

Aus der Abteilung für Allgemeine Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz
des Departments für Nutzpflanzenwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

**Phänotypisierung von Resistenzquellen und Charakterisierung von
Resistenzfaktoren in *Brassica*-Arten gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum*,
dem Erreger der Weißstängeligkeit.**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Kerstin Höch
geboren in Mühlhausen (Thüringen)

Göttingen, im Mai 2016

D 7

1. Referent: Prof. Dr. Andreas von Tiedemann

2. Referent: Prof. Dr. Petr Karlovsky

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen und Symbole.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung des Rapsanbaus in Deutschland.....	1
1.2 Der Lebenszyklus von <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	3
1.3 Pathogenitätsfaktoren von <i>S. sclerotiorum</i>	5
1.4 Pflanzenschutzstrategien zur Bekämpfung von <i>S. sclerotiorum</i> – einem Erreger mit breitem Wirtsspektrum	6
1.5 Resistenzquellen im Genus <i>Brassica</i> gegen die Weißstängeligkeit	9
1.6 Methoden zur Resistenzbewertung von <i>S. sclerotiorum</i>	10
1.7 Wirt-Pathogen-Interaktion in <i>B. napus</i> - <i>S. sclerotiorum</i>	11
1.8 Ziele dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien	16
2.2 Nährmedien und Lösungen	18
2.3 Herkunft, Vermehrung und Anzucht des Pilzisolats	22
2.4 Resistenzscreening von <i>Brassica</i> -Arten im Gewächshaus	23
2.4.1 Verwendetes Pflanzenmaterial	23
2.4.2 Pflanzenanzucht	26
2.4.3 Inokulationsmethode.....	27
2.4.3.1 Versuchsjahr 2012.....	27
2.4.3.2 Versuchsjahr 2013.....	28
2.4.4 Erfassung des Befalls	28
2.5 <i>In vivo</i> Blattsegmenttest von <i>Brassica</i> -Arten zur Oxalsäuresensitivität	30
2.5.1 Pflanzenmaterial und –anzucht.....	30
2.5.2 Blattsegmenttest modifiziert nach Wulf (2011)	30
2.5.3 Bestimmung der Anzahl der Spaltöffnungen	33

2.6	Resistenzcharakterisierung in <i>B. napus</i>	33
2.6.1	Behandlungen und experimentelle Bedingungen.....	33
2.6.2	Verwendetes Pflanzenmaterial und Pilzisolat.....	34
2.6.3	Pflanzenanzucht und Inokulation	34
2.6.4	Erfassung des Befalls	35
2.6.5	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.6.5.1	Probenahme und Aufbereitung	36
2.6.5.2	Realtime PCR Quantifizierung der Infektion mit <i>S. sclerotiorum</i>	36
2.6.5.3	Expression von Genen des Phenylpropanoidsyntheseweges	39
2.6.6	Physiologische Untersuchungen.....	44
2.6.6.1	Analyse der Zellwandzusammensetzung.....	44
2.6.6.2	Bestimmung der Festigkeit des Stängelgewebes.....	44
2.6.7	Histologische Untersuchungen	45
2.6.7.1	Probenahme und Fixierung des Stängelmaterials.....	45
2.6.7.2	Paraffinverfahren modifiziert nach Stüwe & von Tiedemann (2013).....	46
2.6.7.3	Histochemische Färbe- und Nachweismethoden an Paraffinschnitten	48
2.7	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Resistenzscreening von <i>Brassica</i> -Arten im Gewächshaus	51
3.1.1	Versuchsjahr 2012.....	51
3.1.2	Versuchsjahr 2013.....	53
3.2	<i>In vivo</i> Blattsegmenttest von <i>Brassica</i> -Arten zur Oxalsäuresensitivität	58
3.3	Vergleich von Gewächshauscreening und Blattsegmenttest.....	60
3.4	Interaktionsstudie zwischen <i>B. napus</i> und <i>S. sclerotiorum</i>	61
3.4.1	Identifizierung eines resistenten Standards für die Interaktionsstudie	61
3.4.2	Krankheitsausprägung in <i>B. napus</i>	62
3.4.3	Quantifizierung der Pathogenbiomasse in <i>B. napus</i>	64
3.4.4	Expression von Genen des Phenylpropanoidsyntheseweges	67
3.4.5	Zellwandzusammensetzung verschiedener <i>B. napus</i> Genotypen	72
3.4.5.1	Analyse der Zellwandzusammensetzung.....	72

3.4.5.2 Gewebefestigkeit des Rapsstängels	75
3.4.6 Korrelationsanalysen der Versuchsparameter	76
3.4.7 Einfluss der Infektion mit <i>S. sclerotiorum</i> auf die Phenol- und Lignineinlagerung in die sekundäre Zellwand	81
3.4.7.1 Akkumulation von Phenolen	82
3.4.7.2 Lignifizierung im Stängelgewebe	85
4 Diskussion	92
4.1 Resistenzausprägung unterschiedlicher <i>Brassica</i> -Arten gegen <i>S. sclerotiorum</i> im Gewächshaus	92
4.2 Resistenzbewertung anhand des Blattsegmenttests zur Oxalsäuresensitivität	99
4.3 Bewertung der verwendeten Resistenzprüfmethoden	102
4.4 Resistenzausprägung gegen <i>S. sclerotiorum</i> der <i>B. napus</i> Genotypen für die Interaktionsstudie	106
4.5 Rolle der Zellwandabwehr in der Interaktion <i>B. napus</i> und <i>S. sclerotiorum</i>	107
4.5.1 Resultate der Zellwandanalysen	107
4.5.2 Expression von Schlüsselgenen des Phenylpropanoidsyntheseweges	109
4.5.3 Histologische Untersuchungen zur Phenolakkumulation und Lignineinlagerung	111
4.6 Rolle der Zellwand bei der Abwehr von <i>S. sclerotiorum</i> in Raps	113
5 Schlussfolgerung	115
6 Zusammenfassung	117
7 Summary	120
8 Literatur	123
9 Anhang	147
Danksagung	162
Lebenslauf	164
Eidesstattliche Erklärung	165

Abkürzungen und Symbole

00-Sorte	Doppelnullsorte
Abb.	Abbildung
AULPC	Area under Lesion Progress Curve
BBCH	Codierung der phänotypischen Entwicklungsstadien von Raps
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSL	Bundessortenliste
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
dpi	Tage nach Inokulation
E	Effizienz
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division
FM	Frischmasse
g	Gramm
x g	x-fache der Erdbeschleunigung
G-Lignin	Guaiacyl-Lignin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
GWH	Gewächshaus
h	Stunde
Ha	Hektar
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IE	Inokulationseffizienz

IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben
l	Liter
m	Meter
m ²	Quadratmeter
M	Molar
max.	maximal
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
Mha	Millionen Hektar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
Mt	Millionen Tonnen
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
μS	Mikrosiemens
N	Normal
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
norm.	normalisiert
n.s.	nicht signifikant
OA	Oxalsäure
PCD	Programmierter Zelltod
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
pmol	Pikomol
ppm	Parts per million
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
QTL	Quantitative Trait Loci
rel.	relativ

rel. LF	relative Luftfeuchte
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Schwefel
SD	Standardabweichung
S-Lignin	Syringyl-Lignin
s.o.	siehe oben
Ss	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
t	Tonne
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TG	Trockengewicht
UFOP	Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V.
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
§	Paragraph
±	mehr oder weniger
Ø	Durchmesser

1 Einleitung

1.1 Die Entwicklung des Rapsanbaus in Deutschland

Raps (*Brassica napus* L.) ist im Vergleich zu anderen Kulturarten eine sehr junge Kulturpflanze aus der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae). Neben Weizen und Mais ist Raps eine der ökonomisch wichtigsten Ackerkulturen weltweit. Die Züchtung von Doppelnultrapssorten (00-Raps) zu Beginn der 80iger Jahre (Brauer, 2011), führte zu einer qualitativen Verbesserung des Rapses, wodurch dieser endgültig zu einer wertvollen Kulturpflanze wurde. Durch die Reduktion der natürlich vorkommenden Abwehrstoffe Erucasäure (weniger als 2% im Öl) und Glucosinolate (insgesamt max. 25 $\mu\text{mol/g}$ im gerösteten Rapsschrot) im Raps, konnten Rapsöle fortan als Speiseöle und das Schrot als proteinreiches Futtermittel in der Tierernährung eingesetzt werden (Mohr & Funk, 2011). Im Verlauf der Jahre 2000 bis 2013 wurden im Mittel rund 29 Millionen Hektar (Mha) Raps pro Jahr auf der ganzen Welt angebaut, wobei jährlich ca. 52 Millionen Tonnen (Mt) Raps produziert wurden (FAOSTAT, 2016). Die Europäische Union (EU) gehört mit einem Anteil von 32% an der Rapsproduktion zu den führenden Rapsproduktionsgebieten der Welt. Im Wettbewerb um die fünf führenden Produktionsländer von Raps liegt China mit einem Produktionsanteil von 24% (12,4 Mt) an erster Stelle, dicht gefolgt von Kanada mit 20% (10,4 Mt), Indien mit 12,5% (6,5 Mt), Deutschland mit 9,4% (4,8 Mt) und Frankreich mit 8,4% (4,3 Mt) (FAOSTAT, 2016).

In der europäischen Landwirtschaft gehört Raps zu den wichtigsten Ölsaaten mit zunehmendem Anbau. In der EU zählt Deutschland mit 26% der EU-weiten Rapsproduktion (24,3 Mt) im Jahr 2014 zu den wichtigsten Anbauregionen (Abb. 1, UFOP 2016a). In den Jahren von 2010 bis 2015 wurden durchschnittlich 1,3 Mha Ackerfläche mit Raps bewirtschaftet (Abb. 1, FAOSTAT, 2016; Statistische Bundesamt, 2016a). Diese machten rund 12% der gesamten Ackerfläche in Deutschland aus. Der gestiegene Anbau beruht auf diversen ökonomischen und ökologischen Vorteilen. Neben den ernährungsphysiologisch hochwertigen Fettsäuren von Rapsöl kann dieses zusätzlich als Rohmaterial in Produkten wie Biodiesel oder Schmierstoffen verwendet werden. Im Jahr 2014 wurden 3 Mt Raps allein zur Biodieselproduktion in Deutschland gewonnen (UFOP, 2016b). Die Überreste aus der Rapsproduktion, der Rapskuchen, dienen als eiweißreiches Futtermittel in der Tierernährung.

Die Kulturpflanze Raps an sich bietet zahlreiche agronomische Vorteile. Aufgrund ihres schnellen Wachstums und der langen Bedeckung des Bodens verhindert Raps die Auswaschung von stickstoffhaltigen Verbindungen und die Erosion des Bodens während

der Wintermonate. Die tiefe Durchwurzelung des Bodens verbessert die Bodenstruktur und führt zu einer Humusanreicherung. Die starke Biomasseproduktion unterdrückt das Wachstum von Unkräutern. Aufgrund dieser Eigenschaften hat Raps einen hohen Vorfruchtwert für den Anbau vor anderen Kulturen (Christen, 2011; Diepenbrock, 2011).

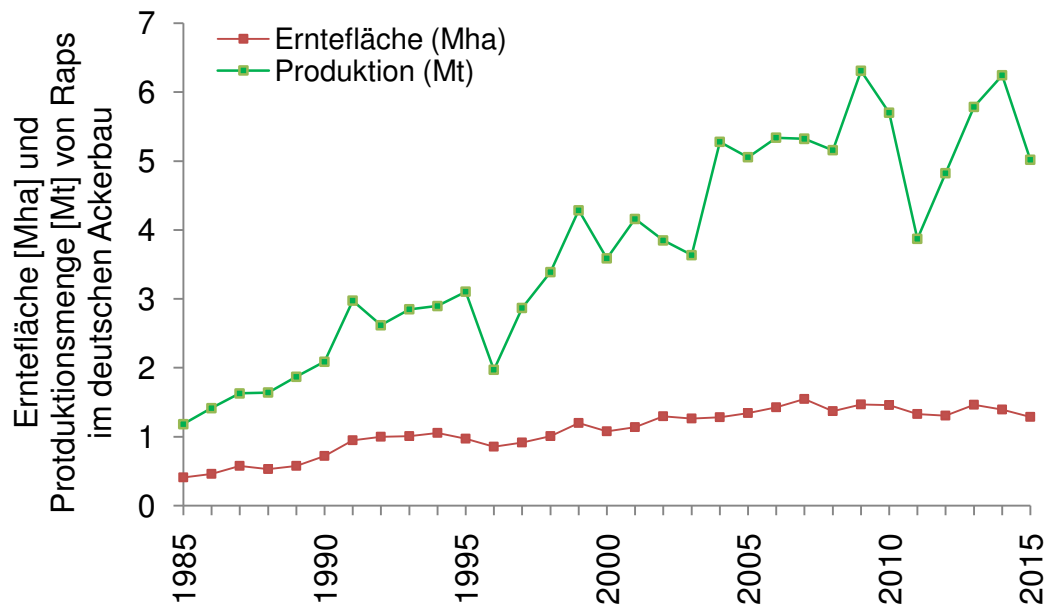


Abb. 1 Übersicht zur Erntefläche und Produktionsmenge von Raps in Deutschland über die Zeitspanne von 1985 bis 2015. Als Quelle diente FAOSTAT (2016) und das Statistische Bundesamt (2016 a, b).

Bedingt durch die gestiegene Nachfrage kam es in Deutschland über die letzten zwei Jahrzehnte zu einem Anstieg der Rapsanbaufläche um ca. 880 Tausend ha, eine Steigerung von 214% (FAOSTAT, 2016; Statistisches Bundesamt, 2016a). Aufgrund der zunehmenden Intensivierung des Rapsanbaus im deutschen Ackerbau und der damit einhergehenden Einengung und Vereinfachung der Fruchtfolge rücken Untersuchungen zum Befall durch Schaderreger und Pathogene vermehrt in den Fokus der Wissenschaft (Garbe, 1999). Neben den bodenbürtigen Krankheitserregern der Wurzelhals- und Stängelfäule *Leptosphaeria maculans* anamorph: *Phoma ligam* und der Rapswelke *Verticillium longisporum* ist auch der Erreger der Weißstängeligkeit im Raps, *Sclerotinia sclerotiorum*, von wirtschaftlicher Bedeutung. *S. sclerotiorum* kommt besonders im gemäßigttem Klima vor, vorwiegend in küstennahen Regionen, Talkesseln und geschützten Lagen mit hoher Luftfeuchte (Willets et al., 1980; von Tiedemann & Steinbach, 2011). Mittlerweile ist es in allen Winter- und Sommerrapsanbauregionen auffindbar (Paul, 2003).

1.2 Der Lebenszyklus von *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary gehört innerhalb der Ascomyzeten zur Klasse der Discomyzeten und zählt somit zum Reich der Echten Pilze (de Bary, 1887). Der Pilz besitzt gestielte, schüsselförmige Apothezien, welche nicht durch eine Membran verschlossen und somit ein Merkmal der Ordnung Helotiales sind. Die Bildung langfristiger Dauerstrukturen gehört zu den Charakteristika der Familie der Sclerotiniaceae (Kosasih & Willetts, 1975; Hoffmann & Schmutterer, 1989). Von diesen bodenbürtigen Dauerstrukturen geht der Befall der Pflanzen aus. Im Raps sind zwei Wege bekannt, durch die eine Infektion mit *S. sclerotiorum* hervorgerufen werden kann (Bolton et al., 2006). Bei der myzeliogenen Keimung des Sklerotiums werden vor allem unterirdische Pflanzenteile sowie die Stängelbasis durch Myzel infiziert. Dies geschieht über direkten Kontakt mit der Wurzel sowie den oberirdischen Teilen junger Rapspflanzen (McQuilcken et al., 1994). Von Tiedemann & Steinbach (2011) berichten von einem frühzeitigen Befall an Jungpflanzen des Rapses vor dem Erreichen des BBCH-Stadiums 30 im Frühjahr, welcher vorwiegend nach milden Wintern auftrat und zu Totalausfällen der Rapspflanzen führte. Eine größere Bedeutung hat der karpogene Lebenszyklus, die Infektion über die sexuell gebildeten Ascosporen. Eine asexuelle Infektion über Konidiosporen ist bei *S. sclerotiorum* nicht bekannt, weshalb das Pathogen als monozyklisch eingestuft wurde (Hallmann et al., 2007).

Bei dem karpogenen Lebenszyklus keimen aus den Sklerotien von *S. sclerotiorum* ein bis mehrere gestielte Fruchtkörper, die Apothezien, aus. Die Keimung erfolgt in der Regel im Frühjahr nach einer vorherigen Konditionierungsphase (Krüger, 1975; Dillard et al., 1995). Hierbei spielen eine ausreichende Bodenfeuchte, Temperaturen von 7 bis 16°C in den oberen Bodenschichten sowie das Alter und die Herkunft der Sklerotien eine entscheidende Rolle (Singh & Singh, 1983; Huang & Kozub, 1991; Dillard et al., 1995; Huang et al., 1998; Mila & Yang, 2008). Nur Sklerotien in den oberen Bodenschichten bis 5 cm unterhalb der Oberfläche sind in der Lage auszukeimen und Fruchtkörper zu bilden, während tiefer gelegene Sklerotien im Boden überdauern (Krüger, 1975; Singh & Singh, 1983; von Tiedemann & Steinbach, 2011). Die Anzahl gebildeter Apothezien ist nach Dillard et al. (1995) abhängig von der Größe der Sklerotien. Die trompetenförmigen sexuellen Fruchtkörper sind gelborange bis hellbraun und tragen mehrere Asci, welche die oval bis elliptischen Ascosporen enthalten (je 8 Ascosporen je Ascus, Kohn, 1979; von Tiedemann & Steinbach, 2011). Erreichen die reifen Apothezien eine bestimmte Größe, kommt es zum stoßartigen Ausschleudern der Ascosporen, welche durch den Wind verbreitet werden (Harthill & Underhill, 1976; Saur, 1983). Der Ascosporenausstoß ist ebenfalls abhängig von äußeren Umwelteinflüssen, wie der Luftfeuchtigkeit, der

Temperatur und der Beleuchtungsintensität (Ingold, 1971). Laut Venette (1998) können pro Apothezium bis zu 30 Mio. Sporen entlassen werden. Diese sind laut Ceasar & Pearson (1983) je nach Umweltbedingungen von mehreren Tagen bis zu einigen Stunden vital. Der Vorgang der Verbreitung und das Überleben der Ascosporen sind wichtige Faktoren für die erfolgreiche Infektion und den Lebenszyklus des Pathogens. Optimale Witterungsbedingungen sind hierbei entscheidend. Nach einer Studie von Clarkson et al. (2003) gilt, je höher die Temperatur und Luftfeuchtigkeit, desto geringer ist die Überlebenswahrscheinlichkeit der Ascosporen. Für eine erfolgreiche Keimung der Ascosporen muss das Temperaturoptimum zwischen 15 und 27°C liegen (Phillips, 1994; Young et al., 2004), wobei Clarkson et al. (2014) ein Temperaturoptimum von 21,7°C angeben. Nach Ceasar & Pearson (1983) wirken Temperaturen über 25°C schädlich auf das Überleben der Ascosporen. Als optimale Luftfeuchte für die Ascosporenkeimung gibt Krüger (1977) einen Bereich von 84 bis 92% an und Ahlers & Hindorf (1987) bestätigen, dass eine relative Luftfeuchte von 83% die unterste Grenze für die Keimung darstellt.

Die Ascosporen landen auf Blättern, Blüten und Stängeln des Rapses und keimen unter optimalen Bedingungen auf gealtertem oder abgestorbenem Gewebe aus (Krüger, 1976). Da die Ausbildung eines Keimschlauches einen hohen Energieaufwand für die Ascospore darstellt, ist die Verfügbarkeit von leicht zugänglichen Nährstoffen für die Keimung entscheidend (McLean, 1958; Jamaux et al., 1995). Im Raps spielen herabfallende Blütenblätter eine entscheidende Rolle bei der Infektion durch Ascosporen, da sie als primäre Nährstoffquelle für die Keimung genutzt werden können (Krüger, 1975; Ahlers, 1986; Jamaux et al., 1995; Bardin & Huang, 2001). Nach Schmoltdt (2014) konnte Myzelwachstum aus Ascosporen *in vitro* nur durch Blütenblätter (intakt oder gemahlen) ausgelöst werden, nicht jedoch über künstlich nachgeahmte Nährstofflösungen. Die Blütenblätter fallen herab und bleiben auf Blättern oder in den Achseln von Seitentrieben des Rapses hängen, wo später der Befall sichtbar wird (von Tiedemann & Steinbach, 2011). Die Ascospore penetriert zuerst das Blütenblatt mittels eines kurzen Keimschlauchs und bildet eine Schicht aus verzweigten Hyphen auf der Blütenblattoberfläche. Die entstandenen Infektionshyphen wachsen weiter Richtung Blatt- und/oder Stängeloberfläche und bilden dort ein Infektionskissen aus übereinandergelagerten Hyphen. Nach der Ausbildung eines Appressoriums erfolgt die initiale Infektion des Blattes, des Blattstiels oder des Stängels über mechanischen Druck auf die Kutikula oder über natürliche Öffnungen (Lumsden, 1979; Lumsden & Wergin, 1980; Tariq & Jeffries, 1984; Jamaux et al., 1995). Das Pathogen breitet sich innerhalb der Pflanze aus und führt letztendlich zum Absterben des befallenen Pflanzengewebes. In dem nekrotischen Gewebe entwickelt sich aus dem Myzel die 0,5 bis 2 cm langen und

1 bis 5 mm breiten Sklerotien, welche meist erst beim Drusch entweder auf den Acker fallen oder in den Rapsstängeln verbleiben und dann durch Bodenbearbeitungsmaßnahmen in die Bestandsflächen eingearbeitet werden (Paul, 2003; Sharma et al., 2015). Diese Dauerstrukturen sind mehr als 10 Jahre lebensfähig und bilden den Ausgangspunkt für neue Infektionen im nächsten Anbaujahr (Adams & Ayers, 1979; McCartney & Lacey, 1999; von Tiedemann & Steinbach, 2011).

Krankheitssymptome treten meist erst nach der Rapsblüte stärker in Erscheinung, da die Infektion im Frühstadium meist unentdeckt bleibt. Bei Blattinfektionen kommt es zur Ausbildung kreisförmiger gräulicher Läsionen, welche keine scharfe Begrenzung zum gesunden Gewebe besitzen und häufig myzelbewachsene Blütenblätter aufweisen (Sharma et al., 2015). Bei Haupt- und Seitentrieben des Rapsstängels sind Symptome meist erst im späteren Befallsverlauf erkennbar. Die Infektion beginnt gewöhnlich im Bereich der Blattachsel oder des Seitentriebs, in dem die Blütenblätter hängen bleiben. Die Läsionen erscheinen zuerst wässrig und grau und breiten sich schnell aus (Sharma et al., 2015). Später umgibt die Läsion den gesamten Stängel und die Befallszone wirken trocken und weiß-gräulich ausgebleicht. Das Innere des nekrotischen Stängelgewebes ist mit weißem flockigem Myzel gefüllt, was zur frühzeitigen Welke und Austrocknung des Stängels führt (Bolton et al., 2006). Oberhalb des infizierten Bereichs kommt es zum Vergilben der Triebe und Schoten, welche notreif werden und vorzeitig absterben. Auch der unabhängige Befall von Schoten durch Ascosporen konnte beobachtet werden. Dieser führte zu einer grauen bis gelblichen Verfärbung und letztlich zum Vertrocknen der Schoten (Sharma et al., 2015). Herrscht während des Befalls hohe Luftfeuchtigkeit, kann die Myzelbildung auch auf den Ober- bzw. Außenflächen der Rapspflanze beobachtet werden (von Tiedemann & Steinbach, 2011). Die befallenen Stängel platzen auf und die gräulichen bis schwarzen Sklerotien werden sichtbar (Sharma et al., 2015).

1.3 Pathogenitätsfaktoren von *S. sclerotiorum*

S. sclerotiorum ist ein Pathogen mit nekrotropher Lebensweise, was bedeutet, dass es sich von abgestorbenem Gewebe ernährt (Purdy, 1979). Das Maß der Pathogenität bzw. der Virulenz wird durch die Kombination aus der Absonderung von Oxalsäure und der Aktivität von Zellwand-degradierenden Enzymen bestimmt (Favaron et al., 2004). Nach Infektion des Pflanzengewebes verzweigen sich die Infektionshyphen und breiten sich intra- und interzellulär aus (Ahlers, 1986). Die Hyphen setzen pektolytische Enzyme, z.B. Endo- und Exogalacturonasen, Pektinmethylesterasen und saure Proteasen frei, welche

die Zellmembran schädigen und zum Absterben der Zellen führen (Morrall et al., 1972; Riou et al., 1991; Billon-Grand et al., 2002; Reignault et al., 2008).

Eine besondere Rolle in der Pathogenese von *S. sclerotiorum* kommt der Oxalsäure zu (Kim et al., 2008; Williams et al., 2011). Sie ist entscheidend für den erfolgreichen Befall von Wirtspflanzen und fungiert als Initiator für die Wirkung pektolytischer Enzyme, als unspezifisch wirkendes Phytotoxin sowie als Signalmolekül zur Manipulation der Pflanzenabwehr, wie z.B. der Unterdrückung des ‚oxidativen burst‘ und der Induktion von Zelltodmechanismen in der Pflanze (Godoy et al., 1990; Cessna et al., 2000; Cotton et al., 2003; Kim et al., 2008; Williams et al., 2011). In den befallenen Zellen führt die Säure zur Absenkung des pH-Milieus und aufgrund der Chelatisierung von Calciumionen zum Verlust der Zellwandintegrität. Die große Bedeutung der Oxalsäure für die Infektion durch das Pathogen wurde durch eine Studie von Godoy et al. (1990) nochmals bestätigt. In dieser zeigten Oxalsäure-defiziente Mutanten von *S. sclerotiorum* neben dem Verlust der Oxalsäuresekretion eine verringerte Aktivität der pathogenrelevanten lytischen Enzyme, wodurch ihre Virulenz herabgesetzt war und sie die Wirtspflanze nicht mehr infizieren konnten.

Da die Sekretion von Oxalsäure eine hohe Relevanz für den Infektionserfolg des Pathogens besitzt (Godoy et al., 1990; Cessna et al., 2000), wurden Oxalsäurebehandlungen von Pflanzen für die Selektion von resistentem Material eingesetzt (Fang, 1993; Kolkman & Kelly, 2000; Bradley et al., 2006; Rahmanpour et al., 2011; Wulf, 2011).

1.4 Pflanzenschutzstrategien zur Bekämpfung von *S. sclerotiorum* – einem Erreger mit breitem Wirtsspektrum

Neben Raps besitzt dieser Schaderreger einen großen Wirtspflanzenkreis, deren Anzahl stetig zunimmt (Purdy, 1979; Boland & Hall, 1994; Saharan & Mehta, 2008; Sharma, 2014). Nach Boland & Hall (1994) gehören insgesamt ca. 64 Pflanzenfamilien mit 225 Gattungen und mehr als 408 Arten zum Wirtspflanzenspektrum von *S. sclerotiorum*. Eine neuere Untersuchung von Sharma (2014) berichtet von mehr als 500 Pflanzenarten unterschiedlichen phylogenetischen Hintergrundes, die durch das Pathogen befallen werden. Hierzu zählen die landwirtschaftlich relevanten Kulturen der Kreuzblütler, z.B. Raps, Kohl und Senf, Hülsenfrüchte, wie Erbsen und Bohnen, Korbblütler, z.B. Kopfsalat und Sonnenblume, Doldengewächse, wie Dill, Petersilie und Koriander, Nachtschattengewächse, z.B. Aubergine, Tomate sowie Gänsefußgewächse, wie Spinat (von Tiedemann & Steinbach, 2011). Zudem können nahezu alle im Raps bekannten Unkräuter (z.B. Ackerfuchsschwanz, Kamille, Hirtentäschelkraut) sowie andere

Wildkräuter und Zierpflanzen von dem Pathogen befallen werden (Saur & Löcher, 1984; Rashid, 2001; Paul, 2003; von Tiedemann & Steinbach, 2011). Saur & Löcher (1984) konnten sogar den Befall an Gerste unter Freiland- und Gewächshausbedingungen zeigen. Eine Untersuchung zur *in vitro* Keimung von Sklerotien und Apothezienbildung zeigte, dass Weizenkörner das beste Substrat darstellten (Liu & Paul, 2007).

Aufgrund dieses breiten Wirtsspektrums sowie der langen Überlebensdauer der Sklerotien unter Hitze- und Kältebedingungen im Boden muss bei der strategischen Bekämpfung über Fruchtfolgemaßnahmen, verstärkt auf die Sortenwahl und die Fruchtfolgeglieder geachtet werden (Coley-Smith & Cooke, 1971; Singh et al., 1985; Pottinger et al., 2008; Dölger et al., 2011; Christen, 2011; von Tiedemann & Steinbach, 2011). Beim Befallsmanagement über Fruchtfolgen sollten laut Steinbach et al. (2011) max. 25% Rapsanteil in der Fruchtfolge angebaut werden und Koch et al. (2007) empfehlen eine vierjährige Rotation von Raps in der Fruchtfolge zur Verringerung des Befallsrisikos mit dem Weißstängeligkeitserreger.

Neben der Bekämpfungsstrategie über die Fruchtfolgerotation ist die derzeit wirksamste Maßnahme zur Regulation des Befalls mit *S. sclerotiorum* eine Fungizidapplikation zum Zeitpunkt der Vollblüte (von Tiedemann & Steinbach, 2011). Da die Befallssymptome von *S. sclerotiorum*, wie oben näher ausgeführt, erst in der späteren Entwicklung sichtbar werden und eine kurative Fungizidbehandlung nicht möglich ist, erfolgt die Pflanzenschutzmaßnahme vorbeugend (Dunker, 2006; Koch, 2006). Diese Risikominderung über Behandlungen zur Vollblüte ist für viele Rapsbauern mittlerweile obligatorisch, da sie die größten Aussichten auf wirtschaftlichen Erfolg bringt (Steinbach et al., 2011). Beim Auslassen jeglicher Bekämpfungsmaßnahmen kann der Befall mit *S. sclerotiorum* zu Ertragsverlusten von bis zu 50% führen, da 1% Befallshäufigkeit zwischen 0,6 und 1,3% Ertragsverlust bewirkt (Pope et al., 1989; von Tiedemann & Steinbach, 2011). In einer Gegenüberstellung der Kosten zeigten del Río et al. (2007), dass bereits bei einem Auftreten von 17% Befall mit *S. sclerotiorum* die Höhe der Ertragsverluste den Ausgaben der Fungizidbehandlung entsprach. Da *S. sclerotiorum* nur unter bestimmten Witterungsbedingungen einen Befall auslöst, waren in früheren Untersuchungen lediglich etwa 33% der durchgeführten Fungizidmaßnahmen wirtschaftlich gerechtfertigt (Wahmhoff, 2000; Dunker & von Tiedemann, 2004; Dunker, 2006). Um eine gezieltere Fungizidapplikation zu erreichen, wurde das Prognosemodell SkleroPro entwickelt (Koch et al., 2007; Steinbach et al., 2011). Das Modell berechnet in Abhängigkeit von Witterung, Bestandesklima, Rapsentwicklung und erregerspezifischen

Faktoren den Zeitpunkt, an dem ein Befall mit *S. sclerotiorum* den Schadschwellenwert überschreitet und eine Fugizidapplikation wirtschaftlich sinnvoll ist.

Wegen der Problematik einer Resistenzbildung gegen Fungizide (Gossen et al., 2001; Ma et al., 2009), sowie des gesetzlich geforderten integrierten Pflanzenschutzes (Anonymus, 2012a) steigt die Nachfrage nach Alternativen zur chemischen Bekämpfung.

Die Befallsregulation über antagonistische Organismen findet bereits in der Praxis Anwendung. Die Applikation des mykoparasitären Pilzes *Coniothyrium minitans*, enthalten im Pflanzenschutzmittel Contans WG, führt zu einer signifikanten Reduktion der im Boden vorkommenden Sklerotien und der sich entwickelnden Apothezien (McQuilken et al., 1994; Hedke & Tiedemann, 1998; Luth, 2001). Andere biologische Antagonisten aus dem Reich der Pilze sind *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. und *Aspergillus* sp. (Sen, 2000; Rodriguez & Godeas, 2001; Singh & Kaur, 2001; Metha & Hieu, 2014). Einige bakterielle Antagonisten, welche zur Bekämpfung eingesetzt werden, beinhalten Arten der Gattungen *Bacillus* und *Pseudomonas* (Fernando et al., 2004, 2007; Metha & Hieu, 2014).

Aus ökologischer und ökonomischer Sicht stellt die Bereitstellung von *Sclerotinia*-resistentem Rapsmaterial die beste Alternative für eine auch in Zukunft weiter ansteigende Rapsproduktion dar. Jedoch sind in dem zur Verfügung stehenden Rapsortiment bisher keine hinreichend resistenten Sorten vorhanden (Wulf, 2011; Frauen, 2011). Nur einige chinesische Zuchtlinien, wie Zhongshuang 9 oder Zhongyou 821, stellen interessantes Zuchtmaterial dar (Li et al., 1999a; Wang et al., 2003; Wulf, 2011). Neben diesen Rapslinien bieten wilde *Brassica*-Arten (Navabi et al., 2010; Mei et al., 2011; Wulf, 2011; Uloth et al., 2013) und andere Kruziferen-Wildarten (Garg et al., 2010a; Uloth et al., 2013, 2014) ein gesteigertes Potential für die Resistenzzüchtung. Laut Jesske (2011) ist dies darin begründet, dass *Brassica*-Wildarten eine große genetische Distanz zu bisherig verwendeten Rapsmaterial aufweisen, weshalb sie als erfolgsversprechende Erweiterung des Rapsgenpools gelten.

Die Gattung *Brassica* umfasst insgesamt 39 Arten (Warwick et al., 2009), deren Ursprung in den drei diploiden Arten *Brassica rapa* L. (Rübsen, Genom AA), *Brassica oleracea* L. (Kohl, Genom CC) und *Brassica nigra* (L.) Koch (schwarzer Senf, Genom BB) liegen. Aus diesen sind durch allopolyploide Hybridisierung die drei Tetraploiden Arten *Brassica napus* (Raps, Steckrübe, Genom AACC), *Brassica carinata* A. Braun (Abessinischer Senf, Genom BBCC) und *Brassica juncea* L. Czern. (brauner oder indischer Senf, Genom AABB) hervorgegangen (U, 1935). Züchterische Verfahren ermöglichen die Herstellung

artübergreifender Kreuzungen in der Gattung *Brassica*, wodurch zahlreiche Kombinationen bekannter und wilder *Brassica*-Arten entstehen (Jesske, 2011).

1.5 Resistenzquellen im Genus *Brassica* gegen die Weißstängeligkeit

Wie bereits erwähnt gibt es bisher keine resistenten Sorten oder Linien von *B. napus*, welche kommerziell zu erwerben sind und in der Praxis Anwendung finden. Potential für züchterische Ansätze bieten einige chinesische Rapslinien (Wulf, 2011). Die Rapslinie Zhongyou 821 zeigte hervorragende Resistenzeigenschaften in Feldversuchen und konnte zusätzlich hohe Erträge erzielen (Li et al., 1999a). Wang et al. (2003) berichteten von der Rapslinie Zhongshuang 9, welche eine noch bessere Resistenz als Zhongyou 821 besitzen soll. Ein hohes Maß an Resistenz wurde kürzlich in der chinesischen *B. napus* Linie ZY006 unter kontrollierten Bedingungen und in Feldversuchen nachgewiesen (Li et al., 2008; Ge et al., 2012; Uloth et al., 2013). Partielle Resistenz konnte in anderen *B. napus* sowie *B. juncea* Genotypen aus China (Zhao et al. 2004; Garg et al., 2008; Li et al., 2008), Australien (Li et al., 2006, 2008) und Indien (Singh et al., 2008) identifiziert werden. Außerdem wurde hohe Resistenzlevel in anderen *Brassica*-Arten, wie denen der Kohlgruppe zugehörigen Arten *B. incana*, *B. rupestris*, *B. insularis*, *B. montana* und *B. villosa*, sowie Abessinischer (*B. carinata*) und Schwarzer Senf (*B. nigra*) berichtet (Navabi et al., 2010; Mei et al., 2011; Uloth et al., 2013). Wildformen der bekannten Gruppe *B. oleracea* scheinen verstärkte Resistenzeigenschaften zu besitzen. Bei der Resistenzbewertung von 55 resynthetisierten Rapslinien, welche aus sieben wilden und zwei kultivierten *B. oleracea* Arten stammten, wiesen die Rapsresynthesen stärkere Stängelresistenzen im Vergleich zur resistenten Sorte Zhongyou 821 auf (Ding et al., 2013).

Neben *Brassica*-Wildarten konnten verschiedene Forschungsgruppen in wilden Kruziferen-Arten Quelle für die Resistenzzüchtung entdecken. Lefol et al. (1997) sowie Seguin-Swartz & Lefol (1999) identifizierten die Französische Hundsrake (*Erucastrum gallicum*) als resistente Art. Wulf (2011) konnte in einigen Vertretern der *Erucastrum* sp. erhöhte Anfälligkeit nachweisen. Garg et al. (2010) konnten durch Hybridisierung dreier wilder Kruziferen, *Erucastrum cardaminoides*, *E. abyssinicum* und *Diplotaxis tenuisiliqua*, mit *B. napus* und *B. juncea* Introgressionslinien erzeugen, die verglichen mit einem Set von 55 verschiedenen *B. napus* und *B. juncea* Arten eine verstärkte Resistenz gegen *S. sclerotiorum* aufwiesen. Auch in anderen wilden Kruziferen-Arten, wie der Garten-Senf ruke (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*, Guan et al., 2004), dem Gemeinen Hirtentäschel (*Capsella bursa-pastoris* L. Medic, Chen et al., 2007) und Vertretern der

Rettichgattung *Raphanus* (Uloth et al., 2013) konnte ein hoher Grad an Resistenz gegen *S. sclerotiorum* festgestellt werden.

Neue Ansätze für die Resistenzzüchtung im Raps bietet die Entwicklung von genetisch veränderten Pflanzen, welche aufgrund erhöhter Abwehr (Wang et al., 2009, 2014) oder durch Reduktion bzw. Abbau der Oxalsäure (Thompson et al., 1995; Dong et al., 2008), dem wichtigsten Pathogenitätsfaktor von *S. sclerotiorum* (Cessna et al., 2000), geringere Anfälligkeiten gegen den Erreger der Weißstängeligkeit besitzen.

1.6 Methoden zur Resistenzbewertung von *S. sclerotiorum*

Es gibt zahlreiche Methoden zur Bewertung der Resistenz von *S. sclerotiorum* in Raps. Eine anerkannte Methode sind Feldversuche, da sie nahezu unter natürlichen Bedingungen eine Beurteilung des Befalls ermöglichen. Aufgrund schwankender Umweltbedingungen kann jedoch nicht immer ein gleichmäßiger Befall von *S. sclerotiorum* im Feld hervorgerufen werden, weshalb die Wahl der Inokulumquelle entscheidend für die erfolgreiche Durchführung von Feldscreenings ist (Bradley et al., 2006; Li et al., 2007). Neben den Witterungsbedingungen können auch Unterschiede in der Pflanzenarchitektur und den Blühverläufen zu verringertem Befallsvorkommen führen, welche fälschlicherweise als physiologische Resistenz interpretiert werden könnten (Phillips et al., 1990; Clarkson et al., 2014). Aufgrund der sehr variablen Bedingungen bei Feldversuchen war es notwendig, effiziente, günstige und zuverlässige Screeningmethoden zur Bewertung der Resistenz gegen *S. sclerotiorum* unter kontrollierten Bedingungen zu entwickeln (Bradley et al., 2006).

Im Laufe der Jahre etablierten sich verschiedene Methoden, welche zur Selektion von resistentem Material unter kontrollierten Bedingungen genutzt werden. Hierzu gehört die Inokulation von Pflanzen: im Keimblattstadium (Garg et al., 2008), an der ganzen Pflanze am Blatt (Rahmanpour et al., 2011), am Blattstiel (Zhao et al., 2004; Bradley et al., 2006) am Stängel (Li et al., 2008; Wulf, 2011), an abgetrennten Blättern (Bradley et al., 2006) oder Stängeln (Mei et al., 2012) sowie an Blattscheiben (Rahmanpour et al., 2011).

Auch für die Wahl des Inokulums bieten sich verschiedene Verfahren an. Anerkannte Inokulationsmethoden in Feldversuchen sind Inokulationen durch Ascosporen- (Rahmanpour et al., 2011), Myzelsuspension (Li et al., 2007; Wulf, 2011), myzelbewachsene Zahnstocher (Dunker, 2006; Yin et al., 2010) sowie das Ausbringen von Sklerotien (Wulf, 2011; Scott et al., 2014). Bei stark verseuchten Feldern wird meist der natürliche Befallsdruck genutzt (Kim et al., 2000; Li et al., 2007). Unter kontrollierten

Bedingungen kann ebenfalls über Myzel- (Chaocai, 1995; Dunker, 2006; Garg et al., 2008) sowie Ascosporensuspension (Koch et al., 2007; Eynck et al., 2012) inokuliert werden. Häufiger wird die Inokulation mit Myzelplug (Zhao et al., 2004; Li et al., 2008; Yin et al., 2010; Rahmanpour et al., 2011; Wulf, 2011) oder über infizierte Blütenblätter (Koch et al., 2007; Yin et al., 2010; Eynck et al. 2012) genutzt. Chaocai (1995), Kim et al. (2000), Hahn (2002) und Dalili (2013) verwendeten *S. sclerotiorum* befallene Hirse-, Roggen-, Hafer- und Weizenkörner als Inokulumquelle.

1.7 Wirt-Pathogen-Interaktion in *B. napus* - *S. sclerotiorum*

Für den erfolgreichen Befall einer Wirtspflanze durch ein Pathogen ist es wichtig, dass (1) der Schaderreger befähigt ist, den „Angriff“ auf die Pflanze durchzuführen, dass (2) die jeweilige Wirtspflanze auch anfällig gegenüber dem Schaderreger ist und dass (3) der geeignete Zeitpunkt für den Befall gegeben ist (Koinzidenz, Hallmann et al., 2007). Kommt es zu einer Interaktion zwischen einer Nicht-Wirtspflanze und einem Pathogen, so kann das Pathogen die Pflanze nicht befallen und es liegt eine inkompatible Interaktion vor (Prell & Day, 2001; Hallmann et al., 2007). Bei einer kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion kann ein Befall, abhängig von der Witterung und dem Entwicklungsstadium der Pflanze (Koinzidenz), durch den Schaderreger erfolgen. Wenn es dem Erreger gelingt, die Basisresistenz der Pflanze zu überwinden, können im Laufe der Pathogenese Symptome ausgeprägt werden, die jeweils charakteristisch für die vorliegende Wirt-Pathogen-Interaktion sind. Eine Pathogenabwehr der Pflanze erfolgt nach Erkennung des Erregers, entweder über exogene oder endogene Signale (Dixon & Lamb, 1990; de Wit, 2007). Im Laufe der Evolution haben Pflanzen komplexe und vielfältige Abwehrmechanismen zur Bekämpfung von Pathogenen entwickelt, welche entweder konstitutiv aktiv sind oder erst nach Befall induziert werden (Kunkel & Brooks, 2002). Für den polyphagen Erreger der Weißstängeligkeit, *S. sclerotiorum*, sind mehr als 500 kompatible Interaktionen mit Wirtspflanzen beschrieben (Sharma, 2014). Obwohl bereits mehrere partiell resistente *Brassica*-Arten identifiziert wurden, gestaltet sich die Züchtung resistenter Rapsorten als Herausforderung. Dies ist der Komplexität der Abwehrmechanismen geschuldet, welche in den verschiedenen *Brassica*-Arten unterschiedlich ausgeprägt sind (Sharma et al. 2015). Studien zur Ermittlung potentieller quantitativer Merkmalsregionen (Quantitative trait loci, QTL) berichten von monogenen und/oder polygenen Resistenzen, je nach *Brassica*-Art und untersuchtem Pflanzengewebe (Zhao & Meng, 2003a; Zhao et al., 2006). Während Zhao & Meng (2003a) je drei unterschiedliche QTLs für Blattresistenz im Keimlingsstadium und Stängelresistenz im Reifestadium im A- und C-Genom des Rapses detektierten, konnten Zhao et al. (2006) nach Keimblattinokulation von zwei

verschiedenen DH-Populationen insgesamt vier Regionen identifizieren, welche mit den beiden Resistenzbewertungsmethoden assoziiert waren. Jedoch wurde keine Übereinstimmung zwischen den QTLs der beiden getesteten Rapspopulationen detektiert. In der Studie von Mei et al. (2013) konnten zum ersten mal zwei QTLs auf dem Chromosom C09 identifiziert werden, welche sowohl mit der Blatt- als auch der Stängelresistenz assoziiert waren. Neben den phänotypischen Unterschieden des Pflanzenmaterials konnten Yin et al. (2010) nachweisen, dass je nach Inokulationsmethode die Anzahl der detektierten QTLs variierte. Eine potentielle Quelle für Resistenz gegen *S. sclerotiorum* könnte die lokale und systemische Induktion von Glucosinolaten spielen (Li et al., 1999b; Li et al., 2001; Zhao & Meng, 2003b; Zhao et al., 2009; Stotz et al., 2011). Li et al. (1999b, c) konnten in der resistenten chinesischen Rapslinie 014 (00-Sorte) eine erhöhte Induktion von Indolglucosinolat und 2-Phenylethylglucosinolat nachweisen, jedoch nicht in der resistenten Rapslinie 020 (double-high). Auch die bekannte chinesische Rapslinie Zhongyou 821, welche eine gesteigerte Resistenz gegen den Weißstängeligkeitserreger besitzt, produziert bei Befall mit *S. sclerotiorum* mehr Indolglucosinolat im Blattgewebe (Li et al., 1999a, 2001). Stotz et al. (2011) generierten *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit Defiziten in der Synthese des Phytoalexins Camalexin sowie Indol- und aliphatischen Glucosinolaten, welche sich als hochanfällig gegenüber *S. sclerotiorum* erwiesen.

Pflanzenhormone, wie Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenabwehr von Pflanzen. Das Signalmolekül Salizylsäure ist entscheidend für die Induktion der systemisch erworbenen Resistenz (systemic acquired resistance, SAR), welche mit einer Aktivierung von Pathogenese-bezogenen Proteinen (pathogen related proteins, PR) einhergeht und die Expression pflanzlicher Resistenzgene reguliert (Hallmann et al., 2007). Jasmonsäure und Ethylen können direkt Abwehrgene aktivieren, die z.B. zur Bildung von Phytoalexinen oder Lignin beitragen (Hallmann et al., 2007). Zusätzlich besitzen die beiden Hormone Signalfunktionen und sind entscheidend für die induzierte systemische Resistenz (induced systemic resistance, ISR). Beide Resistenzwege, sowohl SAR als auch ISR, führen zur Sensibilisierung der Pflanze, wodurch diese bei einem erneuten Befall schneller auf den Schaderreger reagieren kann (Hallmann et al., 2007). Studien in *A. thaliana* zeigten, dass der Befall mit biotrophen Pathogenen eher die Salizylsäure-bedingte Abwehr hervorruft, während Jasmonsäure und Ethylen regulierte Mechanismen eher bei nekrotrophen Pathogenen zu finden sind (Glazebrook, 2005).

Interaktionsstudien von *S. sclerotiorum* mit *B. napus* bestätigten die Rolle von Jasmonsäure und Ethylen bei der Pathogenabwehr (Guo & Stotz, 2007; Zhao et al., 2007;

Perchepped et al., 2010; Zhu et al., 2013). Jedoch scheint eine strikte Trennung von SAR und ISR überholt, da in einigen Studien neben der Induktion durch Jasmonsäure und Ethylen auch ein positiver Einfluss der Salizylsäure festgestellt werden konnte (Zhao et al., 2009; Wang et al., 2012; Nováková et al., 2014; Wang et al., 2014).

Neben Pflanzenhormonen sind reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), wie Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie das Hydroxylradikal (OH^\cdot), unabdingbar für die Abwehr der Pflanze. Die Freisetzung der ROS erfolgt durch den Mechanismus des ‚oxidative burst‘, welcher zusammen mit der Bildung von Stickoxiden zu den ersten postinfektionellen Abwehrreaktionen der Pflanze gehört (Hallmann et al., 2007; Scheler et al., 2013). Durch die Auslösung des ‚oxidative burst‘ kann (1) die hypersensitive Reaktion (hypersensitive reaction, HR) des Pflanzengewebes hervorgerufen werden, welche zu einem Absterben der Zellen durch den programmierten Zelltod (programmed cell death, PCD) führt, (2) vermehrt H_2O_2 freigesetzt werden, welches für den schnelleren Einbau von Lignin und Proteinen in die Zellwand benötigt wird und (3) die Aktivierung weiterer Signalkaskaden für Abwehrmechanismen wie SAR, ISR sowie eine Expression abwehrrelevanter Proteine induziert werden (Hallmann et al., 2007; Scheler et al., 2013). Interaktionsstudien von *B. napus* mit *S. sclerotiorum* belegten die Relevanz von Stickoxiden und ROS für eine erfolgreiche Pathogenabwehr (Cessna et al., 2000; Perchepped et al., 2010; Garg et al., 2013; Zhou et al., 2013). Williams et al. (2011) demonstrierten, dass von *S. sclerotiorum* sekretierte Oxalsäure die Reaktion des ‚oxidativen burst‘ zu Beginn der Infektion zunächst unterdrückt, dann aber im späteren Verlauf fördert. Diese Oxalsäure-gesteuerte Manipulation führt in der späteren Pathogenese zur Aktivierung der hypersensitiven Abwehrreaktion und folglich zum PCD. Die Auslösung des PCD ist ein Indiz für Anfälligkeit gegenüber *S. sclerotiorum*, da die Ausbreitung des nekrotrophen Erregers durch die Bereitstellung von leicht zugänglichen Nährstoffquellen gefördert wird (Kim et al., 2008; Williams et al., 2011; Garg et al., 2013; Niu et al., 2014). Rietz et al. (2012) und Garg et al. (2013) konnten bestätigen, dass in resistenten Genotypen der ‚oxidative burst‘ und die Freisetzung von ROS zu Beginn der Infektion hochreguliert wurden und im späteren Infektionsverlauf andere abwehrrelevante Enzyme den programmierten Zelltod verhinderten. Zusätzlich konnten Garg et al. (2013) eine erhöhte Expression von Proteinen für die Ethylenbiosynthese in dem resistenten Genotyp nachweisen. Ethylen spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion von PR-Proteinen und der Bildung von sekundären Stoffwechselprodukten, wie Vorstufen von Phytoalexinen, Melanin, Phytohormonen, Polyphenolen und Lignin (Broekaert et al., 2006; Hallmann et al., 2007).

Die Verstärkung der Zellwand und die Synthese von Phytoalexinen gelten als entscheidende Abwehrmechanismen der Pflanze. Die Zellwand kann durch die Anhäufung von Cellulose mit eingelagerten phenolischen Substanzen sowie durch Lignineinlagerungen anschwellen und verdicken, wodurch ihre Festigkeit und Stabilität unterstützt, der Abbau durch Zellwand-degradierende Enzyme vermindert sowie die Diffusion von pflanzlichen Nährstoffen und Pathogen-induzierten Toxinen eingeschränkt wird (Ride, 1978; Hallmann et al., 2007; Weng & Chapple, 2010). Die Bildung von Lignin, dessen phenolische Vorstufen sowie Vorstufen von Phytoalexinen erfolgt über den Phenylpropanoidsyntheseweg (Vogt, 2010). Dass die Synthese von Phenolen und Lignin eine wichtige Rolle bei der Interaktion von *S. sclerotiorum* mit anderen Wirtspflanzen spielt, wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen (Green et al., 1998; Rodríguez et al., 2004; Wally et al., 2008; Eynck et al., 2012).

