

**Entwicklung einer PCR basierten Methode
zur Quantifizierung der Erreger
des Echten Gurkenmehltaus,
Podosphaera xanthii und *Golovinomyces orontii*,
in Mischinfektionen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Gartenbauwissenschaften
- Dr. rer. hort. -
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Ing. agr. Alexandra Wichura
geboren am 12.12.1972 in Kassel

2007

Diese Arbeit wurde angefertigt am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Referent: **Prof. Dr. Bernhard Hau**
Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz,
Naturwissenschaftliche Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover

Korreferent: **Prof. Dr. Petr Karlovsky**
Fachgebiet Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz,
Department für Nutzpflanzenwissenschaften,
Fakultät für Agrarwissenschaften der
Georg-August-Universität Göttingen
Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

„... Arthur fühlte sich glücklich. Er war irrsinnig erfreut darüber, dass der Tag endlich mal so ganz nach Plan verlief. Erst vor zwanzig Minuten hatte er beschlossen verrückt zu werden, und nun jagte er bereits ein Chesterfield-Sofa über die Felder der prähistorischen Erde. Das Sofa hopste mal hierhin, mal dorthin und schien gleichzeitig so fest wie die Bäume zu sein, an denen es vorüberschwebte, und so nebelhaft wie ein wallender Traum, wenn es wie ein Gespenst durch sie hindurchwehte. Ford und Arthur trampelten planlos hinter ihm her, aber es wich aus und schlug Haken, als folge es seiner eigenen komplizierten mathematischen Topografie, und das tat es auch. Immer noch rannten sie hinterher, immer noch tanzte und wirbelte es dahin, und plötzlich kehrte es um und duckte sich, als schösse es über den Rand eines Katastrophendiagramms hinweg, und da saßen sie auch schon so gut wie auf ihm. Mit einem Sprung und einem Schrei hüpfen sie drauf, ...“

aus

Douglas Adams

Das Leben, das Universum, und der ganze Rest

DANKSAGUNG

Vielen Dank

Prof. Dr. Bernhard Hau, für die Gewährung der Freiräume beim Bearbeiten des Themas, die Aufgeschlossenheit neuen Ideen gegenüber, die immerwährende Bereitschaft zu Diskussionen und das große in mich gesetzte Vertrauen.

Prof. Dr. Petr Karlovsky, für das gezeigte große Interesse an dieser Arbeit, die hilfreichen Anregungen und Kommentare, sowie das Ermöglichen der Datenüberprüfung mit der Real-Time PCR.

Prof. Dr. Edgar Maiß, für die offene Tür und die wertvollen Tipps.

Dr. Christof Dietrich, für die Einweisung in die Laborarbeit und die Gesprächsbereitschaft auch zu später Stunde. Ich bedanke mich für deine Geduld, deine Motivation und unglaubliche Unterstützung.

Dr. Jürgen Serth, für die Bereitschaft mir das Prinzip der kompetitiven PCR näher zu bringen.

Dr. Gisela Grunewaldt-Stöcker, für die Hilfestellungen und die Unterweisung in Mikroskopier- und Diagnosetechniken von Pilzen.

Dr. Volker Garbe, für die einjährige Beileitung während meiner Promotionszeit im Rahmen des Mentoringprogramms der Leibniz Universität Hannover.

Dipl.-Ing. agr. Lars Burmeister, Dr. Andrea Denecke, PhD Turoop Losenge und MSc. Zelalem Mersha, meinen Arbeitskollegen aus der AG Epidemiologie, die zu einer schönen Arbeitsatmosphäre beitrugen und ohne die alles nur halb so schön gewesen wäre. **Dipl. Biol. Christiane Pech**, die das Büro als „Nicht-Epidemiologin“ bereichert hat, sowie **MSc. Buyung Ratna-Hadi** und **BSc. Philipp Pohlmann**, „meine“ Master- und Bachelorstudenten, die mein Doktorandendasein um Vieles verschönert haben.

MSc. Rosana Blawid, Dipl.-Ing. agr. Ilona Möller und Dipl. Biol. hum. Angelika Waltermann, sowie allen Mitgliedern der AG Pflanzenvirologie, für die nette Zusammenarbeit im Labor und die vielen kleinen Labortipps und -tricks.

Natalie Röder und **Ute Meisel**, für die technische Unterstützung und **Jutta Zimmermann**, für die Übernahme so mancher Transformation.

Joachim Seelbinder und **Willi Arndt**, für die Regelung des Gewächshausbereiches, sowie die Hilfe beim Aufbau der Versuchsapparatur und allen **Institutsmitgliedern**, die den Arbeitsalltag so vielfältig und erlebenswert gestaltet haben.

Patricia Bartoschek aus der Arbeitsgruppe von Prof. Karlovsky, für die Durchführung der Real-Time PCR.

Merret und **Hauke Wichura**, für eure unglaubliche Geduld, euer Lob, euren Zuspruch und die vielen kleinen selbst gemachten Glücksbringer. Und dafür, dass ihr mich immer mal wieder darauf aufmerksam gemacht habt, dass es neben einer Doktorarbeit auch andere wichtige Dinge gibt.

Annegret Wichura und **Helmut Schulz, Monika Dietrich-Ostertag** und **Alfons Dietrich**, und dem Rest meiner Familie für das lebhaftes Interesse an meiner Arbeit, das große Verständnis und die tatkräftige Unterstützung in turbulenten Zeiten.

ZUSAMMENFASSUNG

Podosphaera xanthii und *Golovinomyces orontii* sind endemische Erreger des Echten Mehltaus an Cucurbitaceae in Deutschland, die auch gemeinsam auf demselben Wirt/Blatt auftreten können. Die Befallsstärke der beiden Pilze wird durch unterschiedliche Klimaoptima beeinflusst, aber vermutlich auch durch weitere Faktoren. Um diese Faktoren benennen zu können, müssen die Dynamiken beider Pilze unter anderem auch in Mischinfektionen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine quantitative kompetitive PCR entwickelt, durch die ein spezifischer Nachweis und eine Quantifizierung der Pathogene auf DNA-Ebene möglich ist. Mit einer getrennten Analyse von Myzel und Konidien sollten die epidemiologisch relevanten Parameter Befallsstärke und Sporulation erfasst werden.

Für die Kultivierung verschiedener in Hannover gesammelter Isolate wurde eine *in vitro* Erhaltungsmethode modifiziert und etabliert. Die Gattungen wurden auf Grund der Konidienmorphologie und mit PCR-RFLP bestimmt. Eine Sequenzanalyse der rDNA-ITS-Region zeigte genug Heterogenität zwischen und Homogenität innerhalb der beiden Pilzarten, so dass diese Region zur Ableitung spezifischer Primer herangezogen werden konnte. Primerpaare für die spezifische Amplifikation jedes Pilzes wurden entwickelt und die PCR-Bedingungen optimiert. Die Spezifität der Primer wurde gegen genomische DNA von *Cucumis sativus* und verschiedener Pilztaxa überprüft.

Für die Quantifizierung wurden heterologe Kompetitoren entwickelt. Da sich die Amplifikationseffizienzen zur Zielsequenz unterschieden und nicht angeglichen werden konnten, waren sie zur Quantifizierung allerdings nicht geeignet. Die Quantifizierung jedes Pilzes gelang durch die Verwendung eines homologen Kompetitors unter Einbeziehung der gebildeten Heteroduplizese. Beide Kompetitorfragmente wurden in ein Plasmid kloniert. Auf diese Weise konnte eine genaue vergleichende Quantifizierung der beiden Pilze erfolgen. Das Detektionslimit des Essays lag für beide Pilze bei 10 pg genomischer DNA.

Zur experimentellen Überprüfung der entwickelten Methode wurde ein Klimakammerversuch durchgeführt, bei dem die Pilze jeweils getrennt und in einer Mischung auf Gurkenpflanzen inokuliert wurden. Die getrennte Analyse von Sporulation und Befallsstärke gelang durch das Absaugen der Konidien. In den beiden Einzelinokulationsvarianten konnte unter den getesteten Bedingungen ein konstantes Verhältnis zwischen dem jeweiligem Pilz-DNA-Gehalt und der Befallsstärke ermittelt werden. Mittels dieses Faktors war es möglich, die Befallsstärke jedes Pilzes in der Mischvariante zu bestimmen. Es konnte keinerlei gegenseitige Beeinflussung der beiden

Pilze beim Koloniewachstum nachgewiesen werden. Unter Einbeziehung eines Korrekturfaktors für den unterschiedlichen DNA-Gehalt der beiden Pilze pro Befallsstärkeeinheit ist somit ein Rückschluss von dem quantifizierten Pilz-DNA-Gehalt auf die Befallsstärke des Pilzes in einer Mischinfektion möglich. Eine Quantifizierung der Konidien durch den direkten Einsatz der Konidien suspension in den PCR-Ansatz gelang nur für *G. orontii*. Die Konidien von *P. xanthii* enthielten Inhibitoren, die allerdings durch eine einfache Chelex-Extraktion entfernt werden konnten. Der Vergleich der Konidienmengen erfolgte relativ zueinander, da sich das Absaugverfahren für die Angabe der absoluten Konidienmenge als zu variabel erwies.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Normierung des Quantifizierungsergebnisses über die jeweilige Probenkonzentration keinen Vorteil in der Genauigkeit bringt, wenn sichergestellt werden kann, dass die DNA-Extraktion über alle Versuchsproben mit derselben Effizienz erfolgt. Ein durchgeführter Vergleich der quantitativen kompetitiven PCR-Methodik mit einem Real-Time PCR Essay mit externer Standardkurve zeigte eine hohe Korrelation zwischen den beiden Quantifizierungsstrategien. Die Real-Time PCR hatte hierbei eine erhöhte Sensitivität.

Schlagworte:

Echter Mehltau, Gurke, kompetitive PCR, Cucurbitaceae

ABSTRACT

Podosphaera xanthii and *Golovinomyces orontii* are endemic pathogens in Germany causing cucurbit powdery mildew, also in mixed infections. Their occurrence can be explained partly by their different climatic preferences, partly by other factors still to be elucidated. To detect such factors, the dynamics of both pathogens in mixed infections have to be investigated. The aim of this work was to develop a quantitative competitive PCR assay allowing the specific quantitative detection of each fungus in a mixed infection at the DNA level. To investigate the epidemiologically important parameters disease severity and sporulation, the mycelium on the leaf and the conidia should be analysed separately.

For the simultaneous maintenance of different isolates collected in Hannover, an *in vitro* culture method was adapted and established. The two genera could be distinguished by means of the morphology of their conidia and with PCR-RFLP. The analysis of the rDNA-ITS sequences revealed enough heterogeneity between the two species and enough homogeneity within one species to be suited for the development of species specific primer. Primer pairs for the specific amplification of each fungus were developed and PCR conditions were optimised. The primer pairs proved to discriminate against genomic DNA of *Cucumis sativus* and other fungi taxa.

For the quantification, heterologous competitor fragments were developed for each fungus. However they were not really useful, because of their different amplification efficiency to the target sequence that could not be adapted. Good quantification results could be achieved by using homologous competitors and calculating the target amount by means of the heteroduplex fraction. Both competitor fragments were cloned into the same plasmid, ensuring the comparability of the quantification results between the two pathogens. The detection limit for each pathogen was 10 pg genomic DNA.

The developed competitive PCR assay was tested in an artificial inoculation experiment in a climate chamber. Three variants were used, two variants with the single inoculation of each pathogen and one variant with a mixed inoculation. Sporulation and disease severity were assessed separately by sucking and collecting the conidia. A constant ratio between disease severity and analysed pathogen DNA content was found in both single inoculation variants. Based on these factors, disease severity of each pathogen could be calculated in the mixed infection. No mutual influence of the pathogens with respect to colony growth could be detected. It could be shown that it is possible to calculate disease severity out of the quantified pathogen DNA content after correcting for the different DNA content per

disease severity unit of both pathogens. Direct quantification of the untreated conidia suspension was possible for *G. orontii* only. To quantify *P. xanthii* conidia, existing inhibitors had to be removed by a simple chelex extraction. Due to the variability of the sucking method used, was only possible in relative terms.

In addition it could be shown that normalisation of the quantification results with the sample DNA concentration had no advantage when it could be ensured that DNA extraction efficiency was the same over all samples of the experiment. The results of the competitive PCR assay and of a real time PCR assay using an external standard curve were highly correlated. The real time PCR assay had a slightly higher sensitivity.

Keywords:

powdery mildew, cucumber, competitive PCR, Cucurbitaceae

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung	IV
Zusammenfassung	V
Abstract	VII
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis	XVI
Abkürzungsverzeichnis	XVIII
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURTEIL	4
2.1 Gurke (<i>Cucumis sativus</i> L.)	4
2.2 Echter Mehltau an Gurke	5
2.2.1 Taxonomie	5
2.2.2 Echte Mehltau-Arten an Cucurbitaceae in Deutschland und ihr Wirtspflanzenkreis	6
2.2.3 Unterscheidende Morphologie	8
2.2.4 Entwicklungszyklus der Echten Mehltau-Pilze	10
2.2.5 Entwicklungsfaktoren	12
2.2.5.1 Umweltfaktoren	12
2.2.5.2 Physiologie und genetische Prädispositionen der Wirte und der Erreger	14
2.2.6 Verbreitung in Europa	15
2.3 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	16
2.3.1 Das Prinzip der PCR	16
2.3.2 Quantitative PCR (qPCR)-Methoden	17
2.3.2.1 Methoden ohne Standard	19
2.3.2.2 Methoden mit externem Standard	19
2.3.2.3 Methoden mit internem Standard	20
2.3.3 Design von Kompetitoren	21
2.3.4 Durchführung einer kompetitiven qPCR	22
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Material	24
3.1.1 Geräte	24
3.1.2 Chemikalien	25
3.1.3 Datenbanken	27
3.1.4 Software	27
3.1.5 Sonstiges Material	27

3.1.6	Bakterienstamm zur Klonierung	27
3.1.7	Restriktionsenzyme	28
3.1.8	Enzyme und Nukleotide	28
3.1.9	Reaktionskits	29
3.1.10	DNA-Standards	30
3.1.11	Pflanzenmaterial	30
3.1.12	Verwendete Pilzisolat	30
3.1.13	Datenbanksequenzen	31
3.2	Anzucht von Pflanzenmaterial	31
3.3	Echte Mehltau-Erhaltung	32
3.3.1	Oberflächensterilisation von Gurkenkotyledonen	32
3.3.2	Monosporisolate	33
3.3.3	Überimpfung und Erhaltung der Echten Mehltau-Isolate	33
3.3.4	Herstellung von Inokulum	34
3.4	Oligonukleotidprimer	34
3.4.1	Planungskriterien für Oligonukleotidprimer	34
3.4.2	rDNA-ITS-Region	35
3.4.3	Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Primer	36
3.5	PCR-Verfahren	37
3.5.1	Allgemeine Hinweise zur Durchführung einer PCR	37
3.5.2	PCR-Komponenten	38
3.5.3	PCR-Mutagenese	38
3.5.4	Durchführung einer qPCR mit homologen Kompetitoren	39
3.5.5	Real-Time PCR	40
3.6	Klonierung	41
3.6.1	Ligation von PCR-Produkten und Vektoren	41
3.6.2	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	41
3.6.3	Herstellung kompetenter Zellen zur Lagerung (Eiszellen)	43
3.6.4	Schnelltransformation	43
3.6.5	Selektion transformierter Bakterienzellen	44
3.6.6	Dauerlagerung transformierter Bakterienzellen	44
3.7	DNA-Präparationsverfahren	44
3.7.1	Minipräparation von rekombinanter Plasmid-DNA	44
3.7.2	Maxipräparation rekombinanter Plasmid-DNA	45
3.7.3	Linearisierung von Plasmiden	46
3.7.4	DNA-Extraktion modifiziert nach Möller et al. (1992)	46
3.7.5	DNA-Extraktion mit dem DNeasy® Plant Mini Kit	47

3.7.6	DNA-Extraktion mit Chelex® 100	47
3.7.7	Präparative Agarose-Gelelektrophorese	48
3.7.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	48
3.7.9	Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen	49
3.7.10	Präparativer Restriktionsverdau	49
3.7.11	Aufbereitung von DNA für die Auftragssequenzierung	50
3.8	DNA-Analyseverfahren	50
3.8.1	Analytischer Restriktionsverdau rekombinanter Plasmide	50
3.8.2	Analytische Restriktionsspaltung von PCR-Produkten	50
3.8.3	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	50
3.8.4	Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	51
3.8.5	DNA-Quantifizierung mittels Absorptionsspektrometrie	52
3.8.6	DNA-Quantifizierung mittels Videodensitometrie	53
3.8.6.1	Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA	53
3.8.6.2	Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten	53
3.8.6.3	Analyse einer kompetitiven PCR mit homologen Kompetitoren	54
3.8.7	Berechnung der Plasmidkopienzahl	54
3.9	Experimentelle Überprüfung der entwickelten Methode im Mischinfektionsversuch	54
3.9.1	Grundlegende Zusammenhänge	54
3.9.1.1	Berechnung der Blattfläche	54
3.9.1.2	Zusammenhang zwischen Blattfläche und Blattfrischmasse	55
3.9.1.3	DNA-Gehalt der Blätter	55
3.9.2	Versuchsapparatur	55
3.9.3	Inokulation der Gurkenpflanzen	56
3.9.4	Versuchsvarianten	57
3.9.5	Probenentnahme	57
3.9.6	Bonitur	58
3.9.7	Probenaufbereitung	58
3.9.8	Auswertung	59
3.9.8.1	Verrechnung der quantifizierten Pilz-DNA	59
3.9.8.2	Statistische Auswertung der Befallsstärke und Pilz-DNA in den Einzelvarianten	59
3.9.8.3	Pilz-DNA-Gehalt, Befallsstärke und Konidienanzahl in der Mischvariante	60
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Differenzierung der Isolate	61
4.1.1	Mikroskopische Untersuchungen	61
4.1.1.1	Bestimmung von <i>Golovinomyces</i> und <i>Podosphaera</i>	61

4.1.1.2	Differenzierung von <i>G. orontii</i> und <i>G. cucurbitacearum</i>	62
4.1.2	Molekularbiologische Untersuchungen der rDNA-ITS-Region	63
4.1.2.1	Differenzierung von <i>G. orontii</i> und <i>P. xanthii</i> mit PCR-RFLP	63
4.1.2.2	Vergleich der rDNA-ITS-Sequenzen	64
4.2	Entwicklung und Testung spezifischer Primer auf Plasmiden	68
4.2.1	<i>G. orontii</i> -Primer	68
4.2.2	<i>P. xanthii</i> -Primer	70
4.3	PCR-Optimierung	71
4.3.1	Polymerase	72
4.3.2	MgCl ₂ -Konzentration	75
4.3.3	dNTPs	75
4.3.4	Annealingtemperatur	76
4.3.5	Primerkonzentration	76
4.3.6	Zyklenzahl	77
4.3.7	Hohe Templatemengen	77
4.3.8	Zusammenfassung der Optimierung	77
4.4	Testung unter optimierten PCR-Bedingungen	78
4.4.1	Sensitivität und Spezifität auf Plasmid-DNA	78
4.4.2	Sensitivität und Spezifität auf genomischer DNA	79
4.4.3	Spezifität gegenüber genomischer Gurken-DNA	80
4.4.4	Spezifität gegenüber verschiedenen Pilztaxa	80
4.5	Entwicklung und Testung heterologer Kompetitoren	81
4.5.1	Design und Klonierung	81
4.5.2	Testung des heterologen Kompetitors von <i>G. orontii</i>	83
4.5.3	Testung von Zusätzen	84
4.6	Entwicklung und Testung homologer Kompetitoren	85
4.6.1	Design und Klonierung	85
4.6.2	Systemvalidierung	87
4.6.3	Klonierung der beiden Kompetitorsequenzen in ein Plasmid	89
4.7	Experimentelle Überprüfung der Methode im Mischinfektionsversuch	89
4.7.1	Grundlegende Zusammenhänge	89
4.7.1.1	Berechnung der Blattfläche	90
4.7.1.2	Zusammenhang zwischen Blattfrischmasse und Blattfläche	90
4.7.1.3	DNA-Gehalt der Gurkenblätter	91
4.7.2	Mischinfektionsversuch	93
4.7.2.1	Eichung	93
4.7.2.2	Befallsstärke und Pilz-DNA-Gehalt in den Einzelvarianten	93

4.7.2.3	Pilz-DNA-Gehalt und Befallsstärke in der Mischvariante	96
4.7.2.4	Konidienquantifizierung	99
4.7.3	Überprüfung der Daten mit Real-Time PCR	102
5	DISKUSSION	105
5.1	Echte Mehltau-Erhaltung	105
5.2	Differenzierung der Pilzisolat	107
5.2.1	Gattungs- und Artendifferenzierung	107
5.3	Taxaspezifische qPCR	109
5.3.1	Spezifische Primer	109
5.3.2	Kompetitorenentwicklung und -testung	111
5.3.3	Nachweisgrenzen	114
5.4	Experimentelle Überprüfung der Methode im Mischinfektionsversuch	115
5.4.1	Biologische Zusammenhänge	115
5.4.1.1	Blattfläche	115
5.4.1.2	Blattfrischmasse	116
5.4.1.3	Gesamt-DNA-Gehalt der Blätter	117
5.4.2	Mischinfektionsversuch	118
5.4.2.1	Verrechnung des quantifizierten Pilz-DNA-Gehalts	118
5.4.2.2	Befallsstärke und Pilz-DNA-Gehalt in den Einzelvarianten	119
5.4.2.3	Pilz-DNA-Gehalt und Befallsstärke in der Mischvariante	121
5.4.2.4	Konidienquantifizierung	122
5.4.2.5	PCR-Inhibition von <i>P. xanthii</i>	123
5.4.2.6	Überprüfung der Quantifizierung mit Real-Time PCR	125
5.4.3	Gesamtdiskussion	127
6	LITERATURVERZEICHNIS	130
7	ANHANG	144

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1	Lebenszyklus von <i>P. xanthi</i> . _____	11
Abbildung 3.1	rDNA-ITS-Region. _____	35
Abbildung 3.2	Versuchsanlage zur Durchführung der Mischinfektionsversuche. ____	56
Abbildung 4.1	Konidien von <i>G. orontii</i> und <i>P. xanthii</i> . _____	61
Abbildung 4.2	PCR-RFLP-Bandenmuster von <i>G. orontii</i> und <i>P. xanthii</i> . _____	63
Abbildung 4.3	Sequenzvergleich der rDNA-ITS-Sequenz des <i>G. orontii</i> -Isolats Gz02.2 und des <i>P. xanthii</i> -Isolats Pg03.2. _____	64
Abbildung 4.4	rDNA-ITS-Sequenzvergleich verschiedener <i>G. orontii</i> -Isolate. _____	65
Abbildung 4.5	rDNA-ITS-Sequenzvergleich verschiedener <i>P. xanthii</i> -Isolate. _____	67
Abbildung 4.6	Lage der spezifischen <i>G. orontii</i> -Primer. _____	68
Abbildung 4.7	Spezifitätstestung der unterschiedlichen <i>G. orontii</i> -Primerpaare. ____	69
Abbildung 4.8	Lage der spezifischen <i>P. xanthii</i> -Primer. _____	70
Abbildung 4.9	Spezifitätstestung der unterschiedlichen <i>P. xanthii</i> -Primerpaare. ____	71
Abbildung 4.10	AccuTherm-Testung. _____	73
Abbildung 4.11	Vergleich von BioTherm und KlenTherm Polymerase. _____	74
Abbildung 4.12	Vergleich von zwei dNTP-Konzentrationen. _____	76
Abbildung 4.13	Spezifitätstestung der Primer Go1s/Go4a und Px1s/Px2a auf Plasmiden. _____	78
Abbildung 4.14	Spezifitätstestung der Primer Go1s/Go4a und Px1s/Px2a mit genomischer DNA. _____	79
Abbildung 4.15	Testung der Primerpaare Px1s/Px2a und Go1s/Go4a mit genomischer Gurken-DNA. _____	80
Abbildung 4.16	Spezifitätstestung mit verschiedenen Pilzarten. _____	81
Abbildung 4.17	Fragmentschema der Ziel- und heterologen Kompetitorsequenzen. __	82
Abbildung 4.18	Verhältnis von heterologem Kompetitor und <i>G. orontii</i> - Plasmidzielsequenz bei Koamplifikation mit Go1s/Go2a. _____	83
Abbildung 4.19	Fragmentschema der Ziel- und homologen Kompetitorsequenzen. ____	86
Abbildung 4.20	Doppelte Heteroduplex-Bande bei Migration der <i>P. xanthii</i> -Produkte an zwei Beispielproben. _____	87
Abbildung 4.21	Nachweis des linearen Bereichs der kompetitiven PCR von <i>G. orontii</i> und <i>P. xanthii</i> . _____	88
Abbildung 4.22	Zusammenhang zwischen dem Produkt aus Blattbreite und Blattlänge (BB·BL) und der Blattfläche (BF) von Gurkenblättern. ____	90

Abbildung 4.23	Zusammenhang zwischen Blattfläche und Frischmasse bei Gurkenblättern. _____	91
Abbildung 4.24	DNA-Gehalt der Blätter pro 100 mg Blattfrischmasse (FM) in Abhängigkeit von der Blattfläche. _____	92
Abbildung 4.25	Befallsstärke und Pilz-DNA-Gehalt in den beiden Einzelinokulationsvarianten <i>G. orontii</i> und <i>P. xanthii</i> auf den Blattetagen im Versuchsverlauf. _____	94
Abbildung 4.26	Zusammenhang zwischen quantifizierter Pilz-DNA und bonitierter Befallsstärke in den beiden Einzelinokulationsvarianten <i>P. xanthii</i> und <i>G. orontii</i> . _____	96
Abbildung 4.27	Korrigierter DNA-Gehalt (%) von <i>P. xanthii</i> und <i>G. orontii</i> in der Mischvariante auf den Blattetagen im Versuchsverlauf. _____	97
Abbildung 4.28	Zusammenhang zwischen errechneter und bonitierter Befallsstärke in der Mischvariante. _____	98
Abbildung 4.29	Entwicklung des relativen Anteils der Pilze <i>P. xanthii</i> und <i>G. orontii</i> an der Gesamtbefallsstärke in der Mischvariante im Versuchsverlauf. _____	99
Abbildung 4.30	Amplifikation von gefrorenen und frischen Konidien von <i>P. xanthii</i> und <i>G. orontii</i> . _____	100
Abbildung 4.31	Zusammenhang zwischen Befallsstärke und Anzahl der quantifizierten Konidien in den drei Versuchsvarianten. _____	101
Abbildung 4.32	Entwicklung des relativen Anteils der Konidien von <i>P. xanthii</i> und <i>G. orontii</i> in der Mischvariante im Versuchsverlauf. _____	102
Abbildung 4.33	Eichgerade für die Quantifizierung mit dem Real-Time-Cycler. _____	103
Abbildung 4.34	Vergleich der mit Real-Time PCR und kompetitiver PCR quantifizierten Proben der <i>G. orontii</i> -Einzelvariante. _____	104
Abbildung 7.1	Migration der unterschiedlichen Größenmarker. _____	144
Abbildung 7.2	Sequenzen der heterologen Kompetitoren. _____	145
Abbildung 7.3	Sequenz des homologen Kompetitors von <i>G. orontii</i> im Vergleich zur Zielsequenz. _____	145
Abbildung 7.4	Sequenz des homologen Kompetitors von <i>P. xanthii</i> im Vergleich zur Zielsequenz. _____	146

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1	Morphologische Merkmale von <i>G. cucurbitacearum</i> , <i>G. orontii</i> und <i>P. xanthii</i> (nach Braun 1995). _____	9
Tabelle 3.1	Geräte. _____	24
Tabelle 3.2	Feste Chemikalien. _____	25
Tabelle 3.3	Flüssige Chemikalien. _____	26
Tabelle 3.4	Datenbanken. _____	27
Tabelle 3.5	Software. _____	27
Tabelle 3.6	Sonstiges Material. _____	27
Tabelle 3.7	Bakterienstamm. _____	27
Tabelle 3.8	Restriktionsenzyme. _____	28
Tabelle 3.9	Enzyme und Nukleotide. _____	28
Tabelle 3.10	Reaktionskits. _____	29
Tabelle 3.11	DNA-Standards. _____	30
Tabelle 3.12	Pflanzenmaterial. _____	30
Tabelle 3.13	Herkunft der verwendeten Pilzisolat. _____	30
Tabelle 3.14	Datenbanksequenzen. _____	31
Tabelle 3.15	Verwendete Primer. _____	36
Tabelle 4.1	Mittlere Konidienabmessungen der zur Gattung <i>Golovinomyces</i> zählenden Isolate Gg03.1 und Gk02.2. _____	62
Tabelle 7.1	Statistische Werte der DNA-Gehalte und Blattflächen der einzelnen Blattstufen bei 24 Tage alten Gurkenpflanzen. _____	146
Tabelle 7.2	Ränge des Kruskal-Wallis-Tests des DNA-Gehalts der einzelnen Blattstufen. _____	147
Tabelle 7.3	Teststatistik des Kruskal-Wallis-Tests zwischen dem DNA-Gehalt der Blätter 1 bis 3. _____	147
Tabelle 7.4	Multipler Mittelwertvergleich des DNA-Gehalts der Blätter 1 bis 3 nach Scheffé. _____	147
Tabelle 7.5	Statistische Daten der <i>P. xanthii</i> -Einzelvariante. _____	148
Tabelle 7.6	Statistische Daten der <i>G. orontii</i> -Einzelvariante. _____	149
Tabelle 7.7	Ränge der Kruskal-Wallis-Tests der Pilz-DNA-Gehalte der Blätter 1 bis 3 zu den einzelnen Boniturterminen bei den Varianten <i>P. xanthii</i> und <i>G. orontii</i> . _____	150

Tabelle 7.8	Test-Statistik der Kruskal-Wallis-Tests zum Einfluss des Faktors Blatt auf den Pilz-DNA-Gehalt zu den einzelnen Boniturterminen in den Varianten <i>P. xanthii</i> und <i>G. orontii</i> . _____	150
Tabelle 7.9	Ränge und Rangsummen der U-Tests nach Mann-Whitney der Pilz-DNA-Gehalte in den Blättern 2 und 3 zum Zeitpunkt 21 DAI bei den Einzelvarianten <i>P. xanthii</i> und <i>G. orontii</i> . _____	151
Tabelle 7.10	Teststatistiken der U-Tests zum Einfluss des Faktors Blatt zum Zeit 21 DAI in den Einzelvarianten <i>P. xanthii</i> und <i>G. orontii</i> zwischen den Blättern 2 und 3. _____	151
Tabelle 7.11	Statistische Daten der Mischvariante. _____	152
Tabelle 7.12	Ränge des Kruskal-Wallis-Tests der korrigierten Pilz-DNA-Gehalte (%) in den Blättern 1 bis 3 zu den drei Boniturterminen in der Mischvariante.	153
Tabelle 7.13	Teststatistik des Kruskal-Wallis-Tests der korrigierten Pilz-DNA-Gehalte (%) in den Blättern 1 bis 3 zu den drei Boniturterminen in der Mischvariante. _____	153
Tabelle 0.2	Mittelwerte der über die Blätter 1-3 gepoolten <i>G. orontii</i> -DNA-Gehalte in der Einzel- und in der Mischvariante. _____	154
Tabelle 7.15	Mittelwertvergleich (t-Test) der gepoolten <i>G. orontii</i> -DNA-Gehalte zwischen Einzel- und Mischvariante an den einzelnen Boniturterminen. _	154
Tabelle 7.16	Mittelwerte der über die Blätter 1-3 gepoolten <i>P. xanthii</i> -DNA-Gehalte in der Einzel- und in der Mischvariante. _____	154
Tabelle 7.17	Mittelwertvergleich (t-Test) der gepoolten <i>P. xanthii</i> -DNA-Gehalte zwischen Einzel- und Mischvariante an den einzelnen Boniturterminen	154
Tabelle 7.18	Ränge des Kruskal-Wallis-Test der relativierten Konidienanzahl von <i>G. orontii</i> zwischen den drei Boniturterminen. _____	155
Tabelle 7.19	Teststatistik des Kruskal-Wallis-Tests der relativierten Konidienanzahl von <i>G. orontii</i> zwischen drei Boniturterminen. _____	155

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
bp	Basenpaar
DA	Dalton
dsDNA	doppelsträngige DNA
h	Stunde
IOD	Integrierte Optische Dichte
IPP	Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz
min	Minute
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
rL	relative Luftfeuchte
rpm	Drehzahl („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
T _m	Schmelztemperatur
U	Einheit („unit“)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 EINLEITUNG

Die Echten Mehltau-Pilze (Erysiphales) sind weltweit verbreitete Pathogene an einer Vielzahl von Pflanzen. Amano (1986) nannte 9838 Pflanzenarten in 1617 Gattungen, 169 Familien und 44 Ordnungen der Angiospermen als Wirtspflanzen der Erysiphales. Hiervon gehören 93 % zu den Dikotylen und der Rest hauptsächlich zu den monokotylen Gräsern. Viele dieser Pflanzen sind wichtige Kulturpflanzen, wie z. B. die Kürbisgewächse (Cucurbitaceae). Diese Familie umfasst ungefähr 825 Arten in 119 Gattungen (Andres 2000). Nur ein kleiner Teil davon wird vom Menschen kultiviert und dient ihm als Nahrung, als Gebrauchsgegenstand oder als Zierpflanze (Sitterly 1978). In Europa zählen zu den wichtigsten kultivierten Arten *Cucumis sativus* L. (Gurke), *Cucumis melo* L. (Varietäten der Zuckermelone), *Citrullus lanatus* (Thum.) var. *vulgaris* (Schrad.) Mansf. (Wassermelone) und Kürbisse der Gattung *Cucurbita*, wie *C. pepo* L., *C. maxima* Duch., *C. moschata* Poir. und *C. mixta* Pang (u. a. Zucchini, Garten-, Mark- und Moschuskürbisse) (Liebig 1991; Vogel 1996).

Bei der Kultivierung von Kürbisgewächsen in Freiland- und Unterglaskulturen gehört der Echte Mehltau zu den wichtigsten Phytopathogenen. Vor allem Kulturen von Gurken, Zucchini, Kürbissen und Zuckermelonen werden befallen. Wassermelonen dagegen eher seltener (Bertrand 1991). Ein Befall mit Echtem Mehltau ist sehr leicht durch das epiphytische Myzel der Pilze zu erkennen. Die anfänglich hauptsächlich auf den Blattoberseiten vorkommenden kleinen weißen Läsionen vergrößern sich schnell und können das ganze Blatt überziehen. Bei sehr starkem Befall wächst der Pilz auch auf dem Stängel und den Blattunterseiten, seltener auch auf den Früchten. Befallene Blätter werden meist chlorotisch, in schwereren Fällen kommt es zu vorzeitigem Blattfall als Folge von sich entwickelnden Nekrosen. Bedingt durch diese Dezimierung von photosynthetisch aktiver Blattfläche, sind Ertrags- und Qualitätseinbußen der Früchte die Folgen (Jarvis et al. 2002).

Weltweit sind vier Erreger des Echten Mehltaus an Cucurbitaceae bekannt: *Leveillula taurica*, *Podosphaera xanthii* und zwei Arten aus der Gattung *Golovinomyces*, *G. orontii* und *G. cucurbitacearum* (Braun 1995). *L. taurica* spielt als Erregerart in Europa nur eine untergeordnete Rolle und wurde in Deutschland noch nicht gefunden. Auch Fragen zum Vorkommen und der Verbreitung von *G. cucurbitacearum* bedürfen noch der genaueren Klärung (siehe 2.2.2).

Die Verbreitung der beiden Gattungen *Podosphaera* und *Golovinomyces* ist in Europa sehr unterschiedlich (siehe 2.2.6). Die Verbreitungsmuster können zum Teil durch die

verschiedenen Temperaturansprüche der beiden Pilzen erklärt werden, verfügen aber zusätzlich über eine temperaturunabhängige Komponente (Schlösser 1976b). Dies wird z. B. deutlich an einer früheren Untersuchung in der ehemaligen DDR, bei der ein sehr hoher Anteil an Mischinfektionen gefunden wurde (Janke et al. 1977) oder an der aktuellen Situation in Tschechien, bei der *Golovinomyces* und *Podosphaera* unter klimatischen Bedingungen auftreten, die nicht ihren Klimaoptima entsprechen (Kristkova et al. 2002).

