Aus dem Fachgebiet Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz

des Departments für Nutzpflanzenwissenschaften

der Georg-August-Universität Göttingen

"Phänotypisierung von Raps- und anderen Brassica-Genotypen zur Identifizierung von Resistenzquellen gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum*"

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Agrarwissenschaften

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Tobias Wulf

geboren in Neustadt a. Rbge.

Göttingen im Juli 2011

D 7

1. Referent: Prof. Andreas von Tiedemann

2. Korreferent: Prof. Heiko C. Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 21.Juli 2011

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:

Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,

etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,

wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein

Inhalt

Abkürzungen und Symbole 1

1 Einleitung 1

2 Material und Methoden 4

2.1 Chemikalien 4

2.2 Nährmedien und Pufferlösungen 7

2.3 Herkunft und Anzucht der Pilzisolate 12

2.4 Plasmide und Bakterien 13

2.5 Pflanzenmaterial 13

2.6 Feldversuche 26

2.6.1 Versuchsstandorte 26

2.6.2 Versuchsanlage 27

2.6.2.1 Feldversuch 2007/08 27

2.6.2.2 Feldversuche 2008/09 und 2009/10 28

2.6.3 Witterungsverlauf und Pflanzenentwicklung 2007 bis 2010 30

2.6.4 Sklerotinia-Bonitur im Feld 30

2.6.5 Ertragserfassung 31

2.7 Resistenzscreening im Gewächshaus 32

2.8 Oxalsäuretest 35

2.9 Pflanzentransformation 38

2.9.1 Entwicklung spezifischer PCRs 38

2.9.2 Vektorherstellung 40

2.9.2.1 Extraktion von Plasmiden aus *E. coli* 42

2.9.2.2 Restriktion 43

2.9.2.3 DNA Isolation aus Agarosegelen 43

2.9.2.4 Ligation 44

2.9.3 Transformation von *E. coli* 45

2.9.4 Transformation von *A. tumefaciens* 46

2.9.5 Pflanzentransformation 47

2.9.5.1 Phänotypisierung der Transformanten 48

2.9.5.2 Nachweis der Expression 50

2.10 Wurzelinokulationen 50

2.11 Statistische Auswertung 52

3 Ergebnisse 54

3.1 Feldversuche 54

3.1.1 Witterungsverlauf und Pflanzenentwicklung 2007 bis 2010 54

3.1.2 Feldversuch 2007/08 61

3.1.3 Feldversuche 2008/09 67

3.1.4 Feldversuche 2009/10 75

3.2 Resistenzscreening im Gewächshaus 83

3.3 Oxalsäuretest 95

3.4 Vergleich der Resistenzprüfmethoden 98

3.5 Wurzelinokulation 101

3.6 Pflanzentransformation und Resistenztestung der Transformanten 106

4 Diskussion 113

4.1 Beurteilung der Sklerotinia Resistenz anhand der Feldversuche 113

4.2 Beurteilung der Sklerotinia Resistenz anhand des Gewächshausscreenings 130

4.3 Beurteilung der Sklerotinia Resistenz anhand des Oxalsäuretests 142

4.4 Methodenvergleich zur Validierung der Ergebnisse 148

4.5 Beurteilung der Wurzelinfektion unter Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse 153

4.6 Beurteilung der Pflanzentransformation im Hinblick auf die Wirksamkeit der inserierten Gene 157

5 Schlussfolgerungen 163

6 Zusammenfassung 164

7 Literaturverzeichnis 168

8 Anhang 187

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
ad.	addiert
AUDPC	Area Under Disease Progress Curve
bp	Basenpaare
BBCH	Codierung der phänotypischen Entwicklungsstadien von Raps
BH	Befallshäufigkeit in Prozent
BSL	Bundessortenliste
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CGN	Center for Genetic Resources, Netherlands
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleotidtriphosphat
dpi	days post inoculation
dt	Dezitonne
DWD	Deutscher Wetterdienst
ESPUPMIACB	Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Banco de Germoplasma, Comunidad de Madrid

et al.	und andere
Fa.	Firma
FM	Frischmasse
FV	Feldversuch
g	Gramm
GBRNVRS	National Vegetable Research Station, Groß Britannien
Gö	Göttingen
GWH	Gewächshaus
h	Stunde
ha	Hektar
H_2O bidest.	doppelt destilliertes Wasser
incl.	inklusive
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben
K	Körner
k.A.	keine Angabe
kbp	Kilo-Basenpaare
kf	keimfähig
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter
m	Meter
M	Mol
m^2	Quadratmeter

mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm^2	Quadratmillimeter
µmol	Mikro Mol
µS	Mikro Siemens
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OA	Oxalsäure
o.g.	oben genannt
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pe	Peine
PGRC	Plant gene resources of Canada
Po	Poel
QTL	Quantitative Trait Loci
rel.	relativ
rel. LF	relative Luftfeuchte
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde

Tab.	Tabelle
taq	*Thermus aquaticus*
Temp.	Temperatur
TKG	Tausendkorngewicht
U	Units
u.a.	unter anderem
UFOP	Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V.
u.U.	unter Umständen
vs.	versus
Wdh	Wiederholung
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

1 Einleitung

„Insgesamt muß der Anbau resistenter Sorten als eine der wichtigsten, vorbeugenden Maßnahmen zur Herabsetzung der Schadenswahrscheinlichkeit gesehen werden, die praktisch keinen zusätzlichen Aufwand für den einzelnen Landwirt erfordert, und die in integrierten Anbausystemen stärker als bisher genutzt werden sollte.“ (Heitefuss 2000)

Auch wenn diese Aussage besonders am Beispiel der Weißstängeligkeit im Raps, hervorgerufen durch *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary zutrifft, sind in Deutschland bis zum jetzigen Zeitpunkt keine resistenten Sorten gegenüber dem Erreger Sklerotinia verfügbar. *S. sclerotiorum* gehört den Ascomyceten an und hierbei ist er den Discomyceten zuzuordnen (de Bary 1887). Schon de Bary (1887) beschreibt, dass die Ascosporen zur Infektion eine zusätzliche Nährstoffquelle benötigen. Im Falle von Raps stellen Blütenblätter diese Nährstoffquelle dar. Der Hauptbefall an Raps wird also durch Ascosporen verursacht, die abgefallene Blütenblätter besiedeln und von dort aus den Stängel infizieren. Nach dieser Infektion werden Sklerotien gebildet, die nach der Ernte erneut in den Boden gelangen und in darauf folgenden Jahren Apothecien produzieren können, aus denen erneut Ascosporen entlassen werden. Eine Konidienbildung findet nicht statt, so dass es sich um ein monozyklisches Pathogen handelt (Hallmann et al. 2009). Unter günstigen Bedingungen kann *S. sclerotiorum* Ertragsverluste von über 50% hervorrufen (Pope et al. 1989).

Besondere Bedeutung hat die eingangs erwähnte Aussage aufgrund mehrerer Faktoren. Zum einen ist jede Blütenbehandlung gegen das Pathogen aufgrund der Bestandesstruktur des Rapses mit hohen Durchfahrtsverlusten von bis zu 2,6% verbunden (Dunker 2006). Zum anderen müssen diese Blütenspritzungen vorbeugend durchgeführt werden und nur in einzelnen Fällen, unter günstigen klimatischen Bedingungen, kommt es auch zu einer Befallshäufigkeit, die die Behandlung rechtfertigen kann. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Wirtschaftlichkeit von Fungizidmaßnahmen gegen *S. sclerotiorum* durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass lediglich 32% der durchgeführten Maßnahmen wirtschaftlich waren (Dunker 2006). Da aber zum Zeitpunkt der Behandlung der Befall vom Landwirt nicht abgeschätzt werden kann und auch andere positive Eigenschaften der Fungizidapplikation, wie eine erhöhte Platzfestigkeit der Schoten,

vor allem von der chemischen Industrie ausgewiesen werden, handelt es sich hierbei immer noch in vielen Fällen um eine Routinebehandlung. Auch die Verfügbarkeit des Prognosemodells SkleroPro (Koch 2005), (Koch et al. 2007) konnte an diesem Sachverhalt nichts ändern. Als dritter wichtiger Faktor, der die oben genannte Aussage unterstützt, kann eine zu erwartende Reduktion in der Anzahl an zur Verfügung stehenden Fungiziden (Kleiner und Eichel 2009) genannt werden. Insbesondere die Blütenspritzung im Raps ist kritisch zu beurteilen, da ein blühender und damit von Bienen besuchter Bestand behandelt wird. Aus diesem Grund muss bei jeder Behandlung die Bienenverträglichkeit der eingesetzten Präparate geprüft werden und u.U. die Behandlung außerhalb des Bienenflugs durchgeführt werden. Es handelt sich hierbei also um ein Thema mit großer Tragweite, bei dem die Resistenzzüchtung eine sehr elegante Lösung darstellen würde.

Sklerotinia ist eine klassische Fruchtfolgekrankheit, da die Sklerotien über mehrere Jahre im Boden lebensfähig sind und somit durch eine Erhöhung des Anteils anfälliger Kulturen in der Fruchtfolge der Befallsdruck erhöht werden kann. Nicht zuletzt aufgrund einer vergleichsweise hohen monetären Rentabilität des Rapses nahm die Anbaufläche in den letzten Jahren zu. So betrug die Anbaufläche von Winterraps im Jahr 1998 noch 1.220.000 ha (Dunker 2006), stieg dann aber stark an, bis im Jahr 2009 eine Fläche von 1.471.200 ha mit Winterraps bestellt wurde (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2011). Dieser Zuwachs ist natürlich auch mit einer Erhöhung des Anteils innerhalb der Fruchtfolge verbunden, so dass in Zukunft mit höheren durch *S. sclerotiorum* hervorgerufene Schäden gerechnet werden muss.

Zusätzlich scheint der Klimawandel die Krankheit zu begünstigen. Umfassende Literaturstudien legen die Vermutung nahe, dass durch höhere Temperaturen neben anderen Pathogenen vor allem Sklerotinia gefördert wird (Siebold und Tiedemann 2011). In der Zukunft wird sich zeigen, ob diese beiden Faktoren den Befall tatsächlich erhöhen oder ob der Klimawandel z.B. zu einer fehlenden Koinzidenz von Ascosporenflug und Blüte führt. Sollte dies allerdings zutreffen, so kann es zu einer noch größeren Notwendigkeit einer Behandlung führen. Zusammengenommen demonstrieren diese Faktoren die Notwendigkeit die Resistenz des vorhandenen Sortenmaterials zu erhöhen.

Grundlage eines jeden Zuchtfortschritts ist genetische Variabilität im gewünschten Merkmal. Schon die Bundessortenliste zeigt, dass im Merkmal Resistenz gegenüber Sklerotinia nur geringe Unterschiede vorhanden sind (Anonymus 2006), (Anonymus 2007), (Anonymus 2009). Unterschiedliche Einstufungen der Sorten in verschiedenen Jahren lassen darüberhinaus die Frage aufkommen, ob die vorhandene Variabilität genetisch bedingt ist, oder vor allem durch Umwelteinflüsse zustande kommt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, praktikable und reproduzierbare Screeningmethoden zur Beurteilung der Resistenz einzelner Genotypen zu entwickeln. Mit diesen Methoden sollten im Anschluss mögliche Resistenzquellen identifiziert und somit der Züchtung zugänglich gemacht werden. Im Einzelnen wurden hierfür Screeningmethoden für das Feld, Gewächshaus aber auch Labor entwickelt. Diese Methoden wurden anhand von von beteiligten Züchtern zur Verfügung gestelltem Material mit großen Unterschieden im Merkmal Sklerotinia Resistenz bewertet und in Beziehung gesetzt. Dies ermöglichte gleichzeitig eine Umfassende Bewertung des vorhandenen Materials. Darüberhinaus wurden diese Methoden eingesetzt um in wilden *Brassica* Arten und Rapsresynthesen nach möglichen Resistenzquellen zu suchen. Um einen resistenten Standard für die Screeningmethoden im Gewächshaus und Labor zur Verfügung zu haben wurden transgene Pflanzen erstellt, die Oxalsäure, einen wichtigen Pathogenitätsfaktor des Pilzes, abbauen sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Acetosyringon	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO	Applichem, Darmstadt
$AgNO_3$	Merck, Darmstadt
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Äpfelsäure	Merck, Darmstadt
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
6-Benzylaminopurine (BAP)	Applichem, Darmstadt
Bengalrosa	Merck, Darmstadt
Beschwerungspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Bromkresolgrün	Merck, Darmstadt
$CaCO_3$	Merck, Darmstadt
$CaCl_2$	Merck, Darmstadt
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chlortetracyclin	Applichem, Darmstadt
DKW Basal-Medium	Duchefa Biochemie, Haarlem
dNTP-Mix (10 mM)	Fermentas, St.Leon-Rot
Dream taq Puffer (10x)	Fermentas, St.Leon-Rot

EcoRI	Fermentas, St.Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol (100%)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt
$FeSO_4$	Sigma, Taufkirchen
Gibberellinsäure (GA3)	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Hefe Extrakt	Roth, Karlsruhe
4-(3-Indolyl) Buttersäure (IBA)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
K_2HPO_4	Applichem, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Luria Broth	Roth, Karlsruhe
Lysozym	Applichem, Darmstadt
2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat (MES)	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$	Fermentas, St.Leon-Rot
$MgSO_4$	Merck, Darmstadt
Murashige und Skoog Basal-Medium	Duchefa Biochemie, Haarlem
Myo-Inositol	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt

NaOH	Merck, Darmstadt
NH_4NO_3	Merck, Darmstadt
Oxalsäure	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kartoffel Glukose Agar (PDA)	Roth, Karlsruhe
Pepton	Roth, Karlsruhe
Picloram	Merck, Darmstadt
Hind III	Fermentas, St.Leon-Rot
Hind III Restriktionspuffer (10x)	Fermentas, St.Leon-Rot
Rindfleischextrakt	Merck, Darmstadt
RNAseA	Applichem, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Duchefa Biochemie, Haarlem
T4 Ligase	Fermentas, St.Leon-Rot
T4 Ligase-Puffer (10x)	Fermentas, St.Leon-Rot
Taq-Polymerase (5U/µl)	Fermentas, St.Leon-Rot
TBE Puffer (10 x)	Applichem, Darmstadt
TE Puffer	Applichem, Darmstadt
Tris pH 8	Fermentas, St.Leon-Rot
Triton X 100	Applichem, Darmstadt
Trypton	Roth, Karlsruhe
$ZnCl_2$	Merck, Darmstadt

2.2 Nährmedien und Pufferlösungen

Die unten aufgelisteten Medien wurden für 15 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 55°C wurden etwaige Antibiotika zugegeben und die Festmedien in Polystyrolpetrischalen (9 cm Durchmesser, Fa. Sarstett, Nümbrecht) ausplattiert.

Potato Dextrose Agar (PDA):

PDA	39g
Aqua bidest.	ad. 1000ml

Saccharose-Salz-Medium (SSM) (verändert nach Hedke (1992)):

Agar	15 g
Saccharose	40 g
NH_4NO_3	1 g
KH_2PO_4	0,7 g
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,2 g
KCl	140 mg
$CaCO_3$	4 g
Triton	2 ml
Bromkresolgrün	80 mg
Bengalrosa	60 mg
Chloramphenicol	60 mg
Streptomycin	60 mg
Chlortetracyclin	20 mg
Spurenelementstammlösung	2 ml
H_2O bidest.	ad. 1000 ml

Spurenelementstammlösung:

$FeSO_4$ x $7H_2O$	1 g
$ZnCl_2$	1 g
$MgCl_2$ x $7H_2O$	0,6 g
H_2O bidest.	ad. 1000 ml

Glukose-Medium (Ahlers 2006):

NH_4NO_3	2 g
Glukose	20 g
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,1 g
Äpfelsäure	3 g
KH_2PO_4	1 g
NaOH	1 g
H_2O bidest.	ad. 1000 ml

Roggenmehl-Quarzkiesgemisch (Heppner 1995):

Grober Quarzkies (Ø 1,5 mm)	210 g
Hafermehl (Typ 997)	15 g
H_2O bidest.	40 ml

Schrägagar:

Murashige und Skoog Basal-Medium	2,2 g
Saccharose	10 g
Agarose	8 g
H_2O bidest.	ad. 1000 ml

Hefe Extrakt und Rindfleisch-Medium (YEB), pH: 7:

Rindfleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	1 g
Pepton	5 g
Saccharose	5 g
$MgSO_4$	300 mg
Agar	20 g
H_2O bidest.	ad. 1000 ml
Kanamycin	50 mg

Murashige und Skoog Basal-Medium (MS); pH: 5,7:

Murashige und Skoog Basal-Medium	4,4 g
Saccharose	20 g
Agarose	10 g
H_2O bidest.	ad. 1000 ml
Carbenicillin	250 mg
Kanamycin	75 mg

Callus Induktions-Medium (MS CIM) flüssig; pH: 5,7:

Murashige und Skoog Basal-Medium	5,3 g
Saccharose	20 g
H_2O bidest.	ad. 1000 ml
MES	0,5 g
Myo-Inositol	0,3 g
BAP	2 mg
Acetosyringon	100 µM
Picloram	0,001 mg

Callus Induktions-Medium (MS CIM) fest; pH: 5,7:

Murashige und Skoog Basal-Medium	5,3 g
Saccharose	20 g
H_2O bidest.	ad. 1000 ml
MES	0,5 g
Myo-Inositol	0,3 g
BAP	2 mg
$AgNO_3$	5 mg
Picloram	0,003 mg
Carbenicillin	500 mg
Kanamycin	50 mg

Driver und Kuniyuki-Medium (DKW); pH: 5,7:

DKW Basal-Medium	5,3 g
Saccharose	20 g
Agarose	5,4 g
H_2O bidest.	ad. 1000 ml
BAP	1 mg
$AgNO_3$	5 mg
GA3	0,1 mg
IBA	0,1 mg
Carbenicillin	500 mg
Kanamycin	75 mg

Terrific Broth (TB):

Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glyzerin	4 ml
H_2O bidest.	ad. 990 ml
KH_2PO_4 10x0,17 M	5 ml
K_2HPO_4 10x0,72 M	5 ml
Kanamycin	50 mg

Luria Broth (LB):

Luria Broth	20 g
Agar	15 g
H_2O bidest.	ad. 1000 ml
Kanamycin	50 mg

Super Optimal broth with Catabolic repressor-Medium (SOC); pH: 7:

Bacto Trypton	20 g
Bacto Hefe Extrakt	5 g
NaCl	0,5 g
in H_2O bidest. lösen	
KCl Lösung (250 mM)	10 ml
H_2O bidest.	ad. 1000 ml
Glukose Lösung (1M)	20 ml

LYZ Pufferlösung

NaOH	0,2 N
SDS	1%

GLC Pufferlösung

Tris pH 8	50 mM
Glukose	50 mM
EDTA	10 mM

HS Pufferlösung

Kaliumacetat	147g
Ameisensäure 98-100%	19,16ml
Aqua bidest.	ad 500 ml

2.3 Herkunft und Anzucht der Pilzisolate

Für die Stängelinokulationen wurde das Isolat SS 1.5, isoliert aus Rapsstängeln in Biestow (Mecklenburg-Vorpommern), verwendet. Für die Wurzelinokulationen fanden die Isolate SS F (Fehmarn, Schleswig-Holstein), SS TH (Thüle, Nordrhein-Westfalen), SS LÜ (Lübeck, Schleswig-Holstein) und SS GÖ (Göttingen, Niedersachsen) Verwendung. Alle Isolate wurden aus Winterraps isoliert, wobei SS 1.5 aus dem Stängel und die übrigen aus Wurzeln stammten. Für die Feldversuche 2008/09 und 2009/10 wurden Sklerotien verwendet, die von der Insel Poel (Mecklenburg-Vorpommern) bzw. aus Schackenthal in der Nähe von Aschersleben (Sachsen Anhalt) stammten. Die Sklerotien von der Insel Poel wurden nach der Ernte von Raps aus dem Erntegut heraus gereinigt, während die aus Schackenthal aus einer Erbsenernte gewonnen wurden.

Die Anzucht der Pilze erfolgte auf PDA bzw. für den Feldversuch 2007/08 in Glukose-Medium. Hierzu wurden 330 ml Medium mit 3 myzelüberwachsenen Agarplugs beimpft und bei 20°C für sieben Tage mit 100 rpm geschüttelt (Schüttler Infors CH-4103, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Nach dieser Inkubationszeit wurde das Myzel abgenutscht und für die Inokulation verwendet.

Zur Lagerung der Isolate wurden die sich auf PDA Platten bildenden Sklerotien ab gesammelt und bei 10°C gelagert. Zur Gewinnung größerer Mengen an Sklerotien, wurden diese in einem sterilem Roggenmehl-Quarzkiesgemisch in Anlehnung an Heppner (1995) vermehrt. Hierzu wurde ein feuchtes Roggenmehl-Quarzkiesgemisch in mit Aluminiumfolie verschlossenen Einmachgläsern zweimal im Abstand von 24 h für 15 min bei 121°C autoklaviert. Mindestens 12 Stunden später wurde das Gemisch durch Zugabe von drei myzelüberwachsenen Agarplugs beimpft und erneut gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit bei Raumtemperatur von mindestens vier Wochen wurden die Sklerotien unter sterilen Bedingungen abgesammelt.

2.4 Plasmide und Bakterien

Zur Konstruktion, Vermehrung und Erhaltung der Plasmide wurde der *Escherichia coli* ((*Migula*) Castellani und Chalmers) Stamm DH5α (Hanahan 1983) genutzt. Die Transformation der Pflanzen erfolgte durch den *Agrobacterium tumefaciens* ((Smith und Townsend) Conn) Stamm AGL0, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Heiko C. Becker, Department für Nutzpflanzenwissenschaften; Abteilung Pflanzenzüchtung, Georg-August-Universität Göttingen. Die kurzfristige Lagerung der *E. coli* Bakterien, bzw. die Vermehrung erfolgte in LB-Medium. Die Vermehrung der *A. tumefaciens* Stämme fand in YEB-Medium statt. Die Lagerung für längere Zeit erfolgte als elektrokompetente Zellkultur bei -80°C.

Für die Transformation wurden die Plasmide pUC19-35S-gf2.8 (Oxalat Oxidase; im Folgenden DH10B genannt) und p211-TOXDC (Oxalat Decarboxylase; im Folgenden TOXDC genannt) genutzt. Beide wurden von Dr. Andreas Walz (damals Universität Hohenheim) in Form von Expressionskonstrukten in *E. coli* bezogen. Beide Gene stehen unter der Kontrolle des 35S Promoters des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) und die Konstrukte enthalten das Neomycin Phosphotransferase Gen, das die Selektion von transformierten Bakterien oder Pflanzenzellen auf kanamycin-haltigem Medium ermöglicht.

2.5 Pflanzenmaterial

Tabelle 1 zeigt die Genotypen, welche im Feldversuch 2007/08 verwendet wurden. Hierbei handelte es sich mit Ausnahme von Toccata um in Deutschland zugelassene Winterrapssorten, die sich in ihrer Anfälligkeit gegenüber *S. sclerotiorum* laut Bundessortenliste unterschieden. In der Tabelle ist neben der letzten Einstufung der Sorten im Merkmal Sklerotinia Resistenz auch der Sortentyp und die Versuche, in denen die Sorten eingesetzt wurden, angegeben. Bei Toccata handelt es sich um eine Hybrid Sorte, die in Dänemark und Groß Britannien zugelassen wurde.

Tab. 1: In dem Feldversuch 2007/08 verwendete Sorten, die Einstufung ihrer Resistenz gegen Sklerotinia nach Bundessortenliste (Anonymus 2006), (Anonymus 2007), (Anonymus 2009), der Sortentyp und Angabe über die Verwendung in weiteren Versuchen (H = Hybrid Sorte, L = Linien Sorte, FV = Feldversuch, GWH = Gewächshaus, OA = Oxalsäuretest, Gö = Göttingen, Pe = Peine, Po = Poel).

Sorte	Einstufung nach BSL (Jahr der Einstufung)	Typ	Verwendet im
Baldur	6 (2009)	H	FV 07/08
Billy	6 (2009)	L	FV 07/08
Bravour	6 (2009)	L	FV 07/08
Caiman	5 (2006)	L	FV 07/08
Elektra	6 (2009)	H	FV 07/08
Favorit	5 (2009)	L	FV 07/08
Hearty	8 (2007)	L	FV 07/08 OA Test
Ladoga	5 (2009)	L	FV 07/08
Libretto	5 (2007)	H	FV 07/08
Lion	6 (2007)	L	FV 07/08 FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
Marcant	6 (2009)	H	FV 07/08
Mika	7 (2009)	H	FV 07/08
Mohican	5 (2006)	L	FV 07/08 FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test

Sorte	Einstufung nach BSL (Jahr der Einstufung)	Typ	Verwendet im
Oase	5 (2009)	L	FV 07/08
Olpop	6 (2009)	L	FV 07/08
Pacific	6 (2009)	L	FV 07/08 FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
Smart	5 (2007)	L	FV 07/08
Talent	6 (2009)	H	FV 07/08 OA Test
Tenno	6 (2009)	H	FV 07/08
Titan	6 (2009)	H	FV 07/08
Toccata	-	H	FV 07/08 FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
Trabant	6 (2009)	H	FV 07/08
Viking	6 (2007)	L	FV 07/08
Zeppelin	5 (2007)	H	FV 07/08 OA Test

In Tabelle 2 sind die Winterrapsgenotypen aus den Feldversuchen 2008/09 und 2009/10 aufgelistet. Neben dem Züchterhaus, von dem der entsprechende Genotyp zur Verfügung gestellt wurde, ist auch die Einstufung der Züchter im Merkmal Sklerotinia Resistenz, sofern bekannt, angegeben. Darüberhinaus sind auch die Versuche, in denen die Genotypen eingesetzt wurden vermerkt. Die Züchtungsunternehmen haben in der Regel drei resistente und einen anfälligen Genotyp zur Verfügung gestellt, wovon allerdings nicht alle im Feldversuch

eingesetzt werden konnten. Darüberhinaus stellten einige Züchter wie z.B. die Fa. KWS-Lochow GmbH mehr Genotypen zur Verfügung, welche nicht alle berücksichtigt werden konnten. Aufgrund zu später Lieferung des Saatguts, bzw. unzureichender Saatgutmengen, war es nicht möglich in jedem Feldversuch die gleichen Genotypen einzusetzen.

Nach dem Feldversuch 2008/09 stellte sich heraus, dass es sich bei den beiden Genotypen WVB 2 und NPZ 2 um die Sorte Visby handelt. Die Hybrid Sorte Visby die laut der Bundessortenliste 2009 eine Einstufung von 5 in ihrer Sklerotinia Resistenz aufweist, sollte allerdings in den nachfolgenden Feldversuchen nicht zweimal vertreten sein. Aus diesem Grund wurde im Feldversuch 2009/10 der Genotyp WVB 2 durch NPZ 4 ersetzt. Darüberhinaus stellte sich heraus, dass es sich bei dem Genotyp LBN 241/78 um die Sorte Pacific handelte, die als Standard aus dem letzten Versuchsjahr übernommen wurde. Um Pacific nicht doppelt zu testen, wurde LBN 241/78 im Feldversuch 2009/10 durch NIC06-1346CB ersetzt. Schließlich ließ sich noch in Erfahrung bringen, dass es sich bei dem Genotyp NPZ 1 um die Liniensorte Lorenz, die in der Bundessortenliste 2009 eine Einstufung von 6 bezüglich ihrer Sklerotinia Anfälligkeit erhielt, handelte.

Tab. 2: Von den Züchterhäusern zur Verfügung gestellte Genotypen, das verantwortliche Unternehmen, die Einstufung der Resistenz durch die Züchter und die Versuche, in denen die Genotypen zusätzlich verwendet wurden (FV = Feldversuch, GWH = Gewächshaus, OA = Oxalsäuretest, Gö = Göttingen, Pe = Peine, Po = Poel).

Genotyp	Züchter	Einstufung nach Züchterangabe	Verwendet im
DSV 1-09	Deutsche Saatveredelung AG, Lippstadt	Gering anfällig	FV 08/09 Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening, OA Test
DSV 2-09	Deutsche Saatveredelung AG, Lippstadt	Gering anfällig	FV 08/09 Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
DSV 3-09	Deutsche Saatveredelung AG, Lippstadt	Gering anfällig	GWH Screening OA Test
DSV 4-09	Deutsche Saatveredelung AG, Lippstadt	Hoch anfällig	FV 08/09 Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
KWS-SCL-1	KWS-Saat AG, Einbeck	Hoch anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
KWS-SCL-2	KWS-Saat AG, Einbeck	Mittel bis gering anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
KWS-SCL-3	KWS-Saat AG, Einbeck	Mittel bis gering anfällig	FV 08/09 Gö GWH Screening OA Test
KWS-SCL-4	KWS-Saat AG, Einbeck	Mittel anfällig	GWH Screening OA Test
KWS-SCL-5	KWS-Saat AG, Einbeck	Mittel bis gering anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test

Genotyp	Züchter	Einstufung nach Züchterangabe	Verwendet im
KWS-SCL-6	KWS-Saat AG, Einbeck	Mittel bis gering anfällig	FV 08/09 Gö GWH Screening OA Test
LBN 241/78	Limagrain GmbH, Edemissen	Sehr hoch anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
NIC06-1346CB	Limagrain GmbH, Edemissen	Sehr hoch anfällig	FV 09/10 Gö, Pe, Po OA Test
NPZ 1	Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG, Hohenlieth	Hoch anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
NPZ 2	Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG, Hohenlieth	k.A.	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
NPZ 3	Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG, Hohenlieth	k.A.	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
NPZ 4	Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG	k.A.	FV 08/09 Gö FV 09/10 Gö, Pe GWH Screening OA Test
NSL 02/95	Limagrain GmbH, Edemissen	Mittel anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
NSL 04/120	Limagrain GmbH, Edemissen	Mittel anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test

Genotyp	Züchter	Einstufung nach Züchterangabe	Verwendet im
Rapid	Limagrain GmbH, Edemissen	Gering anfällig	GWH Screening
SRG 2009/01	Raps GbR Saatzucht Lundsgard, Grundhof	Mittel bis gering anfällig	FV 08/09 Gö GWH Screening OA Test
SRG 2009/02	Raps GbR Saatzucht Lundsgard, Grundhof	Mittel bis gering anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
SRG 2009/03	Raps GbR Saatzucht Lundsgard, Grundhof	Hoch anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
SRG 2009/04	Raps GbR Saatzucht Lundsgard, Grundhof	Gering anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö
SRG 2009/05	Raps GbR Saatzucht Lundsgard, Grundhof	Gering anfällig	FV 09/10 Pe, Po GWH Screening OA Test
SW 1	Lantmännen SW Seed GmbH, Hanstedt	k.A.	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
SW 2	Lantmännen SW Seed GmbH, Hanstedt	k.A.	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
SW 3	Lantmännen SW Seed GmbH, Hanstedt	k.A.	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test

Genotyp	Züchter	Einstufung nach Züchterangabe	Verwendet im
SW 4	Lantmännen SW Seed GmbH, Hanstedt	k.A.	FV 08/09 Gö GWH Screening OA Test
SYN Sclero 1	Syngenta Agro GmbH, Maintal	Sehr hoch anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
SYN Sclero 2	Syngenta Agro GmbH, Maintal	Mittel anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
SYN Sclero 3	Syngenta Agro GmbH, Maintal	Mittel anfällig	FV 08/09 Gö, Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
SYN Sclero 4	Syngenta Agro GmbH, Maintal	Mittel anfällig	FV 08/09 Gö GWH Screening OA Test
WVB 1	W. von Borries-Eckendorf. GmbH & Co., Leopoldshöhe	k.A.	FV 08/09 Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
WVB 2	W. von Borries-Eckendorf. GmbH & Co. , Leopoldshöhe	k.A.	FV 08/09 Pe, Po GWH Screening OA Test
WVB 3	W. von Borries-Eckendorf. GmbH & Co. , Leopoldshöhe	k.A.	FV 08/09 Pe, Po FV 09/10 Gö, Pe, Po GWH Screening OA Test
WVB 4	W. von Borries-Eckendorf. GmbH & Co. , Leopoldshöhe	k.A.	GWH Screening OA Test

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit außerdem verwendeten Rapssorten angegeben. Mit Ausnahme von Drakkar, bei der es sich um eine französische Sommerrapssorte handelt, die für die Pflanzentransformation genutzt wurde, und Elektra handelt es

sich hierbei um chinesische Genotypen. Die chinesischen Sorten besitzen eine sehr geringe Winterhärte, sie werden auch als „Semi-Sommerraps“ bezeichnet. Des Weiteren zeigen sie eine hohe *Phoma lingam* (Tode) Anfälligkeit. Aus diesen Gründen konnten sie nicht in Feldversuchen eingesetzt werden.

Tab. 3: Außerdem in dieser Arbeit verwendete Rapsgenotypen, sowie die Versuche in denen sie eingesetzt wurden (GWH = Gewächshaus, OA = Oxalsäuretest).

Genotyp	Verwendet im
Elektra	Wurzelinokulation
Drakkar	Pflanzentransformation GWH Screening OA Test
Tianhe You 1	OA Test GWH Screening
Wan You 14	OA Test GWH Screening
Wan You 19	OA Test GWH Screening
Yake 28	GWH Screening
You You 5	OA Test GWH Screening
Zhong You 821	OA Test GWH Screening
Zhongshuang 9	OA Test GWH Screening

In Tabelle 4 sind die im Gewächshausscreening eingesetzten Resynthesen aufgelistet. Hierbei handelt es sich um Resynthesen, die aus Kreuzungen von Rübsen (*Brassica rapa* L. ssp.) und einer wilden *Brassica* Art hervorgegangen sind. Zur Verfügung gestellt wurden sie von der Abteilung für Pflanzenzüchtung (Prof. Dr. Heiko C. Becker), DNPW, Georg-August-Universität Göttingen. Angegeben sind neben der Bezeichnung der Resynthese auch die Kreuzungspartner, die zu ihrer

Herstellung Verwendung fanden. Zusätzlich findet sich in Tabelle 4 die Angabe der Genbank aus der sie stammten, sowie die Akzessionsnummer des Vaters (die Wildart) und die Versuche, in denen sie eingesetzt wurden.

In Tabelle 5 sind die *Brassica* Wildarten aus dem Gewächshausscreening dargestellt. Neben der Bezeichnung sind, sofern vorhanden, die Herkunft, die Genbank, Akzessionsnummer und die Versuche, in denen sie eingesetzt wurden, angegeben. Auch die Wildarten wurden von der Abteilung für Pflanzenzüchtung (Prof. Dr. Heiko C. Becker), DNPW, Georg-August-Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

Tab. 4: Verwendete Resynthesen, die zu ihrer Herstellung verwendeten Kreuzungspartner, die Genbank aus der sie stammen, ihre Akzessionsnummer und die Herkunft des Pollenspenders, sowie die Versuche in denen sie eingesetzt wurden.

Genotyp	Mutter	Vater	Genbank / Akzessionsnr. / Herkunft des Vaters	Verwendet im
BOY 1	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica bourgeaui* (Webb in Christ) Kuntze	IPK / K 9825 / Spanien, La Palma	GWH Screening OA Test
CRY 1	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica cretica* Lam.	ESPUPMIACB / 5971 / Griechenland	GWH Screening OA Test
HIY 1	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica hilarionis* Post	ESPUPMIACB / 7344-89 / Türkei	GWH Screening OA Test
INY 1	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica incana* Ten.	ESPUPMIACB / 6563 / Italien	GWH Screening
INY 3	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica incana* Ten.	ESPUPMIACB / 6569 / Italien	GWH Screening OA Test
INY 4	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica incana* Ten.	ESPUPMIACB / 6570 / Italien	GWH Screening

Genotyp	Mutter	Vater	Genbank / Akzessionsnr. / Herkunft des Vaters	Verwendet im
ISY 1	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica insularis* Moris	ESPUPMIACB / 7356 / Frankreich	GWH Screening OA Test
MAY 1	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica macrocarpa* Guss.	ESPUPMIACB / 6584 / Italien	GWH Screening
MOY 4	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica* Pourr. (= Brassica oleracea L. subsp. robertiana (Gay) Rouy & Fouq.)	ESPUPMIACB / 6835 / Spanien	GWH Screening
MOY 6	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica* Pourr. (= Brassica oleracea L. subsp. robertiana (Gay) Rouy & Fouq.)	CGN NL / CGN 18472 / Italien	GWH Screening
OLY 2	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* (L.) DC. cv. *acephala* (DC.) Alef. var. *selenisia* L.	IPK / K 9344	GWH Screening OA Test
RUY 1	*Brassica rapa* L. ssp. *trilocularis* (Roxb.) Hanelt	*Brassica rupestris* Raf. var. *hispida* (Raimondo & Mazzola)	ESPUPMIACB / 6580-84 / Italien	GWH Screening
MOL 1	*Brassica rapa* L. ssp. *oleifera* (DC.) Metzg. f. *biennis*	*Brassica* Pourr. (= Brassica oleracea L. subsp. robertiana (Gay) Rouy & Fouq.)	IPK / K 8380 /	GWH Screening
OLL 1	*Brassica rapa* L. ssp. *oleifera* (DC.) Metzg. f. *biennis*	*Brassica oleracea* L. ssp. *oleracea*	IPK / BRA 258 / Deutschland, Hamburg	GWH Screening OA Test

Tab. 5: Verwendete *Brassica* Wildarten, deren Herkunft, die Genbank aus der sie stammen, ihre Akzessionsnummer und die Versuche in denen sie verwendet wurden.

Genotyp	Herkunft	Genbank/ Akzessionsnr.	Verwendet im
Brassica bourgeaui (Webb in Christ) Kuntze	Spanien / La Palma	IPK/K9825	GWH Screening
Brassica cretica Lam.	Griechenland	IPK/K 6631	GWH Screening
Brassica cretica Lam. ssp. *aegea*	Türkei	IPK/K 9689	GWH Screening OA Test
Brassica drepanensis (Caruel) Ponzo	Italien / Sizilien	IPK/K 6926	GWH Screening OA Test
Brassica hilarionis Post.	Türkei	GBRNVRS/ 012483B	GWH Screening
Brassica incana Ten. 1	Russland	IPK/BRA 1166	GWH Screening OA Test
Brassica incana Ten. 2	Russland	IPK/BRA 1262	GWH Screening OA Test
Brassica incana Ten. 3	Russland	CGN/CGN18470	GWH Screening
Brassica incana Ten. 4	Russland	CGN/CGN18471	GWH Screening OA Test
Brassica insularis Moris 1	Italien / Sardinien	IPK/K 8934	GWH Screening
Brassica insularis Moris 2	Italien / Sardinien	IPK/K 9321	GWH Screening
Brassica insularis Moris 3	Italien / Sardinien	IPK/K 9338	GWH Screening
Brassica montana Pourr. (=*Brassica oleracea* L. subsp. *robertiana* (Gay) Rouy & Fouq.) 1	Italien	CGN/CGN18472	GWH Screening OA Test
Brassica montana Pourr. (=*Brassica oleracea* L. subsp. *robertiana* (Gay) Rouy & Fouq.) 2	Italien	IPK/K 6675	GWH Screening
Brassica montana Pourr. (=*Brassica oleracea* L. subsp. *robertiana* (Gay) Rouy & Fouq.) 3	k.A.	IPK/K 8380	GWH Screening OA Test

Genotyp	Herkunft	Genbank/ Akzessionsnr.	Verwendet im
Brassica montana Pourr. (=*Brassica oleracea* L. subsp. *robertiana* (Gay) Rouy & Fouq.) 4	Italien	IPK/K 7223	GWH Screening
Brassica oleracea L. ssp. *oleracea* 1	Kanada	IPK/BRA 101	GWH Screening
Brassica oleracea L. ssp. *oleracea* 2	Italien / Messina	IPK/BRA 108	GWH Screening
Brassica oleracea L. ssp. *oleracea* 3	Berlin	IPK/BRA 141	GWH Screening OA Test
Brassica oleracea L. ssp. *oleracea* 4	Hamburg	IPK/BRA 258	GWH Screening
Brassica oleracea L. ssp. *oleracea* 5	Wien	IPK/BRA 259	GWH Screening
Brassica oleracea L. ssp. *oleracea* 6	Kanada	IPK/BRA 260	GWH Screening
Brassica oleracea L. ssp. *capitata* (L.) DC. cv. *acephala* (DC.) Alef. var. *selenisia* L.	Italien	IPK/K 9344	GWH Screening OA Test
Brassica taurica Tzvel.	Ukraine	IPK/K 9238	GWH Screening OA Test
Brassica villosa Biv. 1	Italien / Sorento	GBRNVRS/6691	GWH Screening OA Test
Brassica villosa Biv. 2	k.A.	GBRNVRS/6849	GWH Screening
Brassica montana Pourr. (=*Brassica oleracea* L. subsp. *robertiana* (Gay) Rouy & Fouq.) 5	k.A.	IPK/BRA 1644	GWH Screening
Erucastrum gallicum	k.A.	PGRC/CN 102119	GWH Screening
Erucastrum sp. 1	Frankreich	IPK/Eruc1	GWH Screening
Erucastrum sp. 2	k.A.	IPK/Eruc 2	GWH Screening
Brassica oleracea var. *viridis*	Deutschland		GWH Screening OA Test

2.6 Feldversuche

2.6.1 Versuchsstandorte

Die Feldversuche wurden am Stadtrand von Göttingen zwischen den Ortsteilen Weende und Holtensen durchgeführt. Verwendet wurden die Schläge „Hinter der Bahn“ (Feldversuch 2007/08), „Große Breite“ (Feldversuch 2008/09) und „Dragoneranger“ (Feldversuch 2009/10), die sich in unmittelbarer Nachbarschaft befinden und aus diesem Grund vergleichbare Klima- und Bodenbedingungen aufweisen. Die Flächen, die zur Versuchswirtschaft Reinshof der Universität Göttingen gehören, liegen nahe dem Fluss Leine und zeichnen sich durch einen Lehmboden mit einer Ackerzahl von 89 nach Klassifizierung der Reichsbodenschätzung aus. Während auf dem Schlag „Hinter der Bahn“ drei Jahre vor dem Versuch bereits Raps angebaut wurde, und somit bereits Sklerotien im Boden vorhanden sein konnten, war dies auf den beiden anderen Flächen nicht der Fall. Auf diesen Flächen war der natürliche Befallsdruck folglich geringer.

Darüber hinaus wurden in den Versuchsjahren 2008/09 und 2009/10 zusätzlich Versuche an zwei Standorten der beteiligten Züchter angelegt. Einer dieser Versuche lag bei Rosenthal in der Nähe von Peine, während der andere in der Nähe von Malchow auf der Insel Poel lag. Sämtliche Behandlungen und Bonituren wurden von den beteiligten Züchtern analog zu dem nachfolgend beschriebenen Boniturschema durchgeführt. Die Versuche bei Peine wurden auf dem Schlag Atila angelegt. Dieser Schlag zeichnet sich durch einen sandigen Lehm und einer Ackerzahl von 58 aus. Der Standort auf der Insel Poel dagegen weist einen lehmigen Sandboden auf.

2.6.2 Versuchsanlage

2.6.2.1 Feldversuch 2007/08

Der Versuch wurde mit vier Wiederholungen in einem vollständig randomisierten Design und einer einheitlichen Aussaatstärke von 50 Samen/m² angelegt. Die Parzellengröße im Versuchsjahr 2007/08 betrug 12,4 m x 3 m, wobei jede Parzelle in drei Subparzellen unterteilt wurde, so dass ein Teil durch eine Cantus (Boscalid) Behandlung befallsfrei gehalten werden konnte. Ein weiterer Teil wurde durch die Applikation einer Myzelsuspension inokuliert und ein Teil diente als unbehandelte Kontrolle, in welcher natürlicher Befall zugelassen wurde. Aufgrund ihrer Einstufung in der Bundessortenliste in Bezug auf ihre Anfälligkeit gegenüber Sklerotinia, wurden 24 Sorten ausgewählt, welche im Feldversuch Verwendung fanden. Zusätzlich wurde ein Sklerotiendepot angelegt, um die Keimung und Apothecienentwicklung der im Boden vorhandenen Sklerotien und damit den natürlichen Befallsdruck beobachten zu können. Hierfür wurden Sklerotien des Isolats SS 1.5 in Roggenmehl-Quarzkiesgemisch hergestellt und nach der Aussaat auf einer zuvor markierten, mit Raps bestellten Fläche am Rande des Versuchs oberflächlich in den Boden eingearbeitet. Die Behandlung mit Cantus erfolgte praxisüblich zur Vollblüte. Die Inokulation wurde dagegen an drei Terminen (29. April 2008, 08. Mai 2008 und 15. Mai 2008) durchgeführt, um die Blütenblätter der frühen und späten Sorten gleichmäßig zu erreichen. Zur Inokulation wurde Myzel in 27,06 L Glukose-Medium hergestellt, abgenutscht und mit Hilfe eines Blenders homogenisiert. Das so gewonnene Myzel wurde in 150 l frisch angesetztem Glukose-Medium überführt und mit einer Feldspritze auf die zu inokulierende Fläche ausgebracht. Die eingesetzte Menge entsprach etwa 1000 l/ha, so dass zusammen mit dem Myzel eine größere Wassermenge mit ausgebracht wurde. Um den Infektionserfolg zu erhöhen, wurden die Inokulationen in den Abendstunden durchgeführt, so dass ein schnelles Antrocknen der Myzelsuspension verhindert werden konnte. Die Inokulationen wurden stets nach leichtem Regen durchgeführt und es wurde darauf geachtet, dass in den nächsten Stunden kein erneuter Regen einsetzte. Als Erfolgskontrolle wurden zwei Tage nach jeder Inokulation und vor der ersten Inokulation Blütenblätter entnommen und auf SSM-Medium ausgelegt, um das Vorhandensein des Pilzes nachzuweisen.

Düngung, Pflanzenschutz und andere pflanzenbauliche Maßnahmen erfolgten praxisüblich und sind im Anhang auf Seite 187 aufgeführt.

2.6.2.2 Feldversuche 2008/09 und 2009/10

In den Versuchsjahren 2008/09 und 2009/10 wurde der Versuch zusätzlich zum Standort Göttingen an zwei weiteren Standorten angelegt. Während allerdings in Göttingen wieder vier Wiederholungen angelegt wurden, konnte in Peine nur mit drei und auf Poel mit lediglich zwei Wiederholungen gearbeitet werden. An beiden Standorten wurden die Versuche im Gegensatz zum Standort Göttingen als randomisierte Blockanlage angelegt. An allen Standorten wurde eine einheitliche Aussaatstärke von 50 Samen/m² gewählt.

In beiden Versuchsjahren wurden 28 statt 24 Genotypen verwendet. Bei diesen Genotypen handelte es sich um 24 von den beteiligten Züchterhäusern bereitgestellte Sorten oder Linien. Jedes Züchterhaus stellte vier Genotypen (drei resistente und ein anfälliger Genotyp) zur Verfügung, wobei es eine Einstufung des Resistenzniveaus angeben sollte. Bei der Auswahl des Materials wurden den Züchterhäusern keine Vorgaben gemacht, sie erfolgte nach ihren Vorstellungen. Es konnte sich also bei den verwendeten Genotypen z.B. sowohl um Hybrid- wie auch um Liniensorten handeln. Dies wurde bei der Wahl der Aussaatstärke nicht weiter berücksichtigt. Da anzunehmen ist, dass die Züchter in der Lage sind ihr Material entsprechend zu klassifizieren bzw. einzuschätzen, spiegelt das hier verwendete Material die größte der Züchtung zur Verfügung stehende Differenzierung im Merkmal Sklerotinia Resistenz wieder. Zusätzlich zu den von den Züchtern zur Verfügung gestellten Genotypen, wurden vier Genotypen aufgrund der Ergebnisse des vorigen Versuchsjahres ausgewählt. Bei diesen Genotypen handelte es sich um jeweils zwei Sorten mit hoher und geringer Resistenz, um das Material der Züchterhäuser mit dem bisher zur Verfügung stehenden vergleichen zu können.

Da zum Teil nicht ausreichend Saatgut zur Verfügung stand oder das Saatgut nicht rechtzeitig geliefert wurde, mussten zum Teil unterschiedliche Genotypen in den einzelnen Versuchen bzw. Versuchsjahren eingesetzt werden.

Die Parzellengröße in den beiden Versuchsjahren betrug in Göttingen 7,9 m x 3 m. Allerdings wurden die Parzellen nicht wie im Vorjahr dreigeteilt, sondern nur in zwei gleich große Teile geteilt. Während ein Teil, wie schon im Versuchsjahr 2007/08, durch eine Behandlung mit Cantus zur Vollblüte befallsfrei gehalten wurde, wurde der Befallsdruck auf dem anderen Teil durch das Ausbringen von Sklerotien künstlich erhöht. Diese Sklerotien wurden in beiden Jahren im späten Herbst ausgebracht um sicherzustellen, dass sie eine ausreichende Konditionierung erfahren und im folgenden Jahr auskeimen. Hierzu wurden die Sklerotien aus Schackenthal in der Nähe von Aschersleben und von der Insel Poel verwendet. Das Mischungsverhältnis betrug etwa 7:1, da eine deutlich geringere Menge an Sklerotien von der Insel Poel zur Verfügung stand. Es wurden, um eine starke und gleichmäßige Verseuchung zu gewährleisten, ca. 4 g Sklerotien je m² ausgebracht, was ca. 221 Sklerotien je m² entspricht. Hiermit wurde also eine erhebliche Sklerotienmenge, die weit über der natürlich vorkommenden Menge liegen sollte, ausgebracht. Die Sklerotien wurden in die zu inokulierenden Parzellen gestreut und nicht eingearbeitet. An den beiden anderen Versuchsstandorten wurde die gleiche Menge Sklerotien ausgebracht.

Die Parzellengröße am Versuchsstandort Peine betrug 16,5 m² während auf Poel 12,8 m² große Parzellen angelegt wurden. An beiden Standorten wurde jeweils ein Block mit Sklerotien verseucht, während der andere Block durch die Cantus Behandlung zur Vollblüte befallsfrei gehalten werden sollte.

An jedem der Standorte wurden wiederum Sklerotiendepots angelegt, um die Entwicklung von Apothecien beobachten zu können. Hierzu wurden wiederum Sklerotien der beiden in den Versuchen verwendeten Herkünfte auf vorher markierte Flächen auf dieselbe Weise wie in den Parzellen ausgestreut. Zusätzlich wurde am Standort Göttingen ein Depot mit dem Isolat SS 1.5 angelegt, um Unterschiede zu den ausgestreuten Isolaten mit zu erfassen. Die Sklerotien des Isolats SS 1.5 wurden wie oben beschrieben in Roggenmehl-Quarzkiesgemisch angezogen. Die Depots befanden sich wiederum direkt neben den Versuchen und waren ebenfalls mit Raps bestellt, um vergleichbare Bedingungen sicherzustellen. Auch auf ein Einarbeiten der Sklerotien wurde in diesen Versuchsjahren verzichtet, da dies auch im Versuch selbst nicht durchgeführt werden konnte.

Im Versuchsjahr 2008/09 wurde darüber hinaus ein Depot mit Sklerotien angelegt, die sich im Frühjahr auf infizierten Pflanzen gebildet hatten.

Auch in diesen Versuchsjahren erfolgten alle übrigen pflanzenbaulichen Maßnahmen praxisüblich und sind im Anhang auf den Seiten 188 und 189 angegeben.

Es wurde also im Versuchsjahr 2007/08 ein Versuch am Standort Göttingen angelegt, der durch das Ausbringen einer Mycelsuspension inokuliert wurde. In den Versuchsjahren 2008/09 und 2009/10 wurden Feldversuche an den Standorten Göttingen, Peine und Poel angelegt. All diese Versuche wurden durch das Ausbringen von Sklerotien und nicht durch eine Myzelsuspension inokuliert.

2.6.3 Witterungsverlauf und Pflanzenentwicklung 2007 bis 2010

Die Angaben zum Witterungsverlauf beruhen auf den Daten der Messstationen des Deutschen Wetterdienstes in Göttingen, Braunschweig und Rostock. Es werden die Lufttemperatur in 2 m Höhe [°C], die relative Luftfeuchtigkeit [%], Monatsniederschläge [mm] und die Bodentemperatur in 5 cm Tiefe [°C] für den Zeitraum August bis Juli angegeben.

Um die Pflanzenentwicklung und vor allem die Bestandesdichte beurteilen zu können, wurde in jedem Frühjahr die Bestandesdichte ermittelt. Hierzu wurden die Pflanzen auf vier mal 0,25 m² je Parzellenteil erfasst.

Zum Zeitpunkt der Blüte wurden die BBCH-Stadien der einzelnen Parzellen bestimmt, um Aussagen über den Zeitpunkt der Vollblüte machen zu können. Die BBCH-Stadien wurden im Folgendem stets nach Meier (2001) bestimmt. Im selben Zeitraum wurden auch die Sklerotiendepots regelmäßig auf sich entwickelnde Apothecien überprüft.

2.6.4 Sklerotinia-Bonitur im Feld

Die Bonitur des Befalls erfolgte ausschließlich im Bestand. In allen Versuchsjahren wurde ca. zu BBCH 80, kurz vor der Abreife der Schoten, die Bonitur durchgeführt. Hierfür wurden am Standort Göttingen vier mal 1 m² je Parzellenteil betrachtet. Auf dieser Fläche erfolgte eine Betrachtung sämtlicher Pflanzen. Die Anzahl der infizierten und nicht infizierten Pflanzen wurde durch Auszählen bestimmt. Die Größe der Läsion oder der Ort der Läsion wurde nicht berücksichtigt. Bei dieser Bonitur

wurde die Befallshäufigkeit bestimmt. Eine Beurteilung der Befallsstärke fand nicht statt.

In den Versuchsjahren 2007/08 und 2009/10 wurde zusätzlich eine Bonitur der Stoppeln nach der Ernte durchgeführt. Hierfür wurden die befallenen und nicht befallenen Stoppeln auf einer Fläche von vier mal 0,25 m² je Parzellenteil erfasst.

In den Versuchsjahren 2008/09 und 2009/10 konnte schon im Frühjahr der Befall mit *S. sclerotiorum* bestimmt werden. Hierzu wurden im Versuchsjahr 2008/09 in den inokulierten Parzellenteilen die befallenen und nicht befallenen Pflanzen auf einer Fläche von zwei Mal 1 m² am 4. April bestimmt. Im darauf folgenden Versuchsjahr wurden vom 19. bis zum 22.4.2010 in den inokulierten Parzellenteilen 100 Pflanzen auf Befall mit *S. sclerotiorum* untersucht.

2.6.5 Ertragserfassung

In jedem Versuchsjahr sollte eine Ertragserfassung durchgeführt werden. Aufgrund eines Hagelereignisses war dies im Versuchsjahr 2007/08 nicht möglich. In den beiden übrigen Versuchsjahren wurden die Parzellen einzeln mit Hilfe eines Parzellenmähdreschers beerntet. Die Ertragsmenge wurde mittels wiegen direkt nach der Ernte festgestellt. Zur Ermittlung der Feuchte, des Schmutzes und des TKGs wurde ein Aliquot des Ernteguts entnommen, in dem durch eine Differenzwägung von Frischmasse zu Trockenmasse (für 24 h bei 103°C getrocknet und auf 80°C abgekühlt) die Feuchte bestimmt wurde. Die getrocknete Probe wurde im Anschluss mit einem Probenreiniger (Sample Cleaner, Model MLN, Pfeuffer, Kitzingen) gereinigt, so dass der Schmutzanteil durch erneutes Wiegen bestimmt werden konnte. Schließlich wurde das TKG mit Hilfe eines elektronischen Zählgerätes (Numigral I Seed Counter, Tripette et Renaud, Paris) bestimmt, indem ca. 500 Körner abgezählt und gewogen wurden.

Mithilfe dieser Daten ließ sich der Ertrag, bezogen auf eine Kornfeuchte von 9% und ohne Schmutz bzw. Besatz bestimmen und auf Hektarerträge (dt/ha) umrechnen.

2.7 Resistenzscreening im Gewächshaus

Die Aussaat der Pflanzen für das Gewächshausscreening erfolgte in mit Torf gefüllten Pikierschalen (24 x 32 cm), die zur Erhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit mit einer Glasscheibe abgedeckt waren. Nach ca. einer Woche wurden die Sämlinge in Multitopfschalen (51 Töpfe mit Ø 5 cm) pikiert. Das Substrat in den Multitopfschalen bestand aus einer Mischung aus Torf, gedämpftem Kompost und Sand (3:3:1). Hierin wurden die Pflanzen für ca. zwei weitere Wochen kultiviert, bis sich das dritte Laubblatt zeigte. Anschließend wurden sie zur Vernalisation für einen Zeitraum von ca. acht Wochen bei 4°C kultiviert. Nach der Vernalisation wurden die Pflanzen aus den Multitopfplatten in größere Kunststofftöpfe (13 cm x 13 cm x 13 cm) umgetopft. In diesen Töpfen wurden sie bis zur Inokulation bei einer Temperatur von 25±10°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 35 bis 40% im Gewächshaus weiter kultiviert, wobei sie vollständig randomisiert aufgestellt wurden, um etwaige Randeffekte wie z.B. Temperaturunterschiede auszuschließen. Während des gesamten Versuchszeitraums standen sie auf Gewächshaustischen, die mit einem Gießfilz und perforierter Folie ausgelegt waren, so dass die Wasserversorgung von unten sichergestellt war. Die Regelung der Temperatur erfolgte durch Zuschalten der Heizung bzw. durch Öffnen oder Schließen der Dachfenster und Beschattung. Um die Pflanzen möglichst geringem Stress auszusetzen, wurde Wasserstress vermieden und nach Berücksichtigung der vor allem im Kompost vorhandenen Nährstoffe wöchentlich nach Bedarf mit Hakaphos (15% N; 15% K_2O; 11% P_2O_5; 1% MgO) sowie Bittersalz (16% MgO; 13% S) gedüngt. Um den Befall mit Insekten oder pilzlichen Pathogenen zu vermeiden, wurde regelmäßig Netzschwefel gegen Echten Mehltau (*Erysiphe chicoracearum* DC), Rody (Fenpropathrin) in Kombination mit Paraffinöl gegen die Weiße Fliege (*Trialeurodes vaporariorum* (West.)) und Tamaron (Methamidophos) gegen Thripse (*Thrips tabaci* (Lindeman)) appliziert.

Unabhängig von der Jahreszeit und der von außen einfallenden Strahlung wurde durch Kunstlicht eine mindestens sechzehnstündige Photoperiode mit einer mindest Beleuchtungsstärke von 10.000 Lux gewährleistet.