Hierbei stellten Eynck et al. (2012) fest, dass in einer resistenten Linie von *Camelina sativa* mehr Phenylpropanoide sowie Monolignole gebildet wurden und folgerten, dass die Zellwandverstärkung durch Lignin eine wichtige Rolle für die Resistenz gegen Weißstängeligkeit spielt. Wu et al. (2013) identifizierten das Gen *Bna.C.IGMT5.a* als ein Gen aus dem Phenylpropanoidsyntheseweg für die Monolignolsynthese, welches sehr wahrscheinlich mit einem wichtigen QTL für *Sclerotinia*-Resistenz (LG C6) in *B. napus* gekoppelt ist. Neue histologische Studien in *B. napus* und *B. carinata* assoziierten verstärkte Lignifizierung im Gewebe des Stängels mit kleineren Läsionsausprägungen nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* (Uloth et al., 2015). In einer Expressionsstudie von Zhao et al. (2009) wurde aufgrund erhöhter Transkription von Genen des Phenylpropanoid- und des Glucosinolatsyntheseweges ebenfalls auf die mögliche Relevanz von sekundären Metaboliten bei der Abwehr von *S. sclerotiorum* in Raps hingewiesen. Garg et al. (2013) vermuteten, dass die Proteine, deren Genexpression in dem resistenten *B. napus* Genotyp Charlton hoch reguliert waren, die Bildung sekundärer Metabolite förderten und somit die Pathogenausbreitung im Wirtsgewebe verhinderten.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Trotz der umfangreichen Suche nach resistentem Material in der Forschung weltweit stehen Rapssorten bzw. -linien mit kompletter oder hoher Resistenz gegenüber *S. sclerotiorum* den Landwirten bisher nicht zur Verfügung.

Wie oben näher aufgeführt, bieten Wildformen bekannter *Brassica*-Arten eine Chance in der Resistenzzüchtung von Raps weiterzukommen.

Diese Suche nach neuen Resistenzquellen wurde in unserer Arbeitsgruppe in der Arbeit von Wulf (2011) bereits aufgegriffen und im Zuge des internationalen PLANT-KBBE III - Verbundvorhabens MONARCH (Resistenz von *Brassica napus* gegen Weißstängeligkeit – eine Herausforderung, Teilprojekt B) in dieser Arbeit weiter verfolgt.

Zusätzlich wurden weitere Akzessionen wilder *Brassica*-Arten mit in die Resistenzuntersuchungen gegen *S. sclerotiorum* einbezogen.

Die von Wulf (2011) eingesetzten Methoden zur Inokulation und zur Resistenzbewertung im Gewächshaus sowie im Labor wurden in dieser Arbeit angewandt, überprüft und optimiert. Dabei galt es besonders, die Reproduzierbarkeit und Relevanz des von Wulf (2011) entwickelten Gewächshauscreenings und des Blattsegmenttests zur Oxalsäuresensitivität zu evaluieren.

Um erfolgreiche Strategien gegen den Erreger der Weißstängeligkeit zu entwickeln, ist das Verständnis biologischer, physiologischer, biochemischer und genetischer Prozesse bei der Interaktion zwischen Raps und *S. sclerotiorum* von entscheidender Bedeutung. Wie bereits erwähnt, belegen inzwischen viele Daten, dass sekundäre Stoffwechselprodukte, wie phenolische Verbindungen und Lignin, dabei eine große Rolle spielen können.

Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Interaktionsstudie in zwei *B. napus* Genotypen mit gegensätzlicher Resistenzprägung vorgenommen. Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob die Zusammensetzung der sekundären Zellwand und deren Veränderung eine Rolle bei der Resistenzprägung gegen *S. sclerotiorum* spielt.

Hierfür lagen folgende Aspekte im Fokus der Untersuchungen:

- Identifizierung eines geeigneten *B. napus* Sets mit kontrastierender Resistenzprägung gegen den Weißstängeligkeitserreger,
- Zusammensetzung und Festigkeit der Zellwand des Stängelgewebes,
- Untersuchung der Expressionsmuster von Genen des Phenylpropanoid-syntheseweges über quantitative Realtime PCR,
- Histologische Detektion von Änderungen der Phenol- und Lignineinlagerungen in den sekundären Zellwänden verschiedener Gewebeschichten des Stängels nach Infektion mit *S. sclerotiorum*.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

In den folgenden Tabellen 1 und 2 sind die in den Versuchen verwendeten Chemikalien und Materialien gelistet. Eine Auflistung aller verwendeten Geräte ist dem Anhang zu entnehmen (Tab. 1A).

Tab.1 Verwendete Chemikalien unter Angabe der Hersteller

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Agar-Agar, Kobe-I	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Agarose Standard	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Agarose NEEQ Ultra Quality	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ammoniaklösung (25%)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ammoniumacetat (NH ₄ -Acetat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Archut Fruhstorfer Erde®	Hawita Gruppe GmbH, Vechta, D
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Chrom(III)kaliumsulfat-Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Diethyldicarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethanol	Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel, D
Ethidiumbromid (1%)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Gelatine Gold	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Glyzerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Hakaphos® blau	Compo Expert GmbH, Münster, D
Isoamylalkoholl	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumpermanganat (KMnO ₄)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Kartoffel-Glukose Agar (PDA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kartoffel-Glukose Boullion (PDB)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumacetat (NaO-Acetat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,

Chemikalien	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Natriumlaurylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
N-Laurosylsacrosin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Oxalsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Roti [®] -Plast (Paraffin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Phloroglucin	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis/Missouri, USA
Polyethylenglykol 6000 (PEG)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Polyvinylpyrrolidon K 30	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis/Missouri, USA
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Roggenmehl (Typ 997), Diamant	Aurora Mühle Hamburg GmbH, Hamburg, D
Roti [®] -Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Salzsäure (HCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Streptomycin-Sulfat	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL
Trichloressigsäure (TCA)	Merck KGaA, Darmstadt, D
TRIS-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (50 x)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
TRIS-Borat-EDTA (TBE) Puffer (10 x)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Trishydroxyaminomethan (TRIS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

Tab. 2 Verwendete Materialien

Materialien	Hersteller
Deckgläschen No.1 (24 x 60 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, D
Minisart® Spritzenfilter (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D
Objektträger ELKA ^{med} ECO	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, D
Parafilm M®	Bemis Company Inc., Wisconsin, USA
Petrischalen (92 x 16 mm, ohne Nocken)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Pilzanzuchtstüben (57 x 21 cm)	Saco2, Nevele, BE
Quali Microtest Plates, 384 Wells	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, D
Reaktionsgefäße (0,2; 1,5; 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Zellkultur Multiwell Platte, 24 Wells	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Zentrifugenröhrchen (15 & 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D

2.2 Nährmedien und Lösungen

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 (92 x 16 mm, Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) ausplattiert.

Halbkonzentrierter Kartoffel-Glucose Agar (Potato Dextrose Agar, PDA)

PDA	19,5 g
Agar	7,5 g
H ₂ O bidest.	1000 ml

Halbkonzentrierte Kartoffel-Glucose Boullion (Potato Dextrose Boullion, PDB)

PDB	13,25 g
H ₂ O bidest.	1000 ml

Roggenmehl-Quarzkiesgemisch (Heppner 1995)

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

Für die molekularen Untersuchungen wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

Diethylidcarbonat (DEPC) -behandeltes Wasser

DEPC	1 ml
Wasser	1 l

Zur Aktivierung des DEPC wurde das Gemisch über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend zur Deaktivierung autoklaviert.

RNA/DNA-Extraktionspuffer (Winter et al., 2013)

Tris/HCL	100 mM
LiCl	100 mM
EDTA	10 mM
SDS	1%

CTAB-Puffer, pH 8,0 (Brandfaß & Karlovsky, 2008)

Na-EDTA	20 mM
Sorbitol	130 mM
N-Laurosylsacrosin-Natriumsalz	30 mM
CTAB	20 mM
NaCl	800 mM
Polyvinylpyrrolidon K30	1%
Tris (1 M)	10 mM
dest. Wasser	1 Liter

1 x TE Puffer, pH 8

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Agarose-Trenngel für DNA (1%, exemplarisch)

Agarose Standard	1 g
TBE Puffer (0.5 x)	100 ml
Ethidiumbromid	3 µl

Agarose-Trenngel für RNA (2%, exemplarisch)

Agarose Standard	2 g
TAE Puffer (1 x)	100 ml
Ethidiumbromid	3 µl

0,5 x TBE Puffer

TBE Puffer (10 x)	50 ml
dest. Wasser	950 ml

1 x TAE Puffer

TAE Puffer (50 x)	20 ml
dest. Wasser	980 ml

Für die histologischen Untersuchungen wurden nachfolgende Lösungen und Färbemittel genutzt:

Essigsäure-Chloroform-Ethanol (Acetic acid-Chloroform-Ethanol, ACE), pH 2,8

Trichloressigsäure	0,2%
Chloroform	24,8%
Ethanol (96%)	75%

Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline, PBS), pH 7,2

NaCl	140 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
NaH ₂ PO ₄	3,3 mM
KCl	2,7 mM

Gelatinelösung

Chrom(III)kaliumsulfat-Dodecahydrat	0,125 g
Gelatine	1,25 g
bidest. Wasser	250 ml

Für eine homogene Lösung aller Bestandteile wurde das Gemisch für ca. eine Stunde bei 60°C inkubiert.

Phloroglucinol-Färbelösung

Phloroglucin	0,3 g
Ethanol (92 %)	10 ml

Wiesner-Färbelösung

Kaliumpermanganat	1%
bidest. Wasser	99%

2.3 Herkunft, Vermehrung und Anzucht des Pilzisolats

Die Stängelinkokulationen wurden mit dem *S. sclerotiorum* Isolat Ss1.5 durchgeführt, welches 1997 aus Rapsstängeln in Biestow (Mecklenburg-Vorpommern) isoliert wurde.

Für die Vermehrung der Sklerotien wurden Pilzanzuchttüten (57 x 21 cm, Fa. Saco2, Nevele, Belgien) verwendet. Diese wurden mit einem Gemisch aus 420 g Quarzsand, 30 g Roggenmehl (Typ 997) und 40,5 ml destilliertem (dest.) Wasser befüllt, luftdicht verschlossen und zweimal autoklaviert. Aus myzelbewachsenem, halbkonzentriertem PDA-Medium wurden Plugs mit einem Durchmesser von 7 mm ausgestanzt und je fünf Plugs zur Inokulation in eine Anzuchttüte gegeben. Die Tüten wurden steril verschlossen und ohne Sonnenlicht bei RT gelagert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Tüten gut durchgeschüttelt, um eine homogene Verteilung des angewachsenen Myzels zu gewährleisten. Nach drei Wochen wurden die Sklerotien aus dem Quarzsand-Roggen-Gemisch durch ein 2 mm Sieb unter fließendem Wasser ausgewaschen und mit 70% Ethanol desinfiziert. Die getrockneten Sklerotien wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 10°C und Dunkelheit gelagert und für die Myzelanzucht genutzt.

Für die Anzucht von Myzel wurden Sklerotien verwendet, welche zuvor für 5 min in bidest. Wasser gewaschen und anschließend für 5 min in Ethanol (70%) sterilisiert wurden. Im Anschluss wurden die Sklerotien halbiert und auf halbkonzentriertem PDA-Medium, welches mit 200 ppm Streptomycin (Fa. Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande) versetzt wurde, ausgelegt und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Nach vier bis fünf Tagen wurden *S. sclerotiorum* bewachsene PDA-Plugs (Ø 5 mm) ausgestochen und erneut in Petrischalen mit gleichem Medium bei RT ausgelegt. Aus dem Randbereich des noch heranwachsenden Myzels wurden nach drei Tagen Plugs mit einem Durchmesser von 4 mm ausgestochen und für die Inokulation der Pflanzen in den Gewächshausversuchen verwendet. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass bei jeder Inokulation vergleichbares Material eingesetzt wurde.

Für die DNA-Isolierung wurde Myzel von *S. sclerotiorum* in flüssigem halbkonzentriertem PDB-Medium (mit 200 ppm Streptomycin) angezogen. Hierfür wurden 350 ml Medium mit einem myzelüberwachsenen Agarplug (Ø 7 mm) beimpft und bei 20°C auf einem Schüttler (Lab-Shaker LSR-V, Fa. Adolf Kühner AG, Birsfelden/Basel, Schweiz) mit 100 Umdrehungen pro Minute (upm) inkubiert. Nach sieben Tagen wurde das Myzel abgenutscht und gefriergetrocknet (Gefrier Trocknung Alpha 1-4, Martin Christ Gefrier Trocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland).

2.4 Resistenzscreening von *Brassica*-Arten im Gewächshaus

Das Gewächshauscreening erfolgte in zwei unabhängigen Durchgängen innerhalb der Jahre 2012 und 2013 in der Abteilung Allgemeine Phytopathologie und Pflanzenschutz der Georg-August-Universität Göttingen.

2.4.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

Gestestet wurden insgesamt 26 *Brassica*-Arten auf ihre Resistenz gegenüber dem Erreger *S. sclerotiorum* unter Gewächshausbedingungen. Dabei handelte es sich bei 19 Genotypen um *Brassica*-Akzessionen, welche über die Genbank des Leibniz-Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, Gatersleben, Deutschland) bezogen wurden (Tab. 3). Bei den meisten *Brassica*-Arten handelte es sich um Wildformen der Kohlgruppe (*B. oleracea* L.), welche viele verschiedene Ausprägungen aufweisen. Hierzu zählen *B. cretica*, *B. oleracea*, *B. oleracea robertiana* (auch bezeichnet als *B. montana* Pourr), *B. rupestris*, *B. villosa*, *B. incana*, *B. macrocarpa* und *B. insularis*. Die Akzessionen *B. oleracea italica* (Brokkolie), *B. oleracea capitata* (Kohl), *B. carinata* Braun (Äthiopischer Senf) sowie *B. rapa pekinensis* (Pekingkohl) gehören zu den domestizierten *Brassica*-Arten, welche weltweit angebaut werden.

Tab. 3 Verwendete *Brassica*-Wildarten unter Angabe der Bezeichnung in dieser Arbeit, des Artnamens, der IPK-Akzessionsnummer, des Herkunftslandes und des Versuchsjahres, in dem sie verwendet wurden.

Bezeichnung	Artname	IPK-Akzessions Nr.	Herkunft	Versuchsjahr
<i>B. cretica</i>	<i>B. oleracea</i> L. spp. <i>cretica</i> (Lam.) Gladis & K.Hammer	BRA 3029	Griechenland	2012, 2013
<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea</i> L. subsp. <i>oleracea</i>	BRA 101	unbekannt	2012, 2013
<i>B. oleracea italica 1</i>	<i>B. oleracea</i> L. subsp. <i>capitata</i> (L.) DC convar. <i>botrytis</i> (L.) Alef. var. <i>italica</i> Plenck	BRA 258	unbekannt	2012, 2013
<i>B. oleracea italica 2</i>	<i>B. oleracea</i> L. subsp. <i>capitata</i> (L.) DC convar. <i>botrytis</i> (L.) Alef. var. <i>italica</i> Plenck	BRA 259	unbekannt	2012, 2013

Bezeichnung	Artname	IPK-Akzessions Nr.	Herkunft	Versuchsjahr
<i>B. oleracea capitata</i> 1	<i>B. oleracea</i> L. subsp. <i>capitata</i> (L.) DC convar. <i>capitata</i> (L.) Alef var. <i>capitata</i> (L.) f. <i>capitata</i> (L.) Duch. ex. Lam.	BRA 2577	Deutschland	2013
<i>B. oleracea capitata</i> 2	<i>B. oleracea</i> L. subsp. <i>capitata</i> (L.) DC convar. <i>capitata</i> (L.) Alef var. <i>capitata</i> L. f. <i>capitata</i> (L.) Duch. ex. Lam.	BRA 145	China	2013
<i>B. oleracea robertiana</i>	<i>B. oleracea</i> L. subsp. <i>robertiana</i> (Gay) Rouy & Fouq.	BRA 2993	Italien	2012, 2013
<i>B. oleracea rupestris</i>	<i>B. oleracea</i> L. subsp. <i>rupestris</i> (Raf.) Gladis & K. Hammer	BRA 2851	Italien	2013
<i>B. juncea</i>	<i>B. juncea</i> L. Czern. subsp. <i>integrifolia</i> (West) Thell	CR 3356	Korea	2013
<i>B. rapa pekinensis</i> 1	<i>B. rapa</i> L. subsp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Hanelt var. <i>glabra</i> E. Regel	BRA 123	China	2013
<i>B. rapa pekinensis</i> 2	<i>B. rapa</i> L. subsp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Hanelt var. <i>glabra</i> E. Regel	BRA 1606	Korea	2013
<i>B. carinata</i>	<i>B. carinata</i> A. Braun	BRA 2264	Pakistan	2013
<i>B. macrocarpa</i>	<i>Brassica macrocarpa</i> Guss.	BRA 2944	Italien	2013
<i>B. drepanensis</i>	<i>Brassica drepanensis</i> (Caruel) Ponzo	BRA 3093	Deutschland	2012, 2013
<i>B. napus</i>	<i>B. napus</i> L. subsp. <i>napus</i> var. <i>napus</i> f. <i>biennis</i> (Schübl. & Mat.) Thell	CR 281	China	2013
<i>B. rupestris</i>	<i>Brassica rupestris</i> Raf.	BRA 2945	Italien	2013
<i>B. villosa</i>	<i>Brassica villosa</i> Biv.	BRA 1896	Italien	2012, 2013
<i>B. incana</i>	<i>Brassica incana</i> Ten.	BRA 1166	Russland	2012
<i>B. insularis</i>	<i>Brassica insularis</i> Moris.	BRA 3051	Italien	2012

Des Weiteren bestand das Set aus drei Rapsresynthesen, welche von der Abteilung für Pflanzenzüchtung des Departments für Nutzpflanzenwissenschaften (DNPW) der Georg-August-Universität Göttingen (Prof. Dr. Heiko C. Becker, Göttingen, Deutschland)

stammten (Tab.4). Diese entstanden durch Kreuzung von *B. rapa* (A-Genom) mit verschiedenen Wildarten (*B. rupestris*, *B. bourgeau* und *B. oleracea*), welche das C-Genom tragen (Jesske et al., 2013).

Tab. 4 Angabe der verwendeten Rapsresynthesen mit den jeweiligen Kreuzungspartnern sowie des Versuchsjahres, indem sie getestet wurden.

Bezeichnung	Mutter	Vater	Versuchsjahr
RUY 1	<i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>trilocularis</i> (Roxb.) Hanelt	<i>Brassica rupestris</i> Raf. var. <i>hispida</i> (Raimondo & Mazzola)	2012, 2013
BOY 1	<i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>trilocularis</i> (Roxb.) Hanelt	<i>Brassica bourgeau</i> (Webb in Christ) Kuntze	2012, 2013
OLL1	<i>Brassica rapa</i> L. spp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzg. f. <i>biennis</i>	<i>Brassica oleracea</i> L. spp. <i>oleracea</i>	2012

Bei den übrigen *Brassica*-Genotypen handelte es sich, mit Ausnahme von Pacific, um in Deutschland ehemals und aktuell zugelassene Winterrapsorten (Tab. 5). Alle drei sind 00-Sorten und zeichnen sich laut Bundessortenliste (Anonymus, 2009; Anonymus, 2012b; Anonymus, 2013a) durch hohe Anfälligkeit gegenüber *S. sclerotiorum* aus.

Tab. 5 Verwendete Winterrapsorten unter Angabe der Resistenzeinstufung gegen *S. sclerotiorum* nach Bundessortenliste (Anonymus, 2009; Anonymus, 2012b; Anonymus, 2013a), des Sortentypus und des verwendeten Versuchsjahres.

Name	Einstufung nach BSL (Jahr der Einstufung)	Typus	Züchter	Versuchsjahr
Pacific	6 (2009)	Linien-Sorte	Limagrain GmbH	2012, 2013
Lorenz	6 (2013)	Linien-Sorte	Norddeutsche Pflanzenzucht (NPZ)	2012, 2013
NK-Bravour	6 (2012)	Linien-Sorte	Syngenta Crop Protection AG	2012

Bei der in Tabelle 6 gelisteten chinesischen Rapslinie Zhonshuang 9 handelt es sich um eine Semi-Winterrapsvariante, welche 2002 in der Volksrepublik China zugelassen wurde (Whang et al., 2004). Sie besitzt eine hohe Toleranz gegen *S. sclerotiorum* und zeichnet sich durch hohen Ertrag und niedrige Glucosinolat- und Erucasäurekonzentrationen aus.

Tab. 6 Angabe der verwendeten chinesischen Rapslinie, des Typus und des verwendeten Versuchsjahres.

Name	Typus	Versuchsjahr
Zhongshuang 9	Semi-Winterraps	2012, 2013

In beiden Versuchsjahren wurden die anfällige Liniensorte Pacific und die tolerante Rapslinie Zhongshuang 9 als Referenzstandards verwendet.

2.4.2 Pflanzenanzucht

Die Aussaat der Pflanzen für das Gewächshauscreening erfolgte in einem 3:1 Gemisch aus Einheitserde vom Typ T 25 (Archut Fruhstorfer Erde[®], Fa. Hawita Gruppe GmbH, Vechta) und Quarzsand. Das Erdgemisch wurde ca. 3 cm dick in flache Pikierschalen (33 x 24 x 5 cm) ausgelegt und eingeebnet. Die Samen wurden breitflächig auf der Erdschicht verteilt, leicht angedrückt und die Schale nach Bewässerung mit einer Glasscheibe abgedeckt. Dies sollte die Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit bei der Keimung gewährleisten. Nach fünf bis sechs Tagen wurden die Sämlinge pikiert und in Multitopfschalen (51 Töpfe je Schale mit Ø 5 cm) umgesetzt. Das Substrat in den Multitopfschalen setzte sich aus vier Anteilen Einheitserde vom Typ T 25, zwei Anteilen gedämpfter Komposterde und einem Anteil Quarzsand zusammen. Sobald die Pflanzen das BBCH-Stadium 13 erreicht hatten, erfolgte die achtwöchige Vernalisation bei 4°C in Klimaschränken der Firma Mytron Bio- und Solartechnik GmbH (Mytron WB 750 KFL, Heiligenstadt, Deutschland). Die Beleuchtung mit 16 Stunden Licht pro Tag erfolgte bei einer Stärke von 37 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ im Abstand von 34 cm durch den Lampentyp Osram Natura T8 (L 18W/76, Fa. Osram GmbH, München, Deutschland). Nach der Vernalisation wurden die Pflanzen in Kunststofftöpfe (11 x 11 x 12 cm, Fa. Lamprecht-Verpackungen GmbH, Göttingen) umgesetzt. Das hier verwendete Substratgemisch wurde im gleichen Verhältnis wie das der Multitopfplatten angesetzt. In diesen Töpfen wurden die Pflanzen bis zur Inokulation im Gewächshaus weiter kultiviert. Hierfür wurden die Gewächshaustische mit einem Gießfließ und perforierter Folie ausgelegt, um eine gleichmäßige Wasserversorgung von unten sicherzustellen. Die vorherrschenden Bedingungen zur Anzucht lagen bei einer Temperatur von $25 \pm 5^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 35 bis 40%. Die Regulierung der Temperatur erfolgte durch das Öffnen oder Schließen der Dachfenster und Beschattung sowie durch die Zuschaltung einer Heizung. Unabhängig von der Jahreszeit wurde ergänzend zum natürlichen Lichteinfall täglich eine sechzehnständige Photoperiode mit Kunstlicht gewährleistet. Zur Beleuchtung wurden Lampen des Typs Phillips SON-T PIA Plus 400 W (Fa. Phillips

GmbH Market DACH, Hamburg, Deutschland) eingesetzt, welche eine photosynthetisch aktive Strahlung von $121 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ im Abstand von etwa 1,8 m erzeugten. Um Trockenstress zu vermeiden, wurden die Pflanzen täglich nach Bedarf gegossen. Während der Anzuchtphase wurden die Pflanzen alle zwei Wochen mit 3 g Hakaphos® blau (15% N, 10% P_2O_5 , 15% K_2O , 2% MgO + Mikronährstoffe: B, Cu, Mn, Mo, Zn, Fe, Fa. COMPO Expert GmbH, Münster, Deutschland) je Liter Wasser gedüngt. Um den Befall mit Insekten oder pilzlichen Pathogenen zu regulieren wurde bei Bedarf mit DANADIM PROGRESS (Dimethoat) gegen Blattläuse (*Aphis fabae* und *Acyrtosiphon pisum*) und Thripse (*Thrips tabaci* (Lindemann)), sowie GRANIT PLUS (Iprodium & Bromuconazol) gegen Echten Mehltau (*Erysiphe cruciferarum*) behandelt. Zusätzlich wurde regelmäßig Netzschwefel (80% S) gegen Echten Mehltau appliziert.

2.4.3 Inokulationsmethode

Im Laufe der Arbeit wurden zwei unabhängige Gewächshauscreenings durchgeführt. Diese unterschieden sich in der Anzahl an getesteten *Brassica*-Arten und der verwendeten Inokulationsmethode.

2.4.3.1 Versuchsjahr 2012

Nach einem sechswöchigen Aufwuchs im Gewächshaus erfolgte die Inokulation aller Pflanzen zum gleichen Zeitpunkt. Es wurde darauf geachtet, dass alle Pflanzen mindestens das BBCH-Stadium 33 überschritten hatten und sich die Mehrheit im BBCH-Stadium 50 befand. Einige wiesen auch höhere BBCH-Stadien auf. An dem Tag der Inokulation wurde die Pflanzenhöhe in Zentimetern (cm) und der Stängelumfang in Millimetern (mm) aller Pflanzen bestimmt. Die Höhe wurde mittels Zollstock bestimmt, wobei der Abstand zwischen Hypokotyl und Apikalmeristem des Stängels gemessen wurde. Der Stängeldurchmesser wurde mit Hilfe einer Schieblehre ermittelt. Es wurden drei Messungen je Pflanze (Inokulationsstelle selbst, sowie 1 cm ober- und unterhalb der Inokulationsstelle) durchgeführt, welche zum jeweiligen Mittelwert des Stängelumfangs verrechnet wurden. Zusätzlich wurden noch weitere morphologische Merkmale, wie Stängelfarbe (grün/lila) und Behaarung (stark/gering) erhoben. Zur Inokulation wurde ein myzelbewachsener Agarplug (\varnothing 4 mm) aus dem Randbereich einer drei Tage alten PDA-Platte ausgestochen und in eine Blattachsel auf einer Höhe von 20 ± 3 cm gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die myzelbewachsene Seite des Plugs direkt am Stängel anlag. Damit dieser enge Kontakt anhielt, wurde der Plug mittels Parafilm (Parafilm M®, Fa. Bemis Company Inc., Wisconsin, USA) fixiert. Umgehend nach der Inokulation wurden die Gewächshaustische zusammen mit den Pflanzen in einen Folientunnel

eingehüllt. Dieser diente zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur und hoher Luftfeuchtigkeit, um eine erfolgreiche Penetration des Pathogens zu gewährleisten. Zur Erzeugung der hohen Luftfeuchtigkeit, wurden die Pflanzen zuvor gründlich gewässert.

Die Anordnung des ersten Durchgangs erfolgte durch ein komplett randomisiertes Design. Die Anzahl der Wiederholungen betrug im Versuchsjahr 2012 20 Pflanzen pro *Brassica*-Art und Behandlung.

2.4.3.2 Versuchsjahr 2013

Das Screening im Jahr 2013 wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Alexander Pfaff durchgeführt. Die Pflanzen wurden wie im Versuchsjahr 2012 nach sechs Wochen Aufwuchs inokuliert, wobei wieder darauf geachtet wurde, dass mindestens das BBCH-Stadium 33 erreicht war. Auch hier erfolgte zuvor die Erfassung morphologischer Parameter, wie Pflanzenhöhe (cm), Stängeldurchmesser (mm), Stängelfarbe (grün/lila) und Behaarung (stark/gering) entsprechend der in 2.4.3.1 angegebenen Weise. Zur Inokulation wurde aus dem Randbereich einer drei Tage alten PDA-Platte ein myzelbewachsener Agarplug (\varnothing 4 mm) ausgestochen und auf der Inokulationsstelle mittels Parafilm fixiert. Diese lag in einer Höhe von ca. 20 cm im Bereich eines Internodiums. Neben der normalen Inokulation („unverletzt inokuliert“) wurde im Rahmen der Bachelorarbeit eine zweite Inokulationsvariante „verletzt inokuliert“ durchgeführt. Hierfür wurde eine Nadel mit 0,5 mm Durchmesser etwa 3 mm tief in den Stängel eingestochen. Auf dieser Einstichstelle wurde anschließend der Agarplug positioniert und mit Parafilm fixiert. Bei beiden Inokulationsvarianten wurde darauf geachtet, dass die myzelbewachsene Seite des Plugs direkt am Stängel anlag. Auch hier wurden die Pflanzen direkt nach Inokulation gründlich gewässert und in einen Folientunnel eingehüllt, um konstante Temperaturen und hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten.

Auch im Versuchsjahr 2013 folgte die Anordnung des Durchgangs einem komplett randomisierten Design und die Anzahl der Wiederholungen betrug 13 Pflanzen pro *Brassica*-Art und Behandlung.

2.4.4 Erfassung des Befalls

Nach drei Tagen wurden der Parafilm sowie der Agarplug entfernt und die Länge der entstandenen Stängelläsion mittels Lineal [mm] in vertikaler Richtung gemessen. Waren mehrere Läsionen erkennbar, wurde immer die größte Läsion vermessen. Um den Verlauf der Läsionsentwicklung bestimmen zu können, wurde die Läsionslänge täglich über einen

Zeitraum von sieben Tagen nach entfernen des Parafilms (drei bis neun Tage nach der Inokulation (Days past Inoculation, dpi)) festgehalten.

Aus den erhaltenen Läsionswerten konnte für jeden Tag die Fläche unter der Läsionsentwicklungskurve (Area under Lesion Progress Curve, AULPC) nach der modifizierten Formel von Kaiser (2007) berechnet werden.

$$\text{AULPC} = \sum \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i)$$

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

Aus den AULPC-Werten der einzelnen Tage wurde anschließend die Summe für jede Pflanze gebildet. Um die natürliche Variation der Infektionsstärke zwischen den verschiedenen Versuchsjahren zu kompensieren, wurde eine Normalisierung des AULPC-Wertes jeder Akzession zur Basis der Reaktion der Referenzkontrollen vorgenommen. Dieser normalisierte AULPC-Wert (norm. AULPC) berechnete sich wie folgt:

$$\text{norm. AULPC} = \frac{\text{AULPC (X)}}{[(\text{AULPC (Zhongshuang 9)} + \text{AULPC (Pacific)})/2]}$$

Zur Normalisierung der AULPC-Werte jeder *Brassica*-Art wurden die AULPC-Werte durch die Mittelwerte der Standardgenotypen Zhongshuang 9 und Pacific geteilt.

Im Versuchsjahr 2012 wurden Pflanzen, welche nach Inokulation keine Läsionsentwicklung aufwiesen, erneut ober- oder unterhalb der ersten Inokulationsstelle inokuliert, bis sich eine Läsion entwickelte. Die Anzahl aller Inokulationen, welche nötig waren, um eine erfolgreiche Infektion hervorzurufen, wurde notiert und daraus die Inokulationseffizienz in Prozent nach folgender Formel von Wulf (2011) berechnet.

$$\text{Inokulationseffizienz [\%]} = \frac{n \text{ Läsionen}}{n \text{ Inokulationen}} * 100$$

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

Im Versuchsjahr 2013 konnte zwischen den beiden Inokulationsvarianten „unverletzt inokuliert“ und „verletzt inokuliert“ unterschieden werden.

2.5 *In vivo* Blattsegmenttest von *Brassica*-Arten zur Oxalsäuresensitivität

Über die Zeitperiode von 2012 bis 2013 wurde das Screening zweimal wiederholt, wobei sich die Genotypensets zwischen den Versuchsjahren teilweise unterschieden. Insgesamt wurden 12 Pflanzen je Art im Screening getestet.

2.5.1 Pflanzenmaterial und –anzucht

Im Blattsegmenttest wurden die gleichen *Brassica*-Arten untersucht, wie bereits im Gewächshauscreening (siehe Abschnitt 2.4.1). Die Aussaat erfolgte, wie im vorangegangenen Abschnitt 2.4.2 beschrieben, in Pikierschalen mit einem 3:1 Substratgemisch. Die angewachsenen Keimlinge wurden ebenfalls in Multitopfplatten pikiert, jedoch nicht vernalisiert oder umgetopft. In diesem Zustand wurden die Pflanzen in einem geschlossenen Klimaraum bei einer konstanten Temperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ und konstanter Luftfeuchte (ca. 20%) kultiviert. Die tägliche Photoperiode betrug 16 Stunden bei einer Beleuchtungsstärke von $155 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ im Abstand von ca. 1,5 m durch den Lampentyp Phillips SON-T PIA Argo 400 W (Fa. Phillips GmbH Market DACH, Hamburg, Deutschland). Da es sich um einen geschlossenen Raum handelte, muss berücksichtigt werden, dass keine natürlich einfallende Strahlung vorhanden war. Die Bewässerung der Pflanzen erfolgte von unten über ein Gießfließ, um Trockenstress zu vermeiden. Unter diesen standardisierten Bedingungen wurden die Pflanzen ungefähr fünf Wochen angezogen, bis das fünfte Laubblatt (BBCH-Stadium 15) voll entwickelt war. Am Tag vor der Durchführung des *in vivo* Screenings wurden die Pflanzen ausreichend gewässert, um sicherzustellen, dass die Wasserversorgung zum Zeitpunkt des Tests zwischen den Pflanzen identisch war. Während der Anzucht wurden die Pflanzen nicht gedüngt und vollständig auf Pflanzenschutzmaßnahmen verzichtet, um eventuelle Beeinflussungen der Messergebnisse durch Spritzrückstände auf den Blättern zu vermeiden. Pflanzen die von Schädlingen oder Pathogenen befallen waren, wurden nicht für den Test verwendet.

2.5.2 Blattsegmenttest modifiziert nach Wulf (2011)

Zur Vorbereitung wurde am Vortag des Screenings eine 2 mM Oxalsäurelösung mit bidestilliertem (bidest.) Wasser angesetzt. Des Weiteren wurden 24er Zellkultur-Mikrotiterplatten (Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gründlich mit bidest. Wasser gespült und anschließend die Leitfähigkeit mittels eines Leitfähigkeitsmessers des Typs CDM 2e (Fa. Radiometer Kopenhagen, Dänemark) überprüft. Dafür wurde die Vertiefung mit bidest. Wasser aufgefüllt, welches dann in die Elektrode des Leitfähigkeitsmessgerätes eingesaugt wurde. Hohe Leitfähigkeiten deuteten auf Verunreinigungen hin, so dass die Platte erneut mit bidest. Wasser gespült

wurde. Saubere Platten konnten über Nacht getrocknet werden. Direkt vor der Durchführung des Blattsegmenttests wurden alle Geräte und Gefäße gründlich mit bidest. Wasser gespült. Für den eigentlichen Test wurde von 12 gleich entwickelten Pflanzen jeder Art das fünfte Laubblatt entnommen. Aus jedem Laubblatt wurde rechts und links der Mittelrippe eine Blattscheibe von 10 mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestochen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Blätter keine Risse oder sonstige Verletzungen aufwiesen und die Blattscheiben immer mittig ausgestochen wurden. Diese Blattscheibenpaare wurden dann geordnet mit der Blattunterseite in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gelegt und je eine Hälfte mit 2 ml bidest. Wasser und die andere Hälfte mit 2 ml 2 mM Oxalsäurelösung entsprechend der Abbildung 2 befüllt. Um einen gleichmäßigen Kontakt mit den Lösungen sicherzustellen, wurden entstandene Luftblasen unter den Blattscheiben entfernt. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und in einem Mytron Klimaschrank (WB 750 KFL) bei konstanten 20°C unter Kunstlichtbeleuchtung durch den Lampentyp Osram Natura T8 (L 18 W/76, Beleuchtungsstärke: 37 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ in 34 cm Abstand, Fa. Osram GmbH, München, Deutschland) inkubiert. Nach zwei Stunden wurde das bidest. Wasser sowie die Oxalsäurelösung vollständig aus den Mikrotiterplatten entfernt und jede Vertiefung mit der darin befindlichen Blattscheibe zweimal mit bidest. Wasser gespült. Dies sollte sicherstellen, dass jegliche Rückstände der Oxalsäurelösung entfernt wurden. Nach dem Spülen wurden die Wells erneut mit je 2 ml bidest. Wasser befüllt. Hierbei wurde wiederum darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Blattscheibe und Lösung bildeten sowie stets die Blattunterseite auf der Lösung auflag. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Leitfähigkeit in Mikrosiemens (μS) durch Einsaugen des bidest. Wassers in die Elektrode des Leitfähigkeitsmessgeräts. Nach dem Ablesen des Wertes wurde das Wasser wieder zurück in die Vertiefung gegeben (Abb. 3). Wells, bei denen die erste Messung einen Wert von 3,5 μS überschritt, wurden erneut mit bidest. Wasser gespült. Nach der Rückgabe des Wassers aus der Elektrode wurden Luftblasen wiederum entfernt und die Platten erneut in den Klimaschrank bei 20°C und künstlicher Beleuchtung gestellt. Die Messung der Leitfähigkeit erfolgte von diesem Zeitpunkt an nach 1, 2, 3 sowie 24 Stunden. Dabei wurde das bidest. Wasser jedesmal wieder zurück in die Vertiefung gegeben, um es zum nächsten Zeitpunkt erneut messen zu können. Die Messungen nach 1, 2 und 3 Stunden dienten dabei lediglich als interne Kontrolle, um Oxalsäurerückstände in den Vertiefungen oder Verletzungen der Blattscheiben frühzeitig zu erkennen und entsprechende Blattscheiben nicht in die Versuchsauswertung mit einzubeziehen. Die gemessenen Leitfähigkeiten der Oxalsäurevariante (2 mM OA) zu Beginn des Testes (0 h) sowie 24 Stunden nach Oxalsäureinkubation (24 h) wurden entsprechend um die

jeweiligen Leitfähigkeiten der Wasserkontrollvariante korrigiert und die Endleitfähigkeit ΔS nach der unten beschriebenen Formel berechnet.

$$\Delta S = (S_{2 \text{ mM OA};24\text{h}} - \bar{x}S_{2 \text{ mM OA};0\text{h}}) - (\bar{x}S_{\text{Wasser};24\text{h}} - \bar{x}S_{\text{Wasser};0\text{h}})$$

Wobei $S_{2 \text{ mM OA};24\text{h}}$ der Wert der Leitfähigkeit zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der Inkubation mit 2 mM Oxalsäure und $\bar{x}S_{2 \text{ mM OA};0\text{h}}$ der Mittelwert der Leitfähigkeiten nach Oxalsäureinkubation zum Zeitpunkt 0 Stunden, unmittelbar nach dem Spülen mit bidest. Wasser ist. $\bar{x}S_{\text{Wasser};0\text{h}}$ und $\bar{x}S_{\text{Wasser};24\text{h}}$ sind die äquivalenten Leitfähigkeiten in der Wasserkontrolle zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden nach Inkubation.

Um auch hier natürliche Variationen zwischen den verschiedenen Versuchsjahren zu kompensieren, wurde eine Normalisierung der Änderung der Leitfähigkeit jeder Akzession zur Basis der Reaktion der Referenzkontrollen vorgenommen.

$$\text{norm. } \Delta S = \frac{\Delta S(X)}{[(\Delta S(\text{Zhongshuang 9}) + \Delta S(\text{Pacific}))/2]}$$

Während des gesamten Ablaufs des Blattsegmenttests wurde mit Sorgfalt darauf geachtet, die Blattscheiben weder beim Befüllen, noch beim Absaugen der Lösungen oder Entfernen der Luftblasen zu verletzen, um einer Verfälschung der Ergebnisse vorzubeugen. Um Verunreinigungen durch herabfallende Staubteilchen zu vermeiden, wurde während des gesamten Versuchablaufs unter dem Abzug gearbeitet.

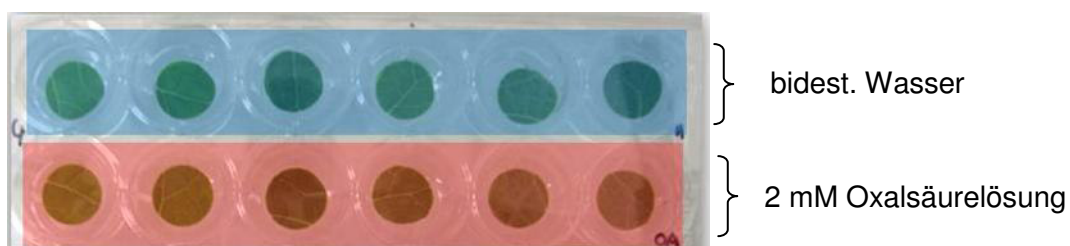


Abb. 2 Inkubationsschema der Blattscheiben in einer 24er Mikrotiterplatte mit bidest. Wasser und 2 mM Oxalsäurelösung.



Abb. 3 Bestimmung der Leitfähigkeit nach Inkubation der Blattscheiben mit Oxalsäure durch Einsaugen des bidest. Wassers in die Messelektrode des Leitfähigkeitsmessgerätes.

2.5.3 Bestimmung der Anzahl der Spaltöffnungen

Da das untersuchte Material eine hohe Variabilität aufwies, wurde die Anzahl der Spaltöffnungen pro mm^2 Blattfläche bestimmt. Zur Auszählung wurden Negative der Blattunterseiten angefertigt. Dafür wurden die Blätter mit Nagellack bepinselt und dieser nach Trocknung mittels Tesafilm auf einem Objektträger fixiert. Unter dem Mikroskop wurden anschließend die Stomata für je 5 Teilflächen von je $0,069 \text{ mm}^2$ Größe bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt und daraus die Anzahl pro 1 mm^2 Blattfläche berechnet. Je Genotyp wurden immer sechs Blätter untersucht.

2.6 Resistenzcharakterisierung in *B. napus*

2.6.1 Behandlungen und experimentelle Bedingungen

Die Interaktionsstudie zur Resistenzcharakterisierung wurde in zwei unabhängigen Durchgängen mit dem *B. napus* Set Loras als anfällige Sorte und Zhongyou 821 als resistente Rapslinie durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten in einem komplett randomisierten Design unter Gewächshausbedingungen. Die Versuche bestanden aus einer Kombination von zwei experimentellen Faktoren, welche in vier Behandlungen resultierten (Tab. 7). Die experimentellen Faktoren waren Genotyp (zwei Rapsgenotypen Zhongyou 821 und Loras) und Inokulation (Mock- und *Sclerotinia*-inokuliert).

Tab. 7 Behandlungsbezeichnung und Beschreibung

Nummer	Bezeichnung	Experimentelle Faktoren und Beschreibung	
		Genotyp	Inokulation
1	LM	Loras	Mock-inokuliert
2	LSs	Loras	Ss-inokuliert
3	ZM	Zhongyou 821	Mock-inokuliert
4	ZSs	Zhongyou 821	Ss-inokuliert

L, Loras. Z, Zhongyou 821. M, Mock-inokuliert. Ss, *Sclerotinia*-inokuliert.

2.6.2 Verwendetes Pflanzenmaterial und Pilzisolat

Bei dem hier verwendeten Pflanzenmaterial handelte es sich um die Sommerrapsorte Loras (Quelle IPK Gatersleben) als anfälliger Standard und die resistente chinesische Rapslinie Zhongyou 821. Der Sommerraps Loras ist eine erucasäure- und glucosinolatarme Sorte (00-Sorte) des ehemaligen Züchters Lochow-Pektus GmbH, mittlerweile KWS Lochow GmbH, welche von 1978 bis 1989 auf dem Markt verfügbar war. Laut Dr. Elke Diederichsen (Freie Universität Berlin, Department Biologie, Institut für Angewandte Genetik, Emailkontakt 22.11.2012) besitzt die Sorte eine hohe Anfälligkeit gegenüber *S. sclerotiorum*. Die chinesische Rapslinie Zhongyou 821 wurde im Institute of Oil Crops Research Wuhan (China) in den 70iger Jahren durch eine Kreuzung von *B. napus* und *B. campestris* entwickelt (Li et al., 1999a). Hierbei handelt es sich um eine erucasäure- und glucosinolatreiche Linie (double high line). Zhongyou 821 zeichnet sich durch hohe Toleranz gegen *S. sclerotiorum*, hohe und stabile Erträge sowie Anpassungsfähigkeit an verschiedene Klimaverhältnisse in China aus (He et al., 1987).

Für den Versuch wurde ebenfalls das *S. sclerotiorum* Isolat Ss1.5 verwendet, welches 1997 aus Rapsstängeln in Biestow (Mecklenburg-Vorpommern) isoliert wurde. Die Anzucht und Vermehrung erfolgte entsprechend der Angaben aus Abschnitt 2.3.

2.6.3 Pflanzenanzucht und Inokulation

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.4.2. Nachdem die Pflanzen das Entwicklungsstadium BBCH 13 erreicht hatten, wurde sie in 7er Kunststofftöpfe (7 x 7 x 8 cm, Fa. Lamprecht Verpackungen GmbH, Göttingen) umgetopft und darin weiter bis zum Entwicklungsstadium BBCH 50-52 angezogen. Am Tag vor der Inokulation wurden die Pflanzen nochmals mit 3 g Hakaphos® blau gedüngt, um eine gleichmäßige Nährstoffversorgung der Pflanzen zu gewährleisten. Direkt vor der Inokulation wurde am Stängel jeder Pflanze eine künstliche Eintrittsstelle für das

Pathogen geschaffen, um eine sichere Infektion hervorzurufen. Hierfür wurde eine Nadel mit 0,5 mm Durchmesser etwa 2 mm tief auf einer Höhe von 8 cm im Bereich eines Internodiums in den Stängel eingestochen. Auf diese Einstichstelle wurde ein mit dem *S. sclerotiorum* Isolat Ss1.5 myzelbewachsener Plug von 4 mm Durchmesser platziert, welcher aus dem Randbereich einer drei Tage alten halbkonzentrierten PDA Platte ausgestochen wurde (siehe Abschnitt 2.3). Bei der Positionierung des Plugs wurde darauf geachtet, dass die myzelbewachsene Seite direkt am Stängel anlag. Für die Fixierung wurde Parafilm verwendet. Die inokulierten Pflanzen wurden entsprechend eines komplett randomisierten Designs in einer Klimakammer (Joh. Mattern Kälte-Klima GmbH, Northeim, Deutschland) aufgestellt (Tab. 7) und bei einem Rhythmus von sechzehn Stunden künstlichen Lichts und acht Stunden Dunkelheit weiter kultiviert. Die photosynthetisch aktive Strahlung des Lampentyps Lumilux T5 HO Constant (54 W/840, Fa. Osram GmbH, München, Deutschland) betrug hierbei $207 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ bei einem Abstand von 95 cm.

2.6.4 Erfassung des Befalls

Nach 1, 2, 4 und 7 Tagen nach Inokulation wurden jeweils Proben für die verschiedenen Untersuchungen genommen und die Läsionsentwicklung dokumentiert. Die Läsion wurde in vertikaler Richtung entsprechend ihrer Länge mittels Lineal in Millimetern (mm) gemessen, sowie Eigenschaften zur Farbe, Konsistenz (trocken/feucht), Umrandung (ja/nein) und Myzelbildung notiert. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden Versuchsdurchgängen herzustellen, wurde die relative Läsionslänge (rel. LL) in Prozent nach folgender Formel ermittelt.

$$\text{rel. LL [\%]} = \frac{(\text{LL (X)} * 100)}{\text{LL (LSs, 7dpi)}}$$

Hierbei ergab sich die relative Läsionslänge (rel. LL), indem die Läsionslängen jeder *Brassica*-Art (LL (X)) durch den Mittelwert der Läsionslänge der *Sclerotinia*-inokulierten Behandlung des anfälligen Genotyps Loras zum Zeitpunkt 7 dpi (LL (LSs, 7dpi)) geteilt wurde.

Neben dem Befall wurden Pflanzenhöhe (cm) und Stängelumfang (mm) erhoben sowie Erscheinungen wie Welke und Abknicken der Pflanze vermerkt.

Nach der Erfassung der Pflanzen- und Krankheitsparameter wurden Stängelproben für molekulare, physiologische und histologische Analysen geerntet.

2.6.5 Molekularbiologische Methoden

2.6.5.1 Probenahme und Aufbereitung

Von den Stängelproben wurden Stücke geerntet, welche jeweils 1 cm ober- und unterhalb der Läsion abgeschnitten wurden. Zur Probenvorbereitung wurde das geerntete Stängelmateriale direkt in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend in einer Kugelmühle (Schwingmühle MM 200, Fa. Retsch GmbH, Haan, Deutschland) in gekühlten Mahlbechern (5 ml Volumen) gemahlen. Dieses Stängelpulver wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Während der Probenvorbereitung wurde darauf geachtet, dass die Stängelproben zu keinem Zeitpunkt an- bzw. auftauten, da dies kommende Untersuchungen beeinflusst hätte. Je Behandlung und Probezeitpunkt wurden vier biologische Wiederholungen untersucht, wobei sich eine biologische Wiederholung aus fünf gepoolten Stängelproben zusammensetzte.

2.6.5.2 Realtime PCR Quantifizierung der Infektion mit *S. sclerotiorum*

Zur Einschätzung der Resistenz wurde im Pflanzenmaterial die DNA-Menge von *S. sclerotiorum* durch eine quantitative Realtime Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt.

Isolierung von DNA

Die Extraktion der genomischen DNA aus Proben des Resistenzscreenings erfolgte über die modifizierte Methode zur RNA- und DNA-Isolation nach Winter et al. (2013). Für die Extraktion wurden 100 mg des gemahlene Stängelmateriale in ein vorgekühltes 2 ml Reaktionsgefäß abgewogen und mit 500 µl 80°C heißem RNA-/DNA-Extraktionspuffer versetzt. Die Probe wurde rasch gevortext und 500 µl Phenol hinzugegeben. Nach kurzer Durchmischung und einem Zentrifugationschritt bei 16.060 x g und 4°C für 10 min (Heraeus® Biofuge® fresco, Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham/Massachusetts, USA) wurde der wässrige Überstand (ca. 350 µl) in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser wurde nun mit 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) versetzt, invertiert und erneut auf höchster Stufe bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Von der oberen wässrigen Phase wurden 300 µl in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 Volumen 4 M LiCl hinzugegeben und die Proben für drei Stunden auf Eis inkubiert. Dieser Schritt dient der Fällung der RNA. Anschließend wurde die Probe bei 16.060 x g bei 4°C für 20 min zentrifugiert und der erhaltene Überstand in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Mit dem erhaltenen RNA-Pellet wurde dann entsprechend der Angaben zur RNA-Isolierung weiterverfahren. Durch die Zugabe von 0,75 Volumen

7,5 M NH₄-Acetat und 2,5 Volumen Ethanol (96%) wurde DNA gefällt. Nachdem die Proben für eine Stunde bei -20°C inkubiert wurden, erfolgte die Zentrifugation bei 4.227 x g und 4°C (Model 4K 10, Fa. Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) für 20 min zur Pelletierung der DNA. Bis auf 1 ml wurde der gesamte Überstand verworfen und das Pellet darin resuspendiert. Die Probe wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, nochmals zentrifugiert (16.060 x g, 4°C, 15 min) und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in 700 µl eisgekühltem Ethanol gewaschen und für 5 min zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde verworfen und das DNA-Pellet bei 240 x g in der Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 30°C für 10 min getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 200 µl 1 x TE Puffer für ca. eine Stunde oder über Nacht bei RT gelöst. Die Überprüfung der Qualität und Konzentration der gewonnenen DNA erfolgte über Gelelektrophorese. Hierfür wurden 5 µl DNA mit 0,2 Volumen 6 x Loading Dye (Fa. Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) beschwert und auf ein 1% (w/v) Agarosegel, hergestellt mit 0,5 x TBE Puffer, aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 3 V/cm Gel in 0,5 x TBE Puffer ab und wurde über Ethidiumbromidfärbung visualisiert. Die Dokumentation erfolgte auf dem Transilluminator unter UV-Licht mittels Rotfilter (Geldoc 1000, Fa. Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). Für die Auswertung der Proben wurde die Quantity One® Software (Version 4.5.0, Bio-Rad) verwendet. Zur densitometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration, wurde eine Standardreihe aus Lambda-DNA (Fa. Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) erstellt und die Proben mit Hilfe der Software Multi-Analysist (Version 1.1, Fa. Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) analysiert.

