Florin Daniel LIPŞA

Genetische und molekulare Untersuchungen antinutritiver phenolischer Inhaltsstoffe (Tannine) der Rapssaat (*Brassica napus* L.)

Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt

Genetische und molekulare Untersuchungen antinutritiver phenolischer Inhaltsstoffe (Tannine) der Rapssaat (*Brassica napus* L.)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. agr.) im Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Florin Daniel LIPŞA
aus Iaşi, Rumänien

Giessen 2010

Dissertation im Fachbereich

Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement

der Justus-Liebig-Universität Giessen

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I

25. Juni 2010

Dekanin:	Prof. Dr. U. Leonhäuser

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. G. Leithold
1. Gutachter:	Prof. Dr. Dr. h.c. W. Friedt
2. Gutachter:	Prof. Dr. B. Honermeier
Prüferin:	Prof. Dr. S. Schnell
Prüfer:	Prof. Dr. K. Eder

AGRARWISSENSCHAFTEN

Genetische und molekulare Untersuchungen antinutritiver phenolischer Inhaltsstoffe (Tannine) der Rapssaat (*Brassica napus* L.)

Florin Daniel LIPŞA

Giessen 2010

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.
1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2010
Zugl.: Gießen, Univ., Diss., 2010

978-3-86955-540-9

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2010
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
1. Auflage, 2010
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-540-9

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1
2. LITERATURÜBERBLICK 5
2.1 Rapsschrot als wertvolles Futtermittel 5
2.1.1 Wertgebende Komponenten 7
2.1.2 Wertmindernde und antinutritive Komponenten 12
2.2 Tannine 16
2.2.1 Allgemeines 16
2.2.2 Proanthocyanidine in Raps 20
2.2.3 Analytik von Proanthocyanidinen 21
2.2.3.1 Quantifizierung 22
2.2.3.2 Extraktion, Reinigung und Trennung 23
2.3 Anatomie und Ontogenese des Rapssamens 25
2.3.1 Aufbau des Rapssamens 25
2.3.2 Reservestoffeinlagerung im Verlauf der Ontogenese 25
2.3.3 Struktur und Funktion der Samenschale 26
2.4 Biosynthesen phenolischer Substanzen (Phenylpropanoid-Stoffwechsel) 28
2.5 Flavonoid-Akkumulation in der Samenschale 32
2.6 Bedeutung und Züchtung gelbsamiger Rapsformen 34
3. MATERIAL UND METHODEN 38
3.1 Pflanzenmaterial 38
3.2 Phänotypisierung 38
3.2.1 Ermittlung der Samenfarbe 38
3.2.1.1 Messung mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung 39
3.2.1.2 Bestimmung der Samenfarbe mittels NIRS 39
3.2.2 Bestimmung des Tanningehaltes 40
3.2.2.1 Photometrische Methode 40
3.2.2.1.1 Samenaufarbeitung und Extraktion von Tanninen 40
3.2.2.1.2 Vanillin-Methode 41
3.2.2.2 Chromatographische Trennung 42
3.2.2.2.1 Festphasenextraktion (SPE) 42
3.2.2.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) 44

3.3 Genotypisierung 45
3.3.1 Gewinnung der pflanzlichen DNA (Maxipräparation) 46
3.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten 47
3.3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese 47
3.3.2.2 Polyacrylamid-Gelektrophorese 48
3.3.3 Markeranalysen über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 49
3.3.3.1 *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP) 49
3.3.3.2 *Simple sequence repeat* (SSR) 52
3.3.4 Erstellung der genetischen Kopplungskarte 53
3.3.4.1 Auswertung der PCR-Amplifikationsprodukte 53
3.3.4.2 Genetische Kopplungsanalyse 54
3.3.5 Analyse von *Quantative Trait Loci* (QTL) 55
4. ERGEBNISSE 57
4.1 Phänotypisierung von Samenfarbe und Sameninhaltsstoffen 57
4.1.1 Bestimmung der Flavonoidzusammensetzung mittels Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) 57
4.1.2 Samenfarbe, phenolische Verbingungen und assoziierte Qualitätsmerkmale ... 62
4.1.3 Korrelationen zwischen Merkmalen in der DH-Population YE2 65
4.1.3.1 Phenolische Säure 65
4.1.3.2 Oligomere Proanthocyanidine (OPC) 68
4.1.3.3 Polymere Proanthocyanidine (PPC) 70
4.1.4 Häufigkeitsverteilungen für die untersuchten Merkmale 76
4.1.4.1 Samenfarbe 76
4.1.4.2 Oligomere Proanthocyanidin-Fraktionen (HPLC Methode) 77
4.2 Genetische Kartierung der DH-Population YE2 80
4.3 Kartierung von *Quantitative Trait Loci* (QTL) 82
4.3.1 Chromosomale QTL-Verteilung in der YE2-Population 82
4.3.2 Lokalisierung von QTL für die Samenfarbe 83
4.3.3 Lokalisierung von QTL für den Ölgehalt 84
4.3.4 QTL für den Proanthocyanidingehalt (Vanillin-Methode) 84
4.3.5 QTL für den Flavonoidgehalt (HPLC-Methode) 84

4.3.6 Lokalisierung von QTL für phenolische Säuren 84
4.3.7 QTL für oligomere Proanthocyanidine (OPC) 85
4.3.8 QTL für polymere Proanthocyanidine (PPC) 86
5. DISKUSSION 89
6. ZUSAMMENFASSUNG 98
7. SUMMARY 102
8. LITERATURVERZEICHNIS 105
9. ANHANG 126
10. DANKSAGUNG 133
Eidesstattliche Erklärung 134

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Raps (*Brassica napus* L.) gehört zur Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*, *Cruciferae*) und ist vermutlich erst vor wenigen Jahrhunderten im Mittelmeerraum (FRANKE 1989) aus der spontanen Bastardisierung zwischen wildem Gemüsekohl (*B. oleracea* L.) und Rübsen (*B. rapa* L.) entstanden. Das Genom des amphidiploiden Rapses besteht aus 2n=38 Chromosomen und setzt sich aus den Genomen der beiden Ausgangsformen zusammen. Das so genannte „U'sche Dreieck" (Abb. 1), welches von dem Japaner MORINAGA (1934) und dem Koreaner U (1935) zum ersten mal publiziert wurde, zeigt die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den drei *Brassica*-Grundgenomen: das A-Genom von Rübsen (*B. rapa*, 2n=20), das B-Genom des Schwarzen Senfes (*B. nigra*, 2n=16) und das C-Genom des Kohls (*B. oleracea*, 2n=18). Durch interspezifische Kreuzungen konnten MORINAGA und U die drei amphidiploiden Arten Raps (*B. napus* L., Genom AACC), Brauner oder Indischer Senf (*B. juncea* CERN., 2n=36, Genom AABB) und Abessinischer bzw. Äthiopischer Senf (*B. carinata* BRAUN, 2n=34, Genom BBCC) wiederherstellen. Durch diese so genannten „Resynthesen" wurde die Herkunft der amphidiploiden *Brassica*-Arten zunächst morphologisch sowie später durch molekularbiologische Analysen erklärt (PALMER *et al.* 1983).

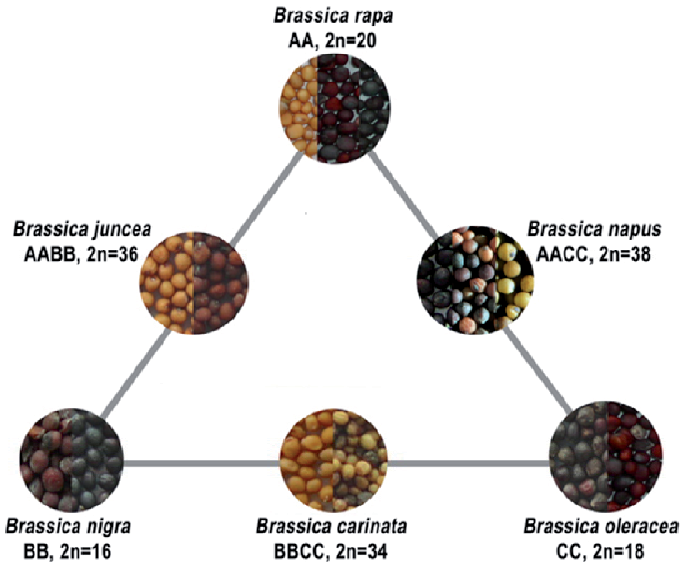

Abb. 1 - Verwandtschaftsbeziehungen in der Gattung Brassica nach U (1935). Raps (B. napus) hat normalerweise schwarze oder braune Samen, aber gelbsamige Formen können durch Kreuzungen mit den nahe verwandten Arten erzeugt werden.

Die *Brassica*-Arten sind die Ölfrüchte mit der größten Verbreitung in der gemäßigten Klimazone, u. a. in Nord- und Zentraleuropa, Kanada, China und Indien (vgl. FAOSTAT, http://faostat.fao.org). In Mitteleuropa wird vornehmlich der leistungsfähige und ertragreiche Winterraps angebaut (WALKER und BOOTH 2001).

Die rapide Entwicklung des Rapsanbaus in den letzten 25 Jahren stützt sich auf die enormen Erfolge der Pflanzenzüchtung, der es gelang, glucosinolatarme und erucasäurefreie Sorten zu entwickeln. Der so entstandene Doppel-Null (00) Raps wurde im Jahr 1987 in der BRD als Standardqualität eingeführt (RÖBBELEN 1999).

Aufgrund konsequenter und erfolgreicher Qualitätszüchtung ist Raps heutzutage eine der weltweit wichtigsten Ölpflanzen und Lieferant vielfältiger Ölqualitäten sowie der zweitwichtigste Lieferant pflanzlichen Eiweißes für die Tierernährung (WAN *et al.* 2002). Hinter der Sojabohne (220,5 Mio. t) hat Raps im Jahr 2007 mit 50,6 Millionen Tonnen Saat den zweiten Platz in der weltweiten Ölsaatenproduktion eingenommen. In Deutschland hat Winterraps mit ca. 1,5 Mio. ha Anbaufläche und einer Gesamt-Jahresproduktion von 5,3 Millionen Tonnen Saat (2007) eine dominierende Stellung im Vergleich zu Sonnenblume (19.161 ha, 50.862 t) und Lein (6.300 ha, 6.400 t). Die globale Produktion von Extraktionskuchen aus der Ölgewinnung (weltweit 204,5 Mio. t) geht zu etwa zwei Dritteln auf Sojabohne (115,8 Mio. t) und Raps (22,4 Mio. t) zurück (FAOSTAT 2007).

Raps (*B. napus* L.) stellt mit Abstand die wichtigste Ölsaat in Deutschland dar und dient aufgrund hoher Ölgehalte (40-50%) mit einer ernährungsphysiologisch günstigen Fettsäurezusammensetzung (hoher Ölsäureanteil, mehrfach ungesättigte Fettsäuren) primär als Öllieferant. In zunehmendem Maße wird die Wettbewerbsfähigkeit von 00-Körnerraps aber auch von der Inhaltsstoffzusammensetzung des Rapsmehles bzw. Schrotes als proteinreiches Koppelprodukt der Ölgewinnung bestimmt. Die politisch-rechtlichen Auswirkungen der BSE-Krise und die aktuellen Diskussionen über gentechnisch veränderte Sojabohnen (z.B. Herbizidresistenz) haben dazu geführt, dass einheimisch erzeugbare, pflanzliche Proteinquellen vermehrt nachgefragt werden und aus diesem Grund auch Rapsschrot verstärkt zum Einsatz kommt (LÜHS *et al*. 2001, FRIEDT *et al*. 2002). Der Selbstversorgungsgrad der EU bei Ölschroten beträgt derzeit immer noch weniger als 40% (vgl. GUNSTONE 2000, OILWORLD 2000).

Die verschiedenen Verwendungszwecke stellen unterschiedliche Anforderungen an die Qualität des Rapsöls. So dient Rapsöl nicht nur als Nahrungsmittel, sondern beispielsweise auch als Rohstoff für Pharmazeutika, Farben und Lacke, aber auch als Hydrauliköl in der Industrie. Darüber hinaus gewinnt Rapsöl als Rohstoff für „Biodiesel“ (Rapsmethylester,

RME) zunehmend an Bedeutung. Zusätzlich trägt das Rapsschrot als Koppelprodukt der Ölgewinnung zur Wettbewerbsfähigkeit von Raps bei, insbesondere gegenüber Sojaprodukten (LÜHS *et al.* 2000).

Rapsschrot enthält ca. 36-40% Protein mit einer günstigen Aminosäuren-Zusammensetzung und hohen Anteilen der in der Tierfütterung essentiellen Aminosäuren Lysin, Methionin und Cystein. Es zeichnet sich auch durch höhere Mineralstoff- und Vitamin-Gehalte aus. Aber herkömmliches Rapsschrot kann in der Tierernährung – insbesondere bei Monogastriern – aufgrund eines relativ hohen Rohfasergehaltes - nur begrenzt eingesetzt werden und findet daher überwiegend in der Wiederkäuerfütterung Einsatz (SCHÖNE 1993, HENKEL 1994). Um die Verwendungsmöglichkeiten des wertvollen Rapsproteins – auch in der Humanernährung – zu verbessern, gilt es nun, den Gehalt an wertmindernden Schrotinhaltsstoffen wie Rohfaser (insbes. Lignin) und einer Reihe weiterer antinutritiver Substanzen (u.a. Tannine, Phytate und Sinapine) zu reduzieren. Zu den antinutritiven Stoffen zählen auch die phenolischen Verbindungen und die Isothiocyanate, die Abbauprodukte der Glucosinolate. Die phenolischen Verbindungen umfassen phenolische Säuren und die Tannine.

Tannine können einen ungünstigen Einfluss auf die Verdauung haben, da sie durch ihre komplexbildenden Eigenschaften Enzyme inaktivieren und Proteine präzipitieren können und somit die Futtermittelqualität senken (MOÏSE *et al.* 2005). Ebenfalls komplexierende Wirkung zeigen Phytinsäure und deren Derivate, die zweiwertige Metallionen und Aminosäuren sowie größere Mengen Phosphor binden können (THIES 1994, LÜHS *et al.* 2000). Der Bitterstoff Sinapin, Hauptbestandteil der Sinapinsäureester, hemmt die Futteraufnahme und ist Ursache für den fischigen Geruch von Hühnereiern, wenn braune Legehennen, die Sinapin bzw. Trimethylamin nicht abbauen können, mit Rapsschrot gefüttert werden (THIES 1994). Dieses Problem konnte Ende 2007 seitens der Hühnerzüchtung gelöst werden und die neu gezüchteten Braunleger (ohne Enzymmutation) werden nun weltweit eingeführt.

Neben den negativen Wirkungen auf die Verdaulichkeit haben phenolische Verbindungen auch eine Vielzahl positiver Eigenschaften und zeichnen sich durch ein sehr großes Funktionsspektrum in der Pflanze aus: Sie sind für die Farbe von Samen, Blüten, Blättern und Früchten verantwortlich, beeinflussen die Keimung, vermitteln Krankheitsresistenz und schützen vor UV-B-Strahlung. Außerdem spielen sie bspw. eine Rolle in der Kommunikation zwischen Pflanze und Mikroorganismen, der Regulation des

Auxin-Transports und der Ausprägung männlicher Fertilität in einigen Pflanzenarten (WINKEL-SHIRLEY 2001).

Auch in der Ernährung von Mensch und Tier können Polyphenole positive Effekte haben. So wird eine möglicherweise präventive Wirkung auf bestimmte Krankheiten, wie Arteriosklerose und Krebs, durch antioxidative und antimutagene Eigenschaften der Polyphenole beschrieben (MOÏSE *et al.* 2005). Proanthocyanidinkonzentrationen von 2 bis 4% im Futter können bei Schafen dem Auftreten von inneren Parasiten entgegenwirken und bei Rindern ein Aufblähen des Pansens nach zu proteinreicher Kost verhindern (AERTS 1999).

Zur weiteren Stärkung der Konkurrenzfähigkeit des Rapsschrotes auf dem europäischen Markt sehen es LÜHS *et al.* (2000) als vorrangiges Ziel der Züchtung an, das genetische Ertragspotenzial des Rapses bei gleichzeitiger Reduktion des pflanzenbaulichen Inputs noch besser auszuschöpfen und durch eine Erhöhung des Ölgehaltes die Marktleistung zu steigern. Dazu gehört es auch, durch die Steigerung des Proteingehaltes und eine Verringerung von Rohfasergehalten sowie Gehalten an Glucosinolaten, Tanninen, Phytat und Sinapin die Rapsmehlqualität als Koppelprodukt der Ölgewinnung anzuheben. Hier spielt die Züchtung gelbsamiger Rapssorten eine besondere Rolle, wobei aber eine hinreichende Samenvitalität (Keimfähigkeit, Triebkraft, Gesundheit etc.) sicherzustellen ist.

Das wesentliche Ziel dieser Arbeit bestand darin, anhand einer doppelhaploiden (DH) Population, welche eine breite Variation für das Merkmal Samenfarbe bzw. Schrotqualität aufweist, genetische und chemische Untersuchungen der antinutritiven phenolischen Verbindungen im Rapssamen (hauptsächlich kondensierte Tannine) durchzuführen. Mit Hilfe dieser Analysen sollte der Zusammenhang zwischen Samenfarbe und Tanningehalt bei Raps im Hinblick auf eine verbesserte Schrotqualität untersucht werden. Die Untersuchungen des Tanningehalts erfolgten sowohl anhand qualitativer als auch quantitativer Methoden (Vanillin- bzw. HPLC-Assay). Die ermittelten Inhaltsstoffdaten sollten genutzt werden, um quantitative Merkmalsloci (*Quantitative trait loci*, QTL) für die jeweiligen Merkmale zu ermitteln. Dafür werden Kandidatenloci für die Zielmerkmale genetisch kartiert und mit den Positionen der entsprechenden QTL verglichen. Das entscheidende Ziel des Projektes, im Rahmen dessen diese Arbeit durchgeführt wurde, ist die Entwicklung von wirkungsvollen molekularen Markern für eine zeit- und arbeitssparende Selektion auf vorteilhafte Allele in der Rapszüchtung.

2. LITERATURÜBERBLICK

2.1 Rapsschrot als wertvolles Futtermittel

In den letzten Jahren hat Rapsmehl - Nebenprodukt der Ölgewinnung aus Rapssaat - bei der Herstellung von Futtermitteln zunehmend als Eiweißlieferant an Bedeutung gewonnen. Eine Verwertung des Rapsschrotes als hochwertiges Futtermittel wurde grundsätzlich durch die züchterische Reduktion der Glucosinolate- und Erucasäure-Gehalte auf nahezu Null (00-Sorten) ermöglicht. Die Verwendung in der Tierernährung war jedoch lange Zeit auf Wiederkäuer beschränkt. Die früher als kritisch geltende Grenze von 5 % im Milchvieh- und Rindermast-Mischfutter wurde schnell überwunden, heute liegt der Anteil von Rapsschrot hier bei rund 15%. Um eine ausgewogene Aminosäurenversorgung sicher zu stellen, fand Rapsschrot ebenfalls schnell Zugang im Schweinemischfutter und wird heute mit einem Anteil von bis zu 10% in den Rationen eingesetzt. Mit der Einführung der TMR-Fütterung („Totale Mischration“) hat Rapsschrot auch als Einzelfutter deutlich an Marktanteilen gewonnen (LUFA 2006). Bei dem derzeitigen Stand der Qualitätszüchtung ist die Verwendung des Rapsmehles in Futterrationen von Monogastriern (Hühner, Schweine) wegen höherem Rohfaseranteil, niedrigerem Proteingehalt und geringerer Verdaulichkeit der Proteine noch begrenzt.

Rapsmehl enthält gegenüber dem Konkurrenzprodukt Sojaschrot weniger Rohprotein (38,3% *vs.* 48,1%). Aufgrund des höheren Rohfaseranteils (ca. 12% *vs.* 7%) ist der Gehalt an verwertbarer Energie gegenüber Sojamehl deutlich geringer. Dagegen ist der Anteil einiger essentieller Aminosäuren – vor allem schwefelhaltiger wie Methionin und Cystein – sowie wichtiger Mineralien und Vitamine im Rapsschrot erhöht (BELL 1984, DOWNEY und BELL 1990, BELL 1993, SCHÖNE 1993, THIES 1994) (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1 - Mittlere Zusammensetzung von Rapsschrot im Vergleich zu Sojaschrot (DOWNEY und BELL 1990, BELL 1993)

Inhaltstoffe			Raps	Soja
Haupt-komponenten	Ölgehalt[1)]	%	40,0	20,0
	Rohfaser	%	11,8	7,0
	Rohprotein	%	38,3	48,1
Aminosäuren	Lysin	%	2,45	3,14
	Methionin	%	0,76	0,60
	Cystein	%	1,08	0,70
Mineralien	Phosphor	%	1,03	0,65
	Calcium	%	0,64	0,30
	Magnesium	%	0,52	0,29
Vitamine	B4 (Cholin)	mg/kg	6700	2609
	E (Tocopherol)	mg/kg	14,5	2,4

[1)] im Samen

Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass durch das Merkmal „gelbe Samenfarbe" aufgrund einer dünneren Samenschale eine Reduzierung des Rohfasergehaltes bei gleichzeitiger Erhöhung des Anteiles an wertbestimmenden Sameninhaltsstoffen wie Öl und Protein erreicht werden kann (u. a. BAETZEL *et al*. 1999) (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2 - Einfluss der Samenfarbe auf Öl-, Protein und Rohfasergehalt (DOWNEY und BELL 1990)

Samenfarbe	Ölgehalt % ATM[1)]	Rohprotein % ATM[1)]	Rohfaser % ATM[1)]
Braun	39,9	39,3	13,7
Gelb-Braun	42,2	41,0	11,5
Gelb	44,5	42,1	8,9

[1)] Ölfreies Schrot

Der Züchtung hellsamiger Rapsformen wird daher große Bedeutung beigemessen, um die Schrotqualität des Rapses gegenüber dem Konkurrenzprodukt Soja-Extraktionsschrot zu verbessern, indem Tannine und Rohfaser als wertmindernde Inhaltsstoffe reduziert und die innere Samenqualität dadurch deutlich verbessert werden kann (vgl. JÖNSSON und BENGTSSON 1970, STRINGAM *et al.* 1974, BELL und SHIRES 1982, SHIRZADEGAN und RÖBBELEN 1985, BECHYNE 1987, THIES 1994, SLOMINSKI *et al.* 1994, SLOMINSKI 1997). Der Einsatz größerer Mengen an hellem Raps-Extraktionsschrot als Eiweiß-Ergänzungsfuttermittel in der Schweine- und Geflügelmast ist durchaus vorstellbar (SCHÖNE 1993, HENKEL 1994). Denn rohfaserarme und pigmentfreie Rapsschrote sind nicht nur in ihrem Energiegehalt verbessert; ein niedriger Rohfasergehalt führt auch zu einer

erhöhten Eiweißverdaulichkeit und ein verringerter Polyphenolgehalt der transparenten Schale gelber Samen zu einer verbesserten Eiweißverfügbarkeit. Dies wird auch durch Schälungsexperimente bestätigt, in denen der Einfluss der Schälung auf antinutritive Substanzen der Rapssaat und die Fütterung bzw. den Futterwert des Rapsschrotes untersucht wurde. So konnte gezeigt werden, dass durch den Schälprozess der Gehalt an kondensierten Tanninen je nach Rapssorte um 26,0-81,2% gesenkt werden kann (MATTHÄUS 1998); somit sind diese antinutritiven phenolischen Verbindungen – ähnlich dem Lignin – mit der Samenschale assoziiert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass rohfaserarme, hellsamige Rapsformen auch einen niedrigeren Tanningehalt aufweisen (vgl. BELL und SHIRES 1982, BIBI *et al.* 1991, ERIKSSON *et al.* 1994, MATTHÄUS 1998, JEROCH *et al.* 2001, FRIEDT *et al.* 2002).

Bis jedoch seitens der Futtermittelindustrie ein neuer Rohstoff in die Produktion gelangt, muss er zahlreichen Prüfungen – hinsichtlich seiner Inhaltstoff-Zusammensetzung und Herstellungstechnologie – unterzogen werden. Hierbei spielt vor allem die äußere Beschaffenheit des Rohstoffes, wie z. B. die Farbe und der Geruch, im Hinblick auf eine bessere Akzeptanz durch die Nutztiere eine wesentliche Rolle.

2.1.1 Wertgebende Komponenten

Das Protein bildet mit Gehalten von 35-40% den Hauptbestandteil des entölten Rapsmehles. Nach einer Phase intensiver Züchtungsforschung hatte jedoch die qualitative Verbesserung der Rapsernteprodukte im Hinblick auf die miteinander verbundenen Merkmale Protein-Gehalt, Protein-Zusammensetzung und Protein-Flächenertrag in den letzten zwei Jahrzehnten nur eine untergeordnete Bedeutung (HOUGEN und STEFANSSON 1983, LÜHS *et al.* 2000a, FRIEDT *et al.* 2002). Mit der aktuellen Diskussion über gentechnisch veränderte Sojabohnen (z.B. Herbizidresistenz) kam es zu einer verstärkten Nachfrage und Neubewertung heimischer pflanzlicher Proteinquellen, wie Körnerleguminosen und Raps. Des Weiteren hat die Grundlagenforschung über die Eigenschaften von Reserveproteinen sowie deren Biosynthese und Akkumulation während der Samenentwicklung Erklärungen für eine Reihe von Problemen geliefert, die bei der züchterischen Nutzung proteinreicher oder in der Proteinqualität verbesserter Ausgangsformen auftreten, so dass auch seitens der Forschung neue Impulse gegeben sind (HIGGINS 1984, NORTON 1989, HARRIS *et al.* 1993, GALILI 1995, GALILI *et al.* 1995, HABBEN und LARKINS 1995, SHEWRY *et al.* 1995).

Die Rapssamenproteine bestehen wie alle pflanzlichen Speicherproteine aus verschiedenen Fraktionen. Dabei sind sowohl Parallelen in Aufbau und Struktur als auch charakteristische Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzenarten zu erkennen. Entsprechend ihrer Löslichkeit in wässrigen Medien werden pflanzliche Proteine in vier Hauptfraktionen unterschieden (vgl. OSBORNE 1924):

- Albumine (wasserlöslich)
- Globuline (unlöslich in Wasser, aber löslich in Kochsalzlösung)
- Prolamine (löslich in einem Alkohol-Wasser-Gemisch)
- Glutenine (löslich in verdünnter Kaulilauge).

Die beiden letztgenannten Fraktionen sind Bestandteile von Getreideproteinen (außer Hafer) und kommen in Rapssamen nicht vor. Das in Raps enthaltene Rohprotein besteht zum großen Teil aus Albuminen und Globulinen (BHATTY *et al.* 1968, SCHWENKE *et al.* 1973, GURURAJ RAO und NARASINGA RAO 1981, DALGALARRONDO *et al.* 1986). Diese Speicherproteine bestehen aus Untereinheiten, die in wässrigen Lösungen mittels der Ultrazentrifugation auf Grund ihres verschiedenen Sedimentationsverhaltens getrennt werden können. Danach wird bei den Rapsspeicherproteinen zwischen 2-S- und 11- bzw. 12-S-Proteinen unterschieden, eine Einteilung, die letztlich mit der Molmasse korreliert (GODING *et al.* 1970, GILL und TUNG 1978, SCHWENKE *et al.* 1980, SCHWENKE *et al.* 1981, ERICSON *et al.* 1986, RAAB und SCHWENKE 1986, JOSEFSSON *et al.* 1987, RODIN *et al.* 1990, MONSALVE *et al.* 1991, INQUELLO *et al.* 1993, GERBANOWSKI *et al.* 1999, SCHMIDT *et al.* 2004).

Mit einem Anteil von bis zu 60% bildet das Cruciferin das bedeutendste Speicherprotein. Es gehört zur salzlöslichen Globulinfraktion und hat ein Molekulargewicht von ca. 300 kDa. Seine Oligomere, aus sechs Untereinheiten aufgebaute Struktur mit einem Sedimentationskoeffizienten von ca. 12 S ist mit der Struktur von anderen Legumin-ähnlichen Globulinen vergleichbar (SCHWENKE *et al*. 1981, 1983, RÖDIN und RASK 1990a, 1990b, MIMOUNI *et al.* 1990, SJÖDAHL *et al.* 1991, BREEN und CROUCH 1992).

Eine weitere Hauptfraktion mit Anteilen von 20-40% bilden die Napine – eine heterogene, stark basische, in wässrigen Medien lösliche Albuminfraktion mit einem Molekulargewicht von ca. 12-14 kDa. Für die Rapssaat werden mindestens sechs verschiedene, dimere Polypeptide - die jeweils durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden - beschrieben (CROUCH *et al.* 1983, ERICSON *et al.* 1986, SCOFFIELD und

CROUCH 1987, SCHWENKE *et al.* 1988, MUREN *et al.* 1996, NEUMANN *et al.* 1996a, 1996b). Die Primärstruktur der beiden Polypeptidketten des Napins haben ERICSON *et al.* (1986) untersucht.

Neben Cruciferin und Napin sind weitere Proteine, allerdings in vergleichbar geringen Mengen, in Rapssamen nachgewiesen worden. So isolierten FALK *et al.* (1995) verschiedene Myrosinase bindende Proteine. Diese Proteine wurden hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung, ihrer Peptidsequenz und der isoelektrischen Punkte charakterisiert. Die Molmassen dieser Präparate wurden mit 30 - 110 kDa ermittelt. Alcalase-Inhibitoren sind ebenfalls in Rapssamen gefunden worden (VIOQUE *et al.* 2001). Auf den Myrosinase-Komplex, dem Enzymsystem, das die Glucosinolate spaltet, soll hier nicht näher eingegangen werden. Diese spezielle Rapsproblematik ist in einer Reihe von Übersichtsarbeiten abgehandelt worden (FENWICK *et al.* 1983, MIETH *et al.* 1983, BELL 1984, LANGE *et al.* 1992). Die Aminosäuresequenz einzelner Proteinfraktionen ist aufgeklärt (BHUSHAN *et al.* 1990, MONSALVE *et al.* 1997, BHUSHAN und TYAGI 1998).

Zusätzlich findet man in der Rohproteinfraktion des Rapses Oleosine; eine spezifische in den Oleosomen lokalisierte Gruppe der Membranproteine (TZEN et al. 1993). Demnach sind Oleosomen kugelförmige Lipidtröpfchen (Triacylglycerol, TAG, Durchmesser 0,65 µm) mit einer 2,5 nm dicken Monoschicht aus 80% Phospholipiden (PL) und 20% eingebettetem Protein (Oleosin). *Brassica*-Samen besitzen aufgrund des hohen Ölgehaltes (40–45%) und der kleinsten bekannten Oleosomen eine sehr große Oberfläche pro Triacylglycerol-Einheit (HUANG 1996). Angaben zum Anteil des Oleosins am Gesamtproteingehalt schwanken in der Literatur zwischen 7–8% (TZEN *et al.* 1990) und 20–25% (MURPHY *et al.* 1989).

Eine Betrachtung der Aminosäuren-Zusammensetzung – als Bausteine der Proteine – zeigt, dass der Anteil an essentiellen Aminosäuren in Rapsprotein in hervorragender Weise den Vorgaben der FAO/WHO entspricht (THIES 1994, KLOCKEMANN *et al.* 1997, O´MARA *et al.* 1997, ROZAN *et al.* 1997) und hinsichtlich der Proteinzusammensetzung durchaus mit dem Sojaprotein konkurrieren kann (Tabelle 3).

Tabelle 3 - Aminosäure-Zusammensetzung von Raps- und Sojaschrot im Vergleich zu den Empfehlungen der FAO (Werte in mg/g Protein (THIES 1994)

Aminosäuren	FAO/WHO	Raps	Sojabohne
Threonin	3,4	4,8	3,7
Valin	3,5	5,3	4,9
Ile	2,8	4,1	4,7
Leucin	6,6	7,3	7,6
Tryptophan	1,1	1,3	1,3
Lysin	5,8	6,7	6,4
His	1,9	3,0	2,7
Methionin+Cystein	2,5	4,1	2,8
Phe+Tyr	6,3	7,2	8,5
Summe	33,9	43,8	42,6

Im Rapsschrot enthaltene Proteine können ernährungsphysiologisch als sehr hochwertig eingestuft werden. Rapsproteinisolate könnten den Bedarf an essentiellen Aminosäuren zu mehr als 99% decken. Rapsprotein hat daher ein erhebliches Potenzial für die Ernährung von Tier und Mensch. In der Tierernährung wird dieses Potenzial bereits in erheblichem Maß genutzt (KRACHT *et al.* 2004, SCHOENE und SCHUHMANN 2005, WEISS 2006). Ein Einsatz in der menschlichen Ernährung könnte durch die züchterische Reduktion antinutritiver Stoffe, solcher wie Tannine, Rohfaser und Sinapine, realisiert werden (LECKBAND *et al.* 2002). Bei einem für den Menschen hohen biologischen Wert hat Rapsprotein eine Verdaulichkeit, die derjenigen von Milchprotein gleicht (BOS *et al.* 2007). Die kanadische Firma Burcon hat sich durch mehrere Patente ein Verfahren schützen lassen, dass aus Rapssaat durch Salz/Wasserextraktion und Ultrafiltration zwei über 90% reine Fraktionen erzeugt (SCHWEIZER *et al.* 2007). Ein Supertein™ genanntes Rapsproteinisolat enthält vor allem Albumine der Napin-Fraktion; es soll besonders reich an schwefelhaltigen Aminosäuren sein und besitzt Wasserlöslichkeit. Ein als Puratein® bezeichnetes Proteinisolat besteht aus Globulinen der Cruciferinfraktion und hat emulgierende Eigenschaften.

Des Weiteren wäre der Einsatz von Rapsprotein als Ergänzungsfuttermittel in getreidereichen Futterrationen durchaus denkbar, denn den meisten Getreidearten mangelt es aufgrund der überwiegend dominierenden Prolamin-Fraktion an Lysin und in geringerem Maße auch an Threonin und Tryptophan. Leguminosensamen, wie z.B. Ackerbohne (*Vicia faba*), Körnererbse (*Pisum sativum*) oder Sojabohne (*Glycine max*), fehlt es hingegen an

schwefelhaltigen Aminosäuren, insbesondere Methionin; eine weitere limitierende Aminosäure ist dort Tryptophan, während das im Getreide wertbegrenzende Lysin durchaus in ausreichender Menge vorkommt (SCHWENKE 1982, HABBEN und LARKINS 1995). Schwefelhaltige Aminosäuren, wie Methionin und Cystein, sind im Rapsprotein mit ausreichenden Gehalten vorhanden, so dass ein Vorteil gegenüber Leguminosenprotein zu verzeichnen ist.

Es muss jedoch beachtet werden, dass neben den erwähnten Reserveproteinen noch weitere Eiweiße sowie niedermolekulare Verbindungen in den Samen zu finden sind, von denen die meisten hemmende Effekte auf die Eiweißverwertbarkeit haben. Zu nennen sind hier Trypsininhibitoren, Lectine und Tannine bei den Körnerleguminosen sowie Glucosinolate, Sinapine, Tannine und weitere phenolische Verbindungen bei Kruziferen (FENWICK *et al*. 1983, THIES 1994, KRAUSE *et al.* 2006).

Als weitere wertbestimmende Inhaltstoffe in Rapsschrotprodukten sind die Minerale und Vitamine anzusehen. Der Mineralstoffgehalt im Rapsmehl liegt gewöhnlich bei Werten von 6-7% und Inhaltstoffuntersuchungen (BELL 1993) lassen erkennen, dass das Rapsmehl bei gewissen Mineralstoffen höhere Gehalte aufweist als das Konkurrenzprodukt Sojamehl (THIES 1994); Rapsmehl scheint somit eine bessere Quelle für einige wichtige Mineralstoffe, z.B. Calcium, Phosphor, Mangan, Magnesium und Selen, darzustellen (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4 - Mineralstoffgehalt in Rapsmehl und Sojaschrot
(Angaben in % TM, BELL 1993)

Mineralstoff	Gehalte im Rapsmehl	Entfettetes Sojaschrot
Phosphor	1,03	0,65
Calcium	0,64	0,30
Magnesium	0,52	0,29
Selen	1,12	0,10
Mangan	50,1	31,0
Schwefel	0,86	0,42

Auch bei den Vitamingehalten hat Rapsmehl gegenüber Sojamehl mitunter deutliche Vorteile, hervorzuheben ist hier ein Vergleich der beiden Vitamine B4 *(Cholin)* (0,7 *vs.* 0,3) und E *(alpha-Tocopherol)* (0,2 *vs.* 0,1) (THIES 1994, Angaben in % der TM). Die beiden Vitamine haben im Tierkörper wichtige Funktionen, so übernimmt das wasserlösliche Cholin eine bedeutende Rolle im Fettstoffwechsel sowie bei der Reizübertragung des Nervensystems. Die unter dem Begriff Vitamin E zusammengefassten Tocopherole und Tocotrienole sind eine Gruppe biologisch aktiver, fettlöslicher Substanzen, die in der Natur ausschließlich von

Pflanzen synthetisiert werden. Die Tocopherole übernehmen im Tierkörper eine Reihe wichtiger Funktionen, eine der Hauptfunktionen ist der antioxidative Schutz der Membranlipide vor Schädigungen durch freie Radikale. Ferner beeinflusst das Vitamin E die Zellatmung, den Nukleinsäurestoffwechsel und die Fruchtbarkeit (WEISS 2000, SCHNEIDER 2005, DELLAPENNA 2005).

2.1.2 Wertmindernde und antinutritive Komponenten

Der Einsatz von Rapsschrotprodukten in der Tierernährung und die Verwendung des Rapsproteins in der menschlichen Ernährung sind aufgrund einiger antinutritiver Faktoren eingeschränkt. Als wichtigste limitierende antinutritive Substanzen wurden lange Zeit die Glucosinolate angesehen, jedoch mit der Einführung der ersten 00-Sorten wurden die Glucosinolat-Gehalte stark reduziert und sollen durch weitere züchterische Bemühungen möglichst vollständig eliminiert werden. Durch diesen züchterischen Erfolg gilt es nun, die Gehalte weiterer wertmindernder und antinutritiver Inhaltstoffe des Rapsschrotes – wie Rohfaser, Tannine (Polyphenole), Phytate und Sinapine – zu reduzieren (vgl. FENWICK *et al*. 1983, 1984, THIES 1994, GRIFFITHS *et al*. 1998, MATTHÄUS 1998, NACZK *et al*. 1998, FRIEDT und LÜHS 1998, 1999a, 1999b, KRAUSE *et al.* 2006), um die Futterqualität des Rapsmehles zu erhalten bzw. weiter zu verbessern (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5 - Optimierung der Schrotqualität bei 00-Raps (LÜHS et. al 2000a)

Inhaltsstoff	Negative Wirkung	Gehalt im Rapsmehl (% TS)	Maßnahme
Phenolcarbonsäuren und Derivate Sinapinsäure-Ester (vornehmlich Sinapin) Freie oder gebundene Phenol-carbonsäuren	Bitterer Geschmack, adstringierende Eigenschaften des Rapsmehls; dunkle Farbe des Schrotes; Fischgeschmack Hühnerei (Sinapin)	0,5 - 3,0 0,1 - 0,3	Selektion sinapinarmer Formen Hemmung von Enzymen des Phenylpropanoid-Stoff-wechsels (Mutagenese, Gentechnik)
Tannine (Polyphenole) Kondensierte Tannine (etwa 1/3, in der Samenschale) lösliche Tannine (etwa 2/3, im Embryo)	Futteraufnahme und Energieumsatz eingeschränkt; Verdaulichkeit der Proteine aufgrund Komplexbildung reduziert; dunkle Farbe	1,5 - 4,0	Selektion tanninarmer Formen, Züchtung von gelbsamigem Raps Hemmung von Enzymen des Phenylpropanoid-Stoff-wechsels (Mutagenese, Gentechnik)
Phytinsäure und Derivate	Schlecht verfügbare P-Form (Mono-gaster); Resorption von Spurenelemen-ten behindernd; Komplexe mit Aminosäuren	2,0 - 5,0	Phytase als Futtermittel-zusatz Induzierte Phytase-Aktivität (Gentechnik) Selektion phytatarmer Formen (Mutagenese, Gen-technik)

Die Rohfaser besteht aus pflanzlichen Zellwand- und Gerüstsubstanzen und wird als eine stofflich sehr heterogene, chemisch-analytisch schwierig zu erfassende Fraktion angesehen. Aufgrund ihrer schlechten Verdaulichkeit ist der Gehalt an Rohfaser eine wichtige Maßeinheit für die Bestimmung des ernährungsphysiologischen Wertes. Futtermittel mit hohen Rohfasergehalten – speziell Eiweißergänzungsfuttermittel in der Monogasterfütterung (Schweine- und Geflügelmast) – gelten als minderwertig, da durch die hohen Rohfasergehalte die Proteinverfügbarkeit deutlich reduziert wird und zu viele Inhaltstoffe der Futterration wieder unverdaut ausgeschieden werden. Für die Bestimmung des Rohfasergehaltes wurden mehrere Verfahren entwickelt, wie die fraktionierte Extraktion mit Detergenzien und Säuren (*acid detergent fiber*, ADF-Methode, VAN SOEST 1964) oder die Neutral-Detergenz-Methode (*neutral detergent fibre*, NDF, VAN SOEST und WINE 1967), die unterschiedliche

Ergebnisse für Rapsschrot liefern: 12-13% Rohfaser, 17-23% ADF und 20-30% NDF (VAN SOEST und ROBERTSON 1985, VOHRA 1989, NACZK und SHAHIDI 1990, BOURDON und AUMAÎTRE 1990, BELL und KEITH 1991, VAN SOEST *et al*. 1991, UPPSTRÖM 1995, DAUN 1995, BELL 1995). In jüngerer Zeit wird von einer Rohfaser-Schnellbestimmung mit Hilfe der Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS bzw. NIT) basierend auf ADF-Werten berichtet (MICHALSKI *et al*. 1992, FONT *et al*. 2003b).

Phenolsäuren und kondensierte Tannine stellen die vorherrschenden phenolischen Verbindungen in den Rapssamen dar, deren Gesamtgehalt wesentlich höher als in anderen Ölsaaten (Sojabohne, Baumwollsamen, Erdnuss) ist. Sie sind durch die Komplexbildung hervorgerufene Minderung der Proteinverdaulichkeit für die dunkle Farbe, den bitteren Geschmack, den unangenehmen Geruch und die adstringierenden Eigenschaften der Rapsschrotprodukte verantwortlich (KRYGIER *et al.* 1982, NACZK *et al.* 1998, WANG *et al.* 1998, AMAROWICZ *et al.* 2000, NACZK *et al.* 2000, LI und EL RASSI 2002, VUORELA *et al.* 2004, VUORELA *et al.* 2005, ROMANI *et al.* 2006). Im Rapsmehl kann der Gehalt an phenolischen Verbindungen 30mal höher liegen als in Sojamehl (KOZLOWSKA *et al.* 1990, SHAHIDI und NACZK 1992) (Tabelle 6).

Tabelle 6 - Gesamtgehalt an phenolischen Verbindungen in Ölsaatrückständen (KOZLOWSKA et al. 1990)

Extraktionsschrot	**Gesamt-phenolische Verbindungen (mg/100 g TM)**
Sojabohnen	23,4
Baumwollsamen	56,7
Erdnüsse	63,6
Rapssamen	639,9

Phenolsäuren kommen im Raps in freier, veresterter und unlöslich-gebundener Form vor und stellen Benzoe- und Zimtsäurederivate dar. Lösliche phenolische Verbindungen werden im Rapssamen hauptsächlich in den Kotyledonen akkumuliert. Die Sinapinsäure (Abb. 2) macht dabei den Hauptanteil der freien Phenolsäuren aus (NACZK *et al*. 1998).

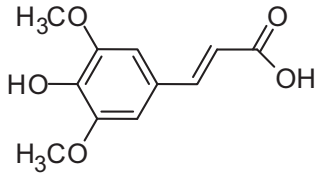

Abb. 2 - trans-Sinapinsäure.

Mengenmäßig stellen allerdings die veresterten Phenolsäuren den größten Anteil dar, wobei der Cholinester der Sinapinsäure, das Sinapin, zwischen 70% (BOUCHEREAU *et al.* 1991, KOLODZIEJCZYK *et al.* 1999) und 80% (DABROWSKI und SOSULSKI 1984, POKORNY und REBLOVA 1995) aller vorkommenden Sinapinsäureester im Raps ausmacht und Gehalte im Rapsmehl von 1-2 % erreichen kann.

Eine Verringerung der Gehalte an phenolischen Verbindungen ist daher eine unabdingbare Vorraussetzung für die Verwendung des Rapsschrotes in der Tierernährung und in der menschlichen Proteinversorgung. Umfangreiche Untersuchungen zum Sinapinsäureestergehalt verschiedener *Brassica*-Arten und -Herkünfte zeigen eine erhebliche Variabilität für dieses Merkmal (KOZLOWSKA *et al*. 1990, BOUCHEREAU *et al*. 1991, KRÄLING *et al*. 1991). In neueren Untersuchungen konnten VELASCO und MÖLLERS (1998) unter mehr als 1300 *B. napus*-Samenproben Phänotypen mit Sinapingehalten von 5,0 bis 17,7 mg/g Samen identifizieren.

Obwohl die verfügbaren Sorten mitunter deutliche Unterschiede in den Gehalten an phenolischen Substanzen und den Sinapinkonzentrationen aufweisen, war die Entwicklung neuerer Sorten mit reduzierten Sinapingehalten durch die klassische Züchtung bisher wenig erfolgreich und sehr zeitaufwendig. Ein viel versprechender Weg die Sinapingehalte zu reduzieren, ist die genetische Unterdrückung der beiden Schlüsselenzyme UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT) und Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (Sinapinsynthase; SCT) im Sinapin-Biosyntheseweg mit Hilfe einer Antisense-Regulierung (vgl. u.a. KRÄLING *et al*. 1991, VELASCO und MÖLLERS 1998, MILKOWSKI *et al*. 2000, MILKOWSKI *et al.* 2004). Solche gezielten gentechnischen Ansätze lassen hoffen, dass die Gehalte an phenolischen Verbindungen in Raps nachhaltig reduziert werden können. Eine Verbesserung des ernährungsphysiologischen Wertes und möglicherweise ein gesteigerter Einsatz von Rapsmehlprodukten in der Ernährung von Tier und Mensch wäre das Resultat.

Die in der Tierernährung unerwünschte Phytinsäure (Abb. 3), der Hexaphosphorsäureester des myo-Inositols, ist ein sekundärer Inhaltsstoff, der in Rapssamen in Konzentrationen von 3-6% enthalten ist (BELL *et al*. 1993).

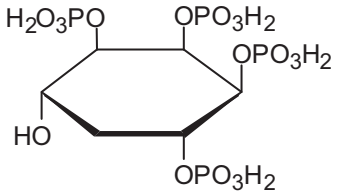

Abb. 3 – Phytinsäure.

Diese Verbindung besitzt die Fähigkeit, vor allem zweiwertige Kationen so stark zu binden, dass deren Bioverfügbarkeit herabgesetzt bzw. verhindert wird. Daraus resultieren die bekannten negativen ernährungsphysiologischen Wirkungen. Dieser Komplexbildner reagiert in Abhängigkeit von den Milieubedingungen auch mit Proteinen (KROLL 1991a, INGELMANN *et al.* 1993). Hinsichtlich der züchterischen Verminderung der Phytate gilt analog zu Sinapin, dass auch hier eine hinreichende genetische Variation vorhanden ist und geeignete Screening-Verfahren für die Selektion zur Verfügung stehen (THIES 1991, 1994; LICKFETT *et al.* 1999). Heute wird Mischfuttermitteln z.T. mikrobiell erzeugte Phytase zugegeben, um die negativen Effekte der Phytinsäure auszuschalten.

2.2 Tannine

2.2.1 Allgemeines

Die Tannine sind polyphenolische Verbindungen mit einem relativ großen Molekulargewicht von 500 bis 28000 Da (JONES *et al.* 1976, MUELLER-HARVEY und MCALLAN 1992, GUYOT *et al.* 2001, SCHOFIELD *et al.* 2001). Tannine haben die Fähigkeit, starke Komplexe mit Proteinen, Kohlenhydraten, Gelatine, Mineralen und Verdauungsenzymen zu bilden (BATE-SMITH *et al.* 1957, CLANDININ 1961, MALCOLMSON *et al.* 1978, SOSULSKI 1979, ISMAIL *et al.* 1981, SHAHIDI und NACZK 1992). Chemisch gesehen werden die Tannine in drei Gruppen aufgeteilt: Phlorotannine, hydrolisierbare und kondensierte Tannine (*syn.* Proanthocyanidine).

Die **Phlorotannine** sind die am wenigsten komplexen und fast unbekannten Typen von Tanninen. Sie sind in den letzten Jahrzehnten aus verschiedenen Braunalgen-Arten und Gattungen isoliert worden (RAGAN und GLOMBITZA 1986). Sie entstehen durch die Polymerisation von Phloroglucinol-Molekülen, die durch C-C oder C-O Verknüpfungen verbunden sind (Abb. 4).

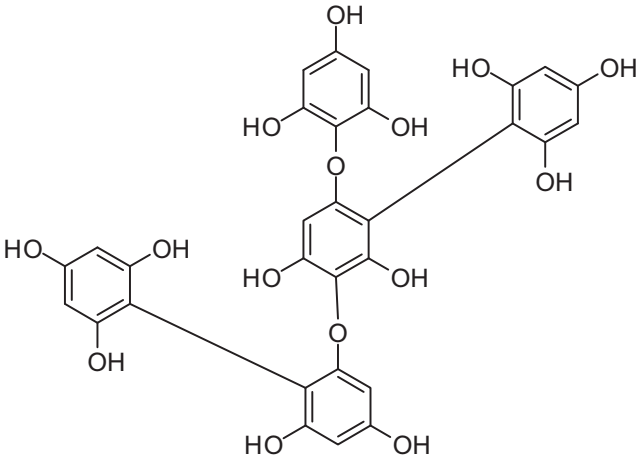

Abb. 4 - Phlorotannine (nach WATERMAN und MOLE 1994).

Hydrolysierbare Tannine sind weniger verbreitet als die kondensierten Tannine und kommen vor allem in Früchten wie Erdbeeren, Himbeeren, Brombeeren und Mangos vor (OKUDA *et al.* 1993, CLIFFORD *et al.* 2000).