Weitere Faktoren, die die Abundanz der Pilze beeinflussen können, könnten z. B. aus einem selektivem Wirtspektrum der beiden Pilze bestehen (Giraud 2006). Wirtsarten und auch die angebauten Sorten wurden bisher noch in keine Untersuchung systematisch mit einbezogen. Ebenso könnten Veränderungen der jeweiligen Sporulationsraten eine Rolle spielen. Hierbei kann, neben vom Wirt ausgehenden Selektionsfaktoren (Dutzmann 1984), Intraferenz eine Rolle spielen, wie es in Echtem Mehltau an Gerste beobachtet wurde (Stähle 1986), oder Interferenz, wie es für Rostpilze gezeigt wurde (Newton et al. 1999). Aber auch unterschiedliche Fungizidsensibilitäten wären in Betracht zu ziehen (Crüger & Meyer 1976; Kilian 1990; O'Hara et al. 2000).

Um die weiteren Faktoren ermitteln zu können, die neben dem Klima die Populationsdynamik und Abundanz von *P. xanthii* und *G. orontii* beeinflussen, müssen Untersuchungen durchgeführt werden, die das Verhalten beider Pilze in Mischinfektionen zum Inhalt haben. Zu diesem Zweck sollte eine Methodik entwickelt werden, mit der es möglich war, nicht nur die Konidien, sondern auch die Hyphen von *P. xanthii* und *Golovinomyces* sp. in einer Mischinfektion eindeutig voneinander unterscheiden zu können. Auf diese Weise sollte es möglich werden, die epidemiologisch relevanten Parameter wie Sporulation und Befallsstärke unabhängig voneinander zu erheben und mögliche Wechselwirkungen der Pathogene auf diese beiden Parameter zu erfassen.

Die Methode, mit der diese Voraussetzungen erfüllt werden konnten, war die quantitative kompetitive Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). Hierzu mussten als Erstes **pathogenspezifische Primer** und im zweiten Schritt **geeignete Kompetitoren**, die als interne Standards benutzt werden konnten, entwickelt und getestet werden. In dieser Arbeit wird die Entwicklung dieser Methode beschrieben, sowie ihre **Anwendung in einem artifiziellen Mischinfektionsversuch auf Gurken**. Am Ende erfolgt die Überprüfung der Daten, die mit der kompetitiven quantitativen PCR erhoben wurden, mit einer anderen Quantifizierungsstrategie, der **Real-Time PCR mit einer externen Standardkurve**. Dieser letzte Schritt wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Karlovsky, Abteilung für molekulare Phytopathologie und Mykotoxinforschung der Georg-

August-Universität Göttingen, durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mir für diese Arbeit freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Da zu Beginn dieser Arbeit mit den beiden verwendeten Echten Mehltau-Pathogenen am IPP noch nicht gearbeitet wurde, musste eine **in vitro-Erhaltung** etabliert werden, die die gleichzeitige und vermischungsfreie Erhaltung von Pathogenisolaten erlaubte. In diesem Rahmen mussten die angelegten Isolate genau bestimmt werden. Dies geschah durch die Verwendung und Überprüfung **mikroskopischer und molekularbiologischer Diagnosemethoden**.

Zu Beginn dieser Dissertationsschrift wird in einem Literaturteil der aktuelle Kenntnisstand über die Pathogene *P. xanthii* und *Golovinomyces* sp. sowie die verwendete qPCR-Methodik zusammengestellt. Hierbei wird die Taxonomie der Erysiphaceae etwas ausführlicher beschrieben. Dies geschieht mit Hinblick auf die Änderungen der Nomenklatur in dieser Familie in den letzten Jahren. Um das Verständnis des Literaturteils in dieser Hinsicht zu erleichtern, wird hinter den in den Originalveröffentlichungen benutzten Pilznamen der aktuelle Name in Klammern angegeben.

Da es sich bei dieser Arbeit um die Beschreibung einer Methodenentwicklung handelt, wird, zum besseren Verständnis und zur Verdeutlichung der Relevanz der einzelnen Schritte für das weitere Vorgehen in der Entwicklung, von der formalen Trennung von Ergebnis und Diskussion in einigen Ergebnispunkten abgewichen. Dies betrifft hauptsächlich die Punkte der PCR-Optimierung.

2 LITERATURTEIL

2.1 Gurke (*Cucumis sativus* L.)

Die Gurke gehört weltweit zu den bedeutendsten Arten des Gemüsesortiments und wird in Deutschland im Gewächshaus, vorwiegend als Salatgurke, und im Freiland, vorwiegend als Einlegegurke für den Vertragsanbau, angebaut. Sie ist eine einjährige Pflanze und besitzt ein sich flach ausbreitendes Wurzelsystem. Der Spross kann eine Länge von bis zu 10 m erreichen. Er ist jedoch nicht selbsttragend. Die Pflanze liegt entweder auf dem Boden auf oder rankt an Stützen. In der Kultur benötigen Gurken hohe Temperaturen, einen lockeren, leicht erwärmbaren Boden und viel Wasser. Sie bevorzugen feuchte Wärme und sind extrem windempfindlich. Das Minimum der Lufttemperatur für die Keimung und das Wachstum liegt bei 10-12 °C. Schon kurzzeitig einwirkende Lufttemperaturen von 3-5 °C, aber auch längere kühlere Temperaturphasen von 6-12 °C während der Nacht, können zu physiologischen Schäden und Wachstumsstockungen führen. Das Temperaturmaximum liegt bei 40 °C, wobei eine Bodentemperatur von 21-24 °C und eine Lufttemperatur im Bereich von 22-30 °C optimal ist. In Deutschland ist daher der Anbau im Gewächshaus meist erst ab den Monaten April bis Mai wirtschaftlich. Die Kultur wird dabei in der Regel im Kurzzeitanbau bis August/September, manchmal auch Oktober, geführt. Da die Gurke im Nachbau mit sich selbst unverträglich ist, existieren verschiedene Kulturtechniken, die einen schnellen Austausch des Substrats ermöglichen oder ganz ohne Substrat auskommen. Verwendet werden Steinwolle, Strohballen, Foliensäcke oder organische Substrate, die als Damm aufgeschüttet werden. Besonders in Spezialbetrieben haben sich auch substratlose Kulturtechniken durchgesetzt.

Zum Schutz vor Krankheiten, vor allem gegen den bodenbürtigen Pilz *Fusarium oxysporum*, und zur Verbesserung der Bodenkältetoleranz wird die Gurke meist auf den Feigenblattkürbis (*Cucurbita ficifolia*) oder die Haargurke (*Sicyos angulatus*) veredelt. Die Bekämpfung von Krankheiten wird auch von züchterischer Seite stark bearbeitet. Im Handel sind gegenwärtig vorwiegend Hybridsorten, die Resistenzen oder Toleranzen gegen Echten Mehltau, Gurkenkrätze (*Cladosporium cucumerinum*), Blattbrand (*Corynespora cassiicola*) und Falschen Mehltau (*Pseudoperonospora cubensis*) besitzen (Liebig 1991; Vogel 1996).

2.2 Echter Mehltau an Gurke

2.2.1 Taxonomie

In der Taxonomie wurden in den letzten Jahren viele Veränderungen vorgenommen. Die Taxonomie der Echten Mehltau-Pilze wird an dieser Stelle etwas genauer beschrieben, um einen Überblick über die Namensänderungen für die Pilze der Gattungen *Erysiphe*, *Sphaerotheca*, *Golovinomyces* und *Podosphaera* zu geben.

Innerhalb des Phylums Ascomycota gehören die Echten Mehltau-Pilze zur einzigen Familie (Erysiphaceae) der Ordnung Erysiphales. Das lange Zeit angewendete grundlegende Gattungskonzept beruhte auf der Einteilung nach den Fruchtkörpereigenschaften, wie der Zahl der Asci und Ascosporen und Struktur der Anhängsel (Blumer 1967; Braun 1995). Durch ihre einzigartige Fruchtkörperform bereitet eine höhere phylogenetische Eingruppierung der Ordnung Erysiphales Schwierigkeiten. Die Erysiphales wurden normalerweise den Plectomycetes oder Pyrenomycetes zugeordnet, ihr Fruchtkörper aus diesem Grund als Perithezium oder Kleistothezium bezeichnet. Die Analyse der 18S rRNA-Sequenzen von Saenz et al. (1994) zeigte, dass die Erysiphales tatsächlich nicht zu den Plecto- oder Pyrenomycetes, sondern in die Nähe von Ascomyceten mit Apothezien oder Pseudoapothezien gehören (Takamatsu 2004). Die Fruchtkörper sollten daher mit dem neutralen Wort Ascoma bezeichnet werden. Als spezielle Bezeichnung schlugen Braun et al. (2002) Chasmothecium vor. Heute werden die Erysiphales in die Klasse der Leotiomycetes innerhalb der Unterabteilung Pezizomycotina eingeordnet (Wang et al. 2006).

Durch Sequenzierungen der ITS-rDNA-Region (Takamatsu et al. 1998; Saenz & Taylor 1999; Mori et al. 2000) und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Konidien (Cook et al. 1997) konnte die Phylogenie auch innerhalb der Erysiphales neu bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Beschreibung der phylogenetischen Zusammenhänge nicht über die teleomorphe, sondern über die anamorphe Form erfolgen kann. Braun und seine Koautoren fassten diese Ergebnisse zusammen und veröffentlichten sich daraus ergebende Konsequenzen für die Gattungs- und Artdefinitionen (Braun 1999; Braun & Takamatsu 2000; Braun et al. 2001), die im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Die in der Gattung *Erysiphe* früher vorhandenen Sektionen werden nun auf Grund ihrer anamorphen Form als eigene Gattungen definiert. Es existieren die Gattungen *Erysiphe* s. str. mit der Gattung *Oidium* subgen. *Pseudoidium* Jacz. als Anamorph, *Golovinomyces* (U. Braun) V.P. Gelyuta mit dem Anamorph *Oidium* subgen. *Reticuloidium* R.T.A. Cook, Inman & Billings und die neue Gattung *Neoerysiphe* U. Braun stat. et nom. nov. mit dem

Anamorph *Oidium* subgen. *Striatoidium* R.T.A. Cook, Inman & Billings. Die Gattungen *Microsphaera* und *Uncinula* wurden auf Grund ihrer *Pseudoidium*-Anamorphe mit *Erysiphe* s. str. vereinigt und in *Erysiphe* umbenannt. Ebenso wurden die Gattung *Sphaerotheca* mit der Gattung *Podosphaera* vereinigt und in letztere umbenannt. Die Gattung *Podosphaera* besitzt einen Anamorph der Gattung *Oidium* subgen. *Fibroidium*.

Innerhalb der Gattungen ist eine Arteneinteilung auf Grund von morphologischen Unterschieden oder Wirtspflanzenspektren gerechtfertigt (Braun et al. 2002).

2.2.2 Echte Mehltau-Arten an Cucurbitaceae in Deutschland und ihr Wirtspflanzenkreis

Noch bis Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden weltweit neben *Leveillula taurica* (Lév.) Arnaud im Wesentlichen drei Erreger des Echten Mehltaus an Gurken unterschieden: *Erysiphe cichoracearum* DC. ex Mérat, *E. polyphaga* Hammarlund und *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.) Pollacci. Die genaue Bestimmung bereitete vielfach Probleme, da die Hauptfruchtform nur selten zu finden ist und so die Zuordnung der Arten entweder gar nicht vorgenommen wurde oder sich auf Konidienmerkmale stützen musste (für eine Zusammenfassung siehe Khan 1983). In einigen Fällen kam es dabei auch zu Fehlbestimmungen (Beispiele dazu finden sich bei Reuveni et al. 1971 und Staub et al. 1973).

Die Art *E. polyphaga* wurde zwar bald auf Grund ihrer inkorrekten Beschreibung in Frage gestellt (Nagy 1975), trotzdem aber weiterhin die Existenz einer weiteren mit *E. cichoracearum* sehr eng verwandten Art angenommen. Von morphologischen Unterschieden in den Anamorphen zweier unterschiedlichener *E. cichoracearum*-Rassen ausgehend, bei denen die eine auf Asteraceae beschränkt blieb, die andere neben Asteraceae auch auf anderen Wirtspflanzen, unter anderem Cucurbitaceae, zu finden war, wurden zwei Arten definiert: *E. cichoracearum* als das Taxon, das auf Asteraceae beschränkt bleibt und *E. orontii* Castagne emend. U. Braun, als das Taxon mit einem weiteren Wirtspflanzenkreis (Molot & Lecoq 1986; Cohen & Eyal 1988; Braun 1995). Nach Untersuchungen von Matsuda & Takamatsu (2003) erfolgte die Erweiterung des Wirtspflanzenspektrums dieses Taxons ausgehend von den Lactucae der Asteraceae einerseits durch Divergenz im Einklang mit der Radiation des Stammes Lactucae und andererseits durch „Sprünge“ auf andere Pflanzentaxa. Letzteres wurde von Vági et al. (2007) erst vor Kurzem dokumentiert. Die Art *E. orontii* entspricht der früher beschriebenen Art *E. polyphaga* und wird, wie auch *E. cichoracearum*, weiterhin als polyphyletisch angesehen, d. h. als eine Sammlung morphologisch gleicher Arten (Zeller

& Levy 1995); Braun, pers. Mitteilung). Ob sich von *E. orontii* noch eine weitere Art, *E. cucurbitacearum* Zheng & Chen, die wahrscheinlich auf Cucurbitaceae beschränkt bleibt und schmalere Konidien aufweisen soll, unterscheiden lässt, wurde erst in Frage gestellt, dann aber von der Arbeitsgruppe um Vakalounakis bestätigt (Vakalounakis et al. 1994; Vakalounakis & Klironomou 2001). Hinweise auf eine auf Cucurbitaceae beschränkte Art finden sich auch schon bei Schmitt (1955). Auch die Studie von Matsuda & Takamatsu (2003) bestätigte die Präsenz von zwei Biotypen auf *Cucurbita*-Arten.

Durch die taxonomischen Neuordnungen innerhalb der Erysiphales änderten sich die Namen der beiden Arten in *Golovinomyces orontii* (Castagne) V. P. Gelyuta und *G. cucurbitacearum* (Zheng & Chen) Vakalounakis & Klironomou comb. nov. Vergleichende Versuche zum Wirtspflanzenspektrum beider Arten wurden bisher noch nicht durchgeführt. Es lässt sich jedoch vermuten, dass unter Feldbedingungen *G. cucurbitacearum* die dominierende Sippe zu sein scheint, während im Gewächshaus auch *G. orontii* zu erwarten wäre (Braun, pers. Mitteilung).

S. fuliginea war jahrzehntelang der gebräuchliche Name für den Echten Mehltau an Kürbisgewächsen mit Fibrosinkörpern. Auch dieses Taxon wurde als Artenkomplex gesehen. Braun (1995) definierte aus diesem Komplex zwei Arten. Er limitierte den Wirtspflanzenkreis von *S. fuliginea* auf Veronica-Arten und eng verwandte Arten in den Scrophulariaceae. Das Taxon, das auf Asteraceae, Cucurbitaceae und anderen Pflanzenarten zu finden war, wurde mit *S. fusca* (Fr.) Blumer emend. U. Braun angesprochen. Morphologische Untersuchungen (Braun & Takamatsu 2000) und DNA-Sequenzanalysen (Hirata et al. 2000) zeigten, dass auch *S. fusca* aus mindestens zwei verschiedenen Taxa besteht. *S. fusca* wurde daraufhin als das Taxon definiert, das u. a. auf Löwenzahn und anderen Asteraceae zu finden ist, während die andere Art als *S. xanthii* (Castagne) Junell bezeichnet wurde und u. a. Lamiaceae, Asteraceae, Verbena und Cucurbitaceae befällt.

Nach der Kombination der beiden Gattungen *Spaerotheca* und *Podosphaera* ist der Name der beiden Arten *P. fusca* (Fr.) U. Braun & N. Shishkoff comb. nov. und *P. xanthii* (Castag.) U. Braun & N. Shishkoff comb. nov. (Braun & Takamatsu 2000) Shishkoff, pers. Mitteilung). Der auf Kürbisgewächsen vorkommende *P. xanthii*, unterscheidet sich von *P. fusca* durch seine Heterothallie, große Fruchtkörper und Asci mit großen Okuli (Braun & Takamatsu 2000; Braun et al. 2001). Beide Arten werden nach wie vor als Artkomplexe betrachtet (Braun et al. 2001). Dies wird auch an Untersuchungen verschiedener *P. xanthii*-Isolate deutlich. Isolate von *Cosmos bipinnatus* (Asteraceae) konnten Gurke kaum infizieren und gelangten nicht zur Sporulation. Isolate von Gurke dagegen konnten *C. bipinnatus* infizieren, allerdings mit einer sehr niedrigen Rate, und zur Sporulation

gelangen, aber auch hier mit einer sehr geringen Konidiendichte (Hirata & Takamatsu 2001). Trotz der Eindeutigkeit dieser Ergebnisse, ist die Existenz von Linien, die sowohl Cucurbitaceae als auch Asteraceae infizieren können, nicht völlig ausgeschlossen (Abiko 1978; Lemaire et al. 1998).

Auch in der neueren Literatur finden sich die Bezeichnungen *G. cichoracearum* (z. B. Nicot et al. 2002) und *P. fuliginea* (z. B. Hirata & Takamatsu, 2001) für den Echten Mehltau an Cucurbitaceae. Der Name wird in diesen Fällen aber „im weitesten Sinn“ (s. lat.) zur Bezeichnung eines Artkomplexes verwendet.

2.2.3 Unterscheidende Morphologie

Die Fruchtkörper von *G. orontii*, *G. cucurbitacearum* und *P. xanthii* sehen sich äußerlich sehr ähnlich. Im reifen Zustand ist ihre Farbe dunkelbraun bis schwarz, ihre Anhängsel sind myzeloid und unverzweigt. Das Chasmothezium von *P. xanthii* hat einen Ascus, der sechs bis acht Sporen beinhaltet, während bei *Golovinomyces sp.* fünf bis 14 Asci mit je zwei Ascosporen zu finden sind. Bei *G. orontii* treten gelegentlich auch Asci mit drei Ascosporen auf (Nagy 1973; Braun 1995).

Auf Grund des seltenen Auftretens der teleomorphen Form erfolgt die Artenbestimmung jedoch hauptsächlich über die Konidienmerkmale. Viele Charakteristika der Anamorphe eignen sich generell für die Artendifferenzierung bei den Erysiphales. Zum Beispiel der Ort des Myzels (epiphytisch oder hemiendophytisch), Art der Konidiophoren, Aussehen und Größe der Konidien, Keimmodus, Länge des Keimschlauchs, Appressorienform, Anwesenheit von Fibrosinkörpern oder Oberflächenstrukturen der Konidien (Zaracovitis 1965; Bösewinkel 1977 und 1980; Cook et al. 1997). Auch die Erreger an Cucurbitaceae lassen sich über ihre Anamorphe unterscheiden (Nagy 1970; Ballantyne 1975; Schlösser 1976a; Crüger & Meyer 1976; Crüger & Philipp 1977; Vakalounakis & Klironomou 2001).

Generell besitzen die hier beschriebenen Arten an Kürbisgewächsen ein epiphytisches Myzel. An den Konidiophoren entwickeln sich die Konidien in Ketten. Sie reifen graduell zur Spitze hin und sind cytoplasmatisch miteinander verbunden (Euoidium-Typ). Die Konidien der Erreger lassen sich an ihrer Form, dem Keimmodus und den Fibrosinkörpern unterscheiden. Alle Unterscheidungsmerkmale sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Konidienform *G. orontii* besitzt zylindrische Konidien mit abgerundeten Ecken (doliiform bis subzylindrisch). Sie sind etwa 25-40 µm lang und 15-23 µm breit. *G. cucurbitacearum* lässt sich von *G. orontii* durch die kleineren und schmalere Konidien unterscheiden. Sie sind etwa 18-35 µm lang und 12-18 µm (durchschnittlich < 15 µm) breit. Die Konidien von *P. xanthii* sind eher ellipsoid (ellipsoid-ovoid bis doliiform), generell dickleibiger und größer

(24-45 µm lang, 14-20 µm breit). Das Längen/Breiten-Verhältnis liegt bei *G. orontii* leicht unter 2 bei *G. cucurbitacearum* über 2 und bei *P. xanthii* deutlich um 1,6.

Fibrosinkörper Die Konidien sind allgemein einzellig, einkernig und farblos. Bei *P. xanthii* lassen sich zusätzlich noch Fibrosinkörper finden. Dies sind kleine stäbchenförmige Strukturen, die in keimfähigen Konidien am leichtesten nach der Behandlung mit 3 % KOH gesehen werden können. Bei älteren, nicht mehr keimfähigen Konidien, können die Fibrosinkörper nicht mehr nachgewiesen werden. Die Gattung *Golovinomyces* besitzt keine Fibrosinkörper.

Keimmodus Den Keimmodus von *Golovinomyces* sp. bezeichnete Braun (1995) als Cichoracearum-Typ. Der Keimschlauch setzt apikal an einer Ecke an und endet in einem keulenförmigen Appressorium. *P. xanthii*-Konidien keimen lateral von der Mitte her und der Keimschlauch ist häufig verzweigt. Ein deutliches Appressorium ist nicht sichtbar (Fuliginea-Typ).

Tabelle 2.1 Morphologische Merkmale von *G. cucurbitacearum*, *G. orontii* und *P. xanthii* (nach Braun 1995). Angaben in Klammern bezeichnen Extremwerte.

	<i>G. cucurbitacearum</i>	<i>G. orontii</i>	<i>P. xanthii</i>
Myzel	epiphytisch		
	?	heterothallisch	
Wirtspflanzenkreis	wahrscheinlich auf Cucurbitaceae beschränkt	Asteraceae, Cucurbitaceae, u. a.	Asteraceae, Cucurbitaceae, Lamiaceae, Verbena u. a.
Anamorph^a	<i>Oidium</i> subgen. <i>Reticuloidium</i>		<i>Oidium</i> subgen. <i>Fibroidium</i>
Fibrosinkörper	nein		ja
Konidienform	doliiform-subzylindrisch	ellipsoid-ovoid bis doliiform-subzylindrisch	ellipsoid-ovoid bis doliiform
Konidienlänge	18-35 µm	25-40 µm	24-45 (-50) µm
Konidienbreite	12-18 µm	15-23 µm	14-20 (-26) µm
Längen/Breiten-Verhältnis	etwas über 2 ^b	etwas unter 2	um 1,6 ^c
Konidienkeimtypus	Cichoracearum		Fuliginea
Ascokarpdurchmesser	(85-) 95-125 (-135) µm	80-140 µm	60-120 µm
Ascokarpanhänge	myzeloid, unverzweigt am unteren Teil des Ascokarps		
Zahl der Asci	5-14		1
Zahl der Ascosporen	2	2 (-4) ^d	(6-) ^d

^a Zuordnung nach Cook et al. 1997

^b nach Vakalounakis et al. 1994

^c nach Nagy 1970

^d Ascosporenzahl nach dem Bestimmungsschlüssel von Braun (1995). Allerdings wurden in der Literatur bei *G. orontii* an Cucurbitaceae nie mehr als maximal 3 und bei *P. xanthii* nie weniger als 8 beschrieben.

Inwieweit die Konidienmerkmale zu einer eindeutigen Bestimmung der Arten herangezogen werden können, wurde in der Literatur auf Grund der Variabilität der Merkmale immer wieder diskutiert. So fanden Crüger & Meyer (1976) bei der Untersuchung von Konidienmerkmalen von *S. fuliginea* (= *P. xanthii*) neben den ovoiden auch kugelige und zylindrisch erscheinende Konidien. Zudem wurde der Keimschlauch bei den *Sphaerotheca* (= *Podosphaera*) -Isolaten zu einem geringen Anteil an anderen Stellen als der Mitte der Konidienoberfläche gebildet. Auch gegabelte Keimschläuche, die nach Schlösser (1976a) bei etwa 15-50 % der Konidien auftreten, wurden nur äußerst selten gefunden. Dieselbe Variabilität bei den Konidien von *S. fusca* (= *P. xanthii*) wurde auch von Vakalounakis et al. (1994) beschrieben. Allerdings bestätigten sie den Prozentsatz für gegabelte Keimschläuche. Diese Schwankungen innerhalb der morphologischen Merkmale sind jedoch mit den Artenbeschreibungen nach Braun (1995) konform.

2.2.4 Entwicklungszyklus der Echten Mehltau-Pilze

Echte Mehltau-Pilze sind obligat biotrophe Parasiten. Sie besitzen ein epiphytisches Myzel, dessen einkernige Hyphen septiert und hyalin bis weißlich sind.

Landet eine Konidie auf einer Blattoberfläche, keimt sie aus und bildet am Ende des Keimschlauchs einen lateralen Auswuchs, ein Appressorium. Auf dessen Unterseite formt sich eine kleine Penetrationshyph, mit deren Hilfe die Wirtsepidermis durchstoßen wird. Daraufhin wird ein Haustorium in der Epidermiszelle gebildet, das zur Ernährung des Pilzes dient. Enzyme sind bei den Prozessen der Wirtserkennung und Infektion beteiligt (Jarvis et al. 2002). Ist die Infektion erfolgreich verlaufen, bildet sich durch das Wachstum weiterer Hyphen mit weiteren Appressorien und Haustorien eine Kolonie. Nach einigen Tagen werden an den Hyphen Konidiophore sichtbar, an denen Konidien in Ketten gebildet werden. Sind die Konidien reif, werden sie abgeschnürt und mit dem Wind verbreitet. Ein Zyklus kann nun von Neuem durchlaufen werden (Braun 1995) (Abb. 2.1).

G. orontii und *P. xanthii* sind heterothallich, das heißt, Chasmothezien formen sich, wenn zwei unterschiedlich ausgeprägte Geschlechtstypen des Pilzmyzels aufeinander treffen. Bardin et al. (1999) fanden bei ihren Untersuchungen von *E. cichoracearum* an Cucurbitaceae (= *Golovinomyces* sp.) jedoch auch eine große Anzahl Isolate, die sich keinem definierten Geschlechtstyp zuordnen ließen. Für *G. cucurbitacearum* kann über seine Differenzierung noch keine Aussage getroffen werden.

An Kürbisgewächsen wird die teleomorphe Form der Echten Mehltau-Arten jedoch nur selten gebildet und laut Hinweisen in der Literatur auch erst ab Ende August vorwiegend

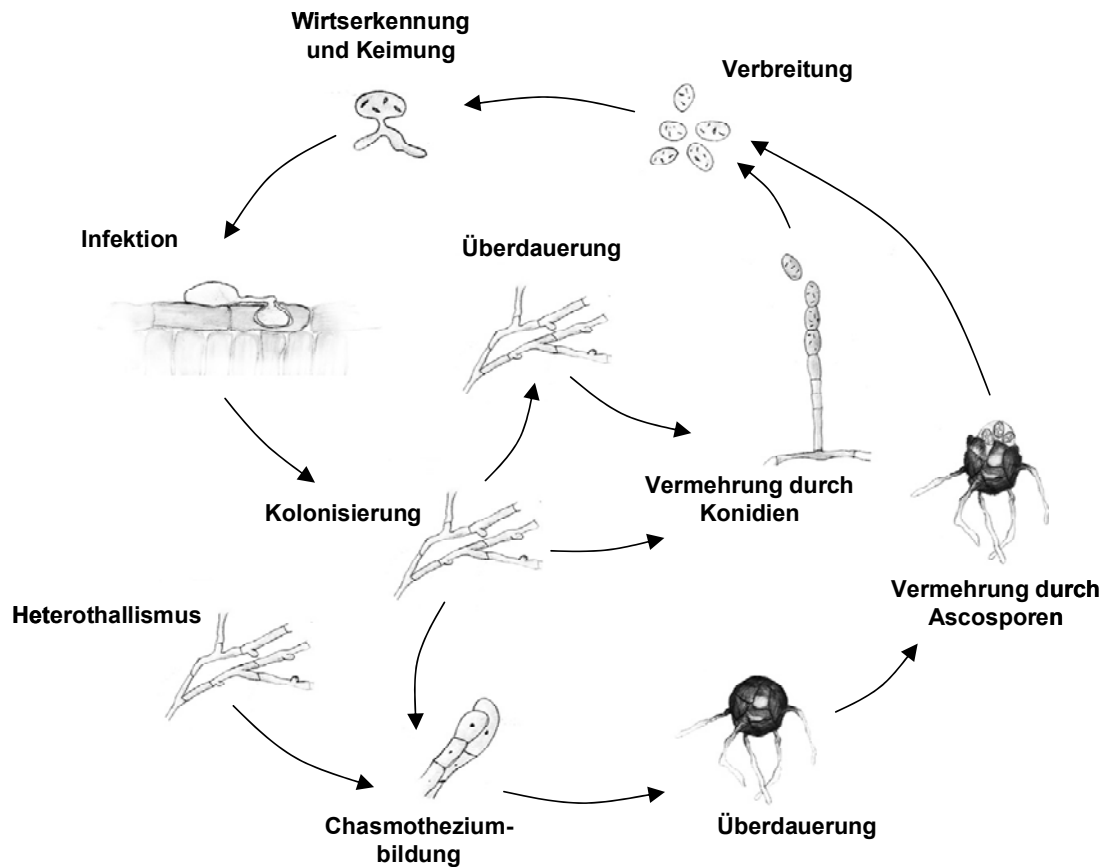


Abbildung 2.1 Lebenszyklus von *P. xanthii*. (Zeichnungen von A. Wichura)

auf der Blattunterseite gefunden (z. B. Crüger & Meyer 1976). Die Fruchtkörper öffnen sich durch den Druck der reifenden Asci, die dann die Ascosporen ausschleudern (Braun et al. 2002). Inwieweit die Bildung der Ascomata für die Pilze zur genetischen Rekombination wichtig ist, ist nicht geklärt. Es scheint zumindest, dass die sexuelle Vermehrung bei *P. xanthii* eine größere Rolle spielt als bei *G. orontii* (Bardin et al. 1997 und 1999).

Die Überdauerung der Pilze in Abwesenheit ihrer Wirte ist noch wenig erforscht. Eine wichtige Rolle der Chasmothezien scheint bei allen Arten wenig wahrscheinlich. Für *P. xanthii* ist eine Überdauerungen mit persistenten Hyphen, wie sie Braun (1995) für *P. fusca* beobachtet hat, denkbar. Explizit für *P. xanthii* gibt es darüber jedoch keine Untersuchungen. Eine Überwinterung auf alternativen Wirtspflanzen scheint zumindest für *P. xanthii* ausgeschlossen (Hirata & Takamatsu 2001). Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass die Ganzjahreskultur von Gurken in Gewächshäusern (Schepers 1984) in Verbindung mit der Verbreitung des Pathogens mit dem Wind über lange Distanzen (Brown & Hovmøller 2002) eine zentrale Rolle spielt.

Bei *G. orontii* könnte auf Grund seines großen Wirtspflanzenkreises die Überdauerung auf anderen Wirtspflanzen zusätzlich in Betracht gezogen werden. Aber wie auch für *G. cucurbitacearum* besteht hier noch Bedarf für nähere Untersuchungen.

2.2.5 Entwicklungsfaktoren

Die Hauptfaktoren, die auf die einzelnen Stadien innerhalb des Lebenszykluses der Pilze einwirken, sind einerseits Umweltbedingungen wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Licht und Wind, andererseits auch die Wirtsphysiologie und genetische Prädispositionen der Pilze und ihrer Wirtspflanzen. Bei der Untersuchung und Interpretation der Einflüsse von Umweltfaktoren muss immer beachtet werden, dass die Umweltbedingungen nur schwer getrennt voneinander zu betrachten sind und dass sie immer auch einen Effekt auf die Wirtspflanze haben. Im Folgenden werden die Entwicklungsfaktoren erörtert, die speziell bei *Podosphaera* und *Golovinomyces* schon näher untersucht worden sind.

Eine generelle Übersicht zum Einfluss verschiedener Entwicklungsfaktoren auf die Erysiphales findet sich bei Jarvis et al. (2002). Weitere Zusammenfassungen speziell zum Einfluss des Mikroklimas auf eine Echte Mehltau-Epidemie finden sich bei Aust & Hoyningen-Huene (1986) oder zu Abwehrreaktionen von Pflanzen auf eine Pathogeninfektion bei Bélanger et al. (2002) und Bechtold et al. (2005).

2.2.5.1 Umweltfaktoren

Die Konidien der Gattungen *Golovinomyces* und *Podosphaera* zeigen sich in ihrem Keimverhalten sehr unterschiedlich. Zaracovitis (1965) fand zeitliche Unterschiede in der Ausbildung des Keimschlauchs von Erysiphales-Arten. *Golovinomyces* lässt sich zu der Gruppe zählen, bei der 70% der Konidien innerhalb von 10 h auf Glasscheiben ausgekeimt waren, *Podosphaera*-Konidien zu der Gruppe, die über 10 h benötigte. Dies deutet daraufhin, dass die Pilze unterschiedliche Anforderungen an die relative Luftfeuchtigkeit (rL) während der Keimung stellen. Untersuchungen von Nagy (1970) bestätigen dies. Die Variation der rL bei 22 °C zeigte, dass das Optimum für die Konidienkeimung beider Arten auf Glasscheiben bei 100 % rL lag. *E. cichoracearum* (= *Golovinomyces* sp.) war aber, im Gegensatz zu *S. fuliginea* (= *P. xanthii*), noch bei bis zu 94 % rL fähig auszukeimen. Zudem fand sie, dass die Konidien von *S. fuliginea* unter gleichen Bedingungen schneller einschrumpften als die Konidien von *E. cichoracearum*. Bei gesättigter rL konnten die Konidien von *E. cichoracearum* in einem Temperaturbereich von 15-30 °C keimen, mit einem Optimum bei 25 °C. *S. fuliginea* konnte nur im Bereich von 20-30 °C auskeimen, mit einem Optimum von ca. 22 °C. Die Keimungsrate von

S. fuliginea war generell immer niedriger als die von *E. cichoracearum*. Auch die Keimgeschwindigkeit ist temperaturabhängig und nimmt bei gesättigter rL mit steigender Temperatur zu, wie Miller et al. (2003) bei Keimungstests auf Glasscheiben für *S. macularis* f. sp. *fragariae* (= *P. aphanis* (Wallr.) U. Braun var. *aphanis*), den Erreger des Echten Mehltaus an Erdbeeren, herausfanden.

Nagy (1976) fand, dass sich bei 100 % rL aus gekeimten Konidien von *E. cichoracearum*, im Gegensatz zu *S. fuliginea*, keine Kolonien entwickelten. Sie schloss daraus, dass *S. fuliginea* höhere Luftfeuchtigkeit toleriert, während *E. cichoracearum* für Kolonisation und Sporulation trockenere Bedingungen benötigt. In detaillierteren Untersuchungen fanden Reuveni & Rotem (1974), dass auch bei *S. fuliginea* die Kolonisation, Sporulation und Verbreitung von trockeneren Bedingungen gefördert wird, während sich höhere Luftfeuchtigkeiten positiv auf Infektion und Überleben auswirken. Alle Entwicklungsprozesse konnten aber auch unter weniger günstigen Feuchtigkeitsbedingungen stattfinden. Unterstützt wird dies von Untersuchungen von Miller et al. (2003), die herausfanden, dass das Wachstum einer Kolonie von *S. macularis* f. sp. *fragariae* hauptsächlich durch die Temperatur und nicht durch die Luftfeuchtigkeit beeinflusst wird.

Vergleichende Untersuchungen zum Temperatureinfluss auf epidemiologisch wichtige Parameter von Ratna-Hadi (2005) und Wichura (Daten nicht gezeigt) am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz zeigten, dass das Optimum epidemiologisch wichtiger Parameter bei *Golovinomyces* sp. im Vergleich zu *P. xanthii* tatsächlich in niedrigeren Temperaturbereichen lag. So lag die kürzeste Latenzzeit von *Golovinomyces* sp. bei 24 °C und bei *P. xanthii* bei 26 °C. Bei Temperaturen um 10-12 °C hatte *Golovinomyces* sp. um bis zu zwei Tage kürzere Latenzzeiten als *P. xanthii*. Die Koloniewachstumsrate war für *G. orontii* am höchsten bei Temperaturen um 22 °C und für *P. xanthii* um 24 °C. Auch bei der Sporulationsrate war das Optimum von *Golovinomyces* sp. mit 18 °C im niedrigeren Temperaturbereich als bei *P. xanthii*, bei dem es um die 25 °C lag.

Dass die produzierten Konidien nicht immer das gleiche Infektionspotenzial besitzen, zeigen Versuche von Bashi & Aust (1980). Die Konidienanzahl von *S. fuliginea* an Gurke sank unter kühleren und/oder feuchteren Bedingungen, konnte aber durch eine gesteigerte Infektiosität der Konidien kompensiert werden. Ob diese Beobachtung durch einen indirekten Effekt durch die Wirtsphysiologie oder aber durch einen direkten Effekt auf die Konidien, z. B. durch eine schnellere Alterung der Konidien bei höheren Temperaturen, hervorgerufen wurde, wurde in diesem Zusammenhang nicht geklärt.