Unter diesen Bedingungen wurden die Pflanzen kultiviert bis sie das Stadium der Vollblüte (BBCH 65) erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Inokulation durchgeführt, indem ein myzelüberwachsener Agarplug (Ø 7 mm) in eine Blattachsel gelegt und mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, USA) fixiert

wurde. Die Agarplugs wurden vom Rand eines noch wachsenden Myzels von einer drei Tage alten PDA Platte ausgestochen. Auf diese Weise war sichergestellt, dass stets vergleichbares Inokulum verwendet wurde. Bei der Inokulation wurde darauf geachtet, dass die myzelüberwachsene Seite des Plugs in direktem Kontakt zum Stängel war und dass das Blatt, wie auf Abb. 1 zu erkennen, durch den Parafilm ein wenig nach oben gedrückt allerdings nicht verletzt wurde, um möglichst engen Kontakt des Plugs zur Pflanze zu gewährleisten. Außerdem sollte durch das dichte Umwickeln der Inokulationsstelle mit Parafilm sichergestellt werden, dass der Plug und damit der Pilz nicht austrocknet bevor es zu einer Infektion kommen konnte. Nach drei Tagen wurde der Parafilm wieder entfernt, um die Länge der entstandenen Läsion messen zu können, sofern die Läsion nicht bereits größer war als die vom Parafilm abgedeckte Fläche. Die Messung wurde stets auf der Seite des Stängels mit der größten Läsionslänge in vertikaler Richtung durchgeführt. Um aus den Daten den AUDPC-Wert errechnen zu können wurde die Länge der Läsion täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen nach entfernen des Parafilms, von 3 dpi bis 9 dpi, festgehalten. Der AUDPC-Wert wurde nach folgender Formel (Kaiser 2007) berechnet:

$$AUDPC = \frac{y_i + y_{i+1}}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

Wobei y_i die Läsionslänge zum Zeitpunkt i und t_i die Anzahl der Tage nach der Inokulation ist.

Da der Inokulationstermin von dem Entwicklungsstadium der Pflanze abhängig gemacht wurde und die Entwicklung sich zwischen verschiedenen Genotypen, aber auch zwischen Pflanzen eines Genotyps, unterschied wurde über einen längeren Zeitraum hinweg täglich kontrolliert, ob Pflanzen inokuliert werden mussten. Außerdem wurde die Temperatur beim Zeitpunkt der Inokulation berücksichtigt und an extrem warmen Tagen fand keine Inokulation statt.

Die Anzahl der Wiederholungen betrug in dem Gewächshausscreening, in dem die Genotypen aus dem Feldversuch getestet wurden, 12 und in dem Gewächshausscreening, in dem die wilden *Brassica* Arten eingesetzt wurden, 11.

Da einige der wilden *Brassica* Arten, die im Gewächshausscreening eingesetzt wurden, keinen Spross bildeten oder blühten, wurden diese Pflanzen im Winter

2009/10 ein weiteres Mal vernalisiert. Für ca. vier Wochen wurden sie in eine offene Vegetationshalle gestellt, in der zu diesem Zeitpunkt Temperaturen zwischen 0 und 5°C herrschten. Im Anschluss daran wurden sie wiederum in das Gewächshaus gebracht, um die Spross und Blütenentwicklung zu ermöglichen. Pflanzen, die während dieser Zeit erfroren oder keine Sprosse oder Blüten entwickelten, konnten nicht inokuliert und somit in den Versuch mit einbezogen werden. Da sich der Versuch über einen längeren Zeitraum hinzog, wurde auch die Temperatur im Gewächshaus mittels Data Logger (Voltcraft® DL-120 TH, Conrad Electronic GmbH, Hirschau) aufgezeichnet, so dass die Temperatur zum Zeitpunkt der Inokulation mit in die Betrachtung einbezogen werden konnte. Pflanzen, die nach der Inokulation keine Läsion aufwiesen wurden direkt über oder unterhalb des ersten Inokulationsversuches erneut Inokuliert bis sich Läsionen entwickelten. Die Zeitpunkte und die Anzahl sämtlicher Inokulationen, auch der nicht erfolgreichen wurden notiert, so dass aus der Anzahl an Inokulationen die nötig waren, um eine Läsion zu erzeugen, die Inokulationseffizienz in Prozent ermittelt werden konnte. Bei dem Gewächshausscreening, in dem die Feldgenotypen verwendet wurden, trat diese Phänomen nicht auf. Die Inokulationseffizienz wurde nach folgender Formel berechnete:

$$Inokulationseffizienz\ \ \% \ = \frac{\#Läsionen}{\#Inokulationen} * 100$$

Dabei ist *#Läsionen* die Anzahl der zu beobachtenden Läsionen und *#Inokulationen* die Anzahl der Inokulationen, die nötig waren, um die Läsionen zu erzeugen.

In dem Experiment, in dem die wilden Brassica Arten und Resynthesen eingesetzt wurden, wurde zusätzlich zum Zeitpunkt der Inokulation direkt an der zu inokulierenden Stelle der Stängeldurchmesser bestimmt. Weitere morphologische Merkmale wie z.B. Blütenfarbe (gelb/weiß), Blütengröße (groß/klein), Blütenzahl (viele/wenige), Verzweigung (stark/gering), Blattform, Behaarung (stark/gering), Dicke der Wachsschicht (stark/gering), Stängelfarbe (grün/rot) sowie die Größe zum Zeitpunkt der Inokulation (cm) wurden ebenfalls visuell erfasst. Außerdem wurde nach der letzten Läsionslängenmessung die Läsion entfernt und das Frisch- sowie Trockengewicht des Stängels direkt unterhalb der Läsion bestimmt.

Abb. 1: Im Gewächshaus durchgeführte Inokulation mittels Agar-Myzelplugs und daraus resultierende Läsion.

2.8 Oxalsäuretest

Die Samen der Pflanzen für den Oxalsäuretest wurden, wie vorangegangen für die Pflanzen für das Gewächshausscreening beschrieben, in Pikierschalen ausgelegt. Sie wurden ebenfalls in Multitopfplatten mit der oben beschriebenen Substratmischung pikiert, allerdings nicht vernalisiert oder umgetopft. Diese Pflanzen wurden in einem Klimaraum, der sich durch extrem konstante Temperatur und Luftfeuchtigkeit auszeichnete, bei einer konstanten Temperatur von 20°C kultiviert. Die Photoperiode und Beleuchtungsstärke entsprach den oben genannten Bedingungen, wobei berücksichtigt werden muss, dass keine von außen einfallende Strahlung vorhanden war. Durch die Anzucht unter diesen sehr standardisierten Bedingungen sollte sichergestellt werden, dass stets vergleichbares Pflanzenmaterial im Oxalsäuretest eingesetzt wird. Die Bewässerung erfolgte über ein Gießflies von unten, um Wasserstress zu vermeiden. Unter diesen Bedingungen wurden die Pflanzen für ca. vier Wochen angezogen, bis das fünfte Laubblatt voll entwickelt war. Auf die Gabe von Düngern wurde verzichtet, um Unterschiede in der Nährstoffversorgung der Pflanzen zu vermeiden. Am Tag vor dem Oxalsäuretest wurden die Pflanzen unabhängig von der Feuchtigkeit des Substrats gründlich

gegossen, um sicherzustellen, dass die Wasserversorgung zum Zeitpunkt des Tests zwischen allen Pflanzen identisch war.

Auf Pflanzenschutzmaßnahmen wurde vollständig verzichtet, um eine Beeinflussung der Messergebnisse durch etwaige Rückstände der Spritzbrühe zu vermeiden. Sofern die Pflanzen von Schädlingen oder Pathogenen befallen waren, wurden sie verworfen und nicht für den Test benutzt. Um stets Pflanzen im gleichen Entwicklungsstadium zur Verfügung zu haben, wurden in regelmäßigen Abständen erneut Pflanzen angezogen.

Zur Vorbereitung des Oxalsäuretests wurden 24-Well-Mikrotiterplatten (Ø der Vertiefung 1,6 cm) am Vortag gründlich mit bidest. Wasser gespült und die Leitfähigkeit in den einzelnen Wells mittels eines Leitfähigkeitsmesser (Fa.: Radiometer Kopenhagen, Typ CDM 2e) überprüft. Sofern diese Messung ergab, dass die Platten sauber waren, wurden sie über Nacht getrocknet. Alle Geräte und Gefäße wurden gründlich mit bidest. Wasser gespült. Am Tag des Tests wurden die 24-Well-Mikrotiterplatten mit 2 ml bidest. Wasser, 1 und 2 mM, am Vortag angesetzter, Oxalsäure befüllt.

Für den eigentlichen Test wurde jeweils das fünfte voll entwickelte Laubblatt verwendet, das direkt vor dem Ansetzen des Tests von der Pflanze entnommen wurde. Hieraus wurden mit einem scharfen Korkbohrer rechts und links der Mittelrippe Blattscheiben (Ø 1,3 cm) ausgestanzt. Je Konzentration wurden sechs Blattscheiben verwendet, die von unterschiedlichen Pflanzen stammten. Da das Blattmaterial der eingesetzten wilden *Brassica*-Arten bzw. Resynthesen recht inhomogen war, wurde in diesem Versuch zusätzlich das Gewicht der Blattscheiben bestimmt. Diese wurden dann in die vorbereiteten Vertiefungen mit unterschiedlichen Oxalsäurekonzentrationen überführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Blattscheiben mit der Oberseite nach oben in der Lösung schwammen und sich keine Luftblasen unter den Blattscheiben bildeten, um einen gleichmäßigen Kontakt mit den Lösungen sicherzustellen. Die so vorbereiteten 24-Well-Mikrotiterplatten wurden zur Inkubation für zwei Stunden bei 20°C und Kunstlicht in einem biologischem Klimaschrank (WB 750 KFL, Mytron, Heiligenstadt) aufbewahrt. Nach dieser Inkubation wurde die Oxalsäure vollständig aus den Vertiefungen entfernt und jede Vertiefung mit der darin befindlichen Blattscheibe zweimal mit jeweils 2 ml bidest. Wasser gespült, um möglichst viel Oxalsäure zu entfernen. Nach dem Spülen

wurden erneut 2 ml bidest. Wasser zugegeben und die Leitfähigkeit in µS mit einem Leitfähigkeitsmesser zu Versuchsbeginn bestimmt, indem das bidest. Wasser zwischen die Elektroden gesaugt und nach der Messung wieder in das Well zurückgegeben wurde (siehe Abb. 2). Hierbei wurde wiederum darauf geachtet, dass die Blattscheiben mit der Oberseite nach oben in der Lösung schwammen und sich keine Luftblasen unter den Scheiben bildeten. Außerdem wurde während des Spülens und den sich anschließenden Messungen vermieden die Blattscheiben direkt zu berühren um Verletzungen des Gewebes zu vermeiden.

In Vertiefungen, bei denen der erste Messwert 3,5 µS überschritt, wurde erneut gespült, da nicht die gesamte Oxalsäure entfernt wurde und die verbleibende Oxalsäure weiteren Schaden am Blattgewebe hervorrufen könnte.

Von diesem Zeitpunkt an wurden nach 1, 2, 3, 4, 5 und 24 Stunden Messungen der Leitfähigkeit des bidest. Wassers in den Wells durchgeführt, wobei jedes Mal das Wasser wieder zurück ins Well gegeben wurde, um es nach einer Stunde erneut messen zu können. Zwischen den Messungen wurden die Platten stets bei 20°C und einem Tag/Nachtzyklus von 16/8 h inkubiert. Hierbei dienten die Messungen nach 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden lediglich als interne Kontrolle. Sofern eine Vertiefung nicht ausreichend gespült wurde oder eine Blattscheibe durch das Spülen oder Messen verletzt wurde, konnte dies an den frühen Messterminen erkannt werden und diese Blattscheiben wurden dann nicht mit in die Betrachtung einbezogen. Um die Inhomogenität des Blattmaterials der wilden *Brassica*-Arten und Resynthesen zu berücksichtigen, wurde außerdem das Frisch- und Trockengewicht der Blätter, die Anzahl der Spaltöffnungen je mm² und der Grad der Behaarung bestimmt. Diese Daten sollten später als Korrekturfaktoren mit in die Berechnung einbezogen werden.

Die Änderung der Leitfähigkeit wurde um die Änderung der Leitfähigkeit in der Wasservariante nach folgender Formel korrigiert:

$$\Delta S = S_{2mM;24h} - \overline{x}S_{2mM;0h} - (\overline{x}S_{0mM;24h} - \overline{x}S_{0mM;0h})$$

Wobei ΔS die Änderung der Leitfähigkeit korrigiert um die Änderung der Leitfähigkeit in der Wasservariante, $S_{2mM;24h}$ der Messwert der 2 mM Variante zum Zeitpunkt 24 h, $\overline{x}S_{2mM;0h}$ der Mittelwert der 2 mM Variante zum Zeitpunkt 0 h, $\overline{x}S_{0mM;24h}$ der Mittelwert der 0 mM Variante zum Zeitpunkt 24 h und $\overline{x}S_{0mM;0h}$ der Mittelwert der 0 mM Variante zum Zeitpunkt 0 h ist.

Abb. 2: Messung der Leitfähigkeit nach der Inkubation der Blattscheiben in Oxalsäure.

2.9 Pflanzentransformation

2.9.1 Entwicklung spezifischer PCRs

Zur Überprüfung der erhaltenen Genkonstrukte musste zunächst eine spezifische PCR (Polymerase Chain Reaction) etabliert werden. Hierzu wurden die Primerpaare
TOXDC_Primer9_F (5´ CTCTCTCCAGGCTACCAACG 3´) und
TOXDC_Primer10_R (5´ GTCATCCCAGTCGGCTATGT 3´) bzw.
DH10B_Primer11_F (5´ CCTAGTAGCTGGCCTGTTCG 3´) und
DH10B_Primer12_R (5´ GCCAACTTGGACGAGAAGAG 3´), die Produkte der Größe 169 bzw. 180 Basenpaare synthetisieren, genutzt. Die Primer wurden für diesen Zweck erstellt, indem die Sequenz der Gene über eine Gendatenbank (Anonymus 2011a) gesucht und dann mittels der Software Primer3Plus (Anonymus 2011b) erstellt wurden. Die Primer sollten eine Größe von 19-22 Basenpaaren und einen GC-Gehalt von 45-80% aufweisen, sowie eine Produktgröße von 100-300 Basenpaaren amplifizieren. Die Primerpaare sind spezifisch für das Oxalat Decarboxylase (TOXDC) bzw. Oxidase Gen (DH10B), so dass bei allen nachfolgenden Arbeiten die DNA von Pflanzen, denen das jeweils andere Gen inseriert wurde, als Negativkontrolle dienen konnte. Auf diese Weise war sichergestellt, dass stets mit vergleichbaren DNA-Extrakten z.B. aus

Plasmidpräparationen oder DNA-Extraktionen aus Pflanzenmaterial gearbeitet werden konnte. Die Komponenten des PCR Ansatzes sind in Tab. 6 und 7 dargestellt, während die Reaktionsbedingungen in Tab. 8 angegeben sind. Die PCR-Konturen waren für beide Genkonstrukte identisch und es wurde für jede Reaktion ein Endvolumen von 25 µl gewählt.

Tab. 6: PCR (Polymerase Chain Reaction) Reaktionsansatz für das Oxidase Gen (DH10B). Gesamtvolumen je Reaktion 25 µl.

Chemikalie	Konzentration	Endkonzentration	µl/je Reaktion
H_2O			12,8
10x Dream taq Puffer	10x	1x	2,5
dNTPs	10 mMe	200 µM	0,5
MgCl2	25 mM	2 mM	2
DH10B_Primer11_F	10 µM	1 µM	2,5
DH10B_Primer12_R	10 µM	1 µM	2,5
Dream taq	5 U/µl	1 U/µl	0,2
DNA			2

Tab. 7: PCR (Polymerase Chain Reaction) Reaktionsansatz für das Oxalat Decarboxylase Gen (TOXDC). Gesamtvolumen je Reaktion 25 µl.

Chemikalie	Konzentration	Endkonzentration	µl/je Reaktion
H_2O			14,3
10x Dream taq Puffer	10x	1x	2,5
dNTPs	10 mMe	200 µM	0,5
MgCl2	25 mM	0,5 mM	0,5
TOXDC_Primer9_F	10 µM	1 µM	2,5
TOXDC_Primer10_R	10 µM	1 µM	2,5
Dream taq	5 U/µl	1 U/µl	0,2
DNA			2

Tab. 8: PCR Programm zum Nachweis der eingesetzten Gene.

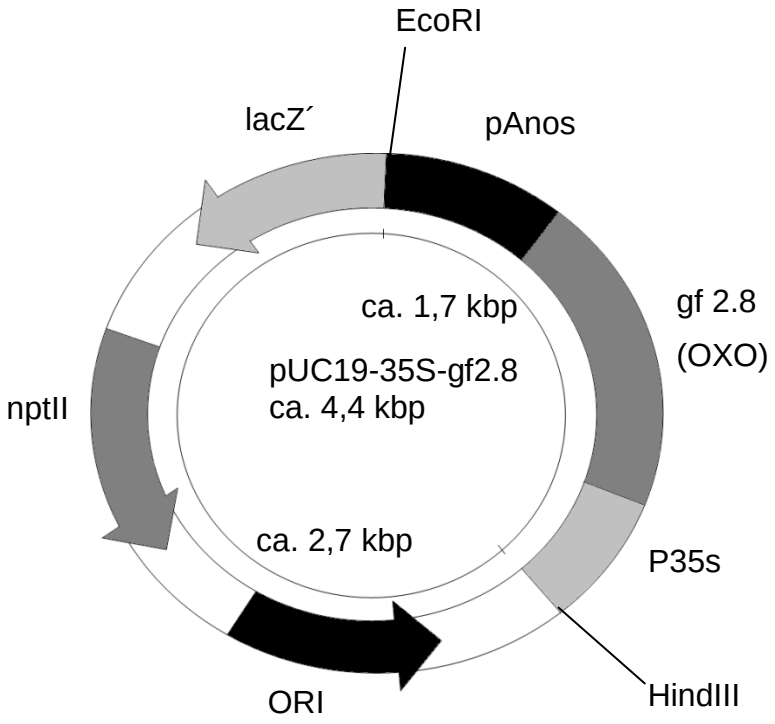
Programm	Phase	Zeit	Temperatur
1	Denaturierung	2 min	94°C
2	Primer Hybridisierung (Annealing)	1 min	68°C
3	Elongation (2-fache WDH. Der Schritte 1 bis 3)	10 sec	72°C
4	Denaturierung	1 min	94°C
5	Primer Hybridisierung (Annealing)	1 min	68°C
6	Elongation (1-fache WDH. Der Schritte 4 bis 6)	10 sec	72°C
7	Denaturierung	1 min	94°C
8	Primer Hybridisierung (Annealing)	1 min	68°C
9	Elongation (24-fache WDH. Der Schritte 7 bis 9)	10 sec	72°C

Zur Dokumentation der PCRs wurden Gelelektrophoresen durchgeführt. Hierfür wurden 1 bis 1,5%ige Agarosegele mit TBE Puffer verwendet, denen vor dem Gießen bereits 3 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Gel zugegeben wurde. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 0,2 Volumen Beschwerungspuffer versetzt. Die Elektrophoresen wurden in der Regel bei 3 V/cm Gel in 0,5x TBE Puffer durchgeführt. Durch Geldokumentation (Fa. Bio-Rad, Hagen) ließ sich die Fluoreszenz über eine Videokamera erfassen und festhalten. Ausgewertet wurden die Gele mittels der Software Quantity One (Version 4.5.0; Fa. Bio-Rad, Hagen).

2.9.2 Vektorherstellung

Während das Genkonstrukt für die Oxalat Decarboxylase bereits in einer für die Transformation geeigneten Form vorlag (P221-TOXDC; siehe Abb. 3), musste für die Oxalat Oxidase zunächst ein geeigneter Klonierungsvektor hergestellt werden. Hierzu wurde das Oxalat Decarboxylase Gen (TOXDC) samt dem Neomycin Phosphotransferase Gen (nptII) und dem CaMV 35S Promoter (P35s) aus dem

Klonierungsvektor entfernt und durch das Oxalat Oxidase Gen (gf2.8) und dem daran gekoppelten Resistenzgen (nptII) und Promotor (P35s) ersetzt.



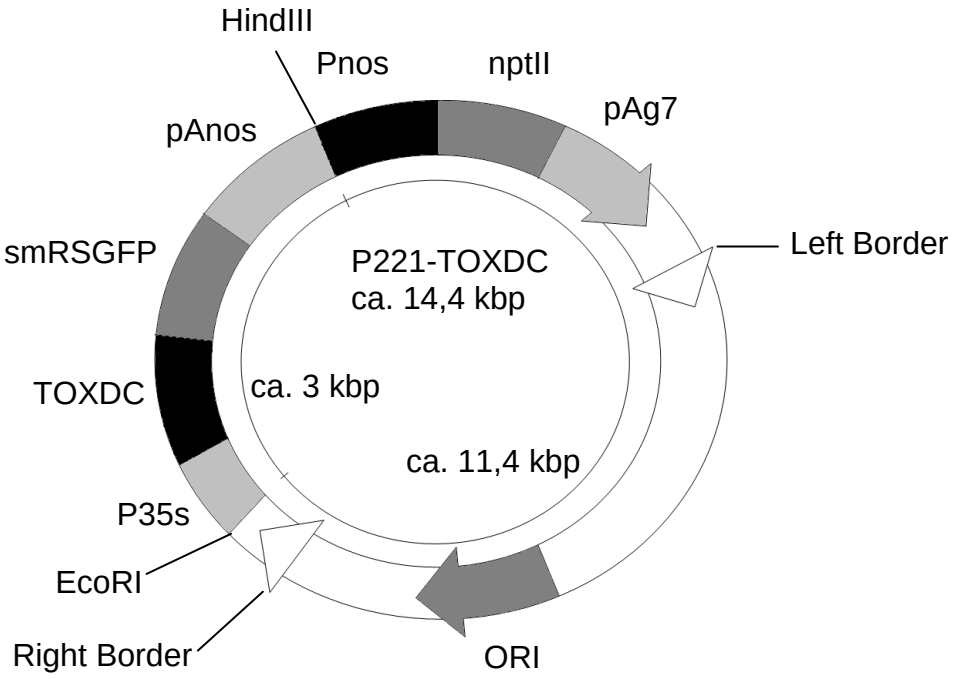


Abb. 3: Partielle Restriktionskarten der Vektoren pUC19-35S-gf2.8 und P221-TOXDC (verändert nach Walz (2007), Anonymus (2011c)).

2.9.2.1 Extraktion von Plasmiden aus *E. coli*

Zunächst mussten die Plasmide aus *E. coli* gewonnen werden. Hierfür wurde die Plasmid-Minipräparation nach Birnboim (1983) durchgeführt, indem *E. coli* auf LB-Medium angezogen wurde. Von dieser Platte wurden einzelne Kolonien gepickt und in 3 ml flüssiges LB-Medium überführt. Durch die Zugabe des Kanamycins zum Medium ist sichergestellt, dass lediglich Bakterien, die das entsprechende Plasmid tragen wachsen können. Diese Suspension wurde über Nacht bei 37°C auf einem Roll-Inkubator inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 2 ml der Kultur, sofern sich eine Trübung eingestellt hatte, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, um die Bakterien von dem Nährmedium ab zu trennen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde durch Zugabe von 200 µl eiskaltem, mit 0,5 mg/ml Lysozym versetztem, GLC und Vortexen resuspendiert. Nach einer Inkubation von ca. 20 min bei Raumtemperatur wurden 300 µl LYZ zugegeben, der Ansatz vorsichtig geschüttelt und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl HS Lösung wurde erneut gevortext und die Lösung für 30 min auf Eis inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurden die Zellfragmente aus der flüssigen Phase entfernt. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,6 bis 0,65 Volumen Isopropanol versetzt, geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA zu präzipitieren. Die DNA ließ sich im Anschluss durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min vom Überstand trennen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen werden. Nach dem Trocknen wurde das Pellet für 30 min in 50 µl 1 x TE Puffer resuspendiert. Durch die Zugabe von 1 µl RNAse und einer anschließenden Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min erfolgte die Degradation der mit isolierten RNA.

Der Nachweis des Extraktionserfolgs fand mittels Gelelektrophorese statt. Während das Plasmid des Genkonstrukts TOXDC (P221-TOXDC; siehe Abb. 3) eine Größe von 14,4 kbp aufwies, war das Plasmid des Konstrukts DH10B (pUC19-35S-gf2.8; siehe Abb. 3) lediglich 4,4 kbp groß.

2.9.2.2 Restriktion

Um die Plasmide zu schneiden, wurden zwei Restriktionsansätze hergestellt. Für TOXDC wurden bei einem Endvolumen von 300 µl zunächst 30 µl des bei dem Restriktionsenzym Hind III mitgelieferten Puffers (10x) vorgelegt. Im nächsten Schritt wurden 250 µl des Plasmidextrakts zugegeben und schließlich je 10 µl der Restriktionsenzyme Hind III (10 U/µl) und EcoRI (10 U/µl) zugegeben. Die Restriktionsstellen der beiden Enzyme sind in Abb. 3 dargestellt. Für DH10B wurden bei einem Endvolumen von 110 µl zunächst 13 µl des oben erwähnten 10x Puffers vorgelegt, dann 80 µl des Plasmid Extrakts und je 5 µl der Restriktionsenzyme Hind III (10 U/µl) und EcoRI (10 U/µl) zugegeben. Beide Ansätze wurden für 4 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor die Enzyme durch die Zugabe von jeweils 10 µl Beschwerungspuffer inaktiviert wurden.

2.9.2.3 DNA Isolation aus Agarosegelen

Um die geschnittenen Plasmidfragmente, wie oben beschrieben, zu trennen, wurde ein präparatives Agarosegel angefertigt. Hierzu wurde ein 1,5%iges TBE-Agarosegel mit einer 6 cm und einer 2 cm breiten Tasche neben weiteren Taschen für den Größenstandard hergestellt. In diese Taschen wurden die gesamten Ansätze aus dem Restriktionsverdau gegeben, um sie bei einer Spannung von 1 V/cm für 16 Stunden elektrophoretisch aufzutrennen. Nach der Auftrennung wurde das Gel in Streifen geschnitten, so dass ein Streifen die Größenstandards und einen kleinen Teil der durch die Plasmidteile entstandenen Banden enthielt. Dieser Streifen wurde für 10 min in einem Ethidiumbromid-Wasserbad (2 µg/ml) angefärbt. Nach der Entfernung des überschüssigen Ethidiumbromids durch eine erneute Inkubation von 10 min in einem Wasserbad, konnten die gesuchten Banden unter UV-Licht anhand eines Transilluminators identifiziert werden. Hierbei wurde in dem Ansatz von TOXDC die Bande mit der Größe von ca. 11,4 kbp und in dem Ansatz von DH10B die Bande mit der Größe von ca. 1,7 kbp verwendet. Durch die Verwendung der Bande mit einer Größe von 1,7 kbp wurde sichergestellt, dass der ungeeignete Vektor puc19 eliminiert wurde und lediglich das zu untersuchende Genkonstrukt weiter verwendet wurde. Um im Anschluss eine Ligation durchführen zu können

wurden in beiden Ansätzen dieselben Restriktionsenzyme verwendet, die an den in Abb. 3 dargestellten Position schneiden.

Nachdem die Banden durch kleine Schnitte im Gel markiert wurden, konnten die ungefärbten Gelstreifen angelegt werden und somit die gesuchten Banden mittels Skalpell herausgeschnitten werden ohne sie zu färben und UV-Licht auszusetzen.

Nach dem Wiegen des herausgeschnittenen Gelstreifens wurde die DNA mit dem Kit QIAEX II (Fa. Qiagen, Hilden) für Gelextraktionen nach dem mitgeliefertem Handbuch extrahiert. Allerdings wurde die DNA im letzten Schritt nicht wie empfohlen in Tris-Cl, sondern in 1 x TE Puffer resuspendiert.

Eine Kontrolle der Extraktion erfolgte durch eine erneute Gelelektrophorese.

2.9.2.4 Ligation

Anhand der Gelelektrophorese zur Kontrolle der Extraktion aus dem Gel konnten die Konzentrationen der beiden Fragmente abgeschätzt werden. Bei der Ligation sollten beide Fragmente in äquimolaren Mengen eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde eine deutlich größere Menge des P221-TOXDC Fragments eingesetzt. Im Einzelnen wurden zunächst 9 µl bidest. Wasser vorgelegt und 2 µl des 10x T4 Ligase-Puffers unterpipetiert. Im Anschluss wurden 5 µl der P221-TOXDC Fragment Lösung und 2 µl der pUC19-35S-gf2.8 Fragment Lösung unterpipetiert. Dieser Ansatz wurde gut gemischt und kurz an zentrifugiert, bevor 2 µl der T4 Ligase zugegeben wurden. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert, so dass das in Abb. 4 dargestellte Plasmid gebildet werden konnte. Das neu entstandene Plasmid DH10B wies eine Größe von 13,1 kbp auf.

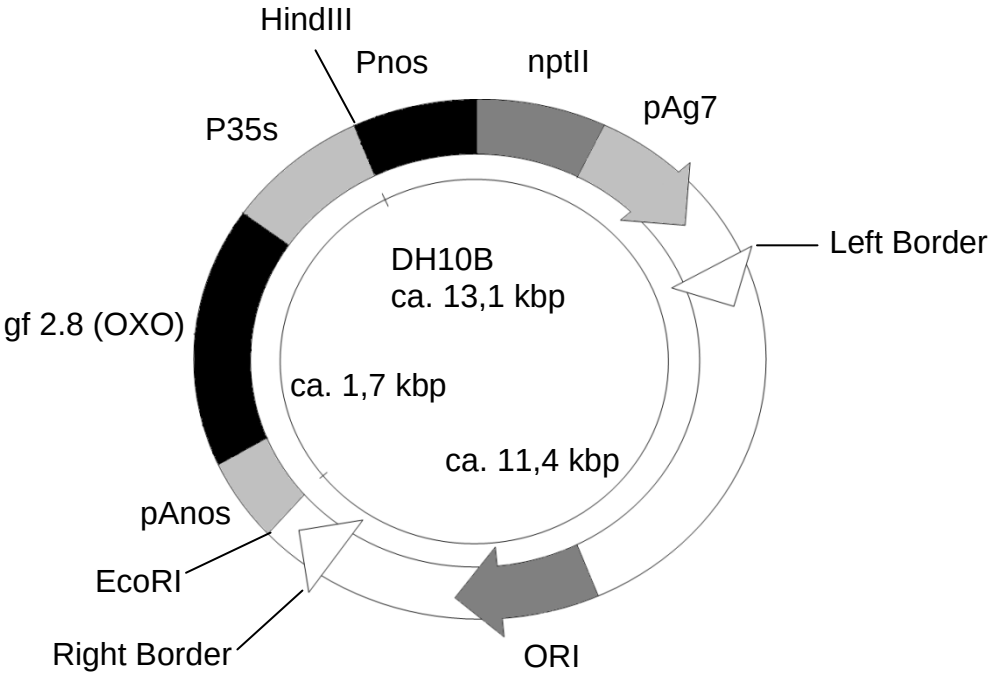


Abb. 4: Partielle Restriktionskarten des neu synthetisierten Vektors DH10B (verändert nach Walz (2007), Anonymus (2011c)).

2.9.3 Transformation von *E. coli*

Um das neu synthetisierte Plasmid zu erhalten und zu vermehren, wurde es zunächst durch die Erzeugung eines Hitzeschocks in chemokompetente *E. coli* überführt. Hierfür wurden die bei -80°C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und 200 µl der Zellsuspension mit 10 µl des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie für 40 sec in ein 42°C warmes Wasserbad überführt (Hitzeschock) und in 800 µl 37°C warmes Medium (SOC) überführt. Nach einer einstündigen Inkubation wurden 200 µl dieses Ansatzes auf LB-Medium ausplattiert. Da das Medium Kanamycin enthielt, konnten nach der Inkubation über Nacht bei 37°C lediglich *E. coli* Kolonien entstehen, die das oben beschriebene Plasmid aufgenommen hatten. Zur Überprüfung des Transformationserfolgs, wurde von den entstehenden Kolonien eine Plasmid-Minipräparation nach Birnboim (1983) durchgeführt, s.o., um mittels PCR-Verfahren die Anwesenheit des Plasmids zu zeigen.

Auf dem LB-Medium ließen sich 45 Kolonien identifizieren, von denen die Kolonie DH10B-39 das stärkste Wachstum und in der PCR das stärkste Signal lieferte. Folglich wurden alle weiteren Arbeiten mit der Kolonie DH10B-39 durchgeführt.

2.9.4 Transformation von *A. tumefaciens*

Um die beiden Gene in die Pflanze überführen zu können, mussten die erhaltenen Plasmide zunächst in *A. tumefaciens* überführt werden. Hierzu wurde als erstes eine weitere Plasmid-Minipräparation nach Birnboim (1983), s.o., durchgeführt und mittels PCR-Verfahren die Anwesenheit der beiden Plasmide nachgewiesen.

Zur eigentlichen Transformation der *A. tumefaciens* wurden elektrokompetente Zellen, die bei -70°C gelagert wurden, langsam auf Eis aufgetaut. Die verwendeten Plasmide wurden kurz anzentrifugiert, bevor jeweils 40 µl der *A. tumefaciens* Suspension mit 2 µl des entsprechenden Plasmidextrakts versetzt und für 1 min auf Eis inkubiert wurde. Nach dieser Inkubation wurde der Ansatz in eine 0,1 cm Elektroporationsküvette pipetiert, die zuvor mit Ethanol gespült wurde. Beim Befüllen der Küvette musste darauf geachtet werden, dass der Boden der Küvette bedeckt war, um die Leitung des Stroms zu gewährleisten. Die Küvette wurde in den Gene Pulser II (Gene Pulser II Electroporation System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingesetzt und die Spannung von 2,5 kV und 200 Ω angelegt. Nach dem Ertönen des akustischen Signals konnte die Küvette wieder entfernt werden und 450 µl YEB ohne Antibiotikum hinzugegeben werden. Der Ansatz wurde gemischt und in konische Zentrifugenröhren (15 ml) überführt. Nach einer Inkubation für 2 Stunden bei 26°C konnten vier Mal 100 µl auf YEB-Medium ausplattiert werden, welche über Nacht bei 26°C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien in flüssiges YEB-Medium überführt, um sie zu vermehren. Durch eine Kontrolle der Transformation mittels Plasmid-Minipräparation nach Birnboim (1983) und anschließendem PCR-Nachweis konnten *A. tumefaciens* Stämme identifiziert werden, die die entsprechenden Plasmide trugen.

2.9.5 Pflanzentransformation

Um geeignetes Gewebe für die Pflanzentransformation zu gewinnen, wurden Samen der Sommerrapssorte Drakkar, die zuvor für 20 min in 2%igem Calciumhypochlorid sterilisiert und drei Mal in sterilem Wasser gewaschen wurden, auf Schrägagar ausgelegt. Die Samen wurden im Anschluss für fünf bis sieben Tage bei 16 h Licht und 20 bis 24°C kultiviert. Parallel hierzu wurde durch Animpfung von 40 ml YEB-Medium eine Suspension von *A. tumefaciens* am Vortag der Transformation hergestellt. Am Tag der Transformation wurde die optische Dichte der Suspension mit einem Photospektrometer (Photometer Specord 40, Analytik, Jena) bei 600 nm bestimmt und auf ca. 1,0 eingestellt. Diese Suspension wurde für 10 min bei 9000 rpm zentrifugiert, um die Bakterien von dem Medium zu trennen. Das entstandene Pellet wurde in flüssigem MS CIM-Medium resuspendiert und für die Transformation genutzt.

Die Hypokotyle der zuvor angesetzten Pflanzen wurden ohne Wurzeln oder Spitzenmeristeme in 15 ml MS CIM-Medium gesammelt und 1 ml der vorbereiteten Bakteriensuspension dazugegeben. In dieser Suspension wurden die Hypokotyle in ca. 5 bis 7 mm lange Abschnitte zerschnitten und für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Schüttler Infors CH-4103 Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubation wurde die Bakterienlösung abpipettiert und die Hypokotylsegmente auf mit 6 ml flüssigem CIM-Medium ohne Antibiotika getränktes Filterpapier überführt. Das Filterpapier befand sich in einer Petrischale, so dass die Segmente für zwei Tage hierauf zusammen mit den *A. tumefaciens* kultiviert werden konnten. Nach dieser Kokultur bei 22°C und 24 h Licht wurden die Segmente drei Mal mit MS CIM-Medium gewaschen und auf festes MS CIM überführt. Auf diesem Medium wurden sie weiter kultiviert und wenn nötig auf frisches Medium umgesetzt, bis sich nach ca. 4 Wochen erste grüne Kalli erkennen ließen. Diese Kalli wurden auf DKW-Medium umgesetzt, so dass sich aus ihnen Sprosse entwickeln konnten. Um die Nährstoffversorgung sicherzustellen, wurden die Kalli alle 14 Tage auf frisches Medium umgesetzt. Sich entwickelnde Sprosse wurden vom Kallus getrennt und auf MS-Medium überführt, bis sich Wurzeln bildeten. Um ausreichend Material für die Saatgutgewinnung zur Verfügung zu haben, wurden die Sprosse in drei Teile geteilt, so dass je Transformationsereignis drei Klone zur Verfügung standen. Die Pflanzen

wurden mittels PCR-Verfahren auf das Vorhandensein der beiden Gene getestet und, sofern dies positiv war, in Erde überführt.

Die DNA-Extraktion erfolgte durch das DNeasy Plant Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) anhand des mitgelieferten Protokolls und den oben beschriebenen PCR-Bedingungen.

Zur Saatgutgewinnung wurden die in Substrat überführten Pflanzen im Gewächshaus bei einer Temperatur von 25±10°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 35 bis 40% angezogen. Zur Blüte wurden die einzelnen Pflanzen mit Plastiktüten versehen, um eine ungewollte Kreuzung zwischen den entstandenen Linien zu vermeiden. Auch diese Pflanzen wurden nach Bedarf gedüngt und der Pflanzenschutz wurde wie oben beschrieben situationsbezogen durchgeführt. Nach der Abreife der Schoten wurden die Samen der drei Klone eines Transformationsevents zusammen gesammelt.

2.9.5.1 Phänotypisierung der Transformanten

Die Samen der T1-Generation der Transformanten wurden für nachfolgende Versuche verwendet. Da es sich bei der T1-Generation um eine aufspaltende Generation handelt, musste jede Pflanze die in den Versuchen verwendet werden sollte, zunächst mittels PCR-Nachweis auf die inserierten Gene hin getestet werden. Hierzu wurden stets zur DNA Extraktion das DNeasy Plant Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers und den oben beschriebenen PCR-Bedingungen genutzt.

Da vor der PCR-Durchführung nicht abgeschätzt werden konnte wie viele der eingesetzten Samen transgen waren, kam es in den Versuchen zum Teil zu recht unterschiedlichen Anzahlen von Wiederholungen. Die mittels PCR-Verfahren negativ getesteten Pflanzen wurden in den Versuchen stets als untransformierte Kontrolle genutzt, so dass der Wildtyp Drakkar nicht extra mit ausgesät wurde.

Mit den transformierten Linien wurde ein Oxalsäuretest, wie oben beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurden die Linien TOXDC-22, 44, 54, DH10B-67, 68 und 77 verwendet.

Darüberhinaus fanden Inokulationsversuche der Blattstiele oder Blätter statt. Bei der Inokulation am Blatt wurden Samen wie oben beschrieben ausgelegt und die Pflanzen in Multitopfplatten pikiert. Hierbei wurden die Linien TOXDC-2, 4, 12, 14, 15, 17, 22, 44, 48, 54, DH10B-59, 62, 67, 68, 73, 77, 93, 95, 97 und 99 verwendet, da von diesen Linien die größte Saatgutmenge gewonnen werden konnte. Das fünfte voll entwickelte Laubblatt wurde analog zur Stängelinokulation mittels myzelüberwachsenem PDA-Plugs inokuliert. Dieser Plug wurde etwa mittig auf dem Blatt platziert, ohne die die Mittelrippe zu berühren. Um eine Haftung auf dem Blatt zu gewährleisten wurden die Plugs durch Insektennadeln (Ø 0,3 mm) am Blatt fixiert. Somit wurde eine Verwundung gesetzt, die es dem Pilz unter Umständen erleichterte das Blatt zu infizieren. Um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit sicherzustellen, wurde in diesem Versuch in den ersten 24 h stündlich ca. 350 ml Wasser fein versprüht, so dass die Luftfeuchtigkeit stets annähernd 100% betrug. Am Tag nach der Inokulation wurden die Plugs und Nadeln wieder entfernt und der Durchmesser der sich entwickelnden Läsionen bestimmt. Diese Bestimmung der Läsionsgröße erfolgte ebenso am 2. und 3. Tag nach der Inokulation.

Nach der Bestimmung der Läsionsgröße wurden die infizierten Blätter entfernt, um weitere Untersuchungen mit den Pflanzen durchführen zu können.

Um Blattstiele zu inokulieren, wurde der Blattstiel des sechsten voll entwickelten Laubblatts der zuvor erwähnten Pflanzen entnommen. Dieser Blattstiel wurde mit einem myzelüberwachsenen PDA-Plug, der wiederum mit einer Insektennadel fixiert wurde, am unteren Ende inokuliert und unter feuchten Bedingungen inkubiert. Zwei, drei und vier Tage nach der Inokulation wurde die Läsionslänge ausgehend vom Inokulationspunkt, der durch die Nadel gekennzeichnet wurde, gemessen.

Aus den Läsionsdurchmessern der Blattinokulation und der Läsionslänge der Blattstielinokulation wurde, wie oben beschrieben, der AUDPC errechnet.

Zusätzlich wurde eine Stängelinokulation, wie oben beschrieben, mit bei den Inokulationsversuchen an den Blättern und Blattstielen erwähnten Linien durchgeführt. Die Pflanzen wurden aus Platzgründen bis zur Blüte in Multitopfplatten kultiviert. Die Inokulation erfolgte allerdings wie üblich zur Vollblüte. Auch aus diesen Läsionslängen wurden AUDPC-Werte errechnet.

2.9.5.2 Nachweis der Expression

Um weitere Ergebnisse auf molekularer Ebene zu erhalten, wurde neben den oben beschriebenen phänotypischen Daten Untersuchungen durchgeführt, die eine Expression der inserierten Gene nachweisen sollten.

Hierzu wurden Pflanzen der Linien, die im Blatt- oder Blattstielinokulationstest verwendet wurden, wie oben beschrieben angezogen, so dass von diesen Pflanzen 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden konnten. Im Anschluss daran wurde mittels des RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) gemäß der Herstellerangaben die gesamte RNA extrahiert. Allerdings wurde die RNA nicht wie empfohlen in zwei mal 30 bis 50 µl RNAse freiem Wasser aufgenommen, sondern in drei mal 30 µl RNAse freiem Wasser. Auf diese Weise entstanden drei Proben unterschiedlicher RNA-Konzentration, die zur Kontrolle und Einschätzung der Konzentration elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Anhand der Stärke der Banden wurde je Linie eine Probe gewählt, so dass in etwa vergleichbare RNA-Konzentrationen vorlagen. Mit diesen Proben wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt. Hierfür wurde das QuantiTect Reverse Transkription Kit (Fa. Qiagen, Hilden) unter Beachtung der Herstellerangaben verwendet.

Die synthetisierte cDNA wurde zum Nachweis der Synthese elektrophoretisch aufgetrennt. Schließlich wurde sie in den beiden oben beschriebenen PCR-Nachweisen eingesetzt, so dass das PCR-Produkt als Nachweis der Expression diente. Das PCR-Produkt wurde über konventionelle Gelelektrophorese nachgewiesen.

2.10 Wurzelinokulationen

Um mehr Daten zur im Feld beobachteten Wurzelinfektion bzw. zu der in den hier durchgeführten Feldversuchen beobachteten Frühjahrsinfektion zu gewinnen, wurden Versuche durchgeführt, in denen die Wurzeln gezielt inokuliert wurden. Hierzu wurden Vorversuche, in denen verschiedene Inokulationsmethoden, wie z.B. Ausbringen von Myzelsuspension in den Wurzelballen, Anbringen von myzelüberwachsenen Agarplugs direkt an die Wurzel, Infektion durch

myzelüberwachsene Zahnstocher, die in die Wurzeln gesteckt wurden oder Ausbringen von Sklerotien, die in oder an der Wurzel fixiert wurden, getestet wurden durchgeführt. Diese zeigten, dass die höchste Inokulationseffizienz erzielt wurde, wenn myzelüberwachsene Agarplugs direkt an die Wurzel appliziert wurden. Im Rahmen dieser Vorversuche wurden auch verschiedene Entwicklungsstadien des Raps betrachtet, wobei vor allem Pflanzen mit einer stärker ausgebildeten Wurzel anfällig zu sein schienen.

Für die Wurzelinokulation wurden Mitte November 2008 aus dem Randstreifen des Feldversuches Pflanzen entnommen. Bei diesen Pflanzen handelte es sich um die Sorte Elektra (BBCH Stadium 18), die laut Bundessortenliste 2008 eine Einstufung von 6 bezüglich ihrer Sklerotinia-Anfälligkeit aufweist. Die Pflanzen wurden auf dem Feld mit der dortigen Erde in Töpfe (13 x 13 x 13 cm) überführt und vorerst für zwei Tage ins Gewächshaus gestellt. Nach diesen zwei Tagen wurden sie inokuliert, indem vier myzelüberwachsene Agarplugs an der Wurzel platziert wurden. Um verschiedene Isolate betrachten zu können, wurden in diesem Versuch die Isolate SS 1.5, SS F, SS TH, SS LÜ und SS GÖ verwendet. Zusätzlich wurde eine nicht infizierte Kontrolle verwendet, bei der Agarplugs ohne Myzel an die Wurzel platziert wurden. Direkt nach der Inokulation wurden die Pflanzen aufgeteilt und bei verschiedenen Temperaturen weiter kultiviert, um den Einfluss der Temperatur auf diese Art der Infektion beobachten zu können. Ein Teil der Pflanzen wurde bei einer Sollwerttemperatur von 15°C, ein weiterer Teil bei einer Sollwerttemperatur von 20°C und der letzte Teil der Pflanzen bei den gegebenen Außentemperaturen weiter angezogen. Zur Kontrolle der Temperatur wurde in einem der Töpfe ein Datenlogger vergraben, um die Bodentemperatur über den gesamten Versuchszeitraum zu erfassen. Die übrigen pflanzenbaulichen Maßnahmen erfolgten wie vorangegangen für die anderen Versuche beschrieben.

Nach einem Zeitraum von 59 Tagen wurden die Wurzeln der Pflanzen gründlich vom Substrat befreit, so dass eine visuelle Bonitur der Symptome erfolgen konnte. Diese wurde nach dem in Tab. 9 angegebenem Boniturschema durchgeführt.

Tab. 9: Im Wurzelinokulationsversuch verwendetes Boniturschema.

Boniturnote	Symptome
1	kein Befall
2	kleine, punktförmige Läsionen
3	größere Läsionen, beinahe stängelumfassend
4	stängelumfassende Läsionen
5	Wurzel faserig und brüchig

Im Anschluss an die Bonitur wurden Gewebeproben aus den Randbereichen der Läsionen entnommen und zur eindeutigen Identifikation des Pilzes auf PDA und SSM-Medium überführt. Zusätzlich wurden die Wurzeln in Feuchte Kammern überführt um ein weiteres Pilzwachstum zu ermöglichen.

2.11 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung wurde mit dem Programm Statistica Version 9.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) durchgeführt. Nach einer ANOVA (Analysis of Variance) wurde in der Regel ein Fisher LSD (Least Significant Difference) Test durchgeführt. Da sich die Anzahl der Wiederholungen bei den Versuchen, in denen die Transformanten eingesetzt wurden, wie schon erwähnt unterschieden, wurde hierfür ein HSD (Honestly Significant Difference) Test für ungleiche N durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation des Tukey-HSD-Tests für den Fall ungleicher Stichprobenumfänge.

Wegen der geringen Anzahl an Wiederholungen mancher Versuche, musste die Normalverteilung vorausgesetzt werden, so dass die Auswertung einzelner Ergebnisse nur eine Annäherung darstellt.

Unterschiedliche Buchstaben in den Grafiken kennzeichnen signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p \leq 0{,}05$).

Wurden Korrelationen zwischen den verschiedenen Versuchen durchgeführt, so wurden Rangkorrelationen nach Spearman angewandt, um die verschiedenen Parameter in Beziehung setzen zu können. Angegeben ist stets Spearman´s R_s, der

p-Wert und die Geradengleichung in der Form $y = a + b^* x$, wobei a der y-Achsenabschnitt und b die Steigung der Geraden darstellt. Signifikante Zusammenhänge wurden stets zu einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p \leq 0{,}05$) abgesichert.

Für die durchgeführten Regressionsanalysen wurden lineare Modelle verwendet um das Bestimmtheitsmaß R^2 zu ermitteln. Zur Ermittlung der p-Werte wurde stets der globale F-Test verwendet. Auch hierbei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p \leq 0{,}05$) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Feldversuche

3.1.1 Witterungsverlauf und Pflanzenentwicklung 2007 bis 2010

In Abb. 5 und 6 ist der Witterungsverlauf der drei Versuchsjahre 2007/08, 2008/09 und 2009/10 am Standort Göttingen dargestellt. Angegeben sind neben der monatlichen Durchschnittstemperatur der Luft und des Bodens in 5 cm Tiefe auch der Monatsniederschlag und die durchschnittliche relative Luftfeuchtigkeit für den jeweiligen Vegetationszeitraum. Zwischen den einzelnen Jahren lassen sich am Standort Göttingen deutliche Unterschiede erkennen. So lag die Bodentemperatur im Winter 2008/09 und 2009/10 deutlich unter den Werten des Winters 2007/08. Vor allem im Januar 2008 herrschten vergleichsweise hohe Bodentemperaturen von annähernd 5°C während die Temperatur in den beiden nachfolgenden Jahren, die sich in den Wintertemperaturen relativ ähnlich waren, auf fast -5°C abfiel. Die Lufttemperatur im Winter hingegen war in den Versuchsjahren am Standort Göttingen sehr ähnlich. Auch zum Zeitpunkt der Blüte lassen sich Unterschiede in der Temperatur, vor allem der Lufttemperatur, erkennen. So lag diese im April und Mai des Jahres 2009 relativ hoch. Im Versuchsjahr 2008 wurden vor allem im April noch deutlich niedrigere Temperaturen verzeichnet, ehe sie im Mai auf ein vergleichbares Niveau anstiegen. Im Jahr 2010 dagegen lag die Temperatur in den beiden Monaten April und Mai vergleichsweise niedrig und stieg erst im Juni deutlich an. Die Bodentemperaturen, die einen starken Einfluss auf die Entwicklung der Apothecien ausüben, folgten in allen Jahren dem beschriebenen Verlauf, wobei sie vor allem im Mai 2010 noch relativ niedrig waren. Durch diese Temperaturverläufe wurde natürlich auch der Blühzeitpunkt am Standort Göttingen beeinflusst, so dass es vor allem im Jahr 2009 zu einer relativ späten und kurzen Blüte kam. Die Zeit der Blüte lag im Jahr 2008 etwa zwischen dem 25. April 2008 und dem 25. Mai 2008, im Jahr 2009 zwischen dem 16. April 2009 und dem 12. Mai 2009 und im Jahr 2010 zwischen dem 25. April 2010 und dem 29. Mai 2010. Damit stand im Versuchsjahr 2008 ein Zeitraum von etwa 30 Tagen, im Jahr 2009 von etwa 26 Tagen und im Jahr 2010 von etwa 34 Tagen für die Infektion zur Verfügung. Der Zeitpunkt der Vollblüte lag am Standort Göttingen allerdings in allen Jahren deutlich nach oder etwa zu der Zeit als auch die ersten Apothecien in den Depots entdeckt werden konnten

(BBCH 65 2008: 08. Mai 2008; 2009: 29. April 2009; 2010: 28. April 2010; Zeitpunkt der ersten Apothecien 2008: 21. April 2008; 2009: 30. April 2009; 2010: 28. April 2010). Da sich in allen Jahren am Standort Göttingen Apothecien über einen relativ langen Zeitraum entwickelten und es keine deutlichen Unterschiede zwischen den ausgebrachten Isolaten gab, war die Koinzidenz von Blüte und Apothecien in allen Jahren gegeben. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Temperatur zum Zeitpunkt der Vollblüte im Jahr 2009 am höchsten und im Jahr 2010 am niedrigsten war, was einen Einfluss auf die Infektion gehabt haben kann. Die Temperaturen zur Zeit der Läsionsentwicklung (Juni) waren in allen drei Jahren vergleichbar.

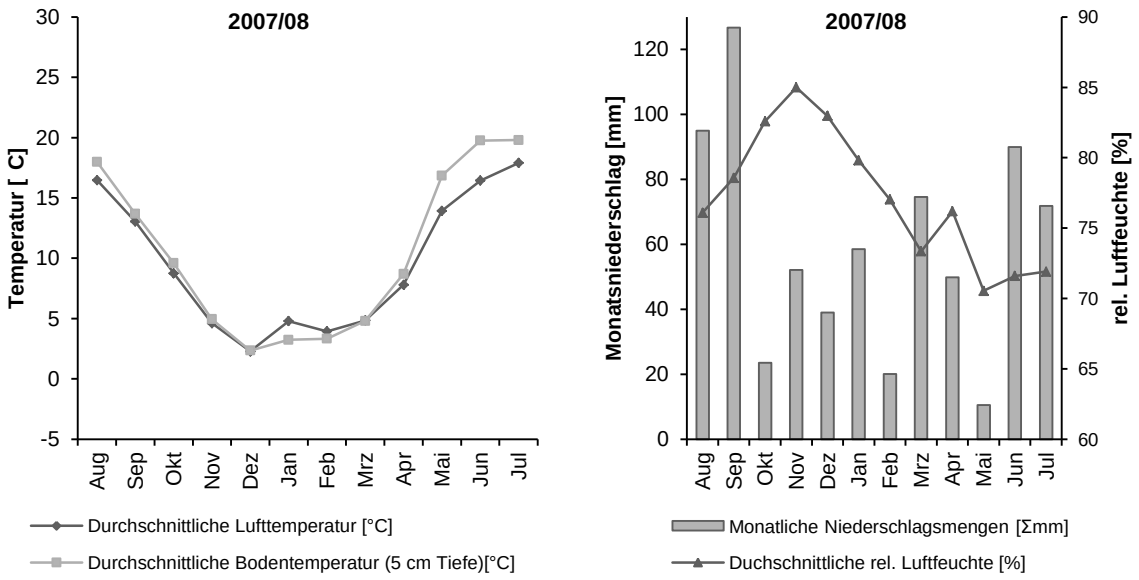


Abb. 5: Durchschnittliche monatliche Luft- und Bodentemperatur in 5 cm Tiefe [°C], monatliche Niederschlagsmengen [∑mm] und durchschnittliche monatliche rel. Luftfeuchte [%] am Standort Göttingen des Versuchsjahrs 2007/08 für den Zeitraum von August bis Juli. Datenaufzeichnung vom Deutschen Wetterdienst (DWD), Messstation Göttingen.

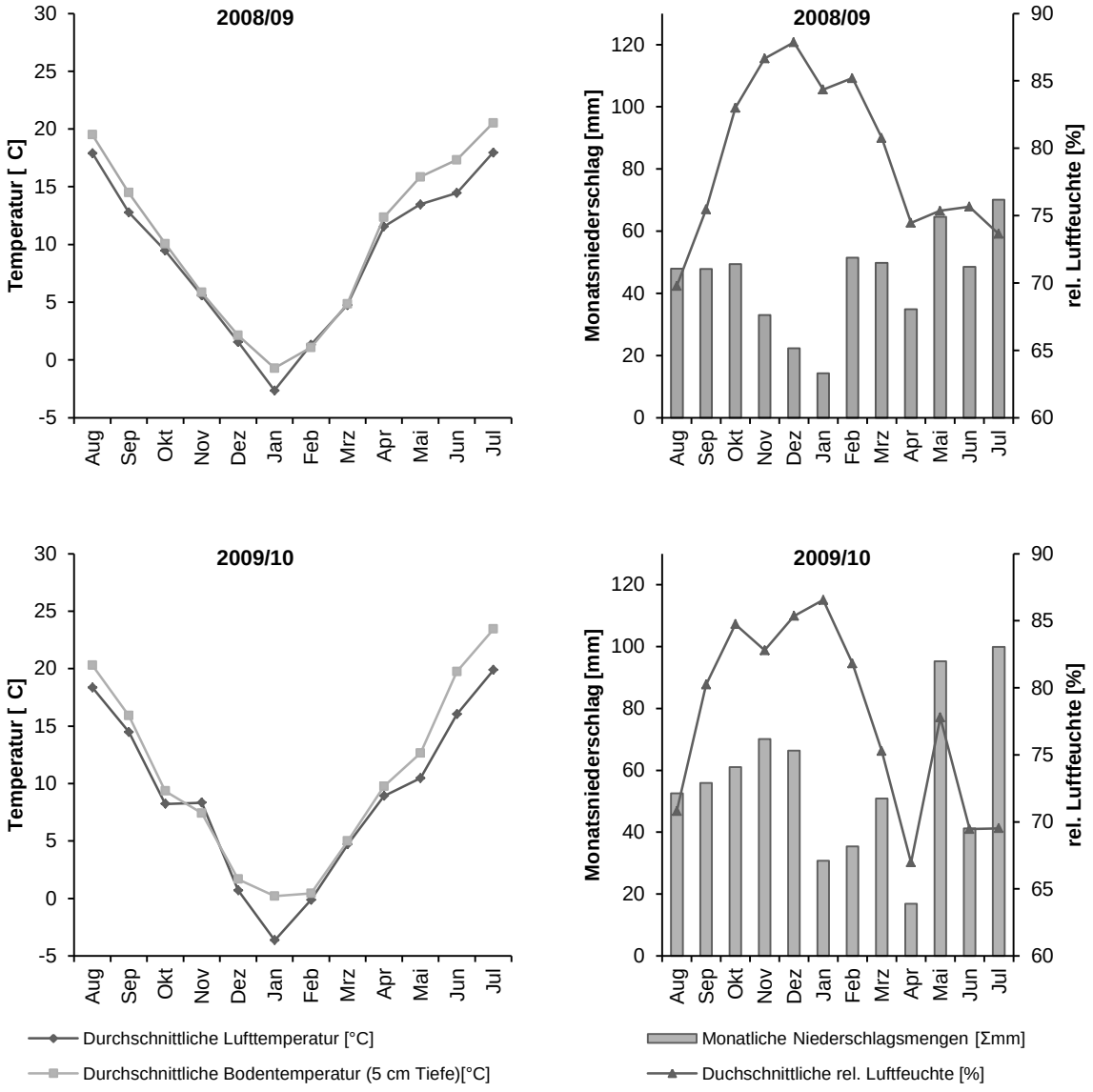


Abb. 6: Durchschnittliche monatliche Luft- und Bodentemperatur in 5 cm Tiefe [°C], monatliche Niederschlagsmengen [∑mm] und durchschnittliche monatliche rel. Luftfeuchte [%] am Standort Göttingen der Versuchsjahre 2008/09 und 2009/10 für den Zeitraum von August bis Juli. Datenaufzeichnung vom Deutschen Wetterdienst (DWD), Messstation Göttingen.

Das Prognosemodell SkleroPro empfahl eine Blütenspritzung für den Standort Göttingen am 19. Mai 2008, 28. Mai 2009 und 11. Mai 2010. Ein Nachweis des Pathogens auf Blütenblättern mittels SSM-Medium wurde lediglich im Jahr 2008 durchgeführt und war bereits am 09. Mai 2008 erfolgreich.

