



UFOP-SCHRIFTEN | AGRAR

ABSCHLUSSBERICHT

Herkunft von phänotypisch stark abweichenden Durchwuchspflanzen in Praxisbeständen von Winterraps

Autoren

Jonas Klemm und Prof. Dr. Christian Jung

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Botanischen Garten 1-9, 24118 Kiel

Dr. Wolfgang Sauermann

Lankwitzweg 1, 24111 Kiel

Herkunft von phänotypisch stark abweichenden Durchwuchspflanzen in Praxisbeständen von Winterraps

Jonas Klemm und Prof. Dr. Christian Jung

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung,
Am Botanischen Garten 1-9 24118 Kiel

Dr. Wolfgang Sauermann

Lankwitzweg 1, 24111 Kiel

In Zusammenarbeit mit der

Norddeutschen Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG, Hohenlieth und

Prof. Dr. Sabine Gruber, Universität Hohenheim, Stuttgart Hohenheim

Zusammenfassung

In Schleswig-Holstein aber zum Teil auch in benachbarten Bundesländern sind in Winterraps-Beständen in den letzten Jahren vermehrt Pflanzen mit stark abweichendem Wuchs aufgetreten. Das hat zu Diskussionen über die Herkunft dieser Pflanzen geführt. Vielfach wurde dabei unterstellt, dass es sich um Aufspaltungen aus den Folgegenerationen der F1-Hybridsorten handelt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob sich die Abstammung und die genetische Herkunft der phänotypisch stark abweichenden Durchwuchspflanzen klären lässt. Die Bestimmung der genetischen Ähnlichkeit erfolgte dabei über die Genotypisierung mit DNA Markern (SSR und AFLP). Dazu wurden aus 23 Praxisbeständen in Schleswig-Holstein Blatt- und Samenproben von stark abweichenden Durchwuchspflanzen sowie auch von Pflanzen, die phänotypisch dem Habitus der angebauten Rapsorte entsprechen, genommen. Als Referenz wurden 105 Sorten verwendet, die zwischen 1953 und 2014 zugelassen worden sind. Mit der Untersuchung der Erucasäure- und Glucosinolategehalte wurde die Samenqualität des phänotypisch stark abweichenden Durchwuchses wie auch der phänotypisch normalen Pflanzen erfasst.

Die beprobten Rapspflanzen ließen sich nach ihrem Genotyp in fünf Gruppen unterteilen. Dabei gruppiert der phänotypisch stark abweichende Durchwuchs mehrheitlich mit Futterrapsorten und alten Körnerraps Sorten ohne oder einfacher Qualität (++ und 0-Qualität). Die Pflanzen, die dem Normaltyp zuzuordnen sind, weisen dagegen eine geringe genetische Ähnlichkeit mit dem extremen Durchwuchsraps auf und gruppieren vorwiegend mit modernen Sorten. Die Ergebnisse passen zu den Qualitätsuntersuchungen des Samenmaterials. Diese zeigten, dass der stark abweichende

Durchwuchs erhöhte Erucasäure- und Glucosinolatgehalte aufweist. Der Anteil sekundär dormanter Samen war in den Samen der extremen Durchwuchspflanzen zwar im Mittel höher als in den Samen der Normaltypen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Daraus wird der Schluss gezogen, dass die phänotypisch stark abweichenden Pflanzen entweder direkte Nachkommen alter Sorten sind, deren Samen lange im Boden überdauert haben oder dass sie Nachkommen von Auskreuzungen mit später angebauten Sorten sind.

Summary

In the past years, rapeseed plants with a strikingly different phenotype (putative volunteers) have been found in production fields in the state of Schleswig-Holstein (Germany) and in neighboring states. This raised the question about the genetic origin of these volunteers which obviously did not belong to the cultivar which had been sown in the field. Two alternative hypotheses have been discussed. Either plants originate from hybrid varieties which after selfing give rise to segregating populations, or they represent old varieties whose seeds have survived in the soil. In this study, we aimed to clarify the origin and ancestry of phenotypically different rapeseed volunteers. We took leaf and seed samples from strikingly different volunteers from 23 production fields. As a control, normally looking plants were sampled which were likely representing the cultivar which had been sown by the farmer. As a reference material, 105 varieties of different quality were genotyped which had been released between 1953 and 2014. First, we genotyped them with DNA markers (SSR and AFLP). Calculation of genetic relatedness was carried out based on the genotypic data. The rapeseed material used in this study was assigned to five distinct clusters. The volunteer plants clustered mainly with fodder rape and old rapeseed varieties with double or single low erucic acid/glucosinolates contents. The normally looking rapeseed plants showed low genetic similarity to the volunteers and the majority clustered with modern rapeseed varieties. These results were supported by quality measurements of the seeds which demonstrated that rapeseed volunteers have highly increased erucic acid and glucosinolate contents. In conclusion, the volunteers trace back to old rapeseed varieties or to spontaneous crossings in the field between old and modern varieties.

1. Einleitung

In Schleswig-Holstein sind in den letzten Jahren in Praxisbeständen von Raps vermehrt Pflanzen aufgetreten, die phänotypisch stark von den angebauten Sorten abweichen. Diese werden in Folgenden als „Durchwuchs“ bezeichnet. Die Hauptunterschiede bestehen in der Länge dieses Durchwuchses, der den Rapsbestand weit überragt, und in der deutlich späteren Blüte und Abreife im Vergleich zu den Pflanzen der angebauten Sorten. Das führt zu einer Behinderung und bei einem sehr starken Besatz mit Durchwuchspflanzen sogar zur Verhinderung der Ernte. Durch Untersuchungen der Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein an einzelnen Herkünften dieses extremen Durchwuchses wurden hohe Erucasäure- und Glucosinolatgehalte in extremem Durchwuchs nachgewiesen, welche nicht der ‚00‘-Qualität von modernen Rapsorten entsprechen.

Das Auftreten des stark abweichenden Durchwuchses hat zu einer intensiv geführten Diskussion über die Herkunft geführt. Dabei stehen mehrere Hypothesen über die Herkunft des Durchwuchses im Vordergrund. Die erste Hypothese lautet, dass der extreme Durchwuchs aus der Aufspaltung von F1-Hybridsorten herrührt. Durchwuchs, der unmittelbar aus der F1 Hybride entsteht, entspricht der F2-Generation. In dieser kommt es naturgemäß zu Aufspaltungen, so dass diese Pflanzen eine breite phänotypische Varianz aufweisen können. Auch in den darauf folgenden Generationen, wie der F3, F4 usw. können dann weitere Aufspaltungen stattfinden, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als in der F2. Eine andere Hypothese besteht darin, dass der stark abweichende Durchwuchs von alten Öl- und Futterrapsorten stammt, die vor sehr langer Zeit angebaut worden sind.

Dass Rapsdurchwuchs in späteren Kulturen auftreten kann, liegt an dem Verlust von Samen vor und während der Ernte, an der Fähigkeit der Rapsamen, eine sekundäre Dormanz auszubilden, und an pflanzenbaulichen Maßnahmen wie der Bodenbearbeitung und Sortenwahl.

Bei der Ausbildung der sekundären Dormanz spielen verschiedene Umwelteinflüsse eine Rolle wie z.B. Trockenstress und Dunkelheit (PEKRUN et al. 1997; FRANCISCA et al. 1998). Sekundäre Dormanz ist, im Vergleich zur primären Dormanz, welche bei der Abreife naturgemäß entsteht und allein genetisch bedingt, erwünscht, weil sie den Auswuchs der Samen in der Schote verhindert, die induzierte Unfähigkeit der Samen zu keimen (GUBLER et al. 2005; BEWLEY 1997; FRANCISCA et al. 1998). Die Phytohormone Gibberellinsäure und Abscisinsäure spielen bei der Ausprägung eine fundamentale Rolle (FINCH-SAVAGE and LEUBNER-METZGER 2006; FINKELSTEIN et al. 2008). Die komplexe Regulierung der sekundären Dormanz, die

von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen abhängt, ist jedoch noch nicht ganz erfasst worden. Studien im Raps haben gezeigt, dass verschiedene Sorten eine unterschiedlich hohe sekundäre Dormanz zwischen 8% und 56% aufweisen können (SCHATZKI et al. 2013a; GRUBER et al. 2009). Dass die sekundäre Dormanz züchterisch beeinflusst werden kann, hat SCHATZKI et al. (2013b) nachgewiesen, indem er fünf QTLs gefunden hat, die 45% der Variation erklären. Das Merkmal weist dabei eine hohe Heritabilität auf.

Durch verschiedene Umwelteinflüsse können vor der Ernte bis zu 6,4% der Samen der Gesamternte ausfallen. Der Anteil kann sich während der Ernte auf rund 11% erhöhen (PRICE et al. 1996). Die Verluste entsprechen 2-3 dt pro ha oder 4000-6000 Samen pro m² (GRUBER et al. 2008). Der Verlust der Samen führt dazu, dass eine Bodensamenbank, die bis zu 29% der ursprünglichen Ausfallverluste enthält (PEKRUN et al. 2006), aufgebaut werden kann und die Samen in den folgenden Kulturen auflaufen können. Es wurde nachgewiesen, dass die Lebensdauer der Rapssamen in der Bodensamenbank über 10 Jahre beträgt (LUTMAN et al. 2003), in Einzelfällen sogar bis zu 17 Jahre (JØRGENSEN et al. 2007).

Die Größe und der Abbau der Bodensamenbank hängen dabei sowohl von der Sorte als auch von der Bodenbearbeitung ab (PEKRUN et al. 2006; GRUBER et al. 2008). Gering dormante Sorten tragen weniger zum Aufbau einer Bodensamenbank bei und die Anzahl der Samen in der Bodensamenbank nimmt schneller ab (GRUBER et al. 2010). Durch Alterung reduziert sich die Anzahl der Samen innerhalb von fünf Jahren um bis zu 92%, in Abhängigkeit der Dormanzneigung der Sorte (GRUBER et al. 2010). Um den Anteil der Samen, die in die Bodensamenbank Eintrag finden, gering zu halten, ist eine sofortige Stoppelbearbeitung zu vermeiden (GRUBER et al. 2010). Des Weiteren sollten die Wetterbedingungen berücksichtigt werden, da eine Stoppelbearbeitung unter trockenen Bedingungen die Anzahl der Samen erhöht, die eine sekundäre Dormanz ausbilden können (PEKRUN et al. 1997). Um eine schon vorhandene Bodensamenbank am Auflaufen zu hindern, schlug GRUBER et al. (2010) vor, einmalig eine wendende Bodenbearbeitung durchzuführen um die Samen in eine tiefere Bodenschicht zu verlagern, in der diese nicht keimen können, und anschließend nur eine oberflächliche Bodenbearbeitung durchzuführen.

