-incompatibility in crucifers in view of genetic analysis. In: D. L. Mulcahy, G. B. Mulcahy und E. Ottaviano: *Biotechnology and ecology of pollen*. Springer-Verlag, New York, 185-190.
- HINATA, K., K. OKAZAKI und T. NISHIO 1983: Gene analysis of self-compatibility in *Brassica campestris* var. yellow sarson (a case of recessive epistatic modifier). *Proc. 6th Int. Rapeseed Conf.*, Paris, 354-359.

- HODGKIN, T. 1978: The inheritance of partial self-compatibility in *Brassica oleracea* L.: Results from a half diallel homozygous for a highly recessive S allele. *Theor. Appl. Genet.* **53**, 81-87.
- HODGKIN, T. 1986: Self-incompatibility reactions in a synthetic *Brassica napus* line. *Eucarpia Cruciferae Newsletter* **11**, 77-78.
- HORSTMANN, V. 2000: PCR-RFLP zur Unterscheidung von Selbstinkompatibilitäts-allelen in *Brassica*-Arten. Diplomarbeit, Abteilung Angewandte Genetik, Universität Hannover.
- IBELGAUBTS, H. 1990: Gentechnologie von A bis Z. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- IKEDA, S., J. B. NASRALLAH, R. DIXIT, S. PREISS und M. E. NASRALLAH 1997: An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science* **276**, 1564-1566.
- IWANO, M., K. SAKAMOTO, G. SUZUKI, M. WATANABE, S. TAKAYAMA, K. FUKUI, K. HINATA und A. ISOGAI 1998: Visualisation of a self-incompatibility gene in *Brassica campestris* L. by multicolor FISH. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 751-757.
- JAASKA, V. E. 1978: Electrophoretic study of acid phosphatase isoenzymes in the grass genus *Aegilops* L. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **172**, 133-153.
- JAASKA, V. E. 1981: Genetic polymorphism of aspartate aminotransferase in rye species. *Soviet Genetics* **17**, 372-379.
- JOHNSON, A. G. und J. BLYTON-CONWAY 1976: Inbred lines with dominant incompatibility alleles for use as parents of F₁ hybrid Brussels sprouts. *Euphytica* **25**, 175-183.
- KAMISUGI, Y., S. NAKAYAMA, C. M. O'NEIL, R. J. MATHIAS, M. TRICK und K. FUKUI 1998: Visualization of the *Brassica* self-incompatibility S locus on identified oilseed rape chromosomes. *Plant Molecular Biology* **38**, 1081-1087.

- KHO, Y. O. und J. BAËR 1968: Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* **17**, 298-302.
- KOTT, L. S. 1995: Hybrid production systems based on self-incompatibility in oilseed *Brassica*. Proc. **9th** Int. Rapeseed Cong., Cambridge, 73-78.
- KRIETE, G., K. NIEHAUS, A. M. PERLICK, A. PÜHLER und I. BROER 1996: Male sterility in transgenic tobacco plants induced by tapetum-specific deacetylation of the externally applied non-toxic compound N-acetyl-L-Phosphinotricin. *The Plant Journal* **9** (6), 809-818.
- KUÇERA, V., M. VYVADILOVÁ, D. TOMÁŠKOVÁ 1995: Development of self-incompatible lines of winter rape by means of doubled haploid system. Proc. **9th** Int. Rapeseed Cong., Cambridge, 89-91.
- KUSABA, M., T. NISHIO, Y. SATTA, K. HINATA und D. OCKENDON 1997: Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparisons of class I SLG alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implications for the evolution and recognition mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 7673-7678.
- LALONDE, B. A., M. E. NASRALLAH, K. G. DWYER, C. H. CHEN, B. BARLOW und J. B. NASRALLAH 1989: A highly conserved *Brassica* gene with homology to the S locus specific glycoprotein structural gene. *Plant Cell* **1**, 249-258.
- LEFORT-BUSON, M., B. GUILLOT-LEMOINE und Y. DATÉE 1987: Heterosis and genetic distance in rapeseed (*Brassica napus* L.): crosses between European and Asiatic selfed lines. *Genome* **29**, 413-418.
- LÉON, J. 1991: Heterosis and mixing effects in winter oilseed rape. *Crop Science* **31**, 281-284.
- LEWIS, L. J. und D. L. WOODS 1993: Field performance of self-compatible and an equal proportion mixture of self-compatible and self-incompatible summer rape lines at two Alberta locations in 1989. *Can. J. Plant. Sci.* **73**, 829-833.
- LÖPTIEN, H., Marner Gemüse-Zucht-Genossenschaft Saaten AG.