Darüberhinaus lässt sich in den Abb. 5 und 6 erkennen, dass vor allem im Winter 2008/09, aber auch 2009/10 vergleichsweise wenig Niederschlag fiel. Aufgrund der niedrigen Temperaturen herrschte über lange Zeiträume eine geschlossene Schneedecke vor, die die Bestände vor stärkeren Auswinterungsverlusten schützte. Der Mai 2008 zeichnete sich durch relativ wenig Niederschlag und eine niedrige relative Luftfeuchtigkeit aus, was einer Infektion entgegenwirken kann. Im April und Juni war die Niederschlagsmenge bzw. die Luftfeuchtigkeit am Standort Göttingen deutlich höher, so dass günstigere Infektionsbedingungen herrschten. Ein ähnliches Bild zeigte sich im April 2010. Auch hier fiel sehr wenig Niederschlag und die Luftfeuchtigkeit war sehr gering. Der Mai hingegen zeichnete sich durch relativ hohe Niederschläge und Luftfeuchtigkeit aus, so dass erst dann günstige Infektionsbedingungen vorhanden waren. Nur im Frühjahr 2009 konnten gleichmäßig verteilte Niederschläge und auch eine relativ konstante Luftfeuchtigkeit beobachtet werden.

Im Jahr 2008 kam es im Frühjahr zu extrem niedrigen Niederschlagsmengen. Der Blühzeitraum am Standort Göttingen war im Vergleich zu den anderen Untersuchungsjahren vergleichsweise lang. Auf der anderen Seite kann auch die extrem hohe Niederschlagsmenge im Mai 2010 durch eine Reduzierung der Sonnenscheindauer zum langen Blühzeitraum im Jahr 2010 beigetragen haben.

Bemerkenswert sind außerdem die hohen Niederschlagsmengen im November und Dezember 2009 am Standort Göttingen, die zu einem tieferen Einwaschen der Sklerotien in den Boden führten.

Auch für den Standort Peine sind die Wetterdaten der beiden Versuchsjahre 2008/09 und 2009/10 in der Abb. 7 und 8 angegeben. Auffällig ist, dass die Temperatur im Winter 2009/10 deutlich stärker abfiel als im Winter 2008/09. Dies führte, da nicht über den gesamten Zeitraum eine geschlossene Schneedecke vorhanden war, im Jahr 2010 am Standort Peine zu größeren Auswinterungsschäden. Außerdem fällt auf, dass die Temperaturen im Frühjahr größere Unterschiede aufwiesen. Während die Temperaturen im April, Mai und Juni 2009 relativ hoch lagen und nur geringe Änderungen zu beobachten waren, lagen sie im April und Mai 2010 deutlich niedriger und stiegen dann sehr stark im Juni an. Die Bodentemperatur am Standort Peine erfuhr im Jahr 2010 eine ähnliche Entwicklung. Im Jahr 2009 stieg die Bodentemperatur allerdings noch langsamer an als die Lufttemperatur, so dass der

Unterschied zwischen diesen beiden deutlich größer wurde. Allgemein lässt sich sagen, dass sich die Temperaturen am Standort Peine denen am Standort Göttingen in beiden Jahren sehr stark ähneln. Auch die Entwicklung der Bestände ähnelte der in Göttingen stark. Die ersten Apothecien wurden am Standort Peine am 09. Juni 2009 und am 20. April 2010 beobachtet. Obwohl das Erscheinen der Apothecien im Jahr 2009 sehr spät zu verzeichnen war, ließen sich bereits davor, am 05. Juni 2009, erste Symptome im Bestand finden.

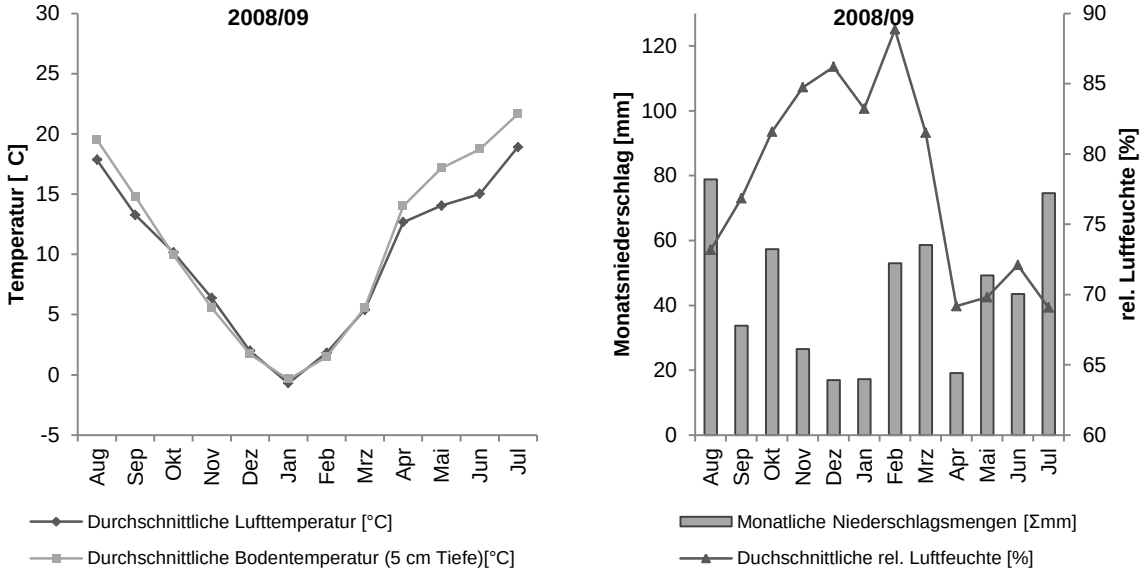


Abb. 7: Durchschnittliche monatliche Luft- und Bodentemperatur in 5 cm Tiefe [°C], monatliche Niederschlagsmengen [∑mm] und durchschnittliche monatliche rel. Luftfeuchte [%] am Standort Rosenthal des Versuchsjahrs 2008/09 für den Zeitraum von August bis Juli. Datenaufzeichnung vom Deutschen Wetterdienst (DWD), Messstation Braunschweig.

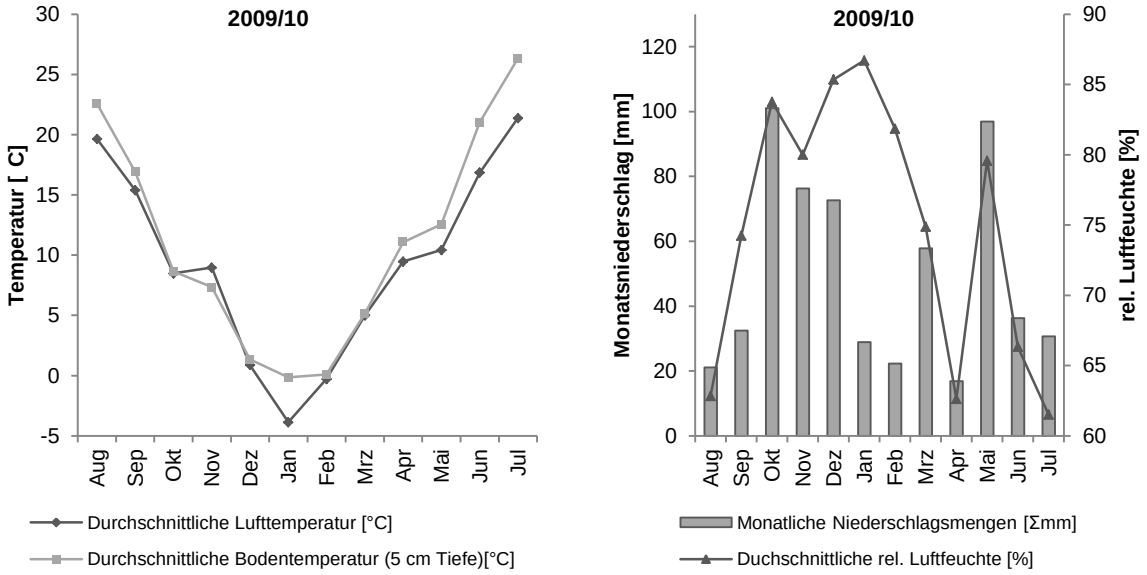


Abb. 8: Durchschnittliche monatliche Luft- und Bodentemperatur in 5 cm Tiefe [°C], monatliche Niederschlagsmengen [∑mm] und durchschnittliche monatliche rel. Luftfeuchte [%] am Standort Rosenthal des Versuchsjahrs 2009/10 für den Zeitraum von August bis Juli. Datenaufzeichnung vom Deutschen Wetterdienst (DWD), Messstation Braunschweig.

Große Unterschiede gab es dagegen in den Niederschlägen und der relativen Luftfeuchtigkeit der beiden Jahre am Standort Peine. Während die Niederschläge im Jahr 2008/09 zwar nicht sehr hoch aber doch relativ gleichmäßig verteilt waren, gab es im Jahr 2009/10 sehr große Unterschiede in den monatlichen Niederschlagsmengen. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die relative Luftfeuchtigkeit. Im Jahr 2008/09 war diese sehr gleichmäßig und hoch, variierte aber stark im Jahr 2009/10. So kann davon ausgegangen werden, dass nach vergleichsweise starken Niederschlägen im Oktober, November und Dezember des Jahres 2009 die ausgebrachten Sklerotien deutlich tiefer in den Boden eingewaschen wurden als im vorigen Jahr. In beiden Jahren wurden allerdings die ausgebrachten Sklerotien vor allem durch Regen nicht nur am Standort Peine bis zum nächsten Frühling zu einem großen Teil in den Boden eingewaschen, so dass sich nur vereinzelt Sklerotien an der Bodenoberfläche finden ließen.

Kritisch zu beurteilen ist die niedrige Niederschlagsmenge und Luftfeuchtigkeit im April und Juni des Jahres 2010 am Standort Peine. Dies könnte sich negativ auf die Infektion bzw. die Läsionsentwicklung ausgewirkt haben. Günstige

Infektionsbedingungen zeigten sich im Mai, der sich durch extrem hohe Niederschlagsmengen und auch Luftfeuchtigkeit auszeichnete, so dass etwaige Infektionen u.U. in diesem Zeitraum stattfanden. Auch hier lassen sich gewisse Parallelen zum Standort Göttingen ziehen. Die Verteilung der Niederschläge und Höhe der Luftfeuchtigkeit ähneln sich im Versuchsjahr 2009/10 stark. Auch im Versuchsjahr 2008/09 sind deutliche Analogien zu erkennen, auch wenn die Luftfeuchtigkeit am Standort Peine deutlich höher lag.

Der Witterungsverlauf auf der Insel Poel, der in Abb. 9 und 10 dargestellt ist, wies vor allem milde Winter auf. Die durchschnittliche Bodentemperatur fiel in beiden Jahren am Standort Poel nicht unter den Gefrierpunkt. Im Winter 2008/09 lag die Bodentemperatur sogar geringfügig über der Lufttemperatur. Im April divergierten beide Jahre allerdings stark voneinander. Während die Temperatur im Jahr 2009 sehr niedrig lag und dann stark anstieg, war sie im darauf folgenden Jahr schon im April vergleichsweise hoch und stieg im folgenden Monat nur noch geringfügig an. Verglichen mit den anderen Standorten scheint die Temperatur vor allem im Mai und Juni beider Jahre auf der Insel Poel relativ hoch zu sein. Darüberhinaus fällt auf, dass der Unterschied zwischen Boden- und Lufttemperatur am Standort Poel größer ist als an den anderen Standorten.

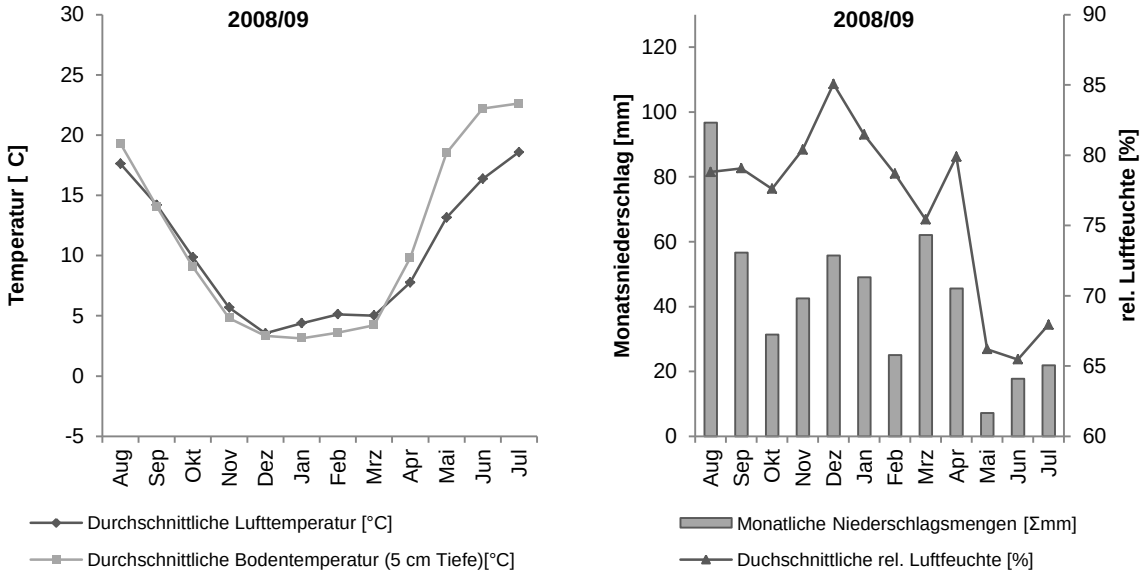


Abb. 9: Durchschnittliche monatliche Luft- und Bodentemperatur in 5 cm Tiefe [°C], monatliche Niederschlagsmengen [∑mm] und durchschnittliche monatliche rel. Luftfeuchte [%] am Standort Poel des Versuchsjahrs 2008/09 für den Zeitraum von August bis Juli. Datenaufzeichnung vom Deutschen Wetterdienst (DWD), Messstation Rostock.

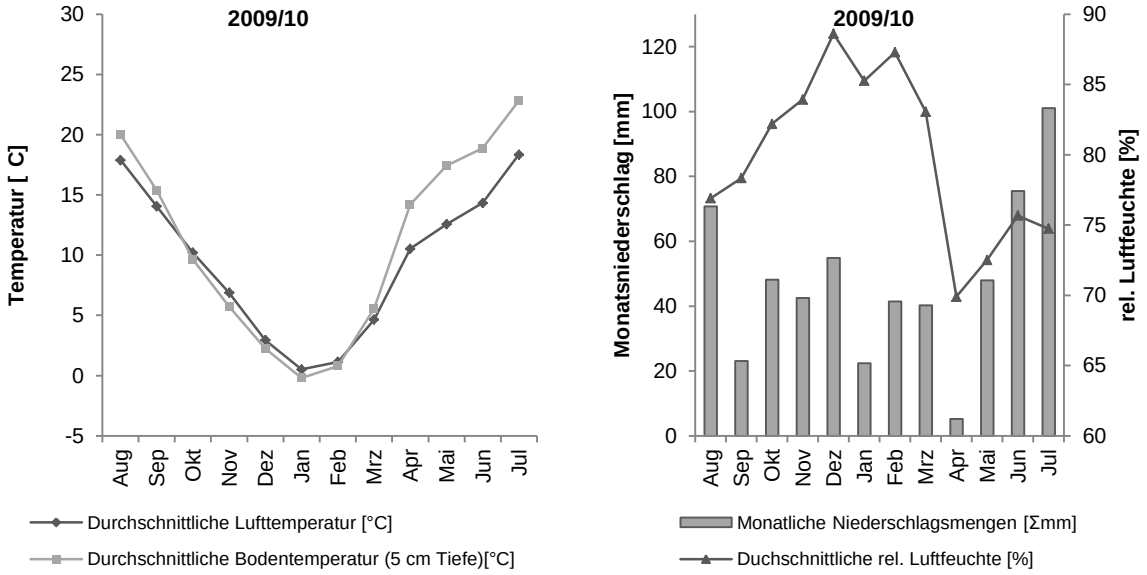


Abb. 10: Durchschnittliche monatliche Luft- und Bodentemperatur in 5 cm Tiefe [°C], monatliche Niederschlagsmengen [∑mm] und durchschnittliche monatliche rel. Luftfeuchte [%] am Standort Poel des Versuchsjahrs 2009/10 für den Zeitraum von August bis Juli. Datenaufzeichnung vom Deutschen Wetterdienst (DWD), Messstation Rostock.

In beiden Jahren konnten am Standort Poel relativ gleichmäßige Luftfeuchtigkeiten und gleichmäßig verteilte Niederschläge beobachtet werden. Lediglich in dem für die Infektion wichtigen Zeitraum April bis Mai sank die Luftfeuchtigkeit in beiden Jahren drastisch ab. Die Niederschläge fielen vor allem im Mai des Versuchsjahrs 2009 und im April 2010 sehr gering aus. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass in beiden Jahren keine Apothecien in den angelegten Depots beobachtet werden konnten.

3.1.2 Feldversuch 2007/08

In den Feldversuchen sollte das Resistenzniveau der eingesetzten Sorten ermittelt werden. Hierzu wurden im Versuchsjahr 2007/08 kommerziell erhältliche Rapssorten mit unterschiedlichen Einstufungen bzgl. ihrer Resistenz gegenüber Sklerotinia, ermittelt vom Bundessortenamt, verwendet. Um einen ausreichenden Befall sicherzustellen, wurde eine Variante durch eine künstliche Myzelsuspension inokuliert. Zusätzlich wurde eine Variante mit Cantus behandelt, um einen gesunden Standard zu erzeugen. Eine unbehandelte Variante sollte den natürlichen Befall

widerspiegeln. Die Bonitur erfolgte in den Feldversuchen in allen Untersuchungsjahren zu BBCH 80 an der gesamten Pflanze im Bestand.

Die Bonitur ergab mittlere Befallshäufigkeiten von 8,6 bis 31% in der nicht behandelten Variante, in der der natürliche Befall zugelassen wurde. 6,1 bis 25,5% konnten in der inokulierten Variante und ein sehr niedriger Befall von lediglich 0,9 bis 5,4% in der mit Cantus behandelten Variante festgestellt werden. Eine Abstufung im Resistenzniveau ist deutlich zu erkennen und spiegelt sich auch in den statistischen Unterschieden zwischen den Genotypen, die in der Tab. 10 dargestellt sind, wieder. Allerdings ließ sich in allen drei Varianten eine vergleichsweise hohe Streuung der Daten feststellen, die auch mit dazu beitrug, dass sich nicht sämtliche Unterschiede statistisch absichern ließen. Außerdem ließ sich kein Genotyp identifizieren, der sich deutlich von den übrigen abgrenzte.

Auffällig war, dass die Befallshäufigkeit in der Variante, in der der natürliche Befall zugelassen wurde mit einer Ausnahme stets über der Befallshäufigkeit in der inokulierten Variante lag. Dieser Unterschied ließ sich in einigen Fällen sogar statistisch absichern, wie es ebenfalls in Tab. 10 dargestellt ist. Zur Beurteilung des Resistenzniveaus wurde daher die Variante mit natürlichem Befall herangezogen. Die Befallshäufigkeit in der mit Cantus behandelten Variante lag sehr niedrig. Die Blütenspritzung erfolgte zum richtigen Zeitpunkt und zeigte eine gute Wirksamkeit.

Tab. 10: Mittlere Befallshäufigkeit [BH %] und Standardabweichung der eingesetzten Genotypen in den drei Varianten Cantus, inokuliert und natürlicher Befall des Feldversuchs 2007/08 am Standort Göttingen zum Entwicklungsstadium BBCH 80. Unterschiedliche Majuskel kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Varianten, während unterschiedliche Minuskel statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Variante kennzeichnen (n=4, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	BH [%] ±SD Natürlicher Befall	BH [%] ±SD Inokuliert	BH [%] ±SD Cantus
Toccata	8,61±2,93 ^{aA}	6,13±1,76 ^{aA}	1,26±0,59 ^{abB}
Mohican	10,83±3,63 ^{abA}	7,67±2,16 ^{abA}	2,36±1,92 ^{abcdefghB}
Oase	11,91±5,96 ^{abA}	7,90±5,33 ^{abcAB}	1,23±0,10 ^{abB}
Zeppelin	12,92±7,51 ^{abcA}	12,25±3,26 ^{abcdefA}	2,64±1,52 ^{abcdefghB}
Smart	13,43±3,65 ^{abcA}	7,81±3,96 ^{abB}	1,48±0,60 ^{abcC}
Olpop	14,02±3,72 ^{abcA}	10,34±4,23 ^{abcdeA}	1,79±0,52 ^{abcdeB}
Caiman	14,21±2,22 ^{abcA}	12,74±4,89 ^{abcdefA}	3,77±0,59 ^{fghijB}
Titan	14,72±2,57 ^{abcdA}	11,70±5,64 ^{abcdefA}	1,96±1,75 ^{abcdefgB}
Ladoga	14,88±2,66 ^{abcdeA}	9,64±4,31 ^{abcdB}	1,42±1,70 ^{abcC}
Tenno	15,04±6,71 ^{abcdeA}	11,46±3,12 ^{abcdefA}	3,64±0,48 ^{efghijB}
Trabant	15,17±3,42 ^{abcdefA}	10,78±5,11 ^{abcdefA}	3,37±2,36 ^{cdefghiB}
Libretto	15,97±2,43 ^{abcdefA}	11,82±5,45 ^{abcdefA}	0,92±0,37 ^{aB}
Marcant	17,63±3,62 ^{bcdefgA}	13,45±3,44 ^{bcdefA}	2,55±0,70 ^{abcdefghB}
Elektra	17,77±8,00 ^{bcdefgA}	11,17±2,98 ^{abcdefA}	1,63±0,95 ^{abcdB}
Mika	17,92±3,47 ^{bcdefgA}	13,39±2,37 ^{bcdefB}	2,41±1,13 ^{abcdefghC}
Viking	18,25±2,83 ^{bcdefgA}	21,16±5,25 ^{ghiA}	3,95±1,67 ^{hijB}
Baldur	18,26±4,73 ^{bcdefgA}	13,28±4,03 ^{bcdefA}	3,32±0,80 ^{cdefghiB}
Billy	20,56±5,53 ^{cdefghA}	13,74±1,29 ^{bcdefB}	3,03±1,57 ^{bcdefghC}
Favorit	22,70±7,52 ^{defghA}	14,51±4,92 ^{cdefgA}	3,51±1,41 ^{defghijB}
Lion	23,01±10,14 ^{efghiA}	16,53±2,65 ^{efghA}	4,31±2,46 ^{hijB}
Hearty	23,33±5,54 ^{fghiA}	17,39±6,60 ^{fghA}	3,87±1,35 ^{ghijB}
Talent	25,52±8,96 ^{ghiA}	15,39±4,12 ^{defghB}	1,89±1,19 ^{abcdefC}
Bravour	27,62±13,23 ^{hiA}	22,04±10,61 ^{hiA}	5,14±2,20 ^{ijB}
Pacific	31,02±2,99 ^{iA}	25,47±6,55 ^{iA}	5,37±1,79 ^{jB}

Zur besseren Beschreibung des Resistenzniveaus wurde im Anschluss an die Ernte eine weitere Bonitur des Versuchs an den Stoppeln durchgeführt. Da es sich um eine Nacherntebonitur handelte, konnte ein Großteil der Pflanze nicht mit in die visuelle

Bonitur mit einbezogen werden. Die Befallshäufigkeiten lagen mit 13,8 bis 37,4% (natürlicher Befall), 4,2 bis 30,1% (inokulierte Variante) bzw. 1,9 bis 7,5% (Cantus Variante) allerdings geringfügig über denen der an der ganzen Pflanze ermittelten Befallshäufigkeiten (Tab. 11).

Auch bei dieser Bonitur ließ sich der Unterschied zwischen der inokulierten und der Variante mit natürlichem Befall wieder erkennen. Es ließen sich allerdings nur bei wenigen Genotypen statistische Unterschiede absichern.

Zu beachten ist auch, dass bei der Stoppelbonitur im Vergleich zur Bonitur der gesamten Pflanze eine höhere Streuung der Daten zu beobachten war, was u.U. auf Unterschiede in der Stoppellänge zurückgeführt werden kann. Aufgrund der Erntetechnik variierte die Stoppellänge zwischen 20 und 50 cm.

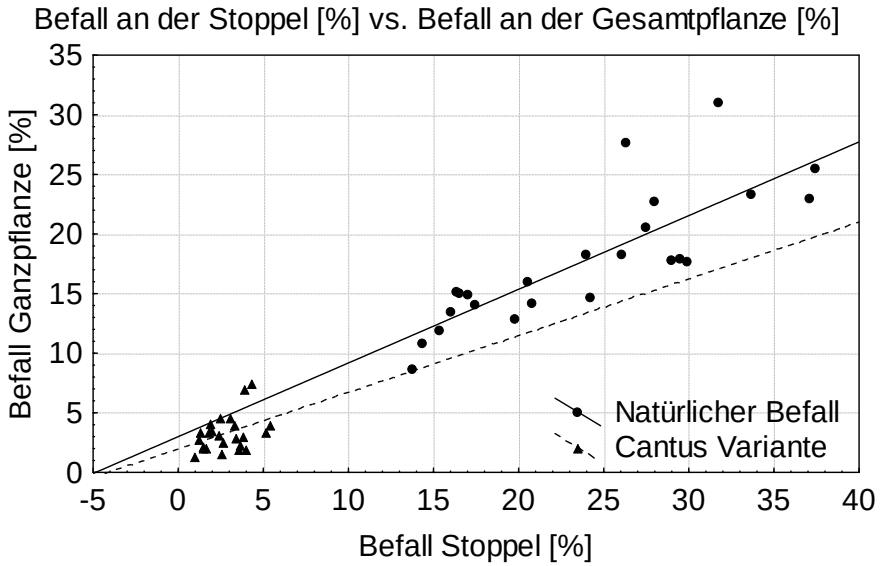
Tab. 11: Mittlere Befallshäufigkeit [BH %] und Standardabweichung der eingesetzten Genotypen in den drei Varianten Cantus, inokuliert und natürlicher Befall des Feldversuchs 2007/08 am Standort Göttingen nach der Ernte an den verbliebenen Stoppeln. Unterschiedliche Majuskel kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Varianten, während unterschiedliche Minuskel statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Variante kennzeichnen (n=4, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	BH [%] ±SD Natürlicher Befall	BH [%] ±SD Inokuliert	BH [%] ±SD Cantus
Toccata	13,77±6,18 ^{aA}	16,74±10,68 ^{bcdeAB}	3,35±0,30 ^{abB}
Oase	15,29±4,91 ^{aA}	14,76±4,65 ^{abcdeA}	2,73±1,97 ^{aB}
Smart	16,02±4,91 ^{abA}	4,15±3,99 ^{aB}	2,11±2,50 ^{aB}
Olpop	17,40±6,06 ^{abcA}	14,67±7,01 ^{abcdA}	3,41±2,89 ^{abB}
Trabant	16,29±7,73 ^{abA}	14,19±7,24 ^{abcA}	2,94±1,09 ^{aB}
Mohican	14,36±9,79 ^{aA}	5,45±4,74 ^{abAB}	3,17±2,83 ^{abB}
Zeppelin	19,73±5,72 ^{abcA}	18,12±9,15 ^{cdeA}	2,51±1,03 ^{aB}
Tenno	16,46±9,69 ^{abA}	14,50±6,63 ^{abcdA}	2,23±3,22 ^{aB}
Libretto	20,53±5,94 ^{abcA}	13,60±11,19 ^{abcA}	1,37±1,72 ^{aB}
Ladoga	16,96±9,79 ^{abA}	17,09±6,85 ^{bcdeA}	2,03±3,17 ^{aB}
Caiman	20,79±11,94 ^{abcA}	13,46±7,96 ^{abcAB}	2,99±3,66 ^{aB}
Billy	27,44±8,30 ^{abcdeA}	15,32±6,63 ^{abcdeB}	4,63±0,59 ^{abcC}
Mika	29,49±7,76 ^{abcdeA}	21,44±6,86 ^{cdefA}	4,54±1,95 ^{abcB}
Favorit	27,99±9,71 ^{abcdeA}	17,26±7,18 ^{bcdeA}	1,93±1,47 ^{aB}
Baldur	23,97±14,47 ^{abcdeA}	21,91±8,04 ^{cdefA}	3,92±3,27 ^{abcB}
Titan	24,20±16,71 ^{abcdeA}	16,34±9,35 ^{bcdeAB}	3,55±2,41 ^{abcB}
Marcant	29,90±12,07 ^{abcdeA}	26,72±10,46 ^{efA}	1,55±1,27 ^{aB}
Viking	26,00±16,73 ^{abcdeA}	22,89±10,69 ^{cdefA}	1,94±2,93 ^{aB}
Bravour	26,32±17,44 ^{abcdeA}	17,69±15,10 ^{cdeAB}	3,37±4,13 ^{abB}
Elektra	28,93±14,94 ^{abcdeA}	19,20±13,96 ^{cdefAB}	2,07±2,11 ^{aB}
Pacific	31,74±14,34 ^{bcdeA}	30,88±3,43 ^{fA}	3,94±2,23 ^{abcB}
Hearty	33,61±12,70 ^{cdeA}	15,99±4,78 ^{abcdeB}	7,02±6,21 ^{bcB}
Lion	37,06±13,65 ^{deA}	19,22±9,69 ^{cdefB}	7,51±4,58 ^{cB}
Talent	37,38±19,04 ^{eA}	26,25±5,49 ^{defA}	4,10±3,28 ^{abcB}

Auf Basis der Ergebnisse der beiden Bonituren wurden die Genotypen Mohican und Toccata als relativ resistente Genotypen bzw. Pacific und Lion als relativ anfällige Genotypen als Standards für die nachfolgenden Versuche ausgewählt. Mohican und

Toccata zeigten in beiden Bonituren die geringste Befallshäufigkeit in der Variante, in der der natürliche Befall zugelassen wurde. Während die Befallshäufigkeit von Toccata bei 8,6 und 13,8 % lag, lag die von Mohican mit 10,8 und 14,4 % geringfügig höher. Pacific und Lion zeigten eine der höchsten Anfälligkeiten in der Bonitur der Gesamtpflanze bzw. in der Stoppelbonitur von 31 und 31,7 % bzw. 23 und 37 %.

In Abb. 11 ist der Zusammenhang zwischen den beiden Boniturformen in den beiden Varianten natürlicher Befall und Cantus durch eine Regression dargestellt. Die Grafik zeigt, dass bei höherem Befall, wie er in der Variante mit natürlichem Befall vorhanden war, ein signifikanter Zusammenhang gegeben ist. Liegt der Befall jedoch niedriger, wie z.B. in der Cantus Variante zwischen 0 und 5%, so ist es nicht möglich einen Zusammenhang herzustellen. Die Geradengleichung der Regressionsgerade spiegelt die höhere Befallshäufigkeit in der Stoppelbonitur ebenfalls wieder.



Natürlicher Befall p = 0,0000; R^2 = 0,6685; y = 2,999+0,6181*x
Cantus Variante p = 0,0601; R^2 = 0,1515; y = 1,9633 + 0,4758*x

Abb. 11: Lineare Regression zwischen der Befallshäufigkeit [%] zu BBCH 80 und der Stoppeln in den Varianten mit natürlichem Befall und Behandlung mit Cantus am Standort Göttingen im Versuchsjahr 2007/08. Für die Regressionsgerade und zur Ermittlung des Bestimmtheitsmaßes (R^2) wurde ein lineares Modell angenommen. Zur Ermittlung der p-Werte wurde der globale F-Test verwendet (n=24, $p \leq 0,05$).

3.1.3 Feldversuche 2008/09

Da die Inokulation im vorangegangenen Versuchsjahr nicht den gewünschten Erfolg erzielte, wurde im Feldversuch 2008/09 darauf verzichtet. Um die natürliche Infektion, die allerdings neben Wetterbedingungen hauptsächlich von der Ausgangsverseuchung der Fläche abhängig ist, sicherzustellen, wurde jeweils eine Hälfte der Parzellen durch Ausbringen von Sklerotien künstlich verseucht. Der andere Teil wurde erneut durch eine Behandlung mit Cantus befallsfrei gehalten. Dies führte zu einem unerwarteten Befall im Frühjahr des Versuchsjahrs. Anfang April konnten bereits erste befallene Pflanzen in den inokulierten Teilen der Parzellen entdeckt werden. In den nicht inokulierten Parzellenteilen war dies nicht der Fall. Die ausgebrachten Sklerotien, die sich zu einem großen Teil in den obersten Bodenschichten oder sogar auf der Bodenoberfläche befanden, scheinen myzeliogen ausgekeimt zu sein. Auf diese Weise konnten sie Blätter, die sich nahe der Bodenoberfläche befanden infizieren (siehe Abb. 12). Von dort wuchs der Pilz weiter und es konnte, sofern das Blatt nicht rechtzeitig abgeworfen wurde, die gesamte Pflanze infiziert werden. Die befallenen Pflanzen starben im Laufe des Frühlings ab und die oberirdischen Pflanzenteile wurden vollständig von dem Pilz infiziert und zersetzt (siehe Abb. 12). Lediglich das Wurzelsystem und das Hypokotyl wurden nicht befallen, so dass sich diese Teile der Pflanze auch später noch finden ließen. Auf dem zersetzten Pflanzenmaterial bildeten sich frische Sklerotien, die allerdings in dem betreffenden Jahr weder myzeliogen noch carpogen auskeimten. Der genaue Zeitpunkt des Erstauftretens dieses Infektionstyps lässt sich nicht genau bestimmen. Am 02. April 2009 wurden zum ersten Mal die beschriebenen Symptome beobachtet. Da es zu diesem Zeitpunkt aber bereits abgestorbene Pflanzen gab, muss die Infektion bereits zu einem früherem Zeitpunkt begonnen haben. Diese Art der Infektion fand bis in den Mai hinein statt, so dass auch Anfang Mai noch frisch infizierte Pflanzen gefunden werden konnten. Obwohl der obere Pflanzenabschnitt gesund wirkte, konnte beobachtet werden, dass infizierte Pflanzen zum Zeitpunkt des beginnenden Schossens / beginnende Blüte umfielen. Dies ist auf die vollständige Zersetzung der Sprossbasis zurückzuführen.

Abb. 12: Infektion der Pflanzenbasis im Feldversuch 2008/09 am Versuchsstandort Göttingen, oben: 02. April 2009, unten: 15. April 2009.

Über den gesamten Zeitraum der Infektion ließ sich außerdem beobachten, dass der Pilz durch direkten Kontakt zwischen Pflanzen in der Lage war, auch benachbarte Pflanzen zu befallen. Dies führte zum Teil zu einem nesterartigen Absterben der Pflanzen.

Die Befallshäufigkeit dieses Infektionstyps wurde am 06. April 2009 (BBCH 19), in den inokulierten Parzellenteilen bestimmt und ist zusammen mit der Befallshäufigkeit zu BBCH 80, in den beiden Varianten in Tab. 12 angegeben. Darüberhinaus ist in der Tabelle die Ertragsdifferenz zwischen der inokulierten und der mit Cantus behandelten Variante angegeben.

Der Befall lag im Frühjahr 2009 mit 4,8 bis 17,8% niedriger als der Befall zu BBCH 80, der etwa zwischen 10,3 und 21,2% lag. In der Cantus Variante konnte wiederum nur ein sehr geringer Befall von 0,3 bis 2,6% festgestellt werden. Es kann also auch in diesem Versuchsjahr von einer zeitlich gut abgestimmten

Blütenspritzung ausgegangen werden. Die Ertragsdifferenz bzw. der Ertragsverlust lag zwischen -0,8 und 5,1 dt/ha Die Streuung der Daten waren vor allem beim Frühjahrsbefall und der Ertragsdifferenz sehr groß, was die Absicherung statistischer Unterschiede erschwerte. Dennoch ließen sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen absichern. Allerdings handelt es sich um fließende Übergänge, die es nicht ermöglichen einen hoch anfälligen oder resistenten Genotyp zu identifizieren.

Außerdem sollte bedacht werden, dass es aufgrund der Feldbonitur durch aufplatzende Schoten und Abknicken von Pflanzen zu ertragswirksamen Effekten gekommen sein kann.

Zu beachten ist bei diesem Ergebnis allerdings, dass es sich bei dem Frühjahrsbefall lediglich um eine Momentaufnahme handelt. Die Befallshäufigkeit wurde Anfang April bestimmt, während die Infektion bis in den Mai hinein stattfand. Zu einem späteren Zeitpunkt war es allerdings nicht mehr ohne weiteres möglich den Befall zuverlässig zu bestimmen, da das Schossen der Pflanzen eine Bonitur ohne Beschädigung der Pflanze nicht ermöglichte. Außerdem muss beachtet werden, dass sich der Frühjahrsbefall nicht vollständig von dem Befall zu BBCH 80 differenzieren lässt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch noch nach Mai Infektionen stattfanden, die nicht auf Ascosporen zurückzuführen sind. Auch war es in einigen Fällen nicht möglich eindeutig zuzuordnen wo die Infektion an einer Pflanze erfolgte.

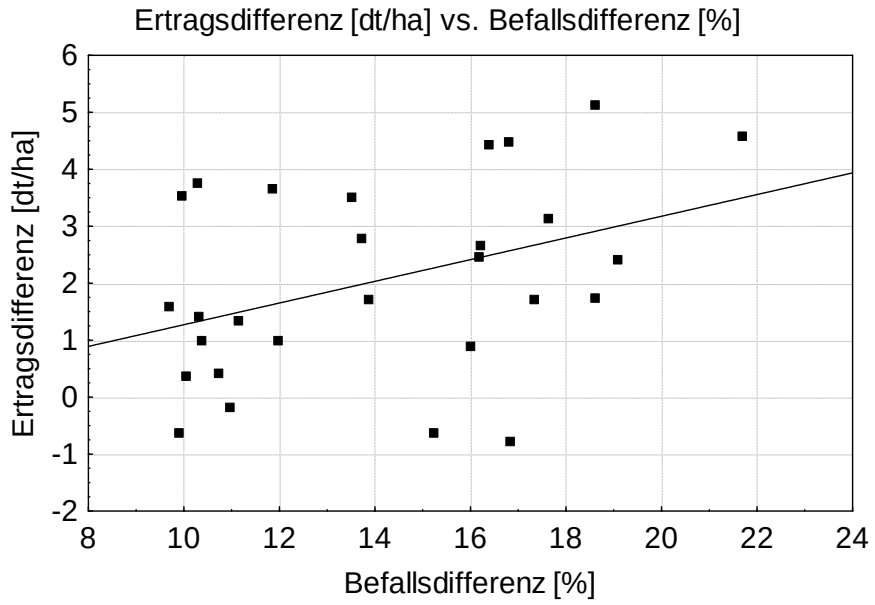
Tab. 12: Mittlere Befallshäufigkeit [BH %] und Standardabweichung der eingesetzten Genotypen Anfang April zu BBCH 19 und zu BBCH 80 in den beiden Varianten Cantus und inokuliert des Feldversuchs 2008/09 am Standort Göttingen, sowie die Ertragsdifferenz [dt/ha] zwischen den beiden Varianten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Variante (n=4, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	BH [%] BBCH 19 ±SD Inokuliert	BH [%] BBCH 80 ±SD Inokuliert	BH [%] BBCH 80 ±SD Cantus	Ertragsdiff. [dt/ha] ±SD
KWS-SCL-1	8,12±8,06 ^{abcdef}	12,82±3,63 ^{abcd}	1,69±1,38 ^{bcdefg}	1,34±8,65 ^{abcd}
KWS-SCL-2	10,33±8,32 ^{abcdef}	11,84±6,15 ^{abcd}	1,12±1,52 ^{abcdef}	0,41±3,23 ^{abcd}
KWS-SCL-3	9,83±7,08 ^{abcdef}	16,09±3,05 ^{abcdefg}	0,85±1,22 ^{abcde}	-0,64±3,14 ^{a}
KWS-SCL-5	9,61±5,66 ^{abcdef}	10,30±1,11 ^{a}	0,60±0,21 ^{abc}	1,60±2,95 ^{abcd}
KWS-SCL-6	10,79±5,62 ^{abcdef}	17,58±3,45 ^{bcdefg}	1,37±0,69 ^{abcdefg}	2,65±3,01 ^{abcd}
LBN 241/78	5,44±4,81 ^{ab}	20,66±8,26 ^{fg}	2,06±0,47 ^{defg}	1,73±2,00 ^{abcd}
Lion	10,22±7,72 ^{abcdef}	12,17±5,09 ^{abcde}	0,31±0,62 ^{abc}	3,66±3,10 ^{abcd}
Mohican	11,66±11,72 ^{abcdef}	19,16±7,30 ^{efg}	2,32±1,71 ^{fg}	-0,77±4,04 ^{a}
NPZ1	9,37±4,29 ^{abcdef}	18,04±3,12 ^{defg}	1,64±1,04 ^{bcdefg}	4,44±4,54 ^{bcd}
NPZ2	18,25±5,42 ^{f}	17,98±7,06 ^{defg}	0,66±0,60 ^{abcd}	1,71±2,79 ^{abcd}
NPZ3	8,64±2,31 ^{abcdef}	21,18±11,30 ^{fg}	2,58±1,04 ^{g}	5,14±2,97 ^{d}
NPZ4	6,96±2,06 ^{abcd}	14,52±3,14 ^{abcdef}	0,81±1,28 ^{abcde}	2,78±2,24 ^{abcd}
NSL 02/95	8,18±7,47 ^{abcdef}	18,28±3,25 ^{defg}	0,66±0,82 ^{abcd}	3,13±3,82 ^{abcd}
NSL 04/120	15,72±2,05 ^{bcdef}	21,99±6,77 ^{g}	0,29±0,37 ^{ab}	4,59±3,04 ^{cd}
Pacific	17,81±9,45 ^{ef}	20,52±3,44 ^{fg}	1,45±1,13 ^{abcdefg}	2,40±2,83 ^{abcd}
SRG 2009/01	11,30±7,53 ^{abcdef}	18,13±6,42 ^{defg}	2,14±0,80 ^{efg}	0,90±2,78 ^{abcd}
SRG 2009/02	9,55±5,14 ^{abcdef}	16,76±6,18 ^{abcdefg}	0,57±0,45 ^{abc}	2,46±2,17 ^{abcd}
SRG 2009/03	13,87±6,85 ^{abcdef}	12,91±3,40 ^{abcd}	0,93±0,75 ^{abcdef}	1,00±2,51 ^{abcd}
SRG 2009/04	7,12±4,23 ^{abcde}	15,63±4,79 ^{abcdefg}	2,12±1,40 ^{efg}	3,51±4,30 ^{abcd}
SW1	16,27±10,31 ^{cdef}	14,08±4,15 ^{abcdef}	0,21±0,25 ^{a}	1,72±2,05 ^{abcd}
SW2	7,11±6,30 ^{abcde}	10,64±1,52 ^{abc}	0,68±0,62 ^{abcd}	3,53±2,63 ^{abcd}
SW3	17,10±6,85 ^{def}	17,77±5,81 ^{cdefg}	0,97±0,34 ^{abcdef}	4,48±5,50 ^{cd}
SW4	13,25±20,08 ^{abcdef}	11,98±2,63 ^{abcd}	1,71±0,72 ^{cdefg}	3,75±3,31 ^{abcd}
SYN Sclero1	8,04±6,77 ^{abcdef}	10,61±2,79 ^{ab}	0,31±0,62 ^{abc}	1,42±4,13 ^{abcd}
SYN Sclero2	6,09±5,69 ^{abc}	11,99±2,83 ^{abcd}	1,03±0,91 ^{abcdef}	-0,19±3,21 ^{abc}
SYN Sclero3	11,54±8,82 ^{abcdef}	11,44±2,14 ^{abcd}	1,06±0,77 ^{abcdef}	0,98±4,39 ^{abcd}
SYN Sclero4	6,58±2,83 ^{abcd}	11,61±5,24 ^{abcd}	1,71±0,95 ^{cdefg}	-0,62±2,84 ^{ab}
Toccata	4,82±6,74 ^{a}	12,35±3,32 ^{abcd}	2,30±2,21 ^{fg}	0,36±1,91 ^{abcd}

Bei der Bonitur zu BBCH 80 ergaben sich Unterschiede in der Bestandesdichte zwischen den beiden Varianten (Daten nicht dargestellt). Im Mittel über alle Sorten wurden ca. 12 Pflanzen weniger (Standardabweichung: 2,71) in der inokulierten Parzelle gefunden. Die Vermutung liegt nahe, dass dies auf den Frühjahrsbefall zurückzuführen ist, bei dem im Mittel über alle Sorten 10,48% der Pflanzen befallen waren (Standardabweichung: 3,81). Die Spearman Rang Korrelation zwischen diesen beiden Parametern ergab allerdings ein R_s von -0,042 bei einem p-Wert von 0,831 und ist somit nicht signifikant. Dies könnte wiederum ein Indiz dafür sein, dass der Frühjahrsbefall auch zu späteren Zeitpunkten noch zu erheblichen Pflanzenverlusten führte. 10,48% befallene Pflanzen entsprechen bei einer Bestandesdichte von ca. 50 Pflanzen/m² etwa 5 Pflanzen, so dass auch später noch Pflanzen infiziert worden sein mussten, um auf einem Gesamtverlust von 12 Pflanzen/m² zu kommen.

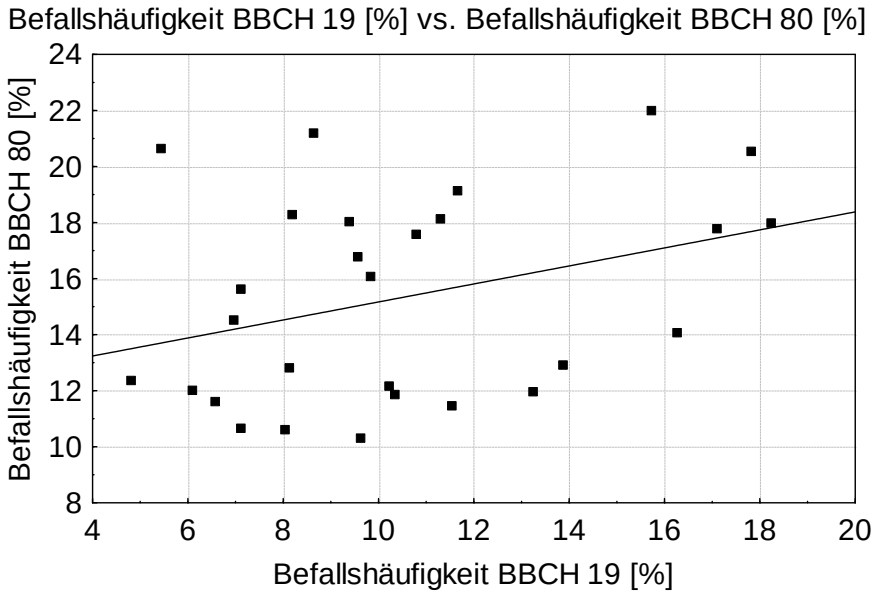
Eine Bonitur der Stoppeln konnte im Versuchsjahr 2008/09 nicht durchgeführt werden, da es aufgrund von Wind zu einer deutlich stärkeren Lagerbildung im Vergleich zum Vorjahr kam und deshalb die Pflanzen z.T. deutlich tiefer abgeschnitten werden mussten, um das gesamte Erntegut zu erhalten.

Der Zusammenhang zwischen der Differenz im Befall der beiden Varianten und der Ertragsdifferenz ist in Abb. 13 dargestellt. Es konnte trotz der hohen Streuung vor allem bei den Ertragsdaten ein signifikant positiver Zusammenhang abgesichert werden.



$p = 0{,}0498$; $R_s = 0{,}3742$; $y = -0{,}6329+0{,}1904*x$

Abb. 13: Korrelationsanalyse zwischen der Befallsdifferenz [%] zu BBCH 80 und der Ertragsdifferenz [dt/ha] zwischen den beiden Varianten Cantus und inokuliert am Standort Göttingen im Versuchsjahr 2008/09 (Rangkorrelation nach Spearman, n=28, p≤0,05).



$p = 0{,}0809$; $R^2 = 0{,}1126$; $y = 11{,}9525+0{,}3214*x$

Abb. 14: Lineare Regression zwischen der Befallshäufigkeit [%] Anfang April zu BBCH 19 und zu BBCH 80 am Standort Göttingen im Versuchsjahr 2008/09. Für die Regressionsgerade und zur Ermittlung des Bestimmtheitsmaßes (R^2) wurde ein lineares Modell angenommen. Zur Ermittlung der p-Werte wurde der globale F-Test verwendet (n=28, p≤0,05).

Zwischen der Befallshäufigkeit zu BBCH 19 und zu BBCH 80 ließ sich, wie in Abb. 14 zu erkennen ist, kein signifikanter Zusammenhang herstellen.

Obwohl am Standort Peine auf dieselbe Weise wie am Standort Göttingen inokuliert wurde, ließ sich hier kein Frühjahrsbefall beobachten. Die Befallshäufigkeiten [%] der einzelnen Genotypen sind für die beiden Varianten in Tab. 13 zusammengefasst. Zusätzlich wurde auch hier die Ertragsdifferenz zwischen den beiden Varianten ermittelt und in der Tabelle dargestellt. Da es sich hierbei nicht wie in Göttingen um ein voll randomisiertes Versuchsdesign mit zweigeteilten Parzellen handelte, war es nicht möglich, Ertragsdifferenzen für die einzelnen Parzellen zu ermitteln. Aus diesem Grund konnte keine statistische Verrechnung der Ertragsdifferenzen erfolgen. Der Befall am Standort Peine war deutlich geringer und lag in der inokulierten Variante zwischen 0 und 3% und in der mit Cantus behandelten Variante lediglich zwischen 0 und 1%, so dass sich in beiden Varianten kaum statistische Unterschiede absichern ließen. Aufgrund dieses niedrigen Befalls waren keine deutlichen Ertragseffekte zu beobachten. Allerdings ist die Spannbreite der Ertragsdifferenz zwischen den beiden Varianten mit von -7,4 bis 7,8 dt/ha Ertragsdifferenz relativ groß. Aus diesem Grund wurde nicht versucht einen Zusammenhang zwischen der Befallshäufigkeit und der Ertragsdifferenz herzustellen.

Aufgrund der niedrigen Befallshäufigkeiten wurde am Standort Peine auf eine Bonitur an den Stoppeln verzichtet.

Tab. 13: Mittlere Befallshäufigkeit [BH %] und Standardabweichung der eingesetzten Genotypen zu BBCH 80 in den beiden Varianten Cantus und inokuliert des Feldversuchs 2008/09 am Standort Peine, sowie die mittlere Ertragsdifferenz [dt/ha] zwischen den beiden Varianten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Variante (n=3, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	BH [%] BBCH 80 ±SD Inokuliert	BH [%] BBCH 80 ±SD Cantus	Ertragsdiff. [dt/ha]
NPZ3	0,00±0,00 [a]	0,33±0,58 [ab]	-2,57
TOCCATA	0,00±0,00 [a]	0,00±0,00 [a]	3,85
MOHICAN	0,33±0,58 [ab]	0,00±0,00 [a]	0,38
DSV4-09	0,33±0,58 [ab]	0,00±0,00 [a]	-3,10
NSL02-95	0,33±0,58 [ab]	0,33±0,58 [ab]	-2,30
SRG2009-05	0,33±0,58 [ab]	0,00±0,00 [a]	3,29
SW1	0,33±0,58 [ab]	0,00±0,00 [a]	4,71
DSV2-09	0,67±0,58 [abc]	0,33±0,58 [ab]	0,77
NPZ2	0,67±0,58 [abc]	0,00±0,00 [a]	1,90
SRG2009-02	0,67±0,58 [abc]	0,00±0,00 [a]	3,06
WVB2	0,67±0,58 [abc]	0,33±0,58 [ab]	1,21
LBN241-78	0,67±1,15 [abc]	0,67±0,58 [ab]	-3,09
SW3	0,67±1,15 [abc]	0,00±0,00 [a]	7,51
SYNSCLERO2	0,67±1,15 [abc]	0,00±0,00 [a]	2,59
KWS-SCL-2	1,00±1,73 [abc]	0,00±0,00 [a]	3,20
KWS-SCL-5	1,00±1,00 [abc]	1,00±1,73 [b]	-1,64
NSL04-120	1,00±1,00 [abc]	0,00±0,00 [a]	1,17
WVB3	1,00±1,00 [abc]	0,33±0,58 [ab]	3,34
PACIFIC	1,33±1,53 [abc]	0,33±0,58 [ab]	-7,87
NPZ1	1,33±2,31 [abc]	0,67±0,58 [ab]	2,13
KWS-SCL-1	1,67±2,89 [abc]	0,00±0,00 [a]	7,81
SW2	1,67±1,53 [abc]	0,33±0,58 [ab]	-7,36
SRG2009-03	2,00±1,73 [abc]	0,00±0,00 [a]	-1,09
SYNSCLERO3	2,00±1,73 [abc]	0,00±0,00 [a]	-6,77
SYNSCLERO1	2,33±4,04 [abc]	0,00±0,00 [a]	1,57
LION	2,33±0,58 [abc]	0,00±0,00 [a]	-1,54
WVB1	2,67±0,58 [bc]	0,00±0,00 [a]	-2,10
DSV1-09	3,00±2,65 [c]	0,00±0,00 [a]	-0,71

Aufgrund des niedrigen Befallsniveau und den großen Unterschieden in der Ertragsdifferenz wird auf eine Korrelation dieser beiden Parameter verzichtet.

Auch am Standort Poel wurde wie oben beschrieben inokuliert. Allerdings ließ sich an diesem Standort weder ein Frühjahrsbefall, noch ein Befall zu BBCH 80 beobachten, so dass auf die Darstellung dieser Versuchsergebnisse verzichtet wird.

Die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Versuchsstandorten, aber auch Versuchsjahren und den übrigen noch folgenden Screeningmethoden werden in Kapitel 3.4 dargestellt.

3.1.4 Feldversuche 2009/10

Sowohl Inokulation, wie auch Bonitur erfolgten im Feldversuch 2009/10 wie für das Feldversuchsjahr 2008/09 beschrieben. Ein Frühjahrsbefall konnte auch in diesem Versuchsjahr beobachtet werden, wobei dieser auf einem deutlich niedrigeren Niveau lag. Der Befall variierte zwischen 0,5 und 5,5%, also in einem relativ engem Bereich, was die Absicherung von statistischen Unterschieden nahezu unmöglich machte. Da die Befallshäufigkeit zu BBCH 80 in diesem Jahr deutlich geringer war, wurde die Bestimmung der Befallshäufigkeit zwei Wochen später durchgeführt, um möglichst viele befallene Pflanzen mit zu erfassen.

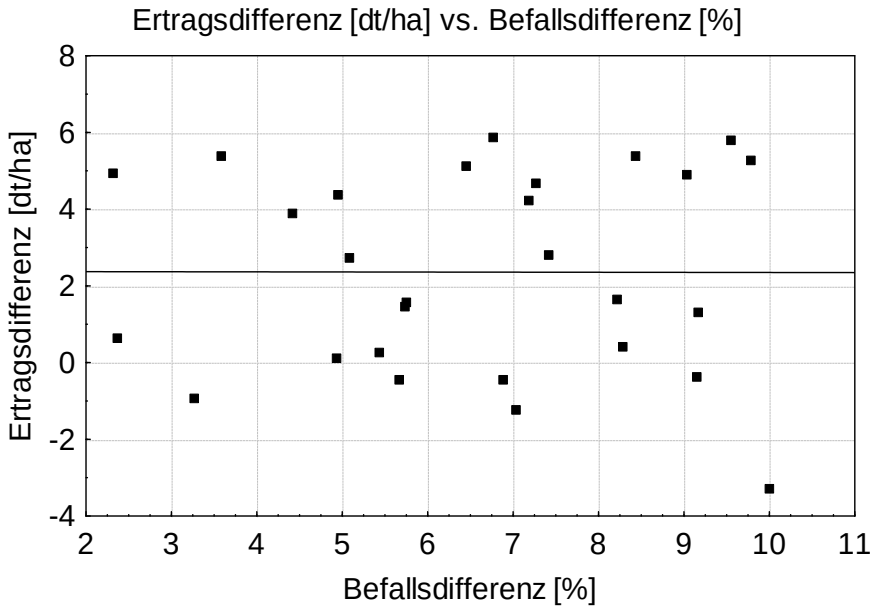
Auch der Befall zu BBCH 80, der zusammen mit dem Frühjahrsbefall und der Ertragsdifferenz in Tab. 14 dargestellt ist, war in diesem Versuchsjahr mit Werten zwischen 2,6 und 10,2% in der inokulierten Variante und 0 und 1,3% in der mit Cantus behandelten Variante deutlich geringer als im Vorjahr. Aufgrund dieser engen Spannweite und der dennoch relativ hohen Streuung der Daten konnten kaum statistisch absicherbare Unterschiede festgestellt werden. Ein ähnliches Bilde zeigte sich bei der Ertragsdifferenz zwischen den beiden Varianten, die zwischen -3,3 und 5,9 dt/ha lag, auch hier war es kaum möglich signifikante Effekte abzusichern, was z.T. auch an der verhältnismäßig hohen Streuung der Daten lag.