Die Konidienfreisetzung folgt bei vielen Erysiphales einem täglichen Rhythmus. Dies zeigt sich besonders bei *P. xanthii*, der einen Tag-/Nacht-Rhythmus zum Freisetzen der Konidien benötigt, während *E. cichoracearum* (= *Golovinomyces* sp.) im Gegensatz dazu seine Konidien auch in völliger Dunkelheit oder unter Dauerlicht abschnüren kann (Bertrand 1991).

Ein Einfluss der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit auf die Bildung von Fruchtkörpern von *S. fuliginea* auf Gurke wurde bei Inokulationsversuchen in Indien gefunden. In der Zeit von Dezember bis Februar wurden Chasmotheziden schneller gebildet als in den Monaten September bis November. Zwischen März und August wurden keine Ascocarpe gefunden (Khan & Khan 1970).

2.2.5.2 Physiologie und genetische Prädispositionen der Wirte und der Erreger

Die Entwicklung der Echten Mehltaupilze kann nicht ohne ihren Wirt geschehen. Die Wirtsart, ihr physiologischer Status und ihre Abwehrreaktionen, die auch gewebespezifisch sein können, beeinflussen deshalb maßgeblich das Wachstum des Pilzes.

Schon die Konidienkeimung kann von der Wirtspflanze abhängig sein. Die Keimungsrate eines *P. xanthii*-Isolates von *Cosmos bipinnatus* Cav. war auf *C. bipinnatus* doppelt so hoch wie auf *Cucumis sativus* (Hirata & Takamatsu 2001).

Dass die Konidiengröße von Umweltbedingungen, der Wirtsart und dem Wirtsalter abhängig ist, fasste Braun (1995) zusammen. Nagy (1970) konnte allerdings keinen Zusammenhang zwischen Wirtsart und Konidiengröße bei den Arten an Cucurbitaceae feststellen. Auch die Ober- oder Unterseite eines Blattes hatten keinen Einfluss. Dagegen wurde mit zunehmendem Wirts- bzw. Blattalter der Befall von *S. fuliginea* (= *P. xanthii*) an Gurken reduziert. Temmen et al. (1980) fanden als Erklärung für dieses Phänomen, eine mit dem Alter steigende Anzahl vakuolisierter Epidermiszellen. Ebenso wurde bei unterschiedlichen Gurkensorten mit steigendem Resistenzgrad eine ansteigende Anzahl vakuolisierter Zellen festgestellt. Den scheinbar genau gegenteiligen Effekt, nämlich den höchsten Krankheitsbefall an alten und mittelalten Blättern, beschrieben Jarvis et al. (2002). Doch diese Beschreibung vernachlässigt den Einfluss des Inokulationszeitpunkts und insbesondere das schnelle Wachstum von Gurken. Das heißt, dass bei Gurkenblättern, die in einem jungen Stadium infiziert worden sind, die Krankheit erst sichtbar wird, wenn sie bereits zu den mittelalten Blättern zählen.

Auch im Zusammenhang mit der Chasmothezidenbildung kann die Züchtungssorte eine Rolle spielen. Während sich auf einigen Gurkensorten Ascomata von *S. fuliginea* bildeten,

war bei der Verwendung des gleichen Inokulums auf anderen Sorten keine Fruchtkörperbildung zu beobachten (Khan & Khan 1970). Ebenso fanden Ulbrich & Smolka (1994) keine Ascomata von *S. fuliginea* und *E. cichoracearum* (= *Golovinomyces* sp.) auf einer gegen Echten Mehltau resistenten Gurkensorte, während auf der anfälligen Sorte Fruchtkörper beider Pilze gebildet wurden.

Die Erreger können auch nach ihrem Vermögen unterteilt werden, verschiedene Gattungen und Arten innerhalb der Cucurbitaceae zu befallen (Bertrand 1991). Z. B. fanden Lebeda et al. (2004) bei einem Monitoring sechs Pathotypen bei *G. cichoracearum* s. lat. und drei Pathotypen bei *P. xanthii*. Zusätzlich ist eine Einteilung in physiologische Rassen auf *C. melo* mit einem Differenzialsortiment möglich. Für *P. xanthii* können mittlerweile 28 Rassen (McCreight 2006) und für *G. cichoracearum* s. lat. 22 Rassen (Lebeda et al. 2004) unterschieden werden. Auf Gurken wurden für beide Erregergattungen noch keine Rassen gefunden. Schlösser (1979) schloss eine Rassenbildung bei Gurken auf Grund ihres hohen horizontalen Resistenzgrades aus.

Das Resistenzverhalten von Gurken kann jedoch durch eine höhere Temperatur verändert werden. Prinzipiell werden zwei Typen unterschieden: Gurken, die bei niedrigen und hohen Temperaturen (20 und 26 °C) ihre Resistenz nicht verändern und Gurkensorten, die bei 20 °C anfällig sind, aber bei 26 °C resistent werden (Munger 1979; Morishita et al. 2002 und 2003).

2.2.6 Verbreitung in Europa

Die Gattungen *Podosphaera* und *Golovinomyces* sind weltweit anzutreffen (Hirata 1968). Da beide Pilze häufig falsch identifiziert wurden, was zum Teil auf die Verwendung einer uneinheitlichen Nomenklatur zurückzuführen ist, konnte die Verbreitung der Arten in den einzelnen Ländern nicht immer sicher geklärt werden. In einer Übersicht versuchte Khan (1983) die Verbreitungssituation der beiden Erreger weltweit bis Anfang der 80er Jahre zusammenzufassen.

In ganz Europa (außer in den Niederlanden, in denen nur *P. xanthii* gefunden wurde) konnten beide Erregergattungen nachgewiesen werden, allerdings in unterschiedlichen Dominanzverhältnissen. *P. xanthii* überwog in Freiland und Gewächshauskulturen in ganz Frankreich (Bardin 1996) und in Griechenland (Vakalounakis et al. 1994), sowie in Gewächshauskulturen in den Niederlanden (Schepers 1984), in Deutschland (Schlösser 1976b; Janke et al. 1977) und in der ehemaligen Tschechoslowakei (Lebeda 1983). In West-Deutschland (Schlösser 1976b; Crüger & Meyer 1976) und in der Tschechoslowakei (Lebeda 1983; Kristkova & Lebeda 1999; Kristkova et al. 2002 und 2004) dominiert im

Freiland die Gattung *Golovinomyces*. In West-Deutschland war in Gegenden mit viel Gewächshausanbau auch das Auftreten von *P. xanthii* verstärkt zu beobachten. In Ungarn (Nagy 1970) und in der ehemalige DDR (Janke et al. 1977) wurden im Freiland beide Gattungen gefunden. Mischinfektionen, das heißt das Vorkommen beider Gattungen in einem Feld oder auf einer Pflanze, wurden von fast allen Wissenschaftlern beobachtet, allerdings in sehr unterschiedlichen Prozentsätzen: von 22% bei Schlösser (1976b) bis 68% bei Janke et al. (1977). Nagy (1970) beobachtete eine Artensukzession: nach dem ersten Auftreten von *Golovinomyces* sp. im Feld, wurde er einige Tage oder Wochen später von *P. xanthii* ersetzt, bis dann nach einiger Zeit *G. orontii* wieder überwog.

Ein guter Erklärungsansatz für die beschriebenen Verbreitungsmuster sind die unterschiedlichen Temperaturoptima der beiden Pilze. Dass aber die Temperatur nicht allein die geografische Verbreitung erklären kann, zeigt vor allem die Situation in Tschechien. Hier wurde die Gattung *Golovinomyces* auch in wärmeren Regionen gefunden, wo sie nicht von *P. xanthii* ersetzt wurde und *P. xanthii* in den letzten Jahren vor allem im kälteren Norden (Kristkova & Lebeda 1999). Des Weiteren fand man in Tschechien in Unterglaskulturen vorzugsweise *Golovinomyces* sp., ein Umstand, der auch in Deutschland durchaus möglich sein kann, wie der Fund von Ulbrich & Smolka (1994) belegt.

2.3 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

2.3.1 Das Prinzip der PCR

Nach der Beschreibung der thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) von Mullis et al. (1988) ist die Polymerase Kettenreaktion (PCR) zu einem der wichtigsten Werkzeug in der Molekularbiologie geworden. Mit Hilfe der PCR wurde es möglich, DNA-Sequenzen aus geringsten Ausgangsmengen zu amplifizieren und sie so weiteren Analysen zugänglich zu machen.

Die PCR besteht im Prinzip aus drei Schritten. Mit einer anfänglichen hohen Hitzeeinwirkung wird das doppelsträngige DNA-Molekül in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Beim nachfolgenden zweiten Schritt, dem Annealing, hybridisieren bei niedrigeren Temperaturen sequenzspezifische Oligodesoxyribonukleotide (Primer) an die Einzelstränge, die im dritten Schritt durch eine enzymatisch katalysierte Polymerisation verlängert werden (Elongation). Das Produkt ist wieder eine doppelsträngige DNA, die der Zielsequenz exakt gleicht. Durch die Wiederholung des

beschriebenen Zyklusses, wird die Produktmenge exponentiell vervielfacht. Allerdings wird mit steigender Zyklenzahl die exponentielle Produktbildung durch verschiedene Faktoren begrenzt. Die Bildung von Pyrophosphat, die Degenerierung der dNTPs, rehybridisierendes Produkt und nachlassende Enzymtätigkeit vermindern den Produktzuwachs, bis schließlich kein neues Produkt mehr gebildet wird. Die reale Produktakkumulation folgt somit einer Sättigungsfunktion. Die Produktmenge N zu einem bestimmten Zyklus $i+1$ kann dabei mit folgender diskreten Gleichung beschrieben werden:

$$N_{i+1} = N_i \cdot (1 + E_i) \quad \text{Gl. 2.1}$$

E_i gibt den Faktor an, um den sich die Produktmenge während eines Zyklusses erhöht. Er wird auch als Effizienz bezeichnet. Die Effizienz liegt im Idealfall bei eins und fällt mit dem Erreichen der Plateauphase auf null ab ($0 \leq E_i \leq 1$).

Im Laufe der Zeit wurde die PCR-Technik erweitert und verschiedenste PCR-basierte Applikationen entwickelt. Sie wird unter anderem angewendet für sensitive Pathogendetektionen, bei Sequenzierungen, phylogenetischen Analysen, Generierung und Analyse von Sequenzmutationen, ligaseunabhängigen Klonierungen und der Quantifizierung von Nukleinsäuren. Gute Beschreibungen der PCR-Prinzipien, Optimierungsstrategien und Anwendungstechniken finden sich in verschiedenen Büchern (Innis et al. 1990 und 1999; Müller 2001; Dieffenbach & Dveksler 2003).

2.3.2 Quantitative PCR (qPCR)-Methoden

Die PCR-Technik wurde relativ schnell nach ihrer ersten Beschreibung für die Quantifizierung von Nukleinsäuren verwendet. Anwendungen der qPCR auf DNA-Ebene finden sich u. a. für die Bestimmung von Genkopienzahlen (Volkenandt et al. 1992), Genomlängen und zur Genotypisierung (Wilhelm 2003), zur Quantifizierung von Viren (Piatak et al. 1993) oder ganzer Organismeneinheiten wie z.B. Sporen (Haugland et al. 2004). Auf RNA-Ebene wird sie für Transkriptionsanalysen eingesetzt (Coquer et al. 2003; Watzinger & Lion 2003).

Die Strategien zur Quantifizierung von DNA und mRNA sind prinzipiell dieselben. Allerdings macht es der zusätzliche Reverse-Transkriptase-Schritt bei der mRNA-Quantifizierung nötig, der Effizienz der cDNA-Synthese, der Wahl der Synthesepriemer, dem Primerdesign und der Auswahl eines RNA- oder DNA-Kompetitors besondere Beachtung zu schenken. Ausführliche Beschreibungen hierzu finden sich u. a. bei Gilliland et al. (1990b) und Freeman et al. (1999).

Die qPCR weist gegenüber traditionellen Quantifizierungsmethoden, die auf Hybridisierungsverfahren beruhen, wie z. B. Southern oder Northern Blot oder *in situ* Hybridisierung, einige Vorteile auf (Freeman et al. 1999). Sie bietet dem Anwender die Möglichkeit viele Proben und/oder Gene gleichzeitig zu untersuchen, gepaart mit einer sehr hohen Sensitivität, die die Detektion von sehr geringen Nukleinsäuremengen, sogar aus einzelnen Zellen, erlaubt. Die sich in den letzten Jahren durchgesetzte Variante der qPCR, die Real-Time-PCR, ist zwar gegenüber neu entwickelten Quantifizierungstechnologien, wie Microarrays, SAGE (Serial analysis of gene expression) oder Differential Display, in ihrer Eignung für den Hochdurchsatz unterlegen, sie ist aber vor allem in der absoluten Quantifizierung die akkurateste und reproduzierbarste Methode (Ding & Cantor 2004).

Die Anwendung der PCR für die Quantifizierung beruht bei den meisten Verfahren auf der Nutzung der mathematischen Beziehungen zwischen Produktakkumulation und Ausgangsmenge. Aus Gl. 2.1 ergibt sich für die gebildete Menge PCR-Produkt nach n Zyklen folgender Zusammenhang mit der Ausgangsmenge N_0 :

$$N_n = N_0 + \sum_{i=1}^n (N_{i-1} \cdot E_i) \quad \text{Gl. 2.2}$$

Für konstante Effizienzen ($E = \text{const.}$) ergibt sich daraus:

$$N_n = N_0 \cdot (1 + E)^n \quad \text{Gl. 2.3}$$

Die Berechnung der Produktmenge mit Hilfe dieser Formel ist nur zulässig, wenn sich die Reaktion in der exponentiellen Phase befindet, denn nur hier ist die Effizienz der Reaktion konstant. Da die Amplifikationseffizienzen für ein Produkt nicht von vorneherein bekannt sind, lässt sich die Ausgangsmenge N_0 nicht direkt durch die Bestimmung der Produktmenge N zum Zyklus n berechnen.

Unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Effizienz und anschließenden Berechnung der initialen Zielsequenzmenge werden unter 2.3.2.1 bis 2.3.2.3 beschrieben. Sie lassen sich nach der angewendeten Quantifizierungsstrategie in Methoden ohne, mit internem oder externem Standard einteilen. Nach ihrem Bezugspunkt kann das Quantifizierungsergebnis absolut oder relativ sein.

Die Auswertung einer qPCR kann, je nach gewählter Quantifizierungsstrategie, nach der Amplifikation durch eine Endpunktanalyse wie bei einer normalen PCR erfolgen. Übliche Methoden sind u. a. die gelelektrophoretische Auftrennung mit Fluorophorfärbung und nachfolgender videodensitometrischer Auswertung (Chehadeh et al. 1995), Hochdruck-

flüssigkeitschromatografie (HPLC) (Hayward-Lester et al. 1995) oder eine Schmelzkurvenanalyse im Real-Time-Cycler (Kusser et al. 2003; Brandfass & Karlovsky 2006). Die Standardauswertungsmethode in Real-Time-Cyclern erfolgt allerdings durch die kontinuierliche Messung der Zunahme des fluoreszenzmarkierten Produkts während des Amplifikationsprozesses im Reaktionsgefäß. Hierbei können die Produkte sowohl spezifisch mit verschiedenen Sondentechniken (Hybridisierungssonden, Molecular Beacons, etc.) als auch unspezifisch durch die Zugabe eines Fluorophors wie SYBR Green nachgewiesen werden (Kusser et al. 2003).

2.3.2.1 Methoden ohne Standard

Eine in diese Kategorie fallende beschriebene Methode ist die limitierende Verdünnungstechnik. Die Quantifizierung des DNA-Targets wird hier durch die wiederholte Amplifikation des seriell verdünnten Ausgangsmaterials erreicht. Grundlage dieses Verfahrens ist eine optimierte PCR-Reaktion, die bei der Präsenz von theoretisch einem Zielsequenzmolekül zu einem positiven PCR-Produkt führt. An dem Punkt einer Verdünnungsreihe, an dem einige der Ansatzwiederholungen zu einem positiven und andere zu einem negativen Ergebnis führen, kann mit Hilfe der Poisson-Verteilung die akkurate Kopienanzahl bestimmt werden (Sykes et al. 1992). Dieses Verfahren hat sich wegen des erheblichen zeitlichen und materiellen Aufwands nie durchgesetzt.

Eine weitere Möglichkeit besteht in einem anderen Ansatz. Zur Quantifizierung wird hier der kinetische Prozess der Produktbildung selbst benutzt. Die älteste Version dieser Methode beruht auf der kontinuierlichen Probenentnahme und Analyse der Produktmenge mit fortschreitender Zyklenzahl. Auf diese Weise wurde die Effizienz der Reaktion bestimmt und daraus die Ausgangsmenge errechnet (Wiesner 1992; Wiesner et al. 1992). Diese Methode wendeten auch Higuchi et al. (1993) an, die die Produktakkumulationskurve mit dem Vorläufermodell eines Real-Time-Cyclers bestimmten.

2.3.2.2 Methoden mit externem Standard

Wie aus Gl. 2.3 ersichtlich wird, können durch die exponentielle Vermehrung schon kleine Abweichungen in der Amplifikationseffizienz E einen großen Effekt auf die amplifizierte Produktmenge haben. Die Amplifikationseffizienz wird im Wesentlichen beeinflusst von der Länge, der Sekundärstruktur, der Menge und dem GC-Gehalt der Nukleinsäurezielsequenz beeinflusst. Des Weiteren spielen die verwendeten Primer, die Pufferbedingungen, der $MgCl_2$ -Gehalt, die Polymerase, die dNTP-Konzentration und das

Temperaturprofil der PCR eine Rolle. Auch kleine Unterschiede im Thermoblock des Cyclers können die Effizienz beeinflussen (Gilliland et al. 1990b; Favre & Rudin 1996). Deshalb können schon bei der Amplifikation verschiedener Aliquots desselben Ansatzes die Effizienzen unterschiedlich und die Produktmengen am Ende sehr verschieden sein (Gilliland et al. 1990a). Aus diesem Grund ist eine Standardisierung der Quantifizierung notwendig, die es erlaubt, Ergebnisse aus zwei oder mehreren Reaktionsgefäßen, miteinander zu vergleichen. Die Standardisierung wird gegen die konstante Menge einer anderen Nukleinsäure vorgenommen. Je nach der Amplifikation des Standards, im selben oder einem getrennten Reaktionsgefäß, werden externe oder interne Standards unterschieden. Wenn die Menge des Standards bekannt ist, ist eine absolute Quantifizierung möglich, wenn seine Menge nicht bekannt ist, eine relative.

Die einfachste Form der Standardisierung erfolgt durch den Vergleich der zu quantifizierenden Produktmenge mit den Produkten von seriell verdünnten Mengen bekannter Konzentration derselben Zielsequenz (Ferre 1992). Das Problem dieser Methode liegt in der oben beschriebenen Variabilität der PCR-Produkte in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen und der strikten Limitierung der Reaktion auf den linearen Teil der Produktakkumulationskurve.

Externe Standards in dieser Form werden heute hauptsächlich bei der Quantifizierung in Real-Time-Cyclern mit der Generierung von Standardkurven über die C_T -Werte angewendet. Die C_T -Werte geben dabei jenen Schwellenwertzyklus an, ab dem sich die PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase befindet. Durch die Bestimmung der C_T -Werte unterschiedlicher Zielsequenzmengen und eine anschließende Regressionsanalyse gegen die Logarithmen ihrer bekannten Konzentrationen kann eine Standardkurve erstellt werden. Durch den C_T -Wert einer unbekannt Konzentration kann nun mit Hilfe der Standardkurve die Ausgangsmenge der Zielsequenz ermittelt werden. Dies Verfahren ist momentan das meist verwendete bei der absoluten Quantifizierung. Allerdings ist die Genauigkeit der Ergebnisse erheblich von der Präzision der Bestimmung der C_T -Werte abhängig. Genauere Untersuchungen hierzu finden sich bei Wilhelm (2003).

2.3.2.3 Methoden mit internem Standard

Die in Kombination mit Endpunktanalysen häufig vorkommende Art der Quantifizierung ist die Verwendung von internen Standards. Das Prinzip beruht auf der Koamplifikation einer zweiten Sequenz im selben PCR-Ansatz, deren Menge bekannt oder in allen Ansätzen konstant ist und gegen die sich die gesuchte Produktmenge normieren lässt. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass beide Sequenzen den gleichen

Amplifikationsbedingungen ausgesetzt sind und auf diese Weise Vergleiche zwischen verschiedenen Proben problemlos möglich werden.

Häufig wird versucht, eine Normierung des amplifizierten Produkts über die Menge an Gesamt-DNA zu erreichen. Hierzu wird mit einer Multiplex-PCR ein bestimmter Bereich der genomischen DNA koamplifiziert und als interner Standard herangezogen. Verwendet werden meist Gene, deren Kopienzahl bekannt ist oder, im Falle von mRNA-Quantifizierung, sogenannte „housekeeping“ Gene, die fortwährend exprimiert werden und deren Transkriptzahl als konstant angesehen wird (Raeymaekers 1995). Doch neuere Studien zeigen, dass der Expressionsgrad von „housekeeping“ Genen beträchtlich schwanken kann (Dheda et al. 2004; Pfaffl et al. 2004). Andere Nachteile liegen in der möglichen unterschiedlichen Amplifikationseffizienz bedingt durch die heterologe Sequenz und der Längendifferenz des Standards sowie in der gleichzeitigen Verwendung verschiedener Primerpaare¹.

Die genaueste Quantifizierung kann erfolgen durch die Zugabe einer bekannten Konzentration eines extern generierten Fragments. Dieser Kompetitor wird mit denselben Primern amplifiziert wie das Target und sollte auch ansonsten der Zielsequenz möglichst ähnlich sein. Die Idee dabei ist, dass durch die Ähnlichkeit der beiden Sequenzen der Kompetitor genau denselben Amplifikationsbedingungen unterworfen ist wie die Zielsequenz und dass alle limitierenden Bedingungen gleichzeitig auf Zielsequenz und Kompetitor einwirken. Die Effizienz der Amplifikation beider Fragmente ist somit über den gesamten Amplifikationsprozess gleich. Unter dieser Voraussetzung ist eine Quantifizierung auch über die exponentielle Phase hinaus möglich (Cottrez et al. 1994). Die Quantifizierung mit Hilfe von Kompetitoren erlaubt auch die Ausweitung der Detektionsgrenzen durch die Verwendung eines „nested“ PCR-Ansatzes (Haff 1994).

2.3.3 Design von Kompetitoren

Da der Kompetitor der Zielsequenz möglichst ähnlich sein soll, bietet es sich an, die Zielsequenz selbst als Kompetitor zu benutzen und durch kleine Sequenzunterschiede analytisch differenzierbar zu machen. Unterschiede können in durch Deletion oder Insertion entstandenen Längenpolymorphismen bestehen. Hierdurch wird der Kompetitor schon während der analytischen Auftrennung von der Zielsequenz unterscheidbar. Auch

¹ Die Begriffe des internen und externen Standards werden in der Literatur heterogen verwendet. Von einigen Autoren wird die Multiplexvariante des internen Standards auch als externer Standard bezeichnet.

mittels PCR-Mutagenese punktmutierte Restriktionsschnittstellen können zur Unterscheidung herangezogen werden. Nach einem Verdau des PCR-Produkts lassen sich Zielsequenz und Kompetitor voneinander trennen (Gilliland et al. 1990b). Je ähnlicher (homolog) die Kompetitorsequenz aber der Zielsequenz ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Heteroduplex-Fragmenten (McCulloch et al. 1995; Zimmermann & Mannhalter 1996). Hierbei hybridisiert nach der Denaturierung ein Einzelstrang des Kompetitors mit einem Einzelstrang der Zielsequenz. Heteroduplexe sind nicht mehr verdaubar, es kommt bei der folgenden Analytik zu einer Überschätzung des ungeschnittenen Targets. Um die Bildung von Heteroduplexen zu vermeiden, werden heterologe Kompetitorsequenzen verwendet die zwar mit denselben Primern amplifizierbar sind, sich in ihrer Sequenz und/oder Länge aber vollkommen von der Zielsequenz unterscheiden. Dabei muss immer beachtet werden, dass längere Sequenzen mit einer niedrigeren Effizienz als kürzere amplifiziert werden (McCulloch et al. 1995).

Es gibt eine große methodische Vielfalt Kompetitorsequenzen zu konstruieren. Eine sehr einfache Methode beschrieben Caballero et al. (1995), indem sie die unter nicht stringenten Bedingungen amplifizierten unspezifischen PCR-Produkte als Kompetitorsequenzen betrachteten, gegen die eine relative Quantifizierung der Zielsequenz erfolgen konnte. Eine absolute Quantifizierung wird hingegen möglich, wenn ein solches unspezifisches Produkt aufgereinigt, quantifiziert und in die PCR eingesetzt wird (Förster 1994b). Ein Kompetitor kann auch durch die Benutzung so genannter Linker- (Förster 1994a) oder Hybridprimer (Watzinger et al. 2001) mittels PCR amplifiziert oder auch gleich komplett synthetisiert werden (Fille et al. 1997). Klonierungs- (Zimmermann & Mannhalter 1996) und Ligationsverfahren (Siebert & Larrick 1993) wurden ebenfalls beschrieben.

2.3.4 Durchführung einer kompetitiven qPCR

Die Quantifizierung erfolgt durch die Titration verschiedener Verdünnungen des Kompetitors gegen die gleiche Konzentration der Zielsequenzmenge. In der nachfolgenden Analyse wird das Verhältnis von Kompetitor- zu Zielsequenzmenge bestimmt und dessen Logarithmus gegen den Logarithmus der eingesetzten Kompetitorsequenz in einem Plot aufgetragen. An dem Punkt, an dem das Verhältnis von Kompetitor zur Zielsequenz eins ist ($\log = 0$), liegt der Äquivalenzpunkt und die Mengen von Kompetitor und Zielsequenz sind gleich. Mögliche Ungleichheiten in der Amplifikationseffizienz von Kompetitor und Target können durch die Verwendung eines Korrekturfaktors in einem gewissen Rahmen ausgeglichen werden (McCulloch et al. 1995). Bei vielen Proben verursacht dieses Verfahren jedoch einen hohen zeitlichen und materiellen Aufwand. Dieser Aufwand kann jedoch verringert werden, wenn die

Zielsequenz ebenfalls separat, z. B. auf einem Plasmid vorliegt. Titriert man im Vorfeld unterschiedliche Zielsequenzmengen gegen eine gleich bleibende Menge Kompetitor, so lässt sich aus dem Verhältnis dieser beiden Banden, aufgetragen gegen die eingesetzte Menge an Zielsequenz eine Standardkurve erstellen. Allerdings wurde gezeigt, dass das Quantifizierungsergebnis am genauesten ist, je ähnlicher die Mengen von Kompetitor und Zielsequenz sind (Zimmermann & Mannhalter 1996).

Mehrere weitere Methoden wurden entwickelt, um den experimentellen Aufwand zu minimieren. Callaway et al. (2002) konnten, in Kombination mit einer mathematischen Formel, die Reaktionsansätze auf zwei reduzieren. Ein von Serth et al. (1998) beschriebenes Verfahren nutzt die Bildungskinetik der Heteroduplexes bei der Verwendung eines homologen Kompetitors. Durch die Bestimmung der relativen Verhältnisse aller drei Fragmente kann die Zielsequenzmenge errechnet werden. Eine andere Strategie verfolgten Szibor & Morawietz (2002), die den seriell verdünnten Kompetitor nicht in mehrere unterschiedliche PCR-Ansätze gaben, sondern Verdünnungen von sich unterscheidenden Kompetitorfragmenten in einen Ansatz. Eine Quantifizierung ist auf diese Weise innerhalb eines Gefäßes möglich.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 3.1 Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Binokular	MZ75	Leica, Wetzlar
Blattflächenmessgerät	Modell 3100 area meter	LI-COR, Lincoln, USA
Elektrophoresekammer	Horizontal Mini (8,2x10,5 cm)	Harnischmacher, Kassel
Elektrophoresekammer	Mighty Small II SE 250 Mini Vertical Unit (8x10 cm)	Hoefer, San Francisco, USA
Feinwaage	analytic A 200 S	Sartorius, Göttingen
Heizblock	Dir-Block DB3	Techne, Jahnsdorf
Horizontalschüttler	Vibrax-VXR Typ VX7	IKA, Staufen
Inkubationsschüttler	Certomat IS Rel 01	B. Braun, Melsungen
Kaltlichtquelle für Binokular	KL 1500 LCD	Leica, Wetzlar
Kreisschüttler	MS 2 Minishaker	IKA, Staufen
Kühlzentrifuge mit Festwinkelrotoren	RC 5 B plus SS-35, GSA	Sorvall, Bad Homburg
Kühlzentrifuge mit Festwinkelrotoren und Ausschwingrotor	4 K 10 Nr. 12167 Nr. 11140	Sigma, Osterode am Harz
Lichtthermostat	Typ 1301	Rumed, Laatzen
Magnetrührer mit Heizung	RH basic KT/C	IKA, Staufen
PCR-Arbeitsplatz	Template Tamer	Qbiogene, Carlsbad, USA
Pipetten	2, 20, 200 und 1000 µL	Abimed, Langenfeld
Spannungsquelle	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank	Lamina Air HA 2448 GS	Heraeus, Hanau
Sterilisationsschrank	TV40u	Memmert, Schwabach
Stereolichtmikroskop	473011-9901	Carl Zeiss, Jena
Thermocycler	Tgradient	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Tpersonal	Biometra, Göttingen
Thermocycler	T3	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Minispin	Eppendorf, Hamburg
UV-Spektrophotometer	DU 640	Beckman, Fullerton, USA

Fortsetzung von Tabelle 3.1

Gerät	Typ	Hersteller
UV-Transilluminator	MW312	Intas, Göttingen
Vakuumentrifuge mit Kompressor	Hetovac VR-1 CT60 e	Heto-Holten, Allerød, DK
Videodokumentationssystem	Gel Jet Imager System	Intas, Göttingen
Videoprinter	P 91 D	Mitsubishi, Ratingen
Wasserbad	F3	Haake, Karlsruhe
Wasserstrahlpumpe		Haake, Karlsruhe

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 3.2 Feste Chemikalien.

Chemikalie	Abkürzung	Hersteller
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure-Monohydrat	MES	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	MOPS	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galactopyranosid	X-Gal	Roth, Karlsruhe
Agar		Fluka, Steinheim
Agarose für die Elektrophorese		Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumacetat	NH ₄ Ac	Sigma, Steinheim
Ammoniumpersulfat	APS	Serva, Heidelberg
Ampicillin		Serva, Heidelberg
BactoTryptone		Difco, Detroit, USA
Benzimidazol		Merck, Darmstadt
Borsäure		Merck, Darmstadt
Bromphenolblau		Serva, Heidelberg
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Cetyltrimethylammoniumbromid	CTAB	Fluka, Steinheim
Chelex [®] 100		Bio-Rad, München
D(-)-Mannit	Mannitol	Roth, Karlsruhe
D-(+)-Glucose	Glukose	Sigma, Steinheim
Dithiothreitol	DTT	ICN, Eschwege
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	EtBr	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat	EDTA	Merck, Darmstadt
Hexaminocobalttrichlorid	HaCoCl ₃	Sigma, Steinheim
Isopropyl-b-D-Thiogalactosidase	IPTG	Roth, Karlsruhe

Fortsetzung von Tabelle 3.2

Chemikalie	Abkürzung	Hersteller
Kaliumacetat	KAc	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	KOH	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Manganchlorid-Dihydrat	MnCl ₂	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	NaAc	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat Ultra Pure	SDS	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumperchlorat-Monohydrat	NaClO ₄	AppliChem, Darmstadt
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	Tween20	Fluka, Steinheim
Rubidiumchlorid	RbCl	Sigma, Steinheim
Saccharose		Sigma, Steinheim
Select Peptone 140		Gibco BRL, Eggenstein
Tetracyclin-Hydrochlorid		Fluka, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	Roth, Karlsruhe
Yeast Extract		Serva, Heidelberg

Tabelle 3.3 Flüssige Chemikalien.

Chemikalie	Abkürzung	Hersteller
Acrylamid (1:19)		Roth, Karlsruhe
Chloroform (reinst.)		Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	DMF	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxyd	DMSO	Serva, Heidelberg
Essigsäure (100%)	Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	EtOH	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	EtBr	Roth, Karlsruhe
Glycerin (99,5%)		Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol		Sigma, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	TEMED	Serva, Heidelberg
Natriumhypochlorit-Lösung	NaOCl	Merck, Darmstadt
Quantum Prep Matrix Suspension		Bio-Rad, München
Tetramethylammoniumchlorid	TMAC	Roth, Karlsruhe
Triton X-100		Roth, Karlsruhe
Xylencyanol		Sigma, Steinheim

3.1.3 Datenbanken

Tabelle 3.4 Datenbanken.

Datenbank	Internetadresse
Entrez Nucleotide	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide

3.1.4 Software

Tabelle 3.5 Software.

Programm	Hersteller
ClustalX 1.8	Thompson et al. (1997)
BioEdit 5.0.9	Hall (1999)
Gel-Dokumentation Intas GDS, 2002	Intas, Göttingen
Gel-Pro Express 4.0, 2001	Intas, Göttingen
Microsoft® Office Excel 11.0, 2003	Microsoft, Unterschleißheim
Sigma Plot 8.0, Demo Version	SPSS GmbH, München
SPSS 14.0	SPSS GmbH, München
Vector NTI Advance 10.1.1	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.5 Sonstiges Material

Tabelle 3.6 Sonstiges Material.

Sonstiges Material	Hersteller
Filterpapier, Ø 185 mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Fischbach-Compact-Gebläse D440/E 100-4	Fischbach, Neunkirchen
Fruhstorfer Erde (Typ P)	Hawita, Vechta
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Brand, Wertheim
Petrischalen mit Nocken, Ø 6 cm	Greiner, Frickenhausen
Schwebstofffilter HS-Mikro SF, H13 (762x610x150 mm)	HS-Luftfilterbau, Kiel
Sprühfläschchen (30 mL)	Apothekerbedarf
Wuxal Top N Flüssigdünger (12-4-6)	Aglukon, Düsseldorf

3.1.6 Bakterienstamm zur Klonierung

Tabelle 3.7 Bakterienstamm.

Art/Gattung	Stamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	NM 522	Pharmacia, jetzt Pfizer, Karlsruhe

3.1.7 Restriktionsenzyme

Tabelle 3.8 Restriktionsenzyme.

Enzym	Erkennungsmotiv (5'-3')	Konzentration	Hersteller	Reaktionspuffer*
<i>Bgl</i>	GCCNNNN [^] NGGC	10 U/ μ L	Fermentas, St. Leon-Rot	O
<i>Bsp120I</i>	G [^] GGCCC	10 U/ μ L	Fermentas, St. Leon-Rot	B
<i>DpnI</i>	GA [^] TC	10 U/ μ L	Fermentas, St. Leon-Rot	Tango [™]
<i>EcoRI</i>	G [^] AATTC	10 U/ μ L	Fermentas, St. Leon-Rot	Puffer <i>EcoRI</i>
<i>Hin6I</i>	G [^] CGC	10 U/ μ L	Fermentas, St. Leon-Rot	Tango [™]
<i>NarI</i>	GG [^] CGCC	4 U/ μ L	NEB, Frankfurt a. M.	NEBuffer 1
<i>PstI</i>	GTGCA [^] G	10 U/ μ L	Fermentas, St. Leon-Rot	O
<i>RsaI</i>	GT [^] AC	10 U/ μ L	Genecraft, Lüdinghausen	L

* Pufferzusammensetzungen laut Herstellerangaben.

1x Puffer O (orange)

50 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37 °C
10 mM MgCl₂
100 mM NaCl
0,1 mg/mL BSA

1x Puffer B (blau)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37 °C
10 mM MgCl₂
0,1 mg/mL BSA

1x Puffer Tango[™] (yellow)

33 mM Tris-Acetat, pH 7,9 bei 37 °C
10 mM Magnesiumacetat
66 mM Kaliumacetat
0,1 mg/mL BSA

1x Puffer *EcoRI*

50 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37 °C
10 mM MgCl₂
100 mM NaCl
0,02% (v/v) Triton X-100
0,1 mg/mL BSA

1x NEBuffer 1

10 mM Bis-Tris-Propane-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTT

1x Puffer L

10 mM Tris-HCl, pH 7,5 bei 37 °C
10 mM MgCl₂
1 mM DTE

3.1.8 Enzyme und Nukleotide

Tabelle 3.9 Enzyme und Nukleotide.