Gallotannine und Ellagitannine werden auch als hydrolysierbare Tannine zusammengefaßt (SANTOS-BUELGA *et al.* 2000). Hydrolysierbare Tannine werden als Ester von Gallussäuren (Abb. 5) oder von Gallussäure abgeleitete Phenolcarbonsäuren mit Polyhydroxyverbindungen (meist D-Glucose) definiert (HASLAM 1996, NUHN 1997).

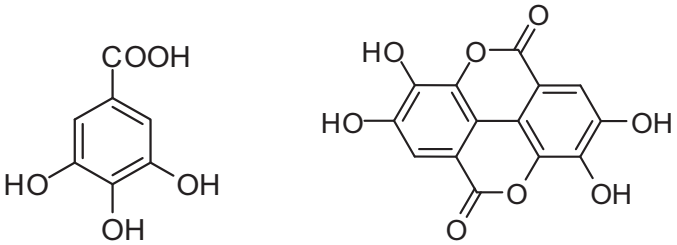

Abb. 5 - Gallussäure und Ellagsäure.

Ellagitannine werden durch oxidative Kupplung von 2 Galloyleinheiten gebildet (KHANBABAEE *et al.* 2001). Nach Hydrolyse entsteht durch Lacton-Bildung die Ellagsäure (Abb. 6), die diesem Tannintyp den Namen gegeben hat (RIMPLER 1999b).

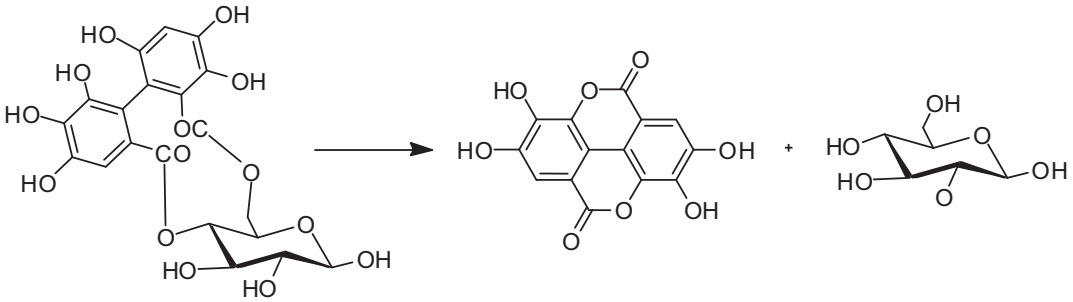

Abb. 6 - Hydrolysierung der Ellagitannine (nach CLIFFORD und SCALBERT 2000).

Der Begriff „hydrolysierbar“ resultiert aus der hydrolytischen Spaltung dieser Tannine in verdünnten Säuren, Laugen oder in der Gegenwart des Enzyms Tannase (CLIFFORD *et al.* 2000, KHANBABAEE *et al.* 2001).

Kondensierte Tannine (*syn.* Proanthocyanidine, PAs) sind weit verbreitet im Pflanzenreich und kommen überwiegend in Früchten, seltener in Gemüse vor (OKUDA *et al.* 1993). Dabei sind besonders Früchte wie Trauben, Äpfel, Birnen, Beeren und Nüsse und Getränke wie Wein, Tee, Bier und Cidre reich an Proanthocyanidinen. Auch Kakao und Zimt sind reich an kondensierten Tanninen.

Die Proanthocyanidine sind Oligomere (Polymerisationsgrad <8) oder Polymere von Polyhydroxyflavan-3-ol Monomeren (PORTER 1989). (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, die sich nur durch die Stereochemie an C2 und C3 unterscheiden, kommen als häufigste Monomeren vor (HAGERMAN 2002) (Abb. 7). Catechin und Epicatechin sind bei Angiospermen und Gymnospermen weit verbreitet. Sie wirken als Antioxidantien (RICE-EVANS *et al.* 1997), Fraßschutz (HARBORNE 1993) und Schutz vor Pilzen (PORTER 1989).

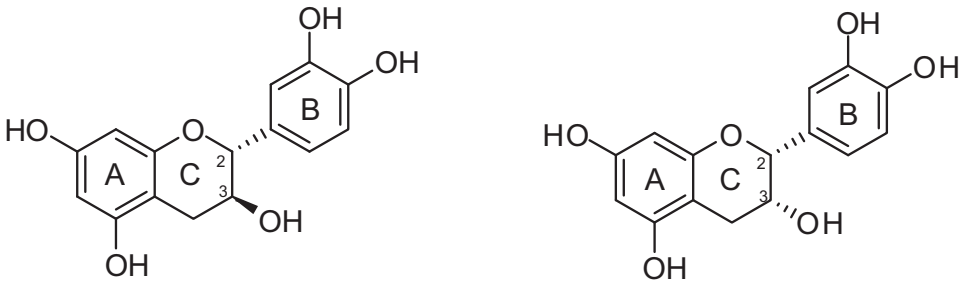

Abb. 7 - (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (nach LEPINIEC et al. 2006).

Die Verknüpfung zwischen den Flavan-3-olen erfolgt meistens über eine C-C Bindung zwischen der C4-Position des einen Monomers mit dem C8 oder dem C6 des zweiten Monomers (SANTOS-BUELGA *et al.* 2000). Einfach verknüpfte Polymere nennt man B-Typen. Die doppelt verknüpften Polymere sind seltener in der Natur und sind als A-Typen bekannt. Diese Art der Verknüpfung kommt durch eine gleichzeitige C-C-Verknüpfung zwischen Position 4 und 8 und einer Ether-Verknüpfung zwischen den Positionen 2 und 7 zustande. Kondensierte Tannine werden in Subklassen unterteilt, von denen drei häufig in Pflanzen vorkommen: Propelargonidine, Procyanidine, Prodelphinidine (BEECHER 2003, FERREIRA *et al.* 2006) (Abb. 8).

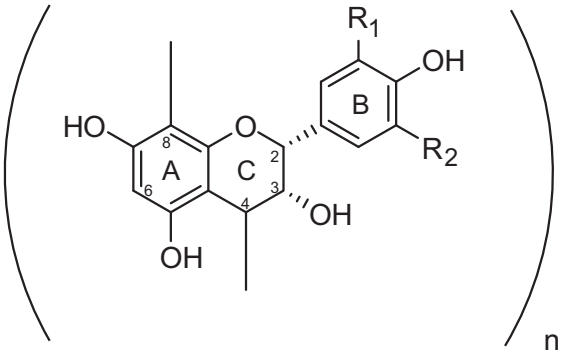

Abb. 8 - R_1, R_2 = H, Propelargonidine; R_1 = 0H, R_2 = H, Procyanidine; R_1, R_2 =OH, Prodelphinidine (nach BEECHER 2003).

Moderate Konzentrationen an kondensierten Tanninen in Futterpflanzen (0,5–5% TS) können den Lebendgewichtzuwachs der Tiere steigern, die Milch- und Wollproduktion fördern und die Gefahr von Blähungen reduzieren, ohne dabei die freiwillige Nahrungsaufnahme herabzusetzen (AERTS *et al.* 1999). Zusätzlich sind tanninhaltige Futterpflanzen im organischen Landbau wegen ihrer Wirkung gegen Magen-Darm-Parasiten (HECKENDORN *et al.* 2006, MARLEY *et al.* 2003) von besonderer Bedeutung. Allerdings vermindern hohe Konzentrationen an kondensierten Tanninen (>5% TS) die Nahrungsaufnahme der Tiere und beeinträchtigen die Verdaulichkeit des Futters (AERTS *et al.* 1999). Folglich ist es für die praktische Verwendung von tanninhaltigem Futter wichtig, dass die Tanninkonzentration des Futters in der Nähe von 5% TS, aber eher darunter liegt.

Einzelne Substanzen oder Gemische aus der Klasse der Tannine zeigen eine antisekretorische, peristaltikhemmende, antimikrobielle, entzündungshemmende, antitumorale, antivirale, zahnbelagshemmende und antihypertensive Wirkung (KAUL 1996). Mehrjährige Studien aus dem Medizinbereich deuten daraufhin, dass bestimmte Tannnine günstige Effekte bei kardiovaskulären Erkrankungen haben. So wurde gezeigt, dass die Procyanidine aus Weißdorn die koronare Durchblutung erhöhen und positiv inotrop wirken. Verschiedene Procyanidine hemmen die Ablagerung von Cholesterin in arteriellem Gewebe. Die bereits genannte blutdrucksenkende Wirkung kommt möglicherweise durch eine Hemmung der Phosphodiesterase, der Na+/K+-ATPase und/oder des Angiotensin-Konversions-Enzyms zustande (KAUL 1996). Die Oxidation von LDL-Cholesterin wird durch die antioxidativen Eigenschaften von Polyphenolen verhindert, die so zu einem antiarteriosklerotischen Effekt beitragen (WEISBURGER 2001). Die positiven Effekte bei Arteriosklerose konnten in Tiermodellen bestätigt werden (RASMUSSEN *et al.* 2005).

Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen ist abhängig von ihrer Struktur und variiert interindividuell (SCALBERT und WILLIAMSON 2000). Innerhalb der Proanthocyanidine werden wahrscheinlich nur die Mono- und Oligomere unverändert absorbiert, so dass die Effekte der Tannine wahrscheinlich nur auf Magen und Darm beschränkt sind. Die Metabolisierung der Polyphenole findet in der Microflora des Darms und in der Leber statt. Über die Eigenschaften sowie die Art der gebildeten Metaboliten sind wenige Informationen verfügbar. Jedoch wurden diverse Effekte für einzelne Metaboliten nachgewiesen (SANTOS-BUELGA *et al.* 2000, MANACH *et al.* 2004).

Neben den positiven Effekten der Tannine wurden auch antinutritive und gesundheitsschädliche Effekte beschrieben. Eine tanninreiche Ernährung führt zu einer geringeren Aufnahme an Vitaminen, Mineralstoffen und essentiellen Aminosäuren und beeinflusst so negativ das Wachstum. In Tiermodellen wurden hepatotoxische und karzinogene Eigenschaften der Tannine beschrieben. Für das vermehrte Auftreten von Wangen- und Speiseröhrenkrebs im Fernen Osten werden die Tannine der in diesen Regionen häufig gekauten Betelnuss verantwortlich gemacht (CHUNG *et al*. 1998a, 1998b).

2.2.2 Proanthocyanidine in Raps

In Raps (*B. napus*) werden die Proanthocyanidine überwiegend in den Vakuolen des inneren Integuments (Samenschale) lokalisiert und sind für die dunkle Farbe, den bitteren Geschmack und die adstringierenden Eigenschaften der Rapsschrotprodukte verantwortlich (AMAROWICZ *et al.* 2000, NACZK *et al.* 2000, VUORELA *et al.* 2005, ROMANI *et al.* 2006). Proanthocyanidine reduzieren die Permeabilität der Samenschale für Wasser und andere lösliche Substanzen und wirken somit einem Penetrationsschaden des Embryos („*imbibition damage*“) entgegen. Des Weiteren bilden die Proanthocyanidine eine vor Verletzungen schützende mechanische Barriere um den Embryo (HALLOIN 1982, BELL *et al.* 1992, KANTAR *et al.* 1996). Die polymere Struktur der Proanthocyanidine und ihre Fähigkeit, an Proteine zu binden, erklären möglicherweise ihren impermeabilisierenden und zellhärtenden Effekt auf die Samenschale (DEBEAUJON *et al.* 2001). Indem sie zur Verstärkung der Samenschale beitragen, verhindern sie auch indirekt den Austritt der Keimwurzel und sind somit eine wichtige Determinante der Samenschalen-induzierten Dormanz (DEBEAUJON *et al.* 2000). Sie sind auch an einer Reihe von wichtigen, biologischen Funktionen beteiligt, z. B. dem Schutz vor Gewebeschädigung durch UV-Licht oder Pathogenbefall (Phytoalexine) und oxidativem Stress (DOONER *et al.* 1991, KOES *et al*. 1994, DIXON und PAIVA 1995, SHIRLEY 1996, GROTEWOLD *et al.* 1998). Die

Samenschale macht zwischen 10,5% und 20% des Samengewichts und 20-30% des Extraktionsschrots aus (APPLEQUIST und OHLSON 1972, THEANDER *et al.* 1977, BEWLEY und BLACK 1983, BELL 1993, JENSEN *et al.* 1995, NACZK *et al.* 1998).

Über die Existenz der kondensierten Tannine in Rapsschalen wurde in 1959 von BATE-SMITH und RIBEREAU-GAYON berichtet. Diese Erfindung ist von DURKEE (1971) bestätigt, die Cyanidin, Pelargonidin und ein *n*-Butyl-Artefakt von Cyanidin in den hydrolytischen Produkten der Rapsschalen identifizieren konnte. Rapsmehl wurde nach der Methode der Tanninbestimmung aus Nelken und Piment (AOAC 1965, CLANDININ und HEARD 1968) untersucht. Zu den geschätzten 3% Tanninen gehört laut FENWICK und HOGGAN (1976) allerdings auch die Sinapinsäure. LEUNG *et al.* berichteten in 1979, dass die Rapsschalen bis zu 0,1% extrahierbare durch gelläufige Lösungsmittel kondensierte Tannine enthalten und Leucocyanidin als Monomer-Einheit besitzen. Rapsmehl der Sorte Tower enthielt laut FENWICK *et al.* (1984) 2,71% (geschälte Saat) bzw. 3,91% Tannine (Gesamtsaat). Der Gehalt an kondensierten Tanninen, untersucht nach der modifizierten Vanillin-Methode (PRICE *et al.* 1978), erreicht 0,09-0,39% in entfetteten Kotyledonen traditioneller Rapssamen und 0,23-0,54% in entfetteten Kotyledonen von Canola (BLAIR und REICHERT 1984). MITARU *et al.* (1982) berichteten, dass Rapsschalen zwischen 0,02 und 0,22% kondensierten Tanninen enthalten, während SHAHIDI und NACZK (1988, 1989) zwischen 0,68 und 0,77% kondensierter Tannine in mehreren Untersuchungen eines Canola-Sortimentes fanden. NACZK *et al.* (1994) wiesen darauf hin, dass Rapsschalen bis zu 2000 mg lösliche kondensierte Tannine pro 100 g ölfreier Schale enthalten (gemessen mit der Vanillin-Methode); dieser Wert ist bis zu 8-mal höher als zuvor berichtet (LEUNG *et al.* 1979, MITARU *et al.* 1982). Der Anteil an kondensierten Tanninen aus dunklen Rapssamen, extrahiert und gemessen nach der Proanthocyanidin-Methode, kann bis zu 6% der Samenschale mit einem Inhalt von insgesamt bis zu 5231 mg/100g ölfreier Schale umfassen (NACZK, 2000). Verantwortlich für die Spannbreite in den Tanningehalten in allen berichteten Ergebnissen sind starke Umwelteffekte (vor allem Temperatur und Lichteinflüsse) sowie die Unterschiede zwischen den verwendeten Extraktionslösungsmitteln bzw. die Quantifizierungsmethoden.

2.2.3 Analytik von Proanthocyanidinen

Die drei Bereiche der Analytik von Tanninen können je nach gewünschten Informationen miteinander kombiniert werden. Quantitative Methoden dienen dazu, die Gesamtmenge an Tanninen in einer Probe zu bestimmen. Methoden zur Trennung bzw.

Aufreinigung dienen dazu, eine reine Form der Tannine für die Weiterverwendung in anderen Tests zu gewinnen. Außerdem erlauben sie eine Trennung nach Molekulargewicht. Ein dritter Bereich umfasst die Methoden, die für eine detailliertere Untersuchung der Tannine geeignet sind.

2.2.3.1 Quantifizierung

Die Methoden zur quantitativen Bestimmung von Tanninen können in folgende drei Gruppen eingeteilt werden: kolorimetrische, Fällungs- und sonstige Methoden.

Kolorimetrische Methoden sind einfach und empfindlich. Die reduzierenden Eigenschaften von Phenolen werden nur in wenigen Methoden genutzt. Im Gegensatz dazu sind die Bildung des Farbstoffes Berliner Blau, die Reduktion von Kaliumpermanganat (Lowenthal-Methode) und die Reduktion von Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Denis-Reagenz, Folin-Ciocalteu-Reagenz) stark verbreitet. Diese Methoden haben den Nachteil, dass sie sämtliche Phenole erfassen und empfindlich gegenüber anderen reduzierenden Pflanzenbestandteilen sind.

Andere Methoden nutzen die Bildung von farbigen Kondensationsprodukten. Beispiele sind die Kondensation mit elektrophilen Reagenzien wie Vanillin (Vanillin-HCl Methode, PRICE *et al.* 1978) oder 4-Dimethylaminocinnamaldehyd (DMCA) im sauren Milieu (McMURROUGH und McDOWELL 1978). Diese Methoden sind spezifisch für *m*-dihydroxyphenyl-Reste und werden für die Analyse von Flavanolen verwendet. Für die Quantifizierung der Proanthocyanidine stehen mehrere spezifische Methoden zur Verfügung: Butanol-HCl-Assay (PORTER *et al.* 1986), Proanthocyanidin Assay (MOLE und WATERMAN 1987) und Sodiumdodecylsulfat-Assay (TERRILL et *al.* 1992). Dieser führt zu ihrer Depolymerisation unter Bildung von farbigen Anthocyanidinen (DESPHANDE *et al.* 1986, MAKKAR 1989, PORTER 1989).

Fällungsmethoden beruhen auf den Eigenschaften von Tanninen, Proteine zu fällen. Rinderserumalbumin wird überwiegend als Protein verwendet. Diese Methoden haben den Vorteil, dass die biologische Aktivität der Tannine erfasst wird. Generell besteht bei diesen Methoden die Möglichkeit, sowohl das Protein als auch die Tannine und zwar sowohl im Niederschlag als auch im Überstand zu bestimmen. Um die gefällten Proteine zu bestimmen, soll man sie vorher farbig oder radioaktiv markieren. Für die Analyse der Tannine finden die oben genannten kolorimetrischen Methoden Verwendung (REED *et al.* 1985, GINER-CHAVEZ *et al*. 1997).

Weitere Methoden zur Quantifizierung von Tanninen sind die Diffusion in BSA (*bovine serum albumine*) enthaltendem Agargel, gravimetrische Verfahren sowie die Hemmung von Enzymen (GOLDSTEIN und SWAIN 1965, REED *et al.* 1985, HAGERMAN 1987).

2.2.3.2 Extraktion, Reinigung und Trennung

Die Extraktion von Tanninen erfolgt üblicherweise mit Aceton/Wasser (70:30), auch wenn für bestimmte Pflanzen andere Lösungsmittel zu einer vollständigeren Extraktion führen (NACZK und SHAHIDI 2004). Ascorbinsäure, Essigsäure oder Trifluoressigsäure werden manchmal als Zusätze hinzugegeben, um die Oxidation der Tannine zu vermeiden. Zu vermeiden sind ebenso höhere Temperaturen sowie starke Exposition gegenüber Licht und Sauerstoff (LAZARUS *et al.* 2003).

Die Verwendung von Sephadex LH-20 als Säulenmaterial für die Aufreinigung von Tanninen ist weit verbreitet (HAGERMAN 2002). Ebenso zeigten sich andere Gelmaterialien wie Fractogel TSK HW-40F oder Amberlite XAD-7 geeignet (SOUQUET *et al.* 1996, DEGENHARDT *et al.* 2000). SUN *et al.* (1998) hat die Verwendung von C18 Sep-Pak Kartuschen zur Festphasenextraktion erfolgreich eingesetzt. Flüssig/Flüssig-Extraktionsverfahren zeigten sich ebenso wie Fällungsmethoden geeignet (REED 1995, NACZK und SHAHIDI 2004). Mit diesen Methoden gelingt eine Fraktionierung in oligo- und polymere Proanthocyanidine.

Mit zunehmendem Polymerisierungsgrad wird die Isolierung von reinen Proanthocyanidinen immer schwieriger, da die Anzahl der möglichen Isomere steigt und somit die Menge jedes einzelnen Isomers geringer wird. Die chromatographische Auflösung wird durch Überlappung von Retentionszeiten schlechter (LAZARUS *et al.* 1999, 2003). Bislang wurden kondensierte Tannine bis zu Pentameren identifiziert und charakterisiert (SANTOS-BUELGA *et al.* 2000). *High-performance liquid chromatography* (HPLC) auf C18 Säulen ist geeignet für eine Trennung bis zu Tetrameren. Höhere Polymere erscheinen dabei als breiter, unaufgelöster Peak (GUYOT *et al.* 1997). HAMMERSTONE *et al.* (1999) gelang die Auftrennung bis zu Decameren auf Normalphasen-HPLC. Allerdings handelte es sich dabei um überwiegend aus Epicatechin bestehende Proanthocyanidine. In komplexeren Mixturen konnte die Auflösung nicht mehr erreicht werden (LAZARUS *et al.* 2003). Eine Größenausschlusschromatographie gelingt nur unzureichend aufgrund der PAs Adsorption an Gelmaterialien wie Sephadex, Amberlite und Fractogel. Auf Sephadex LH-20, Fractogel (*syn.* Toyopearl) gelang eine Trennung bis zu tetrameren Proanthocyanidinen (CHEYNIER und FULCRAND 2003). Auch mittels Gegenstromverteilungschromatographie,

Dünnschichtchromatographie (TLC) und Zentrifugationsverteilungschromatographie gelang eine Trennung bis zu Tetrameren (HAMMERSTONE *et al.* 1999).

Die Struktur der Proanthocyanidine könnte man mit den gängigen analytischen Methoden aufklären, wenn sie in einem reinen Zustand vorliegen. Da ihre Heterogenität jedoch mit ihrer Kettenlänge zunimmt, ist es so gut wie unmöglich, reine kondensierte Tannine jenseits von Pentameren zu isolieren (CHEYNIER und FULCRAND 2003).

Die Zusammensetzung sowie die durchschnittliche Kettenlänge der Proanthocyanidine lassen sich bestimmen mit Hilfe eines säurekatalysierten Abbaus in Gegenwart eines nucleophilen Reagenzes. Die CC-Bindungen werden unter sauren Bedingungen spalten. Dabei wird das Endstück der Kette als Flavanol freigesetzt, während die anderen Monomere mit den nucleophilen Reagenzien reagieren (VIVAS *et al.* 2004). Verbreitete Reagenzien sind Phloroglucinol und Benzylmercaptan (KENNEDY und JONES 2001). Die Abbauprodukte können mittels HPLC oder Gaschromatographie (GC, nach Derivatisierung zu Trimethylsilylether) analysiert werden. Dies setzt allerdings die Identifizierung und Kalibrierung der Abbauprodukte voraus. Zusätzlich wurde eine 1H NMR-Methode (Nuclearmagnetische Resonanz) zur Analyse der Abbauprodukte beschrieben (CAI *et al.* 1991). Mit Hilfe einer 13C-NMR-Methode ist es möglich, über den Vergleich des Signals für C3 der Endeinheit mit dem der Erweiterungseinheiten Kettenlänge abzuschätzen (CZOCHANSKA *et al.* 1979). Der Unterschied zwischen *cis/trans* lässt sich durch Integration der Signale für das C2-Atom bestimmen (CZOCHANSKA *et al.* 1980). Durch Vergleich der Integrale aller Signale der A-Ring Protonen mit den Integralen der H4 Protonen (nur in Endeinheiten) lässt sich mittels 1H-NMR die Kettenlänge der Proanthocyanidine bestimmen. Die Trennung von Proanthocyanidinen nach Molekulargewicht ist aufgrund der Adsorption an Gelmaterialien nur nach vorheriger Derivatisierung der Hydroxylgruppen möglich. Diese können acetyliert oder methyliert werden. Anschließend kann die Trennung auf unterschiedlichen Säulen erfolgen. Die Molekulargewichte-Verteilung kann durch Vergleich mit Polystyrene Standards abschätzt werden (CHEYNIER und FULCRAND 2003).

Die direkte Verwendung von massenspektrometrischen Methoden mit weichen Ionisierungsarten, wie Elektrospray-Ionisisation (ESI), Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie/*Time-of-flight* (MALDI-TOF) und Fast 20 Tannine-Atom-Bombardement (FAB), eignet sich zwar für die direkte Analyse von Proanthocyanidinen. MALDI-TOF hat jedoch dabei einen größeren Massenbereich als ESI und FAB. Die Quantifizierung mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren ist allerdings schwierig (CHEYNIER und FULCRAND 2003, LAZARUS *et al.* 2003).

2.3 Anatomie und Ontogenese des Rapssamens

2.3.1 Aufbau des Rapssamens

Bei der Saat von *B. napus* handelt es sich um einen mehr oder weniger kugelförmigen Samen mit einem Durchmesser von 2,0 bis 3,2 mm, einem Gewicht von 3,5 bis 5,5 mg und zumeist schwarzer, gelegentlich brauner und nur selten gelber Farbe. Die Samenschale schwarzsamiger Typen macht zwischen 10,5 bis 20% des Samengewichts aus und setzt sich aus der Epidermis, dem Palisadenparenchym und dem einzelligen Endosperm zusammen (BEWLEY und BLACK 1983, NACZK *et al.* 1998). Die dunkle Samenfarbe beruht vor allem auf hoch kondensierten Tanninen, die in den Wänden der Palisadenzellschicht und einer der darunterliegenden dichten Pigmentschicht eingelagert sind. Das von der dunklen Samenschale umhüllte, hellgelbe Gewebe besteht ausschließlich aus dem Embryo (84-88% der Saat). Dieses gelbliche Gewebe besteht aus zwei ineinander gefalteten Kotyledonen (Keimblätter) und der Keimwurzel (Radicula). Die Kotelydonen werden überwiegend aus großlumigen Zellen geformt und sind größtenteils mit Ölpartikeln (Oleosomen) gefüllt. Als Eiweißspeicher (20-27% der Saat) sind auch Aleuronkörper eingelagert. Umgeben werden die Kotyledonen von der fein punktierten oder schwach genetzten Samenschale (Testa). Der Wassergehalt der Rapssamen liegt in der Regel zwischen 6 und 8%. Diese bemerkenswert niedrige Feuchte ist im Wesentlichen durch den hohen Gehalt an Öl bedingt, der zwischen 39 und 45% je nach Sorte und Jahrgang schwanken kann. Der Gehalt an Phospho- und Glycolipiden ist im reifen Samen mit 0,5 bis 1,5 % sehr gering (APPELQVIST und OHLSON 1972, THEANDER *et al.* 1977, ANJOU *et al.* 1977, SOSULSKI *et al.* 1981, PRZYBYLSKI und ESKIN 1991, BELL 1993, JENSEN *et al.* 1995, NACZK *et al.* 1998).

2.3.2 Reservestoffeinlagerung im Verlauf der Ontogenese

Reife Rapsembryos enthalten ungefähr 50% Speicherlipide, 25% Speicherprotein und darüber hinaus 5% Oleosin, ein Apolipoprotein, das ausschließlich in den Oleosomen des Rapssamens vorkommt. Diese Speicherkomponenten sind in den Kotelydonzellen nach gleichem räumlichem Muster akkumuliert. Ihre Synthese und Einlagerung folgt allerdings einem bestimmten zeitlichen Ablauf und lässt sich in vier ineinander übergreifende Stadien einteilen. In der ersten Phase (2-3 Wochen) der Zellteilung und Organformation des neu geformten Embryos geht eine geringe oder fehlende Synthese von Speicherkomponenten mit einer Gestaltänderung des Embryos einher. Nach abgeschlossener Zellteilung, mit beginnender Speicherölsynthese, findet in den folgenden 4-5 Wochen Zellstreckung

(Zellvergrößerung) und Akkumulation von Speicherprodukten (hauptsächlich Speicherprotein und -öl) statt. Nach der anschließenden Dehydratation des Samens (ca. 4 Wochen), während der hauptsächlich Oleosin und einige andere Speicherprodukte synthetisiert werden, tritt der reife Samen in eine Ruhephase ein. Mit beginnender Quellung und Samenkeimung werden die im Samen eingelagerten Speicherstoffe mobilisiert und ein neuer Keimling entwickelt sich (NORTON und HARRIS 1983, MURPHY und CUMMINS 1989, MURPHY *et al*. 1989).

Während der Embryoentwicklung beginnt die Speicherlipidsynthese etwa zwei Wochen vor der Synthese der Hauptspeicherproteine Napin und Cruciferin (20-40% bzw. 40-50% des Gesamtproteins) (NORTON und HARRIS 1975, CROUCH und SUSSEX 1981, MURPHY und CUMMINS 1989a, 1989b, BREEN und CROUCH 1992). Die Akkumulation des hydrophoben Apolipoproteins Oleosin (20% am Gesamtprotein) in den Oleosomen beginnt in einem relativ späten Stadium der Embryogenese, etwa 6-7 Wochen nach der Blüte, und erfolgt verstärkt während der Samendehydratation etwa 9-11 Wochen nach der Blüte (MURPHY und CUMMINS 1989, MURPHY *et al*. 1989a, 1989b, MURPHY 1990, 1993).

Neben Öl und Protein ist auch die Einlagerung von Speicherstärke und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (Glucosinolate, Sinapine, Tannine, Tocopherole, Chlorophyll, Carotinoide und Flavonoide) temporär reguliert (DA SILVA *et al*. 1997, DU und HALKIER 1998, NACZK *et al*. 1998, GRIFFITH *et al*. 1998, SHIRLEY 1998). Reifende, selbst photosynthetisch aktive Samen beziehen den für die Biosynthese ihrer Speicherprodukte benötigten Kohlenstoff zum großen Teil in Form von Saccharose, welche über das vaskuläre System der Rapspflanze (Xylem und Phloem) aus den Source-Organen angeliefert wird. Die Saccharose wird zum einen direkt als Speicherstärke akkumuliert oder zum anderen in glycolytische Metabolite umgeformt, die dann der Synthese von Speicherprotein und Samenöl als Vorstufe dienen. Im Rapssamen ist nur eine transiente Akkumulation von Speicherstärke während der frühen Embryoentwicklung nachzuweisen. In späteren Entwicklungsstadien wird Saccharose-Kohlenstoff von der Stärkeformation abgezweigt und der Öl- und Proteinsynthese zugeleitet (KANG und RAWSTHORNE 1994, 1996, EASTMOND *et al*. 1996, DA SILVA *et al*. 1997).

2.3.3 Struktur und Funktion der Samenschale

Die Samenschale (Testa) ist das Interface zwischen dem Embryo und der äußeren Umgebung. Durch einen Vergleich mehrerer Studien zur Struktur der Samenschale in *Brassicaceae* (VAUGHAN und WHITEHOUSE 1971, BOUMAN 1975, VAN CAESEELE *et al.* 1981, 1982, KUANG *et al.* 1996, BEECKMAN *et al.* 2000, WESTER *et al.* 2000,

WINDSOR *et al.* 2000) konnte MOÏSE *et al.* (2005) eine gemeinsame Struktur innerhalb der Familie feststellen, die aus vier unterschiedlichen Schichten von Zellen mütterlichen Ursprungs besteht. Die äußere Schicht des äußeren Integuments besteht typischerweise nur aus einer Lage flacher Zellen. Nach innen folgt die mittlere Schicht des äußeren Integuments (einer oder mehreren Zelllagen), die meist Parenchymgewebe, aber auch Kollenchym- oder Sklerenchymgewebe bilden kann. Die innere Zellschicht des äußeren Integuments stellt die dritte Schicht der Samenschale aus U-förmigen Palisadensklerenchymzellen dar, die Palisadenschicht. Die Zellwände dieser Schicht sind basal und adaxial mit sekundärem Zellwandmaterial (Lignozellulose) verstärkt. Palisadenzellen sind typisches Assimilationsgewebe und besonders reich an Chloroplasten. Die vierte Schicht wird als Pigmentschicht bezeichnet und ist für die Farbgebung verantwortlich, denn in diesem vom inneren Integument des Embryos gebildeten Endothelium sind polyphenolische Pigmente (Proanthocyanidine) eingelagert (BEWLEY und BLACK 1983, BEECKMAN *et al.* 2000). Proanthocyanidine werden in der Vakuole akkumuliert und durch spätere Oxidation eine braune Samenfarbe vermitteln (HAUGHN und CHAUDHURY 2005). Die innere Begrenzung der Samenschale zum Embryo mit seinen Speicherkeimblättern bildet das Endosperm. Dieses besteht bei den *Brassica*-Arten lediglich aus einer einschichtigen Aleuronschicht. Die Samenschale erfährt hinsichtlich der Anzahl an Zellen und Zellschichten während der Samenentwicklung expansive und reduzierende Stadien. Durch Druckwirkungen des wachsenden Embryos gegen Ende der Speicherstoffeinlagerung werden das Endothelium und die Aleuronschicht gegen das innere Palisadengewebe gepresst, so dass letztlich die amorphe Zellwandstruktur aus (Sub-) Epidermis, Pigmentzellschichten und Palisadenschicht eine feste und kompakte Samenschale im reifen Rapssamen bildet (BEECKMAN *et al*. 2000, WAN *et al*. 2002). Die kompakte Struktur der Palisadenschicht bleibt auch im reifen Samen erhalten und ist somit hauptsächlich für die mechanische Widerstandskraft der Samenschale verantwortlich.

Abbildung 9 verdeutlicht den Aufbau der *B. napus*-Samenschale anhand von Dünnschnitten der Samen in drei unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Sechs Tage nach Befruchtung (*days after flowering*, daf) befindet sich der Embryo im kugelförmigen Stadium. Das innere und das äußere Integument weisen mehrere Lagen relativ undifferenzierter Zellen auf. Vierzehn Tage nach Befruchtung (14 daf) nimmt der Embryo eine U-Form an. Das innere Integument ist an einigen Stellen auf zwei bis drei Lagen geschrumpft und die angrenzende Pigmentschicht ist deutlich zu erkennen. (WAN *et al.* 2002). In der Vakuole der Zellen des Endotheliums lagern die Proanthocyanidine ein, die

durch spätere Oxidation die braune Samenfarbe vermitteln werden (HAUGHN und CHAUDHURY 2005). Nach ungefähr 24 Tagen hat der Embryo seine volle Größe erreicht und das innere Integument ist vollständig komprimiert. Das äußere Integument ist noch vierlagig und wird im weiteren Verlauf ebenfalls komprimiert (WAN *et al*. 2002).

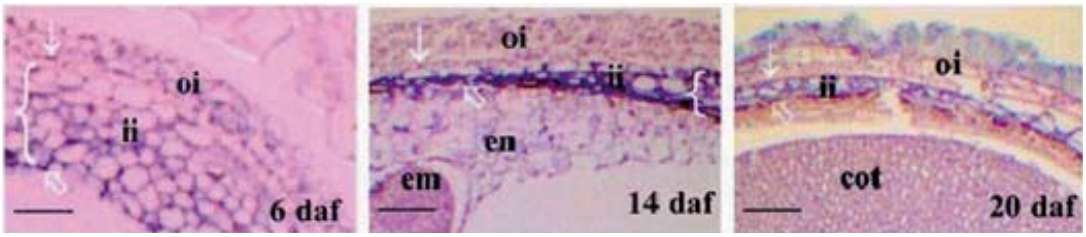

Abb. 9 - Immunocytochemischer Nachweis der Entwicklung der Samenschale von Brassica napus nach 6, 14 und 20 Tage nach der Blüte (days after flowering; daf). Der dünne Pfeil markiert die Palisadenschicht, an die sich nach innen das innere Integument anschließt. Der Blockpfeil markiert die Pigmentschicht. Die geschweifte Klammer umfasst alle Zellschichten des inneren Integuments. cot: Kotyledonen; en: Endosperm; ii: inneres Integument; oi: äußeres Integument (WAN et al. 2002).

Der Samenschale wird es dadurch ermöglicht, wichtige Funktionen für den Schutz des Embryos vor mechanischer Beschädigung und Pathogenbefall zu übernehmen. Ferner bietet die Samenschale durch die Einlagerung von Pigmenten – insbesondere Flavonoide – einen Schutz vor Gewebeschädigungen durch UV-Licht oder Pathogenbefall (Phytoalexine) und oxidativem Stress (DOONER und ROBBINS 1991, DIXON und PAIVA 1995, SHIRLEY 1996, GROTEWOLD *et al*. 1998).

2.4 Biosynthese phenolischer Substanzen (Phenylpropanoid-Stoffwechsel)

Flavonoide sind phenolische Verbindungen des Phenylpropanoidstoffwechsels und gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltstoffen. Der Begriff „sekundäre Pflanzenstoffe“ wurde erstmals von KOSSEL (1891) verwendet, um pflanzliche Verbindungen des primären Stoffwechsels, d. h. in jeder Zelle vorkommende, lebensnotwendige Metabolite des Energie- und Aufbaustoffwechsels (Proteine, Lipide und Kohlenhydrate), von solchen, die nicht essentiell für das Pflanzenleben sind, zu unterscheiden. Diese Unterscheidung wurde bis heute beibehalten, obwohl sich herausstellte, dass auch die sekundären Inhaltsstoffe wichtige Funktionen in der Pflanze übernehmen (RHODES 1994, SHIRLEY 1996). Sie sind an einer Reihe von wichtigen, biologischen Funktionen beteiligt, z. B. dem Einfluss auf Fertilität und Pollenkeimung (VAN DER MEER *et al.* 1992, FISCHER *et al.* 1997), die Samenschalen-

induzierte Dormanz und auf die Lagerfähigkeit von Samen (WINKEL-SHIRLEY 1998, DEBEAUJON *et al.* 2000). Quercetin und Katechin haben antioxidative Eigenschaften (RICE-EVANS *et al.* 1997) und eine enzymhemmende Wirkung (CASTELLUCCIO *et al.* 1995), welche der Samenalterung während der Lagerung entgegenwirken könnte.

In Abbildung 10 ist eine Übersicht des Phenylpropanstoffwechsels dargestellt (nach LEPINIEC *et al.* 2006). Ausgehend von Phenylalanin gliedern sich von der Phenylpropanoidstoffwechsel verschiedene phenolische Verbindungen, wie Pigmente (Flavonoide), Phytoalexine, Zellwandkomponenten (Lignin) und Signalmoleküle (DOONER und ROBBINS 1991, HAHLBROCK und SCHEEL 1989).

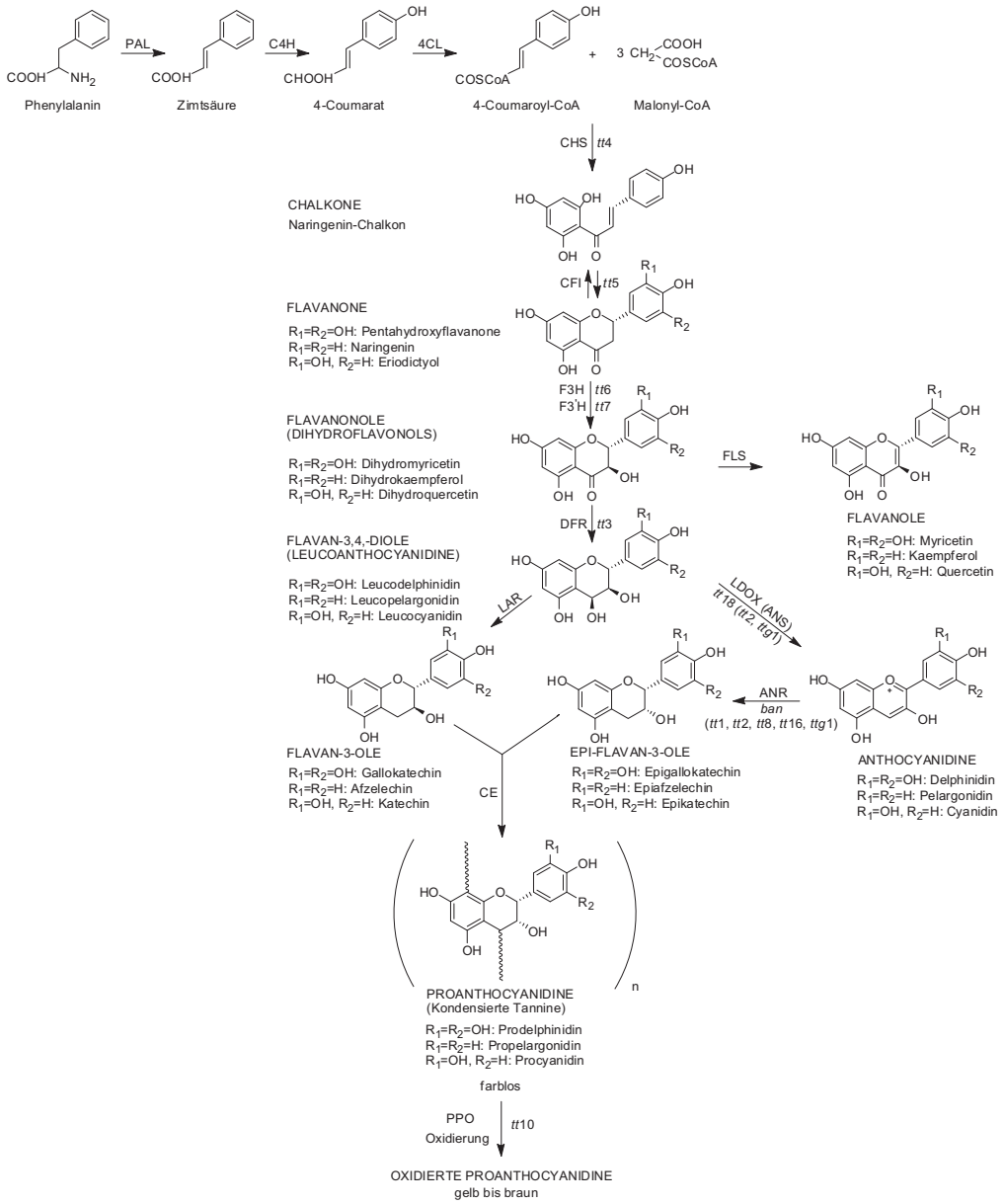

Abb. 10 - Biosyntheseweg der Proanthocyanidine in Arabidopsis thaliana mit beteiligten tt-Genen. Erläuterung der Enzymakronyme im Text. Verändert nach LEPINIEC et al. (2006).

Die Verbindung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel wird von dem Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) hergestellt, das die Desaminierung der aromatischen Aminosäure Phenylalanin zur *trans*-Zimtsäure katalysiert. Die Reaktion der PAL ist die Schlüsselreaktion zur Synthese der phenolischen Inhaltsstoffe in der Pflanze. Die Zimtsäure wird von der Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) durch die Einführung einer Hydroxygruppe in den Phenylring in *p*-Cumarat umgesetzt. *p*-Cumarat wird durch das Enzym 4-Cumarsäure:CoA-Ligase (4CL) zu der Vorstufe Cumaroyl-CoA aktiviert. Über Cumaroyl-CoA, aus dem durch Reduktion Cumarylalkohol (Monolignol) entsteht, ist eine Querverbindung zur Lignin-Biosynthese gegeben (THEANDER *et al.* 1977, WHETTEN und SEDEROFF 1995).

Das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese ist die Chalkon-Synthase (CHS), die Cumaroyl-CoA und drei Malonyl-CoA-Einheiten unter CO_2-Abspaltung in einer irreversiblen Reaktion (Malonatweg) zum Grundgerüst der Flavonoide, dem Naringenin-Chalkon, umsetzt. Die Grundstruktur der Flavonoide (Abb. 11) besteht aus einem C6-C3-C6-Skelett, in dem zwei aromatische (A und B) und ein heterozyklischer Ring (C) mit einem Sauerstoffatom zu finden sind. Der Flavonoid-B-Ring stammt von der Aminosäure Phenylalanin, die während der Phenylpropanoidbiosynthese in den Plastiden gebildet wird (ROUTABOUL *et al.* 2006). Der Flavonoid-A-Ring wird bei der Chalconsynthese durch sukzessive Kondensation von drei Malonyl-CoA-Molekülen zusammengesetzt.

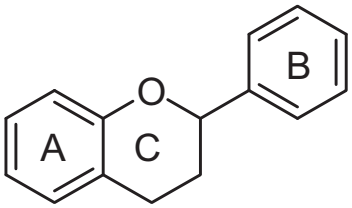

Abb. 11 - Flavonoide Grundstruktur (C6-C3-C6 Skelett).

Die Flavonoide sind in verschiedene Untergruppen, wie Aurone, Flavan-4-ole, Phlobaphene, Flavone, Isoflavonoide, Chalkone, Flavanone, Flavanonole (2,3-Dihydroflavonole), Flavonole, Leucoanthocyanidine (Flavan-3,4,-diole), Flavan-3-ole, Epi-Flavan-3-ole, Proanthocyanidine und Anthocyanidine (Anthocyane) eingeteilt (LEPINIEC *et al.* 2006).

Das Enzym Chalkon-Flavanon-Isomerase (CFI) katalysiert die Umbildung des Naringenin-Chalkons in Naringenin durch die Addition einer phenolischen Hydroxygruppe an die Doppelbindung der C-Kette, indem ein Ringschluss erfolgt. Von dem Naringenin leiten

sich die Flavone, Isoflavone, Phlobaphene und Flavanonole ab. Naringenin, Eriodictyol und Pentahydroxyflavanone sind unterschiedliche Typen vom Flavanone, die neben Anthocyaninen hauptsächlich in den vegetativen Pflanzenteilen vorkommen (CHAPPLE *et al.* 1994). Der letzte gemeinsame Schritt in der Flavonoidbiosynthese ist die schrittweise Hydroxylierung durch Flavanon-3-Hydroxylase (F3H) und Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) zu den Flavanonolen (Dihydrokaempherol, Dihydroquercetin und Dihydromyricetin). Nun können die Flavanonolen durch Katalyse der Flavonolsynthase (FLS), die eine Doppelbindung zwischen C2- und C3-Atom ausbildet, in einem der farblosen Flavanole (Quercetin, Kaempherol, Myricetin) umgewandelt werden. Ein weiterer Weg der Flavononolen führt durch katalytische Reduktion der NADPH-abhängige Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) zu den Flavan-3,4-diolen (Leucocyanidine, Leucopelargonidine, Leucodelphinidine), der letzten gemeinsamen Vorstufe der Anthocyanidin- und Proanthocyanidin-Biosynthese.

Die Anthocyanidine (Cyanidine, Pelargonidine, Delphinidine) werden von der Dihydroflavonol-Reductase (DFR) und der Leucocyanidin Oxygenase/Anthocyanidin-Synthase (LDOX/ANS) über die Leucoanythocyanidine aus Dihydroflavonolen synthetisiert, wobei am B-Ring durch Hydroxylierungen und Methylierungen Modifikationen vorgenommen werden, die die Farbe beeinflussen (FORKMANN und HELLER 1999, HOLTON und CORNISH 1995). Aus der Gruppe der Anthocyanidine werden unter Mitwirkung der Anthocyanidin-Reductase (ANR) die Epi-Flavan-3-ole (Epikatechin, Epiafzelechin und Epigallokatechin) synthetisiert. Über die Anthocyanidine entstehen später die auffällig gefärbten Anthocyanine als rote, violette und blaue Blütenfarbstoffe, die u.a. eine Insekten-anlockende Funktion besitzen.

Aus den Leucoanthocyanidinen (Flavan-3,4-diole) werden nicht nur, wie oben gezeigt, die Anthocyanidine, sondern auch die Flavan-3-ole wie Katechin, Afzelechin und Gallokatechin synthetisiert. Dies erfolgt durch die Reduktion der 4-Hydroxygruppe mit Hilfe der ebenfalls NADPH-abhängigen Leucoanthocyanidin-4-Reductase (LAR) (FORKMANN und HELLER 1999).

Aus den Monomeren Flavan-3-ole und Epi-Flavan-3-ole entstehen durch kondensierende Enzyme die farblosen Proanthocyanidine (kondensierte Tannine), die durch Oxidation in sichtbare, gelbliche bis braune Proanthocyanidin-Derivate umgewandelt werden.

2.5 Flavonoid-Akkumulation in der Samenschale

Proanthocyanidine werden überwiegend in den Vakuolen der Samenendothelialzellen lokalisiert. Eine Reduktion dieser antinutritiven Substanzen ist durch die Selektion von hellsamigen Rapsgenotypen zu erreichen, denn im Hinblick auf die Samenfarbe (Pigmentierung) sind für die zu den Kreuzblütlern gehörende Modellpflanze Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) eine ganze Reihe von Mutanten beschrieben, die eine farblose Testa (*transparent testa*, *tt*) bzw. drastische Veränderungen im Phenylpropanoid-Stoffwechsel aufweisen (*tannin deficient seed*, *tds*). Die in den *tt*- und *tds*-Mutanten betroffenen *Arabidopsis*-Gene stellen aussichtsreiche Kandidatengene für das Merkmal Gelbsamigkeit und relevante phenolische Inhaltsstoffe von Raps dar (FRIEDT *et al.* 2002).

Aufgrund der komplexen Genomstruktur von *B. napus* ist zu erwarten, dass bestimmte Arabidopsis-*tt*-Gene im Raps in mehreren Kopien vorliegen. Bedingt durch die enge Verwandtschaft zeichnen sich die *Arabidopsis*- und *Brassica*-Genome durch eine Konservierung des Genbestandes und der Gensequenzen aus. Damit bietet sich die Möglichkeit, die Kenntnisse über den Aufbau des Arabidopsis-Genoms unmittelbar für die Charakterisierung von merkmalsrelevanten Genombereichen in *B. napus* zu nutzen und damit die Genisolierung in dieser wichtigen Kulturpflanze zu erleichtern. Relevante Kandidatengene, die für die Tanninbiosynthese zuständig sind, beinhalten Gene, welche für Enzyme (*tt*7, *tt1*8, *tt*10, FLS - vermutet *tt*6), Transporter (*tt*12, AHA10) und regulatorische Faktoren (*tt*1, 2, 8 und 16) kodieren (HAUGHN und CHAUDHURY, 2005). Ausgehend von publizierten Sequenzen dieser Kandidatengene, können orthologe Gene von *B. napus* durch vergleichende Sequenzierung lokalisiert werden. Basierend auf diesen Sequenzen können dann locusspezifische Primerpaare entwickelt und dafür verwendet werden, um die Sequenzen sowie die Transkription der betreffenden Gene in gelbsamigen Rapsmutanten zu analysieren.

Die Transkriptionsfaktoren *tt*1 (WIP-Zink Fingerprotein) und *tt*16 (MADS-box Protein) durch Beeinflussung der *ban*-Aktivität sind notwendig für die Proanthocyanidin-Biosynthese im Endothelium (NESI *et al.* 2002, ROUTABOUL *et al.* 2006). Die vermutliche Rolle von *tt*16 besteht in der Bestimmung der Zellenform des Endotheliums und Vakuolisierung. Darüber hinaus beeinflusst es die Höhe des Transkriptionsniveaus des *ban*-Gens, welches eine Hauptrolle in der Biosynthese der Proanthocyanidine spielt. Es ist wissenschaftlich bewiesen, dass die *ban-Arabidopsis*-Mutanten in den Endothelialzellen

Anthocyanidine statt Proanthocyanidine ansammeln (ALBERT *et al.* 1997). Die Zellen der *tt*16-*Arabidopsis*-Mutanten zeigen in allen drei Schichten des inneren Integumentes eine ungewöhnliche Art der Teilung und Differenzierung der Zellen, und aufgrund der Tatsache, dass *tt*16 einige Syntheseschritte vor den anderen Genen wirkt, wird es als globaler Regulator der Endothelialzell-Differenzierung betrachtet (HAUGHN & CHAUDHURY 2005).