Tab. 14: Mittlere Befallshäufigkeit [BH %] und Standardabweichung der eingesetzten Genotypen Anfang April zu BBCH 19 und zu BBCH 80 in den beiden Varianten Cantus und inokuliert des Feldversuchs 2009/10 am Standort Göttingen, sowie die Ertragsdifferenz [dt/ha] zwischen den beiden Varianten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Variante (n=4, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	BH [%] BBCH 19 ±SD Inokuliert	BH [%] BBCH 80 ±SD Inokuliert	BH [%] BBCH 80 ±SD Cantus	Ertragsdiff. [dt/ha] ±SD
DSV 1-09	2,50±0,58 ^{abcd}	7,07±3,42 ^{abcdef}	0,62±0,18 ^{ab}	5,11±3,24 ^{b}
DSV 2-09	2,25±2,63 ^{abcd}	2,79±2,70 ^{a}	0,43±0,51 ^{ab}	0,65±5,21 ^{ab}
DSV 4-09	1,75±2,87 ^{abc}	2,61±1,93 ^{a}	0,30±0,60 ^{ab}	4,94±6,49 ^{b}
KWS-SCL-1	2,75±1,71 ^{abcde}	9,89±2,49 ^{ef}	0,74±1,01 ^{bc}	-0,36±5,43 ^{ab}
KWS-SCL-2	1,50±1,29 ^{abc}	7,54±1,45 ^{abcdef}	0,13±0,26 ^{ab}	2,79±4,73 ^{ab}
KWS-SCL-5	1,00±1,15 ^{ab}	7,91±1,21 ^{bcdef}	0,64±0,45 ^{ab}	4,68±2,23 ^{b}
Lion	1,50±1,73 ^{abc}	10,18±3,18 ^{f}	0,63±0,51 ^{ab}	5,78±4,96 ^{b}
Mohican	1,75±2,22 ^{abc}	3,58±1,15 ^{abc}	0,00±0,00 ^{a}	5,39±7,91 ^{b}
NIC06-1346CB	3,25±1,26 ^{abcde}	3,26±2,23 ^{ab}	0,00±0,00 ^{a}	-0,95±2,01 ^{ab}
NPZ1	2,75±1,71 ^{abcde}	8,29±2,72 ^{cdef}	0,00±0,00 ^{a}	0,41±3,71 ^{ab}
NPZ2	0,75±0,96 ^{a}	9,20±7,71 ^{def}	0,17±0,35 ^{ab}	4,91±4,10 ^{b}
NPZ3	1,75±1,71 ^{abc}	5,44±2,09 ^{abcdef}	0,00±0,00 ^{a}	0,27±8,58 ^{ab}
NPZ4	2,00±1,41 ^{abc}	5,08±2,21 ^{abcde}	0,00±0,00 ^{a}	2,72±10,77 ^{ab}
NSL 02/95	2,00±2,83 ^{abc}	5,66±3,79 ^{abcdef}	0,00±0,00 ^{a}	-0,44±5,16 ^{ab}
NSL 04/120	1,50±1,91 ^{abc}	6,15±1,66 ^{abcdef}	0,41±0,48 ^{ab}	1,47±4,52 ^{ab}
Pacific	3,25±2,75 ^{abcde}	7,52±1,24 ^{abcdef}	0,48±0,61 ^{ab}	-1,24±2,47 ^{ab}
SRG 2009/02	2,50±2,38 ^{abcd}	7,15±2,18 ^{abcdef}	0,39±0,46 ^{ab}	5,86±7,79 ^{b}
SRG 2009/03	2,75±1,71 ^{abcde}	10,15±5,28 ^{f}	0,15±0,30 ^{ab}	-3,28±4,75 ^{a}
SRG 2009/05	3,25±2,50 ^{abcde}	7,18±3,22 ^{abcdef}	0,00±0,00 ^{a}	4,21±5,71 ^{ab}
SW1	0,50±1,00 ^{a}	5,43±3,33 ^{abcdef}	0,48±0,34 ^{ab}	4,38±4,87 ^{b}
SW2	1,25±0,50 ^{abc}	8,60±2,67 ^{def}	0,17±0,34 ^{ab}	5,38±1,65 ^{b}
SW3	1,50±1,29 ^{abc}	7,27±2,72 ^{abcdef}	0,38±0,47 ^{ab}	-0,43±5,02 ^{ab}
SYN Sclero1	2,00±1,83 ^{abc}	9,33±7,72 ^{def}	0,17±0,34 ^{ab}	1,30±3,80 ^{ab}
SYN Sclero2	4,00±2,94 ^{cde}	4,42±0,58 ^{abcd}	0,00±0,00 ^{a}	3,90±5,50 ^{ab}
SYN Sclero3	5,00±3,56 ^{de}	9,98±5,06 ^{ef}	0,19±0,38 ^{ab}	5,28±8,62 ^{b}
Toccata	3,25±1,50 ^{abcde}	6,02±3,28 ^{abcdef}	0,27±0,31 ^{ab}	1,56±5,99 ^{ab}
WVB1	5,50±1,73 ^{e}	6,25±2,41 ^{abcdef}	1,32±1,33 ^{c}	0,12±2,84 ^{ab}
WVB3	3,75±3,50 ^{bcde}	8,50±6,06 ^{cdef}	0,28±0,55 ^{ab}	1,64±3,42 ^{ab}

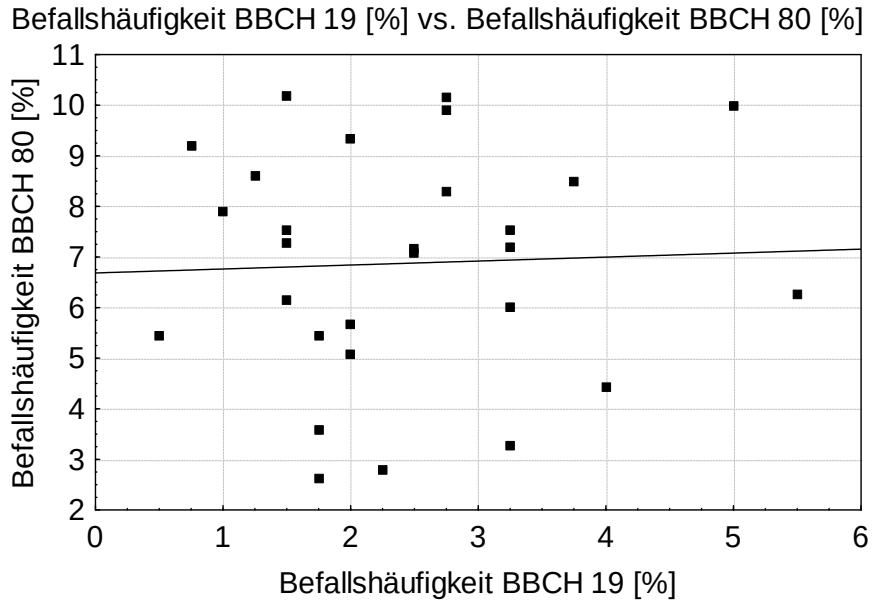
Auch in diesem Versuchsjahr ergaben sich bei der Bonitur der Befallshäufigkeit zu BBCH 80 Unterschiede in der Bestandesdichte (Daten nicht dargestellt). Diese waren deutlich geringer als im vorigen Jahr, mit im Mittel über alle Sorten 1,77 Pflanzen/m² weniger in der inokulierten Variante (Standardabweichung: 3,41). Dies kann auf den beobachteten Frühjahrsbefall zurückgeführt werden. Im Mittel über alle Sorten lag dieser in diesem Versuchsjahr mit 2,41% (Standardabweichung: 1,2) ebenfalls deutlich niedriger als im Vorjahr. Bei einer Bestandesdichte von 50 Pflanzen/m² entsprechen 2,41% etwa 1,2 Pflanzen, so dass die beiden Werte im Versuchsjahr 2009/10 deutlich dichter beieinander lagen. Die Spearman Rang Korrelation zwischen diesen beiden Parametern ergab allerdings ein R_S von 0,25 bei einem p-Wert von 0,19 und ist somit wiederum nicht signifikant. Dass sich dieser Zusammenhang nicht statistisch absichern ließ, könnte an der relativ engen Spannweite liegen, in der die Befallshäufigkeit gelegen hat.

Die in den Abb. 15 und 16 dargestellten Zusammenhänge zwischen der Ertragsdifferenz [dt/ha] und der Befallsdifferenz [%] bzw. zwischen der Befallshäufigkeit [%] zu BBCH 19 und BBCH 80 ließen sich nicht statistisch absichern. In beiden Fällen ließ sich nur ein relativ hoher p-Wert bzw. niedriges Bestimmtheitsmaß erzielen.



p = 0,7503; R_s = 0,0629; y = 2,3757-0,0026*x

Abb. 15: Korrelationsanalyse zwischen der Befallsdifferenz [%] zu BBCH 80 und der Ertragsdifferenz [dt/ha] zwischen den beiden Varianten Cantus und inokuliert am Standort Göttingen im Versuchsjahr 2009/10 (Rangkorrelation nach Spearman, n=28, p≤0,05).



p = 0,8331; R^2 = 0,0017; y = 6,6839+0,0785*x

Abb. 16: Lineare Regression zwischen der Befallshäufigkeit [%] Anfang April zu BBCH 19 und zu BBCH 80 am Standort Göttingen im Versuchsjahr 2009/10. Für die Regressionsgerade und zur Ermittlung des Bestimmtheitsmaßes (R^2) wurde ein lineares Modell angenommen. Zur Ermittlung der p-Werte wurde der globale F-Test verwendet (n=28, p≤0,05).

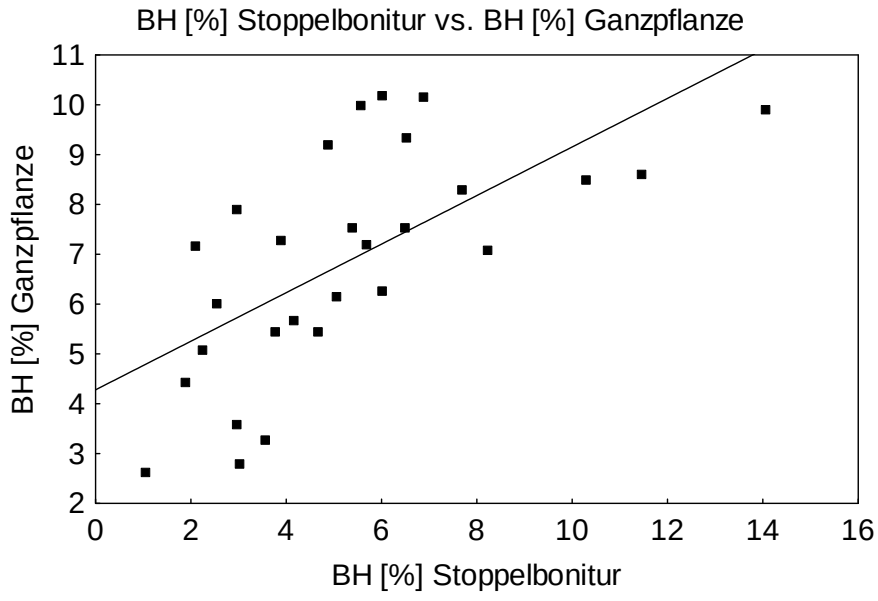
Nach der Ernte wurde eine Bonitur der Stoppel durchgeführt. Die in Tab. 15 dargestellten Befallshäufigkeiten lagen zwischen 1,1 und 14,1% in der inokulierten und zwischen 0 und 1,4% in der mit Cantus behandelten Variante. Damit weisen diese Werte eine geringfügig höhere Spannweite auf als in der Bonitur der Ganzpflanzen. Allerdings war bei dieser Bonitur auch die Streuung der Daten höher als in der Bonitur der ganzen Pflanze. Aufgrund der geringen Spannweite der Befallshäufigkeiten konnten kaum statistisch absicherbare Unterschiede festgestellt werden.

Tab. 15: Mittlere Befallshäufigkeit [BH %] und Standardabweichung an der Stoppel der eingesetzten Genotypen in den beiden Varianten Cantus und inokuliert des Feldversuchs 2009/10 am Standort Göttingen. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Variante (n=4, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	BH [%] Inokuliert ±SD	BH [%] Cantus ±SD
DSV 1-09	8,23±4,83 ^{cdef}	0,45±0,89 ^{ab}
DSV 2-09	3,03±1,47 ^{abc}	0,77±0,90 ^{ab}
DSV 4-09	1,05±1,22 ^{a}	0,00±0,00 ^{a}
KWS-SCL-1	14,06±6,48 ^{f}	0,52±1,04 ^{ab}
KWS-SCL-2	6,49±3,60 ^{abcde}	0,00±0,00 ^{a}
KWS-SCL-5	2,96±2,66 ^{abc}	0,00±0,00 ^{a}
Lion	6,01±4,84 ^{abcde}	0,64±1,28 ^{ab}
Mohican	2,97±2,59 ^{abc}	0,45±0,89 ^{ab}
NIC06-1346CB	3,56±4,72 ^{abc}	0,78±0,91 ^{ab}
NPZ1	7,68±5,68 ^{bcde}	0,39±0,78 ^{ab}
NPZ2	4,86±2,47 ^{abcd}	0,52±1,04 ^{ab}
NPZ3	3,77±3,70 ^{abc}	0,00±0,00 ^{a}
NPZ4	2,24±2,64 ^{ab}	0,00±0,00 ^{a}
NSL02/95	4,15±2,14 ^{abc}	0,48±0,96 ^{ab}
NSL04/120	5,06±3,38 ^{abcd}	0,43±0,86 ^{ab}
Pacific	5,40±2,22 ^{abcd}	0,77±0,90 ^{ab}
SRG2009/02	2,09±2,24 ^{ab}	0,00±0,00 ^{a}
SRG2009/03	6,89±3,28 ^{abcde}	0,00±0,00 ^{a}
SRG2009/05	5,68±5,45 ^{abcde}	0,00±0,00 ^{a}

Genotyp	BH [%] Inokuliert ±SD	BH [%] Cantus ±SD
SW1	4,65±3,28 [abcd]	0,48±0,56 [ab]
SW2	11,44±7,85 [ef]	1,41±0,98 [b]
SW3	3,88±3,84 [abc]	0,96±1,93 [ab]
SYN Sclero1	6,51±4,62 [abcde]	0,48±0,96 [ab]
SYN Sclero2	1,89±2,29 [ab]	0,00±0,00 [a]
SYN Sclero3	5,56±4,81 [abcde]	1,20±1,45 [ab]
Toccata	2,54±1,26 [abc]	0,00±0,00 [a]
WVB1	6,03±6,02 [abcde]	0,99±1,26 [ab]
WVB3	10,30±7,77 [def]	0,87±1,74 [ab]

Obwohl sich die Befallshäufigkeit der unterschiedlichen Sorten nur geringfügig unterschied, war es möglich einen signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden Bonituren vor und nach der Ernte herzustellen (Abb. 17). Es konnte wie schon im Versuchsjahr 2007/08 ein relativ hohes R^2 von 0,42 erzielt werden. Allerdings ist die Steigung der Geradengleichung in diesem Versuchsjahr mit 0,49 niedriger als im Versuchsjahr 2007/08, in dem sie 0,61 betrug. Dies deutet auf größere Unterschiede zwischen den beiden Bonituren hin als im Versuchsjahr 2007/08, wobei jedoch bedacht werden muss, dass die Befallshäufigkeit im ersten Versuchsjahr deutlich höher lag. Auch 2007/08 konnte in der Cantus behandelten Variante, in der der Befall deutlich niedriger war, lediglich eine Steigung von 0,47 ermittelt werden.



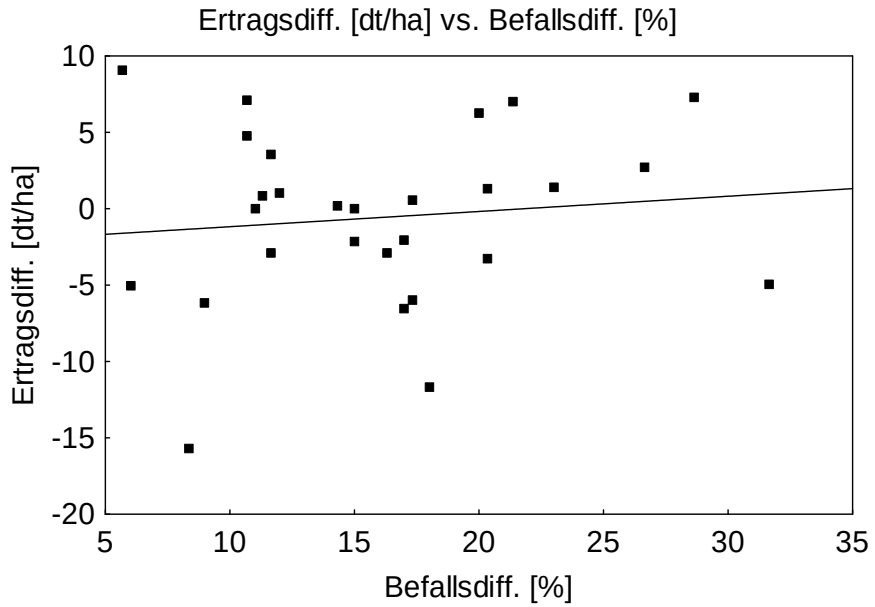
$p = 0{,}0002$; $R^2 = 0{,}4210$; $y = 4{,}279+0{,}4875*x$

Abb. 17: Lineare Regression zwischen der Befallshäufigkeit [%] an Pflanzen zu BBCH 80 und Stoppeln nach der Ernte in der Variante natürlicher Befall am Standort Göttingen im Versuchsjahr 2009/10. Für die Regressionsgerade und zur Ermittlung des Bestimmtheitsmaßes (R^2) wurde ein lineares Modell angenommen. Zur Ermittlung der p-Werte wurde der globale F-Test verwendet ($n=28$, $p \leq 0{,}05$).

Höher lag die Befallshäufigkeit in diesem Versuchsjahr dagegen am Standort Peine. Auch wenn hier kein Frühjahrsbefall festgestellt werden konnte, lag die Befallshäufigkeit in der inokulierten Variante in diesem Versuchsjahr zwischen 6,3 und 33% in der inokulierten und zwischen 0,3 und 4,7% in der mit Cantus behandelten Variante. Eine Differenzierung zwischen den eingesetzten Genotypen war also in diesem Jahr am Standort Peine relativ gut möglich. Zu beachten ist dabei, dass die Infektion an diesem Standort erst relativ spät stattfand, so dass sich auch erst spät erste Symptome zeigten. Diese späte Infektion reduziert den Einfluss des Pathogens auf den Ertrag, weshalb u.U. in Abb. 18 kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Befallsdifferenz [%] und der Ertragsdifferenz [dt/ha] hergestellt werden konnte. Die Ertragsdifferenz, die zwischen -15,7 und 9,1 dt/ha lag wurde u.U. auch durch größere Auswinterungsverluste an diesem Standort beeinflusst und sollte deshalb nur bedingt in die weitere Auswertung mit einbezogen werden.

Tab. 16: Mittlere Befallshäufigkeit [BH %] und Standardabweichung der eingesetzten Genotypen zu BBCH 80 in den beiden Varianten Cantus und inokuliert des Feldversuchs 2009/10 am Standort Peine, sowie die mittlere Ertragsdifferenz [dt/ha] zwischen den beiden Varianten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Variante (n=3, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	BH [%] BBCH 80 ±SD Inokuliert	BH [%] BBCH 80 ±SD Cantus	Ertragsdiff. [dt/ha]
DSV1-09	12,00±2,65 ^{abcd}	0,67±1,15 ^{a}	0,9
DSV2-09	22,67±6,03 ^{efgh}	2,33±1,53 ^{abcde}	-3,3
DSV4-09	9,00±2,65 ^{ab}	0,67±1,15 ^{a}	-15,7
KWS-SCL-1	22,00±4,36 ^{efgh}	1,67±1,15 ^{abcd}	1,3
KWS-SCL-2	27,67±9,61 ^{ghi}	1,00±1,00 ^{ab}	2,7
KWS-SCL-5	12,33±4,16 ^{abcd}	1,67±1,53 ^{abcd}	7,1
Lion	18,00±4,58 ^{bcdef}	1,00±0,00 ^{ab}	-2,1
Mohican	14,33±3,51 ^{abcde}	3,67±2,08 ^{bcde}	4,7
NIC06-1346CB	16,67±7,23 ^{bcdef}	1,67±1,15 ^{abcd}	0,0
NPZ1	22,67±3,06 ^{efgh}	1,33±1,53 ^{abc}	7,0
NPZ2	14,67±6,51 ^{abcde}	2,67±2,08 ^{abcde}	1,1
NPZ3	10,00±4,58 ^{abc}	4,33±2,89 ^{de}	9,1
NPZ4	6,33±3,06 ^{a}	0,33±0,58 ^{a}	-5,1
NSL 02/95	17,67±6,03 ^{bcdef}	0,33±0,58 ^{a}	0,5
NSL 04/120	15,67±1,53 ^{bcde}	4,67±5,51 ^{e}	0,0
Pacific	16,00±3,61 ^{bcdef}	4,33±1,15 ^{de}	-2,9
SRG 2009/02	15,33±6,35 ^{abcde}	0,33±0,58 ^{a}	-2,2
SRG 2009/03	20,67±6,66 ^{defgh}	0,67±0,58 ^{a}	6,3
SRG 2009/05	22,00±5,00 ^{efgh}	4,00±1,73 ^{cde}	-11,7
SW1	29,33±6,11 ^{hi}	0,67±0,58 ^{a}	7,2
SW2	10,67±4,04 ^{abc}	1,67±1,15 ^{abcd}	-6,1
SW3	33,00±11,27 ^{i}	1,33±0,58 ^{abc}	-5,0
SYN Sclero1	25,00±6,24 ^{fghi}	2,00±1,73 ^{abcde}	1,4
SYN Sclero2	13,67±1,53 ^{abcde}	2,00±1,73 ^{abcde}	3,6
SYN Sclero3	18,33±8,14 ^{cdef}	1,00±1,73 ^{ab}	-6,0
Toccata	19,00±1,00 ^{cdefg}	4,67±1,15 ^{e}	0,2
WVB1	18,00±8,00 ^{bcdef}	1,67±0,58 ^{abcd}	-2,9
WVB3	19,00±5,57 ^{cdefg}	2,00±2,00 ^{abcde}	-6,5



p = 0,6149, R_s = 0,0994, y = -2,1745 + 0,0997*x

Abb. 18: Korrelationsanalyse zwischen der Befallsdifferenz [%] zu BBCH 80 und der Ertragsdifferenz [dt/ha] zwischen den beiden Varianten Cantus und inokuliert am Standort Peine im Versuchsjahr 2009/10 (Rangkorrelation nach Spearman, n=28, p≤0,05).

Obwohl am Standort Poel Mitte April vereinzelt befallene Pflanzen beobachtet werden konnten, gab es keinen nennenswerten Frühjahrsbefall. Folglich wurde auf eine Bonitur verzichtet. Auch zu BBCH 80 gab es keine sichtbaren Befallssymptome, so dass auch hier keine Bonitur durchgeführt werden konnte.

3.2 Resistenzscreening im Gewächshaus

Es wurden insgesamt zwei Gewächshausscreenings durchgeführt, in denen das Resistenzniveau von verschiedenen Genotypen unter kontrollierten Bedingungen getestet werden sollte. Im ersten Gewächshausscreening wurden vor allem von den Züchterhäusern zur Verfügung gestellte Genotypen verwendet, um eine größere Differenzierung als im zugelassenen Sortenmaterial zu finden. Die Züchterhäuser wurden gebeten, anfälliges und resistentes Material zur Verfügung zu stellen. Darüberhinaus wurden im ersten Gewächshausscreening chinesische Sorten, die sich durch eine höhere Resistenz auszeichnen sollten verwendet. Im Unterschied zu

den durchgeführten Feldversuchen erfolgte hier die Erfassung der Ausbreitung des Pilzes innerhalb der Pflanze über einen Zeitraum von neun Tagen. Aus der ermittelten Läsionslänge an den Tagen nach der Inokulation wurde der AUDPC-Wert errechnet, der zusammen mit der Standardabweichung in Tab. 17 dargestellt ist.

Im ersten Gewächshausscreening lagen die Werte zwischen 4,1 und 53,4, so dass sich eine wesentlich bessere Differenzierung zeigte als in den Feldversuchen. Allerdings konnten aufgrund der verhältnismäßig hohen Streuung der Daten nur relativ große Unterschiede statistisch abgesichert werden. Auffallend waren die niedrigen AUDPC-Werte der chinesischen Sorten, die mit Ausnahme von You You 5 alle einen AUDPC-Wert unter 15 aufwiesen und es dem Pathogen somit nicht ermöglichten sich schnell auszubreiten.

Erstaunlich ist außerdem, dass die im Feldversuch 2007/08 ausgewählten Standard Genotypen Mohican, Toccata, Pacific und Lion sehr dicht beisammen lagen und keinen statistisch absicherbaren Unterschied in der Befallsstärke zeigten.

Tab 17: AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Werte der im Gewächshausscreening eingesetzten chinesischen Sorten und von den Züchtern zur Verfügung gestellten Genotypen mit Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n=8, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	AUDPC±SD	Genotyp	AUDPC±SD
Wan You 14	4,08±4,22 [a]	NPZ2	32,30±18,27 [klmnopqrs]
Wan You 19	5,20±7,28 [ab]	SW3	34,09±15,90 [lmnopqrst]
Tianhe You 1	5,59±5,97 [abc]	NSL02/95	34,68±14,50 [lmnopqrst]
Yake 28	10,59±5,86 [abcd]	LBN241/78	34,79±15,49 [lmnopqrst]
Rapid	11,36±18,69 [abcde]	KWS-SCL-5	35,20±23,55 [lmnopqrstu]
Zhongshuang 9	11,44±12,20 [abcde]	WVB3	36,31±11,45 [mnopqrstu]
KWS-SCL-6	13,95±18,65 [abcdefg]	Lion	36,39±15,06 [mnopqrstu]
Zhong You 821	14,45±2,96 [abcdef]	Pacific	37,27±16,65 [nopqrstu]
SRG2009/01	15,66±16,77 [abcdefgh]	Toccata	38,20±11,19 [nopqrstu]
NPZ3	16,49±15,58 [abcdefghi]	Mohican	39,05±10,98 [opqrstu]
NPZ1	17,29±19,65 [bcdefghi]	WVB4	39,19±14,05 [opqrstu]
SYN Sclero1	18,16±13,71 [cdefghij]	WVB1	39,21±15,98 [opqrstu]
SW2	18,57±10,60 [defghijk]	WVB2	40,45±20,55 [opqrstuv]

Genotyp	AUDPC±SD	Genotyp	AUDPC±SD
SW1	19,26±14,92 ^{defghijk}	NPZ4	40,54±14,85 ^{opqrstuv}
You You 5	22,40±18,84 ^{efghijkl}	NSL04/120	41,33±6,43 ^{pqrstuv}
SRG2009/02	22,79±18,20 ^{defghijklm}	KWS-SCL-1	42,20±17,50 ^{qrstuv}
SYN Sclero2	23,96±17,10 ^{efghijklmn}	DSV 1-09	42,75±10,72 ^{rstuv}
DSV 4-09	26,93±17,57 ^{fghijklmno}	SRG2009/05	43,56±7,35 ^{rstuv}
KWS-SCL-3	27,92±18,65 ^{ghijklmnop}	SRG2009/03	46,05±11,24 ^{stuv}
SW4	28,76±16,48 ^{hijklmnopq}	KWS-SCL-4	47,20±6,06 ^{tuv}
SYN Sclero4	28,78±14,51 ^{hijklmnopq}	SYN Sclero3	49,48±7,56 ^{uv}
DSV 2-09	29,93±19,05 ^{ijklmnopqr}	DSV 3-09	53,44±4,78 ^{v}
KWS-SCL-2	31,96±17,71 ^{jklmnopqr}		

Da das erste Gewächshausscreening einen verhältnismäßig langen Zeitraum benötigte und die Vermutung bestand, dass die z.T. relativ große Streuung der Daten auf Temperaturunterschiede während dieser Zeit zurückzuführen ist, wurde die Temperatur im zweiten Screening kontinuierlich über den gesamten Inokulationszeitraum erfaßt. Die ermittelten Tagesdurchschnittstemperaturen sind in Abb. 19 dargestellt und weisen eine gewisse Variation über die Zeit auf. Am auffälligsten ist ein recht starker Einbruch der Temperatur im Dezember 2009 bzw. Januar 2010. Dieser Zeitraum wurde allerdings nicht zur Inokulation genutzt, sondern diente einer erneuten Vernalisation der Pflanzen, die bis zu diesem Zeitpunkt keine Anzeichen des Schossens zeigten und somit nicht inokuliert werden konnten. Ca. zwei Drittel der Inokulationen wurden vor dem zur Vernalisation genutzten Zeitraum durchgeführt, so dass bei diesen Pflanzen etwas geringere Unterschiede in der Temperatur zum Inokulationszeitpunkt herrschten.

Es konnte eine relativ breite Temperaturspanne von ca. 15 bis 25°C während des gesamten Inokulationszeitraums verzeichnet werden. Tage mit extremen Temperaturen von mehr als 25°C wurden nicht zur Inokulation genutzt.

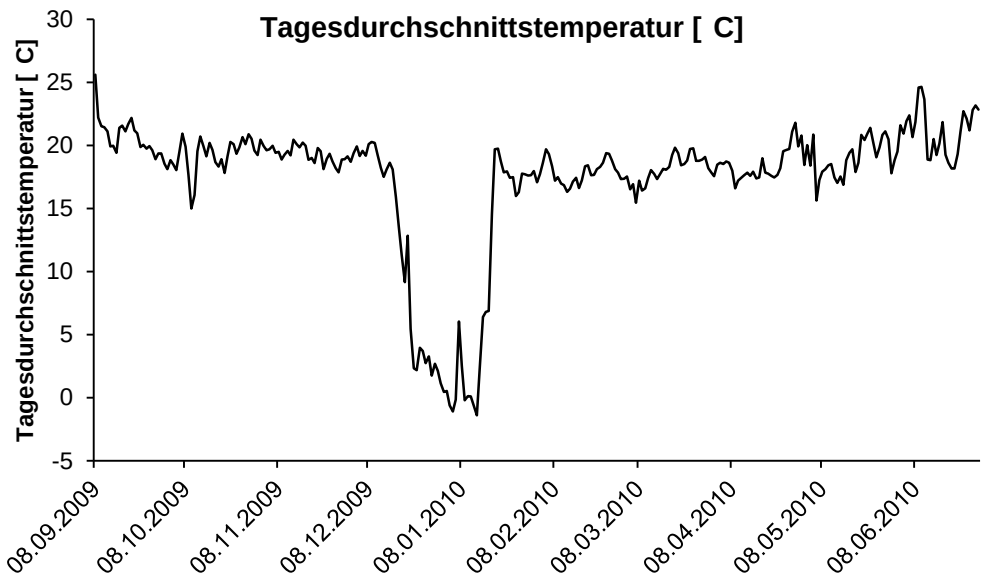


Abb. 19: Tagesdurchschnittstemperatur [°C] im Gewächshaus während des Inokulationszeitraums.

Im zweiten Gewächshausscreening wurden wilde *Brassica*-Arten und Resynthesen verwendet, um resistente Genotypen aus weiter entfernten Genpools zu identifizieren. Die ermittelten AUDPC-Werte lagen hierbei zwischen 6,9 und 52. Diese relativ große Spannweite zeichnete sich zudem zumindest zum Teil durch relativ kleine Streuung der Daten aus, so dass einige Unterschiede als statistisch signifikant abgesichert werden konnten (Tab. 18). Außergewöhnlich war an diesen Ergebnissen, dass es anders als beim vorherigen Screening eine größere Gruppe von Genotypen gab, die sich durch relativ niedrige AUDPC-Werte auszeichneten. Ab dem Genotyp *B. montana* Pourr. stiegen die Werte und Standardabweichungen verstärkt an. In dieser ersten Gruppe von ca. 20 Genotypen mit niedrigen AUDPC-Werten befanden sich mit einer Ausnahme keine der verwendeten Resynthesen. Im Gegensatz dazu handelte es sich bei 15 der 23 Genotypen mit den höchsten AUDPC-Werten um Resynthesen oder Rapssorten, so dass hier von einer deutlichen Abgrenzung der beiden Gruppen gesprochen werden kann. Bei den zwölf Wildarten in der zweiten Gruppe handelte es sich mit drei Ausnahmen ausschließlich um *Erucastrum* sp. oder *B. oleracea* L. ssp., welche in der ersten Gruppe gar nicht bzw. kaum vertreten sind. Auch die Streuung der Daten war in der Gruppe mit hohen AUDPC-Werten deutlich höher, im Vergleich zur Gruppe mit niedrigen AUDPC-Werten.

Bei diesem Versuch konnte beobachtet werden, dass nicht jede Inokulation zu einer Läsion führte. Die Pflanzen, bei denen dies der Fall war, wurden nach drei Tagen an einer anderen Stelle erneut inokuliert um dennoch Läsionslängen feststellen zu können. Da dieses Phänomen häufiger auftrat, wurde aus der Anzahl an Inokulationen, die nötig war, um eine Läsion zu erzielen, eine durchschnittliche Inokulationseffizienz [%] ermittelt und für jeden Genotyp in Tab. 18 dargestellt. Liegt diese Effizienz bei 100%, so führte jede Inokulation zu einer Läsion, während bei niedrigeren Effizienzwerten entsprechend mehrmals inokuliert werden musste. Die Inokulationseffizienz lag zwischen 29,4 und 100% und wies somit ebenfalls eine sehr breite Spannweite auf. Zu beachten ist, dass die zuvor beschriebene Gruppenbildung auch hier zu beobachten ist. In der ersten Gruppe, die sich durch niedrige AUDPC-Werte auszeichnete wurde eine tendenziell höhere Inokulationseffizienz von durchschnittlich 88,2% ermittelt, während diese bei den Pflanzen, die sich durch größere Läsionen auszeichneten, bei etwa 59,4% lag.

Tab 18: AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Werte der im Gewächshausscreening eingesetzten wilden Brassica Arten und Resynthesen mit Standardabweichung und Inokulationseffizienz [%]. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n=8-11, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	AUDPC±SD	Inokulationseffizienz [%]
B. drepanensis (Caruel) Ponzo	6,85±1,06 [a]	91,67
B. incana Ten. 1	7,34±1,88 [a]	91,67
B. montana Pourr. 4	8,38±2,18 [abd]	100,00
B. insularis Moris 2	8,39±2,18 [ab]	71,43
B. taurica Tzvel.	9,39±2,05 [abcd]	83,33
B. oleracea var. *viridis*	9,41±3,55 [abcd]	91,67
B. cretica Lam. ssp. *aegea*	9,43±3,06 [abcd]	83,33
B. montana Pourr. 2	9,51±3,94 [abcd]	72,73
B. incana Ten. 3	9,97±3,36 [abcd]	75,00
B. insularis Moris 1	10,41±2,13 [abcd]	100,00
B. incana Ten. 4	10,41±3,26 [abcd]	83,33
B. oleracea L. ssp. *oleracea* 3	10,78±5,58 [abcd]	90,91
B. villosa Biv. 1	10,93±1,87 [abcd]	100,00
B. villosa Biv. 2	11,33±3,44 [abcd]	90,91

Genotyp	AUDPC±SD	Inokulationseffizienz [%]
B. incana Ten. 2	11,76±3,41 [abcd]	76,92
B. montana Pourr. 5	12,27±7,78 [abcde]	81,82
MOL 1	13,17±1,88 [abcdefgh]	100,00
B. hilarionis Post.	14,56±4,61 [abcdef]	100,00
B. montana Pourr. 3	14,75 [abcdefghijklmnop]	90,91
B. montana Pourr. 1	15,13±7,74 [abcdefg]	88,89
B. oleracea L. ssp. *oleracea* 6	19,02±17,59 [bcdefghi]	52,63
B. oleracea L. ssp. *oleracea* 2	19,66±5,81 [cefghij]	45,45
B. bourgeaui (Webb in Christ) Kuntze	20,29±12,14 [cdefghijk]	77,78
B. oleracea L. ssp. *oleracea* 4	22,65±14,13 [efghijkl]	32,26
INY 4	23,03±10,13 [fghijkl]	57,89
MAY 1	25,50±15,27 [ghijklm]	58,82
RUY 1	26,35±16,34 [hijklmn]	29,41
INY 3	28,33±13,49 [ijklmno]	44,00
Toccata	29,12±14,90 [jklmno]	41,67
B. oleracea L. ssp. *oleracea* 1	29,56±14,48 [ijklmnopq]	30,77
ISY 1	30,71±18,43 [klmnopq]	45,45
HIY 1	31,05±11,97 [klmnopq]	42,31
B. cretica Lam.	31,60±12,10 [klmnopqr]	34,38
CRY 1	31,85±10,64 [lmnopqr]	55,00
B. oleracea L. ssp. *capitata* (L.)	33,56±11,35 [mnopqrs]	57,14
INY 1	35,79±9,64 [mnopqrst]	62,50
Erucastrum sp. 1	35,86±14,12 [nopqrst]	100,00
MOY 6	36,55±20,52 [opqrst]	68,75
MOY 4	37,30±13,54 [opqrst]	76,92
Erucastrum gallicum	37,38±10,94 [opqrst]	100,00
OLY 2	38,68±14,36 [pqrst]	57,89
Erucastrum sp. 2	38,90±12,08 [qrst]	86,67
OLL 1	40,07±16,74 [qrst]	55,00
Pacific	40,50±17,06 [rst]	60,00
BOY 1	41,81±17,73 [stu]	61,11
B. oleracea L. ssp. *oleracea* 5	45,37±16,25 [tu]	90,91
B. insularis Moris 3	52,02±22,62 [u]	77,78

Für die Deutung der Ergebnisse muss erwähnt werden, dass die Anzahl der Wiederholungen in diesem Versuch allgemein zwischen 8 und 11 lag. Allerdings konnten bei dem Genotyp MOL 1 lediglich drei und beim Genotyp *B. montana* Pourr. 3 lediglich eine Wiederholung mit in den Versuch eingeschlossen werden, da die übrigen Pflanzen dieser Genotypen entweder bei der zweiten Vernalisation abstarben oder nicht zum Schossen kamen. Die Ergebnisse dieser Genotypen wurden nicht mit in die Betrachtung einbezogen.

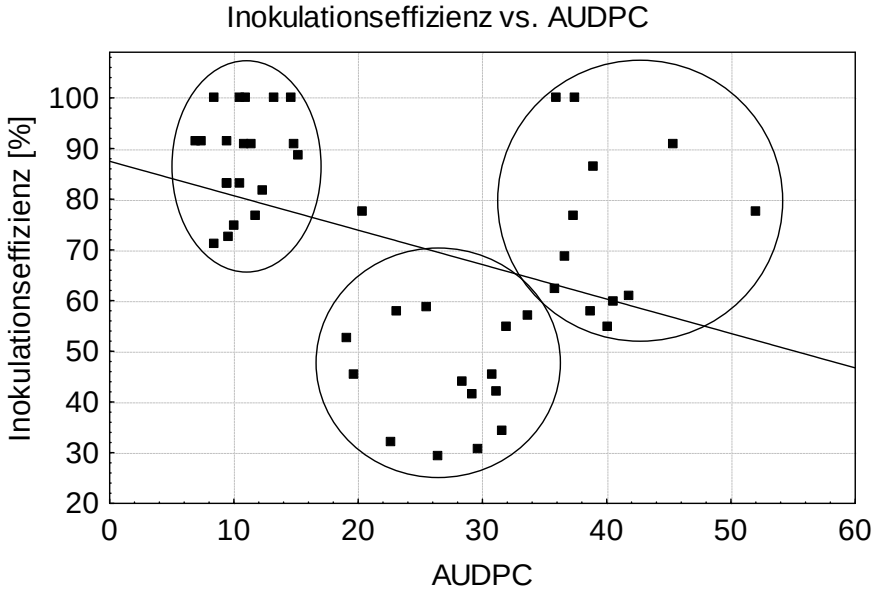
Während die morphologischen Merkmale der Genotypen festgehalten wurden, wurde festgestellt, dass der Genotyp *B. cretica* Lam. kein homogenes Erscheinungsbild aufwies. Bei diesem Genotyp konnten Unterschiede in der Blütenfarbe, Stängelfarbe und der Wuchsform beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich hierbei um kein sortenreines Saatgut handelte. Die Ergebnisse flossen somit nicht in die Betrachtung mit ein.

Die oben beschriebenen Unterschiede in den AUDPC-Werten und der Inokulationseffizienz deuten einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern an (Abb. 20). Es handelt sich um eine signifikant negative Korrelation, wobei sich die Genotypen in drei Gruppen, die in Abb. 20 durch Ellipsen gekennzeichnet wurden, einordnen lassen. Die erste Gruppe, deren Werte vergleichsweise dicht beisammen liegen, scheint sich durch sehr niedrige AUDPC-Werte, aber eine hohe Inokulationseffizienz auszuzeichnen. Während die zweite Gruppe sich durch mittlere AUDPC-Werte und eine niedrige Inokulationseffizienz auszeichnet, scheint die dritte Gruppe, deren Werte am stärksten streuen, hohe Werte bei beiden Parametern aufzuweisen.

Bei der ersten Gruppe handelt es sich fast ausschließlich um *Brassica* Wildarten unterschiedlicher Herkünfte. Die einzige Ausnahme bildet Mol 1, der allerdings wegen der niedrigen Anzahl an Wiederholungen nicht gewertet werden sollte. Dagegen finden sich in der zweiten Gruppe sechs *Brassica* Wildarten, sieben Resynthesen und die im Feldversuch als relativ resistent eingestufte Sorte Toccata. In der letzten Gruppe zeigt sich ein ähnliches Bild, denn sie besteht aus fünf Wildarten, sechs Resynthesen und der im Feldversuch als sehr anfällig eingestuften Sorte Pacific. Bei genauerer Betrachtung der Wildarten in der zweiten und dritten Gruppe fällt auf, dass es sich bei den elf Arten um sechs *B. oleracea* L. ssp., drei *Erucastrum* sp., welche alle in der dritten Gruppe zu finden sind, und nur zwei andere

Arten handelt. Alle übrigen Wildarten finden sich in der ersten Gruppe wieder, in der sich allerdings nur zwei *B. oleracea* L. ssp. finden lassen.

Bei genauerer Betrachtung der Resynthesen fällt ins Auge, dass sich alle Kreuzungen mit *B. oleracea* L. ssp. als Vater in der dritten Gruppe wiederfinden lassen. Darüberhinaus befinden sich in dieser Gruppe nur zwei Resynthesen, bei denen es sich um BOY 1 und INY 1 handelt, wobei es sich bei INY 1 um den Genotyp aus der dritten Gruppe handelt, der am dichtesten an der zweiten Gruppe liegt.

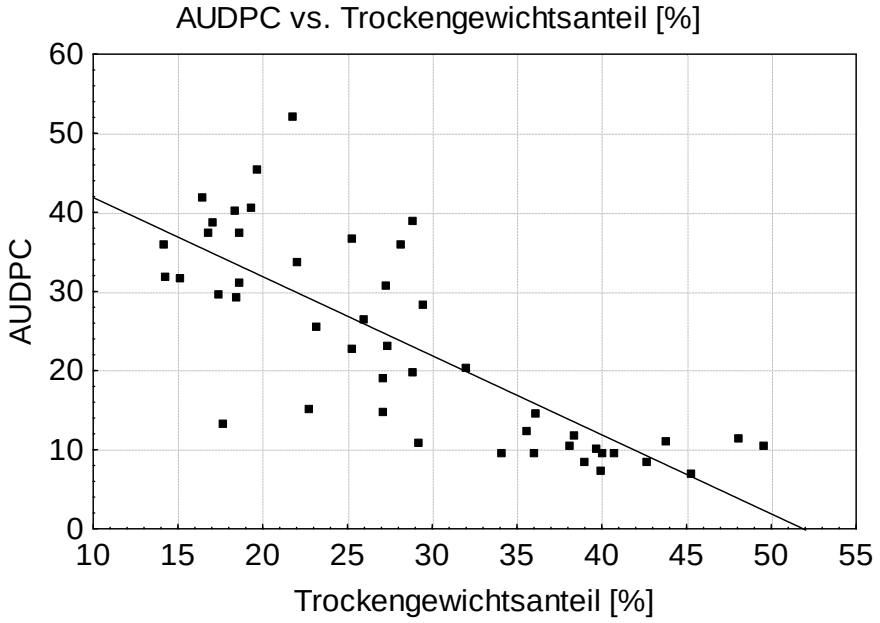


p = 0,0056; R_s = -0,3977; y = 87,4883 - 0,6793*x

Abb. 20: Korrelationsanalyse zwischen den AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Werten und der Inokulationseffizienz [%] der im Gewächshausscreening eingesetzten wilden *Brassica* Arten und Resynthesen (Rangkorrelation nach Spearman, n=47, p≤0,05). Ellipsen kennzeichnen distinkte Gruppen.

Bei diesem Gewächshausscreening wurden aber nicht nur die AUDPC-Werte bzw. die Inokulationseffizienz festgehalten, sondern auch einige morphologische Parameter erfasst. Zu diesen zählte der Trockengewichtsanteil der Stängel. Es ließen sich statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem Trockengewichtsanteil der Stängel und den AUDPC-Werten bzw. der

Inokulationseffizienz herstellen. Diese Zusammenhänge sind in Abb. 21 und 22 dargestellt. Es wird deutlich, dass mit zunehmendem Trockengewichtsanteil die Entwicklung des Pathogens in der Pflanze reduziert wird bzw. die Inokulationseffizienz zunimmt. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass es sehr große Unterschiede im Trockengewichtsanteil gab und dass bei beiden Parametern bis zu einem Trockengewichtsanteil von ca. 30% die Streuung der Daten größer war.

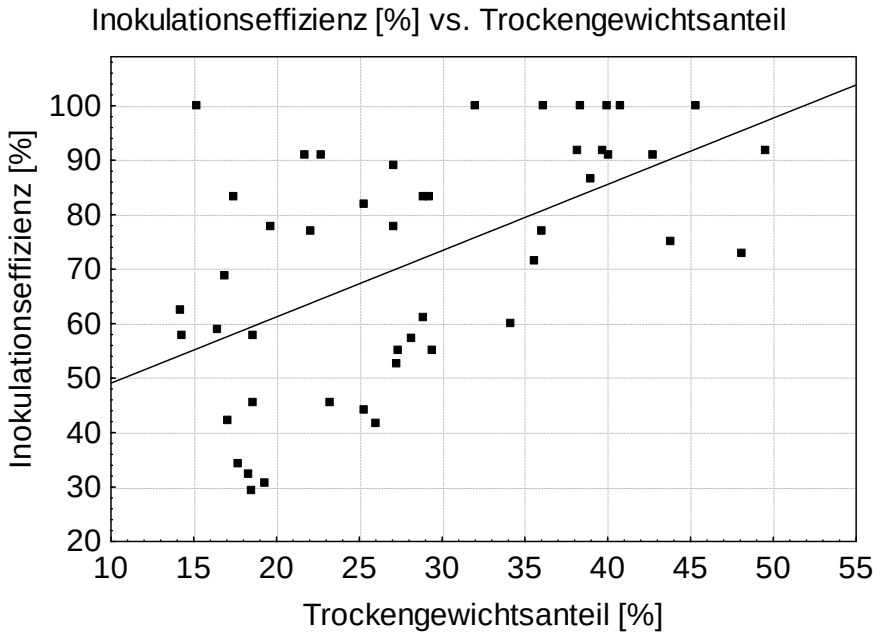


p = 0.0000; R_s = -0,7991; y = = 51,8813-1*x

Abb. 21: Korrelationsanalyse zwischen den AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Werten und dem Trockengewichtsanteil [%] der im Gewächshausscreening eingesetzten wilden *Brassica* Arten und Resynthesen (Rangkorrelation nach Spearman, n=47, p≤0,05).

Bei einer genauen Betrachtung der Daten lässt sich erkennen, dass in dem Bereich oberhalb eines Trockengewichtsanteils von ca. 35% lediglich die Wildarten zu finden sind, die sich durch niedrige AUDPC-Werte auszeichneten. Die einzigen Ausnahmen bilden die Genotypen MOL 1, *B. montana* Pourr. 1, *B. montana* Pourr. 3 und *B. oleracea* L. ssp. *oleracea* 3. Diese Genotypen weisen auch bei einem niedrigeren Trockengewichtsanteil von ca. 17,7; 22,7; 27,1 bzw. 29,2% vergleichsweise niedrige AUDPC-Werte auf. Ein vergleichbares Bild ergab sich bei der Betrachtung der Inokulationseffizienz. Die Genotypen mit niedrigen AUDPC-Werten zeichneten sich hier nicht nur durch hohe Trockengewichtsanteile, sondern auch durch hohe

Inokulationseffizienzen aus. Ausnahmen bildeten hier wiederum die Genotypen MOL 1, *B. montana* Pourr. 1 und *B. montana* Pourr. 3. Während *B. montana* Pourr. 1 und *B. montana* Pourr. 3 auch bei niedrigerem Trockengewichtsanteil hohe Inokulationseffizienzen aufwiesen, lag diese bei MOL 1 vergleichsweise niedrig.

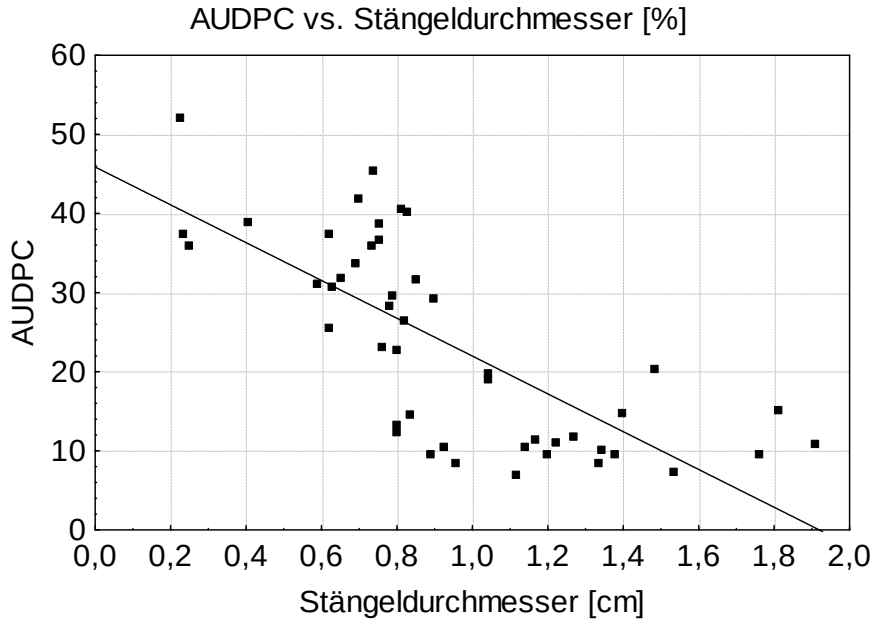


p = 0,0001; Rs = 0,5343; y = 36,8973+1,2169*x

Abb. 22: Korrelationsanalyse zwischen der Inokulationseffizienz [%] und dem Trockengewichtsanteil [%] der im Gewächshausscreening eingesetzten wilden *Brassica* Arten und Resynthesen (Rangkorrelation nach Spearman, n=47, p≤0,05).

Als weiterer morphologischer Parameter wurde u. a. der Stängeldurchmesser der Pflanzen direkt unterhalb der Inokulationsstelle festgehalten. In Abb. 23 ist der Zusammenhang zwischen dem Stängeldurchmesser und den AUDPC-Werten dargestellt. Es ergab sich auch hier ein signifikanter Zusammenhang mit einem vergleichsweise hohen R_S von ca. -0,78. Mit zunehmendem Stängeldurchmesser nimmt folglich der AUDPC-Wert ab. Eine detaillierte Betrachtung der Genotypen zeigte, dass die wilden *Brassica*-Arten, welche niedrige AUDPC-Werte aufwiesen, größere Stängeldurchmesser aufzeigten. Auch dieser Zusammenhang zwischen dem Stängeldurchmesser und der Inokulationseffizienz war mit einem p-Wert von 0,0002 und einem R_S von 0,521 signifikant absicherbar. Allerdings handelte es sich hierbei

um einen positiven Zusammenhang, so dass mit zunehmendem Stängeldurchmesser die Inokulationseffizienz zunahm.



$p = 0{,}0000$; $R_s = -0{,}7750$; $y = 45{,}8761-23{,}8955*x$

Abb. 23: Korrelationsanalyse zwischen den AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Werten und dem Stängeldurchmesser der im Gewächshausscreening eingesetzten wilden *Brassica* Arten und Resynthesen (Rangkorrelation nach Spearman, n=47, $p \leq 0{,}05$).

Um den Einfluss der Temperatur auf die Inokulation zu betrachten, wurden verschiedene Korrelationen durchgeführt. Diese Korrelationen wurden stets zwischen den beobachteten AUDPC-Werten und verschiedenen Maßzahlen für die Temperatur durchgeführt. Es wurde neben der Maximumtemperatur auch die Minimumtemperatur und Durchschnittstemperatur am Tag der Inokulation verwendet. Da u.U. nicht nur die Temperatur am Tag der Inokulation, sondern auch an den darauf folgenden Tagen bis zum Entfernen des Parafilms und Inokulums einen Einfluss haben könnte, wurden diese Temperaturen nicht nur auf Basis des Tages der Inokulation, sondern auch auf drei Tagesbasen berechnet und für die Korrelationen verwendet. In diese Betrachtung ging jede Inokulation mit der dazugehörigen Temperatur als ein Datenpunkt ein. Auf diese Weise werden nicht nur auch die nicht erfolgreichen Inokulationen mit in die Betrachtung einbezogen, sondern auch eine Wechselwirkung

zwischen dem Blühzeitpunkt eines Genotyps, dessen Resistenzniveaus und der Temperatur weitestgehend ausgeschlossen.

Wie in Tab. 19 ersichtlich, ergaben sich signifikante Zusammenhänge zwischen der Tagesmaximumtemperatur, der drei Tagesmaximumtemperatur, der drei Tagesminimumtemperatur, der Tagesdurchschnittstemperatur bzw. der drei Tagesdurchschnittstemperatur und dem AUDPC-Wert. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass die erzielten Bestimmtheitsmaße ohne Ausnahme sehr gering waren. Darüberhinaus sollte bedacht werden, dass die p-Werte durch die extrem hohe Anzahl an Datenpunkten stark positiv beeinflusst wurden. Es handelt sich folglich, wenn auch um signifikante, so doch um nicht sehr enge Zusammenhänge.

Tab. 19: Korrelationsanalyse zwischen der Tagesmaximumtemp., Mittel der Maximumtemp. von drei Tagen, Tagesminimumtemp., Mittel der Minimumtemp. von drei Tagen, Tagesdurchschnittstemp. bzw. Durchschnittstemp. von drei Tagen und dem AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Wert der im Gewächshausscreening eingesetzten wilden *Brassica* Arten und Resynthesen. Statistisch signifikante Zusammenhänge sind durch ein * gekennzeichnet (Rangkorrelation nach Spearman, n=747, p≤0,05).

	AUDPC	
	R_s	p
Tagesmaximumtemp.	-0,0812	0,0264*
Mittel der Maximumtemp. von drei Tagen	-0,1366	0,0002*
Tagesminimumtemp.	0,0142	0,6992
Mittel der Minimumtemp. von drei Tagen	-0,0786	0,0318*
Tagesdurchschnittstemp.	-0,1204	0,0010*
Durchschnittstemp. von drei Tagen	-0,0931	0,0109*

3.3 Oxalsäuretest

Im Oxalsäuretest wurden, neben den von den Züchterhäusern zur Verfügung gestellten Genotypen, ebenfalls die chinesischen Rapssorten eingesetzt. In der Tab. 20 ist die Änderung der Leitfähigkeit [µS] im bidest. Wasser korrigiert um die Leitfähigkeit [µS] zu Versuchsbeginn und die Änderung der Leitfähigkeit [µS] in der Kontrollvariante nach einer Inkubation für 2 h in 2 mM Oxalsäure dargestellt. Die Änderung der Leitfähigkeit bewegte sich in einem Rahmen von ca. 1,3 bis 9 µS.

Tab. 20: Änderung der Leitfähigkeit [µS] im bidest. Wasser korrigiert um die Leitfähigkeit zu Versuchsbeginn und die Änderung der Leitfähigkeit in der Kontrollvariante nach einer Inkubation für 2 h in 2 mM Oxalsäure der chinesischen Sorten und der von den Züchtern zur Verfügung gestellten Genotypen mit Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n=6, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	Änderung der Leitfähigkeit [µS] ±SD	Genotyp	Änderung der Leitfähigkeit [µS] ±SD
Zhongshuang 9	1,28±0,26 ^{a}	Hearty	3,10±0,62 ^{bcdefghijkl}
You You 5	1,36±0,29 ^{ab}	WVB 2	3,20±1,50 ^{cdefghijklm}
Toccata	1,70±0,84 ^{abc}	DSV 2-09	3,20±2,11 ^{cdefghijklm}
KWS 5	1,71±0,84 ^{abc}	NPZ 2	3,32±0,97 ^{cdefghijklm}
WVB 3	1,92±0,50 ^{abcd}	KWS 3	3,42±0,84 ^{cdefghijklm}
WVB 1	1,96±0,98 ^{abcd}	KWS 4	3,58±1,54 ^{defghijklm}
Zhong You 821	2,02±0,79 ^{abcdef}	DSV 3-09	3,68±1,72 ^{defghijklm}
WVB 4	2,13±0,67 ^{abcde}	SW 4	3,83±0,43 ^{efghijklm}
SW 2	2,20±1,53 ^{abcdef}	Tianhe You 1	3,93±0,40 ^{fghijklm}
NSL 04/120	2,23±0,94 ^{abcdef}	SRG 2009/01	3,95±1,58 ^{fghijklm}
DSV 1-09	2,25±0,99 ^{abcdef}	KWS 1	4,13±0,55 ^{ghijklm}
NPZ 4	2,28±0,50 ^{abcdef}	Talent	4,13±1,01 ^{ghijklm}
SRG 2009/05	2,32±1,66 ^{abcdef}	Zeppelin	4,25±0,82 ^{hijklm}
Wan You 19	2,43±1,43 ^{abcdefg}	Pacific	4,28±1,80 ^{ijklm}
Wan You 14	2,45±1,59 ^{abcdefg}	Mohican	4,48±0,68 ^{jklmn}
NIC 06-1346CB	2,48±0,63 ^{abcdefgh}	SYN Sclero 2	4,60±2,40 ^{klmn}
SW 3	2,53±1,42 ^{abcdefghi}	SRG 2009/02	4,85±1,13 ^{lmno}
SYN Sclero 3	2,57±1,03 ^{abcdefghi}	SW 1	4,88±1,07 ^{mno}

Genotyp	Änderung der Leitfähigkeit [µS] ±SD	Genotyp	Änderung der Leitfähigkeit [µS] ±SD
KWS 2	2,57±0,77 [abcdefghi]	SRG 2009/03	6,13±1,45 [nop]
NSL 02/95	2,75±0,88 [abcdefghij]	NPZ 1	6,38±5,05 [op]
NPZ 3	2,90±1,97 [abcdefghijk]	KWS 6	6,82±2,21 [p]
DSV 4-09	2,92±0,74 [abcdefghijk]	LBN 241/78	7,16±1,98 [p]
Lion	2,92±1,42 [abcdefghijk]	SYN Sclero 4	8,96±4,17 [q]
SYN Sclero 1	3,05±1,49 [abcdefghijk]		

Bei Betrachtung der eingesetzten Genotypen fällt auf, dass vor allem die chinesischen Rapssorten Zhongshuang 9, You You 5 und Zhong You 821 relativ niedrige Änderungen in der Leitfähigkeit aufwiesen und somit wiederum als relativ resistent gegenüber dem Pathogen einzustufen sind. Lediglich Tianhe You 1 bildet bei den chinesischen Genotypen eine Ausnahme.

Eine Auswahl von 19 Genotypen der wilden *Brassica* Arten und Resynthesen wurde ebenfalls im Oxalsäuretest eingesetzt. Zusätzlich wurde in diesem Ansatz das Gewicht der eingesetzten Blattscheiben, Frisch- und Trockengewicht der Blätter, die Behaarung und die Anzahl der Spaltöffnungen/mm² für eine evtl. Korrektur der Messwerte um einen dieser Einflussfaktoren festgehalten. Dies war notwendig, da zu befürchten war, dass aufgrund der hohen morphologischen Variabilität des Materials, der Oxalsäuretest keine verwertbaren Ergebnisse liefert. Von diesen Parametern konnte allerdings lediglich die Anzahl der Spaltöffnungen/mm^2 genutzt werden, um die Korrelation, die in Kapitel 3.4 vorgestellt wird, zu verbessern. Alle übrigen Parameter hatten keinen positiven Einfluss auf die Korrelation. Aus diesem Grund ist in Tab. 21 lediglich die Änderung der Leitfähigkeit [µS] im bidest. Wasser korrigiert um die Leitfähigkeit [µS] zu Versuchsbeginn und die Änderung der Leitfähigkeit [µS] in der Kontrollvariante nach einer Inkubation für 2 h in 2 mM Oxalsäure, die Anzahl der Spaltöffnungen/mm² und die Änderung der Leitfähigkeit [µS] korrigiert um die Anzahl der Spaltöffnungen/mm² dargestellt. Die Änderung der Leitfähigkeit lag in diesem Versuch zwischen 2,8 und 9 µS. Da sich die Anzahl der Spaltöffnungen/mm² jedoch sehr stark unterschied, sie lag zwischen 134 und 572, ergab sich durch die Korrektur eine Änderung in der Reihenfolge der Genotypen. Die Änderung der Leitfähigkeit korrigiert um die Anzahl der Spaltöffnungen/m² lag zwischen 0,0069 und

0,0582 µS und zeichnete sich durch vergleichsweise geringe Standardabweichungen aus.