- MACKAY, G. R. 1977a: The introgression of S alleles into forage rape, *Brassica napus* L. from turnip, *Brassica campestris* L. ssp. *rapifera*. *Euphytica* **26**, 511-519.
- MACKAY, G. R. 1977b: A diallel cross method for the recognition of S allele homozygotes in turnip, *Brassica campestris* L. ssp. *rapifera*. *Heredity* **38**, 201-208.
- MARIANI, C., M. DEBEUCKELEER, J. TRUETTNER, J. LEEMANS und R. B. GOLDBERG 1990: Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* **347**, 737-741.
- MARIANI, C., V. GOSSELE, M. DEBEUCKELEER, M. DEBLOCK, R. B. GOLDBERG, W. DEGREEF und J. LEEMANS 1992: A chimaeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* **357**, 384-387.
- MARSHALL, P., M.-C. MARCHAND, Z. LISIECZKO und B. S. LANDRY 1994: A simple method to estimate the percentage of hybridity in canola (*Brassica napus*) F₁ hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **89**, 853-858.
- MATSUBARA, S. 1984: Overcoming the self-incompatibility of *Raphanus sativus* by application of plant hormones, amino acids and vitamins and by temperature treatment of pollen. *Euphytica* **33**, 113-121.
- MICHAELS, S. D. und R. M. AMASINO 1998: A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *The Plant Journal* **14** (3), 381-385.
- MONTEIRO, A. A., W. A. GABELMAN und P. H. WILLIAMS 1988: Use of sodium chloride solution to overcome self-incompatibility in *Brassica campestris*. *HortScience* **23** (5), 876-877.
- MÖHRING, S. 1996: Untersuchungen zur Vererbung der Selbstinkompatibilität in *Brassica napus* nach Rückkreuzung mit *Brassica campestris*. Diplomarbeit, Abteilung Angewandte Genetik, Universität Hannover.
- NAKANISHI, T. und K. HINATA 1975: Self-seed production by CO₂ gas treatment in self-incompatible cabbage. *Euphytica* **24**, 117-120.

- NASRALLAH, J. B. 1997: Evolution of the *Brassica* self-incompatibility locus: A look into S Locus gene polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 9516-9519.
- NASRALLAH, J. B. und M. E. NASRALLAH 1997: Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. The Plant Cell **5**, 1325-1335.
- NASRALLAH, J. B., T. H. KAO, M. L. GOLDBERG und M. E. NASRALLAH 1985: A cDNA clone encoding an S locus specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. Nature **318**, 263-267.
- NASRALLAH, J. B., T. NISHIO und M. E. NASRALLAH 1991: The self-incompatibility genes of *Brassica*: Expression and use in genetic ablation of floral tissues. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **42**, 393-422.
- NASRALLAH, M. E. 1974: Genetic control of quantitative variation in self-incompatibility proteins detected by immunodiffusion. Genetics **76**, 45-50.
- NASRALLAH, M. E. und D. H. WALLACE 1968: The influence of modifier genes on the intensity and stability of self-compatibility in cabbage. Euphytica **17**, 495-503.
- NASRALLAH M. E., J. T. BARBER und D. H. WALLACE 1970: Self-incompatibility proteins in plants: Detection, genetics and possible mode of action. Heredity **25**, 23-27.
- NEFF, M. M., J. D. NEFF, J. CHORY und A. E. PEPPER 1998: dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. The Plant Journal **14** (3), 387-392.
- DENETTANCOURT, D. 1977: Incompatibility in Angiosperms volume 3 of Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- NIKURA, S. und S. MATSUURA 1998: Identification of self-incompatibility alleles (S) by PCR-RFLP in radish (*Raphanus sativus* L.). Euphytica **102**, 379-384.
- NISHIO T. und K. HINATA 1977: Analysis of S specific proteins in stigma of *Brassica oleracea* L. by isoelectric focusing. Heredity **38**, 391-396.