Die spezifische Rolle von *tt*1 ist weniger deutlich, denn es wird nicht für die Transkription des *ban*-Gens benötigt, und weiterhin gibt es widersprüchliche Berichte hinsichtlich seiner Rolle in der Ausbildung der Endothelialzellen (DEBEAUJON *et al.* 2003, SAGASSER *et al.* 2002). Über die Beeinflussung der Endothelialzellen-Differenzierung könnte *tt1* auch die Proanthocyanidin-Biosynthese fördern. Die Aufklärung der Genexpression von *tt*1, *tt*2, *tt*8, *ttg*1, *ttg*2 und *tt*16 in *tt*1-*Arabidopsis*-Mutanten wird vermutlich auch zu einer genaueren Kenntnis der Bedeutung von *tt*1 führen. Es ist auch bemerkenswert, dass *tt*1 und *tt*16 nicht für die Differenzierung von Endotheliumzellen in den chalazal und micropylar gelegenen Enden des Samens benötigt werden (LEPINIEC *et al.* 2006). Die Differenzierung dieser Zellen muss mithin von unterschiedlichen Regulatoren kontrolliert werden. Ein ähnlicher Pigmentationsphänotyp wird häufig an der Samenschale von gelbsamigen Rapsgenotypen beobachtet.

Wegen seiner Rolle in der Regulierung der Samenschalenentwicklung sowie die Flavonoidbiosynthese ist das Gen *tt*1 (SAGASSER *et al.* 2002) ein wichtiges Kandidatengen für Samenfarbe und assoziierte Schrotqualitätsmerkmale in Raps. In *A. thaliana* handelt es sich um ein *single-copy gene* auf Chromosom 1 mit zwei Exons und einigen Kilobasen (kb) repetitiver DNA. Das Gen wird in der Samenanlage und in jungen Samenkörnern exprimiert, hier vor allem im inneren Integument sowie geringfügig auch im äußeren Integument. Das aus der Basensequenz abgeleitete *tt*1-Protein umfaßt 303 Aminosäuren mit zwei ZinkfingerMotiven vom Typ TFIIIA (SAGASSER *et al.* 2002). Der putative Transkriptionsfaktor *tt*1 ist durch posttranskriptionale Regulation der Expression des *banyuls*-Gens (*ban*) an der Proanthocyanidinsynthese und der Differenzierung des inneren Integuments beteiligt (SAGASSER *et al.* 2002, DIXON *et al.* 2005, LEPINIEC *et al.* 2006, ROUTABOUL *et al.* 2006,). *ban* codiert für das Enzym Anthocyanidinreduktase (ANR), das die Bildung von Epiflavan-3-olen, farblosen Vorstufen von kondensierten Tanninen, katalysiert (LEPINIEC *et al.* 2006). In *Arabidopsis* resultieren Mutationen von *ban* in einer transparenten Samenschale, einer Anreicherung von Anthocyaninen und einem Fehlen von Proanthoyaninen in der Samenschale (DIXON *et al.* 2005).

Die samenspezifischen Gene *tt*1 und *tt*16 codieren für Proteine, die in die Entwicklung des Samenendotheliums involviert sind. Daher stellen diese samenspezifischen Gene mögliche Kandidaten für postulierte Majorgene mit einer regulatorischen Funktion bei der Tanninakkumulation dar. In *B. napus* wurden vier zugehörige homologe Kopien von *tt*1 aus einer BAC-Bibliothek isoliert, um die Funktionalität der Kopien zu testen (LOTZ *et al.* 2003). Eine Kartierung der homologen Kopien von *tt*1 in *B. napus* sollte es ermöglichen, die Verbindung zu dem/den Haupt-QTL für Samenfarbe und das Tannin-Merkmal herzustellen. Die Marker, die in dem genetischen Kartierungsexperiment mit der Samenfarbe und dem Proanthocyanidingehalt eng gekoppelt sind, werden wertvolle Werkzeuge für die Züchtung neuer hellsamiger Rapsvarianten mit reduzierten Tanningehalten darstellen.

Die farblosen Proanthocyanidine färben sich durch Oxidation braun. Wenn bei der Reifung durch Desikkation eine Oxidation der Flavonoide ermöglicht wird, färbt sich die Samenschale braun. Eine enzymatische Oxidierung der Proanthocyanidinen in den Schalen von *Arabidopsis*-Samen konnte von POURCEL *et al.* (2005) nachgewiesen werden: In der *Arabidopsis*-Mutante *tt*10, bei der ein Laccase-ähnliches Enzym fehlt, dunkeln die farblosen Proanthocyanidine nicht während der Samenreifung, sondern erst nach Lagerung der Samen nach.

2.6 Bedeutung und Züchtung gelbsamiger Rapsformen

Der Züchtung hellsamiger Rapsformen wird große Bedeutung beigemessen, um den Gehalt an nicht verdaulichen Substanzen zu reduzieren und dadurch die Verdaulichkeit von Rapsschrot zu verbessern. Die dadurch verbesserte Schrotqualität gegenüber dem Konkurrenzprodukt Soja-Extraktionsschrot könnte zu einem verstärktem Einsatz von Rapsschrot in der Tierernährung führen. Die Zusammenhänge zwischen der Hell- bzw. Schwarzsamigkeit, dem Gehalt an Rohfaser, an kondensierten Tanninen und der Verdaulichkeit sind in der Literatur ausgiebig diskutiert worden (u.a. STRINGAM *et al.* 1974, BELL und SHIRES 1982, SHIRZADEGAN und RÖBBELEN 1985, BELL 1993, THIES 1994, SLOMINSKI *et al.* 1994, SIMBAYA *et al.* 1995, SLOMINSKI 1997). Raps-Mutanten mit hellen Samen konnten schon oft im Zuchtgartenmaterial selektiert werden, jedoch erwies sich die Merkmalsstabilität als unzureichend (WANG und LIU 1991). Die erste hellsamige Rapssorte 'Hua-yellow No.1' wurde in China nach Einkreuzung gelbsamiger *B.rapa*-Formen in Rapsmaterial und anschließender mehrjähriger Selektion entwickelt (vgl. FRIEDT *et al.* 2002).

Um die *B. napus*-Samenfarbe zu bestimmen, hat in den vergangenen Jahren das Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie-Verfahren (NIRS) eine besondere Bedeutung erlangt. Der wesentliche Vorteil des NIRS-Verfahrens besteht darin, dass die Gehalte verschiedener Inhaltsstoffe und Qualitätsparameter aus einer einzigen zerstörungsfreien Messung geschätzt werden können (TKACHUK 1981, BENGTSSON 1985, KOESTER 1989). Die Messung erfolgt schnell und kostengünstig. Im Vergleich dazu erfordern die entsprechenden konventionellen nasschemischen Verfahren einen erheblich höheren Zeit- und Personalaufwand (ROTOLO 1979).

Die Gelbsamigkeit entsteht nicht aufgrund einer gelben Samenschale, obwohl diese Vermutung nahe liegt. Vielmehr besitzen gelbsamige *B. napus*-, *B. campestris*- und *B. juncea*-Samen eine transparente Samenschale (ähnlich dem *transparent testa*-Phänotyp bei *Arabidopsis*), so dass die gelbe oder goldene Farbe durch den durchscheinenden Embryo entsteht (TANG *et al.* 1997). Braune und schwarze Samen haben ebenfalls einen gelben Embryo, aber aufgrund einer dickeren Samenschale mit eingelagerten Farbpigmenten scheint seine Farbe nicht durch. Die Pigmente sind überwiegend Polyphenole, die in dem Palisaden- und Parenchymgewebe der Samenschale während der Reifung eingelagert werden. Weitere Studien der Samenschale erbrachten das Ergebnis, dass bei gelbsamigen Genotypen die Zellen der Samenschale kleiner sind und mit einem reduzierten Palisadengewebe einhergehen. Dies führt zu einer Verschiebung der Proportionen von Samenschalenanteil zum ganzen Samen bzw. zum Embryo. Dieser ist bei gelben Samen schwerer als bei vergleichbaren dunkelsamigen Formen (STRINGAM *et al.* 1974). Es kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der Samenfarbe auf verschiedene Qualitätsparameter (Öl, Eiweiß und TKG) mit der Beschaffenheit der Samenschale zusammenhängt (STRINGAM *et al.* 1974).

Gelbsamigkeit geht auf einen Mangel an oxidierten Tanninen in der Samenschale zurück. Dies kann einerseits in einem insgesamt niedrigeren Tanningehalt begründet sein, aber auch in einer veränderten Zellmorphologie der Samenschale, die nur eine geringe Akkumulation von Tanninen erlaubt. In *A. thaliana* werden die meisten Mutationen, die zu Gelbsamigkeit führen, *transparent testa*- oder *tt*-Mutationen genannt. BEECKMAN *et al.* (2000) vermuten, dass die Samenpigmente eine ähnliche biochemische Vorstufe besitzen wie die Anthocyanine anderer Gewebe, da *tt*-Mutanten wenig oder gar keine Anthocyanine in ihren Blättern aufweisen.

Die Untersuchungen zu Flavonoidgehalten in *A. thaliana* fanden heraus, dass Epicatechin und Procyanidine – Vorstufen der oxidierten Tannine – ausschließlich in der Samenschale auftreten. Außerdem akkumulieren hier über 90% des Quercetin-3-O-

Rhamnosids und Biflavonole. In *tt*1-Mutanten waren keine löslichen Proanthocyanidine und nur 21% der unlöslichen Proanthocyanidine im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle nachweisbar. Der niedrige Gesamt-Flavonol-Gehalt ist vor allem in einem reduzierten Anteil von Quercetin-3-O-Rhamnosid, dem Haupt-Flavonol im Samen, begründet (ROUTABOUL *et al.* 2006).

Für *Brassica*-Arten liegen eine Reihe von Untersuchungen zur Vererbung der Samenfarbe und zu den Unterschieden in der Qualität vor: *B. napus* (SHIRZADEGAN 1986, LIU und GAO 1987, HENDERSON und PAULS 1992, VAN DEYNZE und PAULS 1994, RAHMAN 2001), *B. juncea* (VERA *et al.* 1979, WOODS 1980, ASLAM und BECHYNE 1983, ANAND *et al.* 1985, DHILLON *et al.* 1986), *B. carinata* (YOUSUF 1982, GETINET 1986, GETINET *et al.* 1987) und *B. rapa* (JÖNSSON und BENGTSSON 1970, STRINGAM *et al.* 1974, JONSSON 1975, 1977, THEANDER *et al.* 1977, STRINGAM 1980, SCHWETKA 1982, HUTCHESON 1984, DAUN und DECLERQ 1988, RAHMAN 2001). Bei all diesen Vererbungsstudien wurde gezeigt, dass eine braune oder schwarze Samenfarbe dominant über die gelbe Samenfarbe ist. Einen höheren Öl- und Proteingehalt und niedrigere Rohfaser- und Tanningehalte bei gelbsamigen *B. rapa*, *B. carinata* und *B. juncea* im Vergleich zu braunsamigen Typen beschreiben DOWNEY *et al.* (1975) und LUI (1985). In den letzten Jahren wurde aber bei *B. napus* über ein partiell dominantes Gen für die gelbe Samenfarbe berichtet, welches epistatische Effekte auf zwei zusätzliche Gene für eine schwarze Samenfarbe ausübt (SOMERS *et al*. 2001, LIU *et al*. 2005a, BADANI *et al*. 2006).

SOMERS *et al.* (2001), BADANI *et al.* (2006) und FU *et al.* (2007) fanden Haupt-QTL (*Quantitative trait loci*) für das Merkmal Samenfarbe in unterschiedlichen Kreuzungen zwischen schwarz- und gelbsamigen Rapsgenotypen, welche 72%, >52% bzw. >40% der Varianz für diesen Merkmal erklären. BADANI *et al.* (2006) berichten außerdem, dass in allen drei untersuchten Populationen, entwickelt aus zwei unterschiedlichen Kreuzungen zwischen unterschiedlichen schwarz- und gelbsamigen *B. napus* Formen, die Haupt-QTL für Samenfarbe und ADF (*acid detergent fibre)*-Gehalt an der gleichen Stelle liegen. Diese Informationen können die Ergebnisse von SHIRZADEGAN und RÖBBELEN (1985) und LIU *et al.* (1991) bei Raps (*B. napus*) erklären. Sie zeigten, dass gelbsamige Genotypen einem um absolut 2,6% höheren Ölgehalt und um 5,0% höheren Proteingehalt als schwarzsamige Genotypen aufweisen. Darüber hinaus wird berichtet, dass gelbsamige Raps-Genotypen um 3% niedrigere Rohfasergehalte und einen um 4% geringeren Schalenanteil im Vergleich zu schwarzsamigen Formen besitzen (STRINGAM *et al.* 1974, SHIRZADEGAN und RÖBBELEN 1985). Durch den Schälprozess kann der Gehalt an kondensierten Tanninen je

nach Rapssorte um 26,0-81,2% gesenkt werden (MATTHÄUS 1998); somit sind diese antinutritiven phenolischen Verbindungen - ähnlich dem Lignin - mit der Samenschale assoziiert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass rohfaserarme hellsamige Rapsformen auch einen niedrigeren Tanningehalt aufweisen (vgl. BELL und SHIRES 1982, BIBI *et al.* 1991, ERIKSSON *et al.* 1994, MATTHÄUS 1998, JEROCH *et al.* 2001, FRIEDT *et al.* 2002).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Pflanzenmaterial

Als Untersuchungsmaterial für diese Arbeit stand die doppel-haploide (DH) Winterrapspopulation „Yellow 2“ mit 458 DH-Linien zur Verfügung (BAETZEL *et al.* 2003, BADANI *et al.* 2006). Die Population, im Weiteren als YE2-DH bezeichnet, entstand aus einer Kreuzung zwischen der gelbsamigen Winterrapslinie '1012-98' und der schwarzsamigen Inzuchtlinie 'Express 617', beide mit niedrigem Erucasäure- und Glucosinolat-Gehalt im Samen (00-Qualität).

Die gelbsamige Rapslinie '1012-98' geht auf Göttinger Resyntheseraps-Experimente zurück und resultiert aus einer zufällig gefundenen gelbsamigen Linie bei einer spontanen Kreuzungsresynthese (GLAND 1982, SCHWETKA 1982), während 'Express 617' eine F7-Inzuchtlinie der in den 90er Jahren in Deutschland weit verbreiteten Winterrapssorte 'Express' ist.

3.2 Phänotypisierung

Die DH-Linien der Population YE2-DH wurden zwischen 2003 und 2006 in insgesamt vier verschiedenen Umwelten auf dem Feld angebaut: Rauischholzhausen (2003 und 2004), Einbeck (2005), Groß-Gerau (2006) und Seligenstadt (2006). Das erhaltene Saatgut wurde am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I bezüglich des Phänotyps Samenfarbe sowie der Qualitätsmerkmale Proanthocyanidin-Gehalt, Ölgehalt und Proteingehalt untersucht. Die Öl- bzw. Proteingehalte wurden mittels Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie (NIRS) gemessen und in Prozent der Trockenmasse (% TM) angegeben.

3.2.1 Ermittlung der Samenfarbe

Der Samenfarbe wird in der Züchtung von Raps zunehmend Bedeutung geschenkt. Die Ermittlung der Samenfarbe basiert häufig auf einer visuell geschätzten Bonitur, aber im praktischen Zuchtbetrieb müssen viele tausend Proben in sehr kurzer Zeit erfasst werden und sie unterliegt nicht allein subjektiven Einflüssen, sondern sie ist auch sehr zeit- und personalaufwendig.

3.2.1.1 Messung mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung

Die Erfassung der Samenfarbe wurde mit Hilfe des digitalen Bildauswertungssystems MARVIN der Firma GTA Sensorik, Neubrandenburg, realisiert (BAETZEL *et al.* 2004). Hiermit wurde das Samenmaterial (ca. 200 Samen je Probe) fotografiert und quantitative Werte für die Helligkeit des Saatguts festgelegt. Das MARVIN-Gerät erfasst die Helligkeit einer Probe auf Grund der Lichtabsorbanz im visuellen Wellenlängenbereich auf eine Skala von 0 (100% Reflektanz, weiß) bis 100% Absorbanz (schwarz) des emittierten Lichtes. Die Schätzung der Samenfarbe eines einzelnen Genotyps beruht dabei auf dem Mittelwert aller vom Gerät einzeln gemessenen Samen.

Um die Samenfarbe digital mittels MARVIN bestimmen zu können, musste zunächst eine Standardisierung für die Samenfarben erstellt werden, um so später eine Einteilung der Helligkeitswerte des Gerätes in eine prozentuale Einteilung der Samenprobe vornehmen zu können.

3.2.1.2 Bestimmung der Samenfarbe mittels NIRS

Bei der Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie (NIRS) wird die zu untersuchende Probe von einer definierten Lichtquelle des NIRS-Gerätes mit Infrarotlicht bestrahlt. Je nach chemischer Zusammensetzung der Probe wird ein Teil der Lichtstrahlen absorbiert und der restliche Teil der Lichtstrahlen von der Probe reflektiert. Gemessen wird die Reflektion in Abhängigkeit von der Wellenlänge im Bereich des Lichts im Nahinfrarotbereich (800-2500 nm).

Bei der Messung von festen Substanzen (z.B. Samenproben) wird nicht die durchstrahlte Energie (Transmission), sondern die von der Probe diffus reflektierte Energie im Verhältnis zu der totalen Reflektion eines internen Standards (Keramik) gemessen (vgl. Formel von REINHARD 1992, ENGLING 1997).

$$\mathbf{R} = \frac{\mathbf{I_S}}{\mathbf{I_0}}$$

R = diffuse Reflektion
I_S = Lichtintensität von der Probe reflektiert
I_0 = Lichtintensität vom internen Standard reflektiert

In den eigenen Analysen wurden alle Messungen mit einem NIRSystem 6500 (Foss NIRSystem, Hamburg, Deutschland) mit der Software WinISI, Version 1.02a/b bis 1.04 (Infrasoft International, LLC, Port Matilda, USA) durchgeführt. Neben dem nahinfraroten Bereich (800-2500 nm) nimmt das Gerät auch den sichtbaren Wellenlängenbereich zwischen

400 und 770 nm auf. Über den gesamten Wellenlängenbereich wird alle 2 nm eine Messung vorgenommen. Alle Untersuchungen wurden mit einem Autocup sampler (Foss NIRSystem, Hamburg, Deutschland) in Reflektionsmessung durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte über eine Kalibrierung für Raps aus dem Qualitätssicherungssystem der VDLUFA-Kassel (TILLMANN 1997a, b).

3.2.2 Bestimmung des Tanningehaltes

3.2.2.1 Photometrische Methode

3.2.2.1.1 Samenaufarbeitung und Extraktion von Tanninen

Die Samenaufarbeitung erfolgte mit vorgenommenen Änderungen der von SHAHIDI und NACZK (1989) beschriebenen Methode. Etwa 3,5 g Rapssamen von jeder DH-Linie wurden in einer Kaffeemühle fein vermahlen und für 12 Stunden mit Hilfe eines Soxhlet-Apparates unter dem Abzug mit *n*-Hexan entfettet. Anschließend wurde das Rapsschrot für 18 Stunden bei 50°C im Trockenschrank (Memmert ULE 500, Schwabach, Deutschland) getrocknet und nach der Abkühlung im Exsikkator in 3 Wiederholungen (je 500 mg entfettete Trockenmasse) in 15 ml Falcon-Tubes eingewogen.

Die Extraktion von kondensierten Tanninen und deren Monomeren bzw. Oligomeren erfolgte in zwei weiteren Schritten. Zunächst wurden 5 ml 70%iger Aceton-Lösung (Aceton/ H_2O_{ddist} 7:3) in jeden Falcon-Tube mit 500 mg entfettetem Rapsschrot zugegeben und das Material für 1 min bei 15.000 U/min mit einem Ultra-Turax T 25 (IKA-Werke, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde das Pellet von dem Turax-Stab in einen Tube mit 5 ml 70%igen Aceton-Lösung nachgespült. Die verschlossenen Falcon-Tubes wurden danach für 20 min bei Raumtemperatur in einem Agitator (IKA Werke VIBRAX-VXR, Staufen, Deutschland) geschüttelt, dann zentrifugiert (4000 U/min, 10 min) und der Überstand in Rund-Kolben überführt. Für eine verbesserte Extraktionsausbeute wurden diese letzten Schritte noch einmal wiederholt und die Überstände in die gleichen Kolben überführt.

Das Aceton wurde unter Vakuum bei 40°C in einem Rotationsverdampfer (Kalensee RV05, Gießen, Deutschland) verdunstet und die verbliebene wasserhaltige Tannin-Lösung über Nacht in einem Gefriertrockner (Christ LOC-1M, Osterode am Harz, Deutschland) lyophilisiert. Die extrahierten Tannine wurden zum Schluss in 10 ml Methanol (HPLC Gradient Grade) aufgelöst, zentrifugiert und in einen neuen Falcon-Tube durch einen 0,20 µm sterilen Filter (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) überführt.

Der methanolische Extrakt wurde einerseits benutzt, um den Proanthocyanidin-Gehalt der Proben anhand der Vanillin-Methode zu bestimmen. Andererseits dienten die Proben auch für die Quantifizierung einzelner phenolischer Verbindungen mit Hilfe der analytischen Flüssigchromatographie (HPLC; siehe 2.2.2.2).

3.2.2.1.2 Vanillin-Methode

Um den Tanningehalt im Rapsschrot zu bestimmen, wurde eine nach PRICE *et al.* (1978) modifizierte Vanillin-Methode angewendet. Das Prinzip der Vanillin-Methode beruht auf der Fähigkeit der Aldehydgruppe des Vanillins (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) in saurem Milieu mit Flavan-3-ole und Proanthocyanidine zu rotgefärbten Verbindungen zu reagieren. Bevorzugte Bindungsstelle von Vanillin am Catechinmolekül ist dabei die Position C6 des A-Rings (Abb. 12). Catechin wird in der Regel als Standard benutzt und ergibt die höchsten Absorptionswerte.

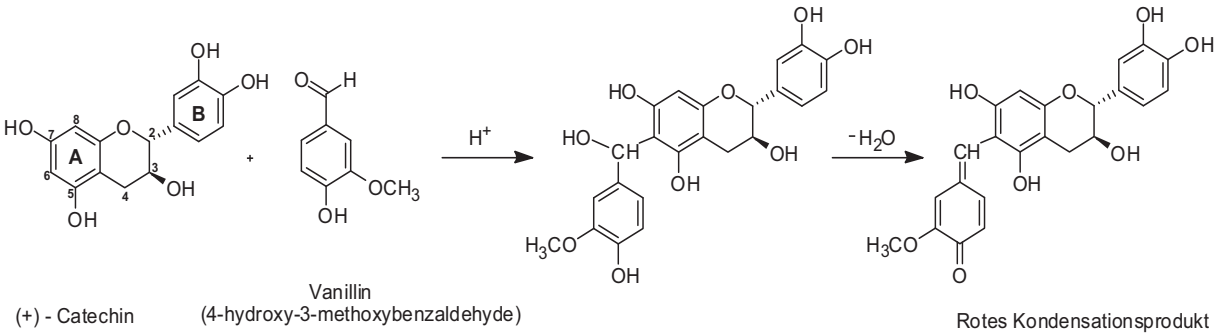

Abb. 12 - Reaktion von Catechin mit Vanillin zu gefärbten Verbindungen (nach SCHOFIELD et al 2001).

Lösungen

- Vanillin-Reagenz: 0,5% Vanillin in 4% HCl-Methanol-Lösung
- Blind-Reagenz: 4% HCl-Methanol-Lösung
- Catechin-Lösung: 3 mg (+)-Catechin in 10 ml abs. Methanol

Für jede Probe wurden in zwei separaten Reagenzgläsern jeweils 1 ml des Analyten (methanolisches Extrakt) mit 5 ml Vanillin-Reagenz (Messprobe) bzw. mit 5 ml Blind-Reagenz (Blindprobe) gemischt und für 20 Minuten im Dunkeln bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach 20 min Reaktionszeit wurden die Proben gut durchmischt und die Messprobe bei 500 nm gegen den Blindwert im Spektrometer (SmartSpecTM Plus Spectrophotometer, USA) gemessen. Den Absorptionswert der Blindprobe wurde jeweils von der Messprobe

abgezogen, um eine eventuelle Beeinflussung durch bereits existierende Chromophore in der Probe zu verhindern.

Die Konzentrationsangabe der Proanthocyanidine erfolgt als Catechin-Äquivalent anhand einer aus Catechin-Lösung erstellten Eichreihe. Aus dieser Lösung werden 11 Eichlösungen von 0 bis 0,3 mg/ml in 0,03 mg/ml Schritte hergestellt. Die Eichkurve wird erstellt, in dem die Absorptionswerte auf der Ordinate und die entsprechende Konzentration der Tannine in mg/ml auf der Abszisse aufgetragen werden (Abb. 13).

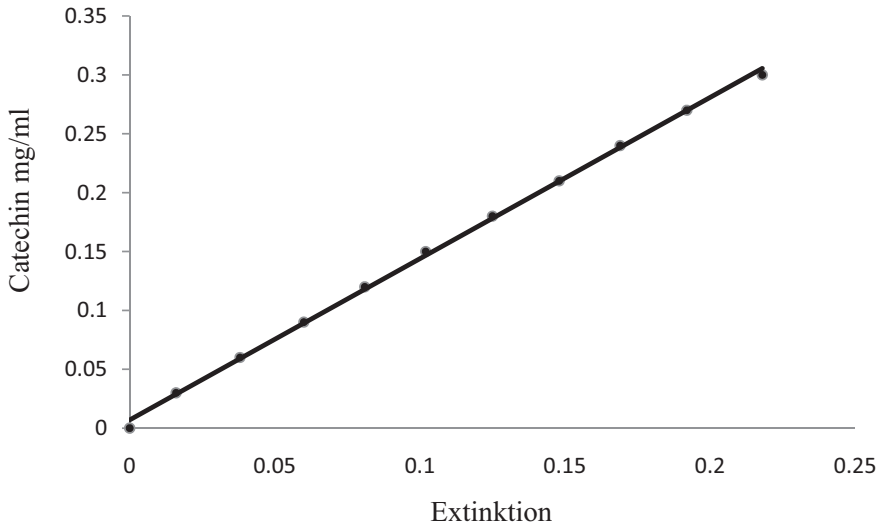

Abb. 13 - Eichgerade zur Ermittlung des Gesamtgehaltes an (+)-Catechin in Rapsschrotextrakten. Daten der Eichgerade: y = 1,369x + 0,006; R^2: 0,999; y = Catechin, x = Extinktion.

Der Tanningehalt (C), angegeben als Catechin-Äquivalent/100g Rapsschrot in Trockensubstanz, wurde anhand der Formel $C= k(1,369A_{500}+0,006)$, wobei k eine Konstante und A500 der Absorptionswert ist, berechnet. Die erzielten Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus drei Messungen dar.

3.2.2.2 Chromatographische Trennung

3.2.2.2.1 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (*solid-phase-extraction*, SPE) stellt eine kostengünstige und zeitsparende Methode zur HPLC-Probenvorbereitung dar und hilft bei der Fraktionierung und Isolierung von Einzeln- oder Gruppensubstanzen. Für SPE sind die Wahl des

Adsorbermaterials und die Zusammensetzung bzw. Volumina der Auftrage-, Wasch- und Elutionsmittel die entscheidenden Einflussfaktoren.

Beim Auftrage- und Waschschritt sollen die interessierenden Analyten vollständig adsorbiert werden, bei weitestgehender Entfernung von unerwünschten Probenkomponenten. Bei der Elution hingegen ist eine komplette Desorption der Analyten mit möglichst geringem Lösungsmittelvolumen das Ziel. Dadurch wird eine Anreicherung von Analyten beim gleichzeitigen Entfernen von störenden Begleitstoffen erreicht.

Zur Entfernung der die HPLC-Analytik störenden Substanzen und Fraktionierung wurde in dieser Arbeit Festphasenextraktion mit C18-Kartuschen (500mg/8ml, Alltech, Deutschland) eingesetzt (MATTHÄUS, 1998; SUN *et al.* 1998, 2006).

Die *Reversed Phase* C18-Kartuschen wurden für die Festphasenextraktion durch Spülen mit 5 ml HPLC-Grade Methanol aktiviert und 5 ml Ultrapure Wasser (pH=7) equilibriert. Wie in Abbildung 14 gezeichnet, wurde 1 ml des methanolisches Extrakts (Probe) auf die SPE-Kartuschen aufgetragen und mittels Vakuumpumpe langsam durch die Kartusche gesaugt (max. 2 ml/min). Die SPE-Kartuschen wurden zu Beginn der Fraktionierung mit 10 ml *Ultrapure* Wasser (pH=7) ausgewaschen, um die phenolischen Säuren (Fraktion 1) zu eluieren. Am Ende dieser Schritte wurden die C18-Säulen in wenigen Sekunden unter verstärktem Vakuum ausgetrocknet. Die Elution mit 25 ml Ethylacetat ermöglichte die Isolierung der mono- und oligomeren Proanthocyanidine (Fraktion 2) aus den Festphasensäulen. Die Komponenten der Fraktion 2 wurden über neue C18-Kartuschen in monomerische (Fraktion 2a) und oligomerische (Fraktion 2b) Proanthocyanidin-Fraktionen weiter getrennt. Erreicht wurde dies durch sequentielle Elution mit 25 ml Diäthyläther (Roth, Deutschland) und 15 ml Methanol.

Um die polymeren Proanthocyanidine und Anthocyanidine (Fraktion 3) aus den SPE-Kartuschen zu eluieren, wurden diese mit 25 ml 0,1% HCl gesäuertem HPLC-Grade Methanol nachgespült.

Fraktion 1 enthielt Wasser und wurde für 12 Stunden gefriergetrocknet. Die phenolischen Säuren wurden danach in 1 ml Methanol (HPLC-Grade) aufgelöst und via HPLC isoliert. Die letzten Fraktionen (Fraktion 2, 2a, 2b und 3) wurden unter Vakuum bei 40°C in einem Rotationsverdampfer für jeweils 15 min getrennt verdunstet, in je 1 ml Methanol (HPLC-Grade) aufgelöst und schließlich per HPLC aufgetrennt.

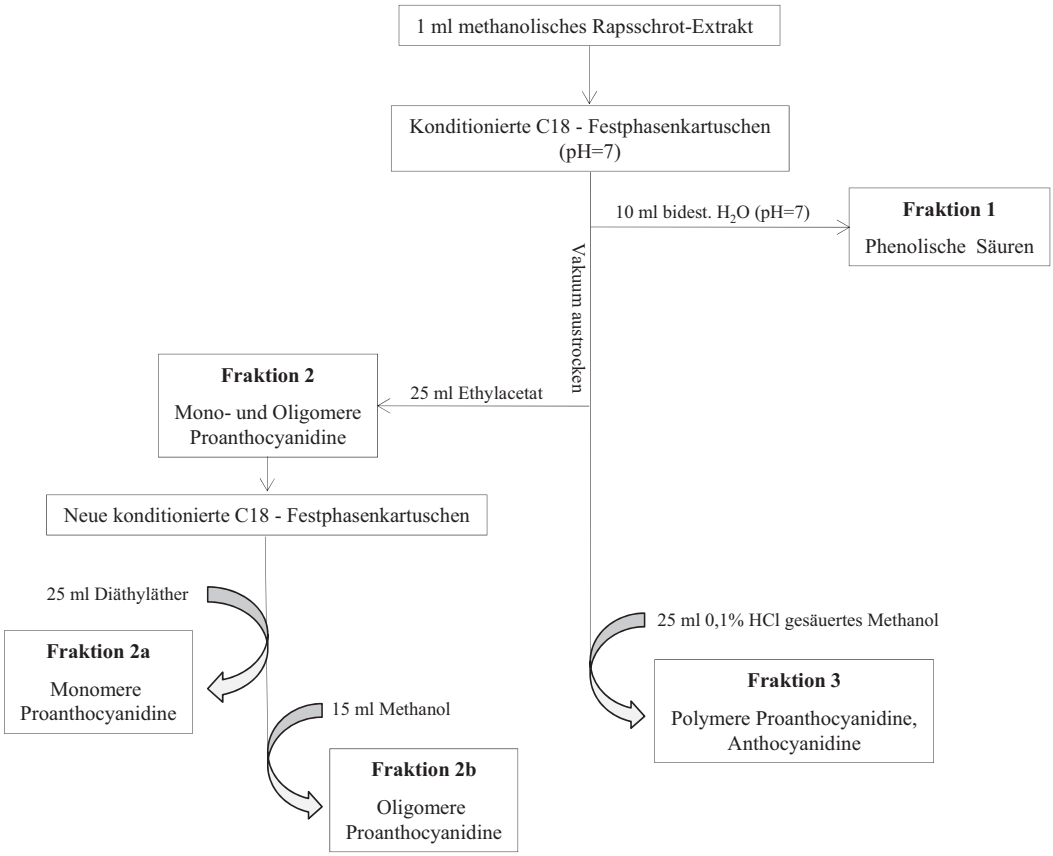

Abb. 14 – SPE-Trennung von phenolischen Komponenten aus Rapsschrot (nach MATTHÄUS, 1998; SUN et al. 1998, 2006).

3.2.2.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über eine stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird (DOMINIK *et al.* 1996). Das gewonnene Eluat (siehe 2.2.2.2.1.) wird mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einer Umkehrphasensäule separiert und in die einzelnen Komponenten aufgetrennt, welche dann im UV-VIS Detektor qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein HPLC-Protokoll nach MATTHÄUS (1998) angewendet. Die HPLC-Analyse erfolgte in einem Niederdruckgradienten-System von Merck Hitachi, bestehend aus: Kontrolleinheit D-7100 IF, Entgasser L -7612, Gradientenpumpe L-7100, Autosampler L-7200, Säulenofen Jetstream 2 Plus, UV-Detektor L-7400. 10 µl des

methanolischen Extrakts wurden mittels Autosampler in einer Nucleodur Sphinx RP-Trennsäule (250 mm x 4 mm), geschützt durch eine Vorsäule (10 mm x 4 mm), mit gleichem Trennmaterial von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) eingeführt. Der Teilchendurchmesser des Trennmaterials betrug 5 µm.

Es wurde ein binäres Lösungsmittelgemisch verwendet, dessen Gradientensystem in Tabelle 7 aufgeführt ist. Das Elutionsmittel A bestand aus 4,5% (v/v) Ameisensäure in Wasser, das Elutionsmittel B war Acetonitril (CH_3CN). Die Elution wurde auf 30°C mit einer Flussrate von 1 ml pro Minute durchgeführt und die Dauer eines Laufes lag bei 50 Minuten.

Tabelle 7 - Standardgradient für die HPLC-Analyse
(Elutionsmittel A:4,5% (v/v) Ameisensäure, Elutionsmittel B: Acetonitril (CH_3CN))

Zeit (min)	Elutionsmittel A (%)	Elutionsmittel B (%)
0	95	5
20	75	25
30	2	98
50	95	5

Die Detektion der Proanthocyanidine wurde mittels des UV-Detektors bei einer Standardwellenlänge von 280 nm durchgeführt. Die Quantifizierung der im Probenmaterial vorkommenden Fraktionen erfolgte dabei durch den Vergleich mit Peakflächen von entsprechenden internen Standards: Procyanidin B2 (Extrasynthèse, Frankreich) für die Fraktionen 1 bzw. 3 und Epigallocatechin (Sigma Chemical, Deutschland) für Fraktion 2. Zur Vorbereitung der jeweiligen Standard-Stammlösungen wurde 5 mg Epigallocatechin (EGC) oder Procyanidin B2 in 10 ml Methanol aufgelöst. 100 µl der Stammlösung wurden mit 1 ml Methanol jeder Probe vor den HPLC-Analysen gemischt.

Für die analytische HPLC wurden Lösungsmittel der Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Wasser, Acetonitril, Methanol, Aceton und *n*-Hexan waren in Gradient-Grade-Qualität und Ameisensäure in Suprapur-Qualität.

3.3 Genotypisierung

Für die ausgewählten 166 DH-Linien der spaltenden YE2-DH Population wurde eine genetische Karte mit Hilfe von *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) und *Simple Sequence Repeat* (SSR)-Markern erstellt. Die Elternlinien, 'Express 617' und '1012-98', wurden zunächst auf Polymorphismen in ihren resultierenden Fragmentmustern

untersucht. Mit den Primerpaaren, die eindeutige Polymorphismen zwischen den Eltern generierten, wurden anschließend die Linien der Kartierungs-Population analysiert und ihre Marker-Genotypen festgestellt.

3.3.1 Gewinnung der pflanzlichen DNA (Maxipräparation)

Von jedem Genotyp der DH-Population YE2-DH (n=166) wurden 2,5 g junges Blattmaterial entnommen und in verschließbare 50 ml Reaktionsgefäße (Falcon-Tubes®) überführt. Die vom Feld geernteten Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Vor der DNA-Extraktion wurden alle Proben gefriergetrocknet.

Die gesamtgenomische DNA wurde nach DOYLE & DOYLE (1990) mit leichten Modifikationen isoliert. Das gefriergetrocknete Blattmaterial wurde zu einem feinen Pulver vermahlen mit Hilfe von verteilten Glaskugeln in jedem Reaktionsgefäß. Insgesamt 2 g dieses Pulvers wurden mit 15 ml des auf 65°C vorgewärmten Extraktionspuffers (siehe Appendix, Tabelle A1) in Suspension gebracht und für 30 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert.

Nach jeweils 10 Minuten wurden die Proben in der Folgezeit geschwenkt. Danach wurden 15 ml CIA-Lösung (Chloroform:Isoamylalkohol, 24:1 v/v, 4°C) auf die Proben gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Das Chloroform bewirkt eine Denaturierung und Koagulation von Proteinen. Durch die Chloroform-Lösung kommt es zu einer Trennung der wasserlöslichen DNA von den anderen pflanzlichen Substanzen. Die Proben wurden anschließend 10 min bei 3700 U/min und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Beckmann GS-6KR, USA) zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Falcon Tube überführt. Zu diesem Überstand wurden 12 ml CIA-Lösung pipettiert, für 10 min geschwenkt und bei 3700 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Da der DNA enthaltende Überstand bei allen Extraktionen klar war, wurde kein dritter Reinigungsschritt durchgeführt. Zur wässrigen DNA-Lösung wurde 1 ml Natriumacetat ($NaCH_3COO$, 3 M, pH 5,5) und 1 ml Ammoniumacetat (NH_4CH_3COO, 10 M) gegeben und um 2/3 VT mit auf 4°C gekühltem Isopropanol aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde vorsichtig geschwenkt, wobei die DNA als fadenförmige, weiße Substanz ausfiel. Die DNA wurde aus der Fällungslösung entfernt und in ein Röhrchen mit ca. 1 ml 70% Ethanol/10 mM NH_4CH_3COO überführt. Hierin verblieb das DNA-Pellet für mindestens 10 min. Anschließend wurde das Nukleinsäure-Pellet in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß gegeben, bei 37°C getrocknet und in 500-1200 µl TE-Puffer 10/1 (siehe

Appendix, Tabelle A2; Volumen abhängig von der gefällten DNA-Menge) gelöst. Diese DNA-Stammlösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Nach der Isolation der DNA wurde ein RNAse-Verdau durchgeführt. Pro 100 µl TE-Puffer 10/1 wurde 1 µl RNAse (1 mg/ml) in die Stammlösung gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde die DNA auf einem 1% Agarosegel auf Hochmolekularität getestet (siehe 2.3.2.1., Agarose-Gelelektrophorese).

Die Konzentration der isolierten und gelösten DNA wurde fluorometrisch mit Hilfe eines DNA-Fluorometers (TKO 100, Hoefer Scientific Instruments) unter Verwendung des Farbstoffs Hoechst 33528 bestimmt; hierbei emittiert eine DNA-haltige Lösung nach Anregung mit einer Wellenlänge von 365 nm bei 460 nm eine Fluoreszenzlichtmenge, welche direkt mit dem DNA-Gehalt korreliert ist. Dazu wurde das Gerät anfangs mit einer Standardmenge Kalbsthymus-DNA geeicht, so dass die DNA-Konzentration im Anschluss direkt in ng/µl abgelesen werden konnte.

Der verwendete Hoechst 33258-Farbstoff interagiert hoch spezifisch mit doppelsträngiger DNA und bindet kaum an RNA, weshalb die RNA-Verunreinigungen keine Auswirkung auf die DNA-Quantifizierung hätten; außerdem gibt es keine Interferenzen mit Stoffen wie z. B. CTAB. Pro Messung wurden 2 µl in TE-Puffer 10/1 gelöster DNA-Stammlösung mit 2 ml TNE/Fluoreszenz-Farbstoff-Lösung (siehe Appendix, Tabelle A3) versetzt; jede Messung wurde mindestens einmal wiederholt.

3.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auswahl der Trennmatrix für Gel-basierte DNA-(Fragment-)Analysen richtet sich im Wesentlichen nach Art und Größenbereich bzw. Längenunterschieden der DNA. So wird für eine visuelle Kontrolle von extrahierter genomischer DNA, von restriktionsverdauter DNA und von PCR-Amplifikationen standardmäßig die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt; für die genaue Größenbestimmung von AFLP- und SSR-Produkten werden hochauflösende Polyacrylamid-Gele verwendet.

3.3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Standard-Analyse von DNA-Fragmenten (6 µl DNA-Lösung mit 1 µl Bromphenolblau-Ladepuffer, Appendix Tabelle A4) wurden Agarosegelelektrophoresen in horizontalen Gelkammern (DNA Sub-Cell GT, Bio-Rad, München, Deutschland; Größe 25 x 25 cm mit 2 x 51 Taschen) durchgeführt. Die Auftrennung von genomischen DNA- und PCR-Produkten (Größenstandard 100 bp-Leiter, Invitrogen) erfolgte in 1,8%igen Agarosegelen

(SAMBROOK et al. 1989). Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 x TBE-Puffer (siehe Appendix, Tabelle 4), die Trennstrecke betrug 5-10 cm bei einer Stromspannung von 4-6 V/cm. Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) angefärbt. Überschüssige Färbe-Lösung wurde anschließend im Wasserbad entfernt (10 min). Die DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm sichtbar gemacht und mittels einer Polaroid-Sofortbildkamera dokumentiert (Modell MP-4+, Polaroid GmbH, Offenbach, Deutschland).

3.3.2.2 Polyacrylamid-Gelektrophorese

Die Auftrennung der AFLP- und SSR-Reaktionsprodukte erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (7% PAA, 10 x TBE-*Long Ranger* Puffer, 25 cm Länge, 0,2 mm Stärke; Größenstandard 50-700bp, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland, Appendix, Tabelle A5).

Die Polyacrylamid-Gel-Komponenten wurden gründlich gemischt. Zum Gießen des Gels wurden die Glasplatten in einem ungefähren Winkel von 30° aufgestellt und am oberen Ende die Acrylamidmischung hineingegossen. War die Gel-Lösung bis zum unteren Rand der Glasplatten gelaufen, wurde das Gel horizontal festgestellt. Die Acrylamidmischung sollte für die Dauer von ca. 1 h auspolymerisieren. Danach wurde das Gel in den Sequenzierapparat gestellt, und die beide Tanks mit TBE-Puffer befühlt. Dieser Gradient dient der Verbesserung der Qualität der Auftrennung, besonders im oberen Bereich des Gels. Anschließend wurde der Kamm eingesetzt und die Taschen gut ausgewaschen.

Die Verwendung des automatischen DNA-Analysers LI-COR 4200 (Li-Cor, Bad Homberg, Deutschland) mit Doppel-Laser System (700 nm bzw. 800 nm) erlaubte das gleichzeitige Auftrennen und Analysieren von Produkten aus zwei unterschiedlichen PCR-Reaktionen. Nach 90 sec Hitzedenaturierung bei 94°C wurde 0,5 µl Amplifikationsansatz-Ladepuffermix (Amplifikationsansatz im Verhältnis 1:1 mit fuchsinhaltigem Formamid-Stop/Lade-Puffer gemischt, Tabelle A5) geladen und mit 1 x TBE-*Long Ranger* Puffer (Appendix, Tabelle A5) als Laufpuffer bei 1800 Volt und 52°C für 120 min aufgetrennt. In der Regel konnte das Gel nach Beendigung des ersten Laufs noch ein zweites Mal mit neuen Proben beladen werden, so dass bei Verwendung eines 50 Taschen-Kamms (jeweils zwei Proben mit verschiedener Fluoreszenz-Markierung) im Optimalfall 192 Proben plus 8 Größenstandards pro Gel analysiert werden konnten.

3.3.3 Markeranalysen über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist die Grundlage für die AFLP-, RAPD- und SSR-Markers (CHIEN *et al.* 1976, SAIKI *et al*. 1985, MULLIS und FALOONA 1987). Sie lässt sich in drei zyklisch wiederholte Reaktionsschritte untergliedern:

- *Denaturierung*: Trennung der doppelsträngigen DNA in die Einzelstränge.
- *Annealing*: die ausgewählten Primer lagern sich an die komplementären Basensequenzen der Einzelstränge an.
- *Polymerisierung*: die Polymerase amplifiziert in 5′→3′ Richtung komplementär zur Basensequenz des ursprünglichen Einzelstranges den neuen Strang. Durch Wiederholung dieser Zyklen werden Fragmente definierter Länge exponentiell (2n, n=Anzahl der Zyklen) und Fragmente nicht definierter Länge multiplikativ amplifiziert.

Die PCR-Reaktionen für diese Arbeit wurden in Temperaturzyklus-Steuergeräten GeneAmp PCR-System 9600/9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

3.3.3.1 *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP)

Die in der Regel dominanten AFLP-Marker werden durch selektive PCR-Amplifizierung von Restriktionsfragmenten genomischer DNA gewonnen und zeichnen sich durch einen hohen Polymorphiegrad und gute Reproduzierbarkeit aus. Auf diesem Weg entsteht eine Vielzahl an Fragmenten, ca. 50-100 pro Ansatz, die zuverlässig amplifiziert und mit Hilfe eines Polyacrylamidgels aufgetrennt und analysiert werden können (VOS *et al.* 1995). Die AFLP-Technik benötigt keine vorherigen Sequenzinformationen zur Erzeugung von AFLP-Markern, damit ist sie relativ kostengünstig und zur genetischen Kartierung artübergreifend verwendbar. Im Laufe dieser Arbeit wurden die AFLP-Analysen mit Restriktionsverdau und Adapterligation unter Verwendung des AFLP® Core Reagent Kits von der Firma Invitrogen angesetzt. Die angewandte Methode bestand aus folgenden Schritten:

1. <u>*Restriktionsverdau und Adapter-Ligation*</u>

Für den Restriktionverdau der genomischen DNA werden zwei Restriktionsendonukleasen - eine selten (*six-base cutter*) und eine häufiger schneidend (*four-base cutter*) - verwendet. Allgemein gebräuchlich ist die Kombination *Eco*RI/*Mse*I, die aus *Escherichia coli* BS5 bzw. *Micrococcus* sp. NEB 446 isoliert sind. Die sechs Basenpaaren Restriktionsenzym schneidet durchschnittlich einmal pro 4^6 = 1/4096 bp und bei der *B. napus*

Genomgröße von 1127 Mbp (BENNETT und LEITCH 1995, 2001) sind etwa 275000 Restriktionsstellen zu erwarten (hier verwendet: *Eco*RI, Erkennungssequenz 5'-G│AATTC-3'). Das andere Restriktionsenzym sollte mit einer Erkennungssequenz von vier Basenpaaren häufiger schneiden, nämlich durchschnittlich alle 4^4 = 1/256 bp, im Fall von *B. napus* werden somit ca. 4402500 Restriktionsfragmente erwartet (in dieser Arbeit eingesetzt: *Mse*I, 5'-T│TAA-3'). Da in der Regel jedes der *Eco*RI-Fragmente im durchschnittlichen Abstand von 256 bp eine *Mse*I-Schnittstelle aufweist, entstehen bei einem Doppelverdau mit beiden Enzymen pro *Eco*RI-Fragment zwei *Eco*RI/*Mse*I-Fragmente, insgesamt also theoretisch ca. 550000. Der Restriktionsansatz wurde für 3 Stunden zur DNA-Verdauung im Thermocycler bei 37°C inkubiert.

An den Enden der Restriktionsfragmente werden danach in der Adapter-Ligation doppelsträngige Adapter-Sequenzen anligiert, die neben den zu Restriktionsstellen komplementären Sequenzen weitere Basen enthalten, welche in ihrer Gesamtheit in den folgenden Amplifikationsschritten als Primerbindungsstellen dienen. Die verwendeten Adapter-Sequenzen waren wie folgt:

- *Mse*I (-): 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
- *Mse*I (+): 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'
- *Eco*RI (-): 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'
- *Eco*RI (+): 5'-AAT TGG TAC GCA GTC-3'

Die Ligation erfolgte bei 20°C für 2 Stunden in einem Thermocycler. Die eingesetzten Reaktionsparameter für Restriktionsverdau und Adapter-Ligation sind im Appendix (Tabelle A6) aufgeführt.

Um die Vollständigkeit der Ligation beurteilen zu können, wurden 5 µl der ligierten DNA auf einem 1,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Der Ansatz wurde danach 1:10 mit TE-Puffer 10/0,1 verdünnt und diente als Ausgangs-DNA für die Präamplifikation.

2. <u>*Präamplifikation*</u>

In der Präamplifikation wird ausgehend von Primern amplifiziert, die aus der Sequenz der Adapter, der Schnittsequenz des jeweiligen Enzyms und einem zusätzlichen selektiven Nukleotid am 3'-Ende (E+1/M+1) zusammengesetzt sind. Diese zusätzliche selektive Base führt zu einer Verminderung der PCR amplifizierte *Eco*RI/*Mse*I-Fragmente an.

