

Molekulargenetische Differenzierung phytopathogener Pilze des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von: Dipl. Biol. Kristina Ulrich

geboren am: 28. Juli 1961 in Berlin

durchgeführt am: Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung in
Müncheberg und an der

Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Oktober 2001

Gutachter:

Prof. Dr. J. Wöstemeyer

Prof. Dr. K. Naumann

Doz. Dr. H. Dörfelt

Tag der Verteidigung: 21. Januar 2002

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Theoretischer Teil	2
2.1.	Die Pilze des <i>Gaeumannomyces/Phialophora</i> -Komplexes	2
2.2.	Infektionsmechanismus und Pathogenese	6
2.3.	Bedeutung und Verbreitung der Schwarzbeinigkeit	11
2.4.	Biologische Kontrolle der Schwarzbeinigkeit	14
2.5.	Konventionelle Unterscheidungsmethoden und ihre Grenzen	16
2.6.	Molekulare Klassifizierungsmethoden	18
2.7.	Genetische Identifizierung und Klassifizierung der Pilze des <i>Gaeumannomyces/Phialophora</i> -Komplexes	23
3.	Material und Methoden	26
3.1.	Material	26
3.1.1.	Pilzisolat	26
3.1.2.	Nährmedien	30
3.1.3.	Puffer und Lösungen	31
3.1.4.	Enzyme und Chemikalien	32
3.2.	Methoden	33
3.2.1.	Anzucht und Lagerung der Pilze	33
3.2.2.	Isolation der Pilze	33
3.2.3.	Untersuchung morphologischer Parameter <i>Untersuchung der Mycelcharakteristika</i> <i>Untersuchung der Hyphopodienform</i> <i>Test auf Perithezienbildung</i>	33
3.2.4.	Untersuchung physiologischer Parameter <i>Bestimmung der durchschnittlichen Wachstumsraten</i> <i>Selektivmediumtest</i>	34
3.2.5.	DNA-Präparationsmethoden <i>DNA-Präparationsmethode nach Gardes et al. (1991)</i> <i>DNA-Präparation nach Lee und Taylor (1990)</i>	34
3.2.6.	DNA-Konzentrationsbestimmung	35
3.2.7.	PCR-Amplifikationen <i>RAPD-PCR</i> <i>Amplifikation des ITS/rDNA-Fragmentes</i>	35
3.2.8.	Restriktionsanalysen	36
3.2.9.	Elektrophoretische Trennung	36

3.2.10.	Southern-Hybridisierung <i>Southern Blotting</i> <i>Nichtradioaktive Hybridisierung</i>	36
3.2.11.	Reinigung der PCR-Fragmente	37
3.2.12.	Sequenzanalyse <i>Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung mit dem LI-COR Sequencer</i> <i>Sequenzierung mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyser</i> <i>Reinigung der Sequenzierungsprodukte</i> <i>Trennung über Kapillarelektrophorese</i> <i>Auswertung der Sequenzdaten</i>	38
3.2.13.	Pathogenitätsuntersuchungen <i>Pathogenitäts-Standardtest</i> <i>Schnelltest zur Untersuchung des Infektionsverhaltens</i>	40
4.	Ergebnisse	42
4.1.	Entwicklung einer Methode zur Identifizierung und Differenzierung der Isolate des <i>Gaeumannomyces/Phialophora</i> -Komplexes auf Basis der RAPD-PCR	42
4.1.1.	Auswahl der RAPD-Primer	42
4.1.2.	Differenzierung von Isolaten des <i>Gaeumannomyces/Phialophora</i> -Komplexes und ausgewählten Referenzstämmen durch RAPD-PCR-Analyse	46
4.1.3.	Taxonomische Zuordnung der RAPD-Gruppen zu Arten und Varietäten des <i>Gaeumannomyces/Phialophora</i> -Komplexes	48
4.1.4.	Vergleich der mit der RAPD-PCR erhaltenen Klassifizierung mit anderen molekulargenetischen Differenzierungsmethoden und der Hyphodienform	51
4.1.5.	Untersuchung der Stabilität der RAPD-PCR-Muster nach Pflanzenpassage	56
4.2.	Analyse der Populationszusammensetzung der Pilze des <i>Gaeumannomyces/Phialophora</i> -Komplexes	56
4.3.	Charakterisierung und phylogenetische Einordnung einer neuen Pilzgruppe des <i>Gaeumannomyces/Phialophora</i> -Komplexes	58
4.3.1.	Identifizierung einer neuen Isolategruppe	58
4.3.2.	Phylogenetische Charakterisierung der neuen Pilzgruppe	59
4.3.3.	Phänotypische Charakterisierung	66
4.3.4.	Untersuchung der Pathogenität der Gruppe E-Isolate	68
4.3.5.	Lokale Verbreitung	69
4.4.	Untersuchung der genetischen und phänotypischen Variabilität innerhalb der <i>G. graminis</i> -Varietät <i>tritici</i>	71
4.4.1.	Phylogenetische Charakterisierung der durch die RAPD-PCR analysierten Untergruppen der Varietät <i>tritici</i>	71

4.4.2.	Physiologische und morphologische Merkmale	75
4.4.3.	Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen genetischer Klassifizierung und Pathogenitätsverhalten innerhalb der <i>G. graminis</i> -Varietät <i>tritici</i>	77
4.5.	Untersuchungen zur genetischen Variabilität innerhalb der Varietät <i>graminis</i>	80
4.5.1.	Intravarietale Klassifizierung und Pathogenitätsverhalten der <i>G. graminis</i> -Varietät <i>graminis</i> -Isolate	80
4.5.2.	Phylogenetische Klassifizierung der Isolate der Varietät <i>graminis</i>	84
5.	Diskussion und Ausblick	88
6.	Literaturverzeichnis	98
7.	Abkürzungsverzeichnis	112
	Danksagung	

1. Zusammenfassung

Die phytopathogen relevanten Pilze des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes, zu denen die Erreger verschiedener bodenbürtiger Wurzelkrankheiten an Getreide und Gräsern gehören, wurden mit Hilfe molekulargenetischer Fingerprint-Methoden differenziert und klassifiziert. Anhand von RAPD-Polymorphismen und Restriktionsanalysen der ITS/rDNA war es möglich, sowohl die Arten *G. graminis* und *G. cylindrosporus* als auch die Varietäten von *G. graminis* eindeutig zu unterscheiden. Bei der Charakterisierung von 2000 *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*- Isolaten von verschiedenen Getreideanbauflächen konnten anhand spezifischer Fingerprintmuster darüber hinaus Isolate einer bisher nicht beschriebenen Gruppe dunkel pigmentierter, wurzelbesiedelnder Pilze identifiziert werden. Sowohl die phylogenetische Analyse als auch die phänotypischen Eigenschaften, wie das Vorhandensein von gelappten Hyphopodien, Phialiden mit gebogenen Phialosporen und charakteristischen Mycelstrukturen zeigten, das diese Pilze eine neue *Phialophora*-Art innerhalb des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes mit enger Verwandtschaft zu *G. graminis* darstellen. Ähnlich wie *G. cylindrosporus* besiedeln die Isolate der neuen *Phialophora*-Art Getreide- und Graswurzeln nur oberflächlich, ohne eine Schädigung der Pflanze zu verursachen.

Neben der Klassifizierung der Arten und Varietäten wurden die Isolate der *G. graminis*-Varietäten *tritici* und *graminis* hinsichtlich subvarietaler Variationen im Zusammenhang mit der Ausprägung phytopathogen relevanter Merkmale untersucht. Die Pilze der Varietät *tritici*, die als Haupterreger der Schwarzbeinigkeit bekannt sind, konnten durch Amplifikation mit dem Primer OPB-07 in die Untergruppen A1 und A2 eingeteilt werden. Die Klassifizierung wurde durch Hybridisierung mit einer mitochondrialen rDNA-Sonde und durch Restriktionsanalyse der ITS/rDNA-Region bestätigt. Sequenzvergleiche der ITS-Regionen repräsentativer Isolate ergaben, daß die beiden Untergruppen phylogenetisch eindeutig separierte Gruppen innerhalb der Varietät *tritici* bilden. Phänotypisch zeigten beide Gruppen Unterschiede in den durchschnittlichen Mycel-Wachstumsraten und den Pathogenitätseigenschaften. Während die A1-Isolate hinsichtlich ihrer Pathogenität sehr variabel waren, verhielten sich alle A2-Isolate aggressiv gegenüber Weizen. Die getreideinfizierenden Isolate der Varietät *graminis* bildeten eine phylogenetisch einheitliche Gruppe innerhalb der sonst sehr heterogenen Varietät. Obwohl *G. graminis* var. *graminis* generell als apathogen gegenüber Getreide beschrieben wird, verursachten über 50% der getreideinfizierenden Isolate deutliche Krankheitssymptome an Weizen.

2. Theoretischer Teil

Vor ca. 150 Jahren vernichtete eine verheerende Epidemie im Süden Australiens riesige Getreidebestände, was ihr den Namen „Take-all“ einbrachte (Butler, 1961). Die Ursache der Krankheit blieb lange unbekannt. Der Erreger, ein Ascomycet, der heute unter dem Namen *Gaeumannomyces graminis* bekannt ist, konnte erst 40 Jahre später eindeutig nachgewiesen werden. Heute ist die „Take-all“-Krankheit, die aufgrund der durch die Ausbreitung des Pilzes symptomatisch schwarz gefärbten Wurzeln „Schwarzbeinigkeit“ genannt wird, die weltweit bedeutendste bodenbürtige Wurzelkrankheit von Weizen und Gerste. Neben Weizen und Gerste werden auch andere Getreidearten, aber auch ein breites Spektrum von Gräsern befallen. So führen Vertreter der Art *Gaeumannomyces graminis* neben den Getreideverlusten besonders in Amerika und Australien zu großen Schäden auf Golf, Bowling- und Zierrasenflächen, die sich oft in musterartigen Ausfällen, sogenannten „Take-all Patches“ äußern. Andere Pilze dieser Art, die den pathogenen sehr ähnlich sind, besitzen als apathogene Besiedler von Gramineen-Wurzeln durch die Konkurrenz zu den pathogenen Pilzen Bedeutung bei der natürlichen biologischen Kontrolle der Schwarzbeinigkeit.

Alle Pilze, die mit den verschiedenen „Take-all“-Formen an Getreide und Gräsern in Verbindung stehen, wurden zum *Gaeumannomyces/Phialophora* (G/P)-Komplex zusammengefaßt (Asher und Shipton, 1981; Walker, 1981; Hornby und Bateman, 1991). Dazu gehören zum einen die pathogenen Pilze der Art *G. graminis* und ihre *Phialophora*-Nebenfruchtformen. Zum anderen beinhaltet der Komplex weitere, nicht pathogene *Gaeumannomyces*-Arten wie *G. cylindrosporus* und verschiedene anamorphe *Phialophora*-Arten, deren Hauptfruchtformen teilweise nicht bekannt sind. Die taxonomische Beschreibung dieser Pilzgruppe ist bisher noch nicht abgeschlossen. Durch die Anwendung molekulargenetischer Methoden wurden in den letzten Jahren viele Fragen zur Klassifizierung der Arten und Varietäten des G/P-Komplexes geklärt. Andererseits ergeben sich gerade durch die Untersuchungen auf DNA-Ebene ständig neue Fragen, die vor allem die phylogenetische Diversität innerhalb der Varietäten und die Einordnung atypischer Isolate bzw. Isolategruppen betreffen.

2.1. Die Pilze des *Gaeumannomyces/Phialophora*- Komplexes

Im Jahre 1890 gelang es den Franzosen Prillieux and Delacroix erstmals, das pilzliche Pathogen der Take-all-Wurzelkrankheit als *Ophiobolus graminis* Sacc. zu identifizieren

(Prillieux and Delacroix, 1890). Vierzehn Jahre später zeigte der Australier McAlpine (1904), daß die Symptome, die bis dahin als „Take-all“ bzw. „Weißfährigkeit“ bekannt waren, Stadien derselben Krankheit sind und durch Infektion der Wurzeln mit dem Pilz *Ophiobolus graminis* hervorgerufen werden. In den 50er Jahren nahmen Arx und Olivier (1952) die Untersuchungen an dieser Art wieder auf und beschrieben die Gattung *Gaeumannomyces*.

Auch die taxonomische Klassifizierung des Pilzes unterlag mehrfachen Veränderungen. Noch unter dem Namen *Ophiobolus graminis* war der Erreger der Schwarzbeinigkeit in die Familie der *Gnomoniaceae* eingeordnet worden (Nannfeldt, 1932). Später erfolgte die Zuordnung der Gattung *Gaeumannomyces* in die durch den Zusammenschluß der *Gnomoniaceae* mit der Familie der *Valsaceae* erweiterte Familie der *Valsaceae* (Eriksson und Hawksworth, 1993). Beides sind Familien der Ordnung *Diaporthales*, zu der die Gattung *Gaeumannomyces* nach Landschoot (1993) auch ursprünglich schon gehörte. Einige wesentliche Merkmale sprechen jedoch gegen die Zuordnung zu dieser Gruppe. So haben echte Vertreter der *Diaporthales* keine *Phialophora*-Nebenfruchtformen und bilden an den infizierten Wirtspflanzen keine Appressorien bzw. Hyphopodien (vgl. 2.2). Außerdem leben die *Diaporthales* entweder saprophytisch von absterbendem Gewebe oder sind systemische Pathogene. In letzter Zeit wurden Beziehungen zwischen den hinsichtlich der Morphologie ihrer Hauptfruchtformen sehr ähnlichen Gattungen *Gaeumannomyces* und *Magnaporthe* mehr in den Mittelpunkt gestellt (Cannon, 1994). Die sich daraus ergebende neue Familie der *Magnaportaceae*, die noch einer Ordnung zugeordnet werden muß, beinhaltet neben *Magnaporthe* und *Gaeumannomyces* fünf weitere Gattungen: *Buergenerula*, *Clasterosphaeria*, *Herbampulla*, *Omnidemplus* und *Pseudotracylla*. Diese zunächst auf morphologischen und physiologischen Eigenschaften beruhende Verwandtschaft wurde von Bryan *et al.* (1995) und Bunting *et al.* (1996) für die Gattungen *Gaeumannomyces* und *Magnaporthe* auch auf molekularer Ebene nachgewiesen.

Die Pilze der Art *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx und Olivier wurden auf der Grundlage von Untersuchungen des Wirtsspektrums und morphologischer Charakteristika in vier Varietäten eingeteilt (Walker, 1972, 1980; Yao, 1993).

G. graminis var. *tritici* (Walker), der „Weizen-Take-all-Pilz“ verursacht als Erreger der Schwarzbeinigkeit von Weizen und Gerste weltweit große Ernteverluste (Walker, 1981; Garrett, 1981; Cook, 1994), kommt aber auch an weiteren Getreidearten und verschiedenen Gräsern vor.

G. graminis var. *avenae* (Turner) hat ein breites Wirtsspektrum innerhalb der *Gramineae*. Durch die Produktion des Enzyms Avenacinase sind die Isolate der Varietät *avenae* im Gegensatz zu den meisten Pilzen der Varietät *tritici* in der Lage, das in Haferwurzeln befindliche Abwehrsubstrat Avenacin zu detoxifizieren und dadurch diese Getreideart zu infizieren (Turner, 1961; Crombie *et al.* 1986; Osbourn *et al.*, 1991; Bowyer *et al.*, 1995). Der Pilz wird traditionell als Hauptverursacher der Schwarzbeinigkeit von Hafer angesehen, besitzt jedoch wesentlich größere Bedeutung als Erreger der „Take-all patch“-Krankheit von Rasengräsern, wie z.B. Straußgras und Hundszahngras (Walker, 1981; Hornby und Bateman, 1991; Dennis und Spooner, 1992; Hornby, 1998; Wong *et al.*, 2000).

Auch *G. graminis* var. *graminis* (Walker) befällt vor allem Gräser und verursacht, ähnlich wie *G. graminis* var. *avenae*, große Schäden an Golfrasenanlagen und Zierrasenflächen vor allem in Amerika und Australien. Zu den wichtigsten Krankheiten von Rasengräsern gehören z.B. die „Take-all Wurzelrotte“ von St. Augustinegras im Süden der USA, besonders in Texas (Krausz, 1991; Elliott *et al.*, 1993) sowie „Spring dead spot“ und „Decline“ von Hundszahngras in den südöstlichen Bundesstaaten (McCarty und Lucas, 1989; Elliott, 1991; Whitney, 1990). Außerdem konnte diese Varietät als Erreger einer Reis-Bleichekrankheit identifiziert werden, die in Texas und Florida zu großen Ernteverlusten führte (Tullis und Adair, 1947; Ou, 1972; Whitney, 1990; Datnoff *et al.*, 1993). Gegenüber Getreide wird *G. graminis* var. *graminis* generell als nicht bzw. nur schwach pathogener Besiedler der äußeren Rindenschichten der Wurzel beschrieben, der Bedeutung als Antagonist bei der natürlichen biologischen Kontrolle der Schwarzbeinigkeit besitzt (Wong, 1975; Asher und Shipton, 1981; Walker, 1981).

Die vierte Varietät der Art *G. graminis*, die Varietät *maydis*, wurde erst 1992 von Yao *et al.* als Erreger der Schwarzbeinigkeit an Mais in China beschrieben (Yao *et al.*, 1992; Yao, 1993). Neben Mais infiziert *G. graminis* var. *maydis* verschiedene Gräser und Getreidearten mit Ausnahme von Hafer (Yao *et al.*, 1992).

Weitere zum G/P-Komplex der Gramineen- infizierenden Pilze gehörende *Gaeumannomyces*-Arten sind *G. cylindrosporus* (Hornby *et al.*) und *G. incrustans* (Landschoot und Jackson). *G. cylindrosporus* kommt als nicht-pathogener Besiedler vor allem an Wurzeln von Getreide, mehr aber an Gräsern vor und kann aufgrund seiner Ähnlichkeit mit *G. graminis* zur Präinokulation bei der biologischen Kontrolle der getreidepathogenen *G. graminis*-Varietäten *tritici* und *avenae* eingesetzt werden (Deacon, 1973; Slope *et al.*, 1978). Die Art *G. incrustans* wurde von Landschoot und Jackson (1989) bei Untersuchungen von Krankheiten an Gräsern

in den USA identifiziert. Vertreter dieser Art besiedeln Wurzeln von Rasengräsern, sind aber im Vergleich zu *G. graminis* var. *graminis* und *avenae* nicht pathogen.

Die Pilze des G/P-Komplexes sind durch charakteristische dunkel pigmentierte, ektotrophe Laufhyphen an den Wurzeln der Wirtspflanzen zu erkennen. Bei Kontakt mit der Wurzelepidermis werden an den vegetativen Hyphen große adhäsive Zellen gebildet, die als Hyphopodien bezeichnet werden und nach Walker (1981) ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung der *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate darstellen. Die Pilze der *G. graminis*-Varietäten *tritici*, *avenae* und *maydis* haben einfache Hyphopodien, *G. graminis* var. *graminis* bildet dagegen in den meisten Fällen deutlich gelappte Hyphopodien. An *G. cylindrosporus*-Isolaten wurden einfache oder leicht gelappte Hyphopodien beobachtet.

Alle Pilze des G/P-Komplexes schließen asexuelle Nebenfruchtformen (Anamorphe) in ihren Lebenszyklus ein. Im Gegensatz zu den Hauptfruchtformen (Teleomorphe), die sich sexuell durch Ascosporen vermehren, bilden die anamorphen Formen durch Zellsprossung Phialosporen und verhalten sich an der Pflanze meist nicht oder nur schwach pathogen. Die Basis für den Wechsel zwischen anamorphem und teleomorphem Stadium der Pilze ist nicht bekannt. Beide Formen werden durch eine Vielzahl genetischer und ökologischer Faktoren gesteuert. Die sexuellen Fruktifikationsformen werden wahrscheinlich nur dann gebildet, wenn die dazu notwendigen, oft hoch spezifischen Ansprüche durch die Umgebung erfüllt sind (Müller und Löffler, 1992).

Da eine Einordnung und Klassifizierung der Nebenfruchtformen in das System der Ascomyceten oft sehr schwierig oder nur begrenzt möglich ist, werden die anamorphen Pilze in einem selbstständigen künstlichen Form-Taxon, der Form-Gattung *Phialophora* zusammengefaßt (Landschoot, 1993). Diese Gattung ist sehr heterogen und umfaßt anamorphe Arten der unterschiedlichsten Ascomyceten von phytopathogenen bis zu humanpathogenen Pilzen.

Während die Nebenfruchtformen der *G. graminis*-Varietäten *tritici* and *avenae* einfache Hyphopodien haben, konnten die meisten *Phialophora* sp.-Isolate mit gelappten Hyphopodien als anamorphe Formen der Varietät *graminis* identifiziert werden (Deacon, 1974; Speakman *et al.* 1978). Andere *Phialophora* sp.-Isolate mit gelappten Hyphopodien, die von Hirsewurzeln in Südafrika stammen, stellen nach Scott (1989) ein Stadium von *G. graminis* var. *graminis* dar, das als Ergebnis der Anpassung an Trockenheit die Fähigkeit zur Perithezienbildung verloren hat. *Phialophora graminicola* (Deacon), der im natürlichen und

landwirtschaftlich genutzten Grünland in Europa und Australien weit verbreitet ist (Scott, 1970; Deacon, 1973; Wong und Southwell, 1980) wurde von Hornby *et al.* (1990) - mehr als 10 Jahre nach der Beschreibung von *G. cylindrosporus* - als anamorphe Nebenfruchtform dieser Art identifiziert.

Die Kompliziertheit der Zusammensetzung des G/P-Komplexes und der Einordnung der Pilze in Beziehung zu den Gattungen *Gaeumannomyces* und *Phialophora* ist in Abb. 2.1. schematisch dargestellt. Neben den relativ gut charakterisierten Teleomorph-Anamorph-Verbindungen lassen die anamorphen *Phialophora*-Formen, die bisher keiner Hauptfruchtform zugeordnet werden konnten und möglicherweise auch die *Gaeumannomyces*-Arten noch viele Fragen offen.

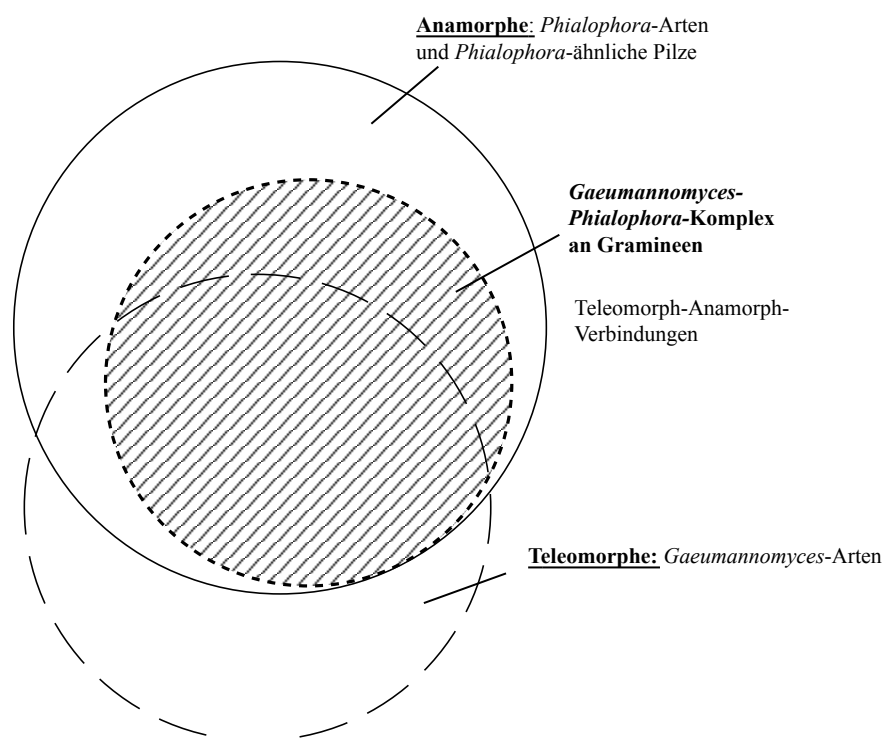


Abb. 2.1: Die Stellung der Pilze des G/P-Komplexes in Beziehung zu den Gattungen *Gaeumannomyces* und *Phialophora* (nach Hornby, 1998).

2.2. Infektionsmechanismus und Pathogenese

Die Pilze des G/P-Komplexes sind typische Wurzelbewohner, die im Boden in Abwesenheit der Wirtspflanze nur wenig konkurrenzfähig sind. Wurzeloberfläche und Halmbasis der Gramineen stellen eine ökologische Nische an der Grenzfläche zwischen Boden und Pflanze dar, in der diese Pilze ihr charakteristisches ektotrophes Wachstum entlang der Wurzeln entfalten können.

Der Infektionsprozeß kann als Zyklus gesehen werden, der mit dem saprophytischen Stadium beginnt (Abb. 2.2). In diesem Stadium kann der Pilz in Form von Mycelresten oder Ascosporen an infizierten Pflanzenrückständen im Boden bis zu drei Jahren überdauern. Stoppeln und Wurzelreste der Vorfrucht sind die wichtigste Infektionsquelle der Schwarzbeinigkeit, aber auch Ausfallgetreide und Ungräser spielen als „grüne Brücke“ eine wichtige Rolle. Die Erstinfektion erfolgt oft schon im Herbst, wenn der Pilz mit Keimwurzeln von Gramineen in Kontakt kommt. Damit beginnt die parasitische Phase. Während des Winters entwickelt sich die Krankheit nur langsam, der Pilz wächst jedoch, solange der Boden über 2°C warm und feucht genug ist. Wenn die Temperatur im Frühjahr und Sommer ansteigt, befällt die Krankheit alle Teile der Pflanze, die in direktem Kontakt mit dem Boden stehen und verbreitet sich im Wurzelbereich durch Laufhyphen schnell von Pflanze zu Pflanze. Selbst eine relativ kleine Bodenpopulation kann deshalb unter ungünstigen Bedingungen bereits zu einem schwerem Befall führen.

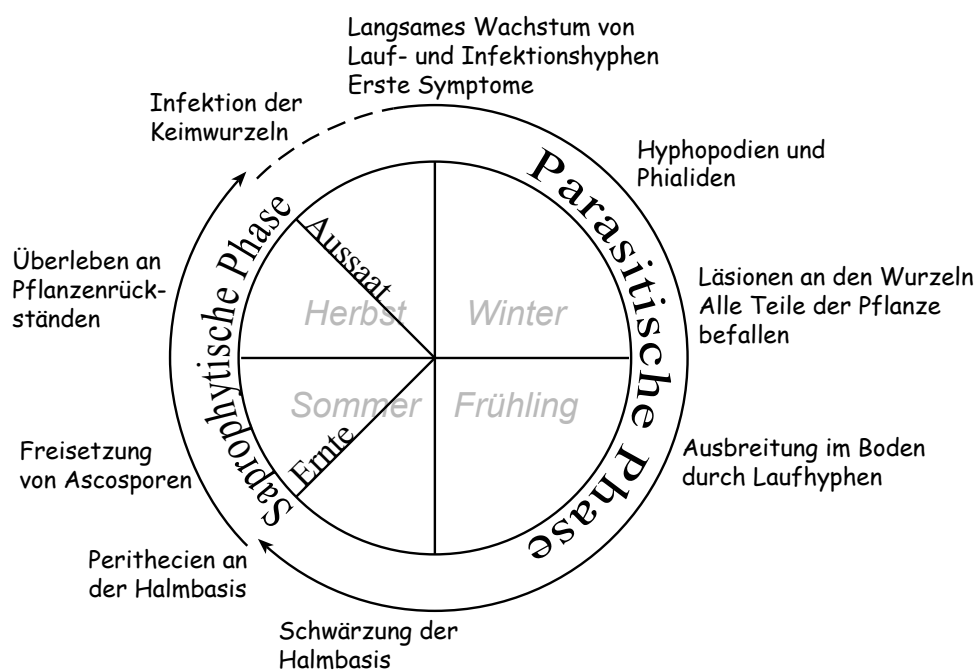


Abb. 2.2: Lebenszyklus von *G. graminis* var. *tritici* an Winterweizen (nach Hornby, 1998).

Schon bald nach der Infektion ist an den Wurzeln das für die Pilze des G/P-Komplexes charakteristische ektotrophe Mycel zu erkennen, das aus dunklen, dickwandigen Makrohyphen (Laufhyphen) und dünnwandigen Mikrohyphen (Infektionshyphen) besteht (Garrett, 1934). Die frühe Phase der Pathogenese, die durch die Verzweigung und Ausbreitung des Pilzes gekennzeichnet ist, erfordert eine erhöhte Biosyntheseleistung von Zellwand-

bestandteilen wie z.B. des linearen Polymers Chitin (Trinci, 1979; Yarden und Russo, 1995). Vom Hauptinfektionsort wachsen die Laufhyphen, die erst dünn und durchsichtig sind und mit zunehmendem Alter dicker und dunkel werden, vorrangig longitudinal als Einzelhyphen oder in Hyphensträngen über die Wurzeloberfläche oder in den äußeren Rindenschichten der Wurzel (Nilsson, 1972; Holden, 1976). Nach Verzweigung der Laufhyphen, die nun die Wurzeloberfläche umhüllen, werden - oft ausgehend von Hyphenclustern - die dünnen hyalinen Infektionshyphen gebildet, die strahlenförmig in die Zellen der Wurzelrinde und der Endodermis eindringen (Walker, 1981; Skou 1981).

Entsprechend der Stärke des Eindringens wurden die Pilze des G/P-Komplexes in stark, schwach und nicht aggressive Typen eingeteilt (Abb. 2.3; Deacon, 1974; Holden, 1976). Die Infektionshyphen stark aggressiver Pilze wie *G. graminis* var. *tritici* und *avenae* durchdringen alle 6 Zellschichten der Wurzelrinde und die Endodermis von Weizenkeimwurzeln.

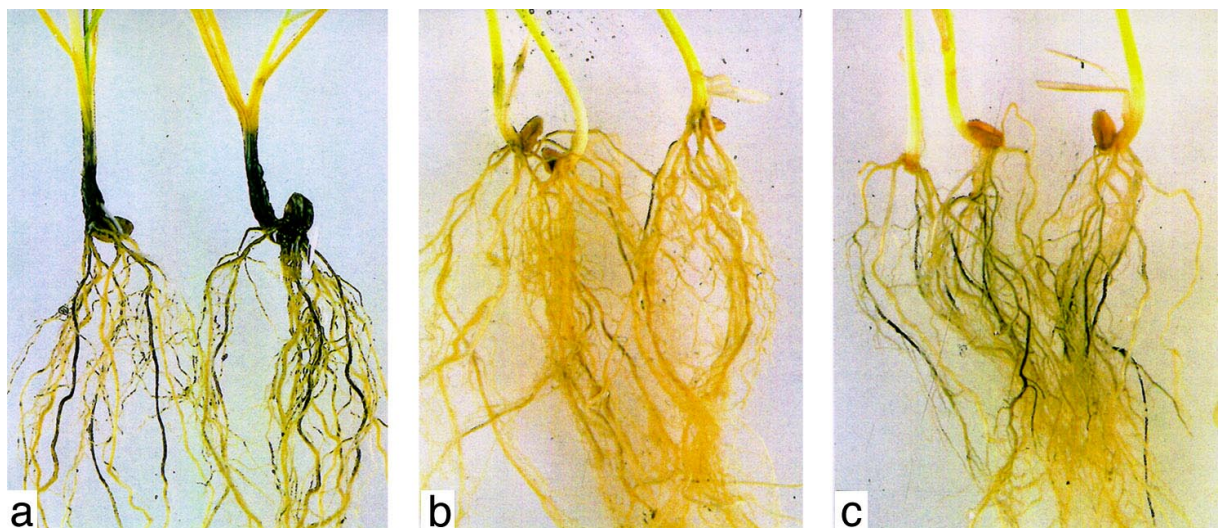


Abb. 2.3: Infektion von Weizenwurzeln durch (a) *G. graminis* var. *tritici*, (b) *G. graminis* var. *graminis*, (c) *G. cylindrosporus* (aus Hornby *et al.*, 1990)

Der Pilz erreicht den Zentralzylinder, besiedelt und zerstört das Phloem und schneidet dadurch die Zulieferung von Photosyntheseprodukten zu den Teilen der Wurzel ab, die unterhalb des zerstörten Gewebes liegen. Die nachfolgende Besiedlung des Xylems ist durch braun-schwarze Verfärbung und Entstehung von dunklen Wurzelläsionen gekennzeichnet. Bei den schwach pathogenen Pilzen, zu denen *G. graminis* var. *graminis* und seine anamorphe Form *Phialophora* sp. (mit gelappten Hyphopodien) gehören, gleicht das erste Stadium der Infektion dem der starken Pathogene. Die schwach pathogenen Pilze durchdringen jedoch nur die äußeren Schichten der Wurzelrinde und bilden dort, möglicherweise als Reaktion auf eine

Wachstumsbarriere der Pflanze, charakteristische dunkel pigmentierte terminale Hyphenverdickungen (Deacon, 1976). Bei *G. graminis* var. *graminis* sind diese Strukturen leicht oder stark gelappt und erinnern in ihrer Form an gelappte Hyphopodien (Holden, 1974; Deverall et al., 1979). In den Wurzeln, die mit *Phialophora* sp.-Isolaten infiziert waren, wurden dagegen runde, geschwollene Zellen mit Poren gefunden, die einzeln oder in Clustern auftraten (Deacon, 1974; Hornby, 1998). In einigen Fällen wird der Zentralzylinder der Lateralwurzeln besiedelt, was an lokalen Gefäßverfärbungen zu sehen ist. Nicht pathogene Pilze wie z.B. *Phialophora graminicola* und eine Reihe von *Phialophora* sp.-Isolaten durchdringen die äußeren 5 Zellschichten der Rinde, beenden dann kurz vor der Wurzelendodermis das Wachstum und bilden dort wie die schwach pathogenen Pilze terminale Hyphenverdickungen (Holden, 1976).

Wenn das vegetative Mycel mit hydrophoben Oberflächen wie z.B. der Zellwand eines Wurzelhaares oder einer Epidermiszelle in Berührung kommt, werden an den Spitzen der Infektionshyphen große melaninhaltige Zellen gebildet, die den Appressorien von *M. grisea* sehr ähnlich sind (Epstein et al., 1994, Frederick et al., 1999). Die Funktion dieser dickwandigen Zellen, die Hyphopodien genannt werden, ist noch nicht bekannt. Ob die Hyphopodien, wie es lange angenommen wurde - ähnlich wie die Appressorien - als Ausgangspunkt für das Eindringen der Hyphen in die Wirtszellen dienen, ist noch umstritten. In Analogie zu den Appressorien von *M. grisea*, bei denen der Aufbau eines enormen Druckes die mechanische Kraft für die Durchdringung der Wirtszellen liefert, konnten Money et al. (1998) auch bei den Hyphopodien von *G. graminis* var. *graminis* einen Zusammenhang zwischen Melanineinlagerung, Turgor und Stabilität der Zellwand finden. Allerdings war der Turgordruck wesentlich geringer als bei den echten Appressorien (Howard et al., 1991; Money et al., 1998). Auch das Auffinden von Mutanten, die keine Hyphopodien bilden und dennoch in der Lage sind, die Wurzeln von Reispflanzen zu besiedeln und zu infizieren, zeigt, daß die Hyphopodien bei *G. graminis* nicht für die Infektion der Wirtspflanze notwendig sind (Epstein et al., 1994). Es wird angenommen, daß ihre Funktion eher darin besteht, innerhalb der infizierten Wurzel als Überdauerungsstrukturen des Pilzes zu dienen und den Ausgangspunkt für die Weiterverbreitung des Pilzes in den folgenden Wachstumsperioden zu bilden (Parbery und Emmett, 1977; Epstein et al., 1994).

Auch die in die Zellwände der Hyphopodien und Laufhyphen eingelagerten Melanine spielen möglicherweise eine Rolle beim Überleben der Pilze unter extremem Streß, wie z.B. Nährstoffarmut, UV-Strahlung oder hohen Temperaturen (Henson et al., 1999). Die

Einlagerung von Melanin verleiht den Pilzhypen Festigkeit und Stabilität und vermindert die Permeabilität der Zellwände (Money und Howard 1997; Money *et al.*, 1998). Bei *G. graminis* var. *tritici*, dem Erreger der Schwarzbeinigkeit an Weizen stellt die Melaninsynthese eine notwendige Voraussetzung zur Infektion und Ausprägung der Krankheitssymptome dar (Kelly *et al.*, 1997). Die Laufhyphen und Hyphencluster können aufgrund der Melanineinlagerung den Druck aufbauen, der für die Besiedlung der Wurzeloberfläche und die mechanische Penetration der Wurzelrinde durch die Infektionshyphen notwendig ist. Im Gegensatz dazu zeigten Frederick *et al.* (1999), daß zur Infektion von Reispflanzen durch den wesentlich stärker pigmentierten Erreger *G. graminis* var. *graminis* kein Melanin erforderlich ist. Gegen einen direkten Zusammenhang zwischen Melanineinlagerung und Pathogenität spricht auch die Tatsache, daß die Hyphen der nicht pathogenen anamorphen *Phialophora*-Arten stärker pigmentiert sind als die der *Gaeumannomyces*-Arten (Henson *et al.*, 1999).

Die erste Auseinandersetzung zwischen Pathogen und Wirtspflanze beginnt, wenn die Infektionshyphne die äußere Rindenschicht der Wurzel berührt und die Zersetzung der Zellwand einleitet. Die Aktivität der Wirtszelle zeigt sich als erstes an der Verdickung der Zellwand direkt am Infektionsort (Holland und Fulcher, 1971). Die Wirtspflanze bildet als Antwort auf die Infektion ligninhaltige Strukturen um die eindringenden Hyphenspitzen, die „Lignituber“ genannt wurden (Fellows, 1928; Soon *et al.*, 1997). Diese Strukturen werden in die Zellwand integriert und bilden eine physikalische Barriere, die die weitere Ausbreitung der Pilzhypen erschwert bzw. verhindert. Untersuchungen von Weste (1972) zeigten, daß die Lignituberbildung schon acht Stunden nach Infektion mit *G. graminis* begann und nach 21 Stunden abgeschlossen war. Noch während die Lignituber wachsen, werden sie von innen durch die Infektionshyphne aufgelöst. Wie *G. graminis* die Lignituber, die sich aus den drei Hauptbestandteilen Cellulose, Hemicellulose und Lignin zusammensetzen, durchdringt, ist bisher nicht bekannt. Es wird angenommen, daß mehr noch als die mechanische Druckwirkung, die durch die melaninverstärkten Hyphen ausgeübt wird, verschiedene Enzyme an der Zersetzung der Zellwand beteiligt sind (Holland und Fulcher, 1971). Xylanasen, Polygalacturonase, Pectinmethylesterase, Cellulasen, weitere Glucanasen sowie Peptidasen wurden in *G. graminis* und *Phialophora* sp.-Isolaten nachgewiesen (Dori *et al.*, 1995; Southerton *et al.*, 1993; Weste, 1970; Holden und Ashby, 1978; Sivasithamparam und Parker, 1981). Edens *et al.* (1999) isolierten und charakterisierten eine extracelluläre Laccase aus *G. graminis* var. *tritici*, die möglicherweise als Lignin-abbauendes Enzym an der

Durchdringung der Lignituber beteiligt ist und außerdem für die Melaninsynthese in den Hyphen des Pathogens Bedeutung hat. Auch der Zusammenhang zwischen Infektion, Virulenz und der Produktion von Zellwand-zersetzenden Enzymen durch *G. graminis* wurde mehrfach gezeigt (Weste, 1970; Holland und Fulcher, 1971; Pearson, 1974; Martyniuk, 1988; Dori *et al.*, 1995). Über das Vorhandensein bestimmter Enzyme und ihren Einfluß auf die Pathogenität der *G. graminis*-Isolate existieren jedoch zum Teil sehr widersprüchliche Ergebnisse, die nicht zuletzt auf Unterschiede zwischen verwendeten Isolaten und Nachweismethoden zurückzuführen sind.

Im weiteren Verlauf, bald nachdem die Infektionshyphen die Spitze des Lignitubers durchdrungen hat, stirbt die Wurzelzelle ab. Die Membranen werden gesprengt, die Infektionshyphen besiedeln die „eroberte Zelle“ mit Mycel und breiten sich zu den benachbarten Zellen aus. Bei den stark aggressiven Pilzen setzt sich die „Attacke“ wie eine Front quer durch die Wurzel bis zum Zentralzylinder durch. Die Besiedlung und Verstopfung des Phloems und Xylems führt zur typischen braun-schwarzen Verfärbung der Leitbündel. Oft wird die gesamte Wurzel durch dunkle Laufhyphen und Mycelzusammenballungen auf der Wurzeloberfläche und in den äußeren Rindenschichten schwarz verfärbt. Die Pflanze kann nicht mehr ernährt werden und stirbt ab. Am toten Gewebe bildet der Pilz, jetzt wieder als Saprophyt, während seines sexuellen Stadiums Perithechien, die Asci und Ascosporen produzieren. Mycelreste und Ascosporen überdauern an den Pflanzenrückständen, und sind bereit für den nächsten Angriff.

2.3. Bedeutung und Verbreitung der Schwarzbeinigkeit

Unter den Pilzen des G/P-Komplexes besitzt der sogenannte „Weizen-Take-all-Pilz“ *G. graminis* var. *tritici* die größte Bedeutung. Die durch diesen Pilz verursachte Schwarzbeinigkeit gilt als weltweit bedeutendste Wurzelkrankheit von Weizen und Gerste (Garrett, 1981; Heim *et al.*, 1986; Huber und McCay-Buis, 1993). Der Erreger ist weit verbreitet über die Weizen-anbauenden Regionen der gemäßigten Klimazone, kommt aber auch in subtropischen und tropischen Gebieten vor (Garrett, 1981). Die Krankheit kann sich bei Boden-pH-Werten zwischen 5,5 und 8,5 und Bodentemperaturen zwischen 5° und 30°C entwickeln, schwerere Infektionen beschränken sich jedoch auf Temperaturen von 12-20°C (Hornby, 1981).

Neben Weizen befällt *G. graminis* var. *tritici* vor allem Triticale und Gerste aber auch ca. 350 Gräserarten inklusive Quecke. Die Schwarzbeinigkeit ist eine der Hauptursachen für den Ertragsrückgang in Fruchtfolgen mit hohem Getreideanteil insbesondere beim Anbau von Weizen nach Weizen, und der am stärksten begrenzende Faktor für den Daueranbau von Getreide (Monsanto). Die in den letzten Jahren immer häufiger vorkommende Witterungskonstellation - feuchte, milde Winter, feuchtes Frühjahr und Vorsommertrockenheit - führen im Zusammenhang mit immer enger werdenden Getreidefruchtfolgen und früheren Aussatterminen zu einem verstärkten Auftreten der Krankheit.

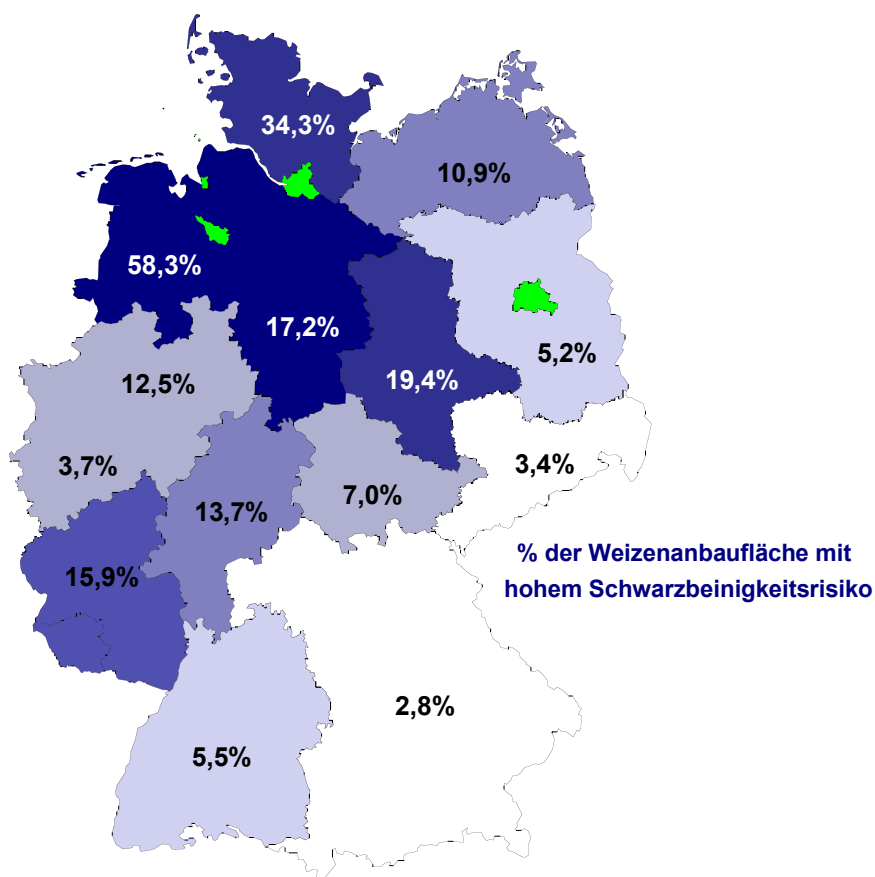


Abb. 2.4: Prognose der Schadenswahrscheinlichkeit für Deutschland. Anhand von Informationen über Anbausysteme und langjährige Wetterdaten kann das Schwarzbeinigkeitsrisiko für die entsprechenden Regionen vorhergesagt werden (Monsanto).