Preparation der *S. sclerotiorum*-Standard-DNA für die qPCR

Genomische DNA von *S. sclerotiorum* wurde aus dem Isolat Ss1.5 isoliert, welches in flüssigem halbkonzentriertem PDB-Medium entsprechend dem Protokoll aus Abschnitt 2.3 angezogen wurde. Das erhaltene Myzel wurde abgenutscht und gefriergetrocknet und anschließend in flüssigem Stickstoff gemahlen. Anschließend erfolgte die Extraktion aus 50 mg Pilzmyzel nach dem modifizierten Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) DNA-Extraktionsprotokoll von Brandfaß & Karlovsky (2008). Die Konzentration und Qualität der erhaltenen Pathogen-DNA wurde wie oben beschrieben quantifiziert und eine Verdünnungsreihe von 1 ng bis hin zu 0,1 pg mit einem Verdünnungsfaktor von 10 in 1 x TE Puffer angesetzt.

Quantitative Realtime PCR

Für diesen Prozess wurde ein hoch spezifisches Primerpaar verwendet, welches für die Identifizierung von *S. sclerotiorum* entwickelt wurde (Tab.8, Yin et al., 2009).

Tab. 8 Angabe des für die qPCR verwendeten spezifischen *S. sclerotiorum* Primerpaares mit zugehöriger Basensequenz und der Herkunft

Erreger	Bezeichnung	Richtung	Basensequenz in 5' - 3'		Herkunft
				Richtung	
<i>S. sclerotiorum</i>	SsF	Vorwärts	AGTCGAGGGACGGGTACTAA		Yin et al., 2009
	SsR	Rückwärts	CTTGCCTCCATTGCCGTTT		

Für die Quantifizierung der Biomasse von *S. sclerotiorum* wurde das 2 x SensiFast™ Probe No-ROX Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) verwendet. Die DNA-Extrakte der Stängelproben wurden entsprechend ihrer Konzentrationen verdünnt, so dass immer 1 µg DNA-Template in der qPCR eingesetzt wurde. Des Weiteren enthielt jede Reaktion 5 µl 2 x SensiFast Mix (3 mM Magnesium je Reaktion), je 0,4 µM des Vorwärts- und Rückwärts-Primers und bidest. Wasser, wodurch der Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt wurde. Die Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse erfolgte im Thermozykler CFX384 Realtime PCR Detektionssystem von Bio-Rad (Fa. Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) in 384er Platten (Quali Microtest Plates, Fa. Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland) unter Verwendung des in Tabelle 9 gelisteten Programms.

Tab.9 Ablauf der qPCR-Reaktion

Abschnitt	Schritt	Phase	Zeit	Temperatur [°C]
Amplifikation	1	Enzymaktivierung	15 min	95
	2	Denaturierung	10 s	95
	3	Annealing	20 s	64,5
	4	Elongation	20 s	72
	5	Schritte 2-5 in 29 x Wiederholung		
	6	Finale Elongation	10 min	72
Schmelzkurven- analyse	7	Denaturierung	10 s	95
	8	Renaturierung	10 s	55
	9	Schmelzkurvenanalyse	(0,5°C/5 s)	65-95°C
	10	Ende	2 min	15

Während der Amplifikation wurde nach jedem Elongationsschritt (Schritt 4) sowie während der Schmelzkurvenanalyse, alle 5 Sekunden nach jedem Temperaturanstieg um 0,5°C, das Fluoreszenzsignal durch den Fluoreszenzdetektor gemessen. Die Filtereinstellung für die Anregung und Emission des SYBR Green Fluoreszenzfarbstoffes lagen bei 490 nm und 530 nm. Zur Datenauswertung wurde die CFX Manager Software (Fa. Bio-Rad Laboratory Inc., Hercules, USA) verwendet. Je DNA-Stängelproben wurden immer drei technische Wiederholungen durchgeführt.

Die ermittelten DNA-Mengen von *S. sclerotiorum* in Pikogramm pro Milligramm eingesetzter Frischmasse berechneten sich entsprechend der angegebenen Formel.

$$\text{Ss-DNA} \left[\frac{\text{pg}}{\text{mg FM}} \right] = \frac{(\text{Ss-DNA [pg]} / \text{Vol. (qPCR)[}\mu\text{l]})}{\text{FM (DNA - Extraktion) [mg]}} * \text{Volm. (DNA - Extrakt)[}\mu\text{l]}$$

Bei der Verrechnung der *Sclerotinia*-DNA-Menge wurden Verdünnungseffekte, wie das Volumen, welches in die qPCR eingesetzt wurde, die Menge Frischmasse, aus der die DNA extrahiert wurde, sowie das Volumen 1 x TE Puffer, in dem das extrahierte DNA-Pellet gelöst wurde, berücksichtigt.

Um die beiden Versuchsdurchgänge miteinander zu vergleichen, wurde die relative *Sclerotinia*-DNA-Menge (rel. Ss-DNA) in Prozent nach folgender Formel ermittelt.

$$\text{rel. Ss-DNA [\%]} = \frac{(\text{Ss-DNA (X)} * 100)}{\text{Ss-DNA (LSs, 7dpi)}}$$

Hierbei ergab sich die relative Ss-DNA (rel. Ss-DNA), indem die Ss-DNA-Gehalte jeder *Brassica*-Art, Behandlung und Zeitpunkt (Ss-DNA (X)) durch den Mittelwert der Menge an Ss-DNA der *Sclerotinia*-inokulierten Behandlung des anfälligen Genotyps Loras zum Zeitpunkt 7 dpi (Ss-DNA (LSs, 7dpi)) geteilt wurde.

2.6.5.3 Expression von Genen des Phenylpropanoidsyntheseweges

Primerdesign und Evaluierung

Für die Untersuchungen der Expression von Schlüsselgenen des Phenylpropanoidsynthesewegs in Raps wurden spezifische Primer verwendet, welche Teile der zu untersuchenden Gene amplifizieren (Tab. 10). Die Primer wurden entweder publizierten Quellen entnommen oder selbst angefertigt.

Tab.10 Sequenzen der verwendeten Primerpaare für die Genexpressionsanalyse

Primername	Richtung	Basensequenz in 5'-3' Richtung	Herkunft
<i>BnActin</i>	Vorwärts	CATCGGTGCTGAGAGATTCA	Anonymus, 2013b
	Rückwärts	CACTGAGCACGATGTTACCG	
<i>BnPAL</i>	Vorwärts	AATATTCGGCAGCACGAAAG	Anonymus, 2013b
	Rückwärts	TGTTGGTGTGAGGAAGCTG	
<i>BnC4H</i>	Vorwärts	CCGTTCCGACCTGAAGAGTTTAGGCCCGAGAG	Bhinu et al., 2008
	Rückwärts	TGGTGGAGTGGTGAAGGATGTG	
<i>Bn4CL</i>	Vorwärts	CGGTGCTAGCAATGTTCGTTA	Anonymus, 2013b
	Rückwärts	ACCACGGATGCAAATCTCTC	
<i>BnF5H</i>	Vorwärts	GCTCGTGAAGGCCCGTAATGACC	Bhinu et al., 2008
	Rückwärts	CTGCGGTTTCGTGTAGGAGGAGTGG	
<i>BnCCR2</i>	Vorwärts	AACGGAGCCAAGTTCGTGAT	Diese Studie
	Rückwärts	CCGTCTCCCATGCTGATTGT	
<i>BnCAD5</i>	Vorwärts	CCACACCGATCTCCATCACA	Diese Studie
	Rückwärts	TCACACCTGATCCACCTCT	

Um neue Primer zu generieren, wurden die Gensequenzen von *A. thaliana* verwendet, um die entsprechenden Homologe über die Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Anonymus, 2013c) zu erhalten. Entsprechende Primer wurden dann mittels der Software Primer3 (Anonymus, 2013d) erstellt. Aus den Vorschlägen wurden Primer ausgewählt, welche eine Größe von 18-22 Basenpaare (bp) und einen GC-Gehalt von 50-60% aufwiesen. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die jeweiligen Enden eines Primers nicht mit sich selbst kompatibel waren und dass das Primerpaar gleiche Annealing-Temperaturen besaß.

PCR-Amplifikation und Analyse der PCR-Produkte

Die Optimierung der Annealingtemperaturen jedes Primers sowie die Anpassung der Konzentrationsverhältnisse der verwendeten Komponenten der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgten über eine Gradienten-PCR (TProfessional Basic, Fa. Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Anschließend wurde jedes Gen in einem Reaktionsansatzvolumen von 25 µl amplifiziert, welcher 10 x Taq Puffer (beinhaltete 15 mM MgCl₂), 2,5 mM jedes dNTPs, 5 Einheiten der FastGene Taq Polymerase, 10 pmol/µl jedes Primers und 10 ng Template-DNA enthielt. Die Amplifikation startete mit einer Denaturierungsphase bei 95°C von 30 s, gefolgt von 30 Zyklen, welche jeweils aus 5 s Denaturierung bei 95°C, Annealing bei 61°C, 64°C (*BnCAD5* Primer) oder 73°C

(*BnF5H* Primer) für 30 s und Elongation bei 72°C für 30 s bestand. Die Reaktion wurde durch eine zweiminütige finale Elongation beendet. Um Reproduzierbarkeit sicherzustellen, wurde die Reaktion zweimal wiederholt. Um die Größe der erhaltenen PCR-Fragmente zu überprüfen, wurden diese elektrophoretisch über ein 1% (w/v) TBE-Agarose-Gel aufgetrennt und über Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht visualisiert, wie in Abschnitt 2.6.5.2 beschrieben. Zur Verifizierung wurde der GeneRuler™ 100 bp Plus DNA-Leiter (Fa. Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Neben der Bestimmung der Fragmentgrößen wurde die Spezifität jedes Primers überprüft, indem neben der pflanzlichen DNA zusätzlich DNA von *S. sclerotiorum* und *bidest.* Wasser jeweils als Template eingesetzt wurden. Um die erhaltenen PCR-Produkte zu identifizieren wurden sie über das QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) gegeben. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden über die Gendatenbank NCBI durch das Programm Blastn (Anonymus, 2013e) verifiziert.

Isolierung von RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte ebenfalls nach dem modifizierten Protokoll zur RNA-/DNA-Extraktion von Winter et al. (2013), wie bereits in Abschnitt 2.6.5.2 beschrieben. Hierbei wurde mit den gleichen Proben gearbeitet, welche bereits zur Extraktion der DNA verwendet wurden. Nach der Lithiumchloridfällung der RNA wurde das erhaltene RNA-Pellet in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser bei RT für 8 min wieder gelöst und danach 2 µl 3 M NaO-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (100%) hinzugegeben. Nach 25 min Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 16.060 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Im Anschluss folgte ein Waschschrift mit 700 µl eisgekühltem RNase-freiem Ethanol (70%). Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 5 min luftgetrocknet. Zum Schluss wurde die RNA in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser für 10 min gelöst. Zur Dokumentation des RNA-Isolationserfolges wurde, ähnlich der DNA, eine gelelektrophoretische Auftrennung in einem 2% (w/v) Agarosegel, welches mit 1 x TAE Puffer angesetzt wurde, vorgenommen. Als Größenstandard wurde der RiboRuler™ High Range RNA-Leiter (Fa. Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 6 V/cm Gel in 1 x TAE Puffer. Die erhaltenen RNA-Fragmente wurden nach Ethidiumbromidfärbung mittels des Transilluminators Geldoc 1000 dokumentiert. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Take3™ Multi-Volume Plate

über das Epoch™ Multi-Volume Spektrophotometers und die Gen5™ Software (Fa. BioTek Inc., Winooski, USA) bestimmt.

Während der gesamten RNA-Extraktion wurde unter einem vorher gereinigten Abzug gearbeitet, um mögliche Kontaminationen durch Staub zu vermeiden. Alle verwendeten Geräte, Gefäße, Pipetten und Arbeitsflächen wurden einmal mit einer 10%igen (v/v) RNase-freien Wasserstoffperoxidlösung und RNase Away (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) behandelt bzw. gesäubert, um jegliche Kontamination mit RNasen auszuschließen. Verwendete Lösungen wurden mit DEPC (0,1%, v/v) versetzt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert oder direkt mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt. Für den elektrophoretischen Nachweis der RNA wurde 1 x TAE Puffer separat mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt, neuer Loading Dye verwendet und die Gelkammer sowie Gelschlitten und Kamm mit „RNase Away“ und RNase-freiem Wasser gesäubert.

DNase Verdau und cDNA Synthese

Nachdem RNA erfolgreich aus den Stängelproben extrahiert und die Konzentration bestimmt wurde, konnte aus dieser die komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) synthetisiert werden. Zuerst wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, wodurch jegliche Rückstände genomischer DNA aus der RNA-Aufreinigung abgebaut wurden. Hierfür wurde das DNase I, RNase-free Kit (Fa. Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Je DNase-Verdau wurde 1 µg RNA eingesetzt. Anschließend wurde die komplette Verdaureaktion (10 µl) für die cDNA-Synthese in einem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fa. Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) eingesetzt. Die Synthese der cDNA folgte den Herstellerangaben. Um sicherzustellen, dass keine der verwendeten Reagenzien kontaminiert war, wurde bei jedem Durchgang eine Negativkontrolle mitgeführt. Hierfür wurde DEPC-behandeltes Wasser an Stelle des RNA-Templates eingesetzt. Um den Erfolg der cDNA-Synthese zu überprüfen, lief bei jedem Synthesedurchgang ein interner Standard als Kontrolle mit. Bei diesem handelte es sich um RNA der humanen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) mit einer Konzentration von 0,05 µg/µl.

Kontrolliert wurde die cDNA-Synthese durch PCR-Amplifikation (s.o.), wobei hier die *BnActin*-Primer als qualitative Kontrolle der cDNA galten und die *BnCCR*-Primer Rückstände von genomischer DNA aufzeigten. Um eine ausreichende Menge an Nukleotiden sowie aktiven Polymerasen sicherzustellen, wurden 4 mM dNTPs sowie

5 Units Taq-Polymerase eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte entsprechend bei einer Annealing-Temperatur von 61°C.

Realtime PCR

Die quantitative Realtime PCR-Methode wurde mit dem 2 x SensiFast™ Probe No-ROX Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR-Reaktionansätze wurden in einem totalen Volumen von 10 µl durchgeführt und bestanden jeweils aus 5 µl 2 x SensiFast Mix, je 0,3 µM jedes Primers sowie 1 µl cDNA. Die PCR-Reaktion erfolgte durch das CFX 384 Real Time PCR Detektionssystem in 384er Platten mit drei technischen Wiederholungen. Die Amplifikation und die Schmelzkurvenanalyse folgten schematisch dem in Abschnitt 2.6.5.2 beschriebenen Programm, wobei die Annealing-Temperaturen entsprechend den Primern angepasst wurden. Für die Auswertung des Fluoreszenzsignals wurde die Software CFX Manager von Bio-Rad verwendet. Die amplifizierten Produkte wurden über ein 1% (w/v) Agarosegel elektrophoretisch nach ihrer Produktgröße verifiziert, indem sie mit dem GeneRuler™ 100 bp Plus DNA-Leiter (beide Fa. Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) verglichen wurden.

Relative Genexpressionsanalyse

Die Bestimmung der relativen Expression der Phenylpropanoidsynthesegene erfolgte nach der Pfaffl Methode (Pfaffl, 2001) entsprechend der angegebenen Formel.

$$R = \frac{(E_{\text{Ziel}})^{\Delta\text{CT Ziel (Kontrolle - Sclerotinia infiziert)}}}{(E_{\text{Referenz}})^{\Delta\text{CT Referenz (Kontrolle - Sclerotinia infiziert)}}$$

Wobei R das relative Expressionslevel, E_{Ziel} die qPCR-Effizienz des zu untersuchenden Gens und E_{Referenz} die qPCR-Effizienz des Referenzgens (*BnACT*) ist. Ct ist der Schwellenwert an dem die relative Fluoreszenz der Proben die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und ΔCt ist die Differenz zwischen dem Ct-Wert der Mock-inokulierten und dem Ct-Wert der *Sclerotinia*-inokulierten Behandlung für das Ziel- bzw. Referenzgen. Die spezifische Amplifikationseffizienz eines jeden Gens bzw. Primers wurde zuvor über eine Verdünnungsreihe mit pflanzlicher DNA bestimmt. Die relative Expression von vier biologischen Wiederholungen wurde für die statistische Analyse verwendet.

2.6.6 Physiologische Untersuchungen

2.6.6.1 Analyse der Zellwandzusammensetzung

Dieser Versuch sollte Aufschluss über die Pektin- und Cellulosezusammensetzung sowie den Gesamtzucker- und Hemicellulosegehalt der Zellwand geben. Hierfür wurden Stängel von Loras und Zhongyou 821 jeweils 2,5 cm ober- und unterhalb der Einstich-/Penetrationsstelle abgeschnitten und die 5 cm langen Stängelproben direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis gelagert versandt. Die Aufbereitung der Proben und die eigentliche Analyse erfolgten im Labor von Prof. Antonio Molina (Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular-UPM, Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP, UPM-INIA), Universidad Politécnica de Madrid (UPM), spanischer Kooperationspartner im Projekt MONARCH). Je 5 mg lyophilisiertes Stängelmateriale wurden in 96%igem Ethanol homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 70% Ethanol resuspendiert und für eine Stunde im Wasserbad gekocht. Das pelletierte Material wurde erneut mit 70% Ethanol versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Probe zweimal in reinem Aceton gewaschen, dann mit einem Methanol/Chloroform-Gemisch (1:1, v/v) versetzt und schließlich in reinem Äther gelöst. Nach diesen Behandlungen wurde das Pellet solange luftgetrocknet, bis sich ein konstantes Gewicht eingestellt hatte. Dieser sogenannte Alkohol-unlösliche Rückstand (AIR, alcohol-insoluble residue) wurde nun in einer Lösung von 2 M Trifluoroessigsäure bei 121°C für eine Stunde hydrolisiert. Die Analyse des Gesamtzucker- und Hemicellulosegehalts erfolgte aus der gelösten AIR-Fraktion nach der Phenol-Schwefelsäure-Methode (Dubois et al., 1956). Hierbei wurde reine Glucose als Standard verwendet. Die Pektinanalyse erfolgte über die Methode von Blumenkratz & Asbeo-Hansen (1973). Hierfür wurde ebenfalls die gelöste Fraktion der AIR-Proben eingesetzt und als Standard Galacturonsäure verwendet. Für die Untersuchung des Cellulosegehalts wurde die unlösliche AIR-Fraktion nochmals mit Schwefelsäure versetzt und der Überstand über die Phenol-Schwefelsäure-Methode (Miedes & Lorences, 2004) analysiert. Untersucht wurden komplett unbehandelte Stängel zum Zeitpunkt 0 dpi sowie infizierte Pflanzen und Mock-Kontrollen zum Zeitpunkt 7 dpi. Die Analyse erfolgte mit zwei biologischen Wiederholungen, welche aus je vier Rapsstängeln je Zeitpunkt und Behandlung bestanden.

2.6.6.2 Bestimmung der Festigkeit des Stängelgewebes

Die Erfassung der Gewebefestigkeit der Rapsstängel erfolgte durch eine Druck-Kraftmessung mit dem Texture Analyser TA-XT2[®] der Firma Winopal (Elze, Deutschland) der Abteilung Qualität pflanzlicher Erzeugnisse der Georg-August-Universität Göttingen.

Je Genotyp wurden acht unbehandelte Pflanzen (BBCH 50-52) zum Zeitpunkt 0 dpi verwendet. Von jeder Pflanze wurde ein 5 cm langes Stängelstück zurechtgeschnitten, indem der Stängel 5 und 10 cm oberhalb des Hypokotyls gekappt wurde. Anschließend wurden zwei Penetrationspunkte auf der Höhe von 1,5 cm und 3 cm des Stängelstücks markiert. Die so vorbereiteten Proben wurden mit ihrer Markierung direkt unter der Messvorrichtung des Texture Analysers positioniert. Als Penetrationskörper wurde eine handelsübliche Nähnadel (Größe Nr. 9) verwendet, welche sich über den Messarm (Stable Micro System) auf den Stängelabschnitt zubewegte (Abb. 4). Die standardisierte Penetrationstiefe betrug 2 mm. Das zur Auswertung der Messergebnisse verwendete Programm hieß Texture Expert (Stable Micro System Ltd., Version 1.22). Es wurde sowohl der Eindringwiderstand der Stängeloberfläche (Wachsschicht und Epidermis), als auch das Integral des Widerstandes im Inneren des Stängelgewebes ermittelt.

Während des Zeitraums von der Ernte und Vorbereitung der Stängelstücke bis zur Kraftmessung wurden die Proben auf Eis gelagert.



Abb. 4 Analyse der Gewebestabilität von Rapsstängel über die Druck-Kraftmessung des Texture Analysers TA-XT2®.

2.6.7 Histologische Untersuchungen

2.6.7.1 Probenahme und Fixierung des Stängelmaterials

Die Stängel wurden jeweils 1 cm ober- und unterhalb der Läsion bzw. der Einstichstelle in vertikaler Richtung abgeschnitten. Die Stängelstücke wurden dann in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in einem Gemisch aus Essigsäure-Chloroform-Ethanol (0,2% Essigsäure, 24,8% Chloroform, 75% Ethanol, ACE) fixiert und in diesem gelagert.

2.6.7.2 Paraffinverfahren modifiziert nach Stüwe & von Tiedemann (2013)

Entwässerung und Einbettung in Paraffin

Nach etwa vier Monaten wurden die fixierten Proben aus der ACE-Lösung entnommen und für einen kurzen Waschschrift in eine Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) überführt. Anschließend erfolgte die Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 90% und 96% Ethanol). Im Anschluss an die Entwässerung wurden die Stängelproben nochmals in kleinere Stücke geschnitten. Hierfür wurde jeweils ober- und unterhalb der Läsion ein 2 mm langes Stück mittels Rasierklinge abgeschnitten. Dieses beinhaltet die Übergangszone zwischen gesundem Stängelmateriale an der Läsionsgrenze und infiziertem Stängelmateriale. Bei den Kontrollen wurde als Ausgangspunkt immer die Position der Einstichstelle verwendet. Die entstandenen 2 mm großen Stängelproben wurden nun über Zwischenschritte in Paraffin eingebettet. Dazu wurden sie zuerst über mehrere Ethanol (96%)/Roti-Histol-Gemische (3:1, 1:1, 1:3) in reines Roti-Histol überführt. Dann erfolgte die Inkubation in kalt- und warmgesättigten Roti-Histol/Paraffin-Gemischen, bis die Proben schließlich in reinem, geschmolzenem Paraffin (60°C) verweilten. Nun wurden entsprechende Einbettungsförmchen mit reinem, geschmolzenem Paraffin gefüllt und die Probe mit einer vorgewärmten Pinzette in diese hineingelegt und ausgerichtet. Um das Erstarren der Blöckchen zu beschleunigen, wurde die Form für 5 min in Eiswasser getaucht. Danach konnten die eingebetteten Proben aus der Form entnommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert werden. Um ein leichteres Ablösen der Paraffinblöcke zu ermöglichen wurden die Förmchen zuvor dünn mit Glycerin bestrichen.

Die entsprechenden Einwirkzeiten für die verschiedenen Schritte bzw. Lösungen sind der folgenden Tabelle 11 zu entnehmen.

Tab. 11 Ablauf der Paraffineinbettung unter Angabe der verwendeten Lösungen mit den entsprechenden Temperaturen und Inkubationszeiten

Lösung	Temperatur	Inkubationszeit
PBS	RT	1 h
50% Ethanol	RT	2 h
70% Ethanol	RT	2 h
90% Ethanol	RT	3 h
96% Ethanol	RT	Über Nacht
Ethanol/Roti-Histol 3:1	RT	3 h
Ethanol/Roti-Histol 1:1	RT	3 h
Ethanol/Roti-Histol 1:3	RT	3 h
Reines Roti-Histol	RT	Über Nacht
Kaltgesättigtes Roti-Histol/Paraffin	RT	1 Tag
Warmgesättigtes Roti-Histol/Paraffin	45°C	1 Tag
Reines Paraffin	65°C	2 Tage

Schneiden und Aufbringen auf gelatinierten Objektträgern

Um die eingebetteten Proben mit dem Rotationsmikrotom (HM 335 E, Fa. Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland) schneiden zu können, mussten diese an Holzblöckchen befestigt werden. Dafür wurden die Paraffinblöcke vorsichtig mit einem Skalpell getrimmt, wodurch überschüssiges Paraffin entfernt wurde. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe von flüssigem Paraffin auf den Holzblöcken befestigt. Die aufgeblockten Proben konnten nun in das Mikrotom eingespannt und 14 bis 20 µm dicke Querschnitte des Stängels angefertigt werden. Diese Schnitte wurden mittels einer Pinzette und einem dünnen Pinsel vorsichtig auf einen gelatinierten Objektträger überführt, welcher zuvor mit einem Wassertropfen benetzt wurde. Je Objektträger wurden immer drei Schnitte platziert. Die Fixierung der Schnitte erfolgte durch das Auflegen des Objektträgers auf eine Heizplatte (ca. 40°C), wobei darauf geachtet wurde, dass sich der Paraffinschnitt nur streckte und nicht komplett schmolz.

Herstellung gelatinierter Objektträger

Neue Objektträger (ELKA^{med} ECO, Fa. Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) wurden kurz mit Aceton gereinigt und anschließend mit Leitungswasser abgespült, um evtl. Verunreinigungen und Fettschlieren zu entfernen.

Danach wurden sie in einem Ultraschallbad (Sonorex Super RK 100, Fa. Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) mit etwas Spülmittel gelegt und nach fünfzehnminütiger Behandlung gründlich mit bidest. Wasser gespült. Anschließend wurden die Objektträger in eine Gelatinelösung getaucht und zur Trocknung auf Filterpapier schräg gegen einen ca. 4 cm hohen Gegenstand gestellt. In einem Präparatkasten wurden sie bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

Entparaffinisierung

Um die erhaltenen Stängelschnitte weiter färben zu können, mussten diese zunächst vom Paraffin befreit werden. Dazu wurden die Objektträger mit den fixierten Paraffinschnitten in reines Roti-Histol getaucht. Anschließend wurden die Schnitte über eine umgekehrte Alkoholreihe wieder bewässert (Tab.12). Die Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt.

Tab. 12 Entparaffinisierung von Paraffinschnitten

Lösung	Inkubationszeit
Reines Roti-Histol	30 min
96% Ethanol	5 min
90% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
50% Ethanol	5 min
Bidest. Wasser	5 min

2.6.7.3 Histochemische Färbe- und Nachweismethoden an Paraffinschnitten

Alle Untersuchungen wurden an einem Leica Mikroskop DM500 CS (Fa. Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Insgesamt wurden bei allen Färbe- und Nachweismethoden fünf Stängelproben je Behandlung und Zeitpunkt untersucht, wobei je Stängelprobe 15 Schnitte mikroskopiert wurden.

Eigenfluoreszenz der Phenole

Polyphenolische Verbindungen konnten unter UV-Licht durch Eigenfluoreszenz nachgewiesen werden. Dazu wurde der Filterwürfel A mit den folgenden Einstellungen verwendet: 340-380 nm Anregungsfilter, Dichromatischer Spiegel bei 400 nm und Suppressionsfilter bei 425 nm. Unter diesen Bedingungen sind Phenoleinlagerungen als bläuliche Fluoreszenz des Pflanzengewebes erkennbar.

Phloroglucinol-Färbung (Lignin)

Die Phloroglucinol-Färbung, auch Wiesner-Färbung genannt, dient zum Nachweis von Lignin im Pflanzengewebe. Zur Färbung wurden einige Tropfen der Phloroglucin-Ethanol-Lösung (0,3 g Phloroglucin in 10 ml 92% Ethanol) auf die entparaffinierten Stängelquerschnitte gegeben. Nach 2 min Inkubation wurden die Schnitte kurz mit bidest. Wasser gespült und dann für 1 min mit einer 20%igen HCl-Lösung bedeckt. Anschließend wurden die Schnitte in der HCl-Lösung unter dem Lichtmikroskop untersucht. Lignineinlagerungen waren durch eine purpurrote Färbung zu erkennen (Gerlach, 1984).

Mäule-Färbung (Monolignole)

Um die in Dikotylen vorkommenden Ligninmonomere Syringyl (S)- und Guaiacyl (G)-Lignin qualitativ nachzuweisen, wurde die Mäule-Färbung verwendet. Hierfür wurde eine Kaliumpermanganatlösung (1% KMnO_4) auf die Stängelquerschnitte getropft und für 5 min inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift mit bidest. Wasser wurde eine 10% HCl-Lösung auf die Schnitte gegeben. Nach 5 min wurden die Objektträger erneut mit bidest. Wasser gespült und die Schnitte anschließend in 25% Ammoniaklösung aufgenommen und unterm Lichtmikroskop mikroskopiert. Lignifiziertes Gewebe von Angiospermen verfärbt sich bei Anwesenheit von S-Monomeren rötlich und bei G-Einheiten gelblich (Gerlach, 1984; Goujon et al., 2003).

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch Verwendung des Programms Statistica (Version 12, StatSoft, Tulsa-Oklahoma, USA). Daten mit Normalverteilung und Varianzhomogenität wurden über die ein- oder mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) nach dem Tukey Test ausgewertet. Konnte innerhalb der Daten keine Varianzhomogenität nachgewiesen werden, so wurde der nicht so konservative Bonferroni Test verwendet. Daten die eine andere lineare-Verteilung als die Normalverteilung aufwiesen wurden über das Allgemeine Lineare Model untersucht. Bei ungleicher Anzahl an Wiederholungen innerhalb eines Versuches wurde der HSD (Honestly Significant Difference) Test für ungleiche N verwendet. Datensätze bei denen keine der bekannten statistischen Verteilungen sowie keine Varianzhomogenität vorlag, wurden über den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test ausgewertet.

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

Untersuchungen von Zusammenhängen zwischen verschiedenen Versuchen wurden über die Rangkorrelation nach Spearman ausgewertet. Hierbei wurde immer der Korrelationskoeffizient nach Spearman (R_s) sowie das Signifikanzniveau p angegeben. Korrelationsanalysen zur Untersuchungen der linearen Zusammenhänge zwischen verschiedenen Versuchsparametern wurden nach Pearson durchgeführt. Hierbei wurde immer der Pearson-Korrelationskoeffizient r , das Bestimmtheitsmaß R^2 , das Signifikanzniveau p und die Geradengleichung $y = a * x + b$, wobei a die Steigung der Geraden und b den y -Abschnitt darstellt, angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Resistenzscreening von *Brassica*-Arten im Gewächshaus

Das Resistenzscreening im Gewächshaus wurde innerhalb von zwei Jahren in unabhängigen Versuchsdurchgängen durchgeführt. Da der Faktor Versuchsjahr einen Effekt auf die Befallsparameter hatte und zusätzlich die Genotypensets zwischen den Versuchsjahren variierten (siehe Abschnitt 2.4.1, Tab. 3), wurden die Ergebnisse separat nach Versuchsjahr dargestellt.

3.1.1 Versuchsjahr 2012

Die gemessenen Läsionslängen wurden zum normalisierten AULPC (norm. AULPC) verrechnet und sind zusammen mit der Standardabweichung in Tabelle 13 dargestellt. Insgesamt sieben Genotypen zeigten im Mittel niedrigere norm. AULPC-Werte als der resistente Standard Zhongshuang 9 (0,97). Dabei handelte es sich um vier wilde *Brassica*-Arten, die domestizierte Art *B. oleracea italica* 1, die Liniensorte Lorenz und die Rapsresynthese RUY1. Sechs Genotypen besaßen im Mittel höhere Krankheitslevel als der anfällige Standard Pacific (norm. AULPC = 0,99). Nur die Rapsresynthese OLL1 hatte einen norm. AULPC-Wert, welcher sich zwischen den mittleren norm. AULPC-Werten der resistenten und anfälligen Kontrolle einordnete. Aufgrund der geringen Spannweite der ermittelten norm. AULPC-Werte (zwischen 0,41 und 1,28) sowie der großen Streuung der Daten innerhalb der Genotypen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen *Brassica*-Arten.

Zusätzlich wurde die Inokulationseffizienz für jeden Genotyp ermittelt (Tab. 13). Effizienzwerte nahe 100% bedeuten, dass beinahe jede Inokulation zu einer erfolgreichen Symptomausprägung führte. Bei niedrigen Effizienzen hingegen wurden Läsionen erst nach mehrmalig wiederholten Inokulationen hervorgerufen. Im Versuch lagen die Inokulationseffizienzen zwischen 21 und 86% und wiesen somit eine breite Spannweite von rund 65% auf. Bei dem resistenten Standard Zhongshuang 9 lag die Inokulationseffizienz bei rund 40%, während sich bei der anfälligen Sorte Pacific ein Wert von 28% ergab. Die niedrigste Inokulationseffizienz zeigte *B. cretica*, die Liniensorte NK-Bravour wies den höchsten Wert auf. Bei der Betrachtung der Verteilung der Inokulationseffizienzen im Vergleich mit den zugehörigen norm. AULPC-Werten wurde kein Zusammenhang zwischen den beiden Befallsparametern festgestellt (Tab.17).

Tab.13 Normalisierte AULPC-Werte (norm. AULPC) der im Gewächshausscreening 2012 getesteten *Brassica*-Arten und Resynthesen mit Standardabweichung (SD) und entsprechender Inokulationseffizienz (IE) [%] sortiert nach aufsteigendem norm. AULPC-Werten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede über den HSD-Test für ungleiche N des Allgemeinen Linearen Modells festgestellt werden ($n = 13-20$, $p \leq 0,05$).

Genotyp	norm. AULPC \pm SD	IE [%]
<i>B. drepanensis</i>	0,41 \pm 0,41	46,88
<i>B. incana</i>	0,43 \pm 0,45	31,58
<i>B. oleracea robertiana</i>	0,57 \pm 0,53	27,03
<i>B. insularis</i>	0,59 \pm 0,93	30,43
Lorenz	0,64 \pm 0,83	29,82
RUY1	0,66 \pm 0,56	31,37
<i>B. oleracea italica</i> 1	0,88 \pm 0,96	35,00
Zhongshuang 9	0,97 \pm 1,12	39,53
OLL1	0,98 \pm 1,13	57,14
Pacific	0,99 \pm 1,44	28,00
<i>B. oleracea</i>	1,01 \pm 1,16	28,26
<i>B. oleracea italica</i> 2	1,03 \pm 1,14	36,11
NK-Bravour	1,05 \pm 0,88	85,71
<i>B. cretica</i>	1,09 \pm 0,80	20,75
BOY1	1,13 \pm 1,25	58,62
<i>B. villosa</i>	1,28 \pm 0,99	43,24

Neben dem Befall wurden von jeder *Brassica*-Art morphologische Parameter, wie Stängelhöhe und Stängelumfang bestimmt (Anhang Tab.2A). Die gemessenen Stängelhöhen variierten zwischen den Genotypen von 9,4 bis 79,1 cm, wodurch signifikante Unterschiede abgesichert werden konnten. Bei Betrachtung der norm. AULPC-Werte und der entsprechenden Stängelhöhen fiel auf, dass die vier *Brassica*-Wildarten mit den niedrigsten Befallswerten auch die geringsten Stängelhöhen besaßen (9,4 cm bis 11,4 cm). Die restlichen Genotypen wiesen deutlich höhere Stängel auf. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Sorte, den norm. AULPC-Werten und den Stängelhöhen nachgewiesen werden. Jedoch wird aus Abbildung 5 ein Effekt der Akkumulation von kleinen norm. AULPC mit entsprechend kleinen Stängelhöhen deutlich.

Die gemessenen Stängelumfänge [mm] zeigten ebenfalls eine Differenzierung zwischen den Genotypen (Anhang Tab. 2A). Jedoch konnten aufgrund der starken Streuung der Daten nur relativ große Unterschiede statistisch abgesichert werden. Ein signifikanter

Zusammenhang zwischen den Befallsparametern und dem Stängelumfängen lag nicht vor (Anhang, Abb. 1A).

Eine Korrelation der Stängelhöhe oder des Stängelumfangs mit dem Befallsparameter Inokulationseffizienz zeigte ebenfalls keine statistisch absicherbaren Zusammenhänge (Anhang, Abb. 2A).

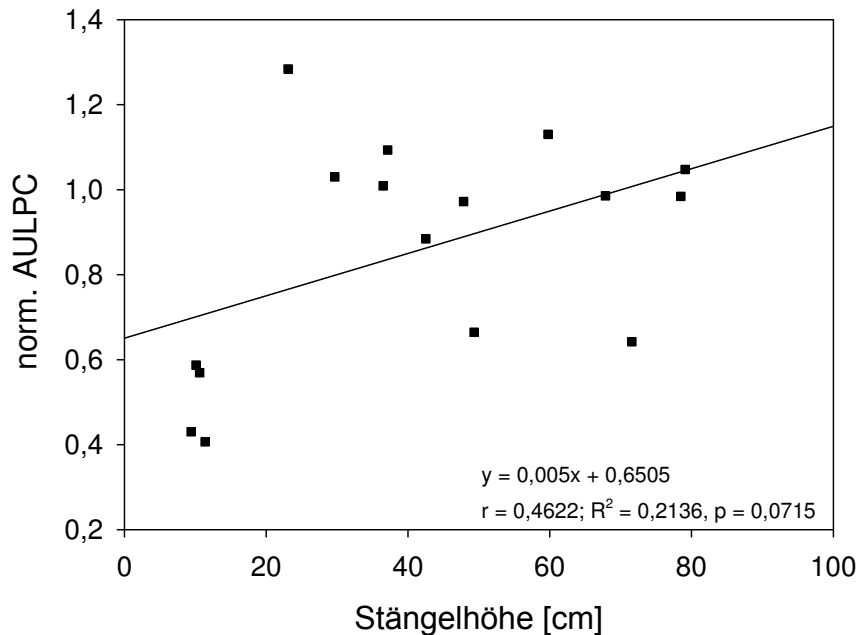


Abb. 5 Korrelationsanalyse für die Beziehung zwischen norm. AULPC und Stängelhöhe [cm] der im Gewächshauscreening geprüften *Brassica*-Arten, Rapssorten und Resynthesen. Die Analyse wurde nach Pearson mit den Mittelwerten des norm. AULPC und den entsprechenden Stängelhöhen von 14 *Brassica*-Arten und zwei Referenzsorten durchgeführt ($n = 16$, $p \leq 0,05$).

R^2 = Bestimmtheitsmaß, r = linearer Korrelationskoeffizient (Pearson-Korrelationskoeffizient)

3.1.2 Versuchsjahr 2013

Da in diesem Jahr zwei verschiedene Inokulationen vorgenommen wurden, wurden die morphologischen und Befallsparameter auf Effekte der Faktoren Genotyp, Inokulationsvariante und deren Interaktion hin untersucht (Tab. 14). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Einfluss dieser Faktoren auf die Verteilung der norm. AULPC-Werte. Die morphologischen Parameter Stängelhöhe (Höhe) und Stängelumfang (Umfang) wurden nur durch den Faktor Genotyp beeinflusst. Angesichts des Effekts der Inokulation wurde die Auswertung entsprechend der Variante unterschieden.

Tab. 14 F-Werte der Varianzanalyse für die Effekte der Faktoren Genotyp, Inokulationsvariante und deren Interaktion auf den Befall (norm. AULPC) mit zugehörigen Freiheitsgraden (FG) des Gewächshausversuchs 2013. Signifikante Unterschiede in der Varianz wurden als Sternchen markiert (ANOVA, *** $p \leq 0,001$).

Faktor	FG	norm. AULPC
Genotyp	21	10,44 ***
Inokulationsvariante	1	26,07 ***
Genotyp x Inokulationsvariante	21	8,84 ***

Die ermittelten norm. AULPC-Werte lagen für die Variante „unverletzt inokuliert“ zwischen 0,03 und 1,99 (Tab. 15). Auffällig war, dass der norm. AULPC-Wert des anfälligen Standards Pacific mit 0,66 unter dem der resistenten Linie Zhongshuang 9 (1,34) lag. Insgesamt zeigten 15 von 20 getesteten Akzessionen im Mittel geringere norm. AULPC-Werte als der anfällige Standard Pacific. Am besten schnitten die domestizierte Art *B. oleracea capitata* 1 und die Wildart *B. oleracea rupestris* ab. Trotz der großen Spannweite zwischen den Werten konnte aufgrund der hohen Standardabweichung mit zunehmenden Mittelwert des norm. AULPCs nur eine schwache Differenzierung zwischen den *Brassica*-Arten statistisch abgesichert werden.

Bei der Variante „verletzt inokuliert“ wurde eine vergleichsweise bessere Differenzierung zwischen den norm. AULPC-Werten der Genotypen erzielt. Wie Tabelle 15 zu entnehmen, lag die Spannweite der norm. AULPC-Werte hier zwischen 0,11 und 5,06. Von 20 Genotypen zeigten 15 *Brassica*-Arten niedrigere norm. AULPC-Mittelwerte als der resistente Standard Zhongshuang 9 (0,93). Am niedrigsten waren die norm. AULPC-Werte der beiden wilden *Brassica*-Akzessionen *B. macrocarpa* (0,11) und *B. oleracea robertiana* (0,16). Signifikant höhere norm. AULPC-Werte als der anfällige Standard Pacific besaßen die beiden domestizierten Rübsenarten *B. rapa pekinensis* 1 (2,7) und *B. rapa pekinensis* 2 (5,06).

Beim Vergleich der norm. AULPC-Werte der beiden Inokulationsbehandlungen, konnten für einige Genotypen statistisch signifikante Unterschiede ermittelt werden (Tab. 15). Bis auf *B. oleracea robertiana* beruhten diese auf höheren norm. AULPC-Werten der „verletzt inokulierten“ Variante im Vergleich zur „unverletzten“. Die beiden Liniensorten Lorenz und Pacific (anfälliger Standard) zeigten eine schwache Variation zwischen den beiden Behandlungen, während die restlichen wilden und domestizierten *Brassica*-Akzessionen, mit Ausnahme von *B. oleracea robertiana*, stärkere Abweichungen zwischen den Mittelwerten der norm. AULPCs aufwiesen.

Tab. 15 Normalisierte AULPC-Werte (norm. AULPC) der „unverletzt inokulierten“ (unvi) und „verletzt inokulierten“ (vi) Varianten der im Gewächshausscreening 2013 getesteten *Brassica*-Arten und Resynthesen mit entsprechender Standardabweichung (SD) und Angabe des signifikanten Unterschieds zwischen den beiden Behandlungen. Die Daten sind sortiert nach aufsteigenden normalisierten AULPC-Werten der Variante „unverletzt“. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den norm. AULPC-Werten der Genotypen (n = 10-13, HSD für ungleiche N, p ≤ 0,05). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der norm. AULPC jedes Genotyps der beiden Behandlungen sind mit Sternen markiert und ergeben sich nach dem t-Test (n = 10-13, Signifikanzniveaus: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

Genotyp	norm. AULPC (unvi) ± SD	norm. AULPC (vi) ± SD	Signifikanz
<i>B. oleracea capitata</i> 1	0,03 ± 0,05 a	0,70 ± 0,73 AB	**
<i>B. oleracea rupestris</i>	0,03 ± 0,08 a	0,32 ± 0,38 AB	**
<i>B. napus</i>	0,13 ± 0,16 ab	0,32 ± 0,31 AB	
<i>B. rapa pekinensis</i> 1	0,14 ± 0,21 ab	2,70 ± 1,74 E	***
<i>B. juncea</i>	0,15 ± 0,19 ab	2,26 ± 0,90 CDE	***
<i>B. macrocarpa</i>	0,18 ± 0,21 ab	0,11 ± 0,10 A	
<i>B. cretica</i>	0,18 ± 0,06 ab	0,42 ± 0,87 AB	
<i>B. oleracea capitata</i> 2	0,31 ± 0,41 ab	2,33 ± 1,91 DE	**
<i>B. oleracea italica</i> 2	0,36 ± 0,24 ab	0,29 ± 0,25 AB	
<i>B. rupestris</i>	0,40 ± 0,65 ab	0,33 ± 0,34 AB	
<i>B. drepanensis</i>	0,44 ± 0,34 ab	0,26 ± 0,15 A	
<i>B. oleracea robertiana</i>	0,50 ± 0,58 ab	0,16 ± 0,08 A	*
<i>B. oleracea italica</i> 1	0,51 ± 0,80 ab	0,69 ± 0,37 AB	
Pacific	0,66 ± 1,01 ab	1,07 ± 0,87 ABCD	*
<i>B. villosa</i>	0,68 ± 0,56 Ab	0,52 ± 0,50 AB	
RUY1	0,74 ± 0,98 ab	0,57 ± 0,56 ABC	
Lorenz	0,76 ± 1,11 ab	0,84 ± 0,85 ABC	*
<i>B. rapa pekinensis</i> 2	0,85 ± 2,55 ab	5,06 ± 1,52 F	**
<i>B. oleracea</i>	1,01 ± 1,41 ab	0,74 ± 0,79 AB	
Zhongshuang 9	1,34 ± 1,78 ab	0,93 ± 0,85 AB	
BOY1	1,80 ± 1,35 b	1,47 ± 0,58 BCDE	
<i>B. carinata</i>	1,99 ± 2,09 ab	0,64 ± 0,54 AB	

Auch in diesem Versuchsdurchgang wurden neben dem Befall morphologische Parameter erhoben. Da zwischen den beiden Inokulationsvarianten keine statistischen Unterschiede der gemessenen Werte der Stängelhöhe und des Stängelumfangs vorlagen (Tab. 14), wurden die Werte für die jeweiligen Genotypen zusammengefasst. In diesem Durchgang zeigte sich eine verbesserte Differenzierung zwischen den Stängelhöhen der verschiedenen *Brassica*-Arten (Anhang, Tab. 3A). Die Messwerte lagen zwischen 4,9 und 112,7 cm. Es gab wiederum eine Gruppe von Genotypen, welche sich durch sehr geringe Stängelhöhen (4,9 bis 12,2 cm) sowie eine relativ kleine Streuung der Werte auszeichnete. Dieser Gruppe gehörten nur wilde bzw. domestizierte *B. oleracea* Akzessionen an. Die geringsten Höhen wurden bei *B. drepanensis* und *B. oleracea robertiana* gemessen, welche bereits im Versuchsjahr 2012 niedrigere Stängelhöhen aufwiesen. Die größten Stängelhöhen lagen zwischen 91,2 und 112,7 cm. Zu dieser Gruppe gehörten die Resynthese BOY1, drei domestizierte *Brassica*-Arten und die wilde Akzession *B. juncea*. Die restlichen Genotypen wiesen Höhen zwischen 16,2 und 69,9 cm auf. Da eine deutliche Unterteilung der verschiedenen Genotypen entsprechend ihrer Stängelhöhen vorgenommen werden konnte, wurde ebenfalls überprüft, ob der Sortentyp einen Effekt auf die Verteilung der norm. AULPC-Werte und die Stängelhöhe hatte. Dabei wurde wieder eine Unterscheidung entsprechend der verschiedenen Inokulationsvarianten vorgenommen (Abb. 6). In beiden Varianten konnte nach Pearson-Korrelation ein linearer Zusammenhang zwischen den Stängelhöhen und den norm. AULPC-Werten aufgezeigt werden, welcher in beiden Fällen statistisch absicherbar war. Die Korrelation für die Variante „verletzt inokuliert“ (Abb. 6, rechts) war mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,445$ stärker, als der Zusammenhang zwischen den Parametern der „unverletzt inokulierten“ Variante ($R^2 = 0,19$, Abb. 6, links).

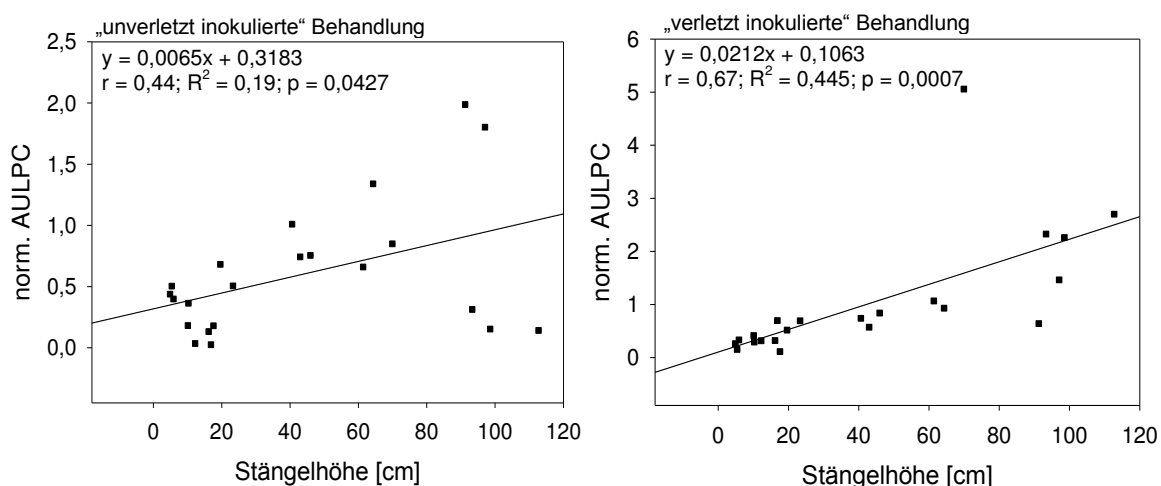


Abb. 6 Korrelationsanalyse zwischen norm. AULPC und Stängelhöhe [cm] der beiden Inokulationsvarianten „unverletzt“ (links) und „verletzt inokuliert“ (rechts) der im Gewächshauscreening 2013 eingesetzten *Brassica*-Arten, Rapsorten und Resynthesen. Für die Analyse wurden die Mittelwerte des norm. AULPC in linearen Zusammenhang mit den entsprechenden Stängelhöhen gesetzt (Pearson-Korrelation: $n = 22$, $p \leq 0,05$).