Die Sequenz der eingesetzten Primer war wie folgt:

- E+1 (E01): 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
- M+1 (M02): 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'

Geht man von den in der Doppelrestriktion erhaltenen 550000 *Eco*RI/*Mse*I-Fragmenten aus, so werden mit zwei selektiven +1-Primern im Durchschnitt 1/16 aller Restriktionsfragmente (also theoretisch ca. 34375 Amplifikate mit *Mse*I und *Eco*RI-Schnittstellen) amplifiziert. Die Zahl der Amplifikate mit zwei *Mse*I-Schnittstellen beträgt ca. 275000. Diese erste Amplifikation (+1 Präamplifikation) wird unter Verwendung einer 1:10 Verdünnung des Ligationsansatzes in TE-Puffer 10/0,1 und des AFLP® Pre-amp Primer Mixes I (Invitrogen) durchgeführt (Appendix, Tabelle A7).

Das PCR-Programm (20 Zyklen) wurde in 96-well-Mikrotiterplatten wie folgt durchgeführt:

- Denaturierung: 94°C, 30 sec
- Annealing: 56°C, 60 sec
- Polymerisierung: 72°C, 60 sec
- Kühlung: 4°C, halten

Das Gelingen der Präamplifikation konnte durch den Auftrag von 5 µl des Ansatzes auf ein 1,8%iges Agarosegel (4,5 g Agarose; 250 ml 0,5xTBE-Puffer) überprüft werden. Das Präamplifikationsprodukt ist anschließend im Verhältnis 1:10 mit TE-Puffer 10/0,1 verdünnt worden und diente als Stammlösung für die Amplifikation mit selektiven Primern.

3. *Selektive Amplifikation*

In der Endreaktion erfolgte die selektive Amplifikation der verdünnten Präamplifikationsprodukte mit um jeweils zwei weitere selektive Basen verlängerten *Eco*RI- bzw. *Mse*I-Primern (E+3, M+3). Die einzelnen Komponenten der selektiven Amplifikation und ihre Konzentrationen sind im Appendix (Tabelle A8) aufgeführt.

Zur Verwendung kamen 5 *Eco*RI-Primer (E+3) und 8 *Mse*I-Primer (M+3), deren Sequenz im Appendix (Tabelle A9) aufgeführt sind.

Hierdurch werden von den ca. 34375 präamplifizierten Fragmenten wiederum pro Primer nur etwa 1/16 (also 1/256) weiter amplifiziert. So werden bei Raps von den ca. 550000 *Eco*RI-/*Mse*I-Ausgangsfragmenten für jede *Mse*I/*Eco*RI-Primerkombination im Durchschnitt ca. 134 Amplifikationsprodukte erwartet. Etwa 1075 Fragmente mit *Mse*I/*Mse*I-Primerkombinationen werden ebenfalls amplifiziert.

Die selektive +3 Amplifikation wurde unter folgendem PCR-Programm durchgeführt:

1 Zyklus:

- Denaturierung: 94°C, 45 sec
- Annealing: 65°C, 60 sec
- Polymerisierung: 72°C, 80 sec

12 Zyklen:

- Denaturierung: 94°C, 45 sec
- Annealing: 65-56,6°C, 60 sec (0,7°C abgesenkt/ Zyklus)
- Polymerisierung: 72°C, 80 sec

23 Zyklen:

- Denaturierung: 94°C, 45 sec
- Annealing: 56°C, 60 sec
- Polymerisierung: 72°C, 80 sec
- Kühlung: 4°C, halten

Im Gegensatz zu VOS *et al.* (1995) werden für die AFLP-Detektion am Licor-Gerät die selektiven +3-*Eco*RI-Primer nicht radioaktiv markiert; stattdessen ist eine Markierung mit spezifischen Fluoreszenz-Farbstoffen (IRD700, IRD800) eingesetzt, die durch Licht der Wellenlänge 700 nm bzw. 800 nm zur Fluoreszenz angeregt und mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert werden können (MYBURG *et al*. 2001). So können die *Eco-Mse*-Fragmenten von den etwa 16-fach häufiger vorhandenen *Mse-Mse*-Fragmenten während der Fragmentanalyse unterschieden werden. Insgesamt 20 AFLP-Primerkombinationen mit dem höchsten Polymorphiegrad (BADANI, 2005) wurden für die genetische Kartierung der DH-Population YE2-DH verwendet (Appendix, Tabelle A10).

3.3.3.2 *Simple sequence repeat* (SSR)

Für die genotypische Charakterisierung der YE2-DH-Kartierungspopulation wurden 50 polymorphe Mikrosatelliten-Marker von Firma KWS Saat AG (Einbeck, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Außerdem standen 53 Mikrosatelliten-Marker aus verschiedenen *Brassica*-Arten zur Verfügung, deren Sequenzen der öffentlichen Datenbank *Brassica*-DB (http://brassica.bbsrc.ac.uk/cgi-bin/ace/searches/BrassicaDB) entnommen wurden.

Das PCR-Programm zur Darstellung von SSR-Markern entsprach dem folgenden Protokoll:

- 95°C, 5 min
- Denaturierung: 95°C, 20 sec
- Annealing: 50-55-60°C, 20 sec
- Polymerisierung: 72°C, 30 sec

  } 36 Zyklen
- 72°C, 56 min
- 4°C, halten

Für die PCR-Reaktionen wurde die M13-Primerverlängerungs-Methode nach OETTING *et al.* (1995) verwendet ('*M13-tailed* Primer', http://www.licor.com/bio/App_514/App514.jsp). Die Methode beruht auf der Verwendung von drei Primern pro Reaktion. Hierbei ist einer der beiden spezifischen Mikrosatelliten-Primer an seinem 5'-Ende um eine Sequenz des Bakteriophagen M13 verlängert; zusätzlich wird ein Fluoreszenz-markierter Primer (in geringerer Konzentration) mit der Verlängerungs-M13-Sequenz eingesetzt. In den ersten Zyklen werden so PCR-Produkte erzeugt, die an einem Ende die M13-Basenabfolge enthalten. Hieran kann der Fluoreszenz-markierte M13-Primer ansetzen und so (neben den nur verlängerten, unmarkierten SSR-Abschnitten) Fragmente erzeugen, welche auf einem automatischen Sequenziergerät analysiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden Mikrosatelliten-Primerpaare eingesetzt, bei denen der Vorwärtsprimer um eine 18 bp-Sequenz aus M13 (5'-TTTCCCAGTCACGACGTT-3') am 5'-'Ende' verlängert war. Als dritter Primer wurde der IRD700- oder der IRD800-markierte Primer M13uniFi (5'-AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT-3') in der PCR-Reaktion verwendet. Die Fragmente, welche den Fluoreszenz-markierten Primer M13uniFi aufweisen, konnten mit Hilfe des LI-COR 4200 direkt detektiert werden. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsgemische und die Thermocycler-Protokolle wurden für jedes Primer-Paar individuell optimiert und sind zusammengefasst aus dem Appendix (Tabelle A11) zu entnehmen.

3.3.4 Erstellung der genetischen Kopplungskarte

Für die Erstellung der genetischen Karte der Population YE2-DH wurden zunächst die Genotypen der 166 DH-Linien der YE2-Population für jedes AFLP- und SSR-Fragment bestimmt. Jedes zwischen den Eltern der beiden Populationen polymorphe Fragment (Marker) wurde getrennt ausgewertet. Die so gewonnenen Daten dienten als Grundlage für die Analyse der genetischen Kopplung.

3.3.4.1 Auswertung der PCR-Amplifikationsprodukte

Die Berechnung der Größen zwischen den Eltern polymorpher Amplifikationsprodukte (in bp) wurde mit Hilfe des Programms RFLPScan^{TM} durchgeführt (Scanalytics, Billerica, USA) und zur Charakterisierung der Markerbanden herangezogen, während die Fragmentgrößenbestimmung der Amplifikationsprodukte der Nachkommen in Anlehnung an die Eltern-Fragmente lediglich visuell durchgeführt wurde. In der homozygoten DH-

Population wurde eine kodominante Auswertung sowohl von den AFLP- als auch von den SSR-Markern vorgenommen, da im polyploiden Rapsgenom die Allele eines SSR-Amplicons nicht immer eindeutig zu einem einzigen Locus zugeordnet werden können. Die An- bzw. Abwesenheit eines allelischen Fragmentes wurde dabei entweder als „*b*“ für den gelben Elter '1012-98' oder als „*a*“ für den schwarzen Elter 'Express 617' dokumentiert. Nicht klar erkennbare oder unbekannte Fragmente wurden als „-“ (*missing data*) bezeichnet. Das Scoring kodominanter Marker in der DH-Individuen ist in der Abbildung 15 beispielhaft dargestellt.

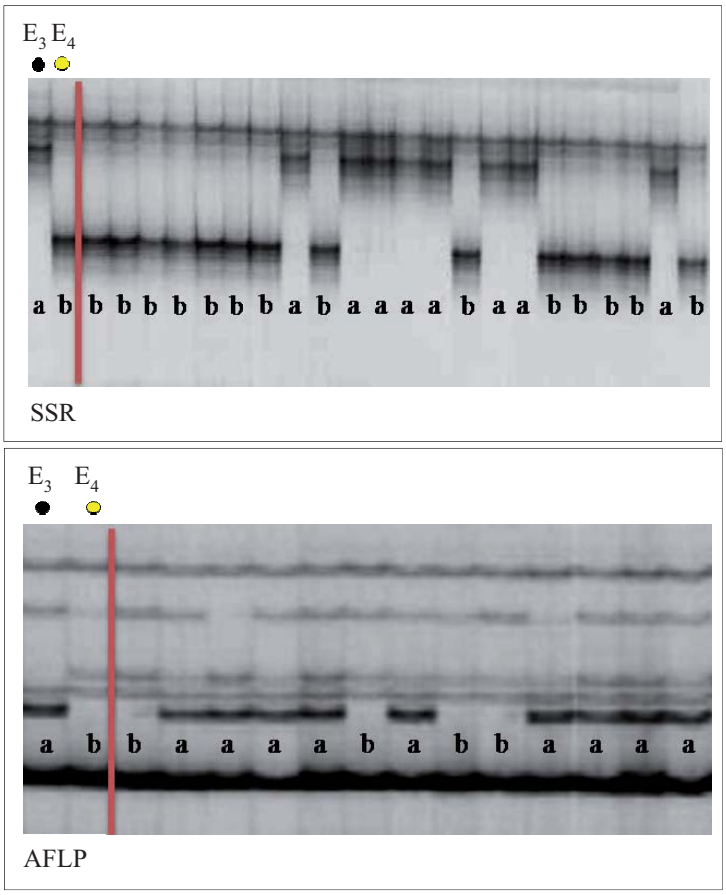

Abb. 15 – Beispiel für die Auswertung kodominanten Markers (SSR, AFLP) in der DH-Population YE2 (Kartierung: aa - Fragment anwesend; bb - Fragment abwesend).

3.3.4.2 Genetische Kopplungsanalyse

Für die Berechnung der Kopplungsgruppe und der Markerreihenfolge in der YE2-DH Kartierungspopulation kam das Programm JoinMap Version 3.0 (VAN OOIJEN und

VOORRIPS 2001) unter Verwendung der Kosambi-Funktion zum Einsatz. Das Programm testet die Wahrscheinlichkeit einer freien Spaltung bzw. einer Kopplung gegen einen festgelegten Schwellenwert (Logarithm of Odds; LOD). Die Untersuchung der Segregationsdaten auf Abweichungen von den erwarteten Spaltungsverhältnissen (1:1) erfolgte mittels des χ^2-Tests mit der Joinmap Software. Die Segregationsdaten wurden zuvor im Programm Microsoft Office Excel in eine für JoinMap erforderliche Form transformiert (*.loc Matrixdatei) und als '*doubled haploid population*' klassifiziert. Die Berechnung der Kopplungsgruppe und Markerreihenfolge basiert auf der Maximum-Likelihood-Methode (FISCHER und BALMUKAND 1928) für die Schätzung genetischer Distanzen zwischen Markern. Für die Gruppierung der Marker wurden ein LOD-Wert von 3,0 (min. Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung), eine Rekombinationsschwelle (max. Rekombinationsfrequenz zwischen zwei Markern) von 0,4 (40%) und eine maximale genetische Distanz zwischen den Markern von 35 cM festgelegt. Die Zuordnung der Kopplungsgruppen zu den *B. napus*-Chromosomen erfolgte über die SSR- bzw. AFLP-Ankermarkern und anhand von veröffentlichten genetischen Karten (UZUNOVA und ECKE 1999, BADANI 2005, PIQUEMAL *et al.* 2005, FU *et al.* 2007).

JoinMap Version 3.0 bietet auch angepasste Möglichkeiten der Datenausgabe, doch wurden die Kartierungsdaten zur Bearbeitung und späteren Einbettung in MS Office-Formate zusätzlich in MS Excel und MS Powerpoint überführt.

3.3.5 Analyse von *Quantative Trait Loci* (QTL)

Die Intervall-Kartierung von QTL wurde mit Hilfe des Programms PLABQTL Version 1.2 (UTZ und MELCHINGER 2005) ausgeführt. Die in Excel erstellten Markerdaten wurde in einer *.qdt Matrixdatei gespeichert, welche von PLABQTL als Eingabedatei benötigt wird; die Matrix enthält die Marker, die Kopplungsgruppe und phänotypische Daten. Als phänotypische Datengrundlage dienten jeweils die Samenfarben-Daten (NIRS-Werte), Proanthocyanidingehalte (Vanillin Methode) und die aus den HPLC-Analysen berechneten Größen der Peaks für phenolische Substanzen, oligomere und polymere Proanthocyanidine. Zur Berechnung der QTL wurde jeweils der Mittelwert aus allen Wiederholungen und Umwelten verwendet. Durch das Editieren der *.qin-Datei (Programcode) konnten die Parameter gesteuert werden, die für die Abfrage von QTL eingesetzt wurden.

PLABQTL führt eine Intervall-Kartierung durch (LANDER und BOTSTEIN 1989), wobei zur Detektion der QTL der Ansatz der multiplen Regression mit flankierenden Markern

(HALEY und KNOTT 1992) unter Verwendung von Cofaktoren angewendet wird (*composite interval mapping*, CIM, JANSEN und STAM 1994, UTZ und MELCHINGER 1994, ZENG 1994). Die Auswahl der Marker, welche als Cofaktoren genutzt wurden, erfolgte anhand der Mittelwerte einer schrittweisen Regressionsanalyse. Das Programm schätzt den Einfluss der einzelnen Genorte auf das Merkmal über einen multiplen Regressionsansatz.

Das Maximum der LOD-Kurve oberhalb des Schwellenwertes bezeichnet die Position des QTL in der genetischen Karte. Das PLABQTL-Resultat wird in einer *.qpt-Datei ausgegeben (Plattform-unabhängige oder ASCII-Datei). Dabei wird die durch einen QTL erklärte phänotypische Varianz eines Merkmals, unabhängig von anderen QTL-Effekten, sowie die partielle phänotypische Varianz berechnet, die den Einfluss eines QTL unter Berücksichtigung des Einflusses aller anderen QTL bestimmt. In einer Varianzanalyse wird die durch alle identifizierten QTL erklärte genetische Varianz eines Merkmals unter Berücksichtigung von (QTL x Umwelt-)Interaktionen geschätzt. Das Bestimmtheitsmaß des Gesamtmodells entspricht der durch die jeweiligen QTL erklärten phänotypischen Varianz. Der Additiveffekt eines QTL wird als halbe Differenz zwischen den genotypischen Werten der homozygoten Eltern angegeben. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten mathematischen Funktionen findet sich bei UTZ und MELCHINGER (2005).

Mittels eines Permutationstests mit 1000 Permutationen wurde separat für jede Kopplungsgruppe der LOD-Schwellenwert, bei denen ein QTL als signifikant angenommen wurde, bestimmt (CHURCHILL und DOERGE 1994, DOERGE und CHURCHILL 1996).

4. ERGEBNISSE

4.1 Phänotypisierung von Samenfarbe und Sameninhaltsstoffen

4.1.1 Bestimmung der Flavonoidzusammensetzung mittels Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Um zu ermitteln, welche phenolischen Substanzen im Rapsmehl vorliegen, wurden die metabolischen Extrakte via Festphasenextraktion getrennt. Die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) stellt eine Methode zur HPLC-Probenvorbereitung dar und hilft bei der Fraktionierung und Isolierung von einzelnen Substanzen oder Substanzgruppen. Da abgesehen von den mono- und dimeren Flavonoiden keine Referenzsubstanzen kommerziell erhältlich waren, wurden die Chromatogramm-Peaks anhand der Retenzionszeiten (RT) und Fraktion gekennzeichnet.

In Abbildung 16 ist ein charakteristisches Beispiel für die resultierenden Profile der HPLC-Untersuchung eines metanolischen Rohextrakts dargestellt.

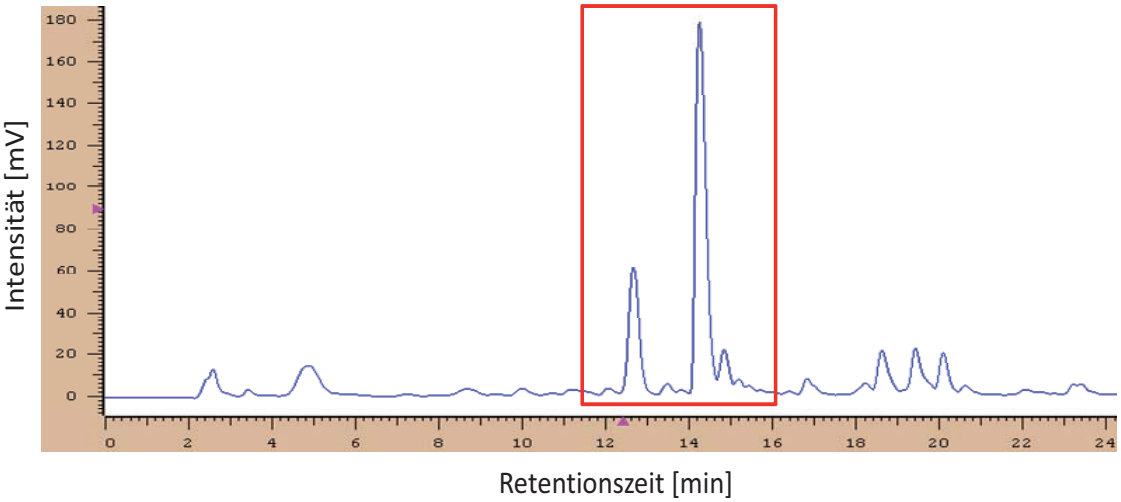

Abb. 16 – HPLC-Chromatogramm des metanolischen Rohextrakts aus der schwarzsamigen Elternlinie Express 617 aufgezeichnet bei einer Standardwellenlänge von 280 nm. Der rote Bereich zeigt die wichtigsten Peaks in dem Chromatogramm.

Zur Beginn der Fraktionierung wurden die phenolischen Säuren aus den SPE-Kartuschen mit reinstem HPLC-Wasser ausgewaschen. Wie in Abbildung 17 sichtbar, konnten deutliche Unterschiede zwischen den HPLC-Chromatogrammen für Fraktion 1 (F1) aus den schwarz- und gelbsamigen Elternlinien 'Express 617' bzw. '1012-98' beobachtet werden. Ein Abgleich der Chromatogramme des metanolischen Rohextrakts und der

phenolischen Säuren zeigen, dass zwei Hauptpeaks in diesen Fraktionen analoge Retentionszeiten haben.

In Fraktion 1 wurden zwei Hauptpeaks bei den Retensinonszeiten RT = 12,72 (F1PA2) und 14,37 min (F1PA1) detektiert. Diese entsprechen vermutlich Sinapoylglucose bzw. Sinapin, den wichtigsten phenolischen Verbindungen in Rapssamen (MABON *et al.* 1999, VUORELA *et al.* 2003, MILKOWSKI *et al.* 2004, ZUM FELDE 2006, 2007). Weiterhin wurden zwei Signale bei den Retentionszeiten RT = 19,47 (F1PA3) und RT = 20,19 min (F1PA4) detektiert.

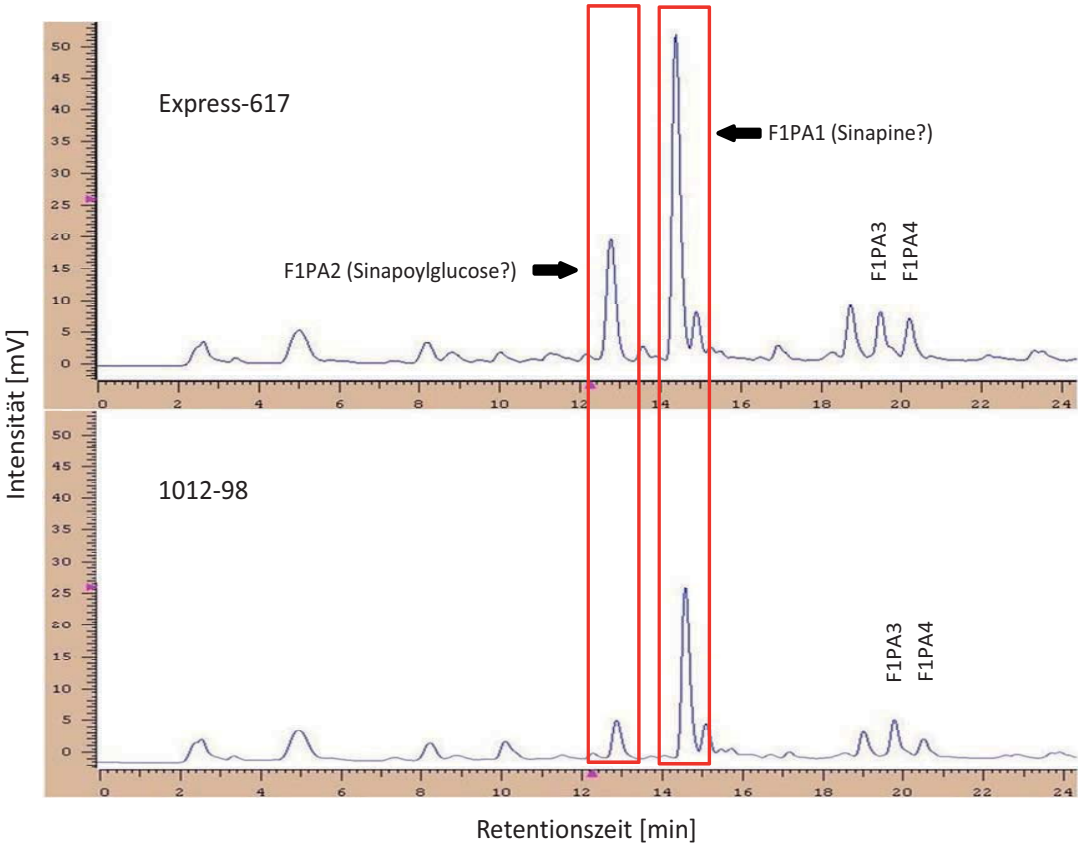

Abb. 17 – HPLC-Chromatogramme (280 nm) von Fraktion 1 (phenolischen Säuren) aus den schwarz- und gelbsamigen Eltern (Express 617 bzw. 1012-98). Die roten Bereiche zeigen die Hauptpeaks für die phenolischen Säuren, vermutlich Sinapoylglucose und Sinapin.

Abbildung 18 zeigt die HPLC-Chromatogramme der monomerischen Proanthocyanidine (Fraktion 2a) sowie der oligomerischen Proanthocyanidine (Fraktion 2b). In der Fraktion 2a wurden keine Proanthocyanidin-Peaks entdeckt, sondern lediglich das übliche Lösungsmittelartefakt bei RT = 2,5 min. Es konnte der Schluss gezogen werden, dass die Rapsmehlextrakte keine monomerischen Proanthocyanidine in nachweisbaren Mengen beinhalten. Die Fraktion 2b stellt daher alle wichtigen Peaks der gesamten Fraktion 2 dar. Aus

diesem Grund konnte die gesamte Fraktion 2 ohne Fraktionierung in monomerischen und oligomerischen Subfraktionen für die Quantifizierung der oligomerischen Proanthocyanidine verwendet werden.

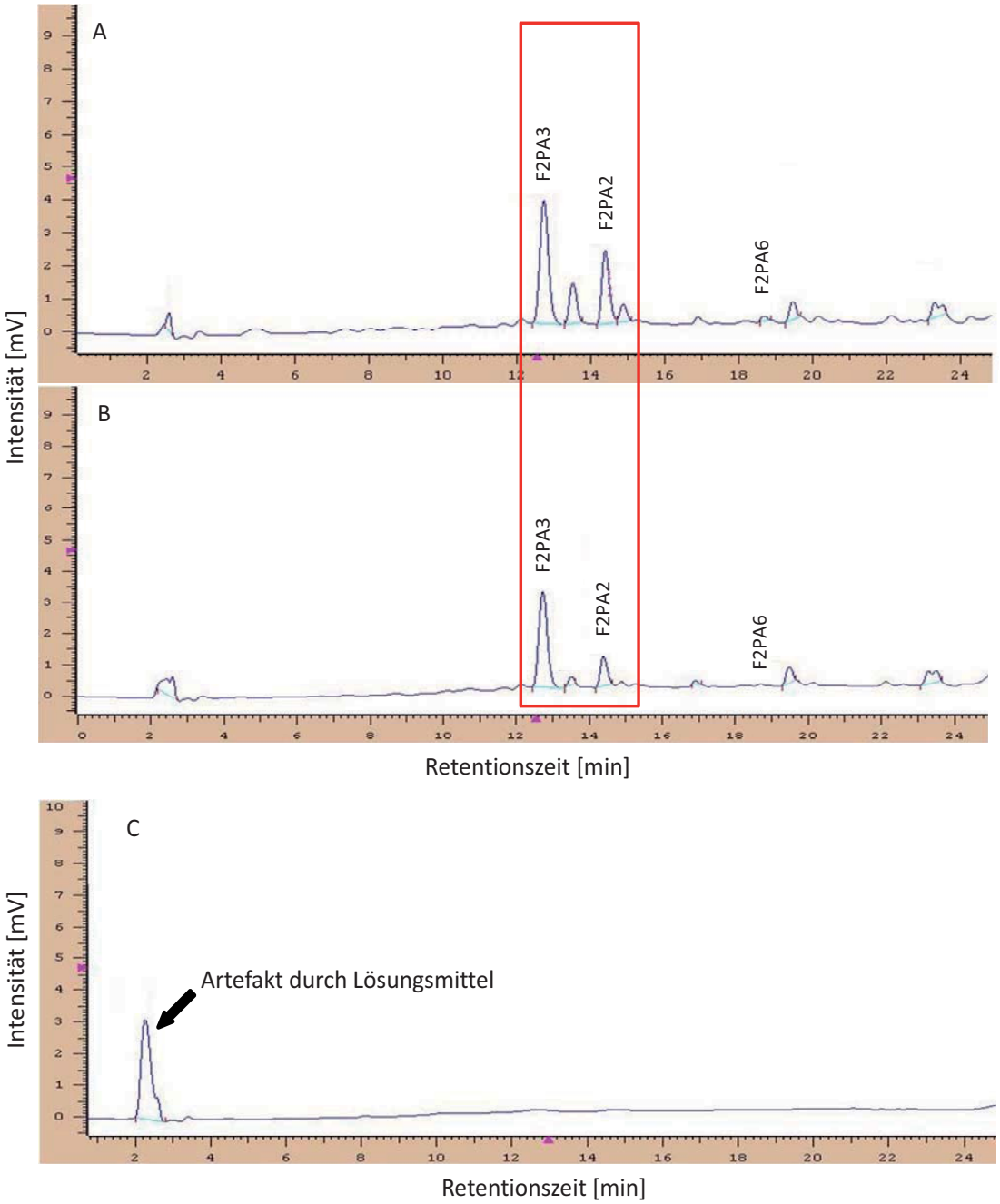

Abb. 18 – HPLC-Chromatogramme (280 nm) von Fraktionen 2, 2a, und 2b. A - Fraktion 2 (mono- und oligomerische Proanthocyanidine); B - Fraktion 2b (oligomerische Proanthocyanidine); C - Fraktion 2a (monomerische Proanthocyanidine). Der rote Bereich zeigt die Hauptpeaks für oligomerische Proanthocyanidine in Rapsmehl.

Die Chromatogramme der schwarzsamigen und gelbsamigen Elternlinien für Fraktion 2 sind in Abbildung 19 dargestellt. Der gelbe Elter '1012-98' hat eine deutlich kleinere Quantität an oligomeren PAs im Vergleich zum schwarzen Elter 'Express 617'. Ein erheblicher Unterschied zwischen den Eltern ist am besten am Peak F2PA3 zu beobachten.

In den DH-Linien der YE2-Population konnten drei unterschiedliche oligomerische Proanthocyanidine an Hand ihrer charakteristischen UV-Spektren beobachtet werden. Sie wurden mittels des internen Standards Epigallocatechin quantifiziert. Die Peaks F2PA3 und F2PA2 konnten bei 12,73 bzw. 14,40 min in allen Linien detektiert werden, während Peak F2PA6 (RT=18,82 min) lediglich in der schwarzsamigen Elternlinie 'Express 617' und wenigen DH-Linien in quantifizierbaren Mengen nachgewiesen wurde.

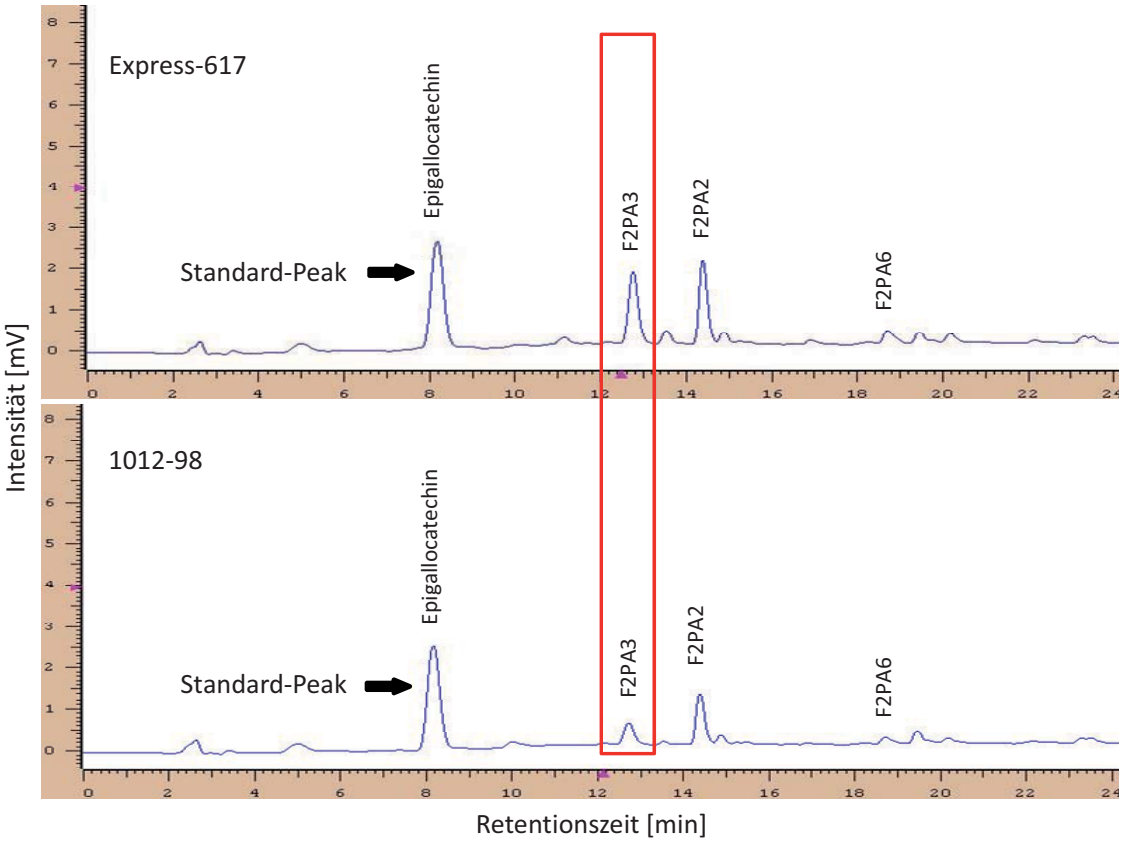

Abb. 19 – HPLC-Spektren der gebildeten Substanzen von Fraktion 2 aus den schwarz- und gelbsamigen Eltern (Express 617 bzw. 1012-98). Die Hauptunterschiede zwischen den beiden Genotypen sind mit rot gekennzeichnet. "Standard-Peak" = interner Standard.

Die freien Anthocyanidine und polymerischen Proanthocyanidine (Fraktion 3) konnten aus den SPE-Kartuschen mit säuerlichem Methanol ausgespült werden. Nach der Eluierung bekamen die Kartuschen ihre ursprüngliche Farbe und so konnte bestätigt werden, dass alle pigmentierten Verbindungen zurückgewonnen wurden. In Abbildung 20 sind Chromatogramme der beiden Elternlinien dargestellt. Die polymerische PAs kamen in der gelben Elternlinie '1012-98' im Vergleich zur schwarzen Elternlinie 'Express 617' in untergeordneter Menge vor. In den Chromatogrammen der beiden Eltern konnten jeweils fünf Peaks identifiziert und quantifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Procyanidin B2 [epicatechin-(4β→8)-epicatechin], die als interner Standard benutzt wurde. Es wurden Peaks bei den Retensionszeiten RT=12,75 (F3PA3), 14,45 (F3PA4), 17,12 (F3PA5), 18,90 (F3PA6) und 19,52 min (F3PA7) gefunden.

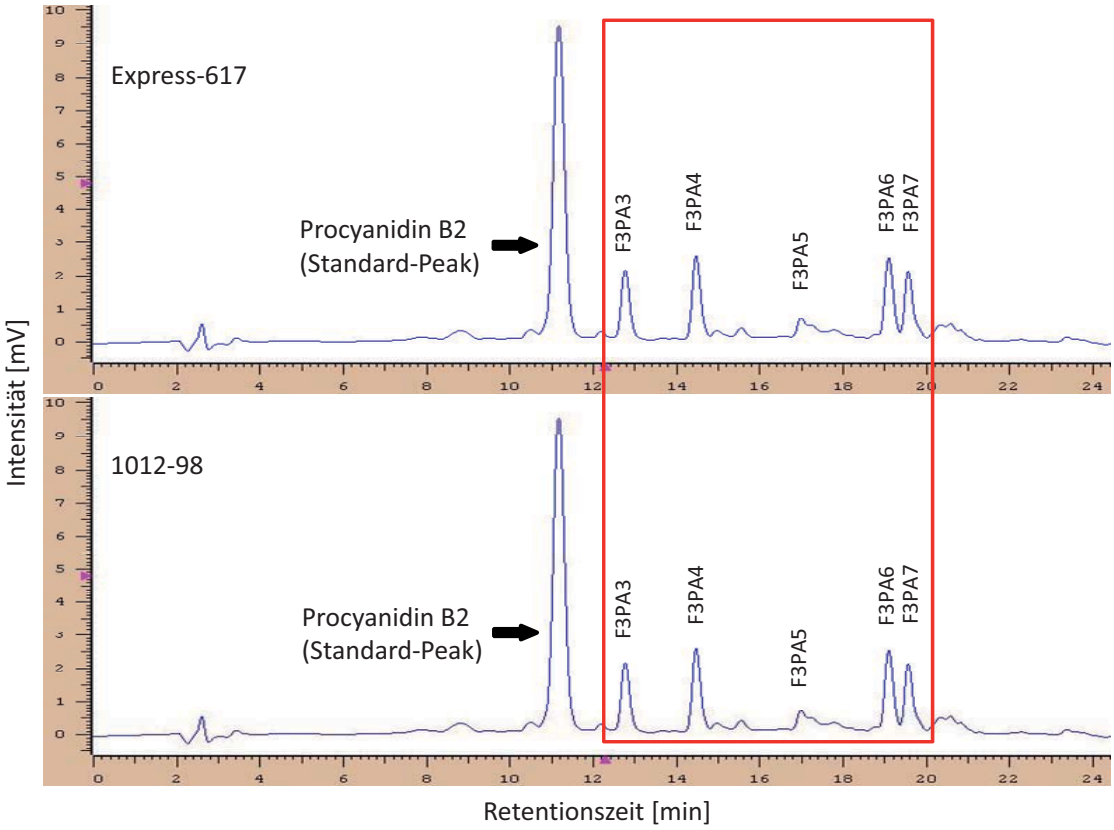

Abb. 20 – HPLC-Chromatogramme (280 nm) der Fraktion 3 aus den schwarz- und gelbsamigen Eltern (Express 617 bzw. 1012-98). Die Hauptunterschiede zwischen den beiden Genotypen sind im roten Bereich gezeichnet. "Standard peak" = Interner Standard.

Der Vergleich von Chromatogrammen zwischen allen drei Fraktionen zeigte eine Überlappung einiger Peaks mit gleichen Retentionszeiten. Ein Peak wurde zum Beispiel in allen drei Fraktionen bei einer Retentionszeit von 12,5 min detektiert. Die jeweiligen phenolischen Verbindungen, die in jeder Fraktion zu einem gegebenen Peak beigetragen haben, konnten mit dem hier verwendeten System nicht identifiziert werden, weil u.a. keine Referenzsubstanzen kommerziell erhältlich waren. In Zukunft sollen für die Identifizierung dieser Signale weitere Studien mittels Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) durchgeführt werden.

4.1.2 Samenfarbe, phenolische Verbindungen und assoziierte Qualitätsmerkmale

Ein Hauptteil dieser Arbeit lag auf der Phänotypisierung des Materials bezüglich Samenfarbe (NIRS-Messungen) und phenolischen Substanzen im Rapsmehl (Vanillin- bzw. HPLC-Methode). Die Farbwerte für die Genotypen der YE2-DH Population lagen zwischen 2,9 (helle Samen) und 8,1 (schwarze Samen) und die Proanthocyanidingehalte (Vanillin-Methode) zwischen 240,7 und 511,6 mg/100g ölfreiem Rapsmehl (Tabelle 8).

Mit der Vanillin-Methode wurden 166 DH-Linien der DH-Population YE2-DH aus der Kreuzung 'Express 617' (schwarzsamig) x '1012-98' (gelbsamig) untersucht. Dabei war erwartungsgemäß eine breite Variation im Tanningehalt und in den gelben DH-Linien teilweise sehr geringe Gehalte zu beobachten (Abb. 21).

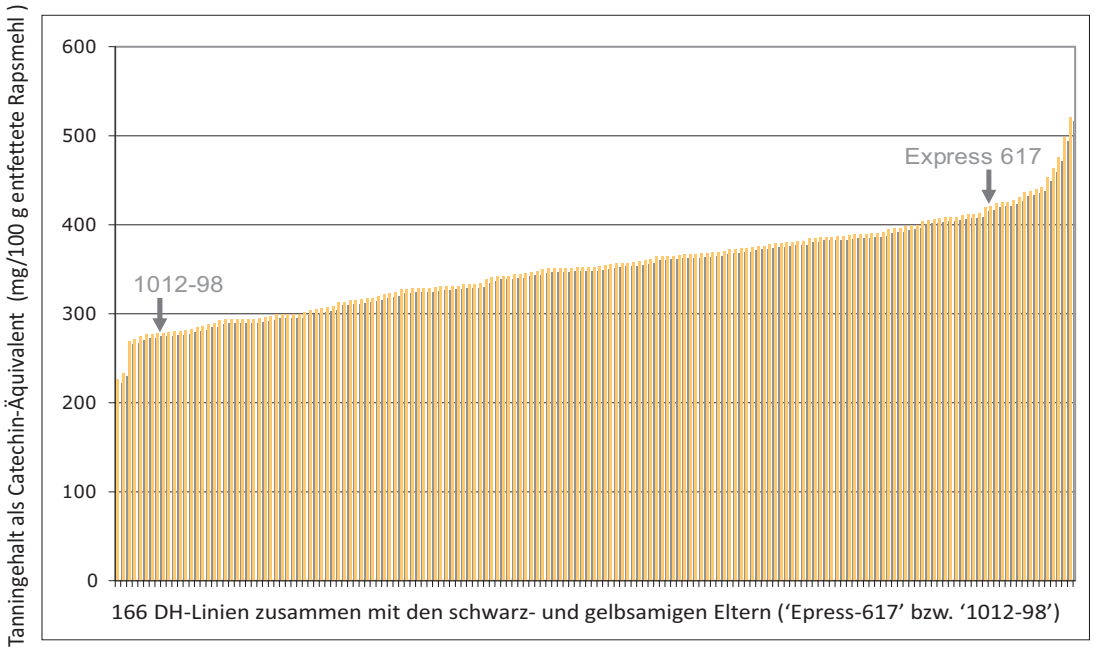

Abb. 21 - Tanningehalt Abweichung in der YE2-DH Population.

Die Ergebnisse der Phänotypisierung des Materials im Hinblick auf die einzelnen phenolischen Verbindungen (Mittelwert, Maximum, Minimum und Standardabweichung) via quantitative HPLC sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die erhaltenen phänotypischen Werte wurden auch für die QTL-Analyse bzgl. Samenfarbe und -inhaltsstoffe (phenolische Säure, oligo- und polymerische PAs) in der Population YE2-DH benutzt. Im Anhang A12 sind die Quantitäten aller Proanthocyanidine aus den jeweiligen Fraktionen an Hand des internen Standards aufgeführt.

Tabelle 8 - Mittelwert, Intervall (Min. - Max.) und Standardabweichung (Stabw.) für phenolische Verbindungen, Samenfarbe und andere wertbestimmende Merkmale der Population YE2-DH.

Merkmal		Mittelwert	Min. - Max.	Stabw.	P^0-S
Samenfarbe[1)]		6,0	2,9 - 8,1	1,1	0,004**
Proanthocyanidingehalt[2)]		363,5	240,7 - 511,6	45,6	0,037*
Ölgehalt (%TM)		44,2	36,7 - 49,5	2,2	< 0,0001***
Proteingehalt (%TM)		24,2	20,5 - 28,3	1,4	< 0,0001***
Oligomere PAs[2)]	**F2PA2**	3,6	0,0 - 21,0	3,9	< 0,0001***
	F2PA3	36,9	0,0 - 115,1	23,9	< 0,0001***
	F2PA6	0,2	0,0 - 4,0	0,6	< 0,0001***
Polymere PAs[2)]	**F3PA3**	10,8	0,2 - 70,4	8,1	< 0,0001***
	F3PA4	21,3	0,9 - 127,0	16,6	< 0,0001***
	F3PA5	4,5	0,0 - 39,3	5,5	< 0,0001***
	F3PA6	24,0	1,6 - 215,1	29,8	< 0,0001***
	F3PA7	14,1	1,9 - 66,7	8,6	< 0,0001***

1) Samenfarbe als Absorbanzwert (1 = weiß, 10 = schwarz)
2) phenolische Verbindungen als mg/100 g entfettetes Rapsmehl
F2: Fraktion 2; F3: Fraktion 3; PA2-PA7: Proanthocyanidine HPLC-Peaks
P^o-S <0,05 zeigt eine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung nach Shapiro-Wilk-Anpassungstest (P^o-S).

Die Häufigkeitsverteilungen der untersuchten Merkmale in der DH-Population wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test (P^o-S) auf Normalverteilung geprüft. Sowohl für die Samenfarbe als auch für die Gehalte an Gesamtproanthocyanidin (Vanillin-Methode) sowie an oligo- und polymerischen PAs (HPLC-Quantifizierung) wiesen sie eine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung auf (Tabelle 8).

Die statistische Analyse beinhaltete als deskriptive Statistiken die Evaluierung von Mittelwerten und Standardabweichungen als Maß der Streuung. Nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test (P^o-S) erfolgte eine Korrelationsanalyse der nicht normal verteilten Daten nach Pearson. Der Pearson-Korrelationskoeffizient entspricht einer Maßzahl, die als r bezeichnet wird und zwischen -1 und +1 liegt. $r > 0,7$ wird als starker linearer Zusammenhang interpretiert, $0,3 < r < 0,7$ als mittlerer linearer Zusammenhang und $0,0 < r < 0,3$ als schwacher linearer Zusammenhang.

Die Elternwerte bezüglich Samenfarbe lagen zwischen 2,8 ('1012-98': helle Samen) und 8,3 ('Express 617': schwarze Samen). Die mittleren Proanthocyanidingehalte der Elternlinien sind der Tabelle 9 bzw. Abb. 22 zu entnehmen.

Tabelle 9 - Proanthocyanidingehalte (Mittelwert ± Standardabweichung) in Rapsmehl aus den schwarz- bzw. gelbsamigen Elternlinien bestimmt mittels Vanillin-Methode

Ort	Jahr	Gelber Elter '1012-98'	Schwarzer Elter 'Express 617'
Rauischholzhausen	2003	236 ± 18	411 ± 6
	2004	215 ±17	409 ± 10
Einbeck	2005	209 ± 14	415 ± 11
Gross Gerau	2006	279 ± 13	417 ± 9
Seligenstadt	2006	233 ± 11	416 ± 7

Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Wiederholungen als mg Catechin-Äquivalent/100 g getrocknetes Rapsmehl.

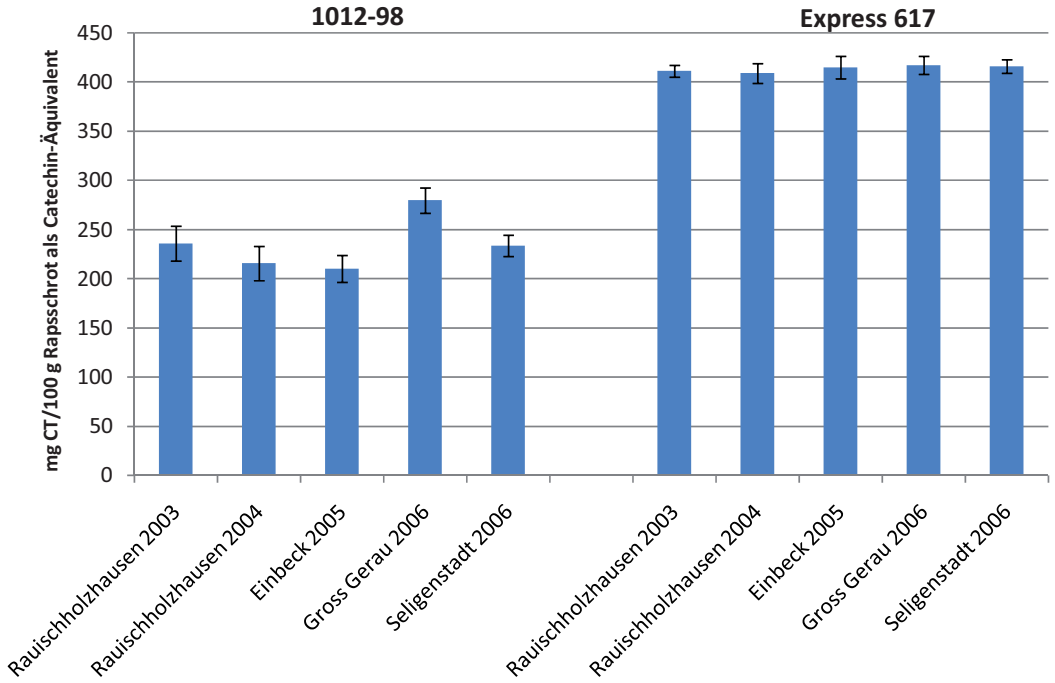

Abb. 22 - Tanningehalt der schwarz- bzw. gelbsamigen Elternlinien (Express 617 bzw. 1012-98) an unterschiedlichen Standorten zwischen 2003 und 2006.

4.1.3 Korrelationen zwischen Merkmalen in der DH Population YE2

Die Gehalte einzelner (HPLC-Methode) bzw. aller (Vanillin-Methode) phenolischen Substanzen aus jeder DH-Linie wurden für Korrelationsanalysen mit Samenfarbe und anderen assoziierten Qualitätsmerkmalen (Protein- bzw. Öl-Gehalt) miteinander verwendet. Als Basis für die Korrelationen wurden die Mittelwerte aus fünf Wiederholungen aller Umwelten verwendet. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten (r) sind in der Tabelle 10 zu finden.

Wie in Tabelle 10 bzw. Abb. 23 ersichtlich, war die Samenfarbe innerhalb der YE2-DH Population signifikant korreliert (p = 0,001) mit Proanthocyanidingehalt (r = 0,33) und Ölgehalt (r = 0,34). Der Vergleich zwischen Proanthocyanidin- und Flavonoidgehalt erbrachte eine signifikante Korrelation (p = 0,001) mit r = 0,32. Die Korrelationsanalyse zeigte dagegen negative Zusammenhänge zwischen Rohproteingehalt und den anderen Qualitätsmerkmalen. Erwartungsgemäß bestand eine starke negative Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von r = -0,60 zwischen Rohproteingehalt und Ölgehalt.

4.1.3.1 Phenolische Säuren

Die Korrelationsanalyse zwischen ***phenolischen Säuren*** und assoziierten Qualitätsmerkmalen zeigte Korrelationskoeffizienten von -0,26 bis 0,67. Es bestand kein Zusammenhang zwischen Samenfarbe und phenolischen Säuren F1PA2 (vermutlich Sinapoylglucose), F1PA3 und F1PA4. Eine signifikante Korrelation (p = 0,001) von r = 0,37 wurde zwischen Samenfarbe und phenolischen Säuren F1PA1 (vermutlich Sinapin) gefunden. Für F1PA1 wurden außerdem signifikante Zusammenhänge (p = 0,001) mit dem Proanthocyanidingehalt (r = 0,40), dem Flavonoidgehalt (r = 0,65) sowie dem Ölgehalt im Samen (r = 0,47) gefunden. Es bestehen keine Daten in der Literatur über die unerwarteten Korrelationen zwischen den verschiedenen phenolischen Säuren und den genannten Merkmalen. Den größten Anteil an Phenolsäuren im Rapssamen hat mit 70–85% die Sinapinsäure bzw. ihre Ester. Diese befinden sich überwiegend in den Keimblättern und nur als Spuren in der Samenschale (0,06 - 0,24%). Alle phenolischen Säuren waren signifikant (p = 0,001) mit dem Gesamtflavonoidgehalt korreliert, mit Korrelationskoeffizienten von 0,43 bis 0,65. Untereinander waren insbesondere F1PA1 mit F1PA2 (r = 0,34; p = 0,001) sowie F1PA2 mit F1PA3 (r = 0,28; p = 0,001) bzw. F1PA4 (r = 0,29; p = 0,001) signifikant korreliert.