Frühere Studien zur Bestimmung der Herkunft von Durchwuchsraps wurden in Dänemark und Deutschland durchgeführt (JØRGENSEN et al. 2007; ANDERSEN et al. 2010; THÖLE and DIETZ-PFEILSTETTER 2012). Dabei wurde festgestellt, dass bis zu 17 Jahre alte Sorten den Durchwuchs bilden (JØRGENSEN et al. 2007). Bei diesen Studien wurden jedoch keine phänotypisch stark abweichenden Durchwuchspflanzen betrachtet, sondern es wurden zum einen zufällige Proben aus Rapsschlägen genommen

und zum anderen Durchwuchspflanzen aus künstlichen Anbaulücken beprobt. Der genetische Fingerabdruck der genommenen Proben wurde ermittelt und mit dem von Referenzsorten abgeglichen. Die Studien geben zwar einen Hinweis darauf, dass Raps sehr hohe Überdauerungsfähigkeiten besitzt, allerdings liefern sie keine Erklärung für die Qualitätsabweichungen. In Schleswig-Holstein wird seit 1987 fast ausschließlich „00“-Raps angebaut (SAUERMAN 2016a).

Dass extremer Durchwuchsraps vor allem in Schleswig-Holstein auftritt, kann mehrere Gründe haben. Zum einen ist die Fruchtfolge in Schleswig-Holstein besonders eng (z.B. WW-WW-WR), wodurch es nur kurze Zeitfenster zur chemischen und pflanzenbaulichen Bekämpfung von extremem Durchwuchsraps gibt. Ein weiterer Punkt sind die Böden in Schleswig-Holstein, die ein Überdauern der Samen begünstigen können, da in Böden mit einer guten Wasserspeicherfähigkeit Samen länger überleben (GRUBER et al. 2014). Des Weiteren kann besonders das östliche Hügelland auf eine längere Historie im Rapsanbau zurückblicken, d.h. dass in diesem Gebiet besonders altes Samenmaterial mit größerer Häufigkeit vorhanden sein dürfte und somit auflaufen kann.

In dieser Studie soll der Ursprung von phänotypisch stark abweichenden Durchwuchspflanzen bestimmt werden. Dazu wurden im Frühjahr und Sommer 2015 von 23 Praxisschlägen in Schleswig-Holstein Blatt- und Samenproben von im Wuchs stark abweichendem und als Kontrolle von Pflanzen mit einem normalen Habitus, welcher dem der angebauten Sorte entspricht, welcher aber nicht zwingend der angebauten Sorte zugehörig sein muss, sondern auch normal wüchsiger Durchwuchs sein kann, genommen. Um die im Feld beprobten Pflanzen später zuzuordnen wurden 105 Rapsorten, die sowohl Körnerraps wie auch Futterraps repräsentieren, und die in den letzten 50 Jahren im Anbau in Schleswig-Holstein standen, im Gewächshaus des Instituts für Pflanzenzüchtung in Kiel angezogen und als Referenz verwendet. Die stark abweichenden Durchwuchspflanzen werden im Folgenden als Durchwuchstyp bezeichnet. Da aus früheren Studien bekannt ist, dass nicht abweichender Durchwuchs einen Anteil von bis zu 32% im Gesamtbestand ausmachen kann (JØRGENSEN et al. 2007), werden die normalwüchsigen Pflanzen, die den jeweils angebauten Sorten entsprechen sollten, aber naturgemäß auch normal wüchsiger Durchwuchs sein können, als Normaltypen bezeichnet. Mithilfe von molekularen Markern wurde das Material genotypisiert und über statistische Verfahren wurde die genetische Distanz zwischen Feldproben und Referenzsorten berechnet. Die genetische Distanz lässt Rückschlüsse auf die Herkunft des Durchwuchses zu. Auch wurde das Samenmaterial aus den Praxisschlägen auf seine Erucasäure- und Glucosinolatgehalte sowie auf die Fähigkeit eine sekundäre Dormanz auszubilden, überprüft.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen dazu beitragen, die anhaltende Diskussion über die Herkunft des stark abweichenden Durchwuchsrapses zu versachlichen, und gezielte Gegenmaßnahmen zu treffen. Des Weiteren soll in der Studie geklärt werden, wie sich die Qualitätsparameter Erucasäure- und Glucosinolatgehalte von Durchwuchstypen im Vergleich zu den Normaltypen unterscheiden.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial für diese Studie stammt aus zwei unterschiedlichen Quellen. Die erste Quelle bilden 23 verschiedene Praxisschläge in Schleswig-Holstein sowie zwei Herkünfte von Versuchsfeldern, auf denen jeweils Blatt- und Samenproben entnommen wurden. Bei den beiden Herkünften von Versuchsfeldern handelt es sich um die gezielte Aussaat von F2-Samen, welche von Hybriden gewonnen worden. Damit sollte ein „definierter Durchwuchs“ dargestellt werden. Die Entnahmezeitpunkte von Blatt- und Samenmaterial waren unterschiedlich:

- bei Blühende: Blattmaterial für die Genomuntersuchungen
- ab Schwadmähreife bis BBCH 85: Samenmaterial für die Qualitätsuntersuchungen

Bei der Entnahme des Blattmaterials wurden die Einzelpflanzen nicht markiert. Die Pflanzen standen in großen Rapsbeständen, und es wäre nicht möglich gewesen, diese Pflanzen zeitnah zur Ernte wiederzufinden und für die Entnahme des Samenmaterials zu verwenden. Insofern stammen die Proben des Blattmaterials für die Genomuntersuchungen und die Proben des Samenmaterials für die Qualitätsuntersuchungen nicht von den gleichen Pflanzen ab, was sicherlich wünschenswert gewesen wäre, was aber nicht praktikabel war, sondern sie stammen von unterschiedlichen Pflanzen ab. In Abb. 1 sind die Standorte der Praxisschläge markiert.

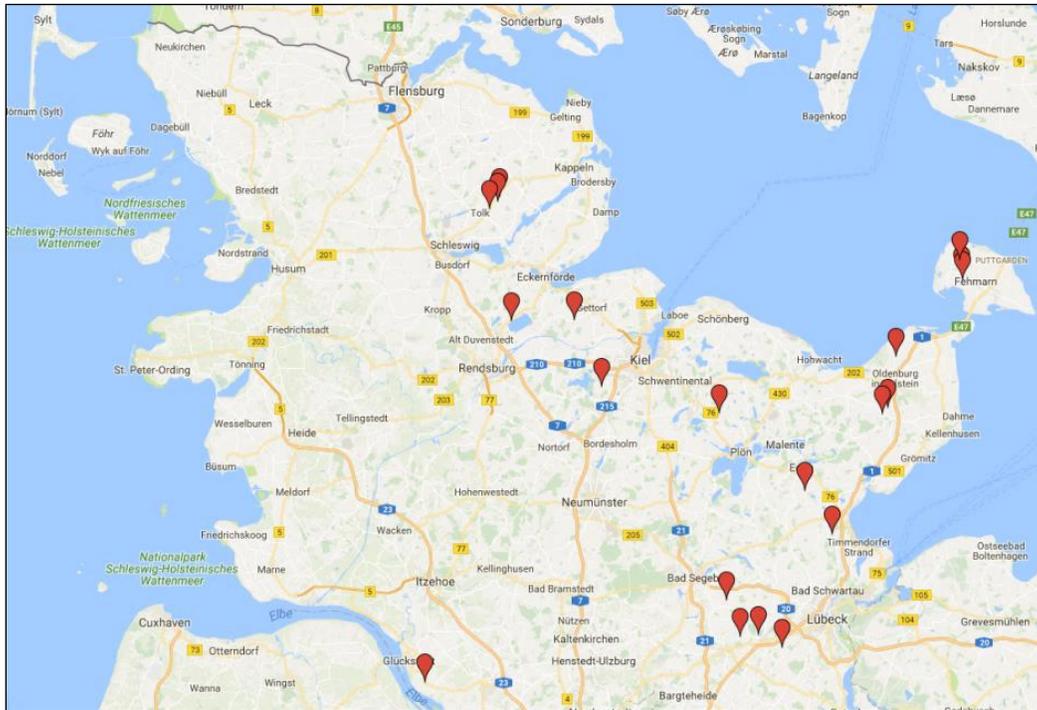


Abb. 1: Karte von Schleswig-Holstein mit Markierungen der Praxisbestände, in denen Durchwuchs- und Normaltypen für die Untersuchungen beprobt wurden. Jede rote Markierung repräsentiert einen beprobten Rapsschlag.

Fig. 1: Map of Schleswig-Holstein. Production fields from which samples of volunteer- and normal rapeseed plants were taken are labelled in red.

Die genommenen Proben sind in Durchwuchs- und Normaltypen unterteilt worden. An dem Standort mit den von zwei Versuchsfeldern gewonnenen F₂-Populationen war die Unterscheidung von Durchwuchs- und Normaltypen nicht möglich. In diesem Material traten keine phänotypisch extrem auffälligen Durchwuchspflanzen, wie sie aus den Praxisbeständen bekannt waren, auf. Dies gilt auch für die Blattprobennahme im Praxisschlag 12. Auf den Praxisschlägen wurden jeweils 5 Normal- und 10 Durchwuchstypen beprobt. Auf den Versuchsfeldern wurden jeweils 10 F₂-Pflanzen beprobt, welche somit definiertem Durchwuchs der 1. Generation nach dem Anbau eine F₁-Hybride entsprechen. Bei der Ernte des Materials wurde jeweils die Durchschnittshöhe der Normal- und Durchwuchstypen registriert. Eine Übersicht über das geerntete Pflanzenmaterial ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Übersicht über Anzahl und Durchschnittshöhe der beprobten Pflanzen in Praxisschlägen und Versuchsfeldern in Schleswig-Holstein. Zusätzlich angegeben sind die angebauten Sorten, die dem Normaltyp entspricht.

Tab. 1: Summary of field probes taken from production fields in Schleswig-Holstein. The number of plants probed and the plant height are given together with the variety which had been sown in this year and which should represent the 'normal' type.