- NISHIO, T., M. KUSABA, M. WATANABE und K. HINATA 1996: Registration of S alleles in *Brassica campestris* L. by the restriction fragment sizes of SLGs. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 388-394.
- NISHIO, T., M. KUSABA, K. SAKAMOTO und D. J. OCKENDON 1997: Polymorphism of the kinase domain of the S locus receptor kinase gene (SRK) in *Brassica oleracea* L. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 335-342.
- NOKAZAKI, T., A. KUMAZAKI, T. KOBA, K. ISHIKAWA und H. IKEHASHI 1997: Linkage analysis among loci for RAPDs, isoenzymes and some agronomic traits in *Brassica campestris*. *Euphytica* **95**, 115-123.
- NOU, I. S., M. WATANABE, A. ISOGAI und K. HINATA 1993: Comparison of S alleles and S-glycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex. Plant Reprod.* **6**, 79-86.
- OCKENDON, D. J. 1974: Distribution of self-incompatibility alleles and breeding structure in open-pollinated cultivars of Brussels sprouts. *Heredity* **33**, 159-171.
- OCKENDON, D. J. 1975: Dominance relationships between S alleles in the stigmas of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *Euphytica* **24**, 165-172.
- OCKENDON, D. J. 1978: Effect of hexane and humidity on self-incompatibility in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* **52**, 113-117.
- OCKENDON, D. J. 1980: Distribution of S alleles and breeding structure of Cape broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Theor. Appl. Genet.* **58**, 11-15.
- OKAZAKI, K. und K. HINATA 1987: Repressing the expression of self-incompatibility in crucifers by short-term high temperature treatment. *Theor. Appl. Genet.* **73**, 496-500.
- OLSSON, G. 1960: Self-incompatibility and outcrossing in rape and white mustard. *Hereditas* **46**, 241-252.

- OZMINSKOWSKI, R. H., Jr. und P. S. JOURDAN 1993: Expression of self-incompatibility and fertility of *Brassica napus* L. resynthesized by interspecific somatic hybridization. *Euphytica* **65**, 153-160.
- PALLOIX, A., Y. HERVE, R. B. KNOX und C. DUMAS 1985: Effect of carbon dioxide and relative humidity on self-incompatibility in cauliflower, *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* **70**, 628-633.
- PLÜMPER, B. 1991: Recent progress in *Brassica napus* resynthesis by means of in-ovule embryo culture. *Proc. 8th Int. Rapeseed Cong.*, Saskatoon, 1005-1010.
- RICHARDS, R. A. und N. THURLING 1973: The genetics of self-incompatibility in *Brassica campestris* L. spp. *oleifera* Metzg. II. Genotypic and environmental modification of S locus control. *Genetica* **44**, 439-453.
- RIPLEY, V. L. und W. D. BEVERSDORF 1991: Transfer of self-incompatibility factors from *Brassica oleracea* to *B. napus*. *Proc. 8th Int. Rapeseed Cong.*, Saskatoon, 1005-1010.
- RIPLEY, V. L., L. S. KOTT und W. D. BEVERSDORF 1995: Self-incompatibility interlocus dominance in *Brassica napus* L. *Proc. 9th Int. Rapeseed Cong.*, Cambridge, 79-81.
- ROGGEN, H. P. J. R. 1972: Electric aided pollination: A method of breaking incompatibility in *Brassica oleracea* L. *Euphytica* **21**, 181-184.
- ROSÉN, B., C. HALLDÉN und W. K. HENEEN 1988: Diploid *Brassica napus* somatic hybrids: Characterization of nuclear and organellar DNA. *Theor. Appl. Genet.* **76**, 197-203.
- RUDLOFF, E. 1991: Results and problems in building up self-incompatible lines and their use in hybrid seed production of winter rape (*Brassica napus* L.). *Proc. 8th Int. Rapeseed Cong.*, Saskatoon, 107-112.
- SAMPSON, D. R. 1967: Frequency and distribution of self-incompatibility alleles in *Raphanus raphanistrum*. *Genetics* **56**, 241-251.