Enzyme und Nukleotide	Konzentration	Hersteller	Reaktionspuffer*
AccuTherm [™] DNA-Polymerase	5 U/ μ L	Genecraft, Lüdinghausen	5x AccuTherm-Reaktionspuffer
BioTherm [™] DNA-Polymerase	5 U/ μ L	Genecraft, Lüdinghausen	10x BioTherm-Reaktionspuffer
KlenTherm [™] DNA-Polymerase	10 U/ μ L	Genecraft, Lüdinghausen	10x KlenTherm-Reaktionspuffer
Phusion [™] High-Fidelity DNA-Polymerase	2 U/ μ L	Finnzymes, Espoo, FI	5x Phusion HF Puffer [°]
Proteinase K	20 mg/mL	Boehringer, Ingelheim	

Fortsetzung von Tabelle 3.10

Enzyme und Nukleotide	Konzentration	Hersteller	Reaktionspuffer*
RNase A	75 U/mg	Fluka, Steinheim	
T4 DNA Ligase	1 U/ μ L	Fermentas, St. Leon-Rot	10x Ligationspuffer
T4 Polynucleotide Kinase	2,5 U/ μ L	Fermentas, St. Leon-Rot	10x Puffer A (dazu 10 mM ATP)
Deoxynucleoside Triphosphat Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 100 mM	Genecraft, Lüdinghausen	

* Pufferzusammensetzungen laut Herstellerangaben.

° Die Pufferzusammensetzung wurde vom Hersteller nicht veröffentlicht.

5x AccuTherm-Reaktionspuffer

83 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 350 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25 °C
 100 mM KCl
 22 mM MgCl_2
 0,75 % (v/v) Triton X-100

10x BioTherm-Reaktionspuffer

160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 670 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25 °C
 15 mM MgCl_2
 0,1 % (v/v) Tween 20

10x Reaktionspuffer A

500 mM Tris-HCl, pH 7,6 bei 25 °C
 100 mM MgCl_2
 50 mM DTT
 1 mM Spermidine
 1 mM EDTA

10x Klentherm-Reaktionspuffer

500 mM KCl
 100 mM Tris-HCl, pH 9 bei 25 °C
 35 mM MgCl_2
 1 % (v/v) Triton X-100

10x Ligationspuffer

400 mM Tris-HCl, pH 7,8 bei 25 °C
 100 mM MgCl_2
 100 mM DTT
 5 mM ATP

3.1.9 Reaktionskits

Tabelle 3.10 Reaktionskits.

Bezeichnung	Hersteller
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
DNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
pGEM T easy Vektor*	Promega, Mannheim
pGEM T Vektor*	Promega, Mannheim
HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

* inklusive T4 DNA-Ligase und Ligationspuffer

2x Ligationspuffer (pGEM T easy und pGEM T)

60 mM Tris-HCl, pH 7,4
 20 mM MgCl_2
 20 mM DTT
 2 mM ATP
 10 % PEG

3.1.10 DNA-Standards

Tabelle 3.11 DNA-Standards.

DNA-Standard	Konzentration	Hersteller
pBR322/ <i>BsuRI</i>	0,5 µg/µL	Fermentas, St. Leon-Rot
Hyperladder I	144 ng/µL	Bioline, Luckenwalde
λ-Phagen DNA	0,3 mg/mL	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>λPstI</i>		selbst, s.u.

λPstI für die Agarosegelelektrophorese

Der Fragmentlängenstandard *λPstI* wurde durch eine vollständige Restriktionsspaltung von λ-Phagen DNA mit *PstI* hergestellt. Hierzu wurden 140 µL λ-Phagen-DNA mit 8 µL *PstI* und 30 µL 10x O-Puffer in einem mit *A. bidest.* aufgefüllten Gesamtvolumen von 300 µL für 3 h bei 37 °C verdaut. Danach wurde das Enzym 15 min bei 70 °C im Wasserbad inaktiviert, mit 100 µL Gelladepuffer (siehe 3.8.3) versetzt und gemischt. Die Lagerung des aliquotierten Standards erfolgte bei -20 °C. Standardmäßig wurden 3 µL dieses Ansatzes als Größenmarker auf ein Agarosegel aufgetragen (Fragmentgrößen siehe Anhang Abbildung 7.1).

3.1.11 Pflanzenmaterial

Tabelle 3.12 Pflanzenmaterial.

Art/Gattung	Sorte	Züchter/Vertrieb
<i>Cucumis sativus</i>	'Delikatess'	Weigelt & Co., Walluf
<i>Cucumis sativus</i>	'Chinesische Schlange'	Weigelt & Co., Walluf

3.1.12 Verwendete Pilzisolat

Tabelle 3.13 Herkunft der verwendeten Pilzisolat.

Isolat	Datum	Herkunft	Wirt
Gz02.2	09/2002	Hannover, Vinnhorst, Freiland	<i>Cucurbita pepo</i>
Gk02.2	09/2002	Hannover, IPP, Freiland	<i>Cucurbita maxima</i>
Gg03.1	07/2003	Hannover, IPP, Freiland	<i>Cucumis sativus</i>
Sf2	02/2003	Dr. M. Bardin, INRA, Frankreich	<i>Cucumis melo</i>
Pg03.1	09/2003	Hannover, IPP, Gewächshaus	<i>Cucumis sativus</i>
Pg03.2	09/2003	Hannover, IPP, Gewächshaus	<i>Cucumis sativus</i>

Fortsetzung von Tabelle 3.13

Isolat	Datum	Herkunft	Wirt
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	2006	DSMZ, Braunschweig, Isolat 4624	<i>S. fuliginea</i> * auf <i>Leontodon</i> sp.
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	2006	DSMZ, Braunschweig, Isolat 2222	<i>E. cichoracearum</i> ° auf <i>Cucumis</i> sp.
<i>Chaetomium globosum</i>	2003	Hannover	Kontaminationspilz
<i>Cladosporium</i> sp.	2003	Hannover	Kontaminationspilz
<i>Fusarium</i> sp.	2003	Hannover	Kontaminationspilz
<i>Geomyces</i> sp.	2003	Hannover	Kontaminationspilz

* (= *P. fusca*)° (= *G. orontii*)

3.1.13 Datenbanksequenzen

Tabelle 3.14 Datenbanksequenzen.

Art	Wirt	Herkunft und Isolat	Datenbank ID-Nr.
<i>G. orontii</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	Ungarn, MUMH677	AB077670
<i>G. orontii</i> *	<i>C. pepo</i>	Frankreich, Ecr1	AF229016
<i>G. orontii</i>	<i>C. pepo</i>	Frankreich, Ecr3	AF229017
<i>G. orontii</i>	<i>Valerianiella cf. uncinata</i>	Iran, KAR516	AB077693
<i>G. orontii</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Japan	AB022413
<i>P. xanthii</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Japan, 97-6	AB040322
<i>P. xanthii</i>	<i>Cosmos bipinnatus</i>	Japan, MUMH315	AB040299

* Dieses Isolat könnte zu *G. cucurbitacearum* gehören (Matsuda & Takamatsu 2003).

3.2 Anzucht von Pflanzenmaterial

Die komplette Anzucht erfolgte in einer speziellen Gewächshauskabine, in der die Pflanzen bis zum Versuchsbeginn befallsfrei kultiviert werden konnten. Die Heiz- und Lüftungstemperaturen betragen über die gesamte Kulturdauer 20 °C bzw. 22 °C. In den Wintermonaten erfolgte eine Zusatzbeleuchtung mit Assimilationslicht.

Die Aussaat der Gurken erfolgte in Aussaatschalen. Nach der einwöchigen Auflaufphase wurden die Pflanzen in 11er Töpfe getopft. Als Substrat diente Fruhstorfer P-Erde. Eine Düngung erfolgte wöchentlich mit 0,2 % Wuxal.

3.3 Echte Mehltau-Erhaltung

Für diese Arbeit erwies es sich als essenzielle Voraussetzung, Echten Mehltau *in vitro* in Petrischalen erhalten zu können. Auf diese Weise konnten verschiedene Isolate beider Echter Mehltau-Arten ohne die Gefahr der Vermischung in Reinkultur vermehrt werden. Die Methodik der Echten Mehltau-Erhaltung wurde basierend auf der Methode von Nicot et al. (2002) modifiziert und am IPP etabliert. Die Modifizierungen bestanden in der Vermeidung von Quecksilber als Desinfektionsmittel und in der Wahl der Gurkensorte 'Delikatess' an Stelle der Sorte 'Marketer', da Letztere nur noch schwer auf dem Markt erhältlich ist.

Alle folgenden beschriebenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.3.1 Oberflächensterilisation von Gurkenkotyledonen

Sieben bis 10 Tage alte Kotyledonen der Gurkensorte 'Delikatess', die wie unter 3.2 angezogen worden waren, wurden mit einem Skalpell an der Basis abgeschnitten, in ein Sieb gegeben und vorsichtig mit Leitungswasser von Erdresten befreit. Danach wurden die Blätter unter vorsichtigem Rühren mit einem Drigalskispatel für 5 min in der Desinfektionslösung sterilisiert und zweimal in sterilem *A. dest.* für je 3 min gewaschen und auf sterilem Filterpapier getrocknet. Mit einer Federstahlpinzette wurden die Kotyledonen in mit MSA gefüllte Petrischalen gelegt und an der Basis leicht angedrückt.

Wurden die Kotyledonen nicht sofort verwendet, konnten sie bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert werden. Zur vollständigen Erhaltung der Funktionsfähigkeit und vor allem des Chlorophyllgehalts der Blätter war es wichtig, einen Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h zu gewährleisten. Dies wurde mit einem zusätzlichen Beleuchtungsrahmen sichergestellt, der in einem Kühlagerraum installiert worden war. Vor der Verwendung von gekühlten Kotyledonen wurde darauf geachtet, dass sämtliches Kondenswasser aus den Petrischalen verdunsten konnte. Zu diesem Zweck wurden die Petrischalen ca. 1 h vor dem Gebrauch unter sterilen Bedingungen bei RT getrocknet.

MSA (Mannitol-Saccharose-Agar)

20 g/L Mannitol
10 g/L Saccharose
7 g/L Agar
autoklavieren
nach Abkühlen auf 50 °C zufügen:
25 mg/L Tetracyclin-hydrochlorid
30 mg/L Benzimidazol

Desinfektionslösung

steriles *A. dest.*
0,5 % NaOCl (v/v)
2 % EtOH (v/v)
0,1 % Tween 20 (v/v)
200 mL reichen für die Sterilisation
von 25-30 Kotyledonen

3.3.2 Monosporisolate

Die Technik der Isolierung einzelner Konidien wurde einerseits zur Sicherstellung der Homogenität bei der Anlage neuer Isolate angewandt, andererseits auch, um mit Mikroorganismen verunreinigte Isolate von den Kontaminationen zu befreien und sauber weiter kultivieren zu können. Die Isolierung einzelner Konidien erfolgte nach der bei Nicot et al. (2002) beschriebenen Methode.

Mit Hilfe einer an einem Metallstäbchen befestigten Wimper wurde unter dem Binokular eine Konidie von einer Kolonie abgenommen und auf ein steriles Kotyledon gelegt. Da der Infektionserfolg bei ca. 50 % lag, wurden mehrere Konidien vereinzelt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und bei 22 °C und einem 16/8 h Tag/Nacht-Rhythmus für ca. 14 Tage in einem Lichtthermostat inkubiert. Waren mehrere Konidien bei der Infektion erfolgreich, wurde eine Monosporenkolonie zur weiteren Vermehrung und Erhaltung des Isolats ausgewählt und die anderen vernichtet. Konidien der ausgewählten Monosporenkolonie wurde auf frische Kotyledonen überimpft, wie unter 3.3.3 beschrieben erhalten und vermehrt.

3.3.3 Überimpfung und Erhaltung der Echten Mehltau-Isolate

Mit einer ausgeglühten und wieder erkalteten Impföse wurden Konidien von einer gut sporulierenden Kolonie abgenommen und auf dem neu zu infizierenden sterilen Kotyledon verteilt. Die Petrischale wurde mit Parafilm verschlossen und bei 22 °C und einem 16/8 h Tag/Nacht-Rhythmus für eine Woche in einem Lichtthermostat inkubiert. Nach der erfolgreichen Infektion und sichtbar gutem Wachstum der Pilze wurden die Petrischalen bei 4 °C mit einem 16/8 h Tag/Nacht-Rhythmus aufbewahrt. Eine Überimpfung auf frische Kotyledonen erfolgte alle vier bis fünf Wochen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Überimpfen der Isolate der beiden Gattungen zeitlich oder räumlich voneinander getrennt wurde.

Die Kontrolle auf eine mögliche Vermischung der Arten wurde in regelmäßigen Abständen durch das Überprüfen der Konidien auf die Präsenz oder Absenz von Fibrosinkörpern durch Bleichen mit 3 % KOH vorgenommen. Vor jeder Verwendung wurden die Kolonien ebenfalls auf Kontaminationspilze überprüft. Kontaminierte Kotyledonen wurden entfernt. Häufig zu findende Kontaminationspilze waren *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Geomyces* sp. und *Chaetomium globosum*. Die Kontamination mit Letzterem konnte durch das zeitweise Aussparen der Saccharose im Medium verhindert werden.

3.3.4 Herstellung von Inokulum

Bei der Herstellung von Inokulum für Versuche mussten mehreren Kriterien beachtet werden: erstens wurden sehr viele Konidien benötigt und zweitens sollten die Konidien möglichst gleich alt und keimfähig sein. Zu diesem Zweck wurden mehrere sterile Kotyledonen wie unter 3.3.3 beschrieben mit Konidien des gewünschten Echten Mehltau-Isolats beimpft. Bei der Kalkulierung der erforderlichen Kotyledonenanzahl wurde die auf der Erfahrung basierende Menge von ca. $4 \cdot 10^5$ Konidien angesetzt, die von einem mit *G. orontii* voll bewachsenen Kotyledon geerntet werden können. Da *P. xanthii* in der Erhaltung nicht so üppig wie *G. orontii* wuchs, wurde hier nur mit der Hälfte der zu erntenden Konidien kalkuliert.

Die beimpften Kotyledonen wurden bei 22 °C und einem 16/8 h Tag/Nachtrhythmus für 10 bis 11 Tage inkubiert. Diese Zeitspanne richtete sich nach den Untersuchungen von Bertrand (1991), der die höchste Qualität des Inokulums, gemessen in dem Verhältnis von lebenden zu toten Konidien, 9 bis 11 Tage nach der Inokulation der Kotyledonen fand.

3.4 Oligonukleotidprimer

3.4.1 Planungskriterien für Oligonukleotidprimer

Oligonukleotidprimer, kurz Primer, wurden mit dem Programm Vector NTI geplant. Zur Planung von consensus Primern, die für die gattungsübergreifende Amplifikation der rDNA-ITS-Region benutzt werden sollten, wurden in der NCBI-Datenbank vorhandene rDNA-ITS-Sequenzen verschiedener Erysiphales-Taxa herangezogen. Artspezifische Primer wurden anhand von Sequenzen der eigenen Isolate entwickelt.

Die Programmparameter wurden so gewählt, dass die Länge der Primer zwischen 18 und 30 bp betragen und der GC-Gehalt zwischen 40-60 % liegen sollte. Basenwiederholungen sollten vermieden werden und der Primer keine Sekundärstrukturen bilden. Bei Primerpaaren wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur (T_m) aneinander angeglichen war. Um die Bildung von Primerdimerprodukten zu vermeiden, sollten Primerpaare keine Komplementärsequenzen enthalten. Die Spezifität eines Primerpaars wurde in der NCBI-Datenbank mit einer BLAST-Suche (Altschul et al. 1997) nach Nukleotidübereinstimmungen oder nach kurzen, fast exakten Übereinstimmungen in anderen Mikroorganismen und humaner DNA überprüft.

Bei der Entwicklung von consensus Primern oder Primern für die Mutagenese wurde zusätzlich darauf geachtet, dass Fehlpaarungen am 5'-Ende lagen. Primer, mit denen

Produkte für die T/A-Klonierung amplifiziert werden sollten, wurden um ein A am 5'-Ende erweitert. Hierdurch sollte die 3'-Anendolyierungsaktivität der Polymerase gesteigert werden (siehe 3.6).

Da mit Hilfe der Software die Entwicklung von artspezifischen Primern auf der rDNA-ITS-Region limitiert war, wurden Primer auch manuell auf heterologen Sequenzen entwickelt. Mögliche suboptimale Primereigenschaften wurden zu Gunsten der gewonnenen Spezifität in Kauf genommen.

3.4.2 rDNA-ITS-Region

Die molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten auf der nuklearen genomischen rDNA-ITS-Region (Abbildung 3.1). Diese DNA-Sequenz kodiert für die RNA der Ribosomen (rRNA) und ist in seriell wiederholten Einheiten zu finden. Eine Einheit besteht aus einem externen transkribierten Spacer (ETS), dem 18S-rRNA-Gen, den internen transkribierten Spacern (ITS1 und ITS2), zwischen denen das 5.8S rRNA-Gen liegt und dem sich anschließenden Gen für die 28S rRNA. Ein nicht transkribierter Spacer (NTS) trennt die rRNA-Operons voneinander (Gerbi 1985; Hillis & Dixon 1991).

Die Arbeit auf dieser Region bietet einige Vorteile. Zum einen ist auf Grund der Vielzahl der im Genom vorhandenen Kopien die Amplifikation eines PCR-Produkts ohne Schwierigkeiten möglich, ohne Extrema in den PCR-Bedingungen provozieren zu müssen. Des Weiteren sind schon viele Primer zum Amplifizieren von Abschnitten unterschiedlicher Länge in der Literatur beschrieben worden: zur Diskriminierung von pflanzlicher und pilzlicher-DNA (Jobes & Thien 1997), universelle Primer, die jede Pilz-DNA als Template akzeptieren (White et al. 1990) oder zur spezifischen Amplifikation von Basidiomyceten- (Gardes & Bruns 1993) oder Erysiphaceae-DNA (Takamatsu & Kano 2001). Unterschiedliche Regionen der rDNA-ITS-Region evolvieren mit unterschiedlichen Raten. Aus diesem Grund eignet sich diese Region mit ihren abwechselnd

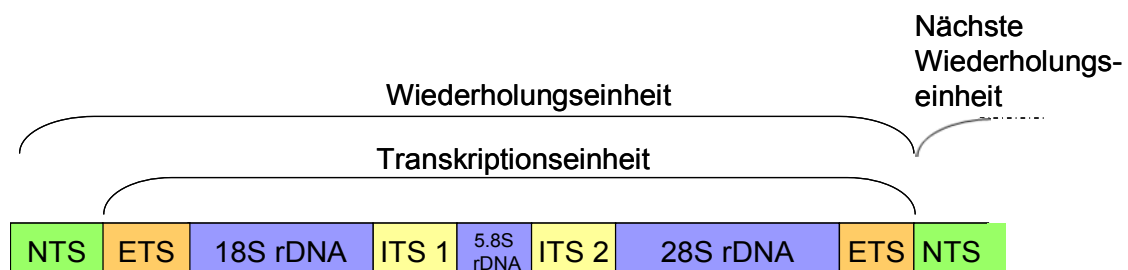


Abbildung 3.1 rDNA-ITS-Region.

Dargestellt sind die Transkriptions- und Wiederholungseinheit einer rDNA-ITS-Region. Eine nähere Beschreibung findet sich im Text.

vorkommenden Sequenzen von hoher Konserviertheit (in den Gensequenzen), Variabilität (in den ITS-Regionen) und Hochvariabilität (im NTS) für die unterschiedlichsten phylogenetischen Studien. Durch die konzertierte Evolution der rDNA-ITS-Sequenzen und ihrer daraus resultierenden Homogenität innerhalb des Genoms, ist die intraspezifische Variabilität im Vergleich zur interspezifischen sehr gering (Gerbi 1985).

Für die Untersuchung von eng verwandten Arten oder Stämmen haben sich die ITS-Sequenzen als besonders geeignet erwiesen. Dies bestätigten Untersuchungen von Hirata & Takamatsu (1996) auch für die Erysiphales.

3.4.3 Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Primer

In Tabelle 3.15 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer, ihre Sequenz und ihre Verwendung aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich bei den verwendeten Oligonukleotiden um selbst entwickelte Primer. Sie wurden von der Firma MWG, Ebersberg, zur Synthese in Auftrag gegeben.

Tabelle 3.15 **Verwendete Primer.** Durch die Verwendung eines angehängten s oder a in der Primerbezeichnung wird angezeigt, ob es sich um einen Hin (s)- oder Rückprimer (a) handelt. Soweit dies nicht aus dem Namen ersichtlich ist, erfolgt eine zusätzliche Kennzeichnung in Klammern.

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
P1 (hin)	ACGTAGGTGAACCTGCGGAAGGA	Consensus Primer, ITS-rDNA
P2 (rück)	ATCAGCGGGTATCCCTACCTGA	Consensus Primer, ITS-rDNA
P3 (rück)	ACTTCACTCGCCGTTACTGAGGTAA	Consensus Primer, ITS-rDNA
ITS1 (hin)*	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Consensus Primer, ITS-rDNA
ITS4 (rück)*	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Consensus Primer, ITS-rDNA
Go1s	GTGTCCGCCAAAGACCCAACCTAA	Spezifisch für <i>G. orontii</i>
Go2a	CATGCCCTCGGAATACCAA	Spezifisch für <i>G. orontii</i>
Go3s	CTCGTGTCGCCAAAGACCCAA	Spezifisch für <i>G. orontii</i>
Go4a	GCGGCTTGAGGGGGTGTGAC	Spezifisch für <i>G. orontii</i>
Go5s	TCGTGTCCGCCAAAGACCCAA	Spezifisch für <i>G. orontii</i>
Go6a	GCTCTGTCGCGAGAATCGTA	Spezifisch für <i>G. orontii</i>
Px1s	AACTCGTGCTGTGAGTGTGTCTGA	Spezifisch für <i>P. xanthii</i>
Px2a	ATACATGACTACGCGGAGAGCA	Spezifisch für <i>P. xanthii</i>
Px3s	GTCAGAACCCCCTCAAGCCTA	Spezifisch für <i>P. xanthii</i>
Px4a	CAAAGACTGGGGTTCTGGCGGGT	Spezifisch für <i>P. xanthii</i>
Px6a	CTGATCCGAGGTCATCCA	Spezifisch für <i>P. xanthii</i>
Hyb_Go1s/pGEM	GTGTCCGCCAAAGACCCAACCTAATTT CAATATTATTGAAGCATTTA	Konstruktion des heterologen Kompetitors für <i>G. orontii</i>

Fortsetzung von Tabelle 3.15

Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendung
Hyb_Go2a/pGEM	CATGCCCCTCGGAATACCAAGTATTT CTCCTTACGCATCTG	Konstruktion des heterologen Kompetitors für <i>G. orontii</i>
Hyb_Px1s/pGEM	AACTCGTGCTGTGAGTGTGTCTGAGA GCCCCGATTTAGAGCTTGACGG	Konstruktion des heterologen Kompetitors für <i>P. xanthii</i>
Hyb_Px2a/pGEM	ATACATGACTACGCGGAGAGCACATCC CCCTTTCGCCAGCTGGCG	Konstruktion des heterologen Kompetitors für <i>P. xanthii</i>
Go-IS_Mut1s	GCTCCCCTTGGTATTCCGAGGG	Mutagenese für <i>G. orontii</i>
Go-IS_Mut2a	AATGTGCGTTCAAAGATTCGATGAT	Mutagenese für <i>G. orontii</i>
GoMut3 (hin)	CCCCCTTGGTATTCCGAGGGG	Mutagenese für <i>G. orontii</i>
GoMut4 (rück)	CAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTC	Mutagenese für <i>G. orontii</i>
GoMut5 (hin)	GCGCTGGCATCGATGAAGAA	Mutagenese für <i>G. orontii</i>
GoMut6 (rück)	CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTT	Mutagenese für <i>G. orontii</i>
PxMut1s	CGCCGGCCCCTAAACGCAGTGGCGGT	Mutagenese für <i>P. xanthii</i>
PxMut2a	AGCCGGCGAGCCCCAAGACCAAGCTA	Mutagenese für <i>P. xanthii</i>
PxMut3 (hin)	GGCTTCCGAGGGGCATGCCTGTTCGA	Mutagenese für <i>P. xanthii</i>
PxMut4 (rück)	CGGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA	Mutagenese für <i>P. xanthii</i>
Pst_Px1s	AACTGCAGAACTCGTGCTGTGAGTGTT GTCTGA	Klonierung des homologen Kompetitors
NarI_Px2a	AAAAGGCGCCATACATGACTACGCGG AGAGCA	Klonierung des homologen Kompetitors

* White et al. (1990)

3.5 PCR-Verfahren

3.5.1 Allgemeine Hinweise zur Durchführung einer PCR

Bei der Durchführung einer PCR ist eine wichtige Voraussetzung die Vermeidung von Kontaminationen. Kontaminationen können durch Verunreinigungen mit unerwünschter Zielsequenz-DNA entstehen oder aus Übertragungen von PCR-Produkten. Dies führt zu falsch positiven Ergebnissen oder bei einer nachfolgenden Quantifizierung der PCR-Banden zu einer Überschätzung der tatsächlich vorhandenen Menge. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Vorbereitung, der Ansatz und die Auswertung der PCR räumlich voneinander getrennt. Der Ansatz erfolgte zudem an einem mit UV-Licht zu sterilisierendem Arbeitsplatz (Template-Tamer) unter Verwendung eines zweiten Pipettensatzes und von gestopften Pipettenspitzen. Die Zutaten und auch die PCR-Ansätze wurden dabei grundsätzlich auf Eis gekühlt. Zur Erhöhung der Sensitivität

wurden alle PCR-Ansätze routinemäßig erst in den Thermocycler gestellt, wenn der Block die Denaturierungstemperatur erreicht hatte.

Die Zyklusbedingungen wurden für jede PCR-Applikation angepasst. Dabei orientierte sich die Elongationsdauer an der Prozessivität der Polymerase, das heißt an der Anzahl der Nukleotide, die eine Polymerase an das 3'-Ende knüpft, bevor sie wieder abdissoziiert. Für eine Standardpolymerase wird dabei eine DNA-Syntheserate von ca. 2800 Nukleotiden pro Minute zu Grunde gelegt. Die Annealingtemperatur wurde ca. 5 °C unter der vom Hersteller angegebenen T_m gewählt. Standardmäßig wurde ein PCR-Programm durch 7 min Elongation bei 72 °C und eine anschließende Abkühlung auf 4 °C abgeschlossen. Dieser Abschluss erfolgte bei allen PCR-Programmen und wird in der weiteren Arbeit nicht mehr explizit erwähnt. Die Rampe aller PCR-Programme, das heißt die Schnelligkeit des Aufheizens und Abkühlens, wurde mit 1 °C/s sehr niedrig gewählt, um die spezifische Amplifikation der PCR zu unterstützen.

Bei jedem PCR-Experiment wurde eine Negativkontrolle (K-) ohne DNA mit angesetzt.

3.5.2 PCR-Komponenten

Alle PCR-Komponenten wurden in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt, dabei wurde ein Aliquot so bemessen, dass es für ca. 50 PCR-Ansätze ausreichte.

Der dNTP-Mix bestand aus einer äquimolaren Mischung von 25 mM je dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Ebenso wurde eine 25 mM $MgCl_2$ -Lösung eingesetzt. Die Primer wurden nach Herstellerangaben mit TE 1/0,1-Puffer (siehe 3.8.3) auf 100 pmol/ μ L eingestellt. Von dieser Stammlösung wurden durch eine 1:10 Verdünnung mit sterilem *A. bidest.* 10 μ M Arbeitslösungen hergestellt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μ L angesetzt. Die Verdünnung der Komponenten im PCR-Ansatz erfolgte mit autoklaviertem *A. bidest.*

3.5.3 PCR-Mutagenese

Die Methode der PCR-Mutagenese wird angewendet, um zielgerichtete Punktmutationen in eine DNA-Sequenz einzufügen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf diese Weise die homologen Kompetitoren hergestellt. Basierend auf der Zielsequenz, wurden Restriktionsschnittstellen generiert oder entfernt. Das hier angewendete Mutageneseverfahren folgte der Beschreibung von Weiner & Costa (2003).

Die Methode beruht auf der Präsenz der zu mutierenden Zielsequenz in einem Plasmid. Zwei komplementäre Primer wurden entwickelt, deren 5'-Enden direkt aneinander stießen

und von denen einer die gewünschte Mutation am 5'-Ende trug. Mit Hilfe dieser Primer wurde ein PCR-Produkt des gesamten Zielsequenz tragenden Plasmids amplifiziert. Die Verwendung von Phusion DNA-Polymerase, einem hoch prozessives Enzym, das „proof-reading“-Aktivität besitzt und somit „blunt ends“ produziert, reduzierte die Wahrscheinlichkeit unerwünschte Mutationen zu erhalten. Um das Risiko für die Bildung von Nebenprodukten zu minimieren, wurde in die PCR eine erhöhte Menge an Plasmid-DNA eingesetzt, die es erlaubte, die Zyklenanzahl zu reduzieren. Die Reaktions- und Zyklusbedingungen richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers.

Acht μL des PCR-Produktes wurden über ein TAE-Gel aufgereinigt und eluiert (siehe 3.7.8). Um die Enden des PCR-Produkts mit einer Ligase zusammenfügen zu können, mussten sie zuerst phosphoryliert werden. Hierzu wurden 5 μL des eluierten Fragments mit 0,5 mM ATP, 2,5 U T4 Polynukleotid Kinase in 20 μL des 1x Puffers A (siehe 3.1.8) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Kinase wurde anschließend durch eine Inkubation von 10 min bei 70 °C im Wasserbad deaktiviert. Der gesamte Phosphorylierungsansatz wurde danach mit 0,5 U T4 DNA Ligase in einem Gesamtvolumen von 30 μL des zugehörigen 1x Ligationspuffers (siehe 3.1.8) über Nacht bei 4 °C ligiert. Am nächsten Morgen wurden 15 μL des Ligationsansatzes mit 10 U *DpnI* in 30 μL des zugehörigen Enzympuffers verdaut. Da *DpnI* nur methylierte DNA verdaut, unmethylierte PCR-Fragmente aber nicht, konnten auf diese Weise alle nicht mutierten Elternklone zerstört werden. Die Plasmide wurden nach dem unter 3.6.4 beschriebenen Protokoll retransformiert und die Plasmid-DNA anschließend durch eine Mini- (siehe 3.7.1) oder Maxi-Präparation (siehe 3.7.2) aufbereitet.

3.5.4 Durchführung einer qPCR mit homologen Kompetitoren

Der Ansatz einer kompetitiven qPCR erfolgt durch die Koamplifikation des Kompetitors mit der unbekannt Zielsequenz. Bei der Benutzung von heterologen Kompetitoren erfolgt die Quantifizierung über eine Eichgerade oder über die Bestimmung des Äquivalenzpunktes durch die Auswertung eines Mehrfachansatzes (siehe 2.3.4). Durch die Anwendung eines von Serth et al. (1998) beschriebenen Verfahrens, bei dem homologe Kompetitoren eingesetzt werden und die Quantifizierung unter Einbeziehung der Bildungskinetik der Heteroduplex-Fragmente erfolgt, kann der Arbeitsaufwand jedoch stark reduziert werden. Auf diese Weise ist die Quantifizierung innerhalb eines Reaktionsgefäßes möglich und Mehrfachansätze zur Quantifizierung einer Probe nicht nötig.

Eine genau bestimmte Anzahl (siehe 3.8.7) linearisierter Kompetitorplasmide (siehe 3.7.3), wurde zu einem PCR-Ansatz mit einer unbekannt Menge an Zielsequenz gegeben und koamplifiziert. Ein Aliquot des PCR-Produkts wurde mit dem Restriktionsenzym, für das sowohl Ziel- als auch Kompetitorfragment eine spezifische Schnittstelle besaßen, verdaut (siehe 3.8.2) und einer analytischen Gelelektrophorese unterzogen (siehe 3.8.4). Die Banden wurden videodensitometrisch ausgewertet und korrigiert (siehe 3.8.6.3). Die Berechnung der unbekannt Zielsequenzmenge a erfolgte durch den Einsatz der relativen Bandensignalwerte der Heteroduplizis (M_{HD}) und der Zielsequenz (M_{ZS}) in folgende Formel:

$$a = \frac{b(2 - M_{HD} - 2M_{ZS})}{M_{HD} + 2M_{ZS}} \quad \text{Gl. 3.1}$$

$$\text{mit } M_{HD} + M_{ZS} + M_{KS} = 1$$

Dabei ist M_{KS} der relative Signalwert des Kompetitorfragments und b die in die PCR eingesetzte Kompetitorkopienzahl oder -konzentration.

3.5.5 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde in der AG von Herrn Prof. Karlovsky am Fachgebiet Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Georg-August-Universität in Göttingen durchgeführt.

Im Vorfeld wurden die optimalen Werte jedes Primerpaars für die Amplifikation im Real-Time-Cycler überprüft und danach die Ct-Werte einer Verdünnungsserie aus reiner Pilz-DNA bestimmt. Die Logarithmen dieser Werte wurden gegen die logarithmierten Ct-Werte aufgetragen und auf diese Weise eine Eichkurve konstruiert. Die Fluoreszenzfärbung der Produkte erfolgte durch die Zugabe von SYBR Green im Reaktionsansatz. Zur Kalibrierung diente der Zusatz von Fluorescein. Die Kontrolle der Amplifikationsprodukte wurde mit einer Schmelzkurvenanalyse vorgenommen. Hierzu wurden, an die Amplifikation anschließend, nach einem erneuten Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1 min und nach einem 1minütigen Schritt bei 60 °C, 80 Zyklen für je 10 s gefahren, deren Temperatur um 5 °C pro Zyklus anstieg.

3.6 Klonierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Klonierung sogenannte T-Vektoren verwendet. Sie sind bereits linearisiert und am 3'-Ende um ein Thymidin verlängert worden. Durch diesen Basenüberhang wird die Klonierung von PCR-Fragmenten vereinfacht. Bei der T/A-Klonierung macht man sich zu Nutze, dass *Taq*-Polymerasen selten Fragmente mit glatten Enden produzieren, sondern am 3'-Ende des neu synthetisierten DNA-Strangs eine Base anhängen. Welche Base angehängt wird, wird beeinflusst durch die Magnesiumkonzentration, die Zyklenzahl und das 5'-Nukleotid des Primers (Clark 1988). Die Wahrscheinlichkeit, dass am 3'-Ende ein A anhängt wird, ist jedoch sehr hoch, wenn das 5'-Nukleotid des Primers ein A ist. Aus diesem Grund wurden Primer, mit denen im Rahmen dieser Arbeit Fragmente für die T/A-Klonierung amplifiziert werden sollten, am 5'-Ende um ein A erweitert (siehe 3.4.1).

Für eine Klonierung wurden, wie im Folgenden beschrieben, DNA-Fragmente mit Hilfe einer Ligase mit dem Vektor verbunden (siehe 3.6.1) und dieser dann in kompetente Bakterien kloniert (siehe 3.6.2 oder 3.6.4). Transformierte Bakterien wurden über die Blau-Weiß-Selektion selektiert (siehe 3.6.5) und deren Plasmide aufbereitet (3.7.1 oder 3.7.2). Die Kontrolle der Plasmide erfolgte durch eine analytische Restriktionsspaltung (siehe 3.8.1) oder eine spezifische PCR mit auf dem Insert liegenden Primern.

3.6.1 Ligation von PCR-Produkten und Vektoren

Für eine sichere Insertion eines PCR-Produkts in einen Vektor ist es wichtig, dass das PCR-Produkt im Überschuss vorliegt. Bei der Ligation wurden deshalb mengenmäßig etwa fünfmal mehr DNA-Fragment als Vektor-DNA eingesetzt. Die Abschätzung der DNA-Mengen erfolgte über die Bandenstärke in einem Gel. Für einen Ligationsansatz wurden z. B. 0,5 μL Vektor, 2-5 μL gereinigtes PCR-Fragment und 1 μL vom Hersteller mitgelieferte T4 DNA Ligase in einem Volumen von 20 μL des zugehörigen 1x Ligationspuffers gemischt (siehe 3.1.9). Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4 °C oder mindestens für 1 h bei RT inkubiert.

3.6.2 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Dauerkulturzellen des Bakterienstamms *E. coli* NM522 wurden auf LB-Medium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einige Kolonien wurden in 1 mL SOB-Flüssigmedium suspendiert und in einen 2 L Erlenmeyerkolben mit 30 mL SOB-Flüssigmedium und 300 μL 2 M Mg-Lösung überführt. Anschließend erfolgte die Anzucht

im Schüttler bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,45 bis 0,55. Zum Ernten der Bakterienzellen wurde die Bakteriensuspension in ein steriles 30 mL Zentrifugengefäß (Corex) überführt und mit Parafilm bedeckt. Der Wachstumsprozess wurde durch eine Inkubation von 10 min auf Eis gestoppt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 12 min bei 4 °C und 1130 rpm im Ausschwingrotor. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 mL Transformationspuffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und dann erneut für 12 min bei 4 °C und 1130 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 4 mL Transformationspuffer resuspendiert, 140 µL DND-Lösung zugegeben und 15 min auf Eis gestellt. Die letzten beiden Schritte wurden einmal wiederholt. Die behandelten Bakterienzellen waren nun bereit für die Aufnahme eines Plasmids.