In Mittel- und Westeuropa spielt *G. graminis* besonders in den Ländern eine große Rolle, in denen Weizenanbau eine entscheidende wirtschaftliche Bedeutung besitzt. In Deutschland führt die Schwarzbeinigkeit zu jährlichen Ernteverlusten von bis zu 35% (Mielke, 1983), was einem jahresabhängigen Schaden zwischen 55 und 90 Millionen DM entspricht. Der Erreger kann nahezu auf allen Weizenanbauflächen nachgewiesen werden. Untersuchungen haben

gezeigt, daß auf 38% der deutschen Weizenanbaufläche ein hohes bzw. mittleres Schwarzbeinigkeitsrisiko besteht (Abb. 2.4, Monsanto). Für England werden durchschnittliche Ertragsverluste zwischen 3 und 15% geschätzt, bei ungünstigen Bedingungen können sogar bis zu 62% erreicht werden (Oerke *et al.*, 1994). Auch in Frankreich werden jährlich große Ernteverluste infolge der Schwarzbeinigkeitskrankheit verzeichnet. Besonders im nördlichen Teil des Landes wird diese Getreidekrankheit als das größte Hindernis für die Steigerung der Weizenproduktion angesehen. In den USA, die einen der größten Weizen-Exporteure der Welt darstellen, wird der Zusammenhang zwischen zunehmender Intensivierung des Anbaus und dem Ansteigen des *G. graminis*- Befalls immer deutlicher. Im Nordwesten des Landes an der Pazifik-Küste wurden Verluste von etwa 20% geschätzt (Fowell *et al.*, 1991). In den trockenen Gebieten des Columbia-Beckens, das das bedeutendste Weizenanbaugebiet dieser Region darstellt, stiegen die durch die Schwarzbeinigkeitskrankheit bedingten Ertragsverluste durch die landwirtschaftliche Nutzung von ehemaligem Wüstenboden, der arm an Antagonisten ist, auf über 50% an (Hornby, 1998). Auch in Australien ist die Schwarzbeinigkeitskrankheit die Hauptursache für Verluste im Weizen- und Gersteanbau. Im westlichen Teil des Landes betragen die durchschnittlichen jährlichen Verluste 30 bis 50% (Cotterill und Sivasithamparam, 1989; Fowell *et al.*, 1991). In den Ländern Südamerikas, Asiens und in Afrika gewinnt die Krankheit besonders durch den intensiveren Anbau immer mehr an Bedeutung.

Selbst 150 Jahre nachdem die Krankheit zum ersten Mal registriert wurde, sind die Möglichkeiten zur wirksamen Bekämpfung begrenzt. Bisher gibt es weder Sortenresistenzen noch wirksame chemische Kontrollmöglichkeiten gegen die Schwarzbeinigkeitskrankheit. Um die Ausbreitung des Pilzes zu verhindern, werden deshalb in der landwirtschaftlichen Praxis Anbauverfahren wie z.B. die Vermeidung von engen Getreidefruchtfolgen und Getreidemonokulturen, der Verzicht auf frühe Saattermine, die Ungrasbekämpfung und die Reduzierung der Aussaatstärke eingesetzt. Im letzten Jahr wurden zwei neue Wirkstoffe zur chemischen Bekämpfung zugelassen: Fluquinconazol (AgrEvo), das unter dem Handelsnamen „Jockey“ vertrieben wird, und ein Wirkstoff mit der Bezeichnung MON 65500 (Monsanto). Die Anwendung dieser Mittel erfolgt als Zusatzbeizung. Beide Wirkstoffe zeigten im Test eine mehr oder weniger starke positive Wirkung auf den Wurzelbefall (Kröcher, 1999) und müssen nun in der Praxis überprüft werden.

2.4. Biologische Kontrolle der Schwarzbeinigkeit

In den letzten 25 Jahren gewann die biologische Kontrolle als alternative Strategie immer größere Bedeutung und man hoffte auf diese Weise, nachdem alle anderen Methoden deutliche Nachteile gezeigt hatten, einen Weg zur Bekämpfung der Schwarzbeinigkeit zu finden.

Krankheiten, die durch bodenbürtige, wurzelinfizierende Pilze verursacht werden, stellen einen Präzedenzfall für die biologische Kontrolle dar, weil die Erreger unter bestimmten Bedingungen im Boden der natürlichen biologischen Kontrolle durch die Bodenmikroflora ausgesetzt sind. Die bekannteste und effektivste Form der natürlichen biologischen Kontrolle ist der „Take-all-decline-effekt“ (TAD; Rovira und Wildermuth, 1981; Hornby, 1983). Dieser Effekt, der erstmals vor ca. 30 Jahren auf langjährigen Weizen-Monokulturen in Rothamsted beobachtet wurde, entwickelt sich nach starken Ausbrüchen der Krankheit infolge enger Getreide-Fruchtfolgen und stellt, wenn er einmal induziert und aufgebaut wurde, einen effektiven Schutz vor weiteren schweren Epidemien dar. Die genaue Ursache dieses Phänomens ist nicht bekannt, es wird angenommen, dass Veränderungen der antagonistischen Mikroflora eine Rolle spielen.

Viel Geld und Zeit wurde investiert, um nach dem Auftreten von TAD-Effekten aus den sogenannten „suppressive soils“ spezifische Antagonisten zu isolieren und zu patentieren (Mathre *et al.*, 1999). Bakterienpräparate auf der Basis von *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas fluorescens*, die aufgrund ihrer ökologischen und physiologischen Eigenschaften geeignet erschienen (Paveley *et al.*, 1992; Becker und Schwinn, 1993; Cook *et al.*, 1995) sowie Kombinationsprodukte (Ryder und Rovira, 1993; Stephens *et al.*, 1994) brachten aber nicht den gewünschten Erfolg. Eine bessere Möglichkeit für die biologische Kontrolle der Schwarzbeinigkeit und ähnlicher Krankheiten scheint in der Nutzung apathogener Pilze des G/P-Komplexes zu bestehen. Diese, mit den Pathogenen eng verwandten Mikroorganismen, besiedeln die gleiche ökologische Nische und sind in gleicher Weise wie die Krankheitserreger an die gegebenen Bedingungen angepaßt (Deacon, 1981). Zu einer Unterdrückung des Pathogens kommt es dann, wenn der Antagonist die Wurzeln besiedelt, bevor das Pathogen angreift. Das Hauptprinzip der biologischen Take-all-Kontrolle durch schwach pathogene, parasitisch lebende Pilze scheint sowohl in der Konkurrenz um Ressourcen und Infektionsstellen in den natürlich absterbenden Rindenschichten der Getreidewurzel als auch in der Antwort der Wirtspflanze auf den Antagonisten zu bestehen. Die Antwort der Wirtspflanze äußert sich entweder in der Bildung physikalischer Barrieren, die z.B. an

gesteigerter Lignineinlagerung in die Zellwand zu erkennen sind, oder in der Förderung des Pflanzen-, speziell des Wurzelwachstums zur Kompensierung der pathogenen Wirkung (Sivasithamparam, 1998).

Scott (1970) isolierte einen apathogenen Pilz von einer Grünlandfläche in England, der das Mycelwachstum des Take-all-Erregers *G. graminis* var. *tritici* an Weizen-Testpflanzen hemmte. Der Pilz wurde später als *P. graminicola*, Nebenfruchtform von *G. cylindrosporus* identifiziert und stand im Mittelpunkt vieler Untersuchungen zur biologischen Take-all-Kontrolle auf Rasenflächen, aber auch im Getreideanbau z.B. nach Brachen (Deacon, 1973; Slope *et al.*, 1978; Gutteridge und Slope, 1978). Untersuchungen von Speakman und Lewis (1978) zeigten, dass *P. graminicola* nicht nur die Rindenschichten der Wurzel besiedelt, sondern außerdem die Pflanzenzellen dazu anregt, physikalische Barrieren in Form von Endodermisverdickungen in der Wurzel zu produzieren und damit das Eindringen des Pathogens abzuwehren. Tivoli *et al.* (1974) isolierten schwach pathogene *G. graminis* var. *tritici*-Isolate aus TAD-Böden und zeigten deren Eignung zur Präinokulation von Weizenpflanzen in Gefäßuntersuchungen. Bei den Untersuchungen wurden Hinweise dafür gefunden, daß der Antagonist in der Wirtspflanze eine Resistenz bzw. Immunisierung gegenüber pathogenen Isolaten induziert. Auch die Nutzung von nicht pathogenen *G. graminis* var. *graminis*/*Phialophora* sp.-Isolaten zur Unterdrückung der Schwarzbeinigkeit wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Wong und Southwell, 1980; Deacon, 1981; Wong, 1981). Kälteresistente *G. graminis* var. *graminis*-Isolate, die in Feldversuchen Ertragssteigerungen von 30 bis 45% bei Weizen brachten, wurden in Australien patentiert (Wong, 1994; Wong *et al.*, 1996). Duffy und Weller (1995) führten Versuche zur Anwendung apathogener *G. graminis* var. *graminis*-Stämme in Kombination mit fluoreszierenden Pseudomonaden in den USA durch.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen, daß alle diese zur biologischen Kontrolle verwendeten Organismen unter Feldbedingungen nicht annähernd die Wirkung und die Dauerhaftigkeit des natürlichen TAD-Effekts bringen (Martyniuk und Myskow, 1984; Speakman, 1984). Der Grund dafür liegt mit großer Wahrscheinlichkeit darin, dass der TAD-Effekt ein Ausdruck für die Kombinationswirkung verschiedener Antagonisten und Kontrollmechanismen ist, die innerhalb eines breiten Spektrums von Bedingungen wirken können (Hornby, 1998). Auch spielt das quantitative Verhältnis zwischen Pathogen und Antagonist im Boden eine entscheidende Rolle. Deacon (1974) zeigte z.B., daß für die Kontrolle von *G. graminis* var. *tritici* ein 5:1 Verhältnis zwischen *G. graminis* var. *tritici* und *Phialophora graminicola* in

Form eines Kornmehl/Sand-Gemisches notwendig ist. Darüber hinaus gehören die verwendeten Antagonisten nicht zur endogenen Mikroflora und können sich so nach der Applikation nicht immer optimal etablieren. Die Entwicklung biologischer Kontrollmethoden mit ausreichender Wirksamkeit und Kosteneffizienz erfordert somit weitere Untersuchungen der komplizierten Wechselwirkungen zwischen Pathogen, Antagonist und Umwelt.

2.5. Konventionelle Unterscheidungsmethoden und ihre Grenzen

Die konventionellen Methoden zur Identifizierung und Differenzierung der Pilze des G/P-Komplexes beschränken sich im wesentlichen auf die Untersuchung der Pathogenität und des Wirtsspektrums, die morphologische Charakterisierung und biochemisch-physiologische Untersuchungen. Die Nutzung moderner genetischer Differenzierungsmethoden erlaubte einen tieferen Einblick in die verwandtschaftlichen Beziehungen der Pilze des G/P-Komplexes und zeigte darüber hinaus eine ungeahnte Vielfalt auf Gattungs-, Art- und Varietäten-Ebene. Durch diese Ergebnisse wurden auch die Grenzen und die Unvollkommenheit der konventionellen Differenzierungsverfahren immer offensichtlicher.

Der traditionelle Weg zur Erkennung eines *G. graminis* var. *tritici*-Isolates besteht im Nachweis charakteristischer Symptome der Schwarzbeinigkeit wie infizierter Leitbündel und dunkler Läsionen an der Hauptwurzel infizierter Weizenkeimlinge nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Wochen im Infektionstest (Hornby, 1981). *G. graminis* var. *graminis* wird dagegen als gegenüber Weizen nicht pathogener Pilz beschrieben, der zu weniger intensiven Verfärbungen von Wurzeln und Halmbasis führt als die Vertreter der Varietät *tritici*. Untersuchungen von Cunningham (1981) und auch eigene Beobachtungen zeigten jedoch, daß die Pathogenität von *G. graminis*-Isolaten je nach physiologischem Zustand der Isolate starken Schwankungen unterworfen ist bzw. durch Haltung auf künstlichen Medien verloren gehen kann. Außerdem wurden wiederholt *G. graminis* var. *graminis*-Isolate gefunden, die sehr aggressiv gegenüber Weizen reagieren (Nilsson, 1972; Roy *et al.*, 1982; Augustin, 1999).

Auch die von Walker (1981) beschriebene Differenzierung der *G. graminis*- Varietäten *tritici*, *avenae* und *graminis* durch Kombination von Ascosporenlänge und Hyphopodienform führt in vielen Fällen nicht zum Ziel. Neben *G. graminis* var. *graminis*-Isolaten mit gelappten Hyphopodien, die als eindeutiges Erkennungsmerkmal für diese Varietät bekannt sind, wurden auch Isolate mit einfachen Hyphopodien gefunden (Walker, 1981). Die Differenzierung der eng verwandten Varietäten *tritici* und *avenae* nach der unterschiedlichen

durchschnittlichen Länge ihrer Ascosporen (60-110 μm bzw. 74-147 μm) wird nicht nur durch Überlappungen der Werte erschwert, sondern auch durch die Unfähigkeit vieler Isolate, Perithezien zu bilden.

Neben anderen Selektivmedien wird für die Isolate des G/P-Komplexes hauptsächlich das Halb-Selektivmedium SM-GGT3 (Juhnke *et al.*, 1984) verwendet, das zusätzlich zu den zur Unterdrückung von Konkurrenten verwendeten Antibiotika und Antimycotica L-DOPA (L- β -3,4-Dihydroxyphenylalanin) enthält, das sich beim Entstehen von Melanin braunschwarz verfärbt. Jedoch eignet sich das Medium mehr zur Identifizierung oder Isolation der Pilze des G/P-Komplexes als zu ihrer Differenzierung. Durch Modifikation der Zusammensetzung des SM-GGT3-Mediums können die Isolate der Varietäten *tritici* und *avenae* anhand der Braunfärbung des Agars von den anderen *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolaten unterschieden werden (Augustin *et al.*, 1999). Zur Differenzierung der eng verwandten und auch in Kultur sehr ähnlichen Varietäten *tritici* und *avenae* wurde ein Agar auf Haferblatt-Basis entwickelt, dessen Eignung allerdings noch umstritten ist (Bateman *et al.*, 1992). Die Isolate der Varietät *avenae* sind im Gegensatz zu den Pilzen der Varietät *tritici* durch die Produktion des Enzyms Avenacinase in der Lage, das in den Haferwurzeln befindliche antimycotisch wirkende Saponin Avenacin zu detoxifizieren und besitzen damit die Voraussetzung zum Wachstum auf diesem Agar und zur Infektion von Haferwurzeln (Turner, 1961; Crombie *et al.*, 1986; Osbourn *et al.*, 1991; Bowyer *et al.*, 1995). Andererseits macht das Auffinden von haferinfizierenden *G. graminis* var. *tritici*-Isolaten (Yeates *et al.*, 1986; O'Dell *et al.*, 1992; Augustin, 1999) deutlich, daß die Pathogenität gegenüber dieser Wirtspflanze kein Privileg der Pilze der Varietät *avenae* ist. Auch weitere Versuche, die Isolate des G/P-Komplexes auf der Grundlage physiologischer Eigenschaften zu unterscheiden, erwiesen sich als nicht erfolgreich. Sowohl die Fähigkeit, auf extremen osmotischen Potentialen zu wachsen (Wong, 1983) als auch unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten (Wetzel *et al.*, 1996) konnten nur begrenzt zur Differenzierung der *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate verwendet werden.

Insgesamt wird deutlich, daß sowohl phänotypische als auch physiologische Eigenschaften neben dem enormen Zeitaufwand extrem abhängig von der Versuchsdurchführung und der Auswahl der Isolate sind und daher nur begrenzt zur Unterscheidung der Pilze eingesetzt werden können. Auch führten Untersuchungen, die ausschließlich auf morphologischen Kriterien und Pathogenitätsuntersuchungen beruhen, in vielen Fällen zu Fehlbestimmungen (Ward und Gray, 1992; Bryan *et al.*, 1995; Ward und Akrofi, 1994). Besonders problematisch

ist die taxonomische Einordnung von Isolaten mit atypischen bzw. überlappenden Eigenschaften, von *Phialophora*-Isolaten mit unbekannter Hauptfruchtform und von neuen, taxonomisch noch nicht beschriebenen Gruppen innerhalb des G/P-Komplexes.

2.6. Molekulare Klassifizierungsmethoden

Die Probleme, die bei den konventionellen Differenzierungsmethoden auftraten, erforderten die Nutzung alternativer Verfahren. So wurden in den letzten Jahren serologische Methoden wie z.B. die ELISA-Technik (enzyme linked immunosorbent assay) zum Nachweis pflanzenpathogener Pilze verwendet, die zwar leicht handhabbar sind, jedoch oft nicht die erwünschte Spezifität bringen (Fox, 1993; Beyer *et al.*, 1993; Schots *et al.*, 1994). Versuche, *G. graminis* var. *tritici* auf der Basis von polyklonalen Antiseren in infizierten Weizenwurzeln nachzuweisen bzw. Beziehungen zwischen den *G. graminis*-Varietäten zu finden, zeigten deutlich die Grenzen der serologischen Methoden (El-Nashaar *et al.*, 1986; Abbott und Holland, 1975). Die Herstellung monoklonaler Antikörper für *G. graminis* als Voraussetzung zur spezifischen Identifizierung gelang bisher nicht, so daß sich insgesamt der serologische Nachweis der Pilze des G/P-Komplexes als problematisch erweist. Die schnellen Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie führten dazu, daß DNA-Techniken heute die Effektivität und Sensitivität der Mehrzahl der serologischen Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von phytopathogenen Pilzen weit übertreffen (Cahill, 1999).

Molekulargenetische Methoden können zur Identifizierung und Klassifizierung von Organismen auf allen taxonomischen Ebenen genutzt werden. Die Vorteile dieser Methoden, die auf Unterschieden im genetischen Material basieren, bestehen in der Unabhängigkeit der DNA-Merkmale vom physiologischen Zustand der untersuchten Organismen und vor allem in der großen Sensitivität, die besonders seit der Entwicklung der PCR (polymerase chain reaction, Saiki *et al.*, 1985) erreichbar ist. Die Wahl der entsprechenden Methode und des verwendeten DNA-Bereiches entscheiden darüber, auf welcher taxonomischen Ebene eine Identifizierung, Differenzierung oder Klassifizierung möglich ist. Die wichtigsten Techniken werden im folgenden kurz erläutert:

Eine Methode zur Identifizierung bzw. Differenzierung von Organismen stellt die Nutzung von **DNA-Sonden** dar, die den Nachweis von Arten- bzw. Varietäten-spezifischen DNA-Bereichen erlauben. Hierzu wird genomische DNA entweder direkt (Dot blot) oder nach

Spaltung mit Restriktionsenzymen und elektrophoretischer Auftrennung (Southern blot) auf einen Filter fixiert und mit einer markierten DNA-Sonde hybridisiert. Oft wird jedoch die Anwendung dieser Methode durch die Verfügbarkeit spezifischer DNA-Bereiche bzw. aufgrund des hohen Aufwandes zur Selektion dieser Bereiche limitiert.

Beim klassischen ***DNA-Fingerprinting***, einer Methode, die ursprünglich von Jeffreys (1985) für die Analyse menschlicher DNA entwickelt wurde, werden hochvariable repetitive Sequenzen (Satelliten-DNA), die einen beträchtlichen Teil eukaryontischer Genome ausmachen, zu Erstellung „genetischer Fingerabdrücke“ genutzt. Die hochvariablen Sequenzen sind tandemartig angeordnete Wiederholungen von DNA-Sequenzmotiven, die auch als „Minisatelliten“ (15-30 bp) bzw. „simple repeats“ oder „Mikrosatelliten“ (2-10 bp) auftreten. Die hohe Variabilität kommt durch Veränderungen in der Kopienzahl des betreffenden Sequenzmotivs zustande und kann zur Unterscheidung von Individuen genutzt werden (Schäfer *et al.*, 1988). Der Nachweis erfolgt zum Beispiel über die RFLP (Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus)- Methode, bei der die genomische DNA mit Restriktionsenzymen verdaut und die repetitiven Bereiche über spezifische DNA-Sonden (Vassert *et al.*, 1987; Epplen, 1988) als Fingerprint sichtbar gemacht werden. Die Größe der Restriktionsfragmente variiert dabei in Abhängigkeit von der Anzahl der DNA-Sequenzmotive. Ebenso können Mini- bzw. Mikrosatelliten über die PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen werden. Dabei ergibt sich ein Fingerprint bestehend aus unterschiedlich großen PCR-Produkten. Die Analyse von Mikrosatelliten hat sich inzwischen als Standardmethode zur Identifizierung und Differenzierung höherer Eukaryonten etabliert. Auch zur Charakterisierung filamentöser Pilze, wie der Gattungen *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* und *Phoma* wurde der Nachweis repetitiver DNA-Sequenzen erfolgreich angewendet (Meyer *et al.*, 1991; Hassan *et al.*, 1991; Lieckfeldt *et al.*, 1992; Groppe und Boller, 1997).

In den letzten 10 Jahren gewann die ***RAPD*** (random amplified polymorphic DNA)-***PCR***, die auch unter dem Namen AP- (arbitrarily primed) PCR bekannt ist, immer größere Bedeutung bei der Differenzierung von Arten, Varietäten und Stämmen pro- und eukaryontischer Organismen. Im Unterschied zur konventionellen PCR, bei der eine genaue Kenntnis der Sequenzen der flankierenden Regionen des zu amplifizierenden Fragmentes zur Ableitung spezifischer Primer notwendig ist, eröffnet diese Methode die Möglichkeit zum Nachweis von DNA-Polymorphismen nahezu jedes beliebigen Genoms. Die Methode, die fast zeitgleich und unabhängig voneinander in zwei verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt wurde, beruht auf

der Nutzung von kurzen, synthetischen „Single-Primern“ mit willkürlicher Basensequenz (Williams *et al.*, 1990; Welsh and McClelland, 1990). Im Gegensatz zur konventionellen PCR werden hier geringe Annealingtemperaturen zwischen 36 und 48°C verwendet. Diese geringen Temperaturen ergeben sich zunächst aus dem niedrigen Schmelzpunkt der Primer. Generell wird die RAPD-PCR bei geringer Stringenz durchgeführt. Die Häufigkeit des Auftretens von zwei Primerbindungsstellen (10 bp Übereinstimmung) in einem Abstand, der von der DNA-Polymerase synthetisiert werden kann, ist rein statistisch direkt von der Genomgröße des verwendeten Organismus abhängig (Williams *et al.*, 1991; Wöstemeyer *et al.*, 1991). Für die Gesamtgenomgröße des *G. graminis*-Genoms ($2,9 \times 10^7$ bp; McFadden und Buck, 1983) ergeben sich bei einem Abstand der Bindungsstellen von ≤ 2000 bp nur 0,04 amplifizierbare Fragmente, so daß für die durchschnittlich bei der RAPD-PCR entstehenden 6-10 Banden eine vollständige Übereinstimmung zwischen Primer- und Template-DNA unwahrscheinlich ist. Auch zeigten andere Experimente, daß die Anzahl der Banden des Fingerprints weitgehend unabhängig von der Komplexität des Genoms ist (Williams *et al.*, 1991). Das deutet darauf hin, daß die Gesamtzahl der PCR-Fragmente eher durch die Konkurrenz um Bindungsstellen als durch die Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen bestimmt wird. Eine vollständige Übereinstimmung zwischen Primer- und Template-DNA scheint für das Auffinden spezifischer Fingerprints durch die RAPD-PCR nicht erforderlich zu sein.

Optimale RAPD-Primer besitzen einen GC-Gehalt von mindestens 50% und beginnen am 3'-Ende mit Guanin oder Cytosin. Die Menge an genomischer DNA, die für die Reaktion eingesetzt wird, sollte 25 ng nicht überschreiten, um unspezifische Amplifikationen zu vermeiden (Williams *et al.*, 1991; Wöstemeyer *et al.*, 1991). Obwohl die verwendeten RAPD-Primer unabhängig vom Zielgenom einsetzbar sind, müssen dennoch in orientierenden Experimenten die geeigneten Primer für den jeweiligen Organismus und das zu lösende Problem ausgewählt werden.

Neben den „Zufallsprimern“ können auch „simple repeats“ oder „Minisatelliten“-DNA zur Ableitung von Primern wie z.B. (GTG)₅ und M13 (Vassert *et al.*, 1987) verwendet werden (Schönian *et al.*, 1993; Hering und Nierenberg, 1995). Somit können auch DNA-Bereiche, die sonst in klassischen Fingerprintmethoden als RFLP-Sonden Anwendung finden, genutzt werden. Obwohl diese Primer in Zusammenhang mit der RAPD-PCR eingesetzt werden, handelt es sich hier eher um einen spezifischen Nachweis von Sequenzen, die mehrfach im

Genom auftreten. Auch hier ergeben sich ähnlich komplexe Fingerprintmuster wie bei der Anwendung von Zufallsprimern.

Eine Modifikation der RAPD-PCR, bei der wesentlich komplexere Fingerprintmuster entstehen, wurde von Caetano-Anolles *et al.* (1991) beschrieben. Beim „DNA amplification fingerprinting“ (DAF) werden kürzere Zufallsprimer (5-8 bp) verwendet und die sich hieraus ergebende relativ große Anzahl von Amplifikationsprodukten auf Polyacrylamidgelen getrennt. Diese Methode eignet sich speziell zur Unterscheidung eng verwandter Organismen.

RAPD-Polymorphismen wurden inzwischen erfolgreich zur Differenzierung und Charakterisierung von verschiedenen phytopathogenen Pilzen eingesetzt (Crowhurst *et al.*, 1991; Wöstemeyer *et al.*, 1991; Schäfer und Wöstemeyer, 1992; Grajal-Martin *et al.*, 1993; Hering, 1993; Assigbetse *et al.*, 1994; Schleier *et al.*, 1997). In Kombination mit anderen molekularen, morphologischen und biochemischen Untersuchungen ist die RAPD-PCR zur Lösung taxonomischer und phylogenetischer Fragestellungen besonders auf der Ebene eng verwandter Arten und Stämme geeignet (Caetano-Anolles *et al.*, 1991; Lieckfeldt *et al.*, 1992; Hering und Nierenberg, 1995). Die Fähigkeit, sehr nah verwandte Organismen zu unterscheiden beruht darauf, daß die kurzen Primer auf eine Vielzahl von Template-Sequenzen im Zielorganismus treffen und auf diese Weise meist komplexe Amplifikationsgemische unterschiedlicher Fragmentgrößen erzeugt werden. Bei dem raps-pathogenen Pilz *Phoma lingam* konnten RAPD-Polymorphismen sogar zur Unterscheidung verschiedener Pathotypen genutzt werden (Schäfer und Wöstemeyer, 1992), wodurch das Potential dieser Methode zur Differenzierung auf Stammebene deutlich wurde.

Im Vergleich zur klassischen Fingerprintmethode bietet die RAPD-Technik viele Vorteile wie z.B. einen geringeren DNA-Einsatz verbunden mit weniger hohen Anforderungen an den Reinheitsgrad, Zeitersparnis und die Unabhängigkeit von zeitaufwendigen Hybridisierungsmethoden und der Verwendung markierter Sonden. Aus diesem Grund hat die RAPD-PCR gerade im Bereich des DNA-Fingerprintings die traditionellen Methoden wie den RFLP zum Teil schon verdrängt.

Weitere Möglichkeiten zur genetischen Charakterisierung von Organismen ergeben sich aus der Untersuchung von Polymorphismen bestimmter, spezifischer Regionen des Genoms. Als besonders geeignet zur Differenzierung von Taxa auf verschiedenen Ebenen und vor allem zur Analyse phylogenetischer Beziehungen erwies sich dabei der **rRNA-Gen-Komplex**. In Eukaryonten liegt die rDNA als vielfach tandemartig wiederholter Abschnitt von drei Genen,

oft auf mehreren Chromosomen verteilt, vor. Für ein haploides Pilzgenom werden 60-200 identische Kopien angenommen (Bruns *et al.*, 1991). Die codierenden Regionen für die 18S-, 5,8S- und 26S-rRNA bilden ein Operon (Garber *et al.*, 1988). Dieses Operon enthält zusätzlich zwei nichtcodierende Bereiche, die „internal transcribed spacer“ ITS1 und ITS2, die die drei rRNA-Gene voneinander abgrenzen (vgl. Abb. 4.8). Jedes rDNA-Operon wird wiederum durch intergene Spacer (IGS) separiert. Die verschiedenen Bereiche der rDNA zeigen hinsichtlich ihrer Variabilität große Unterschiede, die darauf zurückzuführen sind, daß die einzelnen Abschnitte einer unterschiedlich schnellen Evolution unterworfen sind (Apples und Honeycutt, 1986). Bedingt durch die Sekundärstruktur der rRNAs existieren Regionen, in denen sich Mutationen stärker oder weniger stark auf die Funktion auswirken und somit in der Evolution ein unterschiedlich konservatives Verhalten zeigen. Die hoch konservativen Bereiche der rRNA-Gene eignen sich besonders für Analysen auf Klassen- und Reichebene (Turbeville *et al.*, 1991). Andere, variabelere Bereiche sind besser für Untersuchungen von enger verwandten Organismen z.B. auf Ordnungs-, Familien- und Gattungsebene anzuwenden. Wesentlich höhere Variabilität zeigen die nicht codierenden Spacerregionen ITS1 und ITS2 und die IGS-Regionen (Nazar *et al.*, 1991; O'Donnell, 1992; Chen *et al.*, 1992). Diese Bereiche können daher für Verwandtschaftsanalysen auf der Ebene von Gattungen, Arten und innerhalb von Populationen verwendet werden. Polymorphismen treten in Form von Sequenz- und Längenunterschieden der verschiedenen Bereiche auf. Je nach Fragestellung und Wahl der zu erfassenden taxonomischen Ebene können unterschiedliche Bereiche der rDNA mit Primern amplifiziert werden, die homolog zu konservativen Regionen sind. Zur Identifizierung und Klassifizierung von Organismen bzw. Isolaten werden die entsprechenden Amplifikate durch Restriktionsanalyse oder direkte Sequenzierung analysiert. Polymorphismen in den IGS- und ITS- Regionen wurden zur taxonomischen Differenzierung, aber auch zur phylogenetischen Analyse verschiedener phytopathogener Pilze verwendet (Lee and Taylor, 1992; O'Donnell, 1992; Moukhamedov *et al.*, 1994; Appel and Gordon, 1995).

Neben der genomischen DNA kann auch die mitochondriale (mt) DNA zur Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen über mehrere taxonomische Ebenen genutzt werden. Aufgrund der relativ geringen Größe der mt-DNA lassen sich Unterschiede entweder direkt durch Restriktionsanalyse oder durch Southern-Blot-Hybridisierung mit einer entsprechenden mt-DNA-Sonde nachweisen.

2.7. Genetische Identifizierung und Klassifizierung der Pilze des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes

Die erste Methode zur spezifischen Identifizierung von *G. graminis* basierte auf einer Sonde, die ein 4,3 kb großes mitochondriales DNA-Fragment aus *G. graminis* var. *tritici* enthält (Henson, 1989). Mit dieser Sonde war es möglich, *G. graminis* und verwandte *Phialophora*-Arten von einer Reihe anderer wurzelinfizierender Pilze zu unterscheiden. Durch die Ableitung von Primern, die eine spezifische Region dieses DNA-Fragmentes amplifizieren, konnte eine PCR-Methode entwickelt werden, die den Nachweis von *G. graminis*, der vorher nur bei gereinigten Pilzisolaten gelang, nun auch in infizierten Weizenpflanzen ermöglichte (Schesser *et al.*, 1991). Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß der Einsatz eines zweiten, innerhalb des ersten Amplifikates liegenden Primerpaares (nested PCR) erforderlich ist, um die zum Nachweis des Pilzes in der Pflanze notwendige Spezifität zu erreichen (Henson, 1992; Henson *et al.*, 1993). Mit einem analogen Ansatz gelang es, *G. graminis* auch direkt im Boden zu detektieren (Ophel-Keller *et al.*, 1995). Eine Modifizierung der Methode durch Veränderung der Annealing-Temperatur erlaubte darüber hinaus die Differenzierung zwischen den zu Weizen bzw. Hafer pathogenen *G. graminis*-Varietäten *tritici* und *avenae* und der schwach pathogenen Varietät *graminis* (Ward, 1995). Auch durch Verwendung der mtDNA-Sonde (Henson, 1989) in RFLP-Analysen konnten die *G. graminis* Varietäten *tritici* und *avenae* von *G. graminis* var. *graminis* und *Phialophora graminicola* unterschieden werden (Bateman *et al.*, 1992; Ward und Bateman, 1994).

Eine Sonde, die sowohl zur Differenzierung der *G. graminis*-Varietäten *tritici*, *avenae* und *graminis* als auch zur Unterscheidung von *G. graminis* und *G. cylindrosporus* verwendet werden konnte, wurde von Ward und Gray (1992) durch Klonierung eines Teils der kleinen Untereinheit der ribosomalen mtDNA aus *G. graminis* var. *graminis* hergestellt. Zusätzlich zur Unterscheidung auf Arten- und Varietätenebene eignete sich diese Sonde zur Aufdeckung von rDNA-Polymorphismen innerhalb der *G. graminis*-Varietäten und ermöglichte somit die Untersuchung der Populationsstruktur von *G. graminis* var. *tritici*-Isolaten (Bateman *et al.*, 1997). Auf ähnliche Weise konnten Tan *et al.* (1994) durch Hybridisierung der DNA von *G. graminis*-Isolaten mit einer 26S rDNA-Sonde die Varietäten differenzieren und die Isolate der Varietät *tritici* anhand unterschiedlicher RFLP-Muster in drei rDNA-Untergruppen einteilen. Die weitere Analyse der Längenpolymorphismen in der 26S rDNA deutete auf die Anwesenheit von drei verschiedenen Introns in der großen ribosomalen Untereinheit hin und

zeigte, daß die Verteilung der Introns mit der Differenzierung der Varietäten *tritici*, *avenae* und *graminis* korreliert (Tan und Wong, 1996; Tan, 1997).

Eine wesentlich einfachere Methode zur Varietäten-Differenzierung wurde von Ward und Akrofi (1994) basierend auf der Restriktionsanalyse amplifizierter rDNA entwickelt. Unter Nutzung konservativer Primer der 18S bzw. 26S rDNA (White *et al.*, 1990) wurde die ITS1/5,8S rDNA/ITS2-Region amplifiziert. Eine anschließender Restriktionsanalyse erlaubte sowohl die Differenzierung von *G. graminis* und *G. cylindrosporus* als auch die Unterscheidung der *G. graminis*-Varietäten. Fouly *et al.* (1997) nutzten Restriktionsmuster der 18S rDNA/ITS-Region zur Unterscheidung von *G. graminis*-Arten und Varietäten und konnten Längenpolymorphismen im Bereich dieser Region zur Subklassifizierung von *G. graminis* var. *graminis*-Isolaten von verschiedenen Gräsern verwenden. Nähere Untersuchungen zeigten, daß diese Längenunterschiede auf das Vorhandensein von Introns in einer stark konservativen Region der kleinen Untereinheit zurückzuführen sind (Fouly und Wilkinson, 2000a). Alle untersuchten Isolate der Varietäten *tritici* und *avenae* enthielten Introns mit ähnlicher Sequenz, die sich deutlich von denen der *G. graminis* var. *graminis*-Isolate unterschieden.

Für die schnelle Diagnose der Schwarzbeinigkeit wurden, basierend auf Sequenzen der ITS/rDNA-Region, Primer entwickelt, die zur spezifischen Amplifikation von *G. graminis* var. *tritici* bzw. *avenae*-DNA und damit zum direkten Nachweis der Erreger im infizierten Wurzelgewebe geeignet sind (Bryan *et al.*, 1995). Nach dem gleichen Prinzip wurden varietätenspezifische Oligonukleotidprimer zur Identifizierung der Take-all Patch-Erreger *G. graminis* var. *avenae* bzw. *graminis* bei Rasengräsern entwickelt (Goodwin *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 2000; Fouly und Wilkinson, 2000b).

Neben der eigentlichen Identifizierung und Differenzierung kann die Analyse der ribosomalen DNA auch zur phylogenetischen Klassifizierung der Pilze des G/P-Komplexes genutzt werden. Anhand von Nukleotidsequenzvergleichen der ITS1- und ITS2-Region zeigten Bryan *et al.* (1995) die phylogenetischen Beziehungen der Pilze des G/P-Komplexes auf Arten- und Varietätenebene auf. Polymorphismen der rDNA innerhalb der Varietäten ergaben eine Differenzierung der Isolate der Varietät *tritici* in zwei Untergruppen und machten deutlich, daß zwei haferinfizierende australische *G. graminis*-Isolate, die ursprünglich als *G. graminis* var. *tritici* identifiziert worden waren, enger mit *G. graminis* var. *avenae* verwandt sind und möglicherweise eine neue *G. graminis*-Varietät repräsentieren (Bryan *et al.*, 1999). Die Beziehung verschiedener Mais-infizierender *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-ähnlicher

Isolate zu den Pilzen des G/P-Komplexes wurde von Ward und Bateman (1999) durch rDNA-Sequenz-Analyse untersucht. Hierbei konnte die enge Verwandtschaft der von Yao *et al.* (1992) beschriebenen Varietät *maydis* zu *G. graminis* var. *graminis* nachgewiesen werden.

In den letzten Jahren gewann eine weitere Methode, die RAPD-PCR, die besonders zur Differenzierung eng verwandter Organismen geeignet ist, immer mehr Bedeutung bei der Identifizierung und Klassifizierung der *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate. Neben der Differenzierung der Arten und Varietäten des G/P-Komplexes konnte diese Methode auch zum Nachweis der genetischen Variabilität auf subvarietaler Ebene genutzt werden (Fouly *et al.*, 1996). Bryan *et al.* (1999) zeigten anhand von Clusteranalysen der RAPD-Muster, daß RAPD-Polymorphismen auch zur Klassifizierung der Isolate des G/P-Komplexes auf subvarietaler Ebene geeignet sind.

Insgesamt brachten die molekulargenetischen Techniken große Fortschritte bei der Charakterisierung der Pilze des G/P-Komplexes und der Untersuchung der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den verschiedenen Arten, Varietäten und Isolategruppen. Besonders die Analysen der rDNA und der RAPD-Polymorphismen verdeutlichten, daß die Variabilität nicht nur zwischen Arten und Varietäten besteht, sondern auch innerhalb der Varietäten eine starke Diversität vorliegt. Aufbauend auf diesen Untersuchungen, die meist auf einer relativ geringen Anzahl von Isolaten beruhen, ist eine umfangreiche Analyse der getreideinfizierenden Pilze des G/P-Komplexes notwendig, um ein vollständiges Bild der phylogenetischen Diversität dieser Gruppe zu erhalten. Obwohl erste Untersuchungen existieren (O'Dell *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1994; Bryan *et al.*, 1995), ist derzeit noch offen, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der phylogenetischen Diversität, besonders auf subvarietaler Ebene, und phänotypischen Eigenschaften, vor allem dem Pathogenitätsverhalten, bestehen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Pilzisolat

Die in dieser Arbeit verwendeten Pilzstämme wurden von infizierten Getreidewurzeln aus landwirtschaftlich genutzten Flächen isoliert. Von den 46 in Tabelle 3.1 aufgelisteten Standorten in Deutschland wurden über einen Zeitraum von 5 Jahren 2000 *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate gewonnen. Die Untersuchungen waren überwiegend Teil des im ZALF Müncheberg bearbeiteten DFG-Projektes AU120/1-4. Für die über die RAPD-PCR hinausgehenden Analysen wurden repräsentative Isolate der unterschiedlichen Gruppen ausgewählt (Tab. 3.2). Als Referenzisolate wurden Pilze aus verschiedenen internationalen Stammsammlungen verwendet (Tab. 3.3 und 3.4).

Tabelle 3.1: Übersicht über die von verschiedenen Getreide-Anbauflächen gewonnene Anzahl von Pilzisolaten

Standort	Anzahl der Isolate ¹						Hauptfrucht ²			
	1996	1997	1998	1999	2000	Ges.	1996	1997	1998	1999
Neuendorf	8	4	14	-	-	26	WR	WR	WR	Mais
Eggersdorf	2	3	8	10	-	23	TT	WR	WR	B
Müncheberg	7	-	15	30	-	52	WG	Raps	TT/WG	TT
Waldsiedersdorf	48	38	-	7	-	93	WR	WR	Öllein	WR
Prädikow	3	1	-	7	-	11	TT	WR	WG	Raps
Prötzel	2	1	6	-	-	9	WW	WG	WR	Raps
Herzhorn	4	11	13	-	-	28	WR	SG	WG	Öllein
Frankenfelde	4	-	-	3	-	7	WW	WR	L/G	L/G
Siedlerhof	3	8	26	-	-	37	TT	WG	WR	Raps
Dannenberg	5	1	-	13	-	19	WR	WG	Raps	WW
Cöthen	2	13	7	-	-	22	WR	WR	WR	Öllein
Hohenfienow	1	1	19	-	-	21	WR	TT	WG	Raps
Liepe	9	7	6	16	-	38	WR	Lupine	WR+Gras	WR
Brodowin	11	13	9	-	-	33	WR	Gras	WR	WR
Servest	21	10	10	7	-	48	WR	WR	B	Gras
Klein Ziethen	5	9	16	-	-	30	SG	TT	WR	Raps
Schmargendorf	15	1	3	37	-	56	WW	Gras	WR	TT
Sternfelde	9	9	7	20	-	45	WW	WG/Öllein	WR+Gras	WW
Kerkow	3	7	12	-	-	22	WW	WG	WR	Mais
Neugünterberg	3	7	5	32	-	47	WW	WG	TT	WW
Schmiedeberg	8	12	-	4	-	24	WW	WG	WR	WW
Neumeichow	8	8	-	5	-	21	WW	WW	Raps	WW
Hohengüstow	5	-	3	20	-	28	WW	WW	WW	WW
Zernikow	3	3	-	7	-	13	WW	B	WG	WW
Wolfshagen	36	-	5	36	-	77	TT/WG	WW/Mais	WW	WW,TT
Zittau	7	-	-	78	-	85	WG	n.b.	n.b.	WR
Bonn/Tomberg	30	-	-	-	-	30	WW	n.b.	n.b.	n.b.
Bonn/Dickobshof	6	-	-	-	-	6	WG	n.b.	n.b.	n.b.
Göttingen	-	-	-	67	-	67	n.b.	n.b.	n.b.	WW/WG
Kiel/Hohenschulen	-	13	24	78	60 ³	138	n.b.	WW	WW	WW
Kiel/9 restl. Standorte	-	11	46	-	-	94	n.b.	WW	WW	n.b.

Friedrichshof	-	39	-	-	-	39	n.b.	WR,TT	n.b.	n.b.
Börde-Bebertal	12	-	-	-	-	12	WW	n.b.	n.b.	n.b.
Halle-Etzdorf	7	-	-	-	-	7	WW	n.b.	n.b.	n.b.
Ernsthof	-	10	-	-	-	10	n.b.	WR	n.b.	n.b.
Gramzow	-	3	-	-	-	3	n.b.	WG	n.b.	n.b.
Güterfelde	-	131	21	-	-	152	n.b.	WW/Biotest	WW	n.b.
Dedelow	59	24	124	320	-	527	TT/WW	WW	TT/B	Getreide/B

¹ Die Isolate stammten von der entsprechenden Hauptfrucht oder von Ausfallgetreide der Vorfrucht.