R^2 = Bestimmtheitsmaß, r = linearer Korrelationskoeffizient (Pearson-Korrelationseffizient)

Neben den Stängelhöhen zeigten die Genotypen auch eine hohe Variabilität bei den gemessenen Stängelumfängen [mm] (Anhang, Tab. 3A). Auch hier konnte eine Unterteilung in mehrere Größengruppen vorgenommen werden. Die erste Gruppe bestand nur aus wilden *Brassica*-Akzessionen und zeichnete sich durch relativ geringe Stängelumfänge von 4,3 bis 5 mm aus. Dabei besaßen die beiden Wildarten *B. juncea* und *B. oleracea rupestris* mit 4,3 und 4,4 mm die geringsten Umfänge. Die nächste Gruppe (6 bis 7 mm) beinhaltete neben wilden und domestizierten Arten die beiden Rapsresynthesen RUY1 und BOY1 sowie den resistenten Standard Zhongshuang 9. Ein Stängelumfang von 8 bis 9 mm zeichnete die dritte Gruppe aus, zu der neben verschiedenen *Brassica*-Arten auch die Liniensorte Lorenz und der anfällige Standard Pacific zählten. Die Stängelumfänge von *B. cretica* und *B. oleracea italica* 2 waren mit 11,5 und 11,6 mm am größten. Aufgrund dieser deutlichen Unterteilung der Genotypen in verschiedene Gruppen wurde überprüft, ob der Sortentyp Einfluss auf den Zusammenhang zwischen norm. AULPC-Werten und Stängelumfang [mm] hat. Hierfür wurde nochmals die Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt, wobei immer die Mittelwerte der norm. AULPCs separat nach Inokulationsvariante mit dem jeweiligen Umfang verglichen wurden. Es konnte kein linearer Zusammenhang zwischen dem Befallsparameter und den Stängelumfängen aufgezeigt werden (Anhang, Abb. 3A).

3.2 *In vivo* Blattsegmenttest von *Brassica*-Arten zur Oxalsäuresensitivität

Im Blattsegmenttest wurden die gleichen *Brassica*-Arten, Resynthesen und Liniensorten getestet, welche bereits in den Gewächshauscreenings verwendet wurden. Da das Material eine hohe Variabilität in der Morphologie zeigte (siehe Kapitel 3.1 Gewächshauscreening) wurde die Anzahl der Spaltöffnungen pro mm² als zusätzlicher Faktor bestimmt (Abschnitt 2.4.3), um evtl. Korrekturen der Messwerte vorzunehmen. Jedoch konnte über eine Korrelationsanalyse kein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl Spaltöffnungen und der gemessenen Leitfähigkeit gefunden werden (Anhang, Tab. 4A), weshalb eine Verrechnung der Werte nicht vorgenommen wurde. Da auch in diesem Screening ein signifikanter Einfluss des Versuchsdurchgangs auf die normalisierten Leitfähigkeitsänderungen (norm. Leitfähigkeitsänderungen) [μS] ermittelt wurde, musste die Auswertung der Daten separat nach Versuchsjahr erfolgen. In Tabelle 16 sind die norm. Leitfähigkeitsänderungen dargestellt. Diese ergaben sich durch die Korrektur der Änderungen der Leitfähigkeit [μS] nach der Inkubation in 2 mM Oxalsäurelösung um die Leitfähigkeitsänderung [μS] in der Kontrollvariante mit Wasser und der anschließenden Normalisierung um die Mittelwerte der Leitfähigkeitsänderungen der Standardgenotypen Pacific und Zhongshuang 9 entsprechend der Versuchsjahre (Abschnitt 2.5.2). Im Versuchsjahr 2012 bewegten sich die Änderungen der norm. Leitfähigkeit in einem Bereich von 0,8 bis 1,9 μS . Die domestizierte Sorte *B. oleracea italica* 2 zeigte die niedrigsten norm. Leitfähigkeitsänderungen. Für die Resynthese BOY1 sowie die wilden Akzessionen *B. drepanensis*, *B. oleracea robertiana* und *B. insularis* wurden hingegen deutlich höhere Leitfähigkeitsänderungen ermittelt. Die beiden Standardgenotypen Pacific und Zhongshuang 9 zeigten keine Unterschiede in ihrer Oxalsäuresensitivität.

Im Jahr 2013 bewegten sich die Änderungen der norm. Leitfähigkeiten zwischen 0,7 bis 3 μS . Diese größere Streuung der Daten beruht auf der erhöhten Anzahl getesteter Genotypen im Vergleich zum Versuchsjahr 2012. Die geringste norm. Leitfähigkeitsänderung zeigte auch hier *B. oleracea italica* 2. Außerdem wiesen *B. oleracea italica* 1 und die wilde Akzession *B. drepanensis* ebenfalls niedrige Leitfähigkeitsänderungen auf, wobei *B. drepanensis* 2012 mit 1,6 μS zu den oxalsäuresensitiven Genotypen gehörte. Die höchsten norm. Leitfähigkeitsänderungen wurden bei RUY1 und einer Reihe wilder *Brassica*-Akzessionen bestimmt, wobei *B. oleracea robertiana* sich bereits 2012 als sensitiv gegenüber Oxalsäure gezeigt hatte. Auffällig war, dass die anfällige Standardsorte Pacific im Mittel besser abschnitt als der resistente Standard Zhongshuang 9.

Tab.16 Änderung der normalisierten Leitfähigkeit (norm. Leitfähigkeit) [μS] nach Inkubation in 2 mM Oxalsäure korrigiert um die Leitfähigkeit der Wasser-Kontrolle und nach Normalisierung um die Mittelwerte der Leitfähigkeitsänderungen der Standardgenotypen mit zugehöriger Standardabweichung (SD) der in den Versuchsjahren 2012 und 2013 getesteten *Brassica*-Arten. Signifikante Unterschiede zwischen den Änderungen der Leitfähigkeiten der Genotypen sind durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet (2012: n = 15, 2013: n = 22; Bonferroni Test, $p \leq 0,05$).

Jahr	Genotype	norm. Leitfähigkeit \pm SD [μS]	
2012	<i>B. oleracea italica</i> 2	0,8 \pm 0,31	a
	OLL1	1,0 \pm 0,19	abcd
	Pacific	1,0 \pm 0,23	ab
	Zhongshuang 9	1,0 \pm 0,37	ab
	RUY1	1,1 \pm 0,45	abcd
	Lorenz	1,1 \pm 0,16	abc
	<i>B. cretica</i>	1,3 \pm 0,27	abcde
	<i>B. incana</i>	1,3 \pm 0,51	abcde
	<i>B. oleracea italica</i> 1	1,3 \pm 0,46	abcde
	<i>B. oleracea</i>	1,4 \pm 0,19	abcde
	<i>B. villosa</i>	1,4 \pm 0,56	abcde
	BOY1	1,5 \pm 0,33	bcde
	<i>B. drepanensis</i>	1,6 \pm 0,56	cde
	<i>B. oleracea robertiana</i>	1,6 \pm 0,37	de
	<i>B. insularis</i>	1,9 \pm 0,41	e
2013	<i>B. oleracea italica</i> 2	0,7 \pm 0,23	a
	<i>B. oleracea italica</i> 1	0,8 \pm 0,26	a
	<i>B. drepanensis</i>	0,8 \pm 0,20	a
	<i>B. juncea</i>	0,9 \pm 0,16	ab
	Pacific	0,9 \pm 0,19	ab
	<i>B. carinata</i>	0,9 \pm 0,19	abc
	<i>B. oleracea</i>	0,9 \pm 0,15	abc
	Lorenz	0,9 \pm 0,28	abc
	<i>B. oleracea capitata</i> 2	0,9 \pm 0,22	abc
	<i>B. cretica</i>	1,0 \pm 0,19	abc
	<i>B. napus</i>	1,0 \pm 0,21	abc
	BOY1	1,0 \pm 0,17	abcd
	Zhongshuang 9	1,1 \pm 0,20	bcde
<i>B. rapa pekinensis</i> 2	1,2 \pm 0,20	bcdef	

Jahr	Genotype	norm. Leitfähigkeit \pm SD [μ S]	
2013	<i>B. villosa</i>	1,4 \pm 0,51	cdef
	<i>B. rapa pekinensis</i> 1	1,4 \pm 0,21	def
	<i>B. oleracea capitata</i> 1	1,5 \pm 0,23	ef
	RUY1	1,6 \pm 0,26	f
	<i>B. oleracea robertiana</i>	1,8 \pm 0,65	fg
	<i>B. macrocarpa</i>	2,4 \pm 0,57	gh
	<i>B. rupestris</i>	2,5 \pm 0,67	gh
	<i>B. oleracea rupestris</i>	3,0 \pm 0,46	h

3.3 Vergleich von Gewächshausscreening und Blattsegmenttest

Um eine realistische Aussage über das Resistenzniveau eines Genotyps machen zu können, wurden die beiden oben beschriebenen Screeningmethoden miteinander in Beziehung gesetzt. Hierfür wurde die Spearman Rangkorrelation verwendet. Entsprechend der Screeningmethoden wurde auch bei dieser Analyse eine Unterteilung in die Versuchsjahre 2012 und 2013 vorgenommen. Hierfür wurden die Mittelwerte der norm. AULPC-Werte mit den gemittelten norm. Leitfähigkeitsänderungen jedes Versuchsjahres korreliert. Die zugehörigen Rangkorrelationskoeffizienten (R_s) und das Signifikanzniveau (p) sind in den entsprechenden Tabellen 17 und 18 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich weder im Versuchsjahr 2012 noch 2013 Übereinstimmungen zwischen den norm. AULPC-Werten des Gewächshausscreenings und den norm. Leitfähigkeiten des Blattsegmenttests ergaben. Im Versuchsjahr 2012 konnte auch keine Beziehung zwischen den ermittelten Inokulationseffizienzen und dem Blattsegmenttest sowie zu den norm. AULPC-Werten ermittelt werden. Aufgrund des Effekts der Inokulationsvariante im Durchgang 2013 (Tab. 14, Abschnitt 3.1.2) konnte bei der Korrelationsanalyse zwischen den norm. AULPC-Werten der beiden Behandlungen kein Zusammenhang festgestellt werden.

Tab. 17 Die Spearman Rangkorrelation beschreibt die Beziehung zwischen der Änderung der norm. Leitfähigkeit [μS] des Blattsegmenttests, den norm. AULPC-Werten aus dem Gewächshauscreening und der ermittelten Inokulationseffizienz (IE) [%] der eingesetzten *Brassica*-Arten und Resynthesen des Versuchsdurchgangs 2012. Statistisch signifikante Zusammenhänge wurden nicht gefunden ($n = 15$, Spearman Rangkorrelation: Spearman Rangkorrelationskoeffizient R_s , $p \leq 0,05$).

	Blattsegmenttest 2012	GWH-Screening 2012 - norm. AULPC
GWH-Screening 2012 - norm. AULPC	R_s :	-0,286
	p:	0,302
GWH-Screening 2012 - IE	R_s :	0,143
	p:	0,612

Tab. 18 Die Korrelationsanalyse beschreibt die Beziehung zwischen der Änderung der norm. Leitfähigkeit [μS] des Blattsegmenttests, den norm. AULPC-Werten der Inokulationsvariante „unverletzt inokuliert“ (unvi) und der Variante „verletzt inokuliert“ (vi) aus dem Gewächshauscreening der eingesetzten *Brassica*-Arten und Resynthesen des Versuchsjahres 2013. Statistisch signifikante Zusammenhänge wurden nicht gefunden ($n = 22$, Spearman Rangkorrelation: Spearman Rangkorrelationskoeffizient R_s , $p \leq 0,05$).

	Blattsegmenttest 2013	GWH-Screening 2013 - norm. AULPC (unvi)
GWH-Screening 2013 - norm. AULPC (unvi)	R_s :	-0,243
	p:	0,275
GWH-Screening 2013 - norm. AULPC (vi)	R_s :	0,273
	p:	0,219

3.4 Interaktionsstudie zwischen *B. napus* und *S. sclerotiorum*

3.4.1 Identifizierung eines resistenten Standards für die Interaktionsstudie

Für die Interaktionsstudie musste zuerst ein resistenter Standard identifiziert werden. Sieben Tage nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* zeigte Zhongyou 821 signifikant geringere Läsionslängen als Zhongshuang 9 (Abb. 7). Somit wurde Zhongyou 821 als resistenter Genotyp in der folgenden Interaktionsstudie eingesetzt.

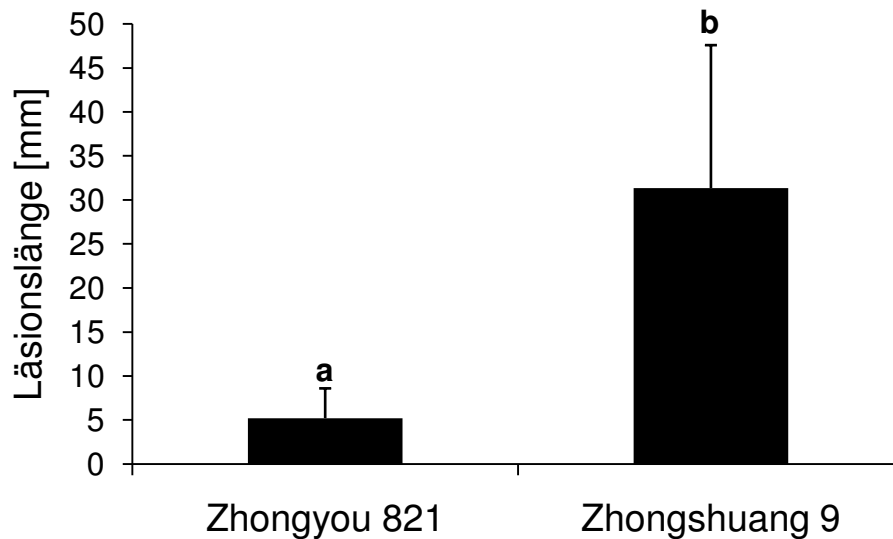


Abb. 7 Ermittlung der Läsionsentwicklung sieben Tage nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* zur Identifizierung eines resistenten Standards für die Interaktionsstudie. Die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen (Fehlerbalken) ergaben sich aus zwei unabhängigen Versuchswiederholungen, welche jeweils 10 Pflanzen beinhalteten. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstagen und den Genotypen ergaben sich über den Bonferroni Test der mehrfaktoriellen Varianzanalyse (7 dpi, $n = 10$, $p \leq 0,05$).

3.4.2 Krankheitsausprägung in *B. napus*

Der morphologische Parameter Stängelhöhe (Anhang, Abb. 4A) wurde signifikant durch den Faktor Genotyp beeinflusst (Tab. 21). Für den Stängelumfang (Anhang, Abb. 4A) ergaben sich keine Effekte durch die Versuchsfaktoren. Der Befallsparameter Läsionslänge wies einen signifikanten Effekt des Faktors Versuchsdurchgang auf (Tab. 21). Um die beiden Durchgänge miteinander zu vergleichen wurde das prozentuale Verhältnis der gemessenen Läsionslängen (Anhang, Tab. 5A) zu dem Mittelwert der *Sclerotinia*-inokulierten Variante der anfälligen Sorte Loras zum Zeitpunkt 7 dpi errechnet (Abschnitt 2.6.4, Anhang, Tab. 6A). Diese relative Läsionslänge wurde signifikant durch die Faktoren Genotyp und Inokulation, sowie der Interaktion von Inokulation und Genotyp beeinflusst (Tab. 21). Unter kontrollierten Bedingungen konnten folgende typischen Symptome im anfälligen Genotyp beobachtet werden: weißlich-gräuliche einfallende Stängelläsionen, welche keine große Abgrenzung zum gesunden Gewebe besitzen, Myzelwachstum, sowie Welke und Abknicken der Pflanze im Bereich der Läsion (Abb. 8). Aufgrund der verwendeten Inokulationsmethode wiesen beide Genotypen bereits einen Tag nach Inokulation Läsionen auf. Bei der anfälligen Sorte Loras nahm das Krankheitsniveau im Zeitverlauf von 1 bis 7 dpi stark zu und die relative Läsionslänge war

zum Zeitpunkt 7 dpi sechsfach höher als zum Zeitpunkt 1 dpi (Abb. 9, Anhang, Tab. 6A). Diese stetige Symptomausbreitung war bei Zhongyou 821 nur sehr schwach zu beobachten. Der Anstieg der relativen Läsionslänge von 1 dpi (5,6%) zu 7 dpi (14,9%) betrug hier das 2,7-fache. Beim Vergleich der beiden Genotypen wies Zhongyou 821 über den gesamten Zeitverlauf signifikant kleinere Läsionslängen als Loras auf. Zum Zeitpunkt 7 dpi lagen die Symptomwerte von Loras mit 100% relativer Läsionslänge sechsfach höher, als die von Zhongyou 821. Zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 dpi wies Zhongyou 821 eine dreifach kleinere relative Läsionslänge auf.

Neben der Läsionslänge wurden auch Befallsymptome wie Welke und Myzelbildung an der Stängeloberfläche nach Infektion mit *S. sclerotiorum* beobachtet (Anhang, Abb. 5A). Insgesamt zeigten Loraspflanzen mehr Welkeerscheinungen und Myzelbildung über die Tage als Pflanzen von Zhongyou 821. Eine Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte signifikante Zusammenhänge zwischen den beobachteten Welkeerscheinungen, Myzelbildungen und relativen Läsionslängen (Anhang, Tab. 7A).



Abb. 8 Typische Symptome sieben Tage nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* in den beiden Raps genotypen unter kontrollierten Gewächshausbedingungen. (A) Weißlich-Gräuliche einfallende Läsion mit Myzelwachstum und bereits abgestorbenen Blattstielansätzen in Loras. (B) Gräulich-bräunliche einfallende Läsion mit unscharfer Abgrenzung zum gesunden Gewebe, jedoch ohne Myzelwachstum in Zhongyou 821.

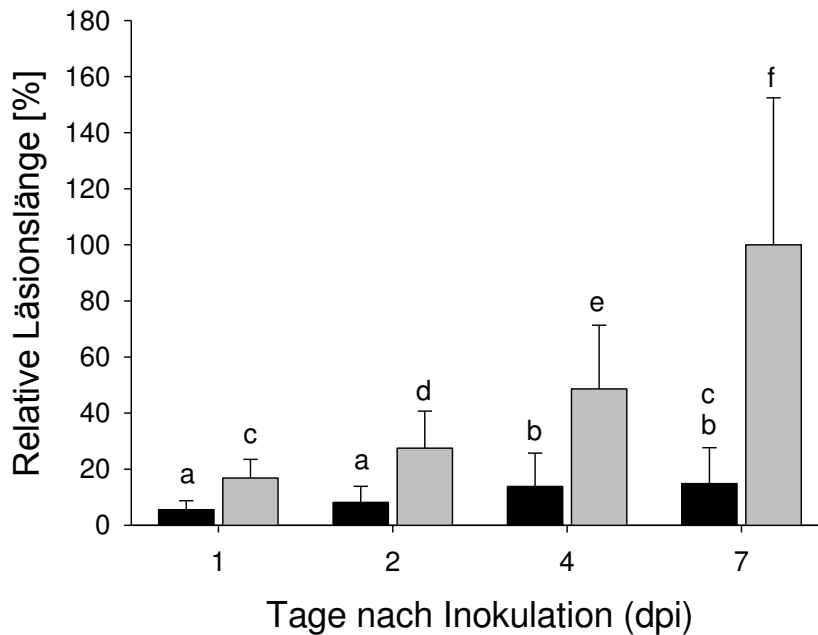


Abb. 9 Verlauf der Läsionsentwicklung zweier *B. napus* Genotypen über mehrere Tage nach Inokulation mit *S. sclerotiorum*. Die relative Läsionslänge (rel. Läsionslänge) ergab sich als prozentuales Verhältnis zwischen den gemessenen Läsionslängen (Anhang, Tab. 5A) zu dem Mittelwert der *Sclerotinia*-inokulierten Variante der anfälligen Sorte Loras zum Zeitpunkt 7 dpi (Abschnitt 2.6.4, Anhang, Tab. 5A). Die schwarzen Balken präsentieren die relative Läsionslänge für den resistenten Zhongyou 821 und die grauen Balken die relative Läsionslänge für den anfälligen Genotyp Loras. Die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen (Fehlerbalken) ergaben sich aus zwei unabhängigen Versuchswiederholungen, welche jeweils 30 Pflanzen beinhalteten. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstagen und Genotypen ergaben sich über den Bonferroni Test der mehrfaktoriellen Varianzanalyse ($n = 30$, $p \leq 0,05$).

3.4.3 Quantifizierung der Pathogenbiomasse in *B. napus*

Für die molekulare Quantifizierung der Biomasse von *S. sclerotiorum* durch quantitative Realtime PCR wurde zuerst eine Standardreihe aus bekannten Konzentrationen von extrahierter *Sclerotinia*-DNA (Ss-DNA) hergestellt. Mit diesen Standards wurde unter der Verwendung von spezifischen Primern eine PCR-Amplifikation durchgeführt. Die erhaltene Standardkurve sowie die Schmelzkurvenanalyse gaben Aufschluss über die Spezifität der PCR-Reaktion. Die Ergebnisse zeigten ein hohes Bestimmtheitsmaß der Standards (Abb. 10, A) und einen einzigen Schmelzpunkt (Abb. 10, B) der DNA, was resultierend für eine einzelne und spezifische DNA-Sequenz steht.

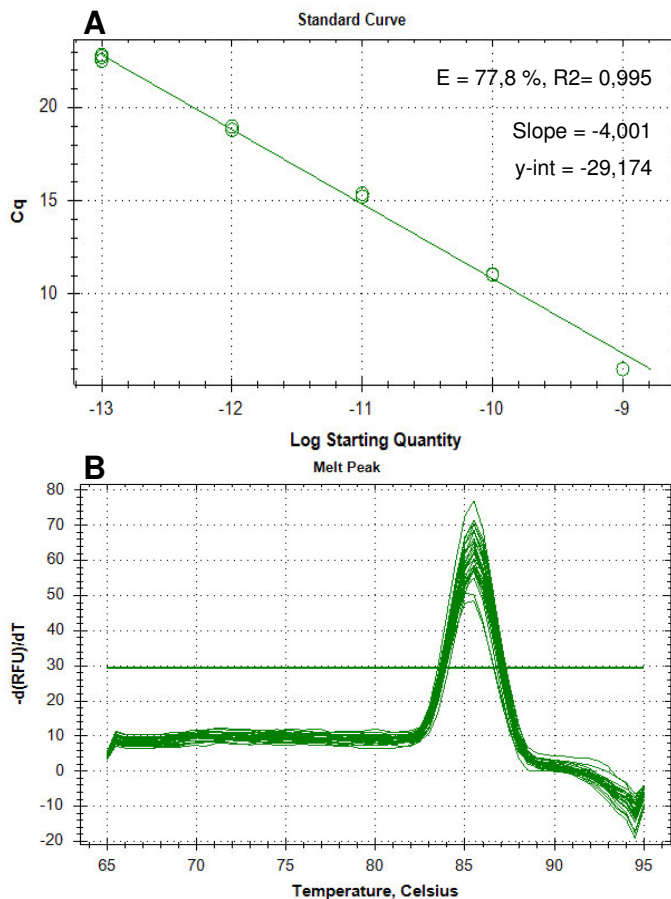


Abb. 10 Standardkurve (A) und Schmelzpunkt (B) der Realtime PCR Amplifikation der 10-fach verdünnten Standardreihe der genomischen DNA von *S. sclerotiorum*. Die PCR wurde unter Verwendung des 2 x SensiFast™ Probe No-ROX Kit in dem Thermozykler CFX384 Realtime PCR Detektionssystem (Bio-Rad Laboratories Inc.) durchgeführt.

Die Ergebnisse der molekularen Quantifizierung der Biomasse von *S. sclerotiorum* wiesen ebenfalls signifikante Effekte durch den Faktor Versuchsdurchgang auf (Tab. 21). Daher wurde auch hier das prozentuale Verhältnis der gemessenen Ss-DNA-Mengen (Anhang, Tab. 8A) zum Mittelwert der *Sclerotinia*-inokulierten Variante der anfälligen Sorte Loras zum Zeitpunkt 7 dpi berechnet (Abschnitt 2.6.5.2, Anhang, Tab. 9A). Für die relativen Ss-DNA-Gehalte ergaben sich signifikante Effekte durch die Faktoren Genotyp, Inokulation sowie deren Interaktion (Tab. 21). Verglichen mit Loras wurde in Zhongyou 821 weniger Ss-DNA zu den verschiedenen Zeitpunkten detektiert (Abb. 11). Zu den späteren Zeitpunkten (nach 4 und 7 dpi) war die relative Menge an Ss-DNA bei Loras im Mittel signifikant höher als bei Zhongyou 821. Zum Zeitpunkt 4 dpi konnte in Loras sechsfach mehr Pathogen-DNA nachgewiesen werden, als in Zhongyou 821. Zum spätesten Zeitpunkt (7 dpi) betrug der Unterschied zwischen den relativen Ss-DNA-Mengen der beiden Genotypen das 16-fache. Zu den frühen Befallszeitpunkten konnten diese Unterschiede statistisch nicht verifiziert werden. Beim Genotyp Loras stieg die Menge an Pathogen-DNA im Verlaufe der Zeit signifikant an. Während zu Beginn der Infektion vergleichsweise wenig relative Ss-DNA-Mengen von 1,4% (1 dpi) und 6,3% (2 dpi) nachgewiesen wurden, kam es nach 4 und 7 dpi zu einem starken Anstieg auf 45,6% und 100%. Hingegen konnte bei Zhongyou 821 nur eine leichte Zunahme der relativen Ss-

DNA über die Zeit nachgewiesen werden (von 0,6% 1 dpi zu 6,1% 7 dpi). Dieser Anstieg konnte jedoch nicht statistisch abgesichert werden.

Über die Spearman Rangkorrelation konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den relativen Läsionslängen und den relativen Ss-DNA-Gehalten ($R_s = 0,91$) nachgewiesen werden (Tab. 25). Zudem ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen den relativen Ss-DNA-Mengen mit den beobachteten Welkeerscheinungen und den Myzelbildungen (Anhang, Tab. 7A).

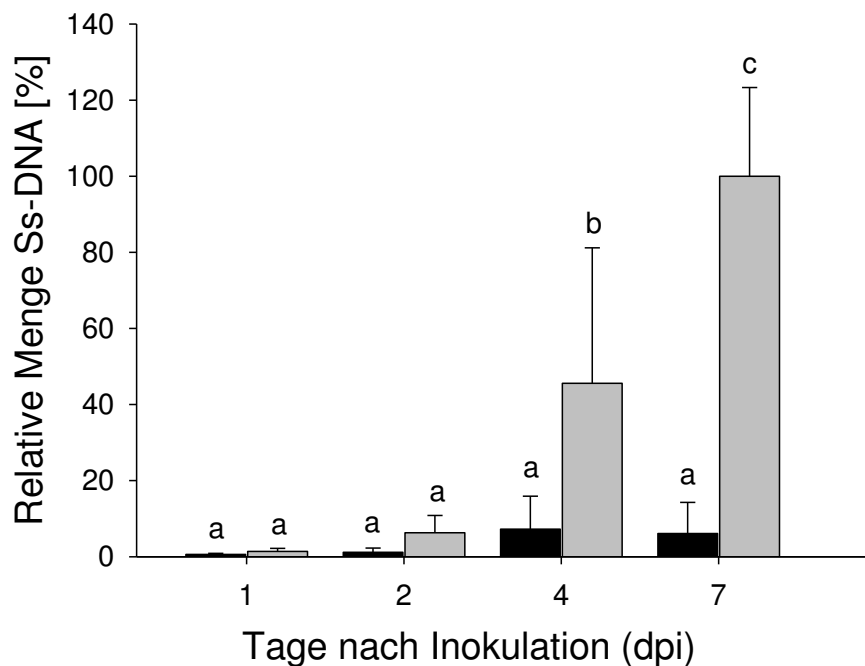


Abb. 11 Quantifizierung der *Sclerotinia*-DNA (Ss-DNA) aus Stängelmaterial der Genotypen Zhongyou 821 und Loras mittels quantitativer Realtime PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation mit *S. sclerotiorum*. Die relativen Ss-DNA-Gehalte (rel. Ss-DNA-Gehalte) ergaben sich als prozentuales Verhältnis zwischen den Ss-DNA-Mengen jedes *Brassica*-Genotyps (Anhang, Tab. 8A) zu den gemittelten DNA-Mengen der *Sclerotinia*-inokulierten Variante des anfälligen Genotyps Loras zum Zeitpunkt 7 dpi (Abschnitt 2.6.5.2, Anhang, Tab. 9A). Die rel. DNA-Mengen in Zhongyou 821 sind durch schwarze Balken und die von Loras durch graue Balken dargestellt. Die Mittelwerte ergaben sich aus zwei unabhängigen Versuchsdurchgängen mit je vier Wiederholungen, welche jeweils fünf gepoolte Stängel beinhalteten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen und Zeitpunkten (ANOVA: $n = 5$, Bonferroni Test, $p \leq 0,05$).

3.4.4 Expression von Genen des Phenylpropanoidsyntheseweges

Die Expression von Schlüsselgenen des Phenylpropanoidsyntheseweges in Mock- und *Sclerotinia*-inokulierten Pflanzen wurde mittels quantitativer Realtime PCR Methode in zwei unabhängigen Versuchswiederholungen analysiert. Zuvor wurden die Sequenzen der sechs zu untersuchenden Schlüsselgene, sowie des Kontrollgens Actin, überprüft (Tab. 19). Die relative Genexpression wurde unter Einbeziehung der entsprechenden Realtime PCR-Effizienz jedes Primers (Tab. 20) nach der Methode von Pfaffl (2001) berechnet.

Tab. 19 Analyse der Nukleotidsequenzen der Gene des Phenylpropanoidsyntheseweges nach *B. napus* Referenzen unter Angabe der erhaltenen Produktgrößen

Primer	Genname	Produkt [bp]	Genbank Akzession	E-Value	% Identität
<i>BnACT</i>	<i>B. napus</i> Actin	155	FJ529168	2e-50	98
<i>BnPAL</i>	<i>B. napus</i> Phenylalanine-Ammoniak-Lyase	152	DQ341309.1	3e-44	99
<i>BnC4H</i>	<i>B. napus</i> Cinnamate-4-Hydroxylase	256	DQ485131.1	1e-95	96
<i>Bn4CL</i>	<i>B. napus</i> 4-Coumarate-CoA Ligase	180	XM013893592	6e-52	99
<i>BnF5H</i>	<i>B. napus</i> Ferulat-5-Hydroxylase	808	DQ679758.1	5e-91	98
<i>BnCCR2</i>	<i>B. napus</i> Cinnamoyl-CoA Reductase	380	HM805073.1	2e-54	98
<i>BnCAD5</i>	<i>B. napus</i> Cinnamyl-Alkoholdehydrogenase	210	XM013834598.1	0,006	100

Tab. 20 Die spezifischen Realtime PCR-Effizienzen der verwendeten Primer unter Angabe des Bestimmtheitsmaßes (R^2) und der Neigung der erhaltenen Standardkurve der beiden *Brassica*-Genotypen Loras und Zhongyou 821

Primername	Loras			Zhongyou821		
	Effizienz	R^2	Neigung	Effizienz	R^2	Neigung
<i>BnACT2</i>	1,85	0,933	-3,732	1,83	0,964	-3,824
<i>BnPAL</i>	1,62	0,985	-4,743	1,77	0,996	-4,033
<i>BnC4H</i>	1,65	0,988	-4,622	1,69	0,991	-4,385
<i>Bn4CL</i>	1,81	0,968	-3,867	1,97	0,974	-3,401
<i>BnF5H</i>	1,58	0,947	-5,067	1,83	0,956	-3,808
<i>BnCCR2</i>	1,63	0,993	-4,73	1,74	0,997	-4,138
<i>BnCAD5</i>	2,19	0,951	-2,941	1,60	0,984	-4,883

Bei *CCR2* und *CAD5* konnte ein signifikanter Effekt der Versuchswiederholung auf das Expressionsniveau nachgewiesen werden (Tab. 22). Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der relativen Genexpression separat nach Versuchsdurchgang betrachtet (Tab. 23). Im ersten Durchgang zeigten *PAL*, *CCR2* und *CAD5* die höchsten Expressionen, während *F5H* nur eine geringe Expressionsänderung (zweifaches Expressionslevel) aufwies (Abb. 12). Statistisch abzusichernde Unterschiede zwischen den Genotypen wurden für *CCR2* und *CAD5* detektiert. Zum Zeitpunkt 4 dpi war die relative Expression von *CCR2* in Loras 42-fach höher, als in Zhongyou 821. Bei *CAD5* war das Expressionslevel von Loras zum Zeitpunkt 1 dpi 33-fach geringer als bei Zhongyou 821. Für die restlichen Gene konnten aufgrund der hohen Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Im Zeitverlauf konnte bei Loras für *PAL*, *4CL*, *F5H* und *CAD5* eine Zunahme der relativen Expression beobachtet werden. Diese erwies sich jedoch nur für *PAL* zwischen den Zeitpunkten 2 und 7 dpi als statistisch signifikant. Bei *C4H* und *CCR2* stieg das Expressionslevel von Loras nach vier Tagen um das 3- bzw. 1,5-fache im Vergleich zu 2 dpi an und sank dann bei 7 dpi wieder auf ein vergleichbares Niveau ab. In Zhongyou 821 wurde zu Beginn der Infektion eine relativ hohe Expression von *4CL*, *F5H* und *CAD5* detektiert, welche über den Zeitverlauf im Mittel eher abnahm (nicht signifikant). Nur die Expression von *PAL* schien über die Zeit nach der Inokulation leicht zuzunehmen.

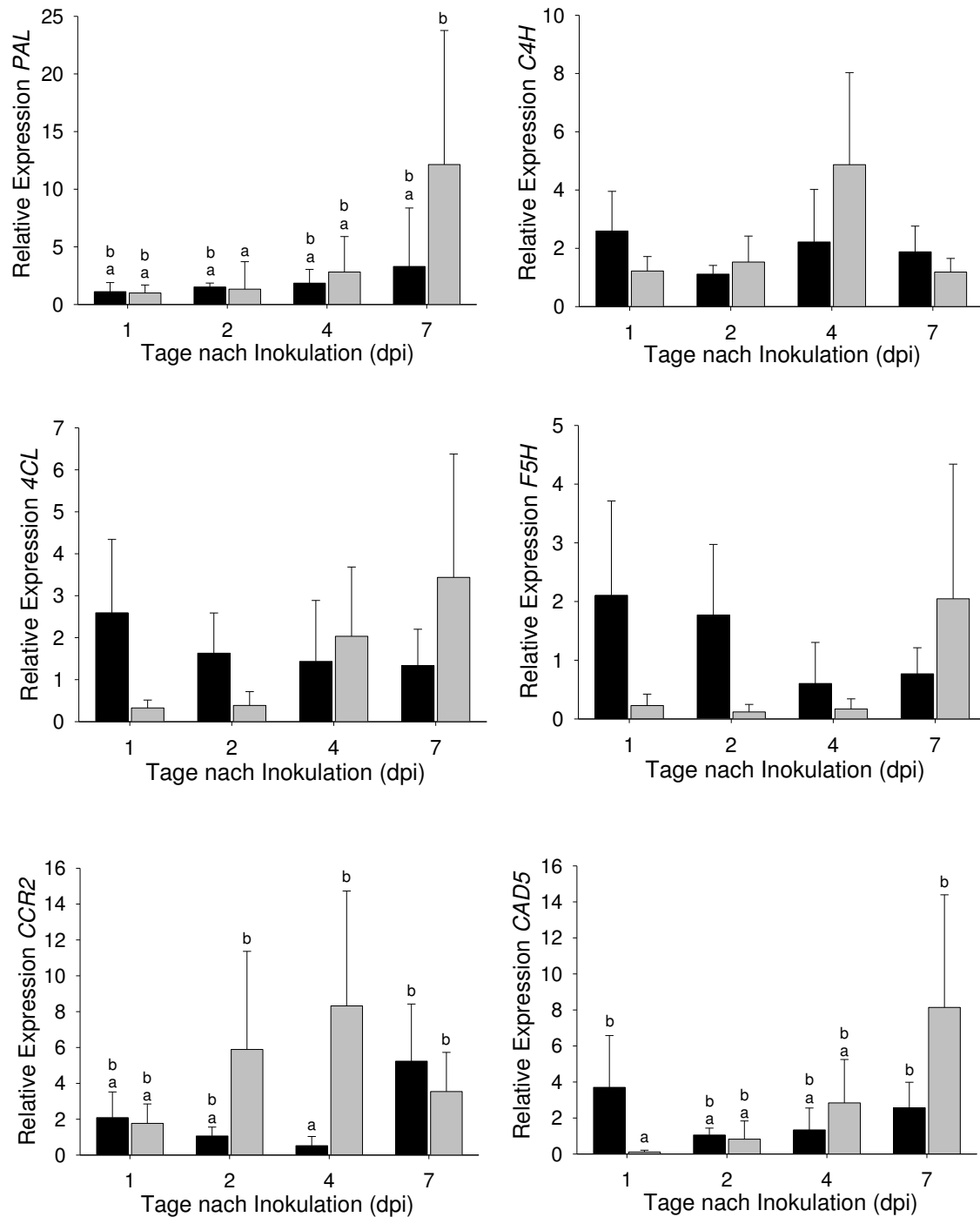


Abb. 12 Realtime PCR-Analyse der Expression von Genen des Phenylpropanoidsyntheseweges in zwei *B. napus* Genotypen nach Infektion mit *S. sclerotiorum* des ersten Versuchsdurchgangs. Die RNA wurde aus Mock- und *Sclerotinia*-inokuliertem Stängelmaterial zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inokulation extrahiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte der relativen Genexpression der Genotypen Zhongyou 821 (schwarze Balken) und Loras (graue Balken). Die Expressionsstärke ergab sich aus der Verrechnung der Transkription der Mock- mit der *Sclerotinia*-inokulierten Variante und der anschließenden Normalisierung mit dem Kontrollgen Actin (Pfaffl, 2001). Die Fehlerbalken verdeutlichen die Standardabweichungen, welche sich aus vier biologischen Wiederholungen errechneten, die jeweils aus fünf gepoolten Stängelproben

bestanden. Signifikanzen zwischen den Genotypen und den Probezeitpunkten ergaben sich durch eine mehrfaktorielle Varianzanalyse nach dem Tukey Test ($p \leq 0,05$). **PAL**, Phenylalanin-Ammoniak-Lyase. **C4H**, Cinnamate-4-Hydroxylase. **4CL**, 4-Coumarat-CoA Ligase. **F5H**, Ferulat-5-Hydroxylase. **CCR2**, Cinnamoyl-CoA Reduktase. **CAD5**, Cinnamyl-Alkoholdehydrogenase.

Im zweiten Versuchsdurchgang war die relative Expressionsstärke von *PAL*, *CCR2* und *CAD5* deutlich erhöht, *4CL* und *F5H* hingegen wiesen vergleichsweise niedrigere Expressionslevel als im ersten Versuchsdurchgang auf (Abb. 13). Auch im zweiten Durchgang war *F5H* das Gen mit den geringsten Expressionsänderungen (1,12-fache relative Expression). Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen ergaben sich hier nur bei *CAD5*. Sieben Tage nach Inokulation stieg hier das Expressionsniveau in Loras um das 18-fache verglichen zu Zhongyou 821 an. Im Zeitverlauf zeigte sich, dass in Zhongyou 821 das Gen *4CL* zum Zeitpunkt 4 dpi signifikant höher exprimiert war, als zum späteren Zeitpunkt 7 dpi.

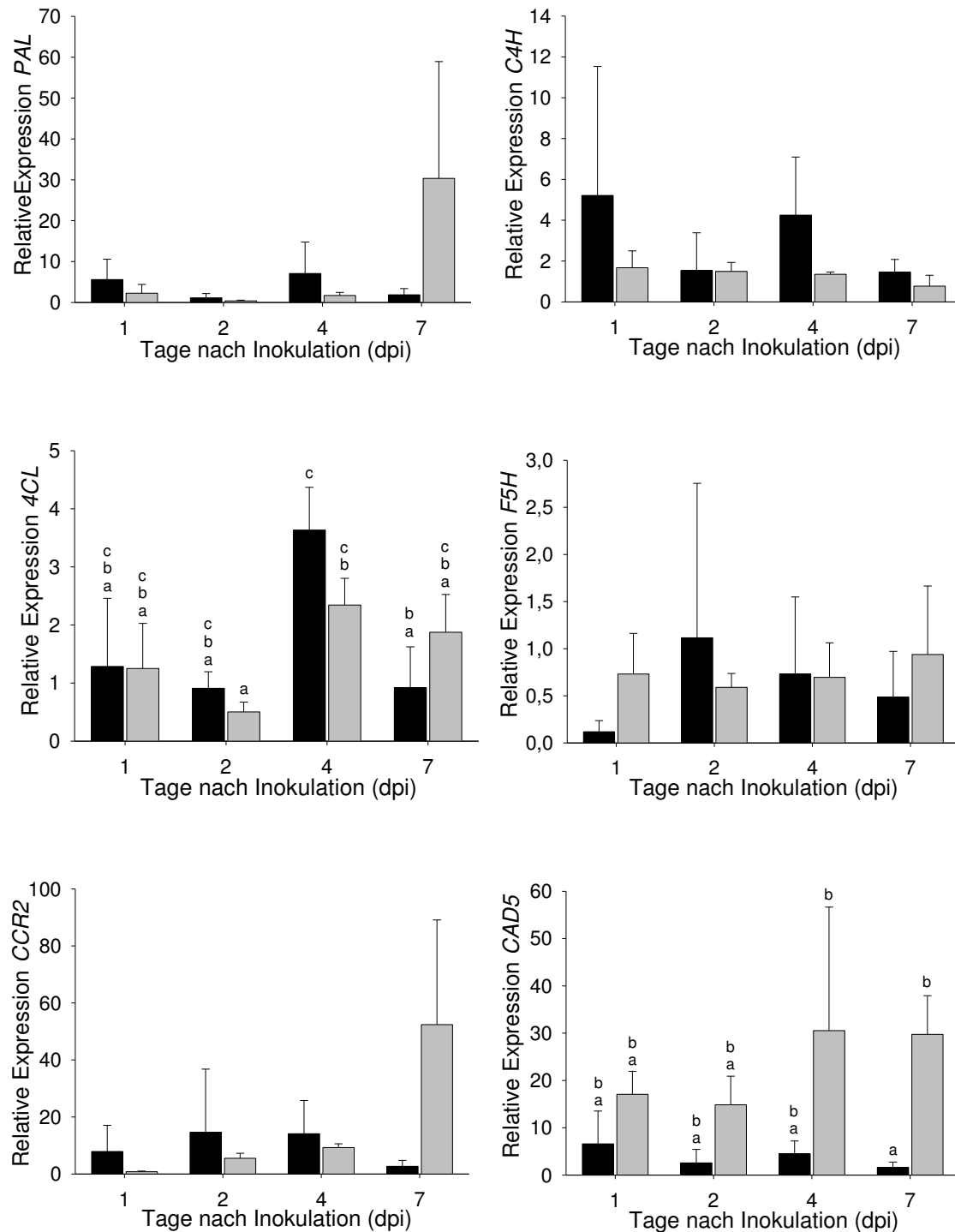


Abb. 13 Realtime PCR Analyse der Expression von Genen des Phenylpropanoidsyntheseweges in zwei *B. napus* Genotypen nach Infektion mit *S. sclerotiorum* des zweiten Versuchsdurchgangs. Die RNA wurde aus Mock- und *Sclerotinia*-inokuliertem Stängelmaterial zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inokulation extrahiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte der relativen Genexpression der Genotypen Zhongyou 821 (schwarze Balken) und Loras (graue Balken). Die Expressionsstärke ergab sich aus der Verrechnung der Transkription der Mock- mit der *Sclerotinia*-inokulierten Variante und der anschließenden Normalisierung zu dem Kontrollgen Actin (Pfaffl, 2001). Die Fehlerbalken verdeutlichen die Standardabweichungen, welche sich aus vier

biologischen Wiederholungen errechneten, die jeweils aus fünf gepoolten Stängelproben bestanden. Signifikanzen zwischen den Genotypen und den Probezeitpunkten ergaben sich durch eine mehrfaktorielle Varianzanalyse nach dem Tukey Test ($p \leq 0,05$). **PAL**, Phenylalanin-Ammoniak-Lyase. **C4H**, Cinnamate-4-Hydroxylase. **4CL**, 4-Coumarat-CoA Ligase. **F5H**, Ferulat-5-Hydroxylase. **CCR2**, Cinnamoyl-CoA Reduktase. **CAD5**, Cinnamyl-Alkoholdehydrogenase.

3.4.5 Zellwandzusammensetzung verschiedener *B. napus* Genotypen

Um Aufschluss über die jeweilige physiologische Zusammensetzung der Zellwand in den *B. napus* Genotypen zu erhalten, wurden Parameter der Zellwandzusammensetzung sowie die Zellwandtextur analysiert.

3.4.5.1 Analyse der Zellwandzusammensetzung

Es konnten signifikante Effekte der Faktoren Genotyp und Inokulation auf die Zellwandzusammensetzung nachgewiesen werden (Tab. 24). Bei den Gesamtzucker- und Cellulosegehalten konnte ein signifikanter Effekt durch den Faktor Genotyp nachgewiesen werden, während beim Pektingehalt der Faktor Inokulation einen Einfluss hatte.

In Bezug auf die Gesamtzuckergehalte der Zellwand konnten grundlegende signifikante Unterschiede zwischen der Rapsorte Loras und der Rapslinie Zhongyou 821 festgestellt werden (Abb. 14). Die chinesische Rapslinie Zhongyou 821 hatte bereits ohne Krankheitsbehandlung (0 dpi) mit 298,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockenmasse (TM) Zellwand deutlich mehr Zuckermoleküle in ihre sekundäre Zellwand eingelagert, als die Sommerrapsorte Loras (264,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ TM Zellwand). Nach 7 dpi betrug der relative Zuckergehalt der Zellwände bei den nicht-infizierten Behandlungen beider Genotypen das 1,2-fache des Zeitpunktes 0 dpi. Nach Infektion mit *S. sclerotiorum* kam es zu einer signifikanten Abnahme des Zuckergehalts in beiden Genotypen. Der Gehalt sank bei Loras von 323 auf 286 μg Gesamtzucker/mg TM Zellwand und in Zhongyou 821 von 360 auf 320 μg Gesamtzucker/mg TM Zellwand ab. Insgesamt hatte Zhongyou 821 immer noch mehr Zuckermoleküle in die Zellwand eingebunden.

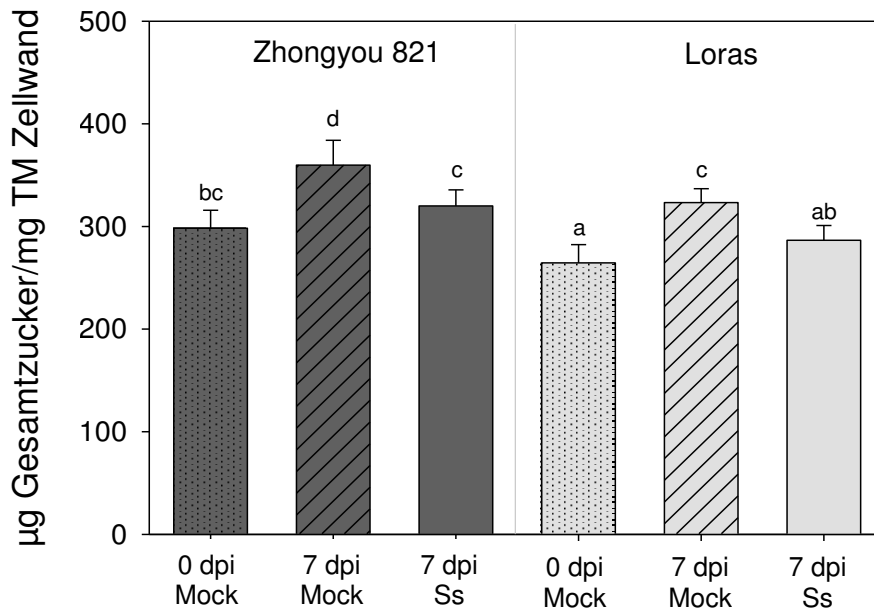


Abb. 14 Änderungen des Gesamtzuckergehalts der Zellwand im Stängelgewebe verschiedener *B. napus* Genotypen zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten und nach Infektion mit *S. sclerotiorum*. Die Mittelwerte ergaben sich aus je zwei unabhängigen Wiederholungen, wobei immer vier Pflanzen untersucht wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die entsprechenden Standardabweichungen. Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sowie den verschiedenen Zeitpunkten und Behandlungen ($n = 4$, Bonferroni Test, $p \leq 0,05$).

Bei der Untersuchung des Pektingehalts der Zellwand ergaben sich nach der mehrfaktoriellen Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen Loras und Zhongyou 821 (Abb. 15). Jedoch schien Zhongyou 821 zum Zeitpunkt 7 dpi sowohl ohne, als auch mit Infektion durch *S. sclerotiorum* tendenziell mehr Pektin in der Zellwand des Stängelgewebes gebunden zu haben, als Loras (auch wenn statistisch nicht abzusichern). Insgesamt konnten bei beiden Genotypen nach sieben Tagen im Mittel geringere Pektingehalte bestimmt werden, als zu Beginn des Versuchs und auch die Infektion mit *S. sclerotiorum* schien mit einer geringfügigen Abnahme einherzugehen. Bei Loras konnte ein Unterschied in der Pektinkonzentration zwischen Versuchsbeginn (0 dpi) und der späteren *Sclerotinia*-Infektion statistisch abgesichert werden (Tab. 24).

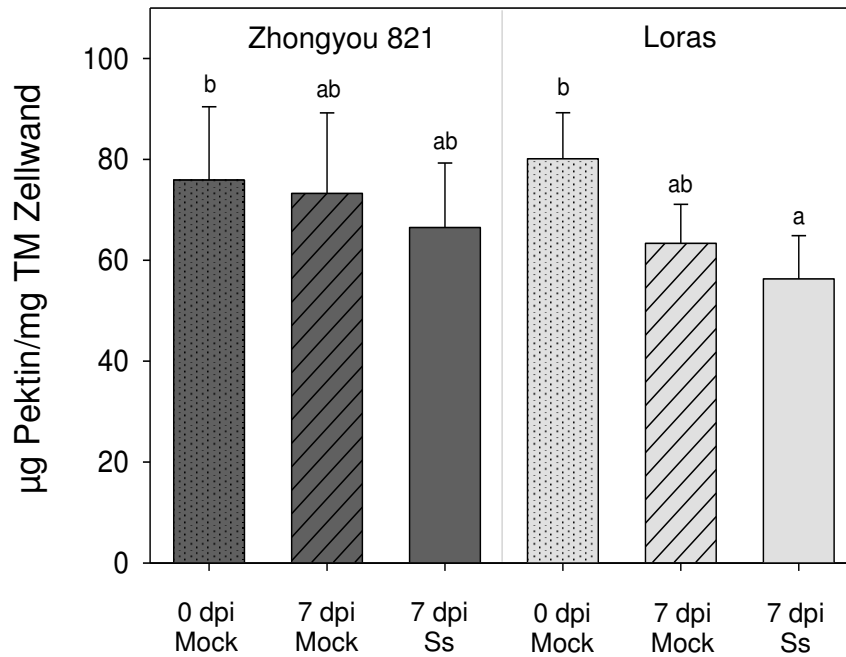


Abb. 15 Veränderungen der Zellwand hinsichtlich des Pektingehaltes im Stängelgewebe verschiedener *B. napus* Genotypen zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten und nach Infektion mit *S. sclerotiorum*. Die Mittelwerte ergaben sich aus je zwei Wiederholungen, wobei immer vier Pflanzen zu einer Wiederholung zusammengefasst wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die entsprechenden Standardabweichungen. Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sowie den verschiedenen Zeitpunkten und Behandlungen ($n = 4$, Bonferroni Test, $p \leq 0,05$).

Die Analyse der Cellulosegehalte der Zellwand zeigte im Mittel geringfügig geringere Cellulosekonzentrationen in Zhongyou 821 als in Loras (Abb. 16). Die Infektion mit *S. sclerotiorum* schien bei Zhongyou 821 ebenfalls zu einer leichten Abnahme des Cellulosegehaltes zu führen, hingegen hatte sie bei Loras keinen Effekt. Allerdings war keine dieser Beobachtungen statistisch abzusichern, trotz des Effekts des Faktors Genotyp auf die Cellulosegehalte (Tab. 24).