Herkunft	Anzahl an Pflanzen			Durchschnittshöhe der Pflanzen (cm)	
	Normaltyp	Durchwuchs typ	Ausgesäte Sorte	Normaltyp	Durchwuchstyp
Praxisschläge					
Schlag 1	5	10	SY Alister	155	220
Schlag 2	5	10	Visby	165	240
Schlag 3	5	10	Mentor	160	220
Schlag 4	5	10	PR46W20	150	180
Schlag 5	5	10	Mercedes	150	220
Schlag 6	5	10	Mentor	160	230
Schlag 7	5	10	SY Alister	165	200
Schlag 8	5	10	Visby	160	205
Schlag 9	5	10	Mentor	160	220
Schlag 10	5	10	Raptor	175	235
Schlag 11	5	10	Sherpa	155	215
Schlag 12	5	10	SY Alister	160	240
Schlag 13	5	10	SY Alister	160	230
Schlag 14	5	10	Visby	155	255
Schlag 16	5	10	Visby	155	210
Schlag 17	5	10	Sherpa	160	210
Schlag 18	5	10	DK Eximus	160	240
Schlag 19	5	10	Avatar	165	230
Schlag 20	5	10	Mendelson	150	180
Schlag 21	5	10	Mentor	175	215
Schlag 22	5	10	Raptor	150	240
Schlag 24	5	10	Trinity	170	240
Schlag 25	5	10	unbekannt	150	220
Angebauter Durchwuchs in F2 Generation					
DWA 14/2015	10	0	-	-	-
DWA 20/2015	10	0	-	-	-
Total	135	230	Durchschnitt	159,35	221,52



Abb. 2: (A) Praxisschlag in Schleswig-Holstein, in dem Durchwuchstypen klar über den Bestand hinausragen. (B) zeigt den Vergleich zwischen einem Durchwuchs- und Normaltyp, die vom gleichen Schlag geerntet wurden. Es ist ersichtlich, dass der Durchwuchstyp (rechts) stärker verzweigt, buschiger und länger ist. (Fotos: Dr. Wolfgang Sauermann)

Fig. 2: (A) rapeseed volunteer plants in a production field which are much longer as the plants from the variety sown by the farmer. (B) comparison between volunteer and normal type plants. The volunteer plant is bigger, bushier and has more branches than the normal type.

(Pictures: Dr. Wolfgang Sauermann)

Die Probenahme wurde durch Fach- und Hilfskräfte der Landwirtschaftskammer Schleswig-Holstein (LKSH) und der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel durchgeführt. Es wurde dabei auf die unterschiedlichen Wuchstypen der Pflanzen geachtet. Die Zuordnung der einzelnen Pflanzen zu normal wüchsigen Pflanzen oder zu phänotypisch stark abweichenden Durchwuchspflanzen erfolgte nach subjektiver Einschätzung im Feld. In Abb. 2A ist ein beprobter Praxisschlag zu sehen, bei dem der Durchwuchstyp deutlich über den Bestand ragt. Der direkte Vergleich von Einzelpflanzen ist in Abb. 2B zu sehen. Auch hier sind Unterschiede im Wuchs klar zu erkennen.

Die zweite Quelle war Saatgut von 105 unterschiedlichen neuen und alten Rapsorten, die in den Jahren von 1953 bis 2014 zugelassen wurden. Ursprünglich waren rund 200 Sorten, welche in den Landessortenversuchen in Schleswig-Holstein in der Prüfung standen und welche Bedeutung im Praxisanbau erlangt hatten und somit als Quelle für potentiellen Durchwuchs infrage kommen, bei den unterschiedlichen Institutionen angefragt wurden. Leider stellte sich aber dabei heraus, dass viele Sorten nicht mehr in Form von Saatgut verfügbar waren. Bei einigen Sorten war es von Seiten der Züchterhäuser untersagt worden, Genomuntersuchungen am Material durchzuführen. Somit verblieben insgesamt 105 unterschiedliche Sorten, worunter auch einige Rübensorten waren. Es handelte sich grundsätzlich um Winterformen. Die Samen wurden von mehreren Züchtern, dem Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und

Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben und der LKSH zur Verfügung gestellt. Das verfügbare Material wurde in den Gewächshäusern der CAU zu Kiel angezogen. Von den angezogenen Pflanzen wurden Blattproben von jeweils 5 Pflanzen pro Sorte genommen. Eine Übersicht über die beprobten Referenzsorten ist in Tab. 2 gegeben.

Tab. 2: Übersicht über die geernteten Referenzsorten in Bezug auf Sortentyp, Qualität und Zulassungsjahr.

Tab. 2: Reference varieties used in this study. The year of release and quality parameters are given.

Sortentyp	Qualität	Zulassungsjahr	Anzahl Sorten
Körnerraps			
Liniensorte	++	1953-1971	6
Liniensorte	0	1973-1981	8
Synthetische Sorte	0	1979-1984	5
Liniensorte	00	1984-2007	24
Hybridsorte	00	1990-2014	42
Futterraps			
Liniensorte	++	1969-1988	7
Liniensorte	0	1977-1986	6
Rübsen			
Populationssorte	++	1969-2002	4
Populationssorte	0	1984-1986	3

2.2. Genetische Untersuchungen

DNA Isolation

DNA wurde mit der CTAB-Methode nach CLARKE (2009) aus den Blattproben isoliert. Die DNA-Konzentration wurde mit einem 1%-Agarosegel und folgend mit einem NanoDrop™2000 bestimmt, um anschließend die DNA-Konzentration auf 10 ng/μL zu normalisieren. Dabei wurden aus jeweils zwei Normaltypen, sechs Durchwuchstypen, einer Referenzsorte und sieben definierten Durchwuchspflanzen DNA isoliert.

Auswahl von SSR Markern

Für die Genotypisierung mit SSR Markern wurden 40 SSR Marker aus öffentlichen Datenbanken ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass mit den Markern alle Kopplungsgruppen abgedeckt werden (CHENG et al. 2009; LI et al. 2013) und dass bei

einigen Markern eine Kopplung mit Glucosinolat-QTL besteht (HASAN et al. 2008). Um zu testen, ob die Marker in dem vorhandenen Material amplifizieren, wurde mit jedem SSR-Primer eine PCR durchgeführt. Dabei wurde ein Teil des Pflanzenmaterials genutzt, welcher eine Vielzahl an Züchtern, Zulassungsjahren und Qualitäten repräsentiert. 20 µL PCR Reaktion enthielten 10x PCR-Puffer mit MgCl₂, 10 mM dNTPs, je 10 pM vom Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 0.5 U *Taq*-Polymerase und 10 ng DNA Vorlage. Die PCRs wurden mit LifeTouch Thermal Cycler (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) durchgeführt. Das PCR Programm variierte nur hinsichtlich der Hybridisierungstemperatur (55°C, 55,5°C und 60°C) basierend auf dem Schmelzpunkt (T_m) der Primer und war ansonsten konstant (Denaturierung bei 94°C und Elongation bei 72°C). Die PCR Produkte wurden anschließend mittels eines 3%-Agarosegels aufgetrennt. Die Gele enthielten Ethidiumbromid und wurden anschließend unter UV-Licht fotografiert.

Die Marker, die eine Bande auf dem Agarosegel aufwiesen, wurden anschließend mit einer M13-Sequenz (SCHUELKE 2000) am 5' Ende des Vorwärtsprimers und einem Rückwärtsprimer zur M13-Sequenz, die eine fluoreszierende Markierung aufweist (Tab. 3), bestellt (Biomers, Ulm, Germany). Dabei wurden zwei M13-Rückwärtsprimer mit unterschiedlichen Wellenlängen (680 nm und 787 nm) bestellt. Anschließend wurde mit einem 6%-Polyacrylamidgel getestet, ob die Marker einen Polymorphismus aufweisen und zur Genotypisierung genutzt werden können.

10 µL PCR Reaktion enthielten dabei 10x PCR-Puffer mit MgCl₂, 10 mM dNTPs, 10 pM vom Vorwärtsprimer mit M13-Sequenz, 10 pM Rückwärtsprimer, 10 pM des M13 Rückwärtsprimers mit fluoreszierender Markierung und 0,25 U *Taq*-Polymerase. Es wurde das oben genannte PCR Programm verwendet und lediglich nach der T_m der Primer modifiziert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem LICOR DNA Analyzer 4300 (LICOR Bioscience, Lincoln, USA). Dabei wurde die fluoreszierende Markierung genutzt, um die Fragmente sichtbar zu machen.

Tab. 3: Sequenz der M13 Primer, die für die PCR verwendet wurden.

Tab. 3: M13-primers used for PCR.

M13 Sequenz am Vorwärtsprimer	5'-CACGACGTTGTAACGAC - Primersequenz-3'
Fluoreszierende Markierung am M13 Rückwärtsprimer	5'- GTCGTTTACAACGTCGTG- Fluoreszierende Markierung-3'

Marker, die eine monomorphe Bande aufwiesen, oder mit der M13-Sequenz keine Fragmente zeigten, konnten nicht für die Genotypisierung genutzt werden. Gleiches gilt für Marker, die kein eindeutiges Bandenmuster aufwiesen.

Auswahl der AFLP Marker

Die Genotypisierung mit AFLP Markern erfolgte in 4 Schritten: (1) Restriktion, (2) Ligation, (3) Prä-Amplifikation, (4) Haupt-Amplifikation.

Im ersten Schritt wurden 100 ng DNA auf 20 µL von den Restriktionsenzymen *PstI* (5'-T|TAA-3'/5'-AAT|T-3') und *MseI* (5'-CTGCA|G-3'/5'-G|ACGTC-3') in Fragmente geschnitten. Dazu wurden zur DNA Vorlage 6 U *MseI*, 5*RL-Puffer und H₂O zugegeben, sodass der Restriktionsmix 30 µL enthielt. Dieser Mix wurde für eine Stunde bei 65°C inkubiert. Nach der Restriktion mit *MseI* wurden zum Restriktionsmix 10 µL mit 6 U *PstI*, 5*RL-Puffer und H₂O hinzugefügt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Im zweiten Schritt wurden an die Fragmente Adapter ligiert (Tab. 4). Dazu wurden zum Restriktionsmix 10 µL mit 5 pM *PstI*-Adapter, 50 pM *MseI*-Adapter, 100 mM ATP, 2 U T4 DNA Ligase, 5*RL-Puffer und H₂O hinzugegeben. Dieser Mix wurde für drei Stunden bei 37°C inkubiert.

Tab. 4: Adaptersequenzen, die für die AFLP-Analysen verwendet wurden.

Tab. 4: Adaptor sequences used for AFLP studies.

Enzym	Adaptersequenz
<i>PstI</i> -Vorwärts	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA-3'
<i>PstI</i> -Rückwärts	5'-TG TAC GCA GTC TAC-3'
<i>MseI</i> -Vorwärts	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
<i>MseI</i> -Rückwärts	5'-TA C TCA GGA CTC AT-3'

Im dritten Schritt wurde die Anzahl der Fragmente reduziert, die während der Restriktion entstanden sind. Dazu wurden 25 µL des Restriktions- und Ligationsmixes mit 100 µL TE-Puffer versetzt. Zur Reduzierung der Anzahl der Fragmente wurden für die PCRs Primer benutzt, die an den ligierten Adapter binden und zusätzlich eine selektive Base besitzen (Tab. 7). Für 15 µL PCR Reaktion wurden 10x PCR-Puffer mit MgCl₂, 2 mM dNTPs, je 50 ng/µL P01 und M01 Primer, 1 U *Taq*-Polymerase und 5µL Restriktions-Ligationsmix vermischt. Das PCR Programm ist in Tab. 5 dargestellt. Nach der PCR wurden zu dem Prä-Amplifikationsmix 180 µL TE-Puffer hinzugefügt.