² WR Winterroggen, TT Triticale, WG Wintergerste, WW Winterweizen, B Brache, L/G Luzerne/Gras-Gemisch, n.b. nicht bestimmt

³ Hauptfrucht: Winterweizen

Tabelle 3.2: Herkunft und RAPD-Klassifizierung der für die weiterführende molekulargenetische und morphologisch/phänotypische Charakterisierung verwendeten Isolate des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes

Isolat	Wirtspflanze	Herkunftsort/Jahr	RAPD-Gruppe
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>			
64.1	Weizen	Hohengüstow, 1996	A1
D95, D9, D40, D100	Weizen	Dedelow, 1991	A2
D79	Weizen	Dedelow, 1991	A2 ₁₀
ND3	Weizen	Dedelow, 1995	A2 ₁₀
ND9	Weizen	Dedelow, 1995	A1
10.4.1a	Roggen	Waldsiefersdorf, 1996	A2 ₁₀
G33, G174	Gerste	Uckermark, 1985	A1
G57	Roggen	M. Oderland, 1985	A1
D109	nicht bekannt	Uckermark, 1991	A1
46.1b, 46.1/1, 46.1/2, 57.5, 46.1	Weizen	Schmargendorf, 1996	A1
10.1.2, 10.4a, 10.5.1	Roggen	Waldsiefersdorf, 1996	A2 ₁₀
G13, G8	Roggen	Friedrichshof, 1991	A1
G126	Gerste	Friedrichshof, 1986	A1
G139, G142, G132	Roggen	Müncheberg, 1986	A1
G163	Weizen	Friedrichshof, 1986	A1
83.3.3, 83.3.1	Triticale	Wolfshagen, 1996	A1
83.1	Triticale	Wolfshagen, 1996	A2
57.1	Weizen	Schmiedeberg, 1996	A2
G234	Roggen	Trebbin, 1990	A2 ₁₀
41.3	Roggen	Servest, 1996	A1
2182	Weizen	Dedelow, 1999	A2
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> / <i>Phialophora</i> sp. (gelappte Hyphopodien)			
29.1, 29.5b	Roggen	Dannenbergl, 1996	B
12.1, 12.4	Roggen	Ernsthof, 1996	B
18.5, 18.1	Roggen	Herzhorn, 1996	B
61.5, 64.4	Weizen	Hohengüstow, 1996	B
5.1, 5.4	Triticale	Eggersdorf, 1996	B
79.3	Weizen	Zernikow, 1996	B

33.2	Roggen	Hohenfinow, 1996	B
G206	Gerste	Golzow, 1989	B
G229	Roggen	Trebbin, 1990	B
60.2	Weizen	Neumeichow, 1996	B
69.1	Weizen	Uckermark, 1996	B
16.3.b	Weizen	Prötzel, 1996	B
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>avenae</i>			
805	Hafer	Finnland, 1997	C
<i>Gaeumannomyces cylindrosporus/Phialophora graminicola</i>			
541-1bc, 541-2.3a, 541-13c1	Weizen	Uckermark, 1996	D
674	Triticale	Friedrichshof, 1996	D

Die Isolate der Gruppe E sind in Abschnitt 4.3.5 aufgelistet

Tabelle 3.3: *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Referenzstämme für die RAPD-PCR-Klassifizierung

Isolat	Wirtspflanze	Herkunftsort/Jahr	Referenz
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>			
92/82-4	Weizen, Biotest	GB, 1992	E. Ward
90/2-4	Weizen	GB, Woburn, 1990	E. Ward
92/132-2	Hafer, Biotest	GB, 1992	E. Ward
87.7/4	Gerste	GB, Rothamsted, 1987	E. Ward
90.GLR.17	Roggen	GB, Gleadthorpe, 1990	E. Ward
T2	Weizen	NL	CBS 188.65
T1*	Weizen	D	CBS 541.86
180 (GG17)*	Weizen	Australien, 1977	P.T.W. Wong
D2	Weizen	D, Uckermark, 1991	Augustin <i>et al.</i> (1999)
D61	Weizen	D, Uckermark, 1991	Augustin <i>et al.</i> (1999)
D109	nicht bekannt	D, Uckermark, 1991	Augustin <i>et al.</i> (1999)
9.1a	Weizen	D, M. Oderland, 1996	Augustin <i>et al.</i> (1999)
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i> / <i>Phialophora</i> sp. (gelappte Hyphopodien)			
92/49-2A	Weizen	GB, Biotest, 1992	E. Ward
92/52-1A	Weizen	GB, Biotest, 1992	E. Ward
96/4-2	Weizen	GB, Woburn, 1996	E. Ward
G203	Gerste	D, M. Oderland, 1989	Augustin <i>et al.</i> (1999)
148	Weizen	Polen, 1979	W. Myskow
G184	Weizen	D, M. Oderland, 1989	Augustin <i>et al.</i> (1999)
G165	Weizen	D, M. Oderland, 1986	Augustin <i>et al.</i> (1999)
G227	Roggen	D, Fläming, 1991	Augustin <i>et al.</i> (1999)
P1	Mais	Canada, Ontario	CBS 296.53
P13	nicht bekannt	Czechien, 1986	nicht bekannt
PR2	Mais	GB	CBS 350.77
Gg1	Gras	GB	CBS 387.81
Gg2	Gras	Australien	CBS 903.73
G197	Weizen	D, Uckermark, 1989	Augustin <i>et al.</i> (1999)
16.3	Triticale	D, M. Oderland, 1996	Augustin <i>et al.</i> (1999)
122	Weizen	Australien, 1974	P.T.W. Wong

Gaeumannomyces graminis var. *avenae*

A1	Hafer	Australien	CBS 870.73
A2	Hafer	NL	CBS 187.65
ABL2	Gras	GB, Yorkshire, 1990	G.L. Bateman
P086/441	Weizen	Irland, 1986	T.W. Hollins
P086/439	Hafer	Irland, 1986	T.W. Hollins
175	Straußgras	Australien, 1976	P.T.W. Wong
179	Straußgras	Australien, 1976	P.T.W. Wong
61"felty"	Hafer	Wales, 1969	D. Hornby

Gaeumannomyces cylindrosporus/Phialophora graminicola

C1	Gras	GB	CBS 610.75
C2	Gras	GB	CBS 609.75
74/1736-2	Weidelgras	GB, Rothamsted, 1974	R.J. Gutteridge
93/5-1	Weizen	GB, Woburn, 1993	E. Ward
96/1-2b	Weizen	GB, Woburn, 1996	E. Ward
96/2-2	Weizen	GB, Woburn, 1996	E. Ward
P7	nicht bekannt	Czechien, 1986	nicht bekannt

* Das Isolat T1 wurde in die Varietät *graminis* klassifiziert; die taxonomische Position des Isolates 180 ist unklar.

Tabelle 3.4: Referenzstämme des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes zur phylogenetischen Analyse

Isolat	Wirtspflanze	Herkunftsort/Jahr	Referenz	Acc. No.
Ggt P081/143 ¹	Roggen	GB, Norfolk	O'Dell <i>et al.</i> (1992)	U17221
Ggt T5	Weizen	GB, Avon	O'Dell <i>et al.</i> (1992)	U17222
Ggt R11	Weizen	GB, Norfolk	Musker (1994)	U17220
Ggt R17	Hafer	GB, Sussex	B. Hollins	U17220
Ggt 90/2-4	Weizen	GB, Woburn, 1990	E. Ward	AJ010036
Ggt 87.7/4	Gerste	GB, Rothamsted, 1987	E. Ward	AJ010037
Ggt P080/124	Roggen	GB, Suffolk	O'Dell <i>et al.</i> (1992)	U17219
Ggt 698	n.b.	n.b.	Zriba <i>et al.</i> , unveröff.	AF087684
Ggg G1 (2033) ¹	Ackerbohne	USA	J. Henson	U17212
Ggg G2 (1845)	n.b.	Australien	O. Glenn	U17213
Ggg G3 (077/98)	Federborstengras	Australien	D. Hornby	U17213
Ggg W4066A	Mais	China	n.b.	AJ010032
Ggg 247	Weizen	GB, Rothamsted	E. Ward	AJ010034
Ggg 85/23-1	Weizen	GB, Rothamsted	E. Ward	AJ010033
Ggg 724	n.b.	n.b.	Zriba <i>et al.</i> , unveröff.	AF087685
<i>Phialophora</i> sp. P2	Weizen	Czechien	J. Henson	U17216
<i>Phialophora</i> sp. P9	n.b.	GB, Rothamsted	D. Hornby	U17216
Gga A1 ¹	Hafer	GB, Wales	D. Hornby	U17206
Gga A3	n.b.	n.b.	D. Hornby	U17207
Gga GG 171	n.b.	n.b.	P.H. Goodwin	U08320

Gga P086/439	Hafer	Irland, 1986	T.W. Hollins	AJ010031
AT1	Hafer	Australien	Yates u. Parker (1986)	U17208
AT2	Gerste	Australien	Yates u. Parker (1986)	U17209
AT3	Straußgras	Australien	Yates u. Parker (1986)	U17210
<i>P. graminicola</i> P4	Weidelgras	n.b.	J. Henson	U17217
<i>G. cylindrosporus</i> C1	Fuchsschwanz	Polen	J. Henson	U17211
<i>P. radicolica</i> Cain, P1	Mais	Canada, Ontario	CBS 296.53, Chain (1952)	AJ010043
<i>G. incrustans</i> II	Hundszahngras	Kansas	Landschoot, Jackson (1989)	U17214
<i>Magnaporthe grisea</i> 2690	n.b.	n.b.	F. Chumley	U17328
<i>Magnaporthe poae</i> 2562	Gras	USA, Jersey	K. Plumley	AJ010041
<i>Neurospora crassa</i>	n.b.	n.b.	C. Chambers (1986)	M13096
Ggg Gg1 (159)	Rasenschmiele	UK, Suffolk	CBS 387.81	diese Arbeit
Ggg Gg2	Gras	Australien	CBS 903.73	diese Arbeit
Ggg 122	Weizen	Australien, 1974	P.T.W. Wong	diese Arbeit
Ggg 10.1.1	Roggen	D, M. Oderland, 1996	Augustin <i>et al.</i> (1999)	diese Arbeit
41.3 (A1 Isolat)	Roggen	D, Barnim, 1996	Augustin <i>et al.</i> (1999)	diese Arbeit
D2 (A2 Isolat)	Weizen	D, Uckermark, 1991	Augustin <i>et al.</i> (1999)	diese Arbeit
10.1.2 (A2 ₁₀ Isolat)	Roggen	D, M. Oderland, 1996	Augustin <i>et al.</i> (1999)	diese Arbeit
K8 (<i>Phialophora</i> sp.) ²	Weizen	D, Kiel	Ulrich <i>et al.</i> (2000)	diese Arbeit
437 (<i>Phialophora</i> sp.) ²	Gerste	D, Herzhorn	Ulrich <i>et al.</i> (2000)	diese Arbeit

¹ Ggt (a,g): *G. graminis* var. *tritici* (*avenae*, *graminis*)

² Die ITS/rDNA-Sequenzen der Isolate K8 und 437 wurden unter Accession Number AJ132541 bzw. AJ132542 in der EMBL-Datenbank hinterlegt.

n.b. nicht bekannt

Die zum Vergleich verwendeten Pilze der Gattungen *Fusarium*, *Selenophoma*, *Trichoderma*, *Phoma* und *Alternaria* wurden von der Humboldt-Universität Berlin (Institut für Biologie) zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Nährmedien

SNA –Medium, Synthetisch-nährstoffarmer Agar nach Nirenberg (1976)

1,0 g KH₂PO₄
 1,0 g KNO₃
 0,5 g MgSO₄ x 7 H₂O
 0,5 g KCl
 0,2 g Glucose
 0,2 g Saccharose
 20 g Agar
 ad 1000 ml A. dest

Malzagar

17 g Agar
 30 g Biomalz
 10 ml Streptomycin (10 mg/ml Stammlösung)
 ad 1000 ml A. dest

Gindrat-Nährlösung

20 g Biomalz
 1,5 g KH₂PO₄
 0,5 g MgSO₄ x 7 H₂O

Hybridisierung

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl	
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl	pH 8,0
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-citrat	pH 7,0
Hybridisierungslösung	5x SSC 0,1% N-Lauroyl-Sarkosyl 0,02% SDS 1% Blocking Reagenz	
Puffer 1	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl	pH 7,5
Puffer 3	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂	pH 9,5

3.1.4. Enzyme und Chemikalien

Restriktionsenzyme: Die Restriktionsenzyme wurden von Boehringer Mannheim bzw. New England Biolabs bezogen und mit den mitgelieferten Puffern (A-H bzw. 1-4) unter den vorgegebenen Bedingungen benutzt.

QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen)

DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer)

Hybond-N Nylonmembranen (Amersham Pharmacia Biotech Inc)

Rnase (Boehringer Mannheim)

Taq- DNA- Polymerase (Promega).

10 x Standard Polymerasepuffer (Promega)

Magnesiumchlorid MgCl₂ 25 mM (Promega)

DNA Polymerization Mix (20 mM/dNTP) (Amersham Pharmacia Biotech Inc)

Agarose (Biozym)

Metaphor-Agarose (Biozym)

Kartoffel-Glucose-Agar (Merck)

Biomalz (Biomalz GmbH Teltow)

Tris (Merck)

Borsäure (Roth)

Na₂-EDTA (Serva)

SDS (Merck)

Phenol (Rotiphenol, Roth)

Ethidiumbromid (Serva)

3.2. Methoden

3.2.1. Anzucht und Lagerung der Pilze

Die Anzucht der Pilze erfolgte auf Malzagarplatten bzw. in Flüssigkulturen unter Verwendung von Gindrat-Nährlösung bei einer Temperatur von 27°C. Zur Lagerung und Stammerhaltung wurden die Isolate auf Malzagar- bzw. SNA-Röhrchen geimpft und ca. alle 6 Monate erneuert. Die Lagerung erfolgte bei ca. 15°C.

3.2.2. Isolation der Pilze

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Pilze wurden aus infizierten Getreidewurzeln von landwirtschaftlich genutzten Flächen gewonnen. Dazu wurden meist im Frühjahr oder Herbst Pflanzen aus dem Bestand entnommen, die Wurzeln gewaschen und auf Symptome der Schwarzbeinigkeit bonitiert. Bei der Bonitur wurden infizierte Wurzelfragmente für die Pilzisolierung entnommen. Zum Abtöten der an der Wurzeloberfläche haftenden Mikroorganismen wurde eine Oberflächensterilisation mit Silbernitrat durchgeführt.

- ca. 3-5 mm lange, dunkel gefärbte Wurzelstücke 30 sec in 1%ige AgNO₃-Lösung eintauchen
- 3 x in sterilem A. dest waschen
- auf sterilem Filterpapier abtrocknen
- Wurzelfragmente auf SNA-Agar auslegen und bei 27°C inkubieren
- nach ca. 3-4 Tagen federförmig auswachsende Pilze auf Biomalzplatten überimpfen und bis zur vollständigen Ausprägung des Pilzmycels weiter bebrüten

3.2.3. Untersuchung morphologischer Parameter

Untersuchung der Mycelcharakteristika

Zur Untersuchung morphologischer Merkmale des Mycels bzw. der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Isolaten wurden die Pilze auf Malzagarplatten ca. zwei Wochen bei einer Temperatur von 27°C inkubiert und in bestimmten Zeitabständen bonitiert.

Untersuchung der Hyphopodienform

Die Form der Hyphopodien gilt als wichtiges Unterscheidungskriterium der Pilze des G/P-Komplexes. Die Untersuchung der Hyphopodien erfolgte wie in Walker (1980) beschrieben an den Coleoptilen infizierter, ca. 4 bis 6 Wochen alter Weizenpflanzen, die nach dem in 3.2.13 beschriebenen Standardtest in Klimakammern angezogen wurden. Die Coleoptilen wurden mit einer Pinzette vorsichtig abgetrennt und lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von Laufhyphen und Hyphopodien untersucht. Nach Walker (1980) werden gelappte, leicht gelappte und einfache Hyphopodien unterschieden.

Test auf Perithezienbildung

Zur Untersuchung der Perithezienbildung, die als Hinweis auf eine sexuelle Vermehrung (teleomorphes Stadium) gilt, wurden infizierte Weizenwurzeln mit deutlich ausgeprägten Krankheitssymptomen auf angefeuchtetem Zellstoff in Petrischalen ausgelegt und 2 bis 6 Wochen unter diffusem Licht bei RT inkubiert (Tan *et al.*, 1994).

3.2.4. Untersuchung physiologischer Parameter

Bestimmung der durchschnittlichen Wachstumsraten

Die Bestimmung der Wachstumsraten erfolgte mit jeweils 5 repräsentativen Isolaten der entsprechenden Pilzgruppen in je 3 Parallelen. Dazu wurde mit einem Korkbohrer (Durchmesser 5 mm) aus frisch hergestellten Vorkulturen Pilzmycel ausgestochen und auf Malzagarplatten übertragen. Die Inkubation erfolgte 7-8 Tage bei 27°C. Alle 24 h wurden zwei Messungen des Kolonieradius im rechten Winkel ausgehend vom äußeren Rand des Beimpfungspunktes durchgeführt. Von den jeweiligen Meßwerten (je 5 Isolate x 3 Wiederholungen) wurden die Mittelwerte und die Standardfehler berechnet.

Selektivmediumtest

Das Selektivmedium SM-GGT3 (Juhnke *et al.*, 1984) wurde zur Identifizierung von *G. graminis* var. *tritici* entwickelt und basiert auf der Braun- bis Schwarzfärbung des Agars durch die Produktion von Melanin in Anwesenheit von L-DOPA (L-b-3,4-Dihydroxyphenylalanin). Die zu testenden Pilzstämme wurden durch Ausstechen mit dem Korkbohrer von Vorkulturen auf das Selektivmedium übertragen und ca. 4 Tage bei 27°C bebrütet. Nach 2 bis 3 Tagen zeigte sich bei den *G. graminis* var. *tritici*-Isolaten eine von der Beimpfungsstelle ausgehende Braunfärbung des Agars, die bei weiterer Bebrütung auf die gesamte Platte übergang (positive Reaktion).

3.2.5. DNA-Präparationsmethoden

DNA-Präparationsmethode nach Gardes et al. (1991)

Zur Gewinnung der DNA für die PCR-Reaktionen wurden die Pilze auf Malzagarplatten angezogen. Nach ca. 10-tägigem Wachstum wurde das Mycel geerntet und die DNA nach einer von Gardes *et al.* (1991) beschriebenen Schnellpräparations-Methode isoliert.

- ca. 2 cm² Mycel mit einer Pipettenspitze von der Malzagarplatte ernten und in ein Tube überführen
- zweimal, mit zwischenzeitlichem Auftauen, mit Hilfe eines Metallstabes unter flüssigem Stickstoff zermörsern
- nach Zugabe von 600 µl 2 x CTAB ca. 20 sec Schütteln auf dem Vortex
- 45 min bei 65°C im Wasserbad zur Lyse der Zellen inkubieren
- Deproteinisierung durch Zugabe von 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 und Schütteln auf dem Vortex
- nach 15 min Zentrifugation bei 12000 rpm die obere, wäßrige Phase abnehmen und in ein neues Tube überführen
- Wiederholung der Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion
- obere Phase mit 1 Volumen kaltem Isopropanol vermischen und über Nacht bei 4°C fällen
- 10 min Zentrifugation bei 12000 rpm
- das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol waschen und in 50 µl 1 x TE-Puffer aufnehmen
- Lagerung der DNA bei -20°C.

DNA-Präparation nach Lee und Taylor (1990)

Die Pilz-DNA für die Southern-Hybridisierung wurde nach einer Methode von Lee und Taylor (1990) aus Flüssigkulturen (Gindrat-Nährlösung) gewonnen. Zusätzlich wurde hier vor der Phenolextraktion eine RNase-Behandlung durchgeführt.

- Anzucht der Pilze durch Schütteln in Gindrat-Nährlösung bei 27°C (7 Tage)
- Abfiltrieren und Trocknen des Pilzmycels mit Filterpapier
- Pulverisieren des Mycels unter flüssigem Stickstoff und Überführung des Pulvers in Tubes
- Zugabe von Lysispuffer im Verhältnis 1:1 und ca. 20 sec Schütteln auf dem Vortex
- 1 h bei 65°C im Wasserbad inkubieren
- das lysierte Gemisch in 0,8 ml-Mengen auf 2 ml-Tubes aufteilen und jeweils durch Schütteln auf dem Vortex mit 1 Volumen Phenol/Chloroform vermischen
- nach 15 min Zentrifugation bei 12000 rpm jeweils die obere Phase in neue Tubes überführen und 40 µl 6M Ammoniumacetat und 600 µl Isopropanol dazugeben
- mehrmals vorsichtig umdrehen und ca. 10 min bei 4°C fällen
- DNA durch 15 min Zentrifugation pelletieren und in 150 µl TE-Puffer lösen
- Zur RNase-Behandlung 0,6 mg/ml RNase-Stammlösung zugeben und 15 min bei 37°C inkubieren
- pro Tube 200 µl Phenol zugeben und nach Schütteln auf dem Vortex und 6 min Zentrifugation die obere Phase in ein neues Tube überführen
- Nach Zusatz von 10 µl 6 M Ammoniumacetat und 600µl Isopropanol DNA 10 min bei 4°C fällen
- nach 10 min Zentrifugation das Pellet mit 0,8 ml kaltem Ethanol waschen und in 50-200 µl TE-Puffer resuspendieren
- Lagerung der DNA bei -20°C

3.2.6. DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Abschätzung der DNA-Konzentration wurden unterschiedliche Mengen der isolierten Pilz-DNA im Vergleich zu ungespaltener λ -DNA als DNA-Mengenstandard elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärbung des Gels wurde die DNA-Konzentration visuell abgeschätzt.

3.2.7. PCR-Amplifikationen

Alle PCR- Amplifikationen wurden in einem OmniGene (Hybaid) Thermocycler durchgeführt.

RAPD-PCR: Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Ansätze enthielten 25 ng Pilz-DNA, 5 µl 10 x Standard Polymerasepuffer, 0,2 mM Deoxynukleotidtriphosphate, 1,75 mM Magnesiumchlorid, entweder 25 pmol der entsprechenden Dekamerprimer oder 12 pmol des Primers (GTG)₅ und 2,5 Einheiten *Taq* DNA-Polymerase. Die Amplifikationen wurden nach folgendem Programm durchgeführt: 3 min Anfangsdenaturierung bei 95°C, 40 Cyclen zu je 20 sec bei 93°C, 60 sec bei 36°C bzw. 50°C für (GTG)₅ und 90 sec bei 72°C; anschließend 6 min 72°C. Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Verwendete Primer (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA):

OPB-06	TGCTCTGCCC
OPB-07	GGTGACGCAG
OPB-17	AGGGAACGAG
(GTG) ₅	GTGGTGGTGGTGGTG

Amplifikation des ITS/rDNA-Fragmentes: Die Amplifikation der ITS/rDNA-Region erfolgte modifiziert nach Bryan *et al.* (1995). Die 50 µl Reaktionsansätze enthielten 25 ng Pilz-DNA, 5 µl 10 x Standard Polymerasepuffer, 0,2 mM Deoxynukleotidtriphosphate, 1,75 mM Magnesiumchlorid, 4,5 pmol der Primer psnDNA2p und pITS4 und 2,5 U Taq DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Nach einer Anfangsdenaturierung von 5 min bei 94°C folgten 35 Cyclen zu je 45 sec bei 94°C, 30 sec bei 56°C und 60 sec bei 72°C und abschließend 10 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden im 1%igen Agarosegel überprüft.

Verwendete Primer (MWG-Biotech):

psnDNA2p (Curtis <i>et al.</i> , 1994)	GTCCACACACCGCCCGT
pITS4 (Walker, 1981)	TTCTTCGCTTATTGATATGC

3.2.8. Restriktionsanalysen

Die Spaltung der ITS/rDNA-Fragmente erfolgte mit 5 Einheiten des jeweiligen Restriktionsenzym in einem 20 µl-Ansatz entsprechend der Angaben der Hersteller. Für die Hybridisierung wurde die genomische DNA mit 10 Einheiten *EcoRI* über Nacht in 20 µl-Ansätzen bei 37°C verdaut.

3.2.9. Elektrophoretische Trennung

Die elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte bzw. der Restriktionsfragmente erfolgte in Flachbettelektrophoresen in 1 bis 2%iger Typ I-Agarose bzw. in 3%iger Metaphoragarose bei 2,5 V/cm (5h). Als Elektrophoresepuffer wurde Tris-Borat-Puffer verwendet. Die Gele wurden 10 min in 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und zur Dokumentation mit einer Video-Kamera (Herolab) aufgenommen.

3.2.10. Southern-Hybridisierung

Southern-Blotting

Die separierten Restriktionsfragmente wurden mit Hilfe eines Vacuumblotter (Pharmacia) von den Agarosegelen auf Hybond-N Nylonmembranen transferiert.

- Zuschneiden einer Maske und der Nylonmembran auf die entsprechende Gelgröße
- Membran 2 min in 2 x SSC tränken
- Maske, Membran und Agarosegel luftblasenfrei auf die Gelträgerplatte auflegen
- Unterdruck von 40-50 mbar anlegen
- Überschichten mit 250 mM HCl und 5 min depurinisieren
- Lösung absaugen und aus dem Blotter absaugen
- 5 min denaturieren (Denaturierungslösung frisch herstellen)
- 5 min neutralisieren

- DNA-Transfer mit 20 x SSC
- Slots markieren und Membran in 6 x SSC tränken
- 1 h lufttrocknen bei RT und die DNA 3 min unter UV-Licht fixieren

Nichtradioaktive Hybridisierung

Die Hybridisierungsexperimente wurden nichtradioaktiv mit Hilfe des DIG DNA Labeling and Detection Kit durchgeführt. Für den Nachweis wurde die DNA-Sonde mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. In der immunologischen Nachweisreaktion bindet das Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Antikörper-Konjugat an das Digoxigenin der markierten DNA. In einem zweiten Schritt setzt die alkalische Phosphatase die Substrate Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (X-Phosphat) um, wobei ein braunes bzw. leicht blaues Präzipitat entsteht.

Die Hybridisierung erfolgte in Zylindern bei geringer Rotationsbewegung

- Nylonmembran in 10-15 ml Hybridisierungslösung 1 h vorhybridisieren
- Sonde 10 min bei 100°C denaturieren und sofort zur Hybridisierungslösung (5-10 ml) geben und gegen die sich im Zylinder befindende Lösung austauschen
- Mindestens 6 h oder über Nacht hybridisieren
- Hybridisierungslösung abgießen und bei -20°C aufbewahren (max. 4 x verwendbar)
- Membran 2 x für 5 min in 2 x SSC, 0,1% SDS bei RT waschen
- Membran 3- 4 x für 10 min in 0,1x SSC, 0,1% SDS bei 65°C waschen
- Für die Nachweisreaktion wurden folgende Schritte bei RT durchgeführt:
- Membran für 1- 2 min in Puffer 1 äquilibrieren
- zur Verringerung des Backgrounds Filter 60 min in 20 ml 1% Blocking Reagenz (in Puffer 1; bei 60°C lösen) inkubieren
- Zur Entfernung des überschüssigen Blocking Reagenz Membran 1-2 min in Puffer 1 spülen
- Membran 60 min in 10 ml Antikörperkonjugat-Lösung (4 µl Lösung auf 10 ml Puffer 1) inkubieren
- Membran 3-4 x für 5 min und 2 x für 10 min in Puffer 1 spülen
- Membran auf eine austarierte Glasscheibe luftblasenfrei auflegen, unter Nutzung der Oberflächenspannung Membran mit Färbelösung (45 µl NBT-Lösung, 35 µl X-Phosphat-Lösung in 10 ml Puffer 3) überschichten
- Membran abgedunkelt 1-8 h färben, Farbreaktion in TE-Puffer abstoppen
- Die Membran wurde unmittelbar nach dem Abstoppen dokumentiert

3.2.11. Reinigung der PCR-Fragmente

Für die nachfolgende Sequenzanalyse war es notwendig, die PCR-Produkte von nicht verbrauchten Primern und Nukleotiden zu reinigen. Hierzu wurde der QIAquick PCR Purification Kit verwendet, der auf der Trennung durch Silica-Gel-Säulen beruht. Die Bindung bzw. die Ablösung der DNA von der Säule ist von der Salzkonzentration und dem pH-Wert abhängig und wird durch die entsprechenden Puffer gewährleistet. Durch Nutzung dieser Minisäulen werden DNA-Fragmente kleiner als 100 bp mit hoher Effizienz abgetrennt.

- 50 µl PCR-Produkt mit 5 Volumen Puffer PB mischen

- QIAquick Säule in das dafür vorgesehene 2 ml Tube einsetzen und zur Bindung der DNA-Probe auf die Säule geben
- 30-60 sec bei 13 000 rpm (RT) zentrifugieren
- den abzentrifugierten Puffer verwerfen und die Säule wieder in das Tube stecken
- zum Waschen der DNA 0,75 ml PE-Puffer auf die Säule geben und 30-60 sec zentrifugieren
- um das restliche Ethanol des PE-Puffers zu entfernen, nach Verwerfung des abzentrifugierten Puffers noch einmal 1 min zentrifugieren
- Säule in ein neues Tube einsetzen und zur Eluierung der DNA 50µl Puffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) auf die QIAquick-Membran geben, 60 sec stehen lassen und anschließend 1 min zentrifugieren

3.2.12. Sequenzanalyse

Die Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte über Cycle Sequencing. Dieses Verfahren beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977), die durch Nutzung einer thermostabilen Polymerase in cyclischer Wiederholung durchgeführt wird. Im Gegensatz zur radioaktiven Sequenzierung werden hier fluoreszierende Farbstoffe für die Markierung genutzt. Ein Teil der Sequenzierungen wurde bei MWG-Biotech in Auftrag gegeben und dort mit dem LI-COR Sequencer (Model 4200) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte für die einzelnen Nukleotide in 4 parallelen Ansätzen, wobei an das 5'-Ende des Primers ein Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt wurde. Der andere Teil der Sequenzierungen wurde mit dem ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) durchgeführt. In diesem Fall waren in der Sequenzierungsreaktion die einzelnen Didesoxy-Nukleotide (A, T, G, C) unterschiedlich Fluoreszenz-markiert, so daß bei der anschließenden Elektrophorese zum einen alle 4 Reaktionen zusammen aufgetrennt werden konnten und zum anderen nur die spezifischen Kettenabbruch-Produkte detektiert wurden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über eine Plattengelelektrophorese (LI-COR) bzw. über eine Kapillarelektrophorese (ABI PRISM 310). Die fluoreszierenden Fragmente wurden nach Anregung durch einen Laserstrahl detektiert.

Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung mit dem LI-COR Sequencer

Nach der Reinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit wurden die DNA-Fragmente unter Verwendung der Primer psnDNA2p und pITS4, die zusätzlich am 5'Ende die M13-Primer-Sequenz enthielten, reamplifiziert. So erhält man Fragmente, die eine Sequenzierung mit den M13-universal and M13-reverse Standardprimern ermöglichen. Beide komplementären Stränge wurden im Auftrag sequenziert.

Sequenzierung mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyser

Sequenzierreaktion: Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit nach folgendem Ansatz:

- ca. 30 ng gereinigtes PCR-Produkt
- 3,2 pmol des jeweiligen Sequenzierprimers (psnDNA2p bzw. pITS4)
- 4 µl Terminator Ready Reaction Mix
- deionisiertes A. dest ad. 20 µl

mischen, anzentrifugieren und im vorgeheizten (96°C) Thermocycler (GeneAmp PCR Systems 2400, Applied Biosystems) nach folgendem Protokoll inkubieren:

- 25 Cyclen von 10 sec 96°C, 5 sec 50°C, 4 min 60°C
- Kühlen auf 4°C bis zur Entnahme und Reinigung

Reinigung der Sequenzierungsprodukte

Da bei der Sequenzierungsreaktion die Didesoxynukleotide fluoreszenzmarkiert sind, müssen die überschüssigen Nukleotide vor der Auftrennung der Sequenzierungsprodukte abgetrennt werden. Zu diesem Zweck erfolgte eine differentielle Fällung der DNA-Fragmente mit Isopropanol.

- 20 µl des Sequenzierungsansatzes mit 20 µl Wasser und 60 µl 100%igem Isopropanol (RT) auf dem Vortex mischen und 20 min bei RT fällen
- nach 20 min Zentrifugation den Überstand vorsichtig mit einer Hamilton-Glasspritze abziehen und das Pellet zweimal mit 150 µl 75%igem Isopropanol bei RT waschen (5 min bei RT inkubieren, 5 min zentrifugieren)
- das Pellet ca. 10 min trocknen lassen, anschließend in 40 µl A. dest aufnehmen, 15 min bei 65°C inkubieren und auf dem Vortex schütteln
- 2 µl der Probe mit 18 µl A. dest verdünnen und in ein Autosampler-Tube geben

Trennung über Kapillarelektrophorese

Die Trennung erfolgte in POP-6 Polymer mit der 61 cm Kapillare unter denaturierenden Bedingungen. Die Kapillare wurde auf 50°C vorgeheizt. Es wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

- Mobility File: DT POP 6 (BD Set-Any Primer)
- Matrix File für das Filter-Set E
- Run Module File: Seq POP 6 (1 ml) E

Laufbedingungen: Spannung 12,8 kV, Kapillartemperatur 50°C, Laufzeit 80 min

Die Sequenzierungsprobe wurde 2 min bei 95°C denaturiert, sofort ins Eisbad überführt, gemischt, anzentrifugiert und in den Autosampler gestellt. Die Injektion erfolgte 10 sec bei 2kV.

Auswertung der Sequenzdaten

Nach Beendigung des Laufs wurden die Sequenzdaten mit der Sequencing-Software (Applied Biosystems) bzw. der SeqMan-Software (DNASTAR) bei LI-COR-Sequenzen kontrolliert. Nach Export der Teilsequenzen wurden Überlappungen zwischen der forward- und reverse- Sequenzierung analysiert und fragliche Positionen durch Vergleich beider Sequenzen berichtigt. Die Gesamtsequenz wurde mit der Software EditSeq (DNASTAR) erstellt.

Die DNA-Sequenzen wurden auf Homologieen mit der EMBL-Datenbank geprüft. Hierzu wurden die Sequenzdaten per e-mail mit dem FastA-Programm (Pearson und Lipman, 1988) des EMBL-Servers verrechnet (FastA@EBLAC.UK). Die berechneten Ähnlichkeitswerte basieren auf einem paarweisen Vergleich der Sequenzen, die die vollständige ITS1- und ITS2-Region und das 5,8S rRNA-Gen enthielten. Das multiple Sequenzalignement wurde mit dem Programm ClustalW (Programmversion 1.74; Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt (K-tuple=3). Für die phylogenetische Untersuchung wurde das Programmpaket PHYLIP (Version 3.573; Felsenstein, 1993) benutzt.

Die Berechnung der Stammbäume über die *Neighbor-Joining Methode* beruht auf den Distanzwerten zwischen den einzelnen Gesamtsequenzen. Beim paarweisen Vergleich der Einzelsequenzen des multiplen Alignments wird eine Distanzmatrix auf Grundlage des Kimura „2-Parameter“ Modells gebildet (Kimura, 1980). Dieser Algorithmus erlaubt eine differentielle Bewertung zwischen Austausch innerhalb des Purin- bzw. Pyrimidinpools und zwischen den Pools. Aus den so berechneten Distanzwerten werden sukzessiv die einzelnen Zweige des Stammbaums aufgebaut. Hierzu wurde das aus dem Programm ClustalW exportierte Alignment mit dem Programm DNADIST verrechnet (Transition/Transversion Verhältnis 2). Die entstandene Distanzmatrix bildete das Input-File für das Programm NEIGHBOR. Da bei der Neighbor-Joining Methode Stammbäume ohne Ursprung erzeugt werden, wurde dieser durch Verwendung einer phylogenetisch weiter entfernten Sequenz als Outgroup abgeschätzt.

Die *Parsimony Methode* basiert direkt auf dem multiplen Alignment der Sequenzen und betrachtet jede Sequenzposition unabhängig. Dabei wird bei den Sequenzaustauschen nicht zwischen den unterschiedlichen Nukleotidpools differenziert. Alignment-Gaps werden als fünftes Nukleotid bewertet. Für die Erstellung des Stammbaumes wurde das Alignment direkt mit dem Programm DNAPARS verrechnet. Als Parameter wurden 10 Variationen der Reihenfolge der Sequenzdaten (Jumble Option) im Alignment gewählt. Zusätzlich wurde ein Rearrangement der Stammbäume durch das Programm durchgeführt.

Die *Maximum Likelihood Methode* beruht als sehr rechenintensiver Algorithmus ebenso auf dem direkten Vergleich der Sequenzen des multiplen Alignments. Hierbei wird jede Base (Spalte des Alignments) einzeln bewertet und zwischen Austausch innerhalb des Purin- bzw. Pyrimidin-Pools und des Gesamtpools unterschieden. Basenaustausche an bestimmten Positionen des Alignments werden in Abhängigkeit von der Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens bewertet. Alignment-Gaps bleiben unberücksichtigt. Für die Erstellung des Stammbaumes wurde das Alignment wiederum als Input-File für das Programm DNAML benutzt. Als Parameter wurden drei Variationen der Sequenzreihenfolge (Jumble Option) und ein Transition/Transversion Verhältnis von 2 gewählt.

Die Sicherheit des Auftretens einzelner Zweige in den Neighbor-Joining-Stammbäumen wurde durch eine *Bootstrap-Analyse* bewertet. Bei dieser Analyse werden aus dem Original-Alignment veränderte Alignments unveränderter Größe gebildet, in denen einzelne Basen (Spalten des Alignments) gelöscht werden, wofür andere Bereiche dupliziert werden. Nachfolgend werden die „Bootstrap-Alignments“ (100 bzw. 1000) wie das Original-Alignment verrechnet. So entstehen 100 bzw. 1000 Stammbäume, aus denen in Abhängigkeit vom Auftreten einzelner Zweige ein Konsensus-Stammbaum errechnet wird. Das Original-Alignment wird mit dem Programm SEQBOOT verrechnet. Das Output-File, in dem die entsprechende Anzahl von Bootstrap-Alignments hintereinander angelegt wurde, dient als Input-File für das Programm DNADIST. Das Output-File dieses Programms mit der entsprechenden Anzahl von Distanz-Matrizes dient als Input-File für das Programm NEIGHBOR. Das entstandene Tree-File wird als Input-File für das Programm CONSENSE verwendet.

3.2.13. Pathogenitätsuntersuchungen

Pathogenitäts-Standardtest

Die Pathogenitätsuntersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Augustin, ZALF e.V., Institut für Landnutzungssysteme und Landschaftsökologie, nach einem von Augustin *et al.* (1997) beschriebenen

Standardtest durchgeführt. Dazu wurden 300 ml-Glasröhrchen mit einem Gemisch aus sterilem Quarzsand, Nährlösung und auf gehexeltem Stroh angezogenen Pilzkulturen gefüllt. In dieses Gemisch wurden oberflächensterilisierte, angekeimte Getreidesamen eingesetzt und unter semisterilen Bedingungen in Klimakammern inkubiert. Nach ca. 6 Wochen wurden die Pflanzen geerntet und auf Symptome der Schwarzbeinigkeit (Verfärbungen der Wurzeln, Einschränkung des Pflanzenwachstums) bonitiert.

Als Testpflanzen wurde Weizen (*Triticum vulgare* cv. Eta), Hafer (*Avena sativa* cv. Panther) und Roggen (*Secale cereale* cv. Petka) verwendet.

Alle Ansätze erfolgten in jeweils 10 Wiederholungen. Als Kontrollen dienten unbeimpfte Röhrchen mit den entsprechenden Testpflanzen.

Die Pathogenität der Pilzisolat, d.h. der Einfluß der Pilzisolat auf das Wachstum der Testpflanzen wurde anhand der Sproßtrockenmasse (STM) und der Wurzeltrockenmasse (WTM) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (Augustin *et al.*, 1997). Die statistischen Analysen der Trockenmassedaten erfolgten mit dem Programm ANOVA.

Zur Bewertung der Pathogenität wurde folgendes Schema verwendet:

Pathogenitätsstufe 1: STM und WTM \geq 100% der Testpflanze = wachstumsfördernd

Pathogenitätsstufe 2: STM und WTM 80-99% der Testpflanze = nicht pathogen

Pathogenitätsstufe 3: STM und WTM 50-79% der Testpflanze = schwach pathogen

Pathogenitätsstufe 4: STM und WTM 25-49% der Testpflanze = pathogen

Pathogenitätsstufe 5: STM und WTM \leq 24% der Testpflanze = stark pathogen

Schnelltest zur Untersuchung des Infektionsverhaltens

Zur Untersuchung des Infektionsverhaltens der Isolate des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes an verschiedenen Getreidesorten bzw. Gräsern wurde ein Schnelltest durchgeführt. Dazu wurden 5 ml-Glasröhrchen, die am unteren Ende eine kleine Öffnung besitzen (ca. 1 mm Durchmesser) zu etwa 2/3 mit sterilem Quarzsand gefüllt, der vorher mit einer Düngerlösung (4 g Wopil pro 500 ml Wasser) gemischt wurde. Darauf wurde eine mit dem zu testenden Pilzisolat bewachsene und dem Korkbohrer ausgestochene Agarscheibe in der Größe des Röhrchen-Innendurchmessers gelegt. Nach Abdeckung des Pilzes mit einer ca. 2 mm dicken Sandschicht wurden die entsprechenden oberflächensterilisierten, angekeimten Samenkörner eingesetzt. Die Röhrchen wurden in eine Glasschale mit feuchtem Quarzsand gesteckt und bei RT inkubiert. Nach 3 Wochen wurden die Pflanzen geerntet, gewaschen und die Wurzeln auf Verfärbungen bonitiert.

Als Testpflanzen wurden Weizen (*Triticum vulgare* cv. Eta), Hafer (*Avena sativa* cv. Panther) Gerste (*Hordeum vulgare* cv. Maresi), Roggen (*Secale cereale* cv. Petka), Welsches Weidelgras (*Lolium multiflorum* cv. Malmi) und Rotschwingel (*Festuca rubra* cv. Tridano) verwendet. Alle Ansätze erfolgten in jeweils 10 Wiederholungen.

4. Ergebnisse

Im *Gaeumannomyces/Phialophora* (G/P)-Komplex sind eng verwandte Pilze zusammengefaßt, die mit der Schwarzbeinigkeit, einer bedeutenden und weitverbreiteten Wurzelkrankheit von Getreide und Rasengräsern in Verbindung stehen. Dazu gehören zum einen die pathogenen Pilze der wirtsspezifischen *Gaeumannomyces graminis*-Varietäten, die als Erreger unterschiedlicher bodenbürtiger Wurzelkrankheiten bekannt sind. Zum anderen beinhaltet der Komplex nicht pathogene *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Arten, die für die natürliche biologische Kontrolle dieser Krankheit von Bedeutung sind. Zur Differenzierung und Klassifizierung dieser Pilzgruppe sollten Methoden zur Anwendung kommen, die eine einfache und reproduzierbare Unterscheidung der Pilze sowohl auf Ebene der Arten und Varietäten als auch auf intravarietaler Ebene ermöglichen. Ein weiteres Ziel war die detaillierte Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb dieser Pilzgruppe und die Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen phylogenetischer Klassifizierung und dem Pathogenitätsverhalten.

4.1. Entwicklung einer Methode zur Identifizierung und Differenzierung der Isolate des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes auf Basis der RAPD-PCR

4.1.1. Auswahl der RAPD-Primer

„Random Amplified Polymorphic DNA“ (RAPD)-Marker eignen sich besonders zur Unterscheidung auf der Ebene von verwandten Arten, Varietäten und Stämmen bis hin zu unterschiedlichen Pathotypen phytopathogener Pilze (Wöstemeyer *et al.*, 1991; Crowhurst *et al.*, 1991; Lieckfeldt *et al.*, 1992). Für die Entwicklung einer Methode zur Identifizierung und Differenzierung der Isolate des G/P-Komplexes wurden verschiedene RAPD-Dekamerprimer mit zufälliger Nukleotidsequenz getestet. Zusätzlich kamen Primer, die auf „simple repeats“ bzw. Minisatelliten-DNA basieren, wie (GTG)₅ und M13 als Single-Primer für die RAPD-PCR zum Einsatz. Diese Primer werden sonst in klassischen Fingerprintmethoden zum Nachweis repetitiver DNA-Sequenzen verwendet (Vassert *et al.*, 1987; Meyer *et al.*, 1991; Lieckfeldt *et al.*, 1992; Hering und Nierenberg, 1995).