Um die Zellen zu transformieren, wurden ein 200 µL-Aliquot der Bakteriensuspension mit einem Ligationsansatz (3.6.1) in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß gegeben und für 30 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte ein Hitzeschritt von 90 s bei 42 °C im Wasserbad. Hierauf wurden die Bakterien sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach einer Zugabe von 800 µL SOC erfolgte die Vermehrung im Inkubationsschüttler für 1 h bei 37 °C und 180 rpm. 100-200 µL der Lösung wurden auf einem Selektivmedium ausplattiert (siehe 3.6.5).

LB-Medium (fest)

15 g Agar
10 g Select Peptone 140
5 g Yeast Extract
10 g NaCl
A. dest. ad 1 L

auf pH 7,5 einstellen
autoklavieren

SOB

10 g Select Peptone 140
5 g Yeast Extract
0,584 g NaCl (fc 10 mM)
0,186 g KCl (fc 2,5 mM)
A. dest. ad 1 L,

auf pH 6,0-7,0 einstellen
autoklavieren

DND

1,53 mg/mL DTT
90 % DMSO
1% 1M KAc, pH 7,5
zum Lagern aliquotieren
und einfrieren

Transformationspuffer

10 mM K-MES
100 mM RbCl
45 mM MnCl₂
10 mM CaCl₂
3 mM HaCoCl₃

auf pH 6,2 einstellen

K-MES: 1 M MES mit 10 M KOH
auf pH 6,3 eingestellt

SOC

SOB
1 % 2 M Glukose
1 % 2 M MgCl₂

2 M Mg-Lösung

1 M MgCl₂
1 M MgSO₄

3.6.3 Herstellung kompetenter Zellen zur Lagerung (Eiszellen)

Um eine Transformation auch ohne größeren zeitlichen Aufwand durchführen zu können, wurde bei Bakterienzellen zur Lagerung nach folgendem Protokoll die Kompetenz induziert. Aus einer Dauerkultur auf LB-Medium ausgestrichene und über Nacht gewachsene Bakterienkolonien wurden in 1 mL SOB (siehe 3.6.2) suspendiert, in 100 mL Psi überimpft und dann auf dem Inkubationsschüttler bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,48 angezogen. Die Bakteriensuspension wurde in sterile 30 mL Zentrifugationsröhrchen (Corex) überführt, für 15 min auf Eis gekühlt und die Bakterienzellen für 5 min bei 4 °C bei 4000 g im Ausschwingrotor (Nr. 11140, Sigma 4 K 10) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und in 0,4 vol Tfb I (bezogen auf das Ausgangsvolumen) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis, erfolgte eine Wiederholung des vorherigen Zentrifugationsschrittes. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 0,04 vol Tfb II (bezogen auf das Ausgangsvolumen) gelöst. Je 100 µL der Bakteriensuspension wurden in 1,5 mL Eppendorf-Gefäßen aliquotiert, umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Psi

20 g BactoTryptone

5 g Yeast Extract

5 g MgSo₄

A. dest ad 1 L

mit KOH auf pH 7,6 einstellen

Tfb I100 mM RbCl₂50 mM MnCl₂

30 mM KAc

10 mM CaCl₂

15 % (v/v) Glycerol

mit verdünnter Essigsäure

auf pH 5,8 einstellen

Tfb II75 mM CaCl₂

10 mM MOPS, pH 7,0

10 mM RbCl₂

15 % (v/v) Glycerol

mit verdünntem NaOH auf pH 6,5 einstellen

3.6.4 Schnelltransformation

Diese Methode wurde benutzt, um die nach 3.6.3 hergestellten und tiefgefrorenen kompetenten Bakterienzellen zu transformieren. Ein Aliquot der tiefgefrorenen *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, 10 µL des Ligationsansatzes (siehe 3.6.1) auf die Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde die Bakteriensuspension für 90 s auf 42 °C im Wasserbad erhitzt und danach 500 µL Psi (siehe 3.6.3) dazugegeben. Die Bakterien wurden im Inkubationsschüttler für 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Ca. 100 µL des Ansatzes wurden auf einem selektivem Medium (siehe 3.6.5) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6.5 Selektion transformierter Bakterienzellen

Da bei einer Transformation nie alle Bakterienzellen ein Plasmid aufnehmen, muss sicher gestellt werden, dass nur mit transformierten Bakterienzellen weitergearbeitet wird. Die verwendeten Vektoren pGEM T easy und pGEM T enthalten als Selektionsgene ein Ampicillinresistenzgen sowie das lacZ-Gen, mit dessen Hilfe eine einfache Selektion der transformierten Bakterienzellen über die Blau-Weiß-Selektion möglich wird. Die multiple Klonierungsstelle der Vektoren liegt innerhalb des lacZ-Gens. Es wird inaktiviert, wenn ein DNA-Fragment in das Plasmid integriert worden ist. Das lacZ-Gen kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase. Alleine besitzt es keine β -Galactosidase-Aktivität. Kommt es aber mit dem in den Bakterien exprimierten C-terminalen ω -Fragment der β -Galactosidase zusammen, so wird es aktiv (α -Komplementation). Unter der Verwendung von IPTG als Induktor und X-Gal als Substrat wird dieses gespalten und ein Indolderivat freigesetzt, das sich als blauer Niederschlag zeigt. Die nicht-transformierten Bakterien verfärben sich nach der Inkubation auf einem Selektivmedium blau, während die Bakterien, die Plasmide mit Insert enthalten, weiß bleiben (Ullmann 1967).

LB-AIX-Medium (fest)

wie LB-Medium

nach Abkühlen auf 50 °C zu 1 L zufügen:

150 mg Ampicillin (in 1 mL H₂O gelöst)

40 mg X-Gal (in 1 mL DMF gelöst)

46 mg IPTG (in 1 mL H₂O gelöst)

3.6.6 Dauerlagerung transformierter Bakterienzellen

Um eine Dauerkultur transformierter Bakterien herzustellen, wurden 500 μ L Bakteriensuspension und 650 μ L Glycerin (87 %, autoklaviert) gründlich miteinander gemischt und bei -20 °C gelagert.

3.7 DNA-Präparationsverfahren

3.7.1 Minipräparation von rekombinanter Plasmid-DNA

Die Präparation rekombinanter Plasmid-DNA wurde zu analytischen Zwecken im Minimaßstab vorgenommen. Das Protokoll wurde nach der von (Birnboim & Doly 1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse modifiziert.

Eine transformierte Einzelkolonie (3.6.5) wurde in 3 mL selektivem LB-AP-Medium in einem sterilen Reagenzglas in einem Inkubationsschüttler für 6-8 h bei 37 °C und 180 rpm

inkubiert. Zum Ernten der Zellen wurden 2 mL der Bakteriensuspension in einem 2 mL Eppendorf-Gefäß für 2 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 200 µL Lösung A resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. 400 µL Lösung B wurden hinzu gegeben und gemischt. Nach der Zugabe von 300 µL Lösung C wurde die Probe 5-6 mal durch Invertieren gemischt und sofort für 15-30 min auf Eis inkubiert. Die Fällungsprodukte wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 600 µL Isopropanol (-20 °C) gemischt. Die Probe wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. 200 µL Lösung D wurden zugegeben und das Pellet nach Inkubation für 5 min bei RT vorsichtig resuspendiert. Nach der Zugabe von 400 µL EtOH_{abs} (-20 °C) wurde die Probe erneut gemischt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet für 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach wurde es in 60-80 µL TE/RNase (siehe 3.7.4) gelöst und bei -20 °C gelagert.

Lösung A

15 mM Tris, pH 8,0

10 mM EDTA

50 mM Glukose

15 min autoklavieren

Lösung B

0,2 M NaOH

1 % SDS (w/v)

Lösung C

3 M NaAc, pH 4,8

Lösung D

0,1 M NaAc, pH 7,0

0,05 M Tris, pH 8,0

3.7.2 Maxipräparation rekombinanter Plasmid-DNA

Um eine große Menge Plasmid-DNA von hoher Reinheit zu erhalten, wurden Plasmide, die als Interne Standards benutzt wurden, im großen Maßstab mit Hilfe des auf Anionenaustauschersäulen basierenden HiSpeed™ Plasmid Maxi Kits von Qiagen (siehe 3.1.9) aufbereitet. Die Präparation erfolgte leicht modifiziert nach dem Protokoll des Herstellers. Um ein optimales Bakterien/Puffer-Verhältnis für die Lyse und die anschließende Neutralisation des Lysepuffers zu erreichen, wurden die Mengen der Puffer P1 und P2 dem erreichten Pelletnassgewicht proportional angepasst, das laut Herstellerangaben typischerweise bei 3 g/L Medium liegt, also für 150 mL Medium ca. 0,45 g betragen sollte. Die präparierten Plasmide wurden im vom Hersteller mitgelieferten Puffer EB aufgenommen. Nach der Präparation wurde die Plasmid-DNA durch Auftrennung auf einem Agarosegel auf eine potenzielle Verunreinigung mit genomischer Bakterien-DNA und auf die Präsenz von denaturierter Plasmid-DNA geprüft.

EB

10 mM Tris-Cl, pH 8,5

3.7.3 Linearisierung von Plasmiden

Plasmide liegen meist in ihrer geknäulten („supercoiled“) Form vor. Da es sein kann, dass Plasmide mit dieser DNA-Formation während der PCR nicht vollständig denaturieren, wurden Aliquots der Maxipräparationen linearisiert. Durch den Verdau mit einem Restriktionsenzym, dessen Erkennungsmotiv nur einmal im Plasmid vorkommt, wird die Plasmidform relaxiert. In dieser Konformation lässt es sich während der PCR leichter denaturieren.

Die Linearisierung erfolgte durch den Verdau von ca. 30 µg Plasmid mit 100 U *Bsp120I* in einem Gesamtvolumen von 300 µL des 1x-Puffers B bei 37 °C über Nacht. Danach wurde das Spaltprodukt über PCR Purification Kit Säulen nach 3.7.9. gereinigt. Um die Kapazität der Säulen nicht zu überschreiten wurde das Spaltprodukt auf mehrere Säulen aufgeteilt. Die Elution erfolgte pro Säule zweimal mit je 50 µL Puffer EB. Die Eluate wurden vereinigt und das Plasmid photometrisch quantifiziert (3.8.5).

3.7.4 DNA-Extraktion modifiziert nach Möller et al. (1992)

Die Extraktionsmethode nach Möller et al. (1992) wurde für die Aufreinigung von reinem Pilzmaterial entwickelt. Die nach dieser Methode extrahierte DNA ist doppelsträngig, wobei die Mehrheit der Moleküle eine Länge von 50-150 kbp hat. Aus diesem Grund eignet sie sich hervorragend für die meisten sich anschließenden molekularbiologischen Arbeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Extraktionsmethode leicht modifiziert angewandt. Die angegebenen Puffermengen wurden je nach Menge des Ausgangsmaterials proportional reduziert oder erhöht. Die Quantifizierung erfolgte über ein Agarosegel (siehe 3.8.6.1), da eine Konzentrationsbestimmung über das Photometer auf Grund mangelnder Reinheit nur ungenügend möglich war. Die Methode eignete sich auch für die Isolierung von genomischer DNA aus Gurkenblättern.

Konidien wurden in einem Eppendorf-Gefäß eingewogen, in flüssigen Stickstoff getaucht und mit einem kleinen Pistill im Eppendorf-Gefäß gemörsert. Auf ca. 20 mg Material wurden 500 µL TES-Puffer und 100 µg Proteinase K gegeben. Die Probe wurde gemischt und für mindestens 30 min bei 55-60 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde sie in regelmäßigen Abständen invertiert. Die Salzkonzentration wurde mit 5 M NaCl auf 1,4 M eingestellt, 1/10 vol 10% CTAB (auf 55-60 °C vorgewärmt) zugegeben und die Probe für 10 min bei 65 °C erneut inkubiert. Nach der Zugabe von 1 vol Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) (v/v) wurde die Probe für 10 min bei 4 °C bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. 5 M NH₄Ac wurden bis auf eine Endkonzentration von 0,8 M zugegeben und die Probe vorsichtig gemischt. Dann wurde

sie für mindestens 30 min auf Eis gestellt, für 10 min bei 4° C bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Für die Fällung der DNA wurden 0,6 vol Isopropanol (RT) zugegeben und invertiert, bei RT für 15 min inkubiert und dann für 5 min bei RT bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit 70 % EtOH (RT) gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µL TE/RNase aufgenommen.

TES

100 mM Tris, pH 8.0
10 mM EDTA
2 % SDS

TE/RNase

10 mM Tris, pH 8,0
0,1 mM EDTA
10 µg RNase A/mL

3.7.5 DNA-Extraktion mit dem DNeasy® Plant Mini Kit

Um hochreine, mit dem Photometer gut quantifizierbare genomische DNA aus biologischem Material zu erhalten, wurde die Extraktion von DNA mit Hilfe von Silicasäulen nach Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe 3.1.9) und in einem Gesamtvolumen von 200 µL eluiert. Diese Methode wurde angewendet für reines Pilz- oder Gurkenmaterial oder für mit Echtem Mehltau infizierte Gurkenblätter. Die Zusammensetzungen der Puffer wurden vom Hersteller nicht angegeben.

3.7.6 DNA-Extraktion mit Chelex® 100

Die DNA-Extraktion mit Chelex basiert auf dem Einsatz eines chelatebildenden Harzes, das die DNA während der Denaturierung vor der Zerstörung durch Metallionen schützt. Die Methode ist einfach und unkompliziert, und die auf diese Weise aufbereitete DNA geeignet für den Einsatz in einer PCR. Auf Grund des Kochens der Probe und der daraus folgenden Denaturierung ist die aufbereitete DNA aber nicht für alle Analysemethoden geeignet, wie z. B. RFLP (Walsh et al. 2002). Die Extraktion wurde nach Saenz & Taylor (1999) wie folgt durchgeführt.

Mit sterilem *A. dest.* wurde eine 30 % (w/v) Chelex-Suspension hergestellt. Hiermit wurden Konidien suspensionen der Echten Mehltupilze auf eine Endkonzentration von 5 % Chelex eingestellt. Da die Chelex-Partikel in einer Suspension schnell absinken, musste während des Pipettierens sichergestellt werden, dass sie gleichmäßig verteilt waren. Hierzu erfolgte die Entnahme unter ständigem Rühren der Chelex-Suspension. Die mit Chelex versetzte Konidienprobe wurde anschließend für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Um das Aufspringen der Probengefäße während des Autoklavierens zu verhindern, wurden 2 mL „Safe-Lock“-Probengefäße verwendet, deren Deckel zusätzlich

mit Aluminiumfolie umwickelt wurde. Nach dem Autoklavieren wurde das Chelex durch Zentrifugieren für 5 min bei Höchstgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand in ein frisches Probengefäß überführt. Bei Bedarf wurde der Zentrifugationsschritt noch einmal wiederholt. Die nach dieser Methode aufbereitete DNA ist für die sofortige Weiterverwendung geeignet, aber nicht zur langfristigen Aufbewahrung. Die Haltbarkeit der DNA bei -20 °C lag bei etwa sechs Monaten.

3.7.7 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung und Aufreinigung bestimmter DNA-Fragmente wurde wie unter 3.8.3 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde nur an Stelle der Standardagarose eine LM („low melting“)-Agarose verwendet, die eine niedrigere Schmelztemperatur besitzt. Hierdurch wird die Gefahr der DNA-Denaturierung bei der nachfolgenden Aufbereitung vermieden. Um das Schmelzen des Gels schon während der Elektrophorese zu verhindern, wurde an LM-Gele nur eine Spannung und Stromstärke von maximal 80 V und 260 mA angelegt. Die Elektrophoresedauer betrug ca. 20-30 min bis zur gewünschten Auftrennung der Fragmente. Da die Verwendung von TBE-Puffer bei der anschließenden Aufbereitung der DNA zu Schwierigkeiten führen kann, wurde für präparative Agarosegele 1x TAE-Puffer benutzt.

50x TAE-Puffer

242g Tris

57,1 mL Essigsäure

100 mL 0,5 M EDTA-Stocklösung, pH 8,0

A. dest. ad 1000 mL

mit Essigsäure pH 8,44 einstellen

3.7.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA aus TAE-Agarosegelen wurde die auf Glasmilch beruhende Quantum Prep Matrix Suspension (siehe 3.1.2) verwendet. Die Methode wurde angelehnt an das Protokoll von Willis et al. (1990).

Vor der Benutzung wurde die Quantum Prep Matrix Suspension mehrere Male mit sterilem A. bidest. gewaschen. Das zu extrahierende Fragment wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß gegeben und kurz eingefroren. Dann wurden 300 µL Bindepuffer hinzugegeben und das Gelstück darin aufgelöst. In der Zwischenzeit wurde die Quantum Prep Matrix 30 s gevortext. Acht µL wurden zur Probe gegeben, gemischt und unter gelegentlichem Invertieren für 10 min bei 50 °C inkubiert. Durch Zentrifugieren für 30 s bei 13000 rpm wurde die Matrix pelletiert und der Überstand

verworfen. Es wurden erneut 500 µL Bindepuffer zugegeben und das Pellet darin gelöst. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde danach zweimal in jeweils 500 µL Waschpuffer gelöst, abzentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Das Pellet wurde bei einer niedrigen Temperatur im Heizblock getrocknet, bis es schneeweiß war, dann in 23 µL Puffer EB (siehe 3.7.2) gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Die Glasmilch wurde für 30 s bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand (20 µL) in ein neues Gefäß überführt. Um bei Bedarf eine höhere Reinheit der Probe zu erhalten wurde der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt.

Bindepuffer

6 M NaClO₄
50 mM Tris, pH 8,0
10 mM EDTA
nicht autoklavieren
Lagerung bei 4 °C

Waschpuffer

400 mM NaCl
20 mM Tris, pH 8,0
2 mM EDTA
50 % (v/v) EtOH_{abs}
nicht autoklavieren
Lagerung bei 4 °C

3.7.9 Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (siehe 3.1.9) nach den Angaben des Herstellers.

3.7.10 Präparativer Restriktionsverdau

Durch einen präparativen Plasmidverdau entstehen linearisierte Vektoren mit definierten 3'- und 5'-Enden. Durch das Hinzufügen von Erkennungssequenzen eines ausgewählten Restriktionsenzym am 5'-Ende einer Primersequenz können nach einer präparativen Spaltung des PCR-Amplifikats auch DNA-Fragmente mit definierten Endsequenzen hergestellt werden. Sind die 3'- und 5'-terminalen Sequenzen eines Vektors und eines DNA-Fragments kompatibel, so können sie in einer Ligation zusammengefügt werden und auf diese Weise eine gerichtete Klonierung des DNA-Fragments in den Vektor erfolgen. Dies Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Klonierung der beiden homologen Kompetitorsequenzen in ein Plasmid angewandt.

Bei einem präparativen Restriktionsverdau wurden 3-5 ng Plasmid-DNA oder 8 µL PCR-Fragment mit 8-10 U Restriktionsenzym in 40 µL des zugehörigen 1x Enzympuffers für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die verdauten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Banden aus dem Gel eluiert (siehe 3.7.8).

3.7.11 Aufbereitung von DNA für die Auftragssequenzierung

Sequenzierungen von PCR-Fragmenten oder Plasmiden wurden bei der Firma MWG, Ebersberg, in Auftrag gegeben. Ein Aliquot eines nach 3.7.9 gereinigten PCR-Fragments wurde über ein Agarosegel videodensitometrisch quantifiziert (siehe 3.8.6.2). Für die Sequenzierung wurden der Firma 30 ng DNA pro 100 bp geschickt, zusätzlich 10 µL (10 pmol/µL) des spezifischen Hinprimers. Für die Sequenzierung von Vektoren wurden 2-3 µg einer hochreinen Plasmidaufbereitungen, die entweder nach 3.7.2 oder 3.7.9 durchgeführt worden war, benötigt. Die Sequenzierung des klonierten Fragments erfolgte mit den Standardprimern M13uni (-21) und M13rev (-29) von MWG.

3.8 DNA-Analyseverfahren

3.8.1 Analytischer Restriktionsverdau rekombinanter Plasmide

Der analytische Verdau wurde zur Überprüfung von rekombinanten Plasmiden hinsichtlich der erfolgreichen Insertion eines Fragments vorgenommen. Hierzu wurden 1-2 ng der Plasmidpräparation mit 10 U eines Restriktionsenzym in einem Volumen von 15 µL des zugehörigen 1x Enzympuffers des Herstellers für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung (siehe 3.8.3).

3.8.2 Analytische Restriktionsspaltung von PCR-Produkten

Im Rahmen der kompetitiven qPCR musste das PCR-Produkt zur Unterscheidung von Zielsequenz und Kompetitor nach der Amplifikation verdaut werden. Hierzu wurden 15 µL ungereinigtes PCR-Produkt und 5-10 U des entsprechenden Restriktionsenzym in 50 µL des 1x Enzympuffers über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung nach 3.8.4.

3.8.3 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelen wurde eingesetzt für die Analyse von großen Fragmenten, wie z. B. Vektoren nach einem Restriktionsverdau oder einfachen PCR-Produkten.

Standardmäßig wurden Agarosegele in einer Konzentration von 0,8-1 % verwendet. Die Agarose wurde in 50 mL TBE-Puffer in einer Mikrowelle 2 min bei mittlerer Leistungsstufe erwärmt und anschließend für 1 min bei höchster Leistungsstufe vollständig gelöst. Das

verkochte Volumen wurde mit warmen *A. dest.* wieder auf 50 mL aufgefüllt. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ca. 50 °C wurden 1,3 µL einer wässrigen EtBr-Arbeitslösung, die 5 µg EtBr/µL enthielt, dem Gel zum Anfärben der DNA zugesetzt. Das EtBr wurde untergemischt und die Agarose in einen Gelschlitten gegossen. Anschließend wurde der Probenkamm (Taschenvolumen ca. 20 µL) eingesetzt. Nach vollständigem Abkühlen der Agarose wurde der Gelträger in eine Elektrophoresekammer eingelegt, der Probenkamm entfernt und das Gel vollständig mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Standardmäßig wurden 8 µL Probe mit 6x Ladepuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert. Als Größenmarker wurden 3 µL *λ*/PstI aufgetragen. Das Einlaufen der Proben in das Gel erfolgte bei 80 V/260 mA. Die weitere Migration verlief für ca. 20-30 min bei 120 V und 260 mA. Nach der Migration wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminationstisch ($\lambda=312$ nm) sichtbar gemacht und ein digitales Bild mit Hilfe des Videodokumentationssystems erstellt.

5x TBE-Puffer

54 g Tris
27,5 g Borsäure
20 mL 0,5 M EDTA-Stocklösung, pH 8,0
A. dest. ad 1000 mL

mit Borsäure pH 8,44 einstellen.

6x Ladepuffer (Sambrook & Russel 2001)

1 Teil Glycerin (99,5 %)
2 Teile *A. bidest.*
Bromphenolblau nach Ermessen
Xylencyanol nach Ermessen

3.8.4 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für viele Anwendungen ist das Auftrennvermögen von Agarosegelen nicht ausreichend. Insbesondere kleine Fragmente oder Fragmente mit kleinen Längenunterschieden lassen sich besser mittels PAGE voneinander trennen. Anders als bei Agarosegelen kann durch die Verwendung von Polyacrylamid (PA) das Auftrennvermögen des Gels nicht nur durch die Konzentration (T, „thickness“) beeinflusst werden, sondern auch durch die Verwendung verschiedener Acrylamid:Bisacrylamid Verhältnisse, die zu einer unterschiedlichen Weite und Vernetzung (C, „crosslink“) des entstehenden Polyacrylamidgitters führen. Eine weitere Möglichkeit die Auftrennschärfe zu beeinflussen, besteht in der Wahl der Abstandshalter („spacer“) zwischen den Glasplatten, die die physikalische Dicke des Gels bestimmen. Hierbei führen dünne Gele zu feineren Auftrennungen.

Routinemäßig wurde eine PAGE mit 10 x 8 x 0,1 cm (Laufstrecke x Breite x Dicke) Mini-Gelen in einer vertikalen Gelelektrophorese-Apparatur bei 80 V durchgeführt. Als Puffer wurde 1x TBE verwendet. Standardmäßig wurden 5 µL einer PCR-Probe oder bei einer kompetitiven PCR 10-15 µL des verdauten PCR-Produkts mit 6x Ladepuffer gemischt (siehe 3.8.3) und aufgetragen. Das Anfärben mit EtBr erfolgte nach der Elektrophorese für

20 min in 200 mL einer wässrigen Lösung, die mit 0,13 µg EtBr/mL versetzt worden war. Nach der Färbung wurde das Gel für 20 min in *A. dest.* entfärbt und auf einem Transilluminationstisch sichtbar gemacht. Mit dem Videodokumentationssystem erfolgte die Erstellung eines digitalen Fotos.

Ansatz für 4 PA-Gele (C 5 %, T 7 %):

10,5 mL	Acrylamid (1:19)
12 mL	5x TBE
0,42 mL	10 % APS
35,58 mL	<i>A. dest.</i>
45 µL	TEMED

3.8.5 DNA-Quantifizierung mittels Absorptionsspektrometrie

Die Quantifizierung von DNA durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Photometer ist einfach und auch für den Durchsatz von einer hohen Probenzahl geeignet. Um vertrauenswürdige Messergebnisse zu erhalten, müssen jedoch einige Voraussetzungen eingehalten werden: Da alle Nukleinsäuren bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum haben, darf sich nur die gewünschte Nukleinsäure in der Probe befinden. Dies kann schon bei der Extraktion durch einen entsprechenden Verdau sichergestellt werden. Die Probe darf zudem keine Kontamination mit Proteinen, organischen Lösungsmitteln, Salzen oder Ethanol aufweisen, da diese das Messergebnis beeinflussen. Da die Messgenauigkeit des Photometers bei einer OD_{260} zwischen 0,1 und 1 am höchsten ist, wurde die Probenverdünnung so gewählt, dass die gemessene OD_{260} in diesem Bereich lag. Die Absorptionmessung erfolgte in einer 120 µL-Quarzküvette gegen eine den Probenverdünnungen entsprechende Verdünnung *A. bidest.* mit DNA-Puffer. Um zusätzliche Informationen über die Reinheit der Probe zu erhalten, wurden bei 280 nm die OD der Proteine und bei 320 nm der Gesamthintergrund der Probe gemessen. Nach Bereinigung der Werte um den Gesamthintergrund, konnte über das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} , eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Probe getroffen werden. Eine Probe wurde als rein angesehen, wenn das Verhältnis um 1,8 lag. War der Wert höher deutete dies auf eine RNA-Kontamination hin, war der Wert niedriger enthielt die Probe zuviel Protein.

Bei der Konzentrationsbestimmung von dsDNA entspricht eine OD_{260} von 1 einer Menge von 50 µg dsDNA in einem Volumen von 1 mL und einer Schichtdicke von 1 cm. Demnach errechnete sich die Konzentration c (µg/mL) der zu bestimmenden DNA-Lösung mit dem Verdünnungsfaktor V nach Gleichung 3.2 (Sambrook & Russel 2001).

$$c = OD_{260} \cdot V \cdot 50$$

Gl. 3.2

3.8.6 DNA-Quantifizierung mittels Videodensitometrie

Bei der videodensitometrischen Auswertung von DNA-Banden in Gelen, wird die Menge der DNA über die Intensität der Fluoreszenz ermittelt. Hierzu ist es notwendig, dass die Gelfotos in digitaler Form, möglichst im TIFF-Format, vorliegen. Mit Hilfe einer Analysesoftware, in diesem Fall Gel-Pro Express (Tabelle 3.5), wird der Helligkeitswert jedes Pixels in einer Bande ermittelt und durch deren Aufsummierung die integrierte optische Dichte (IOD) der gesamten Bande bestimmt. Durch den Vergleich des IOD-Werts einer unbekanntes Probenbande mit dem IOD-Wert einer Bande mit bekannter DNA-Konzentration, kann die Konzentration der unbekanntes DNA-Lösung errechnet werden. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Nachweismöglichkeit von relativ geringen DNA-Konzentrationen und vor allem in der Unempfindlichkeit gegenüber mangelnder Probenreinheit. Bei der analytischen Auswertung mittels der Software wurden die Bandenlaufstrecken an eventuelle Krümmungen und die Ausmaße der Banden manuell angepasst. Ein Korrekturwert für die Hintergrundfluoreszenz wurde durch Hintergrundlinien ermittelt. Diese Linien wurden von dem Programm automatisch zwischen den Bandenlaufstrecken platziert und die Fluoreszenz des reinen Gels entlang dieser Linien gemessen und intern verrechnet.

3.8.6.1 Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA

Hierbei wurden Aliquots der zu quantifizierenden DNA-Lösung abwechselnd mit 15, 30 und 45 ng λ -Phagen-DNA als Standard auf ein 0,8 % Agarosegel unter der Verwendung eines breiten Probentaschenkamms aufgetragen. Mit Hilfe der Software wurden den IOD-Werten der Standardbanden die entsprechenden absoluten DNA-Mengen zugeordnet und auf diese Weise eine Standardkurve ermittelt. Die Quantifizierung über das Gel wurde akzeptiert, wenn die Standardkurve linear verlief und die gesuchte DNA-Menge im Bereich der Standardkurve lag (Martin 1996). War dies nicht der Fall, wurde die Verdünnung oder die Menge des Standards entsprechend angepasst und die Quantifizierung wiederholt.

3.8.6.2 Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten

Als Mengenstandard zur Quantifizierung von PCR-Fragmenten wurde der quantitative Marker Hyperladder I eingesetzt (siehe Tabelle 3.11). Die Menge eines Aliquots des gereinigten PCR-Fragments wurde entweder durch den Vergleich mit der bekannten Menge einer Bande des Markers oder mittels einer durch mehrere Markerbanden konstruierten Standardkurve bestimmt.

3.8.6.3 Analyse einer kompetitiven PCR mit homologen Kompetitoren

Durch den Verdau eines kompetitiven PCR-Produkts wurden drei Fraktionsbanden erhalten: die Heteroduplex-Bande sowie die Banden der Ziel- und der Kompetitorsequenz. Da in längeren Banden mehr EtBr an der DNA interkaliert als in kürzeren, muss, um eine korrekte Bestimmung des DNA-Gehaltes der Bande vornehmen zu können, der Fluoreszenzwert, sprich die IOD, um das Längenverhältnis der Banden korrigiert werden. In diesem Fall wurden Heteroduplex- und Zielsequenzbande um das Verhältnis zur Kompetitorbande korrigiert. Die Banden wurden anschließend relativiert und diese Werte in Gleichung 3.1 eingesetzt.

3.8.7 Berechnung der Plasmidkopienzahl

Die Kopienzahl hochreiner Plasmide pro mL wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Plasmidkopienzahl} = \frac{c}{\frac{L \cdot 660}{6,022 \cdot 10^{23}}} = \frac{c}{L \cdot 660 \cdot (1,66 \cdot 10^{-24})} \quad \text{Gl. 3.3}$$

Hierbei wird die *Plasmidkopienzahl* (mL^{-1}) bestimmt durch die Konzentration des Plasmids c ($\mu\text{g/mL}$), die Länge des Plasmids L (bp), der molaren Masse eines Basenpaars, das 660 g/mol beträgt, und der Anzahl Moleküle in einem Mol, die durch die Avogadro-Konstante $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ angegeben wird.

Zur Aufbewahrung wurde die Konzentration des Plasmids auf 10^{12} Kopien/mL eingestellt und in Aliquots bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

3.9 Experimentelle Überprüfung der entwickelten Methode im Mischinfektionsversuch

3.9.1 Grundlegende Zusammenhänge

3.9.1.1 Berechnung der Blattfläche

Gurken der Sorte 'Chinesische Schlange' wurden wie unter 3.2 beschrieben angezogen und Blätter unterschiedlichen Alters vermessen. Dabei erfolgte die Längenmessung von der Blattbasis bis zur Spitze entlang der Mittelrippe, die Messung der Breite kurz unterhalb der Seitenspitzen bei parallel verlaufenden Blattseiten. Da bei kleinen Blättern die Seiten nicht parallel verlaufen, wurde hier die breiteste Stelle an den Blattseitenspitzen

vermessen. Die Bestimmung der Blattfläche erfolgte mit einem Blattflächenmessgerät. Die Daten wurden durch eine nichtlineare Regression ausgewertet.

3.9.1.2 Zusammenhang zwischen Blattfläche und Blattfrischmasse

Unterschiedlich alte voll turgeszente Blätter der Gurkensorte 'Chinesische Schlange', die wie unter 3.2 beschrieben angezogen worden waren, wurden gewogen und ihre Blattfläche über die Vermessung der Blattdimensionen oder über eine direkte Messung im Blattflächenmessgerät bestimmt (siehe 3.9.1.1). Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer linearen Regression.

3.9.1.3 DNA-Gehalt der Blätter

Die DNA der Blätter 1-6 (Blatt 1: das älteste, unterste, Blatt 6: das jüngste) von 24 Tage alten Gurken der Sorte 'Chinesische Schlange', die nach Standardbedingungen angezogen worden waren (siehe 3.2), wurde nach Methode 3.7.5 aus 100 mg Frischmasse (FM) extrahiert und ein Aliquot im Photometer quantifiziert (3.8.5). Das tatsächliche Elutionsvolumen wurde durch Messung mit einer Pipette genau bestimmt und durch Multiplikation mit der ermittelten DNA-Konzentration die Gesamt-DNA/100 mg FM errechnet.

Da in den späteren Versuchen hauptsächlich die Blätter 1 bis 3 analysiert werden sollten, wurde der DNA-Gehalt der Blätter 1 bis 3 auf Grund der unterschiedlichen Stichprobenzahlen mit einem Kruskal-Wallis-Test auf den Einfluss der Blattetage getestet. Nach Überprüfung der Normalverteilung und Varianzhomogenität erfolgte der anschließende multiple Mittelwertvergleich mit einem Scheffé-Test.

3.9.2 Versuchsapparatur

Zur gleichzeitigen Durchführung mehrerer unabhängiger Versuche wurde eine auf dem Überdruckprinzip basierende Versuchsanlage, nach dem von Meyer (1976) veröffentlichten Prinzip, in einer Kimakammer errichtet.

Die Anlage (Abbildung 3.2) bestand aus drei geschlossenen separaten Boxen (eine Box: 130 x 64 x 60 cm und zwei Boxen: 120 x 82,5 x 70 cm (Breite x Höhe x Tiefe)), die mit PE-Folie bespannt waren. Im vorderen Bereich befand sich eine mit Klettbindern verschließbare Öffnung. In die Boxen wurde durch einen regelbaren Ventilator, dem ein Schwebstofffilter (siehe 3.1.5) nachgeschaltet worden war, Luft geblasen. Die Luft konnte in den Boxen durch eine mit einem Filter versehene Öffnung entweichen. Wurden die



Abbildung 3.2 Versuchsanlage zur Durchführung der Mischinfektionsversuche. Im hinteren Teil der Klimakammer ist das Gebläse zusehen (1), an das der Schwebstofffilter (2) angeschlossen ist. Im Vordergrund stehen die beiden separaten Versuchsboxen (3 und 4).

Boxen geöffnet, wurde die Leistung des Gebläses erhöht, so dass Luft aus der Box strömte, aber keine hineingelangen konnte. Die Porengröße des Filters wurde mit $< 10 \mu\text{m}$ so gewählt, dass Echte Mehltau-Konidien nicht hindurchgelangen konnten. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass in den Boxen konidienfreie Luft zirkulierte und die Versuche vermischungsfrei nebeneinander ausgeführt werden konnten. Von den drei Boxen wurden nur die zwei gleich großen Boxen für die Versuche verwendet.

3.9.3 Inokulation der Gurkenpflanzen

Gurken der Sorte ‚Chinesische Schlange‘ wurden wie unter 3.2 beschrieben bis zum Versuchsbeginn angezogen. Im Alter von 22-26 Tagen wurden sie in den Versuch eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt waren die drei untersten Blätter voll ausgebildet und das vierte Blatt im Ansatz.

Von den Echten Mehltau-Isolaten Pg03.1 und Gg03.1 wurden wie unter 3.3.4 beschrieben Inokulumkulturen angesetzt. Die Konidien von 10 bis 11 Tage alten Kulturen wurden mit einer Pasteurpipette mit sterilem *A. dest.*, dem 0,1 % Tween 20 zugesetzt worden war,

abgeschwemmt. Die Konidienkonzentration wurde dreimal mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und dann auf 10^4 Konidien je Pilzart/mL eingestellt. Die Inokulation der untersten drei Gurkenblätter (Blatt 1 das Älteste, Blatt 3 das Jüngste) erfolgte durch das dreimalige Einsprühen mit einem Sprühdispenser. Die anderen Blätter der Pflanze wurden während des Sprühens mit einem Cellulosetuch abgedeckt. Die inokulierten Pflanzen wurden angestäubt und 12 Pflanzen in eine Box gestellt.