Tab. 5: PCR Programm für die Prä-Amplifikation.*Tab. 5: PCR conditions for pre-amplification.*

Temperatur in °C	Zeit in s	Zyklen
94	30	
94	30	
56	30	23
72	60	
72	300	
12	∞	

Im vierten Schritt wurde die Anzahl der Fragmente erneut reduziert. Dabei wurden Primer genutzt, die wieder an die Adapter binden, jedoch wurden anstatt einer selektiven Base, wie während der Prä-Amplifikation, drei selektive Basen genutzt (Tab. 7). Hierfür wurden 15 µL PCR-Reaktionsmix, 10x PCR-Puffer mit MgCl₂, 2 mM dNTPs, je 50 ng/µL *Pst*- und *Mse*-Primer und 1 U *Taq*-Polymerase mit 5 µL Prä-Amplifikationsmix versetzt. Das PCR-Programm der Hauptamplifikation ist in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: PCR Programm für die Elongation und Denaturierung.*Tab. 6: PCR conditions for elongation and denaturation.*

Temperatur in °C	Zeit in s	Zyklen
94	30	
94	30	
65 -> 56	30	13
72	60	
94	30	
56	30	23
72	60	
72	300	
12	∞	

Um die Fragmente später auf einem Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, besitzen die *Pst*-Primer eine fluoreszierende Markierung. Um die Wiederholbarkeit des Bandenmusters zu überprüfen, wurden die PCRs mit einer zweiten fluoreszierenden Markierung mit anderer Wellenlänge wiederholt und auf dem gleichen Gel untersucht. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte mit einem LICOR DNA Analyzer 4300 auf einem 6%-Polyacrylamidgel.

Tab. 7: AFLP-Primer- Sequenzen

Tab. 7: AFLP primer sequences

Adapter	Primer	Sequenz
Prä-Amplifikation		
<i>Pst</i> I	P01	5'- GAC TGC GTA CAT GCA G + A -3'
<i>Mse</i> I	M01	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A + A -3'
Haupt-Amplifikation		
<i>Pst</i> I	P32	5'- GAC TGC GTA CAT GCA G + AAC -3'
<i>Pst</i> I	P35	5'- GAC TGC GTA CAT GCA G + ACA -3'
<i>Mse</i> I	M31	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A + AAA -3'
<i>Mse</i> I	M32	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A + AAC -3'
<i>Mse</i> I	M33	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A + AAG -3'
<i>Mse</i> I	M36	5'- GAT GAG TCC TGA GTA A + ACC -3'

2.3. Auswertung der Polyacrylamidgele

Die Aufnahmen der Polyacrylamidgele nach der Auftrennung wurden mithilfe der GelBuddy Software (ZERR and HENIKOFF 2005) analysiert. Da zwei IRDyes mit unterschiedlichen Wellenlängen genutzt wurden, konnte man mit einem Gel zwei unterschiedliche Aufnahmen generieren. Bei der Genotypisierung der SSR Marker wurden somit bis zu 4 verschiedene Marker auf einem Gel aufgetrennt. Für die AFLP Marker wurden die zwei Aufnahmen pro Gel dafür verwendet, zu testen, ob das Fragmentmuster nach zwei separaten PCRs wiederholbar ist. Eine Bande wurde nur dann ausgewertet, wenn sie auf beiden Gelen vorhanden war. Mittels PowerMarker v3.25 (LIU and MUSE 2005) wurden die Werte der Genotypisierung zusammengefasst, inklusive der Berechnung der Anzahl der Allele, der Anzahl Allele pro Marker, der Anzahl der Haplotypen, sowie des Heterozygotiegrades. Die Werte für die Heterozygotie wurden für die einzelnen Sortentypen, die Feldpflanzen und den definierten Durchwuchs auf Basis der SSR Marker berechnet.

Ogleich Raps allopolyploid ist, wurde für die statistische Analyse angenommen, dass der Raps diploid sei. Das heißt, dass davon ausgegangen wird, dass nur ein Genom (A oder C) Ausgangspunkt der Variation ist. Anschließend wurden SSR Marker von der kürzesten zur längsten Bande ausgewertet. Dabei bekam ein Nullallel den Wert 1, das kleinste gefundene Fragment den Wert 2 und alle größeren Fragmente wurden aufsteigend nummeriert. Die Fragmente der AFLP Marker wurden von 50 bis 550 bp ausgewertet. Bei der Abwesenheit eines Fragments wurde eine 0 erfasst und wenn ein

Fragment vorhanden war, eine 1. Falls eine Fragmentbande in weniger als 5% des Materials anwesend bzw. abwesend war, wurde die Fragmentbande nicht zur Genotypisierung genutzt. Damit die Berechnung der Zugehörigkeit über die statistischen Verfahren für diploide Organismen unterstützt wird, wurden die Werte der Auswertung der AFLP Marker verdoppelt.

2.4. Berechnung der genetischen Ähnlichkeit von extremen Durchwuchspflanzen

Die Berechnung der genetischen Ähnlichkeit wurde mit R (R CORE TEAM 2014) durchgeführt. Dabei wurde das R paket „adegenet“ (JOMBART 2008) mit der explorativen Methode der Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) verwendet (JOMBART et al. 2010).

Die Berechnung der genetischen Verwandtschaft mit der DAPC Methode ohne vorherige Kenntnis über die Gruppierung der Pflanzen ist ein dreistufiger Prozess. Als erstes wird eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Dabei wird versucht, mit einer möglichst geringen Anzahl an Linearkombinationen die Variation der Genotypisierungsergebnisse darzustellen und somit zu vereinfachen. Die Hauptkomponenten werden dann als Principal Component bezeichnet (PC). Die Ergebnisse der PCA werden dann genutzt, um mit dem K-means Algorithmus Gruppen zu definieren. Um Gruppen zu definieren, wird die Varianz in „zwischen Gruppen Varianz“ und „in Gruppen Varianz“ unterteilt. Mit dem Bayesian Information Criterion (BIC) wird die wahrscheinlichste Anzahl an Gruppen bestimmt. Bei dieser Studie wurde der BIC für die Gruppen 1 bis 40 berechnet. Je kleiner der BIC und je stärker die Abnahme des BIC von Gruppenanzahl zu Gruppenanzahl ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Anzahl an Gruppen einer optimalen Repräsentation der Daten entspricht. Für die Gruppierung mit K-means wurden hier alle PCs genutzt. Um zu überprüfen, ob die Gruppierung mit dem K-means Algorithmus die Pflanzen in die Gruppe mit der höchsten Wahrscheinlichkeit eingeordnet hat, wird eine Diskriminanzanalyse (DA) durchgeführt. Mit der DA wird auch die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der eine Pflanze zu einer Gruppe zugehörig ist. Um eine Überanpassung zu verhindern, wurden in dieser Arbeit 22 PCs genutzt. Des Weiteren wurden hier alle Eigenwerte für die DA genutzt. Die Eigenwerte repräsentieren das Verhältnis von In-Gruppen und Zwischen-Gruppen Varianz der DA. In dieser Studie wurde eine Pflanze einer Gruppe zugeordnet, wenn die Gruppenzugehörigkeit größer als 0,9 war. Da „adegenet“ nicht die Möglichkeit bietet, die PCR zu visualisieren, wurde eine separate PCA mit dem R Paket „stats“ berechnet und mit dem R Paket „ggfortify“ (HORIKOSHI and TANG 2016) visualisiert.

2.5. Analyse des Samenmaterials

Bestimmung des Erucasäure- und Glucosinolatgehaltes

Die Analyse der Qualitätsparameter Erucasäure- und Glucosinolatgehalt wurde über den Bundesverband Deutscher Pflanzenzüchter e.V. organisiert und im Labor der Norddeutschen Pflanzenzucht Hans-Georg Lembke KG durchgeführt.

Das Fettsäuremuster des Rapsöls wurde mittels Gaschromatografie bestimmt. Dazu wurden Ramsche, getrennt nach Normal- und Durchwuchstypen, von jedem Praxisschlag und den zwei Herkünften aus den Versuchsfeldern analysiert.

Die Glucosinolatgehalte im Rapsschrot wurden mittels Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) gemessen. Dazu wurden jeweils die Samen von den Einzelpflanzen verwendet, die an den unterschiedlichen Standorten geerntet wurden.

Test der sekundären Dormanz

Der Test zur sekundären Dormanz wurde als Auftragsarbeit an der Universität Hohenheim im Labor von Prof. Dr. Sabine Gruber nach dem Protokoll von WEBER et al. (2010) durchgeführt. Dazu wurden von jedem der 23 Praxisschläge 4 Wiederholungen mit je 100 Samen, getrennt nach Normal- und Durchwuchstypen, analysiert und der Anteil an Samen bestimmt, die eine sekundäre Dormanz ausgebildet haben. Bei diesen Ergebnissen ist allerdings zu berücksichtigen, dass diese Untersuchungen erst nach dem Vorliegen von Vorergebnissen, und damit erst während des laufenden Projektes beantragt werden konnten. Bis alle Dinge geklärt waren, und weil die Untersuchungen insgesamt einen Zeitraum von etwa 8 Wochen in Anspruch nehmen, in der die Proben laufend betreut werden müssen und die Zeitspanne von Mitte Dezember bis Anfang Januar damit ausschied, konnten diese Untersuchungen erst im Januar 2016 beginnen. Zwischen der Ernte und dem Beginn dieser Untersuchungen lagen also rund 6 Monate. Die Ergebnisse zur Ausbildung der sekundären Dormanz müssen vor diesem Hintergrund betrachtet werden.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der genetischen Ähnlichkeit zwischen Normal- und Durchwuchstypen sowie zwischen alten und neuen Rapsorten

SSR Marker

Von den 40 getesteten SSR Markern konnten nach dem ersten Test auf dem Agarosegel 31 Marker mit der M13-Sequenz weiter getestet werden. Von den 31 SSR Markern die auf dem Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, konnten 18 zur Genotypisierung genutzt werden. Eine Zusammenfassung, welche Marker getestet wurden und ob sie zur Genotypisierung genutzt werden konnten, ist in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Informationen über die öffentlich zugänglichen SSR Marker, die in dieser Studie getestet wurden. nA=keine Angabe, kA=keine Amplifikation, AGE=Agarose-Gelelektrophorese, PAGE = Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Tab. 8: Publicly available SSR marker used in this study. nA=unknown, kA=no amplification, AGE=Agarose Gel Electrophoresis, PAGE=Polyacrylamid Gel Electrophoresis.