- SARKER, R. H., C. J. ELLEMAN und H. G. DICKINSON 1988: Control of pollen hydration in *Brassica* requires continued protein synthesis, and glycosylation is necessary for intraspecific incompatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4340-4344.
- SCHOPFER, C. R., M. NASRALLAH und J. B. NASRALLAH 1999: The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**, 1697-1700.
- SCUTT, C. P., A. P. FORDHAM-SKELTON und R. D. CROY 1993: Okaidic acid causes breakdown of self-incompatibility in *Brassica oleracea*: Evidence for the involvement of protein phosphatases in the incompatible response. *Sex. Plant. Reprod.* **7**, 282-285.
- SERNYK und STEFANSSON 1983: Heterosis in summer rape (*Brassica napus* L.). *Can. J. Plant. Sci.* **63**, 407-413.
- SHARMA, N., M. BAJAJ und K. R. SHIVANNA 1985: Overcoming self-incompatibility through the use of lectins and sugars in *Petunia* and *Eruca*. *Annals of Botany* **55**, 139-141.
- SHIGA, T. 1976: Studies on heterosis breeding using cytoplasmic male sterility in rapeseed, *Brassica napus* L. *Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. Series D* **27**, 1-101.
- SMITH, B. M., A. G. JOHNSON und J. CONWAY 1977: Inbred lines with stronger self-incompatibility. National Vegetable Research Station, Wellesbourne, Warwick, England. *Ann. Rep.* pp. 22-23.
- STEGEMANN, H., W. BURGERMEISTER, H. FRANCKSEN und E. KRÖGERRECKLENFORT 1983: Gel-Elektrophorese und Isoelektrische Fokussierung. *PAGE-Manual. Inst. Biochemie, BBA, Braunschweig.*
- STEIN, J. C., B. HOWLETT, D. C. BOYES, M. E. NASRALLAH und J. B. NASRALLAH 1991: Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8816-8820.

- STEPHENSON, A. G., J. DOUGHTY, S. DIXON, C. ELLEMAN, S. HISCOCK und H. G. DICKENSON 1997: The male determinant of self-incompatibility in *Brassica oleracea* is located in the pollen coating. *The Plant Journal* **12** (6), 1351-1359.
- STEVENS, J. P. and Q. O. N. KAY 1989: The number, dominance relationships and frequencies of self-incompatibility alleles in a natural population of *Sinapis arvensis* L. in South Wales. *Heredity* **62**, 199-205.
- STONE, S. L., M. ARNOLDO und D. R. GORING 1999: A breakdown of *Brassica* self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **286**, 1729-1731.
- SULAMAN, W., M. ARNOLDO, K. YU, L. TULSIERAM, S. J. ROTHSTEIN und D. R. GORING 1997: Loss of callose in the stigma papillae does not affect the *Brassica* self-incompatibility phenotype. *Planta* **203**, 327-331.
- SUNDBERG, E., M. LANDGREN und K. GLIMELIUS 1987: Fertility and chromosome stability in *Brassica napus* resynthesized by protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* **75**, 96-104.
- TAKAYAMA, S., H. SHIBA, M. IWANO, H. SHIMOSATO, F.-S. CHE, N. KAI, M. WATANABE, G. SUZUKI, K. HINATA und A. ISOGAI 2000: The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (4), 1920-1925.
- THOMPSON, K. F. 1972: Competitive interaction between two S alleles in a sporophytically controlled incompatibility system. *Heredity* **28**, 1-7.
- THOMPSON, K. F. 1978: Application of recessive self-incompatibility to production of hybrid rapeseed. *Proc. 5th Int. Rapeseed Cong.*, Malmö, 56-59.
- THOMPSON, K. F. und J. P. TAYLOR 1966: Non-linear dominance relationships between S alleles. *Heredity* **21**, 345-362.
- THOMPSON, K. F. und J. P. TAYLOR 1971: Self-compatibility in kale. *Heredity* **27**, 459-471.