Zwischen den verschiedenen Zellwandbestandteilen konnten keine signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden (Tab. 25). Lediglich für die Pektingehalte ergaben sich signifikant negative Korrelationen mit den Befallsparametern relative Läsionslänge und relative *Sclerotinia*-DNA-Menge.

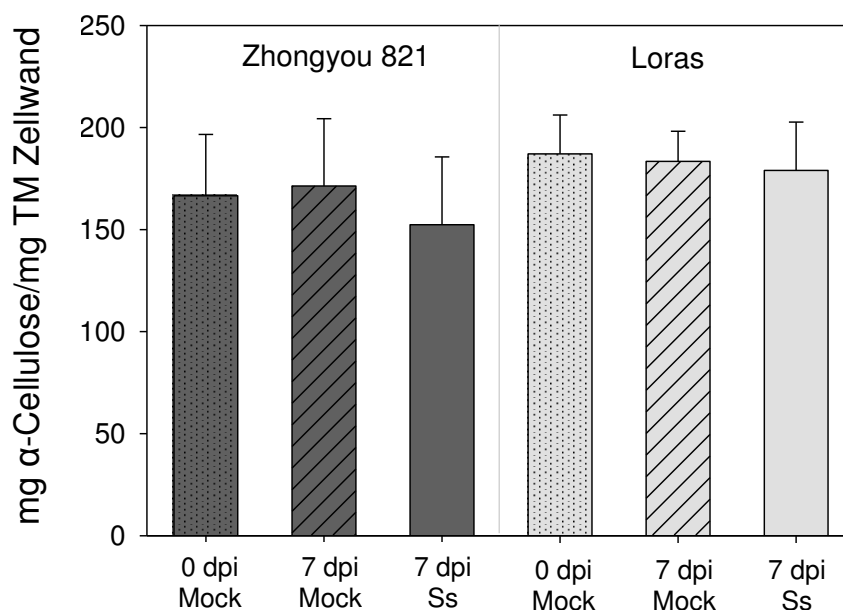


Abb. 16 Änderungen des Cellulosegehaltes der Zellwand in Stängelproben der beiden *B. napus* Genotypen Loras und Zhongyou 821 zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten und nach Infektion mit *S. sclerotiorum*. Die Mittelwerte ergaben sich aus je zwei Wiederholungen mit jeweils vier Pflanzen. Die Fehlerbalken repräsentieren die entsprechenden Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sowie zu den verschiedenen Zeitpunkten und Behandlungen konnten nicht nachgewiesen werden ($n = 4$, Bonferroni Test, $p \leq 0,05$).

3.4.5.2 Gewebefestigkeit des Rapsstängels

Um die grundlegende Eigenschaft der Gewebefestigkeit zu untersuchen wurde gesundes (nicht infiziert mit *S. sclerotiorum*) Pflanzenmaterial von Loras und Zhongyou 821 zu Versuchsbeginn geerntet und miteinander verglichen. Bei der Messung des Penetrationswiderstandes der Stängeloberfläche wurde die Kraft in Newton (N) ermittelt, welche nötig war, um die Cuticula- und Epidermisschicht der Rapsstängel zu durchstoßen. Für die erfolgreiche Penetration von Loras musste 1,5-mal mehr Kraft aufgebracht werden als für die Penetration der Stängeloberfläche von Zhongyou 821 nötig war (Abb. 17, A). Neben der Oberflächenfestigkeit des Stängels wurde auch die Festigkeit des Gesamtgewebes bestimmt. Hierfür diente das Integral des Kurvenverlaufs der Penetrationsmessung im Bereich zwischen Epidermis und einer Eindringtiefe von 2 mm (Kraft*Weg) als Maßeinheit. Die Messung ergab, dass der Widerstand im Gewebe bei Loras mit 11,34 N*mm tendenziell höher lag, als der des Genotyps Zhongyou 821 (Abb. 17, B). Die Gewebefestigkeit betrug bei diesem nur 8,43 N*mm. Somit war der Widerstand in Zhongyou 821 verglichen mit Loras um rund 26% geringer. Aufgrund der großen Abweichungen der Daten um die Mittelwerte waren diese Beobachtungen

statistisch nicht signifikant. Ein Zusammenhang der Gewebetexturdaten mit anderen Parametern der Resistenzuntersuchung war über die Spearman Rangkorrelation nicht nachweisbar (Tab. 25).

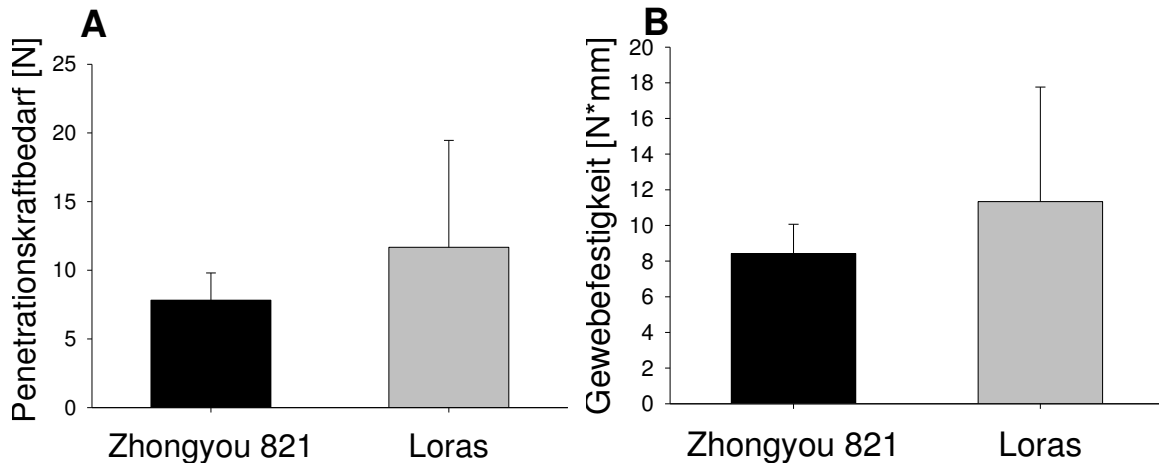


Abb. 17 Die zur Penetration benötigte Kraft (A) und die mittlere Gewebefestigkeit des Stängelmaterials (B) der beiden Rapsgenotypen Loras und Zhongyou 821 zu Versuchsbeginn (ohne Pathogenbefall). Die Mittelwerte ergeben sich aus acht unabhängigen Wiederholungen mit je zwei Messpunkten und die Fehlerbalken kennzeichnen die resultierenden Standardabweichungen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ermittelt werden ($n = 8$, Bonferroni Test, $p \leq 0,05$).

3.4.6 Korrelationsanalysen der Versuchsparameter

Bei der Erfassung der Befallsparameter Läsionslänge und *Sclerotinia*-DNA-Gehalt (Ss-DNA) traten signifikante Effekte durch die Faktoren Versuchsdurchgang, Genotyp und Inokulation auf (Tab. 21). Da die Tendenzen der Läsionslängen in den beiden Versuchswiederholungen gleich sind und die Werte sich nur in ihrem Niveau unterscheiden (Anhang, Tab. 5A), wurde das prozentuale Verhältnis zwischen der anfälligen Sorte Loras und der resistenten Linie Zhongyou 821 gebildet, indem jede gemessene Läsionslänge durch den Mittelwert der Läsionslänge der *Sclerotinia*-inokulierten Behandlung des anfälligen Genotyps Loras zum Zeitpunkt 7 dpi geteilt wurde (Abschnitt 2.6.4, Anhang, Tab. 6A). Daraufhin wurde der signifikante Effekt des Faktors Versuchsdurchgang aufgehoben. Auf die gleiche Weise wurde aus den ermittelten Ss-DNA-Mengen der prozentuale Parameter relative Ss-DNA berechnet (Abschnitt 2.6.5.2, Anhang, Tab. 8A, 9A), wodurch auch hier der Faktor Versuchsdurchgang keine

Rolle mehr spielte. Für beide relativierten Befallsparameter wurden signifikante Einflüsse von Genotyp, Inokulation und deren Interaktion nachgewiesen.

Tab. 21 F-Werte der Varianzanalyse der Effekte der Faktoren Versuchsdurchgang, Genotyp, Inokulation und deren Interaktion auf die untersuchten Befallsparameter (Läsionslänge und Ss-DNA-Gehalte) mit zugehörigen Freiheitsgraden (FG). Signifikante Unterschiede der Varianzen wurden als Sternchen entsprechend des Signifikanzniveaus gekennzeichnet (mehrfaktorielle ANOVA, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ und ns, nicht signifikant).

Parameter	VD	G	I	G*I
FG	1	1	1	1
Höhe		110,46 ^{***}	0,02 ^{ns}	1,94 ^{ns}
Umfang		2,92 ^{ns}	0,18 ^{ns}	1,05 ^{ns}
LL	13,75 ^{***}	327,53 ^{***}	549,61 ^{***}	308,81 ^{***}
rel. LL	1,58 ^{ns}	378,02 ^{***}	737,74 ^{***}	354,70 ^{***}
Ss-DNA	21,01 ^{***}	38,78 ^{***}	72,18 ^{***}	38,79 ^{***}
rel. Ss-DNA	0,02 ^{ns}	73,27 ^{***}	109,88 ^{***}	73,34 ^{***}

VD, Versuchsdurchgang. **G**, Genotyp. **I**, Inokulation. **FG**, Freiheitsgrade. **LL**, Läsionslänge. **rel. LL**, relative Läsionslänge. **Ss-DNA**, *Sclerotinia*-DNA-Menge. **rel. Ss-DNA**, relative Menge an *Sclerotinia*-DNA.

Bei den ermittelten Expressionen der Schlüsselgene des Phenylpropanoidsyntheseweges wurde ein signifikanter Einfluss der Faktoren Versuchsdurchgang für die Gene *CCR2* und *CAD5* nachgewiesen (Tab. 22). Aus diesem Grund wurde die Analyse separat nach Versuchsdurchgang bewertet (Tab. 23).

Tab. 22 F-Werte der Varianzanalyse der Effekte der Faktoren Versuchsdurchgang, Genotyp, Tage nach Inokulation und deren Interaktion auf die relative Expression von Schlüsselgenen des Phenylpropanoidsynthesewegs mit zugehörigen Freiheitsgraden (FG). Signifikante Unterschiede der Varianzen wurden als Sternchen entsprechend dem Signifikanzniveau gekennzeichnet (mehrfaktorielle ANOVA, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ und ns, nicht signifikant).

Parameter	VD	G	dpi	G*dpi
FG	1	1	3	3
<i>PAL</i>	0,07 ^{ns}	0,36 ^{ns}	4,54 ^{**}	2,43 ^{ns}
<i>C4H</i>	3,85 ^{ns}	0,05 ^{ns}	8,89 ^{***}	0,85 ^{ns}
<i>4CL</i>	0,04 ^{ns}	0,44 ^{ns}	4,68 ^{**}	4,1 [*]
<i>F5H</i>	0,34 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,91 ^{ns}
<i>CCR2</i>	4,58 [*]	3,04 ^{ns}	2,18 ^{ns}	1,31 ^{ns}
<i>CAD5</i>	31,68 ^{***}	5,85 [*]	2,33 ^{ns}	3,25 [*]

VD, Versuchsdurchgang. **G**, Genotyp. **dpi**, Tage nach Inokulation. **FG**, Freiheitsgrade. **PAL**, Phenylalanin-Ammoniak-Lyase. **C4H**, Cinnamate-4-Hydroxylase. **4CL**, 4-Coumarat-CoA Ligase. **F5H**, Ferulat-5-Hydroxylase. **CCR2**, Cinnamoyl-CoA Reduktase. **CAD5**, Cinnamyl-Alkoholdehydrogenase.

Tab. 23 F-Werte der Varianzanalyse der Effekte der Faktoren Genotyp, Tage nach Inokulation und deren Interaktion auf die relative Expression von Schlüsselgenen des Phenylpropanoid-synthesewegs mit zugehörigen Freiheitsgraden (FG) unterschieden nach Versuchsdurchgang. Signifikante Unterschiede der Varianzen wurden als Sternchen entsprechend des Signifikanzniveaus gekennzeichnet (mehrfaktorielle ANOVA, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ und ns, nicht signifikant).

	Parameter	G	dpi	G*dpi
	FG	1	3	3
Versuchsdurchgang 1	<i>PAL</i>	0,04 ^{ns}	2,4 ^{ns}	2,28 ^{ns}
	<i>C4H</i>	0,01 ^{ns}	2,33 ^{ns}	2,92 ^{ns}
	<i>4CL</i>	2,05 ^{ns}	1,17 ^{ns}	3,30 [*]
	<i>F5H</i>	7,19 [*]	0,57 ^{ns}	1,11 ^{ns}
	<i>CCR2</i>	7,96 ^{**}	1,86 ^{ns}	5,13 ^{**}
	<i>CAD5</i>	2,87 ^{ns}	4,08 [*]	4,44 [*]
Versuchsdurchgang 2	<i>PAL</i>	0,64 ^{ns}	2,55 ^{ns}	1,15 ^{ns}
	<i>C4H</i>	0,29 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,97 ^{ns}
	<i>4CL</i>	0,04 ^{ns}	7,10 ^{**}	2,67 ^{ns}
	<i>F5H</i>	5,28 [*]	0,69 ^{ns}	0,68 ^{ns}
	<i>CCR2</i>	0,26 ^{ns}	1,84 ^{ns}	1,16 ^{ns}
	<i>CAD5</i>	26,76 ^{***}	0,49 ^{ns}	0,47 ^{ns}

G, Genotyp. **dpi**, Tage nach Inokulation. **dpi**, Tage nach Inokulation. **FG**, Freiheitsgrade. **PAL**, Phenylalanin-Ammoniak-Lyase. **C4H**, Cinnamate-4-Hydroxylase. **4CL**, 4-Coumarat-CoA Ligase. **F5H**, Ferulat-5-Hydroxylase. **CCR2**, Cinnamoyl-CoA Reduktase. **CAD5**, Cinnamyl-Alkoholdehydrogenase.

Bei den physiologischen Untersuchungen wurden bei der Zellwandanalyse signifikante Effekte durch den Faktor Genotyp sowie den Faktor Inokulation nachgewiesen (Tab. 24).

Tab. 24 F-Werte der Varianzanalyse der Effekte der Faktoren Genotyp, Inokulation und deren Interaktion auf die Parameter der Zellwandzusammensetzung und der Gewebefestigkeit mit zugehörigen Freiheitsgraden (FG). Signifikante Unterschiede der Varianzen wurden als Sternchen entsprechend des Signifikanzniveaus gekennzeichnet (mehrfaktorielle ANOVA, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ und ns, nicht signifikant).

Parameter	G	I	G*I
FG	1	1	1
GZ	13,25 ^{***}	0,76 ^{ns}	0,007 ^{ns}
Pk	2,82 ^{ns}	9,17 ^{**}	0,9 ^{ns}
Ce	7,24 ^{**}	2,05 ^{ns}	0,42 ^{ns}
PW	3,68 ^{ns}		
GF	3,08 ^{ns}		

G, Genotyp. **I**, Inokulation. **FG**, Freiheitsgrade. **GZ**, Gesamtzuckergehalt der Zellwand. **Pk**, Pektingehalt der Zellwand. **Ce**, Cellulosegehalt der Zellwand. **PW**, Penetrationswiderstand. **GF**, Gewebefestigkeit.

Die Korrelationsanalysen nach Spearman dienten der Darstellung von Zusammenhängen zwischen den verschiedenen Messparametern (Tab. 25). Innerhalb der morphologischen Parameter (Höhe und Umfang) wurde eine signifikant positive Korrelation ($R_S = 0,67$) nachgewiesen. In der Gruppe der Krankheitsparameter (rel. LL und rel. Ss-DNA) zeigte sich ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen den beiden Datenreihen ($R_S = 0,95$). Zwischen den morphologischen Daten und den Befallsdaten (rel. LL und rel. Ss-DNA) konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden ($R_S = 0,2$ bis $0,42$). Bei der Betrachtung der Zellwandphysiologie zeigte sich ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen den Daten der Celluloseanalyse und der Höhe ($R_S = 0,94$). Eine signifikant negative Korrelation wurde für die Pektingehalte mit den Krankheitsparametern nachgewiesen, wobei der Zusammenhang zwischen rel. Läsionslänge und Pektin stärker war ($R_S = -0,95$), als zwischen rel. Ss-DNA und Pektin ($R_S = -0,81$). Zwischen den Daten der Zellwandphysiologie ergaben sich keine Zusammenhänge.

Tab. 25 Beschreibung der Zusammenhänge zwischen und innerhalb den Datentypen der morphologischen (Höhe und Umfang), der Krankheits- (rel. LL und rel. Ss-DNA) und den physiologischen Zellwandparametern (GZ, Pk, Ce, PW und GF) der beiden *B. napus* Genotypen durch den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (R_s). Signifikante Zusammenhänge wurden mit Sternen entsprechend des Signifikanzniveaus gekennzeichnet und sind fett hervorgehoben (mehrfaktorielle ANOVA, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ und ns, nicht signifikant).

Parameter	Morphologie		Krankheit		Zellwandphysiologie			
	Höhe	Umfang	rel. LL	rel. Ss-DNA	GZ	Pk	Ce	
Morphologie	Umfang	0,67**						
Krankheit	rel. LL	0,33 ^{ns}	0,38 ^{ns}					
	rel. Ss-DNA	0,20 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,95***				
Zellwand-physiologie	GZ	-0,54 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,20 ^{ns}			
	Pk	0,03 ^{ns}	-0,43 ^{ns}	-0,93**	-0,81*	-0,26 ^{ns}		
	Ce	0,94**	-0,54 ^{ns}	-0,2 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	-0,37 ^{ns}	0,09 ^{ns}	
	PW	-0,44 ^{ns}	-0,04 ^{ns}			0,14 ^{ns}	0,09 ^{ns}	-0,1 ^{ns}
	GF	-0,36 ^{ns}	0,08 ^{ns}			0,11 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,1 ^{ns}

rel. LL, relative Läsionslänge. **rel. Ss-DNA**, relative Menge an *Sclerotinia*-DNA. **GZ**, Gesamtzuckergehalt der Zellwand. **Pk**, Pektinengehalt der Zellwand. **Ce**, Cellulosegehalt der Zellwand. **PW**, Penetrationswiderstand. **GF**, Gewebefestigkeit.

3.4.7 Einfluss der Infektion mit *S. sclerotiorum* auf die Phenol- und Lignineinlagerung in die sekundäre Zellwand

Für die histologischen Untersuchungen wurden Stängelquerschnitte von infizierten und Mock-behandelten Pflanzen hinsichtlich ihrer Zellwandkomposition untersucht. Beobachtet wurden Veränderungen in der Phenolakkumulation sowie der Einlagerung von Lignin in die verschiedenen Gewebeschichten.

Allgemein wurde beobachtet, dass die Infektion mit *S. sclerotiorum* zu einer Zerstörung von Gewebeschichten, vor allem des Parenchymgewebes führte. Diese aggressive Zellersetzung war im anfälligen Loras deutlicher ausgeprägt als in Zhongyou 821, wo das Gewebe nur teilweise aufgelöst wurde.

3.4.7.1 Akkumulation von Phenolen

Die Mock-inokulierten Pflanzenstängel des anfälligen und resistenten Genotyps zeigten im mikroskopischen Bild Fluoreszenz in den Zellwänden der Xylemgefäße sowie in den Zwischenräumen der Sklerenchymzellen (Abb. 18, A, C, E und G). Insgesamt schienen in Zhongyou 821 zu beiden Zeitpunkten mehr phenolische Stoffe in den Bereichen des Xylems, des Sklerenchyms sowie der Sklerenchymscheiben eingelagert zu sein, als in der anfälligen Sorte Loras. Zwischen den beiden Versuchszeitpunkten zwei und sieben Tage nach Inokulation konnten innerhalb der Genotypen keine gravierenden Veränderungen in der Phenoleinlagerung beobachtet werden. Bei allen Schnitten war eine generelle Grundfluoreszenz der verschiedenen Gewebearten zu beobachten.

Zwei Tage nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* trat im Bereich der Läsion eine verstärkte Autofluoreszenz in den Leitgefäßen und den sklerenchymatischen Zellen des Xylems auf (Abb. 18, B und D). Diese Reaktion war in Zhongyou 821 stärker ausgeprägt. Die beobachtete Autofluoreszenz beruht auf einer vermehrten Phenoleinlagerung im Bereich des Parenchyms, der oberen Zellschichten des Sklerenchyms sowie der Sklerenchymscheiben (Abb. 18, D, weiße Pfeile). Die verstärkte Autofluoreszenz des Parenchymgewebes in Zhongyou 821 ging einher mit zahlreichen An- bzw. Ablagerungen von phenolgefüllten Vesikeln an den Zellwänden der Parenchymzellen (Abb. 18, D, gelbe Pfeile). Dieses Phänomen konnte auch bei Loras gefunden werden, jedoch nur in Bereichen ohne starke Zellzerstörung (Abb. 18, B, gelbe Pfeile). Sieben Tage nach der Inokulation mit *S. sclerotiorum* zeigte sich aufgrund der gesteigerten Infektion eine verstärkte Auflösung des Parenchymzellverbundes, was eine starke Stauchung der Schnitte zur Folge hatte. Diese beruht darauf, dass die Zellen des Kambiums sowie der Phloemgefäße eng zusammengeschoben wurden (Abb. 18, F). Diese Stauchung war in der anfälligen Sorte Loras stärker ausgeprägt als in Zhongyou 821, da hier nur ein bis zwei Zellschichten in einem kleinen Radius um die Infektionsstelle betroffen waren (Abb. 18, H). Bei Loras beruhte die starke Fluoreszenz des Parenchyms auf der vermehrten Ablagerung von phenolgefüllten Vesikeln (Abb. 18, F, gelbe Pfeile). Hingegen konnten in Zhongyou 821 Zellwandverdickungen sowie Phenoleinlagerungen in den Parenchymzellen sowie deren Interzellularen beobachtet werden (Abb. 18, H, weiße Pfeile). Zudem wies der resistente Genotyp im Bereich der Sklerenchymscheiben verstärkte Fluoreszenz in den Interzellularen der Sklerenchymzellen sowie in den Zellwänden und Interzellularen der Phloemparenchymzellen auf (Abb. 18, H, orange Pfeile). Bei Loras wurden vermehrt phenolische Substanzen in die Zellwände der Xylemgefäße sowie der angrenzenden Xylemparenchymzellen eingelagert (Abb. 18, F, weiße Pfeile). Darüberhinaus konnten in dieser Sorte häufiger Einschlüsse in den

Xylemgefäßen beobachtet werden (Abb. 18, F, grüne Pfeile). In den das Xylem umgebenden Sklerenchymzellen trat in beiden Genotypen keine erhöhte Phenoleinlagerung auf.

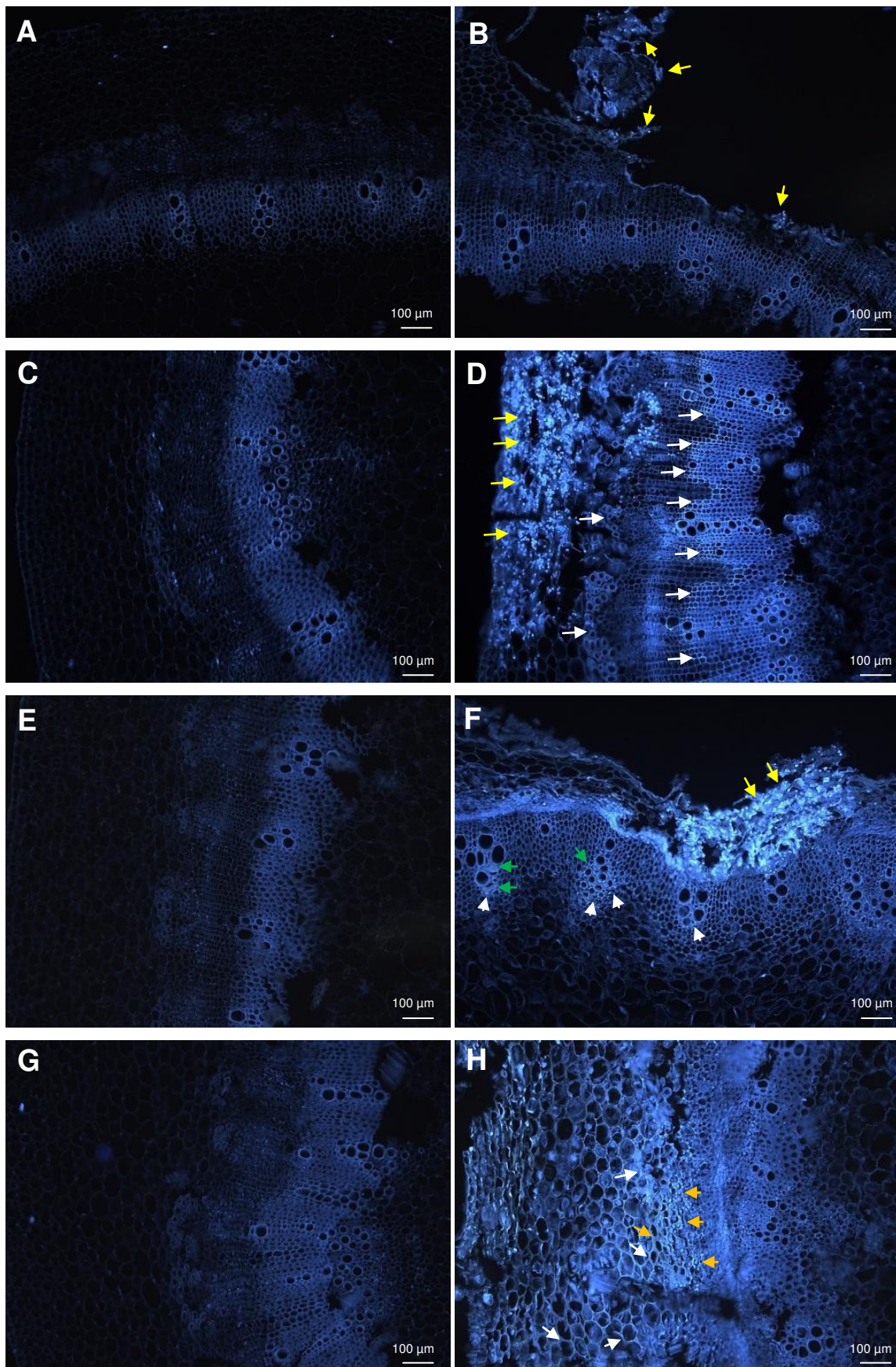


Abb. 18 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Stängelquerschnitten der Sorte Loras und der Rapslinie Zhongyou 821 zur Detektion von phenolischen Einlagerungen in Mock-inokulierten

Kontrollpflanzen und nach Infektion mit *S. sclerotiorum*. **A bis D** nach 2 dpi und **E bis H** nach 7 dpi. **Loras (A-B und E-F): A**, Mock-inokuliert (2 dpi). **B**, Ss-inokuliert (2 dpi): Im Vergleich zu den Kontrollen konnte eine Ablagerung von phenolhaltigen Vesikeln im Parenchymgewebe in Bereichen mit geringerer Zellzerstörung beobachtet werden (gelbe Pfeile). **E**, Mock-inokuliert (7 dpi). **F**, Ss-inokuliert (7 dpi): Eine vermehrte Ablagerung von phenolgefüllten Vesikeln im Parenchymgewebe (gelbe Pfeile) sowie Phenoleinlagerung war in den Zellwänden der Leitgefäße und der angrenzenden Zellen des Xylemparenchyms zu beobachten (weiße Pfeile). Zusätzlich waren phenolhaltige Verstopfungen in den Tracheen erkennbar (grüne Pfeile). **Zhongyou 821 (C-D und G-H): C**, Mock-inokuliert (2 dpi). **D**, Ss-inokuliert (2 dpi): Eine vermehrte Phenoleinlagerung war in den oberen Zellschichten des Xylemsklerenchyms und den Sklerenchymscheiben (weiße Pfeile) sowie die Ablagerung von phenolgefüllten Vesikeln im Parenchymgewebe erkennbar (gelbe Pfeile). **G**, Mock-inokuliert (7 dpi). **H**, Ss-inokuliert (7 dpi): Zellwandverdickungen der Parenchymzellen aufgrund von Phenoleinlagerungen (weiße Pfeile) sowie Akkumulation von phenolischen Substanzen in den Interzellularräumen der Sklerenchymscheiben, den Zellwänden der Phloemparenchymzellen und den angrenzenden Interzellularen (orange Pfeile). Die Balken repräsentieren einen Größenmaßstab von 100 µm.

3.4.7.2 Lignifizierung im Stängelgewebe

Um Unterschiede in der Lignifizierung des Stängelgewebes zu erkennen, wurden die Schnitte mit Phloroglucinol gefärbt. In den Kontrollvarianten führte der Wiesner-Test zu beiden Versuchszeitpunkten zu einer Rotfärbung der Zellwände der Leitgefäße, der angrenzenden Xylemparenchymzellen und der Sklerenchymzellen, was auf Lignineinlagerungen dieser Gewebe beruhte (Abb. 19, A, C, E und G). Zum Zeitpunkt 7 dpi wurden in den Sklerenchymscheiben von Zhongyou 821 zusätzlich Lignin eingelagert, was durch eine leichte Rotfärbung der Zellwände sichtbar war (Abb. 19, G).

Zwei Tage nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* wies lediglich Zhongyou 821 erhöhte Lignineinlagerungen in den Sklerenchymscheiben (Abb. 19, D, schwarze Pfeile) auf. Bei der anfälligen Sorte Loras konnte keine Veränderung in der Lignifizierung beobachtet werden.

Sieben Tage nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* kam es zur verstärkten Anfärbung der zum Kambium angrenzenden Sklerenchymzellen (Abb. 19, F, H und I, schwarze Pfeile) sowie der Zellwände der Leitgefäße und der umgebenden Xylemparenchymzellen. In der resistenten Interaktion konnten zusätzlich starke Lignineinlagerungen in den Zellwänden der Sklerenchymscheiben und in den daran angrenzenden Phloemparenchymzellen (Abb. 19, H und I, weiße Pfeile) beobachtet werden. Außerdem zeigten Zellen der Epidermis und des Parenchymgewebes von Zhongyou 821 starke Lignineinlagerungen. In der Epidermis kam es zur Verdickung des Plattenkollenchyms durch Lignin (Abb. 19, I, gelbe Pfeile). Die Zellwände und Interzellularen des Parenchyms zeigten ebenfalls

Lignineinlagerungen sowie Verstopfungen durch ligninhaltige Substanzen zwischen den Zellen (Abb. 19, H). Diese heftige Reaktion konnte bei Loras nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Kontrollen und zu Zhongyou 821 konnten in der anfälligen Interaktion rotgefärbte Verstopfungen (Thyllen) in den Sklerenchymscheiben und Xylemgefäßen beobachtet werden (Abb. 19, F, rote Pfeile), welche aus Pektin- und Lignin-ähnlichem Material bestanden.

Unabhängig von der Färbung wiesen die *Sclerotinia*-inokulierten Varianten beider Genotypen zu beiden Zeitpunkten eine verstärkte Ablagerung von bräunlichem Material - möglicherweise oxidierte phenolische Substanzen - in den Bereichen des Phloems und des Kambiums auf. Darüberhinaus konnten in der resistenten Interaktion vermehrt bräunliche Vesikelablagerungen im Parenchymgewebe beobachtet werden.

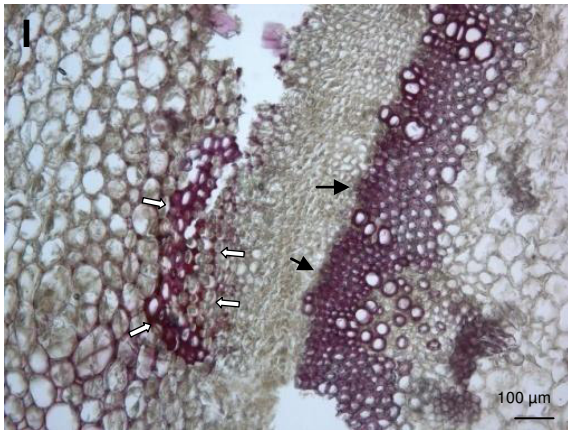


Abb. 19 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Stängelquerschnitten der Sorte Loras und der Rapslinie Zhongyou 821 nach Färbung mit Phloroglucinol-HCl zum Nachweis von Lignin in Mock-inokulierten Kontrollpflanzen und nach Infektion mit *S. sclerotiorum*. **A bis D** nach 2 dpi und **E bis I** nach 7 dpi. **Loras (A-B und E-F)**: **A**, Mock-inokuliert (2 dpi). **B**, Ss-inokuliert (2 dpi): keine Veränderung der Lignineinlagerung erkennbar. **E**, Mock-inokuliert (7 dpi). **F**, Ss-inokuliert (7 dpi): Verstärkte Reaktion der sklerenchymatischen Zellen (schwarze Pfeile) und Verstopfungen in den Leitgefäßen und Sklerenchymscheiben (rote Pfeile) beobachtet. **Zhongyou 821 (C-D und G-I)**: **C**, Mock-inokuliert (2 dpi). **D**, Ss-inokuliert (2 dpi): Verstärkte Lignineinlagerung in den Sklerenchymzellen. **G**, Mock-inokuliert (7 dpi). **H und I**, Ss-inokuliert (7 dpi): Lignineinlagerung in die Kollenchymzellwände (gelbe Pfeile), Parenchymzellwände, sklerenchymatischen Zellen der Sklerenchymscheibe (weiße Pfeile) und des Xylemgewebes (schwarze Pfeile) sowie der Phloemparenchymzellen (weiße Pfeile) detektiert. Verstopfungen in den Interzellularräumen der Parenchymzellen erkennbar. Die Balken kennzeichnen einen Größenmaßstab von 100 µm.

Nach der Mäule-Färbung traten bei den nicht-infizierten Varianten beider Genotypen die für angiosperme Pflanzen typischen Verfärbungen auf: Gelbe Zellwände der Leitbündelgefäße sowie der angrenzenden Parenchymzellen des Xylems als Nachweis von Guaiacyl (G)-Lignin und rotgefärbte Zellwände des Sklerenchymgewebes als Nachweis von Syringyl (S)-Lignin (Eynck et al., 2012, Abb. 20, A, C, E und G). Sowohl bei Zhongyou 821, als auch bei Loras konnte sieben Tage nach Inokulation in den Kontrollen die verstärkte Einlagerung von S-Lignin in den Zellwänden der Sklerenchymzellen beobachtet werden (Abb. 20, E und G).

Die Infektion beider Genotypen mit *S. sclerotiorum* führte zwei Tage nach Versuchsbeginn zu einer verstärkten Färbung des gesamten Xylemgewebes. Diese war in Zhongyou 821 stärker ausgeprägt (Abb. 20, B und D). Zudem konnten bei der resistenten Interaktion S-Lignineinlagerungen in den Zellen der Sklerenchymscheiben nachgewiesen werden (Abb. 20, D). Sieben Tage nach Pathogeninokulation wies Loras eine Abnahme in der Färbung der Sklerenchymzellen des Xylems und der Sklerenchymscheiben sowie orange Verstopfungen in den Sklerenchymscheiben im Bereich der Infektion auf (Abb. 20, F,

schwarze Pfeile). Auch bei Zhongyou 821 konnte eine Farbänderung der Zellwände der Sklerenchymscheiben von rot zu orange beobachtet werden (Abb. 20, H, schwarze Pfeile). Zusätzlich kam es beim resistenten Genotyp zu einer vermehrten G-Ligninanhäufung in den Interzellularräumen der Sklerenchymscheiben sowie in denen der angrenzenden Phloemzellen (Abb. 20, H, weiße Pfeile). Im Gegensatz zu Loras wies der Sklerenchymbereich des Xylems in Zhongyou 821 eine stärkere Rotfärbung auf, welche bis zur Grenze des Kambiums erkennbar war (Abb. 20, H, blaue Pfeile). Nur beim resistenten Genotyp wurde ein erhöhter Einbau von S-Lignin in die Zellwände der Plattenkollenchymzellen und der Parenchymzellen sowie in deren Interzellularräumen beobachtet (Abb. 20, H, grüne Pfeile). Die bereits im Wiesner-Test beobachteten Verstopfungen der Leitgefäße in Loras waren hier nur schwer zu erkennen, da sie aus G-Ligninmonomeren bestanden (Abb. 20, F, lila Pfeile).

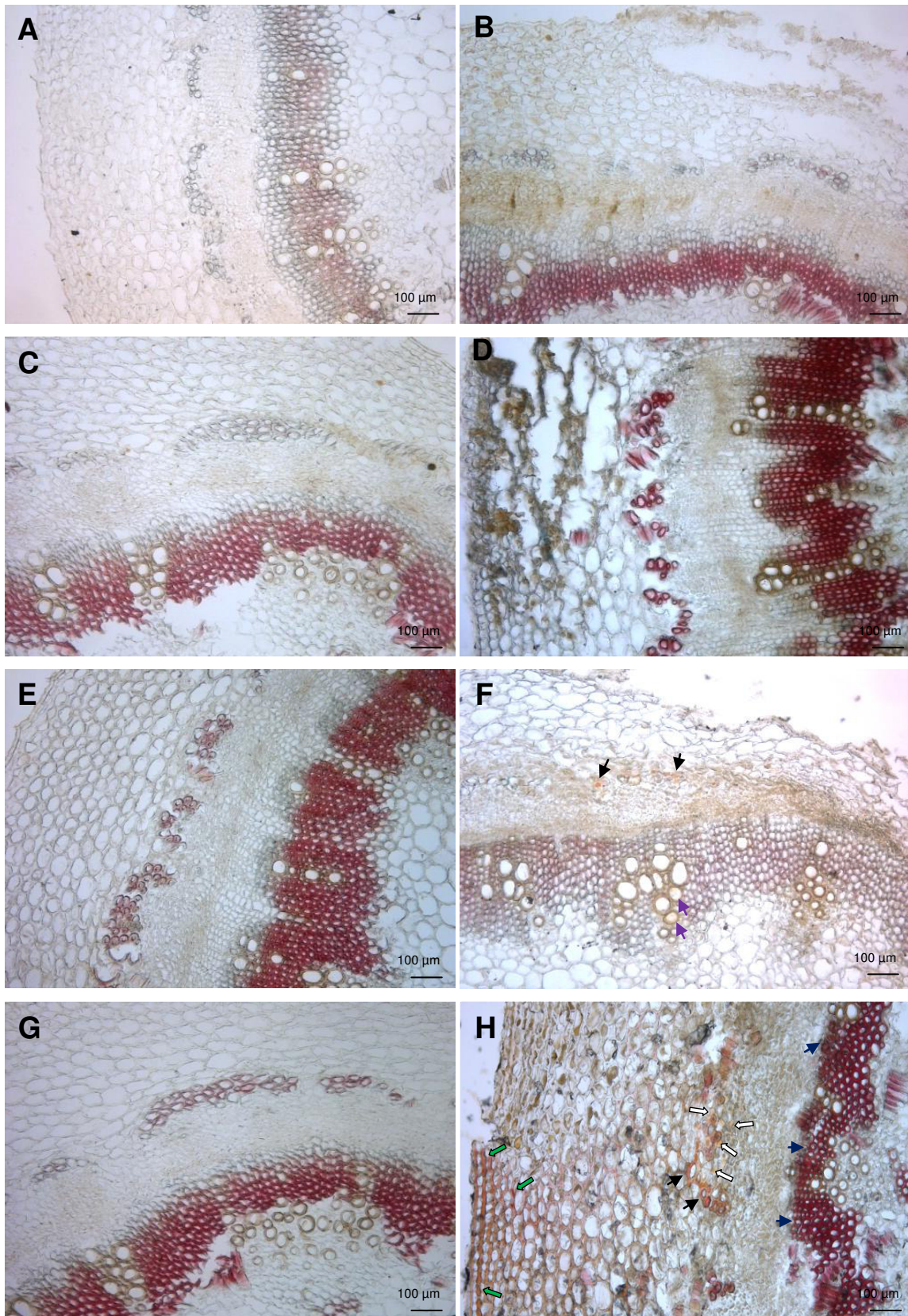


Abb. 20 Lichtmikroskopische Aufnahme von Stängelquerschnitten der Sorte Loras und der Rapslinie Zhongyou 821 nach Mäule-Färbung zum Nachweis von Ligninmonomeren in Kontrollpflanzen und nach Infektion mit *S. sclerotiorum*. **A bis D** nach 2 dpi und **E bis H** nach 7 dpi.

Loras (A-B und E-F): **A**, Mock-inokuliert (2 dpi). **B**, Ss-inokuliert (2 dpi): keine Veränderung in der Verteilung der Ligninmonomere beobachtet. **E**, Mock-inokuliert (7 dpi). **F**, Ss-inokuliert (7 dpi): Verminderte Einlagerung von S-Lignin in die sklerenchymatischen Zellen der Sklerenchymscheibe (schwarze Pfeile) und des Xylems sowie Verstopfungen der Leitgefäße mit G-Lignin (lila Pfeile) erkennbar. **Zhongyou 821 (C-D und G-H):** **C**, Mock-inokuliert (2 dpi). **D**, Ss-inokuliert (2 dpi): Verstärkte S-Lignineinlagerung in den Sklerenchymzellen deutlich. **G**, Mock-inokuliert (7 dpi). **H**, Ss-inokuliert (7 dpi): Verstärkte Einlagerung von S-Lignin in die Kollenchym- und Parenchymzellwände (grüne Pfeile) und in den Sklerenchymzellen des Xylems (blaue Pfeile) ausgemacht. Vermehrte Einlagerung von G-Lignin in den Zellwänden der der Sklerenchymscheibe (schwarze Pfeile) und den angrenzenden Phloemparenchymzellen (weiße Pfeile) beobachtet. Die Balken entsprechen einer Vergrößerungsmaßstab von 100 µm.

4 Diskussion

Im Rahmen des Verbundvorhabens MONARCH wurde in der vorliegenden Arbeit ein Set von unterschiedlichen *Brassica*-Arten mit verschiedenen Resistenzeigenschaften aus der Arbeit von Wulf (2011) zusammengestellt und dieses im Verlauf von zwei Jahren entsprechend der von Wulf (2011) verwendeten Screeningmethoden hinsichtlich der Resistenz bewertet. Weiterführend wurde eine Interaktionsstudie zwischen *S. sclerotiorum* und zwei *B. napus* Genotypen mit kontrastierenden Resistenzeigenschaften durchgeführt, um die Rolle von Abwehrmechanismen der Zellwand sowie der hierfür gebildeten sekundären Metabolite zu beleuchten. Die folgende Diskussion setzt sich zunächst mit der Bewertung der Ergebnisse des Gewächshauscreenings (4.1) und des Blattsegmenttests zur Oxalsäuresensitivität (4.2) auseinander. Anschließend folgt eine kritische Bewertung der beiden Methoden zur Resistenzevaluierung im Hinblick auf bisher bekannte Screeningmethoden (4.3). Im zweiten Teil der Diskussion wird zuerst näher auf die Resistenzausprägung der verwendeten *B. napus* Genotypen der Interaktionsstudie eingegangen (4.4) und dann die Rolle der Zellwand bei der Pathogenabwehr anhand der Ergebnisse (4.5) diskutiert. Hierbei erfolgt die Beurteilung der biochemischen (4.5.1), genetischen (4.5.2) und histologischen Ergebnisse (4.5.3) an sich und abschließend methodenübergreifend (4.6).

4.1 Resistenzausprägung unterschiedlicher *Brassica*-Arten gegen *S. sclerotiorum* im Gewächshaus

Bereits die vorangegangenen Arbeiten von Mei et al. (2011) und Wulf (2011) zeigten, dass *Brassica*-Wildarten eine potentielle Quelle für Resistenz gegen *S. sclerotiorum* darstellen. Wulf (2011) untersuchte hierbei neben der Ausbreitung des Pathogens in der Pflanze auch die Anzahl an Inokulationen, welche nötig waren, um überhaupt eine erfolgreiche Infektion hervorzurufen. Hierbei konnte er feststellen, dass in wilden *Brassica*-Arten postinfektionelle, physiologische Abwehrmechanismen aktiv wurden, welche zur Reduktion der Ausbreitung des Pathogens in der Pflanze führten. Eine andere Form der Resistenz erkannte Wulf (2011) in einigen Rapsgenotypen, welche die Infektion an sich beeinflussen bzw. verhindern konnten. Bei diesen Genotypen schienen präformierte Abwehrmechanismen wirksam, welche den Befall zwar aufhalten, jedoch nach erfolgreicher Penetration des Pathogens nicht verhindern konnten. Aufgrund dieser verschiedenen Resistenzbeobachtungen unterteilte Wulf (2011) die getesteten Genotypen in drei Gruppen. Die erste Gruppe, welche fast ausschließlich aus wilden *Brassica*-Akzessionen bestand, zeichnete sich durch niedrige AULPC-Werte, jedoch geringe

Abwehr der Infektion (hohe Inokulationseffizienzen) aus. Die zweite Gruppe wies mittlere AULPC-Werte und niedrige Inokulationseffizienzen und die dritte hohe Anfälligkeit in beiden Befallsparametern auf. Die beiden letzteren Gruppen bestanden aus den getesteten Rapsresynthesen, wilden Kreuziferen und domestizierten *B. oleracea* Arten.

Die durch Wulf (2011) erbrachten Erkenntnisse wurden in dieser Arbeit im Rahmen des Verbundvorhabens MONARCH mit aufgenommen und die folgenden Arbeitshypothesen aufgestellt:

- In *Brassica*-Wildarten wird die Ausbreitung des Befalls mit *S. sclerotiorum* in der Pflanze durch verstärkte induzierte strukturelle oder biochemische Abwehrmechanismen verhindert (niedrige norm. AULPC-Werte), während der Befall an sich nicht abgewehrt wird (hohe Inokulationseffizienz). *Brassica*-Wildarten besitzen somit erhöhte Ausbreitungsresistenz.
- Bei domestizierten *Brassica*-Arten und Rapssorten wird der Befall durch *S. sclerotiorum* an sich, also die erfolgreiche Penetration des Pathogens, über präformierte oder induzierte strukturelle bzw. biochemische Barrieren abgewendet (niedrige Inokulationseffizienzen), nicht jedoch die Pathogenausbreitung in der Pflanze (hohe norm. AULPC-Werte). Hier liegt dementsprechend eine erhöhte Penetrationsresistenz vor.

Im Versuchsjahr 2012 wiesen die getesteten Genotypen der vorliegenden Arbeit keine hohe Variabilität in ihren Reaktionen gegen den Weißstängeligkeitserreger auf, so dass keine statistisch abzusichernden Unterschiede festgestellt wurden. Auch die Unterteilung der Daten in die von Wulf (2011) beschriebenen Gruppen konnte in den getesteten Genotypen entsprechend ihrer Resistenzausprägung nicht bestätigt werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass erhöhte Resistenz gegen den Erreger der Weißstängeligkeit in Wildarten von *Brassica*, vorwiegend in *B. oleracea*, auffindbar ist. Dieses Ergebnis deckte sich mit vorangegangenen Untersuchungen zur Resistenz gegen *S. sclerotiorum* (Mei et al., 2011; Wulf, 2011; Ding et al., 2013). In diesen Studien konnten ebenfalls große Unterschiede in den Reaktionen der *Brassica*-Arten, welche teilweise auch in dieser Arbeit verwendet wurden, auf das Pathogen festgestellt werden. Mei et al. (2011) erkannten großes züchterisches Potential in *B. oleracea* Wildarten, welche vorwiegend in Sizilien verbreitet sind. Entsprechende Vertreter dieser *Brassica*-Wildarten: *B. insularis*, *B. villosa* und *B. rupestris* zeigten auch in den Studien von Wulf (2011) und bei Ding et al. (2013) gesteigerte Resistenz. In der vorliegenden Arbeit zeichneten sich die Befallsausprägungen der *B. oleracea* Wildarten: *B. drepanensis*, *B. incana*, *B. oleracea robertiana* (Synonym für *B. montana* Pourret),

B. insularis, *B. macrocarpa*, *B. carinata*, *B. villosa* sowie der beiden Akzessionen von *B. rupestris* durch vergleichbare Anfälligkeit zu dem resistenten Standard Zhongshuang 9 aus, was mit den Aussagen der oben genannten Studien übereinstimmt.

Zusätzlich konnten Ding et al. (2013) zeigen, dass resynthetisierte Linien aus *B. oleracea* und *B. rapa* Akzessionen eine stärkere Stängelresistenz gegen *S. sclerotiorum* besaßen als die resistente Kontrolle Zhongyou 821. Die Rapsresynthesen RUY1 und BOY1 wiesen bei Ding et al. (2013) eine niedrige Anfälligkeit relativ zum resistenten Standard auf, während OLL1 sich durch vergleichbare Befallsausprägung auszeichnete. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit für OLL1 und für RUY1 bestätigt werden. Für die Resynthese BOY1 wurde in dem hier durchgeführten Screening höhere Anfälligkeit nachgewiesen, wobei dieses Ergebnis statistisch nicht abzusichern war.

Die hier ermittelten Inokulationseffizienzen ließen keine Rückschlüsse auf die Resistenzausprägung der Genotypen zu. Nur für die Rapsresynthesen sowie eine Akzession der domestizierten *B. oleracea italica* Art konnten Effizienzen ermittelt werden, welche mit den Ergebnissen von Wulf (2011) übereinstimmten. Bei den wilden *Brassica*-Akzessionen sowie der anfälligen Standardsorte Pacific ließen sich die erwarteten hohen Inokulationseffizienzen nicht bestätigen, sondern ergaben alle niedrigere Werte.

Auch die Korrelation der Daten mit den norm. AULPC-Werten ergab nicht das von Wulf (2011) beobachtete Muster der Resistenzausprägung.

Somit konnte in der Untersuchung von 2012 über die Methode der Inokulationseffizienz der von Wulf postulierte Zusammenhang zwischen Befallsausbreitung in der Pflanze (norm. AULPC) und dem Penetrationsverhalten (Inokulationseffizienz) nicht nachgewiesen werden.

Im Versuchsjahr 2013 wurden zusätzlich weitere wilde Arten der *B. oleracea* Gruppe in das Screening einbezogen, die bereits in der Arbeit von Mei et al. (2011) gute Resistenz gegen *S. sclerotiorum* aufwiesen. Da im Versuchsjahr von 2012 durch die Bestimmung der Inokulationseffizienz keine Unterscheidung hinsichtlich der erwarteten Ausbreitungs- und Penetrationsabwehr möglich war, wurden in diesem Durchgang zwei verschiedene Inokulationsvarianten eingesetzt. Ohne Verletzung wiesen vor allem domestizierte und wilde *Brassica*-Arten eine geringere Anfälligkeit auf. Jedoch konnte auch hier, wie bereits im Jahr 2012, nur eine schwache Variabilität des Materials in der Reaktion gegen *S. sclerotiorum* aufgezeigt werden. Erst nach Verletzung und anschließender Inokulation war eine bessere Differenzierung der *Brassica*-Genotypen entsprechend ihrer Resistenz möglich.