Tab. 21: Änderung der Leitfähigkeit [µS] im bidest. Wasser korrigiert um die Leitfähigkeit zu Versuchsbeginn und die Änderung der Leitfähigkeit in der Kontrollvariante nach einer Inkubation für 2 h in 2 mM Oxalsäure der eingesetzten wilden *Brassica* Arten und Resynthesen mit Standardabweichung. Dargestellt ist außerdem die Anzahl der Spaltöffnungen je mm² mit Standardabweichung und die Änderung der Leitfähigkeit [µS] korrigiert um die Anzahl der Spaltöffnungen je mm² mit Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n=6, Fischer-LSD, p≤0,05).

Genotyp	Änderung der Leitfähigkeit [µS] ±SD	Spaltöffnungen / mm² ±SD	Änderung der Leitfähigkeit [µS] / Spaltöffnungen / mm² ±SD
B. drepanensis (Caruel) Ponzo	2,78±0,58 ^{a}	311,46±56,04 ^{g}	0,0089±0,0019 a
OLL 1	3,02±0,50 ^{ab}	134,58±36,96 ^{ab}	0,0224±0,0037 ^{cde}
B. incana Ten. 2	3,18±0,54 ^{ab}	253,79±85,08 ^{ef}	0,0125±0,0021 ^{ab}
B. montana Pourr. 3	3,47±0,95 ^{ab}	380,68±57,91 ^{i}	0,0091±0,0025 ^{a}
OLY 2	3,83±0,79 ^{abc}	215,33±23,83 ^{cde}	0,0178±0,0037 ^{bc}
B. incana Ten. 4	3,96±0,66 ^{abcd}	572,94±44,78 ^{j}	0,0069±0,0011 ^{a}
INY 3	4,08±0,40 ^{bcd}	169,19±18,84 ^{bc}	0,0241±0,0024 ^{cde}
B. oleracea var. *viridis*	4,18±1,06 ^{bcd}	342,23±39,74 ^{ghi}	0,0122±0,0031 ^{ab}
B. incana Ten. 1	4,83±0,41 ^{cde}	380,68±31,80 ^{i}	0,0127±0,0011 ^{ab}
B. oleracea L. ssp. *capitata* (L.)	4,92±1,00 ^{cde}	226,87±26,97 ^{de}	0,0217±0,0044 ^{cde}
ISY 1	5,10±1,11 ^{def}	184,57±48,39 ^{bcd}	0,0276±0,0060 ^{ef}
HIY 1	5,22±2,08 ^{def}	115,36±14,59 ^{a}	0,0452±0,0180 ^{g}
B. oleracea L. ssp. oleracea 3	5,72±0,87 ^{efg}	296,08±33,96 ^{fg}	0,0193±0,0029 ^{bcd}
BOY 1	6,18±1,94 ^{fg}	184,57±41,27 ^{bcd}	0,0335±0,0105 ^{f}
B. villosa Biv. 1	6,28±0,87 ^{fg}	292,24±66,33 ^{fg}	0,0215±0,0030 ^{cde}
B. montana Pourr. 1	6,55±1,04 ^{g}	234,56±44,78 ^{de}	0,0279±0,0044 ^{ef}
B. taurica Tzvel.	6,58±0,80 ^{g}	365,30±49,30 ^{hi}	0,0180±0,0022 ^{bc}
B. cretica Lam. ssp. *aegea*	8,30±1,14 ^{h}	323,00±32,63 ^{gh}	0,0257±0,0035 ^{de}
CRY 1	8,95±2,00 ^{h}	153,81±18,84 ^{ab}	0,0582±0,0130 ^{g}

3.4 Vergleich der Resistenzprüfmethoden

Um abschließende Aussagen über das Resistenzniveau eines Genotyps machen zu können, mussten die drei oben beschriebenen Screeningmethoden in Beziehung gesetzt werden. Dies geschah anhand von Spearman Rang Korrelationen, deren Rangkorrelationskoeffizienten und p-Werte in Tab. 22 dargestellt sind. Es ist zu erkennen, dass die meisten durchgeführten Korrelationen keinen signifikanten Zusammenhang zeigten. Lediglich zwischen der Befallshäufigkeit zu BBCH 19 und 80 im Versuchsjahr 2008/09 am Standort Göttingen, der Befallshäufigkeit zu BBCH 80 im Versuchsjahr 2008/09 am Standort Göttingen und Peine und der Befallshäufigkeit zu BBCH 80 im Versuchsjahr 2008/09 und 2009/10 am Standort Göttingen bzw. der Befallshäufigkeit zu BBCH 80 im Versuchsjahr 2008/09 am Standort Peine ließ sich ein signifikanten Zusammenhang herstellen. Die Rangkorrelationskoeffizienten waren allerdings in zwei der vier genannten Fälle negativ, was bedeuten würde, dass mit zunehmender Befallshäufigkeit im ersten Versuch die Befallshäufigkeit im zweiten Versuch abnahm.

Besonders auffällig ist, dass die signifikanten Zusammenhänge nur zwischen den Feldversuchen gefunden werden konnten. Es ließ sich in keinem Fall ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gewächshausscreening bzw. dem Oxalsäuretest und den Feldversuchen absichern.

Tab. 22: Korrelationsanalyse zwischen der Befallshäufigkeiten (BH) [%] zu BBCH 19 im Versuchsjahr 2008/09 am Standort Göttingen, zu BBCH 80 im Versuchsjahr 2008/09 am Standort Göttingen, zu BBCH 80 im Versuchsjahr 2008/09 am Standort Peine, zu BBCH 19 im Versuchsjahr 2009/10 am Standort Göttingen, zu BBCH 80 im Versuchsjahr 2009/10 am Standort Göttingen, zu BBCH 80 im Versuchsjahr 2009/10 am Standort Peine, den AUDPC-Werten aus dem Gewächshausscreening und der Änderung der Leitfähigkeit [µS] im Oxalsäuretest. Statistisch signifikante Zusammenhänge sind mit * gekennzeichnet (Rangkorrelation nach Spearman, n=19, p≤0,05).

		08/09 Gö BBCH 19	08/09 Gö BBCH 80	08/09 Pe BBCH 80	09/10 Gö BBCH 19	09/10 Gö BBCH 80	09/10 Pe BBCH 80	GWH Screening
08/09 Gö BBCH 80	R_s	0,474						
	p	0,040*						
08/09 Pe BBCH 80	R_s	-0,022	-0,519					
	p	0,929	0,023*					
09/10 Gö BBCH 19	R_s	-0,366	-0,118	0,161				
	p	0,123	0,632	0,510				
09/10 Gö BBCH 80	R_s	0,082	-0,467	0,856	0,068			
	p	0,737	0,044*	0,000*	0,782			
09/10 Pe BBCH 80	R_s	0,177	-0,274	0,266	-0,029	0,300		
	p	0,468	0,257	0,272	0,906	0,212		
GWH Screening	R_s	0,277	0,056	0,186	0,342	0,261	0,086	
	p	0,251	0,819	0,445	0,152	0,280	0,726	
Oxalsäure -test	R_s	0,192	0,176	0,088	0,199	-0,032	0,065	-0,155
	p	0,431	0,470	0,720	0,415	0,898	0,792	0,525

Eine vergleichbare Analyse wurde auch für die eingesetzten Wildarten durchgeführt, die allerdings nicht in Feldversuchen geprüft werden konnten. Die zugehörigen Rangkorrelationskoeffizienten und p-Werte sind in Tab. 23 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass sich kein Zusammenhang zwischen dem Oxalsäuretest und den im Gewächshausscreening ermittelten AUDPC-Werten bzw. der ermittelten Inokulationseffizienz herstellen ließ. Erst durch die Korrektur der im Oxalsäuretest ermittelten Ergebnisse um die Anzahl an Spaltöffnungen/mm² änderte sich dieses Ergebnis, denn auf diese Weise gelang es signifikante Zusammenhänge zwischen den drei Parametern herzustellen. Die Rangkorrelationskoeffizienten dieser beiden Zusammenhänge sind mit 0,61 bzw. -0,61 relativ hoch. Zwischen den im Gewächshausscreening ermittelten AUDPC-Werten und der Inokulationseffizienz konnte ein nur unwesentlich höherer Rangkorrelationskoeffizient von -0,73 ermittelt werden. Dies ist bemerkenswert, da es sich bei dem Oxalsäuretest nicht nur um einen anderen Versuch handelte und somit andere Pflanzen verwendet wurden, sondern auch, da beim Oxalsäuretest ein vollkommen anderer Gewebetyp verwendet wurde. Die übrigen im Oxalsäuretest ermittelten Korrekturfaktoren, wie z.B. das Gewicht der Blattscheiben oder die Behaarung der Blätter, konnten das Ergebnis dieser Korrelationsanalyse nicht verbessern und wurden aus diesem Grund nicht verwendet.

Tab. 23: Korrelationsanalyse zwischen der Änderung der Leitfähigkeit [µS] im Oxalsäuretest, der Änderung der Leitfähigkeit [µS] im Oxalsäuretest korrigiert um die Anzahl Spaltöffnungen je mm², den AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Werten aus dem Gewächshausscreening und der im Gewächshausscreening ermittelten Inokulationseffizienz der eingesetzten wilden *Brassica* Arten und Resynthesen. Statistisch signifikante Zusammenhänge sind durch ein * gekennzeichnet (Rangkorrelation nach Spearman, n=19, p≤0,05).

		Oxalsäuretest	Oxalsäuretest korr. um Anzahl Spaltöffnungen	GWH Screening AUDPC
Oxalsäuretest korr. um Anzahl Spaltöffnungen	R_s	0,653		
	p	0,002*		
GWH Screening AUDPC	R_s	0,016	0,607	
	p	0,949	0,006*	
GWH Screening Inokulationseffizienz	R_s	-0,028	-0,611	-0,726
	p	0,909	0,005*	0,000*

3.5 Wurzelinokulation

Im Rahmen einer Bachelor Arbeit (Algermissen 2008) sollte der Einfluss verschiedener Isolate von Sklerotinia bei divergierenden Temperaturbedingungen auf die Wurzelinfektionen von Raps untersucht werden. Wurzelinfektionen können im Feld beobachtet werden und die befallenen Pflanzen zeichnen sich nach dem Absterben vor allem durch Sklerotien im Inneren der Wurzel aus. Da weder der Infektionszeitpunkt, noch die Art der Infektion bekannt sind, wurden Pflanzen inokuliert und bei verschiedenen Temperaturen weiter kultiviert um zunächst den Einfluss der Temperatur zu beobachten. Hierzu wurden drei Temperaturvarianten gewählt, deren Temperaturverläufe im Boden über den Versuchszeitraum in Abb. 24 dargestellt sind. Neben einer 15°C und einer 20°C Variante wurde eine Variante angelegt, in der die Pflanzen bei den im Winter 2008/09 vorherrschenden Temperaturen kultiviert wurden. Aus dem aufgezeigten Temperaturverlauf (Abb. 24) lässt sich erkennen, dass die Bodentemperatur über den gesamten Versuchszeitraum zwar nicht konstant bei der Sollwerttemperatur lag, aber sich deutlich unterschieden und im Mittel dicht an der gewünschten Temperatur lagen. Bei der Außentemperaturvariante lag die Temperatur deutlich unter denen der anderen Varianten und variierte für einen längeren Zeitraum zwischen 0 und 5°C. Zum Ende des Versuchszeitraums fiel die Temperatur dann allerdings weiter ab, so dass Temperaturen bis nahezu -10°C verzeichnet werden konnten.

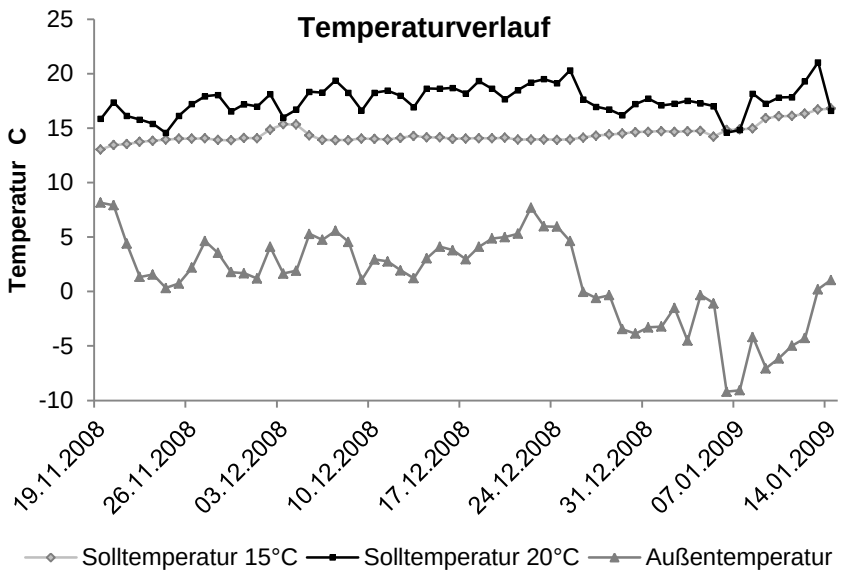


Abb. 24: Durchschnittliche Tagesbodentemperatur [°C] in den Töpfen in den drei Temperaturvarianten über den Versuchszeitraum (Algermissen 2008).

Nach Ablauf des Versuchszeitraums wurden die Wurzeln gewaschen und die sich entwickelnden Läsionen anhand einer Boniturskala von 1 bis 4 bonitiert, um Unterschiede zwischen den Varianten ermitteln zu können. Erwähnenswert ist, dass ein Großteil der Läsionen relativ oberflächlich war und im Gegensatz zu den im Feld beobachteten Symptomen ließ sich der Pilz nur sehr selten im Inneren des Zentralzylinders wieder finden. An 77,5% der Pflanzen konnten Läsionen gefunden werden, so dass von einer erfolgreichen Inokulation ausgegangen werden kann. In der Außentemperaturvariante fanden sich an 80% der Pflanzen Läsionen, während in der 15°C und der 20°C Variante an 70 bzw. 82,5% der Pflanzen Läsionen festgestellt werden konnten. Es ließen sich keine statistischen Unterschiede in der Häufigkeit der Infektion zwischen den Temperaturvarianten gemittelt über alle verwendeten Isolate absichern (n=40, Fischer-LSD, $p \leq 0{,}05$), (Algermissen 2008). Die Größe der beobachteten Läsionen kann anhand der Boniturnoten, die für alle Varianten in Abb. 25 dargestellt sind, beurteilt werden. Auch konnte kein statistischer Unterschied zwischen den verschiedenen Temperaturen festgestellt werden, obwohl der Boden in der Außentemperaturvariante regelmäßig gefroren war und somit zu dieser Zeit nicht mit einer Entwicklung des Pilzes gerechnet werden kann.

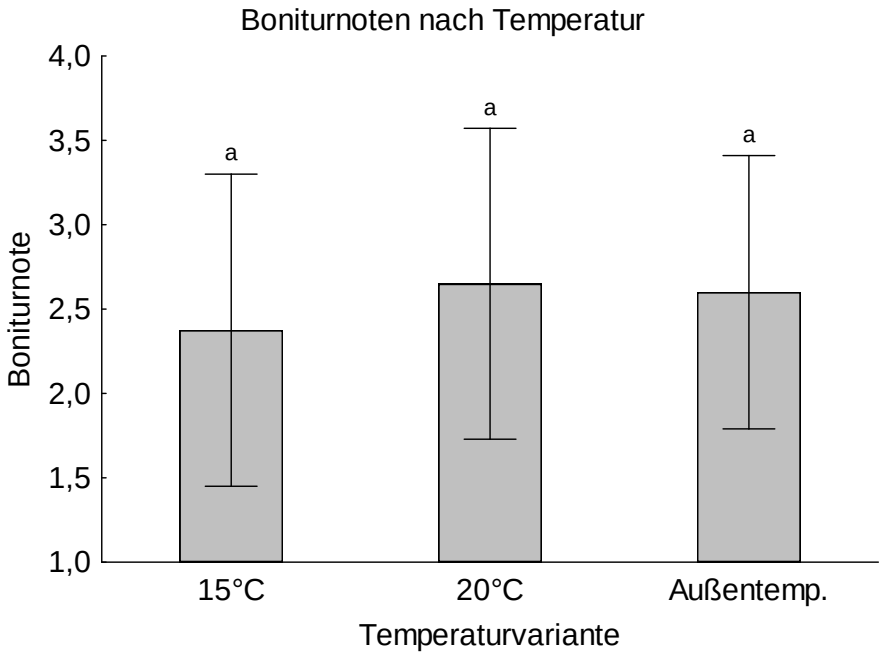


Abb. 25: Durchschnittliche Boniturnoten (1-4) mit Standardabweichungen in den drei Temperaturvarianten, das Mittel aller fünf eingesetzten *S. sclerotiorum* Isolate. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Varianten (n=40, Fischer-LSD, p≤0,05), (Algermissen 2008).

Durch Auslegen auf PDA- oder SSM-Medium bzw. durch Inkubation der Wurzeln in einer feuchten Kammer wurde im Anschluss an die oben beschriebene Bonitur versucht den Pilz *S. sclerotiorum* aus den Läsionen zu reisolieren. Die Reisolationsraten sind in Abb. 26 für jede Temperaturvariante dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Isolationsmethoden vergleichsweise gering sind. Zwischen den Temperaturvarianten konnten allerdings extreme Unterschiede beobachtet werden. Vor allem in der Außentemperaturvariante gelang es häufiger vitales pilzliches Material aus den Läsionen zu isolieren, während dies bei den beiden anderen Varianten eher selten gelang.

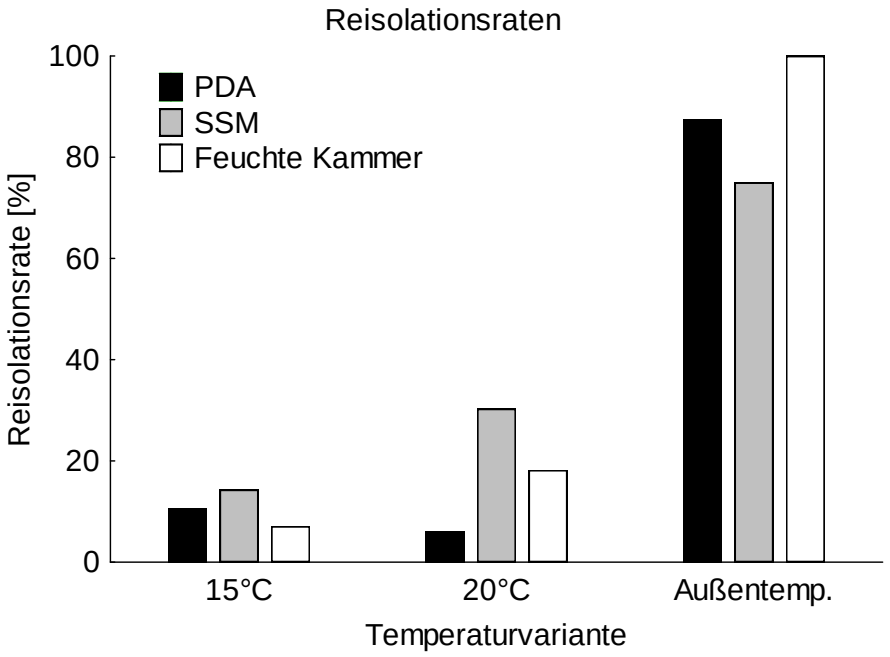


Abb. 26: Reisolationsrate [%] von *S. sclerotiorum* aus Läsionen an der Wurzel mit Hilfe verschiedener Methoden (Auslegen auf PDA- oder SSM-Medium bzw. Inkubation in der Feuchten Kammer) in den drei Temperaturvarianten über die fünf eingesetzten *S. sclerotiorum* Isolate (n = 40), (Algermissen 2008).

Die fünf eingesetzten Isolate zeigten allerdings, wie in Abb. 27 ersichtlich, statistisch absicherbare Unterschiede in der Aggressivität. Während das Isolat aus Lübeck über alle Temperaturvarianten die höchste Aggressivität zeigte, wiesen die beiden Isolate aus Göttingen und Thule deutlich kleinere Läsionen auf.

Auch die Befallshäufigkeit unterschied sich zwischen den eingesetzten Isolaten. Während vor allem die Isolate SS LÜ und SS F sehr hohe Werte erreichten, zeigten die Isolate SS GÖ und SS TH insgesamt eine reduzierte Befallshäufigkeit (Algermissen 2008).

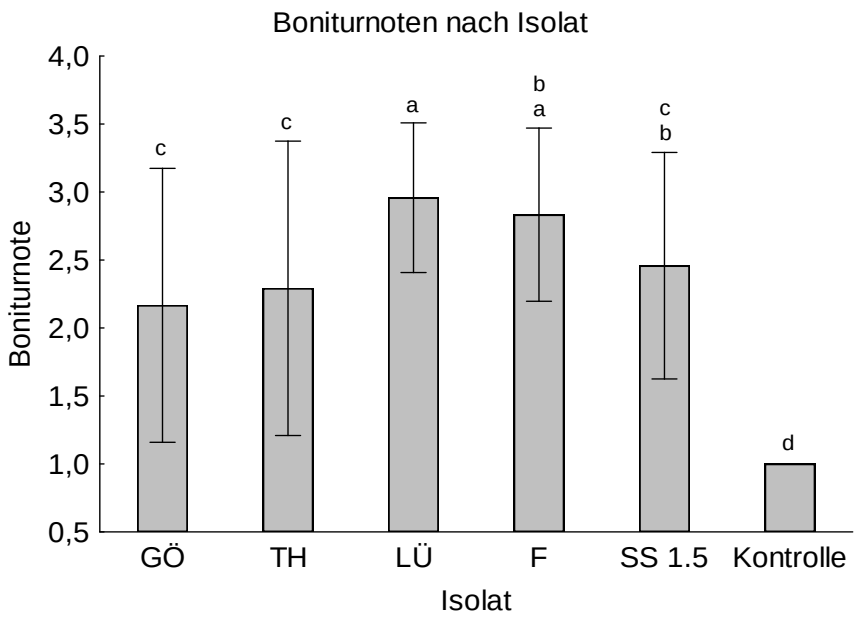


Abb. 27: Durchschnittliche Boniturnoten (1-4) mit Standardabweichungen der fünf eingesetzten *S. sclerotiorum* Isolate (SS GÖ, SS TH, SS LÜ, SS F und SS 1.5) bzw. der Kontrolle über die drei Temperaturvarianten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten (n=24, Fischer-LSD, p≤0,05), (Algermissen 2008).

Getrennt nach Isolaten ließen sich weitere Unterschiede zwischen den Temperaturvarianten erkennen (Abb. 28). Während die Isolate SS LÜ, SS F und SS 1.5 in der Variante mit 15°C signifikant größere Läsionen erzeugten als die Isolate SS GÖ und SS TH, ließ sich in der Variante 20°C kein solcher Unterschied absichern. In der Außentemperaturvariante konnte lediglich das Isolat SS LÜ signifikant von den Isolaten SS GÖ und SS TH abgegrenzt werden. Dies zeigt, dass einzelne Isolate deutliche Unterschiede in ihren Temperaturbedürfnissen aufweisen. Während das Isolat SS LÜ in allen drei Varianten sehr große Läsionen erzeugte, riefen die Isolate SS GÖ und SS TH bei 20°C deutlich größere Läsionen hervor als bei z.B. 15°C. Eine geringfügig reduzierte Boniturnote konnte auch bei dem Isolat SS F in der Außentemperaturvariante im Gegensatz zu den beiden übrigen Varianten beobachtet werden. Das Isolat SS 1.5 dagegen verhielt sich gegensätzlich und rief die größten Läsionen bei kühleren Temperaturen hervor (Algermissen 2008).

Auch in der Befallshäufigkeit ließen sich getrennt nach Isolaten Unterschiede feststellen. Während die Isolate SS GÖ und SS TH vor allem in der 20°C Variante hohe Befallshäufigkeiten erreichten, war dies bei den drei übrigen Isolaten nicht der Fall. Hier ließen sich bei allen Temperaturen vergleichbare Befallshäufigkeiten beobachten (Algermissen 2008).

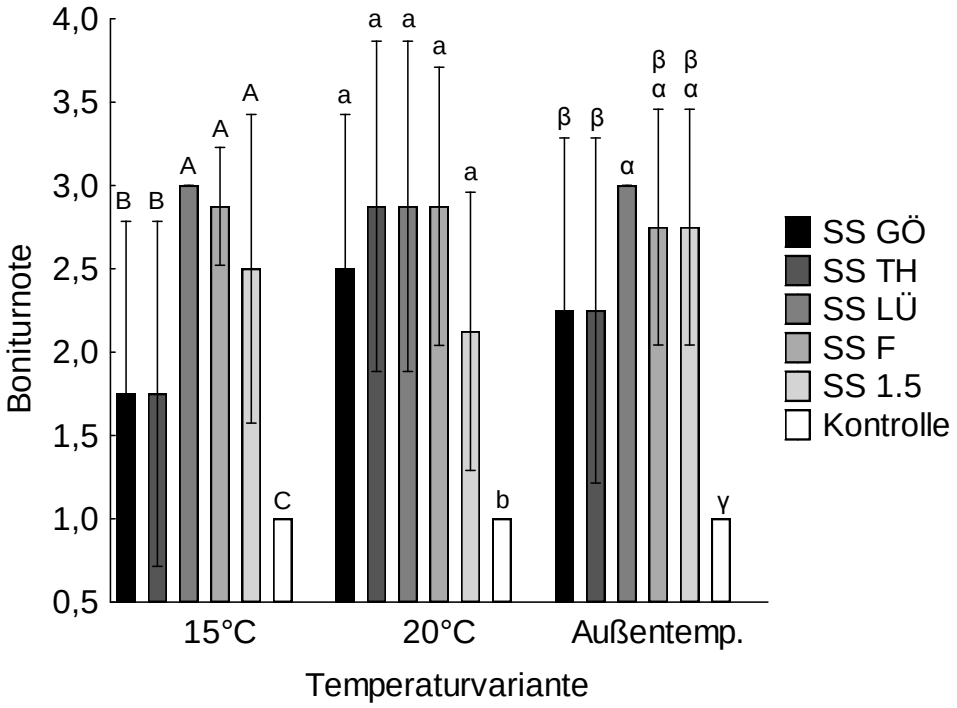


Abb. 28: Durchschnittliche Boniturnoten (1-4) mit Standardabweichungen der fünf eingesetzten *S. sclerotiorum* Isolate (SS GÖ, SS TH, SS LÜ, SS F und SS 1.5) bzw. der Kontrolle in den drei Temperaturvarianten. Unterschiedliche Majuskel, Minuskel oder griechische Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten (n=8, Fischer-LSD, p≤0,05), (Algermissen 2008).

3.6 Pflanzentransformation und Resistenztestung der Transformanten

Aus den 4020 verwendeten Hypokotylsegmenten konnten nach der Transformation und Selektion 59 sprossbildende Kalli regeneriert werden. Aus diesen Kalli ließen sich zum größten Teil Pflanzen regenerieren, die schließlich mittels PCR-Verfahren auf eine erfolgreiche Transformation und die Anwesenheit der inserierten Gene hin getestet werden konnten.

Es ließen sich bei dem Konstrukt TOXDC 20 erfolgreiche Transformationsevents identifizieren und zur Vermehrung nutzen. Bei dem Konstrukt DH10B handelte es sich um 24 Events. Von diesen Linien wurden jeweils zehn anhand der vorhandenen Saatgutmenge ausgewählt und in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass alle eingesetzten Linien der T1 des Konstrukts TOXDC das Genkonstrukt aufwiesen. Bei dem Konstrukt DH10B wiesen neun der zehn eingesetzten Linien das Konstrukt auf, so dass davon ausgegangen werden muss, dass bei einer Linie das Gen nicht stabil ins Genom eingebaut wurde. Der Anteil der transgenen Pflanzen in den einzelnen Linien variierte und ist in Tab. 24 angegeben.

Tab. 24: Mittels PCR ermittelter Anteil transgener Pflanzen [%] der 20 eingesetzten Linien in den Inokulationsversuchen.

	Anteil transgener Pflanzen in Inokulationsversuchen [%]		Anteil transgener Pflanzen in Inokulationsversuchen [%]
TOXDC-2	18,75	DH10B-59	68,75
TOXDC-4	76,47	DH10B-62	58,82
TOXDC-12	82,35	DH10B-67	88,24
TOXDC-14	82,35	DH10B-68	88,24
TOXDC-15	58,82	DH10B-73	81,25
TOXDC-17	64,71	DH10B-77	94,12
TOXDC-22	82,35	DH10B-93	76,47
TOXDC-44	94,12	DH10B-95	64,71
TOXDC-48	70,58	DH10B-97	64,71
TOXDC-54	82,35	DH10B-99	0,00

Der Anteil transgener Pflanzen im Oxalsäuretest betrug allerdings bei den Linien TOXDC-22, TOXDC-44, TOXDC-54, DH10B-67, DH10B-68 und DH10B-77 88,24%; 94,12%; 82,35%; 35,29%; 82,35% und 88,24% und unterschied sich somit deutlich von den in Tab. 24 dargestellten Häufigkeiten.

Durch die Synthese der cDNA aus der extrahierten RNA und einer anschließenden PCR-Untersuchung, um Teile der inserierten Gene nachzuweisen, ließ sich in allen Linien die für die nachfolgenden Gewächshausversuche genutzt wurden, die Expression der inserierten Gene zeigen. Die einzige Ausnahme stellte hierbei die Linie DH10B-99 dar, die das Gen nicht stabil ins Genom eingebaut zu haben scheint.

Da lediglich eine qualitative PCR eingesetzt wurde, kann keine Aussage über die Höhe der Expression in den einzelnen Linien getroffen werden.

Um phänotypische Unterschiede, die durch die Insertion der oben beschriebenen Gene hervorgerufen werden, beobachten zu können wurden 19 der transgenen Linien zusammen mit dem Wildtyp in Gewächshausversuchen eingesetzt. Hierzu wurde, um möglichst schnell einen ersten Eindruck gewinnen zu können, zunächst das Blatt von noch jungen Pflanzen inokuliert und der Durchmesser der sich entwickelnden Läsionen über die Zeit festgehalten, um daraus den AUDPC-Wert zu errechnen. Diese AUDPC-Werte der einzelnen Linien sind in Abb. 29 dargestellt. Die Läsionen an den Blättern waren zu Beginn des Versuchs rundlich. Sobald es dem Pathogen allerdings gelang Leitgefäße zu infizieren, kam es zu einer extrem schnellen Ausbreitung entlang dieses Leitgefäßes. Dies führte zu Läsionen, deren Durchmesser nicht mehr ohne Weiteres genau zu bestimmen waren, so dass hierin u.U. ein Grund für die relativ hohe Streuung der Daten liegt. Zwar sind tendenzielle Unterschiede zu erkennen, diese sind aufgrund der hohen Streuung der Daten allerdings nicht immer signifikant. Außerdem ist zu beachten, dass sich der Wildtyp Drakkar im Mittelfeld der eingesetzten Linien befindet und sich von keiner anderen Linie signifikant unterscheidet. Da ein deutlicher Unterschied zumindest zum Wildtyp zu erwarten wäre, ist zu vermuten, dass es sich bei den übrigen Unterschieden, auch wenn sie sich statistisch absichern ließen um falsch positive Ergebnisse handelt.

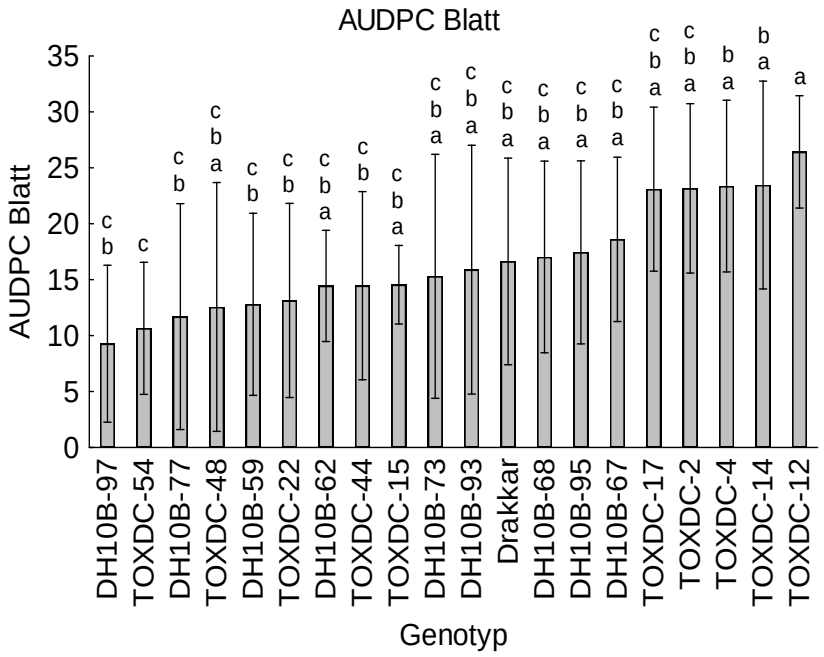


Abb. 29: Durchschnittliche AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Werte nach einer Inokulation am Blatt der im Gewächshausscreening eingesetzten transgenen Linien bzw. des Wildtyps Drakkar mit Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n=2-96, HSD Test für ungleiche n, p≤0,05).

Bei diesem Versuch konnten aufgrund der unterschiedlichen Aufspaltungsverhältnisse in den einzelnen Linien und zum Teil nicht geglückten Inokulationen zwischen 6 und 16 Wiederholungen in die Auswertung mit einbezogen werden. Ausnahmen stellen hierbei die Genotypen TOXDC-2, bei dem lediglich zwei Wiederholungen genutzt werden konnten, und Drakkar, von dem 96 Werte in die Auswertung eingingen. Die hohe Anzahl an Pflanzen des Genotyps Drakkar lässt sich durch die Tatsache erklären, dass sämtliche Pflanzen inokuliert wurden und die nicht transgenen Pflanzen als Kontrolle oder Wildtyp genutzt werden konnten. Die Streuung der Daten ist allerdings trotz der hohen Anzahl an Pflanzen auch beim Genotyp Drakkar vergleichsweise hoch. Um ein anderes Gewebe zu testen und u.U. dennoch schnell erste Ergebnisse zu generieren, wurden im Anschluss an diesen Versuch von den Pflanzen Blattstiele entnommen und diese inokuliert. Auch hierbei wurde wieder die Ausbreitung des Pilzes über die Zeit beobachtet und daraus der AUDPC-Wert errechnet. Die AUDPC-Werte der eingesetzten Linien sind in Abb. 30

dargestellt und zeigen ein ähnliches Bild, wie schon im vorherigen Versuch aufgezeigt. Wiederum lässt sich der Wildtyp Drakkar im Mittelfeld der eingesetzten Linien finden. Bei diesem Versuch konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien beobachtet werden. Auch ein Zusammenhang zwischen den beiden Versuchen ließ sich nicht herstellen (Lineare Regression; $p = 0{,}6745$; $R^2 = 0{,}01$).

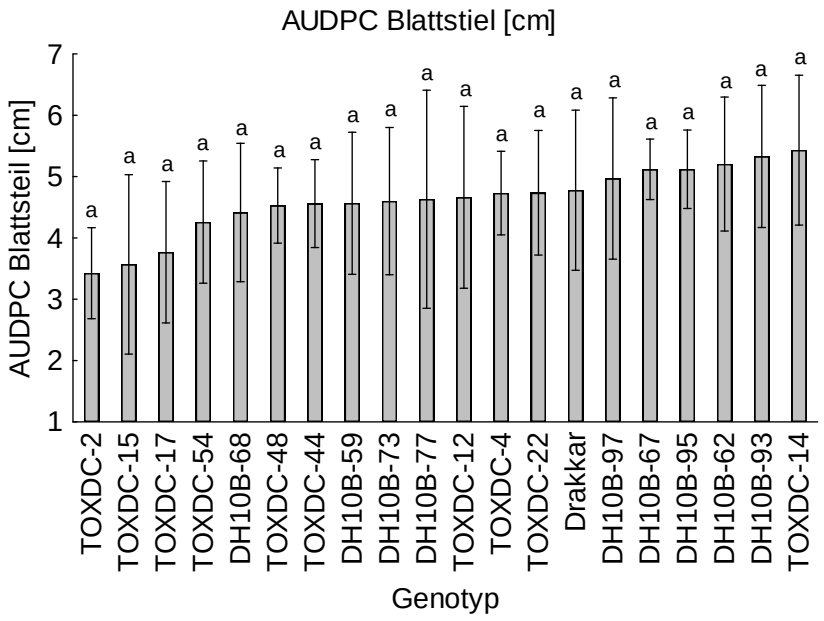


Abb. 30: Durchschnittliche AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Werte nach einer Inokulation des Blattstiels der im Gewächshausscreening eingesetzten transgenen Linien bzw. des Wildtyps Drakkar mit Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n=3-116, HSD Test für ungleiche n, $p \leq 0{,}05$).

Die Anzahl der auswertbaren Wiederholungen lag in diesem Versuch zwischen 8 und 15, was wiederum zum größten Teil an den unterschiedlichen Aufspaltungsverhältnissen der Linien lag. Lediglich bei dem Genotyp TOXDC-2 konnten nur drei Wiederholungen ausgewertet waren. Bei dem Wildtyp Drakkar dagegen konnten 116 Wiederholungen genutzt werden. Schließlich wurde versucht, die ausgewählten Linien analog zu den Gewächshausscreenings am Stängel zu inokulieren und somit die dritte Gewebeart in die Betrachtung mit einzubeziehen. Die

Ausbreitung der Läsion konnte allerdings in diesem Versuchsansatz aufgrund der geringen Pflanzenhöhe nicht über neun Tage, sondern lediglich über einen Zeitraum von sieben Tagen beobachtet werden. Hieraus wurden die AUDPC-Werte errechnet und in Abb. 31 dargestellt. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, befindet sich der Wildtyp im Mittelfeld und lässt sich von keiner anderen Linie signifikant unterscheiden. Zwar gibt es hier wieder signifikante Unterschiede, ähnlich dem Versuch in dem die Blätter inokuliert wurden. Da aber der Wildtyp davon wiederum nicht betroffen ist, könnte es sich hierbei ebenfalls um falsch positive Ergebnisse handeln. Auch zwischen diesem Versuchsansatz und den vorherigen ließ sich mittels einer linearen Regression kein statistisch signifikanter Zusammenhang absichern. Der p-Wert der Regression zwischen diesem und dem Blattinokulationsversuch lag bei 0,439, während der zwischen diesem und dem Blattstielinokulationsversuch bei 0,991 lag.

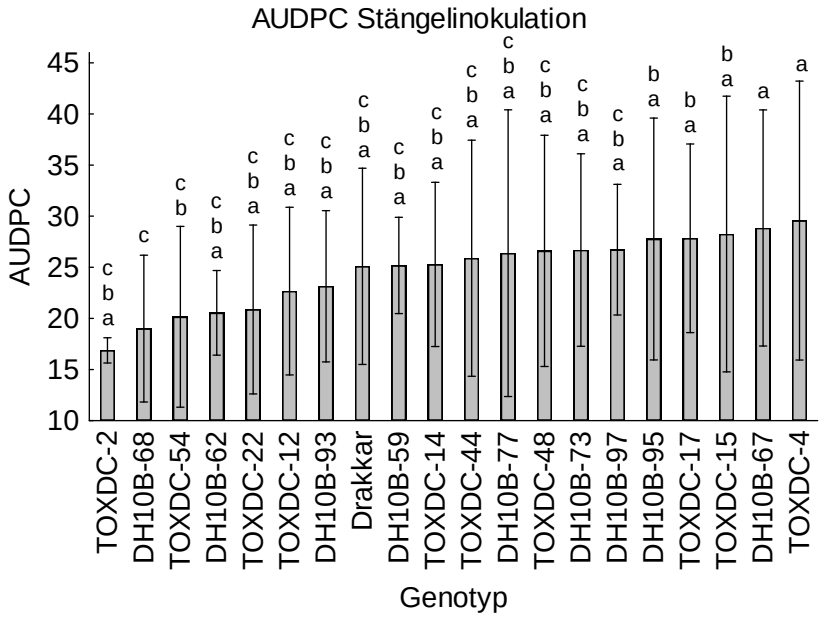


Abb. 31: Durchschnittliche AUDPC (Area under Disease Progress Curve) Werte nach einer Inokulation des Stängels der im Gewächshausscreening eingesetzten transgenen Linien bzw. des Wildtyps Drakkar mit Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n=2-79, HSD Test für ungleiche n, p≤0,05).

Aufgrund der Aufspaltung und der Tatsache, dass einige Pflanzen durch vorherige Inokulationen abstarben, konnten in diesem Versuch zwischen 8 und 16 Wiederholungen genutzt werden. Ausnahmen bildeten die Genotypen Drakkar mit 79 und TOXDC-2 mit lediglich zwei Wiederholungen. Zur Testung von transgenem Pflanzenmaterial im Oxalsäuretest, wurden je Genkonstrukt drei Linien und der Wildtyp auch in diesem Test eingesetzt. Obwohl zu erwarten war, dass die Differenzierung zwischen Wildtyp und transgenen Linien in diesem Test am deutlichsten hervortritt, da hierbei der Einfluss der Oxalsäure ohne Anwesenheit des Pilzes betrachtet wird, ließ sich der Wildtyp Drakkar nicht statistisch von den übrigen Linien differenzieren (Abb. 32). Es konnte kein Einfluss der inserierten Gene auf den Phänotyp nachgewiesen werden.

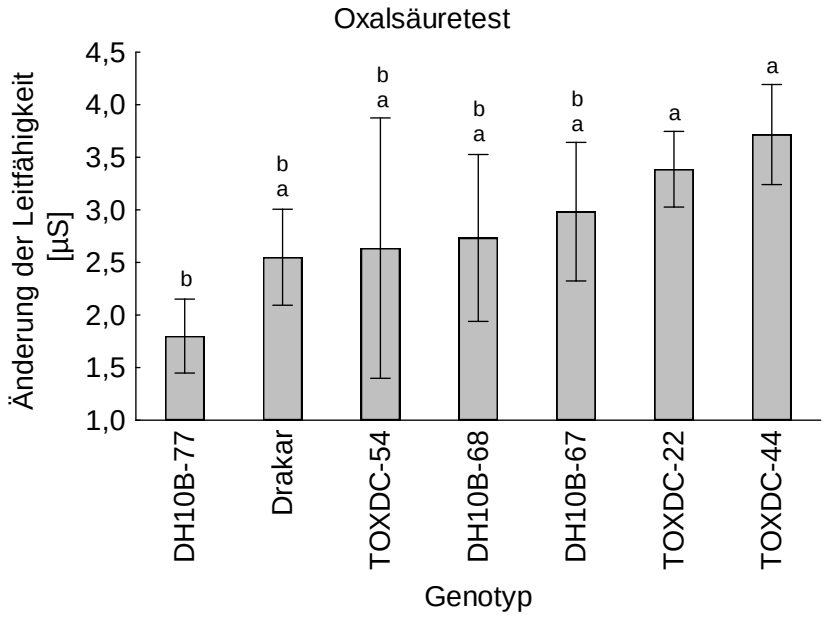


Abb. 32: Änderung der Leitfähigkeit [µS] im bidest. Wasser korrigiert um die Leitfähigkeit zu Versuchsbeginn und die Änderung der Leitfähigkeit in der Kontrollvariante nach einer Inkubation für 2 h in 2mM Oxalsäure der eingesetzten transgenen Linien bzw. des Wildtyps Drakkar mit Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n=5-6, HSD Test für ungleiche n, $p \leq 0,05$).

Da lediglich qualitative Daten zur Genexpression vorliegen und sich kein übereinstimmender Effekt durch die Geninsertion in den phänotypischen Daten erkennen lässt, kann keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen der Veränderung des Genotyps und Phänotyps getroffen werden.

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Screeningmethoden zur Bewertung der Resistenz von Rapssorten oder *Brassica*-Wildarten gegenüber *S. sclerotiorum* entwickelt. Die nachfolgende Diskussion wird zunächst die Feldversuche, dann das Gewächshausscreening und schließlich den Oxalsäuretest näher betrachten. In einem anschließenden Methodenvergleich werden die entwickelten Screeningmethoden kritisch zueinander in Beziehung gesetzt. Weiterführende Ziele dieser Arbeit waren die Betrachtung der Wurzelinfektion und die Erstellung eines resistenten Standards für Gewächshaus- und Laborversuche, so dass in dieser Diskussion auch auf die durchgeführten Arbeiten zur Wurzelinokulation und zur Transformation von Raps zur Erzeugung eines resistenten Standards eingegangen wird.

4.1 Beurteilung der Sklerotinia Resistenz anhand der Feldversuche

Vor allem die Wetterbedingungen sind für eine Infektion der Rapsbestände durch *S. sclerotiorum* entscheidend. Hier sind vorrangig die Temperaturen, aber auch Niederschläge und relative Luftfeuchtigkeit zur Zeit der Blüte von Bedeutung (Koch et al. 2007). In den drei Versuchsjahren bzw. an den drei Versuchsstandorten herrschten z.T. deutlich unterschiedliche Bedingungen, wie in den Abb. 5 bis 10 dargestellt ist.

So können z.B. niedrige relative Luftfeuchtigkeiten zum Zeitpunkt der Blüte, wie sie am Standort Göttingen im Versuchsjahr 2009/10, am Standort Peine in den Versuchsjahren 2008/09 und 2009/10 oder am Standort Poel im Versuchsjahr 2009/10 zu beobachten waren, ein Grund für niedrige Befallshäufigkeiten sein. In drei der vier erwähnten Feldversuche stimmt diese Einschätzung mit den erzielten Ergebnissen überein. Lediglich im Versuchsjahr 2009/10 am Standort Peine ließ sich eine deutlich höhere Befallshäufigkeit beobachten. Allerdings stieg die relative Luftfeuchtigkeit in diesem Feldversuch im Mai auf durchschnittlich 80%, so dass Infektionen zu einem späteren Zeitpunkt stattgefunden haben könnten. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die an diesem Standort gemacht werden konnten, denn die ersten Symptome wurden erst spät entdeckt und hatten kaum einen Einfluss auf den Ertrag.

Laut Koch (2005) wird eine Mindesttemperatur von 7 bis 11°C und eine minimale Luftfeuchtigkeit von 80 bis 86% benötigt, damit der Pilz die Pflanze infizieren kann. Ein weiterer wichtiger Parameter für die Infektion ist die Temperatur, die vor allem im Jahr 2008/09 am Standort Poel niedrig war. Dies könnte ebenso ein Grund für die fehlenden Infektionen darstellen.

Zwar kann die stündliche Temperatur und Luftfeuchtigkeit nicht an den oben dargestellten Grafiken abgelesen werden, aber die Tatsache, dass das Prognosesystem SkleroPro in allen Jahren eine Behandlungsempfehlung herausgab zeigt, dass prinzipiell in allen Versuchen ausreichend infektionsgünstige Stunden vorhanden waren. Auf der anderen Seite sollte bedacht werden, dass SkleroPro im Jahr 2010 bei der Validierung der Ergebnisse zu einer Überschätzung des Befalls in 58% der Fälle neigte (Tschöpe und Kleinhenz 2010). SkleroPro gibt eine Behandlungsempfehlung aus, sobald der zu erwartende Mehrertrag die Kosten durch die Behandlung übersteigt. Folglich sind hierbei wirtschaftliche Schadensschwellen von großer Bedeutung. Für Hybridsorten liegen diese Schadensschwellen zwischen 25 und 13% zu tolerierendem Befall, während sie für Liniensorten von 16 bis 5% Befallshäufigkeit reichen (Dunker und Tiedemann 2004), (Dunker 2006). Diese Befallshäufigkeiten wären auch in den Feldversuchen 2008/09 und 2009/10 am Standort Göttingen, 2008/09 am Standort Peine bzw. 2008/09 und 2009/10 am Standort Poel aufgrund der Behandlungsempfehlung vor allem vor dem Hintergrund der Inokulation der Bestände bzw. der Verseuchung der Flächen durch Sklerotien zu erwarten gewesen. Trotz genauer Bonitur der Befallshäufigkeit bis in das Schotenpaket hinein, ließen sich diese Befallshäufigkeiten allerdings kaum beobachten. Neben den o.g. Einflussfaktoren auf den Infektionserfolg und die Befallshäufigkeiten müssen hier noch weitere nicht erfasste Parameter eine Rolle gespielt haben. Eine mögliche Erklärung wären z.B. Unterschiede in der tatsächlichen Niederschlagsmenge und der von SkleroPro zur Berechnung verwendeten Daten der Wetterstationen. Da sich die Wetterstationen nicht in unmittelbarer Nähe der Versuche befanden, kann es hierbei zu erheblichen Unterschieden gekommen sein.

Bemerkenswert war im Feldversuch 2007/08 am Standort Göttingen, dass der Befall in der inokulierten Variante in vielen Fällen unter dem der nicht behandelten Variante lag. In einigen Fällen ließ sich dieser Unterschied sogar statistisch absichern, so

dass von einem negativen Einfluss der Inokulation auf die Infektion ausgegangen werden muss. Zu erwarten war hier ein deutlich höherer oder zumindest vergleichbarer Befall in der inokulierten Variante. Eine mögliche Erklärung könnte eine induzierte Resistenz darstellen. Unter Umständen wurde durch die scheinbar nicht erfolgreiche Inokulation eine Resistenzreaktion in der Pflanze induziert, so dass natürlich vorkommende Sporen an der Infektion gehindert wurden. Vergleichbare Ergebnisse konnten von Nandini et al. (2010) erzielt werden. Hier wurden Erdnusspflanzen (*Arachis hypogaea* L.) verschiedener Sorten mit Kulturfiltraten bzw. Zellwandbestandteilen von *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) behandelt. Im Anschluss an diese Behandlung wurde die Aktivität verschiedener Enzyme bestimmt und festgestellt, dass die Aktivität von Peroxidasen, aber auch der Phenylalanin-Ammonium-Lyase, β-1,3 Glucanase und der Gehalt an Salicylsäure und Lignin durch die Behandlung mit Kulturfiltraten bzw. Zellwandbestandteilen deutlich erhöht wurde. Es ist bekannt, dass diese Substanzen Pflanzen direkt vor Befall schützen können oder z.B. durch Zellwandverdickungen das Pathogen am Eindringen hindern können (Zhu et al. 1994). Darüberhinaus wurde in der Arbeit von Nandini et al. (2010) die Befallshäufigkeit von *S. rolfsii* im Feld drastisch reduziert. Ein ähnliches Phänomen könnte hier beobachtet worden sein, denn hier wurde der Pilz in Flüssigmedium angezogen, abgesiebt, zerkleinert und auf die Pflanzen ausgebracht. Mit den Myzelfragmenten wurde, da das Myzel nicht gewaschen wurde, auch ein Rest des Kulturfiltrats mit appliziert. Die Zerkleinerung des Myzels kann natürlich u.U. zusätzlich zu einer nennenswerten Menge an Zellwandbestandteilen geführt haben, die dann ausgebracht wurden. Durch diese Elicitoren könnte es zu einer systemisch erworbenen Resistenz in den inokulierten Pflanzen gekommen sein, welche zu einem niedrigeren Befall geführt haben könnte.

Alternativ könnte die vom Pathogen produzierte Oxalsäure für die beobachteten Effekte verantwortlich sein. Oxalsäure kann u.U. auch in den von Nandini et al. (2010) benutzten Kulturfiltraten vorhanden gewesen sein. Ferrar und Walker (1993) konnten zeigen, dass das von ihnen verwendete Isolat von *S. rolfsii* größere Mengen Oxalsäure in das Kulturmedium abgab, als das verwendete *S. sclerotiorum* Isolat. Toal und Jones (1999) haben gezeigt, dass Oxalsäure lokale und systemische Resistenz induzieren kann. Sie haben einzelne Blätter von Rapspflanzen mit unterschiedlichen Oxalsäurekonzentrationen behandelt und diese Blätter, neben weiteren Blättern dieser Pflanzen, mit *S. sclerotiorum* inokuliert. Die

Läsionsausbreitung wurde in dieser Arbeit durch die Oxalsäure an allen untersuchten Blättern reduziert. Auch Oxalsäure, die aus dem Kulturfiltrat stammte und zusammen mit den Myzelfragmenten ausgebracht wurde oder vom Myzel auf den Blättern gebildet wurde, könnte die Resistenzantwort der Pflanzen hervorgerufen haben.

Beide Ansätze könnten die reduzierte Befallshäufigkeit in der inokulierten Variante erklären. Denkbar wäre allerdings ebenso, dass das verwendete Nährmedium einen Einfluss gehabt haben könnte. So könnten sich aufgrund der hohen Zuckerkonzentration in diesem Medium andere Pilze oder Mikroorganismen auf den behandelten Blättern ausgebreitet haben, die die Infektion durch Ascosporen verhindert haben. Sichtbar war ein solcher Pilzbelag auf den behandelten Pflanzen allerdings nicht. Der hohe Zuckergehalt des Mediums könnte durch eine Veränderung des osmotischen Potenzials der Lösung auf den Blättern einen Einfluss ausgeübt haben. So wurde des Öfteren beschrieben, dass Ascosporen von *S. sclerotiorum* in Wasser keimen (Achbani et al. 1996), (Whipps et al. 2002), auf den Blättern befand sich allerdings eine Nährlösung. Zwar ist die Zusammensetzung der Nährlösung in Kapitel 2.2 angegeben, es ist allerdings nicht bekannt, wie lang diese Lösung zum Trocknen auf den Blättern benötigte. Die Auswirkung einer teilweise angetrockneten Nährlösung mit einem höheren Zuckergehalt auf die Infektion kann nicht abgeschätzt werden. Um diesen Effekt weitestgehend auszuschließen, wurde stets in den Abendstunden inokuliert, so dass die Lösung zumindest über Nacht nicht austrocknen konnte. Am darauffolgenden Tag ist dies allerdings geschehen, so dass die Konzentration des Nährmediums nicht mehr genau bestimmt werden kann. Sofern ausreichend Wasser in der Lösung vorhanden war, sollte ein Auskeimen der Ascosporen allerdings möglich sein. So haben z.B. Garg et al. (2010) oder Leone und Tonneijck (1990) ausgekeimte Sporen in einem P_i-Glukose Medium, bestehend aus 62,5 mM KH_2PO_4 und bis zu 5,5 mM Glukose, beobachtet. Die hier verwendete Glukosekonzentration lag allerdings mit 0,1 M deutlich über diesen Werten. Durch ein teilweises Austrocknen dieser Lösung steigt die Konzentration sogar noch weiter, so dass dies ebenfalls einen Grund für die reduzierte Befallshäufigkeit darstellen könnte.

Das beobachtete Resistenzniveau im Versuchsjahr 2007/08 spiegelte die Einstufung nach der Bundessortenliste (Anonymus 2006), (Anonymus 2007), (Anonymus 2009) nur bedingt wieder. Ein Vergleich der in Tab. 1 dargestellten Einstufungen nach der

Bundessortenliste mit den Ergebnissen, die in Tab. 10 dargestellt sind, zeigt allerdings gewisse Parallelen. So lassen sich alle Genotypen, die mit einer fünf eingestuft wurden (moderat anfällig) mit einer Ausnahme unter den zwölf Genotypen finden, die sich durch geringere Befallshäufigkeiten auszeichneten. Die Ausnahme bildet der Genotyp Favorit, der trotz der fünf in der Einstufung der Bundessortenliste (Anonymus 2009) mit 22,7% unwesentlich weniger befallen wurde als Hearty, der mit einer Einstufung von acht laut Bundessortenliste (Anonymus 2007) der anfälligste Genotyp sein sollte. Trotzdem bleibt anzumerken, dass es Unterschiede im Vergleich zur Einstufung der Bundessortenliste gab. So wurde z.B. der Genotyp Olpop trotz einer sechs laut Bundessortenliste (Anonymus 2009) in den hier durchgeführten Versuchen als vergleichsweise resistent eingestuft. Auch andere Genotypen, wie z.B. Mika, der eine hohe Anfälligkeit aufweisen sollte und sich in diesem Feldversuch eher im Mittelfeld wiederfinden ließ, zeigen, dass die Ergebnisse nicht vollständig übereinstimmen. In der Bundessortenliste werden die Genotypen mit einer aus Befallshäufigkeit und Befallsstärke zusammengesetzter Boniturnote versehen. Dies stellt einen gravierenden Unterschied zu der hier vorliegenden Untersuchung dar, denn eine Beurteilung der Befallsstärke fand nicht statt, bzw. war nicht möglich, da die Läsionen während des Boniturzeitraums weiter wuchsen und es somit zu einer Verfälschung der Ergebnisse gekommen wäre. Die beobachteten Unterschiede oder Gemeinsamkeiten ließen sich somit trotz der Unterschiede in der Art der Bonitur darstellen. Zwar lässt sich die Erhebung der Befallsstärke oft durch die Erhebung der Befallshäufigkeit ersetzen, wenn das anfällige Gewebe zum Großteil befallen ist und die Befallsstärke allgemein gering ausfällt (Analytis und Kranz 1972), aber bis heute konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern für *S. sclerotiorum* nachgewiesen werden. Zwar konnten z.B. Ender et al. (2007) eine signifikante Korrelation zwischen der Befallshäufigkeit und dem Befallsstärkeindex herstellen, dies kann u.U. darauf zurückgeführt werden, dass sie mit rekombinanten Inzuchtlinien gearbeitet haben. Hierbei handelt es sich folglich um Genotypen mit einem engen genetischen Hintergrund, was die Ergebnisse beeinflussen kann. Darüberhinaus ist fraglich, ob nicht Resistenzmechanismen im Sortenmaterial vorhanden sind, die diese Beziehung beeinflussen können.

Weitere Vergleiche der eingesetzten Genotypen fallen schwer, da in nur sehr wenigen Veröffentlichungen die oben erwähnten Genotypen genutzt wurden. In der Arbeit von Rewerts (2003) z.B. stimmten lediglich die Genotypen Smart, Talent und

Mohican mit den hier verwendeten überein. Die Ergebnisse zeigten, dass Mohican und Talent in Feldversuchen eine sehr niedrige Befallshäufigkeit aufwiesen, während Smart deutlich häufiger befallen wurde. Dies deckt sich kaum mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, denn Smart und Talent verhielten sich im Feldversuch 2007/08 vollkommen gegensätzlich. Lediglich Mohican zeigte in beiden Untersuchungen ein niedriges Befallsniveau. Zu beachten ist allerdings, dass die Infektionsart in den beiden Arbeiten eine andere war. Während in der hier vorliegenden Arbeit lediglich der natürliche Befall zugelassen wurde, wurden die Pflanzen bei Rewerts (2003) durch den Einstich mit myzelüberwachsenen Zahnstochern in den Stängel inokuliert. Erste Resistenzmechanismen, wie z.B. eine stärkere Kutikula können hierbei nicht mehr zum Einsatz kommen. Folglich können Unterschiede in der Reaktion der Genotypen auch auf der Infektionsart beruhen. Rewerts selbst merkt an, dass die erzielten Befallshäufigkeiten gering waren. Er führt dies auf ungeeignete Witterungsbedingungen zum Zeitpunkt der Inokulation und auf suboptimales Inokulum zurück. Vor allem die Unterschiede in den Witterungsbedingungen aber auch Unterschiede in der Inokulumqualität können die erzielten Ergebnisse stark verzerren, so dass es schwer fällt, eindeutige Aussagen zu treffen.