SSR Marker	Kopplungsgruppe	Erwartete Fragmentgröße [bp]	Beobachtete Fragmentgröße (min/max) [bp]	Anzahl der Fragmente	Analyse-Methode	Genutzt zur Genotypisierung
BnGMS602	A1	218	220	1	PAGE	Nein
BnGMS254	A2	195	kA	0	AGE	Nein
BnGMS291	A3	345	kA	0	AGE	Nein
BnGMS165	A4	364	363/399	4	PAGE	Ja
BnGMS662	A5	205	220	1	PAGE	Nein
BnGMS317	A6	259	274/284	6	PAGE	Ja
BnGMS422	A7	307	310	1	PAGE	Nein
BnGMS315	A8	257	kA	0	PAGE	Nein
BnGMS338	A9	367	kA	0	AGE	Nein
BnGMS9	A10	126	kA	0	PAGE	Nein
BnGMS271	C1	304	320	1	PAGE	Nein
BnGMS239	C2	380	400/404	2	PAGE	Nein
BnGMS2	C3	236	237/261	5	PAGE	Ja
BnGMS347	C4	273	290/294	1	PAGE	Nein
BnGMS205	C6	256	205/250	3	PAGE	Nein
BnGMS386	C7	220	231/239	4	PAGE	Ja
BnGMS3	C8	359	350/365	2	PAGE	Nein

BnGMS185	C9	371	390/406	2	PAGE	Ja
Gi28	nA	nA	404/408	2	PAGE	Nein
Gi24	nA	nA	230	1	PAGE	Nein
BrGMS4031	A1	200	213/225	6	PAGE	Ja
BnGMS0945	A2	167	174/190	5	PAGE	Ja
BrGMS1569	A3	385	kA	0	PAGE	Nein
BrGMS1713	A4	173	~180	1	AGE	Nein
BrGMS4151	A5	219	232/247	4	PAGE	Ja
BrGMS2130	A6	355	kA	0	AGE	Nein
BnEMS0753	A6	187	204/218	4	PAGE	Ja
BnEMS0620	A7	177	194/202	3	PAGE	Ja
BnGMS0373	A8	279	288/294	3	PAGE	Ja
BrGMS0454	A9	289	kA	0	AGE	Nein
BrGMS0899	A10	247	kA	0	AGE	Nein
BoGMS1897	C1	205	224/226	2	PAGE	Ja
BoGMS1652	C2	205	208/224	2	PAGE	Ja
BRAS087	C3	nA	189/195	2	PAGE	Ja
Na12-D09	C4	nA	kA	0	AGE	Nein
BnGMS1004	C5	248	263/267	2	PAGE	Ja
BoGMS1697	C6	210	220	1	AGE	Nein
BoGMS2499	C7	213	206/232	3	PAGE	Ja
BoGMS1145	C8	345	352/364	2	PAGE	Ja
BoGMS3608	C9	190	202/208	2	PAGE	Ja

Die Auswertung der Banden erfolgte mit der GelBuddy Software. Ein Beispiel ist in Abb. 3 dargestellt. Die Marker zeigen dabei klar definierte Banden und weisen jeweils drei verschiedene Allele auf, die in vier Haplotypen resultieren.

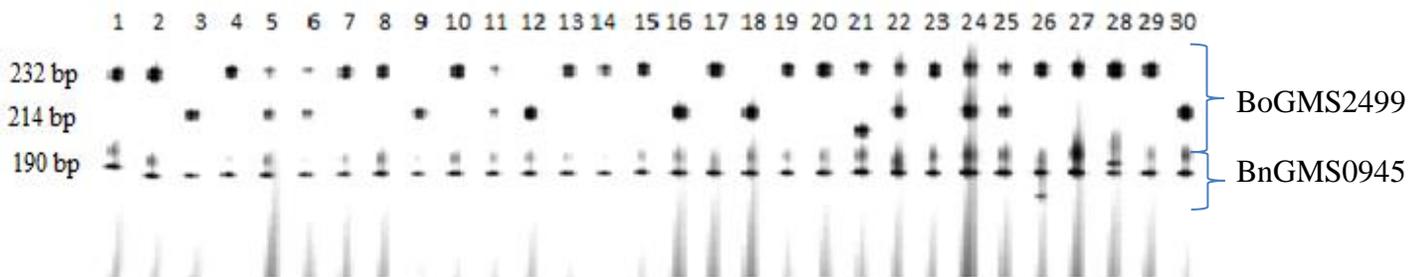


Abb. 3: Polyacrylamidgel mit amplifizierten Fragmenten zweier SSR Marker. Die 30 Proben weisen bei beiden Markern drei Allele auf.

Fig. 3: Polyacrylamid gel with two SSR markers segregating into three alleles.

AFLP Marker

Die vier AFLP Primerkombinationen produzierten komplexe Bandenmuster und konnten somit genutzt werden, um Polymorphismen im Pflanzenmaterial sichtbar zu machen. Zur Analyse wurde auch hier die GelBuddy Software genutzt. Fragmente wurden von 60 bp bis 509 bp ausgewertet. Alle Ergebnisse waren wiederholbar. Die Fragmente, die ausgewertet werden konnten, sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Fragmente die durch die entsprechenden AFLP-Primer amplifiziert wurden und für die Genotypisierung genutzt werden konnten.

Tab. 9: Scorable AFLP fragments used for genotyping.

Primer Kombination	AFLP Fragmentgröße [bp]
M31/P32	75
M31/P32	79
M31/P32	109
M31/P32	111
M31/P32	113
M31/P32	124
M31/P32	163
M31/P32	165
M31/P32	167
M31/P32	223
M31/P32	245
M31/P32	248
M31/P32	256
M31/P32	258
M31/P32	263
M31/P32	281
M31/P32	294
M31/P32	339
M31/P32	394
M31/P32	509
M32/P32	90
M32/P32	92
M32/P32	102
M32/P32	120
M32/P32	122
M32/P32	125
M32/P32	138

M32/P32	177
M32/P32	179
M32/P32	203
M32/P32	227
M32/P32	277
M32/P32	285
M32/P32	320
M33/P32	83
M33/P32	108
M33/P32	124
M33/P32	181
M33/P32	190
M33/P32	227
M33/P32	233
M33/P32	256
M33/P32	271
M33/P32	274
M33/P32	277
M36/P35	60
M36/P35	64
M36/P35	71
M36/P35	93
M36/P35	126
M36/P35	141
M36/P35	163
M36/P35	169
M36/P35	195
M36/P35	252
M36/P35	440

In

Abb. 4 ist ein Polyacrylamidgel mit der Primerkombination M33-P32 von 50 bp bis 364 bp dargestellt. Die schwarzen Pfeile weisen dabei auf Banden hin, die ausgewertet werden konnten.

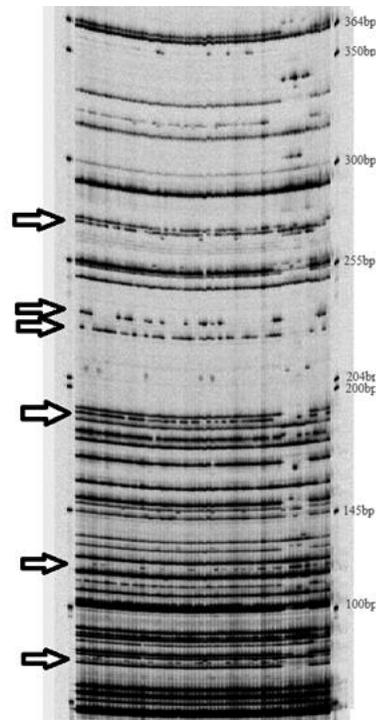


Abb. 4: Ausschnitt eines Polyacrylamidgels der Primerkombination M33-P32, bei dem im Bereich von 50 bp bis 364 bp mehrere Banden zur Genotypisierung genutzt werden konnten.

Fig. 4: Part of a polyacrylamide showing fragments which had been amplified with the primer combination M33-P32. Black arrows indicate scorable bands.

3.2. Ergebnisse der Genotypisierung mit SSR- und AFLP-Markern

Von den 40 getesteten SSR Markern konnten 18 zur Genotypisierung genutzt werden. Die 18 SSR Marker produzierten 78 Allele (inklusive der Nullallele). Dies entspricht einem Durchschnitt von 4,33 Allelen pro Marker, mit einem Minimum von 3 und einem Maximum von 7 Allelen. Die Anzahl der Haplotypen pro Marker liegt im Durchschnitt bei 6,72, mit einem Minimum von 4 und einem Maximum von 13 Haplotypen. Die Heterozygotie über alle Pflanzen liegt bei 0,15.

Von den AFLP Markern konnten alle Primerkombinationen ausgewertet werden und 56 Fragmente konnten für die Genotypisierung genutzt werden. Weil AFLP Marker ein dominantes Markersystem sind, sind Berechnungen der Anzahlen der Allele und Haplotypen nur eingeschränkt aussagekräftig. Daher wurden diese Werte hier nicht berechnet. Die Heterozygotie kann mit AFLP Markern nicht berechnet werden.

Die Berechnungen der Heterozygotie mit SSR Markern weisen für die Hybridsorten einen Wert von 0,25 auf, für die Linien- und synthetischen Sorten hingegen einen Wert von 0,04 bis 0,1. Die Normaltypen weisen eine Heterozygotie von 0,22 auf, die Durchwuchstypen von 0,13 und der definierte Durchwuchs hat einen Wert von 0,23.

3.3. Bestimmung der genetischen Ähnlichkeit

Der erste Schritt der DAPC Methode ist die PCA. In Abb. 5A werden die erste und zweite PC, die jeweils 10% und 3,8% der Gesamtvariation der Genotypisierungsdaten darstellen, gegeneinander aufgestellt. Mit bloßem Auge lässt die Verteilung der Punkte keine Rückschlüsse auf die Anzahl an Gruppen zu. Um die Anzahl der Gruppen basierend auf allen PCs zu berechnen, wurde der K-means Algorithmus angewandt. Der BIC stellt ein Maß für die Wahrscheinlichkeit dar, mit der K-means die optimale Anzahl annimmt. Hier wurde der BIC für jede Gruppe von K=1 bis K=40 berechnet und in Abb. 5B dargestellt. Der Wert fällt dabei von K=1 bis K=3 stark ab und ist dann moderat sinkend zwischen K=4 und K=6. Der BIC steigt dann von K=11 bis K=40 wieder an. Dies erlaubt den Rückschluss, dass die optimale Anzahl an Gruppen zwischen K=4 und K=6 liegt. Nach der ersten Durchsicht der Daten wurden K=5 Gruppen als optimale Repräsentation der Genotypisierungsdaten ausgewählt.