- TRICK, M. und R. B. FLAVELL 1989: A homozygous S genotyp of *Brassica oleracea* expresses two S-like genes. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 112-117.
- U, N. 1935: Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. *Jap. J. Bot.* **7**, 389-452. (Zitiert in MacKay 1977).
- VISSER, D. L., J. G. VAN HAL und W. H. VERHOEVEN 1982: Classification of S alleles by their activity in S heterozygotes of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *Euphytica* **31**, 603-611.
- WALLACE, D. H. 1979a: Interactions of S alleles in sporophytically controlled self incompatibility of *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* **54**, 193-201.
- WALLACE, D. H. 1979b: Procedures for identifying S allele genotypes of *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* **54**, 249-265.
- WALLACE, D. H. und M. E. NASRALLAH 1968: Pollination and serological procedures for isolating incompatibility genotypes in the crucifers. *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir* **406**, 23 (zitiert in Wallace 1979a).
- WATANABE, M., G. SUZUKI, K. TORIYAMA, S. TAKAYAMA, A. ISOGAI und K. HINATA 1999: Two anther-expressed genes downstream of *SLG⁹*: identification of a novel S-linked gene specifically expressed in anthers at the uninucleate stage of *Brassica campestris* (syn. *rapa*) L. *Sex. Plant. Reprod.* **12**, 127-134.
- WERNER, C. P., R. W. JENNAWAY und U. EKUERE 1995: Hybrid oilseed rape – The self-incompatibility system explained. *Proc. 9th Int. Rapeseed Cong.*, Cambridge, 92-94.
- WITTHAUS, N. 2000: Wechselwirkungen zwischen Allelen des Selbstinkompatibilitäts-systems in *Brassica napus*. Diplomarbeit, Abteilung Angewandte Genetik, Universität Hannover.
- WRICKE, G. 1972: *Populationsgenetik*. Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York.

- WRICKE, G. 1994: Hybridzüchtung - Zuchtmethode des Jahrhunderts. Votr. Pflanzenzüchtung **29**, 12-30.
- WRICKE, G. und W. E. WEBER 1986: Quantitative genetics and selection in plant breeding. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- WRIGHT, S. 1939: The distribution of self-sterility alleles in populations. *Genetics* **24**, 538-552.
- YAMAKAWA, S., H. SHIBA, M. WATANABE, H. SHIOZAWA, S. TAKAYAMA, K. HINATA, A. ISOGAI und A. SUZUKI 1994: The sequences of S locus glycoproteins involved in self-incompatibility of *Brassica campestris* and their distribution among *Brassicaceae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 921-925.
- YU, K., U. SCHAFER, T. GLAVIN, D. R. GORING und S. J. ROTHSTEIN 1996: Molecular characterization of the S locus in two self-incompatible *Brassica napus* lines. *The Plant Cell* **8**, 2369-2380.

ANHANG

Tab. 1-10: Kreuzungen der F₁-Pflanzen mit den Eltern genotypen – Aktivitätsverhalten

Erläuterung:

In der oberen Reihe der obersten Zeile der Tabellen sind die S-Allel-Heterozygoten aufgeführt, in denen das Verhalten der S-Allele zueinander auf der Narbenseite (♀) und der Pollenseite (♂) untersucht wurde. Unter den jeweiligen Heterozygoten sind die getesteten S-Allele aufgeführt. Im Falle von S_x unter S_xS_y bedeutet das, daß mit der Testkreuzung S_xS_y x S_xS_x die Aktivität des S_x-Allels in der Heterozygoten S_xS_y auf Narbenseite untersucht wird. Die S-Allel-Aktivität wurde nach der Formel 2.1 (S. 32) berechnet. Wiederholungen sind untereinander aufgeführt. In der Zeile S-Allelaktivität wurde der Mittelwert zwischen den Wiederholungen gebildet und in kursiver Schrift dargestellt.

Pfeile: der obere Pfeil charakterisiert die S-Allel-Wechselwirkung auf Pollenseite,

der untere Pfeil auf Narbenseite

S_a —————> S_b : S_a unterdrückt S_b in seiner Aktivität vollständig

S_a —————> S_b : S_a ist aktiver als S_b

S_a ----- S_b : S_a und S_b sind in gleichem Maße aktiv

S_a <-----> S_b : S_a und S_b schwächen sich gegenseitig ab

Tab. 1

	♀ S _x S _y		♂ S _x S _y		♀ S _y S _x		♂ S _y S _x	
	S _x	S _y	S _x	S _y	S _x	S _y	S _x	S _y
Mittl. Pollenschlauchwachstum	0	0	1,67 1,67	3,33 5	0	2,33	0,67	0
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	0	0	2,67 8,67	9 13,67	4,3	21	12	0
S-Allel-Aktivität [%]	100	100	85,73 65 75,87	59,45 38,60 49,03	85,86	23,28	58,33	100
Aktivitätsunterschiede	S _x $\xrightarrow{\text{-----}}$ S _y				S _y \longleftrightarrow S _x			