Ein Teil der eingesetzten Genotypen wurde in den Sortenversuchen der UFOP (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V.) verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche werden durch eine mehrortige Prüfung erzielt, so dass verschiedene Umwelten mit einbezogen werden konnten. Im Versuch aus dem Jahr 2003 (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2004) konnten vier Versuche in die Sklerotinia Bonitur mit einbezogen werden und acht der hier verwendeten Genotypen wurden darin getestet. Es zeigte sich, dass vor allem Mohican wie in den hier beschriebenen Versuchen sehr niedrige Boniturwerte für Sklerotinia aufwies. Toccata befand sich im Mittelfeld aller getesteten Sorten, war allerdings besser als alle anderen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Die Genotypen Talent, Viking, Elektra, Baldur, Mika und Libretto hatten in den UFOP Sortenversuchen allesamt überdurchschnittlich hohe Sklerotinia Boniturnoten. Dies deckt sich mit Ausnahme von Libretto mit den hier erzielten Ergebnissen. Auch hier wiesen die erwähnten Genotypen einen überdurchschnittlichen Befall auf. Im UFOP Sortenversuch 2004 (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2005) konnten sogar zwölf Orte in die Bonitur mit einbezogen werden. Hier zeichnete

sich Mohican durch einen sehr guten Boniturwert aus, während die Genotypen Tenno, Viking, Elektra und Trabant durchschnittliche oder überdurchschnittliche Werte zeigten. All diese Genotypen wiesen im Feldversuch 2007/08 mittlere Befallshäufigkeiten auf und stimmen somit mit den Ergebnissen überein. Oase zeigte ein übereinstimmendes Bild in beiden Versuchen. Während der Genotyp im UFOP Sortenversuch eine sehr gute Boniturnote aufwies, zeigte er im hier durchgeführten Feldversuch eine nur geringe Befallshäufigkeit. Gleiches gilt für den UFOP Sortenversuch 2005 (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2006), hier fiel Oase durch einen niedrigen Boniturwert auf. Die Genotypen Talent, Elektra, Trabant, Bravour und Pacific dagegen wiesen allesamt überdurchschnittliche Werte auf. Dies deckt sich erneut mit den hier erzielten Ergebnissen, denn alle genannten Genotypen ließen sich im besten Fall im Mittelfeld wiederfinden. Vor allem die drei am häufigsten befallenen Genotypen im hier beschriebenem Feldversuch Talent Bravour und Pacific wiesen im UFOP Sortenversuch sehr schlechte Boniturnoten auf. Schlechter war lediglich der Genotyp Elektra, der sich in dem hier beschriebenem Feldversuch jedoch im Mittelfeld wiederfinden lässt. Hier lassen sich Parallelen zum nachfolgendem Sortenversuch der UFOP finden (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2007), in dem neun Orte berücksichtigt werden konnten, denn hier zeigte der Genotyp Talent die höchste Boniturnote auf, während Elektra wiederum relativ schlecht und Oase sehr gut abschnitt. Lediglich die Genotypen Ladoga, Billy und Trabant wiesen in diesem UFOP Versuch keine Differenzierung auf, während sie in dem hier durchgeführten Versuch dies sehr wohl taten. Im UFOP Sortenversuch 2007 (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2008) lässt sich ebenfalls die in dieser Arbeit beobachtete Differenzierung der Genotypen wiederfinden. Die in der vorliegenden Untersuchung als wenig anfällig eingestuften Sorten Oase und Zeppelin zeichnen sich hier durch Boniturnoten unterhalb des Durchschnitts aus, während Sorten wie Elektra, Trabant, Talent oder Favorit in beiden Feldversuchen bzw. Bonituren im besten Fall durchschnittliche Resistenzeigenschaften zeigen. Lediglich vier der hier verwendeten Genotypen lassen sich im UFOP Sortenversuch 2008 finden (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2009). Allerdings stimmen die Ergebnisse wiederum sehr gut überein, denn die Sorten Oase und Zeppelin, die in dem hier durchgeführten Versuch niedrige Befallshäufigkeiten aufwiesen, zeichnen sich im UFOP Sortenversuch ebenso durch niedrige

Boniturnoten aus. Anders verhält es sich mit den Sorten Elektra und Trabant, die in beiden Versuchen mittlere Befallshäufigkeiten bzw. Boniturnoten zeigten. Der UFOP Sortenversuch 2009 zeichnet sich durch allgemein sehr niedrige Boniturnoten aus (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2010). Darüberhinaus unterscheiden sich die in dieser Arbeit eingesetzten Sorten im UFOP Sortenversuch kaum. Daher sind kaum Parallelen zwischen den Untersuchungen der UFOP im Jahr 2009 und den eigenen zu erkennen.

Ein zum Teil vergleichbares Sortiment an Genotypen wurde von Ahlers (2006) verwendet. Zwar wurde hier nicht die Befallshäufigkeit, sondern die Ausbreitung des Pathogens innerhalb der Pflanze beurteilt, aber hier ließ sich ebenso eine Diskrepanz zwischen den erzielten Ergebnissen und der Einstufung der Bundessortenliste erkennen. Im Vergleich der Ergebnisse von Ahlers (2006) und den hier erzielten fällt auf, dass wiederum Oase in beiden Arbeiten als relativ resistent eingestuft wurde, während die Genotypen Titan, Viking, Elektra und Mika in beiden Fällen im Mittelfeld zu finden sind. Talent zeigte in beiden Arbeiten übereinstimmende Ergebnisse und fiel negativ auf. Lediglich der Genotyp Smart zeigte bei einer eher niedrigeren Befallshäufigkeit in der hier durchgeführten Arbeit eine relativ schnelle Ausbreitung des Pathogens bei Ahlers (2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erzielten Ergebnisse, wenn auch nicht vollständig mit der Bundessortenliste identisch sind, so doch einige Parallelen zu anderen Versuchen dargelegt werden konnten. Vor allem die Ergebnisse der UFOP Sortenversuche scheinen hier eine relativ verlässliche Datengrundlage darzustellen, da sie an einer Vielzahl an Orten und über mehrere Jahre hinweg durchgeführt wurden. Sie demonstrieren somit die Reproduzierbarkeit der hier erzielten Ergebnisse.

In den nachfolgenden Feldversuchen wurde zu einem großen Teil von den Züchtern zur Verfügung gestelltes Material verwendet. Da nicht bekannt ist um welche Genotypen es sich bei diesem Material handelt, können keine Vergleiche zu anderen Versuchen angestellt werden. Einzig bei den als Standard ausgewählten Genotypen Toccata, Mohican, Pacific und Lion ist bekannt um welche Sorten es sich handelt. Im Feldversuch 2008/09 am Standort Göttingen zeigten diese vier Genotypen allerdings ein widersprüchliches Ergebnis. Während Toccata und Pacific mit ihrem Resistenzniveau die Ergebnisse des Vorjahres bestätigten, war dies bei Mohican und

Lion nicht der Fall. Welche Faktoren dafür verantwortlich sind lässt sich nicht ohne weiteres sagen. Fest steht, dass der Befall deutlich niedriger war und die Abstufung der Genotypen schlechter. Ein Einfluss der unterschiedlichen Isolate von Sklerotinia, die zum Einsatz kamen kann weitestgehend ausgeschlossen werden. An Sonnenblume wurden Studien zu möglichen Wirt-Parasit Beziehungen durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der Aggressivität der eingesetzten Isolate gab, wobei das Ranking der getesteten Genotypen aber unverändert blieb (Castaño et al. 1991), (Castaño et al. 2001). Erst nach erfolgter Bonitur stellte sich heraus, dass es sich bei dem Genotyp LBN 241/78 um die Sorte Pacific handelte, so dass dieser Genotyp in diesem Feldversuch doppelt getestet wurde. Die Ergebnisse liegen mit einer Befallshäufigkeit von 20,66% für LBN 241/78 und 20,52% für die Sorte Pacific sehr dicht beieinander und zeigen nicht nur, dass der Stichprobenumfang ausreichend hoch gewählt wurde, um die tatsächliche Befallshäufigkeit widerzuspiegeln, sondern demonstrieren darüberhinaus die Güte des Versuchs. Außerdem stellte sich nach der Bonitur heraus, dass es sich bei dem Genotyp NPZ 2 um die Sorte Visby mit einer Einstufung nach Bundessortenliste von 5 (Anonymus 2007) handelt. Im durchgeführten Feldversuch zeigte sich allerdings eine deutlich höhere Anfälligkeit, so dass diese Daten nicht übereinstimmen. Auch die Befallshäufigkeit, die für den Genotyp NPZ 1, bei dem es sich um die Sorte Lorenz handelt, stimmt nur wenig mit anderen Versuchen überein. Zwar wurde diese Sorte in der Bundessortenliste (Anonymus 2007) mit einer sechs eingestuft und somit als eher anfällig kategorisiert, was sich mit den hier erzielten Ergebnissen deckt, allerdings ließ sich diese Sorte in den UFOP Sortenversuchen 2006 (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2007), die immerhin an neun Standorten durchgeführt wurden, eher im Mittelfeld wiederfinden. Die Einstufung der beteiligten Züchterhäuser bzgl. der Anfälligkeit der Genotypen ließ sich in diesem Versuch kaum wiederfinden. Von den fünf als relativ resistent eingestuften Genotypen wiesen nur zwei (LBN 241/78 und NPZ 1) in diesem Versuch hohe Befallshäufigkeiten auf. Auf der anderen Seite zeichneten sich einige der als moderat oder gering anfällig eingestuften Genotypen durch eine mittlere bis hohe Befallshäufigkeit aus.

Die Befallshäufigkeiten, die in der Frühjahrsbonitur beobachtet wurden, stimmen ebenfalls nicht mit den Befallshäufigkeiten zu BBCH 80 überein, was aus der Regression, die in Abb. 14 dargestellt ist, ersichtlich wird. Dies ist zum einen auf die

z.T. extrem hohe Streuung der Daten im Frühjahrsbefall zurückzuführen. Zum anderen aber auch auf Unterschiede im Habitus der Pflanzen. Die Streuung der Daten machten es nahezu unmöglich statistische Unterschiede abzusichern, obwohl der Befall mit bis zu 18% Befallshäufigkeit überraschend hoch war. Abweichungen im Habitus der Pflanzen führten zu einer nicht gleichmäßigen Ausbreitung des Befalls im Bestand. Zeichnete sich eine Sorte durch eher vertikal ausgerichtete Blätter aus, so fiel es dem Pathogen deutlich schwerer Nachbarpflanzen zu befallen. Dieser Befall von Nachbarpflanzen, der für das nesterartige Auftreten der Symptome verantwortlich war, führte zum einen zu der hohen Streuung der Daten, zum anderen aber auch zu einer Verzerrung der Ergebnisse, so dass das Resistenzniveau der Genotypen in den Hintergrund trat.

Ein vergleichbares Symptom lässt sich z.B. bei Sonnenblumen beobachten. Auch hier keimen Sklerotien myzeliogen aus und infizieren Pflanzen direkt (Huang und Dueck 1980), (Huang und Hoes 1980), (Huang 1985), (Adams und Tate 1976), (Masirevic und Gulya 1992). Ein solcher Mechanismus ist ebenso bei Raps vorstellbar, allerdings ist der Radius, in dem das Myzel eines Sklerotiums eine Pflanze infizieren kann, begrenzt. Willetts und Wong (1980) berichten, dass der Pilz nicht in der Lage ist Pflanzen zu infizieren, die sich mehr als 2 cm vom Sklerotium entfernt befinden. Diese Tatsache, zusammen mit der extrem hohen Sklerotiendichte in den oberen Bodenschichten in den hier durchgeführten Feldversuchen, erklärt das beobachtete Phänomen der Frühjahrsinfektion. Holley und Nelson (1986) zeigten einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen Inokulumdichte und Befallshäufigkeit an Sonnenblume. Da hier der gleiche Infektionsweg vorhanden ist, zeigt dies eindrucksvoll den Einfluss der hohen Sklerotiendichte auf den Frühjahrsbefall in den hier durchgeführten Versuchen.

Die Feldversuche im Versuchsjahr 2008/09 am Standort Peine und Poel zeichneten sich durch extrem niedrige Befallshäufigkeiten aus, so dass auf eine Diskussion der Ergebnisse verzichtet wird.

Der Feldversuch 2009/10 am Standort Göttingen wies ebenfalls einen relativ geringen Befall auf. Hier ist die Differenzierung der Sorten nur gering. Aus diesem Grund fällt die Einstufung der als Standard gewählten Genotypen schwer. Zwar war der Befall von Mohican nur gering, dagegen befanden sich sowohl Pacific wie auch Toccata eher im Mittelfeld. Der hohe Befall von Lion wird ebenso durch die geringe

Differenzierung von nur 6,6% zwischen Lion und Mohican überschattet. In diesem Versuch wurden sechs von den beteiligten Züchtern als hoch anfällig eingestufte Genotypen verwendet. Die Einstufung der Züchter bzgl. der Resistenz der Genotypen stimmte bei diesen sechs Genotypen bei KWS-SCL-1, NPZ1, SRG 2009/03 und SYN Sclero1 mit den erzielten Ergebnissen überein. Dagegen war dies bei den Genotypen DSV 4-09 und NIC06-1346CB nicht der Fall. Auch bei den als moderat anfällig eingestuften Genotypen lassen sich einzelne mit hohen Befallshäufigkeiten finden. Noch niedriger stellt sich der Befall im Frühjahr dieses Jahres dar, so dass abschließend gesagt werden muss, dass eine Bewertung der eingesetzten Genotypen auf Basis dieser Ergebnisse nicht möglich ist. Der Frühjahrsbefall in diesem Feldversuch war feststellbar, lag allerdings auf einem extrem niedrigen Niveau. Aus diesem Grund war es nicht möglich einen signifikanten Zusammenhang zwischen diesen beiden Befallsarten herzustellen.

Anders sah es dagegen im Feldversuch 2009/10 am Standort Peine aus. Hier war die Befallshäufigkeit allgemein höher, allerdings wurde kein Frühjahrsbefall beobachtet. Die als Standard ausgewählten Genotypen wiesen allerdings alle eine Befallshäufigkeit im mittleren Bereich auf. Eine deutliche Differenzierung war zwischen ihnen, auch wenn Mohican wiederum den niedrigsten Befall dieser vier Genotypen und Lion den höchsten Befall aufwies, kaum erkennbar. Pacific und Toccata zeigten keine klare Tendenz. In allen Versuchen zeigt Mohican immer eine niedrige Befallshäufigkeit. So war dies im Feldversuch 2007/08, 2009/10 an den Standorten Göttingen und Peine aber auch in der Arbeit von Rewerts (2003) oder in den UFOP Sortenversuchen (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2004), (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP) 2005) der Fall. Dieses sehr konsistente Ergebnis konnte im Feldversuch 2008/09 am Standort Göttingen nicht gezeigt werden. Dies zeigt, dass in diesem Versuch die Befallshäufigkeit allgemein zu niedrig war um deutliche Aussagen treffen zu können.

Im Feldversuch 2009/10 am Standort Peine wurden wiederum sechs von den Züchtern als hoch anfällig beschriebene Genotypen verwendet, die sich allerdings nicht alle durch eine hohe Befallshäufigkeit auszeichneten. Während vier dieser sechs Genotypen vergleichsweise hohe Werte zeigten und einer im Mittelfeld lag, zeigte der Genotyp DSV4-09, wie schon am Standort Göttingen zu beobachten war, eine sehr niedrige Befallshäufigkeit. Die Einstufung des Züchters sollte also

hinterfragt werden. Die beiden einzigen Genotypen dieses Feldversuchs über die zusätzliche Informationen verfügbar waren, waren die Genotypen NPZ1 und NPZ2. Während es sich bei NPZ1 um die Sorte Lorenz handelte, die eine Einstufung nach Bundessortenliste (Anonymus 2007) von sechs erhielt, handelte es sich bei NPZ2 um die Sorte Visby mit der Einstufung von fünf. Die erzielten Ergebnisse stimmen bei diesen beiden Genotypen mit den Angaben der Bundessortenliste überein, denn NPZ1 zeigte eine deutlich höhere Befallshäufigkeit als NPZ2. Über die übrigen Genotypen lässt sich lediglich sagen, dass eine verhältnismäßig gute Differenzierung zu beobachten war, auch wenn die Einstufung der Züchter als moderat anfällig nicht in allen Fällen bestätigt werden konnte.

In diesem Jahr ließ sich kein nennenswerter Befall von *S. sclerotiorum* am Standort Poel beobachten, so dass die Diskussion dieses Standorts entfällt.

Mit Ausnahme des Feldversuchs 2007/08 am Standort Göttingen und 2008/09 und 2009/10 am Standort Poel wurde in jedem Versuch eine Ertragserfassung durchgeführt. Dank dieser Ertragserfassung und der Behandlung mit Cantus als Standard in jeweils einer Subparzelle konnte der Ertragsverlust für die eingesetzten Sorten bestimmt werden. Die Behandlung mit Cantus führte in allen Fällen zu einer extrem niedrigen Befallshäufigkeit, so dass von einer zeitlich gut abgestimmten Blütenspritzung ausgegangen werden kann. Es ließen sich zwar Unterschiede im Ertrag zwischen den inokulierten und der mit Cantus behandelten Subparzellen feststellen, diese ließen sich aber nur selten mit der Befallshäufigkeit korrelieren (siehe Abb. 15 und 18). Lediglich im Feldversuch 2008/09 am Standort Göttingen konnte eine schwache Korrelation zwischen der Befallshäufigkeit und dem Ertragsverlust hergestellt werden (siehe Abb. 13). Dies liegt zum einen an der verhältnismäßig großen Streuung der Daten beider Parameter, zum anderen aber auch daran, dass die Versuchsflächen für eine Ertragsbestimmung relativ klein waren. Eine engere Korrelation der beiden Parameter wäre zu erwarten gewesen, konnte aber u.U. auch aufgrund der niedrigen Befallswerte nicht abgesichert werden.

In anderen Arbeiten konnten sehr wohl Zusammenhänge zwischen der Befallshäufigkeit und dem Ertragsverlust hergestellt werden. Hier ist zum einen die Arbeit von Dunker (2006) zu nennen, in der je 1% Befallshäufigkeit ein Ertragsverlust von 0,35% für Hybridsorten und 0,4% für Liniensorten beschrieben wird. Die unterschiedliche Reaktion der Sortentypen kann in der hier vorliegenden Arbeit keine

Berücksichtigung finden, da der Sortentyp der Genotypen nicht bekannt ist. Unterschiedliche Reaktionen auf einen Befall erklären allerdings zumindest zum Teil die nicht signifikanten Korrelationen in dieser Arbeit. Bei Dunker (2006) konnte ebenso gezeigt werden, dass die Ertragswirkung einer Infektion vom Zeitpunkt derselben abhängt. Auch der Zeitpunkt der Infektion kann in der hier vorliegenden Arbeit für die meisten Feldversuche nicht genau benannt werden. Lediglich für den Feldversuch 2009/10 am Standort Peine ist bekannt, dass die ersten Symptome sehr spät auftraten, was erklärt, warum sich trotz des relativ hohen Befalls keine eindeutige Wirkung auf den Ertrag zeigte. Auch Kirkegaard et al. (2006) konnten eine deutliche Reduktion des Ertrags durch eine Infektion durch Sklerotinia feststellen. Hier lag der Verlust mit 1,3% je 1% Befallshäufigkeit allerdings deutlich höher als bei Dunker (2006) und zeigt somit den Einfluss klimatischer und anbautechnischer Faktoren deutlich. Einen niedrigeren Ertragsverlust von 0,57% je 1% Befallshäufigkeit wurde von del Rio et al. (2007) beschrieben. Interessant an dieser Arbeit ist, dass sich kein Zusammenhang zwischen der Befallshäufigkeit und dem Ertrag herstellen ließ, wenn der Befall unter 25% lag. Ein Befall von mehr als 25% konnte in der hier vorliegenden Arbeit allerdings nur in dem Feldversuch 2007/08 am Standort Göttingen, in dem keine Ertragserfassung durchgeführt werden konnte, und im Feldversuch 2009/10 am Standort Peine, bei dem die Infektion allerdings sehr spät stattfand, erreicht werden. Folglich ist es nicht verwunderlich, dass sich keine hoch signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Ertrag und der Befallshäufigkeit herstellen ließen. Ertragsverluste werden u.U. bei niedrigen Befallshäufigkeiten durch das hohe Kompensationsvermögen des Rapses ausgeglichen, so dass eine gewisse Befallshäufigkeit vorhanden sein muss, um signifikante Zusammenhänge herstellen zu können. Ebenso können andere Kulturpflanzen einen niedrigen Befall z.T. kompensieren. Für Bohnen (*Phaseolus vulgaris* L.) ist sogar beschrieben, dass Ertragsverluste erst ab 30 bis 40% Befallshäufigkeit nachweisbar sind (Kerr et al. 1978).

Unterschiedliche Auswirkungen des Befalls auf den Ertrag verschiedener Sorten konnten von Dunker (2006) anhand von Untersuchungen mit Linien- und Hybrid-Sorten gezeigt werden. Zwischen verschiedenen Liniensorten konnten zwar bereits Unterschiede im Befallsniveau und somit der Anfälligkeit demonstriert werden, die Reduktion des Ertrags befand sich allerdings auf einem einheitlichen Niveau (Pope

et al. 1989). Hoffman et al. (1998) ermittelten bei Sojabohnen allerdings unterschiedliche Reaktionen verschiedener Sorten auf den Ertrag.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die fehlenden oder nur schwachen Korrelationen zwischen dem Ertragsverlust und dem Unterschied in der Befallshäufigkeit in dieser Arbeit, welche in den Abb. 13, 15 und 18 dargestellt sind, auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden kann. Neben dem Einfluss der unterschiedlichen Reaktionen der beiden Sortentypen in diesen Versuchen auf den Ertragsverlust, dem Zeitpunkt der Infektion, der in der hier vorliegenden Arbeit weder gesteuert noch erfasst wurde, und Ungenauigkeiten vor allem in der Erfassung der Erntemenge aufgrund kleiner Parzellen, ist hier besonders das niedrige Befallsniveau zu nennen. Die Versuche in denen der Befall höher war, so dass ein Zusammenhang hätte abgesichert werden können, eigneten sich aufgrund des Hagelereignisses am Standort Göttingen in 2008 bzw. aufgrund des sehr späten Befalls am Standort Peine im Jahr 2010 nicht zur Erstellung aussagekräftiger Zusammenhänge. Der einzige signifikante Zusammenhang konnte im Versuch 2008/09 am Standort Göttingen hergestellt werden. Hier lässt sich an der Gleichung der Regressiongerade ablesen, dass je 1% Befall der Ertragsverlust um 0,19% zunahm. Dies deckt sich kaum mit den Angaben aus der Literatur, welche im Allgemeinen deutlich höher liegen. Die oben genannten Einflussfaktoren spielen auch hier eine entscheidende Rolle. Interessant ist allerdings, dass sich dieser Zusammenhang signifikant absichern ließ, auch wenn der Befall deutlich unter den von del Rio et al. (2007) beschriebenen 25% lag. Als letzter Einflussfaktor kann hier auch die Art der Bonitur in der vorliegenden Arbeit genannt werden. Um Aussagen über die Resistenzeigenschaften der Genotypen treffen zu können, wurde jede Läsion erfasst. Läsionen, die im Schotenpaket zu finden sind, haben einen wesentlich geringeren Einfluss auf den Ertrag der Pflanze als Läsionen am Stängel. Es ist fraglich in wie weit auch Läsionen an den Schoten in anderen Arbeiten mit in die Betrachtung einbezogen wurden.

Um fundierte Aussagen über die Wirkung des Befalls auf den Ertrag treffen zu können sollten weitere Versuche durchgeführt werden, in denen zum einen ein deutlich höheres Befallsniveau erzielt werden müsste, aber auch die Sortentypen getrennt betrachtet werden müssten. Auch sollten größere Parzellen für eine Ertragserfassung angelegt werden, die darüberhinaus im Kerndruschverfahren beerntet werden sollten um Randeffekte weiter zu reduzieren.

Auch wenn der Befall in allen Feldversuchen, in denen künstlich Sklerotien ausgebracht wurden als eher gering einzustufen ist, so kann nicht von einer fehlgeschlagenen Inokulation oder Verseuchung der Flächen gesprochen werden. Ein Indiz für den Erfolg der Verseuchung der Versuchsfläche stellt ein weiterer Feldversuch dar, der nur ca. 700 m vom Feldversuch 2009/10 am Standort Göttingen entfernt lag, und somit vergleichbaren Bedingungen unterlag. In diesem Feldversuch wurde ebenfalls auf eine Blütenspritzung verzichtet und die Befallshäufigkeit analog zu den hier beschriebenen Versuchen erhoben. Es zeigte sich, dass die Befallshäufigkeit in diesem Versuch im Mittel unter 3% lag (Winter 2011). Dies stellt eine geringere Befallshäufigkeit als in dem hier beschriebenem Versuch dar, welche bei durchschnittlich 6,9% lag, so dass von einer, wenn auch sehr geringen Erhöhung des Befallsniveaus gesprochen werden kann.

Gugel und Morrall (1986) zeigten einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen der Anzahl an gekeimten Sklerotien je m² und der Befallshäufigkeit. Hierbei wurde die höchste Befallshäufigkeit von ca. 75% bei sechs Sklerotien je m² erreicht, so dass von einer ausreichend starken Verseuchung der Flächen in der hier vorliegenden Arbeit ausgegangen werden kann.

Als zusätzliche Bonitur wurde in den Feldversuchen 2007/08 und 2009/10 am Standort Göttingen eine Bonitur der Stoppeln durchgeführt. In beiden Fällen zeigte die Stoppelbonitur höhere Befallshäufigkeiten als die Bonitur der Ganzpflanze zu BBCH 80. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Stoppelbonitur zu einem deutlich späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde. Durch die zusätzliche dem Pathogen zur Verfügung stehende Zeit konnten sich auch sehr kleine Läsionen entwickeln und nach der Ernte erfasst werden. Die in den Abb. 11 und 17 dargestellten Regressionsgeraden verdeutlichen allerdings, dass es Unterschiede zwischen den beiden Versuchsjahren und zwischen den Varianten im Versuchsjahr 2007/08 gab. Die Steigung der Geradengleichung unterscheidet sich in den drei Regressionen, so dass es zu Unterschieden in der Einschätzung des Befalls kommt. Trotzdem konnten signifikante Zusammenhänge zwischen den beiden Boniturformen hergestellt werde. Es kann davon ausgegangen werden, dass beide Formen zu einer reproduzierbaren Einschätzung des Befalls genutzt werden können.

Zu bedenken ist bei der Stoppelbonitur allerdings, dass sie mit gewissen Unsicherheiten verbunden ist. Das Versuchsjahr 2008/09, in dem es zu einer

stärkeren Lagerbildung kam und folglich die Pflanzen sehr nah an der Bodenoberfläche abgeerntet werden mussten, demonstriert z.B., dass die Stoppelbonitur nicht in jedem Jahr durchgeführt werden kann bzw. verlässliche Ergebnisse liefert. Außerdem sollte bedacht werden, dass Unterschiede in der Länge der Stoppeln das Ergebnis zusätzlich beeinflussen können.

Um die Befallshäufigkeit weiter zu erhöhen, wären weitere Maßnahmen wie z. B. die Erhöhung der Bestandesdichte zu nennen (Burdon und Chilvers 1982), (Twengström et al. 1998). Durch eine Erhöhung der Bestandesdichte könnte zum einen das in den Parzellen herrschende Mikroklima beeinflusst werden, zum anderen könnte aber auch die Infektion benachbarter Pflanzen erleichtert werden. Jurke und Fernando (2008) zeigten z.B. einen positiven Zusammenhang zwischen Bestandesdichte und Befallshäufigkeit. Eine weitere Maßnahme zur Beeinflussung des Mikroklimas wäre die Bewässerung der Versuche. Twengström et al. (1998), Weiss et al. (1980) und Abawi und Grogan (1974) beschreiben die Luftfeuchtigkeit als den wichtigsten Parameter für die Entwicklung des Pathogens an Bohnen. Durch eine Bewässerung hätte diese erhöht werden können und somit die Infektion, aber auch die Apothecienentwicklung (Wu und Subbarao 2008) gesteigert werden können. Auch Grau (1984) konnte eine Erhöhung des Befalls durch eine Erhöhung der Bestandesdichte und Bewässerung des Bestands zum Zeitpunkt der Blüte zeigen. Nicht eindeutig waren dagegen die Ergebnisse von Nelson et al. (1989). Hier konnte zwar ein Einfluss der Bestandes- und Inokulumdichte gezeigt werden, höhere Bestandesdichten führten aber nicht immer zu einem höheren Befall. Eine Erhöhung der Luftfeuchtigkeit hätte ebenso durch eine Folienabdeckung erreicht werden können. Allerdings führte dies u.U. zu einer Erhöhung der Temperatur und einer Verminderung der Ausbreitung von Ascosporen durch eine Reduktion des Winds.

Eine weitere Abänderung in der Versuchsanlage könnte eine andere Inokulationsmethode darstellen. Hier ist nicht nur die von Rewerts (2003) oder Grison et al. (1996) verwendete Zahnstochermethode denkbar, sondern auch eine einfache Veränderung des im Feldversuch 2007/08 verwendeten Nährmediums. So verwendeten z.B. Weiss et al. (1980) lediglich eine mit Dextrose angereicherte Myzelsuspension. Die erwähnte Zahnstochermethode hätte allerdings den Nachteil, frühe Resistenzreaktionen der Pflanze zu umgehen. So wird z.B. die Kutikula durchstochen und kann keinen Einfluss mehr auf die Resistenzreaktion nehmen.

Wunden spielen bei der Infektion durch *S. sclerotiorum* eine wichtige Rolle. Allerdings muss hierbei die Art der Wunde berücksichtigt werden. Während Schnittverletzungen keinen großen Einfluss zu haben scheinen, erleichtert eine Quetschung, wie sie auch beim Einstich eines Zahnstochers vorkommt, es dem Pathogen erheblich das Gewebe zu infizieren (Hudyncia et al. 2000).

Vuong et al. (2004) beschreiben eine Inokulationsmethode, bei der durch das Ausbringen von myzelüberwachsenen Sorghumkörnern inokuliert wird. Auf diese Weise würden die Pflanzen nicht verletzt und dem Pathogen stünden mehr Nährstoffe zur Verfügung, die zur Infektion genutzt werden könnten. Ein weiterer Vorteil dieser Methode wäre, dass keine Nährlösung verwendet werden müsste, die im Anschluss an die Inokulation austrocknen kann. Nicht zuletzt ist die Infektion durch Ascosporen zu nennen. In Feldversuchen wurde diese Methode z.B. von Yue et al. (2008) zur Infektion von Sonnenblumen erfolgreich genutzt. Die Produktion ausreichender Mengen an Ascosporen erwies sich allerdings als nicht praktikabel. Darüberhinaus zeigte die Inokulation mittels Sporen bei Rewerts (2003) keinen Erfolg, so dass von dieser Methode Abstand genommen wurde.

Nach der Durchführung der Feldversuche am Standort Poel stellte sich heraus, dass auf den verwendeten Versuchsflächen regelmäßig das biologische Fungizid Contans®WG angewendet wurde. Dieses Fungizid besteht aus Sporen des Pilzes *Coniothyrium minitans*, dessen antagonistische Wirkung gegenüber *S. sclerotiorum* bereits des Öfteren demonstriert werden konnte (Bennett et al. 2005), (Jones und Whipps 2002), (Gerlagh et al. 1996), (Gerlagh et al. 1999), (Teo et al. 1992), (Trutmann et al. 1980). *C. minitans* parasitiert die im Boden vorkommenden Sklerotien und verhindert auf diese Weise eine Infektion des Rapses sowohl durch Ascosporen, wie auch durch eine myzeliogene Keimung der Sklerotien. Für die Effizienz dieses Antagonisten ist neben der Bodenfeuchtigkeit vor allem die Temperatur von entscheidender Bedeutung. Huang und Erickson (2008) konnten z.B. eine deutlich höhere Parasitierungsrate unter höheren Temperaturen beobachten. Tu (1997) berichtet, dass vor allem Sklerotien, die sich dicht an der Bodenoberfläche oder darauf befinden, durch wiederholte Befeuchtung und Austrocknen Risse in der Rinde entwickeln könnten, die sie anfälliger gegenüber Antagonisten machen. Durch die in diesen Feldversuchen gewählte Ausbringung der Sklerotien, ohne anschließende Einarbeitung in den Boden, trifft dies auf nahezu alle

ausgebrachten Sklerotien zu. Der Einsatz dieses biologischen Bekämpfungsmittels zusammen mit den auf der Insel Poel vorherrschenden maritimen Klimabedingungen, wie sie in den beiden Versuchsjahren beobachtet werden konnten und der Tatsache, dass sich der Großteil der Sklerotien nahe der Erdoberfläche befand, erklären das Ausbleiben einer Infektion am Standort Poel. Folglich ist es nicht weiter verwunderlich, dass hier weder eine Frühjahrsinfektion, noch Apothecien oder eine Infektion zum Zeitpunkt der Blüte beobachtet werden konnte. Somit muss dieser Versuchsstandort für die durchgeführten Untersuchungen als ungeeignet angesehen werden. Durch die Wahl eines anderen Versuchsstandorts hätte eine höhere Befallshäufigkeit erzielt werden können.

4.2 Beurteilung der Sklerotinia Resistenz anhand des Screenings im Gewächshaus

In den beiden Gewächshausscreenings wurde ein großes Spektrum an Genotypen getestet. Ziel hierbei war es, die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Pathogens innerhalb der Pflanze zu bestimmen. Diese Ausbreitungsgeschwindigkeit kann einen großen Einfluss auf den entstehenden Pflanzenschaden haben, weshalb sie zur Beurteilung der Resistenz wichtig ist. Im ersten Gewächshausscreening wurden vor allem die von den Züchtern zur Verfügung gestellten Genotypen eingesetzt. Zusätzlich wurden die als Standard ausgewählten Sorten aus dem Feldversuch 2007/08 und einige chinesische Genotypen verwendet. Über die von den Züchtern zur Verfügung gestellten Genotypen ist nur wenig bekannt. Allerdings lässt sich anhand der in Tab. 17 dargestellten Daten erkennen, dass die von den Züchtern als hoch anfällig klassifizierten Genotypen sich in diesem Versuch nicht durchgehend als anfällig erwiesen. Zwar gibt es einzelne Genotypen mit sehr hohen AUDPC-Werten wie z.B. KWS-SCL-1 oder SRG2009/03, allerdings zeigten andere als anfällig eingestufte Genotypen wie NPZ1 oder SYN Sclero1 sehr niedrige AUDPC-Werte. Auch die vier als Standard ausgewählten Genotypen liegen sehr dicht beieinander und lassen sich mittels dieses Versuchs nicht differenzieren. Dies ist bemerkenswert, da zumindest einige dieser Genotypen in den oben erwähnten Versuchen sehr konsistente Ergebnisse lieferten. Das beste Beispiel hierfür stellt der Genotyp Mohican dar, der in fast allen Feldversuchen sehr positiv auffiel, hier allerdings nicht.

Nach der Durchführung des Versuchs wurde bekannt, dass es sich bei den beiden Genotypen NPZ2 und WVB2 um die Sorte Visby handelte. Der Genotyp wurde also doppelt getestet und zeigte AUDPC-Werte, die zwar nicht identisch, aber doch dicht zusammen lagen. Statistisch ließ sich kein Unterschied zwischen ihnen feststellen. Außerdem wurde in diesem Versuch die Sorte Pacific unwissentlich zwei Mal verwendet, da es sich bei dem Genotyp LBN241/78 um eben diese Sorte handelte. Die AUDPC-Werte der Genotypen Pacific und LBN241/78 liegen sogar sehr dicht beieinander und demonstrieren damit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Güte des Versuchs.

Von den hier verwendeten Genotypen wurde der Genotyp Mohican schon von Rewerts (2003) verwendet. In dieser Arbeit zeichnete sich Mohican in Gewächshausversuchen nach einer Inokulation mittels Zahnstocher durch eine niedrige Befallshäufigkeit, wie sie hier im Feld beobachtet wurde, aber ein schnelles Wachstum der Läsionen aus. Dies deckt sich mit der nicht wiedergefundenen geringen Anfälligkeit von Mohican in diesem Gewächshausscreening. Lion dagegen zeigte in von Rewerts (2003) durchgeführten Feldversuchen eine hohe Befallshäufigkeit, was aber nicht mit der Befallsstärke übereinstimmte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl bei Rewerts (2003) wie auch in dieser Studie die Einstufung der Genotypen nach Bundessortenliste, soweit sie bekannt ist, nicht wiedergefunden werden kann. Dies zeigte ebenfalls Ahlers (2006) anhand von einem analog zu dem hier beschriebenen Gewächshausscreening durchgeführten Versuch. In dieser Arbeit wurden vier der hier verwendeten chinesischen Genotypen getestet. Aus beiden Arbeiten geht hervor, dass sich diese Genotypen durch niedrige AUDPC-Werte auszeichnen. Lediglich das Ranking der chinesischen Genotypen stimmt nicht überein. Während bei Ahlers (2006) vor allem You You 5 positiv auffällt, liegt dieser in der hier vorliegenden Arbeit zwar im Bereich niedriger AUDPC-Werte, allerdings ist der AUDPC-Wert deutlich höher als der von den Genotypen Wan You 14, Wan You 19 und Tianhe You1. Allgemein kann von einem höheren Resistenzniveau in chinesischen Genotypen ausgegangen werden. So zeigten Zhao et al. (2004), dass vor allem chinesische Genotypen unter Gewächshausbedingungen eine hohe Resistenz aufweisen. Sie schließen sogar aus ihren Ergebnissen, dass die resistentesten Genotypen, zu denen vor allem die chinesischen zählten, eine vollständige Resistenz aufwiesen. Während in dieser Arbeit chinesisches Material im Allgemeinen sehr gute Ergebnisse lieferte, wird vor

allem den Genotypen Zhongshuang 9 und Zhongyou 821 eine sehr hohe Resistenz nachgesagt. Bei dem Genotyp Zhongyou 821 handelt es sich um eine Sorte, die sich schon seit längerer Zeit in China eine große Anbaufläche einnimmt. So wurden ca. 25 bis 35% der gesamten Rapsanbaufläche in den späten 80igern und frühen 90igern mit dieser Sorte bestellt (Li et al. 1999), obwohl es sich um eine erucasäure- und glukosinolathaltige Sorte handelt. Als Grund hierfür wird vor allem die gute Resistenz gegenüber Sklerotinia genannt. Zhongshuang 9 dagegen ist eine 00-Sorte mit höherer Resistenz gegenüber Sklerotinia. In Feldversuchen konnte gezeigt werden, dass dieser Genotyp deutlich kleinere Läsionen als Zhongyou 821 ausbildete (Wang et al. 1999). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, denn auch hier zeigten beide Genotypen sehr kleine Läsionen im Gewächshausscreening. In der Arbeit von Wang et al. (1999) wird allerdings nicht von erzielten Befallshäufigkeiten gesprochen, so dass dieser Parameter nicht weiter betrachtet werden kann. Allerdings wird berichtet, dass einige Enzyme, die an Resistenzreaktionen beteiligt sein können, nach einer Infektion im Vergleich zu anderen Genotypen erhöht waren. Hier sind neben der Phenylalaninammoniumlyase auch eine Exo-Chitinase, β-1,3-Glucanase, Peroxidase und Polyphenoloxidase zu nennen. Dies deutet auf eine Reaktion der Pflanze nach einer erfolgten Infektion hin und nicht auf eine Abwehr der Infektion. Li et al. (2007) berichten, dass der Genotyp Zhongyou 821 ein mittleres Resistenzniveau aufwies. Nach einer Inokulation mittels Agarplugs oder Myzelsuspension konnte hier nur ein intermediäres Resistenzniveau im Vergleich zu den übrigen Genotypen, bei denen es sich um allerdings nicht nur um *B. napus*, sondern auch um *B. juncea* handelte, gefunden werden. Allerdings lag die Befallshäufigkeit in diesen Versuchen für den Genotyp Zhongyou 821 eher niedrig.

Fei et al. (2004) berichten von kleineren Läsionen am Genotyp Wanyou14 im Vergleich zum Genotyp Zhongyou821 nach einer Inokulation durch Zahnstocher. Dies deckt sich ebenfalls mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, denn hier zeigte Wanyou14 nach einer ähnlichen Inokulation die geringsten AUDPC-Werte.

Noch interessantere Ergebnisse lieferte das zweite Gewächshausscreening, in dem neben wilden *Brassica*-Arten auch Resynthesen eingesetzt wurden, um einen breiteren genetischen Hintergrund zu untersuchen und weitere Resistenzquellen zu identifizieren. Zum einen zeigte sich hier wiederum eine gute Differenzierung der

eingesetzten Genotypen. Zum anderen fiel aber auf, dass sich die verwendeten Genotypen hier in zwei Gruppen einteilen ließen. Die erste Gruppe zeichnete sich durch niedrige AUDPC-Werte aus und es ließ sich lediglich eine Resynthese in dieser Gruppe wiederfinden. Die zweite Gruppe dagegen wies einen deutlich stärkeren Anstieg der AUDPC-Werte auf, so dass von einer höheren Anfälligkeit gesprochen werden kann. In diesem Versuch führte nicht jede Inokulation zu einer Läsion, so dass erneut inokuliert werden musste. Aus der Anzahl der Inokulationen, die benötigt wurde um eine Läsion hervorzubringen, ließ sich eine Inokulationseffizienz ermitteln, die wiederum deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen aufwies. Die beiden Gruppen können auch hier identifiziert werden, so dass nicht nur von Unterschieden in der Ausbreitungsgeschwindigkeit des Pathogens, sondern von unterschiedlichen Abwehrreaktionen der Pflanze schon vor der Infektion bzw. präformierten Resistenzfaktoren wie z.B. Unterschiede in der Wachsschicht ausgegangen werden muss. Auffällig ist, dass die erste Gruppe, die sich durch niedrige AUDPC-Werte auszeichnete, eine tendenziell höhere Inokulationseffizienz aufwies. Dies stärkt die Hypothese der unterschiedlichen Resistenzmechanismen, wobei in vielen Genotypen nur ein solcher Mechanismus zu finden ist, der dann entweder die Ausbreitung oder die Infektion beeinflusst.

Pflanzen, die von dem betreffendem Pathogen infiziert werden, haben mehrere Möglichkeiten dem entgegenzuwirken. Eine Möglichkeit wäre die Infektion allgemein zu verhindern. Eine solche vollständige Resistenz wurde allerdings im Fall von *S. sclerotiorum* bis jetzt noch nicht beschrieben. Es ist anzunehmen, dass mehrere äußere Faktoren, wie z.B. die Qualität und Menge der zur Verfügung stehenden Nährstoffe vor der Infektion, hier einen Einfluss haben können. In der hier vorliegenden Arbeit konnten einige Infektionen von den Pflanzen abgewehrt werden, so dass von einem solchen Resistenzmechanismus auch hier ausgegangen werden kann. Da aber bei einer erneuten Inokulation dennoch Läsionen zu beobachten waren, müssen hierbei auch weitere Faktoren eine Rolle spielen, so dass die Abwehr der Pflanzen überwunden werden kann. Dies zeigt, dass dieser auf den ersten Blick sehr zuverlässig erscheinende Mechanismus bei einem hohen Befallsdruck und günstigen Bedingungen nicht zielführend sein kann. Auch wenn die Mehrzahl der Infektionen abgewehrt wird, so reicht eine erfolgreiche Infektion aus, um die Pflanze abzutöten. Bei den Wilden *Brassica*-Arten wurde dagegen ein anderer Mechanismus beobachtet. Hier wurde die Infektion selbst nicht beeinträchtigt, die

Ausbreitungsgeschwindigkeit innerhalb der Pflanze aber sehr wohl. Dieser Mechanismus scheint weniger anfällig für z.B. einen hohen Befallsdruck zu sein, denn durch die Reduktion der Ausbreitung kann das Pathogen nicht so starke Schäden hervorrufen. Auch äußere Faktoren, wie die zur Infektion zur Verfügung stehenden Nährstoffe, spielen hierbei eine untergeordnete Rolle. Die Pflanze lässt also die Infektion selbst zu und reduziert die Ausbreitungsgeschwindigkeit, so dass auch unter wechselnden Umweltbedingungen sichergestellt ist, dass zumindest einige wenige Samen ausgebildet werden können. Dies unterscheidet sich vom oben erwähntem Mechanismus, bei dem die Pflanze u.U. bereits zum Zeitpunkt der Blüte abgetötet wird. Es ist nicht überraschend, dass ein solcher Mechanismus vor allem bei den Wildarten gefunden wurde, denn das Überleben zumindest einiger weniger Nachkommen ist die Voraussetzung dafür, dass die Gene der Pflanze an die nächste Generation weitergegeben werden können. Es handelt sich hierbei also um einen evolutionären Vorteil, der das Überleben der Art sichert. Im Sortenmaterial wurde ein solcher Mechanismus, sofern er einmal vorhanden war, wahrscheinlich durch die Selektion entfernt. Wenn der Züchter die Resistenz beurteilen und verbessern will, so stand ihm bis jetzt hierfür lediglich der Feldversuch zur Verfügung. Hier kann meist nur die Befallshäufigkeit ermittelt werden, so dass Genotypen, die die Infektion zulassen aber die Ausbreitung reduzieren bei der Selektion auf resistente Genotypen eliminiert werden.

Bei dem Versuch diese beiden Parameter in Beziehung zu setzen ergab sich eine negative Korrelation. Anhand der Lage der einzelnen Datenpunkte in dieser Korrelationsanalyse ließen sich drei Gruppen identifizieren, die sich durch entweder niedrige AUDPC-Werte und hohe Inokulationseffizienzen, mittlere AUDPC-Werte und niedrige Inokulationseffizienzen oder hohe AUDPC-Werte und hohe Inokulationseffizienzen charakterisieren lassen. In diesen Gruppen lassen sich zum Teil Unterschiede in der Art der Genotypen erkennen. So finden sich in der ersten Gruppe fast nur *Brassica* Wildarten, allerdings kaum *B. oleracea* ssp.. Die zweite und dritte Gruppe besteht zu etwa gleichen Teilen aus Wildarten und Resynthesen. Bei den Wildarten handelt es sich fast ausschließlich um *B. oleracea* ssp. und *Erucastrum* sp., wobei sich letztere ausschließlich in der dritten Gruppe finden lassen. Scheinbar lässt sich vor allem in den verwendeten *B. oleracea* ssp. und *Erucastrum* sp. keine Ausbreitungsresistenz gegen das Pathogen finden. Wurden *B. oleracea* ssp. zur Erstellung der Resynthesen genutzt, so führte das in den hier

verwendeten Genotypen nicht nur zu hohen AUDPC-Werten, sondern auch zu höheren Inokulationseffizienzen, denn all diese Resynthesen lassen sich in der dritten Gruppe finden.

Auffallend war, dass sich keine Ausbreitungsresistenz in den verwendeten *Erucastrum* sp. finden ließ, obwohl es sich hierbei um eine resistente Art handeln soll (Pedras und Ahiahonu 2004), (Seguin-Swartz und Lefol 1999). Allerdings scheint es hier Unterschiede zwischen einzelnen Genotypen zu geben, denn Seguin-Swartz und Lefol (1999) konnten durch die Herstellung von Inzuchtlinien anfällige und resistente Genotypen identifizieren, die im Anschluss zu Kreuzungsexperimenten genutzt werden konnten. Eine höhere Anzahl von *Erucastrum* sp. hätte in den hier durchgeführten Experimenten verwendet werden müssen, um resistente Genotypen in dieser Art zu finden.

Boland und Hall (1994) berichten von über 400 Spezies, die von Sklerotinia befallen werden können. Sie berichten hier von 48 *Brassica*-Arten, was allerdings nur wenig über die Stärke des Befalls aussagt. Um diese beurteilen zu können, wurden von Kim und Cho (2003) verschiedene *Brassica*-Kulturarten näher untersucht. Die Befallshäufigkeit wurde im kommerziellen Anbau ausgezählt und festgestellt, dass *B. oleracea* L. var. *capitata* L. (Brokkoli) eine Befallshäufigkeit von bis zu 30% aufwies. Geringer war die Befallshäufigkeit in *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olss. (Chinakohl) und *B. napus* L.. Bei *B. oleracea* L. var. *botrytis* L. (Blumenkohl) und *B. oleracea* L. var. *acephala* DC (Grünkohl). lag die Befallshäufigkeit mit nur 1 bis 2% extrem niedrig. Auch wenn nicht die gleichen Bedingungen in den verschiedenen Anbauformen herrschten, kann anhand dieser Daten ein Unterschied zwischen den *Brassica*-Arten festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich zum Teil mit den hier gefundenen Effekten, denn in dieser Untersuchung ließen sich ebenso *B. oleracea* ssp. finden, die sich durch hohe oder niedrige Inokulationseffizienzen auszeichneten und somit die Variabilität in diesem Material wiederspiegeln.

Sedun et al. (1989) zeigten, wie die hier vorliegende Arbeit, Unterschiede in der Läsionsentwicklung verschiedener *Brassica*-Arten. Im Gegensatz zu den vorgestellten Ergebnissen konnten allerdings keine Genotypen identifiziert werden, die ein deutlich geringeres Läsionswachstum aufwiesen als die verwendeten Rapsgenotypen. Trotzdem wurden Kreuzungen durchgeführt, die zeigten, dass durch

die Verwendung von als anfällig oder resistent eingestuftem Material eine Veränderung im Läsionswachstum der Nachkommen hervorgerufen werden kann. Sie schlussfolgern, dass die Verwendung interessanter Wildarten in der Züchtung eine mögliche Strategie zur Verbesserung der Resistenz von Raps gegenüber *S. sclerotiorum* darstellt.

Mei et al. (2010) verwendeten zum Teil die gleichen *Brassica*-Wildarten, wie sie auch in der hier dargestellten Studie untersucht wurden. Sie konnten ebenfalls große Unterschiede in der Reaktion der Wildarten auf das Pathogen feststellen. Zwar stimmen nicht alle Ergebnisse mit den hier erzielten überein, aber es kann gesagt werden, dass deutliche Analogien zwischen den beiden Arbeiten zu finden sind. In beiden Arbeiten wurden vor allem Wildarten wie z.B. *B. incana, B. insularis, B. villosa* aber auch *B. montana* als sehr resistent beschrieben. Arten die in der hier vorliegenden Arbeit keine Berücksichtigung fanden, wie z.B. *Brassica carinata, Brassica nigra, Brassica juncea* oder *Brassica rapa* zeigten eine deutlich höhere Anfälligkeit. Unterschiede zu den eigenen Ergebnissen ließen sich allerdings bei einzelnen Genotypen finden. Hier ist u. a. der Genotyp *B. insularis* mit der Akzessionsnummer K9338 zu nennen. Während dieser Genotyp einen sehr hohen AUDPC-Wert aufwies und eine eher mittlere Inokulationseffizienz zeigte, zeichnet er sich in der Arbeit von Mei et al. (2010) durch vergleichsweise kleine Läsionen aus. Andere Genotypen, die in beiden Arbeiten genutzt wurden, wie z.B. *B. insularis* mit der Akzessionsnummer K8934, *B. incana* mit der Akzessionsnummer BRA 1262 oder CGN18471 oder der Genotyp *B. montana* mit der Akzessionsnummer BRA1644 zeigten dagegen in beiden Experimenten vergleichbare Läsionsentwicklungen. Unterschiede zwischen den beiden Arbeiten lassen sich durch klimatische Einflüsse, verschiedene Inokulationsmethoden, Unterschiede zwischen den verwendeten Isolaten oder nicht homogenes Saatgut, wie es in der hier vorliegenden Arbeit z.B. beim Genotyp *B. cretica* der Fall war, erklären.

Die in der vorliegenden Studie beobachteten unterschiedlichen Inokulationseffizienzen der wilden *Brassica*-Arten könnten eine Erklärung für z. T. nicht übereinstimmende Ergebnisse in der Arbeit von Mei et al. (2010) darstellen. Die von Mei et al. (2010) beobachteten Läsionslängen könnten durch nicht erfolgreiche Inokulationen verzerrt worden sein. Ein Beispiel, an dem sich dieser Zusammenhang demonstrieren lässt, stellt der Genotyp *B. insularis* mit der Akzessionsnummer K9338

dar. Hier konnte eine Inokulationseffizienz von 78% beobachtet werden. Ein Fünftel aller Inokulationen führte also zu keiner Läsion, was im Mittel zu einer deutlichen Unterschätzung der Läsionsentwicklung führen kann. Dennoch stimmen die Kernaussagen der beiden Arbeiten überein und auch Mei et al. (2010) schlussfolgern, dass wilde *Brassica*-Arten ein enormes genetisches Potential zur Verbesserung der Resistenz in Raps darstellen.

Ein gravierender Unterschied zwischen den verwendeten Wildarten könnte der Glukosinolatgehalt des Gewebes sein. So konnten Zhao und Meng (2003) einen Zusammenhang zwischen dem Glukosinolatgehalt der Samen und der Resistenz gegenüber Sklerotinia nachweisen, indem sie QTLs in Raps identifizierten, die für beide Eigenschaften als verantwortlich angesehen werden. Glukosinolate können eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Pathogenen haben (Mithen et al. 1986), (Mayton et al. 1996), (Mithen et al. 1987), (Mithen 1992). Neben der oben genannten Arbeit konnten auch Fan et al. (2008) oder Rahmanpour et al. (2009) eine hemmende Wirkung von Glukosinolaten auf das Wachstum von *S. sclerotiorum* nachweisen. Das Pathogen scheint allerdings in der Lage zu sein, sich zu adaptieren und somit seine Pathogenität zurückzuerlangen.

Unter anderem Heaney und Fenwick (1980) konnten große Unterschiede im Glukosinolatgehalt verschiedener *Brassica*-Arten nachweisen. Bezogen auf die hier verwendeten wilden *Brassica*-Arten lassen sich Unterschiede feststellen. So konnten Mithen et al. (1987) die Glukosinolatgehalte der Arten *B. oleracea, B. montana*, *B. incana*, *B. drepanensis*, *B. insularis* und *B. cretica* bestimmen. Es zeigten sich im Gesamtglukosinolatgehalt der Arten aber auch in Populationen einer Art extrem große Unterschiede. Der Gesamtglukosinolatgehalt in *B. oleracea* lag z.B. zwischen 0,47 µmol/g Frischmasse in einer *B. oleracea* var. *botrytis* Art und 9,08 µmol/g Frischmasse in einer *B. oleracea*. Besonders in den Arten *B. incana* und *B. insularis* ließen sich Populationen mit sehr hohen Glukosinolatgehalten finden. Auch die einzelnen Glukosinolatspektren unterschieden sich. Während in *B. oleracea, B. montana* und *B. incana* vor allem Gluconapin vorherrschte, war dies bei *B. drepanensis* vor allem Glucoiberverin und bei *B. insularis* Progoitrin.

Die Rolle von Glukosinolaten konnte an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* demonstriert werden. Gene, die mit der Bildung von Glukosinolaten assoziiert sind, wurden nach der Infektion verstärkt exprimiert. Darüberhinaus konnte die

antimikrobielle Wirkung von aliphatischen Glukosinolaten abgeleiteten Isothiocyanaten *in vitro* demonstriert werden (Stotz et al. 2011). Eine Induktion der Glukosinolatsynthese konnte ebenso in Raps beschrieben werden. Durch eine Infektion mit Sklerotinia stieg vor allem in einem als resistent eingestuften chinesischen Genotyp der Gehalt an Indolyl-Glukosinolaten und 2-Phenylethylglukosinolaten lokal und systemisch deutlich an. Dieser Anstieg war bei einer zweiten Inokulation mit einer gesteigerten Resistenz der Pflanze verbunden (Li et al. 1999). Ob Glukosinolate allerdings als verlässlicher Indikator für eine Resistenz genutzt werden können, ist zu überprüfen. Zu beachten ist hierbei unter anderem, dass sich der Glukosinolatgehalt im Gewebe und damit die Reaktion auf das Pathogen während des Tages verändert (Rosa et al. 1994), so dass zunächst wichtige Glukosinolate und ihre Gehalte zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft werden müssten. Dreizehn der hier verwendeten wilden *Brassica*-Arten wurden von Rudloff (2010) auf ihren Blattglukosinolatgehalt hin untersucht. Ein signifikanter Zusammenhang konnte allerdings zwischen den in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten AUDPC-Werten oder den Inokulationseffizienzen und den Gesamtglukosinolatgehalten bzw. den 12 nachgewiesenen Glukosinolaten in der Arbeit von Rudloff (2010) nicht hergestellt werden. Es muss also von weiteren Faktoren ausgegangen werden, die die Resistenzeigenschaften der Wildarten bestimmen. Zu bedenken ist hierbei, dass sich die Glukosinolatspektren in den Blättern z.T. deutlich von denen in Stängeln unterscheiden können. Wichtiger als der Blattglukosinolatgehalt könnte also hierbei der Stängelglukosinolatgehalt sein. Auch eine Reaktion der Pflanze, wie z.B. eine gesteigerte Glukosinolatsynthese nach einer Infektion, wie es von Li et al. (1999) beschrieben wurde, ist denkbar und kann nicht anhand der Glukosinolatgehalte gesunder Pflanzen, wie sie in der Arbeit von Rudloff (2010) verwendet wurden, abgeleitet werden.

Ein Parameter der auch in dieser Arbeit festgehalten wurde und einen signifikanten Zusammenhang zur Läsionslängenentwicklung zeigte, war der Trockengewichtsanteil der Stängel. Dieser höhere Trockengewichtsanteil ist u.U. auf einen höheren Ligningehalt des Gewebes zurückzuführen. Lignin wurde schon von Peltier et al. (2009) als wichtiger Parameter zur Einschätzung der Resistenz gegenüber *S. sclerotiorum* an Sojabohnen beschrieben. Allerdings konnte in dieser Arbeit mit zunehmendem Stängelligningehalt eine höhere Anfälligkeit der Genotypen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte durch einen transgenen Ansatz der

Ligningehalt im resistenten Rapsgenotyp Zhongshuang 9 erhöht werden, was zu einer höheren Resistenz führte (Yang et al. 2007). Vom ebenfalls als resistent eingestuften Genotyp Zhongyou 821 wird berichtet, dass er sich durch festere Stängel auszeichnet, was auf den Ligningehalt zurückzuführen sein könnte (Fei et al. 2004). Diese Ergebnisse sind überraschend, da es sich bei *S. sclerotiorum* um einen Oxalsäure produzierenden Pilz handelt (Marciano et al. 1989) und Oxalsäure in vielen holzabbauenden Pilzen eine wichtige Rolle im Ligninstoffwechsel spielt (Shimada et al. 1997), (Mäkelä et al. 2002). Hier sind eine Vielzahl von Mechanismen vorhanden, von denen neben der Chelatiesierung unstabiler Mn^{3+} Ionen und der zur Verfügung Stellung von H_2O_2 vor allem die Reduktion des pH-Werts außerhalb der Hyphen von Bedeutung ist (Mäkelä et al. 2002). Allerdings sind für *S. sclerotiorum* keine ligninabbauenden Enzyme bekannt (Peltier et al. 2009). Darüberhinaus konnte keine Ligninabbau oder -modifikation durch den Pilz beschrieben werden (Peltier et al. 2004), so dass es fraglich ist, ob Sklerotinia derartige Enzyme produzieren kann. Lignin wäre ein einfach zu bestimmender Parameter und somit für Zuchtprogramme einsetzbar. Allerdings muss bedacht werden, dass in der hier vorliegenden Arbeit eine relativ große Variabilität in den AUDPC-Werten bei einem Trockengewichtsanteil von weniger als 30% festgestellt wurde. Erst bei höheren Trockengewichtsanteilen von 35 bis 50% sinken die AUDPC-Werte drastisch. Solche hohen Trockengewichtsanteile sind in Raps nur schwer zu realisieren, so dass dies nur ein Baustein in der Resistenzzüchtung sein kann.