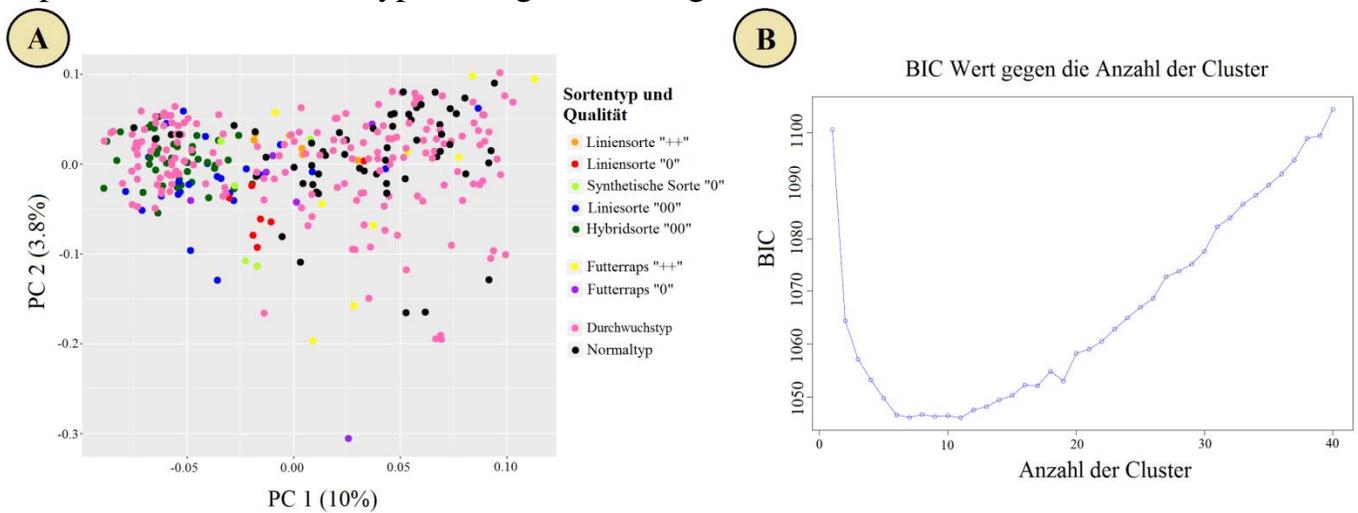


Abb. 5: (A) Erste und zweite PC basierend auf SSR und AFLP Markern. (B) BIC-Werte über einer zunehmenden Anzahl an Gruppen.

Fig. 5: (A) first and second PC based on SSR and AFLP markers. (B) BIC values depending on increasing cluster numbers.

Nachdem die Anzahl an Gruppen bestimmt worden war, konnte die DA ausgeführt werden. Dabei wurden die ersten 22 PCs genutzt, da bei zu vielen PCs das Problem der Überanpassung besteht. Die Verteilung der Pflanzen in Gruppen ist in Abb. 6 dargestellt. Die Grafik in der linken unteren Ecke der Abbildung zeigt die Anzahl der PCs, die man für die DA genutzt hat, und wie viel der Gesamtvariation sie erklären. In der rechten unteren Ecke der Abbildung ist die Anzahl der Eigenwerte der DA dargestellt, die genutzt wurden. In der Mitte der Abbildung sind die einzelnen Pflanzen in Abhängigkeit ihrer Gruppenzugehörigkeit abgebildet. Dabei entspricht die Entfernung zwischen den Gruppen der genetischen Ähnlichkeit bzw. Abweichung der Gruppen untereinander. Die Gruppen 3 und 5 auf der rechten Seite der Abbildung liegen nah beieinander, was auf genetisch ähnliche Pflanzen in den Gruppen schließen lässt. Auf der linken Seite der Abbildung befinden sich die Gruppen 1 und 4, welche untereinander nur eine geringe Ähnlichkeit aufweisen, jedoch beide von den Gruppen 3 und 5 weit entfernt liegen und damit zu diesen Gruppen genetisch unähnliche Pflanzen enthalten. Die Gruppe 2 liegt in der Mitte der Abbildung und weist damit auf Pflanzenmaterial hin, was Ähnlichkeiten zu allen übrigen Gruppen besitzt.

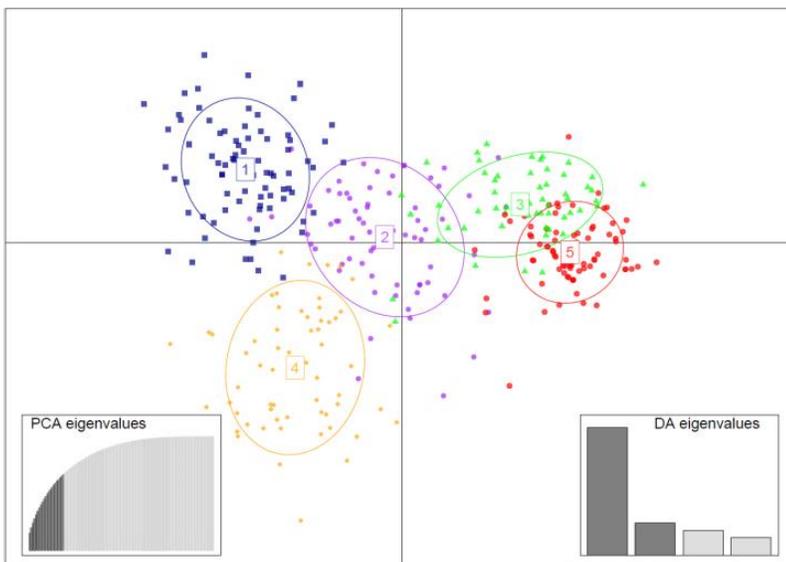


Abb. 6: Verteilung der fünf Gruppen nach der DA, basierend auf SSR und AFLP Markern. Die Anzahl der PCs, die genutzt wurden, liegt bei 22. Die Anzahl der DA Eigenwerte liegt bei 4. Die Entfernung der Gruppen untereinander weist auf genetisch ähnliche oder voneinander abweichende Pflanzen in den Gruppen hin.

Fig. 6: Arrangement of the five clusters after DA, based on SSR and AFLP markers. Calculations were carried out by using 22 PCs and 4 DA Eigenvalues. Genetic similarities and dis-similarities can be assessed by the distance between the groups.

Nachdem die grafische Darstellung der Gruppen schon erste Hinweise auf die genetische Ähnlichkeit lieferte, konnte die Zuordnung der Pflanzenproben von Praxisbeständen zu den Referenzsorten Hinweise auf die Herkunft des extremen Durchwuchses geben. Die Anzahl der Pflanzen in den jeweiligen Gruppen variiert zwischen 36 und 69 Pflanzen. Der Anteil der Pflanzen, die zu einer Gruppe zugeordnet werden konnten, beträgt 82,4%.

Gruppe 1 enthält von den Referenzsorten nur die Futterrapssorte „Akela“, welche eine „++“-Qualität aufweist und 1969 zugelassen wurde. Zu dieser Referenzsorte gruppieren 60 Durchwuchstypen. Diese Anzahl entspricht 40,5% der gesamten Durchwuchspflanzen. In Gruppe 4 befinden sich von den Referenzsorten ebenfalls ausschließlich Futterrapse. Dazu gruppieren 42 Pflanzen des Durchwuchstyps. Die Normaltypen, die zu Gruppe 4 zugeordnet wurden, stammen alle vom selben Praxisschlag.

Die Gruppen 3 und 5, die in der grafischen Darstellung entfernt von den Gruppen 1 und 4 liegen, sind von den Referenzsorten ausschließlich Hybrid- und Liniensorten mit „00“-Qualität zugeordnet worden. Damit befinden sich alle Hybridsorten, die zugeordnet werden konnten, in diesen beiden Gruppen. Ähnliches gilt für die „00“-Qualität Liniensorten. Zu diesen Referenzsorten gruppieren vor allem die Normaltypen der Praxisbestände. Allein Gruppe 5 vereinigt 65,2% aller Normaltypen. Zu diesen beiden Gruppen lassen sich auch alle Rapspflanzen der beiden definierten F₂-Hybriden zuordnen. Von den sieben Durchwuchstypen, die in Gruppe 5 zugeordnet wurden, stammen sechs vom Praxisschlag 12.

Die Gruppe 2, welche sich in der grafischen Darstellung in der Mitte zwischen den vier anderen Gruppen befindet, enthält überwiegend Körnerrapse und Futterrapse mit „++“- und „0“-Qualität. Dabei sind alle Referenzgruppen bis auf die Hybridsorten vertreten. Dazu gruppieren von den Praxisschlägen nur Durchwuchstypen. Die Gruppe 2 repräsentiert dadurch eine Mischung aus den übrigen vier Gruppen, bezogen auf die Referenzsorten, und erklärt dadurch die mittlere Position in der grafischen Darstellung.

Eine Übersicht über die Verteilung des untersuchten Pflanzenmaterials ist in Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10: Einteilung der Rapspflanzen in Gruppen basierend auf die DAPC Methode. Eine Pflanze wurde zu einer Gruppe zugeordnet, wenn ihre Zugehörigkeit größer als 0,9 ist.

Tab. 10: Arrangement of rapeseed plants into groups based on the DAPC method. A plant was assigned to a group if its association to that group was above 0.9.

		Qualität		Gruppe			Gemischt
		1	2	3	4	5	
Sortentyp							
Körnerapps							
Liniensorte	++	0	6	0	0	0	0
Liniensorte	0	0	7	0	0	0	1
Synthetische Sorte	0	0	5	0	0	0	0
Liniensorte	00	0	1	9	0	10	4
Hybridsorte	00	0	0	17	0	15	10
Futtermaps							
Liniensorte	++	1*	1	0	4	0	1
Liniensorte	0	0	4	0	2	0	0

Rapsbestände mit phänotypisch stark abweichenden Pflanzen 2015

Durchwuchstyp	-	60	18	0	42	7	21
Normaltyp	-	1	0	8	2	30	5

Definierter Durchwuchs der 1. Generation aktueller Hybridsorten

Phänotypisch	-	0	0	3	0	7	4
Normal							

*Sorte Akela, insgesamt wurden 3 Saatgut Herkünfte dieser Sorte untersucht, die alle zum gleichen Ergebnis führten und der Gruppe 1 zuzuordnen sind.