Tab. 2

	♀ S _x S _v		♂ S _x S _v		♀ S _v S _x		♂ S _v S _x	
	S _x	S _v	S _x	S _v	S _x	S _v	S _x	S _v
Mittl. Pollenschlauchwachstum	1,33	1,67	0	0,67	1	2,33	1	0,67
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	8,67	9,67	0	0,67	2,33	22,33	4	7,33
S-Allel-Aktivität [%]	67,12	62,71	100	95,59	89,05	18,91	83,56	73,69
Aktivitätsunterschiede	S _x ----- S _v				S _v ----- S _x			

Tab. 3

	♀ S _x S _w		♂ S _x S _w		♀ S _w S _x		♂ S _w S _x	
	S _x	S _w	S _x	S _w	S _x	S _w	S _x	S _w
Mittl. Pollenschlauchwachstum	0	1	0,67	0	0,67	2,33	1	4,33
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	0	12	0	0	1	8,67	7,67	18,33
S-Allel-Aktivität [%]	100	57,25	97,8	100	94,51	63,83	71,49	25,45
Aktivitätsunterschiede	S _x $\xrightarrow{\text{dashed}}$ S _w				S _w $\xleftarrow{\text{dashed}}$ S _x			

Tab. 4

	♀ S _x S _z		♂ S _x S _z		♀ S _z S _x		♂ S _z S _x	
	S _x	S _z	S _x	S _z	S _x	S _z	S _x	S _z
Mittl. Pollenschlauchwachstum	1,33	6	5,67	5,33 5,33	0,67	0	4 6	1
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	5,67	28,33	23,33	21,67 16,33	0	0	30 26,3	0
S-Allel-Aktivität [%]	76,98	0	4,63	11,21 28,77 19,99	97,80	100	0 0 0	96,71
Aktivitätsunterschiede	S _x $\xleftrightarrow{\text{dashed}}$ S _z				S _z $\xrightarrow{\text{dashed}}$ S _x			

Tab. 5

	♀ S _y S _v		♂ S _y S _v		♀ S _v S _y		♂ S _v S _y	
	S _y	S _v	S _y	S _v	S _y	S _v	S _y	S _v
Mittl. Pollenschlauchwachstum	0	0,67	0,33	0,67 0,33	0	1,33 3,33	4,33	2
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	0	1,67	2,33	3 0,33	0	3 13	11,33	7,67
S-Allel-Aktivität [%]	100	92,3	92,3	87,93 97,8 92,87	100	85,76 46,3 66,03	48,47	68,2
Aktivitätsunterschiede	S _y ----- S _v				S _v ↔ S _y			

Tab. 6

	♀ S _y S _w		♂ S _y S _w		♀ S _w S _y		♂ S _w S _y	
	S _y	S _w	S _y	S _w	S _y	S _w	S _y	S _w
Mittl. Pollenschlauchwachstum	0	4 5	0	0	0	0	0	0,33
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	0	18,67 19,33	5	0,33	0	0,33	8	0
S-Allel-Aktivität [%]	100	25,45 19,99 22,72	80,27	98,91	100	98,91	73,69	98,91
Aktivitätsunterschiede	S _y -----> S _w				S _w -----> S _y			

Tab. 7

	♀ S _y S _z		♂ S _y S _z		♀ S _z S _y		♂ S _z S _y	
	S _y	S _z	S _y	S _z	S _y	S _z	S _y	S _z
Mittl. Pollenschlauchwachstum	0	0	3,67 0,33	0	0	5	3,67	5
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	0	0	10,33 2,67	0	0	25,33	13	10,67
S-Allel-Aktivität [%]	100	100	53,96 90,13 72,05	100	100	0,26	45,18	48,47
Aktivitätsunterschiede	S _y ←----- S _z				S _z ←----- S _y			

Tab. 8

	♀ S _v S _w		♂ S _v S _w		♀ S _w S _v		♂ S _w S _v	
	S _v	S _w	S _v	S _w	S _v	S _w	S _v	S _w
Mittl. Pollenschlauchwachstum	0,33	4,33	1	0,67	3,33 4	3,67	5	0
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	0,67	30,33	14	2	3 17	5,33	26	0
S-Allel-Aktivität [%]	96,71	0	50,67	91,22	79,18 30,94 55,06	70,40	0	100
Aktivitätsunterschiede	S _v ↔ S _w				S _w ----- S _v			