Die vorgestellten Untersuchungen zeigten weiterhin, dass der Stängeldurchmesser ebenfalls negativ mit dem AUDPC-Wert korreliert war. Vergleichbare Ergebnisse konnten von Porter et al. (2009) beobachtet werden. Bei Li et al. (2006) wurde allerdings kein einfach negativer linearer Zusammenhang, sondern ein quadratischer Zusammenhang gefunden. Dies bedeutet, dass es ein Optimum für den Stängeldurchmesser gibt, bei dem die Läsionsausbreitung am geringsten ist. Daher könnte dies ein weiterer Ansatzpunkt für eine erfolgreiche Resistenzzüchtung sein. Bei höheren Stängeldurchmessern steht dem Pathogen bei gleicher Läsionslänge mehr Gewebe zur Kolonisation zur Verfügung, was einen negativen Zusammenhang dieser beiden Parameter erklären könnte.

Das bemerkenswerteste Ergebnis des zweiten Gewächshausscreenings ist die negative Korrelation zwischen den AUDPC-Werten und der Inokulationseffizienz.

Dies deutet auf unterschiedliche Resistenzmechanismen hin. Während in einigen der wilden *Brassica*-Arten eine quantitative physiologische Resistenz vorhanden ist, die die Ausbreitung des Pathogens innerhalb der Pflanze reduziert, scheint es in einigen Rapsgenotypen Mechanismen zu geben, die die Infektion selbst beeinflussen oder verhindern können. Dieser zweite Mechanismus konnte vor allem in den beiden verwendeten Rapssorten, aber auch in den Resynthesen beobachtet werden. Die in der Abb. 20 dargestellte Gruppenbildung zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen. Negative Korrelationen zwischen der Läsionsausbreitung und der Befallshäufigkeit konnten schon in anderen Arbeiten beobachtet werden. Auclair et al. (2004) beschreiben z.B. eine solche negative Korrelation zwischen der Ausbreitung der Läsionen und der Befallshäufigkeit an Sojabohnen. Allerdings wurden diese Parameter in Gewächshaus- und Feldversuchen erhoben, so dass die Autoren neben unterschiedlichen Resistenzmechanismen, zusätzlich divergierende klimatische Bedingungen bzw. unterschiedliche Isolate des Pathogens als Erklärung heranzogen. Da verschiedene Isolate im Allgemeinen Unterschiede in der Aggressivität aufweisen, es allerdings nicht zu Unterschieden im Ranking der eingesetzten Genotypen kommt (Castaño et al. 1991), (Castaño et al. 2001), kann diese Erklärung weitestgehend ausgeschlossen werden. Auch Wegulo et al. (1998) oder Chun et al. (1987) konnten die beschriebenen negativen Korrelationen bei Sojabohnen beobachten. Bei Wegulo et al. (1998) traten sie vor allem zwischen der Befallshäufigkeit im Feld und der Läsionsausbreitung nach einer Inokulation des Stängels mittels myzelüberwachsener Agarplugs (ähnlich der hier angewandten Inokulationsmethodik) auf. In beiden Arbeiten wurden die Unterschiede wiederum auf unterschiedliche klimatische Bedingungen oder Unterschiede im Pflanzenmaterial zurückgeführt.

In anderen Studien konnten oft nur schwache Korrelationen zwischen der Befallshäufigkeit und der Läsionsentwicklung beobachtet werden (Vuong et al. 2004). Dies deutet u.U. auf unterschiedliche Resistenzmechanismen hin, die allerdings aufgrund zu geringer Unterschiede im verwendeten Material nicht eindeutig belegt werden konnten. In der Arbeit von Vuong et al. (2004) konnten nicht nur Genotypen von Sojabohnen gefunden werden, die sich durch hohe Befallshäufigkeiten und geringe Läsionsgrößen auszeichneten, sondern auch Genotypen von Sonnenblumen, was daraufhin deutet, dass das beobachtete Phänomen ebenso in anderen Pflanzenarten zu finden ist.

Keine der oben genannten Arbeiten haben die Unterschiede in Befallshäufigkeit und Ausbreitungsgeschwindigkeit an einem so stark differenzierenden Material untersucht. Folglich konnten keine so starken Abweichungen wie in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Die Nutzung dieser quantitativen physiologischen Resistenz in der Züchtung ist vielversprechend und bis heute nicht geschehen. Solange die Resistenz der Genotypen nur in Feldversuchen beurteilt wird, fällt eine Bewertung der Ausbreitungsgeschwindigkeit schwer. Dies ist wahrscheinlich der Grund, warum dieser Resistenzmechanismus bis jetzt keine Beachtung fand. Dass die ausschließliche Nutzung der Befallshäufigkeit als Resistenzparameter nicht die gewünschten Erfolge brachte, kann u.U. dadurch erklärt werden, dass auch wenige Infektionen bei günstigen klimatischen Bedingungen zu einer raschen Ausbreitung des Pathogens innerhalb der Pflanze und somit zu starken Pflanzen- und Ertragsverlusten führen. Erst die Kombination dieses Resistenzmechanismus mit der quantitativen physiologischen Resistenz, wie sie in einigen der wilden *Brassica*-Arten zu finden ist, kann zu einer Reduktion der Ertragsverluste durch ein erhöhtes Resistenzniveau führen. Folglich sollte ein Gewächshausscreening zur Beurteilung dieses Resistenzmechanismus in die Zuchtprogramme mit einbezogen werden.

Zwar konnten signifikante Zusammenhänge zwischen der Temperatur und den AUDPC-Werten hergestellt werden, allerdings sind die R_s-Werte stets sehr gering (Tab. 19). Dies bedeutet, dass nur ein sehr geringer Anteil der beobachteten Variation durch Temperaturunterschiede zu erklären ist. Beachtet werden sollte bei diesen Korrelationen die extrem hohe Anzahl an Datenpunkten, die zu ihrer Erstellung genutzt wurde. Durch eine starke Erhöhung der Anzahl an Datenpunkten lassen sich Korrelationen deutlich leichter statistisch absichern, was auch hier der Fall gewesen sein könnte. Es lässt sich kaum erklären, dass sowohl steigende Tagesmaximumtemperaturen oder Tagesdurchschnittstemperaturen, wie auch Tagesminimumtemperaturen zu einer Reduktion der AUDPC-Werte führen. In Literaturangaben lässt sich ebenfalls kein negativer Effekt von Temperaturen bis zu 27°C oder 28°C finden. Erst ab Temperaturen ab ca. 30°C können negative Auswirkungen auf die Läsionsentwicklung ermittelt werden (Heran et al. 1999), (Young et al. 2004), (Harikrishnan und del Río 2006), (Kora et al. 2003), (Hannusch und Boland 1996). Solche hohen Temperaturen wurden allerdings nicht zur Inokulation genutzt, so dass ein negativer Einfluss der Temperatur ausgeschlossen

werden kann. Darüberhinaus sind die Temperaturen im Gewächshaus im Tagesverlauf nicht konstant, so dass, selbst wenn kurzzeitig Temperaturen von 30°C erreicht werden, die Temperatur wieder abfällt und zumindest in den Abend- oder Nachtstunden eine Infektion möglich ist. Außerdem muss bedacht werden, dass die Temperatur im Pflanzenbestand, durch die Transpiration der Pflanzen bedingt, niedriger liegt als im übrigen Gewächshaus, wo die Temperatur festgehalten wurde.

Andere klimatische Einflüsse, wie z.B. die Luftfeuchtigkeit, wurden zwar nicht aufgezeichnet und könnten einen Einfluss auf die Läsionsentwicklung haben (Harikrishnan und del Río 2006), wurden allerdings während des gesamten Versuchszeitraums, nicht zuletzt durch die Bewässerung der Pflanzen, konstant hoch gehalten. Nicht absolut konstant konnte dagegen die Lichtintensität gehalten werden. Peltier und Grau (2008) konnten zeigen, dass es eine optimale Lichtintensität für die Ausbreitung der Läsionen und die Differenzierung der Genotypen gibt. Aufgrund wechselnder Wetterbedingungen und von Außen einfallender Strahlung lässt sich die Lichtintensität im Gewächshaus trotz Zusatzbeleuchtung nicht vollkommen konstant halten.

Anhand des Gewächshausscreenings, in dem die wilden *Brassica*-Arten und Resynthesen verwendet wurden, konnte das Potential wilder Arten zur Verbesserung der Resistenz gezeigt werden. Dass das Potential wilder Arten zur Verbesserung der Resistenz gegenüber *S. sclerotiorum* nutzbar ist, demonstrierten Rönicke et al. (2004) am Beispiel von Sonnenblumen. Dennoch handelt es sich hierbei um langwierige Zuchtgänge, die die oben beschriebene Methode zur Bewertung der quantitativen physiologischen Resistenz mit einbeziehen sollten.

4.3 Beurteilung der Sklerotinia Resistenz anhand des Oxalsäuretests

Ein sehr schneller und zuverlässiger Test zur Beurteilung der Resistenz der eingesetzten Genotypen gegenüber Sklerotinia ist der Oxalsäuretest. Hierbei werden Blattscheiben Oxalsäure ausgesetzt, diese durch bidest. Wasser ersetzt und die Änderung der Leitfähigkeit in diesem Wasser über die Zeit gemessen. Der Mechanismus hinter dieser Methode besteht darin, dass die Oxalsäure die Zellmembranen schädigt, so dass Ionen ausströmen, welche die Leitfähigkeit des Wassers erhöhen. Somit zeigen Genotypen mit einer höheren Anfälligkeit eine

stärkere Erhöhung der Leitfähigkeit in der Lösung. Dies könnte durch dünnere Zellwände, aber auch auf eine geringere Widerstandskraft der Zellwände gegenüber Oxalsäure durch Unterschiede im Zellwandaufbau erklärt werden.

Oxalsäure wird als der wichtigste Pathogenitätsfaktor von *S. sclerotiorum* beschrieben. So sind *S. sclerotiorum* Mutanten, die keine Oxalsäure bilden, nicht pathogen (Godoy et al. 1990). Hierbei hat die Säure mehrere Funktionen, wie z.B. einen direkten phytotoxischen Effekt, eine Erhöhung der Aktivität von Endopolygalakturonidasen, eine Beeinflussung des Schließens der Stomata oder Unterdrückung des ‚oxidative burst' (Hegedus und Rimmer 2005). Den ‚oxidative burst' unterdrückt auch das nah verwandte Pathogen *B. cinerea* durch die Produktion eines spezifischen Inhibitors (Unger et al. 2005), was die Bedeutung dieses Mechanismus verdeutlicht. All diese Mechanismen erleichtern dem Pathogen eine erfolgreiche Infektion des pflanzlichen Gewebes.

Diese neu entwickelte Screeningmethode wurde mit den von den Züchtern zur Verfügung gestellten Genotypen und einigen chinesischen Sorten durchgeführt. Die Daten ermöglichen wiederum eine Differenzierung zwischen den Genotypen, wobei vor allem die chinesischen Sorten positiv auffielen. Besonders erwähnenswert ist die Sorte Zhongshuang 9, die die niedrigste Änderung der Leitfähigkeit aufwies. Hierbei handelt es sich zu dem um den Genotyp mit der höchsten im Moment zur Verfügung stehenden Resistenz (Wang et al. 1999). Das im Feldversuch ermittelte Anfälligkeitsniveau der Standard Genotypen ließ sich hier allerdings nicht wiederfinden. Zwar zeigte Toccata eine geringe und Pacific eine starke Änderung der Leitfähigkeit, bei Lion und Mohican ließen sich aber gegensätzliche Ergebnisse beobachten. Die Einstufung der Züchter ließ sich nur bedingt wiederfinden. Einige der als hoch anfällig klassifizierten Genotypen zeigten sehr starke Änderungen der Leitfähigkeit und bestätigten damit die Einstufung der Züchter. Dies war vor allem bei SRG 2009/03, NPZ 1 und LBN 241/78 der Fall. Bei anderen, wie z.B. NIC 06-1346CB, DSV 4-09 und SYN Sclero 1 konnte dies nicht beobachtet werden.

Im zweiten Ansatz wurden die wilden *Brassica*-Arten verwendet. Eine Differenzierung anhand der Änderung der Leitfähigkeit zwischen den Genotypen war auch hier möglich. Die wilden *Brassica*-Arten zeichneten sich allerdings durch große morphologische Unterschiede aus, so dass die Verlässlichkeit der Ergebnisse fraglich war. Um zusätzliche Faktoren zur Korrektur der Ergebnisse zur Verfügung zu

haben, wurden einige morphologische Parameter festgehalten. Die großen morphologischen Unterschiede sind anhand der Anzahl an Spaltöffnungen je mm² in Tab. 21 erkennbar. Die Korrektur der Änderung der Leitfähigkeit um die Anzahl der Spaltöffnungen ergab aus diesem Grund ein vollkommen anderes Ranking als die Änderung der Leitfähigkeit ohne diese Korrektur.

Aufgrund der großen Bedeutung von Oxalsäure für die Ausbreitung des Pathogens in pflanzlichem Gewebe wurde schon früh versucht die Reaktion des Pflanzengewebes auf Oxalsäure als Screeningfaktor zur Beurteilung der Resistenz verschiedener Genotypen zu nutzen. Hierzu wurden verschiedene Methoden entwickelt, in denen zunächst gezeigt werden konnte, dass Zellen von resistenten Genotypen höhere Oxalsäurekonzentrationen tolerieren konnten als Zellen von anfälligen Genotypen. Abhängig von der Pflanzenanzucht und des Genotyps lagen die toxischen Oxalsäurekonzentrationen hier zwischen 0,35 und 1,4 mM (Noyes und Hancock 1981). Diese Konzentrationen liegen unter der hier verwendeten Konzentration von 2 mM, so dass starke toxische Effekte auf die Zellen zu erwarten gewesen wären. In der erwähnten Arbeit wurden allerdings Zellsuspensionen und nicht wie in der vorliegenden Arbeit Blattscheiben verwendet, so dass große Unterschiede in der mit Oxalsäure in Kontakt kommenden Fläche bestehen. Auch die schützende Funktion der Kutikula kann in Zellsuspensionen nicht berücksichtigt werden. Auf eine weitere Erhöhung der Konzentration wurde allerdings verzichtet, da Oxalsäure vor allem durch die Schnittflächen der Blattscheiben in diese gelangen konnte. Es ist bekannt, dass es Unterschiede in der Verteilung der Oxalsäure in Blättern gibt. So wird Oxalsäure in Blättern anfälliger Genotypen deutlich gleichmäßiger verteilt, wenn Oxalsäure über den Blattstiel aufgenommen wird. Darüberhinaus scheint sich die Oxalsäure in dem verwendeten resistenten Genotyp vor allem in den Blattadern zu konzentrieren und nicht ins umliegende Gewebe zu gelangen (Tu 1985). Da auch in den verwendeten Blattscheiben Blattadern vorhanden waren wurde zunächst angenommen, dass der größte Teil der Oxalsäure durch die Schnittstelle und die Blattadern in das Gewebe gelangt. Aus diesem Grund wurde in dem Ansatz mit den Wildarten das Gewicht der Blattscheiben festgehalten, um auf diese Weise die Dicke der Scheiben und somit die Größe der Schnittstellen bzw. der Adern abschätzen zu können.

Durch höhere Oxalsäurekonzentrationen hätten die Effekte unterschiedlicher Verteilung der Oxalsäure in den Blattscheiben u.U. nicht mehr betrachtet werden können, da es zu einer starken Zerstörung des Gewebes hätte kommen können. Auf der anderen Seite wurde von Kolkman und James (2000) eine deutlich höhere Konzentration von 20 mM verwendet, um Welkesymptome an Bohnenpflanzen hervorzurufen. Hierbei wurden allerdings ganze Pflanzen verwendet und ein Einfluss des Stängelgewebes kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. So könnte eine andere Reaktion beobachtet werden, wenn lediglich Blattmaterial, wie in der vorliegenden Studie, verwendet werden würde. Die erzielten Ergebnisse dieser Studie korrelierten signifikant mit im Feld beobachteten Befallshäufigkeiten, Befallsstärken und Erträgen, obwohl mit der verwendeten Boniturskala nur eine vergleichsweise ungenaue Einstufung der Genotypen erfolgen konnte. Dies unterstreicht die Bedeutung der Oxalsäure als wichtigen Screeningfaktor umso mehr.

Vergleichbare Oxalsäurekonzentrationen wurden von Tu (1989) verwendet. Hier konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen zwischen 2 und 5 mM in der Lage sind die Plasmamembranen zu schädigen. Darüberhinaus ergaben sich in dieser Arbeit Unterschiede in den Schäden an Plasmamembranen resistenter und anfälliger Genotypen. Diese Schäden an den Membranen sollten durch den gewählten Ansatz in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden, um somit den Ioneneflux zu beeinflussen.

Die Angaben über die von *S. sclerotiorum* in das Gewebe abgegebene Oxalsäuremenge variieren stark. Ferrar und Walker (1993) berichten von bis zu 17 mg Oxalsäure je g Frischgewicht in Bohnenschoten. In Kulturmedium lag dieser Wert allerdings mit 3,65 mg je ml nach einer Inkubation von 10 Tagen deutlich niedriger. Dies kann u.U. an den Unterschieden im Substrat liegen, denn die Oxalsäureproduktion ist nicht nur stark vom Isolat des Pilzes, sondern auch vom Kulturmedium abhängig (Marciano et al. 1989). Auch Durman et al. (2005) berichten von relativ hohen Oxalsäurekonzentrationen von bis zu 110 µg Oxalsäure je mg Trockengewicht. Dies hing allerdings stark vom verwendeten Isolat ab und konnte um mehr als den Faktor sechs niedriger liegen.

Magro et al. (1984) dagegen berichten von bis zu 0,3 mg Oxalsäure je g Frischmasse, was in etwa der hier verwendeten Oxalsäurekonzentration in der Lösung entspricht. Die verwendete Konzentration ist tendenziell eher gering,

allerdings befindet sie sich im Rahmen der bei einer Infektion durch Sklerotinia vorkommenden Konzentration.

Höhere Oxalsäurekonzentrationen führten bei Tomaten zu starken Schäden an den Blattscheiben, so dass nach einer Inkubation von Blattscheiben deutliche Verfärbungen sichtbar wurden (Walz et al. 2008). Aus diesem Grund wurde die Oxalsäurekonzentration niedrig gehalten, um eine Zerstörung der Zellen unabhängig vom Resistenzniveau zu vermeiden.

Andere Effekte der Oxalsäure wie z.B. die Reduktion des pH-Werts (Zou et al. 2007) und die Unterdrückung des ‚oxidative burst' (Cessna et al. 2000), (Kabbage et al. 2010) wurden in den hier durchgeführten Versuchen nicht betrachtet und könnten ebenso einen Einfluss auf die Resistenzmechanismen der Pflanze ausüben.

Zur Erfassung des Einflusses von Oxalsäure auf reaktive Sauerstoffspezies (Kim et al. 2008), (Dickman et al. 2010) hätten andere Methoden angewendet werden müssen. Zur Erfassung der Resistenzmechanismen stellt der Einfluss von Oxalsäure auf reakt. Sauerstoffspezies allerdings einen ebenso brauchbaren Ansatz dar. So konnte gezeigt werden, dass die gebildete Menge an H_2O_2- und OH^--Radikalen mit der Aggressivität verschiedener Isolate von *Botrytis cinerea* korrelierte (Tiedemann 1997). Ein vergleichbarer Ansatz zur Bewertung der Resistenz in der Interaktion Raps-Sklerotinia wäre ebenso denkbar.

Ein oft beobachtetes Symptom von Oxalsäureapplikationen auf Blattgewebe ist eine Welke. Daher wird das durch eine Infektion der Pflanzenbasis an Sonnenblumen hervorgerufene Symptom Stängelwelke genannt (Brändle und Spring 2003), (Huang und Dueck 1980). So konnten Chipps et al. (2005) Unterschiede in der Anfälligkeit verschiedener Bohnengenotypen nicht nur durch Inokulationen beschreiben, sondern auch durch die Bonitur von oxalsäurebedingten Welkesymptome. Sie schlussfolgern, dass Unterschiede in der Resistenz zumindest teilweise auf unterschiedliche Reaktionen gegenüber Oxalsäure zurückgeführt werden können. Die beschriebenen Welkesymptome können durch eine Akkumulation von Kalium und einen Stärkeabbau in den Schließzellen der Stomata, was zu einer Öffnung der Stomata führt, erklärt werden. Darüberhinaus stört Oxalsäure das ABA-induzierte Schließen der Stomata (Guimaraes und Stotz 2004). Dies deutet auf einen Einfluss der Oxalsäure auf die Stomata hin, welches auch in diesem Versuchsansatz beobachtet

wurde. Bei den festgehaltenen Parametern im Ansatz mit den wilden *Brassica*-Arten erwies sich lediglich die Anzahl der Spaltöffnungen je mm² als brauchbarer Korrekturfaktor bei den Korrelationen zur Änderung der Leitfähigkeit. Dies unterstützt die These, dass die Oxalsäure auf die Spaltöffnungen wirkt und evtl. hier ein Eindringen der Säure in das Blatt stattfindet. Neben den Spaltöffnungen wurde das Gewicht der Blattscheiben, und damit indirekt die Blattstärke, festgehalten. Dieser Faktor hatte allerdings keinen positiven Einfluss auf die späteren Korrelationen, es kann also davon ausgegangen werden, dass ein Eindringen der Oxalsäure durch die Spaltöffnungen der primäre Mechanismus ist. Es kann nicht geleugnet werden, dass die Oxalsäure auf die Schnittstelle der Blattscheibe wirkt. Zellen an der Schnittstelle sind entweder bereits verletzt oder der Oxalsäure leicht zugänglich, so dass ein starker Schaden entsteht. Zellbestandteile, die einen Einfluss auf die Leitfähigkeit haben, treten u.U. früh aus und befinden sich somit in der Oxalsäurelösung, in der die Blattscheiben inkubiert wurden. Durch das wiederholte Waschen der Blattscheiben vor der ersten Messung werden diese u.U. entfernt und können somit nicht mehr erfasst werden.

Die anfängliche Hypothese, dass die Oxalsäure vornehmlich an den Schnittstellen wirken kann, muss also in Frage gestellt werden. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass auch bei den übrigen Genotypen eine Bestimmung der Anzahl der Spaltöffnungen je mm² hätte stattfinden müssen. Mit dieser Information hätten die Daten ebenfalls korrigiert werden können und somit die Aussagekraft des Versuchs erhöht werden können. Auf der anderen Seite muss bedacht werden, dass es sich bei dem übrigen Material um Rapsgenotypen und nicht um *Brassica*-Wildarten handelt. Vergleichbare Unterschiede in der Anzahl der Spaltöffnungen sind nicht zu erwarten, da es sich um vergleichsweise homogenes Material mit einem ähnlichen genetischen Hintergrund handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem Oxalsäuretest die Reaktion des Blattgewebes auf Oxalsäure als einen der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren betrachtet werden sollte. Hierbei wurde das Augenmerk vor allem auf die Schäden an den Zellmembranen gelegt und somit die vielfältigen weiteren Wirkungen der Oxalsäure außer acht gelassen. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich allerdings, dass neben den Schäden an den Zellmembranen auch der Einfluss auf die Öffnung der Stomata erfasst wurde. Obwohl nur ein kleiner Teil der Wirkungen

von Oxalsäure auf den pflanzlichen Organismus betrachtet wurden, ließ sich eine Differenzierung der Genotypen durchführen. Mögliche Diskrepanzen zu anderen Screeningmethoden können z.B. auf andere Wirkmechanismen von Oxalsäure, andere vom Pathogen produzierte Enzyme oder Toxine oder ein Zusammenspiel beider Faktoren zurückgeführt werden.

Schon de Bary (1887) beschreibt eine membranauflösende Substanz bei der Infektion durch *S. sclerotiorum*. Diese besteht zum einen aus Oxalsäure. Neben Oxalsäure gibt *S. sclerotiorum* aber auch z.B. extrazelluläre Proteasen (Billon-Grand et al. 2002), Endopolygalakturonasen (Cotton et al. 2003), Pectinmethylesterase Isoformen, Polymethylgalakturonasen (Fraissinet-Tachet und Fevre 1996), eine Aspartyl-Protease (Poussereau et al. 2001) aber auch Nekrosen und Ethylen induzierende Peptide (NEPs) (Dallal Bashi et al. 2010) oder Sclerin, wobei es sich um eine Substanz mit phytohormonaler (Tokoroyama et al. 1969), (Barber et al. 1981), (Tokoroyama et al. 1968) aber auch toxischer (Pedras und Ahiahonu 2004) Wirkung handelt, ab. Dies verdeutlicht, dass es sich bei Oxalsäure nicht um die einzige Substanz handelt, auf die die Pflanze reagieren kann bzw. die durch den pflanzlichen Stoffwechsel inhibiert oder abgebaut werden könnte, um die Infektion zu reduzieren.

4.4 Methodenvergleich zur Validierung der Ergebnisse

Mittels der in Tab. 22. dargestellten Korrelationen sollten die verwendeten Screeningmethoden miteinander in Beziehung gesetzt werden. Zunächst wurde eine Korrelation mit den Genotypen, die von den Züchtern zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt. Es lässt sich erkennen, dass sich nur vier signifikante Zusammenhänge absichern ließen. Bei diesen Zusammenhängen handelte es sich um die Befallshäufigkeit im Feldversuch 2008/09 am Standort Göttingen zu BBCH 19 und 85, um die Befallshäufigkeit in den Feldversuchen 2008/09 am Standort Göttingen und Peine zu BBCH 85, um die Befallshäufigkeit in den Feldversuchen 2008/09 und 2009/10 am Standort Göttingen zu BBCH 85 bzw. um die Befallshäufigkeit im Feldversuch 2008/09 am Standort Peine zu BBCH 85 und die Befallshäufigkeit im Feldversuch 2009/10 am Standort Göttingen zu BBCH 85. Es

ließ sich in keinem Fall ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gewächshausscreening bzw. dem Oxalsäuretest und den Feldversuchen absichern.

Bei der Interpretation muss bemerkt werden, dass es sich bei dem Zusammenhang der Befallshäufigkeit in den Feldversuchen 2008/09 am Standort Göttingen und Peine zu BBCH 85 bzw. bei dem Zusammenhang der Befallshäufigkeit in den Feldversuchen 2008/09 und 2009/10 am Standort Göttingen zu BBCH 85 um negative Zusammenhänge handelt. Je höher also der Befall eines Genotyps in einem der beiden Feldversuche war, desto niedriger war sie in dem anderen. Eine überzeugende Erklärung lässt sich hierfür nicht finden, so dass u.U. von falsch positiven Ergebnissen ausgegangen werden muss. Der signifikante Zusammenhang zwischen der Befallshäufigkeit im Feldversuch 2008/09 am Standort Göttingen zu BBCH 19 und 85 lässt sich durch die Tatsache erklären, dass der Frühjahrsbefall, wie oben beschrieben, nicht vollständig vom Befall zu BBCH 85 differenziert werden konnte. Wenn in beiden Befallswerten zumindest teilweise die gleichen Pflanzen erfasst wurden, erklärt dies den signifikanten Zusammenhang. Das höchste Bestimmtheitsmaß wurde bei dem Zusammenhang der Befallshäufigkeit im Feldversuch 2008/09 am Standort Peine zu BBCH 85 und der Befallshäufigkeit im Feldversuch 2009/10 am Standort Göttingen zu BBCH 85 festgestellt. Hierbei handelt es sich um einen hoch signifikanten Zusammenhang der darüberhinaus durch ein sehr gutes R_s gekennzeichnet ist. Dabei gilt es zu bedenken, dass diese beiden Feldversuche die niedrigsten Befallshäufigkeiten zeigten. Erstaunlicherweise ließ sich vor allem das Resistenzniveau der Genotypen bei Schwachbefall in zwei Umwelten reproduzieren.

In der zweiten Korrelationsanalyse, in der die Ergebnisse aus dem Gewächshausscreening und dem Oxalsäuretest der Wildarten verwendet wurden, ließen sich dagegen deutlich mehr signifikante Zusammenhänge absichern. Es ergab sich zunächst ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der Inokulationseffizienz und den ermittelten AUDPC-Werten. Allerdings ließen sich beide Parameter nicht mit den Änderungen der Leitfähigkeit, die im Oxalsäuretest ermittelt wurden, korrelieren. Erst die Korrektur der Änderung der Leitfähigkeit um die Anzahl der Spaltöffnungen je mm² ergab signifikante Zusammenhänge. Anhand des R_s der Korrelation zwischen dem Oxalsäuretest und den korrigierten Werten des Oxalsäuretests lässt sich der Einfluss der durchgeführten Korrektur abschätzen. Das

niedrige R_s von 0,653 verdeutlicht die Unterschiede in der Anzahl der Spaltöffnungen zwischen den verwendeten Genotypen und somit auch indirekt die allgemeinen morphologischen Unterschiede. Dies macht wiederum die Notwendigkeit einer Korrektur der ermittelten Daten deutlich. Die beiden durch die Korrektur der Daten erhaltenen R_s sind mit 0,607, für den Zusammenhang zwischen dem Oxalsäuretest und den AUDPC-Werten, und 0,611, für den Zusammenhang zwischen dem Oxalsäuretest und den Inokulationseffizienzen, sehr hoch und liegen nur unwesentlich unter dem R_s des Zusammenhangs zwischen den AUDPC-Werten und der Inokulationseffizienz. Dies ist umso erstaunlicher, da es sich bei den AUDPC-Werten und der Inokulationseffizienz um Daten aus demselben Versuch handelt, während es sich bei dem Oxalsäuretest um einen anderen Versuch handelt, der darüberhinaus lediglich einen Pathogenitätsfaktor des Pilzes betrachtet.

Der starke Zusammenhang zwischen den drei Parametern demonstriert die Aussagekraft der Screeningmethoden. Dennoch bleibt die Frage bestehen, warum in der ersten Korrelationsanalyse kein solch eindeutiger Zusammenhang gezeigt werden konnte. Neben vielen weiteren Faktoren sind hier zunächst unterschiedliche klimatische Bedingungen in den einzelnen Versuchen zu nennen. Aber auch Unterschiede in der Aggressivität der verwendeten Isolate oder Genotyp-Umwelt Interaktionen könnten eine entscheidende Rolle gespielt haben.

Schlussendlich muss gesagt werden, dass die beiden Oxalsäuretests und Gewächshausscreenings mit den von den Züchtern zur Verfügung gestellten Genotypen bzw. den *Brassica*-Wildarten unter möglichst gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, sich aber nur bei den Wildarten ein Zusammenhang herstellen ließ. Wenn alle übrigen Bedingungen keine Erklärung liefern können, so muss der Grund für die Unterschiede im Material selbst zu finden sein. In der Tat handelte es sich bei den wilden *Brassica*-Arten um deutlich stärker differenzierendes Material, so dass eine fehlende Korrelation bei den Rapsgenotypen auf zu geringe Unterschiede im Resistenzniveau dieser Genotypen zurückzuführen ist. Nur anhand von stark differenzierendem Material lassen sich Screeningmethoden miteinander in Beziehung setzen.

Dass eine fehlende Differenzierung der Genotypen dafür verantwortlich ist, dass sich die Methoden nicht in Einklang bringen lassen, wird zusätzlich in den Ergebnissen der Feldversuche deutlich. Obwohl davon auszugehen ist, dass die beteiligten

Züchter in der Lage sind ihr Material genau einzuschätzen, ließ sich die Einstufung der Resistenz selbst in den Feldversuchen nur ansatzweise reproduzieren. Die Züchter können die Resistenz der Genotypen nur anhand von Feldversuchen beurteilt haben. Obwohl beide Einschätzungen der Resistenz auf Feldversuchen beruhen, lässt sich das Ergebnis nicht reproduzieren. Auch die anderen Screeningmethoden waren nicht in der Lage, die Einschätzung der Züchter wiederzugeben.

Um ausreichend differenzierendes Material zur Verfügung zu haben, könnten die Ergebnisse der Versuche mit den *Brassica*-Wildarten genutzt werden. Es lassen sich Genotypen identifizieren, die deutlich geringere Läsionsausbreitungen aufweisen als andere. Hiermit könnten Kreuzungen durchgeführt werden, um spaltende Populationen zu erzeugen, die bei ausreichend großer Anzahl an Genotypen in Feldversuchen eingesetzt werden könnten, um somit in Feldversuchen ausreichend differenzierendes Material zu testen. Auf diese Weise könnte ein Zusammenhang zwischen den Screeningmethoden statistisch abgesichert werden.

In einem weiterführenden Versuch, dessen Daten nicht dargestellt sind, wurde ein kleinerer Satz Genotypen der KWS-Lochow GmbH mittels des Oxalsäuretest untersucht. Die erzielten Ergebnisse spiegelten die von der KWS-Lochow GmbH angegebenen Einschätzungen resistenter Pflanzen wider. Als weniger resistent eingestufte Genotypen zeigten dagegen eine höhere Änderung der Leitfähigkeit (Breuer 2011). Hier kann also durchaus von einer Übereinstimmung der Einschätzung der Züchter und des Oxalsäuretests gesprochen werden. In nachfolgenden Versuchen soll eine F2-Population eingesetzt werden (Breuer 2011), so dass davon ausgegangen werden kann, dass von der KWS-Lochow GmbH stark differenzierendes Material zur Erstellung einer spaltenden Population genutzt wurde. Dies zeigt erneut, dass die Ergebnisse bei stärker differenzierendem Material sehr wohl übereinstimmen.

Die hier beschriebenen Ergebnisse lassen sich mit solchen aus der Literatur in Einklang bringen, denn auch in anderen Arbeiten ließen sich oftmals keine Korrelationen zwischen verschiedenen Screeningmethoden herstellen (Huang 2002). Laut der Arbeit von Kull et al. (2003) variierten die Ergebnisse der dort verwendeten Screeningmethoden stark, so dass es schwer fiel resistente Genotypen zu identifizieren. Auf unterschiedliche klimatische Bedingungen kann dies nicht immer

zurückgeführt werden. So haben z.B. Yanar und Miller (2003) Inokulationen mit Ascosporen und myzelüberwachsenen Agarplugs unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Es war allerdings nicht möglich einen Zusammenhang zwischen den beiden Methoden herzustellen. In anderen Fällen gelang es lediglich schwache Zusammenhänge zwischen Gewächshaus- und Feldversuchen zu zeigen (Hollowell et al. 2008). Alle diese Arbeiten verdeutlichen, dass es nicht ohne Weiteres möglich ist, die Ergebnisse einer Screeningmethode auf einen Feldversuch zu übertragen.

Auf der anderen Seite wird von Übereinstimmungen in der Reaktion verschiedener Genotypen von Sonnenblumen auf das Pathogen in verschiedenen Feldversuchen berichtet (Huang 2002). Dies lässt sich mit der Hypothese in Einklang bringen, dass fehlende Zusammenhänge zwischen den Screeningmethoden auf nur unzureichend differenzierendes Material zurückzuführen sind, denn in Sonnenblumen wird von Unterschieden im Resistenzniveau berichtet (Huang 2002).

Auch wenn die Screeningmethoden keinen engen Zusammenhang aufwiesen, so können sie dennoch genutzt werden, um resistentes Material in den Wildarten zu identifizieren. So haben Teran und Singh (2009) signifikante Unterschiede zwischen den dort verwendeten Screeningmethoden gefunden, waren allerdings dennoch in der Lage resistentes Material zu identifizieren. Dies deutet darauf hin, dass der Großteil des dort verwendeten Materials eher geringe Unterschiede im Resistenzniveau zeigte und sich nur einige wenige Genotypen vom übrigen Material absetzten.

Bei Alfalfa konnten auf diese Weise identifizierte Genotypen genutzt werden, um durch Kreuzungen eine Verbesserung des Resistenzniveaus in der Nachkommenschaft zu erzeugen (Pratt 1996). Eine vergleichbare Vorgehensweise wäre auch hier sinnvoll.

Einzig die Arbeit von Garg et al. (2008) beschreibt eine Korrelation zwischen einer Inokulation im Gewächshaus und den Ergebnissen eines Feldversuchs bei Raps. Allerdings muss hierbei bedacht werden, dass in diesem Feldversuch ebenso die Läsionslänge und nicht wie in der hier vorliegenden Arbeit die Befallshäufigkeit festgehalten wurde. Dennoch bleibt die Tatsache bestehen, dass unter unterschiedlichen Umweltbedingungen und an sehr divergierenden Gewebearten Ergebnisse erzielt werden konnten, die miteinander in Einklang zu bringen waren.

Dies lässt sich allerdings wiederum auf das verwendete Material zurückführen, denn bei Garg et al. (2008) wurden neben australischen auch chinesische Genotypen verwendet, die sich durch hohe Resistenz auszeichnen sollen. Dadurch war eine ausreichende Differenzierung des Materials gegeben.

Auch wenn sich nur wenige signifikante Zusammenhänge zwischen den Methoden herstellen ließen, so konnte anhand der wilden *Brassica*-Arten gezeigt werden, dass die beschriebenen Methoden reproduzierbare Ergebnisse liefern, die zu einer Auswahl von Genotypen genutzt werden können. Diese Genotypen stehen damit für Kreuzungen zur Verfügung, um die gefundenen Resistenzeigenschaften zu kombinieren bzw. in Raps zu übertragen.

4.5 Beurteilung der Wurzelinfektion unter Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse

Zur Testung des Temperatureinflusses auf die Wurzelinfektion wurden verschiedene Varianten mit unterschiedlichen Temperaturregimen angelegt. Ein relativ einheitlicher Temperaturunterschied konnte über den gesamten Versuchszeitraum gehalten werden. Lediglich die Außentemperaturvariante zeigte größere Variationen, so dass es vor allem zum Ende des Versuchs zu sehr niedrigen Temperaturen kam. Dennoch konnten in allen Varianten Infektionen der Wurzel beobachtet werden.

Über alle Isolate gemittelt ließ sich trotz der großen Unterschiede in der Temperatur jedoch kein Unterschied in den Boniturnoten feststellen. Erst bei einer einzelnen Betrachtung der Isolate bei unterschiedlichen Temperaturen gelang es, statistisch absicherbare Unterschiede festzustellen. Es wird angenommen, dass es eine spezifische Optimaltemperatur für jedes der eingesetzten Isolate gibt. Während die Isolate SS LÜ und SS F bei allen Temperaturen vergleichbare Läsionen hervorriefen, wurden bei den Isolaten SS GÖ und SS TH in der wärmsten Variante die größten Läsionen gefunden. Gegensätzlich war dies bei dem Isolat SS 1.5, was vor allem bei niedrigen Temperaturen zu großen Läsionen führte. Dies lässt sich mit Daten aus der Literatur in Einklang bringen, in der von unterschiedlichen Temperaturoptima für Isolate aus unterschiedlichen Regionen berichtet wird (Huang und Kozub 1991). Diese Unterschiede in den Temperaturoptima haben einen Einfluss auf den Zeitpunkt der Infektion. So findet die Infektion bei Isolaten mit einem niedrigeren Optimum bei

sonst gleichen Bedingungen früher statt und kann somit u.U. bereits im Frühjahr zu einer Infektion führen. Eine Parallele zu dem in dieser Arbeit beschriebenen Frühjahrsbefall kann erkannt werden. Jedoch sollte bedacht werden, dass es sich um verschiedene Symptombilder handelt. Während bei der Infektion der Wurzel die Läsion direkt an der Wurzel entstand, so wurden bei der Frühjahrsinfektion stets nur an oberirdischen Pflanzenteilen Symptome beobachtet. Selbst wenn die Infektion im Frühjahr weit fortgeschritten war, konnte kein Befall der Wurzel beobachtet werden. Auf der anderen Seite konnte bei der Wurzelinfektion zwar in einzelnen Fällen Myzel oberhalb der Erdoberfläche gefunden werden, dies war vor allem in der Außentemperaturvariante der Fall, welches allerdings zu keinem Befall der oberirdischen Pflanzenteile führte.

Der Befall der Wurzel durch myzeliogen auskeimende Sklerotien ist in anderen Kulturarten wie z.B. Sonnenblume sehr gut beschrieben und von größerer Bedeutung (Hoes und Huang 1976), (Huang und Dueck 1980), (Huang und Hoes 1980), (Degener et al. 1998). Da Sonnenblumen und Raps z.T. unter vergleichbaren klimatischen Bedingungen angebaut werden ist es verwunderlich, dass die bodenbürtige Infektion von Raps durch Sklerotinia nicht oder nur von deutlich untergeordneter Bedeutung auftritt. Außer klimatischen Faktoren müssen noch andere Mechanismen von Bedeutung sein. So ist anhand der hier dargestellten Daten zu erkennen, dass es in dem Wurzelinokulationsversuchen trotz direktem Kontakt des Myzels zur Wurzel, hoher Bodenfeuchten, unterschiedlicher Temperaturen und einem sehr langen Versuchszeitraum nur zu vergleichsweise schwachen Symptomen kam. Keine der infizierten Pflanzen zeigte oberirdische Symptome. Eine Sklerotienbildung trat erst nach einer weiteren Inkubation in der Feuchten Kammer auf und nur bei wenigen Pflanzen konnten im Inneren der Wurzel Sklerotien gefunden werden. Es muss eine eher geringe Anfälligkeit des Wurzelgewebes vorhanden sein. Dies deckt sich mit den Beobachtungen im Feldversuch, wo trotz einer starken Zersetzung der oberirdischen Pflanzenteile, die Wurzeln nicht befallen wurden.

Ein Faktor, der einen fördernden Einfluss auf die Infektion der Wurzeln ausüben könnte, wären z.B. durch Insekten hervorgerufene Wunden. Vergleichbare Effekte konnten bereits gezeigt werden. So kann ein Befall der Kleinen Kohlfliege (*Delia radicum* L.) den anschließenden Befall von *Verticillium longisporum* fördern

(Keunecke 2009). Vergleichbares wurde in anderen Systemen, wie z.B. Fusarium (*Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* (Sacc.)) und Nematoden (*Meloidogyne incognita*) an Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Abawi und Barker 1984) oder *Phoma lingam* (Tode) und der Kleine Kohlfliege an Raps (Keunecke 2009), beschrieben. Während in anderen Interaktionen von Insekten und Pathogenen Insekten als Vektoren fungieren können, ist bei Sklerotinia vor allem die Verwundung der Pflanze von Bedeutung. Durch Wunden könnte es dem Pathogen ermöglicht werden schneller bzw. tiefer in das Pflanzengewebe einzudringen und somit im Inneren der Wurzel Sklerotien zu bilden. Angesichts der Symptome bei niedrigen Temperaturen in dem hier beschriebenen Versuch, ist eine durch Frost hervorgerufene Verwundung der Pflanze als möglicher fördernder Faktor bei der Infektion denkbar. An Kohl wurde bereits beschrieben, dass vor allem durch Frostschäden eine Infektion durch Sklerotinia begünstigt wird (Hudyncia et al. 2000). Insektenfraß führte dagegen zu einer moderaten Erhöhung des Befalls (Dillard und Cobb 1995). Dies erklärt die vergleichbar hohen Befallswerte in der Außentemperaturvariante in dem hier beschriebenen Versuch.

Die hohen Befallswerte in der Außentemperaturvariante lassen sich mit Daten zur Keimung von Sklerotien in Einklang bringen. Schon niedrige Temperaturen von 4°C können ausreichen, um die Keimung von Sklerotien auszulösen (Mylchreest und Wheeler 1987), so dass das Pathogen bei niedrigen Temperaturen aktiv ist.

Darüberhinaus ließen sich in diesem Versuch Unterschiede in der Reisolationsrate des Pathogens bei den verschiedenen Temperaturen feststellen. Bei jeder der genutzten Methoden zur Isolation wurden in der Außentemperaturvariante die besten Ergebnisse erzielt. Es konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den genutzten Methoden erkannt werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass in den beiden wärmeren Varianten das Pathogen entweder nicht mehr lebensfähig war oder durch andere Mikroorganismen stark unterdrückt wurde. In den beiden anderen Varianten lagen die Reisolationsraten z.T. sehr niedrig. Eine weitere Entwicklung der Symptome wäre daher vor allem in der Außentemperaturvariante zu erwarten. Auch wenn die Symptomausprägung bei den unterschiedlichen Temperaturen vergleichbar war, deutet dies auf eine Anpassung an eher niedrigere Temperaturen hin, was eine mögliche Infektion der Wurzel am Anfang der Vegetationsperiode belegene würde.

Schließlich ließen sich in dem Versuch Unterschiede in der Aggressivität der Isolate erkennen. Anhand von myzeliogenen Kompatibilitätsgruppen konnten selbst innerhalb von zwei Rapsfeldern unterschiedliche Isolate von *S. sclerotiorum* nachgewiesen werden (Kohn et al. 1991). Diese Gruppen weisen oft große Unterschiede in der Aggressivität auf (Kull et al. 2004), (Hollowell et al. 2003), (Ekins et al. 2007), (Viji et al. 2004). Allerdings konnten keine Genotyp-Isolat Interaktionen nachgewiesen werden (Kull et al. 2004), (Hollowell et al. 2003). Es ist nicht überraschend, dass hier Unterschiede in der Aggressivität aufgezeigt werden konnten. Vielmehr zeigen diese Unterschiede in der Aggressivität, dass das angewendete Boniturverfahren geeignet war, um Unterschiede zwischen den Varianten nachzuweisen.

Als Schlussfolgerung kann aus diesen Versuchen abgeleitet werden, dass jedes verwendete Isolat eine Optimaltemperatur zur Infektion und Symptomausprägung aufweist. Vergleichbares ist auch schon in der Literatur beschrieben. Während Koch et al. (2007) ein sehr breites Temperaturoptimum zur Infektion von 16 bis 27°C beschreiben, liegt dies z.B. bei Abawi und Grogan (1979) mit 20 bis 25°C niedriger. Ein noch niedrigeres Optimum zur Infektion wird von Young et al. (2004) beschrieben. Hier liegt es zwischen 16 und 22°C.

Darüberhinaus konnte in den hier durchgeführten Arbeiten bei niedrigen Temperaturen eine vergleichbare Symptomausprägung beobachtet werden. Zusammen mit der beschriebenen niedrigen Temperatur, die zur Keimung der Sklerotien notwendig ist und der Hypothese, dass Frostschäden eine Infektion fördern können, kann von einer Wurzelinfektion zu Beginn der Vegetationszeit ausgegangen werden. Die in den Feldversuchen beobachtete Frühjahrsinfektion stützt diese These, denn auch hier wurde die Infektion Anfang April zum ersten Mal beobachtet. Die Sklerotien müssen also vorher ausgekeimt sein und eine frühere Infektion kann nicht ausgeschlossen werden. Vergleicht man die beiden Versuchsjahre, in denen die Frühjahrsinfektion beobachtet wurde, so fällt auf, dass sie im Versuchsjahr 2008/09 stärker war, obwohl nach vergleichbaren Temperaturen im März die Temperaturen im April und Mai 2009 höher lagen als in 2010. Am Standort Peine dagegen, auf dem die Frühjahrsinfektion nicht beobachtet wurde, kann im Versuchsjahr 2008/09 eine deutlich höhere Temperatur im April beobachtet werden, die eine Infektion u.U. behindert hat. Nach initialer Infektion bei kalten

Temperaturen fördern u.U. milde Temperaturen den weiteren Krankheitsverlauf. Im Jahr 2009/10 lässt sich das Ausbleiben der Frühjahrsinfektion durch vergleichsweise niedrige Niederschläge im April erklären.

Sofern die Hypothese allerdings zutrifft, dass Wunden durch Insekten oder Frost eine wichtige Rolle bei der Infektion der Wurzeln spielen, bedeutet dies, dass es nicht ohne Weiteres möglich ist für diese Art der Infektion resistente Genotypen zu identifizieren. Dies lässt sich begründen, da stets andere Faktoren, wie unterschiedlicher Insektenbefall oder Winterbedingungen, aber auch Winterhärte der Genotypen zur Ausprägung der Symptome beitragen und den eigentlichen Resistenzmechanismus überdecken können. Darüberhinaus zeigen die unterschiedlichen Temperaturoptima der verwendeten Isolate zusammen mit den dennoch sehr homogenen Symptomausprägungen die stabile Ausprägung des Befalls, selbst bei nicht optimalen Bedingungen.

Einzig durch eine Reduktion der Ausbreitung des Pathogens innerhalb der Pflanze, wie es in den wilden *Brassica*-Arten zu beobachten war, könnte der Befall hier reduziert werden. Ein verminderter Infektionserfolg kann nicht zielführend sein, sofern die Infektion durch Wunden gewährleistet wird.

4.6 Beurteilung der Pflanzentransformation im Hinblick auf die Wirksamkeit der inserierten Gene

Mittels des durchgeführten PCR-Verfahrens und der cDNA-Synthese konnte gezeigt werden, dass die inserierten Gene in den meisten Fällen stabil in das Genom eingebaut, an die nächste Generation weitergegeben und exprimiert wurden. Dennoch zeigten die vier verwendeten Screeningmethoden Oxalsäuretest, Blatt-, Blattstiel- und Stängelinokulation keine Unterschiede im Phänotyp der transformierten Pflanzen.

Beide Gene sollten Oxalsäure, den wichtigsten Pathogenitätsfaktor von *S. sclerotiorum* (Hegedus und Rimmer 2005), abbauen und somit die Ausbreitung des Pilzes innerhalb der Pflanze reduzieren oder sogar verhindern. Obwohl *S. sclerotiorum* neben Oxalsäure zahlreiche weitere Substanzen abgibt, die zur Infektion beitragen (Marciano et al. 1983), (Fraissinet-Tachet und Fevre 1996),

konnte gezeigt werden, dass Mutanten von Sklerotinia, die nicht in der Lage sind, Oxalsäure zu produzieren, nicht pathogen sind (Godoy et al. 1990). Laut Lu (2003) gibt es drei Klassen von Enzymen, die Oxalsäure abbauen können. Hier sind Oxalat Oxidasen, Oxalat-Decarboxylasen und Oxalyl-CoA-Decarboxylasen zu nennen. Da die Decarboxylasen die Oxalsäure in CO_2 und Ameisensäure abbauen und Ameisensäure einen negativen Effekt auf die Pflanzenzelle ausüben könnte, wurden die meisten Transformationen mit Oxalat-Oxidase durchgeführt. Hier gibt es einige Beispiele, die die Wirksamkeit des Enzyms demonstrieren. Thompson et al. (1995) konnten z.B. zeigen, dass transgene *Brassica napus* Pflanzen, die Aktivität von Oxalat-Oxidase aufwiesen eine höhere Resistenz gegenüber exogen applizierter Oxalsäure aufweisen. Die Verbesserung der Resistenz von Raps gegenüber *S. sclerotiorum* durch die Insertion einer Oxalat-Oxidase aus *Triticum aestivum*, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurde, konnte zusammen mit einer Detoxifikation von Oxalsäure ebenso gezeigt werden. Hierbei kam es zu einer Reduktion des Befalls von bis zu 90% (Dong et al. 2008).

Vergleichbare Ergebnisse ließen sich auch an anderen Pflanzen, wie Sonnenblume, Sojabohne oder Erdnuss zeigen. Hier konnte die Resistenz gegenüber *S. sclerotiorum* oder *S. minor* durch die Insertion einer Oxalat-Oxidase aus Weizen erheblich gesteigert werden (Donaldson et al. 2001), (Hu et al. 2003), (Livingstone et al. 2005).

Die Wirkung der Oxalat-Decarboxylase konnte in der Literatur ebenso demonstriert werden. In Tabak und Sojabohne wurde dieses Enzym erfolgreich exprimiert, was ebenfalls zu einer starken Reduktion der Symptomausprägung führte (Kesarwani et al. 2000), (Cunha et al. 2010).

Die fehlende Wirkung in der vorliegenden Arbeit kann nicht auf die verwendeten Konstrukte zurückgeführt werden, da eben diese Konstrukte eine Wirkung gegenüber *S. sclerotiorum* in Tomate und Tabak zeigten. In Tabak konnte darüberhinaus ein durch die Oxalat-Decarboxylase reduzierter Oxalsäuregehalt und eine stärkere Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies beobachtet werden. In Tomaten ließ sich dagegen der Oxalsäureabbau selbst nachweisen (Walz et al. 2007), (Walz et al. 2008).

Weshalb die dargestellte Transformation in diesen Untersuchungen erfolglos blieb, ist offen. Allerdings berichtet Glue (2009) ebenfalls von einer fehlenden Wirkung der inserierten Gene. Hier wurde eine Oxalat-Oxidase aus Weizen, eine Oxalat-Oxidase aus Gerste und eine Oxalat-Decarboxylase aus *Flammulina velutipes* in Zwiebel (*Allium cepa* L.), Knoblauch (*Allium sativum* L.) und Tabak inseriert. Keines der drei Gene führte zu einer Verbesserung der Resistenz in Zwiebel oder Knoblauch. Lediglich ein Event der Transformation an Tabak konnte identifiziert werden, in dem die Oxalat-Decarboxylase zu einer höheren Resistenz führte.

Zurückgeführt wird dies zum einen auf eine unstabile Expression der Gene. Zum anderen wurden auch Events identifiziert, bei denen histologisch eine Expression gezeigt werden konnte. Es wird vermutet, dass die Expression zu gering war und eine gewisse wirkungsvolle Konzentration erreicht werden muss, um einen ausreichenden Effekt auf die Oxalsäurekonzentration im Gewebe hervorzurufen. Ein ähnlicher Zusammenhang könnte in den hier durchgeführten Versuchen vorliegen. Die Anzahl der Geninsertionen würde einen ersten Anhaltspunkt hierfür geben. Auf der anderen Seite erhöht eine hohe Anzahl an Insertionen die Wahrscheinlichkeit eines ‚gene silencing', was ebenfalls als Erklärungsansatz in der Arbeit von Glue (2009) herangezogen wird. In der hier vorliegenden Arbeit wurde weder die Anzahl der Insertionen, noch die Höhe der Expression bestimmt, so dass beide Erklärungen nicht ausgeschlossen werden können. Die hohe Anzahl der Transformationen in der Arbeit von Glue (2009) zusammen mit der geringen Anzahl an Events, die tatsächlich eine Reduktion im Läsionswachstum aufwiesen verdeutlicht, dass nicht jede Transformation oder Insertion automatisch zu einer deutlichen Veränderung des Phänotyps führt.

In den hier durchgeführten Versuchen zur Phänotypisierung der transgenen Pflanzen wurden je Genkonstrukt nur zehn bzw. neun der 20 bzw. 24 erzeugten Events genutzt. Eine Phänotypisierung der übrigen Events könnte dennoch zu einer Identifikation eines resistenten Genotyps führen. Diese Hypothese wird durch die Auswahl der phänotypisierten Events weiter untermauert. Es wurden hierbei je Genkonstrukt diejenigen ausgewählt, von denen die größte Saatgutmenge produziert werden konnte. Es wurden folglich Events, bei denen es durch die Insertion der Gene zu einer reduzierten Samenbildung kam, nicht berücksichtigt. Eine solche Reduktion der Samenbildung konnte beobachtet werden und könnte ein Hinweis auf

eine reduzierte Fitness dieser Linien sein. Eine solche Reduktion der Fitness könnte u.U. durch eine sehr hohe Expression oder Akkumulation der gewünschten Enzyme zu erklären sein. Folglich sollten die nicht phänotypisierten Linien unbedingt in weiteren Versuchen eingesetzt werden, um herauszufinden, ob sich auch in diesen Events kein Effekt auf die Symptomausprägung finden lässt.

Neben der zu geringen Menge an Enzymen, die für den nicht veränderten Phänotyp verantwortlich sein könnte, können auch weitere Erklärungen herangezogen werden. Zum einen ist hier ein zu geringes Expressionslevel oder eine zu geringe Translation zu nennen, die zu eben dieser niedrigen Enzymmenge führen könnte. Zum anderen ist aber auch eine nicht korrekte Faltung des Enzyms oder eine unvorteilhafte Lokalisation denkbar. Bei falscher Quartärstruktur kann keine Aktivität erwartet werden. Wenn Enzym und Substrat nicht aufeinandertreffen, weil das Enzym z.B. in Vakuolen eingeschlossen ist, kann keine Aktivität vom Enzym ausgehen, was die Bedeutung der Lokalisation des Enzyms verdeutlicht. Eine weitere Erklärung könnte ein Abbau des Enzyms oder bereits der RNA innerhalb der Zellen sein. Sofern von einer korrekten Bildung des Enzyms ausgegangen wird, ist allerdings eine posttranslationale Modifikation oder Glykosylierung desselben denkbar. Gleiches gilt für die RNA, die durch eine Modifikation verändert würde und somit nicht mehr zum korrekten Produkt führen kann. Denkbar wäre ebenso die Notwendigkeit eines Co-Faktors für die Enzymaktivität. So wurde für Oxalat-Oxidase z.B. die Notwendigkeit von Kupfer oder Mangan als Co-Faktor beschrieben (Pundir und Kuchhal 1989), (Requena und Bornemann 1999). Beide Elemente sollten allerdings in der Pflanze vorhanden sein, so dass auch diese Erklärung als unwahrscheinlich angesehen werden kann. Eine weitere Erklärung wäre die Notwendigkeit eines bestimmten pH-Wertes für die Aktivität der Enzyme. Allerdings wurde sowohl für die Oxalat-Decarboxylase wie auch für die Oxalat-Oxidase eine sehr breite pH-Spanne für die Aktivität beschrieben (Mehta und Datta 1991), (Pundir und Kuchhal 1989), so dass dies nicht als Begründung herangezogen werden kann. Natürlich können auch andere Bedingungen für die Aktivität suboptimal gewesen sein. Es bleibt aber zu bedenken, dass eine Aktivität der Enzyme in anderen Pflanzen berichtet wurde (Walz et al. 2007), (Walz et al. 2008).

Ein weiterer Grund für die ausgebliebene Enzymaktivität könnte die Inhibierung der Oxalat-Oxidase durch funktionelle Thiolgruppen (-SH) (Pundir und Kuchhal 1989)

sein. Schwefelwasserstoffverbindungen finden sich u.a. in Glukosinolaten, wie sie im Raps vorkommen. Da Glukosinolate ebenso in Zwiebel und Knoblauch zu finden sind, stellt dies eine Erklärung für die fehlende Wirksamkeit der Oxalat-Oxidase in der hier vorliegenden Arbeit, aber auch in der Arbeit von Glue (2009), dar. Es sollte allerdings nicht vergessen werden, dass z.B. Thompson et al. (1995) die Wirkung einer Oxalat-Oxidase in Raps zeigen konnten. Schwefelwasserstoffe können folglich nicht die einzige Erklärung für die nicht vorhandene Änderung des Phänotyps darstellen. Vermutlich sind auch das sortenspezifische Glukosinolatspektrum sowie die Menge des gebildeten Enzyms hier von Bedeutung.

Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Phosphat- und Sulfationen die Aktivität der Oxalat-Decarboxylase hemmen können (Knowles und Hodgkinson 1972), (Kobos 1980). Beide Ionen kommen in Pflanzenzellen vor, besonders Raps zeichnet sich durch eine vergleichsweise hohe Schwefelkonzentration im Gewebe aus, so dass sie als Inhibitoren in Frage kommen. Auch wenn in den beschriebenen Arbeiten die Enzyme nicht aus den gleichen Organsimen stammten und die beschriebenen Inhibitoren in den Ursprungsorganismen vorhanden sind, stellt dies eine mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen dar.