Aus Untersuchungen mit verschiedenen *Gaeumannomyces*-Isolaten war bekannt, daß neun der getesteten Primer (OPB-01, OPB-06, OPB-07, OPB-10, OPB-17, Primer 3, Primer 17, M13, (GTG)₅) verwertbare RAPD-Muster ergaben (pers. Mitteilung C. Augustin, U. Feiler).

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen wurden die Dekamer-Primer OPB-06, OPB-07, OPB-17 und der Primer (GTG)₅ verwendet.

An einer Reihe von *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolaten, vorrangig Referenzstämmen der Arten und Varietäten des G/P-Komplexes aus internationalen Stammsammlungen (Tab. 3.3), zeigte sich, daß die Primer OPB-17, OPB-06, OPB-07 und (GTG)₅ ausreichend komplexe Fingerprintmuster für die Differenzierung der untersuchten Pilze ergaben.

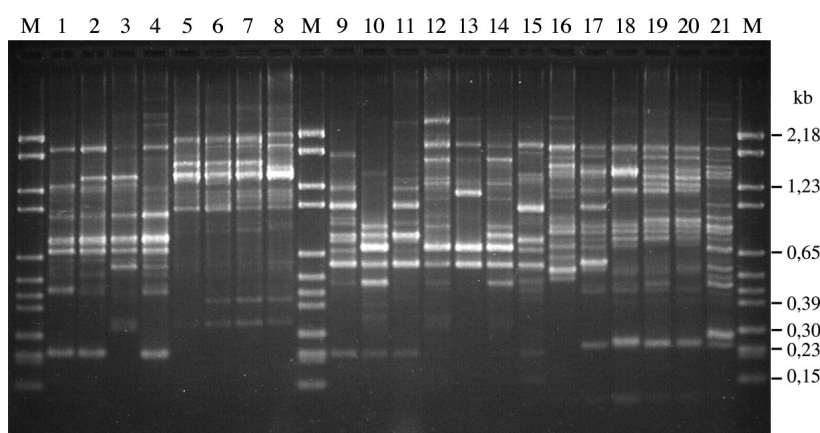


Abb. 4.1: Amplifikationsprodukte von Referenzisolaten des G/P-Komplexes mit dem Primer OPB-17. Bahn 1-4: *G. graminis* var. *tritici*: D61, D2, D109, 9.1a, Bahn 5-8: *G. graminis* var. *graminis*: G197, PR2, G165, G203, Bahn 9-15: *G. graminis* var. *avenae*: A1, A2, 175, ABL2, P086/439, P086/441, 180, Bahn 16-21: *G. cylindrosporus*/*P. graminicola*: C1, 93/5-1, 96/2-2, 96/1-2b, 74/1736-2, P7. Als DNA-Größenstandard wurde der Marker VI (Boehringer Mannheim) verwendet.

Der Primer OPB-17 lieferte Banden im Bereich von 200 bp bis 2,5 kb mit einem deutlichen Hintergrund unspezifisch amplifizierter Fragmente, der jedoch nicht die Auswertung einschränkte (Abb. 4.1). Der erste Vergleich der Fingerprintmuster der verwendeten Referenzstämmen deutete auf einen Bezug der RAPD-PCR-Ergebnisse zur taxonomischen Einteilung der Pilze hin. So wird mit diesem Primer besonders die Differenzierung der Isolate der Varietäten *tritici* und *graminis* deutlich (Bahn 1-4 bzw. 5-8).

Der Primer (GTG)₅ lieferte im Gegensatz zum Primer OPB-17 Banden nur in einem Bereich von 500 bp bis 1,7 kb (Abb. 4.2). Darüber hinaus ergab die Amplifikation deutlich weniger verwertbare DNA-Fragmente als bei den untersuchten OPB-Primern. Die Auswertung der Fingerprintmuster wurde außerdem durch einen starken Hintergrund mit unspezifisch amplifizierten DNA-Fragmenten erschwert.

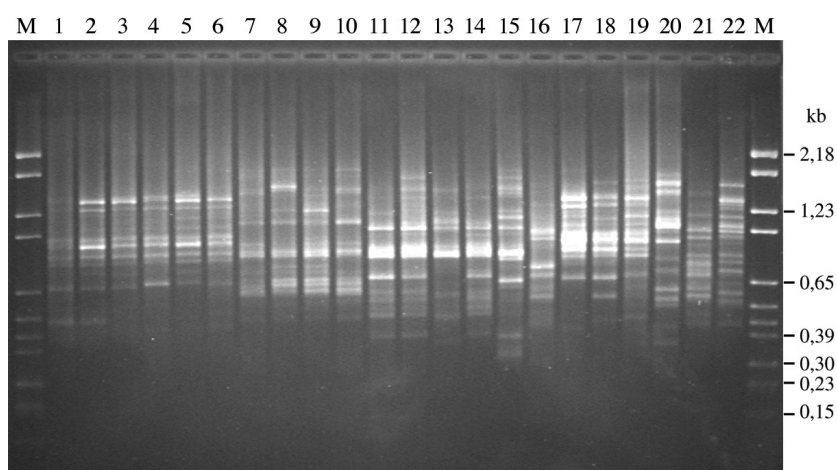


Abb. 4.2: RAPD-PCR-Muster von Isolaten des G/P-Komplexes nach Amplifikation mit dem Primer (GTG)₅. 1-6: *G. graminis* var. *graminis*: G203, G227, G165, 92/49-2A, 92/52-1A, G184, 7-10: *G. graminis* var. *tritici*: 90/2-4, 87-7/4, T2, D61, 11-15: *G. graminis* var. *avenae*: A2, P086/441, P086/439, ABL2, A1, 16: *G. cylindrosporus* 96/2-2, 17-20: *G. graminis* var. *graminis*: G197, 16.3, PR2, Gg1, 21: *G. cylindrosporus* C2, 22: Isolat 122. Als DNA-Größenstandard wurde der Marker VI (Boehringer Mannheim) verwendet.

Die Primer OPB-06 und OPB-07 zeigten Banden im Bereich von 300 bzw. 150 bp bis 2,5 kb (Abb. 4.3 und 4.4), die jedoch im Gegensatz zum Primer OPB-17 aufgrund des geringeren Hintergrundes deutlicher differenzierbar waren. Die Vertreter aller taxonomischen Gruppen des G/P-Komplexes wiesen charakteristische Bandenmuster auf (Abb. 4.3 und 4.4 Bahn 1-8). Ähnlich wie beim Primer OPB-17 waren die Fingerprintmuster der Isolate der Varietäten *graminis* und *tritici* nach Amplifikation mit den Primern OPB-06 bzw. OPB-07 sehr einheitlich und gut voneinander zu unterscheiden. Somit eigneten sich die RAPD-Muster beider Primer auch zur Unterscheidung dieser Varietäten von anderen wurzelinfizierenden Pilzen (Abb. 4.3 und 4.4 Bahn 9-24). Anschließende Tests auf Reproduzierbarkeit der Fingerprints ergaben nahezu identische RAPD-Muster bei mehrfacher Wiederholung unabhängiger PCR-Amplifikationen derselben Stämme.

Der Vergleich der mit den verschiedenen Primern amplifizierten Muster zeigte, daß die OPB-Primer OPB-06 und OPB-07 für die Differenzierung der Isolate des G/P-Komplexes am besten geeignet sind. Alle taxonomischen Gruppen ergaben charakteristische Muster, deren Verwendbarkeit für die Klassifizierung durch die nachfolgende Analyse einer Vielzahl von Isolaten geprüft wurde.

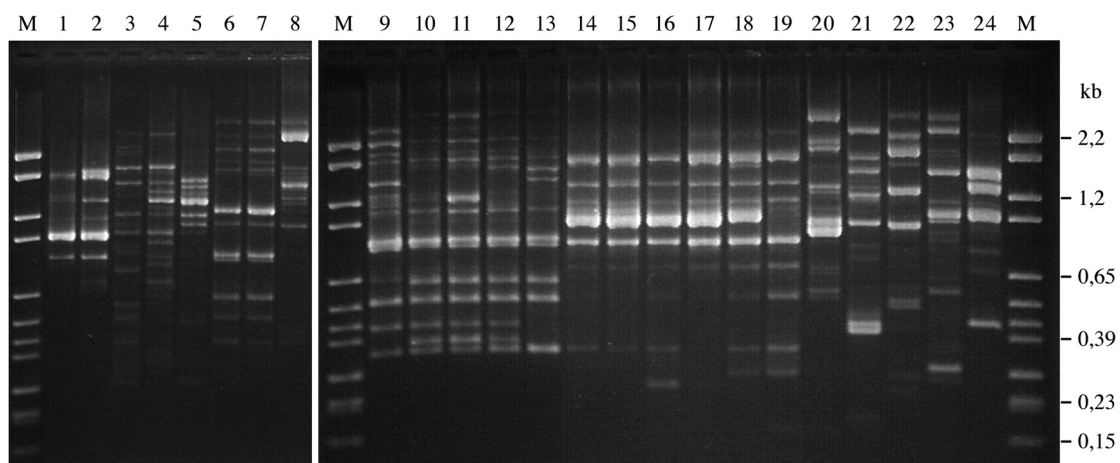


Abb. 4.3: RAPD-PCR-Muster von verschiedenen Isolaten des G/P-Komplexes nach Amplifikation mit dem Dekamerprimer OPB-06 im Vergleich zu Vertretern anderer wurzelinfizierender Pilzgattungen. Bahn 1-2: *G. graminis* var. *tritici*: 87/7-4, 90.GLR17; Bahn 3-4: *G. graminis* var. *avenae* 180, ABL2; Bahn 5: Isolat 122; Bahn 6-7: *G. graminis* var. *graminis* 92/49-2A, 92/52-1A; Bahn 8: *G. cylindrosporus*/*P. graminicola* 74/1736-2; Bahn 9-13: *G. graminis* var. *graminis* P13, T1, G197, PR2, G227; Bahn 14-19: *G. graminis* var. *tritici* D61, D109, G33, 9.1a, D2, 92/82-4; Bahn 20: *Fusarium* sp.; Bahn 21: *Selenophoma* sp.; Bahn 22: *Trichoderma* sp.; Bahn 23: *Phoma* sp.; Bahn 24: *Alternaria* sp. Als DNA-Größenstandard wurde der Marker VI (Boehringer Mannheim) verwendet.

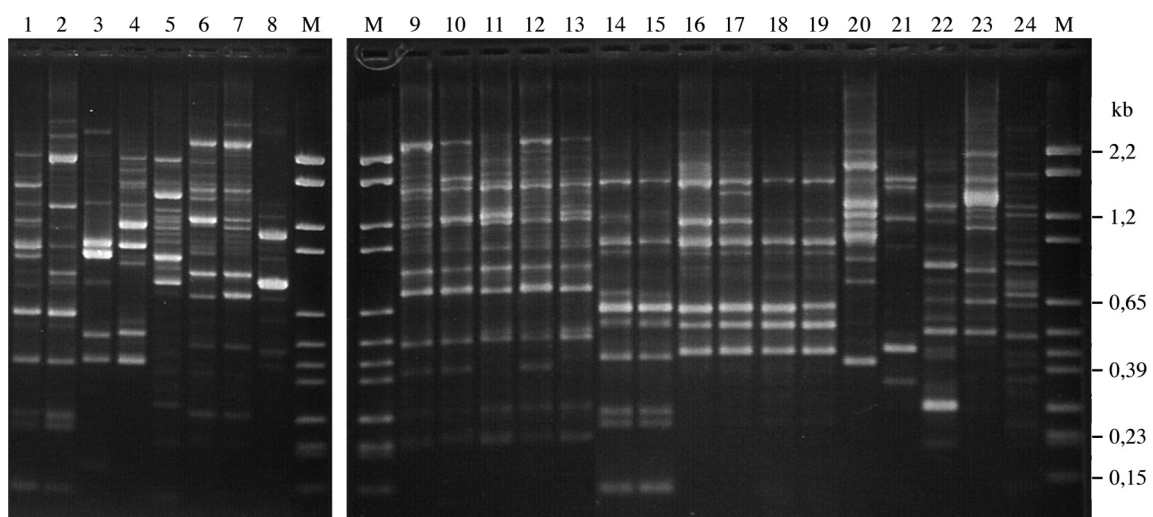


Abb. 4.4: RAPD-PCR-Muster von verschiedenen Isolaten des G/P-Komplexes nach Amplifikation mit dem Dekamerprimer OPB-07 im Vergleich zu Vertretern anderer wurzelinfizierender Pilzgattungen. Die verwendeten Isolate entsprechen denen in Abbildung 4.3.

4.1.2. Differenzierung von Isolaten des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes und ausgewählten Referenzstämmen durch RAPD-PCR-Analyse

In einem Zeitraum von 5 Jahren (1996-2000) wurden von verschiedenen landwirtschaftlich genutzten Standorten in Deutschland (Tab. 3.1) 2000 Pilze des G/P-Komplexes aus infizierten Getreidewurzeln isoliert. Alle Isolate zeigten die typischen morphologischen Charakteristika und Infektionseigenschaften der Pilze des G/P-Komplexes und wurden nachfolgend mit den RAPD-Primern OPB-06 und OPB-07 analysiert. Darüber hinaus wurden *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Referenzstämme in die Untersuchungen einbezogen.

Nach Amplifikation mit dem Primer OPB-07 zeigten alle getesteten Isolate die gleichen charakteristischen Bandenmuster, die sich bei der RAPD-Analyse der Referenzstämme ergeben hatten (vgl. 4.1.1). Ein Vergleich der Muster ergab eine eindeutige Aufteilung aller 2000 Isolate sowie des überwiegenden Teils der Referenzstämme in 5 Gruppen, die mit A, B, C, D und E bezeichnet wurden (Abb. 4.5A). Zur Klassifizierung der Gruppen wurden ausschließlich reproduzierbare Banden mit ausreichender Intensität gewertet.

Charakteristische Banden, die reproduzierbar bei allen Isolaten der RAPD-Gruppe A auftraten, lagen bei 0,61 kb, 1,0 kb und 1,6 kb. Die Isolate der Gruppe B zeigten spezifische Banden bei 0,25 kb, 0,52 kb und 0,75 kb. Die Isolate der Gruppe C hatten spezifische Banden bei 0,45 kb und 1,2 kb und die der Gruppe D bei 0,8 kb bzw. 0,83 und 1,1 kb. Die Gruppe E-Isolate wurden durch PCR-Produkte von 0,3 kb und 0,48 kb gekennzeichnet.

Auch mit dem Primer OPB-06 konnte die DNA aller getesteten Pilzisolat amplifiziert werden. In Analogie zum Primer OPB-07 war auch hier eine Einteilung der Isolate in 5 Mustergruppen möglich, die mit den durch Amplifikation mit dem Primer OPB-07 erhaltenen Mustergruppen A, B, C, D und E vollständig übereinstimmten (Abb. 4.5B). Die zur Differenzierung genutzten Banden lagen bei der Gruppe A bei 1,4 kb und 1,7 kb, bei der Gruppe B bei 0,33 kb, 0,52 kb und 0,88 kb, bei Gruppe D bei 1,4 kb, 1,6 kb und 2,6 kb und bei der Gruppe E bei 0,9 und 1,1 kb.

Die Pilze, die mit dem Primer OPB-07 zur Mustergruppe C zusammengefaßt werden konnten, waren zwar mit dem Primer OPB-06 von den Isolaten der anderen Mustergruppen zu unterscheiden, zeigten aber zu geringe Übereinstimmungen in ihren Bandenmustern, um in eine Gruppe zusammengefaßt zu werden.

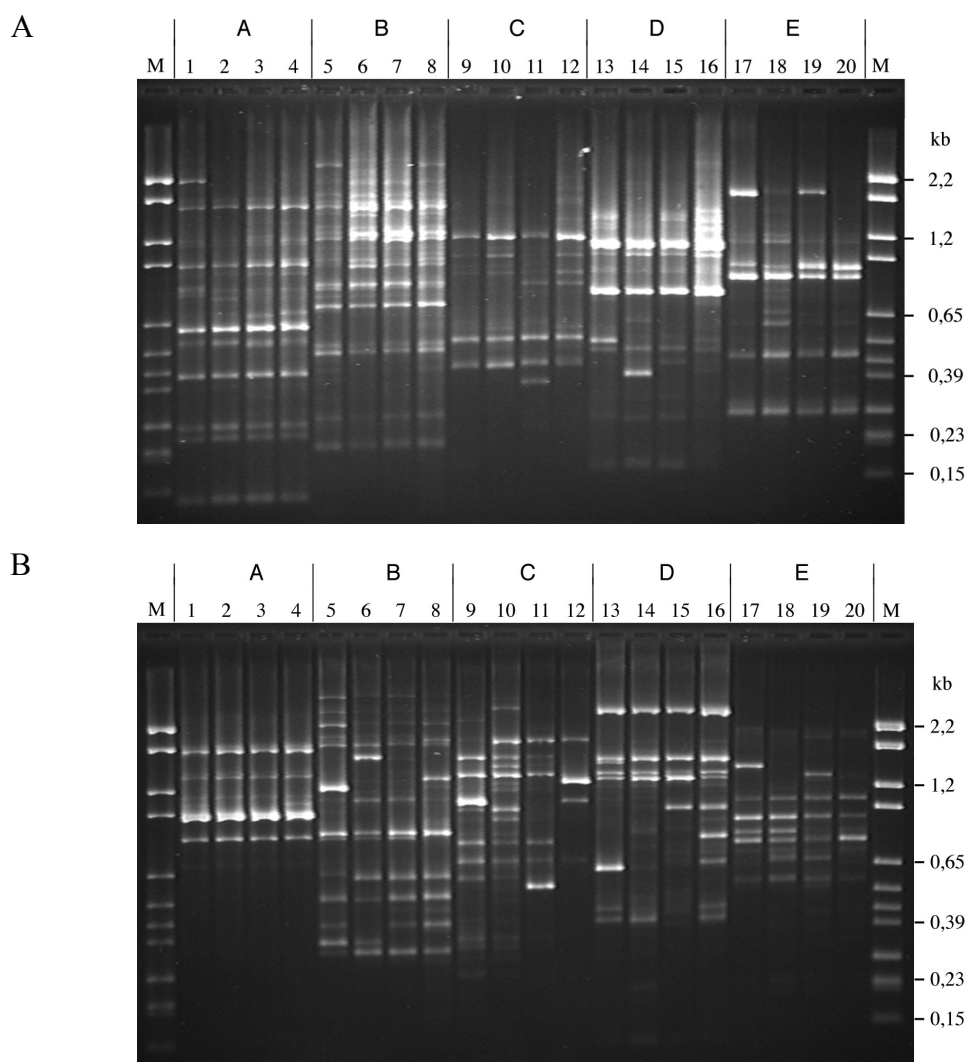


Abb. 4.5: RAPD-PCR-Muster von Isolaten des G/P-Komplexes nach Amplifikation mit den Primern (A) OPB-07 bzw. (B) OPB-06. Bahn 1-4: *G. graminis* var. *tritici* (RAPD-Gruppe A1) 57.5, 83.3.3, G33, G163; Bahn 5-8: *G. graminis* var. *graminis* (RAPD-Gruppe B) 12.4, 64.4, 18.1, 79.3; Bahn 9-12: *G. graminis* var. *avenae* (RAPD-Gruppe C) 179, 175, PO86/441, ABL2; Bahn 13-16: Isolate der Art *G. cylindrosporus*/*P. graminicola* (RAPD-Gruppe D) 541-1bc, 541-13c1, 541-2.3.a, P7; Bahn 17-20: RAPD-Gruppe E-Isolate K7, K8, K11/2, K4. Als DNA-Größenstandard wurde der Marker VI (Boehringer Mannheim) verwendet.

Neben der Differenzierung in die Mustergruppen A bis E war durch Vergleich der mit dem Primer OPB-07 erhaltenen Bandenmuster innerhalb der Isolate der RAPD-Gruppe A eine Unterteilung in zwei deutlich differenzierbare Untergruppen möglich. Die Untergruppen wurden als A1 und A2 bezeichnet.

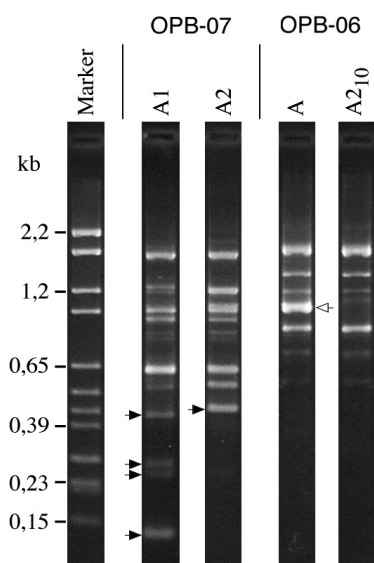


Abb. 4.6: Subklassifizierung der Isolate der RAPD-Gruppe A: Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Banden, die zur Differenzierung der Untergruppen A1 und A2 mit dem Primer OPB-07 genutzt wurden. Der weiße Pfeil zeigt die Position der 1 kb-Bande, die eine Differenzierung der Isolate des A₂₁₀-Typs nach Amplifikation mit dem Primer OPB-06 ermöglichte. Als DNA-Größenstandard wurde der Marker VI (Boehringer Mannheim) verwendet.

Die Unterscheidung erfolgte wie in Abbildung 4.6 dargestellt ist, anhand der Banden bei 0,13 kb, 0,3 kb, 0,31 kb und 0,45 kb, die nach Amplifikation mit dem Primer OPB-07 bei allen A1-Isolaten vorhanden waren und bei den A2-Isolaten fehlten. Dagegen zeigten alle A2-Isolate eine Bande bei 0,48 kb, die bei den A1-Isolaten nicht gebildet wurde. Nach Amplifikation mit dem Primer OPB-06 ergaben 76% der untersuchten Gruppe A- Isolate ein identisches Bandenmuster, während bei den übrigen Isolaten die 1 kb-Bande fehlte. Da alle Isolate, bei denen diese Bande fehlte, mit dem Primer OPB-07 in die Gruppe A2 der Varietät *tritici* eingeordnet werden konnten, wurde diese Isolategruppe als Subtyp der Untergruppe A2 eingeordnet und als A₂₁₀-Typ bezeichnet. Der Anteil der A₂₁₀-Isolate an der Gruppe A2 betrug ca. 42%.

Somit ist es durch Kombination der Primer OPB-06 und OPB-07 möglich, sowohl die Gruppen A-E eindeutig zu differenzieren, als auch eine Subklassifizierung innerhalb der Gruppe A vorzunehmen.

4.1.3. Taxonomische Zuordnung der RAPD-Gruppen zu Arten und Varietäten des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes

Durch die Analyse von 43 Referenzisolaten der *G. graminis*-Varietäten und der Art *G. cylindrosporus* (Tab. 3.3) war es möglich, die gefundenen RAPD-Gruppen den entsprechenden Taxa des G/P-Komplexes zuzuordnen. So zeigten alle *G. graminis* var. *tritici*-Referenzstämme bis auf die Isolate 180 und T1 das typische Fingerprintmuster der RAPD-Gruppe A. Die RAPD-Muster aller Referenzisolate der Varietät *avenae* und der Art *G.*

cylindrosporus/P. graminicola entsprachen denen der Isolate der Gruppen C bzw. D. Von den 15 verwendeten *G. graminis* var. *graminis*-Referenzstämmen stimmten 11 in ihren RAPD-Mustern mit denen der Gruppe B überein.

Das australische Isolat 180 und das CBS-Isolat T1 waren ursprünglich als Vertreter der *G. graminis*-Varietät *tritici* beschrieben worden. Die RAPD-Muster des von Weizen stammenden Isolates 180, das aufgrund seiner kurzen Ascosporen in die Varietät *tritici* eingeordnet worden war, hatten jedoch starke Ähnlichkeit mit denen der Isolate der RAPD-Gruppe C (Varietät *avenae*) (Abb. 4.1, 4.3 und 4.4). In Übereinstimmung damit zeigten auch Ward und Gray (1992) bzw. Ward und Akrofi (1994), daß dieses Isolat nach Hybridisierung gegen eine mitochondriale rDNA-Sonde bzw. Restriktionsanalyse der genomischen rDNA typische RFLP-Muster der Varietät *avenae* aufwies. Daher ist das Isolat 180 nicht der Varietät *tritici* zuzuordnen, sondern scheint eher eine Zwischenstellung zwischen den Varietäten *tritici* und *avenae* einzunehmen. Das ebenfalls von Weizen stammende Isolat T1 zeigte ein typisches RAPD-Muster der Gruppe B und darüber hinaus die für *G. graminis* var. *graminis* charakteristischen gelappten Hyphopodien. Somit ist dieses Isolat der Varietät *graminis* zuzuordnen.

Die Isolate Gg1, Gg2 und P1 aus der CBS-Stammsammlung und das Isolat 122 waren aufgrund morphologischer Merkmale bzw. Pathogenitätseigenschaften als *G. graminis* var. *graminis/Phialophora* sp.-Isolate eingeordnet worden, zeigten aber mit beiden Dekamerprimern Muster, die sowohl von der Gruppe B als auch von den anderen RAPD-Gruppen abwichen und konnten demzufolge in keine der entsprechenden Mustergruppen eingeordnet werden (Abb. 4.7). Das Isolat Gg1 wurde von *Deschampsia caespitosa* (Rasenschmiele) in Suffolk, U.K. isoliert, Gg2 stammt von einem nicht näher bestimmten Gras in Australien. Beide Isolate waren aufgrund der typischen gelappten Hyphopodien ursprünglich der Varietät *graminis* zugeordnet worden, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihres RAPD-Musters grundsätzlich von den in dieser Arbeit von Getreide gewonnenen *G. graminis* var. *graminis*-Isolaten. Das Isolat P1, ursprünglich als *Phialophora* sp. mit gelappten Hyphopodien identifiziert, wurde von einer Maiswurzel in Kanada (Ontario) isoliert. Über rDNA-Sequenzvergleiche wiesen Ward und Bateman (1999) nach, daß dieses Isolat identisch mit dem Isolat W4066B ist, das in China von Mais isoliert und in die *G. graminis*-Varietät *maydis* eingeordnet worden war (Yao *et al.*, 1992). Demzufolge stellt das Isolat P1 wahrscheinlich eine anamorphe Form der *G. graminis*-Varietät *maydis* dar. Das in Australien von Weizen

gewonnene Isolat 122 scheint nach Ward und Akrofi (1994) eine Zwischenstellung zwischen den Varietäten *tritici* und *graminis* einzunehmen.

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, daß es sich bei allen verwendeten Referenzstämmen, die über die RAPD-Analyse nicht in die entsprechenden Gruppen A bis D eingeordnet werden konnten, um falsch zugeordnete bzw. atypische Isolate handelt, deren taxonomischer Status auch mit anderen Methoden nicht geklärt werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, daß es sich bei den RAPD-Gruppen A, B und C um die *G. graminis* Varietäten *tritici*, *graminis* bzw. *avenae* handelt und die RAPD-Gruppe D die Art *G. cylindrosporus*/*P. graminicola* repräsentiert. Die Isolate der Gruppe E hatten RAPD-Muster, die von allen anderen Pilzen des G/P-Komplexes abwichen (Abb. 4.5 und 4.7), und konnten in keine bekannte Art bzw. Varietät eingeordnet werden. Eine genauere phylogenetische und phänotypische Charakterisierung dieser Gruppe ist in Abschnitt 4.3 dargelegt. Die Unterteilung der Isolate der RAPD-Gruppe A in A1, A2 und den Subtyp A2₁₀ weist auf separate Untergruppen innerhalb der Varietät *tritici* hin und wird in Abschnitt 4.4.1. näher beschrieben.

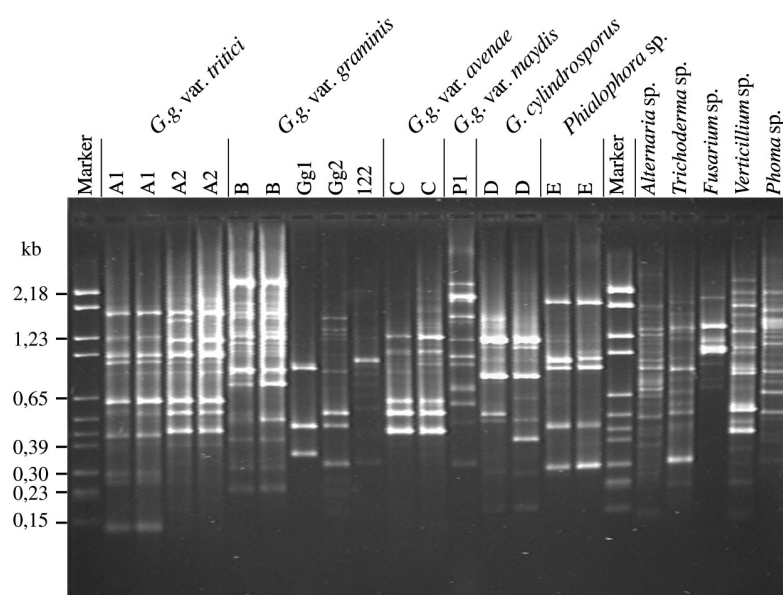


Abb. 4.7: RAPD-PCR-Muster von Pilzen der Arten, Varietäten und Untergruppen des G/P-Komplexes im Vergleich zu Isolaten anderer im Boden vorkommender Pilzgattungen. Die Amplifikation erfolgte mit dem Primer OPB-07. Als DNA-Größenstandard wurde der Marker VI (Boehringer Mannheim) verwendet.

Zusammenfassend sind in der Abbildung 4.7 die typischen RAPD-Muster der *G. graminis*-Varietäten, der Art *G. cylindrosporus*/*P. graminicola*, der Gruppe E sowie atypischer Isolate

der Varietät *graminis* dargestellt. Zum Vergleich sind die Fingerprints von Vertretern verschiedener wurzelinfizierender Pilzgattungen abgebildet.

4.1.4. Vergleich der mit der RAPD-PCR erhaltenen Klassifizierung mit anderen molekulargenetischen Differenzierungsmethoden und der Hyphopodienform

Die anhand der RAPD-Polymorphismen erhaltene Klassifizierung der *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate wurde im folgenden mit weiteren molekulargenetischen Methoden, die eine Unterscheidung der Pilze des G/P-Komplexes ermöglichen, verglichen (Tab. 4.1). Hierzu wurden repräsentative Isolate der Gruppen A bis E bzw. der *G. graminis* var. *tritici*-Untergruppen A1, A2 und A2₁₀ mit den verschiedenen Methoden analysiert.

Tabelle 4.1: Vergleich der Ergebnisse der RAPD-PCR mit den Ergebnissen anderer molekulargenetischer Differenzierungsmethoden und der Hyphopodienform.

Isolat	Wirtspflanze	RAPD-Muster	psnDNA2p/ pITS4- <i>Ddel</i> ¹	psnDNA2p/ pITS4- <i>MspI</i> ²	GggMR1 ³	KSIF/KS2R ⁴	Form der Hyphopodien ⁵
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>							
G33	Gerste	A1	1	1	T2	Ggt/a	leicht gelappt
G57	Roggen	A1	1	1	T2	Ggt/a	leicht gelappt
G163	Weizen	A1	1	1	T2	Ggt/a	gelappt
83.3.3	Weizen	A1	1	1	T2	Ggt/a	einfach
D109	n.b.	A1	1	1	T2	Ggt/a	einfach
46.1b	Weizen	A1	1	1	T2	Ggt/a	einfach
46.1/1	Weizen	A1	1	1	T2	Ggt/a	einfach
46.1/2	Weizen	A1	1	1	T2	Ggt/a	einfach
41.3	Roggen	A1	1	1	T2	Ggt/a	einfach
87.7/4	Gerste	A1	1	1	T2 **	Ggt/a *	einfach
90.GLR.17	Roggen	A1	1	1	T2 **	Ggt/a *	einfach
D2	Weizen	A2	1	2	T1	Ggt/a	einfach
D9	Weizen	A2	1	2	T1	Ggt/a	einfach
57.1	Weizen	A2	1	2	T1	Ggt/a	einfach
9.1a	Weizen	A2	1	2	T1	Ggt/a	einfach
90/2-4	Weizen	A2	1	2	T1 **	Ggt/a *	einfach
T2	Weizen	A2	1	2	T1	Ggt/a	einfach
10.4a	Roggen	A2 ₁₀	1	2	T1	Ggt/a	einfach
10.1.2	Roggen	A2 ₁₀	1	2	T1	Ggt/a	einfach
10.5.1	Roggen	A2 ₁₀	1	2	T1	Ggt/a	einfach
92/82-4	Weizen	A2 ₁₀	1	2	T1	n.b.	n.b.
92/132-2	Hafer	A2 ₁₀	1	2	T1	n.b.	n.b.
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i>							
G184	Weizen	B	2	3	G1	Ggg	gelappt
10.1.1	Roggen	B	2	3	G1	Ggg	gelappt
92/49-2A	Weizen	B	2	3	G1	Ggg *	gelappt
92/52-1A	Weizen	B	2	3	G1	Ggg *	gelappt
18.5	Roggen	B	2	3	G1	n.b.	gelappt
G165	Weizen	B	2	3	G2	Ggg	gelappt
G227	Roggen	B	2	3	G2	Ggg	gelappt
69.1	Weizen	B	2	3	G2	Ggg	gelappt
79.3	Weizen	B	2	3	G2	Ggg	gelappt

T1	Weizen	B	2	3	G2	n.b.	gelappt
148	Weizen	B	2	3	G2	Ggg *	gelappt
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>avenae</i>							
ABL2	Gras	C	3	2	A1 **	Ggt/a *	n.b.
P086/441	Weizen	C	3	2	A1 **	Ggt/a *	n.b.
175	Straußgras	C	3	2	A1 **	Ggt/a *	n.b.
179	Straußgras	C	3	2	A1 **	Ggt/a *	n.b.
A1	Hafer	C	3	2	A1	Ggt/a	einfach
A2	Hafer	C	3	2	A1	Ggt/a	einfach
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>maydis</i>							
P1	Mais	d.	1	6	T1**	Ggg	gelappt
<i>Gaeumannomyces cylindrosporus/Phialophora graminicola</i>							
74/1736-2	Weidelgras	D	4	4	n.b.	k. A. *	n.b.
93/5-1	Weizen	D	4	4	n.b.	k. A. *	n.b.
C2	Gras	D	4	4	n.b.	k. A.	leicht gelappt
541-13c1	Weizen	D	4	4	n.b.	n.b.	n.b.
541-2.3a	Weizen	D	4	4	n.b.	n.b.	n.b.
P7	n.b.	D	4	4	n.b.	k. A.	leicht gelappt
C1	Gras	D	4	4	n.b.	k. A.	leicht gelappt
Gruppe E							
K1/1	Weizen	E	2	5	n.b.	n.b.	gelappt
K4	Weizen	E	2	5	n.b.	n.b.	gelappt
1168	Weizen	E	2	5	n.b.	n.b.	gelappt
437	Gerste	E	2	5	n.b.	n.b.	gelappt
440	Gerste	E	2	5	n.b.	n.b.	gelappt

^{1,2} RFLP-Analyse des mit den Primern psnDNA2p/pITS4 amplifizierten ITS/rDNA-Fragmentes mit den Enzymen *DdeI* bzw. *MspI*

³ Southern-Hybridisierung gegen die Sonde GggMR1 (mitochondriale rDNA).

⁴ Differenzierung mit den *G. graminis*-spezifischen Primern KS1F/KS2R.

⁵ Bestimmung der Hyphopodienform als morphologisches Unterscheidungskriterium.

^{1,3,4,5} Die aufgeführten Daten für *G. graminis* und *G. cylindrosporus* sind in Augustin *et al.*, 1999 beschrieben.

** aus Ward und Gray (1992)

* aus Ward (1995)

n.b. nicht bestimmt

k.A. keine Amplifikationsprodukte

d. von den Gruppen A-E abweichendes Muster

RFLP-Analyse der ITS/rDNA-Region. Alle Isolate wurden durch Restriktionsanalyse der mit den Primern psnDNA2p und pITS4 amplifizierten ITS/rDNA-Region differenziert. Das Fragment besteht aus 175 bp des 18S rRNA-Gens, der ITS1-Region, dem 5,8S rRNA-Gen, der ITS2-Region und 58 bp des 26 S rRNA-Gens (Abb. 4.8).

Wie in Tabelle 4.1 gezeigt, führte die Spaltung der ITS/rDNA-Region mit dem Enzym *DdeI* zu einer Einteilung der Isolate in 4 Gruppen. Die Gruppen 1, 2 und 3 wurden den *G. graminis*-Varietäten *tritici*, *graminis* bzw. *avenae* und die Gruppe 4 der Art *G. cylindrosporus* zugeordnet. Die Isolate der RAPD-Gruppe E zeigten das gleiche *DdeI*-Spaltungsmuster wie

die Isolate der Varietät *graminis*, und das Isolat P1 (*G. graminis* var. *maydis*) hatte das gleiche Muster wie die *G. graminis* var. *tritici*-Isolate.

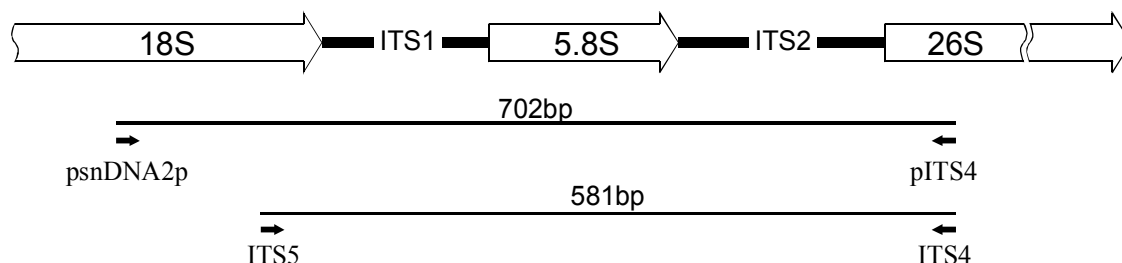


Abb. 4.8: Schematische Darstellung der *G. graminis*-ITS/rDNA-Region. Die offenen Pfeile stellen die ribosomalen Untereinheiten mit den dazwischen liegenden ITS-Bereichen dar. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Positionen der PCR-Primer. Für die in Tabelle 4.1 beschriebenen Analysen wurde das 702 bp psnDNA2p-pITS4-Fragment (Bryan *et al.*, 1995) verwendet. Analoge Untersuchungen wurden von Ward und Akrofi (1994) mit dem um 121 bp kürzeren ITS5-ITS4-Fragment durchgeführt.

Neben der *DdeI*-Spaltung wurde eine Spaltung mit dem Enzym *MspI* durchgeführt, die zur Differenzierung der Isolate in 6 Gruppen führte. Die Gruppen 1 und 2 stimmten mit den anhand der RAPD-Polymorphismen differenzierten *G. graminis* var. *tritici*-Untergruppen A1 bzw. A2 überein und bestätigten so die durch die RAPD-PCR gefundene Subklassifizierung innerhalb der Varietät *tritici*. Die Gruppe 3 entsprach der Varietät *graminis*. Die Isolate der Varietät *avenae* zeigten das gleiche *MspI*-Spaltungsmuster wie die Isolate der Untergruppe A2 der Varietät *tritici*, und die Gruppen 4 und 5 repräsentieren die Isolate der Art *G. cylindrosporus* bzw. der RAPD-Gruppe E. Das Isolat P1 hatte ein von allen anderen Gruppen abweichendes *MspI*-Spaltmuster. Somit kann durch Kombination der Restriktionsenzyme *DdeI* und *MspI* eine vollständige Differenzierung aller Arten und Varietäten sowie der Untergruppen A1 und A2 der Varietät *tritici* erfolgen.

Hybridisierung mit mitochondrialer rDNA. Weiterhin wurden Vertreter der RAPD-Gruppen A, B und C, die die *G. graminis*-Varietäten *tritici*, *graminis* bzw. *avenae* repräsentieren, durch Hybridisierung mit der mitochondrialen ribosomalen Sonde GggMR1 (Ward und Gray; 1992; Ward und Bateman, 1994) getestet. Diese Methode ermöglicht neben der Unterscheidung der Arten *G. graminis* und *G. cylindrosporus* und der Differenzierung der *G. graminis*-Varietäten auch eine Subklassifizierung der Isolate der Varietäten *tritici* und *graminis* in verschiedene RFLP-Typen.

Die Hybridisierungsergebnisse bestätigten zum einen die mit der RAPD-PCR gewonnene Klassifizierung in die *G. graminis*-Varietäten. Zum anderen wurde gezeigt, daß die von Ward und Gray (1992) gefundene Subklassifizierung der *G. graminis* var. *tritici*-Isolate in die RFLP-Typen T1 und T2 mit der durch die RAPD-PCR gewonnenen Differenzierung übereinstimmt. Alle Isolate der Untergruppe A1 zeigten nach Hybridisierung mit der Sonde GggMR1 Banden bei 1,8 kb und 5,4 kb und konnten demzufolge dem RFLP-Typ T2 zugeordnet werden. Bei den Isolaten der Untergruppe A2, einschließlich des Subtyps A2₁₀, konnten Banden bei 1,8 kb und 4,0 kb identifiziert werden, die für den RFLP-Typ T1 charakteristisch sind.

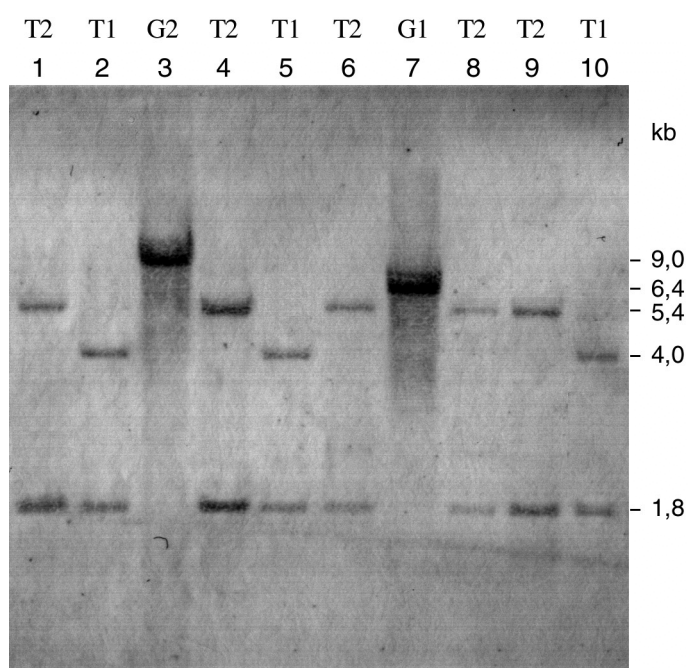


Abb. 4.9: Southern-Hybridisierung von *Eco*RI-gespaltener Gesamt-DNA von Isolaten der *G. graminis*-Varietäten *tritici* und *graminis* gegen die Sonde GggMR1. Bahn 1-10: G33 (A1), 10.5.1 (A2₁₀), G227 (B), G163 (A1), 9.1a (A2), 46.1/2 (A1), 18.5 (B), 46.1b (A1), D109 (A1), 57.1 (A2). Die Bezeichnung über den Bahnen gibt die RFLP-Typen nach Ward und Gray (1992) an.

Die getesteten *G. graminis* var. *graminis*-Isolate konnten entsprechend der Einteilung von Ward und Gray (1992) in die RFLP-Typen G1 und G2 eingeteilt werden (Abb. 4.9). Dabei bildeten die Isolate des RFLP-Typs G1 eine Bande bei 6,4 kb und die Isolate des RFLP-Typs G2 eine Bande von 9,0 kb. Diese Unterteilung konnte anhand der RAPD-Muster nicht nachvollzogen werden.

PCR-Analyse mit *G. graminis*-spezifischen Primern. Zu einem weiteren Vergleich der RAPD-PCR-Differenzierung wurden Ergebnisse aus der Literatur verwendet. Nach einem von Ward (1995) beschriebenen PCR-Test mit den *G. graminis*-spezifischen mitochondrialen Primern KS1F/KS2R (Schesser *et al.*, 1991) ist eine Unterscheidung zwischen den zu Weizen bzw. Hafer pathogenen Varietäten *tritici* und *avenae* und der schwach pathogenen Varietät *graminis* möglich. Nach Ward (1995) und Augustin *et al.* (1999) ergaben alle mit der RAPD-PCR in die Mustergruppen A und C eingeordneten Isolate ein 600 bp-Fragment, das für die Varietäten *tritici* und *avenae* charakteristisch ist. Die Fragmente der Isolate der RAPD-Gruppe B hatten in Übereinstimmung mit Ergebnissen für die Varietät *graminis* eine Größe von 435 bis 550 bp. Die Isolate der RAPD-Gruppe D (*G. cylindrosporus*/*P. graminicola*) zeigten mit den Primern KS1F/KS2R keine Amplifikationsprodukte.