Tab. 9

	♀ S _v S _z		♂ S _v S _z		♀ S _z S _v		♂ S _z S _v	
	S _v	S _z	S _v	S _z	S _v	S _z	S _v	S _z
Mittl. Pollenschlauchwachstum	1,33	0,33	5	0	1,33	5,67	4,67	4,67
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	1,33	0	27,67	0	1,67	14,33	14	11,33
S-Allel-Aktivität [%]	91,22	98,91	0	100	90,13	34,23	38,6	47,38
Aktivitätsunterschiede	S _v ←----- S _z				S _z ⇌----- S _v			

Tab. 10

	♀ S _w S _z		♂ S _w S _z		♀ S _z S _w		♂ S _z S _w	
	S _w	S _z	S _w	S _z	S _w	S _z	S _w	S _z
Mittl. Pollenschlauchwachstum	2,33 4,33	5,67	2,67 5	5,33	5 4,33	0,33	5,33	0
Mittl. Anzahl Samen pro Schote	5,33 9	15,5	13 23,33	18	12,33 15	0	21	0
S-Allel-Aktivität [%]	74,78 56,16 65,47	30,38	48,47 6,84 27,66	23,28	43,01 36,43 29,5	98,91	13,41	100
Aktivitätsunterschiede	S _w ⇌----- S _z				S _z ⇌----- S _w			

DANKSAGUNG

Mit der Vorlage dieser Dissertation verbinde ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. G. Wricke für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein lebhaftes Interesse an den Arbeiten. Frau Dr. E. Esch danke ich herzlich für die ausgezeichnete Betreuung, die kompetenten Anregungen und ihre freundliche Hilfsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. H.-J. Jacobsen möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Den Mitarbeitern der Zuchtstation Thüle der Deutschen Saatveredelung Lippstadt-Bremen GmbH und insbesondere Herrn Dipl.-Ing. agr. H. Busch, Herrn Dipl.-Ing. agr. H. Bockholt, Herrn Dipl.-Ing. agr. D. Hauska und Herrn Dr. C. Oertel danke ich für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials, die Durchführung der Leistungsprüfungen und ihre konstruktive Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. P. Senft möchte ich für die Anregungen und Hilfestellungen bei der Untersuchung der Auskreuzungsraten mittels molekularer Marker danken.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Wiebe vom Institut für Gemüsebau der Universität Hannover danke ich für die Überlassung einer Klimakammer für die Kohlendioxidversuche.

Herrn Dr. H. Löptien von der Marner GZG Saaten AG danke ich für die Bereitstellung eines Gewächshauses zur Vermehrung einer selbstinkompatiblen Linie mit Hilfe der Kohlendioxidbegasung.

Weiterhin möchte ich den Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Angewandte Genetik für ihre vielseitige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Mein besonderer Dank gilt den wissenschaftlichen Hilfskräften Frau N. Witthaus und Frau M. Baumgärtner für ihre unermüdliche Arbeit im Gewächshaus, bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und den Isoenzymbestimmungen. Nochmals Frau N. Witthaus und Frau V. Horstmann möchte ich für die Untersuchungen danken, die sie im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt haben. Bei Frau I. Robotta bedanke ich mich für die kompetente Einweisung in die Methoden der Isoenzymuntersuchung. Frau Dipl. Biol. G. Dewal möchte ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

Für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes danke ich der Firma Deutsche Saatveredelung Lippstadt-Bremen GmbH und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Schließlich danke ich vor allem meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Anteilnahme, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Meinen Eltern möchte ich diese Arbeit widmen.

LEBENS LAUF

Name: Silke Möhring
Geburtsdatum: 21.2.1969 in Stolzenau/Weser
Familienstand: ledig

SCHULAU SBILDUNG:

1975 – 1979 Grunds chule Nendorf
1979 – 1981 Orientierungsstufe Stolzenau
1981 – 1988 Gymnasium Stolzenau

BERUFSAU SBILDUNG:

Aug. 1988 – Sep. 1990 Medizinisch Technische Assistentin (MTA) an der
MHH (Medizinische Hochschule Hannover)

HOCHSCHULAU SBILDUNG:

Okt. 1991 – Jul. 1996 Studium der Gartenbauwissenschaften an der
Universität Hannover
Seit Nov. 1996 Promotionsstudium in der Abteilung Angewandte
Genetik der Universität Hannover

BERUFSTÄTIGKEIT:

Nov. 1990 – Sep. 1991 MTA in der Anatomie V, MHH
Nov. 1996 – Okt. 1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung
Angewandte Genetik der Universität Hannover