Tabelle 10 - Korrelationen zwischen den wertbestimmenden Merkmalen der Population YE2-DH

Merkmal		Samen-farbe	PAs Gehalt	Flavonoid Gehalt	Ölgehalt (%TM)	Protein Gehalt (%TM)	Phenolische Säure				Oligomere PAs			Polymere PAs				
							F1PA1	F1PA2	F1PA3	F1PA4	F2PA2	F2PA3	F2PA6	F3PA3	F3PA4	F3PA5	F3PA6	F3PA7
Samenfarbe		1																
PAs-Gehalt		0,33***	1															
Flavonoidgehalt		0,09	0,32***	1														
Ölgehalt (%TM)		0,34***	0,28***	0,31***	1													
Proteingehalt (%TM)		-0,17*	-0,06	-0,14	-0,60***	1												
Phenolische Säure	F1PA1	0,37***	0,40***	0,65***	0,47***	-0,07	1											
	F1PA2	0,01	0,21**	0,67***	0,28***	-0,26***	0,34***	1										
	F1PA3	0,04	0,06	0,47***	0,00	-0,05	0,13	0,28***	1									
	F1PA4	-0,03	0,03	0,43***	0,04	-0,15*	0,06	0,29***	0,16*	1								
Oligomere PAs	F2PA2	0,04	0,10	0,28***	0,26***	-0,27***	0,12	0,32***	0,06	0,17*	1							
	F2PA3	0,14	0,15*	0,30***	0,26***	-0,34***	0,19*	0,37***	0,10	0,19*	0,77***	1						
	F2PA6	0,05	-0,05	-0,03	0,15*	-0,20**	-0,08	0,10	-0,01	0,05	0,11	0,11	1					
Polymere PAs	F3PA3	0,05	0,05	0,07	0,24**	-0,32***	-0,01	0,20*	-0,05	-0,01	0,28***	0,42***	0,08	1				
	F3PA4	0,19*	0,12	0,11	0,20**	-0,11	0,15*	0,04	-0,02	0,01	0,23**	0,33***	0,02	0,05	1			
	F3PA5	-0,02	0,06	-0,02	0,10	0,02	0,06	0,01	-0,05	-0,08	-0,02	0,00	0,00	0,40***	-0,24**	1		
	F3PA6	-0,12	-0,01	-0,10	-0,02	0,11	0,01	-0,09	-0,11	-0,13	-0,11	-0,09	-0,05	0,26***	-0,28***	0,85***	1	
	F3PA7	0,15*	0,17*	0,18*	0,04	-0,06	0,14	0,06	0,40***	0,01	0,16*	0,31***	-0,03	0,37***	0,03	0,43***	0,43***	1

** signifikant auf dem 0,05 Niveau durch t-Test*
*** signifikant auf dem 0,01 Niveau durch t-Test*
**** signifikant auf dem 0,001 Niveau durch t-Test*

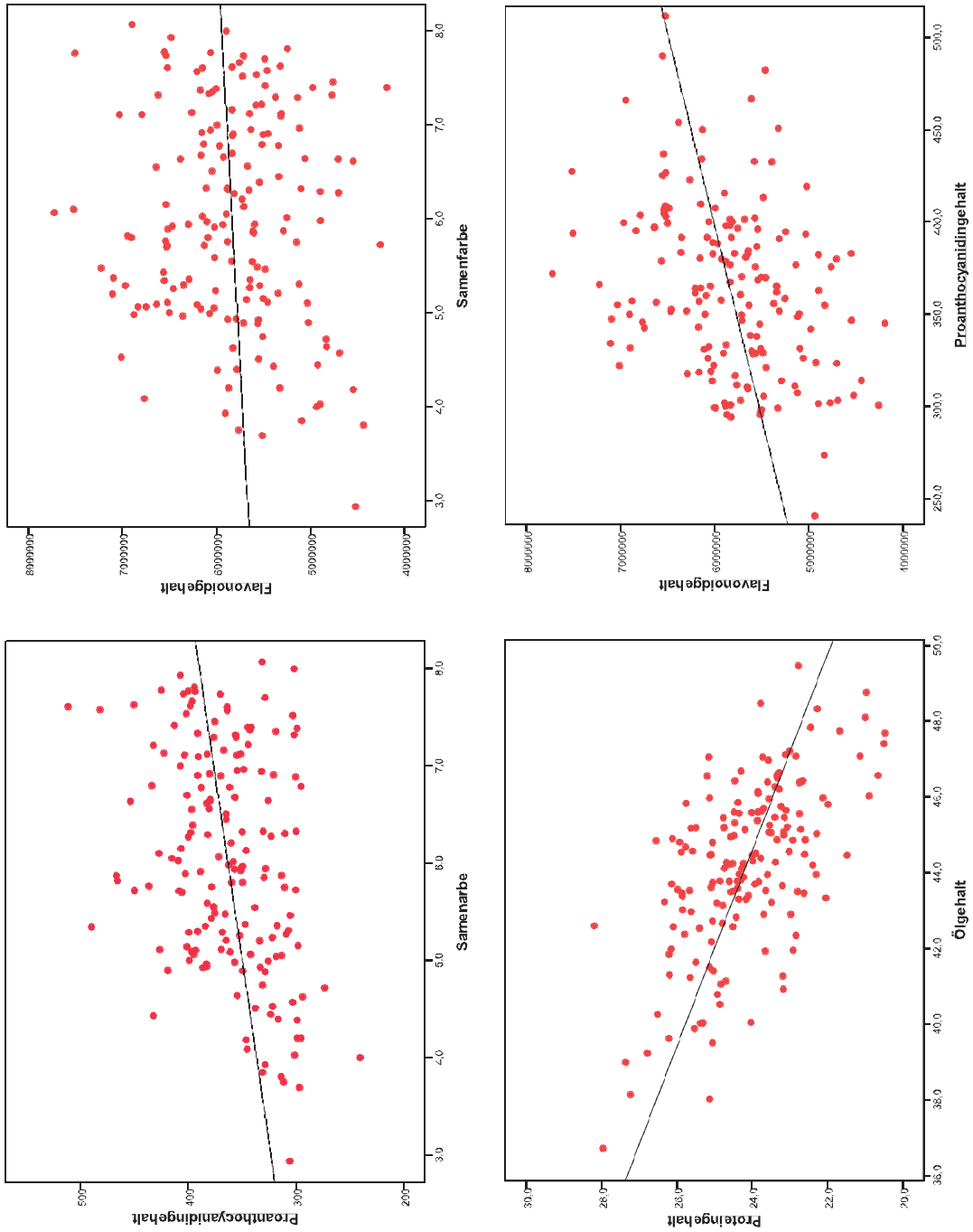

Abb. 23 - Korrelationen zwischen Samenfarbe und Proanthocyanidin- bzw. Flavonoidgehalt, Öl- und Proteingehalt, Proanthocyanidin- und Flavonoidgehalt in der YE2-DH Population.

4.1.3.2 Oligomere Proanthocyanidine (OPC)

Zwischen den Gehalten an ***oligomeren Proanthocyanidinen (F2PA2, F2PA3, F2PA6)*** und der Samenfarbe konnten bei der Population YE2-DH keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden (Tabelle 10), obwohl sich ein Haupt-QTL F2PA3 sowie ein QTL für Samenfarbe an der gleichen Stelle auf Chromosom N11 befinden. Im Gegensatz dazu wurden signifikante Korrelationen (jeweils $p = 0{,}001$) zwischen Flavonoidgehalt, F1PA2 (vermutlich Sinapoylglucose) und oligomerischen Proanthocyanidinen F2PA2 bzw. F2PA3 gefunden. Aus diesen drei oligomeren Proanthocyanidinen ist lediglich F2PA3 mit dem Proanthocyanidingehalt signifikant korreliert ($p = 0{,}05$). Die Korrelationsanalyse zeigte eine schwache, aber statistisch signifikante negative Beziehung zwischen Protein- und oligomerem Proanthocyanidingehalt. Zwischen den oligomeren Proanthocyanidinen wurden mit einer Ausnahme keine signifikanten Zusammenhänge gefunden. Die Ausnahme war die enge Korrelation ($r = 0{,}77$, $p = 0{,}001$) zwischen F2PA2 und den F2PA3 (Abb. 24).

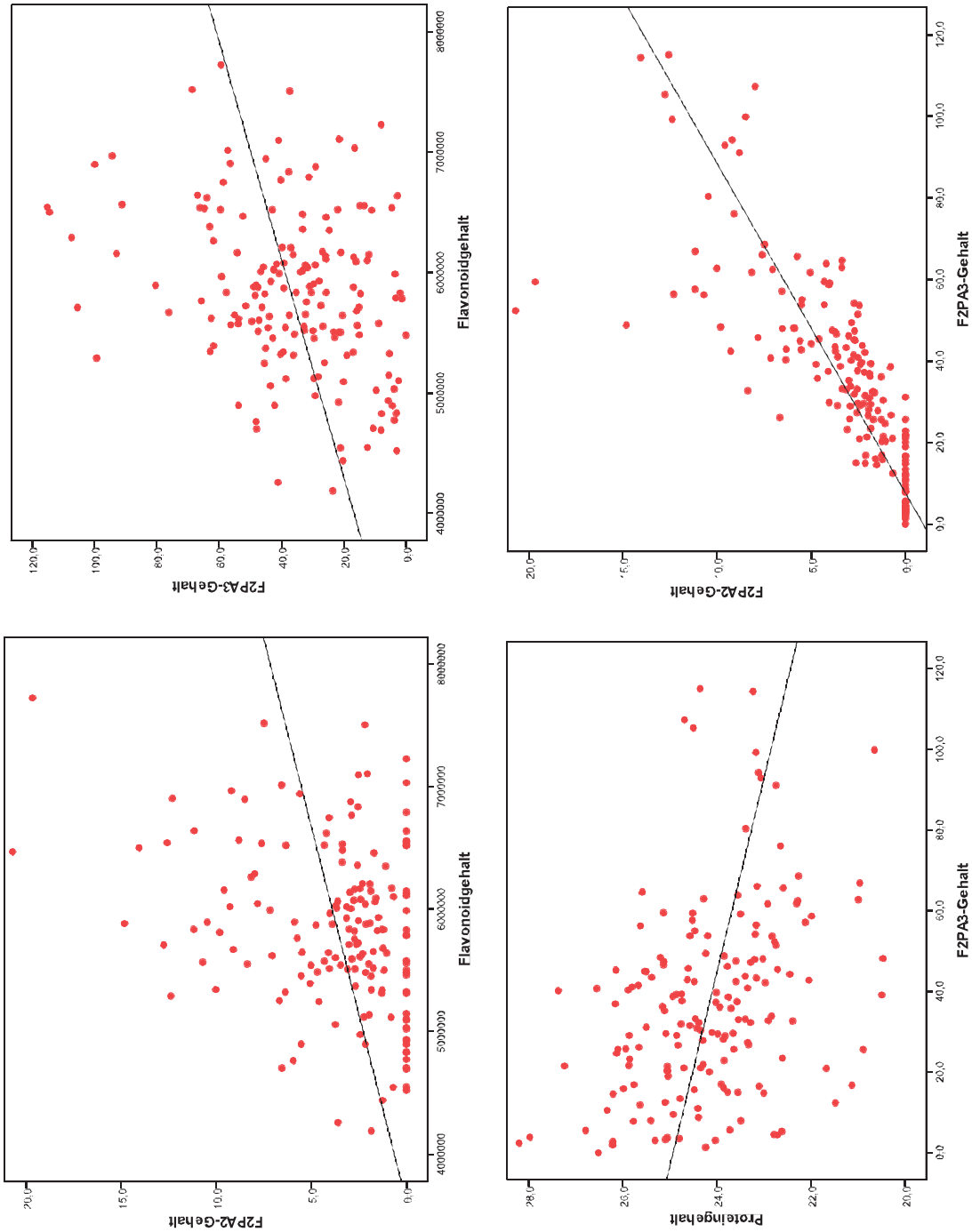

Abb. 24 - Korrelationen der oligomeren Proanthocyanidine in der YE2-DH Population.

4.1.3.3 Polymere Proanthocyanidine (PPC)

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen allen untersuchten ***polymeren Proanthocyanidinen (F3PA3, F3PA4, F3PA5, F3PA6, F3PA7)*** und die assoziierten Qualitätsmerkmale in der Population YE2-DH sind in Tabelle 10 dargestellt. Mit Ausnahme von F3PA4 (r = 0,19; p = 0,05) und F3PA7 (r = 0,15; p = 0,05) konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen Samenfarbe und polymeren Proanthocyanidinen aufgedeckt werden. Die Ergebnisse entsprechen nicht den Erwartungen, weil die eingelagerten Proanthocyanidine im Endothelium und im anliegenden Parenchym für die Pigmentierung in der Samenschale zuständig sind. Zwischen den polymeren Proanthocyanidinen und Proanthocyanidin- (Vanillin-Methode) bzw. Flavonoidgehalt (HPLC-Methode) bestanden bei der DH-Population ebenfalls keine statistisch signifikanten Korrelationen mit Ausnahme von F3PA7. Die ermittelten Werte lassen einen statistisch schwachen Zusammenhang auf dem 5% Niveau zwischen F3PA7 und den beiden Variablen erwarten. Der F3PA7 Peak war außerdem mit polymeren Proanthocyanidinen F3PA3 (r = 0,37; p = 0,001), F3PA5 (r = 0,43; p = 0,001) und F3PA6 (r = 0,43; p = 0,001) positiv korreliert. Für die Korrelation zwischen polymeren Proanthocyanidinen F3PA3 (r = 0,24; p = 0,001) bzw. F3PA4 (r = 0,32; p = 0,001) und Ölgehalt wurden ebenfalls positive Zusammenhänge gefunden. Die Korrelationsanalyse zeigte eine schwache, aber statistisch signifikante negative Beziehung zwischen Proteingehalt und den Proanthocyanidinen F3PA3 (r = -0,32; p = 0,001). Unter den polymeren Proanthocyanidinen bestanden Beziehungen mit Korrelationskoeffizienten von -0,28 bis 0,85. Wie in Tabelle 10 und Abbildung 25 sichtbar, war die stärkste positive Korrelation zwischen den polymeren Proanthocyanidinen F3PA5 und F3PA6 mit r = 0,85 (p = 0,001) zu beobachten. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen Zusammenhang von F3PA4 und F3PA5 liegt aufgrund des Korrelationskoeffizienten von r = -0,24 bei 1%. Für einen Zusammenhang von F3PA4 und F3PA6 liegt sie bei 0,1% (r = -0,28). Für F3PA3 wurden Korrelationen bei p = 0,001 mit F3PA5 (r = 0,40), F3PA6 (r = 0,26) sowie F3PA7 (r = 0,37) gefunden.

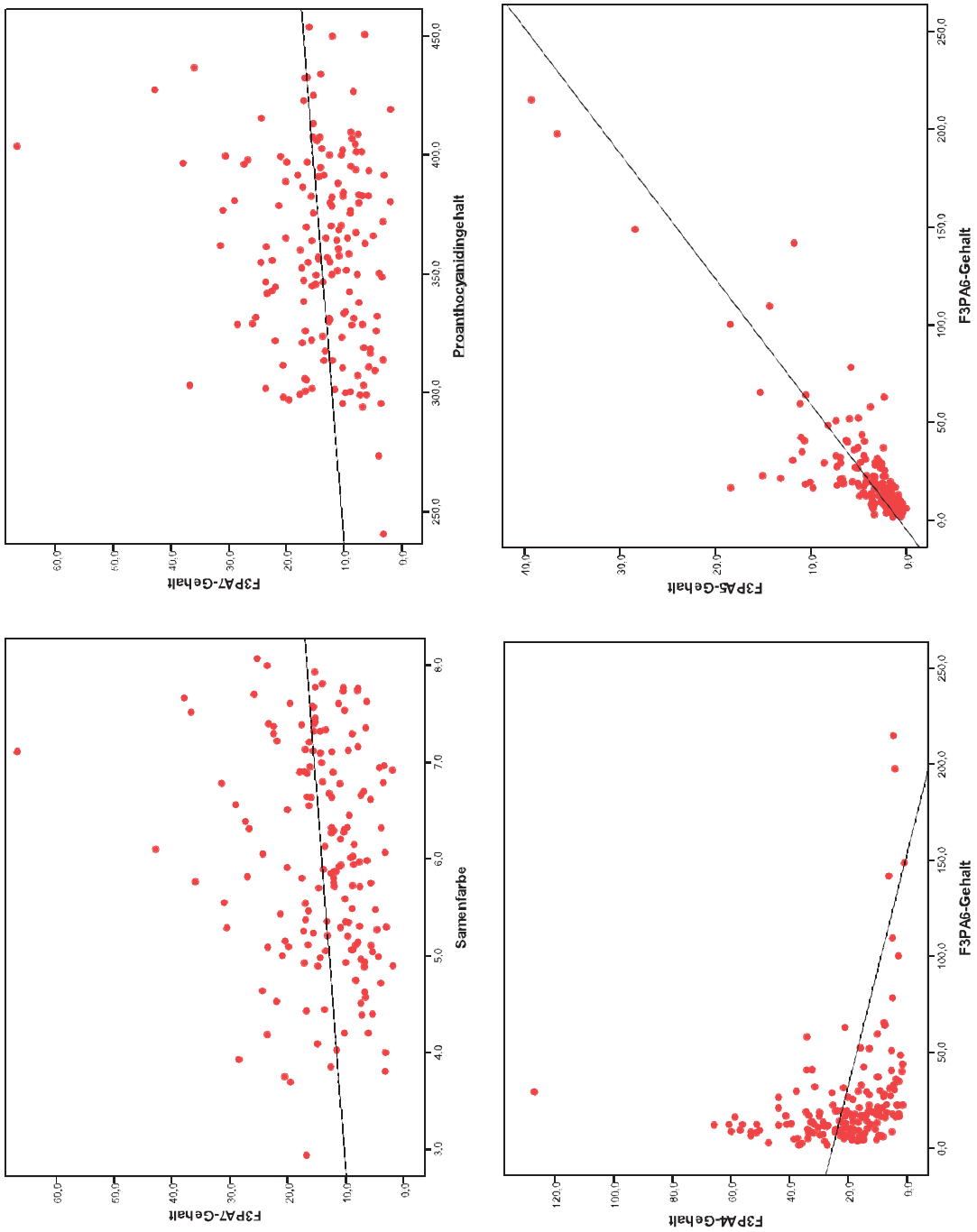

Abb. 25 - Korrelationen der polymeren Proanthocyanidine in YE2-DH Population.

Tabelle 10 zeigt die Korrelationen unter den phenolischen Komponenten des Rapsmehles (phenolische Säuren, oligo- und polymere Proanthocyanidine). Man beobachtet in dem gegebenen Probenumfang positive Korrelationen zwischen den polymeren Proanthocyanidinen F3PA3, F3PA4 bzw. F3PA7, sowohl mit oligomeren Proanthocyanidinen F2PA2 als auch mit F2PA3 (Abb. 26). Die Korrelationskoeffizienten weichen von 0,16 bis 0,42 ab und sind statistisch von p = 0,1 bis 5% bedeutsam. Außerdem korreliert jeder von den obengenannten polymeren Proanthocyanidinen mit einer anderen phenolischen Säure: F3PA3 mit F1PA2 (r = 0,20, p = 0,05), F3PA4 mit F1PA1 (r = 0,15, p = 0,05) und F3PA7 mit F1PA3 (r = 0,40, p = 0,001). Es gibt statistisch signifikante Zusammenhänge auch zwischen oligomeren Proanthocyanidinen und phenolischen Säuren. Die Korrelationen des F2PA2 mit den phenolischen Säuren F1PA1 bzw. F1PA4 zeigten Koeffizienten von r = 0,32 (p = 0,001) bzw. r = 0,17 (p = 0,05). Die Korrelationsanalyse zeigte ebenfalls schwache, aber statistisch signifikante positive Beziehungen zwischen oligomeren Proanthocyanidinen F2PA3 und phenolischen Säuren F1PA1 (r=0,19; p = 0,05), F1PA2 (r=0,37; p = 0,001) bzw. F1PA4 (r=0,19; p = 0,05). Die erhaltenen Ergebnisse lassen eine bisher nicht bekannte biochemische Interkonnektivität zwischen den verschiedenen phenolischen Verbindungen aus dem Phenylpropanoid-Weg erkennen.

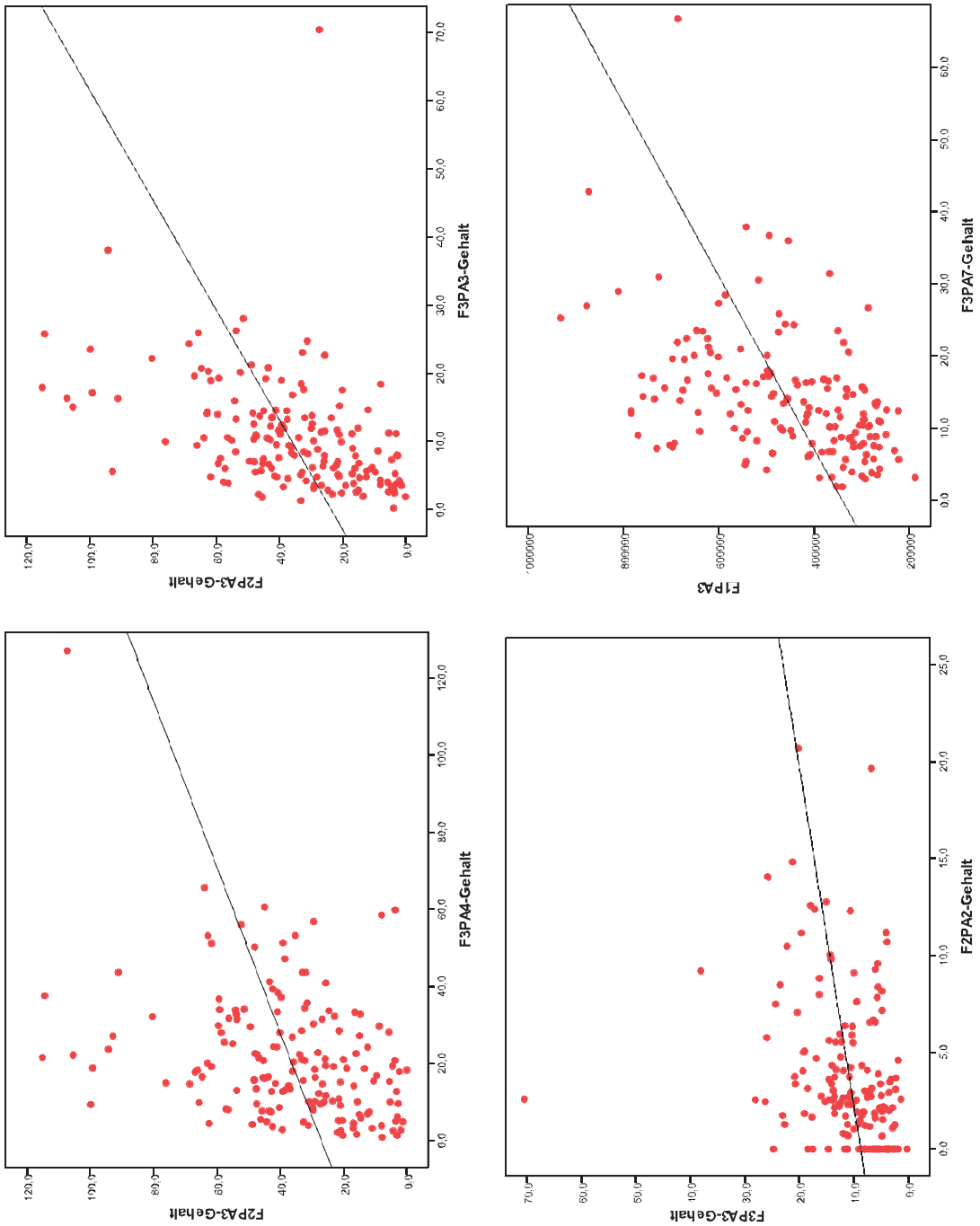

Abb. 26 - Korrelationen der phenolischen Verbindungen in der YE2-DH Population.

Weil die untersuchten Qualitätsparameter eine Beziehung zueinander aufwiesen und gegebenenfalls unter einer gegenseitigen Beeinflussung stehen, wurden zusätzlich die partiellen Korrelationen ermittelt. Die Partialkorrelation ist eine Korrelation zwischen zwei Variablen, bei der die Einflüsse dritter Variablen auf den beobachteten Korrelationszusammenhang ausgeschaltet sind, in dem diese bei der Berechnung konstant gehalten werden. Die Ergebnisse der partiellen Korrelationen für die verschiedenen Samenmerkmale in der YE2-DH Population sind in Tabelle 11 dargestellt.

Bei Nichtberücksichtigung der Samenfarbe wird ersichtlich, dass für den Zusammenhang zwischen Proanthocyanidin- und Flavonoidgehalt wieder eine positive Korrelation errechnet wurde ($r = 0,31$; $p = 0,001$). Bei konstant gehaltenem Proanthocyanidingehalt wurden keine Korrelationen zwischen Samenfarbe bzw. F2PA6 und Flavonoidgehalt berechnet ($r = -0,01$ bzw. $-0,02$). Positive partielle Korrelationen wurden dagegen zwischen Flavonoidgehalt und oligomeren Proanthocyanidinen F2PA2 ($r = 0,26$; $p = 0,001$) und F2PA3 ($r = 0,27$; $p = 0,001$) ermittelt.

Zwischen oligomeren Proanthocyanidinen (F2PA2, F2PA3, F2PA6) wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Nichtberücksichtigung der Variablen Samenfarbe, Proanthocyanidin- bzw. Flavonoidgehalt beobachtet. Es wurde dagegen eine starke Korrelation zwischen F2PA2 und F2PA3 ($r = 0,77$ $p = 0,001$) gefunden.

Die Ergebnisse der partiellen Korrelationsanalyse zwischen alle untersuchten polymeren Proanthocyanidinen (F3PA3, F3PA4, F3PA5, F3PA6, F3PA7) und den assoziierten Qualitätsmerkmalen sind in Tabelle 8 dargestellt. In allen drei getesteten Fällen (d.h. der Nichtberücksichtigung von Samenfarbe, Proanthocyanidingehalt bzw. Flavonoidgehalt) wurden positive Zusammenhänge zwischen F3PA3 und F3PA5 ($r = 0,40$; $p = 0,001$), F3PA3 und F3PA6 ($r = 0,26$; $p = 0,001$) sowie F3PA3 und F3PA7 ($r = 0,37$; $p = 0,001$) aufgedeckt. Negative Korrelationen wurden zwischen F3PA4 und F3PA5 ($r = -0,24$; $p = 0,01$) bzw. F3PA6 ($r = -0,26$; $p = 0,001$) ermittelt. F3PA5 war mit polymeren Proanthocyanidinen F3PA6 ($r = 0,85$; $p = 0,001$) und F3PA7 ($r = 0,44$; $p = 0,001$) positiv korreliert. Der polymere F3PA6 ist mit F3PA7 ebenfalls positiv korreliert ($r = 0,44$; $p = 0,001$). Außerdem waren bei den partiellen Korrelationen signifikante positive Korrelationen ($p = 0,05$) zwischen Flavonoid- und F3PA4-Gehalt ($r = 0,16$) bzw. F3PA7-Gehalt ($r = 0,17$) zu beobachten.

Tabelle 11 - Korrelationen zwischen den wertbestimmenden Merkmalen der Population YE2-DH

	Mermal		PAs Gehalt	Flavonoid Gehalt	Oligomere PAs			Polymere PAs				
					F2PA2	F2PA3	F2PA6	F3PA3	F3PA4	F3PA5	F3PA6	F3PA7
Samenfarbe	Proanthocyanidingehalt		1									
	Flavonoidgehalt		0,31***	1								
	Oligomere PAs	F2PA2	0,09	0,28***	1							
		F2PA3	0,11	0,29***	0,77***	1						
		F2PA6	-0,07	-0,03	0,11	0,10	1					
	Polymere PAs	F3PA3	0,03	0,07	0,28***	0,42***	0,08	1				
		F3PA4	0,06	0,10	0,22**	0,31***	0,01	0,04	1			
		F3PA5	0,07	-0,02	-0,01	0,01	0,01	0,40***	-0,24**	1		
		F3PA6	0,03	-0,09	-0,11	-0,08	-0,05	0,26***	-0,26***	0,85***	1	
		F3PA7	0,13	0,17*	0,16*	0,30***	-0,04	0,37***	0,01	0,44***	0,44***	1
	Mermal		**Flavonoid Gehalt**	**Samen-farbe**	**Oligomere PAs**			**Polymere PAs**				
					F2PA2	**F2PA3**	**F2PA6**	**F3PA3**	**F3PA4**	**F3PA5**	**F3PA6**	**F3PA7**
Proanthocyanidingehalt	Flavonoidgehalt		1									
	Samenfarbe		-0,02	1								
	Oligomere PAs	F2PA2	0,26***	0,01	1							
		F2PA3	0,27***	0,1	0,77***	1						
		F2PA6	-0,01	0,07	0,12	0,12	1					
	Polymere PAs	F3PA3	0,06	0,04	0,28***	0,42***	0,08	1				
		F3PA4	0,08	0,16*	0,22**	0,32***	0,02	0,04	1			
		F3PA5	-0,04	-0,04	-0,02	-0,01	0,01	0,40***	-0,25**	1		
		F3PA6	-0,10	-0,12	-0,11	-0,09	-0,05	0,26***	-0,28***	0,85***	1	
		F3PA7	0,13	0,10	0,15*	0,29***	-0,02	0,37***	0,01	0,43***	0,44***	1
	Merkmal		**PAs Gehalt**	**Samen-farbe**	**Oligomere PAs**			**Polymere PAs**				
					F2PA2	**F2PA3**	**F2PA6**	**F3PA3**	**F3PA4**	**F3PA5**	**F3PA6**	**F3PA7**
Flavonoidgehalt	Proanthocyanidingehalt		1									
	Samenfarbe		0,32***	1								
	Oligomere PAs	F2PA2	0,01	0,02	1							
		F2PA3	0,06	0,12	0,75***	1						
		F2PA6	-0,04	0,05	0,12	0,12	1					
	Polymere PAs	F3PA3	0,03	0,04	0,28***	0,42***	0,08	1				
		F3PA4	0,09	0,18*	0,21	0,31***	0,02	0,04	1			
		F3PA5	0,07	-0,02	-0,01	0,01	0,01	0,40***	-0,24**	1		
		F3PA6	0,02	-0,11	-0,09	-0,07	-0,05	0,27***	-0,27***	0,85***	1	
		F3PA7	0,12	0,14	0,12	0,28	-0,02	0,36	0,01	0,44	0,46	1

** signifikant auf dem 0,05 Niveau durch t-Test*
*** signifikant auf dem 0,01 Niveau durch t-Test*
**** signifikant auf dem 0,001 Niveau durch t-Test*

4.1.4 Häufigkeitsverteilungen für die untersuchten Merkmale

In der Population YE2-DH wurden deutliche Häufigkeitsverteilungen, die durch eine Mendelsche Segregation erklärt werden können, nur für die Samenfarbe und für oligomere Proanthocyanidine F2PA2 und F2PA3 beobachtet. Um eine eindeutige Abgrenzung der Klassen für den Vergleich zwischen den untersuchten Merkmalen objektiv vorzunehmen, wurde eine Datensegmentationsprozedur verwendet. Dabei wurde für die einzelnen Verteilungen in einem sogenannten „Moving Window"-Verfahren der jeweilige Trennpunkt zwischen den Phänotypklassen anhand des maximalen *t*-Wertes der segmentierten Daten identifiziert. In allen Fällen befand sich dieser Trennpunkt jeweils in der kleinsten Phänotypklasse zwischen den beiden Verteilungsgipfeln.

4.1.4.1 Samenfarbe

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der Samenfarbe (Abb. 27) kann man erkennen, dass keine klare Unterscheidung zwischen den Phänotypen „gelbsamig" und „braunsamig" möglich ist. Deswegen wurden die gelben und braunen Phänotypenklassen zu einer Gruppe zusammengefasst und von den schwarzsamigen Genotypen unterschieden, um die Segregationsverhältnisse zwischen diesen beiden Gruppen (nicht-schwarz bzw. schwarz) zu überprüfen.

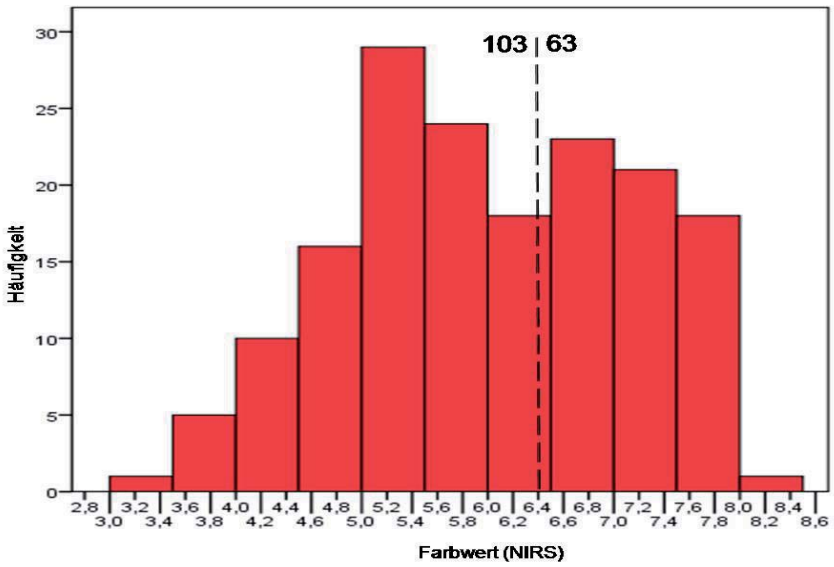

Abb. 27 - Histogramme für Samenfarbe der YE2-DH Population. Die vertikalen Linien stellen die Trennpunkte zwischen den jeweiligen Verteilungen dar (nicht-schwarz/schwarz); die diese Linien flankierenden Zahlen sind die beobachteten Häufigkeiten der jeweiligen Phänotypklassen.

Die Übereinstimmung der beobachteten Spaltungsverhältnisse der YE2-DH Population mit der in Tabelle 12 erwarteten Spaltung wurde mittels Chi-Quadrat-Test getestet. Wie in Tabelle 13 zu sehen, entsprechen die Spaltungsdaten der Kreuzung YE2 am besten einer trigenischen Vererbung (χ^2=0,01; p=0,90; n=166).

Tabelle 12 - Genetisches Modell zur Vererbung der Samenfarbe in Doppelhaploidnachkommen (DH) aus der Kreuzung YE2 mit Spaltungen an drei Loci

YE2: Trigenisches Spaltungsmodell (drei beobachtete QTL)		
Eltern	1012-98	Express 617
Samenfarbe	gelb	schwarz
Genotyp	SSbbcc	ssBBCC
F_1	SsBbCc: braun	

DH	SSBBCC	SSBBcc	SSbbCC	SSbbcc	ssBBCC	ssBBcc	ssbbCC	ssbbcc
Ratio	1	1	1	1	1	1	1	1
Samenfarbe	gelb/braun	gelb/braun	gelb/braun	gelb	schwarz	schwarz	schwarz	gelb/braun
Erwartet	**5 nicht schwarz : 3 schwarz**							

F_2	SSBBCC	SSBBcc	SSbbCC	SSbbcc	ssBBCC	ssBBcc	ssbbCC	ssbbcc
Ratio	27	9	9	3	9	3	3	1
Samenfarbe	gelb/braun	gelb/braun	gelb/braun	gelb	schwarz	schwarz	schwarz	gelb/braun
Erwartet	**55 nicht schwarz : 9 schwarz**							

Tabelle 13 - Chi-Quadrat-Test der erwarteten und beobachteten Spaltungsverhältnisse von schwarzen zu nicht-schwarzen Samen in der YE2-DH Population (p = Chi-Quadrat-Wahrscheinlichkeitswert)

YE2	**Samenfarbe**	**DH-Population (n = 166)**			
		Beobachtet	**Erwartet**	**χ^2**	**p**
Trigenisches Modell	nicht schwarz	103	103,75	***0,01***	***0,90***
	schwarz	63	62,25		

4.1.4.2 Oligomere Proanthocyanidin-Fraktionen (HPLC Methode)

In den Abbildungen 28 und 29 können die Häufigkeitsverteilungen der oligomeren Proanthocyanidine (F2PA2, F2PA3) betrachtet werden. Die Übereinstimmung der beobachteten Spaltungsverhältnisse mit den erwarteten Spaltungen für diese beiden Merkmale wurde mittels Chi-Quadrat-Test überprüft und ist in den Tabellen 15 und 17 zu sehen.

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung für F2PA2-Gehalte kann man erkennen, dass bei insgesamt 38 DH-Linien der YE2-Population diese Substanz gar nicht vorkommt. Das entspricht einem kompletten Knockout des Biosyntheseweges, der für die Herstellung dieser phenolischen Verbindung zuständig ist. Die Spaltung 127:38 passt am besten zu einem 3:1-Verhältnis (χ^2=0,34; p=0,56; n=165) und in der DH-Population wäre sie im Einklang mit einer biallelischen Vererbung (Knockout zweier Gene bzw. Genkopien), wenn für die

Ausprägung des Merkmals F2PA2 mindestens ein Genotyp homozygot dominant existiert (Tabelle 14). Demnach führt das gleichzeitige Ausschalten zweier Gene bzw. Genkopien zur Abwesenheit von F2PA2 im HPLC-Profil.

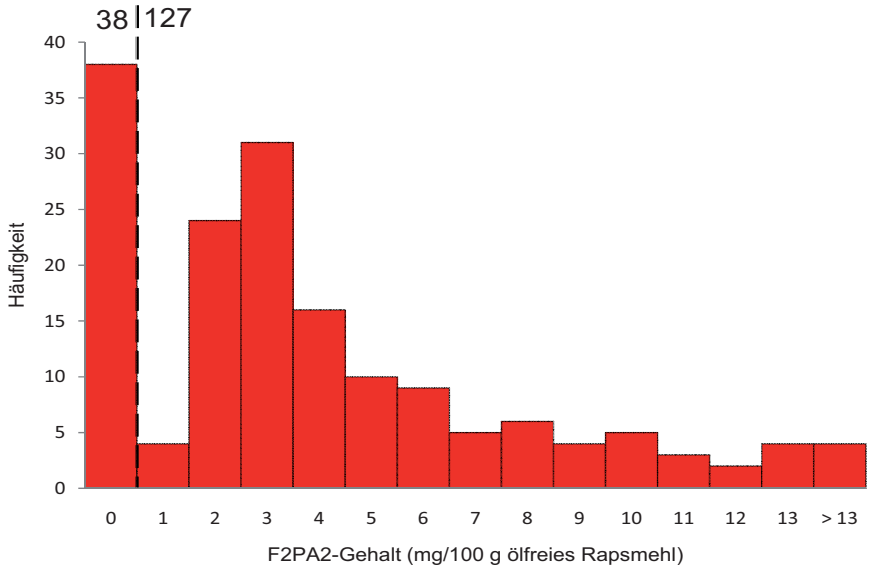

Abb. 28 - Histogramm für die Verteilung der F2PA2-Werte gewonnen via HPLC Methode bei der YE2-DH Population.

Tabelle 14 - Genetisches Modell zur Vererbung der F2PA2-Gehalte in der YE2-DH Population mit Spaltungen an zwei Loci

YE2: Bigenisches Spaltungsmodell (fünf beobachtete QTL)		
Eltern	Express 617	1012-98
Samenfarbe	schwarz	gelb
Genotyp	AABB	aabb
F_1 F2PA2-Gehalt	AaBb: reduziert	

DH	AABB	AAbb	aaBB	aabb
Ratio	1	1	1	1
F2PA2-Gehalt	präsent	präsent	präsent	fehlend
Erwartet	**3 F2PA2 $_{anwesend}$: 1 F2PA2 $_{abwesend}$**			

Tabelle 15 - Chi-Quadrat-Test der erwarteten und beobachteten Spaltungsverhältnisse für reduzierte gegenüber hohen F2PA2-Gehalten in der DH Population (p = Chi-Quadrat-Wahrscheinlichkeitswert)

YE2	**F2PA2-Gehalt**	**DH-Population (n = 165)**			
		Beobachtet	**Erwartet**	**χ^2**	**p**
Bigenisches Modell	F2PA2 $_{anwesend}$	127	123,75	***0,34***	***0,56***
	F2PA2 $_{abwesend}$	38	41,25		

Im Fall der oligomeren Proanthocyanidine F2PA3 zeigt das Verteilungshistogramm (Abb. 29) eine deutliche Trennung zwischen Samen mit höherem F2PA3-Gehalt (> 70 mg/100g entfettetes Mehl) und Samen mit reduziertem Gehalt (< 70 mg/100g entfettetes Mehl).

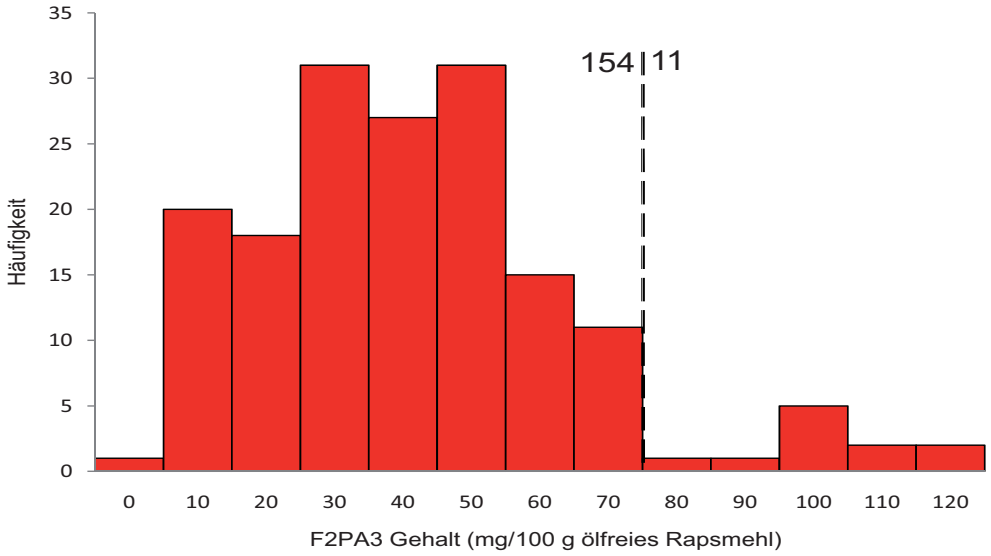

Abb. 29 - Histogramm für die Verteilung der F2PA3-Werte gewonnen via HPLC Methode bei YE2-DH Population.

In der YE2-DH Population stimmten die beobachteten Daten sehr gut mit einer 15:1 Spaltung F2PA3 $_{reduziert}$ vs. F2PA3 $_{hoch}$ überein (χ^2= 0,05; p=0,83; n=165; Tabelle 17). Dies wäre mit einer Vererbung durch vier additive, rezessive Gene zu erklären, wenn die Ausprägung von mindestens einem dieser Gene eine Verringerung des F2PA3-Gehaltes bewirken würde (Tabelle 16).

Tabelle 16 - Genetisches Modell zur Vererbung der F2PA3-Gehalte in der YE2-DH Population mit Spaltungen an vier Loci

YE2: Viergenisches Spaltungsmodell (vier beobachtete QTL)		
Eltern	Express 617	1012-98
F2PA3-Gehalt	hoch	reduziert
Genotyp	AABBCCDD	aabbccdd
F_1	AaBbCcDd: reduziert	

DH	AABBCCDD	aaBBCCDD/ AAbbCCDD/ AABBccDD/ AABBCCdd	aabbCCDD/ aaBBccDD/ aaBBCCdd/AAbbccDD AAbbCCdd/ AABBccdd	aabbccDD/aabbCCdd/ aaBBccdd/AAbbccdd	aabbccdd
Ratio	1	4	6	4	1
F2PA3-Gehalt	hoch	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert
Erwartet	**15 F2PA3 $_{reduziert}$: 1 F2PA3 $_{hoch}$**				

Tabelle 17 - Chi-Quadrat-Test der erwarteten und beobachteten Spaltungsverhältnisse für reduzierte gegenüber hohen F2PA3-Gehalten in der DH Population (p = Chi-Quadrat-Wahrscheinlichkeitswert)

YE2	F2PA3-Gehalt	DH-Population (n = 165)			
		Beobachtet	Erwartet	χ^2	P
Viergenisches Modell	F2PA3 $_{reduziert}$	154	154,6875	***0,05***	***0,83***
	F2PA3 $_{hoch}$	11	10,3125		

4.2 Genetische Kartierung der DH-Population YE2

Für die Erstellung einer Genomkarte der Population YE2-DH wurden zunächst 20 AFLP-Primerkombinationen in insgesamt 166 DH-Linien verwendet. Darüber hinaus wurden weiterhin 50 polymorphe Mikrosatelliten-Primerkombinationen der Firma KWS Saat AG (Einbeck, Deutschland) genotypisiert, weitere 53 Mikrosatelliten-Primerkombinationen aus verschiedenen *Brassica*-Arten wurden im Laufe dieser Arbeit hinzugefügt. Insgesamt gingen 390 polymorphe Marker (287 AFLP und 103 SSR-Marker) in die Kartierung mit Hilfe des Programms JoinMap 3.0 ein.

Die resultierende genetische Karte (Abb. 30) deckt 1171 cM des *B. napus*-Genoms ab und besteht aus 19 Kopplungsgruppen mit 141 AFLP- und 50 SSR-Markern. Die Kopplungsgruppen konnten den *B. napus*-Chromosomen über SSR-Ankermarker und fünf AFLP-Marker zugeordnet werden. Die durchschnittliche Größe der Chromosomen liegt bei 61,6 cM, was einem durchschnittlichen Markerabstand von 6,1 cM entspricht. Die größte Kopplungsgruppe N17 besteht aus 3 AFLP- und 6 SSR-Markern auf einer Gesamtlänge von 112 cM. Die kleinste Kopplungsgruppe N7 besteht aus 4 AFLP- und 2 SSR-Markern und hat eine Länge von 22 cM. Die größte Rekombinationsfrequenz von 32 cM tritt im Markerintervall E32M50_385/Ra2D04 auf Chromosom N6 auf. SSR-Marker sind in allen Chromosomen anwesend, insgesamt konnten pro Chromosom bis zu 8 SSR-Loci kartiert werden.

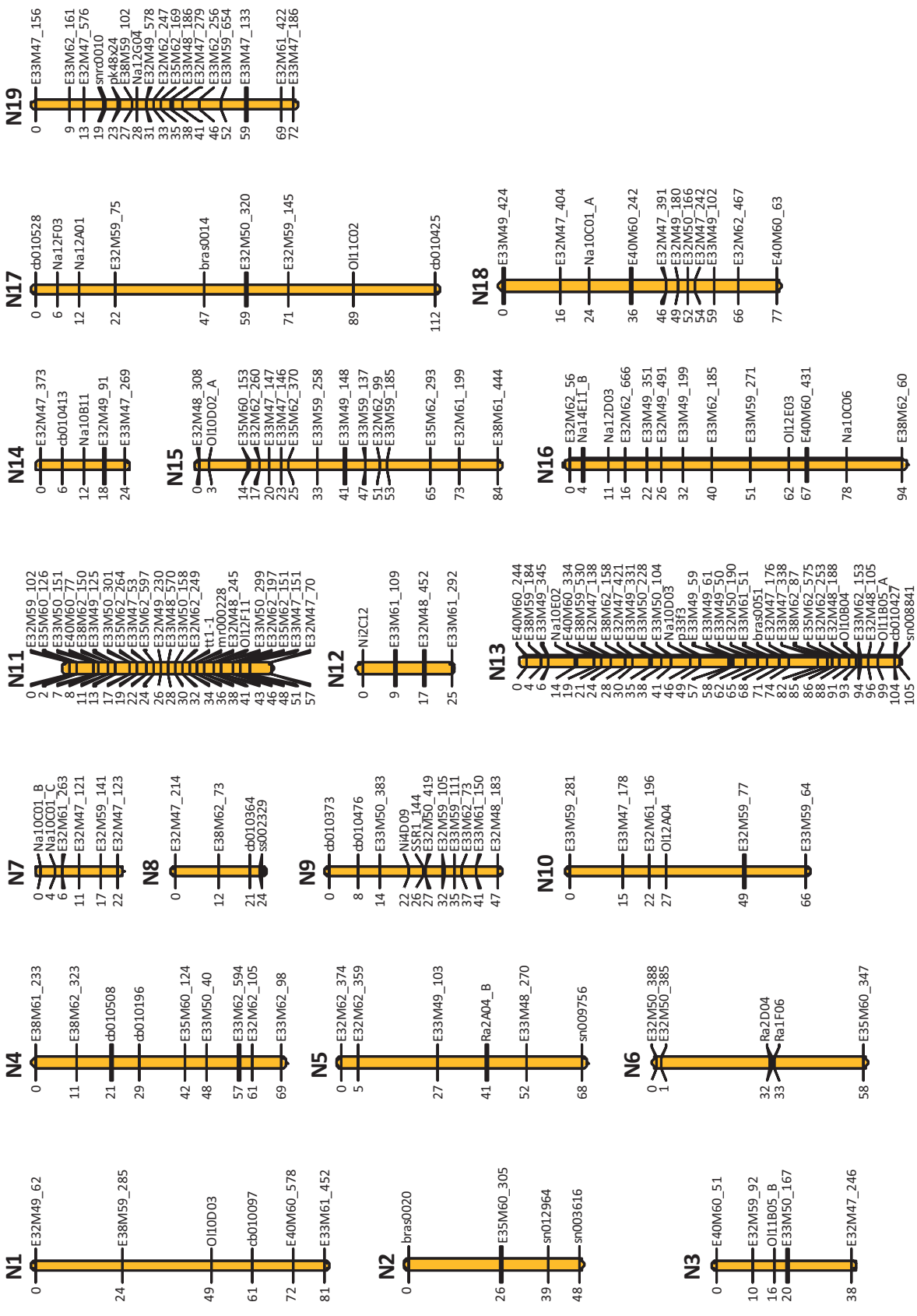

Abb. 30 - AFLP/SSR-Kopplungskarte der YE2-DH Population.

4.3 Kartierung von *Quantitative Trait Loci* (QTL)

Zur Identifizierung von Genomsegmenten, die an der Ausprägung quantitativer Eigenschaften beteiligt sind, wurden QTL-Analysen durchgeführt. Zur Berechnung der QTL wurde jeweils der Mittelwert der Wiederholungen bzw. Umwelten für jede DH-Linie der Kartierungspopulation verwendet. Die Lokalisierung signifikanter QTL wurde mit Hilfe des Programms PLABQTL Version 1.2 (UTZ und MELCHINGER 2005) und einem LOD-Grenzwert von mindestens 3,0 ausgeführt.