3.4. Analyse des Samenmaterials

Die Analyse der Samen von den Praxisschlägen ergab, dass der Durchwuchsrapss im Vergleich zum Normaltyp deutlich erhöhte Erucasäure- und Glucosinolatgehalte aufweist. Der Anteil sekundär dormanter Samen ist in den Durchwuchspflanzen dagegen geringfügig höher als bei den Normaltypen. In Abb. 7 sind die Unterschiede im Erucasäure- und Glucosinolatgehalt, sowie der Anteil sekundär dormanter Samen dargestellt.

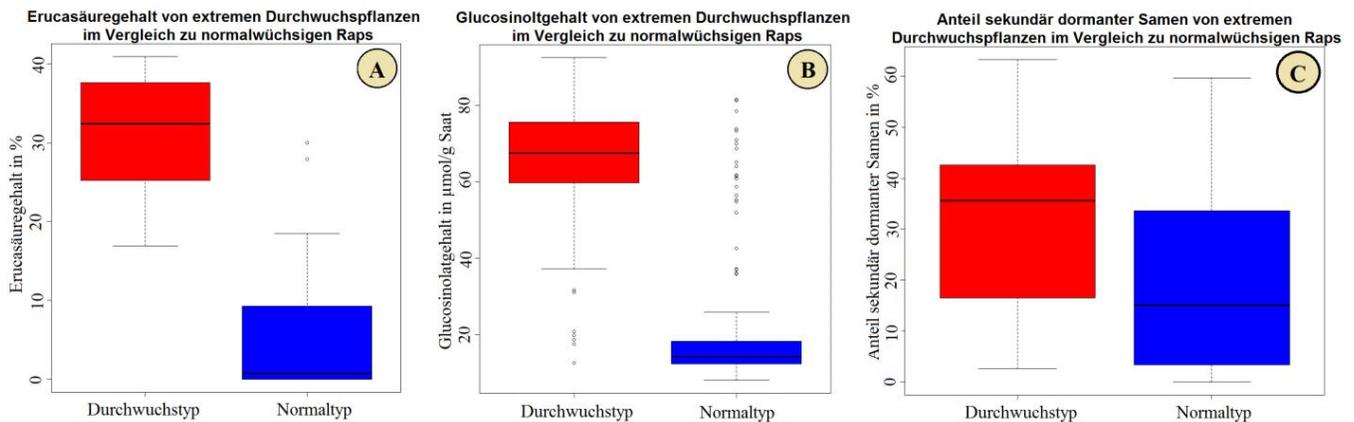


Abb. 7: (A) Erucasäuregehalte von Ramschen der Samen aller Praxisschläge gemessen mittels Gaschromatografie. (B) Glucosinolatgehalte von 229 Durchwuchs- und 115 Normaltypen gemessen mittels NIRS. (C) Anteil sekundär dormanter Samen von Durchwuchs- und Normaltypen aus 23 Praxisschlägen in Schleswig-Holstein.

Fig. 7: (A) erucic acid contents of bulks of seed from all production fields measured by gas chromatography. (B) glucosinolate contents of 229 volunteer and 115 normal type plants measured by NIRS. (C) number of secondary dormant seeds from 23 production fields in Schleswig-Holstein.

Der Erucasäuregehalt lag bei den Durchwuchstypen im Durchschnitt bei 30,7% (Median: 32,4%) und bei den Normaltypen bei 6,0% (Median: 0,7%). Dabei liegen die Werte bei den Durchwuchstypen deutlich über dem Grenzwert von 2% für „0“-Qualität. Die Erucasäuregehalte reichen bei den Durchwuchstypen von 16,9% bis 40,9% und bei den Normaltypen von 0,0% bis 30,0%.

Der Glucosinolatgehalt liegt im Durchschnitt der Durchwuchstypen bei 66,5 µmol/g und bei den Normaltypen bei 23,1 µmol/g. Der Grenzwert für „00“-Qualität für den Glucosinolatgehalt von 18 µmol/g wird von den Durchwuchspflanzen deutlich überschritten. Die Minimal- und Maximalwerte reichen für Durchwuchsrap von 12,6 µmol/g bis 92,5 µmol/g und für die Normaltypen von 8,1 µmol/g bis 81.5 µmol/g.

Die Bestimmung der sekundären Dormanz zeigt, dass der stark abweichende Durchwuchsrap deutlich stärker zur Ausprägung der sekundären Dormanz tendiert. Den Daten liegt jedoch keine statistische Signifikanz zugrunde. Der Anteil der Samen, der eine sekundäre Dormanz bildet, ist in Abb. 7C dargestellt. Der Anteil sekundär dormanter Samen liegt bei den Durchwuchstypen bei 31,6% und bei den Normaltypen bei 21,5%. Dabei reichen die Minimal- und Maximalwerte der Durchwuchstypen von 2,6% bis 63,3% und bei den Normaltypen von 0,0% bis 59,7%.

4. Diskussion

Die vorliegende Studie zur Bestimmung der Herkunft von Rapspflanzen mit extrem abweichenden Wuchs unterscheidet sich von den bereits durchgeführten Studien von JØRGENSEN et al. (2007), ANDERSEN et al. (2010), THÖLE and DIETZ-PFEILSTETTER (2012) und SAUERMAN (2015) (siehe Abschnitt 1) dahingehend, dass in dieser Studie gezielt phänotypisch stark abweichende Durchwuchspflanzen, Normaltypen und Kontrollsorten beprobt wurden. Dadurch ist der direkte Vergleich mit diesen Studien nur eingeschränkt möglich. Die hier gewählte Auswahlmethode basiert einzig auf der phänotypischen Erscheinung der Pflanzen und ist somit praxisnah. Allerdings kann man nicht ausschließen, dass hier möglicherweise Pflanzen ausgewählt wurden, welche nicht aufgrund der Genetik sondern lediglich durch Umwelteinflüsse einen abweichenden Phänotyp aufweisen.

Die Entnahme von Probenmaterial von mehreren Personen kann ebenfalls zur unterschiedlichen Bewertungen von Pflanzen führen und eine Fehlerquelle darstellen. Ein Indiz dafür ist der Heterozygotiegrad. Dieser ist in den Referenz-Hybridsorten ähnlich hoch wie in den Normaltypen, was darauf hinweist, dass die Auswahl der Pflanzen korrekt war.

Wie die Berechnungen zur genetischen Distanz zeigen, lassen sich die Durchwuchstypen klar von den Normaltypen unterscheiden. Eine gute Unterscheidung kann auch zwischen modernen und älteren Rapsorten gemacht werden. Die Gruppen 3 und 5 enthalten dabei neben den modernen Rapsorten mit „00“-Qualität auch die Mehrzahl an Normaltypen, sowie auch den „definierten Durchwuchs“, welcher aus dem gezielten Anbau von F₂-Populationen stammt. Von den sieben Durchwuchstypen in Gruppe 5 stammen sechs Pflanzen von Praxisschlag 12, bei dem die Unterscheidung zwischen Durchwuchs- und Normaltypen schwieriger war, als bei den anderen Praxisschlägen. Dies dürfte eine Erklärung dafür sein, warum die sechs Durchwuchstypen dort gruppieren. Die Gruppen 1,2 und 4 enthielten neben den älteren Körnerrapsorten und Futterrapen vor allem die Durchwuchstypen. Die Gruppen 1 und 4 enthielten dabei nur Futterrapse, mit „++“- und „0“-Qualität. Die Gruppe 2 enthielt neben den Futterrapen auch ältere Körnerrapse mit minderer Qualität.

Besonders auffällig ist, dass in Gruppe 1 als Referenzsorte nur die Sorte „Akela“ zugeordnet wurde. Dass die Futterrapssorte „Akela“ zu einer Vielzahl von Durchwuchstypen gruppiert, könnte daran liegen, dass diese Sorte in früheren Zeiten beim Anbau von Futterraps große Bedeutung in Schleswig-Holstein hatte und wahrscheinlich zu den am meisten angebauten Futterrapssorten gehörte.

Die Verteilung der Pflanzen in die jeweiligen Gruppen und die Zuordnung von Durchwuchstypen zu Sorten mit minderer Qualität wird von den Ergebnissen der Erucasäure- und Glucosinolat-Untersuchungen unterstützt. Diese weisen für die Durchwuchstypen einen deutlich erhöhten Wert für die Qualitätsparameter auf, was den Gruppierungen in der Untersuchung der genetischen Ähnlichkeit entspricht. Die Werte der Qualitätsanalyse können jedoch nur als Indizien genutzt werden, da die Probenahme von Blatt- und Samenmaterial nicht zum gleichen Zeitpunkt erfolgte und von unterschiedlichen Pflanzen vorgenommen werden musste.

Für die Hypothese, dass die Aufspaltungen der F1-Hybridsorten den Ursprung des extremen Durchwuchses bilden, müsste der extreme Durchwuchs zu den modernen Hybridsorten gruppieren, wie es bei den F2-Populationen der Fall ist. Des Weiteren sollte auch der Heterozygotiegrad vom extremen Durchwuchs nicht stark vom Heterozygotiegrad der Hybridsorten abweichen. Dies ist in beiden Fällen jedoch nicht gegeben. Somit kann diese Hypothese verworfen werden. Das deckt sich auch mit Ergebnissen von SAUERMAN (2015) zu Untersuchungen mit Durchwuchsrap, der von aktuellen F1-Hybriden abstammt.

Die Ergebnisse der Berechnungen zur genetischen Distanz unterstützen die zweite Hypothese, dass der stark abweichende Durchwuchsrap von alten Sorten, im Besonderen vom Futterrap, abstammt.

Das Ergebnis dieser Studie wirft die Frage auf, wie hoch die Überdauerungsfähigkeit von Raps im Ackerboden ist. Frühere Studien belegen, dass Raps bis zu 17 Jahre im Boden überdauern kann (LUTMAN et al. 2003; D'HERTEFELDT et al. 2008; JØRGENSEN et al. 2007; BELTER 2016; JACCARD 1902). Jedoch wurde auf den hier beprobten Feldern mindestens seit über 30 Jahren kein Futterrap mehr angebaut. Die wahrscheinliche Erklärung ist, dass Rapssamen länger im Boden keimfähig bleiben können. In seltenen Fällen könnten auch Futterrapse zur Reife gelangen und, sofern sie nicht beim Mähdrusch geerntet werden, zufällig in den Boden gelangen. Diese Samen können dann in den folgenden Jahren wieder auflaufen. Eine Hybridisierung von alten Futterrapen und modernen Sorten ist auch möglich (ANDERSEN et al. 2010), wodurch Rapspflanzen entstehen können, die ähnliche Wuchs- und Reifeigenschaften wie moderne Sorten haben, sich von denen jedoch durch mindere Qualität und Ertrag unterscheiden. Diese müssten dann genetisch zwischen modernen und alten Sorten angesiedelt sein, wofür es in dieser Studie jedoch keine Belege gab.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur sekundären Dormanz zeigen, dass die Durchwuchstypen nur tendenziell von den Normaltypen abweichen. Dies war erwartet worden, da das Merkmal der sekundären Dormanz in unterschiedlichen Sorten variiert und züchterisch nicht bearbeitet wurde (GRUBER et al. 2009; SCHATZKI et al. 2013a). Allerdings müssen die hier vorgestellten Ergebnisse zur Ausprägung der sekundären Dormanz vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass die Untersuchungen erst 6 Monate nach der Ernte begonnen wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass die Ergebnisse durch diesen langen Zeitraum etwas anders ausgefallen sind, als wenn die Untersuchungen idealerweise unmittelbar nach der Ernte eingesetzt hätten.