Auch hier zeigte ein Großteil der wilden und domestizierten *B. oleracea* Arten gute Resistenzeigenschaften verglichen zur resistenten Kontrolle Zhongshuang 9. Beim Vergleich der beiden Inokulationsvarianten wurden signifikante Unterschiede in der Resistenzausprägung in den domestizierten *B. rapa* und *B. oleracea capitata* Arten, einigen wilden Akzessionen und den beiden verwendeten Rapsorten festgestellt. Hierbei fiel bei den beiden Chinakohlakzessionen (*B. rapa pekinensis*), dem indischen Senf (*B. juncea*) sowie der Kohllart *B. oleracea capitata* 2 auf, dass diese nach Verletzung eine erhöhte Anfälligkeit verglichen zum resistenten Standard Zhongshuang 9 zeigten. Eine Akzession von *B. rapa* ssp. *pekinensis*, ‚Waltz‘, wurde bereits in der Arbeit von Uloth et al. 2013 mit hoher Anfälligkeit gegenüber *S. sclerotiorum* eingestuft.

Die unterschiedliche Resistenzausprägung nach Verletzung bestätigt die Annahme von Wulf (2011), dass verschiedene Abwehrmechanismen für die Ausprägung von Resistenz verantwortlich sind. In den oben benannten *Brassica*-Arten schienen spezielle präformierte Abwehrmechanismen, wie die strukturelle Beschaffenheit des Stängels, z.B. Zellwanddicke und Lignineinlagerung, oder antifungale Metabolite, das Eindringen des Pathogens zu behindern. Die Infektionsausbreitung selbst schien jedoch nicht vermindert zu sein, weshalb diese Genotypen signifikant unterschiedliche Befallsreaktionen zwischen den beiden Inokulationsvarianten aufwiesen. Die mangelnde Ausbreitungsresistenz in *B. rapa pekinensis* würde erklären, warum auch bei Uloth et al. (2013) der Befall am Blattgewebe hoch ausfiel.

Weiterhin konnten im Screening von 2013 Genotypen identifiziert werden, welche trotz des signifikanten Effekts der Inokulationsmethode gleiche Resistenzeinstufungen entsprechend der norm. AULPC-Werte aufwiesen. Dieser Effekt wurde z.B. bei den Rapsorten Lorenz und Pacific sowie der Akzession *B. oleracea capitata* 1 und *B. oleracea robertiana* beobachtet. Auch bei diesen Genotypen konnte durch verstärkte Penetrationsabwehr ein Befall durch *S. sclerotiorum*, ähnlich wie bei den oben beschriebenen Genotypen von *B. rapa pekinensis*, *B. juncea* und *B. oleracea capitata* 2, verhindert werden. Nach erfolgreicher Infektion der Rapsorten Lorenz und Pacific sowie der Akzessionen *B. oleracea capitata* 1 und *B. oleracea robertiana* wurde die Ausbreitung des Pathogens hier zumindest schwach abgewehrt, weshalb diese Genotypen eine ähnliche Anfälligkeit, wie der resistente Standard Zhongshuang 9 zeigten. Daher führte der erfolgreiche Befall mit *S. sclerotiorum* nach Verletzung zwar zu einer verstärkten Infektion, jedoch nicht zu einer Neuplatzierung im Resistenzranking. Einzig in *B. oleracea robertiana* konnte eine Verbesserung der Resistenz nach Verletzung beobachtet werden. Diese Wildart wurde bereits im Gewächshauscreening von 2012 sowie anderen Studien mit einer verbesserten Abwehr von *S. sclerotiorum* assoziiert (Mei et al., 2011; Wulf,

2011, Ding et al. 2013). Möglicherweise wurden durch die zugeführte Verletzung Abwehrmechanismen initiiert, welche bei der normalen Infektion durch das Pathogen unterdrückt werden, z.B. der ‚oxidative burst‘ (Williams et al., 2011).

Bei anderen Genotypen der vorliegenden Untersuchung wurde kein Effekt der Inokulationsvariante auf das Befallsniveau festgestellt. Hierbei fielen die Genotypen *B. macrocarpa* und *B. drepanensis* auf, welche sowohl mit als auch ohne Verletzung sehr niedrige Befallsstärken aufwiesen. Bei diesen Genotypen schienen die Abwehrprozesse generell erhöht, was mit einer Reduktion des Befalls von *S. sclerotiorum* einherging. *B. drepanensis* wies bereits in den Untersuchungen von Mei et al. (2011) und Wulf (2011) sowie im vorliegenden Gewächshauscreening von 2012 eine niedrige Anfälligkeit gegenüber *S. sclerotiorum* sowie niedrige Inokulationseffizienzen auf.

Bei der Betrachtung von Genotypen, welche 2013 signifikant unterschiedliche Befallsausprägungen zwischen den beiden Inokulationsvarianten besaßen, fiel auf, dass bei diesen bereits 2012 niedrigere Inokulationseffizienzen ermittelt wurden.

Die in dieser Arbeit als resistenter Standard eingesetzte chinesische Linie Zhongshuang 9 ist laut Wang et al. (2003) eine semi-winterharte Rapslinie, welche sich neben der hohen Resistenz gegen *S. sclerotiorum* zusätzlich durch hohe Erträge und Doppelnullqualität auszeichnet. In Feldversuchen zeigte Zhongshuang 9 eine geringere Anfälligkeit als die bis dahin als resistent eingestufte chinesische Rapslinie Zhongyou 821 (Li et al., 1999a; Wang et al., 2003). Auch im Gewächshauscreening von Wulf (2011), dem Feldversuch von Mei et al. (2011) sowie einem Blatttest von Wang et al. (2003) wies die Rapslinie Zhongshuang 9 bessere Resistenz verglichen mit Zhongyou 821 auf. In der Arbeit von Mei et al. (2011) und auch bei Wulf (2011) war der Unterschied jedoch nicht signifikant. In der vorliegenden Untersuchung zeigte Zhongshuang 9 Befallswerte vergleichbar mit denen aus dem Gewächshauscreening von Wulf (2011). Neben Zhongshuang 9 und Zhongyou 821 konnten bereits andere chinesische *B. napus* und *B. juncea* Linien sowie australische Genotypen mit erhöhter Resistenz identifiziert werden (Zhao et al., 2004; Garg et al., 2008; Li et al., 2006, 2007, 2008). So konnten Zhao et al. (2004) über eine Infektion von Blattstielen im Gewächshaus zeigen, dass neben Zhongyou 821 auch der chinesische Wintertyp NingRS-1 gute Resistenzen besaß. Li et al. (2008) beschrieben die Rapsgenotypen Zy006, 06-6-3792, Zy004 aus China, RT108 aus Australien sowie die *B. juncea* Genotypen *B. juncea* #2 aus China sowie JM06018 und JM06006 aus Australien als Kandidaten mit gesteigerter Stängelresistenz, wobei vor allem Zy006 hervorgehoben wurde. In neueren Publikationen wird mittlerweile ein Set aus chinesischen und australischen *B. napus* und *B. juncea* Genotypen mitgeführt, welches

sich in früheren Untersuchungen aufgrund hervorragender Resistenz auszeichnete (Ge et al., 2012, Uloth et al., 2013; You et al., 2015).

Neben resistentem *B. napus* und *B. juncea* Material aus China und Australien zeigten auch domestizierte Gemüsearten von *B. oleracea* erhöhte Resistenzen gegen den Weißstängeligkeitserreger. In der Studie von You et al. (2015) ließen 65% der *B. oleracea* var. *capitata* Genotypen aus China höhere Stängelresistenzen im Feld erkennen. In einem Keimblattscreening von Uloth et al. (2014) konnte neben australischen Genotypen von *B. oleracea* var. *capitata* erhöhte Abwehr auch in der australischen Sorte *B. oleracea* var. *italica* ‚Prophet‘ nachgewiesen werden. Hingegen konnte ein gesteigertes Resistenzpotential der hier verwendeten Brokkoliakzessionen (*B. oleracea italica*) weder im Versuchsjahr 2012 noch 2013 festgestellt werden. Eine gesteigerte Abwehr ergab sich in der vorliegenden Arbeit nur für *B. oleracea capitata* 1 der *Sclerotinia*-inokulierten Variante ohne Verletzung. Nach Verletzung zeigten beide *B. oleracea capitata* Genotypen signifikant höhere Anfälligkeit gegenüber *S. sclerotiorum*.

Typen der *B. oleracea* Gruppe stellen nicht nur geeignetes Material für die Resistenzzüchtung gegen den Weißstängeligkeitserreger *S. sclerotiorum* dar (Mei et al., 2011; Wulf, 2011; Ding et al., 2013; Uloth et al., 2013, 2014; You et al., 2015), sondern zeigen auch Resistenz gegen andere Schaderreger, wie die Wurzelhals- und Stängelfäule *Leptosphaeria maculans* (Mithen et al., 1987; Mithen & Magrath 1992), die Rapswelke *V. longisporum* (Rygulla et al., 2007), die Kohlmottenschildlaus (*Aleyrodes proletella*, Ramsey & Ellis, 1994) sowie die Kohlflye (*Delia radicum*, Ellis et al., 1999) auf.

Die Schwierigkeit bei der Generierung reproduzierbarer Ergebnisse mit wilden *Brassica*-Arten liegt in der hohen Variabilität des Materials. Beispielsweise wiesen im vorliegenden Screening von 2013 die beiden Akzessionen der Wildart *B. rupestris* je nach Inokulationsvariante, trotz gleicher Herkunft, unterschiedliche Resistenzreaktionen auf. So zeigte der Genotyp *B. oleracea rupestris* ohne Verletzung nur geringe Befallslevel, während er nach Verletzung signifikant anfälliger für *S. sclerotiorum* war. Die andere Akzession *B. rupestris* besaß in beiden Inokulationsvarianten im Mittel höhere Befallswerte. Eine Verletzung führte hier jedoch zu keiner Verstärkung der Befallsreaktion.

Eine hohe Variabilität des zu bewertenden Materials ist laut Wulf (2011) zwar förderlich für eine gute Differenzierung zwischen den Arten, jedoch spiegelt sie sich auch in der morphologischen Beschaffenheit sowie in verschiedenen Vegetationsperioden wieder. Entsprechend des ursprünglichen Protokolls von Wulf (2011) hätte die Inokulation zum Zeitpunkt der Vollblüte (BBCH 65) stattfinden müssen. Da ein Großteil der hier getesteten Wildarten jedoch perennierend war, wurden alle Genotypen zum gleichen Zeitpunkt

inokuliert, auch wenn einige noch nicht das Blütenstadium erreicht hatten. Diese Änderung der Inokulationsmethode hatte den Vorteil, dass alle Genotypen unter einheitlichen klimatischen Bedingungen mit ähnlichem Material inokuliert wurden. Wäre die Inokulation zum Zeitpunkt der Vollblüte, wie bei Wulf (2011), durchgeführt worden, hätten die perennierenden *Brassica*-Wildarten lange Entwicklungszeiten, teilweise über mehrere Jahre, gebraucht, bis sie in das Blütestadium gekommen wären. Während dieser Zeit hätten natürlich auftretende Alterungsprozesse der Pflanze zu einer Verholzung der Zellwände sowie zur Bildung anderer sekundärer Metabolite geführt, welche evtl. einen Einfluss auf die Befallsausprägung gehabt hätten. So konnte z.B. für Glucosinolate nachgewiesen werden, dass diese sowohl gewebe-, als auch altersspezifisch gebildet werden (Wentzell et al., 2008). Allerdings muss bedacht werden, dass auch in dieser Arbeit einige wilde Akzessionen bereits früher inokuliert wurden. Somit kann hier ebenfalls ein altersspezifischer Effekt nicht ausgeschlossen werden.

Um diesen Alterseffekt zu vermeiden, könnten die Genotypen entsprechend der Studie von Uloth et al. (2014) im Keimblattstadium inokuliert werden. Bereits Garg et al. (2008) bestätigten, dass diese Methode zur Resistenzbewertung geeignet ist, da sie zu vergleichbaren Ergebnissen in einem Feldversuch führte. Allerdings zeigte eine Gegenüberstellung der beiden Studien von Uloth et al. (2013 und 2014), dass die in beiden Studien eingesetzten Vertreter der Wildart *Raphanus raphanistrum* und der *B. carinata* Gruppe unterschiedliche Resistenzausprägungen je Studie aufwiesen. In dem Feldversuch von 2013 zeichneten sich beide Genotypen durch hohe Resistenz aus, während sie im Keimblattscreening von 2014 als anfälligste Genotypen galten. Dies lässt an der wirklichen Reproduzierbarkeit von gleichwertigen Ergebnissen über den Keimblatttest Zweifel aufkommen. Möglicherweise werden verschiedene Abwehrmechanismen nicht nur abhängig vom Alter sondern auch vom getesteten Gewebe der Pflanze beeinflusst.

Li et al. (2007) untersuchten den Einfluss des Inokulationszeitpunktes auf die Resistenzbewertung verschiedener Raps genotypen und stellten fest, dass bei einer verspäteten Resistenzbewertung von drei Wochen nach Inokulation das Entwicklungsstadium der Pflanzen, speziell das des Blütezeitpunktes, keinen Effekt mehr auf die Resistenzausprägung hat. Da in dem vorliegenden Screening die Resistenzbewertung innerhalb von neun Tagen nach Inokulation erfolgte, kann ein Effekt des Entwicklungsstadiums auf die Reaktion der wilden *Brassica*-Akzessionen nicht ausgeschlossen werden.

Um den Effekt der Temperatur und der Luftfeuchte auf den Infektionserfolg zu minimieren, wurden inokulierte Pflanzen für die Dauer des gesamten Versuchs in einem Folientunnel gehalten. Diese Optimierung der Screeningmethode hatte den Vorteil, dass ideale Infektionsbedingungen für *S. sclerotiorum* geschaffen wurden und zwischen den Versuchen vergleichbare klimatische Bedingungen herrschten.

Trotz der unzureichenden Differenzierung im Gewächshauscreening von 2012 gelang es durch Optimierung der Inokulations- und Screeningmethode im Versuchsjahr 2013, die von Wulf (2011) postulierten verschiedenen Abwehrtypen zu bestätigen. Entsprechend der zugrundeliegenden Arbeitshypothese der vorliegenden Studie zeichneten sich vermehrt *Brassica*-Wildarten als auch die beiden domestizierten *B. oleracea italica* Akzessionen und die Rapsresynthesen durch verbesserte induzierte Mechanismen aus, welche die Pathogenausbreitung in der Pflanze abwehrten. Rapsorten, domestizierte *Brassica*-Arten und einige wilde Akzessionen konnten den Befall des Stängels an sich aufgrund verstärkter Penetrationsabwehr durch strukturelle und biochemische Mechanismen verhindern. Allerdings wurde die Ausbreitung des Pathogens nach erfolgreicher Penetration bei diesen Genotypen nicht bzw. nur gering abgewehrt.

Durch Methodenoptimierung in der vorliegenden Arbeit konnten die Genotypen *B. macrocarpa* und *B. drepanensis* mit erhöhter Resistenz assoziiert werden. Die neue Inokulationsmethode ermöglicht auch Rückschlüsse auf evtl. prä- und postinfektionell wirkende Abwehrmechanismen des jeweiligen Materials. Zusätzlich konnte durch Zuführung einer Verletzung in kurzer Zeit an vergleichbarem Material eine bessere Differenzierung zwischen den diversen *Brassica*-Arten vorgenommen werden. Genotypen mit guten Resistenzeinstufungen sowohl mit als auch ohne Verletzung scheinen verbesserte postinfektionelle Abwehrmechanismen zu besitzen und bieten interessante Resistenzquellen für die Züchtung neuer Rapsorten.

4.2 Resistenzbewertung anhand des Blattsegmenttests zur Oxalsäuresensitivität

Neben dem Gewächshauscreening wurde das Resistenzniveau der verschiedenen *Brassica*-Arten über einen Blattsegmenttest bestimmt, welcher in der Vorgängerarbeit von Wulf (2011) entwickelt und als schnelle und zuverlässige Screeningmethode beschrieben wurde. Dieser ermittelt die Sensitivität der jeweiligen Genotypen gegenüber Oxalsäure.

Oxalsäure gehört zu den wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *S. sclerotiorum* und ist für eine erfolgreiche Infektion des Pflanzengewebes unabdingbar (Godoy et al., 1990; Cessna et al., 2000). Der hier beschriebene Blattsegmenttest nutzt die Eigenschaft der

Zellwand-destabilisierenden Wirkung von Oxalsäure. Bei direktem Kontakt von Pflanzenmaterial mit Oxalsäure kommt es zur Schädigung der Zellmembran, wodurch in der Zelle enthaltene Ionen ausströmen und dadurch die Leitfähigkeit des umgebenden Wassers erhöhen. Diese wiederum wird über eine elektrische Spannung bestimmt. Es galt, je höher die mit einer Elektrode gemessene Ionenleitfähigkeit ist, desto anfälliger ist der jeweilige Genotyp.

Diese Methode führte zu einer guten Differenzierung zwischen den hier verwendeten Genotypen. Auch in diesem Screening wurde die chinesische Linie Zhongshuang 9 als resistenter Standard verwendet, da diese bereits bei Wulf (2011) die geringste Sensitivität gegenüber Oxalsäure aufwies. Beim Vergleich der verwendeten Genotypen beider Screeningdurchgänge waren lediglich die beiden Wildarten *B. oleracea robertiana* und *B. villosa* sowie der domestizierte Genotyp *B. oleracea italica* 2 nach Normalisierung der Leitfähigkeit (norm. Leitfähigkeit) ähnlich sensitiv für Oxalsäure. Auffällig war die Reaktion des Genotyps *B. drepanensis*, welcher im Versuchsdurchgang 2012 hoch sensitiv gegenüber Oxalsäure war, im Screening von 2013 aber zur Gruppe mit der geringsten Oxalsäuresensitivität zählte. Neben den inhomogenen Reaktionen der Genotypen in den beiden Screeningdurchgängen konnten weder für das Versuchsjahr 2012 noch für 2013 Übereinstimmungen zwischen der Oxalsäuresensitivität und dem ermittelten Befallsniveau des jeweiligen Gewächshausscreenings festgestellt werden. Ein Vergleich der ermittelten norm. Leitfähigkeiten mit den Ergebnissen von Wulf (2011) ließ weder im Versuchsjahr 2012 noch 2013 Übereinstimmungen erkennen.

Bei der kritischen Betrachtung des Blattsegmenttests muss auf dessen störanfällige Handhabung hingewiesen werden. Bereits Schaderregerbefall vor der eigentlichen Durchführung des Tests sowie ungewollte Verletzungen und die Bildung von Luftblasen während des Tests können die Messergebnisse beeinflussen. Zur Bestimmung der Sensitivität der Genotypen müssen die Blattscheiben nach Inkubation mit Oxalsäure mehrfach gewaschen werden, wodurch leicht Verletzungen am Gewebe auftreten können. Zusätzlich wurde beobachtet, dass nach jeder Messung ein Teil des Wassers in der Saugelektrode zurückbleibt. All diese Störfaktoren können zu einer Verfälschung der Ergebnisse beitragen. Auch das Blattmaterial an sich kann einen Effekt auf die Resistenzbewertung haben. So konnte Wulf (2011) zwar einen Einfluss der Blattstärke ausschließen, jedoch schien die Anzahl der Spaltöffnungen einen Effekt auf die Oxalsäuresensitivität des Genotyps zu besitzen. Dies liegt laut Guimarães & Stotz (2004) an einer Manipulation des Schließmechanismus der Spaltöffnungen durch Oxalsäure. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen erhöhter Oxalsäuresensitivität und Anzahl der Spaltöffnungen erkannt.

In der Studie von Rahmanpour et al. (2011) wurden die Resistenzreaktionen von Blattmaterial über drei verschiedene Screeningmethoden ermittelt. Hierbei wurde eine gute Differenzierung zwischen den getesteten Genotypen nur über die Behandlung intakter Blätter mit Myzel oder Oxalsäure erreicht. Die Methode über Myzel-inokulierte Blattscheiben lieferte keine gute Unterscheidung des getesteten Materials. Auch in dem in dieser Arbeit eingesetzten Blattsegmenttest wurde mit Blattscheiben gearbeitet. Aufgrund der Verletzung des Blattes könnte die Oxalsäure leichter über die Schnittstelle in das zu untersuchende Gewebe diffundieren und andere Zellbestandteile könnten hierdurch austreten. Dies könnte mögliche Diskrepanzen zwischen dem Blattsegmenttest und dem Gewächshauscreening erklären. Allerdings wurde in dem Oxalsäureassay von Rahmanpour et al. (2011) vor der Inkubation mit Oxalsäure absichtlich eine Verletzung des Blattgewebes vorgenommen und dennoch konnten vergleichbare Reaktionen der Genotypen mit denen der Inokulation durch Myzel beobachtet werden.

Dass Oxalsäure ein geeignetes Agens zur Resistenzeinstufung darstellen kann, wurde bereits mehrfach gezeigt. Noyes & Hancock (1981) gelangen Resistenzeinstufungen in Sonnenblume (*Helianthus annuus*), indem sie Blattzellen verschiedenen Konzentrationen von Oxalsäure aussetzten und anschließend ihr Überleben bewerteten. Tu (1989) gelang die Unterscheidung von einer toleranten und einer anfälligen Sorte der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), indem er zum einen über elektronmikroskopische Aufnahmen die Zersetzung der Plasmamembran beurteilte und zum anderen die Leitfähigkeit aufgrund des gesteigerten Ionenausstroms ermittelte. Tu (1989) kam ebenso wie Wulf (2011) zu der Feststellung, dass die Plasmamembran der anfälligeren Sorte stärker von Oxalsäure angegriffen wird und somit auch die ermittelte Leitfähigkeit bei dieser höher liegt. Wegulo et al. (1998) testeten drei verschiedene Inokulationstechniken an verschiedenen Sojabohnensorten und stellten fest, dass der Oxalsäuretest die zuverlässigsten Ergebnisse lieferte. Für die Bewertung wurden Sojabohnenstängel in 40 mM Oxalsäure inkubiert und anschließend die Läsionsentwicklung am Stängelgewebe sowie das Ausmaß der pinkfarbigen Pigmentierung in der Oxalsäurelösung bestimmt. Die Autoren vermuteten, dass die pinke Färbung auf die Bildung von Anthocyaninpigmenten zurückzuführen ist und eine verstärkte Pigmentierung der Oxalsäurelösung mit verstärkter Resistenz in der Sojabohne verbunden ist. Diese Methode wurde von Bradley et al. (2006) im Raps etabliert. Sie konnten verschiedene *B. napus* Sorten hinsichtlich ihrer Resistenz über den Oxalsäureassay bewerten. Jedoch konnte diese Gruppe nicht bestätigen, dass Rapsstängel, die eine verstärkte Pigmentierung hervorriefen auch resistenter waren. Außerdem konnten in diesen Untersuchungen weder Welkeerscheinungen noch Läsionen am Stängel beobachtet werden. In den Arbeiten von

Fang (1993) und Chaocai et al. (1995) konnten diese Symptome in Raps nach Oxalsäureinkubation allerdings ausgelöst und somit in die Resistenzbewertung einbezogen werden.

4.3 Bewertung der verwendeten Resistenzprüfmethoden

Für eine realistische Bewertung der Resistenz der untersuchten *Brassica*-Arten wurden die beiden Screeningmethoden über Korrelationen miteinander in Beziehung gesetzt. Hierbei ergab sich keine Deckung der Ergebnisse aus dem Gewächshauscreening mit den Ergebnissen des Blattsegmenttests für Oxalsäuresensitivität, weder für das Genotypenset des Versuchsjahrs 2012, noch für das des Durchgangs von 2013. Hingegen stellte Wulf (2011) einen Zusammenhang zwischen den Prüfmethoden fest, allerdings erst nach Korrektur der Leitfähigkeitsänderungen um die Anzahl der Spaltöffnungen je mm² Blattfläche. Die Leitfähigkeitsänderungen der Genotypen allein ergaben, wie in der vorliegenden Arbeit, keine Korrelation mit den Befallsparametern. Da in dieser Arbeit die Anzahl der Spaltöffnungen je mm² keinen Einfluss auf die Oxalsäuresensitivität hatte, wurde dementsprechend auch keine Korrektur der ermittelten Leitfähigkeitsänderung vorgenommen.

Die hier geschilderte Problematik einer fehlenden Korrelation zwischen verschiedenen Screeningmethoden wurde auch von Wulf (2011) bei der Testung von Rapsgenotypen beobachtet, welche von verschiedenen Züchtern zur Verfügung gestellt wurden. Hierbei konnte er weder zwischen den Feldversuchen und dem Gewächshauscreening, noch zwischen dem Blattsegmenttest und dem Gewächshauscreening oder den Feldversuchen einen Zusammenhang feststellen. Er begründete dies mit der geringen Unterscheidbarkeit des Materials bezüglich des Resistenzniveaus und folgerte, dass nur stark distinkte Genotypen, wie *Brassica*-Wildarten, einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Resistenzprüfmethoden erkennen lassen würden.

Des Weiteren wurden in der hier vorliegenden Arbeit insgesamt nur wenige Genotypen bezüglich ihrer Resistenz gegen *S. sclerotiorum* untersucht. Uloth et al. (2013) demonstrierten, dass eine Resistenzbewertung nur dann möglich ist, wenn ein großes Set mit einer ausreichenden Anzahl an Genotypen derselben Art getestet wird, da teilweise gleiche Arten unterschiedliche Befallsreaktionen aufzeigen. Unterschiedliche Reaktionen gleicher *Brassica*-Arten gegenüber dem Pathogen sowie dessen Pathogenitätsfaktor wurden auch in dieser Arbeit sowie in der Arbeit von Wulf (2011) beobachtet. Hierbei muss bei den Wildarten bedacht werden, dass bei diesen keine vollständige Homogenität innerhalb einer Population vorliegt, während bei der Züchtung von neuen *Brassica*-

Kulturen auf Uniformität der Pflanzen und Homogenität innerhalb der Population geachtet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Blattsegmenttest als zusätzliche Methode zur Resistenzbewertung eingesetzt. Laut Wulf (2011) galt dieser Test als reproduzierbar und hatte den Vorteil, dass gleich altes Blattmaterial verwendet werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Blattsegmenttests sowie den Ergebnissen der Gewächshausversuche festgestellt werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte, wie bereits vermutet, die unzureichende Zuverlässigkeit des Blattsegmenttests an sich sein.

In dem vorliegenden Gewächshauscreening wurde die Resistenz von Stängelmaterial beurteilt, welches eine andere Zusammensetzung der Zellwand sowie der Gewebefestigkeit als Blattmaterial aufweist. Daher könnte die Verwendung verschiedener Pflanzengewebe für die fehlende Übereinstimmung zwischen den beiden Screeningansätzen verantwortlich sein. Auch in der Studie von Ding et al. (2013) konnten bei der Untersuchung von wilden *Brassica*-Arten und Resynthesen keine bzw. nur schwache Korrelationen zwischen Blatt- und Stängelmaterial ermittelt werden. You et al. (2015) stellten in einem Feldversuch über natürliche Infektion von Blatt und künstlicher Myzelinokulation am Stängelmaterial verschiedener *Brassica*-Arten ebenfalls keine Korrelationen fest.

Im Gegensatz dazu konnten Mei et al. (2011) und Dazlili (2013) signifikante Zusammenhänge zwischen Blatt- und Stängelinokulation aufzeigen, bei Mei et al. (2011) allerdings nur für Akzessionen der *B. oleracea* Gruppe. Somit scheinen bei diesen Genotypen gleiche bzw. ähnliche Abwehrmechanismen in den verschiedenen Pflanzengeweben zu wirken. Ferner konnten Kim et al. (2000) in Sojabohnensorten Korrelationen zwischen Keimblatt- bzw. Blatinokulationen im Gewächshaus und Stängelinokulationen im Feld feststellen. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen Keimblattassay und der Resistenzbewertung von Rapsgenotypen im Feld wiesen auch, wie bereits im Abschnitt 4.1 erwähnt, Garg et al. (2008) nach.

Nach der Studie von Yin et al. (2010) können Abwehrreaktionen von Genotypen bereits durch die jeweils verwendete Inokulationsmethode an sich beeinflusst werden. In ihren Untersuchungen konnten die Autoren in 77 *B. napus* DH-Linien unterschiedliche Resistenzausprägungen bei der Anwendung von drei unterschiedlichen Blatinokulationsmethoden feststellen. Der ermittelte Effekt der Inokulationsmethode spiegelte sich dabei auch in den durchgeführten QTL-Analysen wieder.

Somit bleibt die Frage nach einer geeigneten und reproduzierbaren Resistenzbewertungs- und Inokulationsmethode weiterhin offen. Einen neuen Lösungsansatz bieten Ge et al. (2012) an, die ein Differentialset aus anfälligen und resistenten *B. napus* und *B. juncea* Genotypen aufstellten, um die Resistenzreaktion auf verschiedene Pathotypen von *S. sclerotiorum* zu bewerten. Zusätzlich entwickelten sie eine neue Bewertungsmethode über eine achtgliedrige Nomenklatur um unterschiedliche *Sclerotinia*-Isolate hinsichtlich Virulenz und Interaktion mit den *Brassica*-Genotypen einzustufen. Dabei stellten sie fest, dass sowohl anfällige als auch resistente Reaktionen innerhalb eines Genotyps in Abhängigkeit vom verwendeten Isolat hervorgerufen wurden. Einige wenige resistente *Brassica*-Arten zeichneten sich auch nach Inokulation mit verschiedenen Isolaten durch eine geringe Anfälligkeit aus. Ge et al. (2012) folgerten daraus, dass für die erfolgreiche Resistenzzüchtung die Reaktionen von Wirtspflanzen gegenüber verschiedenen *Sclerotinia*-Pathotypen bewertet werden müssen, um zu einer realistischen Resistenzbeurteilung zu kommen.

Im Folgenden soll ein kurzer Einblick in bisher eingesetzte Bewertungssysteme für die Stängelresistenz gegen *S. sclerotiorum* gegeben werden. Am häufigsten wird die Beurteilung über die Läsionslänge angewandt und zwar sowohl in Gewächshausversuchen, Oxalsäureassays als auch Feldversuchen. Meist wird hierbei die Länge der Läsion beurteilt (Li et al., 2006, 2008; Uloth et al., 2013, 2014; You et al. 2015), jedoch können die Daten auch als sogenannte Befallsflächenwerte (Wulf, 2011; diese Arbeit) angegeben werden. Teilweise findet auch eine Relativierung zu dem mitgeführten resistenten Standard (Mei et al., 2011; Ding et al., 2013) statt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Normalisierung um die Werte der anfälligen und der resistenten Kontrolle vorgenommen. In der Arbeit von Garg et al. (2010) wurde neben der Messung der Läsionslänge eine Kategorisierung der Resistenz durchgeführt. Bei Sedun et al. (1989) wurde das Maß der Läsionsausbreitung [$\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$] bestimmt. Hierbei wurde täglich die Läsionslänge (mm) gemessen bis genau 10 cm Läsionsausbreitung erreicht waren. Anschließend wurde die Läsionslänge um die Anzahl der Tage korrigiert.

Diese kurze Zusammenfassung der wichtigsten Resistenzbewertungsmethoden verdeutlicht, dass es auch hier zahlreiche Möglichkeiten gibt, die Auswirkung einer Resistenz gegenüber dem Weißstängeligkeitserreger zu quantifizieren. Für andere Pathogene existieren einheitlichere Bewertungsmethoden. So wird bei der Resistenzeinstufung von *V. longisporum* im vegetativen Entwicklungsstadium und *L. maculans* im Keimblattstadium von Raps meist eine Boniturnote entsprechend einer festgelegten Skala vergeben. Bei Untersuchungen von Befall mit *L. maculans* an

vegetativen Pflanzen werden gewöhnlich Läsionslänge, -breite und -tiefe bestimmt und daraus dann das Volumen von infiziertem Gewebe (VDT) (Volume of diseased tissue).

Es gibt, wie bereits erwähnt, zahlreiche Methoden zur Inokulation, zum Screening und zur Resistenzvalidierung von Wirtspflanzen gegenüber *S. sclerotiorum*. Bisher konnte keine der Methoden wirklich überzeugende Ergebnisse liefern und somit ist eine universelle Resistenzbewertung zurzeit nicht möglich.

Für eine das Problem lösende, zukünftige Versuchsplanung muss berücksichtigt werden, dass sowohl die Inokulationsmethode als auch das verwendete Gewebe und das Alter der Pflanzen eine entscheidende Rolle für Resistenzbewertung spielen. Zusätzlich muss bei der Resistenzsuche beachtet werden, dass die verwendeten Genotypen eine hohe Variabilität aufweisen, um eine ausreichende Differenzierung zu erzielen, dass ein großer Probenumfang für die Resistenzbeurteilung vorliegt sowie dass eine große Anzahl gleicher Arten getestet wird. Auch sollte eine Einstufung des Materials gegenüber verschiedenen Pathotypen von *S. sclerotiorum* vorgenommen werden.

Da bisher noch keine vollständige Resistenz gegenüber *S. sclerotiorum* bekannt ist, erscheint für eine einheitliche Resistenzbewertung die Verwendung eines uniformen *Brassica*-Standardsets als sinnvoll. Dieses sollte identische und reproduzierbare Resistenzausprägungen bei Infektion mit verschiedenen Pathotypen von *S. sclerotiorum* aufweisen. Ein solcher Ansatz wurde bereits von Ge et al. (2012), Uloth et al. (2013) und You et al. (2015) genutzt. Die jeweils getesteten *Brassica*-Arten könnten zu den Befallsreaktionen des vorgeschlagenen uniformen *Brassica*-Standardsets normalisiert werden.

Als geeignetste Methode sticht aus all den Untersuchungen die Bewertung der Stängelresistenz im Feld- oder Gewächshausversuch hervor (Bradley et al., 2006; Mei et al., 2012; Dalili, 2013; You et al., 2015).

Yin et al. (2006) beschreiben die Inokulation über infiziertes Blütenblattmaterial oder artifiziell über myzelbewachsene Agarplugs als gute Alternative zur natürlichen Infektion mit *S. sclerotiorum*.

Auf Grund der Erkenntnisse aus dieser Arbeit muss für zukünftige Untersuchungen bedacht werden, dass präformierte Abwehrmechanismen mit gesteigerter Resistenz assoziiert werden können, wodurch allerdings die für die Züchtung interessanten gesteigerten postinfektionellen Abwehrmechanismen außer Acht gelassen werden. Daher sollte überlegt werden, neben naturnahen Inokulationsmethoden immer eine Variante mit

zugeführter Verletzung, z.B. Zahnstochermethode (Dunker, 2006; Yin et al., 2010) mitlaufen zu lassen, um die Resistenz umfassender zu beurteilen.

Eine einheitliche Resistenzbewertung zeichnet sich somit durch eine große Anzahl verschiedener *Brassica*-Arten mit vielen Genotypen einer Art sowie einem mitgeführten uniformen *Brassica*-Standardset gegenüber verschiedenen Pathotypen von *S. sclerotiorum* aus. Das Screening sollten dann in einem Feld- bzw. Freilandversuch und die Inokulation zum Zeitpunkt der Blüte mittels infizierter Blütenblätter sowie der Zahnstochermethode durchgeführt werden. Die Läsionsentwicklung sowie die Anzahl abgestorbener Pflanzen sollten über mehrere Wochen, optimal wären mehr als drei Wochen, bestimmt werden. Die Evaluierung der Resistenz sollte über eine Normalisierung zu dem verwendeten *Brassica*-Standardsets sowie nach der neuen Nomenklatur von Ge et al. (2012) erfolgen.

4.4 Resistenzausprägung gegen *S. sclerotiorum* der *B. napus* Genotypen für die Interaktionsstudie

Bei der Suche nach einem resistenten *B. napus* Genotyp erwies sich in dieser Arbeit die chinesische Rapslinie Zhongyou 821 als besonders resistent gegenüber *S. sclerotiorum*. Zhongyou 821 wies eine geringere Läsionsentwicklung als die chinesische Linie Zhongshuang 9 auf, welcher eigentlich höhere Resistenz nachgesagt wird (Wang et al., 2003; Mei et al., 2011; Wulf, 2011). Laut Li et al. (1999a) ist Zhongyou 821 eine Sorte mit mittlerem Resistenzniveau. Zhao et al. (2009) konnten bereits aufzeigen, dass sich Zhongyou 821 hervorragend für Interaktionsstudien eignet, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt.

In der vorliegenden Studie gelang es ein *B. napus* Set mit verschiedenen Resistenzausprägungen zu identifizieren. Mit diesem Set wurden Untersuchungen zur Identifikation von Mechanismen zur Ausbreitungsabwehr durchgeführt. Die große Bedeutung dieses Resistenztyps wurde bereits im Gewächshauscreening sowie auch von Wulf (2011) diskutiert und hervorgehoben. Da für die Untersuchung ein hundertprozentiger Infektionserfolg notwendig war, wurde vor der Inokulation am Stängel eine Verletzung vorgenommen. Diese Methode erwies sich bereits in dem hier durchgeführten Resistenzscreening als sehr effizient. Somit konnten präformierte morphologische Abwehrmechanismen des Stängels außer Acht gelassen und nur die induzierten Resistenzreaktionen beurteilt werden.

Wie bereits in anderen Studien gezeigt (Zhao et al., 2009; Eynck et al., 2012; Uloth et al., 2015), manifestierte sich die Resistenz in *B. napus* durch eine Verringerung der Pathogenausbreitung innerhalb der Pflanze. In der vorliegenden Studie wurde Zhongyou 821 zwar befallen, jedoch schien die Pathogenausbreitung deutlich verlangsamt im Vergleich zum anfälligen Genotyp Loras. Der Befall mit *S. sclerotiorum* war bei der anfälligen Sorte signifikant stärker und führte bei dieser auch zu sichtbarer Myzelbildung auf der Stängeloberfläche und zur Welke der Pflanzen. Dieser Genotypeneffekt spiegelte sich auch in den Ergebnissen der über quantitative Realtime PCR ermittelten Pathogen-DNA-Mengen wieder. Bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion konnte DNA von *S. sclerotiorum* in beiden Genotypen nachgewiesen werden, was die Effektivität der Inokulationsmethode belegt. Im späteren Infektionsverlauf bestätigen die PCR-Ergebnisse der relativen Ss-DNA-Gehalte die Ergebnisse der relativen Läsionsentwicklung. Trotz der anfänglichen Unterschiede zu den frühen Infektionszeitpunkten konnte ein positiver Zusammenhang zwischen den beiden Befallsparametern ermittelt werden. Daher konnten die in dieser Arbeit identifizierten *B. napus* Genotypen in den nachfolgenden Untersuchungen zur Raps – *S. sclerotiorum* Interaktion verwendet werden.

4.5 Rolle der Zellwandabwehr in der Interaktion *B. napus* und *S. sclerotiorum*

4.5.1 Resultate der Zellwandanalysen

Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellwand, die eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Pathogenen hat, können die Resistenz der Pflanzen beeinflussen. Llorente et al. (2005) und Delgado-Cerezo et al. (2012) stellten einen positiven Zusammenhang des Xylosegehaltes der Zellwand mit erhöhter Resistenz gegen den nekrotrophen Erreger *Plectosphaerella cucumerina* in *A. thaliana* fest. Zusätzlich konnten Delgado-Cerezo et al. (2012) eine erhöhte Resistenz gegen *P. cucumerina* aufgrund struktureller Veränderung des Polysaccharids Xyloglucan, welches ebenfalls Bestandteil der Hemicellulose ist, nachweisen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Gesamtzuckergehalt ließen direkte Rückschlüsse auf den Hemicelluloseanteil in der Zellwand zu. Dies hat seinen Grund in der Tatsache, dass Hemicellulose ein Kohlenhydrat-basierendes Polymer ist, welches sich aus chemisch unterschiedlichen Zuckermolekülen zusammensetzt, während die Cellulose ein Polysaccharid ist, das nur aus Glucoseeinheiten besteht. Da über eine Korrelationsanalyse kein Zusammenhang zwischen dem Gesamtzucker- und dem Cellulosegehalt gezeigt werden konnte, wurde der Gesamtzuckergehalt mit dem Hemicellulosegehalt der Zellwand assoziiert. Die Untersuchungen der Zellwand im resistenten Genotyp ergaben einen konstitutiv höheren

Gehalt an Gesamtzucker/Hemicellulose verglichen zur anfälligen Sorte Loras, während der Celluloseanteil in beiden Rapsstypen gleich war. Nach Infektion mit *S. sclerotiorum* konnte bei beiden untersuchten Genotypen eine Abnahme des Zuckergehaltes der Zellwand beobachtet werden, jedoch nicht im Cellulosegehalt. Dies beruht möglicherweise auf dem schnelleren Abbau von Hemicellulose durch das Pathogen, um möglichst schnell Kohlenhydrate für die Bildung von Oxalsäure zur Verfügung zu haben (Billon-Grand et al., 2012). Miedes & Lorneces (2004) erkannten, dass der Abbau von Hemicellulose Zellwandverbindungen auflöst, wodurch Cellulose leichter zugänglich und hierdurch der Befall des Pflanzengewebes gefördert wird. Eine weitere mögliche Erklärung für den verringerten Zuckergehalt, wäre die Verwendung der durch den Befall freigewordenen Moleküle für die Synthese anderer Abwehrstoffe, wie z.B. phenolische Metabolite. Da im Rahmen dieser Arbeit keine Unterscheidung der Zuckermoleküle vorgenommen wurde, ist diese Vermutung mit Vorsicht zu betrachten.

Pektin ist ein wichtiger Bestandteil der primären Zellwand von Pflanzen und weniger in der sekundären Zellwand vorhanden (Endler & Persson, 2011), weshalb vermutlich über die Versuchszeit hin keine Veränderung in der Pektinmenge, verglichen zum Gesamtzuckergehalt beobachtet wurde. *S. sclerotiorum* kann Pektin über Polygalacturonasen (PGs) abbauen und als Kohlenhydratquelle nutzen (Bolton et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied zwischen den Inokulationen der beiden Genotypen ermittelt werden, was möglicherweise an der Verfügbarkeit einfacher Zucker lag. Rio et al. (1992) und Fraissinet-Tachet & Févre (1996) konnten zeigen, dass die Aktivität von einigen PGs in *S. sclerotiorum* bei Anwesenheit von einfachen Zuckern reduziert war. Diese Ergebnisse wurden durch die Identifizierung des CRE1 Glucose-Repressors in den Promotorregionen einiger PGs von *S. sclerotiorum* bestätigt (Vautard et al., 1999). Hingegen testeten Cotton et al. (2003) die Genexpression der Endo-Polygalacturonasen *pg1-3* von *S. sclerotiorum* gegenüber der Präsenz von verschiedenen Zuckerquellen und konnten nur einen Einfluss des pH, nicht jedoch der vorgelegten Kohlenhydrate erkennen. Eine andere Erklärung könnte die erhöhte Aktivität von Polygalacturonase-Inhibitorproteinen (PGIPs) in den beiden Rapsstypen sein. Ferrari et al. (2012) konnten in verschiedenen anderen Pflanzen zeigen, dass eine Überexpression von Zellwand-assoziierten PGIPs die Anfälligkeit gegenüber nekrotrophen Pathogenen verringert.

4.5.2 Expression von Schlüsselgenen des Phenylpropanoidsyntheseweges

Um ein besseres Verständnis für die Rolle der Phenylpropanoide und Monolignole bei der Interaktion von Raps mit *S. sclerotiorum* zu erhalten, wurde die Expression von sechs Schlüsselenzymen des Phenylpropanoidsyntheseweges analysiert (Abb. 21). Hierbei fiel vor allem in Zhongyou 821 eine verstärkte Expression aller Gene zu Beginn der Infektion auf. Dies deutet auf eine schnelle Erkennung und Abwehr von *S. sclerotiorum* hin. Hingegen konnte bei Loras ein Anstieg der Expression im Vergleich zu den Kontrollen erst über die Zeit beobachtet werden, was eine verspätete Abwehrreaktion vermuten lässt. Untersuchungen zur Expression verschiedener Abwehrgene über Microarray (Zhao et al., 2007, 2009) sowie Proteomanalysen (Garg et al., 2013) bestätigen, dass Resistenz gegen den Weißstängeligkeitserreger mit der raschen Aktivierung defensiver Mechanismen verbunden ist.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte in der hier vorliegenden Arbeit bei beiden Genotypen eine erhöhte *PAL* Expression verglichen zu den Mock-Kontrollen beobachtet werden. Diese war in Zhongyou 821 bereits zu Beginn deutlich verstärkt, während in Loras erst zum späteren Zeitpunkt eine um das 12- bzw. 30-fache erhöhte Expression beobachtet wurde.

Die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (*PAL*) katalysiert den ersten Schritt im Phenylpropanoidsyntheseweg (Fraser & Chapple, 2011; Abb. 21) und bildet auch eine Schnittstelle für die Synthese von Salizylsäure (Vlot et al., 2009; Huang et al., 2010). Huang et al. (2010) konnten in Vierfachmutanten aller *PAL*-Isoformen von *A. thaliana* eine Reduktion sowohl im Lignin- als auch im Salizylsäuregehalt feststellen. Somit könnte die schnelle Reaktion von Zhongyou 821 auf den Befall mit einer raschen Bildung von Phenolen sowie mit erhöhter Synthese von Salizylsäure verbunden sein. Diese Rolle von *PAL* bei der Pathogenabwehr konnte bereits in Reis (*Oryza sativa* L.) durch Behandlung einer Zellkultur eines resistenten Genotyps mit *Magnaporthe oryzae* bestätigt werden (Giberti et al., 2012). In Melone (*Cucumis melo* L.) wurden nach Befall mit dem Mehltauerreger *Podosphaera fusca* in einem resistenten Genotyp ein erhöhter Ligningehalt verglichen zum anfälligen Genotyp nachgewiesen, welcher mit einem gesteigerten *PAL*-Aktivität korrelierte (Romero et al., 2008).

In höheren Pflanzen wird die Synthese von Syringyl (S)-Lignin durch das Gen *F5H* reguliert (Meyer et al., 1996; Sibout et al., 2002; Zhao et al., 2010). Das Enzym Ferulat-5-Hydroxylase (*F5H*) wandelt zusammen mit der 5-Hydroxyferulasäure O-Methyltransferase (*COMT*) Coniferylaldehyde und Coniferylalkohol, welche eigentlich Vorstufen des Guaiacyl (G)-Lignins sind, zu Vorstufen von S-Lignin um (Weng et al., 2008; Abb. 21). In

der vorliegenden Arbeit wurde in Zhongyou 821 eine leicht erhöhte Expression des *F5H* Gens im Vergleich zu den Mock-Behandlungen zu Beginn des Befalls beobachtet. Diese nahm über die Zeit ab und war nach 4 dpi deutlich geringer als in den Mock-Kontrollen. Durch die rasche Aktivierung des Phenylpropanoidsyntheseweges über PAL konnte in Zhongyou 821 die Synthese von S-Lignin gefördert werden. In Loras wurde die gegensätzliche Reaktion beobachtet. Hier kam es über die Zeit zu einer leichten Zunahme der Expression von *F5H*, welche erst nach 7 dpi gleich bzw. leicht höher als in den Kontrollen war. Somit schien hier eine Abwehr über S-Lignineinlagerung in die Zellwände erst verspätet aufzutreten, während in Zhongyou 821 zu diesem Zeitpunkt bereits weitere Mechanismen aktiviert wurden. Die wichtige Rolle von *F5H* bei der Abwehr konnte bereits in *A. thaliana f5h-1* Defekt-Mutanten aufgezeigt werden, welche eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *S. sclerotiorum* zeigten (Huang et al., 2009). Auch in der Arbeit von Eynck et al. (2012) konnte im resistenten *C. sativa* Genotyp bei Betrachtung des Gesamtignins mehr S-Lignin im Vergleich zum anfälligen Genotyp festgestellt werden. Jedoch veränderte sich nach Infektion mit *S. sclerotiorum* das Ligninmuster und es konnte eine erhöhte Synthese von G-Lignin in der resistenten *C. sativa* Linie beobachtet werden. Verantwortlich für die *de novo* Synthese von G-Lignin ist laut Eynck et al. (2012) eine erhöhte Expression des Gens *CsCCR2*. Das Enzym Cinnamoyl-CoA Reduktase (CCR) katalysiert die Umwandlung von Hydroxycinnamoyl-CoA Thioestern zu Hydroxycinnamaldehyden, welche die Vorstufen von G-Lignin bilden (Fraser & Chapple, 2011; Abb. 21). In *A. thaliana* gibt es zwei Isoformen, von denen *AtCCR1* für die entwicklungsbedingte Lignifizierung verantwortlich ist und *AtCCR2* für die Pathogen-induzierte Lignifizierung (Lauvergeat et al., 2001). Diese Aufteilung konnte durch Eynck et al. (2012) ebenfalls bestätigt werden. Auch in den vorliegenden Untersuchungen wurde nach Infektion mit *S. sclerotiorum* eine erhöhte *CCR2* Expression in beiden Genotypen beobachtet. Diese war zu Beginn der Infektion in Zhongyou 821 bereits stärker erhöht als in Loras, was wiederum auf eine schnellere Abwehr der Infektion hindeutet. Somit scheint die Synthese von G-Lignin sowie dessen Vorstufen, eine Rolle bei der Pathogenabwehr zu spielen. Diese Vermutung wird durch Lauvergeat et al. (2001) gestützt, die eine erhöhte Expression von *AtCCR2* bei der inkompatiblen Interaktion zwischen *A. thaliana* und *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* mit einer verstärkten Synthese von Phenolen korrelieren konnten. Auch in der Cellulose-defizienten *A. thaliana* Mutante *eli1-1* wurde eine ektopische Lignifizierung von Gewebe durch die erhöhte Expression von *AtCCR2* induziert (Caño-Delgado et al., 2003). In Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) konnte eine erhöhte Expression von *HsCCR2* durch Stressinduktion festgestellt werden (Ghosh et al., 2014).

Das Enzym Cinnamoyl-Alkoholdehydrogenase (CAD) katalysiert die finale Synthese von G- und S-Lignin (Fraser & Chapple, 2011; Abb. 21). In *A. thaliana* sind neun Isoformen dieses Gens bekannt, wobei nur *AtCAD4* und *AtCAD5* an der Synthese von Lignin beteiligt sind (Costa et al., 2003; Sibout et al., 2003) und wahrscheinlich eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen (Tronchet et al., 2010). In der Genexpressionsstudie von Eynck et al. (2012) zeigten beide Gene ein verändertes Expressionsmuster nach Infektion. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine verstärkte Expression nach Infektion in beiden Genotypen nachgewiesen werden. Die Expressionsmuster von *CAD5* ähnelten in dieser Arbeit denen des Gens *CCR2*, weshalb vermutet wird, dass *CAD5* die Umwandlung von Coniferylaldehyd zu Coniferylalkohol katalysiert.