4.3.1 Chromosomale QTL-Verteilung in der YE2-Population

Auf Kopplungsgruppe N2 (Abb. 31) treten zwei distinkte QTL-Bereiche durch statistisch signifikante LOD-Werte hervor. In einem Bereich überlagern sich die Haupt-QTL für F1PA2-Gehalt (vermutlich Sinapoylglucose) mit einem QTL für Flavonoidgehalt und erklären 40 bzw. 18,2% der phänotypischen Varianz für diese Merkmale. Der QTL auf N2 hat eine sehr große Wirkung auf antinutritive Phenolsäuren, ohne aber einen Einfluss auf die Samenfarbe zu zeigen, weil die Phenolsäuren überwiegend in den Keimblättern lokalisiert sind. Für das Merkmal F1PA2 konnten bei einem LOD-Grenzwert von 3,0 insgesamt drei QTL auf den Kopplungsgruppen N2, N9 und N11 lokalisiert werden, die mit den QTL für Flavonoidgehalt kolokalisieren und stark korreliert sind. In dem anderen Bereich des Chromosoms N2 befindet sich der QTL für den polymeren PAs F3PA3. Er erstreckt sich über 16 cM, erklärt 3,2% der phänotypischen Varianz und ist im 16 bzw. 18 cM Abstand vom QTL für F1PA2 und Flavonoidgehalt.

Auf Kopplungsgruppe N9 wurde eine 10 cM-Region mit starker Wirkung auf 6 verschiedene Samenmerkmale detektiert. Hier kolokalisieren die QTL für Samenfarbe, Flavonoidgehalt, phenolische Säuren (F1PA2, F1PA3), oligomere Proanthocyanidine F2PA2 und Ölgehalt. Zwischen allen QTL befindet sich einer mit der stärksten Wirkung auf die Samenfarbe, aber (unerwartet) eben nicht die stärkste Wirkung auf Flavonoidgehalt oder polymere PAs. Der QTL erklärt 40,9% der beobachteten partiellen phänotypischen Varianz (part. R^2) und spielt eine wichtige Rolle in der Phänotypausprägung. An der gleichen Stelle mit dem QTL für Samenfarbe auf Kopplungsgruppe N9 liegen Haupt-QTL für ADF- (*acid detergent fibre*), NDF- (*neutral detergent fibre*) und ADL-Gehalt (*acid detergent lignin*) (BEKELE, 2008).

Der SSR-Marker *tt*1_1 liegt in der Mitte der Kopplungsgruppe N11 der Population 'Express 617' x '1012-98' und ist potentiell eng mit dem *tt*1-Gen in *B. napus* gekoppelt

(STEIN, 2007). Die QTL für F1PA1 (vermutlich Sinapin), F1PA2 (vermutlich Sinapoylglucose), Flavonoid- und Proanthocyanidingehalt kolokalisieren und befinden sich auf Kopplungsgruppe N11 in unmittelbarer Nähe des Markers *tt*1_1. Im gleichen Intervall wurde ein QTL für das polymere Proanthocyanidin F3PA4 detektiert; dieser Lokus liegt im 2 cM Abstand von zwei kolokalisierenden QTL für Samenfarbe und F2PA3. Die gefundenen Loci für oligomere Proanthocyanidine (OPC) F2PA2 und F2PA3 liegen im Abstand von 16,0 cM auf dieser Kopplungsgruppe und können jeweils 10,2 bzw. 15,6% der beobachteten Variation erklären.

Der Haupt-QTL für die phenolische Säure F1PA3 liegt im ca. 50 cM Abstand von den gefundenen Loci für die oligomeren Proanthocyanidine F2PA2 und F2PA3, die sich an der gleichen Stelle auf den Kopplungsgruppen N13 bzw. N15 befinden.

In Abbildung 31 ist die Kopplungsgruppe N15 der *B. napus* DH-Population gezeigt. Auf dieser Kopplungsgruppe befinden sich praktisch entlang des gesamten Chromosoms verteilte QTL, die Qualitätsmerkmale der Rapssamen beeinflussen. Die kartierten QTL für Samenfarbe, der oligomeren PAs F2PA2 und phenolischen Säure F1PA1 (vermutlich Sinapin) kolokalisieren im oberen Teil des Chromosoms. Der zweite QTL für F2PA2 auf dieser Kopplungsgruppe liegt an der gleichen Stelle mit dem Lokus für F2PA3. In der mittleren Region des Chromosoms N15 wurde der Haupt-QTL für Ölgehalt lokalisiert.

Im gleichen Intervall auf Kopplungsgruppe N16 wurden zwei QTL für die oligomeren PAs F2PA3 und F2PA6 detektiert; diese Loci kolokalisieren mit einem Minor-QTL für F1PA3-Gehalt auf dieser Kopplungsgruppe.

Auf Chromosom N19 wurden QTL für Proanthocyanidingehalt, polymere PAs F3PA6 und die phenolische Säure F1PA3 lokalisiert. Der QTL für F3PA6 befindet sich in 2 bzw. 36 cM Abstand vom QTL für F1PA3 bzw. Proanthocyanidingehalt.

4.3.2 Lokalisierung von QTL für die Samenfarbe

Für das Merkmal Samenfarbe konnten auf den Kopplungsgruppen N9, N11 und N15 drei QTL lokalisiert werden (Abb. 31, Tabelle 18), die insgesamt 66,8% der phänotypischen Varianz (R^2) erklären. Die positiven Allele aller drei QTL stammen aus dem gelbsamigen Elter '1012-98'. Auf Kopplungsgruppe N9 befindet sich ein hoch signifikanter QTL mit einem maximalen LOD-Wert von 6,4 bei einem Additiveffekt von 0,45%. Der QTL erklärt 40,9% der beobachteten partiellen phänotypischen Varianz (part. R^2) und spielt eine wichtige Rolle in der Phänotypausprägung.

Der QTL auf Kopplungsgruppe N11 (LOD=7,6) hatte eine geringere Wirkung auf die Phänotypausprägung (R^2=19,0%; part. R^2=19,8%) bei einem Additiveffekt von 0,29%, während der QTL auf Kopplungsgruppe N15 (LOD=3,9) nur 12,2% der beobachteten partiellen phänotypischen Varianz bei einem Additiveffekt von 0,23% erklärte.

4.3.3 Lokalisierung von QTL für den Ölgehalt

In der DH-Population YE2 wurden drei QTL für Ölgehalt auf den Kopplungsgruppen N9, N11 und N15 lokalisiert, welche 11,3 bzw. 9,7 und 11,5% der phänotypischen Varianz und 2,0 bzw. 8,8 und 11,3% der partiellen phänotypischen Varianz in allen Loci erklären. Die gesamte phänotypische Varianz entspricht demnach 18,4%. Die LOD-Werten für alle drei QTL lauten: 4,3(N9), 3,7 (N11) und 4,4 (N15) (Abb. 21, Tabelle 23). Zwei QTL für Ölgehalt konnten in unmittelbarer Nähe der wichtigsten QTL für Samenfarbe lokalisiert werden (Chromosom N9 bzw. N11).

4.3.4 QTL für den Proanthocyanidingehalt (Vanillin-Methode)

Auf den Kopplungsgruppen N11 und N19 konnten zwei QTL für den erhaltenen Proanthocyanidingehalt via Vanillin-Methode lokalisiert werden (Abb. 31, Tabelle 18). Diese beiden QTL besitzen mit 9,9 bzw. 6,7% einen geringeren Effekt auf die Phänotypausprägung. Die zwei QTL erklären insgesamt 14,8% der phänotypischen Varianz, die statistische Signifikanz (LOD) beträgt 4,5 bzw. 4,3 und bei den beiden Loci handelt es sich um Gene mit einem additiven Effekt (14,77 bzw. 13,96%).

4.3.5 QTL für den Flavonoidgehalt (HPLC-Methode)

Für den Flavonoidgehalt wurden in der YE2-DH Population drei QTL auf den Kopplungsgruppen N2, N9 und N11 detektiert, die zusammen 27,0% der phänotypischen Varianz erklären. Die QTL auf den Kopplungsgruppen N2, N9 und N11 haben LOD-Werten von 6,9 bzw. 3,8 und 8,4, erklären allerdings lediglich 18,2 bzw. 10,3 und 20,9% der phänotypischen Varianz für das obengenannten Merkmal. Der Lokus mit der höchsten partiellen phänotypischen Varianz von 18,8% liegt auf der Kopplungsgruppe N11 und befindet sich im gleichen Intervall mit dem Haupt-QTL für den Proanthocyanidingehalt.

4.3.6 Lokalisierung von QTL für phenolische Säuren

Für drei unterschiedliche Phenolsäureverbindungen (F1PA1, F1PA2, F1PA3) konnten insgesamt neun quantitative Merkmalsloci auf sieben Kopplungsgruppen kartiert werden.

Für das Merkmal F1PA1 (vermutlich Sinapin) konnten zwei Haupt-QTL ($R^2 \geq 10\%$) auf den Kopplungsgruppen N11 und N15 lokalisiert werden. Diese zwei QTL besitzen mit 13,6 bzw. 12,8% einen deutlich vergleichbaren Effekt auf die Phänotypausprägung. Die zwei QTL erklären insgesamt 21,1% der phänotypischen Varianz und die LOD-Kurven erreichen zwei Maxima von 5,3 bzw. 4,9.

Für das Merkmal F1PA2 (vermutlich Sinapoylglucose) konnten bei einem LOD-Grenzwert von 3,0 insgesamt drei QTL auf den Kopplungsgruppen N2, N9 und N11 lokalisiert werden. Sie kolokalisieren mit den QTL für Flavonoidgehalt. Die gesamte phänotypische Varianz entspricht 39,7%. Die einzelnen QTL erklären 11,1 (N9), 16,8 (N11) bzw. 40,0% (N2) der beobachteten phänotypischen Varianz (R^2) und 5,6 (N9), 14,9 (N11) bzw. 32,2% (N2) der partiellen phänotypischen Varianz (part. R^2). Die LOD-Werte weichen zwischen 4,2 auf Kopplungsgruppe N9 und 18,4 auf Kopplungsgruppe N2 ab.

Die einzelnen QTL für das Merkmal F1PA3 beschreiben zwischen 8,8 und 16,0% der beobachteten phänotypischen Varianz in der Kartierungspopulation. Insgesamt konnte 34,2% der phänotypischen Varianz durch diese vier QTL erklärt werden. Der Lokus mit der höchsten partiellen phänotypischen Varianz (part. R^2=6,4%) und dem LOD-Wert 6,3 liegt auf Kopplungsgruppe N13. Auf Kopplungsgruppe N9 befindet sich der zweite QTL (LOD=4,9; part. R^2=12,1%), der dritte auf Kopplungsgruppe N19 (LOD=4,4; part. R^2=8.6%) und der vierte QTL auf Kopplungsgruppe N16 (LOD=3,3; part. R^2=8,6%).

4.3.7 QTL für oligomere Proanthocyanidine (OPC)

In der DH-Population YE2 konnten für drei oligomerische Proanthocyanidine (F2PA2, F2PA3, F2PA6) zehn QTL auf fünf Kopplungsgruppen lokalisiert werden.

Für das oligomere Proanthocyanidin F2PA2 wurden in der YE2-DH Population fünf QTL ermittelt, die zwischen 8,2 und 26,2% der phänotypischen Varianz erklären. Auf Kopplungsgruppe N9 wurde ein QTL gefunden (LOD=10,9), welches 26,2% der phänotypischen Varianz bzw. 7,1% der partiellen phänotypischen Varianz für F2PA2 erläutert. Zwei benachbarte QTL (LOD=8,5 bzw. 6,6) wurden auf Kopplungsgruppe N15 im Abstand von 22,0 cM gefunden. Diese QTL erklären 21,1 bzw. 16,7% der phänotypischen Varianz für den Gehalt an F2PA2, wobei die partielle phänotypische Varianz 19,9 bzw. 9,9% beträgt. Auf Kopplungsgruppe N11 befindet sich der vierte Lokus (LOD=3,1; R^2=8,2%; part. R^2=10,2%) und auf N13 der fünfte Lokus (LOD=7,7; R^2=19,3%; part. R^2=18,0%) für dieses Merkmal. Die gesamte phänotypische Varianz entspricht demnach 38,9%.

Für das oligomere Proanthocyanidin F2PA3 wurden vier QTL auf den Kopplungsgruppen N11, N13, N15 und N16 mit LOD-Werten zwischen 3,4 und 7,0 lokalisiert. Den größten Anteil an der genotypischen Varianz besitzt der QTL auf Kopplungsgruppe N11, welcher alleine 17,7% der Phänotypausprägung erklärt. Die drei anderen QTL erklären jeweils etwa 10% der phänotypischen Varianz. Insgesamt erklären alle vier QTL 36,9% der phänotypischen Varianz.

Für das oligomere Proanthocyanidin F2PA6 wurde ein QTL auf Kopplungsgruppe N16 nahe dem SSR-Lokus Ol12E03 detektiert. Dieser QTL erklärt 9,4% der phänotypischen Varianz. Jeweils ein QTL für F1PA3- und F2PA3-Gehalt liegen dabei, assoziiert im gleichen Intervall mit diesem QTL.

4.3.8 QTL für polymere Proanthocyanidine (PPC)

In der YE2-DH Population wurden fünf polymere Proanthocyanidine quantifiziert, aber für nur drei davon (F3PA3, F3PA4, F3PA6) konnten vier QTL auf vier unterschiedlichen Kopplungsgruppen lokalisiert werden.

Für das polymere Proanthocyanidin F3PA3 wurde ein QTL auf Kopplungsgruppe N2 kartiert. Der QTL erklärt 9,7% der beobachteten phänotypischen Varianz und 6,2% der partiellen phänotypischen Varianz bei einem LOD-Wert von 3,6.

Den größten Anteil an der genotypischen Varianz der polymeren Proanthocyanidine F3PA4 besitzt das QTL (LOD-Wert = 6,4) nahe dem SSR-Lokus Ol12F11, welcher alleine 16,3% der phänotypischen Varianz und 8,5% der partiellen phänotypischen Varianz bei einem Additiveffekt von 0,06% erklärt. Dieser QTL wurde auf Kopplungsgruppe N11 kartiert. Der zweite QTL (LOD=4,1) wurde auf Kopplungsgruppe N19 nachgewiesen und zeichnet sich durch eine etwas geringere Wirkung für die Phänotypausprägung (R^2=10,8%; part. R^2=4,1%) aus. Beide QTL erklären insgesamt 12,3% der phänotypischen Varianz.

Für das polymere Proanthocyanidin F3PA6 wurde ein QTL auf Kopplungsgruppe N1 detektiert. Der QTL zeichnet sich durch einen kleinen LOD-Wert für das Merkmal aus (LOD=3,8) und erklärt mit 2,6% den geringsten Anteil der beobachteten partiellen phänotypischen Varianz von allen polymeren Proanthocyanidinen.

Die Ergebnisse der QTL-Analyse sind in Abbildung 31 sowie in Tabelle 18 zusammenfassend dargestellt.

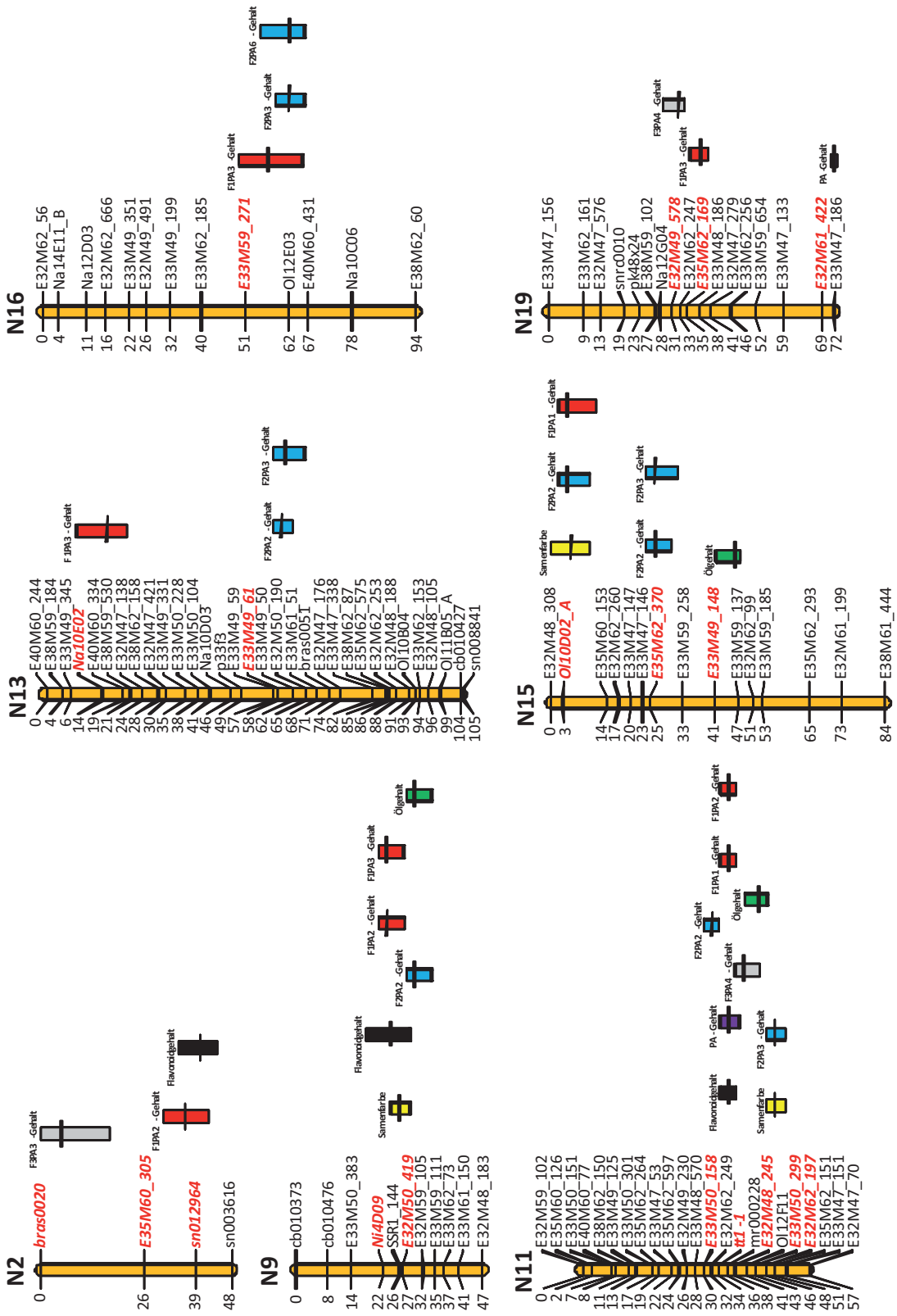

Abb. 31 – Ergebnisse der QTL-Analyse für die YE2-DH Population.

Tabelle 23 –Ergebnisse der QTL-Analyse für die YE2-DH Population.

Merkmal		Marker-Intervall	Chr./ Position (cM)	LOD Wert	R^2 (%)	Partial R^2 (%)
Samenfarbe		Ni4D09 / SSR1_144	N9 / 26	6,38***	16,2	40,9
		E32M62_197 / E35M62_151	N11 / 48	7,61***	19,0	19,8
		Ol10D02_A / E35M60_153	N15 / 4	3,89*	10,2	12,2
Ölgehalt		E32M50_419 / E32M59_105	N9 / 32	4,31**	11,3	2,0
		E33M50_299 / E32M62_197	N11 / 44	3,68**	9,7	8,8
		E33M49_148 / E33M59_137	N15 / 46	4,42**	11,5	11,3
Proanthocyanidingehalt (Vanillin-Methode)		tt1-1 / mr000228	N11 / 36	4,51**	11,8	9,9
		E32M61_422 / E33M47_186	N19 / 72	4,32**	11,3	6,7
Flavonoidgehalt (HPLC-Methode)		sn012964 / sn003616	N2 / 40	6,88***	18,2	8,4
		Ni4D09 / SSR1_144	N9 / 24	3,80*	10,0	7,1
		tt1-1 / mr000228	N11 / 36	8,44***	20,9	18,8
Phenolische Säure	**F1PA1** (vermutlich Sinapin)	tt1-1 / mr000228	N11 / 36	5,25**	13,6	12,5
		Ol10D02_A / E35M60_153	N15 / 6	4,94**	12,8	11,6
	F1PA2 (vermutlich Sinapoylglucose)	E35M60_305 / sn012964	N2 / 36	18,39***	40,0	32,2
		Ni4D09 / SSR1_144	N9 / 24	4,24**	11,2	5,6
		tt1-1 / mr000228	N11 / 36	6,65***	16,8	14,9
	F1PA3	Ni4D09 / SSR1_144	N9 / 24	4,91**	12,7	12,1
		Na10E02 / E40M60_334	N13 / 16	6,25***	15,9	16,4
		E33M59_271 / Ol12E03	N16 / 56	3,32	8,8	8,6
		E35M62_169 / E33M48_186	N19 / 38	4,38**	11,4	8,6
Oligomere PAs	**F2PA2**	E32M50_419 / E32M59_105	N9 / 30	10,88***	26,2	7,1
		E33M50_158 / E32M62_249	N11 / 32	3,06	8,2	10,2
		E33M49_61 / E33M49_50	N13 / 60	7,67***	19,3	18,0
		Ol10D02_A / E35M60_153	N15 / 4	6,56**	16,7	9,9
		E35M62_370 / E33M59_258	N15 / 26	8,50***	21,1	19,1
	F2PA3	E32M62_197 / E35M62_151	N11 / 48	6,98***	17,7	15,6
		E33M49_61 / E33M49_50	N13 / 62	5,21***	13,5	7,7
		E35M62_370 / E33M59_258	N15 / 26	3,36	9,0	6,4
		E33M59_271 / Ol12E03	N16 / 62	5,62***	14,5	9,9
	F2PA6	E33M59_271 / Ol12E03	N16 / 58	3,70**	9,8	7,2
Polymere PAs	**F3PA3**	bras0020 / E35M60_305	N2 / 6	3,58*	9,7	6,2
	F3PA4	E32M48_245 / Ol12F11	N11 / 40	6,36***	16,3	8,5
		E32M49_578 / E32M62_247	N19 / 32	4,09*	10,8	4,1
	F3PA6	cb010097 / E40M60_578	N1 / 62	3,77*	10,0	2,6

** signifikant auf dem 0,05 Niveau durch Permutations-Analyse*
*** signifikant auf dem 0,01 Niveau, *** signifikant auf dem 0,001 Niveau*
***R^2 (%)**=phänotypische Variation, **Partial R^2 (%)**= partielle phänotypische Varianz, **Chr**= Chromosom*

5. DISKUSSION

Die Verwendung des Rapskuchens bzw. Rapsextraktionsschrotes als eine hochwertige Proteinquelle für die Tier- und Humanernährung stellt eine Alternative für das Sojaschrot dar. Der Einsatz von Rapsextraktionsschrot als vollwertiges Futtermittel ist aber aufgrund antinutritiver bzw. unerwünschter Inhaltsstoffe (Glucosinolate, Sinapine, Tannine und Faserkomponenten), welche die Verdaulichkeit und die Eiweißverfügbarkeit beeinträchtigen und darüber hinaus für einen bitteren Geschmack verantwortlich sind, vor allem beim Einsatz in der Fütterung monogastrischer Nutztiere (Huhn, Schwein) noch limitiert.

Die Züchtung und Selektion gelbsamiger Rapsgenotypen stellt eine Möglichkeit dar, um bei gleichzeitiger Erhöhung des Öl- und/oder Proteingehaltes den Faser- und Tanningehalt zu reduzieren und eine bessere Verdaulichkeit und Eiweißverfügbarkeit sowie eine höhere Akzeptanz des Rapsschrotes als Tierfutter zu erzielen. In den letzten 20 Jahren sind die durchgeführten Forschungsarbeiten für eine rein gelbsamige Rapsform mit gutem Ertrag wegen des starken Umwelteffektes auf die Samenfarbe nicht erfolgreich gewesen (RAHMAN *et al.* 2001). Genetische Untersuchungen auf gelbsamigen Raps mit unterschiedlicher Herkunft haben gezeigt, dass mindestens drei Loci mit einem partiell dominanten Effekt die Variation in der Samenfarbe bedingen (SOMERS *et al.* 2001, LIU *et al.* 2005, BADANI *et al.* 2006). Allerdings sind die Gene für diese Loci bisher noch unbekannt und deren Wirkung bzgl. fütterungsrelevanter Sameninhaltsstoffe ist auch weitgehend ungeklärt. Verbesserte Kenntnisse über antinutritive phenolische Substanzen (Flavonoide, kondensierte Tannine) die in Zusammenhang mit der Samenfarbe stehen, könnten wesentlich zur Aufklärung der Genetik der Samenfarbe beisteuern. Darüber hinaus wären molekulare Marker, die mit wichtigen Inhaltsstoffen in Zusammenhang stehen, ein interessantes Werkzeug für die Züchtung von Raps mit verbesserter Schrotqualität. Grundlage für die Entwicklung solcher Marker ist die Etablierung von nasschemischen Messmethoden sowie die genetische Kartierung von QTL für relevante Inhaltsstoffe.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden 166 Linien einer DH-Population aus der Kreuzung 'Express 617' (schwarzsamig) x '1012-98' (gelbsamig) zunächst auf Gesamtflavonoidgehalt der Samen anhand der Vanillin-Methode untersucht. Dabei war erwartungsgemäß eine breite Variation im Flavonoidgehalt zu beobachten. In gelben DH-Linien konnten erwartungsgemäß teilweise sehr geringe Gehalte festgestellt werden.

Zusätzlich zur spektrophotometrischen Messung wurde auch die HPLC-Methodik für die Analyse und Quantifizierung einzelner Flavonoidkomponenten etabliert und zunächst für Messungen in den 166 DH-Linien verwendet. Zwischen gelb- und schwarzsamigen Eltern der DH-Population konnten teilweise starke Unterschiede in der Flavonoidzusammensetzung ermittelt werden.

In der vorliegenden Untersuchung war die Samenfarbe schwach, aber signifikant korreliert mit Proanthocyanidingehalt und nicht korreliert mit Flavonoidgehalt. Die Proanthocyanidine sind eine Untergruppe von Flavonoiden, die im Endothelium einlagern und die Samenfarbe beeinflussen können. Andere Flavonoide wie Chalkone, Flavanone, Flavanonole, Flavonole, Leucoanthocyanidine, Flavan-3-ole, Epi-Flavan-3-ole und Anthocyanidine befinden sich in unterschiedlichen Quantitäten in Rapssamen und können einen negativen Einfluss auf die Korrelation mit der Samenfarbe ausüben. Die geringe Korrelation zwischen Samenfarbe und Proanthocyanidingehalt (Vanillin Methode) kann zu der Schlussfolgerung führen, dass die Gelbsamigkeit allein nicht als Selektionsmarker für eine Reduktion der Proanthocyanidin- oder Gesamtflavonoidgehalte verwendet werden kann. Die schwache Korrelation zwischen diesen Merkmalen kann u.U. durch die schwierige Extraktion der Proanthocyanidine wegen ihres hohen Polymerisierungsgrades, und/oder durch einen hohen Gehalt an farblosen, nicht-oxidierenden Proanthocyanidinen erklärt werden (LEPINIEC *et al.* 2006, AKHOV *et al.* 2009). Mit den HPLC-Messwerten der YE2-DH Population konnten ebenfalls relevante QTL für die verschiedenen Flavonoidkomponenten bzw. für die Gesamtflavonoide aufgedeckt werden. Dabei konnten neben Loci, die mit signifikanten QTL für Samenfarbe in dieser Kreuzung kolokaliseren, auch verschiedene QTL lokalisiert werden, die vermutlich in Verbindung mit farblosen Flavonoiden stehen und daher unabhängig von der Samenfarbe einen ernährungsphysiologisch relevanten Einfluss auf die Flavonoidzusammensetzung ausüben.

Phenolische Säuren stellen die vorherrschenden phenolischen Verbindungen in der Rapssaat dar, wobei das Sinapin etwa 85% alle vorkommenden Sinapinsäureester in Raps ausmacht (QIAO *et al.* 2003). Die HPLC-Untersuchung eines metanolischen Rohextrakts ließ zwei Hauptpeaks erkennen. In Bezug auf Untersuchungen von QIAO *et al.* (2003) wird vermutet, dass diese Peaks Sinapin (Peak F1PA1) bzw. Sinapoylglucose (Peak F1PA2) entsprechen, die beiden im Rapsmehl am häufigsten vorkommenden Phenolsäuren. Die QTL-Analyse zeigte, dass der Haupt-QTL für F1PA1-Gehalt sich an der gleichen Stelle auf Chromosom N11 mit einem Lokus für F1PA2-Gehalt befindet. Mit anderen Worten liegt an dieser Stelle im Genom vermutlich eine Genmutation vor, die zu einer gleichzeitigen

Verringerung beider Phenolsäuren im gelbsamigen Elter führt. Am gleichen Lokus befinden sich Haupt-QTL für Gesamtflavonoid- und Proanthocyanidingehalt sowie benachbarte QTL für Samenfarbe und oligomere (F2PA3) bzw. polymere Proanthocyanidine (F3PA4). Da hier ebenfalls eine Kopie des potentiellen Kandidatengenes *tt*1 aufgrund eines benachbarten SSR-Markers vermutet wird (*Bntt*1), wäre eine Mutation in einer *tt*1-Genkopie eine mögliche Erklärung für diese QTL. *tt*1 ist ein WIP-Zinkfinger Transkriptionsfaktor mit direkter Wirkung auf die Ausbildung der Endotheliumzellen. Mutationen bei diesem Gen in *Arabidopsis* werden durch eine dünne, transparente Samenschale ausgeprägt.

Ein Minor-QTL für F1PA1-Gehalt (vermutlich Sinapin) befindet sich auf Kopplungsgruppe N15 im gleichen Intervall (2-8 cM) mit dem QTL für Samenfarbe und F2PA2 (vermutlich Sinapoylglucose). Auf Chromosom N9 kolokalisierten zwei Loci für F1PA2 und F1PA3 mit dem Haupt-QTL für Samenfarbe (part. R^2 = 40,9%), gemeinsam mit weiteren QTL für ADF-, NDF- sowie ADL-Gehalt sowie mit einem QTL mit geringem Effekt auf Flavonoidgehalt (BEKELE 2008, LIPSA *et al.* 2009). Im Hinblick auf die Züchtung zur Verbesserung der Rapsmehlqualität ist dieses Ergebnis signifikant, denn hiermit wird eine Assoziation zwischen der Samenschalendicke, den Gehalten an phenolischen Säuren (F1PA1, F1PA2, F1PA3) und anderen antinutritiven Substanzen belegt. Durch eine markergestützte Selektion mit Bezug auf diesen Lokus könnte unabhängig von der Samenfarbe eine wesentliche Reduzierung von Phenolsäuren und Faserkomponenten im Rapsschrot erreicht werden.

Die QTL auf den Kopplungsgruppen N11 und N15 für phenolische Säuren (F1PA1, F1PA2), Samenfarbe und andere antinutritive Merkmale stimmen in der YE2-DH Population mit den Positionen von zwei Kopien des Gens *BnSGT*1-(Sinapoylglucose Transferase) überein. *SGT*1 ist ein Haupt-Gen bei der Sinapatester-Biosynthese und wird im Verlauf der Samenbildung exprimiert. Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine mögliche Interaktion zwischen *Bntt*1 und *BnSGT*1 bei der Regulierung der Phenylpropanoid-Biosynthese in der Samenschale hin.

Die HPLC-Untersuchungen der mono- und oligomerischen Proanthocyanidine ließen erkennen, dass die Rapsmehlextrakte keine monomerischen Proanthocyanidine (Katechin, Gallokatechin, Epikatechin, Epigallokatechin usw.) in nachweisbaren Mengen beinhalten. Die Abwesenheit der monomeren PAs kann durch die schnelle Umwandlung dieser Substrate in den Phenylpropanoidstoffwechsel erklärt werden (AKHOV *et al.* 2009). Der gelbe Elter '1012-98' hat eine kleinere Quantität an oligomeren PAs im Vergleich zum schwarzen Elter 'Express 617'. Ein erheblicher Unterschied zwischen den Eltern ist am besten am F2PA3-Peak

zu beobachten. Die farblosen Flavanole (Quercetin, Kaempherol, Myricetin) haben im *B. napus*-Phenylpropanoidstoffwechsel gemeinsame Vorprodukte mit den Proanthocyanidinen, aber die Proanthocyanidin-Biosynthese ist in der Samenschale der gelbsamigen Genotypen im Vergleich zu den schwarzsamigen deutlich verringert. Ein Grund dafür könnte eine verringerte Expression des Enzyms Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) in der gelbsamigen Rapslinie sein. DFR katalysiert den Weg zu den farblosen bis gelbfarbigen oligomerischen Verbindungen der Flavan-3,4-Diolen (*sin.* Leucoanthocyanidine; AKHOV *et al.* 2009). Bei einigen dunkelsamigen DH-Linien wurde interessanterweise festgestellt, dass die Samengehalte an oligomeren Proanthocyanidinen sehr niedrig und vergleichbar mit den Gehalten in gelben Samen sind. Diese Beobachtungen bestätigen die Existenz von genetischer Variation für Samenchalendicke und assoziierten Merkmalen (phenolische Verbindungen, Fasergehalt), die die Samenfarbe und Rapsmehlqualität in schwarzsamigem *B. napus* beeinflussen können (SNOWDON *et al*. 2010). Es wurden auch QTL identifiziert, die zwar für kondensierte Tannine oder Phenolsäuren kodieren, aber eben keinen großen Einfluss auf die Samenfarbe haben. Diese Ergebnisse zeigen, dass es in dunkelsamigen Linien der DH-Population eine große Variation für phenolische Substanzen gibt. Somit kann man Selektionsfortschritte bzgl. der Schrotqualität auch unabhängig von der Samenfarbe erreichen.

In der YE2-DH Population wurde ein genetisches Modell zur Vererbung der F2PA3-Gehalte mit Spaltungen an vier Loci vorgeschlagen. Anhand der QTL-Ergebnisse ist der Lokus auf Chromosom 11 vermutlich für eine Verringerung der F2PA3-Gehalte im gelbsamigen Elter verantwortlich, während der Lokus auf Chromosom 16 zu einer Steigerung des Gehaltes im schwarzsamigen Elter führt. Im Fall des F2PA2-Gehalts deutet das Spaltungsverhältnis stark auf ein komplettes Knockout der Gene, die für die Herstellung dieser phenolischen Verbindung zuständig sind, hin. Zwei rezessive Mutationen der notwendigen Gene für die Ausbildung dieser Substanz können anscheinnd zur Eliminierung dieser phenolischen Verbindungen führen. Die weiteren QTL für dieses Merkmal (insgesamt fünf) sind demnach für die quantitative Variation in der Menge an F2PA2 verantwortlich, falls es doch zu einer Bildung der Polymere kommt.

In Fraktion 3 der DH-Population wurden für drei polymere Proanthocyanidine (F3PA3, F3PA4, F3PA6) vier QTL auf vier unterschiedlichen Kopplungsgruppen lokalisiert (N1, N2, N11, N16). Der QTL für die polymeren Proanthocyanidine F3PA4 befindet sich auf Kopplungsgruppe N11 in unmittelbarer Nähe des Gens *tt*1 sowie ein QTL für Samenfarbe (2 cM) bzw. F2PA3-Gehalt (2 cM). Im gleichen Intervall liegen außerdem auch noch QTL für F1PA1-, F1PA2-, Flavonoid- und Proanthocyanidingehalt. Insofern kann vermutet werden,

dass eine Kopie des Samenschalen-Transkriptionsfaktors *tt*1 einen Einfluss auf verschiedene phänolische Substanzen in der Samenschale bzw. im Rapsschrot ausübt. Im Fall der polymeren PAs zeigen die Spaltungsverhältnisse mehrere Gipfel an, die durch eine polygene Vererbung und starke Umwelteinflüsse erklärt werden können.

Der Haupt-QTL für Samenfarbe auf Chromosom N9 erklärt mehr als 40% der phänotypischen Varianz und beeinflusst andere Samenmerkmale (phenolische Säure, oligomere PAs, ADF, NDF, ADL) und somit die Gesamtrapsmehlqualität stark. SNOWDON *et al.* (2010) konnte mit Sequenzen aus den flankierenden Markern des Haupt-QTL eine Region mit unterbrochener Syntänie zu *Arabidopsis*-Chromosom 2 über 1 Mbp. Genomische- und EST (*Expressed Sequence Tags*)-Sequenzen von *B. napus* wurden verwendet, um eine Reihe von neuen Markern in dieser Region zu entwickeln. Die neuen Marker wurden verwendet, um das Ausmaß der Syntänie zu bestätigen und die Markerdichte an der wichtigsten QTL-Position der YE2-DH Karte zu erhöhen. Sequenzen der aus ESTs abgeleiteten Marker wurden auch genutzt, um BAC-Klone aus *B. rapa* mit Kollinearität zur QTL-Region zu identifizieren. Die Ergebnisse einer Assoziationsanalyse bestätigten die Relevanz dieser *B. rapa* BAC-Contig für kartengestützte Klonierung des für den Haupt-QTL zuständigen Gens bzw. Gene und deuteten darauf hin, dass der Haupt-Lokus für Samenfarbe in YE2-DH Population auch zu einer erheblichen Veränderung des Samenendotheliums in dunkelsamigen *B. napus* führt. Eine funktionierende Mutation dieses Gens führt zu einer dünneren Samenschale, einer Verminderung des Fasergehaltes und der phenolischen Verbindungen in Rapsschrot. Bei Anwesenheit von zusätzlichen Flavonoid-Mutationen kann die durch das Hauptgen hervorgerufene dünnere Samenschale auch in starke phänotypische Unterschiede in der Samenfarbe resultieren.

Hinsichtlich der Samenfarbe stimmen die hier aufgeführten Resultate sowohl mit den Ergebnissen der QTL-Analyse von SOMERS *et al*. (2001) und BADANI *et al*. (2006) als auch mit den von LIU *et al*. (2005a) beschriebenen Spaltungsmustern für Samenfarbe bei *B. napus* gut überein. In den oben genannten Veröffentlichungen interagiert ein partiell dominantes Gen für gelbe Samenfarbe epistatisch mit zwei zusätzlichen Loci bei der Ausprägung der Samenfarbe bei *B. napus*. Die beiden letzteren Loci wurden von LIU *et al.* (2005b) als dominante Gene für schwarze Samenfarbe beschrieben. Die von LIU et al. (2005a) vorgeschlagene Spaltungshypothese basierte auf Kreuzungen einer gelbsamigen DH-Linie chinesischen Ursprungs mit zwei genetisch unterschiedlichen Rapssorten mit Canola-Qualität. Die Übereinstimmung der hier erzielten Ergebnisse mit dem LIU-Modell deutet darauf hin, dass die genetische Kontrolle der Samenfarbe in der YE2-DH Population der in

dem chinesischen Material ähnlich ist. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zusammen mit der von BADANI *et al*. (2006) vorgeschlagenen Hypothese lassen vermuten, dass der Haupt-QTL für Samenfarbe (N9) bei Raps ein dominantes Gen für eine Verringerung des Gehaltes an antinutritiven Substanzen (Phenolsäure, oligomerische PAs, Rohfaser) darstellt. In diesem Fall könnte braun- bzw. gelbsamiger Raps mit verringerten antinutritiven Substanzen durch Selektion auf ein einzelnes, dominantes Gen gezüchtet werden. Die beiden dominierenden Loci für schwarze Samenfarbe stellen außerdem vermutlich voneinander unabhängige Gene dar, die für die Synthese der kondensierten Tannine (*syn.* Proanthocyanidine) verantwortlich sind. Braun- bzw. gelbschalige Samen besitzen immer eine dünnere Samenschale (NEUBERT *et al.* 2003), woraus zu schließen ist, dass dieses Major-Gen die Entwicklung der Testa beeinflusst.

Bedingt durch die enge Verwandtschaft zeichnen sich die *Arabidopsis*- und *Brassica*-Genome durch eine Konservierung des Genbestandes und der Gensequenzen aus. Damit bietet sich die Möglichkeit, die Kenntnisse über den Aufbau der *Arabidopsis*-Samenschale und insbesondere über die Proanthocyanidin-Biosynthese in *B. napus* zu nutzen und damit die Genisolierung in dieser wichtigen Kulturpflanze zu erleichtern (XU *et al.* 2006, WEI *et al.* 2007, CHAI *et al.* 2009). In *A. thaliana* sind zurzeit 26 Loci bekannt, die einen Einfluss auf die Farbe der Samenschale haben (NESI *et al.* 2009). Einige der *Arabidopsis*-*tt*-Gene wurden bereits kloniert und können auf Basis ihrer Funktionsprodukte in zwei Kategorien eingeteilt werden. Die erste Gruppe der *tt*-Gene codiert für Proteine, welche für die Biosynthese und Separierung der Flavonoidverbindungen erforderlich sind. Zur ersten Gruppe gehören u.a. die Gene *tt*3, *tt*4, *tt*5, *tt*6, *tt*7, *ban, tt*12, *tt*19 und *tds*4/*tt*18, welche für einzelne Schritte der Biosynthese der Proanthocyanidine verantwortlich sind. Eine zweite Gruppe der *tt*-Gene codiert für Transkriptionsfaktoren: *tt*1, *tt*2, *tt*8, *tt*16, *ttg*1 und *tt*g2 (HAUGHN und CHAUDHURY 2005). Die Nicht-Expression aller Kopien von F3H (*tt*6), F3'H (*tt*7) oder DFR (*tt*3) in *B. napus* würde die Produktion von Proanthocyanidinen stark reduzieren oder auch ganz unterdrücken; eine verringerte Expression eines oder mehrerer dieser Gene, die alle in mehreren Kopien im polyploiden Rapsgenom vorliegen, sollte dagegen eine quantitative Verringerung der Pigmentierung bewirken. Eine verringerte DFR-Expression in gelbsamigem *B. napus* ist allerdings wahrscheinlich nicht vom Verlust eines oder mehrere DFR-Genkopien verursacht, weil die zwei vermuteten Kopien der DFR-Gene in gelbsamigen Rapsgenotypen präsent und transkribiert sind (AKHOV *et al.* 2009). Unter den bekannten *tt*-Loci in *A. thaliana* ist das BANYULS-Gens (*ban*) von besonderem Interesse, weil es in der Proanthocyanidin-Biosynthese eins der Haupt-Enzyme, Anthocyanidin-Reduktase (ANR),

kodiert (DEVIC *et al.* 1999, XIE *et al.* 2003). Die Aktivierung des *ban*-Promotors ist auf Zellen beschränkt in denen PAs produziert werden und wird durch die Befruchtung im Endothelium ausgelöst (DEBEAUJON *et al.* 2003). In *Arabidopsis* benötigt die Expression des *ban*-Gens wenigstens fünf Transkriptionsfaktoren (*tt*1, *tt*2, *tt*8, *tt*16 sowie *ttg*1), wovon im *B. napus*-Genom homologe Kopien für *tt*8, *tt*16, *ttg*1 identifiziert wurden (NESI *et al.* 2009). Die samenspezifischen Gene *tt*1 und *tt*16 codieren für Proteine, welche in die Entwicklung des Samenendotheliums involviert sind. Daher stellen diese Gene mögliche Kandidaten für das postulierte Majorgen mit einer regulatorischen Funktion bei der Tanninakkumulation dar.

Wegen seiner Rolle in der Regulierung der Samenschalenentwicklung sowie der Flavonoidbiosynthese ist das Gen *tt*1 ein wichtiges Kandidatengen für Samenfarbe und assoziierte Schrotqualitätsmerkmale in Raps (SAGASSER *et al.* 2002). Der putative Transkriptionsfaktor *tt*1 ist durch posttranskriptionale Regulation der Expression von *ban* während der Proanthocyanidinsynthese und der Differenzierung des inneren Integuments, in das die Tannin-Pigmente eingelagert werden, beteiligt (SAGASSER *et al.* 2002, DIXON *et al.* 2005, LEPINIEC *et al.* 2006, ROUTABOUL *et al.* 2006). In *B. napus* wurden vier zugehörige homologe Kopien von *tt*1 aus einer BAC-Bibliothek isoliert, um die Funktionalität der Kopien zu testen (LOTZ *et al.* 2003). Die Ergebnisse von STEIN (2007) deuten auf *B. napus*-*tt*1-Kopien auf den Chromosomen N1, N2, N11 und N12 hin. Die vorläufigen QTL- und Spaltungsdaten für phenolische Verbindungen lassen vermuten, dass die Vererbung dieser Merkmale in *B. napus* unterschiedlich ist, wobei aber ein einzelnes, dominantes Gen eine Hauptrolle bezüglich der Verringerung einiger Inhaltsstoffe spielt.

Die Methode, SSR-Marker in benachbarten Regionen von Kandidatengenen zu ermitteln, führte zur erfolgreichen Kartierung eines SSR-Markers (tt1_1) in der YE2-DH Population. Dieser Marker ist potentiell eng mit einem *tt*1-Genlokus in *B. napus* gekoppelt, da er aus der Umgebung des *tt*1-Gens abgeleitet wurde. Unter der Annahme, dass die *Arabidopsis*-Chromosomenregion um *tt*1 zu der entsprechenden Region in *Brassica* konservierte Syntänie aufweist, sollten die Marker und das Gen auch in Raps gekoppelt sein. Auf Chromosom N11 konnte an der gleichen Stelle mit dem SSR-Marker tt1_1 hochsignifikanter QTL für F1PA1-, F1PA2-, Flavonoid- und Proanthocyanidingehalt und in den unterschiedlichen Abständen von 4 cM bis 12 cM QTL für Samenfarbe, Öl-, F2PA2-, F2PA3 und F3PA4-Gehalt lokalisiert werden. Dies deutet darauf hin, dass der Marker mit einer spaltenden Kopie des Gens *tt*1 in der YE2-DH Population gekoppelt sein könnte. Aus der Kartierungsposition des Markers lässt sich eine schwach signifikante Korrelation zur Samenfarbe in *B. napus* herstellen, da keine direkte Kopplung mit dem Samenfarben-QTL auf

Chromosom N11 nachweisbar war. Jedoch lässt sich der beschriebene Einfluss von *tt*1 auf die Struktur der Endotheliumzellen anhand der Kopplung zu den genannten QTL ableiten: Eine veränderte Morphologie der Endotheliumzellen kann zu einer verringerten Akkumulation von braunen, oxidierten Proanthocyanidinen in der Samenschale führen (SAGASSER *et al.* 2002). Diese morphologisch bedingte Reduzierung der Tanninanreichung in der Samenschale könnte sich graduell ausprägen, möglicherweise bedingt durch eine additive Wirkung mehrerer *tt*1-Genkopien und ein Zusammenwirken der verschiedenen *tt*-Gene. Dadurch kann eine verringerte Menge an Proanthocyanidinen nicht direkt mit der Samenfarbe korreliert werden. Eine Senkung der phenolischen Verbindungen in der Samenschale hätte demnach bis zu einem bestimmten Niveau keine Auswirkung auf die Samenfarbenausprägung. Anscheinend genügt ein sehr geringer Anteil an oxidiertem Proanthocyanidin für eine schwarze Rapssamenfarbe. Die Übereinstimmung des tt1_1-Markers mit den genannten QTL deutet auf eine mögliche direkte Wirkung einer *tt*1-Genkopie auf die Ausbildung der Endotheliumzellen sowie auf einen indirekten Einfluss des Genprodukts auf die Anreicherung von Proanthocyanidinen hin (vgl. SAGASSER *et al.* 2002).

Außerdem deuten die Ergebnisse von AUGER *et al.* (2009) auf die Existenz von vier Kopien des *ban*-Gens in *B. napus* hin. Eine Kopie davon (*BnaA.BANa*) wurde auf *Arabidopsis*-Chromosom A1 in der Nähe der Zentromer-Region kartiert. Der SSR-Marker tt1-1 befindet sich in der genetischen Karte der YE2-DH Population auf Kopplungsgruppe N11 im gleichen Intervall mit dem QTL für Samenfarbe und F2PA2. Im Bezug auf die existierende Syntänie zwischen *A. thaliana*-Chromosom A1 und *B. napus*-Kopplungsgruppe N11 (PARKIN *et al.* 2005) könnte vermutet werden, dass auch eine *ban*-Gen Kopie in der Nähe von diesen Loci zu finden ist. Hypothetisch gesehen könnten dadurch alle diese Samenmerkmale beeinflusst werden und der Marker mit einer spaltenden Kopie des *ban*-Gens in der YE2-DH Population als Kandidat-Marker für die QTL nützlich sein.

In der vorliegenden Untersuchung ist in der DH-Population zwischen Samenfarbe und Proteingehalt eine negative Korrelation (r = -0,17) zu beobachten, während Samenfarbe und Ölgehalt (r = 0,34) positiv korreliert sind. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, da eine Verringerung der Samenschalendicke bei hellsamigen Genotypen den relativen Beitrag der Kotyledonen zum Gesamt-Trockengewicht und somit die relativen Anteile von Öl- und/oder Protein erhöht. Ein QTL für Ölgehalt stimmt mit dem Samenfarbe-QTL auf Chromosom N11 in YE2-DH überein und ein zweiter befindet sich in unmittelbarer Nähe des Samenfarbe-QTL auf Chromosomen N9 (2cM). Diese Beobachtung deutet auf eine kausale Beziehung zwischen diesen Merkmalen hin. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die untersuchten

Elternlinien aufgrund ihrer Spaltungen für Samenfarbe und phenolischen Verbindungen ohne Berücksichtigung ihrer Öl- oder Protein-Gehalte ausgewählt wurden.

In *B. napus* ist eine deutliche Reduzierung des Fasergehalts in gelbsamigen Genotypen gleichbedeutend mit einer Verringerung der Samenschalendicke (WITTKOP *et al.* 2009). Die wichtigste physiologische Veränderung, verbunden mit diesem Phänotyp, ist eine erhebliche Reduzierung der sekundären Verdickung der Palisadenschicht in den äußeren Integumenten während der mittleren Phase der Samen-Entwicklung. Diese Veränderung ist für die starke Korrelation zwischen Samenfarbe und ADL-Gehalt verantwortlich (WITTKOP *et al.* 2009), weil ADL in *B. napus*-Samen überwiegend aus Lignin und phenolischen Lignin-Zwischenprodukten aus der sekundären Verdickung der Samenzellwände zusammengesetzt ist. Der damit verbundene Einfluss auf die Akkumulation der polymeren Proanthocyanidine könnte durch die gemeinsame Vorstufe (z.B. *p*-Cumarat) im Sekundärstoffwechselweg verursacht werden (WHETTEN *et al.* 1998). Auf der anderen Seite ist es möglich, dass ein gemeinsamer regulatorischer Faktor beide Stoffwechselwege beeinflusst, oder dass eine räumliche Reduktion der Samenschalendicke zu einer quantitativen Reduzierung der Pigment-Akkumulation führt.