Die stark abweichenden Gehalte an Erucasäure und Glucosinolaten von Durchwuchs- zu Normaltypen unterstützen nicht nur die Berechnungen zur genetischen Distanz, sondern bestätigen frühere Ergebnisse der LKSH (SAUERMAN 2016b). Nichtsdestotrotz überraschen die hohen Werte, da sie die Grenzwerte von 2% Erucasäuregehalt im Öl und 18 µmol/g Glucosinolatgehalt im Rapsschrot deutlich überschreiten. Dies zeigt, dass die Qualität in Rapsbeständen stark von den phänotypisch stark abweichenden Durchwuchspflanzen beeinflusst werden kann. Insbesondere bei einem starken Besatz mit solchen Durchwuchstypen besteht die Gefahr, dass es neben den Ernteproblemen auch beim Verkauf der Rapsernte Probleme geben kann.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- Die Berechnung der genetischen Distanz zwischen den Pflanzen hat ergeben, dass der phänotypisch stark abweichende Durchwuchs von alten Rapsorten und im Besonderen von Futterraps stammt.
- Raps-Samen können möglicherweise viel länger im Boden überdauern als vorher angenommen. Das Vorhandensein von Futterrapen liegt höchstwahrscheinlich an wiederholten Reproduktionszyklen, welche zum erneuten Eintrag von Samen in die Bodensamenbank führen.
- Die Qualitätsuntersuchungen zeigen, dass der stark abweichende Durchwuchs keine „00“-Qualität hat und dessen Grenzwerte um das 3- (Glucosinolatgehalt) bis 15-fache (Erucasäuregehalt) übersteigt.

Danksagung

Wir bedanken uns bei den Landwirten und den vermittelnden Beratern für die Benennung der Rapsschläge und die Bereitschaft, die Beprobungen auf diesen Flächen durchführen zu können. Wir danken der UFOP (Union zur Förderung von Öl- und

Proteinpflanzen e.V.) für die finanzielle Unterstützung des Projektes. Wir danken dem BDP und der Norddeutschen Pflanzenzucht in Hohenlieth für die Durchführung der Qualitätsuntersuchungen am Erntegut und Frau Professor Sabine Gruber am Institut für Allgemeinen Pflanzenbau der Universität Hohenheim für die Untersuchungen zur sekundären Dormanz.

Literaturverzeichnis

- ANDERSEN NS, RASMUSSEN J, JØRGENSEN RB (2010) You reap what you sow—or do you?—volunteers in organic row-sown and broadcast-sown oilseed rape fields. *European Journal of Agronomy* 32 (2):121-126
- BELTER A (2016) Long-Term Monitoring of Field Trial Sites with Genetically Modified Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) in Saxony-Anhalt, Germany. Fifteen Years Persistence to Date but No Spatial Dispersion. *Genes* 7 (1):3
- BEWLEY JD (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9 (7):1055-1066. doi:10.1105/tpc.9.7.1055
- CHENG X, XU J, XIA S, GU J, YANG Y, FU J, QIAN X, ZHANG S, WU J, LIU K (2009) Development and genetic mapping of microsatellite markers from genome survey sequences in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 118 (6):1121-1131. doi:10.1007/s00122-009-0967-8
- CLARKE JD (2009) Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor protocols* 2009 (3):pdb.prot5177-pdb.prot5177. doi:10.1101/pdb.prot5177
- D'HERTEFELDT T, JORGENSEN RB, PETTERSSON LB (2008) Long-term persistence of GM oilseed rape in the seedbank. *Biology Letters* 4 (3):314-317. doi:10.1098/rsbl.2008.0123
- FINCH-SAVAGE WE, LEUBNER-METZGER G (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171 (3):501-523. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x
- FINKELSTEIN R, REEVES W, ARIIZUMI T, STEBER C (2008) Molecular aspects of seed dormancy. In: *Annual Review of Plant Biology*, vol 59. *Annual Review of Plant Biology*. pp 387-415. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740
- FRANCISCA L, XF, PEZ G, PETER JW (1998) Effect of Environmental Conditions on the Dormancy and Germination of Volunteer Oilseed Rape Seed (*Brassica napus*). *Weed Science* 46 (4):419-423
- GRUBER S, BÜHLER A, MÖHRING J, CLAUPEIN W (2010) Sleepers in the soil—Vertical distribution by tillage and long-term survival of oilseed rape seeds compared with plastic pellets. *European Journal of Agronomy* 33 (2):81-88. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2010.03.003>
- GRUBER S, EMRICH K, CLAUPEIN W (2008) Management der Bodensamenbank von Raps durch Bodenbearbeitung und Genotypenwahl – Bilanz aus drei Projektjahren. *Die Bodenkultur* vol 59 (1-4). Wien
- GRUBER S, EMRICH K, CLAUPEIN W (2009) Classification of canola (*Brassica napus*) winter cultivars by secondary dormancy. *Canadian Journal of Plant Science* 89 (4):613-619

- GRUBER S, WEBER EA, CLAUPEIN W (2014) Which soils are comfortable for oilseed rape seed (*Brassica napus*) to survive? *Plant, Soil and Environment* 60 (6):280-284
- GUBLER F, MILLAR AA, JACOBSEN JV (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Current Opinion in Plant Biology* 8 (2):183-187. doi:10.1016/j.pbi.2005.01.011
- HASAN M, FRIEDT W, PONS-KÜHNEMANN J, FREITAG NM, LINK K, SNOWDON RJ (2008) Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). *Theoretical and Applied Genetics* 116 (8):1035-1049. doi:10.1007/s00122-008-0733-3
- HORIKOSHI M, TANG Y (2016) ggfortify: Data Visualization Tools for Statistical Analysis Results. vol R package version 0.2.0.
- JACCARD P (1902) Lois de distribution florale dans la zone alpine. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 38 (144)
- JOMBART T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24 (11):1403-1405. doi:10.1093/bioinformatics/btn129
- JOMBART T, DEVILLARD S, BALLOUX F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11 (1):94. doi:10.1186/1471-2156-11-94
- JØRGENSEN T, HAUSER TP, JØRGENSEN RB (2007) Adventitious presence of other varieties in oilseed rape (*Brassica napus*) from seed banks and certified seed. *Seed Science Research* 17 (2):115-125. doi:10.1017/S0960258507708103
- LI H, YOUNAS M, WANG X, LI X, CHEN L, ZHAO B, CHEN X, XU J, HOU F, HONG B, LIU G, ZHAO H, WU X, DU H, WU J, LIU K (2013) Development of a core set of single-locus SSR markers for allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 126 (4):937-947. doi:10.1007/s00122-012-2027-z
- LIU KJ, MUSE SV (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21 (9):2128-2129. doi:10.1093/bioinformatics/bti282
- LUTMAN PJW, FREEMAN SE, PEKRUN C (2003) The long-term persistence of seeds of oilseed rape (*Brassica napus*) in arable fields. *Journal of Agricultural Science* 141:231-240. doi:10.1017/s0021859603003575
- PEKRUN C, LUTMAN PJW, BAEUMER K (1997) Induction of secondary dormancy in rape seeds (*Brassica napus* L.) by prolonged imbibition under conditions of water stress or oxygen deficiency in darkness. *European Journal of Agronomy* 6 (3):245-255. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1161-0301\(96\)02051-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1161-0301(96)02051-5)
- PEKRUN C, LUTMAN PJW, BÜCHSE A, ALBERTINI A, CLAUPEIN W (2006) Reducing potential gene escape in time by appropriate post-harvest tillage—Evidence from field experiments with oilseed rape at 10 sites in Europe. *European*

- Journal of Agronomy 25 (4):289-298.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2006.06.006>
- PRICE JS, HOBSON RN, NEALE MA, BRUCE DM (1996) Seed losses in commercial harvesting of oilseed rape. Journal of Agricultural Engineering Research 65 (3):183-191. doi:10.1006/jaer.1996.0091
- R CORE TEAM (2014) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria
- SAUERMAN W (2015) Der Einfluss von Durchwuchs auf Bestandseigenschaften und Ertrag. Raps 33 (2/2015):30-35
- SAUERMAN W (2016a) Ein Rückblick auf 45 Jahre. Bauernblatt Schleswig-Holstein.
- SAUERMAN W (2016b) Zwischenfruchtraps: auf Sorten mit 00-Qualität achten! Raps 34 (2/2016):34-35
- SCHATZKI J, ALLAM M, KLÖPPEL C, NAGEL M, BÖRNER A, MÖLLERS C (2013a) Genetic variation for secondary seed dormancy and seed longevity in a set of black-seeded European winter oilseed rape cultivars. Plant Breeding 132 (2):174-179. doi:10.1111/pbr.12023
- SCHATZKI J, SCHOO B, ECKE W, HERRFURTH C, FEUSSNER I, BECKER HC, MÖLLERS C (2013b) Mapping of QTL for seed dormancy in a winter oilseed rape doubled haploid population. Theoretical and Applied Genetics 126 (9):2405-2415. doi:10.1007/s00122-013-2144-3
- SCHUELKE M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology 18 (2):233-234. doi:10.1038/72708
- THÖLE H, DIETZ-PFEILSTETTER A (2012) Molecular marker-based identification of oilseed rape volunteers with different secondary dormancy levels in oilseed rape fields. European Journal of Agronomy 43:194-200.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2012.07.003>
- WEBER EA, FRICK K, GRUBER S, CLAUPEIN W (2010) Research and development towards a laboratory method for testing the genotypic predisposition of oilseed rape (*Brassica napus* L.) to secondary dormancy. Seed Science and Technology 38 (2):298-310. doi:10.15258/sst.2010.38.2.03
- ZERR T, HENIKOFF S (2005) Automated band mapping in electrophoretic gel images using background information. Nucleic Acids Research 33 (9):2806-2812.
doi:10.1093/nar/gki580



Herausgeber:

UNION ZUR FÖRDERUNG VON
OEL- UND PROTEINPFLANZEN E.V. (UFOP)

Claire-Waldoff-Straße 7 · 10117 Berlin

info@ufop.de · www.ufop.de