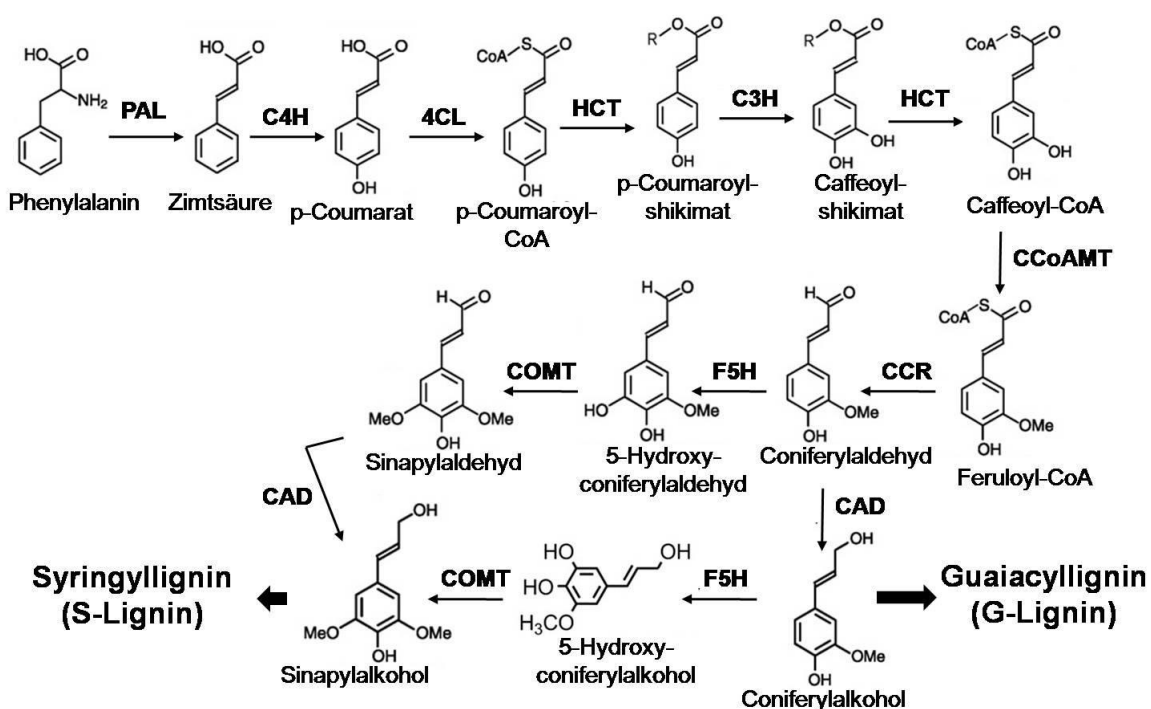


Abb. 21 Der Phenylpropanoid- und Ligninsyntheseweg in *Arabidopsis thaliana* modifiziert nach Vanholm et al. (2008) und Frase & Chapple (2011). **PAL**, Phenylalanin-Ammoniak-Lyase. **C4H**, Cinnamate-4-Hydroxylase. **4CL**, 4-Coumarat-CoA Ligase. **C3H**, p-Coumaroyl-CoA-3-Hydroxylase. **HCT**, Hydroxycinnamoyl-CoA Shikimat/Quinate Hydroxycinnamoyl Transferase. **CCoAMT**, Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase. **CCR2**, Cinnamoyl-CoA Reduktase. **F5H**, Ferulat-5-Hydroxylase. **COMT**, Kaffeesäure O-Methyltransferase. **CAD5**, Cinnamyl-Alkoholdehydrogenase.

4.5.3 Histologische Untersuchungen zur Phenolakkumulation und Lignineinlagerung

Bei den histologischen Untersuchungen konnte, wie bereits in anderen Arbeiten (Uloth et al., 2015) gezeigt, eine Übereinstimmung der Bereiche mit erhöhter Autofluoreszenz mit denen der Ligninfärbungen festgestellt werden. Lediglich die autofluoreszierenden Vesikel

des Parenchymgewebes der beiden Genotypen schienen mit anderen phenolischen Stoffen, z.B. Phytoalexinen befüllt. Die histologischen Studien bestätigten die Relevanz einer induzierten Abwehr gegen *S. sclerotiorum* über Phenol- und Lignineinlagerungen. Die gesteigerte Resistenz manifestierte sich auch hier wieder in einer früh auftretenden Infektionsabwehr. So kam es in Zhongyou 821 zur Phenolakkumulation und Lignifizierung im Parenchymgewebe und in den vaskulären Zellwänden nahe der Läsionsstelle. Diese Reaktion konnte auch von Eynck et al. (2012) in einer resistenten Linie von *C. sativa* nach Infektion mit *S. sclerotiorum* beobachtet werden. Uloth et al. (2015) hingegen wiesen derartige Abwehrreaktionen sowohl in resistenten als auch in anfälligen *B. napus* und *B. carinata* Genotypen nach. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurden verstärkte Autofluoreszenz und Ligninfärbung der betroffenen Bereiche ohne Befall mit *S. sclerotiorum* auch dort nicht beobachtet.

Die anfällige Sorte Loras zeigte neben schwächeren Abwehrreaktionen im Bereich der Inokulationsstelle eine deutliche Zersetzung des Parenchymgewebes, welche teilweise auch die vaskulären Gewebeschichten betraf. Derartige Gewebeerstörungen wurden bereits in Stängeln anfälliger *B. napus* und *B. carinata* Genotypen (Huang et al., 2008; Uloth et al., 2015) sowie in Keimblättern der anfälligen Rapssorte ‚RQ001-02M2‘ (Garg et al., 2010b) gezeigt. Uloth et al. (2015) konnten zudem beweisen, dass Genotypen, bei denen *S. sclerotiorum* in das vaskuläre System eindringen konnte, längere Läsionen bildeten und somit eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Pathogen aufzeigten. Dieser Zusammenhang zwischen einer longitudinalen Läsionsausbreitung und der Xyleminvasion von *S. sclerotiorum* wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, jedoch deutete die vermehrte Beobachtung von Verstopfungen bzw. Thyllen in den vaskulären Zellen des anfälligen Genotyps auf einen bereits erfolgreichen Befall der Leitbahnen mit dem Pathogen hin.

Zu einem späteren Infektionszeitpunkt schien wie bei Eynck et al. (2012) die Abwehr in beiden Genotypen erhöht. In den vorliegenden Untersuchungen kennzeichnete sich diese Ausprägung durch die Verdickung der Zellwände aufgrund verstärkter Lignineinlagerung und durch die Akkumulation von ligninhaltigen Komponenten in den Interzellularräumen. Diese Beobachtung war in der resistenten Linie Zhongyou 821 verstärkt.

Entsprechend der Annahme von Uloth et al. (2015) könnte die starke Abwehrreaktion von Zhongyou 821 eine Invasion der vaskulären Zellen durch *S. sclerotiorum* verhindert haben. Neben der Invasion könnte durch die Zellwandverdickungen auch die Ausbreitung von Oxalsäure verhindert werden (Sattler & Funnell-Harris, 2013). Noyes & Hancock (1981) und Tu (1985) beobachteten, dass sich Oxalsäure systemisch in der Pflanze

ausbreitet und konnten diese sogar im Xylemsaft der Pflanzen nachweisen. Dies würde die in dieser Arbeit vermehrte Beobachtung von Welkesymptomen sowie die erhöhte Anfälligkeit von Loras erklären.

Die Einlagerung von S- und G-Lignin schien über die Zeit zuzunehmen, wobei zum Zeitpunkt 2 dpi mehr Monolignole im resistenten Genotyp Zhongyou 821 erkennbar waren. Zusätzlich wurde kurze Zeit nach Pathogenbefall die Einlagerung von S- und G-Lignin noch verstärkt. Zum späteren Infektionszeitpunkt schien die Ausbreitung von *S. sclerotiorum* in Richtung Leitbündelgefäße durch die erhöhte G-Lignineinlagerung abgewehrt zu werden. Bereits Eynck et al. (2012) zeigten über analytische und histologische Untersuchungen, dass in einem resistenten *C. sativa* Genotyp signifikant mehr Monolignole gebildet wurden und dass die Lignin-induzierte Abwehr des *Sclerotinia*-Befalls auf der *de novo* Bildung von G-Lignin beruht. Auch in Weizen konnte eine verstärkte Abwehr von *Fusarium proliferatum* und *Puccinia graminis* mit erhöhter Lignifizierung in Zusammenhang gebracht werden (Bishop et al., 2002; Menden et al., 2007). Diese jedoch beruhte auf der verstärkten Bildung von S-Lignin, welches in dieser Arbeit schon bei der frühen Abwehr eine Rolle zu spielen schien. Diese Vermutung wurde durch Untersuchungen an der *A. thaliana f5h-1* Mutante gestützt (Huang et al., 2009; König et al., 2014), welche eine höhere Anfälligkeit gegen *S. sclerotiorum* und *V. longisporum* aufgrund der verringerten Synthese von Sinapinestern und S-Lignin Einheiten aufwies. König et al. (2014) konnten zusätzlich nachweisen, dass Vorstufen von G-Lignin: Coniferyl-Alkohol und Coniferin sowie Sinapinester das Hyphenwachstum von *V. longisporum in vitro* hemmen. Eine Rolle wasserlöslicher Phenolpropanoide bei der Abwehr von *S. sclerotiorum* konnte auch in den vorliegenden histologischen Studien bestätigt werden, da Autofluoreszenz und Ligninfärbungen auch in den Interzellularräumen zwischen den Parenchym- sowie den Xylemparenchymzellen auftraten.

4.6 Rolle der Zellwand bei der Abwehr von *S. sclerotiorum* in Raps

In dieser Arbeit wurde über physiologische, genetische sowie histologische Untersuchungen die Bedeutung der Zellwandmodifikation bei der Abwehr von *S. sclerotiorum* in *B. napus* bestätigt. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei die Synthese von Phenylpropanoiden und die Bildung von Lignin. Über Genexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass Schlüsselgene des Phenylpropanoidsyntheseweges bei der resistenten Interaktion mit *S. sclerotiorum* bereits zum frühen Zeitpunkt der Infektion hochreguliert wurden. Auch die histologischen Betrachtungen bestätigten eine schnelle

Abwehr der Pathogenausbreitung aufgrund erhöhter Akkumulation von Phenolen und Lignineinlagerung. Im anfälligen Genotyp konnten derartige Abwehrmechanismen erst verspätet beobachtet werden. Sowohl genetische als auch histologische Untersuchungen unterstützen die Arbeitshypothese, dass die Ligninzusammensetzung bei der Abwehr eine wichtige Rolle spielt (Eynck et al., 2012). Wie bereits erwähnt, können die Vorstufen von G-Lignin durch das Enzym Ferulat-5-Hydroxylase (F5H) auch zur Synthese von S-Lignin verwendet werden. Da in den vorliegenden Untersuchungen die Expression von *F5H* in der resistenten Linie Zhongyou 821 über die Zeit abnahm, liegt die Vermutung nahe, dass S-Lignin zwar zu Beginn der Infektion mit *S. sclerotiorum* eine Rolle bei der Abwehr spielt, im späteren Verlauf jedoch vermehrt G-Lignin synthetisiert wird. Hingegen scheint in der anfälligen Interaktion mit Loras kaum S-Lignin gebildet zu werden und die verspätete Abwehr größtenteils über G-Lignin reguliert zu werden. Diese Annahmen konnten über die hier erbrachten histologischen Untersuchungen bestätigt werden. Dies lässt vermuten, dass G-Lignin generell eine wichtige Rolle bei der Abwehr von *S. sclerotiorum* spielt, während S-Lignin eher mit Resistenz verbunden ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Annahme von Uloth et al. (2015), dass eine erhöhte Pflanzenabwehr mit der Verhinderung der longitudinalen Pathogenausbreitung einhergeht. In der Studie von Eynck et al. (2012) zeigten die Autoren, dass G-Lignin vorwiegend in den Zellwänden von Xylemgefäßen zu finden ist, während S-Lignin eher in den intervaskulären, sklerenchymatischen Zellen vorkommt. Auch in dieser Arbeit konnte dieses Verteilungsmuster der Monolignole beobachtet werden. Die erhöhte Einlagerung von S-Lignin zum frühen Zeitpunkt könnte somit möglicherweise verhindern, dass *S. sclerotiorum* die Leitbahnen erreicht bzw., dass Oxalsäure in diese hinein diffundiert. Die generell erhöhte Synthese von G-Lignin in Loras und Zhongyou 821 diene möglicherweise der Verstärkung der Zellwände der Leitgefäße sowie der Thyllenbildung.

Neben der hier untersuchten Abwehr über Zellwandverstärkungen und Einlagerung von Lignin haben viele weitere Mechanismen bei der Abwehr von *S. sclerotiorum* eine wichtige Bedeutung. Zahlreiche Analysen über Mikroarrays, zum Metabolom und Proteom konnten bereits zeigen, dass ein Arsenal an Abwehrmechanismen bei der Interaktion von *S. sclerotiorum* mit verschiedenen Wirten aktiv ist (Zhao et al., 2007, 2009; Calla et al., 2009; Peluffo et al., 2010; Zhuang et al., 2012; Garg et al., 2013; Wu et al., 2016).

5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Auswertung des Standes der Wissenschaft zeigen, dass in Wildarten von *Brassica* interessante Quellen für die Resistenzzüchtung vorliegen.

Durch die Verwendung der neu etablierten Inokulationsmethode konnte eine bessere Differenzierung der getesteten *Brassica*-Arten im Gewächshausscreening erzielt werden. Zusätzlich ermöglichte der Vergleich zwischen den Befallsstärken der unverletzten und der verletzten Inokulationsvariante eine verbesserte und detailliertere Einschätzung potentieller Resistenzquellen hinsichtlich ihrer Abwehr- und Penetrationsresistenz.

In den hier getesteten Rapsorten sowie einigen domestizierten *Brassica*-Arten zeigte sich eine verbesserte Penetrationsabwehr, welche verantwortlich für den geringen Befall mit *S. sclerotiorum* in der unverletzten Inokulationsvariante war. Diese Art der Abwehr sollte jedoch nicht primäres Ziel für die Züchtung resistenter Rapsorten sein, da hier der Befall nur verzögert, aber nicht komplett abgewehrt wird.

Geeignete Kandidaten für weitere Untersuchungen auf dem Weg zur neuen resistenten Rapsorte wären vor allem Genotypen mit erhöhter induzierter Abwehr, welche die Ausbreitung des Pathogens im Pflanzengewebe begrenzen bzw. verhindern könnten (Ausbreitungsresistenz). Dieser Abwehrtyp kam vorwiegend in wilden *Brassica*-Arten vor, wobei sich die beiden Akzessionen *B. drepanensis* und *B. macrocarpa* hierbei als interessantes Material für die Resistenzzüchtung gegen *S. sclerotiorum* herauskristallisierten.

Ein Screening weiterer Vertreter dieser Arten gegenüber verschiedenen Pathotypen von *S. sclerotiorum* und die Herstellung von Introgressionslinien wäre ein nächster Schritt, um die Stabilität der Abwehrmechanismen innerhalb der Art sowie die Verwendbarkeit für die Züchtung festzustellen.

Des Weiteren würde der Züchtung eine detailliertere Aufklärung der in dieser Arbeit beobachteten Mechanismen der Penetrations- und Ausbreitungsabwehr neue Möglichkeiten zur Entwicklung von Resistenzmarkern für eine gezieltere Selektion geben.

Die Ergebnisse der Interaktionsstudie von Raps mit dem Weißstängeligkeitserreger belegen die Rolle der Zellwand sowie die einer induzierten Zellwandmodifikation bei der Abwehr des Pathogens. Vor allem eine rasche Reaktion auf den Befall und das Verteilungsmuster von Syringyl (S)- und Guaiacyl (G)-Lignin scheinen die Befallsausprägung maßgeblich zu beeinflussen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen neue Einblicke in die komplexe Beziehung zwischen Wirt und Pathogen und können in Assoziationsstudien zur Identifizierung neuer Selektionsmarker für die Resistenz gegen *S. sclerotiorum* angewandt werden.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des internationalen PLANT-KBBE III - Verbundvorhabens MONARCH (Resistenz von *Brassica napus* gegen Weißstängeligkeit – eine Herausforderung, Teilprojekt B) durchgeführt. Die Projektaufgaben beinhalteten die Identifizierung neuer Resistenzquellen in dem Genus *Brassica* und die Charakterisierung resistenzbedingter Abwehrreaktionen.

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bewertung von Resistenzreaktionen verschiedener *Brassica*-Arten gegenüber *S. sclerotiorum*. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden bereits bekannte Inokulations-, Screening- und Resistenzbewertungsmethoden evaluiert und optimiert. Im Gewächshauscreening wurde neben der Läsionsausbreitung auch der Penetrationserfolg von *S. sclerotiorum* bewertet.

Da über die bisherigen Resistenzbewertungsstandards - Läsionslänge nach unverletzter Inokulation und Inokulationseffizienz - nur eine unzureichende Differenzierung der getesteten *Brassica*-Arten bezüglich ihrer Resistenz gegen *S. sclerotiorum* im Versuchsjahr 2012 möglich war, wurde eine neue Inokulationsmethode entwickelt und im Gewächshauscreening von 2013 angewandt. Hierfür wurden Stängel der zu untersuchenden Pflanzen vor der Inokulation mit Myzel von *S. sclerotiorum* verletzt und anschließend die sich entwickelnden Stängelläsionen mit denen unverletzter Inokulationen verglichen. Durch die zugeführte Verletzung wurde eine hundertprozentige Infektionsrate erreicht. Außerdem ließ der Vergleich mit der unverletzten Inokulationsvariante Rückschlüsse auf die jeweiligen Abwehrprozesse, Penetrations- und Ausbreitungsabwehr, zu.

Durch die Etablierung dieses neuen Screeningverfahrens konnte eine verbesserte Differenzierung verschiedener *Brassica*-Arten bezüglich ihrer Resistenz gegen *S. sclerotiorum* vorgenommen werden. Die Befallsabwehr der hier eingesetzten Rapsorten sowie einiger domestizierter *Brassica*-Akzessionen beruhte im Wesentlichen auf der Verhinderung der erfolgreichen Penetration des Pathogens aufgrund präformierter oder induzierter Mechanismen. Hingegen konnte bei den meisten wilden *Brassica*-Akzessionen die Ausbreitung von *S. sclerotiorum* in der Pflanze nach erfolgreicher Infektion reduziert werden.

Von den untersuchten *Brassica*-Wildarten kristallisierten sich *B. drepanensis* und *B. macrocarpa* aus dem Gewächshauscreening von 2013 heraus. Sie zeigten sowohl mit als auch ohne Verletzung einen geringen Befall durch das Pathogen, welcher auf verstärkte, präformierte und induzierte Penetrations- und Ausbreitungsabwehrreaktionen

zurückzuführen ist. Aufgrund der erfolgreichen Pathogenabwehr stellen die beiden *Brassica*-Wildarten geeignete Kandidaten für weitere Untersuchungen dar. Hierbei sollte der Fokus der Untersuchungen auf der induzierten Ausbreitungsresistenz liegen, welche für die Resistenzzüchtung gegen *S. sclerotiorum* am interessantesten scheint.

Um Mechanismen zur Ausbreitungsabwehr zu bestätigen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Screening der verwendeten *Brassica*-Arten über einen Blattsegmenttest, welcher die Sensitivität der Genotypen gegenüber Oxalsäure bewertete. Trotz einer Optimierung des Testes konnten hierbei allerdings keine reproduzierbaren Ergebnisse erbracht und auch keine Übereinstimmung mit dem Gewächshauscreening erzielt werden. Deshalb wird dieser Test mit der hier angewandten Methodik als ungeeignet eingestuft.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der sekundären Zellwand sowie deren Veränderungen bei der Interaktion zwischen Raps und *S. sclerotiorum* zu beurteilen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde zuerst ein Genotypenset von *B. napus* identifiziert, welches Unterschiede in der Resistenzausprägung gegen den Weißstängeligkeitserreger aufwies. Anschließend sollten genetische, biochemische und histologische Untersuchungen Aufschluss über Veränderungen in der Zusammensetzung der sekundären Zellwand dieser Rapstypen geben.

Das verwendete *B. napus* Set bestand aus der chinesischen Rapslinie Zhongyou 821, welche sich als äußerst resistent erwies, und dem Sommerraps Loras als anfälliger Sorte. In den Gehalten von Cellulose und Pektin zeigten sich keine gravierenden Unterschiede zwischen den beiden Genotypen und Behandlungen. Allerdings schien Zhongyou 821 mehr Hemicellulose in die Zellwand eingelagert zu haben. Nach Infektion zeigten beide Genotypen eine signifikante Abnahme in ihren Zellwandzuckergehalten. Diese beruhte auf dem Befall durch *S. sclerotiorum*, welches die freigesetzten Zuckereinheiten direkt als Nährstoffquelle nutzen kann. Eine Verwendung der freien Zuckermoleküle als Kohlenstoffquelle für die Synthese von Phenylpropanoiden zur Abwehr des Befalls wäre ebenfalls möglich. Diese Annahme wurde durch die durchgeführten genetischen und histologischen Untersuchungen bestätigt. Die Analysen ergaben hierbei, dass die Abwehr von *S. sclerotiorum* mit einer erhöhten und schnelleren Synthese von Phenylpropanoiden und Lignin einhergeht. In der resistenten Rapslinie kam es bereits zum frühen Infektionszeitpunkt zu einer raschen Hochregulation der Expression von Schlüsselgenen des Phenylpropanoidsyntheseweges, während bei der anfälligen Sorte die Expression erst zum späteren Befallszeitpunkt erhöht wurde. Zusätzlich konnte in Zhongyou 821 eine erhöhte Expression des Gens für die Ferulat-5-Hydroxylase (*F5H*) zu Beginn des Befalls

beobachtet werden, was mit einer verstärkten Einlagerung von Syringyl (S)-Lignin einherging. In der anfälligen Sorte Loras konnte weder auf genetischer noch auf histologischer Ebene eine Verstärkung der Zellwände durch S-Lignin nach Infektion mit *S. sclerotiorum* beobachtet werden.

Beide Genotypen zeigten eine erhöhte Expression des Gens für die Cinnamoyl-CoA Reduktase 2 (*CCR2*), ein Enzym, das für die Synthese der Vorstufen von Guaiacyl (G)-Lignin verantwortlich ist. Zusätzlich zeigten die histologischen Untersuchungen eine erhöhte G-Lignineinlagerung in die Zellwände der Xylemgefäße der beiden Genotypen nach Infektion mit *S. sclerotiorum*. Ferner konnten in den Zellwänden und Interzellularen des Parenchymgewebes von Zhongyou 821 vermehrt G-Lignifizierungen beobachtet werden. Die Verdickungen der Zellwände über Lignin führen möglicherweise zu einer Reduktion der invasiven Ausbreitung des Pathogens sowie zur Hinderung der systemischen Diffusion von Oxalsäure.

Zusammenfassend kann aus den durchgeführten Untersuchungen gefolgert werden, dass bei der Interaktion zwischen *B. napus* und *S. sclerotiorum* die Abwehr über Zellwandmodifikationen eine wichtige Rolle spielt. Diese Erkenntnisse ermöglichen neue Einblicke in die Wirt-Pathogen-Beziehung und bieten neue züchterische Ansätze für die spezifische Resistenzselektion.

7 Summary

The present study was part of the international PLANT-KBBE III – joint research project MONARCH (White Mold *Brassica napus* Resistance Challenge, subproject B). The project assignment included the identification of new resistance sources in the genus *Brassica* and the characterization of resistance responses.

The evaluation of resistance reactions of diverse *Brassica* species against infection with *S. sclerotiorum* was a main objective of the present work. For this purpose previous established methods for inoculation, screening and disease assessment were applied and optimized. Beside the lesion expansion also the penetration success was rated in greenhouse screenings.

Due to the insufficient resistance differentiation of *Brassica* species in the screening of 2012 using two disease assessment methods - lesion length after uninjured infection and inoculation efficiency - a new inoculation technique was developed and used for the greenhouse screening in 2013. Therefore stems of studied plants were injured before inoculation with mycelia of *S. sclerotiorum* and the measured lesion lengths were compared to the lesion expansion of the uninjured inoculations. The conducted injury led to one hundred percent infection and from the contrast of injured and uninjured lesion expansion conclusions were drawn regarding the defence mechanisms against pathogen penetration and pathogen spread in the plants.

Based on the new screening procedure an improved differentiation between the resistances of the tested *Brassica* species was achieved. The disease defense of the used oilseed rape cultivars and some domesticated *Brassica* accessions was based on preformed or induced defense mechanisms preventing the invasion of the pathogen into the stem tissue. In contrast most wild *Brassica* species can restrict the pathogen from spreading inside the infected plant tissue as a result of triggering postinfectious induced defense mechanism.

Two candidates for further investigations are the wild type *Brassica* species *B. drepanensis* and *B. macrocarpa* which showed increased defense responses after infection with *S. sclerotiorum* with and without injury. These two wild types have elevated defense mechanisms and seem to be adequate sources for the resistance breeding.

To confirm the existence of enhanced defense mechanisms against pathogen expansion a detached leaf segment test was carried out to screen the different *Brassica* species for their sensitivity to the presence of oxalic acid. Despite optimization neither reliable and

reproducible results nor any analogy with the results of the greenhouse screening could be generated. Therefore the detached leaf segment test was declared inappropriate in the present study.

The second major objective of this work was to evaluate the role of the secondary cell wall in the interaction between oilseed rape and *S. sclerotiorum*. For this purpose a genotype set of two *B. napus* types contrasting in their resistance reaction to the pathogen was identified and subsequently investigated biochemically, genetically and histologically.

The *B. napus* set consisted of the Chinese rapeseed line Zhongyou 821, which showed increased resistance and the spring oilseed rape cultivar Loras as susceptible standard. The biochemical analysis of the concentration of cellulose and pectin revealed no significant differences between the two genotypes or the Mock/*Sclerotinia* inoculated treatment. However, the hemicellulose content seemed to be more elevated in the resistant genotype Zhongyou 821. After infection with the pathogen both genotypes showed a reduction of hemicellulose. This could be due to the fact that *S. sclerotiorum* uses the sugar monomers as a carbon source for nutrition. Another reason may be the metabolic conversion of sugar monomers for the synthesis of phenylpropanoids.

The genetic and histological analysis revealed that defense response to infection with *S. sclerotiorum* results in an elevated and rapid synthesis of phenylpropanoids and lignin. The interaction of the resistant genotype showed a quick activation of gene expression during early stages of infection while the gene expression of the susceptible interaction type was up-regulated at later infection stages. Additionally elevated gene expression of the ferulate-5-hydroxylase (*F5H*) was detected in Zhongyou 821 at the beginning of infection as well as increased incorporation of syringyl (S)-lignin in the intervascular fibers. In the susceptible genotype Loras no enhanced gene expression after infection with *S. sclerotiorum* was detected. Histological staining neither revealed stronger S-lignin synthesis or accumulation in Loras after infection with *S. sclerotiorum*.

Both genotypes showed an elevated gene expression of the cinnamoyl-CoA reductase (*CCR2*), an enzyme catalyzing the synthesis of guaiacyl (G)-lignin precursors. In addition histological examinations indicated stronger G-lignin incorporation in the cell wall of xylem vessels of both interaction types. In the resistant rapeseed line Zhongyou 821 increased lignifications of G-lignin could be detected in cell wall and intercellular space of the parenchymatous tissue.

The thickening of the cell wall via S- and G-lignin possibly prevents or limits the pathogen invasion into the plant and restricts the systemic diffusion of oxalic acid.

This study showed the importance of cell wall modifications during interaction between *B. napus* and *S. sclerotiorum*. These results offer new insights into the host-pathogen-interaction and provide new breeding opportunities for resistance selection against *S. sclerotiorum*.

8 Literatur

Adams P B & W A Ayers (1979). Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69, 896-899.

Ahlers D (1986). Untersuchungen über den Erreger der Weißstengeligkeit *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary an Winterraps – Sortenresistenz – Epidemiologie – Krankheitsverlauf – Prognose. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 136-138 pp.

Ahlers D & H Hindorf (1987). Epidemiologische Untersuchungen über den Schaderreger *Sclerotinia sclerotiorum* an Winterraps im Hinblick auf eine Prognose. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst*, 39, 113-119.

Anonymus (2009). Beschreibende Sortenliste 2009 - Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen (großkörnig), Hackfrüchte (außer Kartoffeln). Landbuchverlag, Bundessortenamt Hannover, ISSN 0948-4167.

Anonymus (2012a). Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen (Pflanzenschutzgesetz – PflSchG) - Abschnitt 1 Allgemeine Bestimmungen § 2 Begriffsbestimmung, Punkt 2. URL: https://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/pflschg_2012/gesamt.pdf, abgerufen am 22.01.2016.

Anonymus (2012b). Beschreibende Sortenliste 2012 - Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte. Landbuchverlag, Bundessortenamt Hannover, ISSN 2190-6130.

Anonymus (2013a). Beschreibende Sortenliste 2013 - Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte. Landbuchverlag, Bundessortenamt Hannover, ISSN 2190-6130.

Anonymus (2013b). Primer erhalten von. Dr. Avinash Kamble. Department of Botany, Savitribai Phule Pune University.

Anonymus (2013c). National Center for Biotechnology Information. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, abgerufen am 14.06.2013.

Anonymus (2013d). [NCBI](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)/ **Primer-BLAST**: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, abgerufen am 16.06.2013.

Anonymus (2013e). NCBI / BLAST / tblastn. URL: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, abgerufen am 27.07.2013.

Anonymus (2016). Wild Crucifer Species as Sources of Agronomic Traits. URL: http://www.Brassica.info/info/publications/guidewild/Guide_ed3_PART%20IV_16July2009.pdf, abgerufen am 08.02.2016

Bardin S D & H C Huang (2001). Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 23, 88-98.

Bhinu V, R Li, J Huang, S Kaminskyj, A Sharpe, A Hannoufa (2008). Perturbation of lignin biosynthesis pathway in *Brassica napus* (canola) plants using RNAi. Canadian Journal of Plant Science, 89, 441-453.

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

Billon-Grand G, C Rascle, M Droux, J A Rollins, N Poussereau (2012). pH modulation differs during sunflower cotyledon colonization by the two closely related necrotrophic fungi *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Molecular Plant Pathology, 13 (6), 568-578.

Bishop D L, N J Chyatterton, P A Harrison, R D Hatfield (2002). Changes in carbohydrate partitioning and cell wall remodeling with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. Physiological and Molecular Plant Pathology, 61, 53-63.

Blumenkrantz N & G Asboe-Hansen (1973). New method for quantitative determination of uronic acid. Analytical Biochemistry, 54, 484-489.

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

Bolton D M, P H J B Thomma, D B Nelson (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology, 7, 1-16.

Bradley C A, R A Henson, P M Porter, D G LeGare, L E del Rio, S D Khot (2006). Response of canola cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum* in controlled and field environments. *Plant Disease*, 90, 215-219.

Brandfass C & P Karlovsky (2008). Upscaled CTAB-based DNA extraction and real-time PCR assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in plant material with reduced sampling error. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 2306-2321.

Brauer D (2011). Geschichte des Rapsanbaus. In: Christen, O & W Friedt: *Winterraps - Das Handbuch für Profis*, DLG-Verlag, 2. Auflage, 12-14 pp., 2011 (ISBN 987-3-7690-0764-0).

Broekaert W F, S L Delaure, M F C De Bolle, B P A Cammue (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 393-416.

Caesar A J & R C Pearson (1983). Environmental-factors affecting survival of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 73, 1024-1030.

Calla B, T Vuong, O Radwan, G L Hartman, S J Clough (2009). Gene expression profiling soybean stem tissue early responses to *Sclerotinia sclerotiorum* and in silico mapping in relation to resistance markers. *The Plant Genome*, 2 (2), 149-166.

Caño-Delgado A, S Penfield, C Smith, M Catley, M Bevan (2003). Reduced cellulose synthesis invokes lignifications and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 34, 351–362.

Cantu D, A R Vicente, J M Labavitch, A B Bennett, A L Powell (2008). Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in Plant Science*, 13, 610-617.

Cessna S G, V E Sears, M B Dieckmann, P S Low (2000). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell*, 12, 2191-2199.

Chaocai S (1995). Comparison of methods for evaluating rapeseed cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus* L. *Acta Agriculturae Shanghai*, 11, 17-22.

Chen H, H Wang, Z Li (2007). Production and genetic analysis of partial hybrids in intertribal crosses between *Brassica* species (*B. rapa*, *B. napus*) and *Capsella bursa-pastoris*. *Plant Cell Reports*, 26, 1791-1800.

Christen O (2011). Nutzungssysteme und Fruchtfolgen – Der Vorfruchtwert von Raps. In: Christen, O & W Friedt: Winterraps - Das Handbuch für Profis, DLG-Verlag, 2. Auflage, 64-69 pp., 2011 (ISBN 987-3-7690-0764-0).

Clarkson J P, J Staveley, K Phelps, C S Young, J M Whipps (2003). Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycological Research, 107 (2), 213-222.

Clarkson J P, L Fawcett, S G Anthony, C Young (2014). A model for *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce, based on the effects of temperature, relative humidity and ascospore density. PLoS ONE, 9(4), e94049, doi:10.1371/journal.pone.0094049.

Coley-Smith JR & RC Cooke (1971). Survival and germination of fungal sclerotia. Annual Review of Phytopathology, 9, 65-92

Costa M A, R E Collins, A M Anterola, F C Cochrane, L B Davin, N G Lewis (2003). An *in silico* assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. Phytochemistry, 64, 1097-1112.

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

Dalili A (2013). Greenhouse and field evaluation of rapeseed cultivars and lines for resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Journal of Oilseed Brassica, 4 (2), 61-65.

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

Delgado-Cerezo M, C Sánchez-Rodríguez, V Escudero, E Miedes, P V Fernández, L Jordá, C Hernández-Blanco, A Sánchez-Vallet, P Bednarek, P Schulze-Lefert, S Somerville, J M Estevez, S Persson, A Molina (2012). *Arabidopsis* heterotrimeric G-protein regulates cell wall defense and resistance to necrotrophic fungi. Molecular Plant, 5, 98-114.

del Río L E, C A Bradley, R A Henson, G J Endres, B K Hanson, K McKay, M Halvorson, P M Porter, D G Le Gare, H A Lamey (2007). Impact of *Sclerotinia* stem rot on yield on canola. Plant Disease, 91, 191-194.

de Wit P J G M (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Science*, 64, 2726-2732.

Diepenbrock W (2011). Biologische Grundlagen und Ertragsbildung – Die Kulturpflanze und ihr Ertragspotential. In: Christen, O & W Friedt: Das Handbuch für Profis, DLG-Verlag, 2. Auflage, 53 p., 2011 (ISBN 987-3-7690-0764-0).

Dillard H R, J W Ludwig, J E Hunter (1995). Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. *Plant Disease*, 79 (4), 411-415

Ding Y, J Mei, Q Li, Y Liu, H Wan, L Wang, H C Becker, W Qian (2013). Improvement of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in *Brassica napus* by using *B. oleracea*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 1615-1619.

Dixon R A & C J Lamb (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 339-367.

Dölger D, N Lassen, D Riewe (2011). Optimierung des Anbauverfahrens – Pflanzenschutz. In: Christen, O & W Friedt: Winterraps - Das Handbuch für Profis, DLG-Verlag, 2. Auflage, 223-226 pp., 2011 (ISBN 987-3-7690-0764-0).

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

Dubois M, K A Gilles, J K Hamilton, P A Rebers, F Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytic Chemistry*, 28, 350-356.

Dunker S & A v Tiedemann (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.

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, 151-153 pp.

Ellis P R, D A C Pink, N E Barber, A Mead (1999). Identification of high levels of resistance to cabbage root fly, *Delia radicum*, in wild *Brassica* species. *Euphytica*, 110, 207-214.

Endler A & S Persson (2011). Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 4, 199-211.

Eynck C, G Séguin-Swartz, W E Clarke, I A P Parkin (2012). Monolignol biosynthesis is associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Camelina sativa*. *Molecular Plant Pathology*, 18, 887-899.

Fang J (1993). Evaluation of screening methodologies for selection of resistance in oilseed rape to *Sclerotinia* stem rot. Masterarbeit, University of Manitoba, Winnipeg, Canada.

FAOSTAT (2016). URL:

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>, abgerufen am 16.01.2016

Favaron F1, L Sella, R D´Ovidio (2004). Relationship among endo-polygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 17, 1402-1409.

Fernondo W G D, S Nakkeeran, Z Yilan (2004). Eco-Friendly methods in combining *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. In: *Recent research in developmental and environmental biology*, 329-347 pp., 2004 (ISBN 81-7736-217-8).

Fernondo W G D, S Nakkeeran, Z Yilan, S Savchuk (2007). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26, 100-107.

Ferrari S, L Sella, M Janni, F Favaron, R D´Ovidio (2012). Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in *Arabidopsis* and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Biology*, 14, 31-38.

Fraissinet-Tachet L & M Fèvre (1996). Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Microbiology*, 33, 49-53.

Fraser C M & C Chapple (2011). The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. *American Society of Plant Biologists*, e0152, doi: 10.1199/tab.0152.

Frauen M (2011). Zuchtziel. In: Christen, O & W Friedt: *Winterraps - Das Handbuch für Profis*, DLG-Verlag, 2. Auflage, 28 p., 2011 (ISBN 987-3-7690-0764-0).

Garbe V (1999): Krankheiten im Winterraps in Europa. Wo steht der integrierte Pflanzenschutz ? Raps, 17, 68-71.

Garg H, K Sivasithamparam, S S Banga, M J Barbetti (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.

Garg H, C Atri, P S Sandhu, B Kaur, M Renton, S K Banga, H Singh, C Singh, M J Barbetti, S S Banga (2010a). High level of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in introgression lines derived from hybridization between wild crucifers and the crop *Brassica* species *B. napus* and *B. juncea*. Field Crops Research, 117, 51-8.

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

Garg H, H Li, K Sivasithamparam, M J Barbetti (2013). Differentially expressed proteins and associated histological and disease progression changes in cotyledon tissue of a resistant and susceptible genotype of *Brassica napus* infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. PLoS ONE, 8 (6), 1-13, e65205. doi:10.1371/journal.pone.0065205

Ge X T, Y P Li, Z J Wan, M P You, P M Finnegan, S S Banga, P S Sandhu, H Garg, P A Salisbury, M J Barbetti (2012). Delineation of *Sclerotinia sclerotiorum* pathotypes using differential resistance responses on *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes enables identification of resistance to prevailing pathotypes. Field Crops Research, 127, 248-58.

Gerlach D (1984). Botanische Mikrotechnik - Eine Einführung. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. Auflage, 243-244 pp., 1984.

Ghosh R, B Choi, B Cho, H Lim, S Park, H Bae, S Natarajan, H Bae (2014). Characterization of developmental- and stress-mediated expression of cinnamoyl-CoA reductase in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). The Scientific World Journal, ID 601845, doi: org/10.1155/2014/601845.

Giberti S, C M Berteau, R Narayana, M E Maffei, G Forlani (2012). Two phenylalanine ammonia lyase isoforms are involved in the elicitor-induced response of rice to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. Journal of Plant Physiology, 169, 249–254.

Glazebrook J (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.

Godoy G, J R Steadman, M B Dickman, R Dam (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.

Gossen B D, S R Rimmer, J D Holley (2001). First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*, *Plant Disease*, 85, 1206.

Goujon T, R Sibout, B Pollet, B Maba, L Nussaume, N Bechtold, F Lu, J Ralph, I Mila, Y Barrière, C Lapierre, L Jouanin (2003). A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of *O*-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Molecular Biology*, 51, 973-989.

Green S, R E Gaunt, I C Harvey, G W Bourdot (1998). Histopathology of *Ranunculus acris* infected by a mycoherbicide, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Australasian Plant Pathology*, 27, 73-79.

Guan C, F Li, X Li, S Chen, Z Liu, G Wang, W Sun (2004). Resistance of rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) to stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Scientia Agricultura Sinica*, 37, 1138-1143.

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

Guo X & H U Stotz (2007). Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 20, 1384-1395.

Hahn V (2002). Genetic variation for resistance to *Sclerotinia* head rot in sunflower inbred lines. *Field Crop Research*, 77, 153-159.

Hallmann J, A Quadt-Hallmann, A v Tiedemann (2007). *Phytomedizin – Grundwissen Bachelor*. Eugen-Ulmer Verlag, 1. Auflage, 179-202 pp., 2007 (ISBN 978-3-8252-2863-7).

Harthill W F T & A P Underhill (1976). Puffing in *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *New Zealand Journal of Botany*, 14, 335-358.

- He Y H, R F Yang, S Q Luo (1987).** Development and study of new rapeseed variety Zhongyou 821 with high yield and disease resistance (tolerance). *Oil Crops of China*, 2, 11-15.
- Hedke K & A v Tiedemann (1998).** Environmental influences on the decomposition of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. *Mitteilung aus der Biologischen Bundesanstalt*, 357, 352.
- Hoffmann G M & H Schmutterer (1989).** Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Eugen-Ulmer Verlag, Auflage, 330 pp., 1989 (ISBN 978-3800130580).
- Huang J, V S Bhinu, X Li, Z D Bashi, R Zhou, A Hannoufa (2009).** Pleiotropic changes in *Arabidopsis f5h* and *sct* mutants revealed by large-scale gene expression and metabolite analysis. *Planta*, 230, 1057-1069.
- Huang L, H Buchenauer, Q Han, X Zhang, Z Kang (2008).** Ultrastructural and cytochemical studies on the infection process of *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115, 9-16.
- Huang H C, C Chang, G C Kozub (1998).** Effect of temperature during sclerotial formation, sclerotial dryness, and relative humidity on myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany*, 76, 494-499.
- Huang J, M Gu, Z Lai, B Fan, K Shi, Y H Zhou, J Q Yu, Z Chen (2010).** Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153, 1526-1538.
- Huang HC & G C Kozub (1991).** Temperature requirements for the carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 32, 279-286.
- Ingold C T (1971).** *Fungal Spores: their liberation and dispersal*. Oxford University Press, London.
- Jamaux I, B Gelie, C Lamarque (1995).** Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. *Plant Pathology*, 44, 22-30.

Jesske T (2011). *Brassica*-Wildarten als neue genetische Ressource für die Rapszüchtung. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen. 102-105 pp.

Jesske T, B Olberg, A Schierholt, H C Becker (2013). Resynthesized lines from domesticated and wild *Brassica* taxa and their hybrids with *B. napus* L.: genetic diversity and hybrid yield. *Theoretical and Applied Genetics*, 126 (4), 1053-1065.

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, 7-8 pp.

Kim H S, G L Hartman, J B Manandhar, G L Graef, J R Steadman, B W Diers (2000). Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. *Crop Science*, 40, 665-669.

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

Koch S (2006). Entwicklung eines schlagspezifischen und schadensbezogenen Prognosemodells zur Bekämpfung von *Sclerotinia sclerotiorum* an Winterraps. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, 148-151 pp.

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

Kohn L M (1979). Delimitation of the economically important plant pathogenic species. *Phytopathology*, 69 (8), 881-886.

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

König S, K Feussner, A Kaefer, M Landesfeind, C Thurow, P Karlovsky, C Gatz, A Polle, I Feussner (2014). Soluble phenylpropanoids are involved in the defense response of *Arabidopsis* against *Verticillium longisporum*. *New Phytologist*, 202, 823-837.

Kosasih B D & H J Willetts (1975). Ontogenetic and histochemical studies of apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Annals of Botany*, 39, 185-191.

Krüger W (1975). Die Beeinflussung der Apothezien- und Ascosporenenentwicklung des Rapskrebserregers *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary durch Umweltfaktoren. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 82, 101-108.

Krüger W (1976). Untersuchungen zur Beeinflussung der Apothezien-Entwicklung von *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst, 28, 129-135.

Krüger W (1977) Einfluss abiotischer Faktoren auf den Erreger des Rapskrebsees und dessen Bekämpfung. Kali Briefe, 13, 1-12.

Kunkel B N & D M Brooks (2002). Cross talk between signaling pathway in pathogen defense. Current Opinion in Plant Biology, 5, 325-331.

Lauvergeat V, C Lacomme, E Lacombe, E Lasserre, D Roby, J Grima- Pettenati (2001). Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. Phytochemistry, 57, 1187-1195.

Lefol C, G Seguin-Swartz, R A A Morrall (1997). Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in a weed related to canola. Canadian Journal of Plant Pathology, 19, 113 (Abstract).

Li Y, J Chen, R Bennett, G Kiddle, R Wallsgrove, Y Huang, Y He, (1999a). 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, URL: <http://www.regional.org.au/au/gcisc/4/230.htm>, abgerufen am 19.12.2015.

Li Y, G Kiddle, R Bennett, K Doughty, R Wallsgrove (1999c). Variation in the glucosinolate content of vegetative tissue of Chinese lines of *Brassica napus* L. Annals of Applied Biology, 134, 131-136.

Li Y, G Kiddle, R N Bennett, R M Wallsgrove (1999b). 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, 45-58.

Li C X, H Li, A B Siddique, K Sivasithamparam, P Salisbury, S S Banga, S Banga, C Chattopadhyay, A Kumar, R Singh, D Singh, A Agnihotri, S Y Liu, Y C Li, J Tu, T D Fu, Y F Wang, M J Barbetti (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, 1198-1203.

Li C X, H Li, K Sivasithamparam, T D Fu, Y C Li, S Y Liu, M J Barbetti (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, 1131-1135.

Li C X, S Y Liu, K Sivasithamparam, M J Barbetti (2008). New sources of resistance to *Sclerotinia* stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Chinese and Australian *Brassica napus* and *B. juncea* germplasm screened under Western Australian conditions. *Australasian Plant Pathology*, 38, 149-152.

Li Y, D Mei, Y Huang, Y Xu, W Roger, K Guy, B Richard (2001). Biochemical changes of Zhongyou 821 after inoculation with mycelia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Chinese Journal of Oil Crop Science*, 23, 63-65.

Liu Y & V H Paul (2007). Studies on the germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* – Untersuchungen zur Keimung der Sklerotien von *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Plant Disease and Protection*, 144 (1), 14-19.

Llorente F, C Alonso-Blanco, C Sanchez-Rodriguez, L Jorda, A Molina (2005). ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis arer* required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Journal*, 43, 165-180.

Lumsden R D (1979). Histology and physiology of plant disease caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69, 890-896.

Lumsden R D & W P Wergin (1980). Scanning electron microscopy of infection of bean by species of *Sclerotinia*. *Mycologia*, 72, 1200-1209.

Luth P (2001). The biological fungicide Contans WG – a preparation on the basis of the fungus *Coniothyrium minitans*. Proc XI International *Sclerotinia* Workshop, Central Science Laboratory, York, UK, July 8-12, p. 127.

- Ma H X, X J Feng, Y Chen, C J Chen, M G Zhou (2009).** Occurrence and characterization of dimethachlom insensitivity in *Sclerotinia sclerotiorum* in Jiangsu Province China. *Plant Disease*, 93, 36-42.
- McCartney H A & M E Lacey (1999).** Timing and infection of sunflower by *Sclerotinia sclerotiorum* and disease development. *Aspects of Applied Biology*, 56, 151-156.
- McLean D M (1958).** Role of dead flower parts in infection of certain crucifers by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Plant Disease Report*, 42, 663-666.
- McQuilcken M P, S J Mitchell, S A Archer (1994)** Origin of early attacks of *Sclerotinia* stem rot on winter oilseed rape (*Brassica napus* sup. Sp. *oleifera* var. *biensis*) in the UK. *Journal of Plant Pathology*, 140, 179-186.
- Mei J, Y Ding, K Lu, D Wei, Y Liu, J O Disi, J Li, L Liu, S Liu, J McKay, W Qian (2013).** Identification of genomic regions involved in resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* from wild *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 126, 549-556.
- Mei J, L Qian, J Disi, X Yang, Q Li, J Li, M Frauen, D Cai, W Qian (2011).** Identification of resistant sources against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica* species with emphasis on *B. oleracea*. *Euphytica*, 177, 393-399.
- Mei J, D Wei, J Disi, Y Ding, Y Liu, W Qian (2012).** Screening resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica* crops with use of detached stem assay under controlled environment. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 599–604
- Menden B, M Kohlhoff, B M Moerschbacher (2007).** Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry*, 68, 513-520.
- Metha N & N T Hieu (2014).** Evaluation of bacterial strains and species against *Sclerotinia sclerotiorum* responsible for white stem rot of mustard. *PAU J Res*, 51, 93-95.
- Meyer K, J C Cusumano, C Somerville, C C S Chapple (1996).** Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 6869-6874.
- Miedes E, E P Lorences (2004).** Apple (*Malus domestica*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits cell wall hemicelluloses and xyloglucan degradation during *Penicillium expansum* infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7957-7963.

- Mila A L & X B Yang (2008).** Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotia germination and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 92, 78-82.
- Mithen R, B Lewis, R Heaney, G Fenwick (1987).** Resistance of leaves of *Brassica* species to *Leptosphaeria maculans*. *Transactions of British Mycology Society*, 88, 525-531.
- Mithen R & R Margath (1992).** Glucosinolates and resistance to *Leptosphaeria maculans* in wild and cultivated *Brassica* species. *Plant Breeding*, 108, 60-68.
- Mohr R & H Funk (2011).** Ökonomie und Markt – Die Rapsabrechnung: Kauf- und Lieferbedingungen für Raps. In: Christen, O & W Friedt: *Winterraps - Das Handbuch für Profis*, DLG-Verlag, 2. Auflage, 255 p., 2011 (ISBN 987-3-7690-0764-0).
- Morrall R A A, L J Duczek, J W Sheard (1972).** Variation and correlation within and between morphology, pathogenicity, and pectolytic enzyme activity in *Sclerotinia* from Saskatchewan. *Canadian Journal of Botany*, 50, 767-786.
- Navabi Z K, S E Strelkov, A G Good, M R Thiagarajah, M H, Rahman, (2010).** *Brassica* B-genome resistance to stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) in a doubledhaploid population of *Brassica napus* × *Brassica carinata*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32, 237-246.
- Niu F, B Wang, F Wu, J Yan, L Li, C Wang, Y Wang, B Yang, Y Jiang (2014).** Canola (*Brassica napus* L.) *NAC103* transcription factor gene is a novel player inducing reactive oxygen species accumulation and cell death in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 454, 30-35.
- Nováková M, V Šašek, P I Dobrev, O Valentová, L Burketová (2014).** Plant hormones in defense response of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum* – Reassessing the role of salicylic acid in the interaction with a necrotroph. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 308-317.
- Noyes R D & J G Hancock (1981).** Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Physiological Plant Pathology*, 18 (2), 123-132.
- Paul V H (2003).** Raps – Krankheiten, Schädlinge, Schadpflanzen. Verlag Th. Mann, 1. Auflage, 41-46pp., 2003 (ISBN 3-7862-0148-X)

Peluffo L, V Lia, C Troglia, C Maringolo, P Norma, A Escande, H E Hopp, A Lytovchenko, A R Fernie, R Heinz, F Carrari (2010). Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Phytochemistry*, 71, 70-80.

Perchepied L, C Balagué, C Riou, C Claudel-Renard, N Rivière, B Grezes-Besset, D Roby (2010). Nitric oxide participates in the complex interplay of defense related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 23, 846-860.

Pfaffl M W (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9), 2002-2007.

Phillips A J L (1994). Influence of fluctuating temperatures and interrupted periods of plant surface wetness on infection of bean leaves by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Annals of Applied Biology*, 124, 413-427.

Phillips D V, P L Raymer, D L Auld (1990). Apparent resistance to *Sclerotinia* stem rot in oilseed *Brassica*. (Abstr.) *Phytopathology*, 80, 1039.

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

Pottinger B M, H J Ridgway, G W Bourdôt, A Stewart (2008). Influence of storage method on the viability, mycelial growth and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. *Australasian Plant Pathology*, 37, 609-614.

Prell H P & P Day (2001). Plant fungal pathogen interaction: A classical and molecular view. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, 1. Auflg. Hartcover 2001, Taschenbuch 2010 (ISBN 978-3642086014)

Purdy L H (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: History, disease and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69, 875-880.

Rahmanpour S, D Backhouse, H M Nonhebel (2011). Reaction of *Brassica* species to *Sclerotinia sclerotiorum* applying inoculation techniques under controlled conditions. *Crop Breeding Journal*, 1 (2), 143-149.

Ramsey A D & P R Ellis (1994). Resistance in wild *Brassica* to the cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella*. In: proceedings of the ninth crucifer genetics workshop. Acta Horticulturae, 407.

Rashid K Y (2001). *Sclerotinia* stem infection in flax in western Canada: In: Proceedings of *Sclerotinia* 2001. Central Science Laboratory, York, England, 8-12 July 2001, 106-107.

Reignault P, O Valette-Collet, M Boccara (2008). The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. European Journal of Plant Pathology, 120, 1-11.

Rietz S, F E M Bernsdorff, D Cai (2012). Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Experimental Botany, 63 (15), 5507-5519.