3.9.4 Versuchsvarianten

Der Versuch wurde mit drei Varianten angesetzt: eine Mischvariante, in der *P. xanthii* und *G. orontii* im gleichen Verhältnis inokuliert wurde, und jeweils eine Einzelvariante von jedem Pilz als Vergleich. Das Inokulum enthielt 10^4 Konidien/mL je Pilzart.

Die einzelnen Varianten wurden versetzt angesetzt, um das Bonituraufkommen an einem Tag zu reduzieren. Bei dem ersten Termin am 08.11.2005 wurde in Box 1 und am 14.11.2005 in Box 2 je ein Ansatz der reinen *P. xanthii*-Variante angesetzt, während am 08.12.2005 in Box 1 die Mischvariante und am 09.12.2005 in Box 2 die reine *G. orontii*-Variante angesetzt wurde. Der Versuch wurde bei 20 °C und 70 % rL durchgeführt.

3.9.5 Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte destruktiv jeweils 7, 14 und 21 Tage nach der Inokulation (DAI). An jedem Bonitурtag wurden bei der *P. xanthii*-Variante je drei Blätter und bei den anderen beiden Varianten je vier Blätter der ersten drei inokulierten Blattetagen randomisiert entnommen, also 9 bzw. 12 Blätter pro Variante und Termin. Die Beprobung erfolgte unter der Bedingung, dass jeder Pflanze pro Termin nur ein Blatt entnommen wurde, was bedeutete, dass bei den letzten beiden Varianten an einem Bonitурtermin jede Pflanze beprobt wurde. Ab 14 DAI wurden zur Überprüfung der im Versuch vorhandenen natürlichen Infektion auch Proben von Blatt 4 entnommen. Der Blattstiel wurde entfernt und das Blatt nach dem Ernten zum Schutz vor Verdunstung und zur Bewahrung der Konidien leicht gefaltet und bis zur Bonitur in Aluminiumfolie gewickelt. Nach der Bonitur wurden die Blätter in der Aluminiumfolie bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Abgestorbene Blätter wurden nicht ausgewertet.

3.9.6 Bonitur

Blattfläche Die linearen Dimensionen jedes Blattes wurden wie unter 3.9.1 beschrieben vermessen und die Blattfläche mit Gleichung 4.1 berechnet.

Befallsstärke Die Befallsbonitur erfolgte unter einem Binokular. Um die Befallsstärke möglichst genau abschätzen zu können, wurde der Durchmesser jeder Kolonie an zwei Stellen gemessen und gemittelt. Die Berechnung der Koloniegröße erfolgte mit der Kreisflächenformel. Nach der Summierung der berechneten Koloniefächen und der Relativierung über die berechnete Blattgröße erfolgte die Angabe der Befallsstärke in %.

Konidien Während der Vermessung einer Kolonie wurden die vorhandenen Konidien abgesaugt. Das Absaugen erfolgte mit einem an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Schlauch. An den Schlauch war eine 1 mL-Pipettenspitze aufgesteckt, die mit einem etwa 0,5 cm² großen Papierfilterstück gestopft worden war. Auf diese Weise konnten die abgesaugten Konidien in dem Filterstück gesammelt werden. Die Filter wurden bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert.

3.9.7 Probenaufbereitung

Die tiefgefrorenen Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und die DNA aus einem 100 mg Aliquot wie unter 3.7.5 beschrieben extrahiert, die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (3.8.5) und 15 und 30 µL jeweils in eine kompetitive PCR eingesetzt (siehe 3.5.4). Die Proben wurden wie unter 3.8.2 und 3.8.4 beschrieben verdaut und analysiert. Die eingesetzte Kompetitormenge richtete sich nach der Befallsstärke und lag zwischen 10⁴ und 10⁶ Kopien. Eine Probe galt als nicht quantifizierbar, wenn in beiden Wiederholungen keine Banden oder nur Kompetitorbande und/oder Heteroduplex-Bande, sichtbar waren.

Die Konidien wurden mit in einem variablen, aber genau bestimmten Volumen *A. bidest.*, dem 0,1 % Tween 20 zugesetzt worden war, aus dem Filter in ein Eppendorf-Gefäß gespült. Da das Spülen nicht ausreichte um sämtliche Konidien in das Eppendorf-Gefäß zu überführen, wurde der Filter in die Konidien suspension gegeben. Die Suspension wurde gevortext und die Konidien anschließend für 3 min bei 13000 rpm bei RT abzentrifugiert. Das Filterpapier wurde entfernt und mit Hilfe einer Pipette das Volumen genau bestimmt. Vor der PCR-Amplifikation wurden die Konidien in einem Aliquot der Konidien suspension mit einem initialen Hitzeschritt von 12 min bei 95 °C aufgebrochen, bevor die restlichen PCR-Zutaten inklusive 10⁴ bis 10⁵ Kopien des Kompetitors hinzugegeben wurden. Der Restriktionsverdau und die Analyse erfolgten wie unter 3.8.2 und 3.8.4 beschrieben.

3.9.8 Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit den Statistikprogrammen SPSS und Sigma Plot sowie dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (siehe Tabelle 3.5).

3.9.8.1 Verrechnung der quantifizierten Pilz-DNA

Die quantifizierte Pilz-DNA wurde zum Vergleich auf zwei Arten verrechnet. Bei der ersten Variante erfolgte eine Normierung über die DNA-Konzentration der jeweiligen Probe. Die quantifizierte Pilz-DNA P_K (ng) wurde wie in Gleichung 3.4 dargestellt auf 100 ng Gesamt-DNA bezogen. Unter Einbeziehung der Probenkonzentration c (ng/ μ L), dem Verdünnungsfaktor V und dem in die PCR eingesetzten Probenvolumen Z (μ L) ergibt sich der prozentuale Anteil Pilz-DNA M_1 (% von Gesamt-DNA) wie folgt:

$$M_1 = \frac{P_K \cdot V \cdot 100}{c \cdot Z} \quad \text{Gl. 3.4}$$

Bei der in Gleichung 3.5 angegebenen zweiten Variante wurde die quantifizierte Pilz-DNA P_K in einer Probe ohne Berücksichtigung der DNA-Konzentration über das DNA-Gesamtextraktionsvolumen von 200 μ L (siehe 3.7.5) auf die in der Extraktion eingesetzten 100 mg Blattfrischmasse bezogen. Über den in Gleichung 4.2 ermittelten Zusammenhang zwischen Blattfrischmasse und Blattfläche, der zeigt, dass 100 mg FM 0,588 cm^2 entsprechen, kann die Pilz-DNA M_2 auch pro Flächeneinheit angegeben werden (ng/cm^2).

$$M_2 = \frac{P_K \cdot V \cdot 200}{Z \cdot 0.588} \quad \text{Gl. 3.5}$$

In der Mischvariante erfolgte die Verrechnung nur nach Gleichung 3.4.

3.9.8.2 Statistische Auswertung der Befallsstärke und Pilz-DNA in den Einzelvarianten

Die Befallsstärke in den beiden Wiederholungen (Box1 und Box2) der *P. xanthii*-Variante wurde mit einem t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Da keine Unterschiede gefunden werden konnten, wurden die Proben der beiden Wiederholungen in den restlichen Auswertungen gepoolt.

Der Vergleich der nach Gleichung 3.4 errechneten Pilz-DNA der Blätter 1 bis 3 an den einzelnen Boniturterminen in den drei Versuchsvarianten erfolgte auf Grund des geringen Stichprobenumfangs mit dem Kruskal-Wallis-Test. Da Blatt 4 nicht spezifisch inokuliert worden war, wurde es in den Vergleichen nicht berücksichtigt. Bei der reinen *G. orontii*-

Variante wurde auf Grund des geringen Stichprobenumfangs beim ersten Boniturermin (7 DAI) auf die Verrechnung der Daten verzichtet. Am dritten Boniturermin (21 DAI) wurden in beiden Einzelvarianten nur die Blätter 2 und 3 mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen, da für Blatt 1 jeweils nur zwei Quantifizierungen vorlagen.

Der Zusammenhang zwischen quantifiziertem Pilz-DNA-Gehalt und der Befallsstärke in den Einzelinokulationsvarianten wurde mit einer linearen Regressionsanalyse untersucht.

3.9.8.3 Pilz-DNA-Gehalt, Befallsstärke und Konidienanzahl in der Mischvariante

Die pilzlichen DNA-Gehalte in der Mischvariante wurden für einen korrekten Vergleich mit den Einzelvarianten um den DNA-Gehalt des jeweils anderen Pilzes bereinigt. Die Pilz-DNA-Gehalte jedes Pilzes der Blätter 1-3 wurden an den einzelnen Boniturerminen mit einem Kruskal-Wallis-Test auf einen signifikanten Einfluss der Blätter geprüft (siehe Anhang Tabellen 7.12 und 7.13). Da kein Unterschied zu finden war, wurden die Daten an den Boniturerminen für den jeweiligen Pilz gepoolt und die Mittelwerte mit einem t-Test mit den Mittelwerten der gepoolten Daten der entsprechenden Einzelvariante verglichen (siehe Anhang Tabellen 7.14 bis 7.17).

Die relativierten Konidienanzahlen wurden über den zeitlichen Verlauf auf Grund ihrer unterschiedlichen Probenanzahl mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Differenzierung der Isolate

4.1.1 Mikroskopische Untersuchungen

4.1.1.1 Bestimmung von *Golovinomyces* und *Podosphaera*

Für die mikroskopische Bestimmung der Gattung und Art wurden die unter 2.3.3 aufgeführten Kriterien angewendet. Es zeigte sich, dass die Merkmale Fibrosinkörper, Konidienform und Ort der Keimschlauchbildung für die Diskriminierung der beiden Gattungen *Golovinomyces* und *Podosphaera* bei Monosporenisolaten ausreichen. Bei der Anwesenheit beider Gattungen in Mischproben waren die morphologischen Kriterien nicht immer eindeutig, da die Fibrosinkörper gelegentlich nicht deutlich zu sehen waren und sich auch die Konidienform sehr variabel zeigte. Bei den *P. xanthii* zugeordneten Isolaten waren runde oder abnorm große Konidien zu finden (Abbildung 4.1 C). Auch

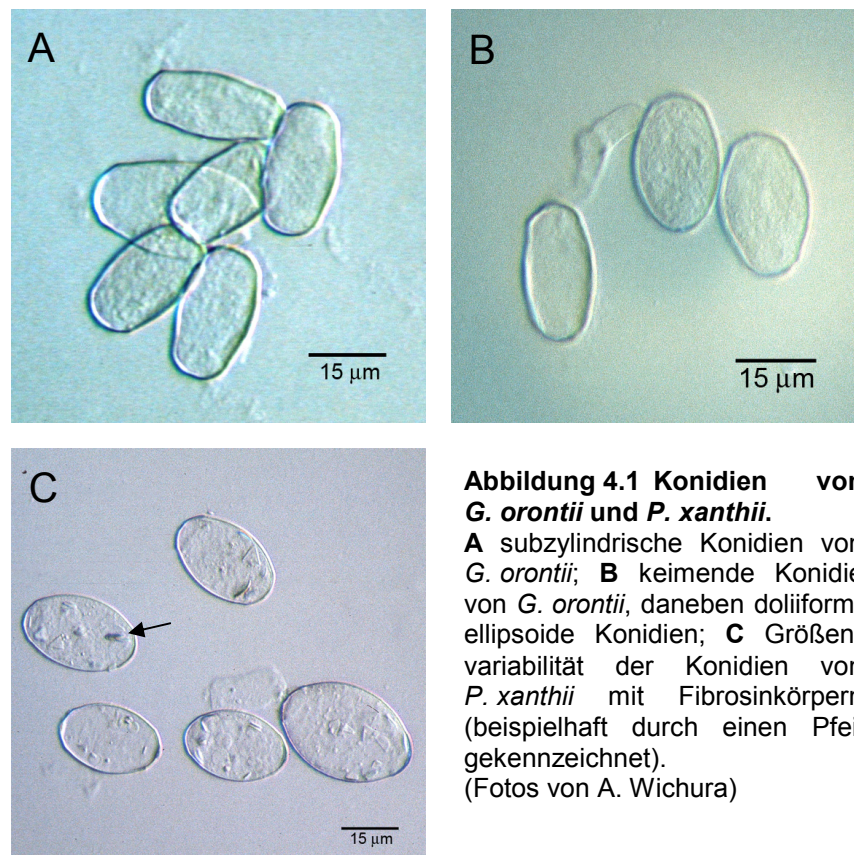


Abbildung 4.1 Konidien von *G. orontii* und *P. xanthii*.

A subzylindrische Konidien von *G. orontii*; **B** keimende Konidie von *G. orontii*, daneben doliiform-ellipsoide Konidien; **C** Größenvariabilität der Konidien von *P. xanthii* mit Fibrosinkörpern (beispielhaft durch einen Pfeil gekennzeichnet).

(Fotos von A. Wichura)

Konidien von Isolaten, die der Gattung *Golovinomyces* zugeordnet worden waren, waren häufig eher ellipsoid-doliiform als zylindrisch (Abbildung 4.1 A und B).

Allgemein ließ sich zudem beobachten, dass die Keimrate von *Podosphaera* auf Objektträgern im Vergleich zu *Golovinomyces* generell sehr niedrig war. Auf Wasseragar keimte *Podosphaera* im Gegensatz zu *Golovinomyces* überhaupt nicht aus. Auch die bei einigen *Golovinomyces*-Isolaten beobachtete Keimung der Konidien an den Konidiophoren fand bei *Podosphaera* nicht statt.

4.1.1.2 Differenzierung von *G. orontii* und *G. cucurbitacearum*

Mindestens zehn Konidien der Isolate Gg03.1 und Gk02.2, die der Gattung *Golovinomyces* zugeordnet worden waren, wurden unter 400x Vergrößerung vermessen. Die Konidien des Isolats Gk02.2 wurden einmal vermessen, während Konidien von Gg03.1 über 1 ½ Jahre in verschiedenen zeitlichen Abständen wiederholt gemessen wurden. Das Isolat Gz02.2 ging kurz nach der DNA-Extraktion und der Klonierung verloren. Die Konidien konnten deshalb nicht vermessen werden. Die untersuchten Konidien wurden mittels 3 %iger KOH-Bleichung und dem Auftreten des typischen Keimschlauchansatzes (siehe Tabelle 2.1) eindeutig der Gattung *Golovinomyces* zugeordnet.

In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Messungen der beiden Isolate dargestellt. Der Durchschnitt der Konidienbreite lag nur bei der Messung von Gg03.1 am 29.09.05 unter 15 µm. Bei allen anderen Messungen war der Mittelwert der Konidienbreite über 15 µm. Nach Braun (pers. Mitteilung) und Vakalounakis & Klironomou (2001) zeichnet sich die Art *G. cucurbitacearum* durch generell schmalere Konidien aus. Der Durchschnitt der Breite liegt dabei eher unter 15 µm. Auf Grund dieses Kriteriums wären beide Isolate zu *G. orontii* zu zählen gewesen. Für die Zuordnung zu *G. orontii* sprach zudem das Auftreten von überwiegend dolliform-ellipsoiden Konidien bei den Messungen des Isolats

Tabelle 4.1 Mittlere Konidienabmessungen der zur Gattung *Golovinomyces* zählenden Isolate Gg03.1 und Gk02.2.

Isolat	Datum	Konidien- anzahl	Länge (µm)	Breite (µm)	Länge/Breite
Gg03.1	21.04.2005	10	35,0 (±5,4)	18,3 (±1,05)	1,93
	29.09.2005	12	30,6 (±2,17)	14,6 (±2,34)	2,13
	29.11.2005	48	29,3 (±3,88)	18,3 (±1,81)	1,62
	09.12.2006	28	29,8 (±3,09)	18,0 (±2,11)	1,68
Gk02.2	21.04.2005	12	32,5 (±3,53)	15,1 (±1,95)	2,2

Gg03.1 am 29.11.2005 und 09.12.2006, was sich auch im Längen/Breiten-Verhältnis widerspiegelte. Trotzdem konnte die Zuordnung nicht sicher erfolgen, da bei beiden Isolaten der Konidienbreitendurchschnitt und vor allem das Längen/Breiten-Verhältnis an jeweils einem Messtermin auf die Präsenz von Konidien schließen ließen, die wahrscheinlich hauptsächlich zu *G. cucurbitacearum* gezählt werden konnten. Zudem lag das Längen/Breiten-Verhältnis mit ca. 1,6 an den letzten Messterminen von Gg03.1 deutlich unter 2, das in der Literatur als typisch für *G. orontii* beschrieben wird (Braun 1995). Ein Längen/Breiten-Verhältnis um 1,6 hatte allerdings auch Nagy (1970) bei ihren Messungen bei einigen Isolaten gefunden.

4.1.2 Molekularbiologische Untersuchungen der rDNA-ITS-Region

Da die morphologischen Kriterien mit einer gewissen Variabilität behaftet sind, sollte eine molekularbiologische Methode etabliert werden, mit deren Hilfe eine eindeutige Gattungszuordnung möglich war. Des Weiteren war für die Entwicklung artspezifischer Primer wichtig, die Sequenzhomogenität der rDNA-ITS-Region (siehe auch Abbildung 3.1) zwischen und innerhalb der beiden Pilzarten abzuschätzen.

4.1.2.1 Differenzierung von *G. orontii* und *P. xanthii* mit PCR-RFLP

Nach der Analyse von Datenbanksequenzen verschiedener Erysiphaceae-Taxa (siehe Tabelle 3.14), wurden an Hand konservierter Sequenzen der 18S- und 28S-rRNA-Gene die allgemeinen Primer P1 und P3 entwickelt (siehe Tabelle 3.15). Mit diesem Primerpaar konnte die gesamte rDNA-ITS-Region, d. h. ITS1, 5.8S rDNA und ITS2 amplifiziert werden. Die Amplifikation lieferte für *P. xanthii* ein 604 bp und für *G. orontii* ein 635 bp großes Fragment. Innerhalb dieses Fragments verfügt *G. orontii* über eine einzelne *RsaI*-Restriktionsschnittstelle (Bardin 1996). Durch einen Verdau des PCR-Produkts mit diesem Enzym entstehen zwei Fragmente der Länge 476 bp und 159 bp. *P. xanthii* besitzt kein entsprechendes *RsaI*-Erkennungsmotiv innerhalb der amplifizierten Region. Dieser Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP) konnte als Marker zur sicheren Unterscheidung von *G. orontii* und *P. xanthii* herangezogen werden (Abbildung 4.2).

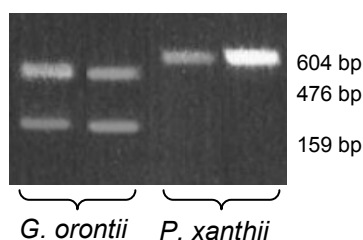


Abbildung 4.2 PCR-RFLP-Bandenmuster von *G. orontii* und *P. xanthii*. Die rDNA-ITS-Region wurde mit dem allgemeinen Primerpaar P1/P3 amplifiziert und das Produkt anschließend mit *RsaI* verdaut. 1 % Agarosegel.

4.1.2.2 Vergleich der rDNA-ITS-Sequenzen

Die rDNA-ITS-Region der verschiedenen Isolate wurde mit dem allgemeinen Primerpaar P1/P3 amplifiziert. Die Sequenzierung erfolgte von dem in einen T-Vektor klonierten Fragment (siehe 3.6) oder direkt von dem PCR-Produkt (siehe 3.7.11). Die Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm ClustalX verglichen und mit BioEdit editiert (siehe Tabelle 3.5).

Der Vergleich der sequenzierten rDNA-Regionen beider Pilze zeigte, dass die Sequenzen der rRNA-Gene konserviert und homolog waren. Innerhalb des 5.8S-Gens existierten zwischen beiden Arten nur drei Nukleotidaustausche und auch in der partiellen Sequenz des 28S-rRNA-Gens waren nur zwei Nukleotide unterschiedlich. Deutlich mehr Variabilität war dagegen in beiden ITS-Regionen zu finden (Abbildung 4.3). Diese Heterogenität wurde hervorgerufen durch zusätzliche Nukleotide, vor allem in der Sequenz von *G. orontii*, und durch einzelne Nukleotidaustausche, die über die ITS-Regionen verteilt zu finden waren. Die ermittelte Sequenzidentität zwischen den beiden Gattungen auf der gesamten rDNA-ITS-Region betrug 82,7 %.

————— ITS1

```

Gz02.2 1 TCAITFACAGAGCGTGTGACTCGGCCCGGGCGTGTCCC GCGTGTGAGTCGACCCTCCACCGTGTGACT TTATCTGTT
Pg03.2 1 TCAITFACAGAGCGTGTGACTCGGCCCGGGCGTGTCCC GCGTGTGAGTCGACCCTCCACCGTGTGACT TTATCTGTT
Consensus 1 ***** **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

————— 5.8S rDNA

```

Gz02.2 80 GCTTTGGCGGGCCAGGTGCC TGGCGCGACCGGCTTCGTGCTGGCTCGTGTCCGCCAAGACCACCTAACTCGTGTG
Pg03.2 79 GCTTTGGCGGGCCAGGTGCC TGGCGCGACCGGCTTCGTGCTGGCTCGTGTCCGCCAAGACCACCTAACTCGTGTG
Consensus 59 ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

————— ITS2

```

Gz02.2 160 TC GTGTAGTCTGAGGAAGAATATTTGAATTTTAAAACCTTCAACAACCGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAAC
Pg03.2 152 TGAGTGTTGTCTGAGG AAATGIGGAATTTAGTAAACTTTCAACAACCGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAAC
Consensus 115 * **** ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

————— ITS2

```

Gz02.2 319 ATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTGTCAACACCCCTCAAGCCGCGCGGTGTGTGTGGCTTGGTGTGGGGCTCGT
Pg03.2 309 ATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTGTCAACACCCCTCAAGCC TAGCTTGGTCTTGGGGCTCGC
Consensus 262 ***** ***** * ***** *****

```

Rsal

```

Gz02.2 399 CCGTCGGCGGCCCTTAAAGACAGTGGCGGTGCCGTGTGGTCTCTACCGTGTACGATCTCGCGACAGAGCGGCAG
Pg03.2 376 CCGCTCGCGGCCCTTAAAGACAGTGGCGGTGCCGTGTGGTCTCTACCGTGTACGATCTCGCGACAGAGTGGCGA
Consensus 323 * * ***** **** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