Hyphopodienform. Neben dem Vergleich zu bekannten molekularbiologischen Differenzierungsmethoden wurde auch die Bestimmung der Hyphopodienformen, die als wichtiges morphologisches Unterscheidungskriterium der *G. graminis*-Isolate beschrieben wurde (Walker, 1981), herangezogen. Der größte Teil der Isolate der RAPD-Gruppe A, die die *G. graminis*-Varietät *tritici* repräsentiert, hatte die für diese Varietät typischen einfachen Hyphopodien. Ausnahmen bildeten die Isolate G33 und G57 mit leicht gelappten und das Isolat G163 mit gelappten Hyphopodien. Ähnliche Isolate, die sowohl Eigenschaften der Varietät *tritici* als auch der Varietät *graminis* besitzen, wurden auch von Nilsson (1972) und Ward und Akrofi (1994) beschrieben. Alle Isolate der RAPD-Gruppe B (*G. graminis* var. *graminis*) hatten gelappte Hyphopodien. Die Isolate der Gruppe C hatten wie erwartet einfache und die der Gruppe D leicht gelappte Hyphopodien. Bei den Pilzen der RAPD-Gruppe E wurden wie bei den Isolaten der Varietät *graminis* gelappte Hyphopodien beobachtet.

Insgesamt zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung in der Klassifizierung zwischen der RAPD-PCR und den zum Vergleich verwendeten Methoden. Die Ergebnisse machen deutlich, daß die RAPD-PCR zur schnellen und sicheren Identifizierung und Differenzierung der *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate sowohl auf inter- als auch auf intravarietaler Ebene geeignet ist. Darüber hinaus erlaubt die Spezifität der Fingerprintmuster die Einordnung atypischer Isolate und das Auffinden neuer Pilzgruppen, wie am Beispiel der Gruppe E-Isolate gezeigt werden konnte.

4.1.5. Untersuchung der Stabilität der RAPD-PCR-Muster nach Pflanzenpassage

Die Stabilität der RAPD-Muster wurde anhand von vier repräsentativen Isolaten der *G. graminis*-Varietäten *tritici* (Gruppe A1) bzw. *graminis* (Gruppe B) vorgenommen. Dazu wurden im Pathogenitäts-Standardtest sterile Weizenpflanzen mit den entsprechenden Pilzisolaten beimpft. Nach sechs Wochen unter semisterilen Bedingungen in der Klimakammer wurden die Pilze aus der Wurzel reisoliert und wiederum ihr RAPD-Muster analysiert. Hierbei zeigte sich eine hohe Stabilität der Fingerprints. Die RAPD-Muster der einzelnen Stämme waren vor und nach der Passage nahezu identisch. Alle spezifischen Banden zur Klassifizierung der Gruppen A und B sowie die spezifischen DNA-Fragmente der Gruppe A1 waren nachweisbar (vgl. 4.1.2).

4.2. Analyse der Populationszusammensetzung der Pilze des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes

Von den insgesamt 2000 untersuchten Pilzisolaten wurden 97% der Art *Gaeumannomyces graminis* zugeordnet (Abb. 4.10). Davon gehörten 1818 Isolate der Varietät *tritici* und 123 Isolate der Varietät *graminis* an. *G. graminis* var. *avenae*-Isolate konnten auf keinem der untersuchten Standorte in Deutschland nachgewiesen werden. Einen sehr geringen Anteil an der Gesamtisolatezahl (0,5%) machte die Art *Gaeumannomyces cylindrosporus*/*P. graminicola* aus.

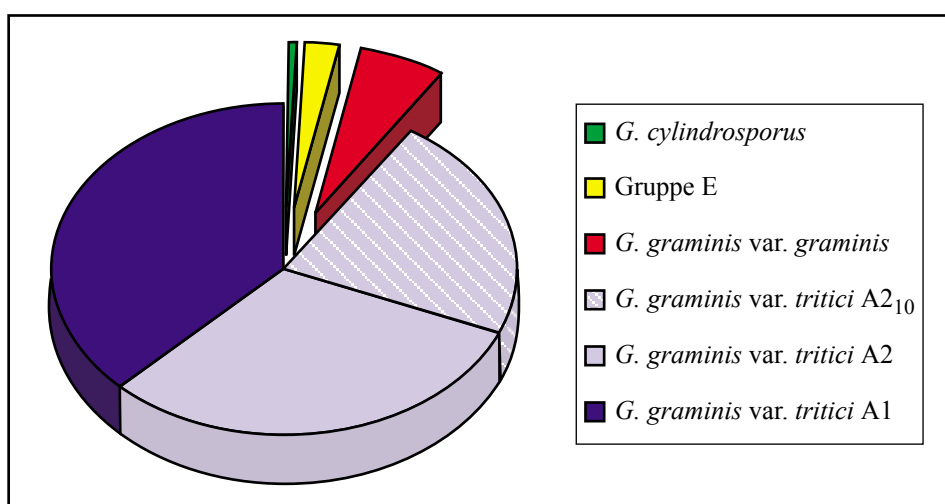


Abb. 4.10: Darstellung der relativen Anteile der Arten, Varietäten und Untergruppen der Pilze des G/P-Komplexes bezogen auf die Gesamtisolatezahl

Die Pilze der RAPD-Gruppe E hatten mit einer Gesamtzahl von 50 Isolaten einen Anteil von 2,5%. Von den 1818 untersuchten *G. graminis* var. *tritici*-Isolaten (RAPD-Gruppe A) wurden 757 Isolate in die Untergruppe A1 und 1061 Isolate in die Untergruppe A2 eingeordnet, das entspricht einem prozentualen Verhältnis von 40% zu 60%. Innerhalb der A2-Gruppe zeigten 42% der Isolate nach Amplifikation mit dem Primer OPB-06 das typische A2₁₀-Muster.

Die Analysen ergaben, daß auf unseren Versuchsflächen, bei denen es sich vorwiegend um Getreideanbauflächen handelte, die Isolate der *G. graminis*-Varietät *tritici* den Hauptanteil der Pilze des G/P-Komplexes ausmachen. Innerhalb der Varietät kommt dabei der Untergruppe A2 der größte Anteil zu. Im Gegensatz dazu machten die Isolate der Varietät *graminis* nur einen relativ geringen Anteil an den Gesamtisolaten aus. Ähnlich wie die Pilze der Art *G. cylindrosporus*, die auf den untersuchten Standorten nur in sehr geringem Umfang nachgewiesen werden konnten, ist auch das Vorkommen der Pilze der Varietät *graminis* eher an das Vorhandensein von Gräsern gebunden (Hornby *et al.*, 1977; Smiley und Fowler, 1984; Smiley *et al.*, 1986). Keine Bedeutung für die von uns untersuchten Standorte scheinen die Pilze der Varietät *avenae* zu besitzen. Analoge Beobachtungen wurden auch von S. Martyniuk in Polen gemacht (pers. Mitteilung) und sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Pilze dieser Varietät zwar als Erreger der Schwarzbeinigkeit an Getreide, vor allem an Hafer beschrieben wurden, jedoch mehr mit dem Befall von Rasengräsern (Take-all patch-Krankheit) in Verbindung stehen (Smiley *et al.*, 1992).

Die in dieser Arbeit identifizierten *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Stämme wurden von unterschiedlichen Getreidearten isoliert. Mögliche Anhaltspunkte für eine bevorzugte Assoziation zwischen einzelnen Getreidearten und bestimmten Pilzgruppen des G/P-Komplexes sollten durch eine standortübergreifende Auswertung der relativen Anteile einzelner Pilzgruppen bezogen auf die Wirtspflanze gewonnen werden. Die in Abbildung 4.11 dargestellten relativen Anteile der Pilzgruppen zeigten bei den verschiedenen Getreidearten deutliche Unterschiede. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Bateman *et al.* (1997) scheint Gerste bevorzugt durch die Pilze der Untergruppe A1 der Varietät *tritici* infiziert zu werden. Bei Roggen und Weizen waren die Anteile der Untergruppen A1 und A2 nahezu gleich. Triticale und besonders Ausfallgetreide auf Bracheflächen zeigten eine deutlich höhere Assoziation zu den Isolaten der Untergruppe A2. Die Anteile der Pilze der Varietät *graminis* und der Art *G. cylindrosporus*/*P. graminicola* waren bei allen untersuchten Getreidearten ähnlich. Die Pilze der neu identifizierten Gruppe E wurden vorrangig an Weizen und Gerste gefunden.

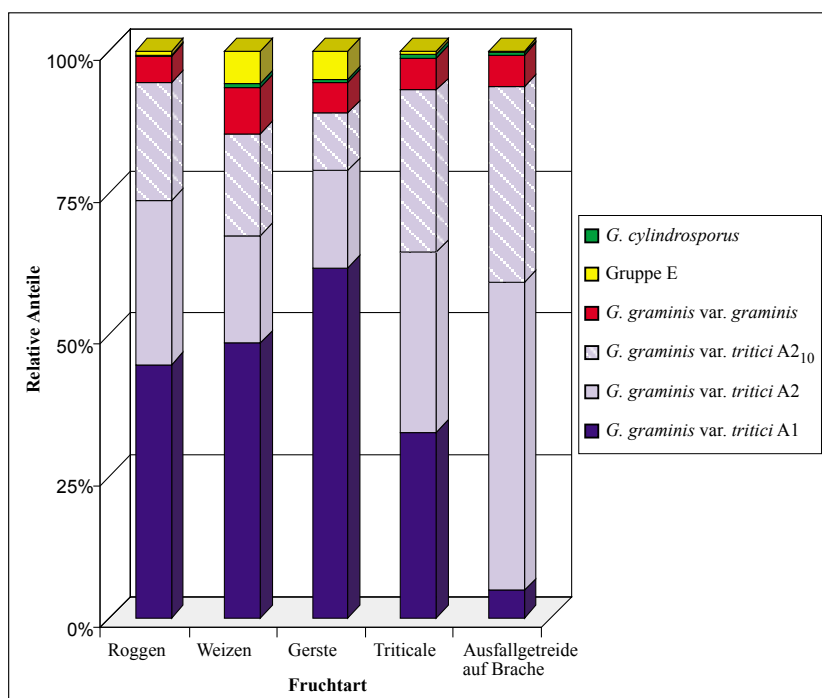


Abb. 4.11: Relative Anteile der Pilzgruppen des G/P-Komplexes bezogen auf die Wirtspflanze (standortübergreifend). Das Ausfallgetreide auf den Bracheflächen entsprach überwiegend der Vorfrucht.

In diese Untersuchung gingen 1838 Isolate ein, die jedoch in unterschiedlicher Anzahl von 46 verschiedenen Standorten isoliert wurden. Dadurch kann die hier gefundene Präferenz einzelner Getreidearten zu bestimmten Pilzgruppen des G/P-Komplexes lediglich als Hinweis gewertet werden.

4.3. Charakterisierung und phylogenetische Einordnung einer neuen Pilzgruppe des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes

4.3.1. Identifizierung einer neuen Isolategruppe

Wie in Abschnitt 4.1.2 dargestellt, ergaben die Isolate der Gruppe E nach Amplifikation mit dem Primer OPB-06 bzw. OPB-07 untereinander sehr einheitliche, jedoch von den Pilzen der bekannten Arten und Varietäten des G/P-Komplexes deutlich abweichende RAPD-PCR-Muster. Alle Isolate der Gruppe E wurden aus infizierten, schwarz gefärbten Getreidewurzeln isoliert und zeigten die für die Pilze des G/P-Komplexes typischen Infektions- und Mycelcharakteristika. Nachfolgende Untersuchungen sollten Klarheit über die phylo-

genetische Einordnung, die phänotypischen Merkmale und das Pathogenitätsverhalten dieser Gruppe bringen.

4.3.2. Phylogenetische Charakterisierung der neuen Pilzgruppe

Die phylogenetische Charakterisierung der neuen Pilzgruppe basiert auf der Analyse der ITS/rDNA-Region. Dazu wurde die ITS/rDNA repräsentativer Isolate der Gruppe E sowie von Referenzstämmen der bekannten Arten und Varietäten des G/P-Komplexes mit den Primern psnDNA2p und pITS4 (Abb. 4.8) amplifiziert. Die Isolate der neuen Gruppe bildeten ein 702 bp Fragment, das für die *G. graminis*-Varietäten *tritici*, *avenae* und *graminis* typisch ist. Bei den Pilzen der Art *G. cylindrosporus*/*P. graminicola* dagegen wurde ein 740 bp großes Amplifikationsprodukt nachgewiesen.

Nachfolgend wurde eine Restriktionsanalyse mit fünf repräsentativen Isolaten der Gruppe E (K4, 437, K13/4, 440, 1287) und Referenzisolaten der *G. graminis*-Varietäten und *G. cylindrosporus* durchgeführt. Dazu wurden die Restriktionsendonukleasen *AluI*, *CfoI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI*, *ScrFI* und *TaqI* verwendet. Die Isolate der Gruppe E ergaben mit allen acht Enzymen jeweils einheitliche Muster.

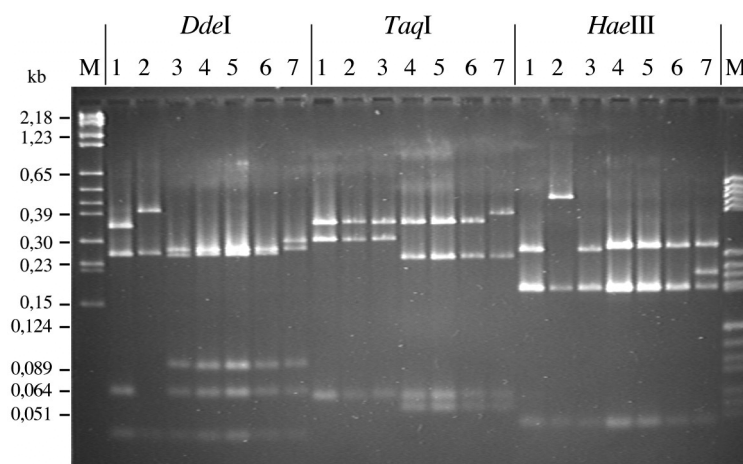


Abb. 4.12: Restriktionsanalyse der ITS/rDNA-Region der Isolate der RAPD-Gruppe E im Vergleich zu Pilzen des G/P-Komplexes. Bahn 1-3: *G. graminis* var. *tritici* G163, *G. graminis* var. *avenae* P086/441, *G. graminis* var. *graminis* 18.5, Bahn 4-6: Gruppe E-Isolate K4, 437, K13/4, Bahn 7: *G. cylindrosporus* 74/1736-2. Als DNA-Größenstandard wurden die Marker V und VI (Boehringer Mannheim) verwendet.

Nach Spaltung der amplifizierten ITS/rDNA-Region mit dem Restriktionsenzym *DdeI*, das wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben, eine Differenzierung der *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate ermöglicht, zeigten die Isolate der Gruppe E das gleiche Spaltungsmuster

wie die *G. graminis* var. *graminis*-Isolate (Abb. 4.12). Auch die Spaltung mit dem Enzym *CfoI* ergab gleiche Muster für die Isolate der Gruppe E und die Isolate der Varietät *graminis*. Durch Spaltung mit den Enzymen *HinfI*, *MspI*, *ScrFI*, *HaeIII* und *TaqI* war eine Differenzierung der Gruppe E-Isolate von den *G. graminis*-Varietäten und von *G. cylindrosporus* möglich (Tab. 4.2, Abb. 4.12, gezeigt am Beispiel *TaqI* und *HaeIII*). Das Enzym *AluI* erlaubte lediglich eine Unterscheidung der Isolate der Gruppe E und der Art *G. graminis* von *G. cylindrosporus*. Von den Enzymen, die eine Unterscheidung der Gruppe E-Isolate von den Referenzisolaten ermöglichten, wurden *HinfI*, *MspI* und *TaqI* ausgewählt, um die phylogenetische Einheitlichkeit innerhalb der RAPD-Gruppe E einschätzen zu können. Die 50 identifizierten Isolate der Gruppe ergaben jeweils identische Muster mit den Enzymen *HinfI* und *TaqI*, während die Spaltung mit *MspI* zur Differenzierung der Gruppe in zwei Untergruppen führte. Drei Isolate zeigten bei einer der fünf entstandenen Banden eine Abweichung von ca. 10 bp, was wahrscheinlich auf einen zusätzlichen *MspI*-Schnittort zurückzuführen ist. Um die Aufteilung der Gruppe E-Isolate näher zu analysieren, wurden Vertreter beider Untergruppen mit weiteren Restriktionsenzymen gespalten.

Tabelle 4.2: Restriktionsmuster der amplifizierten ITS/rDNA-Region der Gruppe E-Isolate im Vergleich zu Referenzstämmen des G/P-Komplexes.

Isolate	Restriktionsmuster der amplifizierten ITS/rDNA-Region ¹ :							
	<i>AluI</i>	<i>CfoI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>MspI</i>	<i>ScrFI</i>	<i>TaqI</i>
Gruppe E-Isolate: K4, K13/4, 437, 440, 1287	A	A	A	A	A	A	A	A
var. <i>tritici</i> G163	A	B	B	B	B	B	B	B
var. <i>avenae</i> P086/441	A	B	C	C	B	C	C	B
var. <i>graminis</i> 18.5	A	A	A	B	B	D	C	B
<i>G. cylindrosporus</i> 74/1736-2	B	C	D	D	C	E	D	C

¹ Unterschiedliche Restriktionsmuster, die sich nach Spaltung mit den entsprechenden Enzymen ergaben, wurden mit verschiedenen Buchstaben bezeichnet.

Es zeigte sich, daß auch die Enzyme *DpnII* und *RsaI* eine Differenzierung beider Untergruppen ermöglichten (Abb. 4.13). Die Gruppenunterteilung war dabei mit allen drei Enzymen (*MspI*, *DpnII* und *RsaI*) identisch.

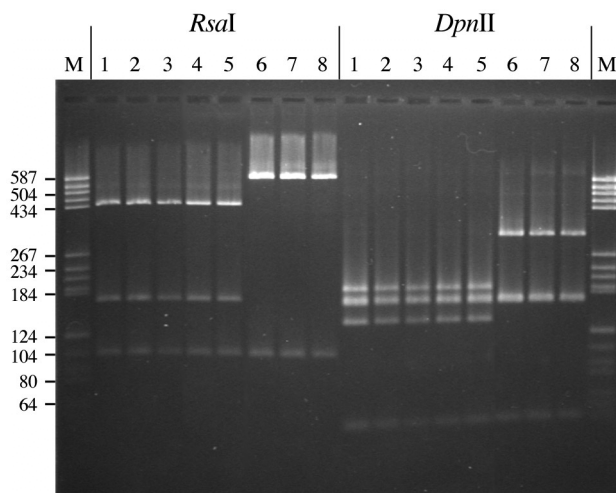


Abb. 4.13: Differenzierung der RAPD-Gruppe E-Isolate in zwei Untergruppen durch Restriktionsspaltung der rDNA/ITS-Region mit *RsaI* bzw. *DpnII*: Bahn 1-5: Gruppe E-Isolate: 1206, 1198, K13/4, 1168, K4; Bahn 6-8: Isolate der Gruppe E*: K8, K7 und 1216. Als DNA-Größenstandard wurde der Marker V (Boehringer Mannheim) verwendet.

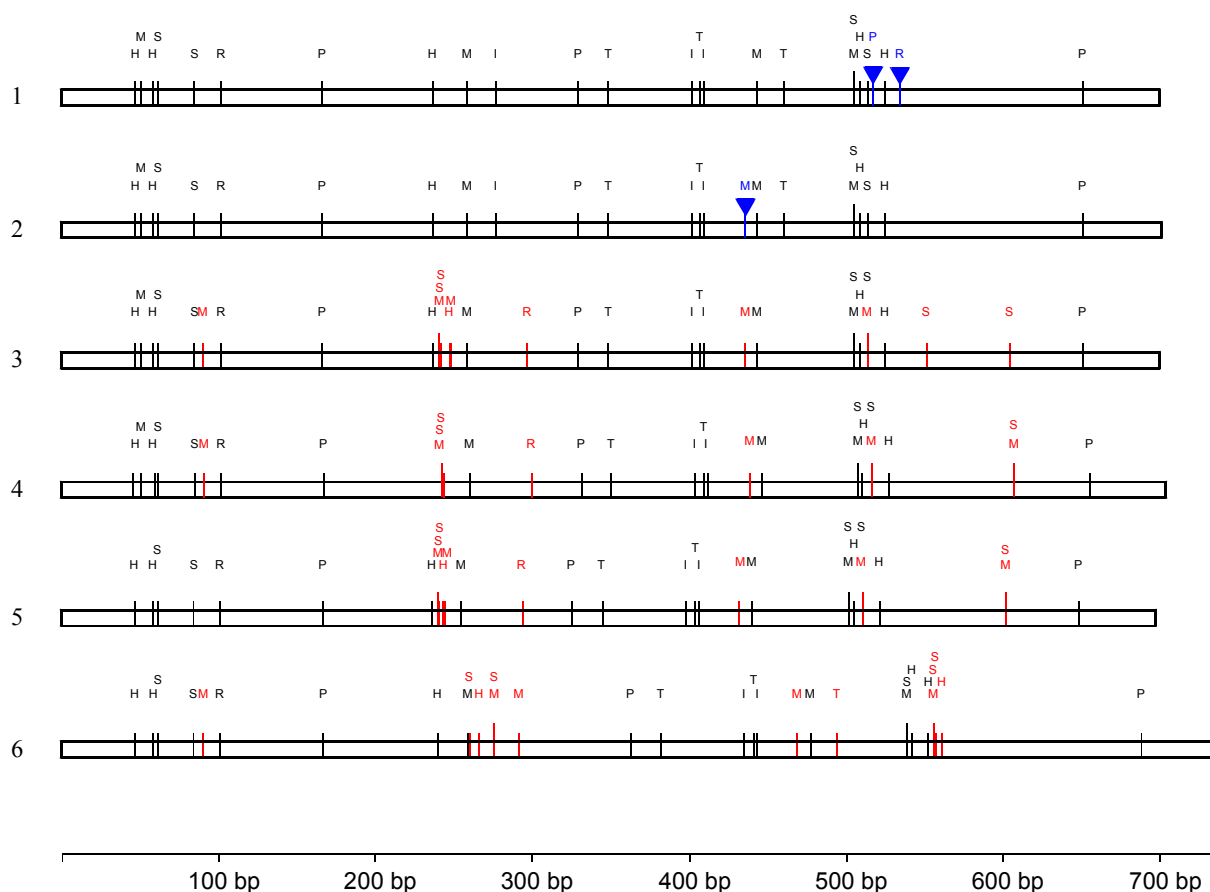


Abb. 4.14: Restriktionskarte der Untergruppen der RAPD-Gruppe E und E* (437 bzw. K8) im Vergleich zu den anderen Pilzen des G/P-Komplexes. Die Karte basiert sowohl auf DNA-Sequenzinformationen als auch auf Daten der Restriktionsanalyse. Unterschiede in den Restriktionsorten sind durch Pfeile (Differenzierung Gruppe E und E*) bzw. farblich hervorgehoben. Zur besseren Übersicht wurden

nur 7 von 10 untersuchten Enzymen dargestellt. *HaeIII* (H), *HinfI* (I), *MspI* (M), *RsaI* (R), *DpnII* (P), *ScrFI* (S), *TaqI* (T).

1: Gruppe E-Isolat 437

2: Gruppe E*-Isolat K8

3: *G. graminis* var. *tritici* P080/124

4: *G. graminis* var. *avenae* A1

5: *G. graminis* var. *graminis* P2

6: *G. cylindrosporus* C1

Die so entstandene Untergruppe (Isolate K8, K7, 1216) der Gruppe E wurde als Gruppe E* bezeichnet. Alle drei Isolate stammten vom Standort Kiel/Hohenschulen und wurden in zwei aufeinanderfolgenden Jahren isoliert (Tab. 4.3).

Zur phylogenetischen Einordnung wurde die ITS/rDNA-Region der Isolate 437 und K8, die jeweils repräsentative Isolate der Gruppe E bzw. der Gruppe E* darstellen, sequenziert. Der Vergleich der beiden Sequenzen ergab eine Ähnlichkeit von 99,4%, was einem Unterschied von zwei Nukleotiden in der ITS2-Region und einem Nukleotid im 5.8S rRNA-Gen entspricht.

	<i>P.g.</i>	<i>G.c.</i>	437	K8	D2	698	41.3	G2	A3	171	AT1	AT2	A1	AT3	G1	724	P1	P2	<i>G.i.</i>	<i>M.p.</i>
<i>P. graminicola</i> P4	-																			
<i>G. cylindrosporus</i> C1	*99,8	-																		
437 (Gruppe E)	84,7	84,8	-																	
K8 (Gruppe E)	84,8	85,0	99,4	-																
<i>Ggt</i> D2 (A2)	86,2	86,4	93,0	93,2	-															
<i>Ggt</i> 698	85,5	85,5	91,7	92,0	98,7	-														
<i>Ggt</i> 41.3 (A1)	85,6	85,8	92,8	93,0	99,2	97,9	-													
<i>Ggg</i> G2	85,2	85,4	93,2	93,4	98,7	97,5	98,7	-												
<i>Gga</i> A3	85,4	85,6	92,6	92,8	98,5	97,3	98,1	97,7	-											
GG171	83,9	84,1	91,6	91,8	97,3	96,0	97,1	96,8	98,4	-										
AT1	85,8	86,0	92,6	92,8	98,9	97,7	98,5	98,1	99,6	97,9	-									
AT2	85,8	86,0	92,6	92,8	98,7	97,5	98,3	97,9	99,4	97,7	99,8	-								
<i>Gga</i> A1	85,4	85,6	92,2	92,4	98,5	97,3	98,1	97,7	99,6	97,9	99,6	99,4	-							
AT3	85,6	85,8	92,8	93,0	98,7	97,5	98,3	97,9	99,8	98,1	99,8	99,6	99,4	-						
<i>Ggg</i> G1	85,4	85,6	93,8	94,0	98,3	97,0	98,3	98,9	97,2	96,6	97,7	97,5	97,2	97,5	-					
<i>Ggg</i> 724	84,3	84,5	92,1	92,4	97,2	96,0	97,2	98,5	96,2	95,4	96,6	96,4	96,2	96,4	97,9	-				
<i>Ggm</i> P1	83,9	83,7	91,3	91,5	96,4	95,3	96,4	97,4	95,3	94,7	95,8	95,6	95,3	95,6	97,0	97,4	-			
<i>Phialophora</i> sp. P2	84,9	85,1	93,6	93,8	97,5	96,2	97,5	98,3	96,8	95,8	97,3	97,0	96,8	97,0	97,9	98,1	97,4	-		
<i>G. incrustans</i>	83,0	83,2	85,1	85,3	85,9	84,7	86,1	85,7	85,7	86,0	85,9	85,9	85,5	85,9	85,5	85,1	83,9	86,2	-	
<i>Magnaporthe poae</i>	78,5	78,7	84,2	84,4	83,9	83,1	84,9	84,8	83,9	84,2	83,9	83,9	84,4	83,7	84,4	83,6	83,3	85,0	87,5	-
<i>Magnaporthe grisea</i>	79,1	79,1	82,6	82,8	82,5	81,8	82,1	82,6	81,9	81,7	81,7	81,7	81,9	81,7	82,6	81,7	81,9	82,1	77,6	79,7

Abb. 4.15: Vergleich der Ähnlichkeiten der ITS/rDNA-Region der Isolate des G/P-Komplexes. Die Angaben beziehen sich auf den Vergleich der DNA-Sequenzen bestehend aus ITS1, 5,8S rDNA und ITS2. *Ggt(a,g,m)*: *G. graminis* var. *tritici* (*avenae*, *graminis*, *maydis*)
* Angaben in Prozent

Alle drei Basenaustausche führten zur Entstehung von neuen Restriktionsorten, die durch Spaltung der ITS/rDNA-Region von Vertretern der Untergruppen E und E* mit *MspI*, *DpnII*

und *RsaI* nachweisbar waren (Abb. 4.14). Dies verdeutlicht die Sensitivität der Restriktionsanalyse amplifizierter ITS/rDNA für die Differenzierung eng verwandter Pilzgruppen. In Abbildung 4.14 sind die Unterschiede in den Restriktionsorten der ITS/rDNA-Region zwischen den Untergruppen E und E* sowie zwischen den Gruppe E-Isolaten und den Referenzstämmen des G/P-Komplexes dargestellt.

Die Sequenzen beider Gruppe E-Isolate zeigten eine starke Homologie zu den ITS-Regionen der anderen *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate. Die Ähnlichkeiten zu den Varietäten von *G. graminis* lagen im Bereich von 93,8% bis 91,3%. Die größte Sequenzübereinstimmung des Isolates 437, das die Mehrheit der Gruppe E-Isolate repräsentiert, bestand zu den *G. graminis* var. *graminis*/*Phialophora* sp. Isolaten G1 und P2 mit 93,8% bzw 93,6%. Im Gegensatz dazu ergaben die Sequenzvergleiche zu anderen verwandten Arten Ähnlichkeitswerte von nur 82,6% bis 85,1% (Abb. 4.15).

Die größten Nukleotidsequenzunterschiede sowohl zwischen den verschiedenen *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolaten untereinander als auch zum Isolat 437 der Gruppe E sind in der ITS1-Region zu finden. In der Abbildung 4.16 ist ein Alignment¹ dieser 177 bp umfassenden Region dargestellt.

Der Sequenzvergleich ergab eine hohe Übereinstimmung zwischen dem Isolat 437 der Gruppe E und den Varietäten von *G. graminis*. Die enge Verwandtschaft zeigte sich besonders im Vorhandensein von 6 übereinstimmenden sogenannten „Alignment gaps“ zwischen der Sequenz des Isolates 437 und den Sequenzen der *G. graminis*-Isolate bzw. des Isolates *Phialophora* sp. P2 im Vergleich zu den *G. cylindrosporus*/*P. graminicola*-Isolaten. Zwei dieser „gaps“ hatten Größen von 12 (Position 55-66) bzw. 13 (Position 106-118) Nukleotiden. Positionen, die zwischen der Gruppe E und den Varietäten von *G. graminis* variierten, stimmten hingegen oft mit denen von *G. cylindrosporus*/*P. graminicola* oder *G. incrustans* (Positionen 32, 72, 89, 95, 135, 162, 167) überein. Insgesamt verdeutlicht das Alignment somit die eindeutige phylogenetische Zuordnung der Gruppe E zu den Pilzen des G/P-Komplexes.

¹„Alignment“ steht in diesem Fall für das Übereinanderlegen von homologen DNA-Sequenzen. Hierbei werden, um eine möglichst hohe Übereinstimmung der Sequenzen zu erreichen, sogenannte „Alignment-gaps“ (künstliche Fehlstellen in den DNA-Sequenzen) eingefügt.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90													
Group E isolate 437	C	A	G	A	G	T	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	C	C	T	T	G
<i>Phialophora</i> sp. P2
Ggg G1
Ggg G2
Ggg 724	A
Ggt PO81/143
Ggt PO80/124
<i>G. graminis</i> AT1
<i>G. graminis</i> AT2
<i>G. graminis</i> AT3
Gga A1
Gga A3
<i>P. graminicola</i> P4
<i>G. cylindrosporus</i> C1
<i>G. incrustans</i> I1	A

	100	110	120	130	140	150	160	170	177														
Group E isolate 437	G	G	G	C	T	G	---	G	A	T	G	C	C	---	G	A	C	C	C	C	T	T	G
<i>Phialophora</i> sp. P2
Ggg G1
Ggg G2
Ggg 724
Ggt PO81/143
Ggt PO80/124
<i>G. graminis</i> AT1
<i>G. graminis</i> AT2
<i>G. graminis</i> AT3
Gga A1
Gga A3
<i>P. graminicola</i> P4	T
<i>G. cylindrosporus</i> C1	T
<i>G. incrustans</i> I1

Abb. 4.16: Nukleotidsequenz-Alignment der ITS1-Region des Gruppe E-Isolates 437 im Vergleich zu Sequenzen anderer *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate. Zur Sequenz des Isolates 437 identische Basen sind mit Punkten gekennzeichnet, Alignment-„gaps“ sind durch Striche markiert.

Der Stammbaum, der nach der Neighbor-Joining-Methode für die ITS1/5.8SrDNA/ITS2-Region konstruiert wurde, zeigt deutlich separate Zweige für *G. graminis*, die Isolate der Gruppe E, *Magnaporthe poae*/*G. incrustans*, *G. cylindrosporus*/*P. graminicola* und *Magnaporthe grisea* (Abb. 4.17). Die hohen Werte der Bootstrap-Analyse von je 100 unterstützen diese eindeutige Klassifizierung. Die engste Verwandtschaft der Gruppe E-Isolate wurde zu den *G. graminis*-Isolaten gefunden. In der nächsten Ebene wurden *G. graminis* und die Gruppe E mit *Magnaporthe poae*/*G. incrustans* gruppiert. Dieser Zweig besitzt jedoch nur eine relativ geringe Unterstützung durch die Daten der Bootstrap-Analyse. Die enge Verwandtschaft, die sich hier zwischen *G. graminis*, den *Phialophora*-Arten und den *Magnaporthe*-Arten, vor allem *M. poae* zeigt, wurde auch von anderen Autoren gefunden (Bryan *et al.*, 1995; Ward und Bateman, 1999; Bunting *et al.*, 1996) und bestätigt die von Cannon (1994) beschriebene Verbindung zwischen *G. graminis* und der *Magnaporthe*-Gruppe.

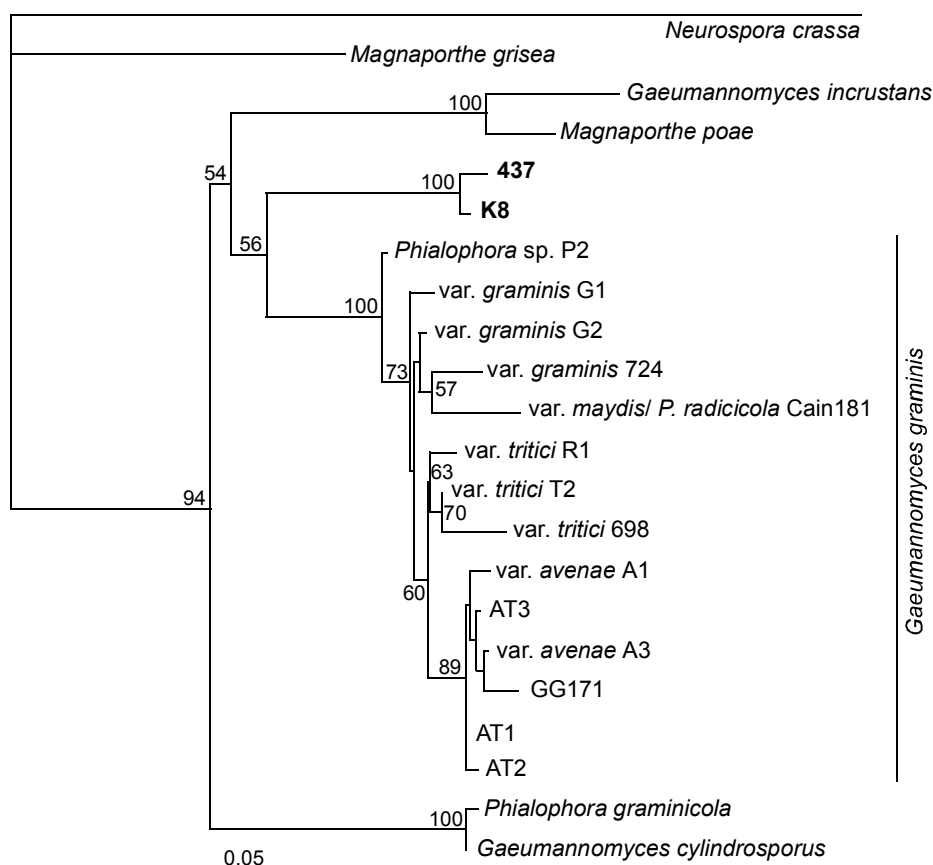


Abb. 4.17: Stammbaum zur Darstellung der phylogenetischen Beziehungen der Gruppe E-Isolate zu den *Gaeumannomyces*-Arten und verwandten Pilzen. Der Stammbaum, der mit der Neighbor-Joining-Methode mit *Neurospora crassa* als Outgroup errechnet wurde, basiert auf einem 554 bp-Alignment einer DNA-Sequenz bestehend aus der ITS1-Region, der 5.8S rRNA und der ITS2-Region. Die Zahlen (0-100) repräsentieren die Anzahl, mit der die jeweiligen Zweige in 100 Bootstrap-Wiederholungen auftraten. Es wurden nur Bootstrap-Werte über 50 angegeben. Der Balken kennzeichnet die relative genetische Distanz.

Stammbäume, die zum Vergleich separat für die ITS1-bzw. ITS2-Region berechnet wurden, zeigten ebenfalls die Isolate der Gruppe E als separaten Zweig. Dabei lag die Gruppe E im Stammbaum für die ITS1-Region zwischen *G. graminis* und *G. cylindrosporus*/*P. graminicola* und in der Berechnung für die ITS2-Region zwischen *G. graminis* und *M. poae*/*G. incrustans*. Neben der Neighbor-Joining-Methode wurden zum Vergleich Stammbäume für die ITS1/5,8SrDNA/ITS2-Region mit der Parsimony- und der Maximum-Likelihood-Methode berechnet. Mit Ausnahme von geringen Unterschieden innerhalb der *G. graminis*-Gruppe und hinsichtlich der Position von *M. grisea* stimmten die mit den drei verschiedenen Methoden konstruierten Stammbäume überein. Alle Berechnungen zeigten eindeutig, daß die Isolate der

Gruppe E einen separaten Zweig innerhalb des G/P-Komplexes zwischen *G. graminis* und *G. incrustans/M.poa* bilden.

4.3.3. Phänotypische Charakterisierung

Hinsichtlich ihrer Mycelstruktur sind die Isolate der RAPD-Gruppe E den anderen Pilzen des G/P-Komplexes sehr ähnlich. Auf Malzagarplatten bildeten sie anfangs graue Kolonien mit relativ wenig hellgrauem Luftmycel. Ähnlich wie bei den *G. graminis* var. *graminis*-Isolaten wurden die Kolonien nach einigen Tagen dunkler und bildeten nach ca. 2 Wochen schwarze Ablagerungen im Agar bzw. auf der Agaroberfläche. Derartige Ablagerungen, erstmals von Landschoot *et al.* (1993) bei *Magnaporthe poae* als "zusammengeballtes dunkel pigmentiertes Mycel" beschrieben, wurden auch bei *G. incrustans*-Isolaten (Wetzel *et al.*, 1996) gefunden. Im Unterschied zu den Isolaten der Varietät *graminis* verfärbten die Gruppe E-Isolate darüber hinaus den Agar nach ca. 4 Wochen vollständig schwarz, und das Luftmycel wurde fast völlig flach und glänzend.

Die Wachstumsrate der Isolate der RAPD-Gruppe E betrug 4,2 mm pro 24 h und entsprach damit der Wachstumsrate der Isolate der Untergruppe A1 der Varietät *tritici* (vgl. Abb. 4.24). Die zum Vergleich gemessene Wachstumsrate der *G. cylindrosporus/P. graminicola*-Isolate lag nur bei ca. 2,7 mm/24 h. Damit gehören die Gruppe E-Isolate nach Wetzel *et al.* (1996) zusammen mit den Pilzen der Varietäten *tritici*, *avenae* und *graminis* zu den schnell wachsenden Isolaten, die bei 25°C eine Wachstumsgeschwindigkeit von 3,2 bis 6,6 mm/24h aufweisen, während *G. cylindrosporus/P. graminicola* ein Vertreter der langsam wachsenden Arten ist, die 1,6 bis 3,4 mm/24h wachsen (vgl. Abb. 4.24).

Die Isolate der Gruppe E bildeten beim Aufeinandertreffen mit allen Isolaten der Varietät *tritici* deutliche Hemmzonen, die als dunkler, fast schwarzer Mycelrand sichtbar waren. Während sich die mit gleicher Geschwindigkeit wachsenden Isolate der Gruppen E und A1 fast genau in der Plattenmitte trafen, wurden die Isolate der Gruppe E durch die schneller wachsenden Isolate der Gruppen A2 bzw. A2₁₀ im Wachstum zurückgedrängt (Abb. 4.18A,B,C). Am deutlichsten zeigte sich die Eindämmung des Wachstums beim Zusammentreffen der Gruppe E-Isolate mit Isolaten der Varietät *graminis* (Abb. 4.18D). Auch in diesem Fall bildeten die Gruppe E-Isolate eine dunkle Hemmzone, wurden aber vom dichten Luftmycel der Konkurrenten überwachsen. Die Isolate der Varietät *graminis* werden durch die Isolate der Gruppe E offensichtlich nicht in ihrem Wachstum gehemmt. Auch beim

Aufeinandertreffen mit den Isolaten der Varietät *avenae* und der Art *G. cylindrosporus* entwickelten die Gruppe E-Isolate dunkel pigmentierte Hemmzonen (Abb. 4.18E,F).

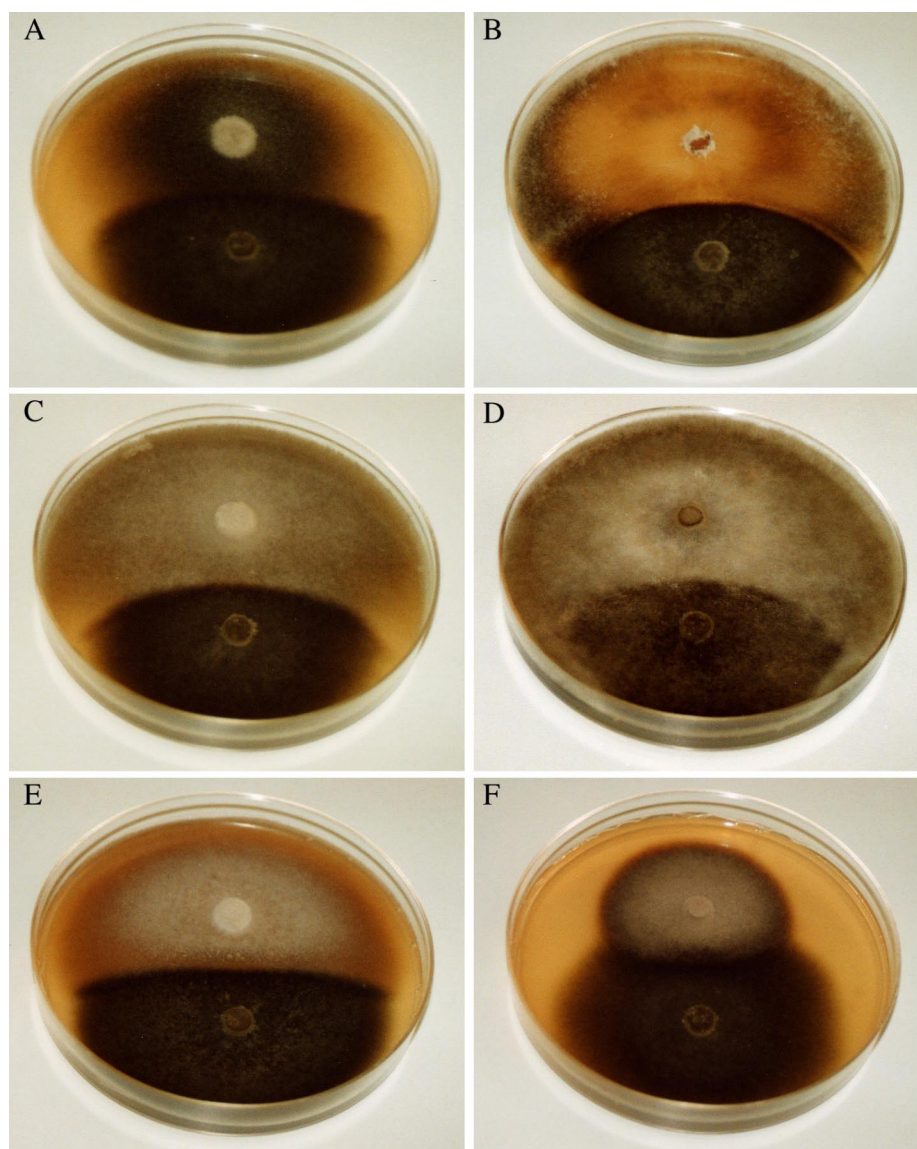


Abb. 4.18: Vergleich der Mycelcharakteristika der Isolate der Gruppe E mit anderen Pilzen des G/P-Komplexes. Der untere Teil der Petrischale wurde jeweils mit dem Gruppe E-Isolat 437 beimpft. Als Vergleichsisolate wurden folgende Pilze verwendet: A-C: *G. graminis* var. *tritici* G163 (A1), D2 (A2), 10.4a (A2₁₀); D: *G. graminis* var. *graminis* G227, E: *G. graminis* var. *avenae* 179, F: *G. cylindrosporus* 541-2.3a

Im Pflanzentest besiedelten die Isolate der Gruppe E die Wurzeln von Getreide bzw. Gras mit dem für *G. graminis* charakteristischen ektotrophen Mycel (Walker, 1981). An den Coleoptilen waren wie bei den Isolaten der Varietät *graminis* (Walker, 1980) sowohl einfache als auch gelappte Hyphopodien sichtbar (Abb. 4.19a). Die einfachen Hyphopodien waren

jedoch etwas dicker als die der Varietäten *tritici* und *avenae*. Außerdem konnten in der Rindenschicht von infizierten Weizenwurzeln sogenannte “geschwollene Zellen” mit Poren beobachtet werden (Abb. 4.19b). Diese terminalen Hyphenverdickungen wurden von Deacon (1974) und Hornby *et al.* (1998) als typische Strukturen für Gramineenwurzeln-infizierende Pilze beschrieben. Auf Malzagarplatten bilden die Isolate der Gruppe E Phialiden mit gekrümmten Phialosporen (Abb. 4.19c), die als anamorphe Verbreitungsorgane höherer Pilze bekannt sind. Perithezien als Hinweis auf eine sexuelle Fortpflanzung konnten nicht gefunden werden.