Neben dem hier dargestellten Ansatz zur Erzeugung transgener Pflanzen mit erhöhter Resistenz sind weitere Möglichkeiten in der Literatur dargestellt. So konnten Liu et al. (2010) z.B. durch die Insertion eines Chitinasegens die Resistenz gegenüber *S. sclerotiorum* deutlich erhöhen. Alternativ kann die Expression bereits vorhandener Gene und somit die Resistenz beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass in dem als resistent eingestuftem Genotyp Zhongshuang 9 die Expression des Gens für die BnMPK4 nach einer Infektion induziert wird, während es in einem anfälligen Genotyp nicht aktiviert wird. Durch die Überexpression dieses Gens ließ sich die Resistenz gegenüber *S. sclerotiorum* stark erhöhen (Wang et al. 2009).

Auch andere biotechnologische Verfahren lassen sich zur gezielten Selektion resistenter Genotypen nutzen. Oxalsäure als Selektionsmarker wurde z.B. von Liu et al. (2005) eingesetzt, um aus einer Population an mutanten Genotypen zu selektieren, die eine höhere Toleranz gegenüber diesem Pathogenitätsfaktor aufweisen. Die selektierten Mutanten zeigten eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber dem Pathogen als der resistente Standard Zhongyou 821.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zunächst die bis jetzt nicht verwendeten Transformationsevents aus dieser Arbeit phänotypisiert werden sollten. Sollte sich kein Genotyp mit erhöhter Resistenz finden lassen, so ist dies kein Beweis dafür, dass eine auf diese Weise durchgeführte Transformation keinen Erfolg bringen kann. In anderen Arbeiten wurde eben dies bewiesen, so dass von einem erfolgversprechenden Ansatz gesprochen werden kann. Darüberhinaus gibt es weitere Ansätze, die zur Erzeugung von resistentem Material genutzt werden könnten, so dass biotechnologische Methoden in der Züchtung nicht vernachlässigt werden sollten.

5 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Bewertung der Resistenz des momentan zur Verfügung stehenden Rapsmaterials gegenüber *S. sclerotiorum* nicht ohne Weiteres möglich ist. Die hohe Variabilität der Ergebnisse, die starken Genotyp-Umwelt Interaktionen und vor allem die geringen Unterschiede im Resistenzniveau des Materials sind hierfür verantwortlich. Um dennoch die Resistenzeigenschaften der zukünftigen Sorten beeinflussen zu können, müssen folglich Resistenzquellen aus anderen Genpools herangezogen werden. Es konnten Quellen in chinesischem Material aber auch in *Brassica*-Wildarten gefunden werden, die in der Rapszüchtung eingesetzt werden können. Vor allem in wildem *Brassica*-Material ließen sich darüberhinaus unterschiedliche Formen der Resistenz finden. Die hier zum ersten Mal beschriebene Form der quantitativen physiologischen Resistenz stellt hierbei das vielversprechendste Werkzeug zur Verbesserung der Sorteneigenschaften dar. Durch die Reduktion des Wachstums des Pilzes können Ertragsverluste reduziert werden. Besonders vor dem Hintergrund ökonomischer Gesichtspunkte, könnte u.U. dadurch auf Blütenspritzungen verzichtet werden. Trotz dieser Möglichkeit, sollte bedacht werden, dass es sich hierbei um einen relativ aufwendigen Zuchtgang handelt, in dem es schon bei der Erstellung der Resynthesen zu Problemen kommen könnte. Unter allen Umständen müssten die hier beschriebenen Screeningmethoden berücksichtigt werden. Zusätzlich bleibt zu klären, inwieweit eine solche Resistenz die Anfälligkeit der Wurzel verringern kann.

Aus diesem Grund stellen biotechnologische Methoden, wie z.B. die Transformation von bestehenden Sorten mit hohem Ertragspotential eine verlockende Alternative dar. Einen Einfluss der hier durchgeführten Transformationen auf den Phänotyp konnte zwar nicht gezeigt werden, aber Beispiele aus der Literatur zeigen vielversprechende Resultate oder Alternativen. In Europa steht allein die fehlende gesellschaftliche Akzeptanz dieser Methoden der Entwicklung und Forschung an transgenen Genotypen entgegen. Aus diesem Grund kann im Moment nur durch klassische Züchtung mit chinesischem Material oder Resynthesen aus Wildarten das Problem der fehlenden Variabilität im vorhandenen Material gelöst und neue Resistenzquellen erschlossen werden.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung praktikabler Screeningmethoden zur Bewertung der Resistenz von Rapssorten gegenüber *S. sclerotiorum* zur Identifizierung möglicher Resistenzquellen für die Winterrapszüchtung. Drei Methoden konnten entwickelt werden, die die Resistenzeigenschaften verschiedener Genotypen auf unterschiedlichen Ebenen erfassen. Neben Befallsbonituren in Feldversuchen, wurden ein Gewächshausscreening und ein Labortest durchgeführt. Dieser beruht auf der Reaktion des Pflanzengewebes auf den Pathogenitätsfaktor Oxalsäure. Mit diesen Methoden wurde das von den beteiligten Züchterhäusern zur Verfügung gestelltes Material phänotypisiert, welches eine möglichst große Differenzierung aufweisen sollte. Durch die Kombination dieser drei Methoden konnte gezeigt werden, dass das der Züchtung zur Verfügung stehende Material eine nicht ausreichende Differenzierung im Merkmal der Resistenz gegenüber Sklerotinia aufweist, um eine erfolgreiche Resistenzzüchtung zu betreiben. Dennoch konnte die Reproduzierbarkeit des Gewächshausscreenings und des Oxalsäuretests anhand von besser differenzierendem Material gezeigt werden. Bei diesem Material handelte es sich um wilde *Brassica*-Arten, welche unterschiedliche Resistenzreaktionen aufgezeigt haben. Während in dem vorhanden Sortenmaterial oder den verwendeten Resynthesen die Pathogenabwehr hauptsächlich auf einer Reduktion des Penetrationserfolgs zu beruhen scheint, weisen die wilden *Brassica*-Arten eine quantitative physiologische Resistenz auf, die die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Pilzes im pflanzlichen Gewebe reduziert. Durch diesen bis heute in der Züchtung ungenutzten Mechanismus könnte die Resistenz im Zuchtmaterial erhöht werden. Zusätzlich konnten in chinesischem Sortenmaterial Resistenzquellen identifiziert werden. In diesen Genotypen wird ebenfalls die Ausbreitung des Pathogens und nicht die Infektion selbst beeinflusst. Eine Nutzung dieser Resistenzquellen in Feldversuchen, war allerdings, aufgrund mangelnder Resynthesen der wilden *Brassica*-Arten bzw. mangelnder Winterhärte des chinesischen Materials, nicht möglich. Anhand zahlreicher Übereinstimmungen zwischen dem Feldversuch 2007/08, in dem noch kein von den beteiligten Züchtern bereitgestelltes Material verwendet wurde und den mehrortigen und mehrjährigen Sortenversuchen der UFOP (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V.), konnte die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der Feldversuche demonstriert werden.

Künstliche Infektionen der Wurzeln bei unterschiedlichen Temperaturen im Gewächshaus und der im Feld beobachtete Frühjahrsbefall deuten darauf hin, dass eine Infektion der Wurzel schon früh in der Vegetationsperiode stattfinden kann. U.U. spielen Wunden, wie sie durch Insekten aber auch Frost hervorgerufen werden können, hierbei eine entscheidende Rolle. Resistenzreaktionen der Genotypen traten hierbei nicht sehr deutlich auf.

In weiterführenden Arbeiten wurde durch eine Transformation der Sommerrapssorte Drakkar versucht einen resistenten Standard für das Gewächshausscreening und den Oxalsäuretest herzustellen. Hierfür erfolgte eine Insertion von Genen für eine Oxalat-Oxidase und eine Oxalat-Decarboxylase. Trotz erfolgreicher Transformation und Expression der Konstrukte konnte in keiner der phänotypisierten Transformationsevents ein Einfluss auf den Phänotyp beobachtet werden. Neben der Reaktion des transgenen Materials in Gewächshausversuchen auf das Pathogen selbst, wurde die Reaktion auf Oxalsäure allein im Oxalsäuretest betrachtet. Da hier kein Einfluss der inserierten Gene auf den Phänotyp beobachtet werden konnte, kann von einer mangelnden oder fehlerhaften Transkription bzw. Aktivität der Enzyme oder einer zu geringen Enzymmenge im Gewebe ausgegangen werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass Screeningmethoden für die Züchtung entwickelt wurden mit denen mögliche Resistenzquellen identifiziert werden konnten. Der Züchtung stehen somit Möglichkeiten zur Verfügung die Resistenz von Raps gegenüber *S. sclerotiorum* zu verbessern.

Summary

The aim of this work was the development of suitable screening methods for resistance evaluation of oilseed rape cultivars against *S. sclerotiorum*. With these methods, possible sources of resistance had to be identified. Three methods have been developed, which evaluate the characteristics of resistance on different bases. Beside field experiments, which are strongly depending on climatic conditions and are very time and cost intensive, a greenhouse screening and a laboratory assay, which determines the reaction of the tissue against the pathogenicity factor, oxalic acid, have been developed. First genotypes, which were provided by the involved breeders, have been screened with the mentioned methods for evaluating a broad range of differentiation. Thus the complete variability, which is available for the breeders, has been used. By combining the three different methods, it was possible to show a lack of variation in this material. Therefore it is not possible to use this material in further resistance breeding. Nevertheless the reproducibility of the greenhouse screening and the oxalic acid assay was shown by using material with a higher differentiation. This material consists out of wild *Brassica* species, which have shown different resistance reactions. In the available cultivars and the used resynthesized oilseed rape genotypes a mechanism seems to be existing, which reduces the penetration efficiency and thus also the disease incidence. In the wild *Brassica* species a quantitative physiological resistance can be found, which reduces the rate of spread in plant material. This until now unused mechanism seems to be a possibility to increase resistance in breeding material, assumed that the described screening methods are used. Despite this mechanism sources of resistance have been found in Chinese oilseed rape cultivars. These cultivars also decrease the rate of spread but have no effect on the infectionefficiancy. The use of these sources of resistance in field experiments, which are the third and maybe most important method in breeding for resistance, was not possible. On the one hand the resynthesized oilseed rape made out of the wild species was not available. On the other hand the Chinese cultivars show an insufficient winter hardiness.

There were several similarities between cultivars in field experiment 2007/08, in which no material from the breeders has been used, and the UFOP (Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V.) variety trials, which are conducted on several locations and in several years. Because of this it was possible to demonstrate

the reliability and the significance of the field experiments. A prerequisite is therefore a sufficient disease level, which can not be guaranteed because of changing climatic conditions.

Artificial inoculations of roots under greenhouse conditions at different temperatures besides the observation of spring infestation in the field, indicate infection of roots in the field in the beginning of the growing season. Wounds, caused by insects or frost, may play an important role in this kind of infection. Differences in reaction of the used cultivars were not very obvious in spring infestation.

In further experiments a resistant cultivar as a standard for greenhouse screenings and oxalic acid assays should be created by transformation of the spring oilseed rape cultivar Drakkar. For this reason a gene coding for oxalate oxydase and a gene coding for oxalate decarboxylase was used. A successful transformation and expression of the inserted genes has been demonstrated. Nevertheless in none of the phenotyped transformation events an influence of the genes on the phenotype could be observed. Beside the reaction of this transgenic material on the pathogen itself in greenhouse experiments, an oxalic acid assay was conducted to observe the effect of oxalic acid itself. Because even in this assay there was no influence of the genes on the phenotype a missing or incorrect transcription, an insufficient activity of the enzymes or an insufficient amount of the enzyme in the tissue can be suggested.

Over all it can be stated, that suitable screening methods for further breeding have been developed and possible sources of resistance have been identified. Thus tools are available for breeders to increase resistance of oilseed rape against *S. sclerotiorum*.

7 Literaturverzeichnis

Abawi, G. S. und Barker, K. R. (1984). Effects of cultivar, soil temperature, and levels of *Meloidogyne incognita* on root necrosis and Fusarium wilt of tomatoes. *Phytopathology*, 74, 433-438.

Abawi, G. S. und Grogan, R. G. (1979). Epidemiology of Diseases Caused by *Sclerotinia* Species. *Phytopathology*, 69, 899-904.

Abawi, G. S. und Grogan, R. G. (1974). Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 65, 300-309.

Achbani, E. H., Tourvieille de Labrouhe, D. und Vear, F. (1996). Resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to terminal bud attack by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *European Journal of Plant Pathology*, 102(5), 421-429.

Adams, P. B. und Tate, C. J. (1976). Mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* on soil. *Plant Disease Reporter*, 60, 515-518.

Ahlers, S. (2006). Untersuchungen zur Anfälligkeit verschiedener Rapssorten gegenüber dem Erreger der Weißstängeligkeit *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Bachelorarbeit, Georg-August-Universität Göttingen.

Analytis, S. und Kranz, J. (1972). Über die Korrelation zwischen Befallshäufigkeiten und Befallstärke bei Pflanzenkrankheiten. *Phytopathology*, 73, 201-207.

Anonymus. (2006). Beschreibende Sortenliste 2006, Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln). Landbuchverlag, Hannover.

Anonymus. (2007). Beschreibende Sortenliste 2007, Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln). Landbuchverlag, Hannover.

Anonymus. (2009). Beschreibende Sortenliste 2009, Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln). Landbuchverlag, Hannover.

Anonymus. (2011a). National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (März. 31, 2011).

Anonymus. (2011b). Primer3Plus. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> (März. 31, 2011).

Anonymus. (2011c). LGC Standards. <http://www.lgcstandards-atcc.org/> (März. 04, 2011).

Auclair, J., Boland, G. J., Cober, E., Graef, G. L., Steadman, J. R., Zilka, J. und Rajcan, I. (2004). Development of a new field inoculation technique to assess partial resistance in soybean to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Science*, 84, 57-64.

Barber, J., Garson, M. J. und Staunton, J. (1981). The biosynthesis of fungal metabolites: Sclerin, a plant growth hormone from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2584-2593.

de Bary, A. (1887). Comparative Morphology and Biology of the Fungi, Mycetozoa and Bacteria. Clarendon Press, Oxford.

Bennett, A. J., Leifert, C. und Whipps, J. M. (2005). Effect of Combined Treatment of Pasteurisation and *Coniothyrium minitans* on Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in Soil. *European Journal of Plant Pathology*, 113(2), 197-209.

Billon-Grand, G., Poussereau, N. und Fèvre, M. (2002). The extracellular proteases secreted in vitro and in planta by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology*, 150, 507–511.

Birnboim, H. C. (1983). Rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in enzymology*, 100.

Boland, G. J. und Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16, 93-108.

Brändle, F. und Spring, O. (2003). Pathogen-induzierte Stressreaktionen der Sonnenblume. *Gesunde Pflanzen*, 55(1), 21–27.

Breuer, F. (2011). Mündliche Mitteilung.

Burdon, J. J. und Chilvers, G. A. (1982). Host density as a factor in plant disease ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 20(1), 143–166.

Castaño, F., Hémery-Tardin, M. C., Tourvieille de Labrouhe, D. und Vear, F. (1991). The inheritance and biochemistry of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* leaf infections in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, 58(3), 209-219.

Castaño, F., Vear, F. und Tourvieille de Labrouhe, D. (2001). The genetics of resistance in sunflower capitula to *Sclerotinia sclerotiorum* measured by mycelium infections combined with ascospore tests. *Euphytica*, 122(2), 373-380.

Cessna, S. G., Sears, V. E., Dickman, M. B. und Low, P. S. (2000). Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant. *The Plant Cell Online*, 12(11), 2191 -2200.

Chipps, T. J., Gilmore, B., Myers, J. R. und Stotz, H. U. (2005). Relationship between oxalate, oxalate oxidase activity, oxalate sensitivity, and white mold susceptibility in *Phaseolus coccineus*. *Phytopathology*, 95, 292–299.

Chun, D., Kao, L. B. und Lockwood, J. L. (1987). Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 71(9), 811-815.

Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rascle, C. und Fèvre, M. (2003). Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS microbiology letters*, 227(2), 163–169.

Cunha, W. G., Tinoco, M. L. P., Pancoti, H. L., Ribeiro, R. E. und Aragão, F. J. L. (2010). High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. *Plant Pathology*, 59(4), 654-660.

Dallal Bashi, Z., Hegedus, D. D., Buchwaldt, L., Rimmer, S. R. und Borhan, M. H. (2010). Expression and regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* necrosis and ethylene-inducing peptides (NEPs). *Molecular Plant Pathology*, 11(1), 43-53.

Degener, J., Melchinger, A. E., Gumber, R. K. und Hahn, V. (1998). Breeding for Sclerotinia resistance in sunflower: A modified screening test and assessment of genetic variation in current germplasm. *Plant Breeding*, 117(4), 367-372.

Dickman, M., Kabbage, M., Williams, B. und Kim, H. (2010). *Sclerotinia sclerotiorum* via oxalic acid creates a reducing environment in the host which is required for pathogenic success. *Phytopathology - 2010 APS Annual Meeting*, 100(6), 160.

Dillard, H. R. und Cobb, A. C. (1995). Relationship between leaf injury and colonization of cabbage by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Protection*, 14(8), 677-682.

Donaldson, P. A., Anderson, T., Lane, B. G., Davidson, A. L. und Simmonds, D. H. (2001). Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(6), 297-307.

Dong, X., Ji, R., Guo, X., Foster, S. J., Chen, H., Dong, C., Liu, Y., Hu, Q. und Liu, S. (2008). Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (Brassica napus). *Planta*, 228(2), 331-340.

Dunker, S. (2006). Untersuchungen zur Schadwirkung von *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib. de Bary) und *Verticillium longisporum* (comb. nov. Karapapa) in Winterraps (*Brassica napus*). Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

Dunker, S. und Tiedemann, A. v. (2004). Disease/yield loss analysis for Sclerotinia stem rot in winter oilseed rape. *IOBC wprs Bulletin „Integrated Control in Oilseed Crops“*, 27 (10), 59-66.

Durman, S., Menendez, A. und Godeas, A. (2005). Variation in oxalic acid production and mycelial compatibility within field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(12), 2180-2184.

Ekins, M. G., Aitken, E. A. B. und Goulter, K. C. (2007). Aggressiveness among isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* from sunflower. *Australasian Plant Pathology*, 36(6), 580–586.

Ender, M., Terpstra, K. und Kelly, J. D. (2007). Marker-assisted selection for white mold resistance in common bean. *Molecular Breeding*, 21(2), 149-157.

Fan, Z. X., Lei, W. X., Sun, X. L., Yu, B., Wang, Y. Z. und Yang, G. S. (2008). The association of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance with glucosinolates in *Brassica napus* double-low DH population. *Journal of Plant Pathology*, 90(1), 43–48.

Fei, W. X., Hu, B. C., Li, Q. S., Wu, X. J., Chen, F. X. und Hou, S. M. (2004). Evaluation and screening of rapeseed varieties resistance to sclerotinia stem rot. *15th International Plant Protection Congress, Beijing, China*.

Ferrar, P. H. und Walker, J. R. L. (1993). o-Diphenol oxidase inhibition-an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43(6), 415-422.

Fraissinet-Tachet, L. und Fevre, M. (1996). Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current microbiology*, 33(1), 49–53.

Garg, H., Li, H., Sivasithamparam, K., Kuo, J. und Barbetti, M. J. (2010). The infection processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in cotyledon tissue of a resistant and a susceptible genotype of *Brassica napus*. *Annals of Botany*, 106(6), 897-908.

Garg, H., Sivasithamparam, K., Banga, S. S. und Barbetti, M. J. (2008). Cotyledon assay as a rapid and reliable method of screening for resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus* genotypes. *Australasian Plant Pathology*, 37(2), 106–111.

Gerlagh, M., Goossen-Van De Geijn, H. M., Fokkema, N. J. und Vereijken, P. F. G. (1999). Long-term biosanitation by application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*-infected crops. *Phytopathology*, 89(2), 141–147.

Gerlagh, M., Whipps, J. M., Budge, S. P. und Goossen-Van de Geijn, H. M. (1996). Efficiency of isolates of *Coniothyrium minitans* as mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *European journal of plant pathology*, 102(8), 787–793.

Glue, J. B. (2009). Engineering Allium White Rot Disease Resistance in Allium Species and Tobacco Model Species. Masterarbeit, University of Canterbury, Canterbury.

Godoy, G., Steadman, J. R., Dickman, M. B. und Dam, R. (1990). Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 37(3), 179-191.

Grau, C. R. (1984). Effects of Cultivars and Cultural Practices on Sclerotinia Stem Rot of Soybean. *Plant Disease*, 68, 56-58.

Grison, R., Grezes-Besset, B., Schneider, M., Lucante, N., Olsen, L., Leguay, J.-J. und Toppan, A. (1996). Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nature Biotechnology*, 14(5), 643-646.

Gugel, R. K. und Morrall, R. A. A. (1986). Inoculum-disease relationship in sclerotinia stem rot of rapeseed in Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8, 89-96.

Guimaraes, R. und Stotz, H. (2004). Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiology*, 136(3), 3703-3711.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A. und Tiedemann, A. v. (2009). Phytomedizin Grundwissen Bachelor. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580.

Hannusch, D. J. und Boland, G. J. (1996). Influence of Air Temperature and Relative Humidity on Biological Control of White Mold of Bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Phytopathology*, 86, 156-162.

Harikrishnan, R. und del Río, L. E. (2006). Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. *Plant disease*, 90(7), 946–950.

Heaney, R. K. und Fenwick, G. R. (1980). The glucosinolate content of Brassica vegetables. A chemotaxonomic approach to cultivar identification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(8), 794–801.

Hedke, K. (1992). Weiterführende Untersuchungen zum mycoparasitischen Abbau von Sklerotien von *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary in Gewächshaus und Feld. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

Hegedus, D. D. und Rimmer, S. R. (2005). *Sclerotinia sclerotiorum*: When ‚to be or not to be‘ a pathogen? *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 177-184.

Heitefuss, R. (2000). Pflanzenschutz: Grundlagen der praktischen Phytomedizin. Thieme, Stuttgart.

Heppner, C. (1995). Nachweis von *Verticillium dahliae* Kleb. im Boden mit Plattenguss-verfahren und ELISA (Enzyme-Linked-Immonosorbent Assy) sowie Untersuchungen zur Auswirkung des Inokuloms auf den Befall von Winterraps (*Brassica napus* ssp. *oleifera* Metzg.). Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

Heran, A., Mc Cartney, H. A. und Li, Q. (1999). The effect of petal characteristics, inoculum density and environmental factors on infection of oilseed rape by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia*.

Hoes, J. A. und Huang, H. C. (1976). Importance of disease to sunflower in Manitoba in 1975. *Canadian Plant Disease Survey*, 56, 75–76.

Hoffman, D. D., Hartman, G. L., Mueller, D. S., Leitz, R. A., Nickell, C. D. und Pedersen, W. L. (1998). Yield and Seed Quality of Soybean Cultivars Infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 82(7), 826-829.

Holley, R. C. und Nelson, B. D. (1986). Effect of Plant Population and Inoculum Density on Incidence of Sclerotinia Wilt of Sunflower. *Phytopathology*, 76, 71-74.

Hollowell, J. E., Isleib, T. G., Tallury, S. P., Copeland, S. C. und Shew, B. B. (2008). Screening of virginia-type peanut breeding lines for resistance to Cylindrocladium black rot and Sclerotinia blight in the greenhouse. *Peanut Science*, 35(1), 18–24.

Hollowell, J. E., Shew, B. B. und Isleib, T. G. (2003). Evaluating isolate aggressiveness and host resistance from peanut leaflet inoculations with *Sclerotinia minor*. *Plant disease*, 87(4), 402–406.

Hu, X., Bidney, D. L., Yalpani, N., Duvick, J. P., Crasta, O., Folkerts, O. und Lu, G. (2003). Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology*, 133(1), 170-181.

Huang, H. C. und Dueck, J. (1980). Wilt of sunflower from infection by mycelial-germinating sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2(2), 47-52.

Huang, H. C. und Hoes, J. A. (1980). Importance of plant spacing and sclerotial position to development of Sclerotinia wilt of sunflower. *Plant Disease*, 64(1), 81-84.

Huang, H. C. (1985). Factors affection myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 75, 433-437.

Huang, H. C. (2002). Screening Sunflower for Resistance to Sclerotinia Wilt. *Plant Pathology Bulletin*, 11, 15-18.

Huang, H. C. und Kozub, G. C. (1991). Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 32, 279-286.

Huang, H.-C. und Erickson, R. S. (2008). Factors Affecting Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* by Fungal Antagonists. *Journal of Phytopathology*, 156(10), 628-634.

Hudyncia, J., Shew, H. D., Cody, B. R. und Cubeta, M. A. (2000). Evaluation of wounds as a factor to infection of cabbage by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant disease*, 84(3), 316–320.

Jones, E. E. und Whipps, J. M. (2002). Effect of inoculum rates and sources of *Coniothyrium minitans* on control of *Sclerotinia sclerotiorum* disease in glasshouse lettuce. *European journal of plant pathology*, 108(6), 527–538.

Jurke, C. J. und Fernando, W. G. D. (2008). Effects of seeding rate and plant density on sclerotinia stem rot incidence in canola. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 41(2), 142-155.

Kabbage, M., Williams, B., Kim, H., Britt, R. und Dickmann, M. (2010). *Sclerotinia sclerotiorum* induces redox changes in the host cellular environment via oxalic acid. *Phytopathology - 2010 APS Annual Meeting*, 100, 58.

Kaiser, U. (2007). Epidemiologie von *Cercospora beticola* Sacc. und Befalls-Verlust-Relationen bei Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L.) in Abhängigkeit von der Anfälligkeit von Sorten und Konsequenzen für sortenspezifische Bekämpfungsschwellensysteme. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

Kerr, E. D., Steadmann, J. R. und Nelson, L. A. (1978). Estimation of white mold disease reduction of yield and components of dry edible beans. *Crop Science*, 18, 275-279.

Kesarwani, M., Azam, M., Natarajan, K., Mehta, A. und Datta, A. (2000). Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 7230-7238.

Keunecke, H. (2009). Einfluss von Kohlfliegenbefall auf die Infektion und Schadwirkung von *Verticillium longisporum* und *Phoma lingam* an Raps. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

Kim, K. S., Min, J. Y. und Dickman, M. B. (2008). Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(5), 605–612.

Kim, W. G. und Cho, W. D. (2003). Occurrence of Sclerotinia rot in cruciferous crops caused by *Sclerotinia* spp. *Plant Pathology Journal*, 19(1), 69–74.

Kirkegaard, J. A., Robertson, M. J., Hamblin, P. und Sprague, S. J. (2006). Effect of blackleg and sclerotinia stem rot on canola yield in the high rainfall zone of southern New South Wales, Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(2), 201-212.

Kleiner, A. und Eichel, K. (2009). EP verabschiedet neue EU-Pestizidpolitik. *Pressemitteilung Pressedienst, 20090112IPR45936.*

Knowles, C. F. und Hodgkinson, A. (1972). Automated enzymic determination of oxalic acid in human serum. *The Analyst*, 97(1155), 474-481.

Kobos, R. (1980). Enzyme electrode system for oxalate determination utilizing oxalate decarboxylase immobilized on a carbon dioxide sensor. *Analytica Chimica Acta*, 121(1), 110-118.

Koch, S. (2005). Entwicklung eines schlagspezifischen und schadensbezogenen Prognosemodells zur Bekämpfung von *Sclerotinia sclerotiorum* an Winterraps. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

Koch, S., Dunker, S., Kleinhenz, B., Röhrig, M. und Tiedemann, A. v. (2007). A crop loss-related forecasting model for Sclerotinia stem rot in winter oilseed rape. *Phytopathology*, 97(9), 1186–1194.

Kohn, L. M., Stasovski, E., Carbone, I., Royer, J. und Anderson, J. B. (1991). Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 81, 480-485.

Kolkman, J. M. K. und James, D. (2000). An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean. *Crop science*, 40(1), 281-285.

Kora, C., Mc Donald, M. R. und Boland, G. J. (2003). Sclerotinia rot of carrot: An example of phenological adaptation and bicyclic development by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant disease*, 87(5), 456–470.

Kull, L. S., Vuong, T. D., Powers, K. S., Eskridge, K. M., Steadman, J. R. und Hartman, G. L. (2003). Evaluation of resistance screening methods for Sclerotinia stem rot of soybean and dry bean. *Plant disease*, 87(12), 1471–1476.

Kull, L. S., Pedersen, W. L., Palmquist, D. und Hartman, G. L. (2004). Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant disease*, 88(4), 325–332.

Leone, G. und Tonneijck, A. E. G. (1990). A rapid procedure for screening the resistance of bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica*, 48(1), 87–90.

Li, C. X., Li, H., Siddique, A. B., Sivasithamparam, K., Salisbury, P., Banga, S. S., Banga, S., Chattopadhyay, C., Kumar, A., Singh, R., Singh, D., Agnihotri, A., Liu, S. Y., Li, Y. C., Tu, J., Fu, T. D., Wang, Y. F. und Barbetti, M. J. (2007). The importance of the type and time of inoculation and assessment in the determination of resistance in *Brassica napus* and *B. juncea* to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(12), 1198–1203.

Li, C. X., Li, H., Sivasithamparam, K., Fu, T. D., Li, Y. C., Liu, S. Y. und Barbetti, M. J. (2006). Expression of field resistance under Western Australian conditions to *Sclerotinia sclerotiorum* in Chinese and Australian *Brassica napus* and *Brassica juncea* germplasm and its relation with stem diameter. *Australian journal of agricultural research*, 57(10), 1131-1135.

Li, Y., Chen, J., Bennett, R., Kiddle, G., Wallsgrove, R., Huang, Y. und He, Y. (1999). Breeding, inheritance, and biochemical studies on *Brassica napus* CV Zhongyou 821: tolerance to. *Sclerotinia sclerotiorum* (stem rot). *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia*.

Li, Y., Kiddle, G., Bennett, R. N. und Wallsgrove, R. M. (1999). Local and systemic changes in glucosinolates in Chinese and European cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.) after inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* (stem rot). *Annals of Applied Biology*, 134(1), 45-58.

Liu, H., Guo, X., Naeem, M., Liu, D., Xu, L., Zhang, W., Tang, G. und Zhou, W. (2010). Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella xylostella* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Published online.

Liu, S., Wang, H., Zhang, J., Fitt, B. D. L., Xu, Z., Evans, N., Liu, Y., Yang, W. und Guo, X. (2005). In vitro mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Reports*, 24(3), 133-144.

Livingstone, D. M., Hampton, J. L., Phipps, P. M. und Grabau, E. A. (2005). Enhancing Resistance to *Sclerotinia minor* in Peanut by Expressing a Barley Oxalate Oxidase Gene. *Plant Physiology*, 137(4), 1354 -1362.

Lu, G. (2003). Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops. *African Journal of Biotechnology*, 2, 12.

Magro, P., Marciano, P. und Di Lenna, P. (1984). Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters*, 24(1), 9-12.

Mäkelä, M., Galkin, S., Hatakka, A. und Lundell, T. (2002). Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 542-549.

Marciano, P., Di Lenna, P. und Magro, P. (1983). Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiological Plant Pathology*, 22(3), 339–345.

Marciano, P., Magro, P. und Favaron, F. (1989). *Sclerotinia sclerotiorum* growth and oxalic acid production on selected culture media. *FEMS microbiology letters*, 61(1-2), 57–59.

Masirevic, S. und Gulya, T. J. (1992). Sclerotinia and Phomopsis–two devastating sunflower pathogens. *Field Crops Research*, 30(3-4), 271–300.

Mayton, H. S., Olivier, C., Vaughn, S. F. und Loria, R. (1996). Correlation of Fungicidal Activity of *Brassica* Species with Allyl Isothiocyanate Production in Macerated Leaf Tissue. *Phytopathology*, 86(3), 267-271.

Mehta, A. und Datta, A. (1991). Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*, 266(35), 23548-23553.

Mei, J., Qian, L., Disi, J. O., Yang, X., Li, Q., Li, J., Frauen, M., Cai, D. und Qian, W. (2010). Identification of resistant sources against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica* species with emphasis on *B. oleracea*. *Euphytica*, 177(3), 393-399.

Meier, U. (2001). Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.

Mithen, R. (1992). Leaf glucosinolate profiles and their relationship to pest and disease resistance in oilseed rape. *Euphytica*, 63(1), 71–83.

Mithen, R. F., Lewis, B. G. und Fenwick, G. R. (1986). In vitro activity of glucosinolates and their products against *Leptosphaeria maculans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 87(3), 433–440.

Mithen, R. F., Lewis, B. G., Heaney, R. K. und Fenwick, G. R. (1987). Resistance of leaves of *Brassica* species to *Leptosphaeria maculans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 88(4), 525–531.

Mithen, R. F., Lewis, B. G., Heaney, R. K. und Fenwick, G. R. (1987). Glucosinolates of wild and cultivated *Brassica* species. *Phytochemistry*, 26(7), 1969-1973.

Mylchreest, S. J. und Wheeler, B. E. J. (1987). A method for inducing apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, 36(1), 16-20.

Nandini, D., Mohan, J. S. S. und Singh, G. (2010). Induction of Systemic Acquired Resistance in *Arachis hypogaea* L. by *Sclerotinia rolfsii* Derived Elicitors. *Journal of Phytopathology*, 158(9), 594–600.

Nelson, B. D., Hertsgaard, D. M. und Holley, R. C. (1989). Disease Progress of Sclerotinia Wilt of Sunflower at Varying Plant Populations, Inoculum Densities, and Environments. *Phytopathology*, 79(12), 1358-1363.

Noyes, R. D. und Hancock, J. G. (1981). Role of oxalic acid in the Sclerotinia wilt of sunflower. *Physiological Plant Pathology*, 18(2), 123–132.

Pedras, M. S. C. und Ahiahonu, P. W. K. (2004). Phytotoxin production and phytoalexin elicitation by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of chemical ecology*, 30(11), 2163–2179.

Peltier, A. J. und Grau, C. R. (2008). The Influence of Light on Relationships Between Sclerotinia Stem Rot of Soybean in Field and Controlled Environments. *Plant Disease*, 92(11), 1510–1514.

Peltier, A. J., Hatfield, R. D. und Grau, C. R. (2009). Soybean stem lignin concentration relates to resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 93(2), 149–154.

Peltier, A. J., Hatfield, R. D. und Grau, C. R. (2004). *Sclerotinia sclerotiorum* does not detectably modify or metabolize lignin in mature soybean stems. *2004 North Central Division Meeting Abstracts*, <http://www.apsnet.org/members/divisions/nc/meetings/Pages/2004MeetingAbstracts.aspx> (Apr. 8, 2011).

Pope, S. J., Varney, P. L. und Sweet, J. B. (1989). Susceptibility of cultivars of oilseedrape to *Sclerotinia sclerotiorum* and the effect of infection on yield. *Aspects of applied biology*, 23, 451-456.

Porter, L. D., Hoheisel, G. und Coffman, V. A. (2009). Resistance of peas to *Sclerotinia sclerotiorum* in the Pisum core collection. *Plant Pathology*, 58(1), 52–60.

Poussereau, N., Gente, S., Rascle, C., Billon-Grand, G. und Fèvre, M. (2001). aspS encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 194(1), 27–32.

Pratt, R. G. (1996). Screening for Resistance to *Sclerotinia trifoliorum* in Alfalfa by Inoculation of Excised Leaf Tissue. *Phytopathology*, 86, 923-928.

Pundir, C. S. und Kuchhal, N. K. (1989). Detection of an oxalate oxidase in grain sorghum roots. *Phytochemistry*, 28(11), 2909–2912.

Rahmanpour, S., Backhouse, D. und Nonhebel, H. M. (2009). Induced tolerance of *Sclerotinia sclerotiorum* to isothiocyanates and toxic volatiles from *Brassica* species. *Plant Pathology*, 58(3), 479-486.

Requena, L. und Bornemann, S. (1999). Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme. *Biochemical Journal*, 343(1), 185-190.

Rewerts, T. (2003). Entwicklung und Validierung von Methoden zum Screening der Anfälligkeit von Winterraps gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum*. Masterarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

del Rio, L. E., Bradley, C. A., Henson, R. A., Endres, G. J., Hanson, B. K., Mc Kay, K., Halvorson, M., Porter, P. M., Le Gare, D. G. und Lamey, H. A. (2007). Impact of Sclerotinia stem rot on yield of canola. *Plant disease*, 91(2), 191–194.

Rönicke, S., Hahn, V., Horn, R., Grone, I., Brahm, L., Schnabl, H. und Friedt, W. (2004). Interspecific hybrids of sunflower as a source of Sclerotinia resistance. *Plant Breeding*, 123(2), 152-157.

Rosa, E. A. S., Heaney, R. K., Rego, F. C. und Fenwick, G. R. (1994). The variation of glucosinolate concentration during a single day in young plants of *Brassica oleracea* var *acephala* and *capitata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(4), 457–463.

Rudloff, J. A. E. R. (2010). Charakterisierung von *Brassica*-Wildarten und deren Verwendung für Resynthesen. Bachelorarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

Sedun, F. S., Seguin-Swartz, G. und Rakow, G. F. W. (1989). Genetic variation in reaction to Sclerotinia stem rot in Brassica species. *Canadian Journal of Plant Science*, 69(1), 229-232.

Seguin-Swartz, G. und Lefol, C. (1999). Sclerotinia stem rot resistance in crucifers. *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia*.

Shimada, M., Akamtsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K. und Hattori, T. (1997). Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *Journal of Biotechnology*, 53(2-3), 103–113.

Siebold, M. und Tiedemann, A. v. (2011). Potential effects of global warming on oilseed rape pathogens in Northern Germany. *Fungal Ecology*, in Press.

Stotz, H. U., Sawada, Y., Shimada, Y., Hirai, M. Y., Sasaki, E., Krischke, M., Brown, P. D., Saito, K. und Kamiya, Y. (2011). Role of Camalexin, Indole Glucosinolates, and Side Chain Modification of Glucosinolate-Derived Isothiocyanates in Defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Plant Journal*, Accepted Article.

Teo, B. K., Verma, P. R. und Morrall, R. A. A. (1992). The effects of herbicides and mycoparasites at different moisture levels on carpogenic germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant and soil*, 139(1), 99–107.

Teran, H. und Singh, S. P. (2009). Efficacy of three greenhouse screening methods for the identification of physiological resistance to white mold in dry bean. *Canadian Journal of Plant Science*, 89(4), 755–762.

Thompson, C., Dunwell, J. M., Johnstone, C. E., Lay, V., Ray, J., Schmitt, M., Watson, H. und Nisbet, G. (1995). Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase. *Euphytica*, 85(1), 169–172.

Tiedemann, A. v. (1997). Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50(3), 151-166.

Toal, E. S. und Jones, P. W. (1999). Induction of systemic resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* by oxalic acid in oilseed rape. *Plant pathology*, 48(6), 759–767.

Tokoroyama, T., Kamikawa, T. und Kubota, T. (1968). The structure of sclerin, a metabolite of *Sclerotinia libertiana*. *Tetrahedron*, 24(5), 2345–2355.

Tokoroyama, T., Maeda, S., Nishkawa, T. und Kubota, T. (1969). The synthesis of sclerin. *Tetrahedron*, 25(5), 1047–1054.

Trutmann, P., Keane, P. J. und Merriman, P. R. (1980). Reduction of sclerotial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Coniothyrium minitans*. *Soil Biology and Biochemistry*, 12(5), 461-465.

Tschöpe, B. und Kleinhenz, B. (2010). SkleroPro Validierungsergebnisse 2010. Datenversand SkleroPro.

Tu, J. C. (1985). Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. *Physiologial Plant Pathology*, 26(1), 111–117.

Tu, J. C. (1989). Oxalic acid induced cytological alterations differ in beans tolerant or susceptible to white mould. *New Phytologist*, 112(4), 519–525.

Tu, J. C. (1997). An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 38, 73-76.

Twengström, E., Sigvald, R., Svensson, C. und Yuen, J. (1998). Forecasting Sclerotinia stem rot in spring sown oilseed rape. *Crop Protection*, 17(5), 405–411.

Unger, C., Kleta, S., Jandl, G. und Tiedemann, A. v. (2005). Suppression of the Defence-Related Oxidative Burst in Bean Leaf Tissue and Bean Suspension Cells by the Necrotrophic Pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 153(1), 15–26.

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP). (2004). Sortenversuche 2003 mit Winterraps, Ackerbohne, Futtererbsen und Sonnenblumen. UFOP Schriften, Eigenverlag.

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP). (2005). Sortenversuche 2004 mit Winterraps und Sonnenblumen. UFOP Schriften, Eigenverlag.

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP). (2006). Sortenversuche 2005 mit Winterraps, Futtererbsen und Sonnenblumen. UFOP Schriften, Eigenverlag.

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP). (2007). Sortenversuche 2006 mit Winterraps und Sonnenblumen. UFOP Schriften, Eigenverlag.

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP). (2008). Sortenversuche 2007 mit Winterraps. UFOP Schriften, Eigenverlag.

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP). (2009). Sortenversuche 2008 mit Winterraps, Ackerbohne, Futtererbsen und Sonnenblumen. UFOP Schriften, Eigenverlag.

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP). (2010). Sortenversuche 2009 mit Winterraps, Futtererbsen und Sonnenblumen. UFOP Schriften, Eigenverlag.

Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (UFOP). (2011). Anbau von Raps 2004 - 2009 in ha. <http://www.ufop.de/3809.php> (Apr. 20, 2011).

Viji, G., Uddin, W., O'Neill, N. R., Mischke, S. und Saunders, J. A. (2004). Genetic diversity of *Sclerotinia homoeocarpa* isolates from turfgrasses from various regions in North America. *Plant disease*, 88(11), 1269–1276.

Vuong, T. D., Hoffman, D. D., Diers, B. W., Miller, J. F., Steadman, J. R. und Hartman, G. L. (2004). Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop science*, 44(3), 777-783.

Walz, A., Zingen-Sell, I., Loeffler, M. und Sauer, M. (2008). Expression of an oxalate oxidase gene in tomato and severity of disease caused by *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, 57(3), 453–458.

Walz, A., Zingen-Sell, I., Theisen, S. und Kortekamp, A. (2007). Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 120(4), 317-330.

Wang, H., Liu, G., Zheng, Y., Wang, X. und Yang, Q. (1999). Breeding of a *Brassica napus* cultivar Zhongshuang No. 9 with high resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and dynamics of its important defense enzyme activity. *Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark*.

Wang, Z., Mao, H., Dong, C., Ji, R., Cai, L., Fu, H. und Liu, S. (2009). Overexpression of Brassica napus MPK4 enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(3), 235–244.

Wegulo, S. N., Yang, X. B. und Martinson, C. A. (1998). Soybean cultivar responses to Sclerotinia sclerotiorum in field and controlled environment studies. *Plant disease*, 82(11), 1264–1270.

Weiss, A., Kerr, E. D. und Steadman, J. R. (1980). Temperature and moisture influences on development of white mold disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) on Great Northern beans. *Plant Disease*, 64(8), 757-759.

Whipps, J. M., Budge, S. P., Mc Clement, S. und Pink, D. A. C. (2002). A glasshouse cropping method for screening lettuce lines for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108(4), 373–378.

Willetts, H. J. und Wong, J. A.-L. (1980). The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *Botanical Review*, 46(2), 101-165.

Winter, M. (2011). Mündliche Mitteilung.

Wu, B. M. und Subbarao, K. V. (2008). Effects of soil temperature, moisture, and burial depths on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Phytopathology*, 98(10), 1144–1152.

Yanar, Y. und Miller, S. A. (2003). Resistance of Pepper Cultivars and Accessions of *Capsicum* spp. to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant disease*, 87(3), 303–307.

Yang, X., Wang, H., Liu, G. und Wang, X. (2007). The lignin biosynthesis regulation and its relationship with Sclerotinia and lodging resistance for Brassica napus. *12th International Rapeseed Congress. Wuhan, China*.

Young, C. S., Clarkson, J. P., Smith, J. A., Watling, M., Phelps, K. und Whipps, J. M. (2004). Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant pathology*, 53(4), 387–397.

Yue, B., Radi, S. A., Vick, B. A., Cai, X., Tang, S., Knapp, S. J., Gulya, T. J., Miller, J. F. und Hu, J. (2008). Identifying quantitative trait loci for resistance to Sclerotinia head rot in two USDA sunflower germplasms. *Phytopathology*, 98(8), 926–931.

Zhao, J. und Meng, J. (2003). Detection of loci controlling seed glucosinolate content and their association with Sclerotinia resistance in *Brassica napus*. *Plant breeding*, 122(1), 19–23.

Zhao, J., Peltier, A. J., Meng, J., Osborn, T. C. und Grau, C. R. (2004). Evaluation of Sclerotinia stem rot resistance in oilseed *Brassica napus* using a petiole inoculation technique under greenhouse conditions. *Plant disease*, 88(9), 1033–1039.

Zhu, Q., Maher, E. A., Masoud, S., Dixon, R. A. und Lamb, C. J. (1994). Enhanced Protection Against Fungal Attack by Constitutive Co-expression of Chitinase and Glucanase Genes in Transgenic Tobacco. *Nature Biotechnology*, 12(8), 807-812.

Zou, Q. J., Liu, S. Y., Dong, X. Y., Bi, Y. H., Cao, Y. C., Xu, Q., Zhao, Y. D. und Chen, H. (2007). In vivo measurements of changes in pH triggered by oxalic acid in leaf tissue of transgenic oilseed rape. *Phytochemical Analysis*, 18(4), 341-346.

8 Anhang

Tab. 1A: Acker- und pflanzenbauliche Maßnahmen im Sortenversuch 2007/2008 am Standort Göttingen (Schlag „Hinter der Bahn“, Weende)

Vorfrucht	15.07.07	Ernte Wintergerste
Bodenbearbeitung	13.08.07	Pflug mit Packer
Saatbettbereitung	26.08.07	Kreiselegge und Walze
Aussaat	28.08.07	Parzellendrillmaschiene 50 kf K/m²
Sklerotinia Inokulation	29.04.08	Sklerotinia Sprühinokulation
	08.05.08	Sklerotinia Sprühinokulation
	15.04.08	Sklerotinia Sprühinokulation
N_{min}	20.02.08	30,8 kg N/ha
1. N- Düngung	25.02.08	SSA (170 kg/ha) = 35,7 kg N/ha
2. N- Düngung	28.02.08	80 kg N/ha (AHL)
3. N- Düngung	09.04.08	80 kg N/ha (AHL)
N_{gesamt} (incl. N_{min})		226,5 kg N/ha
S- Düngung	25.02.08	SSA (170 kg/ha) = 40,8 kg S/ha
Pflanzenschutz		
1. Herbizid	29.08.07	VA: 1,7 l/ha Brasan, 0,7 l/ha Butisan
2. Herbizid	16.10.07	1 l/ha Gallant Super
1. Wachstumsregler	16.10.07	0,7 l/ha Moddus, 0,4 l/ha CCC 720
2. Wachstumsregler	01.04.08	0,6 l/ha Moddus, 0,3 l/ha CCC 720
1. Fungizid	05.10.07	2 l/ha Eria
2. Fungizid	12.04.08	2 l/ha Eria
3. Fungizid	07.05.08	0,5 kg /ha Cantus
1. Insektizid	05.10.07	0,15 l/ha Karate
2. Insektizid	16.10.07	0,3 l/ha Decis
3. Insektizid	01.04.08	0,1 l/ha Fastac SC
Schneckenkorn	30.08.07	Pro Limax ca.6 kg/ha
Ernte	25.07.08	

Tab. 2A: Acker- und pflanzenbauliche Maßnahmen im Sortenversuch 2008/2009 am Standort Göttingen (Schlag „Große Breite“, Weende)

Vorfrucht	03.07.08	Ernte Wintergerste
Bodenbearbeitung	13.08.08	Pflug mit Packer
Saatbettbereitung	13.08.08	Kreiselegge und Walze
Aussaat	14.08.08	Parzellendrillmaschiene 50 kf K/m²
Sklerotinia Inokulation	08.12.08	Sklerotien ausgestreut
N_{min}	03.03.09	13,1 kg N/ha
1. N- Düngung	03.03.09	SSA (170 kg/ha) = 35,7 kg N/ha
2. N- Düngung	17.03.09	80 kg N/ha (AHL)
3. N- Düngung	02.04.09	80 kg N/ha (AHL)
N_{gesamt} (incl. N_{min})		208,8 kg N/ha
S- Düngung	03.03.09	SSA (170 kg/ha) = 40,8 kg S/ha
Pflanzenschutz		
1. Herbizid	15.08.08	VA: 2,5 l/ha Nimbus
2. Herbizid	08.09.08	0,5 l/ha Agil S
1. Wachstumsregler	16.09.08	0,7 l/ha Caramba
2. Wachstumsregler	07.04.09	0,7 l/ha Moddus, 0,4 l/ha CCC 720
1. Fungizid	28.04.09	0,5 kg/ha Cantus
1. Insektizid	08.09.08	0,15 l/ha Sumicidin Alpha EC
2. Insektizid	07.04.09	0,1 l/ha Fastac super
3. Insektizid	16.04.09	0,3 l/ha Biscaya
Schneckenkorn	20.08.08	ca.6 kg/ha Spiess Urania
Ernte	27.07.09	

Tab. 3A: Acker- und pflanzenbauliche Maßnahmen im Sortenversuch 2009/2010 am Standort Göttingen (Schlag „Dragoneranger“, Weende)

Vorfrucht	16.07.09	Ernte Wintergerste
Bodenbearbeitung	14.08.09	Pflug mit Packer
Saatbettbereitung	18.08.09	Kreiselegge und Walze
Aussaat	20.08.09	Parzellendrillmaschiene 50 kf K/m²
Sklerotinia Inokulation	19.11.09	Sklerotien ausgestreut
N_{min}	08.03.10	40,9 kg N/ha
1. N- Düngung	10.03.10	SSA (170 kg/ha) = 35,7 kg N/ha
2. N- Düngung	18.03.10	80 kg N/ha (AHL)
3. N- Düngung	09.04.10	80 kg N/ha (AHL)
N_{gesamt} (incl. N_{min})		236,6 kg N/ha
S- Düngung	10.03.10	SSA (170 kg/ha) = 40,8 kg S/ha
Pflanzenschutz		
1. Herbizid	22.08.09	VA: 3,5 l/ha Colzor Trio
2. Herbizid	17.09.09	0,5 l/ha Agil S
1. Wachstumsregler	28.09.09	0,6 l/ha Caramba
2. Wachstumsregler	08.04.10	0,7 l/ha Moddus, 0,4 l/ha CCC 720
1. Fungizid	05.05.10	0,5 kg/ha Cantus
2. Fungizid	10.05.10	0,5 kg/ha Cantus
1. Insektizid	17.09.09	0,1 l/ha Fastac Super
2. Insektizid	28.09.09	0,05 l/ha Karate Zeon
3. Insektizid	08.04.10	0,2 l/ha Trebon
4. Insektizid	20.04.10	0,3 l/ha Biscaya
5. Insektizid	27.04.10	0,3 l/ha Biscaya
Schneckenkorn	26.08.09	ca.6 kg/ha FCS
Ernte	31.07.10	

Tab. 4A: Acker- und pflanzenbauliche Maßnahmen im Sortenversuch 2008/2009 am Standort Peine (Schlag „Atila“)

Vorfrucht		Wintergerste
Bodenbearbeitung		Pflug mit Packer
Saatbettbereitung		Kreiselegge und Walze
Aussaat	28.08.08	50 kf K/m²
Sklerotinia Inokulation	12.08.08	Sklerotien ausgestreut
N_{min}		34 kg N/ha
1. N- Düngung	08.09.08	NPK (16+9+14+3) = 48 kg N/ha
2. N- Düngung	20.03.09	99 kg N/ha (Piamon 33-S)
3. N- Düngung	02.04.09	69 kg N/ha (Harnstoff)
N_{gesamt} (incl. N_{min})		250 kg N/ha
S- Düngung	20.03.09	36 kg S/ha (Piamon 33-S)
Pflanzenschutz		
1. Herbizid	04.09.08	2,5 l/ha Butisan Top
2. Herbizid	16.09.08	0,8 l/ha Fusilade Max
1. Fungizid	14.04.09	0,5 kg/ha Cantus Gold
1. Insektizid	16.09.08	0,05 l/ha Karate Zeon
2. Insektizid	06.04.09	0,15 l/ha Talstar
3. Insektizid	14.04.09	0,3 l/ha Biscaya
Schneckenkorn	08.09.08	ca.3,5 kg/ha

Tab. 5A: Acker- und pflanzenbauliche Maßnahmen im Sortenversuch 2009/2010 am Standort Peine (Schlag „Atila“)

Vorfrucht		Wintergerste
Bodenbearbeitung		Pflug mit Packer
Saatbettbereitung		Kreiselegge
Aussaat	29.08.09	50 kf K/m²
Sklerotinia Inokulation	24.10.09	Sklerotien ausgestreut
N_{min}		30 kg N/ha
1. N- Düngung	11.09.09	41 kg N/ha (Kalkammonsalpeter)
2. N- Düngung	05.03.10	91 kg N/ha (Ammonsulfatsalpeter)
3. N- Düngung	06.04.10	81 kg N/ha (Kalkammonsalpeter)
N_{gesamt} (incl. N_{min})		243 kg N/ha
S- Düngung	05.03.10	49 kg S/ha (Ammonsulfatsalpeter)
Pflanzenschutz		
1. Herbizid	10.09.09	2,5 l/ha Butisan Top
2. Herbizid	17.09.09	0,8 l/ha Fusilade Max
1. Fungizid	08.04.10	2 l/ha Nutribor
2. Fungizid	28.04.10	0,5 kg/ha Cantus Gold
3. Fungizid	26.05.10	0,5 kg/ha Cantus Gold
1. Insektizid	17.09.09	0,3 l/ha Decis
2. Insektizid	08.04.10	0,13 l/ha Talstar
3. Insektizid	19.04.10	0,13 l/ha Talstar

Tab. 6A: Acker- und pflanzenbauliche Maßnahmen im Sortenversuch 2008/2009 am Standort Poel

Bodenbearbeitung		Pflug mit Packer
Aussaat	02.09.08	50 kf K/m²
Sklerotinia Inokulation	10.12.08	Sklerotien ausgestreut
N_{min}		30 kg N/ha
1. N- Düngung	16.09.08	25 kg N/ha (NPK, 5-12-24-4-7)
2. N- Düngung	03.03.09	77 kg N/ha (NPK, 11-8-16-4-10)
3. N- Düngung	18.03.09	27 kg N/ha (Kalkammonsalpeter)
N_{gesamt} (incl. N_{min})		159 kg N/ha
1. S- Düngung	16.09.08	35 kg S/ha (NPK, 5-12-24-4-7)
2. S- Düngung	16.09.08	70 kg S/ha (NPK, 11-8-16-4-10)
S_{gesamt}		105 kg S/ha
Pflanzenschutz		
1. Herbizid	17.08.08	2,5 l/ha Devrinol FL
2. Herbizid	17.08.08	2,5 l/ha Ipifluor
3. Herbizid	30.08.08	3 l/ha Roundup Ultra Max
4. Herbizid	09.10.08	1 l/ha Fusilade Max
1. Fungizid	17.08.08	2 kg/ha Contans WG
2. Fungizid	13.10.08	0,3 kg/ha Cantus Gold
3. Fungizid	13.10.08	0,5 l/ha Folicur
1. Insektizid	03.09.08	0,1 kg/ha Trafo WG
2. Insektizid	07.04.09	0,125 l/ha Talstar
3. Insektizid	14.04.09	0,125 l/ha Talstar
Ernte	22.07.09	

Tab. 7A: Acker- und pflanzenbauliche Maßnahmen im Sortenversuch 2009/2010 am Standort Poel

Bodenbearbeitung		Pflug mit Packer
Aussaat	28.08.09	50 kf K/m²
Sklerotinia Inokulation	10.08	Sklerotien ausgestreut
N_{min}		30 kg N/ha
1. N- Düngung	15.09.09	27 kg N/ha (Kalkammonsalpeter)
2. N- Düngung	09.03.10	80 kg N/ha (NPK, 20-8-8-3-4)
3. N- Düngung	01.04.10	40,5 kg N/ha (Kalkammonsalpeter)
N_{gesamt} (incl. N_{min})		182,5 kg N/ha
1. S- Düngung	09.03.10	16 kg S/ha (NPK, 20-8-8-3-4)
2. S- Düngung	24.03.10	66 kg S/ha (Kieserit)
S_{gesamt}		82 kg S/ha
Pflanzenschutz		
1. Herbizid	23.08.09	3 l/ha Glyphosat
2. Herbizid	28.08.09	2,5 l/ha Butisan Kombi
3. Herbizid	28.08.09	0,25 l/ha Centium 36 CS
4. Herbizid	25.09.09	0,5 l/ha Agil S
1. Fungizid	17.08.09	2 kg/ha Contans WG
2. Fungizid	19.05.10	1 l/ha Cercobin FL
3. Fungizid	10.08.10	1 kg/ha Contans WG
Ernte	07.08.10	

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas von Tiedemann für die Bereitstellung des Themas, der Hilfs- und Diskussionsbereitschaft aber auch für die gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Heiko Becker und Herrn Prof. Petr Karlovsky für das Korreferat bzw. die Teilnahme am Prüfungskomitee danken.

Für stets schnelle und unbürokratische Hilfe bei administrativen Fragen möchte ich Martina Bode danken.

Mein Dank nicht nur für Rat sondern auch für Tat gilt Evelin Vorbeck, Hubertus Reintke und Eugen Hodyl bei der Durchführung der Feld- und Gewächshausversuche.

Viel gelernt, diskutiert oder ausgetauscht habe ich mich mit Nazanin Zamani Noor, Dagmar Tacke, Jessica Knüfer, Mark Winter und Birger Koopmann. Danke dafür - es hat sich gelohnt!

Der Abteilung Pflanzenzüchtung, und hier besonders Rosemarie Clemens, gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Transformation, aber auch für den regen Austausch von Daten und Pflanzenmaterial und die Unterstützung bei züchterischen Fragestellungen.

Bei der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung (GFP) möchte ich mich zum einen für die Finanzierung des Projekts zum anderen aber auch für die gute Zusammenarbeit bei den Feldversuchen bedanken. Hierbei gilt mein besonderer Dank Herrn Andreas Girke und Herrn Stefan Abel, aber auch allen anderen Züchtern, die durch die Bereitstellung von Saatgut und Informationen zur Seite standen.

Für das immer überragende Arbeitsklima, den ein oder anderen Scherz, die stete Hilfsbereitschaft aber auch viele anregende Gespräche möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der Allgemeinen Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz bedanken. Ohne euch wäre die Zeit nicht so schön gewesen.

Lebenslauf

Name:	Tobias Wulf
Geboren am	22.03.1982 in Neustadt a. Rbge.
Familienstand:	Verheiratet
03/2008 - heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Georg-August-Universität Göttingen Department für Nutzpflanzenwissenschaften Fachgebiet für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz. Titel der Promotion: "Phänotypisierung von Raps- und anderen Brassica-Genotypen zur Identifizierung von Resistenzquellen gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum*"
10/2005 - 01/2008	Studium der Gartenbauwissenschaften, Leibniz Universität Hannover. Abschluss: M.Sc. Gartenbauwissenschaften
10.2002 - 09.2005	Studium der Gartenbauwissenschaften, Leibniz Universität Hannover. Abschluss: B.Sc. Gartenbauwissenschaften
07/2002 - 09/2002	Grundwehrdienst
1994 - 2002	Gymnasium Neustadt a. Rbge.
1992 - 1994	Orientierungsstufe Süd, Neustadt a. Rbge.
1988 - 1992	Grundschule Eilvese