Durch die Züchtung von hellsamigen Ölrapssorten mit verbesserter Schrotqualität wäre es möglich, den Wert des Pressrückstandes als Futtermittel zu erhöhen und als Rapsschrot längerfristig als Basis für die Gewinnung von hochwertigem Protein zu etablieren. Die eng mit der Samenfarbe und den phenolischen Verbindungen gekoppelten molekularen Marker, die im Laufe dieser Studie identifiziert wurden, können wertvolle Werkzeuge für die Züchtung neuer hellsamiger oder gelbsamiger Genotypen mit reduzierten Gehalten an antinutritiven Substanzen werden. Hinweise auf potentielle Kanidatengene, z.B. *tt*1, könnten dabei eine wichtige Rolle spielen.

Um das Zuchtziel hell- und gelbsamige Rapsgenotypen durch reduzierte Gehalte an oligo- und polymerischen Proanthocyanidinen verfolgen zu können, sind weitere Informationen über die regulatorischen Faktoren der Proanthocyanidin-Biosynthese einerseits und die Samenschalenmorphologie andererseits nötig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, genetische und chemische Untersuchungen zu antinutritiven phenolischen Verbindungen im Rapssamen, hauptsächlich kondensierten Tanninen, durchzuführen. Damit sollten gegebenenfalls Zusammenhänge zwischen der Samenfarbe und phenolischen Substanzen im Hinblick auf eine verbesserte Qualität des Rapsschrotes festgestellt werden. Die Untersuchungen der Proanthocyanidine erfolgten anhand quantitativer und qualitativer Methoden (Vanillin- und HPLC-Assay). Die Werte wurden verwendet, um quantitative Merkmalsloci (*Quantitative trait loci*) für die jeweiligen Komponenten zu ermitteln. Die Positionen der identifizierten QTL wurden mit Kandidaten-Genloci für die Zielmerkmale verglichen.

Als Untersuchungsmaterial stand die doppelhaploide (DH) Winterrapspopulation YE2 mit 166 DH-Linien zur Verfügung. Die Population entstand aus einer Kreuzung zwischen der gelbsamigen Winterrapslinie '1012-98' und der schwarzsamigen Inzuchtlinie 'Express 617', beide mit niedrigen Erucasäure- und Glucosinolat-Gehalten im Samen (00-Qualität). Mit Hilfe von 141 AFLP- und 50 SSR-Markern wurde eine genetische Karte für die YE2 DH-Population entwickelt, die 19 Kopplungsgruppen mit einer genetischen Gesamtgröße von 1171 cM umfasst.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand in der Phänotypisierung des Materials bezüglich Samenfarbe und phenolischen Substanzen im Rapsmehl. Die Farbwerte für die DH-Linien variierten von 2,9 (gelbe Samen) bis 8,1 (schwarze Samen), und die Proanthocyanidingehalte (Vanillin-Methode) von 240,7 bis 511,6 mg/100g ölfreiem Rapsmehl. Die Samenfarbe erwies sich als signifikant, jedoch nicht sehr eng korreliert mit dem Proanthocyanidingehalt (r=0,33), dagegen aber nicht korreliert mit dem Flavonoidgehalt (r=0,09). Die eher schwache Korrelation zwischen Samenfarbe und Proanthocyanidingehalt führt zu der Schlussfolgerung, dass die Gelbsamigkeit allein nicht als Selektionsmarker für eine Reduktion des Proanthocyanidin- oder Gesamtflavonoidgehaltes verwendet werden kann. Mit den HPLC-Messwerten der DH-Population YE2 konnten ebenfalls relevante QTL für die verschiedenen Flavonoid-Komponenten bzw. für die Flavonoide insgesamt aufgedeckt werden. Dabei konnten neben Loci, die mit signifikanten QTL für Samenfarbe in dieser Kreuzung kolokaliseren, auch verschiedene QTL lokalisiert werden, die vermutlich in Verbindung mit farblosen Flavonoiden stehen und daher unabhängig von der Samenfarbe

einen ernährungsphysiologisch relevanten Einfluss auf die Flavonoidzusammensetzung haben.

Die HPLC-Untersuchung eines methanolischen Rohextrakts auf phenolische Säuren ließ zwei Hauptpeaks erkennen. Es wird vermutet, dass diese den zwei im Rapsmehl am häufigsten vorkommenden Phenolsäuren, Sinapin (F1PA1) bzw. Sinapoylglucose (F1PA2), entsprechen. Der Haupt-QTL für F1PA1-Gehalt befindet sich an der gleichen Genomposition wie die QTL für F1PA2-, Gesamtflavonoid- und Proanthocyanidin-Gehalt auf Chromosom N11, in unmittelbarer Nähe der QTL für Samenfarbe, oligomere PAs (F2PA3) und polymere PAs (F3PA4). Ein Minor-QTL für den F1PA1-Gehalt (vermutlich Sinapin) befindet sich auf Kopplungsgruppe N15 im gleichen Intervall (2-8 cM) wie der QTL für Samenfarbe und dem Oligomer-PA F2PA2. Auf Chromosom N9 kolokalisieren zwei Loci für F1PA2 (vermutlich Sinapoylglucose) und F1PA3 mit dem Haupt-QTL für Samenfarbe (part. R^2 = 40,9%) mit weiteren QTL für ADF-, NDF- und ADL-Gehalte sowie einem QTL mit geringem Effekt auf den Flavonoidgehalt. Im Hinblick auf die Züchtung zur Verbesserung der Rapsschrotqualität ist dieses Ergebnis signifikant, denn hiermit wird eine Assoziation zwischen der Dicke der Samenschale mit den Gehalten an phenolischen Säuren und anderen antinutritiven Substanzen belegt. Durch eine markergestützte Selektion in Bezug auf diesen Lokus könnte ggf. unabhängig von der Samenfarbe eine wesentliche Reduktion der Gehalte an Phenolsäuren und Faserkomponenten im Rapsschrot erreicht werden.

Die Ergebnisse von HPLC-Untersuchungen auf mono- und oligomerische PAs lassen erkennen, dass die Rapsmehlextrakte keine monomerischen Proanthocyanidine in nachweisbaren Mengen beinhalten. Bei einigen dunkelsamigen DH-Linien wurde interessanterweise festgestellt, dass die Samengehalte an oligomeren PAs sehr niedrig und somit vergleichbar mit den Gehalten in gelben Samen sind. Diese Beobachtungen bestätigen die Existenz von genetischer Variation für Samenzellwanddicke und assoziierte Komponenten, welche die Samenfarbe und Rapsmehlqualität in dunkelsamigen *B. napus*-Formen beeinflussen. Diese Ergebnisse zeigen, dass in dunkelsamigen Linien der DH-Population eine große Variation für phenolische Substanzen existiert. Somit kann man auch unabhängig von der Samenfarbe Selektionsfortschritte bzgl. Schrotqualität erwarten.

Anhand der kombinierten QTL- und Segregationsdaten für Samenfarbe in der DH-Population (zweigipfelige Verteilung von schwarz- zu hellsamigen) wird postuliert, dass die Samenfarbe in *B. napus* primär durch ein dominantes Gen kontrolliert wird, während möglicherweise zwei epistatische Gene Einfluss auf die Pigmentbiosynthese haben. Das Vorhandensein dominanter Allele an dem Hauptlokus für Samenfarbe bedingt nach diesem

Vererbungsmodell immer einen nicht-schwarzsamigen Phänotyp. Es wird ein genetisches Modell zur Vererbung der F2PA3-Gehalte in der YE2 DH-Population mit Segregation an vier Loci vorgeschlagen. Anhand der QTL-Ergebnisse ist der Lokus auf Chromosom N11 für eine Verringerung des F2PA3-Gehalts verantwortlich, während der Lokus auf Chromosom N16 eine Steigerung dieses Gehaltes bedingt. Im Fall des F2PA2-Gehalts deutet das Spaltungsverhältnis stark auf ein komplettes Knockout der Gene, die für die Biosynthese dieser phenolischen Verbindung zuständig sind, hin. Homozygot-rezessive Mutationen dieses Gens führen offensichtlich zum kompletten Ausfall dieser phenolischen Verbindungen. Im Fall der polymeren PAs zeigen die Spaltungsverhältnisse mehrere Gipfel, die durch eine oligogenische Vererbung mit starkem Umwelteinfluss zu erklären sind.

Wegen seiner Rolle in der Regulierung der Samenschalenentwicklung sowie der Flavonoid-Biosynthese ist *tt*1 ein wichtiges Kandidatengen für Samenfarbe und assoziierte Schrotqualitätsmerkmale in Raps. Die vorläufigen QTL- und Spaltungsdaten für phenolische Verbindungen lassen vermuten, dass die Vererbung dieser Merkmale in verschiedenem *B. napus* Material unterschiedlich ist, wobei aber ein einzelnes, dominantes Gen eine Hauptrolle bezüglich der Verringerung einiger Inhaltsstoffe spielt. Auf Chromosom N11 konnten an gleicher Position mit dem SSR-Marker tt1_1 hochsignifikante QTL für F1PA1-, F1PA2-, Flavonoid- und Proanthocyanidin-Gehalte lokalisiert werden. Ferner finden sich in unterschiedlichen Abständen von 4 cM bis 12 cM auch QTL für Samenfarbe, Öl-, F2PA2-, F2PA3 und F3PA4-Gehalte. Dies deutet darauf hin, dass der SSR-Marker mit einer Kopie des Gens *tt*1 in der DH-Population YE2 gekoppelt sein könnte. Aus der Kartierungsposition des Markers lässt sich eine schwache Assoziation zur Samenfarbe in *B. napus* ableiten, da keine direkte Kopplung mit dem Samenfarbe-QTL auf Chromosom N11 nachweisbar war. Die gleiche Position des tt1_1-Markers mit den genannten QTL deutet auf eine mögliche direkte Beteiligung des *tt*1-Gens bei der Ausbildung der Endotheliumzellen und einen indirekten Einfluss des Genprodukts auf die Anreicherung von Proanthocyanidinen hin.

Die Ergebnisse dieser Studie bilden die Grundlage für eine markergestützte Züchtung zur Erzeugung hellsamiger Winter-Ölrapssorten mit verbesserter Schrotqualität. Dies ist sowohl in Hinblick auf eine Verwendung des Pressrückstandes als Futtermittel als auch als Basis für die Gewinnung von hochwertigen Protein-Isolaten und Konzentraten für die Tier- und Humanernährung relevant. Die eng mit der Samenfarbe und den phenolischen Verbindungen gekoppelten molekularen Marker, die in dieser Studie identifiziert wurden, können wertvolle Werkzeuge für die Züchtung neuer hell- bzw. gelbsamiger Genotypen mit reduzierten Gehalten an antinutritiven Substanzen darstellen. Die vorliegenden Hinweise auf

eine Beteiligung potentieller Kandidatengene, z.B. *tt*1, bilden einen wichtigen Ausgangspunkt für die Aufklärung der Funktion identifizierter Genloci (QTL).

7. SUMMARY

The objective of this work was to perform genetic and chemical analyses of antinutritive phenolic compounds in rapeseed (principally condensed tannins). Using this analysis, the relationship between seed color and phenolic compounds in *B. napus* was investigated with a view to improving the rapeseed meal quality. The investigations of proanthocyanidin (PAs) content were carried out by quantitative and qualitative methods (Vanillin- and HPLC assay). The obtained values were used to identify *quantitative trait loci* (QTL) for the respective traits. The candidate loci for the target traits were genetically mapped and compared with the positions of the corresponding QTL.

Using the software JoinMap 3.0 a dense genetic map was generated from the DH mapping population YE2 with 166 doubled-haploid (DH) lines derived from a cross between an inbred line of the black-seeded German winter oilseed rape cultivar 'Express' and the true-breeding, yellow-seeded line '1012-98', both with 00-seed quality. A total of 176 polymorphic markers (126 AFLP and 50 SSR- markers) covering 1171 cM were localized in the genetic map from the YE2-DH population. The linkage groups were designated based on known marker positions using the standard N1 to N19 nomenclature for *B. napus,* with the exception of one unidentified group that was designated KG14.

A major part of this work concentrated on the phenotyping of the plant materials regarding seed color and phenolic compounds in the seed meal. The seed color values for the genotypes of the DH population ranged from 2.9 (yellow seeds) to 8.1 (black seeds) and the condensed tannin content (via Vanillin assay) from 240.7 to 511.6 mg/100 g oil-free rapeseed meal. The seed color was significantly correlated with the total PA content (r = 0.33) but not correlated with the total flavonoids content (r = 0.09). The week correlation between seed color and total PA content leads to the conclusion that the yellow seed coat color alone cannot be used as a selection marker for a reduction of total PA or flavonoid content. Using quantitative data obtained by HPLC analysis it was possible to detect QTL for total and individual flavonoid compounds. In addition to some loci that co-localized with significant QTL for seed color in this population, a number of seed colour-independent QTL for different phenolic substances were detected. These loci presumably represent genes involved in biosynthesis of colorless flavonoids, and therefore exert a nutritionally effect on the flavonoid composition independently of the seed colour.

HPLC analysis of crude phenolic extracts showed two main peaks for phenolic acids. It is believed that these represent sinapine (F1PA1) and sinapoylglucose (F1PA2), respectively,

the two most abundant phenolic acids in rapeseed meal. The main QTL for F1PA1 content was located at the same position on chromosome N11 with QTL for F1PA2, total flavonoid and proanthocyanidin content, and in the immediate area of a QTL for seed color, oligomeric and polymeric PAs (F2PA3, respectively F3PA4). A minor QTL for F1PA1 content (presumably sinapine) is located on linkage group N15 in the same interval (2-8 cM) with QTL for seed color and oligomeric PAs (F2PA2). On chromosome N9 two loci for F1PA2 (presumably sinapoylglucose) and F1PA3 co-localize with the main QTL for seed color (part. R^2 = 40.9%) and additionally with QTL for total flavonoid compounds, ADF, NDF and ADL content. In terms of breeding for rapeseed meal quality improvement this result is significant because it demonstrates an association between the seed coat thickness, the concentrations of phenolic acids and other antinutritive compounds. Using marker assisted selection (MAS) with respect to this locus it could be possible to obtain a significant reduction of phenolic acids and fiber components in rapeseed meal independently of the seed color.

The HPLC studies of mono- and oligomeric PAs showed that the crude extract from rapeseed meal contains no monomeric proanthocyanidins (PAs) in detectable quantities. Interestingly, some DH lines with dark seed coats possessed low oligomeric PA contents comparable with the levels found in yellow seeds. These observations confirm the existence of genetic variation for seed cell wall thickness and associated traits influencing seed color and rapeseed meal quality in dark seeded *B. napus*. In dark seeded DH lines from the YE2-DH population a large variation of phenolic compounds was observed, therefore a selection regarding meal quality can be made independently of the seed color.

By means of combined QTL and segregation data for seed color in the YE2-DH population (two-peaked distribution of black vs. non-black-seeded), it was proposed that seed color is controlled by a dominant gene in *B. napus*, with additional epistatic genes possibly influencing pigment biosynthesis. The presence of one or two dominant alleles at the major locus for seed color always results in a non-black-seeded phenotype. A genetic model for inheritance of F2PA3 oligomeric PA content in the YE2-DH population is proposed with segregation at four loci. Based on the QTL results the locus on chromosome 11 is presumably responsible for reducing of the F2PA3 content, while the locus on chromosome 16 seems to increase the content. In case of F2PA2 content the segregation ratio strongly suggests a complete knockout of the genes responsible for production of this phenolic compound. Two recessive mutations of the responsible genes or gene copies could lead to the elimination of these phenolic compounds, even when five QTL on different chromosomes were identified. In

case of polymeric PAs the segregation ratios show several peaks which can be explained by polygenic inheritance and strong environmental influence.

Because of its role in the regulation of seed coat development and flavonoid biosynthesis the *tt*1 gene is an important candidate gene for seed color and associated quality traits in canola meal. The preliminary QTL and segregation data for phenolic compounds suggest that the inheritance of these traits in *B. napus* is different, but a single, dominant gene has an important role relating the reduction of these antinutritive compounds. Highly significant QTL for F1PA1, F1PA2, total flavonoid and total PAs content were co-localized at the same position as the SSR marker tt1_1 on chromosome N11, and QTL for seed color, oil-, F2PA2-, F2PA3- and F3PA4 content were also found nearby. This indicates that this SSR marker, and possibly a physically linked *B. napus* copy of the *tt*1 gene, could be responsible for variation in these traits in the YE2-DH population. From the mapping position of the SSR marker only a weak correlation with seed color in *B. napus* can be explained, because there was no direct connection with the seed color QTL on chromosome N11. The co-localization of the tt1_1 marker with the above named QTL suggests a possible direct effect of the *tt*1 gene on the formation of endothelial cells and an indirect impact of the gene product on enrichment with proanthocyanidins.

A marker-assisted breeding strategy based on the results of this study could accelerate the generation of pure-breeding, light-colored winter rapeseed varieties with improved meal quality – both in respect to a utilization of seed meal as animal feed or as a basis for the extraction of highly nutritious protein for animal diet and human nutrition.

Closely linked molecular markers that were identified during this study to the seed color and phenolic compounds can be valuable tools for breeding of new yellow or dark seeded genotypes with reduced levels of antinutritive compounds. Potential candidate genes, e.g. *Bntt*1, could play an important role in this direction.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AERTS R. J., BARRY T. N., McNABB W. C. 1999. Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in forages. Agriculture, Ecosystems and Environment, **75**: 1-12.

AKHOV L., ASHE P., TAN Y., DATLA R., SELVARAJ G. 2009. Proanthocyanidin biosynthesis in the seed coat of yellow-seeded, canola quality *Brassica napus* YN01-429 is constrained at the committed step catalyzed by dihydroflavonol 4-reductase. Botany, **87**: 616-625.

ALBERT S., DELSENY M., DEVIC M. 1997. BANYULS, a novel negative regulator of flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat. Plant J., **11**: 289-299.

AMAROWICZ R., NACZK M., SHAHIDIS F. 2000. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. J. Agric. Food Chem., **48**: 2755-2759.

ANAND I. J., MISHRA P. K., RAWAT D. S. 1985. Mechanism of male sterility in *Brassica juncea*. I. Manifestation of sterility and fertility restoration. Cruciferae Newsl., **10**: 44-46.

ANJOU K., LÖNNERDAL B., UPPSTRÖM B., AMAN P. 1977. Composition of seeds from *Brassica* cultivars. Swedish J. Agric. Res., **7**: 169-178.

AOAC 1965. Official Methods of Analysis. 10th edn. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C., USA.

APPLEQUIST L., OHLSON R. 1972. Rapeseed Cultivation, Composition, Processing and Utilization. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

AUGER B., BARON C., LUCAS M.·O., VAUTRIN S., BERGÈS H., CHALHOUB B., FAUTREL A., RENARD M.,·NESI N. 2009. *Brassica* orthologs from BANYULS belong to a small multigene family, which is involved in procyanidin accumulation in the seed. Planta, **230**: 1167-1183.

BADANI A. G., SNOWDON R. J., BAETZEL R., LIPSA F. D., WITTKOP B., HORN R., DE HARO A., FONT R., LÜHS, W., FRIEDT W. 2006. Colocalization of a partially dominant gene for yellow seed color with a major QTL influencing acid detergent fiber (ADF) content in different crosses of oilseed rape (*Brassica napus*). Genome, **49**: 1499-1509.

BADANI A., 2005. Genetik der Samenfarbe in *Brassica napus*: QTL-Kartierung, Kandidatengene und Assoziationen mit Qualitätsmerkmalen. Dissertation, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen, 83 S.

BAETZEL R. 2003. Development of segregating populations in the breeding of yellow-seeded winter rapeseed (*Brassica napus* L.). In: Proc. 11th Int. Rapeseed Congr. Frederiksberg, Denmark. Vol. I, pp. 238-242.

BAETZEL R. 2004. Stabilität und Genetik von wertbestimmenden Inhaltsstoffen gelbsamiger Rapslinien (*Brassica napus)* als Basis für die Züchtung von qualitativ hochwertigen Körnerölraps-Sorten. Dissertation, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen, 164 S.

BAETZEL R., FRIEDT W., LÜHS W. 1999. Yellow-seeded high-erucic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) as a source of improved industrial raw materials. In: Proc. 6th Symp. Renewable Resources & 4th Eur. Symp. Industrial Crops and Products, Bonn, Germany. Landwirtschaftsverl. Münster, pp. 407-412.

BATE-SMITH E. C., METCALFE C. R. 1957. Leucoanthocyanidins. 3. The nature and systematic distribution of tannins in dicotyledons plants. J. Linn. Soc. Lond. Bat., **55**: 669-705.

BATE-SMITH E. C., RIBEREAU-GAYON P. 1959. Leucoanthocyanidins in seeds. Qual. Plant. Mater. Veg., **5**: 189-198.

BECHYNE M. 1987. Breeding and some biological properties of yellow seeded winter rapeseed (*Brassica napus* L.). In: Proc. 7th Int. Rapeseed Congr., Poznan, Poland. Vol. II, pp. 481-491.

BEECHER G. 2003. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. J. Nutr., **133**: 3248-3254.

BEEKMAN T., DE RYCKE R., VIANE R., INZÉ D. 2000. Histological study of seed coat development in *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Res., **113**: 139-148.

BEKELE, W.A. 2008. Cloning and characterization of a candidate gene for seed coat lignin biosynthesis in oilseed rape. Masterarbeit, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen.

BELL A. A., EL-ZIK K. M., THAXTON P. M. 1992. Chemistry, biological significance and genetic control of proanthocyanidins in cotton (*Gossypum* spp.). Edited by HEMINGWAY R. M. and LACKS P. E., Plenum Press, New York, USA. pp. 571-595.

BELL J. M. 1984. Nutrients and toxicants in rapeseed meal: A review. J. Anim. Sci., **58**: 996-1010.

BELL J. M. 1993. Factors affecting the nutritional value of canola meal: a review. Can. J. Anim. Sci., **73**: 679-697.

BELL J. M. 1995. Meal and by-product utilization in animal nutrition. In: Brassica Oilseeds - Production and Utilization. Edited by KIMBER D. and McGREGOR D. I. CAB Int., Wallingford, UK. pp. 301-337.

BELL J. M., KEITH M. O. 1991. A survey of variation in the chemical composition of commercial canola meal produced in Western Canadian crushinhg plants. Can. J. Animal Sci., **71**: 469-480.

BELL J. M., SHIRES A. 1982. Composition and digestibility by pigs of hull fractions from rapeseed cultivars with yellow and brown seed coats. Can. J. Anim. Sci., **62**: 557-565.

BENGTSSON L. 1970. Some experiences of using different analytical methods in screening for oil and protein content in rapeseed. Fette, Seifen, Anstrichmittel, Vol. 87, Issue **7**: 262-265.

BENNETT M. D., LEITCH I. J. 1995. Nuclear-DNA amounts in angiosperms. Ann. Bot., **76**: 113-176.

BENNETT M. D., LEITCH I. J. 2001. Angiosperm DNA C-values database (re-lease 3.1, Sept. 2001). http://www.rbgkew.org.uk/cval/homepage.html.

BEWLEY J. D., BLACK M. 1983. Physiology and biochemistry of seed in relation to germination. In: Development, Germination and Growth. Springer Verlag, Berlin, Germany.

BHATTY R. S., MCKENZIE S. L., FINLAYSON A. J. 1968. The proteins of rapeseed *(Brassica napus* L.) soluble in salt solutions. Can. J. Biochem., **46**: 1191-1197.

BHUSHAN R., MAHESH V. K., MALLIKHARJUN P. V. 1990. Complete amino acid sequence of a subunit from rapeseed high molecular weight protein. Int. J. Peptide Protein Research, **36**: 445-449.

BHUSHAN R., TYAGI A. K. 1998. Complete amino acid sequence of a subunit from rapeseed protein. J. Plant Biochem. Biotech., **7**: 13-21.

BIBI N., SATTAR A., CHAUDRY M.A. 1991. Phenolic constituents in major fractions of tropical rapeseed. Nahrung, **35**: 1053-1059.

BLAIR R., REICHERT R. D. 1984. Carbohydrate and phenolic constituents in a comprehensive range of rapeseed and canola fractions: nutritional significance for animals. J. Sci. Food Agr., **35**:29-35.

BOS C., AIRINEI G., MARIOTTI F., BENAMOUZIG R., BEROT S., EVRARD J., TOME D., GAUDICHON C. 2007. Rapeseed protein exhibit a poor digestibility but very high metabolic utilization in humans. In: Proc. 12th Int. Rapeseed Congr., Wuhan, China. Vol. V, pp. 168-171.

BOUCHEREAU A., HAMELIN J., LAMOUR I., RENARD M., LARHER F. 1991. Distribution of sinapine and related compounds in seeds of *Brassica* and allied genera. Phytochemistry, **30**: 1873-1881.

BOUMAN F. 1975. lntegument initiation and testa development in some *Cruciferae*. Bot. J. Linn. Soc., **70**: 213-229.

BOURDON D., AUMAÎTRE A. 1990. Low-glucosinolate rapeseeds and rapeseed meals: Effect of technological treatments on chemical composition, digestible energy content and feeding value for growing pigs. Animal Feed Sci. Technol., **30**: 175-191.

BREEN J. P., CROUCH M. L. 1992. Molecular analysis of a cruciferin storage protein gene family of *Brassica napus*. Plant Mol. Biol., **19**: 1049-1055.

CAI Y., EVANS F. J., ROBERT M. F. 1991. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. Phytochemistry, **30**: 2033-2040.

CASTELLUCCIO C., PAGANGA G., MELIKIAN N. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. FEBS Lett., **368**: 188-192.

CHAI Y. R., LEI B., HUANG H. L., LI J. N., YIN J. M., TANG Z. L., WANG R., CHEN L. 2009. TRANSPARENT TESTA12 genes from *Brassica napus* and parental species: cloning, evolution, and differential involvement in yellow seed trait. Mol. Genet. Genomics, **281**: 109-123.

CHAPPLE C., SHIRLEY B., ZOOK M., HAMMERSCHMIDT R., SOMERVILLE S. 1994. Secondary metabolism in *Arabidopsis*. In: Arabidopsis. Edited by MEYEROWITZ E. and SOMERVILLE C. R., Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA, pp. 989-1030.

CHEYNIER V., FULCRAND H. 2003. Analysis of polymeric proanthocyanidins and complex polyphenols. In: Methods in Polyphenol Analysis. Edited by SANTOS-

BUELGA C. and WILLIAMSON G. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. pp. 284-307.

CHIEN A., EDGAR D. B., TRELA J. M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol., **127**: 1550-1557.

CHUNG K. T., CHENG I., JOHNSON M. G. 1998b. Are tannins a double-edged sword in biology and health? Trends Food Sci. Technol., **9**: 168-175.

CHUNG K. T., WONG T. Y., WIE C. I. 1998a. Tannins and Human Health: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **38**: 421-464.

CHURCHILL G. A., DOERGE R. W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics, **138**: 963-971.

CLANDININ D. R. 1961. Effect of sinapin, the bitter substance in rapeseed oil meal, on the growth of chickens. Poult. Sci., **40:**484-487.

CLANDININ D., HEARD J. 1968 Tannins in prepress-solvent and solvent-processed rapeseed meal. Poult. Sci., **47**: 688-689.

CLIFFORD M. N., SCALBERT A. 2000. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agric., **80**: 1118-1125.

CROUCH M. L., SUSSEX I. M. 1981. Development and storageprotein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro. Planta, **153**: 64-74.

CROUCH M. L., TENBARGE K. M., SIMON A. E., FERL R. 1983. cDNA clones for *Brassica napus* seed storage proteins: evidence from nucleotide sequence analysis that both subunits of napin are cleaved from a precursor polypeptide. J. Mol. Appl. Genet., **2**: 273-283.

CZOCHANSKA Z., FOO L. Y., NEWMAN R. H. 1979. Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. J. Chem. Soc. Chem. Commun., **8**: 375-377.

CZOCHANSKA Z., FOO L. Y., NEWMAN R. H. 1980. Polymeric proanthocyanidins. stereochemistry, structural units, and molecular weight. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. Vol. I, pp. 2278-2285.

DA SILVA P. M. F. R., EASTMOND P. J., HILL L. M., SMITH A. M., RAWSTHORNE S. 1997. Starch metabolism in developing seeds of oilseed rape. Planta, **203**: 480-487.

DABROWSKI K. J., SOSULSKI F. W. 1984. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. J. Agric. Food Chem., **32**: 128-130 .

DALGALARRONDO M., ROBIN J. M., AZANZA J. L. 1986. Subunit composition of the globulin fraction of rapeseed *(Brassica napus* L.). Plant Sci., **43**: 115-124.

DAUN J. K., DECLERCQ D. R. 1988. Quality of yellow and dark seeds in *Brassica campestris* canola varieties Candle and Tobin. JAOCS, **65**: 122-126.

DEBEAUJON I., LÉON-KLOOSTERZIEL K. M., KOORNNEEF M. 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination and longelivity in *Arabidopsis*. Plant Physiol., **122**: 403-413.

DEBEAUJON I., NESI N., PEREZ P., DEVIC M., GRANDJEAN O., CABOCHE M., LEPINIEC L. 2003. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. Plant Cell, **15**: 2514-2531.

DEBEAUJON I., PEETERS A. J. M., LÉON-KLOOSTERZIEL K.M., KOORNNEEF M. 2001. The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. The Plant Cell, **13**: 853-871.

DEGENHARDT A., ENGELHARDT U. H., WENDT S., WINTERHALTER P. 2000. Isolation of black tea pigments using high-speed countercurrent chromatography and studies on properties of black tea polymers. J. Agric. Food Chem., **48**: 5200-5205.

DELLAPENNA D. 2005. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. J. Plant Physiol., **162**: 729-737.

DESHPANDE S. S., CHERYAN M., SALUNKHE, D.K. 1986. Tannin analysis of food products. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., **24**: 401-449.

DEVIC M., GUILLEMINOT J., DEBEAUJON I., BECHTOLD N., BENSAUDE E., KOORNNEEF M., PELLETIER G., DELSENY M. 1999 The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. Plant J., **19:** 387-398.

DIXON R. A., PAIVA N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell, **7**: 1085-1097.

DIXON R. A., XIE D. Y., SHARMA S. B. 2005. Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? New Phytol., **165**: 9-28.

DOERGE R. W., CHURCHILL G. A. 1996. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. Genetics, **142**: 285-294.

DOONER H. K., ROBBINS T. P. 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. Ann. Rev. Genet., **25**: 173-199.

DOONER H. K., ROBBINS T. P. 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. Annu. Rev. Genet., **25**: 173-199.

DOWNEY R. K., BELL J. M. 1990. New developments in canola research. In: Canola and Rapeseed - Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. Edited by F. SHAHIDI. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. pp. 37-46.

DOWNEY R. K., STRINGHAM G. R., MCGREGOR D. I., STEFFANSON S. 1975. Breeding rapeseed and mustard crops. In: Oilseed and Pulse Crops in Western Canada. Edited by: J.T. HARAPIAK Western Cooperative Fertilize Ltd. Calgary, Canada. pp. 157-183.

DOYLE J. J., DOYLE J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, **12**: 13-15.

DU L., HALKIER B. A. 1998. Biosynthesis of glucosinolates in the developing silique walls and seeds of *Sinapis alba*. Phytochemistry, **48**: 1145-1150.

DURKEE A. B. 1971. The nature of tannins in rapeseed (*Brassica campestris*). Phytochemistry, **10**: 1583-1585.

EASTMOND P. J., RAWSTHORNE S. 1996. Photosynthetic characteristics of developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). J. Exp. Bot., **47**: 1763-1769.

ERICSON M. L., RODIN J., LENMAN M., GLIMELIUS K., JOSEFSSON L. G., RASK L. 1986. Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein, napin, and its precursor. J. Biol. Chem., **261**: 14576-14581.

ERIKSSON I., WESTERLUND E., ÅMAN P. 1994. Chemical composition in varieties of rapeseed and turnip rapeseed, including several samples of hull and dehulled seed. J. Sci. Food Agric., **66**: 233-240.

FALK A., TAIPALENSUU J., EK B., LENMAN M., RASK L. 1995. Characterization of rapeseed myrosinase-binding protein. Planta, **195**: 387-395.

FAO, 2007: http: www.fao.org

FENWICK G. R., CARALYN L. C., PEARSON A. W., BUTLER E. J. 1984. The treatment of rapeseed meal and its effect on chemical composition and egg tainting potential. J. Sci. Food Agric., **35**: 757-761.

FENWICK G. R., HEANEY R. K., MULLIN W. J. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. CRC Critical Review Food Science Nutrition, **18**: 123-201.

FENWICK R., HOGGAN S. 1976. The tannin content of rapeseed meals. British Poultry Science, **17**: 59-62.

FERREIRA D., SLADE D., MARAIS P. J. J. 2006. Flavans and Proanthocyanidins. In: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Edited by: ANDERSEN Ø. M. and MARKHAM K. R. Taylor & Francis Group, Boca Raton. pp. 553-616.

FISHER R. A., BALMUKAND B. 1928. The estimation of linkage from the offspring of selfed heterozygotes. J. Genet. **20**: 79-92.

FONT R., DEL RIO M., FERNANDEZ J. M., DE HARO A., 2003b. Acid detergent fibre analysis in oilseed *Brassicas* by near-infrared spectroscopy. J. Agric. Food Chem., **51**: 2917-2922.

FORKMANN G., HELLER W. 1999. Biosynthesis of flavonoids. In: Comprehensive Natural Products Chemistry. Edited by SANKAWA U. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Vol. I, pp. 713–748.

FRANKE W. 1989. Nutzpflanzenkunde. Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. pp. 157-158.

FRIEDT W., BAETZEL R., BADANI A.G., KOCH M., SCHMIDT R., HORN R., LÜHS W. 2002. Züchtung auf optimierte Schrotqualität bei Raps (*Brassica napus*). Vortr. Pflanzenzüchtg., **54**:131-143.

FRIEDT W., LÜHS W. 1998. Recent developments and perspectives of industrial rapeseed breeding. Fett/Lipid **100**: 219-226.

FRIEDT W., LÜHS W. 1999a. Breeding of rapeseed (*Brassica napus*) for modified seed quality - synergy of conventional and modern approaches. In: Proc. 10th Int. Rapeseed Congr., Canberra, Australia. Vol. IV, pp. 440-442.

FRIEDT W., LÜHS W. 1999b. Perspektiven molekularer Pflanzenzüchtung – Züchterische Optimierung von Ölpflanzen. Biologie in unserer Zeit, **29**: 142-150.

FU F. Y., LIU L. Z., CHAI Y. R., CHEN L., YANG T., JIN M. Y., MA A. F., YAN X. Y., ZHANG Z. S., LI J. N. 2007a. Localization of QTL for seed color using recombinant inbred lines of Brassica napus in different environments. Genome, **50**: 840-854.

GALILI G. 1995. Regulation of lysine and threonine synthesis. Plant Cell, **7**: 899-906.

GALILI G., SHAUL O., PERL A., KARCHI H. 1995. Synthesis and accumulation of the essential amino acids lysine and threonine in seeds. In: Seed Development and

Germination. Edited by J. KIGEL and G. GALILI. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 811-831.

GERBANOWSKI A., MALABAT C., RABILLER C., GUEGUEN J. 1999. Grafting of aliphatic and aromatic probes on rapeseed 2S and 12S proteins: influence on their structural and physicochemical properties. J. Agr. Food Chem., **47**: 5218-5226.

GETINET A., RAKOW G., DOWNEY R. K. 1987. Seed color inheritance in *Brassica carinata* cultivar S-67. Plant Breed., **99**: 80–82.

GILL T. A., TUNG M. A. 1978. Electrophoretic and immunochemical properties of the 12s rapeseed protein. Cereal Chem., **55**: 809-817.

GINER-CHAVEZ B., VAN SOEST P. J., ROBERTSON J. B., PELL A. N., LASCANO C. E., REED J. D. 1997. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. J. Sci. Food Agric., **74**:359-368.

GLAND A. 1982. Gehalt und Muster der Glucosinolate in den Samen von resynthesierten Rapsformen. Vortr. Pflanzenzüchtg, **88**: 242-254.

GODING, L. A., R. S. BHATTY, A. J. FINLAYSON, 1970: The characterization of the 12 S globulin from rapeseed and its glycoprotein component. Can. J. Biochem. **48**: 1096-1103.

GOLDSTEIN J. L., SWAIN T. 1965. The inhibition of enzymes by tannins. Phytochemistry, **4**: 185-192.

GRIFFITHS D. W., BIRCH A. N. E., HILLMAN J. R. 1998. Antinutritional compounds in the *Brassicaceae*: analysis, biosynthesis, chemistry and dietrary effects. J. Hort. Sci. Biotechnol., **73**: 1-18.

GROTEWOLD E., CHAMBERLIN M., SNOOK M., SIAME B., BUTLER L., SWENSON J., MADDOCK S., CLAIR G. ST, BOWEN B. 1998. Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. Plant Cell, **10**: 721-740.

GUNSTONE, F. D. 2000. Composition and properties of edible oils. In: Edible oil processing. Edited by HAMM W. and HAMILTON R. J. Sheffield Academic Press, UK. pp. 3-5.

GURURAJ RAO, NARASINGA RAO. 1981. Comparative study of the high molecular weight protein fraction of mustard (*B. juncea*) and rapeseed (*B. campestris*). Int. J. Peptide Prot. Res., **18**: 154-161.

GUYOT S., DOCO T., SOUQUET, J. M. 1997. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. *kermerrien*) skin and pulp. Phytochemistry, **44**: 351-357.

GUYOT S., MARNET N., DRILLEAU J., THIOLYSIS F. 2001. HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. J. Agric. Food Chem., **49**: 14-20.

HABBEN J. E., LARKINS B. A. 1995. Improving protein quality in seeds. In: Seed Development and Germination. Edited by KIGEL J.and GALILI G. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 791-810.

HAGERMAN A. E. 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. J. Chem. Ecol., **13**: 437-449.

HAGERMAN A. E. 2002. The tannin handbook. URL: www.users.muohio.edu/hagermae.

HAHLBROCK K., SCHEEL D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **40**: 347-369.

HALLOIN J. M. 1982. Localization and changes in catechin and tannins during development and ripening of cottonseed. New Phytol., **90**: 651-657.

HAMMERSTONE J. F., LAZARUS S. A., MITCHELL A. E., RUCKER R., SCHMITZ H. H. 1999. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J. Agric. Food Chem., **47**: 490-496.

HARBORNE J. B. 1993. Methods in plant biochemistry. In: Plant Phenolics, vol. I. Academic Press, London, U.K.

HARRIS N., HENDERSON J., ABBOTT S. J., MULCHRONE J., DAVIES J. T. 1993. In: Seed Storage Compounds - Biosynthesis, Interactions and Manipulation. Edited by SHEWRY P.R. and STOBART K. Clarendon Press, Oxford, UK. pp. 3-21.

HASLAM E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. J. Nat. Prod., **59**: 205-215.

HAUGHN G., CHAUDHURY A. 2005. Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci., **10**: 472-477.

HECKENDORN F., HÄRING D. A., MAURER V., ZINSSTAG J., LANGHANS W., HERTZBERG H. 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. Vet. Parasitol., **42**: 293-300.

HENDERSON C. A. P., PAULS K. P. 1992. The use of haploidy to develop plants that express several recessive traits using light-seeded canola (*Brassica napus*) as an example. Theor. Appl. Genet., **83**: 476-479.

HENKEL H. 1994. Rapssaat-Produkte als Futtermittel. Vortr. Pflanzenzüchtg, **30**: 69-79.

HIGGINS T. J. V. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. Annu. Rev. Plant Physiol., **35**: 191-221.

HOLTON T. A., CORNISH E. C. 1995 Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell, **7**: 1071-1083.

HOUGEN F. W., STEFANSSON B.R. 1983. Rapeseed. In: Advances in Cereal Science and Technology. Vol V. Edited by PAUL ST. American Association of Cereal Chemists., New York, USA. pp. 261-289.

HUANG A. H. C. 1996. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. Plant Physiology, **110**: 1055-1061.

INGELMANN H. J., RIMBACH G., PALLAUF J. 1993. Phytinsäure–ein antinutritiver Faktor? Ernährungs-Umschau, **40**: 400-402.

INQUELLO V., RAYMOND J., AZANZA J. L. 1993. Disulfide interchange reactions in 11S globulin subunits of *Cruciferae* seeds. Relationships to gene families. Eur. J. Biochem., **217**: 891-895.

ISMAIL F., VAISEY-GENSER M., FYFE B. 1981. Bitterness and astringency of sinapine and its components. J. Food Sci., **46**:1241-1244.

JANSEN R. C., STAM P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics, **136**: 1447-1455.

JENSEN S., LIU Y., EGGUM B. 1995. The influence of variations in seed size and hull content on composition and digestibility of rapeseed. In: Proc. 9th Int. Rapeseed Congr., Cambridge, UK. Vol. II, pp. 188-l90.

JEROCH H., KRACHT W., DÄNICKE S. 2001. Feeding value of rape products and is inprovement for broilers and laying hens. Eur. J. Lipid Sci. Technol., **103**: 7-11.

JONES W. T., BROADHURST B., LYTTLETON J. W. 1976. The condensed tannins of pasture legume species. Phytochemistry, **15**:1407-1409.

JÖNSSON R., BENGTSSON L. 1970. Yellow-seeded rape and turnip rape. I: Influence of breeding for yellow seeds upon yield and quality properties. Sveriges Utsädesf. Tidskrift, **80**: 149-155.

JOSEFSSON L. G., LENMAN M., ERICSON M. L., RASK L. 1987. Structure of a gene encoding the 1.7 S storage protein, napin, from *Brassica napus*. J. Biol. Chem., **262**: 12196-12201.

KANG F., RAWSTHORNE S. 1994. Starch and fatty acid synthesis in plastids from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant J., **6**: 795-805.

KANG F., RAWSTHORNE S. 1996. Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. Planta, **199(2)**: 321-327.

KANTAR F., PILBEAM C. J., HEBBLETHWAITE P. D. 1996. Effect of tannin content of faba bean (*Vicia faba*) seed on seed vigour, germination and field emergence. Ann. Appl. Biol., **128**: 85-93.

KAUL R. 1996. Pflanzliche Procyanidine Vorkommen, Klassifikation und pharmakologische Wirkung. Pharm Unserer Zeit, **25**: 175-185.

KENNEDY J. A., JONES G. P. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. J. Agric. Food Chem., **49**: 1740-1746.

KHANBABAEE K., van REE T. 2001. Tannins: Classification and Definition. Nat. Prod. Rep., **18**: 641-649.

KLOCKEMANN D., TOLEDO R., SIMS K. A. 1997. Isolation and characterization of defatted canola meal protein. J. Agric. Food Chem., **45**: 3867-3870.

KNOTT S. A., HALEY C. S. 1992. Aspects of maximum-likelihood methods for the mapping of quantitative trait loci in line crosses. Genet. Res., **60**: 139-151.

KOES R. E., QUATTROCCHIO F., MOL J. N. M. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. BioEssays, **16**: 123-132.

KOESTER S. 1989. Methodische Untersuchungen zum Einsatz der Nahinfrarot-Reflexionsspektroskopie (NIRS) in der Körnerrapszüchtung, Landbauforschung Volkenrode, Sonderheft 98.

KOLODZIEJCZYK P., XIAOYAN W., MARIANCHUK M., WANLI L., AMAROWICZ R. 1999. Phenolics in rapeseed: capillary electrophoresis as a novel analytical method for detection of sinapine, sinapic acid esters and ferulates. In: Proc. 10th Int. Rapeseed Congr., Canberra, Australia. Vol. I, pp. 478-491.

KOZLOWSKA H., NACZK M., SHAHIDI F., ZADERNOWSKI R., 1990: Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. In: Canola and Rapeseed. Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. Edited by SHAHIDI F. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. pp. 193-210.

KRACHT W. DANICKE S., KLUGE H., KELLER K., MATZKE W., HENNIG U. 2004. Effect of dehulling of rapeseed on feed value and nutrient digestibility of rape products in pigs. Arch. Anim. Nutr., **58**: 389-404.

KRÄLING K., RÖBBELEN G., THIES W. 1991. Genetic variation of the content of sinapoyl esters in seeds of rape, *B. napus*. Plant Breed., **106**: 254-257.

KRAUSE J. P., KROLL J., RAWEL H. M. 2006. Gewinnung und Eigenschaften von Rapsproteinen. PPM – Pilot Pflanzenöltechnologie Magdeburg e.V.

KROLL J. 1991a. Selected Functional-Properties of Detoxified Rapeseed Protein Preparations Effected by Phytic Acid. Nahrung, **35**: 619-624.

KRYGIER K., SOSULSKI F., HOGGE L. 1982. Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic-Acids. 2. Composition of Phenolic-Acids in Rapeseed Flour and Hulls. J. Agric. Food Chem., **30**: 334-336.

KUANG A., XIAO Y., MUSGRAVE M. E. 1996. Cytochemical localization of reserves during seed development in *Arabidopsis thaliana* under spaceflight conditions. Ann. Bot., **78**: 343-351.

LANDER E. S., BOTSTEIN D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics, **121**: 185-189.

LANGE R., BAUMGRASS R., DIEDRICH M., HENSCHEL K. P., KUJAWA M. 1992. Glucosinolate in der Ernährung - Pro und Kontra einer Naturstoffklasse. Ernährungs-Umschau, **39**: 252-257.

LAZARUS S. A., KELM M. A., WÄCHTER G. A., HAMMERSTONE J. F., SCHMITZ H. H. 2003. Analysis and purification of proanthocyanidin oligomers. In: Methods in Polyphenol Analysis. Edited by SANTOS-BUELGA C. and WILLIAMSON G. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. pp. 267-283.

LAZARUS S., ADAMSON G. E., HAMMERSTONE J. F., SCHMITZ H. H. 1999. High-performance liquid chromatography/Mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. J. Agric. Food Chem., **47**: 3693-3701.

LECKBAND G., FRAUEN M., FRIEDT W. 2002. Napus 2000. Rapeseed (*Brassica napus*) breeding for improved human nutrition. Food Res. Int., **35**: 273-278.

LEPINIEC L., DEBEAUJON I., ROUTABOUL J. M., BAUDRY A., POURCEL L., NESI N., CABOCHE M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. Annu. Rev. Plant Biol., **57**: 405-430.

LEUNG J., FENTON T. W., MUELLER M. M., CLANDININ D. R. 1979. Condensed tannins of rapeseed meals. J. Food Sci., **44**: 1313-1316.

LI J., EL RASSI Z. 2002. High performance liquid chromatography of phenolic choline ester fragments derived by chemical and enzymatic fragmentation process: analysis of sinapine in rape seed. J. Agric. Food Chem., **50**: 1368-1373.

LICKFETT T., MATHHÄUS B., VELASCO L., MÖLLERS C. 1999. Seed yield, oil and phytate concentration in the seeds of two oilseed rape cultivars as affected by different phosphorus supply. European Journal of Agronomy, **11**: 293-299.

LIPSA F. D., SNOWDON R. J., FRIEDT W. 2009. QTL analysis of condensed tannins content in *Brassica napus* L. Research Journal of Agricultural Science, **41** (2): 274-278.

LIU H. L., HAN J. X., HU X. J. 1991. Studies on the inheritance of seed coat colour and other related characteristics of yellow seeded *Brassica napus*. In: Proc. 8th Int. Rapeseed Congr., Saskatoon, Canada. Vol. V, pp. 1438-1444.

LIU X. P., TU J. X., CHEN B.Y., FU T. D. 2005a. Identification and inheritance of a partially dominant gene for yellow seed colour in *Brassica napus*. Plant Breed., **124**: 9-12.

LIU Z. W., FU T. D., TU J. X., CHEN B. Y. 2005. Inheritance of seed colour and identification of RAPD and AFLP markers linked to the seed colour gene in rapeseed (*Brassica napus* L.). Theor. Appl. Genet., **110**: 303-310.

LOTZ T., SNOWDON R., HORN R., DEWAL G., WEISSHAAR B., FRIEDT W., CABOCHE M., CHALHOUB B. 2003. Molecular analysis of *Arabidopsis thaliana* tt-genes in *Brassica napus*. In: Proc. 11th Int. Rapeseed Congr. Frederiksberg, Denmark. Vol. I., pp. 109-111.

LÜHS W., BAETZEL R., FRIEDT W. 2000. Genetic analysis of seed colour in rapeseed (*Brassica napus* L.). Czech. J. Genet. Plant Breed., **36**: 111-115.

LÜHS W., BAETZEL R., FRIEDT W. 2000a. Zur Kombinierbarkeit von hoher Saatgutqualität und wertvollen Korninhaltsstoffen bei Raps (*Brassica napus*): Möglichkeiten und Grenzen. 51. Arbeitstagung, Arbeitsgemein. der Saatzuchtleiter, Vereinig. österreichischer Pflanzenzüchter, Gumpenstein, Österreich.

LÜHS W., BAETZEL R., FRIEDT W. 2001. Züchtung gelbsamiger Rapsformen. Raps, **19**: 210-212.

LUI H. 1985. Genetics and breeding of rapeseed. Shanghai Science and Technology Press. Shanghai, China. pp. 556-559.

MABON N., WATHELET J. P., MARLIER M. 1999. Measurement of aromatic choline esters in rapeseed by HPLC. In: Proc. 10th Int. Rapeseed Congr. Canberra, Australia. Vol. I, pp. 118-122.

MAKKAR H. P. S. 1989. Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. J. Agric. Food Chem., **37**:1197-1202.

MALCOLMSON L., VAISEY-GENSER M., WALKER B. 1978. Some textural and flavor characteristics of canola/rapeseed. In: Proc. 5th Int. Rapeseed Congr., Malmo, Sweden. Vol. II, pp. 147-152.

MANACH C., SCALBERT A., MORAND C. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr., **79**: 727-747.

MARLEY C. L., COOK R., KEATING R., BARRETT J., LAMPKIN N. H. 2003. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Chicorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. Vet. Parasitol., **112**: 147-155.

MATTHÄUS B. 1998. Effect of dehulling on the composition of antinutritive compounds in various cultivars of rapeseed. Fett/Lipid, **100**: 295-301.

MCMURROUGH I., MCDOWELL J. 1978. Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. Analytical Biochemistry, **91**: 92-108.

MICHALSKI K., OCHODSKI P., CICA B. 1992. Determination of fibre, sulfur amino acids and lysine in oilseed rape by NIT. In: Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy. Edited by MURRAY I. and COWE I. A. VCH Weinheim, Germany. pp. 333-335.