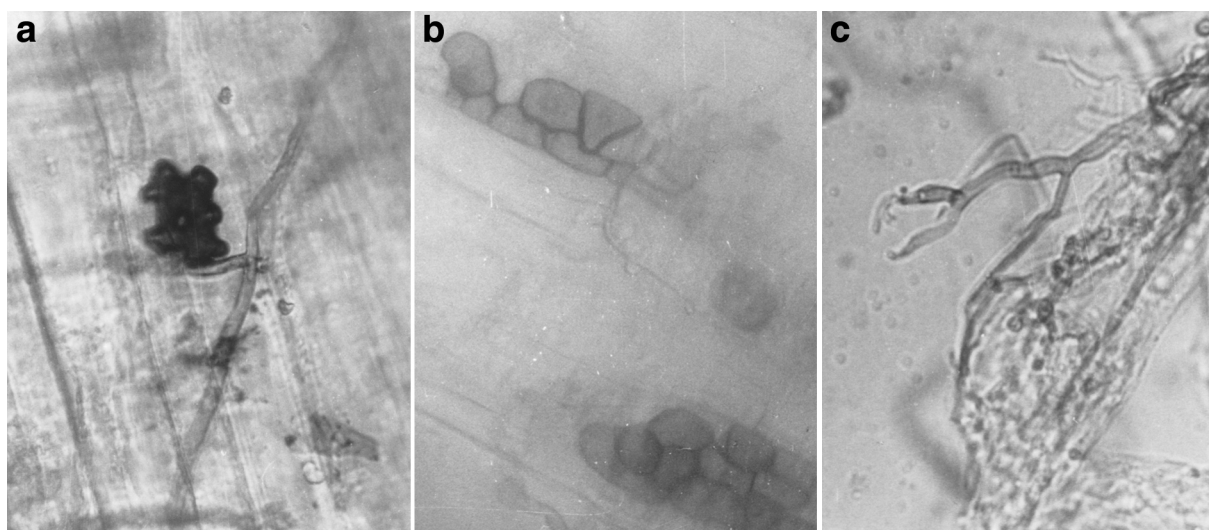


Abb. 4.19: Morphologische Charakteristika der Pilze der Gruppe E. a: Laufhyphen mit gelappten Hyphopodien an Weizencoleoptilen, b: Geschwollene Zellen in infizierten Weizenwurzeln, c: Phialiden mit freierwerdenden Phialosporen

Im physiologischen Farbttest auf dem modifizierten Selektivmedium SM-GGT3 (Juhnke *et al.*, 1984) zeigten die Isolate der Gruppe E wie die Pilze der Varietät *graminis* und *G. cylindrosporus/P. graminicola* eine negative Reaktion. Im Gegensatz dazu verursachten die Isolate der Varietät *tritici* eine Braunfärbung des Mediums, die als positive Reaktion gewertet wurde.

4.3.4. Untersuchung der Pathogenität der Gruppe E-Isolate

Die Wirkung von 10 verschiedenen Gruppe E-Isolaten (K4, K7, K12, 1206, 1226, 1168, 437, 1295, 1299, 1485) auf das Wachstum von Weizen und Hafer wurde im Pathogenitäts-Standardtest untersucht. Nach 6-wöchiger Inkubation in der Klimakammer zeigten die

Wurzeln deutliche dunkle Verfärbungen als Zeichen einer Infektion durch Pilzen des G/P-Komplexes. Der Vergleich mit den unbeimpften Kontrollen ergab jedoch, daß die getesteten Isolate keine sichtbare Schädigung der Pflanzen hervorrufen und auch auf das Wachstum der Pflanzen keinen Einfluß haben.

Zusätzlich wurde das Infektionsverhalten von 5 Stämmen an Gerste, Roggen, Welschem Weidelgrass und Rotschwingel in einem Schnelltest analysiert. Nach drei Wochen zeigten auch hier alle Wurzeln die typischen Symptome. Die Gräser waren dabei stärker infiziert als die Getreidepflanzen. Auffällig war auch, daß die Roggenpflanzen den geringsten Befall aufwiesen. Insgesamt zeigte die Bonitur beider Tests, daß die Isolate der Gruppe E die für Infektionen mit Pilzen des G/P-Komplexes typische Schwarzfärbung der Wurzeln verursachen. Der Pilz besiedelt jedoch die Wurzeln, ähnlich wie *G. cylindrosporus*/*P. graminicola* nur oberflächlich durch ektotrophe Hyphen ohne in das Vasculargewebe einzudringen und kann deshalb als apathogen gegenüber den getesteten Getreide- bzw. Grassorten angesehen werden.

Sowohl die phylogenetischen als auch die phänotypischen Untersuchungen der Gruppe E-Isolate, die enge Verwandtschaft zu *G. graminis*, das Fehlen eines sexuellen Stadiums, die oberflächliche Besiedlung von Getreide- und Graswurzeln, das Vorhandensein von gelappten Hyphopodien und sogenannten "geschwollenen Zellen" an den infizierten Wurzeln und die Produktion von Phialosporen lassen darauf schließen, daß die Isolate der Gruppe E eine neue *Phialophora*-Art innerhalb des G/P-Komplexes darstellen (Ulrich *et al.*, 2000).

4.3.5. Lokale Verbreitung

Insgesamt wurden 50 Isolate der neuen *Phialophora*-Art an 12 der 46 untersuchten Standorte gefunden. Die ersten 14 Isolate wurden in zwei aufeinanderfolgenden Jahren, 1997 und 1998, auf Weizen-Anbauflächen der Universität Kiel identifiziert. Hierbei wurden auf drei der neun verschiedenen Standorte, die in der Umgebung von Kiel untersucht wurden, Isolate der Gruppe E gefunden. Der Anteil an der Gesamtzahl der Isolate des G/P-Komplexes betrug bezogen auf alle drei Standorte im ersten Jahr 30% und im zweiten Jahr 7%. Die größte Anzahl an Gruppe E-Isolaten wurde dabei am Standort Kiel/Hohenschulen ermittelt, wo der Anteil an der Gesamtpopulation 1997 46% und 1998 21% ausmachte. Daraufhin wurde die Populationszusammensetzung der Pilze des G/P-Komplexes an diesem Standort in den folgenden zwei Jahren näher untersucht (Abb. 4.20).

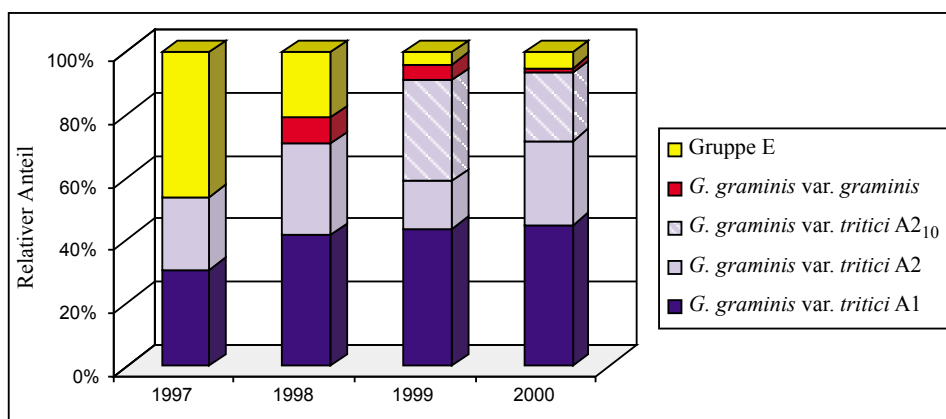


Abb. 4.20: Populationszusammensetzung der Pilze des G/P-Komplexes am Standort Kiel/Hohenschulen. Die Untersuchungen in den Jahren 1997 und 1998 beziehen sich auf eine Gesamtzahl von nur 13 bzw. 24 Isolaten von verschiedenen Winterweizen-Parzellen. In den Jahren 1999 und 2000 wurden 78 bzw. 60 Isolate von sieben mit Winterweizen bzw. Wintergerste bestellten Versuchspartellen gewonnen. Die Fruchtfolge der einzelnen Parzellen war unterschiedlich, zum größten Teil wurde Winterweizen in Monokultur, zum Teil aber auch Raps bzw. Zuckerrüben angebaut.

Im Gegensatz zu den Voruntersuchungen von 1997/1998 war der Anteil an Gruppe E-Isolaten in den Jahren 1999 und 2000 mit 4% bzw. 5% deutlich geringer. Auch bezogen auf die anderen Pilze des G/P-Komplexes ergaben sich Veränderungen in der Populationsstruktur.

Tabelle 4.3: Herkunft der Isolate der Gruppe E

Isolat	Wirtspflanze	Herkunftsort	Jahr
K1/1, K4, K7*, K8*, K11/2, K12	Weizen	Kiel, Hohenschulen	1997
1206, 1215, 1216*, 1220, 1226	Weizen		1998
1849, 1888, 1889	Weizen		1999
2731, 2744, 2744/1	Weizen		2000
K13/4	Weizen	Kiel, Manhagen	1997
1168	Weizen		1998
1198	Weizen	Kiel, Ostenfeld	1998
437, 440	Gerste	Herzhorn	1997
1295, 1297, 1298, 1299, 1301, 1303	Gerste		1998
1287, 1288, 1291	Roggen	Prötzel	1998
1485, 1490, 1496, 1497	Weizen	Güterfelde	1998
1818, 1842, 1843, 1845, 1846	Weizen	Göttingen	1999
2103, 2108, 2109, 2112	Weizen	Zernikow	1999
2115	Triticale	Wolfshagen	1999
1994	Weizen	Dannenberg	1999
1979, 1980	Weizen	Frankenfelde	1999
2069, 2072	Weizen	Schmiedeberg	1999

* Isolate der Untergruppe E*.

So ging der Anteil der Isolate der Varietät *graminis* von 5% auf 2% zurück und innerhalb der Gruppe A2 der Varietät *tritici* verringerte sich der Anteil der A2₁₀-Isolate.

Neben den 20 auf drei verschiedenen Versuchsflächen der Universität Kiel identifizierten Isolaten der neuen *Phialophora*-Art wurden weitere 30 Isolate dieser Gruppe an neun anderen Standorten in Deutschland gefunden (Tab. 4.3). Der Anteil der Gruppe E-Isolate an der Gesamtpopulation der Pilze des G/P-Komplexes lag an diesen Standorten im Bereich von 10% bis 40%.

Insgesamt wurde deutlich, daß die Isolate der Gruppe E auf der einen Seite zwar nur an relativ wenigen Probepunkten, dort aber mit verhältnismäßig großen Anteilen an der Gesamtpopulation der Pilze des G/P-Komplexes (bis zu 50%) vorkommen. Interessanterweise wurden die Vertreter der Untergruppe E* nur auf einem Standort in der Nähe von Kiel gefunden.

4.4. Untersuchung der genetischen und phänotypischen Variabilität innerhalb der *G. graminis*-Varietät *tritici*

4.4.1. Phylogenetische Charakterisierung der durch die RAPD-PCR analysierten Untergruppen der Varietät *tritici*

Die Isolate der Varietät *tritici*, die als Erreger der Schwarzbeinigkeit an Weizen bekannt sind, waren durch Amplifikation mit den Dekamerprimern OPB-06 und OPB-07 in die RAPD-PCR-Gruppe A eingeteilt worden. Anhand des Vergleiches der mit dem Primer OPB-07 entstandenen Bandenmuster wurden die Isolate dieser Gruppe in die Untergruppen A1 und A2 subklassifiziert. Mit dem Primer OPB-06 wurden innerhalb der Untergruppe A2 zusätzlich die Isolate des Subtyps A2₁₀ differenziert (vgl. 4.1.2).

Zur weiteren Untersuchung der Subklassifizierung der *G. graminis* var. *tritici*-Isolate wurde mit jeweils 10 repräsentativen Isolaten jeder Gruppe eine Restriktionsanalyse der amplifizierten ITS/rDNA durchgeführt. Hierzu wurde die ribosomale DNA der entsprechenden Isolate mit den Primern psnDNA2p/pITS4 amplifiziert und anschließend mit sechs verschiedenen Endonucleasen verdaut. Mit den Enzymen *DdeI*, *ScrFI*, *HinPII* und *DpnII* zeigten die Isolate aller drei Gruppen einheitliche Restriktionsmuster, mit *MspI* und *RsaI* konnten die A1-Isolate von den A2-Isolaten unterschieden werden. Innerhalb der beiden

Gruppen lagen mit beiden Enzymen jeweils einheitliche Muster vor. Da bei allen untersuchten Isolaten die mit der rDNA-Restriktionsanalyse ermittelte Klassifizierung mit der durch die RAPD-PCR-Analyse gefundenen Einteilung übereinstimmte, kann davon ausgegangen werden, daß die RAPD-Analyse auch auf intravarietaler Ebene eine Einteilung liefert, die der phylogenetischen Entwicklung der Pilze entspricht. Eine Unterscheidung des Subtyps A2₁₀ von den anderen A2-Isolaten konnte mit den verwendeten Enzymen nicht erfolgen.

Im folgenden wurde die ITS/rDNA-Region jeweils eines repräsentativen Isolates der *G. graminis* var. *tritici*-Untergruppen Gruppen A1, A2 und des Subtyps A2₁₀ sequenziert. Der Vergleich der Sequenzen der drei Isolate ergab eine Ähnlichkeit von 99.15% zwischen dem A1-Isolat 41.3 und dem A2-Isolat D2, d.h., 4 der 470 Basen waren unterschiedlich (Abb. 4.15). Die Sequenzen des A2-Isolates und des Isolates des Subtyps A2₁₀ (Isolat 10.1.2) waren identisch. Der Vergleich mit den Daten der EMBL-Genbank ergab eine vollständige Sequenzübereinstimmung zwischen dem Isolat der RAPD-Gruppe A1 und den R-Typ-Isolaten bzw. den Isolaten der RAPD-Gruppe A2/A2₁₀ mit den N-Typ-Isolaten der Varietät *tritici* (Hollins und Scott, 1990). Die von Hollins und Scott hinsichtlich ihrer Pathogenität gegenüber Weizen, Gerste und Roggen in Roggen-pathogene (Rye-adapted) R-Typ-Isolate und nicht gegenüber Roggen pathogene N-Typ-Isolate unterschiedenen Pilze wurden von O'Dell *et al.* (1992) durch RFLP-Analyse der genomischen und ribosomalen DNA genetisch differenziert und die ITS/rDNA-Region von Bryan *et al.* (1995) sequenziert.

Zur Bestätigung der gefundenen Zuordnung wurden Vertreter der von B. Hollins in England isolierten N- und R-Typ-Isolate über die RAPD-PCR mit den Primern OPB-06 und OPB-07 analysiert. Dabei zeigten die R-Typ-Isolate PO80/124, PO81/158, PO81/159, PO81/163, PO82/199 und PO82/210 RAPD-Muster der Gruppe A1, die N-Typ-Isolate dagegen hatten Muster der Gruppe A2. Von den fünf A2-Isolaten wurden zwei als A2₁₀ identifiziert.

Neben der Übereinstimmung der Untergruppen A1 und A2 der Varietät *tritici* mit den von Hollins und Scott (1990) beschriebenen R-bzw. N-Typen zeigte sich auch ein Zusammenhang zu den von Ward und Gray (1992) differenzierten RFLP-Typen T2 bzw. T1. Alle über Hybridisierung mit der Sonde GggMR1 getesteten *G. graminis* var. *tritici*-Isolate der Untergruppe A1 gehörten zu den RFLP-Typ T2-Isolaten, die Isolate der Gruppen A2 bzw. A2₁₀ dagegen zum RFLP-Typ T1 (vgl. Abschnitt 4.1.4; Augustin *et al.*, 1999). Auch auf ITS/rDNA-Sequenzebene ergab sich eine vollständige Übereinstimmung zwischen dem A1-Isolat 41.3 und dem RFLP-Typ T2-Isolat 87/7-4 bzw. den Gruppe A2-Isolaten und dem Isolat 90/2-4 des RFLP-Typs T1.

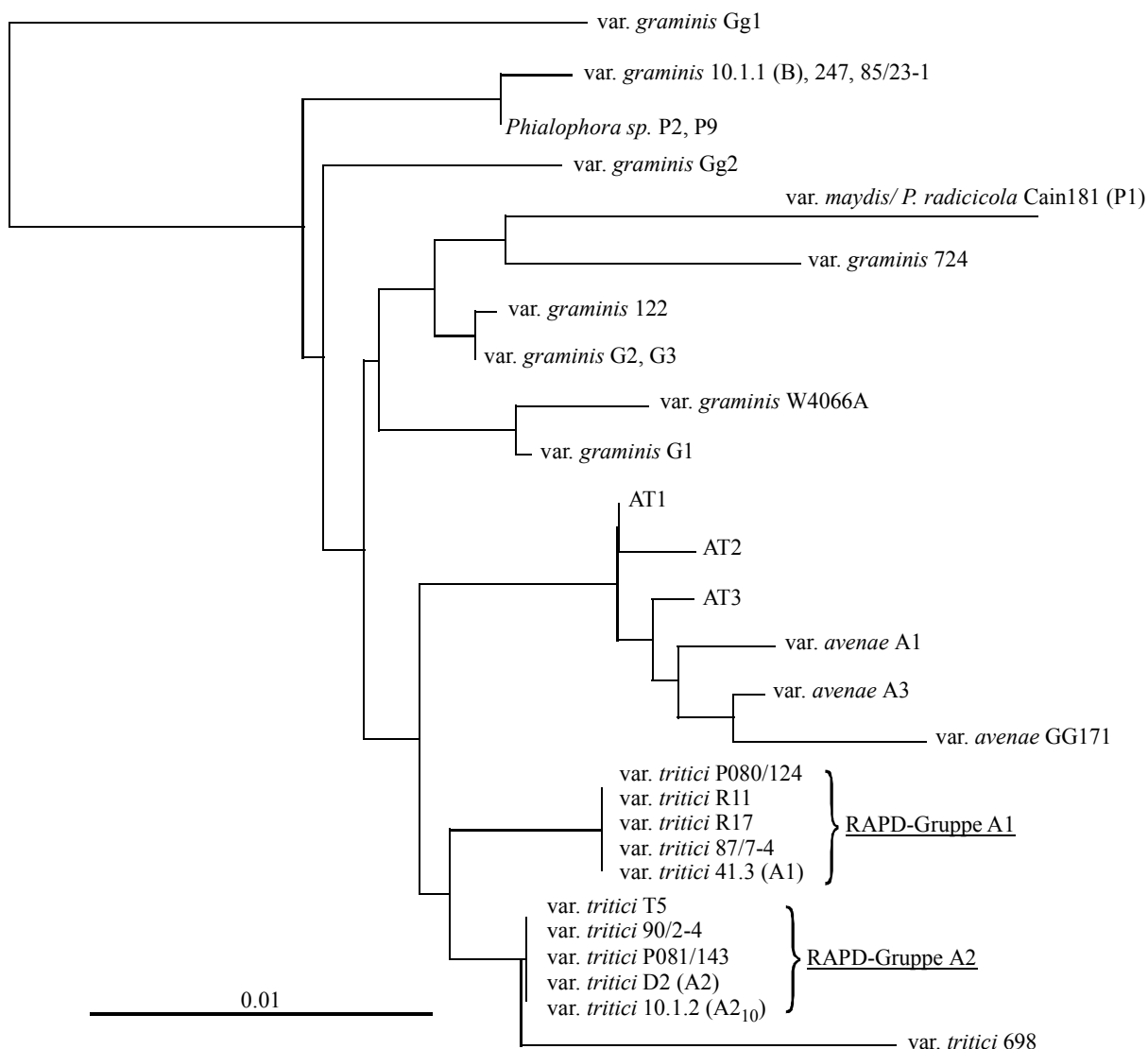


Abb. 4.21: Stammbaum zur Darstellung der phylogenetischen Beziehungen zwischen den *G. graminis*-Isolaten. Der Stammbaum wurde nach der Neighbor-Joining-Methode basierend auf dem 477 bp-Alignment der ITS/rDNA-Region (ITS1, 5,8S rRNA, ITS2) berechnet. Die Wurzel des Stammbaums wurde durch Nutzung von *G. cylindrosporus* als Outgroup abgeschätzt. Der Balken kennzeichnet die relative genetische Distanz.

Somit zeigen die Ergebnisse, daß sowohl die Einteilung der Varietät *tritici* in R- und N-Typ-Isolate nach Hollins und Scott (1990) als auch die von Ward und Gray (1992) beschriebene Differenzierung in die RFLP-Typen T2 und T1 der durch die RAPD-PCR-Analyse gefundenen Klassifizierung in A1 und A2 entsprechen.² Die phylogenetische Einordnung der

² **RAPD-Gruppe A1** (Isolat 41.3) = **R-Typ**-Isolat P080/124 (B. Hollins) = **RFLP-Typ T2**, Isolat 87/7-4 (Ward und Gray, 1992)

RAPD-Gruppe A2 (Isolate D2 bzw. 10.1.2) = **N-Typ**-Isolat P081/143 (B. Hollins) = **RFLP-Typ T1**, Isolat 90/2-4 (Ward und Gray, 1992)

Untergruppen A1 und A2 bzw. A2₁₀ innerhalb von *G. graminis* wurde in einem nach der Neighbor-Joining-Methode errechneten Stammbaum dargestellt (Abb. 4.21). Deutlich zu sehen ist die Unterteilung der *G. graminis*-Isolate in die Varietäten *avenae*, *tritici* und *graminis*. Die Varietäten *tritici* und *avenae* sind dabei enger miteinander verwandt als jede von beiden mit der Varietät *graminis*. Eine damit übereinstimmende Aufteilung der *G. graminis*-Varietäten wurde auch von Bryan *et al.* (1995) unter Verwendung des Parsimony-Algorithmus gefunden.

Bis auf das separat liegende *G. graminis* var. *tritici*-Isolat 698 teilen sich alle Isolate der Varietät *tritici* in zwei phylogenetisch eindeutig separierte Gruppen auf. Die erste Gruppe beinhaltet die Isolate der RAPD-Gruppe A1 und die zweite Gruppe die A2/A2₁₀-Isolate. Innerhalb dieser beiden Gruppen zeigen alle getesteten Isolate eine vollständige Sequenzübereinstimmung. Beim Vergleich der Varietäten *tritici* und *avenae* zeigte sich, daß die A2-Isolate eine höhere Ähnlichkeit zu den Isolaten der Varietät *avenae* aufwiesen als die A1-Isolate. Die engste Verwandtschaft besteht hierbei zu den Isolaten AT1 und AT2 mit 98,9% bzw. 98,7% (Abb. 4.15). Diese Isolate stellen nach Bryan *et al.* (1999) ein Intermediat zwischen den Varietäten *tritici* und *avenae* dar. Der taxonomische Status ist nicht geklärt, möglicherweise handelt es sich bei dieser Gruppe um eine neue Varietät der Art *G. graminis*.

Insgesamt besitzt der in Abbildung 4.21 gezeigte Neighbor-Joining-Stammbaum nur eine relativ geringe Unterstützung durch die Werte der Bootstrap-Analyse, was sicher durch die generell hohe Übereinstimmung der analysierten Sequenzen begründet ist (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen wurden die gleichen DNA-Sequenzen auch mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode verrechnet. Der resultierende Stammbaum (vgl. Abb. 4.27) zeigt wiederum die enge Verwandtschaft zwischen den Varietäten *tritici* und *avenae*, während die Isolate der Varietät *graminis* deutlich separiert werden. In Übereinstimmung mit der engen Verwandtschaft der A2-Isolate mit den Isolaten der Varietät *avenae* werden diese beiden Gruppen hier zusammen geclustert. Zwischen dem Gruppe A2-var. *avenae*-Cluster und dem nachfolgenden Gruppe A2-var. *avenae*/Gruppe A1-Cluster besteht dabei kaum ein Unterschied. Beide Stammbäume verdeutlichen die enge Verwandtschaft der *G. graminis*-Varietäten *tritici* und *avenae* und zeigen, daß die Gruppen A1 und A2 eindeutig separate Zweige innerhalb der Varietät *tritici* darstellen.

4.4.2. Physiologische und morphologische Merkmale

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob sich die genetische Differenzierung der *G. graminis* var. *tritici*-Untergruppen auch in phänotypischen Eigenschaften der Pilze widerspiegelt. Für die Versuche wurden repräsentative Vertreter der Untergruppen A1 und A2 sowie des Subtyps A2₁₀ ausgewählt.

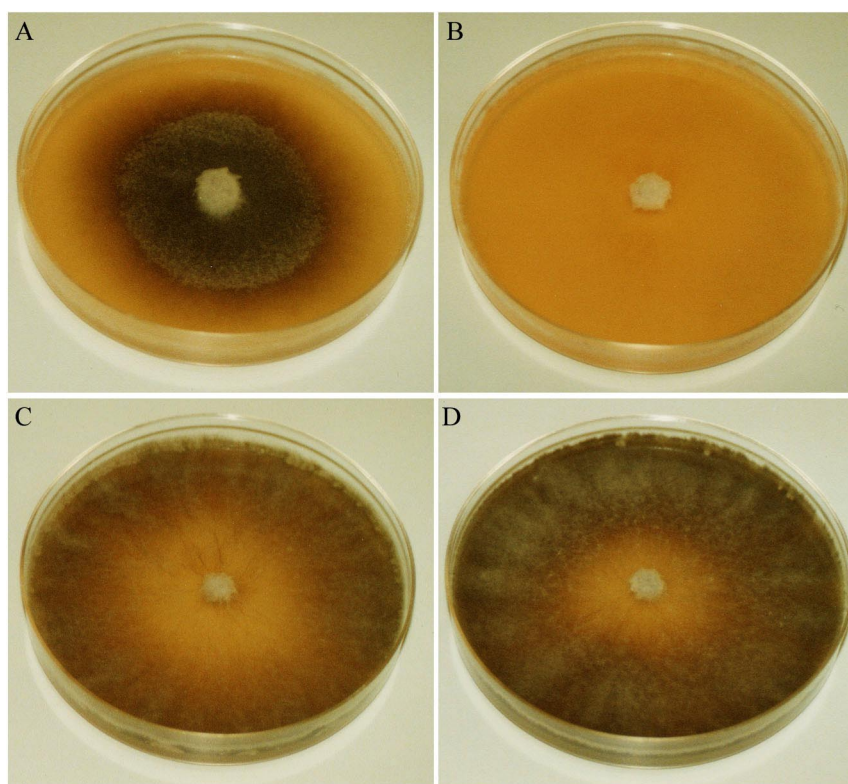


Abb. 4.22: Unterschiedliche Varianten der Mycelbeschaffenheit bei *G. graminis* var. *tritici*-Isolaten. A: Isolat 64.1 (A1), B: Isolat 2182 (A2), C: Isolat 10.4.1a (A2₁₀), D: Isolat D40 (A2)

Koloniemorphologie: Die Isolate der Gruppen A1 und A2 konnten in den meisten Fällen schon aufgrund ihrer unterschiedlichen Koloniebeschaffenheit voneinander unterschieden werden. Die Pilze der Gruppe A1 waren im Vergleich zu den Isolaten der Gruppe A2 meist dunkler pigmentiert (Abb. 4.22A). Das Luftmycel war wesentlich dichter und ging zum Rand hin oft in eine hellere Zone über. Die Pigmentierung der Isolate der Gruppe A2 war sehr variabel. Während einige Isolate fast durchsichtig erschienen (Abb. 4.22B), zeigten andere ein hell- bis dunkelgraues, meist fädiges Luftmycel (Abb. 4.22C). In den meisten Fällen waren bei den A2-Isolaten die Kolonieränder deutlich dunkler pigmentiert als das Zentrum. Eine Unterscheidung der A2₁₀- von den anderen A2-Isolaten war anhand der Myceleigenschaften nicht möglich.

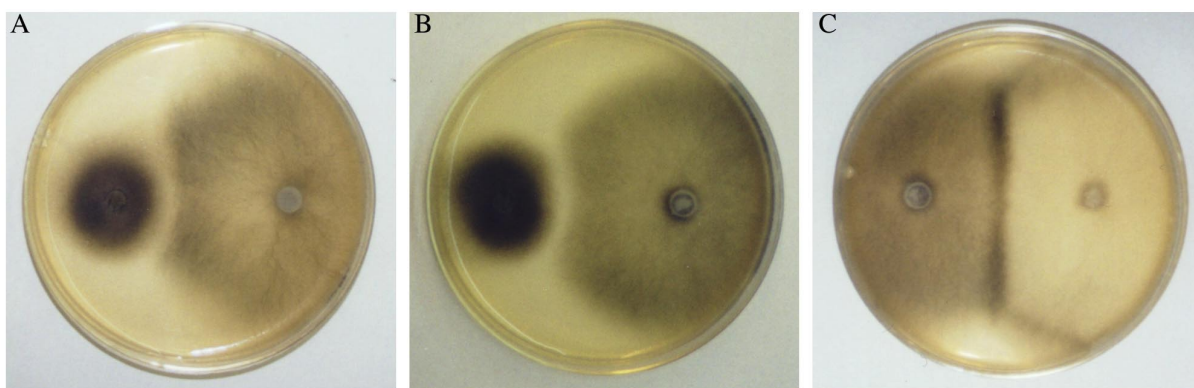


Abb. 4.23: Konkurrenzverhalten der *G. graminis* var. *tritici*-Isolate. A: Isolat G163 (A1) zu Isolat 9.1a (A2), B: Isolat G163 (A1) zu Isolat 10.4a (A2₁₀), C: Isolat 10.4a (A2₁₀) zu Isolat 9.1a (A2).

Konkurrenzverhalten: Zur Untersuchung des Konkurrenzverhaltens der Pilze wurden Isolate der Gruppen A1, A2 und A2₁₀ im definierten Abstand zueinander auf Malzagarplatten geimpft und angezogen. Zwischen den Pilzen der verschiedenen Untergruppen der Varietät *tritici* waren eindeutige Hemmzonen erkennbar. So bildeten sich zwischen A1-Isolaten und A2- bzw. A2₁₀-Isolaten meist nahezu mycelfreie, also unbewachsene Bereiche (Hemmhöfe). Dagegen waren an der Grenze zwischen A2 und A2₁₀-Isolaten nur Streifen aus dunkel pigmentiertem Mycel zu sehen (Abb. 4.23).

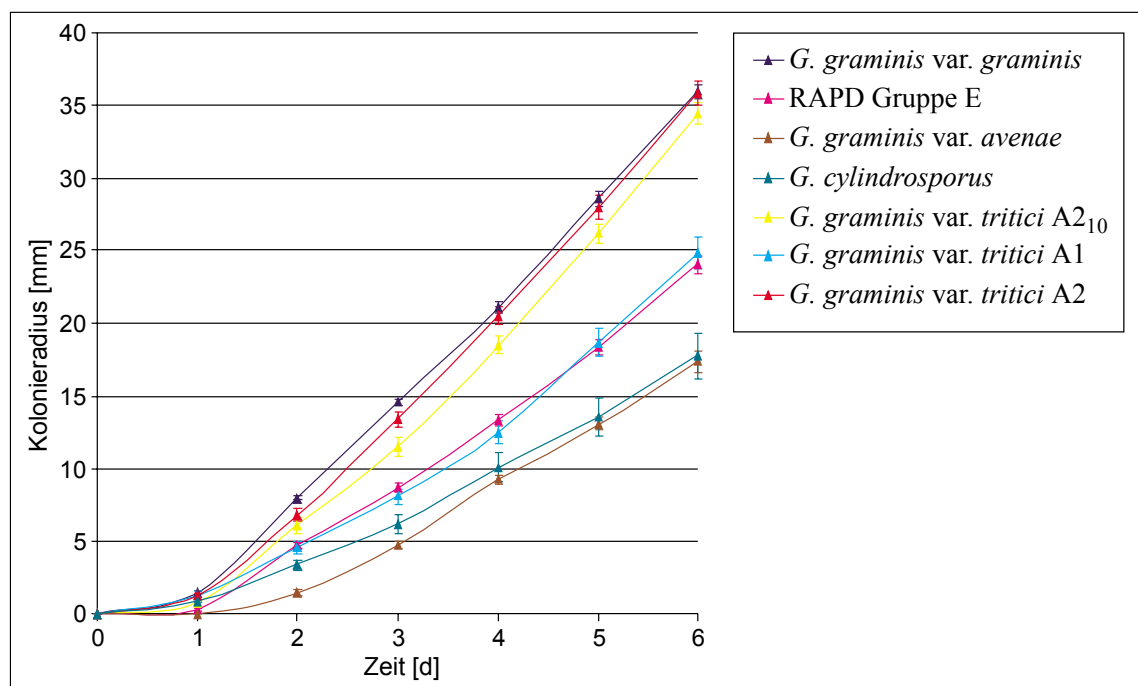


Abb. 4.24: Vergleich der durchschnittlichen Wachstumsraten von Vertretern der verschiedenen Arten, Varietäten und Isolategruppen der G/P-Komplexes. Die Balken kennzeichnen die Standardfehler der errechneten Werte.

Wachstumsgeschwindigkeit: Bei der Bestimmung der durchschnittlichen Wachstumsrate zeigten sich zwischen den Isolaten der verschiedenen Untergruppen der Varietät *tritici* relativ große Unterschiede. Mit 6,2 bzw. 5,9 mm/24h wuchsen die Isolate der *G. graminis* var. *tritici* Untergruppen A2 bzw. A2₁₀ deutlich schneller als die A1-Isolate mit 4,2 mm/24h (Abb. 4.24). Während die Isolate der Gruppe A1 eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit wie die Isolate der neu beschriebenen *Phialophora*-Art hatten, stimmten die A2-Isolate in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit mit den *G. graminis* var. *graminis*-Isolaten überein. Beide Untergruppen gehören dennoch zu den schnell wachsenden *G. graminis*-Isolaten.

4.4.3. Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen genetischer Klassifizierung und Pathogenitätsverhalten innerhalb der *G. graminis* Varietät *tritici*

Die Pathogenität gegenüber bestimmten Getreidearten bzw. Gräsern gilt als konventionelles Unterscheidungskriterium der verschiedenen Arten und Varietäten des G/P-Komplexes. Ein charakteristisches Merkmal der Pilze der Varietät *tritici* ist ihre Fähigkeit, an Weizen typische Symptome der Schwarzbeinigkeit zu verursachen. Dazu gehört das Auftreten von Verfärbungen und Läsionen der Wurzeln bis hin zur Gelbfärbung der Pflanze, Blattnekrosen und Hemmung des Wachstums.

Erste Pathogenitätstests zeigten jedoch, daß einzelne Isolate hinsichtlich dieser generellen Eigenschaft von der Varietät *tritici* abwichen. Daraufhin wurden jeweils 12 Isolate der Untergruppen A1 und A2 systematisch auf ihr Pathogenitätsverhalten gegenüber Weizenpflanzen im standardisierten Pflanzentest untersucht (Augustin, 1999). Die Auswertung ergab, daß zwar beide Gruppen pathogen gegenüber Weizen sind, zwischen den Gruppen jedoch deutliche Unterschiede auftraten (Tab. 4.4). Die Isolate der Gruppe A1 zeigten sich hinsichtlich ihrer Pathogenität sehr variabel. Die Wirkung auf die Testpflanzen, die in den meisten Fällen in drei voneinander unabhängigen Untersuchungen ermittelt wurde, reichte von wachstumsfördernd über schwach pathogen bis stark pathogen. Die Isolate der Gruppe A2 waren dagegen durchgängig pathogen. 75% der Isolate wurden nach dem verwendeten Boniturschema als stark pathogen eingestuft. Zwischen den Gruppen A2 und A2₁₀ waren keine Unterschiede im Pathogenitätsverhalten zu finden.

Neben der Untersuchung der Pathogenität gegenüber Weizen wurden als weitere Wirtspflanzen Roggen und Hafer in die Analysen einbezogen. Insgesamt zeigte sich, wie es für die Varietät *tritici* charakteristisch ist, die höchste Pathogenität gegenüber Weizen.

Tabelle 4.4: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der genetischen Differenzierung der Isolate der Varietät *tritici* und der Pathogenität gegenüber Weizen.

<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i> - Untergruppe	Pathogenitätsstufen ¹			Gesamteinschätzung der Pathogenität ²
	(a)	(b)	(c)	
<u>Gruppe A1</u>				
G13	2	2	3	-
G8	4	4	4	++
G126	4	5	5	+++
G139	4	4	5	++
G142	4	5	4	++
G174	1	2	2	-
G132	5	4	4	++
G33	1	2	1	f
41.3	3	2	2	-
G163	5	4	5	+++
46.1	5	5	-	+++
83.3.1	4	2	2	++ *
<u>Gruppe A2</u>				
D9	5	5	5	+++
D2	5	5	5	+++
D40	5	3	4	++
57.1	5	5	4	+++
D61	4	5	5	+++
D100	5	5	4	+++
9.1a	5	5	-	+++
83.1	4	4	4	++
D79 (A2 ₁₀)	5	5	5	+++
10.4.1a (A2 ₁₀)	5	5	5	+++
10.5.1 (A2 ₁₀)	5	5	-	+++
G234 (A2 ₁₀)	5	4	4	++

¹ Die Pathogenität der Isolate wurde nach dem im Methodenteil beschriebenen Bewertungsschema, das nach Auswertung der Sproß- und Wurzeltrockenmasse der Testpflanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Einteilung in die Pathogenitätsstufen 1 bis 5 vornimmt, ermittelt. Jedes Isolat wurde in mindestens zwei, meistens drei unabhängig voneinander durchgeführten Pathogenitätstests (a) (b) (c) mit jeweils 10 Wiederholungen getestet (Augustin, 1999).

² Aus den Ergebnissen dieser Tests wurde eine Gesamteinschätzung der Pathogenität der einzelnen Isolate abgeleitet: f: wachstumsfördernd, - : nicht pathogen, + : schwach pathogen, ++ : pathogen, +++ : stark pathogen.

* Die im ersten Test nachgewiesene Pathogenität konnte in den folgenden Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Auch war der größte Anteil der Isolate pathogen gegenüber Hafer, was jedoch der allgemeinen Beschreibung der Varietät *tritici* widerspricht. Hafer gilt aufgrund der Bildung des Saponins Avenacin (Osbourn *et al.*, 1991; Crombie *et al.*, 1986) als resistent gegenüber Infektionen durch *G. graminis* var. *tritici*. Als möglicher Grund für die hier gefundene Pathogenität wurde zunächst eine verminderte Avenacin-Bildung der verwendeten Hafersorte „Panther“ angenommen. Nachfolgende Analysen zeigten jedoch einen normalen Avenacin-Gehalt der Sorte (pers. Mitteilung K. Wake, J. Innes Centre, Norwich), so daß die Ursache für die Pathogenität offen bleibt und in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden sollte.

Tabelle 4.5: Untersuchung der Pathogenität der Isolate der Untergruppen der Varietät *tritici* gegenüber Weizen, Hafer und Roggen

Isolat	Pathogen gegenüber: ¹		
	Weizen	Hafer	Roggen
41.3 (A1)	+	+	-
83.3.1 (A1)	++ *	-	++ *
G142 (A1)	++	++	++
ND9 (A1)	++	++	+++ *
83.1 (A2)	++	+	+++
D40 (A2)	++	+++	+
D95 (A2)	+++	+	+
57.1 (A2)	+++	+++	++
10.5.1 (A2 ₁₀)	+++	++	+
10.4.1a (A2 ₁₀)	+++	++	++
D79 (A2 ₁₀)	+++	++	+
ND3 (A2 ₁₀)	+++	+++	+++ *

¹ Die Einschätzung der Pathogenität beruht auf der Auswertung von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Tests (Augustin, 1999) analog den Angaben zur Tabelle 4.4, f: wachstumsfördernd, - : nicht pathogen, + : schwach pathogen, ++ : pathogen, +++ : stark pathogen.

* Diese Isolate hatten in den nachfolgenden Tests ihre Pathogenität verloren.

Ähnlich wie beim Hafer variierte auch beim Roggen die Pathogenität innerhalb der getesteten Isolate stark. Es zeigte sich jedoch nicht der deutliche Unterschied zwischen den Isolaten der Gruppen A1 und A2, die nach der genetischen Klassifizierung der von O'Dell *et al.* (1992) gefundenen Einteilung in R- und N-Typ-Isolate entsprechen. O'Dell *et al.* (1992) differenzierten die *G. graminis* var. *tritici*-Isolate zunächst nach ihrer Pathogenität. Eindeutig gegenüber Roggen pathogene Isolate wurden dem R-Typ und schwach pathogene Isolate dem

N-Typ zugeordnet, während Isolate mit mittlerer oder nicht eindeutiger Ausprägung der Pathogenität nicht berücksichtigt wurden. Auf der Grundlage dieser phänotypischen Vorauswahl erfolgte die genetische Klassifizierung in N- und R-Typ-Isolate. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch, daß zufällig ausgewählte Isolate, die zunächst genetisch klassifiziert wurden, nicht die von O'Dell *et al.* (1992) beschriebenen Pathogenitätseigenschaften besitzen. Somit kann den Untergruppen der Varietät *tritici* (Abb. 4.21) nicht generell eine unterschiedliche Pathogenität gegenüber Roggen zugeordnet werden.

Zusammenfassend ergibt sich eine eindeutige Beziehung zwischen der phylogenetischen Differenzierung der Varietät *tritici* in die Untergruppen A1 und A2 und dem durchschnittlichen Pathogenitätsverhalten dieser Gruppen gegenüber Weizen.

4.5. Untersuchungen zur genetischen Variabilität innerhalb der Varietät *graminis*

4.5.1. Intravarietale Klassifizierung und Pathogenitätsverhalten der *G. graminis* var. *graminis*-Isolate

Von den im Rahmen dieser Arbeit getesteten *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolaten wurden mit Hilfe der RAPD-PCR unter Verwendung der Primer OPB-06 und OPB-07 123 von verschiedenen Getreidesorten stammende Isolate eindeutig der *G. graminis*-Varietät *graminis* zugeordnet (6% der Gesamtisolate). Die Untersuchung der Pathogenität von 42 repräsentativen Isolaten zeigte, daß 53% der Isolate aggressiv gegenüber Weizenpflanzen reagierten, obwohl diese Varietät generell als nicht bzw. nur schwach pathogen gegenüber Getreide beschrieben wird. 24% der Isolate zeigten dagegen ein schwach pathogenes Verhalten und 23% waren nicht pathogen (Augustin, 1999). Die relativ große Anzahl pathogener Isolate läßt vermuten, daß die Aggressivität von Isolaten der Varietät *graminis* gegenüber Weizen keine, wie bisher angenommen, ungewöhnliche Eigenschaft oder Ausnahme ist. Dennoch scheint das Pathogenitätsverhalten der Isolate der Varietät *graminis*, wesentlich stärker als bei den Isolaten der Varietät *tritici* zu variieren und in der Summe weniger stark ausgeprägt zu sein.

Um eine geeignete Methode zur Klassifizierung der Isolate und möglicherweise auch eine Beziehung zwischen der genetischen Klassifizierung und dem Pathogenitätsverhalten innerhalb der Varietät *graminis* zu finden, wurden ausgewählte pathogene und apathogene

Isolate durch RAPD-PCR, rDNA-RFLP und Hybridisierung mit einer mitochondrialen rDNA-Sonde analysiert.