Ride J P (1978). The role of cell wall alterations in resistance to fungi. Annals of Applied Biology, 89, 302–306.

Riou C, G Freyssinet, M Fèvre (1991). Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Applied and Environmental Microbiology, 57, 1478-1484.

Riou C, G Freyssinet, M Fèvre (1992). Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Applied and Environmental Microbiology, 58, 578-583.

Rodríguez M A, A M Godeas (2001). Comparative study on fungal antagonist *Sclerotinia sclerotiorum*. Proc XI International *Sclerotinia* Workshop, Central Science Laboratory, York, UK, July 8-12, 125-126 pp.

Rodríguez M A, N Venedikian, M E Bazzalo, A Godeas (2004). Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* attack on flower parts of *Helianthus annuus* heads in tolerant and susceptible varieties. Mycopathologia, 157, 291-302.

Romero D, M E Rivera, F M Cazorla, J C Codina, D Fernández-Ortuño, J A Torés, A Pérez-García, A de Vicente (2008). Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell wall reinforcement in compatible and incompatible melon-powdery mildew (*Podosphaera fusca*) interactions. Journal of Plant Physiology, 165, 1895-1905.

Rygulla W, W Friedt, F Seyis, W Luehs, C Eynck, A v Tiedemann, R J Snowdon (2007). Combination of resistance to *Verticillium longisporum* from zero erucic acid *Brassica oleracea* and oilseed *Brassica rapa* genotypes in resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines. *Plant Breeding*, 126, 596-602.

Saharan G S & N Metha (2008). *Sclerotinia* Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management. Springer Science & Business Media B.V., 21-22, 221, 223, 2008 (ISBN 978-1-4020-8407-2)

Sattler S E & D L Funnell-Harris (2013). Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? *Frontiers in Plant Science*, 4 (70), doi: 10.3389/fpls.2013.00070.

Saur R (1983). Versuche mit Sporenfallen zur Terminbestimmung bei der Bekämpfung von *Sclerotinia sclerotiorum* an Winterraps. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 90 (3), 225-231.

Sauer R & F Löcher (1984). Untersuchungen zum Wirtsspektrum von *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mitteilung für Landbau*, 3, BASF.

Scheler C, J Durner, J Astier (2013). Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interaction. *Plant Biology*, 16, 534-539.

Schmoldt T G H (2014). Einfluss der Blütenblättern auf die Stängelinfection von Raps mit *Sclerotinia sclerotiorum*. *Masterarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen, 41-42 pp.

Scott J B, D H Gent, S J Pethybridge, T Groom, F S Hay (2014). Crop damage from *Sclerotinia* crown rot and risk factors in pyrethrum. *Plant Disease*, 98, 103-111.

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

Seguin-Swartz G & C Lefol (1999). *Sclerotinia* stem rot resistance in crucifers. In: Wratten N & P A Salisbury (Eds.): *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress*. Canberra - Australia, September 26-29, 1999, Available at p. 153.

Sen B (2000). Biological control: A success story. *Indian Phytopathology*, 53, 243-249.

Sharma P (2014). Worldwide new host record of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Sarson News*, 18, 9.

Sharma P, P D Meena, P R Verma, G S Saharan, N Mehta, D Singh, A Kumar (2015). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing *Sclerotinia* rot in oilseed rassicas: A review. *Journal of Oilseed Brassica*, 6 (Special), 1 – 44.

Sibout R, M Baucher, M Gatineau, J Van Doorselaere, I Mila, B Pollet, B Maba, G Pilate, C Lapierre, W Boerjan, L Jouanin (2002). Expression of a poplar cDNA encoding a ferulate-5-hydroxylase/coniferaldehyde 5-hydroxylase increases S lignin deposition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 1087-1096.

Sibout R, A Eudes, B Pollet, T Goujon, I Mila, F Granier, A Séguin, C Lapierre, L Jouanin (2003). Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and characterization of the corresponding mutants. *Plant Physiology*, 132, 848-860.

Singh R S, J Kaur (2001). Comparative antagonistic activity of *Trichoderma harzianum*, *T. viride* and *Epicoccum purpureescens* against *Sclerotinia sclerotiorum* causing white rot of brinjal. Proc XI International *Sclerotinia* Workshop, Central Science Laboratory, York, UK, July 8-12, 141p.

Singh U P & R B Singh (1983). The effect of soil texture, soil moisture and depth of soil on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 90 (6), 662-669.

Singh U P, R B Singh, S Gupta (1985). Effect of temperature on sclerotia germination, growth and sclerotia formation in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 92 (3), 281-287.

Singh R, D Singh, H Li, S Sivasithamparam N R Yadav, P Salisbury, M J Barbetti (2008). Management of *Sclerotinia* rot of oilseed *Brassica* - a focus on India. *Journal of Oilseed Research*, 10, 1-27.

Statistisches Bundesamt (2016a). Ackerland nach Hauptfruchtgruppen und Fruchtarten. URL:

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischer/FeldfruechteGruenland/Tabellen/AckerlandHauptfruchtgruppenFruchtarten.html>,

abgerufen 16.01.2016

Statistisches Bundesamt (2016b). Erntemenge ausgewählter Anbaukulturen im Zeitvergleich. URL:

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischer/FeldfruechteGruenland/Tabellen/FeldfruechteZeitreihe.html;jsessionid=E316858B4F6A47FACD4DC31BE959BA02.cae4>, abgerufen 18.01.2016

Steinbach P, B Gerowitt, A v Tiedemann, B Ulber (2011). Integrierter Pflanzenschutz im Betrieb - Krankheits- und Schädlingskontrolle, Prognose, Konzepte. In: Christen, O & W Friedt: Winterraps - Das Handbuch für Profis, DLG-Verlag, 2. Auflage, 205, 212-213 pp., 2011 (ISBN 987-3-7690-0764-0).

Stotz H U, Y Sawada, Y Shimada, M Y Hirai, E Sasaki, M Krischke, P D Brown, K Saito, Y Kamiya (2011). Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Plant Journal*, 67, 81-93.

Stüwe B & A v Tiedemann (2013). Bacterial wilt of tomatoes – histological characterization of seed transmission and cultivar resistance. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120 (5/6), 194-200.

Tariq V N & P Jeffries (1984). Appresorium formation by *Sclerotinia sclerotiorum*: scanning electron microscopy. *Transactions of the British Mycological Society*, 82 (4), 645-651.

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

Tronchet M, C Balagué, T Kroj, L Jouanin, D Roby (2010). Cinnamyl alcohol dehydrogenases C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 11, 83-92.

Tu J C (1985). Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. *Physiological 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.

U, N. (1935). Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 7, 389-452

UFOP (2016a). Ernte von Raps und Rübsen in der EU 2009 – 2014 in 1.000 t. URL: <http://www.ufop.de/agrar-info/agrar-statistik/tabelle-28-ernten-von-raps-und-ruebsen-in-der-eu-2005-2010/>, abgerufen am 16.01.2016

UFOP (2016b). EU-Produktion von Biodiesel und HVO 2007 – 2014 in 1.000 t. URL: <http://www.ufop.de/agrar-info/agrar-statistik/tabelle-39-eu-produktion-von-biodiesel/>, abgerufen am 18.01.2016

Uloth M B, P L Clode, M P You, M J Barbetti (2015). Attack mode and defence reaction in pathosystems involving *Sclerotinia sclerotiorum*, *Brassica carinata*, *B. juncea*, *B napus*. *Annals of Botany*, 1-17.

Uloth M B, M P You, P M Finnegan, S S Banga, S K Banga, P S Sandhu, H Yi, P A Salisbury, M J Barbetti (2013). New sources of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* for crucifer crops. *Field Crops Research*, 154, 40–52.

Uloth M B, M P You, P M Finnegan, S S Banga, H Yi, M J Barbetti (2014). Seedling resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* as expressed across diverse cruciferous species. *Plant Disease*, 98, 184-190.

Underwood W (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*, 3 (85), 1-6. doi:10.3389/fpls.2012. 00085

Vautard G, P Cotton, M Fèvre (1999). The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to the CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Biochemical Societies, Letters* 453, 54-58.

Venette J (1998). *Sclerotinia* spore formation, transport and infection. *Proceedings of the Sclerotinia workshop*. Fargo, North Dakota.

Vlot A C, D A Dempsey, D F Klessig (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Reviews of Phytopathology*, 47,177-206.

Vogt T (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3, 2-20

von Tiedemann A & P Steinbach (2011): Krankheiten durch pilzliche Pathogene. In: Christen, O & W Friedt: Winterraps - Das Handbuch für Profis, DLG-Verlag, 2. Auflage, 156-159 pp., 2011 (ISBN 987-3-7690-0764-0).

Wahmhoff W (2000). Integrierter Rapsanbau: Untersuchungen zur Entwicklung integrierter Produktionsverfahren am Beispiel des Winterrapses (*Brassica napus* L.). Erich Schmidt Verlag, 2000 (ISBN 978-3503058136).

Wally O, J Jayaraj, Z Punja (2008). Comparative resistance to foliar fungal pathogens in transgenic carrot plants expressing genes encoding for chitinase, β -1,3-glucanase and peroxidase. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 331-342.

Wang H, G Liu, Y Zheng, X Wang, Q Yang (2003). 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. URL: http://gcirc.org/fileadmin/documents/Proceedings/IRC2003Copen/Molecular_markers/BO1_2.pdf, abgerufen am 17.03.2012.

Wang Z, H Fang, Y Chen, K Chen, G Li, S Gu, X Tan (2014). Overexpression of *BnWRKY33* in oilseed rape enhance resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Plant Pathology*, 14 (7), 677-689.

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

Wang Z, X Tan, Z Zhang, S Gu, G Li, H Shi (2012). Defense to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape is associated with the sequential activations of salicylic acid signaling and jasmonic acid signaling. *Plant Science*, 184, 75-82.

Warwick S I, A Francis, R K Gugel (2009). Guide to wild germplasm of *Brassica* and Allied Crops (tribe Brassiceae, Brassicaceae). 3. Auflage, Agriculture and Agri-Food Canada, URL: http://www.Brassica.info/info/publications/guidewild/Guide_ed.3_Introd_16July2009.pdf. abgerufen am 29.01.2016.

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

Weng J-K & C Chappel (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187, 273-285.

Weng J-K, X Li, J Stout, C Chapple (2008). Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Science*, 105 (22), 7887-7892.

Wentzell A M, I Boeye, Z Zhang, D J Kliebenstein (2008). Genetic networks controlling structural outcome of glucosinolate activation across development. *PLoS Genetics*, 4 (10), e1000234. doi:10.1371/journal.pgen.1000234.

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

Williams B, M Kabbage, H J Kim, R Britt, M B Dickman (2011). Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathogens*, 7 (6), 1-10, e1002107.

Winter M, B Koopmann, K Döll, P Karlovsky, U Kropf, K Schlüter, A v Tiedemann (2013). Mechanisms regulating grain contamination with trichothecenes translocated from the stem base of wheat (*Triticum aestivum*) infected with *Fusarium culmorum*. *Phytopathology*, 103, 682-689.

Wu J, G Cai, J Tu, L Li, S Liu, X Luo, L Zhou, C Fan, Y Zhou (2013). Identification of QTLs for Resistance to *Sclerotinia* Stem Rot and BnaC.IGMT5.a as a Candidate Gene of the Major Resistant QTL SRC6 in *Brassica napus*. *PLoS ONE*, 8 (7), 1-12, e67740. doi:10.1371/journal.pone.0067740

Wu J, Q Zhao, Q Yang, H Liu, Q Li, X Yi, Y Cheng, L Guo, C Fan, Y Zhou (2016). Comparative transcriptomic analysis uncovers the complex genetic network for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Scientific Reports*, 6 (19007), doi: 10.1038/srep19007.

Wulf T (2011). Phänotypisierung von Raps- und anderen *Brassica*-Genotypen zur Identifizierung von Resistenzquellen gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, 1-4, 7-38, 83-100, 130-153, 163-167pp.

- Yin Y, L Ding, X Liu, J Yang, Z Ma (2009).** Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in planta by real-time PCR assay. *Journal of Phytopathology*, 157, 465-469.
- Yin X R, B Yi, W Chen, W J Zhang, J X Tu, W G D Fernando, T D Fu (2010).** Mapping of QTLs detected in a *Brassica napus* DH population for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in multiple environments. *Euphytica*, 173, 25-35.
- You M P, M B Uloth, X L Xi, S S Banga, S K Banga, M J Barbetti (2015).** Valuable new resistances ensure improved management of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) in horticultural and oilseed *Brassica* species. *Journal of Phytopathology*, 1-9, doi: 10.1111/jph.12456.
- Young C S, J P Clarkson, J A Smith, M Watling, K Phelps; J M Whipps (2004).** Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant Pathology*, 53, 387-397.
- Zhao J, L Buchwaldt, S R Rimmer, A Sharpe, L McGregor, D Bekkaoui, D D Hegedus (2009).** Patterns of differential gene expression in *Brassica napus* cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Plant Pathology*, 10, 635-649.
- Zhao J & J Meng (2003a).** Genetic analysis of loci associated with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetic*, 106, 759-764.
- Zhao J & J Meng (2003b).** Detection of loci controlling seed glucosinolate content and their association with *Sclerotinia* resistance in *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 122, 19-23.
- Zhao J, A J Peltier, J Meng, T C Osborn, C R Grau (2004).** Evaluation of *Sclerotinia* stem rot resistance in oilseed *Brassica napus* using a petiole inoculation technique under greenhouse conditions. *Plant Disease*, 88, 1033-1039.
- Zhao J W, J A Udall, P A Quijada, C R Grau, J L Meng, T C Osborn (2006).** Quantitative trait loci for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and its association with a homeologous nonreciprocal transposition in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 509-516.
- Zhao J W, J L Wang, L L An, R W Doerge, Z J Chen, C R Grau, J L Meng, T C Osborn (2007).** Analysis of gene expression profiles in response to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Planta*, 227, 13-24.

Zhao Q, H Wang, Y Yin, Y Xu, F Chen, R A Dixon (2010). Syringyl lignin biosynthesis is directly regulated by a secondary cell wall master switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (32), 14496-14501.

Zhou J, A Sun, D Xing (2013). Modulation of cellular redox status by thiamine-activated NADPH oxidase confers *Arabidopsis* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Experimental Botany*, 64 (11), 3261-3272.

Zhu W, W Wei, Y Fu, J Cheng, J Xie, G Li, X Yi, Z Kang, M B Dickman, D Jiang (2013). A secretory protein of necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* that suppresses host resistance. *PLoS One*, 8 (1), e53901.

Zhuang X, K E McPhee, T E Coram, T L Peever, M I Chilvers (2012). Rapid transcriptome characterization and parsing of sequences in a non-model host-pathogen interaction; pea - *Sclerotinia sclerotiorum*. *BioMed Central Genomics*, 13 (668), doi: 10.1186/1471-2164-13-668.

9 Anhang

Tab.1A Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklaven	
A 275	ZIRBUS technology, Bad Grund/Harz, D
LTA 2x3x4	ZIRBUS technology, Bad Grund/Harz, D
Fedegarie FVS 3	ibs Tecnomara GmbH, Fernwald, D
Geldokumentator GelDoc 1000	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Elektrophoresekammer	G & P Kunststofftechnik, Kassel, D
Farbkamera Leica DFC 420	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Fluoreszenzkamera DFC300 FX	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Gefriertrocknung Alpha 1-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, D
Klimakammer	Joh. Mattern Kälte-Klima GmbH, Northeim, D
Klimaschrank Mytron WB 750 KFL	Mytron Bio- und Solartechnik GmbH, Heilbad Heiligenstadt, D
Kugel-/Schwingmühle MM 200	Retsch GmbH, Haan, D
Leitfähigkeitsmessgerät CDM2e	Radiometer Copenhagen, DNK
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA® -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Mikroskop Leica DM 500 CS	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
PCR-Zykler	
TProfessional Basic	Biometra GmbH, Göttingen, D
CFX 384 Real Time PCR System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Rotationsmikrotom HM 335 E	Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, D
Schüttler	
IKA Vibrax VXR	IKA® -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Lab-Shaker LSR-V	Adolf Kühner AG, Birsfelden/Basel, CH
Spektrophotometer	
Epoch™ Multi-Volume Spectrophotometer	BioTek Inc., Winooski, USA
Take3™ Multi-Volume Plate	BioTek Inc., Winooski, USA
Texture Analyser TA-XT2®	Winopal Forschungsbedarf GmbH, Elze, D
Ultraschallbad Sonorex Super RK 100	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D
Wärmeschrank UM 400	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D

Geräte	Hersteller
Wasserbad	
Julabo EC 5A	JULABO GmbH, Seelbach, D
WB7	Mettler GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Zentrifugen	
Heraeus® Biofuge® fresco	Thermo Fisher Scientific Inc.,
	Waltham/Massachusetts, USA
Model 4K 10	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode
	am Harz, D

Tab. 2A Stängelhöhe und -umfang der im Screening eingesetzten *Brassica*-Arten und Resynthesen des Versuchsjahres 2012 mit jeweiliger Standardabweichung sortiert nach aufsteigender Höhe. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n= 13-20, Höhe und Umfang: Kruskal-Wallis Test, $p \leq 0,05$).

Genotyp	Höhe [cm]	Signifikanz	Umfang [mm]	Signifikanz
<i>B. incana</i>	9,43 ± 3,87	a	5,62 ± 0,64	A
<i>B. insularis</i>	10,10 ± 1,36	ab	4,81 ± 0,52	ABC
<i>B. oleracea robertiana</i>	10,61 ± 3,03	a	6,27 ± 0,97	AB
<i>B. drepanensis</i>	11,40 ± 3,28	a	5,85 ± 0,89	ABCD
<i>B. villosa</i>	23,10 ± 4,00	abc	4,96 ± 0,91	ABCD
<i>B. oleracea italica 2</i>	29,68 ± 10,14	abcd	6,41 ± 1,08	BCD
<i>B. oleracea</i>	36,52 ± 7,87	abcde	6,17 ± 0,67	ABCD
<i>B. cretica</i>	37,13 ± 25,53	abcde	3,81 ± 3,49	ABCD
<i>B. oleracea italica 1</i>	42,51 ± 12,64	abcdefgh	6,48 ± 0,61	ABCD
Zhongshuang 9	47,85 ± 13,61	bcdefg	4,49 ± 3,68	ABCD
RUY1	49,33 ± 19,77	cdefg	3,20 ± 2,37	BCD
BOY1	59,75 ± 14,13	defgh	6,63 ± 1,33	BCD
Pacific	67,86 ± 14,76	fgh	3,32 ± 3,27	BCD
Lorenz	71,58 ± 13,04	h	3,84 ± 3,72	CD
OLL 1	78,50 ± 11,55	efgh	0,85 ± 0,16	BCD
Bravour	79,09 ± 9,40	gh	0,82 ± 0,08	D

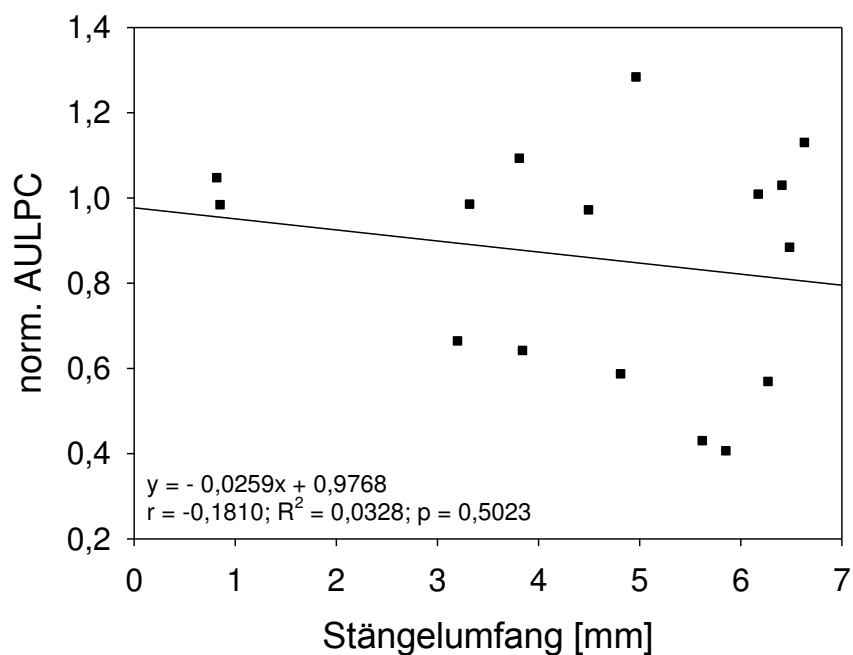


Abb. 1A Korrelationsanalyse zwischen norm. AULPC und Stängelumfang [mm] der im Gewächshauscreenings 2012 eingesetzten *Brassica*-Arten, Rapssorten und Resynthesen. Für die Analyse wurden die Mittelwerte des norm. AULPCs in linearen Zusammenhang mit den entsprechenden Stängelumfängen gesetzt (Pearson-Korrelation: $n = 16$, $p \leq 0,05$).

R^2 = Bestimmtheitsmaß, r = linearer Korrelationskoeffizient (Pearson-Korrelationseffizient)

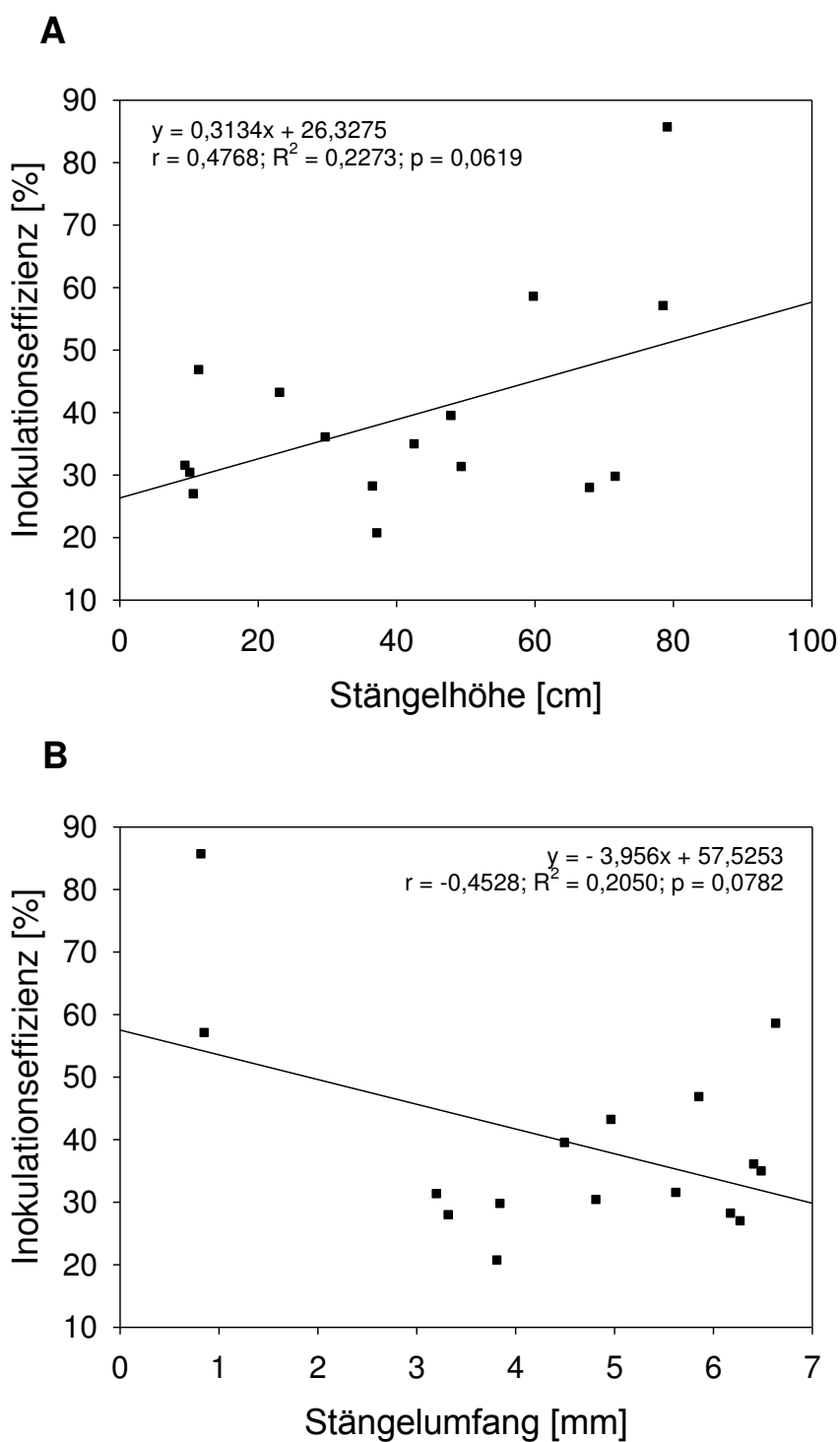


Abb. 2A Korrelationsanalyse zwischen (A) Inokulationseffizienz und Stängelhöhe [cm] sowie (B) Inokulationseffizienz und Stängel-umfang [mm] der im Gewächshauscreenings 2012 eingesetzten *Brassica*-Arten, Rapssorten und Resynthesen. Für die Analyse wurden die Inokulationseffizienz-werte mit den Mittelwerten der Stängelhöhen sowie der Umfänge in einen linearen Zusammenhang gesetzt (Pearson-Korrelation: $n = 16$, $p \leq 0,05$).

R^2 = Bestimmtheitsmaß, r = linearer Korrelationskoeffizient (Pearson-Korrelationseffizient)

Tab. 3A Stängelhöhe und –umfang der im Screening eingesetzten *Brassica*-Arten und Resynthesen des Versuchsjahres 2013 mit Standardabweichung sortiert nach aufsteigender Höhe. Unterschiedliche Buchstaben markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (n= 20-26, Höhe: Kruskal-Wallis Test, $p \leq 0,05$; Umfang: Allgemein lineares Modell (ALM): HSD ungleiche N, $p \leq 0,05$).

Genotyp	Höhe [cm]	Signifikanz	Umfang [mm]	Signifikanz
<i>B. drepanensis</i>	4,86 ± 1,06	a	4,31 ± 0,68	A
<i>B. oleracea robertiana</i>	5,37 ± 1,63	a	4,35 ± 0,33	A
<i>B. rupestris</i>	5,88 ± 1,25	ab	5,18 ± 0,60	ABC
<i>B. cretica</i>	10,08 ± 5,13	ab	5,21 ± 0,71	AB
<i>B. oleracea italica 2</i>	10,26 ± 1,45	ab	5,89 ± 0,72	BCD
<i>B. oleracea rupestris</i>	12,22 ± 1,75	ab	6,37 ± 0,50	BCD
<i>B. napus</i>	16,16 ± 20,18	ab	6,48 ± 0,58	CDE
<i>B. oleracea capitata 1</i>	16,86 ± 4,17	bcd	6,70 ± 1,27	DEF
<i>B. macrocarpa</i>	17,57 ± 24,34	ab	6,73 ± 0,89	DEF
<i>B. villosa</i>	19,58 ± 20,59	abcd	6,87 ± 0,85	DEF
<i>B. oleracea italica 1</i>	23,31 ± 7,18	cde	7,07 ± 0,72	DEF
<i>B. oleracea</i>	40,58 ± 28,83	cdef	7,73 ± 0,77	EFG
RUY1	42,96 ± 28,35	cdefg	7,88 ± 0,96	FGH
Lorenz	45,95 ± 37,40	cdef	8,45 ± 1,31	GHI
Pacific	61,38 ± 40,45	defgh	8,55 ± 0,84	GHI
Zhongshuang 9	64,28 ± 28,68	defgh	8,70 ± 0,83	GHI
<i>B. rapa pekinensis 2</i>	69,94 ± 13,86	defgh	8,82 ± 0,77	GHI
<i>B. carinata</i>	91,24 ± 32,50	efgh	8,89 ± 1,87	GHI
<i>B. oleracea capitata 2</i>	93,31 ± 19,57	fgh	9,10 ± 0,78	HI
BOY1	97,05 ± 12,51	gh	9,43 ± 2,08	I
<i>B. juncea</i>	98,55 ± 13,23	fgh	11,50 ± 2,72	J
<i>B. rapa pekinensis 1</i>	112,71 ± 18,64	h	11,59 ± 1,27	J

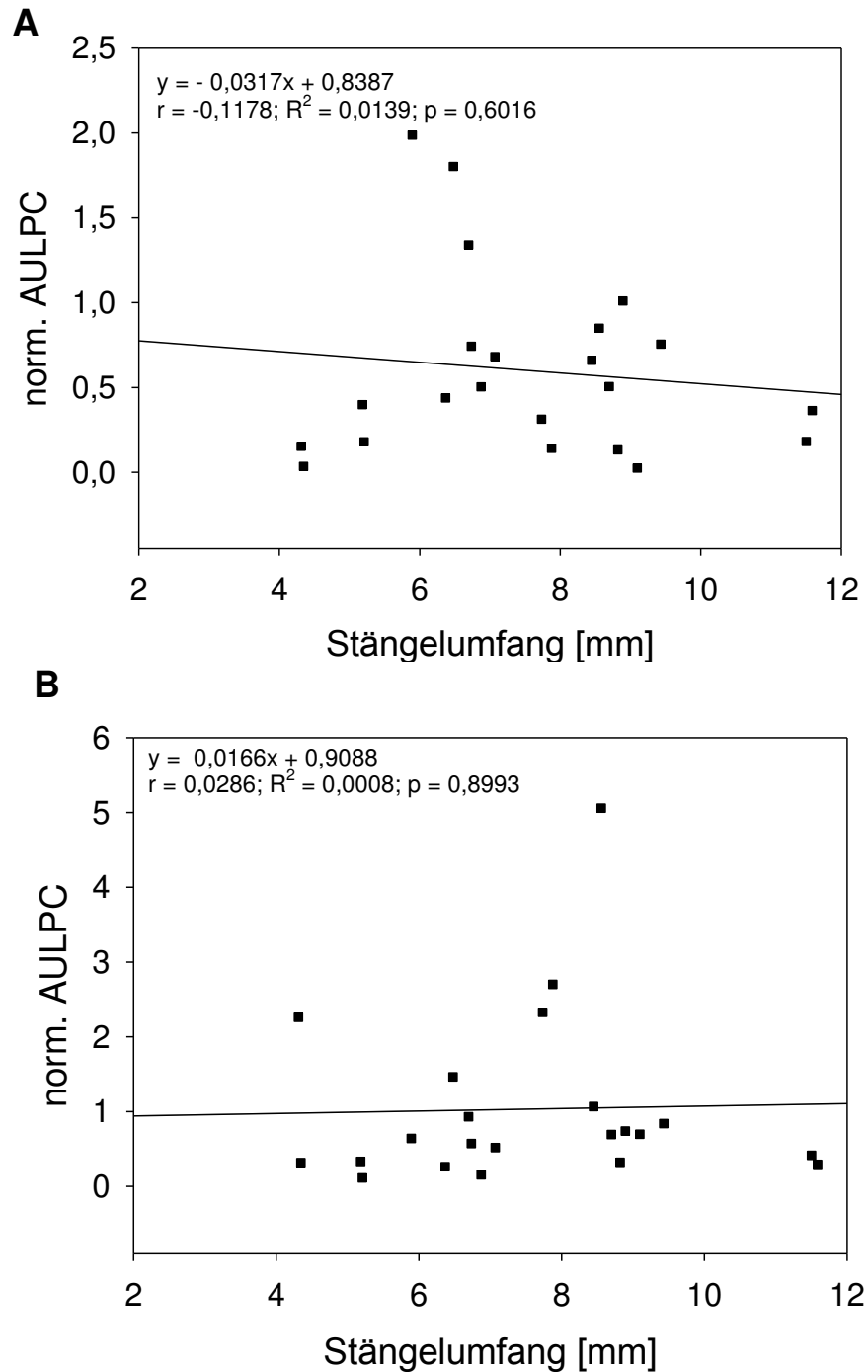


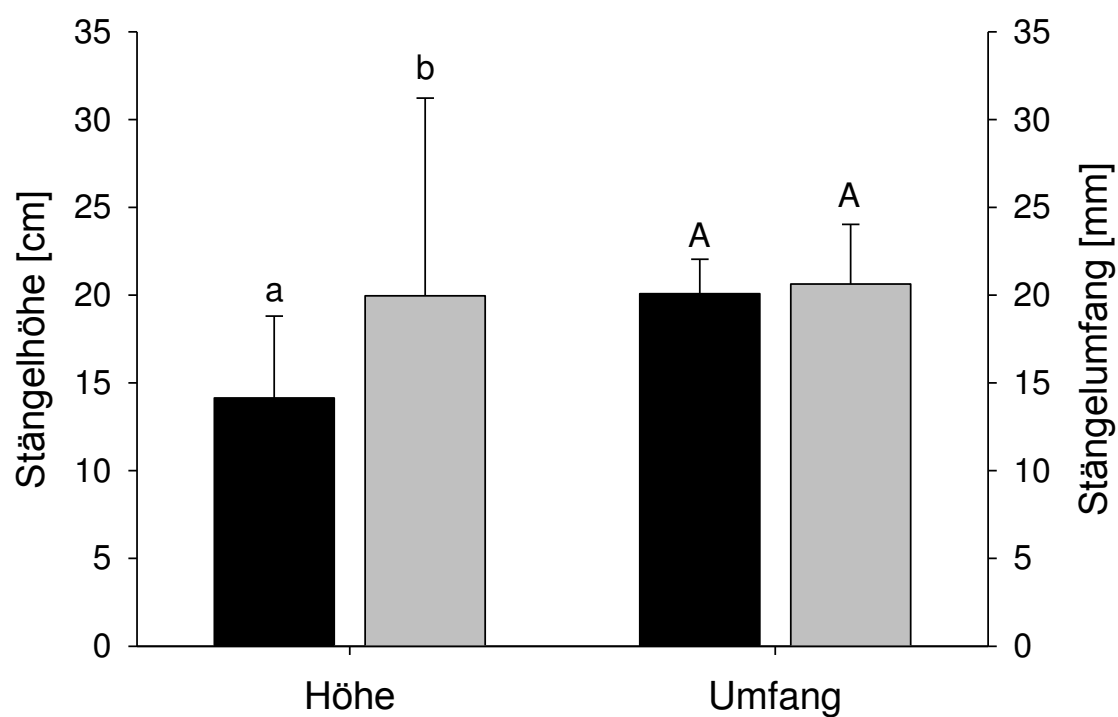
Abb. 3A Korrelationsanalyse zwischen norm. AULPC und Stängelumfang [mm] der beiden Inokulationsvarianten (A) „unverletzt“ und (B) „verletzt inokuliert“ der im Gewächshauscreenings 2013 eingesetzten *Brassica*-Arten, Rapssorten und Resynthesen. Für die Analyse wurden die Mittelwerten des norm. AULPC in linearen Zusammenhang mit den entsprechenden Stängelumfängen gesetzt (Pearson-Korrelation: $n = 22$, $p \leq 0,05$).

R^2 = Bestimmtheitsmaß, r = linearer Korrelationskoeffizient (Pearson-Korrelationseffizient)

Tab. 4A Korrelationsanalyse der Änderung der norm. Leitfähigkeit [μS] und der Anzahl der Spaltöffnungen pro mm^2 Blattfläche der im Blattsegmenttest eingesetzten *Brassica*-Arten je Versuchsjahr. Statistisch signifikante Zusammenhänge wurden nach Spearman Rangkorrelation nicht gefunden (2012: $n = 15$; 2013 $n = 22$; $p \leq 0,05$).

		Blattsegmenttest 2012	Blattsegmenttest 2013
Anzahl an Spaltöffnungen pro mm^2	R_s :	0,233	-0,248
	p :	0,546	0,392

Abb. 4A Stängelhöhe und -umfang der beiden *B. napus* Genotypen der Interaktionsstudie. Die schwarzen Balken demonstrieren die Höhen sowie Umfänge von Zhongyou 821 und die grauen Balken die von Loras. Die Mittelwerte und Standardabweichungen errechneten sich aus zwei unabhängigen Versuchswiederholungen, welche je 30 Pflanzen beinhalteten. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen ergaben sich über den Kruskal-Wallis Test und sind durch kleine Buchstaben für die Stängelhöhe und durch Großbuchstaben für den Stängelumfang gekennzeichnet ($n = 30$, $p \leq 0,05$).



Tab. 5A Mittlere Läsionslängen [mm] in den *B. napus* Genotypen Loras (L) und Zhongyou 821 (Z) in der *Sclerotinia*-inokulierten (Ss) sowie der Mock-inokulierten (M) Behandlung zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten nach der Inokulation der beiden Versuchsdurchgänge. Die Mittelwerte sowie die nachgestellten Standardabweichungen errechneten sich aus 30 Pflanzen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchszeitpunkten und Behandlungen ergaben sich über den Bonferroni Test der mehrfaktorielle Varianzanalyse (n = 30, p ≤ 0,05).

Variante	Tage nach Inokulation (dpi)			
	1	2	4	7
Versuchsdurchgang 1				
ZM	1,0 ± 0,2 a	1,0 ± 0,2 a	1,5 ± 0,5 a	1,3 ± 0,5 a
LM	1,0 ± 0,0 a	1,1 ± 0,4 a	1,8 ± 0,9 a	2,2 ± 0,9 a
ZSs	2,5 ± 1,3 a	2,9 ± 1,5 a	5,6 ± 4,2 a	5,8 ± 4,1 a
LSs	11,6 ± 6,7 ab	21,6 ± 11,6 b	40,6 ± 25,7 c	79,1 ± 46,6 d
Versuchsdurchgang 2				
ZM	1,0 ± 0,0 a	1,1 ± 0,3 a	1,5 ± 0,5 a	1,7 ± 0,5 ab
LM	1,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 a	2,2 ± 0,9 ab	2,7 ± 0,6 abc
ZSs	3,7 ± 1,4 abcd	5,2 ± 2,2 abcd	8,7 ± 6,1 bcde	9,8 ± 6,1 de
LSs	9,5 ± 2,9 cde	13,5 ± 6,1 e	23,4 ± 13,4 f	51,7 ± 26,8 g

ZM, Zhongyou 821 Mock-inokuliert (Kontrolle). **LM**, Loras Mock-inokuliert (Kontrolle).

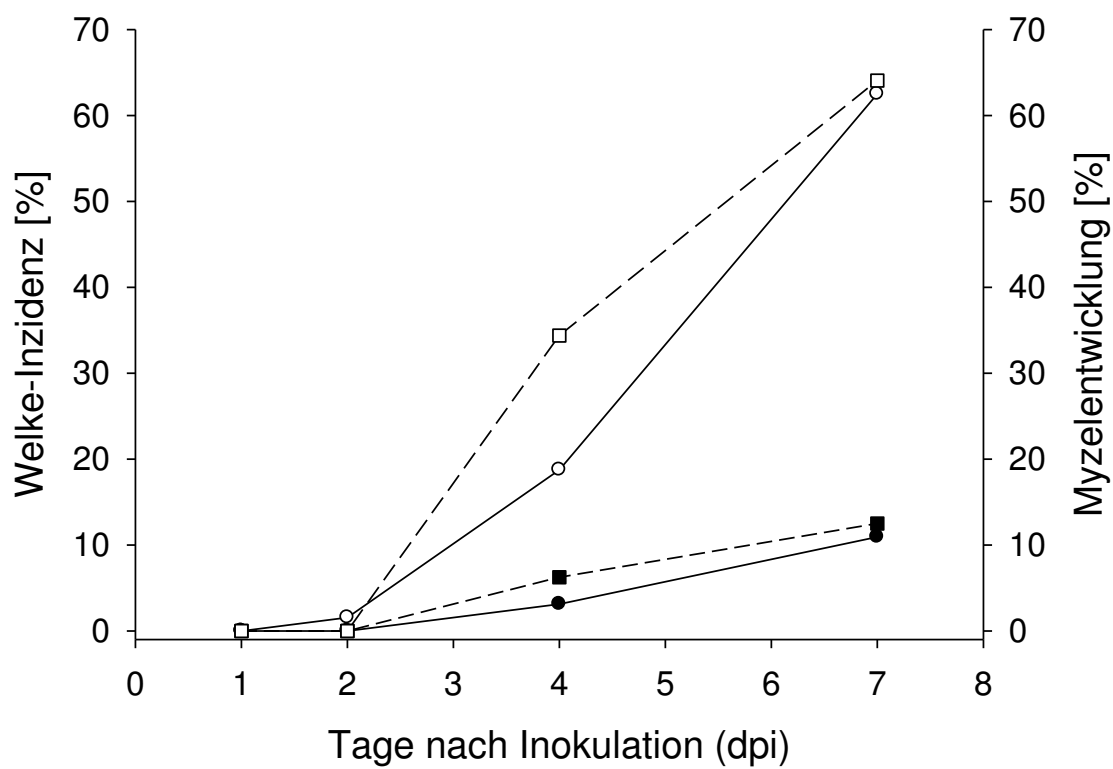
ZSs, Zhongyou 821 *Sclerotinia*-inokuliert (infiziert). **LSs**, Loras *Sclerotinia*-inokuliert (infiziert).

Tab. 6A Mittlere relative Läsionslängen [%] in den *B. napus* Genotypen Loras (L) und Zhongyou 821 (Z) in der mit *Sclerotinia*-inokulierten (Ss) sowie der Mock-inokulierten (M) Behandlung zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten nach der Inokulation. Die Mittelwerte sowie die nachgestellten Standardabweichungen errechneten sich aus zwei unabhängigen Versuchswiederholungen, welche jeweils 30 Pflanzen bestanden. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstagen und Behandlungen ergaben sich über den Bonferroni Test der mehrfaktorielle Varianzanalyse (n = 30, p ≤ 0,05).

Variante	Tage nach Inokulation (dpi)			
	1	2	4	7
ZM	1,92 ± 0,91 a	1,98 ± 0,96 a	2,81 ± 1,68 ab	2,83 ± 1,62 ab
LM	1,90 ± 0,92 a	2,03 ± 1,11 a	3,69 ± 2,02 bc	4,30 ± 1,79 c
ZSs	5,58 ± 3,21 cd	8,14 ± 5,73 d	13,83 ± 11,93 e	14,85 ± 12,81 ef
LSs	16,82 ± 6,70 f	27,49 ± 13,24 g	48,62 ± 22,74 h	100,00 ± 52,43 i

ZM, Zhongyou 821 Mock-inokuliert (Kontrolle). **LM**, Loras Mock-inokuliert (Kontrolle). **ZSs**, Zhongyou 821 *Sclerotinia*-inokulierten (infiziert). **LSs**, Loras *Sclerotinia*-inokulierten (infiziert).

Abb. 5A Prozentuales Auftreten von Welkeerscheinung (●) und Myzelbildung (■) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation mit *S. sclerotiorum*. Die schwarzen Symbole präsentieren den Genotypen Zhongyou 821 und die weißen Symbole den Genotypen Loras (n = 64).



Tab. 7A Die Spearman Rangkorrelation beschreibt die Beziehung zwischen den Welke-Inzidenz [%], der Myzelentwicklung [%], der relativen Läsionslänge [%] und der relativen *Sclerotinia*-DNA-Menge (rel. Ss-DNA) der Rapstypen der Interaktionsstudie. Statistisch signifikante Zusammenhänge wurden über Sternchen entsprechend des Signifikanzniveaus dargestellt. (n = 8; ***p ≤ 0,001; **p ≤ 0,01; *p ≤ 0,05).

		Welke- Inzidenz [%]	Myzel- entwicklung [%]	rel. Läsionslänge [%]
Myzelentwicklung [%]	R _s :	0,962		
	p:	0,000***		
relative Läsionslänge [%]	R _s :	0,83	0,723	
	p:	0,011*	0,042*	
relative Ss-DNA-Menge [%]	R _s :	0,903	0,824	0,857
	p:	0,002**	0,12*	0,007**

Tab. 8A Detektion von *Sclerotinia*-DNA (Ss-DNA) mittels quantitativer Real Time PCR in Stängelmaterial der zwei *B. napus* Typen Zhongyou 821 (Z, resistent) und Loras (L, anfällig), der beiden unabhängigen Versuchswiederholungen. Angegeben sind die Mittelwerte der Ss-DNA-Mengen mit den Standardabweichungen in den verschiedenen Behandlungen (Mock- und *Sclerotinia*-inokuliert) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation (dpi). Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten und den Zeitpunkten jedes Versuchsdurchgangs ergeben sich aus der mehrfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) nach dem Bonferroni Test ($p \leq 0,05$) und sind durch verschieden Buchstaben gekennzeichnet.

dpi	Variante	pgSs-DNA/mg TG	
		Durchgang 1	Durchgang 2
1	ZM	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
	LM	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
	ZSs	0,39 ± 0,21 a	1,69 ± 0,21 b
	LSs	1,84 ± 0,64 a	1,75 ± 0,22 b
2	ZM	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
	LM	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
	ZSs	0,32 ± 0,11 a	4,11 ± 2,23 b
	LSs	8,81 ± 3,76 a	6,39 ± 3,87 b
4	ZM	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
	LM	0,00 ± 0,00 a	0,02 ± 0,04 a
	ZSs	0,56 ± 0,60 a	34,01 ± 8,62 ab
	LSs	48,74 ± 41,24 b	80,85 ± 60,63 b
7	ZM	0,08 ± 0,15 a	0,00 ± 0,00 a
	LM	0,00 ± 0,00 a	0,02 ± 0,05 a
	ZSs	1,19 ± 1,69 a	20,52 ± 20,05 ab
	LSs	92,34 ± 24,71 c	210,73 ± 54,39 c

ZM, Zhongyou 821 Mock-inokuliert (Kontrolle). **LM**, Loras Mock-inokuliert (Kontrolle). **ZSs**, Zhongyou 821 *Sclerotinia*-inokulierten (infiziert). **LSs**, Loras *Sclerotinia*-inokulierten (infiziert).

Tab. 9A Relative *Sclerotinia*-DNA-Gehalte (rel. Ss-DNA) [%] in Stängelmaterial der zwei *B. napus* Typen Zhongyou 821 (Z, resistent) und Loras (L, anfällige). Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Ss-DNA [%] mit den Standardabweichungen in den verschiedenen Varianten (Mock-, *Sclerotinia*-inokuliert) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation (dpi). Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten und den Zeitpunkten jedes Versuchsdurchgangs ergeben sich über mehrfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) nach dem Bonferroni Test ($p \leq 0,05$) und sind durch verschieden Buchstaben markiert.

Variante	Tage nach Inokulation (dpi)			
	1	2	4	7
ZM	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
LM	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
ZSs	0,6 ± 0,3 a	1,1 ± 1,1 ab	7,3 ± 8,6 bc	6,1 ± 8,2 bc
LSs	1,4 ± 0,8 ab	6,3 ± 4,5 c	45,6 ± 35,6 d	100,0 ± 23,3 e

ZM, Zhongyou 821 Mock-inokuliert (Kontrolle). **LM**, Loras Mock-inokuliert (Kontrolle). **ZSs**, Zhongyou 821 *Sclerotinia*-inokulierten (infiziert). **LSs**, Loras *Sclerotinia*-inokulierten (infiziert).

Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Andreas von Tiedemann für die Bereitstellung des Promotionsthemas im Rahmen eines internationalen Netzwerks, seine Hilfestellungen und Diskussionsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Petr Karlovsky für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. Heiko Becker für die Teilnahme am Prüfungskomitee danken.

Dr. Birger Koopmann bin ich für seine theoretische und experimentelle Unterstützung bei schwierigen Fragestellungen und die immer offene Tür dankbar.

Ich möchte allen Personen meinen Dank bekunden, die mich bei der Durchführung meiner Versuche betreut, unterstützt oder beraten haben.

Besonders hervorheben möchte ich hierbei Claudia Nordmann für die technische Hilfe bei den Gewächshausversuchen und im Labor. Evelin Vorbeck und Jutta Schaper danke ich für die nützlichen Ratschläge und ihre bereitwillige Unterstützung bei der Organisation von Versuchen. Ein riesiges Dankeschön geht an Dagmar Tacke für die stete Unterstützung im Labor und für ein offenes Ohr in allen Lebenslagen.

Für ihre gute und gewissenhafte Arbeit möchte ich mich auch bei den Auszubildenden Sebastian Hesse, Marian Süß und Marie Nörtemann bedanken.

Für die stete pragmatische und administrative Unterstützung bin ich Frau Martina Bode und Frau Bianca Gürnke sehr verbunden.

Herzlich möchte mich bei dem Gewächshausteam Maik Knobel und Hubertus Reinke für die Versorgung und Pflege der Pflanzen, Frank Gremmes und Mark Fiebrich für die Hilfe und Unterstützung in allen Technikfragen bedanken. Nicht zu vergessen sind auch die restlichen technischen Mitarbeiter sowie die Hausmeister, welche notwendige Reparaturen durchführten und stets mit Rat und Tat zur Stelle waren.

Für die unermüdliche Hilfe und Unterstützung in allen Computerfragen bedanke ich mich bei dem GWDG EDV-Team Thomas Oesterreich und Siegfried Opolka.

Für die Finanzierung des PLANT-KBBE III – Verbundvorhaben: Resistenz von *Brassica napus* gegen Weißstängeligkeit – eine Herausforderung (MONARCH) (Teilprojekt B) unter dem Förderkennzeichen 0315915B danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). Für die Projektleitung bedanke ich mich bei Bruno Grezes-Beset sowie bei all meinen Kooperationspartnern für die interessanten Gespräche, Diskussionen und den Informationsaustausch. Ein besonderer Dank geht hierbei an Dr. Eva Miedes für die Durchführung der Zellwandanalysen.

Für die schöne Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz sowie meinen beiden Studenten Alexander Pfaff und Thies Schmoldt bedanken.

Ein großes Dankeschön ergeht hierbei nochmal an all meine Arbeitskollegen und ehemaligen Kollegen aus dem Bereich Pflanzenpathologie und anderer Disziplinen für die gemeinsamen Freizeitaktivitäten und anregenden Diskussionen. Ich hatte viel Spaß mit euch.

Mein Dank gilt weiter Dr. Magdalena Siebold und meinem Schwiegervater für die hilfreichen Diskussionen und für die redaktionelle Durchsicht der Dissertation.

Des Weiteren gilt mein Dank meiner Familie, die mich während dieser Zeit unermüdlich bei jeder Entscheidung unterstützt hat und immer für mich da war. Auch meiner Zweitfamilie danke ich für den Rückhalt während dieser Zeit.

Meinen vielen Freunden und Bekannten möchte ich für die Seelsorge, Aufmunterung und den Rückenwind herzlich danken.

Zum Schluss möchte ich meinem Freund und Lebenspartner Stefan Roesler danken, der mir die ganze Zeit über beiseite stand, verständnisvoll war und alle Höhen und Tiefen mit mir durchgestanden hat. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Höch
Geburtsdatum/-ort: 20.03.1987, Mühlhausen (Thüringen)

Hochschulausbildung

2011 – 2016 Doktorand und Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Projekt PLANT-KBBE 3: „Resistenz von *Brassica napus* gegen Weißstängeligkeit – Eine Herausforderung (MONARCH) (Teilprojekt B)“ am Department für Nutzpflanzenforschung, Abteilung Allgemeine Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Georg-August-Universität Göttingen

2005 – 2010 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen mit Abschluss Diplombiologin

Thema der Diplomarbeit: „Kommunikation zwischen NDR-Kinase und Rho-GTPase Signalweg in *Neurospora crassa*“

Schulbildung

1997 – 2005 Albert-Schweitzer Gymnasium, Mühlhausen (Thüringen) mit Abschluss Abitur

1993 – 1997 Grundschule Görmar, Mühlhausen (Thüringen)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst zu haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

Unterschrift:.....