MIETH G., SCHWENKE K. D., RAAB B., BRUCKNER J. 1983. Rapeseed - constituents and protein products. Composition and properties of proteins and glucosinolates. Nahrung, **27**: 675-697.

MILKOWSKI C., BAUMERT A., SCHMIDT D., NEHLIN L., STRACK D. 2004. Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. Plant J., **38**: 80-92.

MILKOWSKI C., BAUMERT A., STRACK D. 2000. Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. Planta, **211**: 883-886.

MIMOUNI B., ROBIN J. M., AZANA J. L. 1990. Comparative studies of 11S globulin constituents of *Brassica napus* L. and of its related species *Brassica campestris* L. and *Brassica oleracea* L. Plant Sci., **67**: 183-194.

MITARU B. N., BLAIR R., BELL T. M., REICHERT R. D. 1982. Tannin and fiber contents of rapeseed and canola hulls. Can. J. Anim. Sci., **62**: 661-663.

MOÏSE J. A, HAN S., GUDYNAITE-SAVITCH L., JOHNSON D. A., MIKI B. L. A. 2005. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. In vitro cellular and developmental biology. Plant, **41**:620-644.

MOLE S., WATERMAN P. G. 1987a. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies: I. Techniques for chemically defining tannins. Oecologia, **72**:137-147.

MOLE S., WATERMAN P. G. 1987b. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies: II. Techniques for biochemically defining tannins. Oecologia **72**: 148-156.

MONSALVE R. I., GONZALEZ DE LA PENA M. A., LOPEZ-OTIN C., FIANDOR A., FERNANDEZ C., VILLALBA M., RODRIGUEZ R. 1997. Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. Clinical Experiments Allergy, **27**: 833- 841.

MONSALVE R. I., LOPEZ-OTIN C., VILLALBA M., RODRIGUEZ R. 1991. A new distinct group of 2 S albumins from rapeseed. Amino acid sequence of two low molecular weight napins. FEBS Letters, **295**: 207-210.

MORINAGA T. 1934. Interspecific hybridization in *Brassica*. The cytology of F1 hybrids of *B. juncea* and *B. nigra*. Cytologia, **6**: 62-67.

MUELLER-HARVEY I., MCALLAN A. B. 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol. **1**: 151-217.

MULLIS K. B., FALOONA F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol., **155**: 335-350.

MUREN E., EK B., BJORK I., RASK L. 1996. Structural comparison of the precursor and the mature form of napin, the 2S storage protein in *Brassica napus.* Eur. J. Biochem., **242**: 214-219.

MURPHY D. J. 1990. Storage lipid bodies in plants and other organisms. Progr. Lipid Res., **29**: 299-324.

MURPHY D. J. 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. Prog. Lipid Res., **32**: 247-280.

MURPHY D. J., CUMMINS I. 1989. Seed oil-bodies: isolation, composition and role of oil-body apolipoproteins. Phytochemistry, **28**: 2063-2069.

MURPHY D. J., CUMMINS I., RYAN A. J. 1989. Immunocytochemical and biochemical study on the biosynthesis and mobilisation of the major seed storage proteins of *Brassica napus*. Plant Physiol. Biochem., **27**: 647-657.

MYBURG A. A., REMINGTON D. L., O'MALLEY D. M., SEDEROFF R. R., WHETTEN R. W. 2001. High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automated DNA sequencer. BioTechniques **30**: 348-357.

NACZK M., AMAROWICZ R., PINK D., SHAHIDI F. 2000. Insoluble condensed tannins of canola/rapeseed. J. Agric. Food Chem., **48**: 1758-1762.

NACZK M., AMAROWICZ R., SULLIVAN A., SHAHIDI F. 1998. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. Food Chemistry, **62**: 489-502.

NACZK M., NICHOLS T., PINK D., SOSULSKI F. 1994. Condensed tannins in canola hulls. J. Agric. Food Chem., **42**: 2196-2200.

NACZK M., SHAHIDI F. 1990. Carbohydrates of canola and rapeseed. In: Canola and Rapeseed - Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. Edited by SHAHIDI F. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. pp. 211-220.

NACZK M., SHAHIDI F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. J. Chromatogr. A, **1054**: 95-111.

NESI N., JOND C., DEBEAUJON I., CABOCHE M., LEPINIEC L. 2001. The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for the proanthocyanidin accumulation in developing seed. Plant Cell, **13:** 2099-2114.

NESI N., LUCAS M. O., AUGER B., LÉCUREUIL A., GUERCHE P., KRONENBERGER J., LEPINIEC L., DEBEAUJON I., RENARD M. 2009. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* BAN gene is active in tannin-accumulating cells of the *Brassica napus* seed coat. Plant Cell Rep. **28**: 601-617.

NEUBERT A. B., LÜHS W., BAETZEL R., FRIEDT W. 2003. Influence of seed colour on seed vigour in *Brassica napus*. In: Proc. 11th Int. Rapeseed Congr., Frederiksberg, Denmark. Vol. I., pp. 253-256.

NEUMANN G. M., CONDRON R., THOMAS I., POLYA G. M. 1996a. Purification and sequencing of multiple forms of *Brassica napus* seed napin small chains that are calmodulin antagonists and substrates for plant calcium-dependent protein kinase. Biochim. Biophys. Acta, **1295**: 23-33.

NEUMANN G. M., CONDRON R., THOMAS I., POLYA G. M. 1996b. Purification and sequencing of multiple forms of *Brassica napus* seed napin large chains that are calmodulin antagonists and substrates for plant calcium-dependent protein kinase. Biochim. Biophys. Acta, **1295**: 34-43.

NORTON G. 1989. Nature and biosynthesis of storage proteins. In: Oil Crops of the World. Edited by RÖBBELEN G., DOWNEY R. K. and ASHRI A. McGraw-Hill, New York, USA. pp. 165-191.

NORTON G., HARRIS J. F. 1975. Compositional changes in developing rapeseed (*Brassica napus* L.). Planta, **123**: 163-174.

NORTON G., HARRIS J. F. 1983. Triacylglycerols in oilseed rape during seed development. Phytochemistry, **22**: 2703-2707.

NUHN P. 1997. Naturstoffchemie. 3. Aufl. Hirzel Verlag, Stuttgart, Deutschland.

O´MARA F., MURPHY J. J., RATH M. 1997. The amino acid composition of protein feedstuffs before and after ruminal incubation and after subsequent passage through the intestines of dairy cows. J. Anim. Sci., **75**: 1941-1949.

OKUDA T., YOSHIDA T., HATANO T. 1993. Classification of oligomeric hydrolyzable tannins and specificity of their occurrence in plants. Phytochemistry, **32**: 507-521.

OSBORNE TH. B. 1924. The vegetable proteins. In: Monographs in Biochemistry. Edited by PLUMMER R. H. and HOPKINS F. G. Longmans, Green and Co., London, UK.

PALMER J. D., SHIELDS C. R., COHEN D. B., ORTON T. J. 1983. Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid *Brassica* species. Theor. Appl. Genet., **65**:181-189.

PARKIN I. A. P., SHARPE A. G., KEITH D. J., LYDIATE D. J. 1995. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). Genome, **38**: 1122-1131.

PIQUEMAL J., CINQUIN E., COUTON F., RONDEAU C., SEIGNORET E., DOUCET I., PERRET D., VILLEGER M. J., VINCOURT P., BLANCHARD P. 2005. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. Theor. Appl. Genet., **111**: 1514-1523.

POKORNY J., REBLOVA Z. 1995. Sinapines and other phenolics of *Brassicaceae* seeds. Potrav. Vedy, **13**: 155-168.

PORTER L. J. 1989. Tannins. In: Methods in plant biochemistry. Plant Phenolics, vol. I. Edited by HARBORNE J. B. Academic Press, London, U.K. pp. 389 – 419.

PORTER L. J., HRSTICH L. N., CHAN B. G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. Phytochemistry, **25**:223–230.

POURCEL L., ROUTABOUL J. M., KERHOAS L., CABOCHE M., LEPINIEC L., DEBEAUJON I. 2005. TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. Plant Cell, **17**: 2966-2980.

PRICE M. L., VAN SCOYOC S., BUTLER L. G. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agric. Food Chem., **26**: 1214-1218.

PRZYBYLSKI R., ESKIN N.A.M. 1991. Phospholipid composition of canola oils during the early stages of processing as measured by TLC with flame ionization detector. J. Am. Oil Soc., **68**: 241-245.

QIAO H., CLASSEN H. L. 2003. Nutritional and physiological effects of rapeseed meal sinapine in broiler chickens and its metabolism in the digestive tract. J. Sci. Food Agric., **83**: 1430-1438.

RAAB B., SCHWENKE K. D. 1986. Contribution to the subunit composition of the 11s globulin from rapeseed (*Brassica napus* L). Nahrung **30**: 395-396.

RAGAN M. A., GLOMBITZA K. 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. Prog. Phycol. Res., **4**: 177-241.

RAHMAN M. H. 2001. Production of yellow-seeded *Brassica napus* through interspecific crosses. Plant Breed., **120**: 463-472.

RASMUSSEN S. E., FREDERIKSEN H., KROGHOLM K. 2005. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. Mol. Nutr. Food Res., **49**: 159-174.

RAVINDERNATH K. 1996. Pflanzliche Procyanidine - Vorkommen, Klassifikation und pharmakologische Wirkung. Pharm. unserer Zeit, **25**: 175-185.

REED J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. J. Anim. Sci., **73**: 1516-1528.

REED J. D., HORVARTH P. J., ALLEN M. S. 1985. Gravimetric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium. J. Sci. Food Agric., **36**: 225-226.

RHODES M. J. C. 1994. Physiological roles for secondary metabolitesin plants: Some progress, many outstanding problems. Plant Mol. Biol., **24**: 1-20.

RICE-EVANS C. A., MILLER N. J., PAGANGA, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci., **2**: 152-159.

RIMPLER H. 1999b. Biogene Arzneistoffe. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Deutschland.

RÖBBELEN G. 1999. Die historische Entwicklung der Pflanzenzüchtung in Deutschland: das Beispiel der Ölpflanze Raps. Biologie in unserer Zeit, **29**: 132-141.

RÖDIN J., ERICSON M. L., JOSEFSSON L. G., RASK L. 1990a. Characterization of a cDNA clone encoding a *Brassica napus* 12S protein (cruciferin) subunit. J. Biol. Chem., **265**: 2720-2723.

RÖDIN J., RASK L. 1990b. The relationship between mature chains and their precursors of curuciferin, the 12S storage protein of *Brassica napus*. Plant Sci., **70**: 57-63.

RODIN, J., ERICSON M. L., L. G. JOSEFSSON, L. RASK, 1990. Characterization of a cDNA clone encoding a Brassica napus 12 S protein, cruciferin) subunit. Relationship between precursors and mature chains. J. Biol. Chem., **265**: 2720-2723.

ROMANI A., VIGNOLINI P., ISOLANI L., IERI F., HEIMLER D. 2006. HPLCDAD/ MS characterization of flavonoids and hydroxycinnamic derivatives in turnip tops (*Brassica rapa* L. subsp. *sylvestri*s L.). J. Agric. Food Chem., **54**: 1342-1346.

ROTOLO P. 1979. Near infrared reflectance instrumentation. Cereal Foods World, **24**: 94-98.

ROUTABOUL J. M., KERHOAS L., DEBEAUJON I., POURCEL L., CABOCHE M. 2006. Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. Planta, **224**: 96-107.

ROZAN P., LAMGHARI R., LINDER M., VILLAUME C., FANNI J., PARMENTIER M., MEJEAN L. 1997. *In vivo* and *in vitro* digestibility of soybean, lupine, and rapeseed meal proteins after various technological processes. J. Agric. Food Chem., **45**: 1762-1769.

SAGASSER M., LU G. H., HAHLBROCK K., WEISSHAAR B. 2002. *A. thaliana* TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. Genes Dev., **16**: 138-149.

SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B., ERLICH H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, **239**(4839): 487-491.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T. 1989. Gel electrophoresis of DNA. In: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring, Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

SANTOS-BUELGA C., SCALBERT A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurence, dietary intake and effects on nutrition and health. J. Sci. Food Agric., **80**: 1094-1117.

SCALBERT A., WILLIAMSON G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J. Nutr., **130**: 2073-2085.

SCHMIDT I., RENARD D., RONDEAU D., RICHOMME P., POPINEAU Y., AXELOS M. A. 2004: Detailed physicochemical characterization of the 2S Storage protein from rape (*Brassica napus* L.). J. Agr. Food Chem., **52**: 5995-6001.

SCHNEIDER C. 2005. Chemistry and biology of vitamin E. Mol. Nutr. Food Res., **49**: 7-30.

SCHOENE F., SCHUHMANN W. 2005. Anforderungen der Tierernährung an Rapsfuttermittel und Vorschläge für die Qualitätssicherung vom Anbau bis zur Verwertung. UFOP-Schriften, Heft 29. Berlin, Deutschland.

SCHOFIELD P., MBUGUA D. M., PELL A. N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. Anim. Feed Sci. Technol., **91**: 21-40.

SCHÖNE F. 1993. Anforderungen der Tierernährung an die Rapszüchtung. Fat Sci. Technol., **95**:147-154.

SCHWEIZER M., SEGALL K., MEDINA S., WILLARDSEN R., TERGESEN J. 2007. Rapeseed/canola protein isolates for use in the food industry. In: 12th Int. Rapeseed Congr., Wuhan, China. Vol. V, pp. 160-163.

SCHWENKE K. D. 1982. Ölsamen und Körnerleguminosen - Eiweißquellen für die menschliche Ernährung. Teil I-III. Ernährungsforschung; **27**: 103-107, 136-141, 171-175.

SCHWENKE K. D. 1983. Ölsamen und Körnerleguminosen - Eiweißquellen für die menschliche Ernährung. Teil IV: 3. Generationen eiweißreicher Pflanzenprodukte: Samenmehle - Konzentrate - Isolate. Ernährungsforschung, **28**: 17-24.

SCHWENKE K. D., DRESCHER B., ZIRWER D., RAAB B. 1988. Structural studies on the native and chemically modified low-molecular mass basic storage protein (napin) from rapeseed (*Brassica napus* L.). Biochem. Physiol. Pflanzen, **183**: 219-224.

SCHWENKE K. D., RAAB B., LINOW K. J., PAHTZ W., UHLIG J. 1981. Isolation of the 12 S globulin from rapeseed (*Brassica napus* L.) and characterization as a neutral protein. On seed proteins. Nahrung, **25**: 271-80.

SCHWENKE K. D., RAAB B., UHLIG J., TKOCZ H., BEHLKE J., BOTTGER M., FREIMUTH U. 1973. Seed proteins. 3. Isolation and characterization of albumin of sunflowers and rapeseed. Nahrung, **17**: 791-809.

SCHWENKE K. D., SCHULTZ M., LINOW K. J., GAST K., ZIRWER D. 1980. Hydrodynamic and quasi-elastic light scattering studies on the 12S globulin from rapeseed. Int. J. Pept. Protein Res., **16**: 12-18.

SCHWETKA A. 1982. Inheritance of seed colour in turnip rape (*Brassica campestris* L.). Theor. Appl. Genet., **62**: 161-168.

SCOFFIELD S. R., CROUCH M. L. 1987. Nucleotide sequence of a member of the napin storage protein family from *Brassica napus*. J. Biol. Chem., **262**: 12202-12208.

SHAHIDI F., NACZK M. 1988. Effect of processing on the phenolic constituents of canola. Bulletin de Liason Groupe Polyphenols, **14**: 89-92.

SHAHIDI F., NACZK M. 1989. Effect of processing on the content of condensed tannins in rapeseed meals. A research note. J. Food Sci., **54**: 1082-1083.

SHAHIDI F., NACZK M. 1992. An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional implications. J. Am. Oil Chem. Soc., **69**: 917-924.

SHEWRY P. R., NAPIER J. A., TATHAM A. S. 1995. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. Plant Cell, **7:** 945-956.

SHIRLEY B. W. 1996. Flavonoid biosynthesis: "New" functions for an "old" pathway. Trends Plant Sci., **1**: 377-382.

SHIRZADEGAN M., 1986. Inheritance of seed colour in *Brassica napus* L. Pflanzenzüchtung, **96**: 140-146.

SHIRZADEGAN M., RÖBBELEN G. 1985. Influence of seed color and hull proportion on quality properties of seeds in *Brassica napus* L. Fette Seifen Anstrichm., **87**: 235-237.

SJÖDAHL S., RÖDIN J., RASK L. 1991. Characterization of the 12S globulin complex of *Brassica napus*. Evolutionary relationship to other 11-12S storage globulins. Eur. J. Biochem., **196**: 617-621.

SLOMINSKI B. A. 1997. Developments in the breeding of low fibre rapeseed/canola. J. Anim. Feed Sci., **6**: 303-317.

SLOMINSKI B. A., CAMPBELL L. D., GUENTER W. 1994. Carbohydrates and dietary fiber components of yellow- and brown-seeded canola. J. Agric. Food Chem., **42**: 704-707.

SNOWDON R. J., WITTKOP B., REZAEIDAD A., HASAN M., KATHA S., LIPSA F., STEIN A., FRIEDT W. 2010. Regional association analysis delineates a sequenced chromosome region influencing antinutritive seed meal compounds in oilseed rape. Genome, in review.

SOMERS D. J., RAKOW G., PRABHU V. K., FRIESEN K. R. D. 2001. Identification of a major gene and RAPD markers for yellow seed coat colour in *Brassica napus*. Genome, **44**: 1077-1082.

SOSULSKI F. 1979. Organoleptic and nutritional effects of phenolics. J. Am. Oil Chem. Soc., **56**: 711-715.

SOSULSKI F., ZADERNOVSKI R., BABUCHOWSKI K. 1981. Composition of polar lipids in rapeseed, J. Am. Oil Chem. Soc., **58**: 561-564.

SOUQUET J. M., CHEYNIER V., BROSSAUD F., MOUTOUNET M. 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. Phytochemistry, **43**: 509-512.

STEIN A. 2007 Syntäniebasierte Kartierung von Markern mit Kopplung zum Gen Transparent Testa 1 in Raps (*Brassica napus* L.). Masterarbeit, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen.

STEIN A., WITTKOP B., LIPSA F., BASUNANDA B., HASAN M., KATTA S., BREUER F., SCHONDELMAIER J., FRIEDT W., SNOWDON R. J. 2010. A major seed colour locus from yellow-seeded *Brassica napus* co-localises with a meal quality QTL in dark-seeded oilseed rape. Theor. Appl. Genet., in preparation.

STRINGAM G. R. 1980. Inheritance of seed color in turnip rape. Can. J. Plant Sci., **60**: 331-335.

STRINGAM G. R., McGREGOR D. I., PAWLOWSKI S. H. 1974. Chemical and morphological characteristics associated with seedcoat color in rapeseed. In: Proc. 4th Int. Rapeseed Congr., Giessen, Germany. Vol. I, pp. 99-108.

SUN B. S., LEANDRO M. C., DA SILVA J. M. R., SPRANGER I. 1998. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. J. Agric. Food Chem., **46**: 1390-1396.

SUN B. S., LEANDRO M. C., DE FREITAS V., SPRANGER M. I. 2006. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography J. Chromatogr. A, **1128**: 27-38.

TANG Z. L., LI J. N., ZHANG X. K., CHEN L., WANG R. 1997. Genetic variation of yellow-seeded rapeseed lines (*Brassica napus* L.) from different genetic sources. Plant Breed., **116**: 471-474.

TERRILL T. H., ROWAN A. M., DOUGLAS G. B., BARRY T. N. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. J. Sci. Food Agric., **58**:321-329.

THEANDER O., ÅMAN P., MIKSCHE G. E., YASUDA S. 1977. Carbohydrates, polyphenols and lignin in seed hulls of different colors from turnip rapeseed. J. Agric. Food Chem., **25**: 270-273.

THIES W. 1994. Die wertbestimmenden Komponenten des Rapsschrotes. Vortr. Pflanzenzüchtg., **30**: 89-97.

THIES, W. 1991: Determination of the phytic acid and sinapic acid esters in seeds of rapeseed and selection of genotypes with reduced concentrations of these compounds. Fat. Sci. Technol., **93**:49-52.

TILLMANN P. 1997. Recent experience with NIRS analysis of rapeseed. CGIRC Bull., **13**: 84-87.

TKACHUK R. 1981. Oil and protein analysis of whole rapeseed kernels by near-infrared reflectance. J. Am. Oil Chem. Soc., **57**: 819-822.

TZEN J. T. C, CAO Y., LAURENT P., RATNAYAKE C. H. 1993. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. Plant Physiology, **101**: 267-276.

TZEN J. T. C., LAI Y. K., CHAN K. L., HUANG A. H. C. 1990. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. Plant Physiology, **94**: 1282-1289.

U, N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and peculiar mode of fertilization. Japan. J. Bot. **7**: 389-452.

UPPSTRÖM B. 1995. Seed chemistry. In: Brassica Oilseeds - Production and Utilization. Edited by KIMBER D. and McGREGOR D. I. CAB Int., Wallingford, UK. pp. 217-242.

UTZ H. F., MELCHINGER A. E. 1996. PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. Verified 14 July 2005. J. Agric. Genom. 2:1–5. http://www.cabi-publishing.org/gateways/jag/papers96/paper196/index.

UZUNOVA M. I., ECKE W. 1999. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Breed., **118**: 323-326.

VAN CASEELE L., MILLS J. T., SUMNER M., GILLESPIE R. 1982. Cytological study of the palisade development in the seed coat of Candle canola. Can. J. Bot., **60:** 2469-2475.

VAN CASEELE L., MILLS J. T., SUMNER M., GILLESPIE R. 1981. Cytology of mucilage production in the seed coat of candle canola (*Brassica campestris*). Can. J. Bot., **59**: 292-300.

VAN DER MEER J. R., DE VOS W. M., HARAYAMA S., ZEHNDER A. J. B. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol. Rev., **56**: 677-694.

VAN DEYNZE A., PAULS K. P. 1994. The inheritance of seed colour and vernalization requirement in *Brassica napus* using doubled haploid populations. Euphytica, **74**: 77-83.

VAN OOIJEN J. W., VOORRIPS R. E. 2001. Joinmap 3.0 software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.

VAN SOEST P. J., WINE R. H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. J. Ass. Off. Anal. Chem., **50**: 50-55.

VAN SOEST P. J. 1964. Symposium on nutrition and forages and pastures: New chemical procedures for evaluating forages. J. Animal Sci., **23**: 838-864.

VAN SOEST P. J., ROBERTSON J. B. 1985. Analysis of Forages and Fibrous Foods. Cornell Univ. Publ. Ithaca, New York., USA.

VAN SOEST P. J., ROBERTSON J. B., LEWIS B. A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci., **74**: 3583-3597.

VAUGHN J. G., WHITEHOUSE J. M. 1971. Seed structures and the taxonomy of the *Cruciferae*. Bot. J. Linn. Soc., **64**: 383-409.

VELASCO L., MÖLLERS C. 1998. Non-destructive assessment of sinapic acid esters in *Brassica* species: II. Evaluation of germplasm and identification of phenotypes with reduced levels. Crop Sci., **38**: 1650-1654.

VERA C. L., WOODS D. L., DOWNEY R. K. 1979. Inheritance of seed coat color in *Brassica juncea*. Can. J. Plant Sci., **59**: 635-637.

VIOQUE J., SANCHEZ-VIOQUE R., CLEMENTE A., PEDROCHE J., YUST M. M., MILLAN F. 2001. Alcalase rapeseed inhibitors: Purification and partial characterization. J. Enzyme Inhib., **16**: 81-87.

VIVAS N., NONIER M. F., DE GAULEJAC N. V. 2004. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of

Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, **513**: 247-256.

VOHRA P. 1989. Carbohydrates and fiber content of oilseeds and their nutritional importance. In: Oil Crops of the World. Edited by RÖBBELEN G., DOWNEY R. K. and ASHRI A. McGraw-Hill, New York, USA. pp. 165-191.

VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M.,. FRIJTERS A, POT J., PELEMAN J., KUIPER M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., **23**: 4407-4414.

VUORELA S., KREANDER K., KARONEN M., NIEMINEN R., HAMALAINEN M., GALKIN A., LAITINEN L., SALMINEN J. P., MOILANEN E., PIHLAJA K., VUORELA H., VUORELA P., HEINONEN M. 2005. Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. J. Agric. Food Chem., **53**: 5922-5931.

VUORELA S., MEYER A. S., HEINONEN M. 2003. Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hydrolysis and HPLC. Eur. Food Res. Technol., **217**: 517-523.

VUORELA S., MEYER A. S., HEINONEN M., 2004. Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapeseed meal phenolics. J. Agric. Food Chem., **52**: 8202-8207.

WALKER K. C., BOOTH E. J. 2001. Agricultural aspects of rape and other *Brassica* products. Eur. J. Lipid Sci. Technol., **103**: 441-446.

WAN L., XIA Q., QIU X., SELVARAJ G. 2002. Early stages of seed development in *Brassica napus*: A seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument. The Plant J., **30**: 1-10.

WANG H., LIU H. 1991. Genetic analysis of seed colour instability in yellow-seeded *Brassica napus* L. In: Proc. 8th Int. Rapeseed Cong., Saskatoon, Canada. Vol. I, pp. 211-218.

WANG S. X., OOMAH B. D., MCGREGOR D. I. 1998. Application and evaluation of ion-exchange UV spectrophotometric method for determination of sinapine in *Brassica* seeds and meals. J. Agric. Food Chem., **46**: 575-579.

WATERMAN P. G., MOLE S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

WEI Y. L., LI J. N., LU J., TANG Z. L , PU D. C., CHAI Y. R. 2007. Molecular cloning of *Brassica napus* TRANSPARENT TESTA 2 gene family encoding potential MYB regulatory proteins of proanthocyanidin biosynthesis. Mol Biol. Rep., **34**: 105-120.

WEISBURGER J. H. 2001. Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. Exp. Biol. Med., **226**: 891-897.

WEISS J. 2000. Tierproduktion. 12. neubearb. Aufl. Parey, Berlin, Germany.

WEISS J. S. 2006. Rapsextraktionsschrot in der Schweinefütterung, Praxisinformation. UFOP-Schriften, Heft 30. Berlin, Deutschland.

WESTER T. L., SKINNER D. J., HAUGHN G. W. 2000. Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. Plant Physiol., **122**: 345-355.

WHETTEN R. W., MACKAY J. J., SEDEROFF R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **49**: 585-609.

WHETTEN R., SEDEROFF R. 1995. Lignin biosynthesis. Plant Cell, **7**: 1001-1013.

WINDSOR J. B., SYMONDS V. V., MENDENHALL J., LLOYD A. M. 2000. *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. Plant J., **22**: 483-493.

WINKEL-SHIRLEY B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physiol., **126**: 485-493.

WITTKOP B., SNOWDON R. J., FRIEDT W. 2009. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. Euphytica, **170**: 131-140.

WOODS D. L. 1980. The association of yellow seed coat with other characters in mustard *B. juncea*. Cruciferae Newsl., **5**: 23-24.

XIE D. Y., SHARMA S. B., PAIVA N. L., FERREIRA D., DIXON R. A. 2003. Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. Science, **299**: 396-399.

XU B. B., LI J. N., ZHANG X. K., WANG R., XIE L. L., CHAI Y. R. 2006. Cloning and molecular characterization of a functional flavonoid 30-hydroxylase gene from *Brassica napus*. J. Plant Physiol., **164**: 350-363.

ZENG Z. B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics, **136**: 1457–1468.

ZUM FELDE T., BAUMERT A., STRACK D., BECKER H. C., MÖLLERS C. 2007. Genetic variation for sinapate ester content in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibration equation. Plant Breed., **126**: 291-296.

ZUM FELDE T., BECKER H. C., MÖLLERS C. 2006. Genotype x environment interactions, heritability and trait correlations of sinapate esters in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). Crop Sci., **46**: 2195-2199.

9. ANHANG

Tabelle A1 - Zusammensetzung des CTAB-Extraktionspuffers (DOYLE & DOYLE 1990)

Extraktionspuffer	
NaCl	1,4 M
Tris-HCl pH 8,0	0,1 M
EDTA pH 8,0	20 mM
CTAB (Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid)	2,0% (w/v)
ß-Mercaptoethanol	0,2% (v/v)

Tabelle A2 - Zusammensetzung des TE Puffer

TE-Puffer 10/1	
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Tabelle A3 - Zusammensetzung der TNE-/Fluoreszenz-Farbstoff-Lösungen zur Bestimmung der DNA-Konzentration

10x TNE	
Tris-HCl	100 mM
EDTA	10 mM
NaCl	1 M
pH 7,4	
Farbstoff-Stammlösung	
Hoechst 33258	10 mg
H_2O_{dd}	10 ml

Tabelle A4 - Zusammensetzung der Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Laufpuffer 0,5 x TBE	
10 x TBE	50 ml
H_2O_{dd}	950 ml
Agarose-Gel (1,8%)	
NEEO Agarose, Roth	4,5 g
0,5 x TBE-Laufpuffer	250 ml
Bromphenolblau-Ladepuffer	
Bromphenolblau	0,15 %
Ficoll	15,0 %
EDTA pH 8,0	10 mM

Tabelle A5 - Zusammensetzung der Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

TE-Puffer 10/0,1	
Tris – HCl pH 8,0	10,0 mM
EDTA pH 8,0	0,1 mM

10 x TBE (Long Ranger Buffer)		**1 x TBE** (Long Ranger Buffer)	
Borsäure	27,5 g	10 x $TBE_{(Long\ Ranger\ Buffer)}$	100 ml
EDTA	9,3 g	H_2O_{dd}	900 ml
H_2O_{dd}	ad 1 l		

Polyacrylamid-(PAA)-Lösung (7%)	
Long Ranger (50%)	35 ml
Harnstoff	105 g
10 x $TBE_{(Long\ Ranger\ Buffer)}$	25 ml
H_2O_{dd}	ad 250 ml

PAA-Gel	
PAA-Lösung (7%)	25 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	175 µl
TEMED	17,5 µl

Formamid-Stop/Lade-Puffer (fuchsinhaltig)	
Formamid	98 %
EDTA pH 8,0	10 mM

Tabelle A6 - AFLP-Restriktions- und Ligationsansätze

RESTRIKTION *(RE-Puffer/Enzym-Mix /Restriktions-MIX)*	**Arbeits-/ Stammlösung**	**Vol. pro Ansatz**
RE-Puffer/Enzym-MIX :		
5 x Reaktionspuffer	aus AFLP® Core Reagent Kit	2,5 µl
*Eco*RI/*Mse*I	aus AFLP® Core Reagent Kit	1,0 µl
AFLP grade Water	aus AFLP® Core Reagent Kit	4,0 µl
		7,5 µl
Restriktions – MIX :		
RE-Puffer/Enzym-MIX	siehe oben	7,5 µl
Template - DNA	[20 ng/µ]	5,0 µl
		12,5 µl
LIGATION *(Adapter/Ligations - MIX)*	**Arbeits-/ Stammlösung**	**Vol. pro Ansatz**
Adapter Ligation Solution	aus AFLP® Core Reagent Kit	12,0 µl
T4 DNA Ligase	aus AFLP® Core Reagent Kit	0,5 µl
		12,5 µl
Ligations – MIX :		
(RE-Puffer/Enzym-, Restriktions - MIX)	siehe oben	12,5 µl
(Adapter/Ligations - MIX)	siehe oben	12,5 µl

Tabelle A7 - AFLP-Präamplifikationsansätze

PRÄAMPLIFIKATION *(Präamplifikations – MIX)*	**Arbeits-/ Stammlösung**	**Vol. pro Ansatz**
Pre-amp Primer Mix	aus AFLP® Pre-amp Primer Mix	20,0 µl
Puffer (Qiagen, mit 15 mM $MgCl_2$)	[10x]	2,5 µl
H_2O_{dd}		0,4 µl
Taq DNA Polymerase (Qiagen)	[5 U/µl]	0,1 µl
		23,0 µl
Präamplifikationsansatz:		
Ligationsverdünnung (LV)	[1:10]	2,5 µl
(Präamplifikations – MIX)		23,0 µl
		25,5 µl

Tabelle A8 - Selektive AFLP-Amplifikationsansätze

AMPLIFIKATION *(Amplifikations – MIX)*	**Arbeits-/ Stammlösung**	**Vol. pro Ansatz**
*Eco*RI/IRD-Primer (markiert mit IRD700/ IRD800)	[50 ng/µl]	0,125 µl
Mse I-Primer	[50 ng/µl]	0,75 µl
dNTPs	[10 mM]	0,25 µl
Puffer (Qiagen, mit 15 mM $MgCl_2$)	[10x]	1,25 µl
H_2O_{dd}		6,5 µl
Taq-Polymerase		0,125 µl
		9,0 µl
Amplifikationsansatz:		
Präamplifikationsverdünnung (PV)	[1:10]	3,0 µl
(Amplifikations - MIX)		9,0 µl
		12,0 µl

Tabelle A9 - Eingesetzte EcoRI-Primer (E+3-Primer)und MseI-Primer (M+3-Primer)

Primer-Bezeichnung	**Sequenz (5' - 3')**
E32	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C
E33	GAC TGC GTA CCA ATT CAA G
E35	GAC TGC GTA CCA ATT CAC A
E38	GAC TGC GTA CCA ATT CAC T
E40	GAC TGC GTA CCA ATT CAG C
M47	GAT GAG TCC TGA GTA ACA A
M48	GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
M49	GAT GAG TCC TGA GTA ACA G
M50	GAT GAG TCC TGA GTA ACA T
M59	GAT GAG TCC TGA GTA ACT A
M60	GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
M61	GAT GAG TCC TGA GTA ACT G
M62	GAT GAG TCC TGA GTA ACT T

Tabelle A10 - Verwendete AFLP-Primerkombinationen

Primer	M47	M48	M49	M50	M59	M60	M61	M62
E32	x	x	x	x	x		x	x
E33	x	x	x	x	x		x	x
E35						x		x
E38					x		x	x
E40						x		

Tabelle A11 - Mikrosatellitenansätze mittels fluoreszenzmarkierter M13-Primerverlängerung

MIKROSATELLITEN *(Mikrosatelliten - MIX)*	**Arbeits-/ Stammlösung**	**pro 15µl- Ansatz**
M13-Forward-Primer	[5 pmol/ µl]	0,15 µl
Reverse-Primer	[5 pmol/ µl]	0,15 µl
M13-IRD-Primer (markiert mit IRD700/ IRD800)	[5 pmol/ µl]	0,15 µl
dNTPs	[10 mM]	0,30 µl
Puffer (Qiagen, mit 15 mM $MgCl_2$)	[10x]	1,50 µl
$MgCl_2$	[25 mM]	0,60 µl
H_2O_{dd}		8,10 µl
Taq-Polymerase (Qiagen)	[5 U/µl]	0,05 µl
		11,00 µl
Mikrosatellitenansatz: *(Mikrosatelliten - MIX)*		11,0 µl
Template - DNA	[5 ng/µl]	4,0 µl

Tabelle A12 - Proanthocyanidingehalte des Rapsmehls (mg/g) der DH Population YE2 und deren Eltern, Express 617 und Linie 1012-98

	Fraktion 2 (oligomere PAs)			Fraktion 3 (polymere PAs)				
Genotyp	**F2PA3**	**F2PA2**	**F2PA6**	**F3PA3**	**F3PA4**	**F3PA5**	**F3PA6**	**F3PA7**
Express 617	0,91	0,07	0,05	0,16	0,12	0,07	0,39	0,18
1012-98	0,08	0,00	0,03	0,05	0,06	0,02	0,23	0,16
28	0,42	0,04	0,03	0,14	0,04	0,05	0,36	0,13
35	0,30	0,04	0,00	0,12	0,09	0,02	0,06	0,04
36	0,29	0,04	0,00	0,03	0,10	0,01	0,04	0,04
37	0,56	0,12	0,00	0,11	0,08	0,03	0,06	0,12
45	0,10	0,00	0,01	0,06	0,17	0,00	0,04	0,02
53	0,33	0,08	0,01	0,06	0,16	0,02	0,04	0,07
55	0,59	0,20	0,02	0,07	0,37	0,01	0,02	0,03
67	0,39	0,01	0,02	0,12	0,47	0,03	0,03	0,03
74	0,32	0,02	0,01	0,04	0,36	0,01	0,03	0,07
81	0,59	0,04	0,02	0,08	0,28	0,02	0,04	0,09
92	0,93	0,10	0,04	0,06	0,27	0,01	0,02	0,02
98	0,37	0,04	0,01	0,13	0,14	0,09	0,29	0,05
101	0,45	0,03	0,00	0,07	0,16	0,07	0,21	0,22
111	0,25	0,01	0,00	0,03	0,34	0,01	0,05	0,03
114	0,21	0,00	0,00	0,05	0,15	0,01	0,07	0,12
119	0,20	0,01	0,02	0,10	0,05	0,04	0,40	0,10
120	0,43	0,04	0,00	0,21	0,08	0,15	0,65	0,17
121	0,49	0,03	0,00	0,07	0,30	0,01	0,07	0,09
122	0,05	0,00	0,00	0,11	0,10	0,11	0,60	0,06
132	0,36	0,01	0,00	0,09	0,18	0,02	0,10	0,14
134	0,27	0,03	0,01	0,70	0,10	0,11	0,18	0,11
135	0,48	0,04	0,00	0,06	0,13	0,02	0,14	0,10
149	0,33	0,03	0,00	0,01	0,21	0,02	0,17	0,07
152	0,40	0,06	0,00	0,12	0,09	0,18	0,17	0,06
155	0,49	0,15	0,01	0,21	0,04	0,12	0,31	0,12
159	0,00	0,00	0,00	0,02	0,18	0,02	0,25	0,16
162	0,08	0,00	0,01	0,18	0,01	0,28	1,49	0,24
163	0,04	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,06	0,06
164	0,26	0,00	0,00	0,08	0,19	0,03	0,18	0,12
167	0,16	0,01	0,00	0,08	0,02	0,06	0,40	0,08
189	0,36	0,02	0,00	0,08	0,27	0,02	0,12	0,09
191	0,21	0,02	0,00	0,15	0,03	0,11	0,35	0,05
192	0,44	0,05	0,00	0,19	0,05	0,14	1,10	0,11
202	0,12	0,00	0,00	0,15	0,07	0,11	0,64	0,11
208	0,33	0,02	0,00	0,23	0,05	0,06	0,78	0,22
215	0,58	0,11	0,00	0,04	0,26	0,03	0,29	0,31
218	0,26	0,01	0,00	0,23	0,41	0,02	0,13	0,08
223	0,45	0,05	0,00	0,02	0,16	0,01	0,09	0,14
224	0,21	0,02	0,00	0,05	0,28	0,02	0,14	0,10
227	0,09	0,00	0,00	0,09	0,30	0,07	0,19	0,16
228	1,05	0,13	0,00	0,15	0,22	0,04	0,20	0,14
232	0,40	0,03	0,00	0,08	0,28	0,02	0,12	0,15
238	0,99	0,12	0,00	0,17	0,19	0,02	0,10	0,12
244	0,37	0,02	0,00	0,09	0,13	0,02	0,10	0,23
245	0,06	0,00	0,00	0,04	0,28	0,02	0,12	0,03
251	0,32	0,02	0,00	0,18	0,34	0,05	0,19	0,10
255	0,38	0,03	0,00	0,15	0,14	0,05	0,18	0,09
257	0,28	0,02	0,00	0,05	0,23	0,05	0,14	0,09
259	0,22	0,01	0,00	0,07	0,11	0,01	0,10	0,20

261	0,12	0,01	0,00	0,05	0,07	0,15	0,23	0,08
263	0,01	0,00	0,00	0,04	0,05	0,01	0,18	0,05
272	0,02	0,00	0,00	0,08	0,18	0,00	0,09	0,04
274	0,17	0,00	0,01	0,09	0,14	0,10	0,17	0,12
275	0,33	0,03	0,01	0,18	0,44	0,07	0,21	0,10
277	0,30	0,03	0,00	0,14	0,08	0,05	0,27	0,28
279	0,17	0,02	0,00	0,05	0,05	0,39	2,15	0,27
281	0,15	0,03	0,00	0,12	0,07	0,03	0,19	0,15
282	0,17	0,01	0,00	0,11	0,03	0,04	0,23	0,09
284	0,26	0,07	0,00	0,06	0,10	0,06	0,20	0,09
290	0,48	0,10	0,00	0,14	0,16	0,05	0,52	0,12
301	0,94	0,09	0,00	0,38	0,24	0,10	0,19	0,31
302	0,66	0,06	0,00	0,26	0,10	0,13	0,21	0,21
304	0,29	0,03	0,00	0,04	0,16	0,01	0,06	0,14
306	0,43	0,06	0,00	0,10	0,07	0,02	0,16	0,08
311	0,62	0,07	0,00	0,20	0,04	0,04	0,33	0,17
312	0,27	0,01	0,02	0,11	0,32	0,02	0,13	0,22
314	0,67	0,11	0,00	0,20	0,18	0,07	0,18	0,16
317	0,48	0,06	0,01	0,13	0,16	0,03	0,17	0,15
318	0,15	0,02	0,00	0,05	0,06	0,04	0,31	0,07
326	0,55	0,05	0,00	0,10	0,25	0,04	0,23	0,16
327	0,43	0,06	0,02	0,12	0,13	0,03	0,28	0,17
332	0,47	0,04	0,00	0,02	0,21	0,01	0,05	0,16
342	0,15	0,02	0,00	0,03	0,27	0,01	0,11	0,15
347	0,33	0,03	0,00	0,05	0,29	0,01	0,07	0,15
381	0,48	0,07	0,01	0,07	0,23	0,02	0,09	0,10
384	0,64	0,04	0,00	0,11	0,66	0,03	0,12	0,14
431	0,56	0,11	0,00	0,04	0,32	0,00	0,08	0,09
482	0,47	0,04	0,02	0,11	0,22	0,03	0,13	0,13
490	0,76	0,09	0,01	0,10	0,15	0,03	0,16	0,29
491	0,23	0,02	0,02	0,14	0,10	0,04	0,17	0,15
495	0,48	0,06	0,00	0,10	0,50	0,03	0,09	0,24
496	0,19	0,00	0,00	0,04	0,19	0,01	0,06	0,10
497	0,42	0,09	0,00	0,06	0,39	0,03	0,13	0,20
499	0,16	0,00	0,00	0,04	0,33	0,02	0,17	0,12
502	0,41	0,07	0,00	0,05	0,38	0,01	0,05	0,14
503	0,45	0,06	0,00	0,15	0,61	0,02	0,12	0,27
504	0,05	0,00	0,00	0,03	0,19	0,01	0,07	0,09
505	0,32	0,03	0,02	0,14	0,44	0,04	0,12	0,38
514	0,63	0,10	0,00	0,14	0,53	0,03	0,09	0,13
522	0,35	0,03	0,00	0,08	0,53	0,01	0,07	0,07
531	0,52	0,21	0,00	0,20	0,56	0,04	0,13	0,11
534	0,41	0,04	0,00	0,15	0,24	0,03	0,20	0,09
565	0,51	0,03	0,01	0,28	0,34	0,11	0,41	0,37
576	1,07	0,08	0,00	0,16	1,27	0,07	0,29	0,13
578	0,03	0,00	0,00	0,05	0,13	0,06	0,52	0,07
590	0,39	0,02	0,00	0,12	0,51	0,04	0,08	0,13
593	0,29	0,02	0,00	0,06	0,57	0,03	0,09	0,17
594	0,30	0,02	0,00	0,13	0,30	0,02	0,11	0,08
598	0,34	0,03	0,00	0,11	0,22	0,01	0,10	0,18
600	0,43	0,03	0,00	0,07	0,41	0,02	0,17	0,07
602	0,12	0,00	0,00	0,06	0,24	0,01	0,10	0,06
623	0,46	0,08	0,00	0,06	0,08	0,03	0,28	0,20
627	0,04	0,00	0,00	0,03	0,60	0,01	0,09	0,16
629	0,57	0,07	0,00	0,06	0,08	0,03	0,21	0,22
644	0,62	0,05	0,00	0,19	0,51	0,05	0,13	0,17
647	0,54	0,02	0,00	0,26	0,31	0,07	0,32	0,12
648	0,91	0,09	0,00	0,16	0,44	0,05	0,27	0,21

661	0,29	0,02	0,00	0,10	0,18	0,02	0,16	0,23
663	0,31	0,00	0,00	0,25	0,04	0,37	1,98	0,67
666	0,69	0,07	0,00	0,24	0,15	0,11	0,42	0,43
668	0,66	0,08	0,00	0,09	0,18	0,04	0,14	0,08
669	0,36	0,05	0,00	0,17	0,20	0,04	0,20	0,26
685	0,39	0,05	0,00	0,12	0,13	0,02	0,22	0,10
693	0,39	0,03	0,00	0,03	0,13	0,02	0,20	0,27
701	0,54	0,06	0,00	0,13	0,13	0,04	0,19	0,12
702	0,26	0,02	0,00	0,12	0,12	0,02	0,19	0,17
707	0,40	0,02	0,00	0,11	0,37	0,01	0,05	0,16
710	0,54	0,03	0,00	0,16	0,34	0,04	0,10	0,13
713	0,15	0,00	0,00	0,07	0,33	0,01	0,09	0,15
716	0,41	0,03	0,00	0,10	0,33	0,03	0,08	0,17
717	0,16	0,02	0,00	0,06	0,23	0,01	0,07	0,18
727	0,62	0,08	0,00	0,05	0,19	0,02	0,07	0,17
737	0,45	0,03	0,00	0,07	0,21	0,01	0,13	0,18
738	0,28	0,01	0,00	0,09	0,12	0,04	0,12	0,11
740	0,39	0,02	0,00	0,19	0,03	0,18	1,00	0,31
752	0,04	0,00	0,00	0,07	0,03	0,03	0,17	0,06
758	0,27	0,02	0,00	0,04	0,15	0,01	0,04	0,17
771	0,02	0,00	0,00	0,04	0,03	0,03	0,18	0,17
780	0,08	0,00	0,00	0,04	0,59	0,02	0,16	0,07
787	0,13	0,00	0,00	0,02	0,19	0,01	0,04	0,10
789	0,47	0,03	0,00	0,11	0,10	0,04	0,07	0,20
792	0,04	0,00	0,00	0,02	0,05	0,01	0,09	0,07
793	0,59	0,04	0,00	0,14	0,30	0,02	0,17	0,20
794	0,16	0,00	0,00	0,03	0,10	0,02	0,37	0,07
797	0,23	0,00	0,00	0,06	0,32	0,02	0,14	0,16
802	0,03	0,00	0,00	0,08	0,10	0,05	0,37	0,20
804	0,59	0,04	0,00	0,19	0,34	0,04	0,58	0,11
808	0,44	0,02	0,00	0,11	0,17	0,01	0,14	0,16
812	0,63	0,03	0,00	0,14	0,20	0,03	0,27	0,16
814	0,20	0,00	0,00	0,18	0,21	0,02	0,63	0,13
830	0,08	0,00	0,00	0,04	0,04	0,02	0,16	0,05
855	0,23	0,03	0,00	0,02	0,19	0,01	0,10	0,08
860	0,03	0,00	0,00	0,04	0,01	0,02	0,23	0,04
869	0,11	0,00	0,00	0,06	0,03	0,03	0,22	0,14
896	0,26	0,03	0,00	0,07	0,21	0,02	0,10	0,14
897	0,80	0,10	0,00	0,22	0,32	0,06	0,41	0,24
900	0,22	0,00	0,00	0,07	0,02	0,08	0,48	0,08
923	0,54	0,04	0,00	0,09	0,33	0,02	0,14	0,10
934	0,06	0,00	0,00	0,03	0,15	0,01	0,17	0,06
935	0,30	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
946	1,14	0,14	0,00	0,26	0,38	0,03	0,30	0,21
955	1,15	0,13	0,00	0,18	0,22	0,03	0,32	0,36
967	0,65	0,03	0,00	0,21	0,17	0,05	0,30	0,15
971	0,11	0,00	0,00	0,06	0,15	0,07	0,33	0,12
983	0,21	0,01	0,00	0,11	0,09	0,03	0,30	0,24
991	0,42	0,03	0,00	0,05	0,15	0,01	0,05	0,04
1004	0,32	0,02	0,00	0,09	0,21	0,01	0,07	0,10
1035	0,42	0,02	0,00	0,14	0,24	0,02	0,08	0,12
1039	0,37	0,02	0,00	0,05	0,14	0,01	0,08	0,08
1043	0,31	0,02	0,00	0,08	0,10	0,02	0,13	0,10
1091	0,46	0,03	0,00	0,14	0,06	0,07	0,27	0,10
1095	1,00	0,08	0,00	0,24	0,09	0,07	0,20	0,25
1098	0,03	0,00	0,00	0,11	0,06	0,12	1,42	0,17
1104	0,22	0,00	0,00	0,12	0,05	0,07	0,51	0,14
1140	0,20	0,01	0,00	0,02	0,01	0,05	0,44	0,03

10. DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt für die Überlassung des Themas, die Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken sowie für die Möglichkeit, am Institut für Pflanzenbau- und Pflanzenzüchtung I in Gießen arbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. B. Honermeier als zweitem Gutachter danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ein besonderes Dankeschön geht an Dr. Rod Snowdon, der mich mit seiner wissenschaftlichen Betreuung und Unterstützung bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit bestens begleitet hat.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. W. Lühs für die Unterstützung in der Anfangsphase meiner Promotion. Dr. R. Baetzel möchte ich für seine Freundschaft und praktische Versuchsbetreuung danken.

Weiterhin danke ich allen, die mir bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit geholfen haben, insbesondere den technischen Assistentinnen Daniela Baetzel, Nelly Weis, Swetlana Renner, Petra Degen und Rosa Allerdings.

Meinen Bürokollegen und Freunden möchte ich für die fachlichen Diskussionen und regelmäßige Ablenkung danke sagen - in alphabetischer Folge: Ana Gloria Badani, Panji Basunanda, Maen Hasan, Eduard Lazarescu, Mirela Lühs, Christian Obermeier, Annette Plank, Liane Renno, Wiebke Rygulla, Mechthild Schuppener, Florentin Simioniuc, Tobias Spiller, Anna Stein, Iuliana Stoleriu, Christof Stoll, Nguyen Tung, Stavros Tzigos, Benny Wittkop und vielen anderen.

Den Sekretärinnen Ingeborg Scholz, Ulla Riedmeier und Sabine Schomber sei ebenfalls herzlich gedankt.

Beim Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, da sie durch Ihre Liebe und Unterstützung ebenso zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere weiterhin, dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat.

Gießen, den 10.März 2010