RAPD-PCR-Analyse: Neben den Dekamer-Primern OPB-06 und OPB-07 wurden weitere RAPD-Primer auf die Bildung geeigneter Bandenmuster, die eine Subklassifizierung der *G. graminis* var. *graminis*- Isolate ermöglichen, getestet. Die meisten Primer, die in Vorversuchen untersucht worden waren (Augustin *et al.*, 1999), wie z.B. Primer 3, Primer 17, OPB-10 und OPB-01, zeigten sich aufgrund zu geringer Bandenzahlen, zu hoher Variabilität der Bandenmuster oder des Fehlens genügend großer Fragmente ungeeignet für die intravarietale Differenzierung.

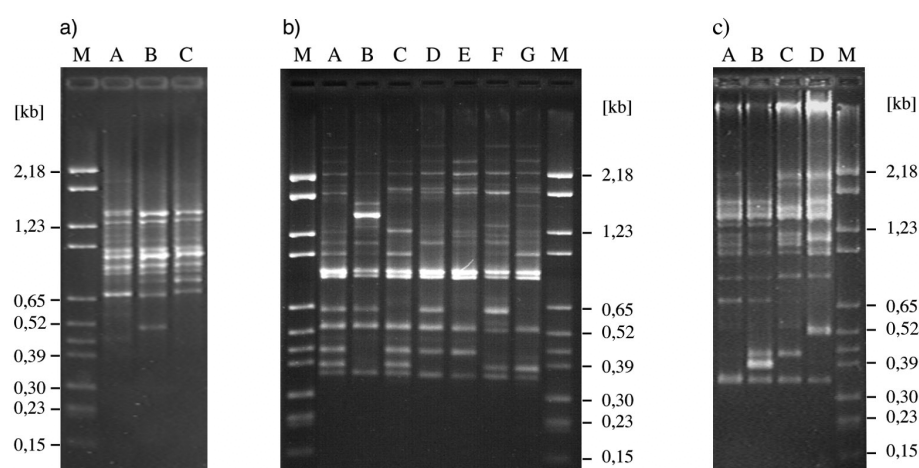


Abb.: 4.25: Subklassifizierung der *G. graminis* var. *graminis*-Isolate durch RAPD-PCR. a) Primer (GTG)₅: Isolate G203, 5.1, 18.5; b) Primer OPB-06: Isolate 10.1.1, 12.1, 33.2, 79.3, 16.3b, G206, 5.4 ; c) Primer OPB-17: Isolate 61.5, 33.2, G227, 5.4. Als Größenstandard wurde der Marker VI (Boehringer Mannheim) verwendet.

Mit dem Primer OPB-07, der am besten zur Subklassifizierung der Isolate der Varietät *tritici* geeignet war, ergaben alle *G. graminis* var. *graminis* Isolate nahezu identische Muster. Die am deutlichsten differenzierbaren Bandenmuster und damit die Möglichkeit zur Bildung von Untergruppen innerhalb der Varietät *graminis* lieferten die Primer OPB-06, OPB-17 und (GTG)₅.

Diese Primer wurden daraufhin zur Untersuchung von 12 gegenüber Weizen pathogenen Isolaten und 12 apathogenen bzw. schwach pathogenen Isolaten verwendet (Tab. 4.6). Die Amplifikation mit dem Primer (GTG)₅ ergab Bandenmuster, die im Bereich zwischen 400 und 1000 bp Unterschiede zeigten und eine Einteilung der Isolate in die Gruppen A, B und C ermöglichten. Mit dem Primer OPB-06 erfolgte entsprechend der Variabilität der Bandenmuster im Bereich von 300 bis 1000 bp eine Aufteilung in 7 Gruppen (A bis G). Nach

den sich aus der PCR mit dem Primer OPB-17 ergebenden Banden konnten die Isolate in 4 Gruppen (A, B, C, D) eingeteilt werden (Abb. 4.26). Die in Tabelle 4.6 gezeigte Zusammenstellung der mit den drei verschiedenen RAPD-Primern gewonnenen Gruppierungen der *G. graminis* var. *graminis*-Isolate verdeutlicht, daß weder ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Einteilungen, noch eine Beziehung zwischen den Mustergruppen und den Pathogenitätswerten der Isolate besteht. Die mit den verschiedenen Primern dargestellte Differenzierung scheint daher nur auf zufällig erfaßten Unterschieden in den Genomen der einzelnen Stämme zu beruhen, die weder auf einen Bezug zur taxonomischen Einordnung hindeuten, noch die Variation in der Pathogenität abbilden können.

Tab. 4.6: Vergleich der genetischen Klassifizierung durch RAPD-PCR und des Pathogenitätsverhaltens gegenüber Weizen am Beispiel repräsentativer *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*-Isolate.

Isolat	Wirtspflanze / Quelle	RAPD-Gruppe ¹ :			Pathogenität geg. Weizen ²
		(GTG) ₅	OPB-06	OPB-17	
Pathogene Isolate					
10.1.1*	Roggen, Waldsiefersdorf, 1996	A	A	B	+++
29.1	Roggen, Dannenberg, 1996	A	G	B	+++
12.1	Roggen, Ernsthof, 1996	A	B	B	+++
16.3*	Weizen, Prötzel, 1996	C	D	B	+++
12.4*	Roggen, Ernsthof, 1996	A	C	B	+++
18.5*	Roggen, Herzhorn, 1996	C	F	B	+++
61.5*	Weizen, Gramzow, 1996	C	A	C	+++
18.1*	Roggen, Herzhorn, 1996	C	D	B	+++
5.1*	Triticale, Eggersdorf, 1996	B	G	C	++
79.3	Weizen, Zernikow, 1996	A	D	B	++
33.2	Roggen, Hohenfinow, 1996	A	C	A	++
29.5b*	Roggen, Dannenberg, 1996	C	A	B	++
Apathogene Isolate					
G184	Weizen, Friedrichshof, 1989	C	D	C	+
G203*	Gerste, Golzow, 1989	A	F	B	+
64.4*	Weizen, Hohen-Güstrow, 1996	C	F	B	+
5.4*	Triticale, Eggersdorf, 1996	C	G	D	+
G206*	Gerste, Golzow, 1989	A	F	B	+
T1*	Weizen (CBS 541.86)	A	A	D	+
60.2*	Weizen, Neumeichow, 1996	A	A	A	-

G227*	Roggen, Trebbin, 1990	C	B	B	-
G229*	Roggen, Trebbin, 1990	C	B	B	-
G165*	Weizen, Friedrichshof, 1986	A	F	B	-
PR2*	Mais (CBS 350.77)	A	A	B	-
G197*	Weizen, Dedelow, 1989	A	A	C	f

¹ Unterschiedliche RAPD-Muster, die sich nach Amplifikation mit den entsprechenden Primern ergaben, wurden mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet.

² Die Einschätzung der Pathogenität beruht auf der Auswertung von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Tests (Augustin, 1999), analog den Angaben zur Tabelle 4.4, f: wachstumsfördernd, - : nicht pathogen, + : schwach pathogen, ++ : pathogen, +++ : stark pathogen.

* Isolate, die für die Restriktionsanalyse der ITS/rDNA-Region verwendet wurden.

rDNA-Restriktionsanalyse: Zur Prüfung einer möglichen Klassifizierung durch rDNA-RFLP-Analyse wurde die ITS/rDNA-Region von 8 gegenüber Weizen pathogenen und 11 schwach- bzw. apathogenen Isolaten mit den Primern psnDNA2p/PITS4 amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *MspI*, *CfoI*, *RsaI*, *DdeI*, *TaqI*, *HinI* und *HaeIII* gespalten. Alle getesteten Isolate (in Tabelle 4.6 mit * gekennzeichnet) zeigten mit den verwendeten Enzymen jeweils einheitliche Restriktionsmuster. Diese Muster waren identisch mit denen des Isolates *Phialophora sp.* P2, das nach phylogenetischen Analysen der ITS/rDNA-Region (Bryan *et al.*, 1995; Ward und Bateman, 1999) zu den *G. graminis* var. *graminis*/*Phialophora sp.*-Isolaten mit gelappten Hyphopodien gehört. Eine Subklassifizierung innerhalb der getesteten Isolate war mit dieser Methode nicht möglich.

Hybridisierung mit mitochondrialer rDNA: Ein Teil der Isolate wurde mit der mitochondrialen rDNA-Sonde GggMR1 getestet, die nach Ward und Gray (1992) eine Subklassifizierung der Isolate der Varietät *graminis* in die drei RFLP-Typen G1, G2 und G3 ermöglicht. Dazu wurde Gesamt-DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten und anschließend mit der rDNA-Sonde hybridisiert (Abb. 4.9). 11 repräsentative Stämme wurden für die Untersuchungen ausgewählt und etwa zu gleichen Teilen den RFLP-Typen G1 bzw. G2 zugeordnet. Ward und Gray (1992) konnten von insgesamt sieben von Weizen stammenden *G. graminis* var. *graminis*-Isolaten sechs dem RFLP-Typ G1 und nur ein Isolat (Isolat 148) dem RFLP-Typ G2 zuordnen. Das Isolat 148 wurde aufgrund dieses Ergebnisses und seiner für *G. graminis* var. *graminis* unüblichen Aggressivität gegenüber Weizen als atypisch, möglicherweise sogar einer anderen *Gaeumannomyces*-Art bzw. Varietät angehörend, eingestuft. In unseren Analysen konnten von den vier pathogenen und sieben

nicht pathogenen Isolaten je zwei pathogene in die Gruppen G1 (Isolate 10.1.1 und 18.5) und G2 (Isolate 79.3 und 148) eingeteilt werden. Drei nicht pathogene Isolate gehörten zum RFLP-Typ G1 (Isolate 184, 92/49-2A und 92/52-1A) und vier zum RFLP-Typ G2 (Isolate T1, 60.2, G227 und G165). Somit scheint auch bei dieser Subklassifizierung keine Beziehung zum Pathogenitätsverhalten zu bestehen, da G1- und G2-RFLP-Typen in gleicher Weise bei pathogenen und apathogenen Isolaten vorkommen.

Das als atypisch beschriebene RFLP-Typ G2- Isolat 148 zeigte typische RAPD-PCR-Muster der Gruppe B (*G. graminis* var. *graminis*) und konnte auch anhand der rDNA-RFLP-Muster der Varietät *graminis* zugeordnet werden (Abb. 4.26). Somit kann man davon ausgehen, daß der RFLP-Isolattyp G2 eine normale Untergruppe der Varietät *graminis* darstellt.

Isolate des RFLP-Typs G3 konnten bei unseren Untersuchungen nicht gefunden werden. Es gibt bisher auch nur ein Isolat in dieser Gruppe (Isolat 153), das von einer Segge isoliert wurde und nach Sequenzanalysen der ITS/rDNA-Region (Ward und Bateman, 1999) eine stärkere Homologie zu der von Walker (1981) beschriebenen Art *G. caricis* zeigt.

4.5.2 Phylogenetische Klassifizierung der Isolate der Varietät *graminis*

Die Analyse der ITS/rDNA-Region mit sieben verschiedenen Restriktionsendonukleasen hatte gezeigt, daß die Muster aller getesteten Isolate der RAPD-Gruppe B, die als *G. graminis* var. *graminis* identifiziert worden waren, mit denen des Isolates *Phialophora* sp. P2 identisch waren. Zur genaueren phylogenetischen Analyse wurde die ITS/rDNA-Region eines repräsentativen Isolates (Isolat 10.1.1) sequenziert und die Nukleotidsequenz mit den Daten der EMBL-Genbank verglichen. Dabei zeigte sich eine 100%ige Übereinstimmung zu den entsprechenden Sequenzen der *G. graminis* var. *graminis*-Isolate 247 und 85/23-1. Zur Sequenz des Isolates *Phialophora* sp.-Isolates P2 ergab sich eine Ähnlichkeit von 99,8%, das entspricht dem Unterschied von nur einer Base.

Nach phylogenetischen Analysen von Bryan *et al.* (1995) und Ward und Bateman (1999) bilden die *Phialophora* sp.-Isolate P2 und P9, die hinsichtlich ihrer ITS/rDNA-Sequenz übereinstimmen, zusammen mit den Isolaten 247 und 85/23-1 eine von drei separaten Gruppen innerhalb der Varietät *graminis*. Die zweite Gruppe umfaßt 2 Isolate, von denen das eine Isolat (W4066A) von Mais und das andere Isolat (G1) von der Gartenbohne isoliert wurde. Zur dritten Gruppe gehören die australischen Isolate G3 und G2 von Federborstengras bzw. einer nicht bestimmten Wirtspflanze.

Alle 123 auf unseren Versuchsflächen gefundenen und als *G. graminis* var. *graminis* identifizierten Isolate können aufgrund der vorliegenden Sequenzübereinstimmungen in die durch das Isolat P2 repräsentierte *G. graminis* var. *graminis*/*Phialophora* sp.-Gruppe eingeordnet werden. Unsere Isolate stammen von den Getreidearten Weizen, Roggen, Gerste und Triticale. Auch die Isolate 247, 85/23-1 und P2 und P9 wurden von Weizen bzw. Gerste isoliert. Somit kann die Annahme von Ward und Bateman (1999), daß diese Gruppe vorrangig die getreideinfizierenden Isolate der Varietät *graminis* beinhaltet, bestätigt werden.

Neben den drei bereits erwähnten Gruppen der Varietät *graminis* existiert eine Reihe weiterer Stämme, die dieser Varietät zugeordnet wurden, aber zum Teil atypische Eigenschaften zeigten. Die *G. graminis* var. *graminis* Isolate Gg1 und Gg2 der CBS-Stammsammlung, die von Gräsern in England bzw. Australien stammen, konnten aufgrund abweichender Amplifikationsmuster weder in die RAPD-Gruppe B, noch in die anderen RAPD-PCR-Gruppen eingeordnet werden (vgl. Abschnitt 4.1.3). Restriktionsanalysen der rDNA/ITS-Region dieser Isolate mit verschiedenen Enzymen ergaben deutliche Abweichungen von den Restriktionsmustern der getreideinfizierenden *G. graminis* var. *graminis*-Isolate (RAPD-Gruppe B). So zeigte das Isolat Gg1 nach der Spaltung mit *DdeI*, *RsaI*, *MspI* und *HaeIII* Unterschiede zu den Vergleichsisolaten der RAPD-Gruppe B, das Isolat Gg2 konnte mit *DdeI* und *MspI* unterschieden werden (Abb. 4.26).

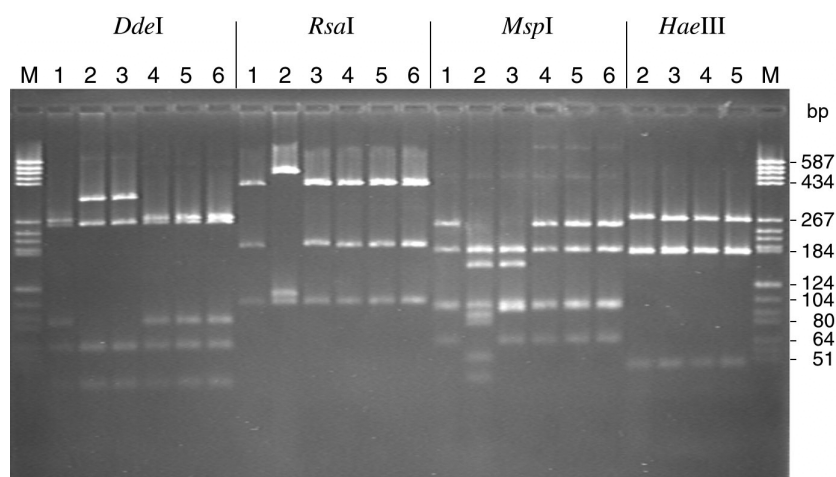


Abb. 4.26: Restriktionsmuster verschiedener *G. graminis* var. *graminis*-Isolate nach Spaltung der ITS/rDNA-Region. Bahn 1-6 : Isolate 96/4-2, Gg1, Gg2, 148, PR2, 10.1.1. Als Größenstandard wurde der Marker V (Boehringer Mannheim) verwendet.

Die Sequenzierung der rDNA/ITS-Regionen der Isolate Gg1 und Gg2 und der anschließende Sequenzvergleich mit der EMBL-Genbank ergab die engste Verwandtschaft des Isolates Gg2

zu den Isolaten G2 und P2 mit 98,9 bzw. 98,7% Ähnlichkeit. Das Isolat Gg1 dagegen zeigte insgesamt eine geringere Sequenzübereinstimmung zu den anderen Isolaten der Varietät *graminis*. Die größte Ähnlichkeit wurde zum Isolat G2 mit 97,4% errechnet.

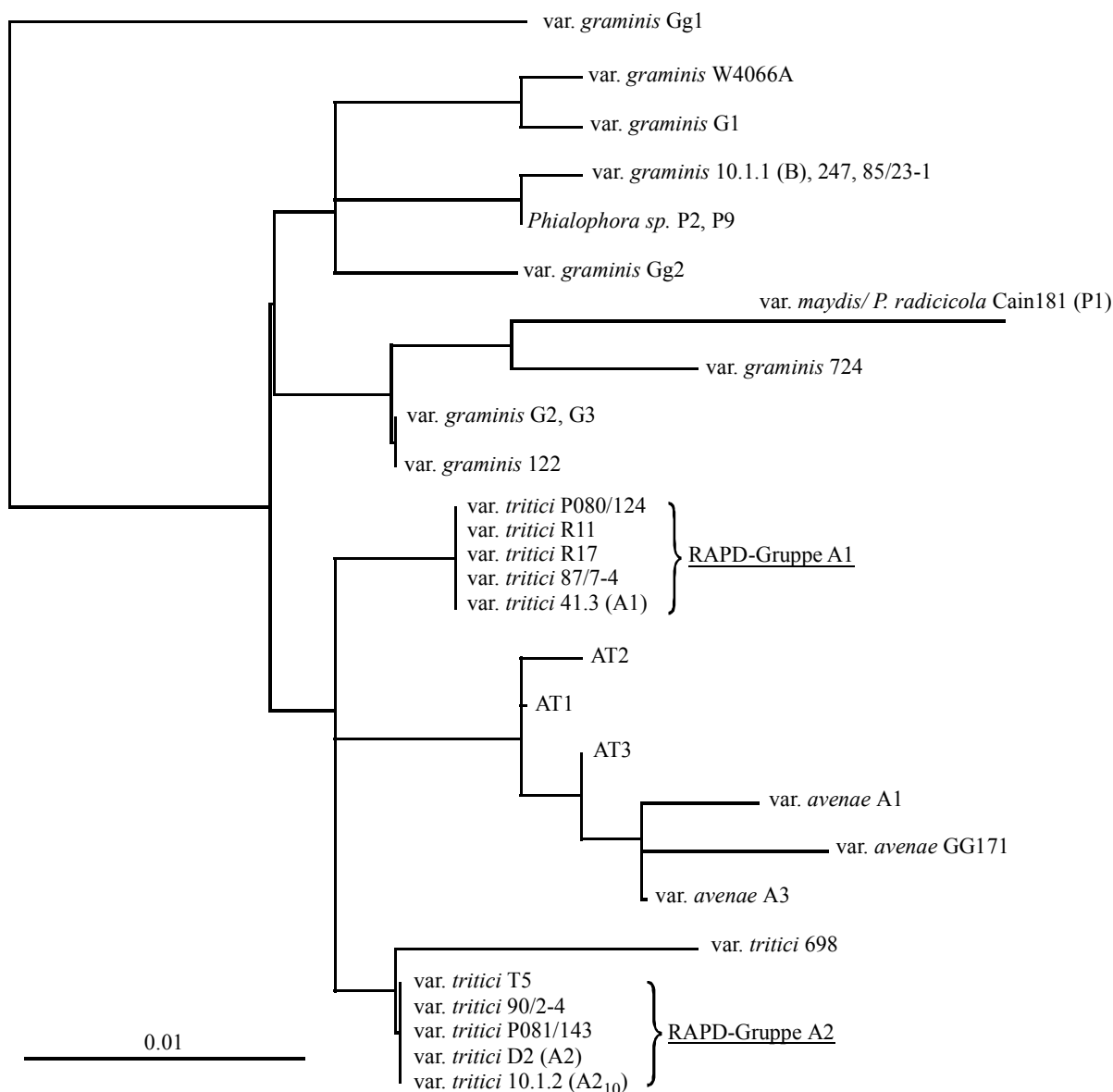


Abb. 4.27: Maximum-Likelihood-Stammbaum der ITS/rDNA-Sequenzen von Isolaten der Art *G. graminis*. Alignment und Outgroup entsprechen dem in Abb. 4.21 dargestellten Stammbaum.

Das australische Isolat 122, das ebenfalls aufgrund seiner abweichenden Muster in keine der RAPD-PCR-Gruppen eingeordnet werden konnte, stellt nach Ward und Akrofi (1994) ein atypisches Isolat dar, das sowohl Eigenschaften der Varietät *tritici* als auch der Varietät *graminis* besitzt. Während es nach Hybridisierung mit der Sonde GggMR1 (Ward und Gray, 1992; Abschnitt 4.1.4) typische RFLP-Muster der Varietät *graminis* zeigte, beschrieben Ward

und Akrofi (1994) ITS/rDNA-Restriktions-Muster, die für *G. graminis* var. *tritici*-Isolate charakteristisch waren. Daraufhin wurde die ITS/rDNA-Region dieses Isolates sequenziert. Der anschließende Vergleich ergab eine Ähnlichkeit von 99,8% zum Isolat G2. Beide Sequenzen unterscheiden sich lediglich in einem zusätzlichen Nukleotid in der Sequenz des Isolates 122 innerhalb der ITS1-Region.

Die phylogenetische Einordnung der beschriebenen Isolate und Isolategruppen innerhalb der Art *G. graminis* wurde unter Verwendung des Neighbor-Joining- und des Maximum-Likelihood-Algorithmus ermittelt (Abbildung 4.21 bzw. 4.27). In beiden Stammbäumen werden die Isolate der Varietät *graminis* von denen der Varietäten *tritici* und *avenae* deutlich separiert. Auch die Untergruppen innerhalb der Varietät *graminis* werden in beiden Stammbäumen gleichermaßen geclustert. Die getreideinfizierenden Isolate, repräsentiert durch das *Phialophora* sp.-Isolat P2, bilden eine separate Untergruppe, die Isolate G1 und W4066A die zweite und das Isolat 122 zusammen mit G2 und G3 die dritte der von Bryan *et al.* (1995) beschriebenen Untergruppen der Varietät *graminis*. Eine zusätzliche, vierte Gruppe wird durch das Isolat Gg2 repräsentiert.

Darüber hinaus liegt die Varietät *maydis*, vertreten durch das Isolat P1 innerhalb der Varietät *graminis* und bildet hier eine Gruppe zusammen mit dem Isolat 724. In beiden Stammbäumen wird auch die geringe Verwandtschaft des Isolates Gg1 zu allen bekannten *G. graminis*-Varietäten deutlich. Die taxonomische Zuordnung dieses Isolates zu *G. graminis* erscheint deshalb zumindest aus Sicht der ITS/rDNA fraglich. Im Maximum-Likelihood-Stammbaum werden mit Ausnahme des Isolates Gg1 alle Isolate der Varietät *graminis* zusammen gruppiert, wobei eine deutliche Gliederung in zwei Hauptgruppen vorliegt. Die eine besteht aus der Varietät *maydis* und der dritten von Bryan *et al.* (1995) beschriebenen Gruppe. Die zweite Hauptgruppe enthält die durch das Isolat *Phialophora* sp. P2 repräsentierte Gruppe der getreideinfizierenden Isolate und macht damit den Hauptteil der bisher identifizierten *G. graminis* var. *graminis*-Isolate aus.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Varietät *graminis* im Vergleich zu den Varietäten *tritici* und *avenae* wesentlich heterogener ist. Andererseits beschränken sich die getreideinfizierenden Isolate dieser Varietät und damit alle in dieser Arbeit analysierten *G. graminis* var. *graminis*-Isolate (RAPD-Gruppe B) auf eine Untergruppe. Diese Gruppe ist mit den verwendeten Methoden phylogenetisch nicht weiter differenzierbar, auch ist innerhalb der Gruppe keine Beziehung zwischen Pathogenitätsverhalten und genetischer Klassifizierung auffindbar.

5. Diskussion

Der *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes beinhaltet sowohl die Erreger verschiedener bodenbürtiger Wurzelkrankheiten an Gräsern und Getreide als auch apathogene Wurzelbesiedler mit ihren Haupt- und Nebenfruchtformen. Die Zusammensetzung dieser Pilzgruppe und die verwandtschaftlichen Beziehungen der Pilze untereinander sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Durch die Entwicklung molekulargenetischer Methoden konnten die bis dahin nur nach konventionellen Methoden wie Pathogenitätsverhalten, morphologischen und biochemischen Merkmalen differenzierten *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*- Isolate auf Art- und Varietätenebene phylogenetisch klassifiziert werden (Ward und Gray, 1992; Ward und Akrofi, 1994; Tan *et al.*, 1994; Fouly *et al.* 1996; 1997). Dabei zeigte sich eine große Diversität auf subvarietaler Ebene, die völlig neue Aspekte in die taxonomische Klassifizierung und die Untersuchung der Populationsstruktur der Pilze des G/P-Komplexes einbrachte und zum Teil klassische Differenzierungsergebnisse in Frage stellte (Ward und Gray, 1992; O'Dell *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1994; Bryan *et al.*, 1995; 1999; Fouly *et al.*, 1996, 1997; Ward und Bateman, 1999).

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Charakterisierung der phytopathogen relevanten Pilze des G/P-Komplexes an Getreide, insbesondere die Analyse der genetischen Diversität dieser Pilze und die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen molekulargenetischer Differenzierung und phänotypischen Merkmalen, speziell der Pathogenität.

2000 *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate von verschiedenen Getreideanbauflächen in Deutschland wurden durch RAPD-PCR mit zwei ausgewählten Dekamerprimern (OPB-06, OPB-07) analysiert und anhand der Polymorphismen in 5 Mustergruppen (A-E) eingeteilt. Durch die Verwendung von Referenzstämmen und den Vergleich mit anderen molekularen Differenzierungsmethoden wurde gezeigt, daß die Gruppen A bis D der klassischen taxonomischen Einteilung der Pilze des G/P-Komplexes in die Arten *G. graminis* mit den Varietäten *tritici*, *graminis* und *avenae* und die Art *G. cylindrosporus* entsprechen. Die Isolate der Gruppe E konnten durch weiterführende phylogenetische und morphologische Analysen als neue *Phialophora*-Art mit enger Verwandtschaft zu *G. graminis* charakterisiert werden (Ulrich *et al.*, 2000).

Die Ergebnisse zeigen, daß RAPD-Polymorphismen zur schnellen und sicheren Differenzierung der eng verwandten Pilze des G/P-Komplexes verwendet werden können. Durch das Auffinden der neuen *Phialophora*-Art wird deutlich, daß die RAPD-Methode auch zur Identifizierung noch nicht beschriebener Isolate bzw. Isolategruppen geeignet ist. Die Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer molekulargenetischer Differenzierungsmethoden, speziell der rDNA-Analyse, und der klassischen taxonomischen Einteilung auf der Ebene der Arten und Varietäten zeigt, daß die RAPD-PCR eine phylogenetische Klassifizierung der *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*- Isolate gestattet. Durch die große Anzahl an Testisolaten wurde darüber hinaus die Zuverlässigkeit der Differenzierungsergebnisse bestätigt.

Die Eignung der RAPD-PCR war auch daran zu erkennen, daß verschiedene Referenzisolate, deren taxonomische Position mit anderen Methoden nicht eindeutig oder falsch bestimmt worden war, anhand der RAPD-Polymorphismen neu zugeordnet werden konnten. So wurde das als *G. graminis* var. *tritici* identifizierte Isolat T1 eindeutig als *G. graminis* var. *graminis* bestimmt. Das von Ward und Gray (1992) aufgrund seiner Aggressivität gegenüber Weizen und abweichender RFLP-Muster nach Hybridisierung mit der mitochondrialen rDNA Sonde GggMR1 als atypisch beschriebene Isolat 148 zeigte ebenfalls typische RAPD-Muster der *G. graminis* var. *graminis*-Isolate. Ein anderes atypisches Isolat (180), das in Australien von Weizen gewonnen und ursprünglich aufgrund seiner kurzen Ascosporen als *G. graminis* var. *tritici* identifiziert wurde, zeigte in Übereinstimmung mit anderen Fingerprintmethoden (Ward und Gray, 1992; Ward und Akrofi, 1994) RAPD-Muster, die für *G. graminis* var. *avenae* typisch sind. Ähnliche Isolate, die kurze Ascosporen besitzen, aber, wie es für die Varietät *avenae* charakteristisch ist, aggressiv gegenüber Hafer reagieren, wurden auch von anderen Autoren beschrieben (Holden und Ashby, 1981; Yeates, 1986).

Der Vergleich mit den Amplifikationsmustern weiterer wurzelinfizierender Pilze wie z.B. *Fusarium*, *Selenophoma* und *Trichoderma* machte deutlich, daß mit der RAPD-PCR begrenzt auch eine Unterscheidung der Pilze des G/P-Komplexes von anderen im Boden bzw. an der Wurzel vorkommenden Pilzgattungen möglich ist. Da die anderen Bodenpilze durch die Methode zur Isolation der *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*- Isolate und die damit verbundene Oberflächensterilisation der Wurzelfragmente jedoch nahezu vollständig ausgeschlossen werden, besitzt dieser Aspekt hier weniger Bedeutung. Das Hauptpotential der RAPD-PCR liegt in der

Differenzierung der Arten und Varietäten aber auch in der Untersuchung subvarietaler genetischer Variationen bis hin zur Unterscheidung einzelner Stämme.

Bei verschiedenen anderen phytopathogenen Pilzen wurden die Vorteile der RAPD-PCR sowohl zur Diagnose als auch zur taxonomischen Einordnung und Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen genutzt. Crowhurst *et al.* (1991) untersuchten mit dieser Technik die genomische Variabilität von *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*-Reinkulturen und konnte anhand der Bandenmuster eine Isolateinteilung vornehmen, die die klassische Rasseneinteilung dieser Pathogengruppe bestätigte. Eine auf RAPD-Polymorphismen basierende Rassendifferenzierung bei *Fusarium solani* f. sp. *vasinfectum* wurde von Hering (1993) vorgenommen. Schäfer und Wöstemeyer (1992) fanden bei *Phoma lingam*-Isolaten eine Korrelation zwischen RAPD-Markern und der Pathogenität gegenüber Raps und konnten so eine Differenzierung zwischen aggressiven und nicht aggressiven Isolaten, also auf der Basis von Pathotypen vornehmen.

In gleicher Weise konnte die Eignung von RAPD-Polymorphismen zur Differenzierung auf subvarietaler Ebene am Beispiel der Isolate der *G. graminis*-Varietät *tritici* demonstriert werden, die als Erreger der Schwarzbeinigkeit an Weizen bekannt ist. Durch Kombination der Primer OPB-06 und OPB-07 wurden in dieser Arbeit insgesamt 1818 Isolate dieser Varietät in die Untergruppen A1 und A2 eingeteilt. Sequenzvergleiche der ITS/rDNA-Region ergaben eine Analogie zwischen den RAPD-Gruppen A1 und A2 und den von Ward und Gray (1992) gefundenen *G. graminis* var. *tritici*-Untergruppen T2 und T1 bzw. den von O'Dell *et al.* (1992) differenzierten R-Typ (Rye-adapted)- und den gegenüber Roggen nicht pathogenen N-Typ-Isolaten. Diese Übereinstimmung zeigt, daß die RAPD-PCR auch zur phylogenetischen Klassifizierung der *G. graminis* var. *tritici*-Isolate auf subvarietaler Ebene geeignet ist. Bei der Untersuchung des Pathogenitätsverhaltens der Isolate der RAPD-Gruppen A1 und A2 (und damit der R- bzw. N-Typ-Isolategruppe) gegenüber Roggen wurde keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von O'Dell *et al.* (1992) gefunden, die einen Zusammenhang zwischen Genotyp und der Ausprägung der Pathogenität gegenüber dieser Getreidesorte festgestellt hatten. Die Ursache dafür lag wahrscheinlich darin, daß der genetischen Klassifizierung in die N- und R-Typ-Isolate eine Differenzierung nach der Pathogenität vorausgegangen war, die zum Ausschluß von Isolaten mit nicht eindeutig bestimmbarer oder mittlerer Pathogenität geführt hatte (Hollins und Scott, 1990). Die in unseren Untersuchungen zufällig und ohne Berücksichtigung der Pathogenitäts-

eigenschaften ausgewählten Isolate zeigten sich in ihrer Aggressivität gegenüber Roggen sehr variabel und ohne Beziehung zur Subklassifizierung in die Gruppen A1 und A2. Ein weiterer Hinweis dafür, daß die Ausprägung der Pathogenität gegenüber Roggen nicht mit der Einteilung in die *G. graminis* var. *tritici*-Untergruppen R- und N bzw. A1 und A2 korreliert, wurde von Bryan *et al.* (1999) gefunden. Zwei eng verwandte Isolate, die nach Hyphenspitzen-Isolation aus einem von O'Dell *et al.* (1992) charakterisierten N-Typ Isolat hervorgegangen waren, zeigten nach molekularen Analysen zwar immer noch typische N-Typ-Fingerprints, reagierten aber entgegen den Erwartungen stark pathogen gegenüber Roggen.

G. graminis var. *tritici* ist generell als Haupterreger der Schwarzbeinigkeit an Weizen und Gerste bekannt und wird demzufolge durch eine ausgeprägte Aggressivität besonders diesen beiden Getreidearten gegenüber charakterisiert (Walker, 1981). Bei der Untersuchung der Pathogenität gegenüber Weizen ergaben sich in unseren Versuchen eine starke Variabilität und darüber hinaus deutliche Unterschiede zwischen den beiden *G. graminis* var. *tritici*-Untergruppen. Während das Pathogenitätsspektrum der A1-Isolate von wachstumsfördernd über nicht pathogen bis stark pathogen reichte, wurden alle A2-Isolate als pathogen, 75% sogar als stark pathogen eingestuft. Nach diesen Ergebnissen besteht demnach eher ein Zusammenhang zwischen der Differenzierung der beiden Untergruppen der Varietät *tritici* und der Pathogenität gegenüber Weizen als zwischen der Gruppeneinteilung und der Pathogenität gegenüber Roggen.

Sehr widersprüchliche Ergebnisse sind hinsichtlich der Pathogenität von *G. graminis* var. *tritici* gegenüber Hafer zu finden. Der „Weizen-Take-all-Pilz“ *G. graminis* var. *tritici* wird aufgrund seiner Unfähigkeit, das von Haferwurzeln gebildete Abwehrsubstrat Avenacin zu detoxifizieren, generell als apathogen gegenüber Hafer beschrieben (Osborn *et al.*, 1994). Die Isolate der Varietät *avenae* sind dagegen durch die Produktion des Enzyms Avenacinase, das das giftige Avenacin in weniger giftige Formen deglycosyliert, zur Infektion von Haferwurzeln in der Lage (Crombie *et al.*, 1986; Osborn *et al.*, 1991). In unseren Versuchen wurde bei 60% der *G. graminis* var. *tritici*-Isolate ein aggressives bis stark aggressives Verhalten gegenüber Hafer festgestellt. Dabei wurde, soweit es bei der relativ geringen Zahl von 12 Isolaten möglich war, kein Zusammenhang zur Einteilung der Isolate in die Untergruppen A1 und A2 gefunden. Einen ähnlich hohen Anteil an Hafer-pathogenen Isolaten konnten Tan *et al.* (1994) bei der Untersuchung von 20 *G. graminis* var. *tritici* Isolaten aus Australien, England, den USA und

Dänemark feststellen. Nach RFLP-Analyse mit einer 26S rDNA-Sonde konnten die Isolate in drei Untergruppen (T1, T2, T3) unterschieden werden. Während sich die Isolate der Gruppe T1 in ihrem Pathogenitätsverhalten sehr variabel zeigten, waren alle Isolate der Untergruppen T2 und T3 neben Weizen auch pathogen gegenüber Hafer. Die Isolate der Gruppe T3 besaßen zwar die für die Varietät *tritici* typischen kurze Ascosporen, hatten aber bezüglich der RFLP-Muster große Ähnlichkeit mit der Varietät *avenae*. Insgesamt verhielten sich in diesem Versuch fast 80% der *G. graminis* var. *tritici*-Isolate aggressiv gegenüber Hafer. Die Ergebnisse der beiden letztgenannten Untersuchungen stehen im Widerspruch zu der üblichen Annahme, daß Hafer aufgrund der Avenacinbildung vor Infektionen durch den Erreger *G. graminis* var. *tritici* geschützt ist. Die Fähigkeit zur Pathogenität gegenüber Hafer scheint daher nicht unbedingt auf die Isolate der Varietät *avenae* begrenzt, sondern auch innerhalb der Varietät *tritici* relativ weit verbreitet zu sein. In diesem Zusammenhang ist auch die enge Verwandtschaft zwischen den getreideinfizierenden *G. graminis*-Varietäten *tritici* und *avenae* und die damit verbundene Möglichkeit des Auftretens von Übergangsformen zu nennen. Zwei Isolate, die entsprechend ihrer Eigenschaften (kurze Ascosporen, Aggressivität gegenüber Hafer, fehlende Avenacinaseproduktion) zwischen beiden Varietäten liegen und möglicherweise eine dritte, durch intervarietale Kreuzung entstandene getreideinfizierende Varietät von *G. graminis* repräsentieren, wurden von Yeates *et al.* (1986) gefunden und von Bryan *et al.* (1995, 1999) phylogenetisch charakterisiert. In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Bryan *et al.* (1995) zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Art *G. graminis*, daß die beiden Untergruppen der Varietät *tritici* nicht wesentlich enger miteinander verwandt sind, als jede mit der Varietät *avenae*. Die engste Verwandtschaft wurde dabei zwischen der Untergruppe A2 und den *G. graminis* var. *avenae*-Isolaten gefunden.

Generell unterstreichen die Ergebnisse die ausgeprägte Diversität innerhalb der Varietät *tritici* und die enge Beziehung zwischen den Varietäten *tritici* und *avenae*, die sowohl auf genetischer Ebene als auch in der Ausprägung der sehr differenzierten Pathogenitätseigenschaften deutlich wird. Das Pathogenitätsverhalten gegenüber verschiedenen Wirtspflanzen, wie hier an Roggen, Weizen und Hafer andeutungsweise gezeigt wurde, scheint wesentlich komplexer zu sein als bisher angenommen wurde.

Neben der Aggressivität gegenüber Weizen unterschieden sich die *G. graminis* var. *tritici*-Untergruppen A1 und A2 auch in ihren durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeiten bei 27°C auf Malzagar. Ob ein Zusammenhang zwischen der stärkeren Pathogenität und dem schnelleren Wachstum der Isolate der Gruppe A2 besteht, muß in weiterführenden Untersuchungen - möglichst *in situ* im Boden - geklärt werden. Vorstellbar wäre, daß das schnellere Wachstum und auch das im Vergleich zu den A1- Isolaten meist lockere Luftmycel einen Konkurrenzvorteil bei der Verbreitung und beim Infektionsvorgang bietet.

G. graminis var. *graminis* wird in der Literatur als sehr heterogene Gruppe mit breitem Wirtsspektrum beschrieben. Bei der Untersuchung von *G. graminis* var. *graminis*-Isolaten von verschiedenen Gräsern konnten Fouly *et al.* (1996) basierend auf RAPD-Analysen mit vier Dekamerprimern eine starke Variabilität der Bandenmuster feststellen. Intraspezifische Variationen innerhalb der Varietät *graminis* wurden auch durch Restriktionsanalyse der ITS/rDNA-Region und Analyse von Introns in der kleinen Untereinheit der rDNA gefunden (Fouly *et al.* 1997; Fouly und Wilkinson, 2000). Phylogenetische Analysen der ITS/rDNA-Sequenz zeigten deutlich die Heterogenität innerhalb der Varietät und führten zur Einteilung der *G. graminis* var. *graminis*-Isolate in drei separate, miteinander wenig verwandte Gruppen (Bryan *et al.*, 1995; Ward und Bateman, 1999). Dabei beinhaltete eine Gruppe vier getreideinfizierende Isolate. Die beiden anderen Gruppen setzten sich aus je zwei eher ungewöhnlichen, aus China, Australien usw. stammenden Isolaten zusammen. Alle bisher durchgeführten Untersuchungen zur Diversität innerhalb der Varietät *graminis* basieren jedoch auf sehr geringen Isolatezahlen (2 bis 14) und lassen daher kaum Rückschlüsse auf die Bedeutung der identifizierten Gruppen zu.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 123 von verschiedenen Getreidesorten stammende *G. graminis* var. *graminis*/*Phialophora* sp.-Isolate untersucht. Diese wurden anhand spezifischer, für die verwendeten Primer OPB-06 und OPB-07 einheitlicher RAPD-Fingerprints (RAPD-Gruppe B) aus der Gesamtzahl der 2000 getesteten *Gaeumannomyces*- und *Phialophora*-Isolate eindeutig als Vertreter der Varietät *graminis* identifiziert. Restriktionsanalysen und der Sequenzvergleich der ITS/rDNA-Region zeigten, daß die Isolate eine genetisch einheitliche Gruppe innerhalb der Varietät *graminis* darstellen und mit den Isolaten übereinstimmen, die nach Bryan *et al.* (1995) in die durch das Isolat *Phialophora* sp. P2 repräsentierte Gruppe der getreideinfizierenden *G. graminis* var. *graminis*-Isolate eingeordnet wurden.

Außerhalb der getreideinfizierenden Isolate besteht jedoch eine wesentlich höhere Diversität, die sich wahrscheinlich mehr auf die Pilze der Varietät beschränkt, die vorrangig an Gräsern anzutreffen sind. Neben den von Bryan *et al.* (1995) und Ward und Bateman (1999) beschriebenen Gruppen, die nur durch eine sehr geringe Zahl eher atypischer, zum Teil von ungewöhnlichen Wirtspflanzen gewonnenen Isolate repräsentiert werden, weisen weitere Untersuchungen auf eine stark ausgeprägte Variabilität der gräserinfizierenden *G. graminis* var. *graminis*-Isolate hin. Fouly *et al.* (1997) differenzierten 14 Isolate von verschiedenen Gräsern wie z.B. Hundszahn, Straußgras, Kolbenhirse und Reis aus Amerika bzw. Südafrika durch Restriktionsanalyse der ITS-Region in drei Genotypen, zeigten jedoch keinen Zusammenhang zu den von Bryan *et al.* (1995) gefundenen Gruppen. Im Rahmen unserer Arbeiten konnte nach Sequenzanalyse der ITS/rDNA-Region der Isolate Gg1, Gg2 und 122 die hohe Diversität durch das Auffinden einer weiteren Untergruppe bestätigt werden. Das Isolat Gg2, das in Australien von einem Gras isoliert wurde, repräsentiert neben den von Bryan *et al.* (1995) beschriebenen Gruppen wahrscheinlich eine vierte Untergruppe der Varietät *graminis*. Möglicherweise ist die Heterogenität der gräserinfizierenden *G. graminis* var. *graminis*-Isolate auch geographisch bedingt. Während die getreideinfizierenden Isolate aus England, Czechien und Deutschland stammen, wurden die Pilze der anderen Gruppen der Varietät *graminis* außerhalb von Europa isoliert. Dabei beinhaltet die zweite von Bryan *et al.* (1995) beschriebene Gruppe ein Isolate aus China und ein amerikanisches Isolat. Die dritte Gruppe setzt sich aus zwei australischen Isolaten zusammen und konnte durch das in unserer Arbeit sequenzierte, ebenfalls aus Australien stammende Isolat 122 erweitert werden.

Die Pilze der Varietät *graminis*, die für verschiedene Krankheiten an Gräsern verantwortlich sind, werden generell als schwach oder nicht pathogen gegenüber Getreide charakterisiert. Die Untersuchung der Pathogenität der von Getreide gewonnenen *G. graminis* var. *graminis*-Isolate ergab jedoch, daß über 50% dieser Isolate deutlich aggressiv gegenüber Weizen reagierten (Augustin, 1999). In Übereinstimmung damit existieren weitere Hinweise über Weizenpathogene *G. graminis* var. *graminis*-Isolate, die jedoch in den meisten Fällen als atypisch beschrieben wurden (Nilsson, 1972; Roy *et al.*, 1976; Ward and Gray, 1992). Verschiedene Versuche, u.a. anhand von RAPD-Polymorphismen bzw. durch Restriktionsanalyse der ITS/rDNA einen Zusammenhang zwischen genetischer Klassifizierung der getreideinfizierenden *G. graminis* var. *graminis*-Isolate und dem Pathogenitätsverhalten gegenüber Weizen zu finden,

blieben erfolglos. Das Auffinden der relativ großen Anzahl aggressiver Isolate zeigt jedoch, daß die Pathogenität gegenüber Weizen eine normale Eigenschaft der Varietät *graminis* ist. Die generelle Einschätzung, daß es sich bei *G. graminis* var. *graminis* um gegenüber Getreide apathogene Pilze handelt, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in der Vergangenheit vorrangig von Gräsern isolierte Pilze analysiert wurden.