————— 28S rDNA

```

Gz02.2 478 CGGCGGCTTGCCAATCAATCCCTTTCTTTTTAAAGGTTGACCTCGAATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAAGCATAATC
Pg03.2 454 CGGCA CCCGCCAG AACCCAGCTTTT GGATGACCTCGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAAGCATAATC
Consensus 384 **** * **** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abbildung 4.3 Sequenzvergleich der rDNA-ITS-Sequenz des *G. orontii*-Isolats Gz02.2 und des *P. xanthii*-Isolats Pg03.2.

Eingezeichnet ist die Lage der *Rsal*-Schnittstelle in der Sequenz von *G. orontii*. Die Sternchen zeigen übereinstimmende Nukleotide.

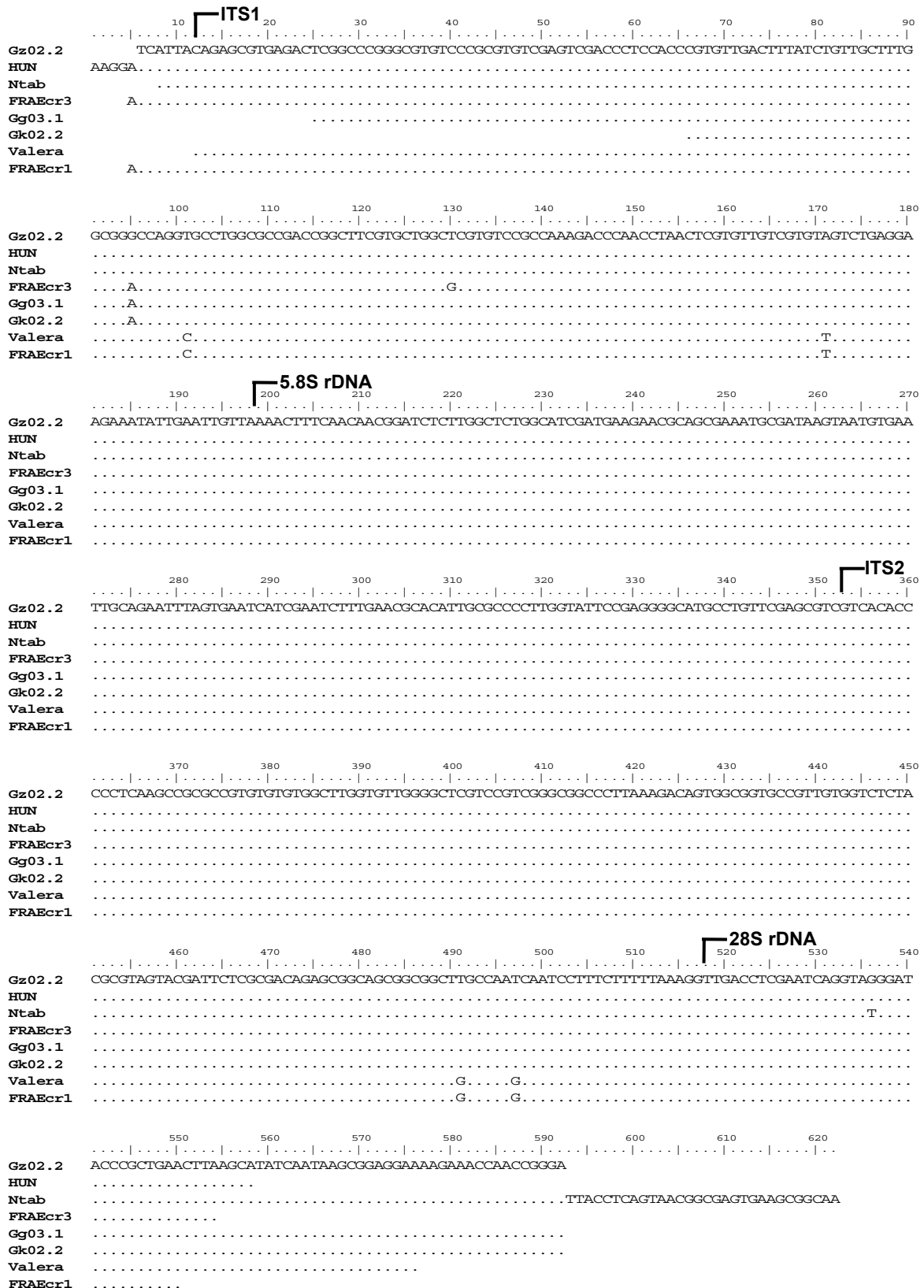


Abbildung 4.4 rDNA-ITS-Sequenzvergleich verschiedener *G. orontii*-Isolate.

Verglichen wurden die Isolate Gz02.2, Gg03.1 und Gk02.2 aus Hannover mit Datenbanksequenzen von *G. orontii*-Isolaten. Die Punkte zeigen gleiche Nukleotide mit der obersten Sequenz. **HUN**: von *Cucurbita pepo* aus Ungarn; **Ntab**: von *Nicotiana tabacum*; **FRAEcr3**: Isolat Ecr3 von *C. pepo* aus Frankreich; **Valera**: von *Valeraniella cf. uncinata*; **FRAEcr1**: Isolat Ecr1 von *C. pepo* aus Frankreich.

Der Vergleich der zu *Golovinomyces* gestellten Isolate Gg03.1, Gk02.2 und Gz02.2 (siehe Tabelle 3.13) erfolgte nach Matsuda & Takamatsu (2003) mit Genbanksequenzen von *G. orontii*-Isolaten von *Cucurbita pepo* aus Ungarn und Frankreich (Ecr1 und Ecr3), sowie von *Nicotiana tabacum* und *Valeraniella* sp. (Abbildung 4.4). Die Beschreibung und die Genbanknummern der einzelnen Datenbanksequenzen sind in Tabelle 3.14 dargestellt. Alle Isolate wiesen mit 98,7 und 99,7 % Sequenzidentität eine sehr niedrige Variation innerhalb dieser Region auf. Die Sequenzen von Gz02.2 und des ungarischen Isolats waren identisch. Ebenso die Isolate Gg03.1 und Gk02.2, die aber im Vergleich zu Gz02.2 innerhalb des ITS1 eine Nukleotidsubstitution von G zu A aufwiesen. Diese Substitution besaß, neben einer zweiten Substitution innerhalb des ITS1, auch das französische Isolat Ecr3. *G. orontii* von *N. tabacum* war bis auf einen Nukleotidaustausch von A zu T innerhalb der Anfangssequenz der 28S rDNA identisch mit Gz02.2 und dem ungarischen Isolat. Das Isolat Ecr1 und das Isolat von *Valeraniella* waren ebenfalls sequenzidentisch und zeigten im Vergleich zu den anderen Isolaten jeweils zwei Nukleotidveränderungen im ITS1 und ITS2. Zusammen mit einem *Arabidopsis*-Isolat bildeten sie nach Matsuda & Takamatsu (2003) eine von den anderen Isolaten getrennte Gruppe. Die Autoren vermuteten, dass diese Gruppe dem zweiten Morphotypus entsprechen könnte, den Vakalounakis & Klironomou (1995) an Cucurbitaceae beschrieben hatten. Es könnte sich folglich um die Art *G. cucurbitacearum* handeln. Da allerdings alle hannoverschen Isolate nicht mit der Sequenz von Ecr1 und dem *Valeraniella*-Isolat übereinstimmten, war davon auszugehen, dass es sich bei allen drei Isolaten um *G. orontii* handelte, wie auch schon durch die Konidienmessungen vermutet worden war.

Der in Abbildung 4.5 dargestellte Vergleich der rDNA-ITS-Sequenzen der *P. xanthii*-Isolate Pg03.1 und Pg03.2 und des französischen Isolats Sf5 mit den Datenbanksequenzen der *P. xanthii*-Isolate von *Cucumis sativus* und *Cosmos bipinnatus* (siehe Tabelle 3.14) machte deutlich, dass alle Isolate von *C. sativus* innerhalb dieser Sequenz homogen waren. Die vollkommene Identität der Sequenzen mit der von anderen *C. sativus*-Isolaten aus den Untersuchungen von Hirata & Takamatsu (2001), zeigte, dass es sich bei den beiden Isolaten aus Hannover und bei dem französischen Isolat tatsächlich um die unter anderem auf Kürbisgewächse spezialisierte Linie von *P. xanthii* handelte.

Für diese Arbeit bedeuteten diese Ergebnisse, dass die rDNA-ITS-Region von *P. xanthii* und *G. orontii* durch die Heterologie zwischen den beiden Arten und die Homologie innerhalb einer Art grundsätzlich für die Entwicklung spezifischer Primer geeignet war.

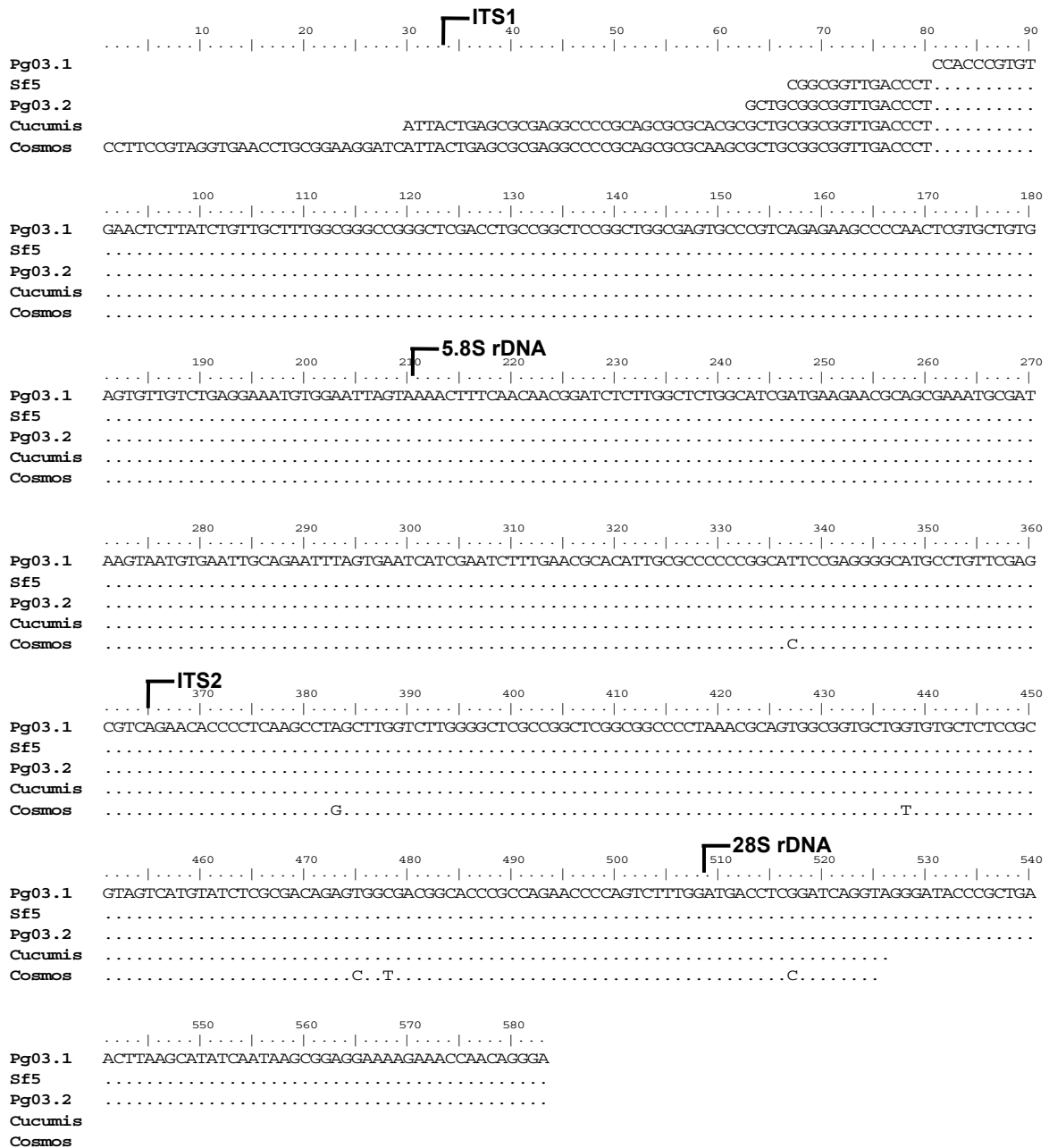


Abbildung 4.5 rDNA-ITS-Sequenzvergleich verschiedener *P. xanthii*-Isolate.
 Verglichen wurden die Isolate Pg03.1, Pg03.2 aus Hannover und Sf5 aus Frankreich mit Datenbanksequenzen von *P. xanthii*-Isolaten. Punkte zeigen gleiche Nukleotide mit der obersten Sequenz. **Cucumis**: von *Cucumis sativus*; **Cosmos**: von *Cosmos bipinnatus*.

4.2 Entwicklung und Testung spezifischer Primer auf Plasmiden

Von beiden Pilzarten wurden die jeweils mit den Primern P1 und P3 amplifizierten rDNA-ITS-Regionen in T-Vektoren kloniert (siehe 3.6). Dies Verfahren bot den Vorteil, die Testung der Primer unabhängig von genomischer DNA durchführen und mit denselben hochreinen Aufarbeitungen, mit gleich bleibender Qualität, auch im hohen Konzentrationsbereich arbeiten zu können. Die Plasmide wurden linearisiert (siehe 3.7.3), UV-spektrometrisch quantifiziert (siehe 3.8.5) und die Kopienzahl eingestellt (siehe 3.8.7). In definierten Kopienzahlen dienten die Plasmide als Template-DNA in der PCR. Da das Hauptziel die Entwicklung von Primern mit hoher Spezifität war, wurden die PCR-Bedingungen parallel auch auf dem rDNA-ITS-Plasmid der anderen Pilzart getestet. Die Testung der entwickelten Primer erfolgte in allen sinnvollen Kombinationen.

Das Primerpaar Go1s/Go2a wurde für die ersten Untersuchungen mit *G. orontii* benutzt. Es wurde zur PCR-Optimierung eingesetzt und mit ihm der heterologe Kompetitor für *G. orontii* entwickelt. Auf Grund der Ergebnisse mit dem internen heterologen Standard (siehe 4.5.2) wurde ein neues Primerpaar für die spezifische Amplifikation gesucht, mit dem die Entwicklung des homologen Kompetitors erfolgen sollte.

4.2.1 *G. orontii*-Primer

Abbildung 4.6 zeigt die Lage der entwickelten Primer. Es wurden 20-24-mere ausgewählt, die Produkte zwischen 207 bp (in der Kombination Go1s/Go2a) und 349 bp (in der Kombination Go3s/Go6a) bildeten (Tabelle 3.15). Für die Entwicklung der Hinprimer bot sich nur eine geeignete Stelle im ITS1 an. Andere durch die Software als geeignet

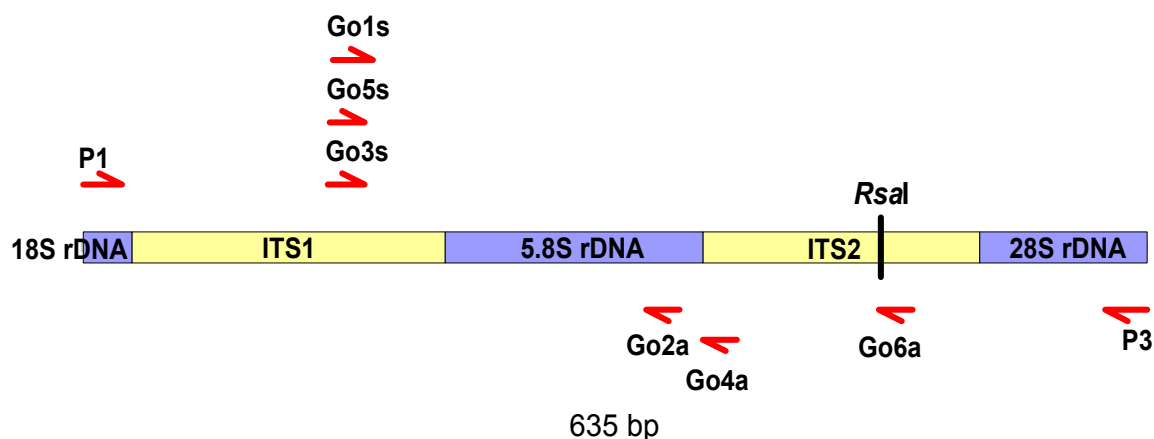


Abbildung 4.6 Lage der spezifischen *G. orontii*-Primer.

Mit den allgemeinen Primerpaar P1/P3 amplifizierte rDNA-ITS-Region von *G. orontii*, unikate *RsaI*-Restriktionsschnittstelle und Position der getesteten Primer.

identifizierte Stellen boten nicht die gewünschte Diskriminierung zur Sequenz von *P. xanthii* oder lieferten ein zu kurzes Produkt. Die Primer wurden nicht hinsichtlich einer potenziellen Unterscheidung von *G. orontii* und *G. cucurbitacearum* ausgewählt. Sie sind zu diesem Zweck auch nicht geeignet, da sie auf Sequenzen entwickelt wurden, die in allen *G. orontii*-Isolaten homolog waren.

Durch Verkürzen oder Verlängern um einige Basenpaare kann unter Umständen die Spezifität eines Primers erhöht werden. Deshalb wurden auf der geeigneten Sequenz einige Hinprimer entwickelt, die sich in ihrer Länge nur leicht voneinander unterschieden (Go1s, Go3s, Go5s). Für die Entwicklung eines Rückprimers bot sich einerseits die, im Vergleich zu *P. xanthii*, einzige heterologe Stelle auf der 5.8S rDNA an. Die drei Nukleotidsubstitutionen sind am 3'-Ende von Go2a enthalten. Des Weiteren konnte auf der Insertionsstelle, die zu Beginn des ITS2 liegt, der Primer Go4a abgeleitet werden und auf einer weiteren Stelle im ITS2 der Primer 6a (vgl. auch Abbildung 4.4).

Die Testung der Primerkombinationen erfolgte in PCR-Ansätzen, die 3,5 mM MgCl₂, 100 µM je dNTP, 1-2 U KlenTherm DNA-Polymerase, 0,2 µM jedes Primers und 10⁴-10⁷ Kopien des Zielsequenzplasmids in 50 µL des 1x KlenTherm-Reaktionspuffers enthielten.

Die Amplifikation erfolgte nach einer initialen Denaturation von 4 min bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen mit je 30 s bei 95 °C, 20 s bei 60 °C und 30 s bei 72 °C. Die Annealingtemperatur wurde möglichst hoch gewählt, um die Amplifikationsbedingungen spezifisch zu halten.

Während die Kombinationen mit dem Rückprimer Go6a bei der Amplifikation fehlschlagen, konnten mit allen anderen Primerkombinationen erfolgreich Produkte amplifiziert werden. Sämtliche Produkte waren spezifisch. Allerdings unterschieden

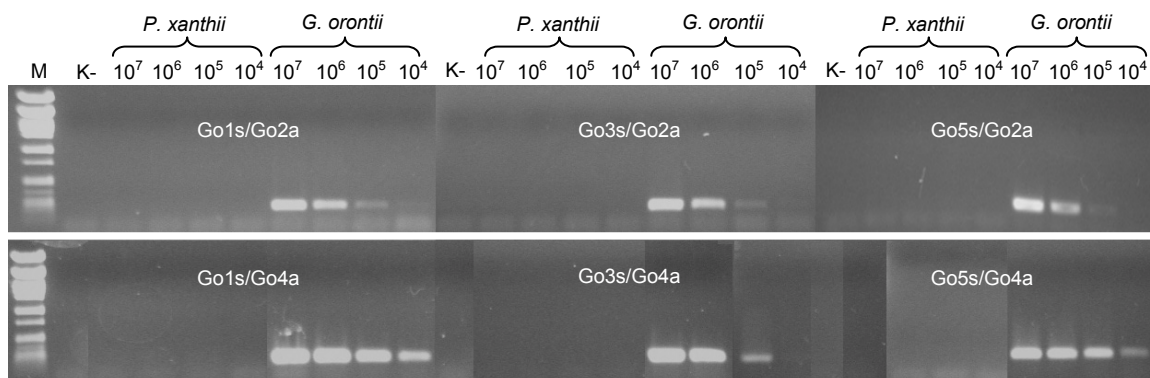


Abbildung 4.7 Spezifitätstestung der unterschiedlichen *G. orontii*-Primerpaare. Eingesetzt wurden 10⁷-10⁴ Kopienanzahlen des Plasmids mit der klonierten rDNA-ITS-Region des jeweiligen Pilzes, der über den Banden angegeben ist. **M:** λ/PstI-Marker; **K-:** Kontrolle ohne DNA. 1 % Agarosegel.

sich die Primerpaare in der Sensitivität und in der gebildeten Produktmenge. Die Primerkombination Go1s/Go4a bildete die höchste Produktmenge bei allen getesteten Plasmidkonzentrationen (Abbildung 4.7).

Die fehlgeschlagene Amplifikation in Kombination mit dem Rückprimer Go6a kann hier nicht vollständig erklärt werden, da Go6a die gleichen thermischen Ansprüche hat wie der Rückprimer Go2a, mit dem eine Amplifikation möglich war. Auch Länge und GC-Gehalt dieser Primer waren identisch. Da mit Go1s/Go4a (Produktlänge 241 bp) bereits ein Primerpaar gefunden worden war, dass unter hohen Annealingtemperaturen ein spezifisches Produkt amplifizierte, wurden die Tests mit Go6a nicht wiederholt.

4.2.2 *P. xanthii*-Primer

Alle Primer für *P. xanthii* wurden auf den beiden ITS-Regionen entwickelt (Abbildung 4.8). Die potenziellen Produktlängen lagen zwischen 101 bp, für die Primerkombination Px3s/Px2a, und 356 bp, für die Primer Px1s/Px6a. Der Primer Px3s wurde nur in Kombination mit Px6a getestet, da die Produktlänge aus den Kombinationen mit Px4a und Px2a von 146 bp und 101 bp für die spätere Analytik als zu kurz erachtet wurde. Dies war begründet in der Bestrebung, das PCR-Produkt mit dem Produkt von *G. orontii* auf einem Gel analysieren zu können und deshalb den Trennbereich für die Fragmente möglichst gleich zu halten. Da die T_m -Werte der Px-Primer grundsätzlich etwas unter den Werten der Go-Primern lagen, wurde die Testung bei einer Annealingtemperatur von 58 °C durchgeführt. Der PCR-Ansatz und die Amplifikationsbedingungen waren ansonsten wie unter 4.2.1 beschrieben. Die Plasmidmenge variierte zwischen 10^3 und 10^7 Kopienzahlen.

Auch bei *P. xanthii* waren alle entwickelten und getesteten Primer spezifisch (Abbildung 4.9). Allerdings variierte die Produktmenge erheblich. Während mit den Primerkombinationen Px1s/Px2a und Px3s/Px6a bei einem Plasmideinsatz von 10^3 Kopien noch ein deutliches Amplifikat zu sehen war, waren bei den beiden anderen

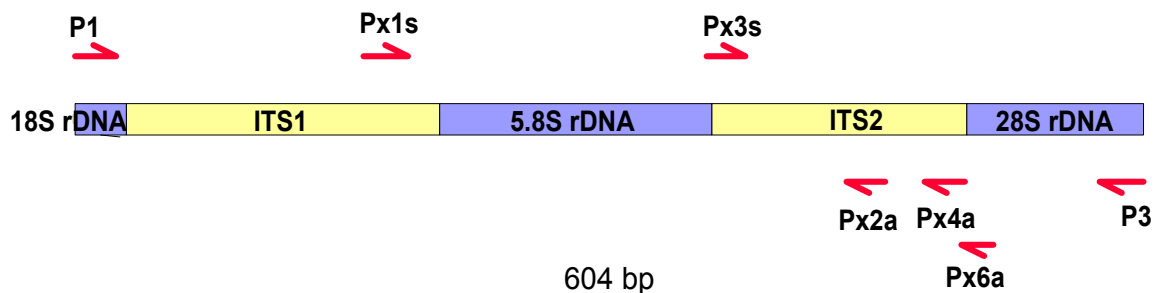


Abbildung 4.8 Lage der spezifischen *P. xanthii*-Primer.

Mit den allgemeinen Primerpaar P1/P3 amplifizierte rDNA-ITS-Region von *P. xanthii* und Position der getesteten Primer.

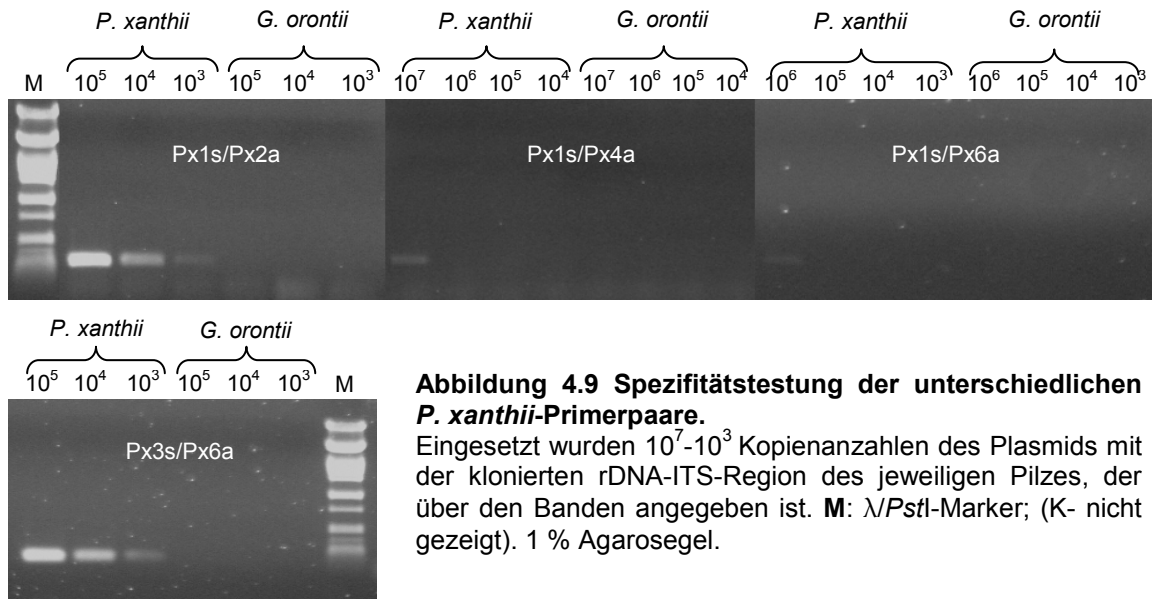


Abbildung 4.9 Spezifitätstestung der unterschiedlichen *P. xanthii*-Primerpaare.

Eingesetzt wurden 10⁷-10³ Kopienanzahlen des Plasmids mit der klonierten rDNA-ITS-Region des jeweiligen Pilzes, der über den Banden angegeben ist. **M:** λ /PstI-Marker; (K- nicht gezeigt). 1 % Agarosegel.

Kombinationen schon bei 10⁷ bzw. bei 10⁵ Kopien nur sehr geringe Produktmengen nachzuweisen. Die Kombinationen Px1s/Px2a und Px3s/Px6a schienen beide geeignet für die weitere Verwendung. Da das Produkt der Primer Px1s/Px2a mit 295 bp, im Gegensatz zu dem 162 bp langen Produkt der Primer Px3s/Px6a, eher in den Trennbereich des bei *G. orontii* amplifizierten spezifischen Produkts (241 bp) fiel, wurde dieses Primerpaar ausgewählt.

4.3 PCR-Optimierung

Die Optimierung der PCR für *G. orontii* und *P. xanthii* wurde parallel vorgenommen. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse für die beiden PCR in den folgenden Unterpunkten zusammen dargestellt.

Die Optimierung einzelner Komponenten erfolgte nicht isoliert voneinander, sondern in der Regel durch die gleichzeitige Variation von zwei Faktoren. Erfolgte die Testung einer Konzentrationsänderung eines Faktors bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen und Zielsequenzmengen geschah dies im Hinblick auf potenzielle Auswirkungen auf Spezifität und Sensitivität. Das Optimum des Faktors wurde definiert als höchste Produktmenge bei maximaler Spezifität. Die Bonitur erfolgte dabei visuell. Der Hauptaspekt lag auf der Spezifität, da es später möglich sein sollte in einem Gemisch verschiedener DNAs nur die gewünschte DNA zu amplifizieren. Durch den Wechsel der Polymerase bzw. Primer erfolgte die Optimierung nicht als stringenter Prozess, sondern erforderte teilweise eine erneute Anpassung und Testung.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde für die spezifische Amplifikation von *G. orontii* und die Entwicklung des heterologen internen Kompetitors das Primerpaar Go1s/Go2a mit der KlenTherm Polymerase benutzt. Einige Optima, die sich für diese beiden Komponenten gefunden hatten, wurden nicht im vollen Umfang für das Primerpaar Go1s/Go4a wiederholt, sondern übernommen, wenn sich keine Probleme bei der Amplifikation zeigten.

In den folgenden Unterpunkten werden die Hauptaspekte der Optimierung gezeigt, die zu grundlegenden Entscheidungen beitrugen. Grundsätzlich beziehen sich die beschriebenen Optimierungen auf die Benutzung der BioTherm DNA-Polymerase. Wenn Ergebnisse mit dem Primerpaar Go1s/Go2a und der KlenTherm DNA-Polymerase herangezogen werden, wird dies explizit erwähnt. Wenn es in den Unterpunkten nicht anders vermerkt wurde, enthielten die Ansätze 100 µM je dNTP, 0,2 µM je Primer mit 3 mM MgCl₂ im 1x BioTherm Polymerase Puffer oder entsprechend 3,5 mM MgCl₂ im 1x KlenTherm-Reaktionspuffer und jeweils 1 U des zugehörigen Enzyms. Als Template wurden die linearisierten rDNA-ITS-Plasmide oder genomische DNA der beiden Pilze eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, nach einer initialen Denaturation von 4 min bei 95 °C und 30 Zyklen für 30 s bei 95 °C, 30 s der entsprechenden Annealingtemperatur und 30 s Elongation bei 72 °C. Das Programm wurde standardmäßig abgeschlossen (Beschreibung siehe 3.5.1).

Eine Zusammenfassung der Optimierung findet sich am Ende des Kapitels unter 4.3.8.

4.3.1 Polymerase

Für die Amplifikation wurden drei Polymerasen getestet. Eine Standardpolymerase, die BioTherm DNA-Polymerase, und zwei Enzyme für spezielle Applikationen, AccuTherm- und KlenTherm DNA-Polymerase.

Die BioTherm DNA-Polymerase basiert auf der Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) isoliert wurde. Sie besitzt neben der 5'-3' DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3' Exonukleaseaktivität und die Eigenschaft, A-Überhänge am 3'-Ende zu produzieren. Sie ist sehr robust und geeignet für den Standardgebrauch. Die AccuTherm DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3' DNA-Polymerase- und eine 3'-5' Exonukleaseaktivität („proof-reading“). Sie wurde isoliert aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) und wird angewendet, wenn die Amplifikation sehr genau erfolgen soll. Die KlenTherm DNA-Polymerase ist das Klenow Fragment der BioTherm Polymerase. Sie besitzt eine N-terminale Deletionsmutation, durch die ihr die 5'-3' Exonukleaseaktivität fehlt. Sie ist hoch thermostabil und besitzt nur eine geringe

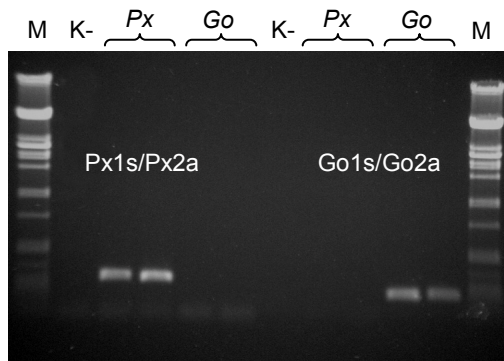


Abbildung 4.10 AccuTherm-Testung. Amplifikation spezifischer Produkte mit dem Primerpaar Go1s/Go2a für *G. orontii* und Px1s/Px2a für *P. xanthii* mit der AccuTherm DNA-Polymerase. Als Template eingesetzt wurden 25×10^9 Kopien des Plasmids mit der klonierten rDNA-ITS-Sequenz des Pilzes, der über den Banden angegeben ist. **M:** λ /PstI-Marker; **K-:** Kontrolle ohne DNA; **Px:** *P. xanthii*; **Go:** *G. orontii*. 1 % Agarosegel.

Aktivität A-Überhänge zu produzieren. Für diese Anwendung schien sie besonders geeignet auf Grund ihrer Eigenschaft, Oligonukleotide mit einem nicht passenden 3'-Ende („mismatched“) nicht als Primer zu akzeptieren und so zu einer erhöhten Spezifität beizutragen.

Die AccuTherm Polymerase wurde in einem jeweiligen PCR-Volumen von 50 μ L mit je 1 U Polymerase, 0,2 μ M je Primer und 250 μ M je dNTP im 1x Reaktionspuffer der AccuTherm getestet. Die benötigte $MgCl_2$ -Menge von 4,4 mM war im Puffer vorhanden. Die Amplifikation erfolgte nach einer Denaturation von 7 min bei 95 °C und 32 Zyklen für 30 s bei 95 °C, 30 s Annealing und 30 s Elongation bei 72 °C. Für die spezifische Amplifikation von *G. orontii* wurden die Primer Go1/Go2a bei einer Annealingtemperatur von 58 °C verwendet, für *P. xanthii* die Primer Px1s/Px2a mit einem Annealing von 56 °C. Als Template wurden 25×10^9 Kopien des entsprechenden Plasmids eingesetzt.

Der Vergleich von BioTherm und KlenTherm DNA-Polymerase wurde angesetzt wie unter 4.3 beschrieben, mit der Abweichung, dass 2 U KlenTherm Polymerase verwendet wurden. Die Zielsequenzplasmide variierten im Bereich von 2×10^3 bis 2×10^8 Kopien. Die Zyklusbedingungen waren wie unter 4.3 beschrieben, wobei die Annealingtemperatur 58 °C für die Primer Px1s und Px2a und 60 °C für das Primerpaar Go1s/Go4a betrug.

Die entwickelten Primer wiesen mit der Amplifikation durch die „proof-reading“ Polymerase eine sehr hohe Spezifität auf (Abbildung 4.10). Die vergleichsweise niedrige PCR-Produktmenge bei dem sehr hohen Einsatz an Templatmenge ließen auf eine ungünstige Amplifikationseffizienz und niedrige Sensitivität schließen. Dies ist bei dem Einsatz eines „proof-reading“ Enzyms, bedingt durch seine hohe Exonukleaseaktivität, zu erwarten. Diesen Nachteilen kann zwar durch eine Angleichung der PCR-Bedingungen, wie eine verlängerte Elongationszeit, eine höhere Zyklenzahl und eine erhöhte Primerkonzentration, entgegen gesteuert werden, für einen routinemäßigen Einsatz schien die AccuTherm Polymerase aber auch aus Kostengründen nicht geeignet.

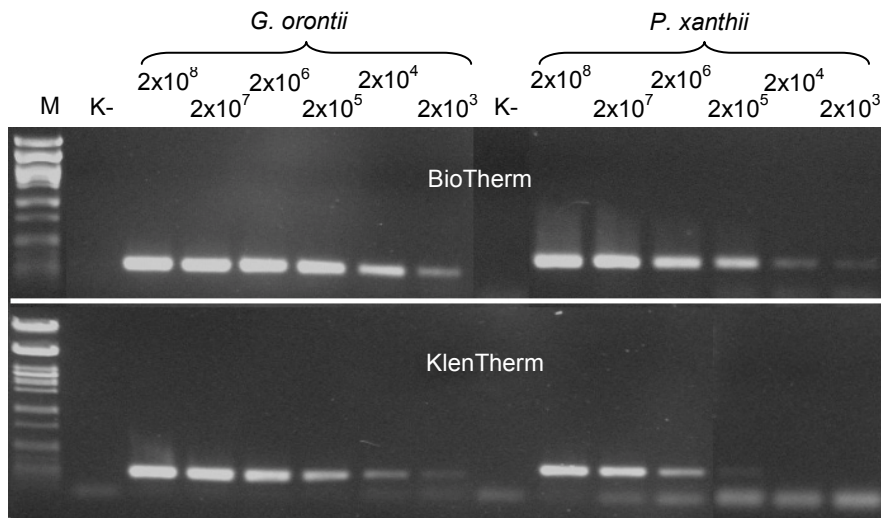


Abbildung 4.11 Vergleich von BioTherm und KlenTherm Polymerase.

Amplifikation spezifischer Produkte mit dem Primerpaar Go1s/Go4a für *G. orontii* und Px1s/Px2a für *P. xanthii* mit der BioTherm und KlenTherm DNA-Polymerase. Eingesetzt wurden 2×10^3 - 2×10^8 Kopienanzahlen des Plasmids mit der klonierten rDNA-ITS-Sequenz des Pilzes, der über den Banden angegeben ist. **M:** λ /PstI-Marker; **K-:** Kontrolle ohne DNA; 1 % Agarosegel.

Der Vergleich von KlenTherm und BioTherm Polymerase zeigte, dass durch die Verwendung von BioTherm Polymerase die Nachweisgrenzen erniedrigt werden konnten (Abbildung 4.11). Zwar waren bei allen eingesetzten Zielsequenzkonzentrationen von *G. orontii* Produkte zu sehen, aber die Produktmenge war mit der BioTherm Polymerase deutlich höher. Letzteres war auch bei *P. xanthii* der Fall. Mit der KlenTherm DNA-Polymerase konnte allerdings schon bei niedrigeren Mengen als 2×10^5 Kopien kein Produkt mehr nachgewiesen werden. Dies deutete darauf, dass die Sensitivität unter den getesteten Reaktionsbedingungen mit der KlenTherm Polymerase bei *P. xanthii* nicht, wie sich aus den beschriebenen Eigenschaften des Enzyms erwarten ließ, erhöht, sondern erniedrigt wurde. Für eine niedrigere Amplifikationseffizienz in einem KlenTherm-Reaktionsansatz sprachen auch die vermehrten Dimerprodukte, die als Bandenwolke im unteren Teil des Gels zu sehen sind (Abbildung 4.11). Die Erhöhung der Enzymmenge von 1 U auf 2 U im Reaktionsansatz hatte bei beiden Polymerasen keinen Einfluss auf die detektierte Produktmenge. Da hohe Enzymmengen jedoch unspezifische Reaktionen fördern können, zusätzlich der Kostenfaktor für eine PCR-Reaktion maßgeblich durch den Preis für das Enzym bestimmt wird, wurde 1 U Enzym in der PCR-Reaktion verwendet.

In der routinemäßigen Verwendung von KlenTherm Polymerase hatte sich herausgestellt, dass sie sehr sensitiv auf nicht vollständig gemischte Reaktionsansätze reagierte und außerdem bei der Amplifikation, vor allem von *P. xanthii*, immer wieder zu Ausfällen führte. Diese letzte Eigenschaft führte dazu, dass für die Entwicklung der homologen

Kompetitoren die BioTherm DNA-Polymerase benutzt wurde, die sich als sehr robust erwiesen hatte.

4.3.2 MgCl₂-Konzentration

Freies Mg²⁺ hat einen großen Einfluss auf eine Vielzahl von Prozessen in der PCR. Es beeinflusst die Enzymaktivität, das Primerannealing, die Denaturierung, die Produktspezifität, die Bildung von Primerdimeren und dadurch die Genauigkeit der Reaktion. Allerdings werden Mg²⁺-Ionen von Primern, DNA, dNTPs und im PCR-Ansatz vorhandenen Chelatoren gebunden, so dass die optimale MgCl₂-Konzentration am besten empirisch bestimmt werden sollte.

Bei dem Primerpaar Go1s/Go2a zeigte die Variation der MgCl₂-Konzentration von 1 bis 4 mM unter verschiedenen Annealingtemperaturen von 56 bis 60 °C, dass die höchste Produktmenge mit 3 mM MgCl₂ bei einer Annealingtemperatur von 60 °C gebildet wurde. Auch für das Primerpaar Px1s/Px2a lag das Optimum bei 3 mM bei einer Annealingtemperatur von 56 bis 58 °C.

4.3.3 dNTPs

Mit dem Primerpaar Px1s/Px2a wurden zwei dNTP-Konzentrationen, 100 µM und 200 µM je dNTP, getestet. Die Testung erfolgte mit der KlenTherm Polymerase und einer Variation der Annealingtemperatur von 56, 58 und 60 °C.

Die Produktmengen mit 100 µM je dNTP in den verschiedenen Temperaturvarianten unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Dagegen waren sie bei den Ansätzen mit 200 µM je dNTP bei 58 und 60 °C etwas erniedrigt und bei 56 °C brach die Reaktion sogar zusammen (Abbildung 4.12). Dies Ergebnis war auch mit anderen Primerkombinationen reproduzierbar.

Obwohl 200 µM je dNTP noch in den Konzentrationsbereich fällt, der als optimal für eine Amplifikation hinsichtlich Produktmenge, Spezifität und Genauigkeit angegeben wird (Innis et al. 1990), schien in diesem Fall die dNTP-Konzentration unter niedrigen Temperaturbedingungen zu hoch gewesen zu sein. Da freie dNTPs MgCl₂-Ionen binden, steht der Polymerase, die freies MgCl₂ zur Polymerisation benötigt, weniger MgCl₂ zur Verfügung. Im Fall von 200 µM je dNTP führte dies wahrscheinlich dazu, dass die Polymerase kein Produkt mehr synthetisieren konnte. Da die Reaktion mit niedriger werdender dNTP-Konzentration spezifischer wird und zum Teil auch Konzentrationen von

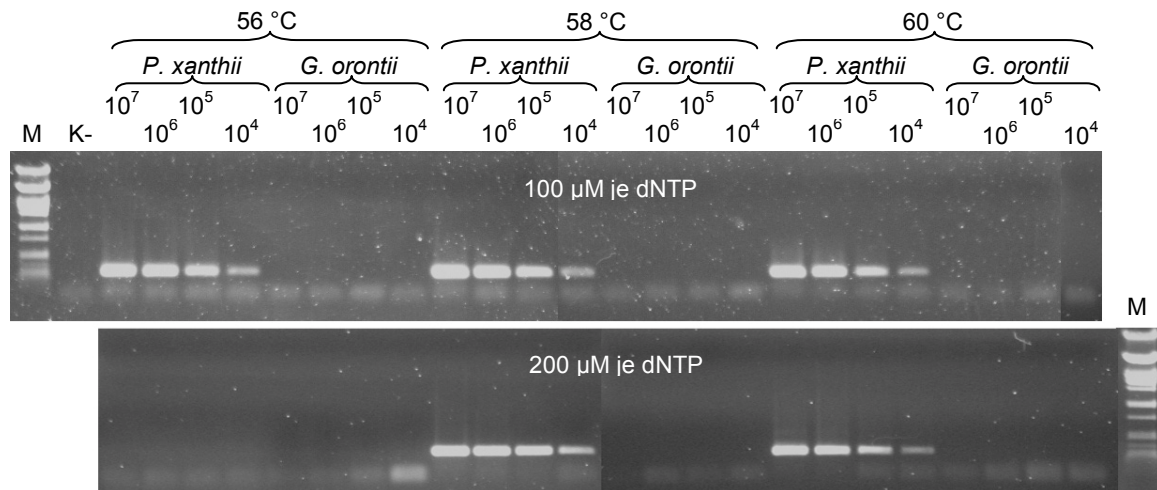


Abbildung 4.12 Vergleich von zwei dNTP-Konzentrationen.

Amplifikation mit dem Primerpaar Px1s/Px2a, mit 100 µM je dNTP (obere Bildhälfte) und 200 µM je dNTP (untere Bildhälfte) und zusätzlicher Variation der Annealingtemperatur (ganz oben angegeben). Eingesetzt wurden 10^4 - 10^7 Kopienanzahlen des Plasmids mit der klonierten rDNA-ITS-Sequenz des Pilzes, der über den Kopienzahlen angegeben ist. **M:** λPstI-Marker; **K-:** Kontrolle ohne DNA. 1 % Agarosegel.

50 bis 20 µM je dNTP empfohlen werden (Innis et al. 1999), wurde in weiteren Tests die dNTP-Konzentration auch auf 50 µM je dNTP erniedrigt. Dies führte jedoch zu einem Sensitivitätsverlust.

4.3.4 Annealingtemperatur

Bei vielen Optimierungsansätzen wurde zusätzlich die Annealingtemperatur variiert. Mit dem Primerpaar Px1s/Px2a konnten bei 54 bis 64 °C Annealingtemperatur Amplifikate erzeugt werden. Dabei nahm mit steigender Temperatur die Produktmenge ab. Die höchste Produktmenge wurde bei 58 °C erhalten, bei dem Primerpaar Go1s/Go4a bei 60 °C. Bei der Benutzung der KlenTherm DNA-Polymerase war die Amplifikation bei etwas höheren Annealingtemperaturen effizienter. Dies war auf die niedrigere Konzentration von monovalenten Kationen im BioTherm-Reaktionspuffer und die damit verbundene Erniedrigung des T_m -Werts im Vergleich zum KlenTherm-Reaktionspuffer zurückzuführen.

4.3.5 Primerkonzentration

Beide Primerpaare wurden anfänglich in einer Konzentration von 0,4 µM je Primer eingesetzt. Eine Reduktion auf 0,2 µM erhöhte jedoch die Spezifität in beiden Ansätzen. Eine weitere Reduktion auf 0,1 µM führte nur in Kombination mit 100 µM je dNTP zu einem Amplifikat, das jedoch sehr gering war.

4.3.6 Zyklenzahl

Bei vielen Applikationen muss die Quantifizierung im linearen Teil der Produktzunahme erfolgen, um verlässlich zu sein. Bei der Benutzung von internen Kompetitoren ist dies nicht immer notwendig, da das Verhältnis von Kompetitor zu initialer Menge auch in der Plateauphase gleich bleibt (Serth et al. 1998). Trotzdem sollte eine PCR-Amplifikation nicht unnötigerweise in die Plateauphase getrieben werden, da hier die Bedingungen immer suboptimaler werden und unspezifische Produkte zunehmen (Innis et al. 1999).