Die intensive Untersuchung der Pilze des G/P-Komplexes, speziell durch die Anwendung molekularer Methoden in den letzten Jahren, offenbarte eine hohe Diversität sowohl auf Art- und Varietätenebene als auch auf subvarietaler Ebene. Die Analysen zeigten neben der Charakterisierung der bekannten Arten und Varietäten das Vorhandensein von Isolaten oder Isolategruppen mit Eigenschaften, die nicht mit den beschriebenen Taxa in Übereinstimmung zu bringen sind. So wurde eine neue *Phialophora*-Art innerhalb des G/P-Komplexes mit enger Verwandtschaft zu *G. graminis* beschrieben, die taxonomisch zwischen *G. graminis* und *G. incrustans/Magnaporthe poae* liegt. Morphologisch ist diese neue Art *G. graminis* sehr ähnlich, während sie im Infektionsverhalten mit dem apathogenen Wurzelbesiedler *G. cylindrosporus* vergleichbar ist. Hierdurch könnte dieser Gruppe eine Bedeutung als Antagonist unter natürlichen Bedingungen zukommen, zumal die Pilze an verschiedenen Standorten mit relativ großen Anteilen an der Gesamtpopulation der Pilze des G/P-Komplexes auftraten.

Auf varietaler Ebene wurde von Yao *et al.* (1992) die Mais-infizierende *G. graminis*-Varietät *maydis* beschrieben. Isolate dieser Varietät sind in China als Erreger einer frühen Form des Maisbrands (Yao *et al.*, 1992) und in Südafrika bzw. Frankreich als Vertreter des Wurzel- und Halmrotte-Komplexes (Deacon und Scott, 1983) bekannt. Phylogenetisch ist die Varietät *maydis* sehr eng mit *G. graminis* var. *graminis* verwandt (Ward und Bateman, 1999) und es zeigt sich eine deutliche Überlappung beider Varietäten. Insgesamt dokumentieren das Auffinden neuer Pilzgruppen und das Vorhandensein von Überschneidungen der Varietätengrenzen, daß die taxonomische Beschreibung der Pilze des G/P-Komplexes noch nicht abgeschlossen ist. Deshalb scheint eine Erweiterung des Konzeptes der Zusammensetzung des Pilzkomplexes unumgänglich zu sein.

Die oft widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Pathogenität der *G. graminis*-Isolate deuten auf generelle Schwierigkeiten bei der experimentellen Erfassung von Pathogenitätseigenschaften hin. Sowohl unter natürlichen Bedingungen, wo Boden- und Klimafaktoren eine Rolle spielen,

als auch im Biotest ist die Pathogenität großen Schwankungen unterlegen. Außerdem verlieren viele *G. graminis* Isolate ihre Pathogenität unter Laborbedingungen bei der Haltung auf künstlichen Medien (Cunningham, 1981). So wurde bei über der Hälfte von 111 *G. graminis* var. *tritici*-Isolaten nach Lagerung auf Agar über einen Zeitraum von 9 Monaten sowohl bei Subkultivierung in 10-Tage-Intervallen als auch bei Lagerung bei 12-24°C ein Verlust der Aggressivität gegenüber Weizen festgestellt (Naiki und Cook, 1983). Die genetische Ursache für diese phänotypische Veränderung ist nicht bekannt. Neben Veränderungen bis hin zum Verlust der Pathogenität können Differenzen in der Einschätzung der Aggressivität auch durch Unterschiede in der Durchführung der Pathogenitätstests zustande kommen. Sowohl die Art der Ansätze, deren Spektrum von einfachen Infektionstests bis hin zu aufwendigeren Tests mit Sand-Maismehl-Mischungen als Inokulum reicht, als auch die Auswertung der Pathogenität anhand unterschiedlicher Parameter sind zum Teil sehr differenziert und die Ergebnisse der Untersuchungen demzufolge nur begrenzt vergleichbar.

Neben der taxonomischen Differenzierung und Klassifizierung konnte die RAPD-PCR auch zu ersten Untersuchungen der Populationsstruktur der Pilze des G/P-Komplexes an verschiedenen Standorten genutzt werden. Die RAPD-Technik bietet in der molekularen Ökologie eine Alternative zu herkömmlichen Fingerprintmethoden, vor allem, wenn unzureichende Kenntnisse über das Zielgenom bestehen und große Probenzahlen bewältigt werden müssen (Hadrys *et al.*, 1992; Mc Donald, 1997). Erste Untersuchungen an unterschiedlichen Standorten in Deutschland zeigten große Unterschiede in der Populationszusammensetzung der Pilze des G/P-Komplexes (Augustin, 1999). Generell war eine starke Dominanz der *G. graminis* var. *tritici*-Isolate zu sehen, die in den meisten Fällen um die 90% lag. Übereinstimmend damit konnten Hornby *et al.* (1990) bei der Analyse von 425 Isolaten von infizierten Getreidewurzeln an zwei verschiedenen Standorten in England einen ähnlich hohen Anteil (89,5%) der *G. graminis* var. *tritici*-Isolate feststellen. Die prozentualen Werte für *G. graminis* var. *graminis* und *G. cylindrosporus* waren besonders bei *G. cylindrosporus* sehr gering und deuten auf eine starke Abhängigkeit von Standortfaktoren hin. Vertreter der Varietät *avenae* wurden weder in Deutschland noch bei den Untersuchungen in England und Polen (S. Martyniuk, persönliche Mitteilung) gefunden. Einige wenige *G. graminis* var. *avenae*-Isolate konnten bei Stichprobenversuchen in Finnland von Haferpflanzen gewonnen werden. Wahrscheinlich steht diese Varietät mehr mit dem Anbau von Hafer, der in Deutschland weniger ausgeprägt ist, bzw. mit Rasengräsern in Verbindung. Neben

der Untersuchung des Auftretens und der Verteilung der verschiedenen Arten und Varietäten des G/P-Komplexes kann die RAPD-PCR auch zur Analyse von Populationsverschiebungen auf subvarietaler Ebene angewendet werden. Die Untersuchung von Veränderungen der Populationsstruktur innerhalb der Varietät *tritici* könnte dabei Ansatzpunkte für epidemiologische Studien liefern.

Insgesamt konnte durch die systematische Analyse von 2000 Pilzisolaten des G/P-Komplexes mit molekulargenetischen Methoden die Taxonomie dieser Gruppe überprüft und vervollständigt werden. Hierbei wurde eine hohe phylogenetische Diversität nachgewiesen und die Bedeutung der einzelnen Gruppen innerhalb der *Gaeumannomyces/Phialophora*- Population an Getreide aufgezeigt.

Ausblick

Nachfolgende Arbeiten sollten sich auf die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der festgestellten genetischen Diversität und der funktionellen Ausprägung phytopathogen relevanter Eigenschaften konzentrieren. Hierbei ist die molekulargenetische und biochemische Charakterisierung der Infektionsmechanismen und des Konkurrenzverhaltens der Pilze des *Gaeumannomyces/Phialophora*-Komplexes von besonderer Bedeutung. Für die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse ist es dann notwendig, *in situ*-Analysen in verschiedenen Mikroökosystemen durchzuführen.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott, L.K., Holland, A.A. (1975).** Electrophoretic patterns of soluble proteins and isoenzymes of *Gaeumannomyces graminis*. *Australian Journal of Botany* **23**: 1-12.
- Appel, D.J., Gordon, T.R. (1995).** Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Experimental Mycology* **19**: 120-128.
- Apples, J.B., Honeycutt, R.L. (1986).** rDNA: Evolution over a billion years. In: Dutter, S.K. (ed) *DNA systematics*. CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 81-135.
- Arx, J.A. von, Olivier, D.L. (1952).** The taxonomy of *Ophiobolus graminis* Sacc. *Transactions of the British Mycological Society* **35**: 29-33.
- Asher, M.J.C., Shipton P.J. (1981).** Biology and Control of take-all. Academic Press, London.
- Assigbetse, K.B., Fernandez, D., Dubois, M.P., Geiger, J.P. (1994).** Differentiation of *Fusarium* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* **84**: 622-626.
- Augustin, C., Jacob, H.-J., Werner, A. (1997).** Effects on growth of wheat plants on isolates of *Gaeumannomyces-Phialophora* complex fungi in different conditions of soil, moisture, temperature, and photoperiod. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 417-426.
- Augustin, C. (1999).** Aufklärung der Wechselbeziehungen zwischen genotypischer Determination und phänotypischer Modulation der Virulenz bodenbürtiger Phytomycozen am Beispiel der Schwarzbeinigkeit bei Getreide. DFG-Zwischenbericht AU 120/1-4.
- Augustin, C., Ulrich, K., Ward, E., Werner, A. (1999).** RAPD-based inter- and intravarietal classification of fungi of the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex. *Journal of Phytopathology* **147**: 109-117.
- Bateman, G.L., Ward, E., Antoniw, J.F. (1992).** Identification of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *G. graminis* var. *avenae* using a DNA probe and non-molecular methods. *Mycological Research* **96**: 737-742.
- Bateman, G.L., Ward, E., Hornby, D., Gutteridge, R.J. (1997).** Comparison of isolates of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, from different cereal sequences using DNA probes and non-molecular methods. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 1225-1232.
- Becker, J.O., Schwinn, F.J. (1993).** Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pesticide Science* **37**: 355-363.
- Beyer, W., Höxter, H., Miedaner, T., Sander, E., Geiger, H.H. (1993).** Indirect ELISA for quantitative assessment of *Fusarium* spp. in rye. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **3**: 278-284.
- Bowyer, P., Clarke, B.R., Lunness, P., Daniels, M.J., Osbourn, A.E. (1995).** Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* **267**: 371-373.

- Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J.W. (1991).** Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **22**: 525-564.
- Bryan, G.T., Daniels, M.J., Osbourn, A.E. (1995).** Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 681-689.
- Bryan, G.T., Labourdette, E., Melton, R.E., Nicholson, P., Daniels, M.J., Osbourn, A.E. (1999).** DNA polymorphism and host range in the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*. *Mycological Research* **103**: 681-689.
- Bunting, T.E., Plumley, K.A., Clarke, B.B., Hillman, B.I. (1996).** Identification of *Magnaporthe poae* by PCR and examination of its relationship to other fungi by analysis of their nuclear ITS1 regions. *Phytopathology* **86**: 398-404.
- Butler, F.C. (1961).** Root and foot rot disease of wheat. *Science Bulletin* **77**: Department of Agriculture N.S.W. 98-105.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M. (1991).** DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**: 294-307.
- Cahill, D.M. (1999).** Detection, identification and disease diagnosis of soilborne pathogens. *Australasian Plant Pathology* **28**: 34-44.
- Cain, R.F. (1952).** Studies of Fungi imperfecti. I. *Phialophora*. *Canadian Journal of Botany* **30**: 338-343.
- Cannon, P.F. (1994).** The new recognized family *Magnaporthaceae* and its interrelationship. *Systema Ascomycetum* **13**: 25-42.
- Chambers, C., Dutta, S.K., Crouch, R.J. (1986).** *Neurospora crassa* ribosomal DNA: sequence of internal transcribed spacer and comparison with *N. intermedia* and *N. sitophila*. *Gene* **44**: 159-164.
- Chen, W., Hoy, J.W., Schneider, R.W. (1992).** Species specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Phythium* species. *Experimental Mycology* **16**: 22-34.
- Cook, R.J. (1994).** Problems and progress in the biological control of wheat take-all. *Plant Pathology* **43**: 429-437.
- Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G., Kim, D.S. (1995).** Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**: 4197-4201.
- Cotterill, P.J., Sivasithamparam, K. (1989).** An autecological study of the take-all fungus (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) in Western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* **40**: 229-240.
- Crombie, W.M.L., Crombie, L., Green, J.B., Lucas, J.A. (1986):** Pathogenicity of take-all fungus to oats: its relationship to the concentration and detoxification of four avenacins. *Phytochemistry* **25**: 2074-2083.

- Crowhurst, R.N., Hawthorne, B.T., Rikkerink, E.H.A., Templeton, M.D. (1991).** Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics* **20**: 391-396.
- Cunningham, P.C. (1981).** Isolation and culture. In: Asher, M.J.C. and Shipton, P.J. (eds) *Biology and Control of Take-all*. Academic Press, London, pp. 103-123.
- Curtis, M.D., Gore, J., Oliver, R.P. (1994).** The phylogeny of the tomato leaf mould fungus *Cladosporium fulvum* syn. *Fulvia fulva* by analysis of rDNA sequences. *Current Genetics* **25**: 318-322.
- Datnoff, L.E., Elliott, M.L., Jones, D.B. (1993).** Black sheath rot caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* on rice in Florida. *Plant Disease* **77**: 210.
- Deacon, J.W. (1973).** Control of the take-all fungus by grass leys in intensive cereal cropping. *Plant Pathology* **22**: 88-94.
- Deacon, J.W. (1974).** Further studies on *Phialophora radiculicola* and *Gaeumannomyces graminis* on roots and stem bases of grasses and cereals. *Transactions of the British Mycological Society* **63**: 307-327.
- Deacon, J.W. (1976).** Biology of the *Gaeumannomyces graminis* Arx & Olivier *Phialophora radiculicola* Chain complex on roots of the Gramineae. *EPPO Bulletin* **6**: 349-363.
- Deacon, J.W. (1981).** Ecological relationship with other fungi: competition and hyperparasites. In: Asher, M.J.C. and Shipton, P.J. (eds) *Biology and Control of Take-all*. Academic Press, London, pp. 75-102.
- Deacon, J.W., Scott, D.B. (1983).** *Phialophora zeicola* sp. nov. and its role in the root rot-stalk rot complex of maize. *Transactions of the British Mycological Society* **81**: 247-262.
- Dennis, R.W.G., Spooner, B.M. (1992).** The fungi of North Hoy, Orkney-I. *Persoonia* **14**: 493-507.
- Deverall, B.J., Wong, P.T.W., McLeod, S. (1979).** Failure to implicate antifungal substances in cross-protection of wheat against take-all. *Transactions of the British Mycological Society* **72**: 233-236.
- Dori, S., Solel, Z., Barash, I. (1995).** Cell wall-degrading enzymes produced by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *in vitro* and *in vivo*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **46**: 189-198.
- Duffi, B.K., Weller, D.M. (1995).** Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. to suppress take-all of wheat. *Plant Disease* **79**: 907-911.
- Edens, W.A., Goins, T.Q., Dooley, D., Henson, J.M. (1999).** Purification and characterization of a secreted laccase of *G. graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3071-3074.
- Elliott, M.L. (1991).** Determination of an etiological agent of bermudagrass decline. *Phytopathology* **81**: 1380-1384.
- Elliott, M.L., Hagan, A.K., Mullen, J.M. (1993).** Association of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* with a St. Augustinegrass root rot disease. *Plant Disease* **77**: 206-209.
- El-Nashaar, H.M., Moore, L.W., George, R.A. (1986).** ELISA quantification of initial infection of wheat by *G. graminis* var. *tritici* as moderated by biocontrol agents. *Phytopathology* **76**: 1319-1322.

- Epplen, J.T. (1988).** Simple repeated GATCA sequences in animal genomes: a critical reappraisal. *Journal of Heredity* **79**: 409-417.
- Epstein, L., Kaur, S., Goins, T., Kwon, Y.H., Henson, J.M. (1994).** Production of hyphopodia by wild-type and three transformants of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Mycologia* **86**: 72-81.
- Eriksson, O.E., Hawksworth, D.L. (1993).** Outline of the ascomycetes - 1993. *Systema Ascomycetum* **12**: 51-257.
- Fellows, H. (1928).** Some chemical and morphological phenomena attending infection of the wheat plant by *Ophiobolus graminis*. *Journal of Agricultural Research* **37**: 647-661.
- Felsenstein, J. (1993).** PHYLIP (phylogeny interference package), 3.5c edn. University of Washington, Seattle.
- Fouly, H.M., Wilkinson, H.T., Domier, L.L. (1996).** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of *Gaeumannomyces* species. *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 703-710.
- Fouly, H.M., Wilkinson, H.T., Chen, W. (1997).** Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. *Mycologia* **89**: 590-597.
- Fouly, H.M., Wilkinson, H.T. (2000a).** A group I intron in the nuclear small subunit ribosomal DNA of *Gaeumannomyces graminis*. *Current Microbiology* **40**: 291-269.
- Fouly, H.M., Wilkinson, H.T. (2000b).** Detection of *Gaeumannomyces graminis* varieties using polymerase chain reaction with variety-specific primers. *Plant Disease* **84**: 947-951.
- Fowell, R.J., Cook, R.J., Heim, M.N., Moore, D.L. (1991).** Economic significance of take-all on winter wheat in the Pacific Northwest USA. *Crop Protection* **10**: 391-395.
- Fox, R.T.V. (1993).** Immunological techniques for identification. In: Fox, R.T.V. (ed) *Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology*. CAB International, Wallingford, pp. 129-151.
- Frederick, B., Caesar-Ton That, T.C., Wheeler, M.H., Sheehan, K.B., Edens, W.A., Henson, J.M. (1999).** Isolation and characterization of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* melanin mutants. *Mycological Research* **103**: 99-110.
- Garber, R.C., Turgeon, B.G., Selker, E.U., Yoder, O.C. (1988).** Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Current Genetics* **14**: 573-582.
- Gardes, M., White, T.J., Fortin, J.A., Bruns, T.D., Taylor, J.W. (1991).** Identification of indigenous and induced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* **69**: 180-189.
- Garrett, S.D. (1934).** Factors affecting the severity of take-all. I. The importance of soil microorganisms. *Journal of the Department of Agriculture of Western Australia* **37**: 664-674.
- Garrett, S.D. (1981).** Introduction. In: Asher, M.J.C. and Shipton, P.J. (eds) *Biology and control of take-all*. Academic Press, London, pp. 1-11.

- Goodwin, P.H., Hsiang, T., Xue, B.G., Liu, H.W. (1995).** Differentiation of *Gaeumannomyces graminis* from other turfgrass fungi by amplification with primers from ribosomal internal transcribed spacers. *Plant Pathology* **44**: 384-391.
- Grajal-Martin, M.J., Simon, C.J., Muehlbauer, F.J. (1993).** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi*. *Phytopathology* **83**: 612-614.
- Groppe, K., Boller, T. (1997).** PCR assay based on a microsatellite-containing locus for detection and quantification of *Epichloe* endophytes in grass tissue. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1543-1550.
- Gutteridge, R.J., Slope, D.B. (1978).** Effect of inoculating soils with *Phialophora radicola* var. *graminicola* on take-all disease of wheat. *Plant Pathology* **27**: 131-135.
- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. (1992).** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**: 55-63.
- Hassan, A.K., Schulz, C., Sacristan, M.D., Wöstemeyer, J. (1991).** Biochemical and molecular tools for the differentiation of aggressive and non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen, *Phoma lingam*. *Journal of Phytopathology* **131**: 120-136.
- Heim, M., Folwell, R.J., Cook, R.J., Kirpes, D.J. (1986).** Economic benefits and costs of biological control of take-all to the Pacific Northwest wheat industry. *Research Bulletin* 0988, Agricultural Research Center, College of agriculture and home economics, Washington State University, Pullman, 15 pp.
- Henson, J.M. (1989).** DNA probe for identification of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 284-288.
- Henson, J.M. (1992).** DNA hybridization and polymerase chain reaction (PCR) tests for the identification of *Gaeumannomyces*, *Phialophora* and *Magnaporthe* isolates. *Mycological Research* **96**: 629-636.
- Henson, J.M., French, R. (1993).** The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* **31**: 81-109.
- Henson, J.M., Goins, T., Grey, W., Mathre, D.E., Elliott, M.L. (1993).** Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil. *Molecular Plant Pathology* **83**: 283-287.
- Henson, J.M., Butler, M.J., Day, A.W. (1999):** The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 447-471.
- Herdina, H.P., Roget, D.K. (2000).** Prediction of take-all disease risk in field soils using a rapid and quantitative DNA soil assay. *Plant and Soil* **227**: 87-98.
- Hering, O. (1993).** Rassendifferenzierung bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* mittels RAPD-PCR (Abstract). *Phytomedizin* **23**: 51-52.
- Hering, O., Nirenberg, H.I. (1995).** Differentiation of *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato and related species by RAPD PCR. *Mycopathologia* **129**: 159-164.

- Holden, J. (1974).** The biology of *Phialophora radicola*, an avirulent root parasite of grasses and cereals. PhD Thesis, University of Cambridge.
- Holden, J. (1976).** Infection of wheat seminal roots by varieties of *Phialophora radicola* and *Gaeumannomyces graminis*. *Soil Biology and Biochemistry* **8**: 109-119.
- Holden, M., Ashby, M. (1978).** Polygalacturonase production in liquid culture by isolates of *Gaeumannomyces graminis* and *Phialophora*-like fungi from cereal roots. *Transactions of the British Mycological Society* **71**: 499-501.
- Holden, M., Ashby, M. (1981).** Growth on oat seedling agar of some isolates of *Gaeumannomyces graminis* and some *Phialophora* species from cereal roots. *Transactions of the British Mycological Society* **77**: 543-547.
- Holland, A.A., Fulcher, R.G. (1971).** A study of wheat roots infected with *Ophiobolus graminis* (Sacc.) using fluorescence and electron microscopy. *Australian Journal of Biological Science* **24**: 819-823.
- Hollins, T.W., Scott, P.R. (1990).** Pathogenicity of *Gaeumannomyces graminis* isolates to wheat and rye seedlings. *Plant Pathology* **39**: 269-273.
- Hornby, D., Slope, D.B., Gutteridge, R.J., Sivanesan, A. (1977).** *Gaeumannomyces cylindrosporus*, a new ascomycete from cereal roots. *Transactions of the British Mycological Society* **69**: 21-25.
- Hornby, D. (1981).** Inoculum. In: Asher, M.J.C. and Shipton, P.J. (eds) *Biology and Control of Take-all*. Academic Press, London, pp. 271-293.
- Hornby, D. (1983).** Suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology* **21**: 65-85.
- Hornby, D., Gutteridge, R., Parsonage, R. (1990).** *Phialophora* spp. in relation to take-all disease of cereals. *Institute of Arable Crops Research Report for 1990*, pp. 73-74.
- Hornby, D., Bateman, G.L. (1991).** Take-all Disease of Cereals. Home-Grown Cereals Authority, London.
- Hornby, D. (1998).** *Take-all disease of cereals. A regional perspective*. Cambridge University Press, Cambridge
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H., Money, N.P. (1991).** Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **88**: 11281-11284.
- Huber, D.M., McCay-Buis, T.S. (1993).** A multiple component analysis of the take-all disease of cereals. *Plant Disease* **77**: 437-447.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985).** Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* **314**: 67-73.
- Juhnke, M.D., Mathre, D.E., Sands, D.C. (1984).** A selective medium for *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Plant Disease* **68**: 233-236.
- Kelly, C.P., Osborn, A.E., Caten, C.E. (1997).** The genetics of *Gaeumannomyces graminis* with particular reference to pigment production and pathogenicity. Fungal Genet. Conf., 19th, Asilomar, CA (Abstract).

- Kimura, M. (1980)** . A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Krausz, J.P. (1991)**. Take-all patch suspected in Texas warm-season turf. *Southern Turf Management* **2**: 12.
- Kröcher, C. (1999)**. Getreide bald gegen Schwarzbeinigkeit beizen. *Top agrar. Das Magazin für moderne Landwirtschaft* **1** (Sonderdruck)
- Landschoot, P.J., Jackson, N. (1989)**. *Gaeumannomyces incrustans* sp. nov., a root infecting hyphopodiate fungus from grass roots in the United States. *Mycological Research* **93**: 55-58.
- Landschoot, P.J. (1993)**. Taxonomy and biology of ectotrophic root-infecting fungi associated with patch diseases of turfgrasses. In: Clarke, B.B. and Gould, A.B. (eds) *Turfgrass Patch Diseases caused by Ectotrophic Root-infecting Fungi*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 41-71.
- Landschoot, P.J., Hoyland, B.F., Clarke, B.B. (1993)**. Variation in cultural characteristics and pathogenicity within a local population of *Magnaporthe poae*. *International Turfgrass Society Research Journal* **7**: 335-341.
- Lee, S.B., Taylor, J.W. (1990)**. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 282-287.
- Lee, S.B., Taylor, J.W. (1992)**. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 636-653.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W., Kuhls, K., Börner, T. (1992)**: Characterization of filamentous fungi and yeasts by DNA fingerprinting and random amplified polymorphic DNA. *Belgian Journal of Botany* **125**: 226-233.
- Martyniuk, S., Myskow, W. (1984)**. Control of the take-all fungus by *Phialophora* sp. (lobed hyphopodia) in microplot experiments with wheat. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **139**: 575-579.
- Martyniuk, S. (1988)**. Pectolytic enzymes activity and pathogenicity of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and related *Phialophora*-like fungi. *Plant and Soil* **107**: 19-23.
- Mathre, D.E., Cook, R.J., Callan, N.W. (1999)**. From discovery to use: traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Disease* **11**: 972-983.
- McAlpine, D. (1904)**. Take-all and white-heads in wheat. (*Ophiobolus graminis* Sacc.). *Journal of the Department of Agriculture, Victoria* **2**: 410-426.
- McCarty, L.B., Lucas, L.T. (1989)**. *Gaeumannomyces graminis* associated with spring dead spot of bermudagrass in the Southeastern United States. *Plant Disease* **73**: 659-661.
- McDonald, B.A. (1997)**. Population genetics of soilborne fungal plant pathogens: The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* **87**: 448-453.
- McFadden, J.J.P., Buck, K.W. (1983)**. Sequence complexities of the nuclear and mitochondrial genomes of the take-all fungus, *G. graminis* var. *tritici*. *Journal of General Microbiology* **129**: 3515-3517.

- Meyer, W., Lieckfeldt, E., Börner, T. (1991).** DNA-Fingerprinting. Charakterisierung, Differenzierung und Identifizierung von Pilzen. *BioTec Gentechnologie* **3**: 37-41.
- Mielke, H. (1983).** Schwarzbeinigkeit bei Getreide. Information zum Integrierten Pflanzenschutz. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **35**: 143.
- Money, N.P., Howard, R.J. (1997).** Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genetics and Biology* **20**: 217-227.
- Money, N.P., Caesar-Ton That, T.C., Frederick, B., Henson, J.M. (1998).** Melanin synthesis is associated with changes in hyphopodial turgor, permeability, and wall rigidity in *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Fungal Genetics and Biology* **24**: 240-251.
- Monsanto Take-all News**, Monsanto (Deutschland GmbH), www.schwarzbeinigkeit.de
- Moukhamedov, R., Hu, X., Nazar, N., Robb, J. (1994).** Use of polymerase chain reaction amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* **84**: 256-259.
- Müller, E., Loeffler, W. (1992).** Mycologie. Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Musker, R. (1994).** Genetics and population studies of *G. graminis*. PhD Thesis, University of Birmingham.
- Naiki, T., Cook, R.J. (1983).** Factors in loss of pathogenicity in *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* to cause take-all. *Phytopathology* **73**: 1652-1656.
- Nannfeldt, J.A. (1932).** Studien über die Morphologie und Systematik der nicht-lichenisierten inoperculaten Discomyceten. *Nova Acta Regiae societatis Scientiarum Upsaliensis ser.* **8**: 368 pp.
- Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D., Robb, J. (1991):** Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**: 1-11.
- Nilsson, H.E. (1972).** The occurrence of lobed hyphopodia on an isolate of the take-all fungus, '*Ophiobolus graminis* Sacc.', on wheat in Sweden. *Swedish Journal of Agricultural Research* **2**: 105-118.
- Nirenberg, H.I. (1976).** Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitteilungen BBA (Berlin-Dahlem)* **169**: 1-117.
- Nirenberg, H.I. (1990).** Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. *Studies in Mycology* **32**: 91-101.
- O'Dell, M., Flavell, R.B., Hollins, T.W. (1992).** The classification of isolates of *Gaeumannomyces graminis* from wheat, rye and oats using restriction fragment length polymorphisms in families of repeated DNA sequences. *Plant Pathology* **41**: 554-562.
- O'Donnell, K.L. (1992).** Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Giberella pulicaris*). *Current Genetics* **22**: 213-220.
- Oerke, E.C., Dehne, H.W., Schönbeck, F., Weber, A. (1994).** Crop production and crop protection. Elsevier, Amsterdam.

- Ophel-Keller, K., Engel, B., Heinrich, K. (1995).** Specific detection of *Gaeumannomyces graminis* in soil using polymerase chain reaction. *Mycological Research* **99**: 1385-1390.
- Osbourn, A.E., Clarke, B.R., Dow, J.M., Daniels, M.J. (1991).** Partial characterization of avenacinase from *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **38**: 301-312.
- Osbourn, A., Bowyer, P., Bryan, G., Lunness, P., Clarke, B., Daniels, M. (1994).** Detoxification of plant saponins by fungi. In: Daniels, M.J., Downie, J.A. and Osbourn, A.E. (eds) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 215-221.
- Ou, S.H. (1972).** Rice diseases. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Parbery, D.G., Emmett, R.W. (1977).** Hypotheses regarding appressoria, spores, survival and phylogeny in parasitic fungi. *Review of Mycology* **41**: 419-447.
- Paveley, N.D., Yarham, D.J., Clare, R., Capper, A.L. (1992).** Take-all disease of winter wheat – field experience in the use of biological control. In: Jenson, D.F., Hockenhull, J. and Fokkema, N.J. (eds) *New Approaches in Biological control of soil-borne diseases*. IOBC/WPRS and EFPP, Copenhagen, pp. 166-168.
- Pearson, V. (1974).** Virulence and cellulolytic enzyme activity of isolates of *Gaeumannomyces graminis*. *Transactions of the British Mycological Society* **63**: 199-202.
- Pearson, W.R., Lipman, D.J. (1988).** Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**: 2444-2448.
- Prillieux, E.E., Delacroix, G. (1890).** La maladie du pied du blé causée par l'*Ophiobolus graminis*, Sacc. *Bulletin de la Société Mycologique de France* **6**: 110-113.
- Rovira, A.D., Wildermuth, G.B. (1981).** The nature and mechanisms of suppression. In: Asher, M.J.C. and Shipton, P.J. (eds) *Biology and Control of Take-all*. Academic Press, London, pp. 385-416.
- Roy, K.W., Abney, T.S., Huber, D.M. (1976).** Isolation of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* from soybeans in the Midwest. *Proceedings of American Phytopathology Society* **3**: 284.
- Roy, K.W., Abney, T.S., Huber, D.M., Keeler, R. (1982).** Isolation of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* from soybeans in the Midwest. *Plant Disease* **66**: 822-825.
- Ryder, M.H., Rovira, A.D. (1993).** Biological control of take-all of glasshouse-grown wheat using strains of *Pseudomonas corrugata* isolated from wheat field soil. *Soil Biology and Biochemistry* **25**: 311-320.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A., Arnheim, N. (1985).** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74**: 5463-5467.
- Schäfer, R., Zischler, H., Birsner, U., Becker, A., Epplen, J.T. (1988).** Optimized oligonucleotide probes for DNA fingerprinting. *Electrophoresis* **9**: 369-374.

- Schäfer, C., Wöstemeyer, J. (1992). Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). *Journal of Phytopathology* **136**: 124-136.
- Schesser, K., Luder, A., Henson, J.M. (1991). Use of polymerase chain reaction to detect the take-all fungus, *G. graminis*, in infected wheat plants. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 553-556.
- Schleier, S., Voigt, K., Wöstemeyer, J. (1997). RAPD-based molecular diagnosis of mixed fungal infections on oilseed rape (*Brassica napus*): Evidence for genus- and species- specific sequences in the fungal genomes. *Journal of Phytopathology* **145**: 81-87.
- Schönian, G., Meusel, O., Tietz, H.-J., Meyer, W., Gräser, Y., Presber, W., Mitchel, T.G. (1993). Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. *Mycoses* **36**: 171-179.
- Schots, A., Dewey, F.M., Oliver, R. (1994). Modern assays for plant pathogenic fungi: Identification, detection and quantification. CAB International, Wallingford.
- Scott, P.R. (1970). *Phialophora radiculicola*, an avirulent parasite of wheat and grass roots. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 163-167.
- Scott, P.R. (1989). *G. graminis* var. *graminis* on gramineae in South Africa. *Phytophylactica* **21**: 251-254.
- Sivasithamparam, K., Parker, C.A. (1981). Physiology and nutrition in culture. In: Asher, M.J.C. and Shipton, P.J. (eds) *Biology and Control of Take-all*. Academic Press, London, pp. 125-150.
- Sivasithamparam, K. (1998). Root cortex - the final frontier for the biocontrol of root-rot with fungal antagonists: A case study on a sterile red fungus. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 439-452.
- Skou, J.P. (1981). Morphology and cytology of the infection process. In: Asher, M.J.C. and Shipton, P.J. (eds) *Biology and Control of Take-all*. Academic Press, London, pp. 175-197.
- Slope, D.B., Salt, G.A., Broom, E.W., Gutteridge, R.G. (1978). Occurrence of *Phialophora radiculicola* var. *graminicola* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on roots of wheat in field crops. *Annals of Applied Biology* **88**: 239-246.
- Smiley, R.W., Fowler, M.C. (1984). *Leptosphaeria korrae* and *Phialophora graminicola* associated with *Fusarium* blight syndrome of *Poa pratensis* in New York. *Plant Disease* **68**: 440-442.
- Smiley, R.W., Fowler, M.C., Reynolds, K.L. (1986). Temperature effects on take-all of cereals caused by *Phialophora graminicola* and *Gaeumannomyces graminis*. *Phytopathology* **76**: 923-931.
- Smiley, R.W., Dernoeden, P.H., Clarke, B.B. (1992). *Compendium of turfgrass diseases*, 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 98 pp.
- Soon, Y., Clayton, G., Clarke, P. (1997). Content and uptake of phosphorus and copper by spring wheat: effect of environment, genotype, and management. *Journal of Plant Nutrition* **20**: 925-937.

- Southerton, S.G., Osbourn, A.E., Dow, J.M., Daniels, M.J. (1993).** Two xylanases from *Gaeumannomyces graminis* with identical N-terminal amino acid sequence. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**: 97-107.
- Speakman, J.B., Lewis, B.G. (1978).** Limitation of *Gaeumannomyces graminis* by wheat root responses to *Phialophora radicicola*. *New Phytologist* **80**: 373-380.
- Speakman, J.B., Garrod, B., Lewis, B.G. (1978).** Response of grass and maize roots to invasion by *Gaeumannomyces graminis* and *Phialophora radicicola*. *Transactions of the British Mycological Society* **70**: 325-328.
- Speakman, J.B. (1984).** Control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat by isolates of the *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*/*Phialophora* sp. (lobed hyphopodia) complex under field conditions. *Phytopathologische Zeitschrift* **109**: 188-191.
- Stephens, P.M., Davoren, C.W., Ryder, M.H., Doube, B.M. (1994).** Enhanced growth of take-all affected plants associated with *Pseudomonas corrugata* 2140R and the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae). In: Ryder, M.H., Stephens, P.M. and Bowen, G.D. (eds) *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. CSIRO Division of soils, Glen Osmond, South Australia, pp. 57-63.
- Tan, M.K., Wong, P.T.W., Holley, M.P. (1994).** Characterization of nuclear ribosomal DNA (rDNA) in *Gaeumannomyces graminis* and correlation of rDNA variation with *G. graminis* varieties. *Mycological Research* **98**: 553-561.
- Tan, M.K., Wong, P.T.W. (1996).** Group I introns in 26S rRNA genes of *Gaeumannomyces graminis* as possible indicators of host specificity of *G. graminis* varieties. *Mycological Research* **100**: 337-342.
- Tan, M.K. (1997).** Origin and inheritance of group I introns in 26S rRNA genes of *Gaeumannomyces graminis*. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 637-645.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.
- Tivoli, B., Lemaire, J.-M., Jouan, B. (1974).** Premunition du ble contre *Ophiobolus graminis* Sacc. par des souches peu agressives du meme parasite. *Annales de Phytopathologie* **6** : 395-406.
- Trinci, A.P. (1979).** The duplication cycle and branching in fungi. In: Burnett, J.H. and Trinci, A.P.J. (eds), *Fungal walls and hyphal growth*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 315-358.
- Tullis, E.C., Adair, C.R. (1947).** Black sheath rot of rice (*Ophiobolus oryzinus*) caused lodging of rice in Arkansas and Texas in 1947. *Plant Disease Reporter* **31**: 468.
- Turbeville, J.M., Pfeifer, D.M., Field, K.G., Raff, R.A. (1991).** The phylogenetic status of arthropods as inferred from 18S rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*: **8**: 669-686.
- Turner, E.M. (1961).** An enzymic basis for pathogenic specificity in *Ophiobolus graminis*. *Journal of Experimental Botany* **12**: 169-175.

- Ulrich, K., Augustin, C., Werner, A. (2000). Identification and characterization of a new group of root-colonizing fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex. *New Phytologist* **145**: 127-135.
- Vassert, G., Georges, M., Monsieur, R., Brocas, H., Laguarre, A.S., Cristophe, D. (1987). A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* **235**: 683-684.
- Walker, J. (1972). Type studies on *Gaeumannomyces graminis* and related fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **58**: 427-457.
- Walker, J. (1980). *Gaeumannomyces*, *Linocarpon*, *Ophiobolus* and several other genera of scolecospored ascomycetes and *Phialophora* conidial states, with a note on hyphopodia. *Mycotaxon* **11**: 1-129.
- Walker, J. (1981). Taxonomy of take-all fungi and related genera and species. In: Asher, M.J.C. and Shipton, P.J.(eds) *Biology and Control of Take-all*. Academic Press, London, pp. 15-74.
- Ward, E., Gray, R.M. (1992). Generation of a ribosomal DNA probe by PCR and its use in identification of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex. *Plant Pathology* **41**: 730-736.
- Ward, E., Akrofi, A.Y. (1994). Identification of fungi in the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycological Research* **98**: 219-224.
- Ward, E., Bateman, G.L. (1994). Identification of fungi in the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex associated with take-all of cereals and grasses using DNA probes. In: Schots, A., Dewey, F.M. and Oliver, R.P. (eds) *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification*. CAB International, Wallingford, pp. 127-134.
- Ward, E. (1995). Improved polymerase chain reaction (PCR) detection of *Gaeumannomyces graminis* including a safeguard against false negatives. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 561-566.
- Ward, E., Bateman, G.L. (1999). Comparison of *Gaeumannomyces*- and *Phialophora*-like fungal pathogens from maize and other plants using DNA methods. *New Phytologist* **141**: 323-331.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**: 7213-7218.
- Weste, G. (1970). Extracellular enzyme production by various isolates of *Ophiobolus graminis* and *O. graminis* var. *avenae*. Part 1. Enzymes produced in culture. *Phytopathologische Zeitschrift* **67**: 189-204.
- Weste, G. (1972). The process of root infection by *Ophiobolus graminis*. *Transactions of the British Mycological Society* **59**: 133-147.
- Wetzel III, H.C., Dernoeden, P.H., Millner, P.D. (1996). Identification of darkly pigmented fungi associated with turfgrass roots by mycelial characteristics and RAPD-PCR. *Plant Disease* **80**: 359-364.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 315-322.
- Whitney, N.G. (1990). Black sheath rot of rice in Texas. In: *Proceedings of the 23rd Rice Technical Working Group*. The Texas Agricultural Experimental station: College Station, Texas. p. 76

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1991).** Genetic analysis with RAPD-markers. In: Bennet, J.W. and Lasure, L.L. (eds) *More Gene manipulations in fungi*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 431-439.
- Wöstemeyer, J., Schäfer, C., Kellner, M., Weisfeld, M. (1991).** DNA polymorphisms detected by random primer dependent PCR as a powerful tool for molecular diagnostics of plant pathogenic fungi. *Advances in Molecular Genetics* **5**: 227-240.
- Wong, P.T.W. (1975).** Cross-protection against the wheat and oat take-all fungi by *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Soil Biology and Biochemistry* **7**: 189-194.
- Wong, P.T.W., Southwell, R.J. (1980).** Field control of take-all of wheat by avirulent fungi. *Annals of Applied Biology* **94**: 41-49.
- Wong, P.T.W. (1981).** Biological control by cross-protection. In: Asher, M.J.C. and Shipton, P.J. (eds) *Biology and Control of Take-all*. Academic Press, London, pp. 417-431.
- Wong, P.T.W. (1983).** Effect of osmotic potential on the growth of *Gaeumannomyces graminis* and *Phialophora* spp. *Annals of Applied Biology* **102**: 67-78.
- Wong, P.T.W. (1994).** Biocontrol of wheat take-all in the field using soil bacteria and fungi. In: Ryder, M.H., Stephens, P.M. and Bowen, G.D. (eds) *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. CSIRO Division of Soils, Glen Osmond, South Australia, pp. 24-28.
- Wong, P.T.W., Mead, J.A., Holley, M.P. (1996).** Enhanced field control of wheat take-all using cold tolerant isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* and *Phialophora* sp. (lobed hyphopodia). *Plant Pathology* **45**: 285-293.
- Wong, P.T.W., Tan, M.K., Beehag, G.W. (2000).** Confirmation of take-all patch disease in tiftwarf hybrid couch grass (bermudagrass) by morphological and DNA methods. *Australasian Plant Pathology* **29**: 19-23.
- Yao, J.M., Wang, Y.C., Zhu, Y.G. (1992).** A new variety of the pathogen of maize take-all. *Acta Mycologica Sinica* **11**: 99-104.
- Yao, J.M. (1993).** The discovery and classification of the corn take-all pathogen in China. In: *Abstracts of the 6th International Congress of Plant Pathology*. National Research Council Canada, Ottawa, p. 132.
- Yarden, O., Russo, V.E.A. (1995).** Changes in chitin deposition accompany runner hypha branching of *Gaeumannomyces graminis* in culture. *Mycological Research* **100**: 444-448.
- Yates, J.S. (1986).** Ascospore length of Australian isolates of *Gaeumannomyces graminis*. *Transactions of the British Mycological Society* **86**: 131-136.

-
- Yates, J.S., Parker, C.A. (1986).** Rate of natural senescence of seminal root cortical cells of wheat, barley and oats, with reference to invasions by *Gaeumannomyces graminis*. *Transactions of the British Mycological Society* **86**: 683-685.
- Yates, J.S., Fang, C.S., Parker, C.A. (1986).** Distribution and importance of oat attacking of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in Western Australia. *Transactions of the British Mycological Society* **86**: 145-152.

7. Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
CBS	“Centraalbureau Voor Schimmelcultures”, Baarn, Niederlande
CTAB	Cetyl-Trimethyl-Ammoniumbromid
D	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>G.</i>	<i>Gaeumannomyces</i>
GB	Großbritannien
G/P-Komplex	<i>Gaeumannomyces/Phialophora</i> -Komplex
IGS	„intergenic spacer“
ITS	„internal transcribed spacer“
kb	Kilobasenpaare
<i>M.</i>	<i>Magnaporthe</i>
M. Oderland	Märkisch Oderland
mtDNA	mitochondriale DNA
NL	Niederlande
PCR	„polymerase chain reaction“
<i>P.</i>	<i>Phialophora</i>
RAPD	„random amplified polymorphic DNA“
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Nukleoside der DNA:	
A	Adenosin
G	Guanosin
C	Cytidin
T	Thymidin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich durch zahlreiche Diskussionen und Ratschläge bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Vor allem danke ich Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer für die Betreuung der Arbeit und die vielen Hinweise und Tips beim Anfertigen der Dissertationsschrift.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Claudia Augustin für die Überlassung des Themas, die Formulierung des DFG-Antrages sowie für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei theoretischen und praktischen Fragen.

Dr. Armin Werner danke ich für das ständige Interesse am Fortgang der Arbeit und die fachlichen Diskussionen und Anregungen.

Für die tatkräftige Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor danke ich Angelika Weirauch, Rita Biewald, Edeltraud Zepernick, Christa Bäsell und Sigrid Mittag.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Landnutzungssysteme und Landschaftsökologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch meinem Mann, Dr. Andreas Ulrich, für die Einweisung in die Sequenzierungstechnik und die Hilfe beim Umgang mit den Computerprogrammen für die Auswertung der Sequenzdaten.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.