Die Zyklenzahl wurde bei der Amplifikation von *G. orontii* mit Go1s/Go2a unter Benutzung der KlenTherm Polymerase zwischen 25, 28 und 30 variiert. Bei 25 Zyklen konnten noch 2×10^6 Kopien in der Auftrennung des verdauten PCR-Produkts nachgewiesen werden. Bei 28 Zyklen 2×10^5 und bei 30 Zyklen 2×10^4 Kopien. Letztere Zyklenzahl entspricht auch den Empfehlungen, die Innis et al. (1990) für den Nachweis von $1,5 \times 10^4$ Molekülen gegeben haben.

Die Temperaturen und die Dauer der einzelnen Zyklusschritte wurden nur marginal verändert. Ausgegangen wurde von einem Standardprogramm von 30 s für jeden PCR-Schritt, einer Denaturation bei 95 °C, einer sich nach dem entsprechenden Primerpaar richtenden Annealingtemperatur und einer Elongation bei 72 °C, mit einer Anfangsdenaturation von 2 min bei 95 °C. Es erwies sich als vorteilhaft bei der Amplifikation von genomischer DNA die Anfangsdenaturation auf 4 min zu verlängern. Eine Temperaturerniedrigung war dagegen unvorteilhaft. Die Sensitivität erniedrigte sich durch die Verkürzung der Annealingzeit auf 15 s. Als optimal zeigten sich hier 20 s. Die Elongationszeit war für beide Produkte ausreichend, eine Verkürzung auf 20 s führte ebenso zu einem leichten Sensitivitätsverlust.

4.3.7 Hohe Templatemengen

Noch sehr hohe Templatemengen von 25×10^9 Kopien konnten mit den Primerpaaren Go1s/Go2a und Px1s/Px2a vor allem durch die Erhöhung der Annealingtemperatur auf 64 °C, die Reduktion der $MgCl_2$ -Konzentration auf 0,5 mM und auf 50 μM je dNTP spezifisch amplifiziert werden. Diese Bedingungen waren allerdings so extrem, dass niedrigere DNA-Mengen damit nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

4.3.8 Zusammenfassung der Optimierung

Aus den Optimierungen der beiden PCR ergaben sich in einem Ansatz folgende Komponentenkonzentrationen: 100 μM je dNTP, 0,2 μM je Primer mit 3 mM $MgCl_2$ und 1 U BioTherm DNA-Polymerase im 1x BioTherm-Reaktionspuffer. Die Zyklusbedingungen

waren wie folgt: 4 min Anfangsdenaturation bei 95 °C gefolgt von 30 Zyklen mit 30 s bei 95 °C, 20 s bei 60 °C für *G. orontii* oder 58 °C für *P. xanthii* und 30 s bei 72 °C mit einem standardmäßigen Programmabschluss (siehe 3.5.1).

4.4 Testung unter optimierten PCR-Bedingungen

4.4.1 Sensitivität und Spezifität auf Plasmid-DNA

Beide Primerpaare wiesen auf Plasmid-DNA eine hohe Sensitivität und Spezifität auf. PCR-Produkte konnten bei beiden Primerpaaren noch bis 2×10^3 Kopien nachgewiesen werden, dies entspricht 34 pg genomischer DNA von *P. xanthii* und 25,2 pg DNA von *G. orontii* (Umrechnung siehe 4.7.2.1). Die Spezifitätsgrenze für beide Primerpaare lag bei 2×10^7 Kopien. Bezogen auf genomische DNA hieß dies, dass die Primer Px1s/Px2a noch gegen eine Menge von 130 ng reiner genomischer *G. orontii*-DNA und die Primer Go1s/Go4a noch gegen ca. 170 ng reine genomische *P. xanthii*-DNA diskriminieren konnten. Bei dem Einsatz von 2×10^8 Kopien konnten beide Primerpaare nicht mehr spezifisch amplifizieren, allerdings war die eingesetzte Menge sehr hoch. Sie würde 1,7 µg genomischer DNA von *P. xanthii* und 1,3 µg von *G. orontii* entsprechen (Abbildung 4.13).

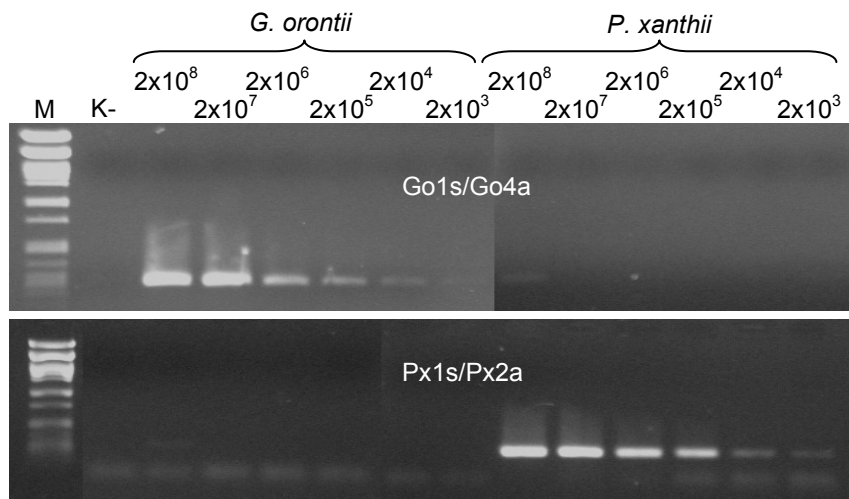


Abbildung 4.13 Spezifitätstestung der Primer Go1s/Go4a und Px1s/Px2a auf Plasmiden.

Als Template eingesetzt wurden 2×10^8 - 2×10^3 Kopienanzahlen des Plasmids mit der klonierten rDNA-ITS-Sequenz des jeweiligen Pilzes, der über den Banden angegeben ist. **M:** λ /PstI-Marker; **K-:** Kontrolle ohne DNA. 1 % Agarosegel.

4.4.2 Sensitivität und Spezifität auf genomischer DNA

Auf Grund der durch Sekundärstrukturen bedingten Komplexität genomischer DNA kann sich die Sensitivität und Spezifität einer PCR von den mit Plasmid-DNA ermittelten Werten unterscheiden. Deshalb wurden die Sensitivität- und Spezifität der Primer auch auf reiner genomischer DNA getestet.

Die Sensitivität der *G. orontii*-Primer Go1s/Go4a auf reiner Pilz-DNA war etwas höher als die der *P. xanthii*-Primer Px1s/Px2a. Die Nachweisgrenzen auf einem PA-Gel lagen für *P. xanthii* bei 1 pg, für *G. orontii* bei 500 fg genomischer DNA. Die Sensitivität erniedrigte sich durch den Einsatz von 150 ng genomischer Gurken-DNA als Hintergrund. Mit Hintergrund konnten nur noch ca. 10 pg jedes Pilzes nachgewiesen werden. Hierzu wurden 5 µL reines PCR-Produkt aufgetragen. Dies entspricht dem PCR-Volumen, das in den analysierten 15 µL des Restriktionsenzymverdaus vorhanden war (siehe 3.8.2 und 3.8.4). Die Spezifität der *P. xanthii*-Primer konnte noch gegen den Einsatz von mindestens 50 ng genomischer *G. orontii*-DNA nachgewiesen werden. Für die *G. orontii*-Primer gelang der Spezifitätsnachweis nur bis 10 ng (siehe Abbildung 4.16). Häufig wurde schon bei der geringsten eingesetzten genomischen DNA-Menge von *P. xanthii* bei der Amplifikation mit dem Primerpaar Go1s/Go4 eine schwache Bande sichtbar (Abbildung 4.14). Dies deutete daraufhin, dass die *G. orontii*-Primer auf genomischer DNA nicht so gut differenzieren konnten wie auf der Plasmid-DNA, oder aber, dass das *P. xanthii*-Isolat, aus dem die DNA isoliert wurde, nicht sauber war.

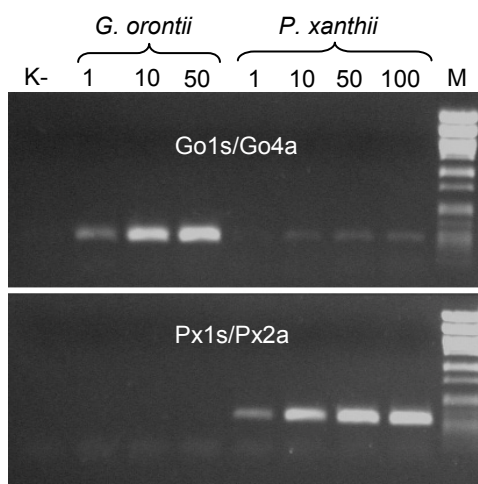


Abbildung 4.14 Spezifitätstestung der Primer Go1s/Go4a und Px1s/Px2a mit genomischer DNA.

M: λ /PstI-Marker; **1-100:** eingesetzte Menge genomischer DNA des über den Banden angegebenen Pilzes in ng; **K-:** Kontrolle ohne DNA. 1 % Agarosegel.

4.4.3 Spezifität gegenüber genomischer Gurken-DNA

Da es einerseits möglich war, dass bei einer Pilz-DNA-Extraktion auch Kontaminationen mit Wirts-DNA vorkommen konnten und andererseits in den späteren Versuchsproben Gurken-DNA als Hintergrund-DNA vorhanden sein würde, wurden beide Primerpaare auf ihre Diskrimierungsfähigkeit gegenüber genomischer Gurken-DNA getestet. Hierbei wurden 150 ng der Gurken-DNA als Template in einem Ansatz mit dem jeweiligen spezifischen Primerpaar eingesetzt und unter optimierten PCR-Bedingungen amplifiziert. Mit beiden Primerpaaren wurden äußerst schwache Banden amplifiziert (Abbildung 4.15). Die Banden konnten einerseits auf Grund der hohen eingesetzten DNA-Menge tatsächliche Amplifikate der Gurken-DNA sein, oder, da sie auf der gleichen Höhe liefen wie die spezifischen Produkte der jeweiligen Pilze, durch minimalen Befall der Gurkenblätter mit Echtem Mehltau hervorgerufen worden sein. Eine genauere Untersuchung wurde jedoch nicht unternommen, da die Bandenstärke, selbst unter der Annahme der Falschamplifikation auf Gurken-DNA, so gering war, dass ein Essay dadurch nicht gestört wurde.

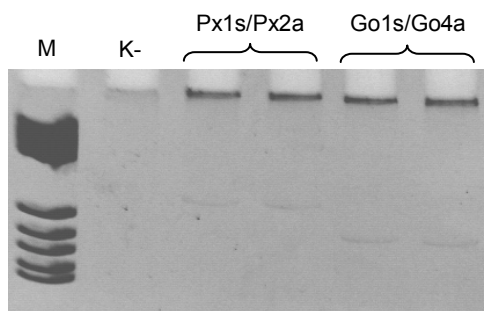


Abbildung 4.15 Testung der Primerpaare Px1s/Px2a und Go1s/Go4a mit genomischer Gurken-DNA.

Reine Gurken-DNA (150 ng) wurde als Template in einer spezifischen PCR eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit den über den Banden angegebenen Primerpaaren. Bei der Gelelektrophorese wird die Gurken-DNA als „Bande“ in den Geltaschen sichtbar. **M**: pBR322/*BsuRI*-Marker; **K-**: Kontrolle ohne DNA. 7 % PA-Gel: inverses Gelfoto.

4.4.4 Spezifität gegenüber verschiedenen Pilztaxa

Die entwickelten Primer wurden auch auf ihre Diskrimierungsfähigkeit gegenüber ausgewählten Vertretern aus anderen Pilztaxa überprüft, da Echte Mehltaukolonien unter Erhaltungs-, Versuchs oder Freilandbedingungen mit Saprophyten oder Hyperparasiten kontaminiert sein können. Die genomische DNA von verschiedenen Pilzisolaten (siehe Tabelle 3.14) wurde nach Möller et al. (1992) (siehe 3.7.4) extrahiert und über ein Gel videodensitometrisch quantifiziert (siehe 3.8.6.1). Nachdem die DNA mit den allgemeinen Primern ITS1/ITS4 auf ihre Amplifizierbarkeit überprüft worden war, wurden 10 ng des entsprechenden Pilzes als Template in die spezifische PCR eingesetzt. Beide Primerpaare konnten gegen die getesteten Pilztaxa diskriminieren und amplifizierten die jeweils spezifischen Produkte für *P. xanthii* und *G. orontii* (Abbildung 4.16).

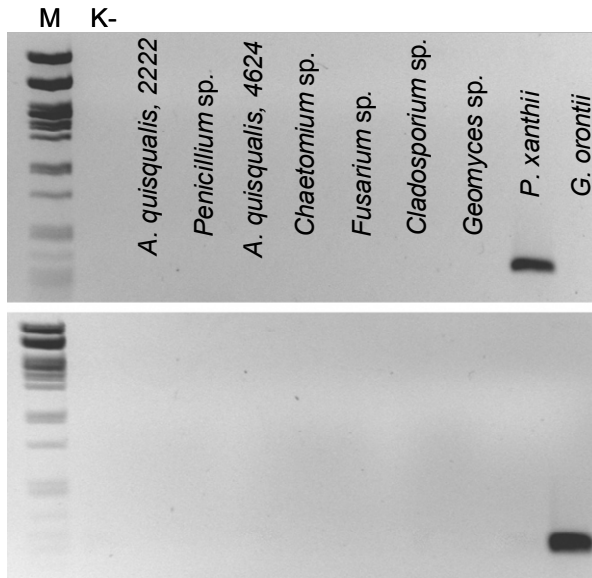


Abbildung 4.16 Spezifitätstestung mit verschiedenen Pilzarten.

Überprüfung der Primer Px1s/Px2a (oberer Teil des Bildes) und Go1s/Go4a (unterer Teil des Bildes) auf ihre Spezifität gegenüber 10 ng genomischer DNA verschiedener Pilzarten. **M:** λ PstI-Marker; **K-:** Kontrolle ohne DNA. 1 % Agarosegele; inverse Gelfotos.

4.5 Entwicklung und Testung heterologer Kompetitoren

4.5.1 Design und Klonierung

Die ersten Kompetitoren, die entwickelt wurden, basierten auf der Amplifikation der rDNA-ITS-Region beider Pilze mit den Primerpaaren Go1s/Go2a für *G. orontii* und Px1s/Px2a für *P. xanthii*.

Das Design der heterologen Kompetitoren wurde unter Berücksichtigung folgender Punkte vorgenommen: sie sollten dieselbe Länge haben wie die Zielsequenz, möglichst denselben GC-Gehalt und mit denselben Primern amplifizierbar sein. Zur Unterscheidung der beiden Amplicons ist es üblich, mindestens eines der beiden Fragmente mit einer Restriktionsendonuklease zu verdauen. Erfolgt der Verdau allerdings nicht vollständig, kann es mit dieser Einzelschnitttechnik zu einer Überschätzung des ungeschnittenen Fragments kommen. Um diesen Fehler zu minimieren, sollte die Doppelschnitttechnik angewendet werden, die auf dem Vorkommen derselben, allerdings verschobenen, Restriktionsschnittstelle in Target- und Kompetitorfragment beruht.

In der Zielsequenz von *P. xanthii* existiert die unikate Restriktionsschnittstelle *Bgl*I, in der von *G. orontii* *Hin*6I. Sequenzen verschiedener Plasmide wurden hinsichtlich der oben genannten Punkte untersucht. Geeignete Sequenzen, in denen natürliche unikate Erkennungsmotive der entsprechenden Restriktionsenzyme lagen, fanden sich für beide Kompetitoren im pGEM T-Vektor. Der Kompetitor für *P. xanthii* wurde derart entwickelt, dass sich nach einem Verdau mit *Bgl*I der 295 bp lange heterologe Kompetitor mit den Fragmentgrößen 199 bp und 96 bp von den Zielsequenzfragmenten von 241 bp und 54

bp unterscheiden ließ. Die 207 bp großen Fragmente des Kompetitors und der Zielsequenz von *G. orontii* wurden durch einen *Hin6I*-Verdau in 117 bp und 90 bp bzw. 181 bp und 26 bp gespalten (Abbildung 4.17).

Es wurden so genannte Hybridprimer entwickelt (Watzinger et al. 2001), 42-50-mere, die am 5'-Ende aus der Sequenz des entsprechenden Primers bestanden und am 3'-Ende komplementär zu der gewünschten pGEM-Sequenz waren. Mittels der Hybridprimerpaare Hyb_Px1s/pGEM und Hyb_Px2a/pGEM für *P. xanthii*, sowie Hyb_Go1s/pGEM und Hyb_Go2a/pGEM für *G. orontii* (siehe Tabelle 3.15) wurden die entsprechenden Fragmente des pGEM-Vektors wie folgt amplifiziert: 5 ng pGEM-DNA, 3 mM MgCl₂, 0,4 μM je Primer, 250 μM je dNTP und 1 U Standard DNA-Polymerase im entsprechenden 1x Reaktionspuffer, mit 5 min Initialdenaturation bei 95 °C und 35 Zyklen mit je 30 s bei 95 °C, 68 °C und 72 °C, gefolgt vom Standardprogrammabschluss. Die Fragmente wurden nachfolgend in den pGEM T easy-Vektor kloniert (siehe 3.6) und zur Kontrolle sequenziert (siehe 3.7.11). Es folgte eine Maxipräparation (siehe 3.7.2), Linearisierung (siehe 3.7.3) und die Quantifizierung (siehe 3.8.5). Die Sequenzen der beiden heterologen Kompetitoren finden sich im Anhang in Abbildung 7.2.

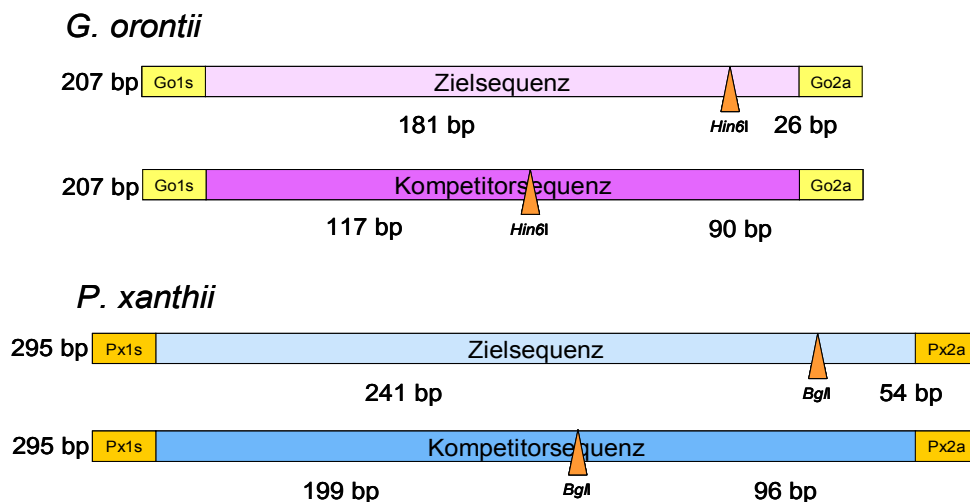


Abbildung 4.17 Fragmentschema der Ziel- und heterologen Kompetitorsequenzen.

Dargestellt sind die für das Primerpaar Go1s/Go2a 207 bp große Zielsequenz und der dazugehörige heterologe Kompetitor von *G. orontii*, mit jeweiliger Restriktionsschnittstelle *Hin6I* (oben), und die 295 bp große Zielsequenz von *P. xanthii* für das Primerpaar Px1s/Px2a mit dem dazugehörigen heterologen Kompetitor und der jeweiligen Restriktionsschnittstelle *BglI* (unten). Abbildung nicht im Maßstab.

4.5.2 Testung des heterologen Kompetitors von *G. orontii*

Zur Überprüfung der Amplifikationseffizienz von Kompetitor und Zielsequenz wurden beide Fragmente in einer PCR koamplifiziert. Gleiche Kopienzahlen der beiden linearisierten Plasmide wurden in einem PCR-Ansatz wie unter 4.3 beschrieben mit KlenTherm DNA-Polymerase angesetzt und amplifiziert. In einem Volumen von 50 µL wurden 15 µL des PCR-Ansatzes wie unter 3.8.2 beschrieben mit einem Restriktionsenzym verdaut und 15 µL dieses Spaltansatzes auf einem PA-Gel aufgetrennt und videodensitometrisch analysiert (siehe 3.8.4). Die Auswertung erfolgte nur über die beiden größten Banden, das 181 bp-Fragment der Zielsequenz und das 117 bp-Fragment des Kompetitors (Abbildung 4.18). Um die durch die Geldokumentation und Auswertungssoftware bedingte Variation zu minimieren, wurde die Auswertung als Wiederholung auf zwei Gelen vorgenommen.

Wie in Abbildung 4.18 zu sehen ist, konnte keine 207 bp große Bande nachgewiesen werden. Dies zeigte einerseits, dass wie erwartet keine Heteroduplizese gebildet wurden, und andererseits, dass auch die Restriktionsspaltung der ungereinigten PCR-Fragmente vollständig war. Das Bandenstärkenverhältnis von Zielsequenz zu Kompetitor nahm mit steigender eingesetzter Plasmidkopienzahl zu. Dies bedeutete, dass die Zielsequenz mit

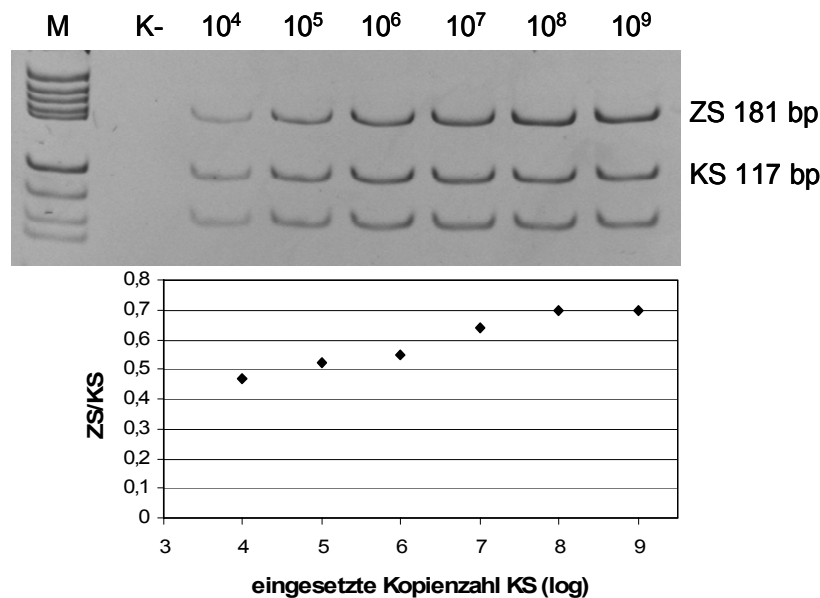


Abbildung 4.18 Verhältnis von heterologem Kompetitor und *G. orontii*-Plasmidzielsequenz bei Koamplifikation mit Go1s/Go2a.

Auftrennung der Produkte aus der Restriktionsspaltung bei Einsatz der gleichen Kopienzahl jedes Plasmids. Im Diagramm dargestellt ist das Verhältnis der Bandenstärken von ZS/KS nach Längenkorrektur gegen den Logarithmus der eingesetzten Kopienzahl des Kompetitors. Die Werte entsprechen dem Mittel zweier Auswertungen. **ZS**: Zielsequenz; **KS**: heterologer Kompetitor **M**: pBR322/*BsuRI*; **K-**: Kontrolle ohne DNA. 7 % PA-Gel; inverses Gelfoto.

steigender Konzentration effizienter amplifiziert wurde. Ein konstantes Verhältnis konnte erst im oberen Kopienzahlbereich von 10^8 und 10^9 mit dem Erreichen der Plateauphase beobachtet werden. Der Kompetitor konnte unter diesen Amplifikationsbedingungen auf Grund der unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen nicht für die Quantifizierung herangezogen werden.

4.5.3 Testung von Zusätzen

Durch die Zugabe von PCR-Zusätzen sollte getestet werden, ob es möglich war, die Amplifikationseffizienzen der beiden Fragmente anzugleichen. Durch den Einsatz von PCR-Zusätzen kann die Schmelztemperatur herabgesetzt und die Amplifikation sekundärstruktureicher DNA-Sequenzen vereinfacht werden. Eingesetzt werden häufig Detergenzien wie Tween 20 oder auf Betain basierende Stoffe (z. B. Q-Solution von Qiagen) (Demeke & Adams 1992; Wilson 1997). Auch Veränderungen der Zyklusparameter, vor allem eine Verlängerung der Denaturierungszeit, können zu einer effizienteren Amplifikation führen.

Getestet wurden 1 % und 3 % Tween 20, 2 mM TMAC und 1x Q-Solution als Zusätze im PCR-Ansatz. Die Amplifikationseffizienz der beiden Fragmente konnte in keinem Fall angeglichen werden. Das Bandenverhältnis blieb mit zunehmender Plasmidkonzentration ansteigend und ein Bereich mit konstantem Verhältnis konnte nicht gefunden werden. Einzig durch den Zusatz von Q-Solution konnte ein fast konstantes Verhältnis im Bereich von 10^6 bis 10^8 identifiziert werden. Allerdings war dabei die Targetbande insgesamt sehr schwach.

Sowohl die Verlängerung und Erhöhung des Initial- als auch des Denaturierungsschritts innerhalb eines Zyklus waren nicht Ziel führend. Eine Erhöhung der Initialdenaturierung auf 5 min bei 97 °C führte nur noch bei sehr hohen Plasmidkonzentrationen zur Amplifikation von Banden.

Da auch durch diese Maßnahmen keine Angleichung der Amplifikationseffizienzen gelang, konnte der entwickelte heterologe Kompetitor nicht zur Quantifizierung herangezogen werden. Die Testung des heterologen Kompetitors von *P. xanthii* wurde nicht mehr vorgenommen.

4.6 Entwicklung und Testung homologer Kompetitoren

4.6.1 Design und Klonierung

Die Entwicklung der homologen Kompetitoren erfolgte auf der klonierten rDNA-ITS-Sequenz des jeweiligen Pilzes durch die Anwendung der PCR-Mutagenese (siehe 3.5.3). Wie auch bei den heterologen Kompetitoren sollte die Unterscheidung der Fragmente durch die Doppelschnitttechnik erfolgen. Hierzu war es nötig, die PCR-Mutagenese zweimal auf einem Plasmid durchzuführen: Einmal um die natürliche Einzelschnittstelle zu entfernen und das zweite Mal um sie an anderer Stelle zu generieren. Um den homologen Kompetitor so ähnlich wie möglich zu halten, wurden geeignete Stellen gesucht, an denen durch minimale Mutationen, also der Veränderung von ein bis zwei Nukleotiden, die gewünschte Restriktionsschnittstelle entstehen würde.

Die natürliche Restriktionsstelle *Hin6I* in der Zielsequenz von *G. orontii* wurde mit dem Primerpaar GoMut3/GoMut4 verändert. Die Mutation saß am äußersten 5'-Ende des Primers GoMut3 und veränderte die Erkennungssequenz GCGC von *Hin6I* zu GCCC. Die zweite Mutation wurde durch das Primerpaar GoMut5/GoMut6 eingefügt. Auch hier saß das mutierte Nukleotid am äußersten 5'-Ende des Primers GoMut5. Es veränderte die Ursprungssequenz GCTC zu der *Hin6I* Erkennungssequenz GCGC. Die homologe Kompetitorsequenz unterschied sich somit von der Zielsequenz nur in zwei Nukleotiden (siehe Anhang Abbildung 6.3). Durch die verschobene *Hin6I*-Schnittstelle konnte der Kompetitor mit seinen 149 bp und 92 bp langen Fragmenten eindeutig von den 181 bp und 60 bp Fragmenten der Zielsequenz und auch von der 241 bp langen Heteroduplex-Fraktion getrennt werden (Abbildung 4.19).

In der Zielsequenz von *P. xanthii* wurde die Erkennungssequenz von *BglI* GCCNNNGGC mit dem Primerpaar PxMut1s/PxMut2a zu GCCNNNGCC mutiert. Die zweite Mutation erfolgte mit dem Primerpaar PxMut3/PxMut4 von GCCNNNCCAT mit dem Ersetzen der Nukleotide CA durch GG zur Erkennungssequenz von *BglI*. Der so entwickelte homologe Kompetitor wies damit nur drei Nukleotide Unterschied zur Zielsequenz auf (siehe Anhang Abbildung 6.4). Nach einem *BglI*-Verdau wurde die Targetsequenz in die Fragmente 241 bp und 54 bp gespalten, der homologe *P. xanthii*-Kompetitor in ein 166 bp und ein 129 bp großes Stück. Die 295 bp lange Heteroduplex-Bande war eindeutig von dem jeweils längsten Fragment des Targets und des Kompetitors zu unterscheiden (Abbildung 4.19).

Die erste PCR-Mutagenese enthielt 10 ng des unverdauten rDNA-ITS-Plasmids des jeweiligen Pilzes als Template-DNA. Das Produkt wurde eluiert, phosphoryliert, ligiert und

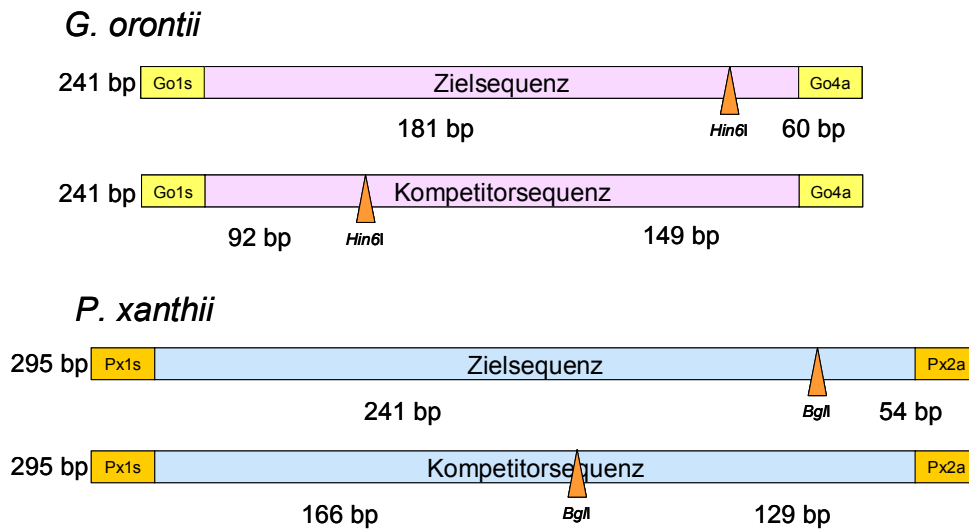


Abbildung 4.19 Fragmentschema der Ziel- und homologen Kompetitorsequenzen.

Die für das Primerpaar Go1s/Go4a 241 bp große Zielsequenz und der dazugehörige homologe Kompetitor von *G. orontii*, mit jeweiliger Restriktionsschnittstelle *Hin6I* (oben), und die 295 bp große Zielsequenz von *P. xanthii* für das Primerpaar Px1s/Px2a mit dem dazugehörigen homologen Kompetitor und der jeweiligen Restriktionsschnittstelle *BglI* (unten). Abbildung nicht im Maßstab.

mit *DpnI* verdaut (siehe 3.5.3). Ein Aliquot dieses Verdau dient als Template in der zweiten PCR-Mutagenese.

Die PCR-Ansätze enthielten weiterhin 250 μ M je dNTP, 0,2 μ M je Primer, 3 % DMSO und 0,4 U Phusion DNA-Polymerase in 20 μ L des 1x Phusion HF-Puffers. Die Amplifikation erfolgte mit 30 s bei 98 °C Anfangsdenaturation und 16 Zyklen mit 10 s bei 98 °C, 30 s Annealing und 135 s Elongation bei 72 °C. Das Programm wurde standardmäßig beendet. Die Annealingtemperatur für das Primerpaar PxMut1s/PxMut2a betrug 68 °C, für die Primerpaare PxMut3/PxMut4 und GoMut3/GoMut4 65 °C und für GoMut5/GoMut6 55 °C.

Die Produkte der zweiten Mutagenese wurden wiederum eluiert, phosphoryliert, ligiert und mit *DpnI* verdaut (siehe 3.5.3) und kloniert (siehe 3.6.4). Aus transformierten Bakterienkolonien wurden klare Lysate gewonnen, die im Folgenden mit einer spezifischen PCR und durch einen Verdau des PCR-Produkts auf die Präsenz der eingefügten Restriktionsstelle kontrolliert wurden. Bakteriendauerkulturen wurden angelegt (siehe 3.6.6) und einzelne Klone sequenziert (siehe 3.7.11). Nach einer Aufbereitung im Maximaßstab (siehe 3.7.2) wurden die Plasmide linearisiert (siehe 3.7.3), im Photometer quantifiziert (siehe 3.8.5) und in definierten Mengen aliquotiert und eingefroren (siehe 3.8.7). Die Sequenzen der homologen Kompetitoren finden sich im Anhang in den Abbildungen 7.3 und 7.4.

4.6.2 Systemvalidierung

Zur Systemüberprüfung wurde eine konstante Menge Kompetitorsequenz mit einer Titrationsreihe des Zielsequenzplasmids unter optimierten Bedingungen koamplifiziert. Wie unter 3.8.2 aufgeführt, wurden 15 µL des PCR-Produkts mit einem Restriktionsenzym gespalten und 10 µL des Verdau auf einem PA-Gel aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.8.6.3 beschrieben. Zur Abschätzung der Güte der errechneten Zielsequenzmenge wurde diese gegen die eingesetzte Zielsequenzmenge grafisch aufgetragen.

Für beide entwickelten Systeme konnte bei der Koamplifikation von 2×10^5 bis 9×10^6 Zielsequenzplasmidkopien mit der konstanten Kompetitorkopienzahl von 10^6 ein linearer Bereich nachgewiesen werden. Die Geraden verliefen dabei in beiden Fällen durch den Nullpunkt und hatten eine Steigung von 0,98 für *G. orontii* ($R^2=0,98$) und 0,97 für *P. xanthii* ($R^2=0,99$) (Abbildung 4.21).

Für die Anwendung bedeuteten diese Ergebnisse, dass mit einem Kompetitor innerhalb eines Bereichs von mindestens einer 10er-Potenz über und unter der eingesetzten Kompetitorkopienzahl quantifiziert werden konnte. Wenn eine Quantifizierung über diesen Bereich hinaus nötig würde, könnte theoretisch eine entsprechend höhere oder niedrigere Kompetitorkopienzahl eingesetzt werden.

Eine Überprüfung der entwickelten Systeme bestätigte den linearen Bereich in den angegebenen Grenzen auch beim Einsatz einer Kompetitormenge von 10^4 Kopien.

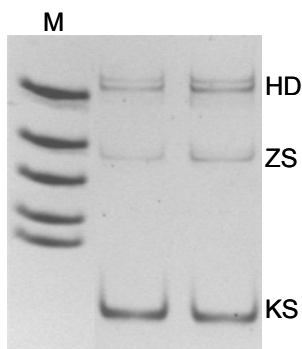


Abbildung 4.20 Doppelte Heteroduplex-Bande bei Migration der *P. xanthii*-Produkte an zwei Beispielproben.
M: pBR322/*Bsu*RI-Marker;
HD: Heteroduplizates;
ZS: Zielsequenz;
KS: Kompetitorsequenz.
 7 % PA-Gel; inverses Gel-foto.

Bei längerer Migration der *P. xanthii*-Restriktionsverdauprodukte, trennte sich die Heteroduplex-Bande in zwei Fragmente auf (Abbildung 4.20). Das Erscheinen der doppelten Bande war auf einen nicht vollständigen Restriktionsverdau der PCR-Fragmente zurückzuführen. Ein Beispiel für den nicht vollständigen Verdau findet sich in den K⁺-Kontrollen von Abbildung 4.30, in denen neben der spezifisch amplifizierten Bande des jeweiligen Targets auch eine schwache Bande der Größe 295 bp zu sehen ist. Die kleinen Sequenzunterschiede zwischen den tatsächlichen Heteroduplizates und den unverdauten Produkten, führten augenscheinlich zu einem unterschiedlichen Migrationsverhalten, so dass sie sich bei längerer Migration voneinander trennten. Eine

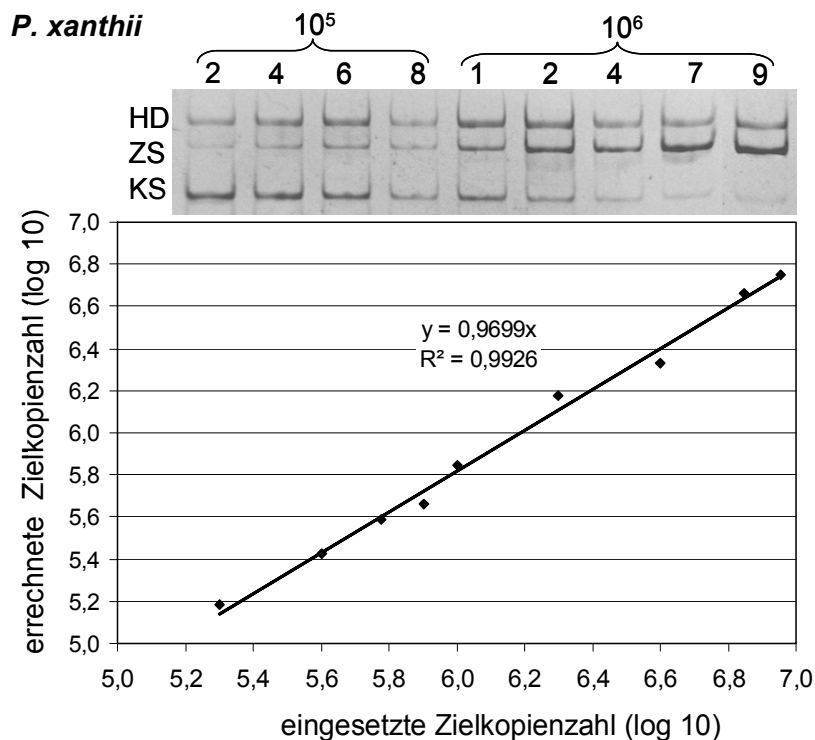
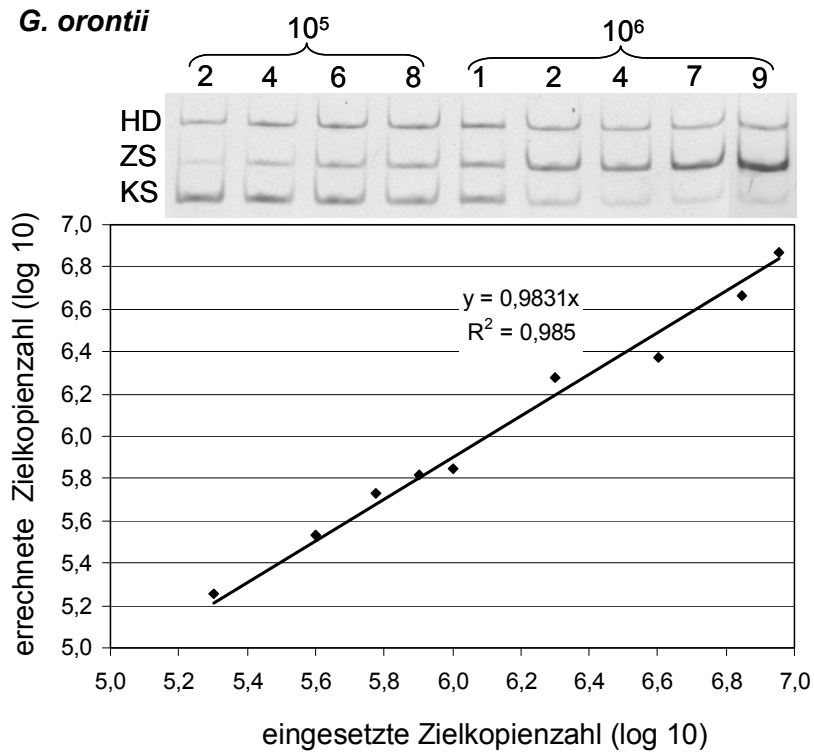


Abbildung 4.21 Nachweis des linearen Bereichs der kompetitiven PCR von *G. orontii* (oben) und *P. xanthii* (unten). Eine konstante Konkurrentorkopienzahl von 10^6 wurde mit einer variablen Zielsequenzplasmidkopienzahl von 2×10^5 bis 9×10^6 , die über den Banden angegeben ist, koamplifiziert. Der obere Bereich zeigt die Gelauswertung, im Diagramm ist die errechnete Zielsequenzmenge gegen die eingesetzte Zielsequenzmenge aufgetragen. **HD**: Heteroduplizese; **ZS**: Zielsequenz; **KS**: Konkurrentorsequenz. 7 % PA-Gele; inverse Gelfotos.

Überprüfung ergab, dass eine Korrektur der Heteroduplex-Bande höchstens 3 % des quantifizierten Produktes ausmachte. Der Fehler wurde vernachlässigt, da durch die angewendete Doppelschnitttechnik sowohl Ziel- als auch Kompetitorsequenz betroffen waren und somit gleichermaßen unterschätzt wurden. Auch bei den Positivkontrollen von *G. orontii* zeigte sich, dass der Restriktionsverdau der qPCR-Produkte nicht immer vollständig war. Hier allerdings ließen sich die unverdauten Produkte mit einer gelelektrophoretische Auftrennung nicht von den echten Heteroduplizaten unterscheiden.

4.6.3 Klonierung der beiden Kompetitorsequenzen in ein Plasmid

Als Ausgangsvektor wurde das Plasmid mit der homologen Kompetitorsequenz für *G. orontii* gewählt. Da beide Kompetitorsequenzen das 5.8S-rRNA-Gen enthalten, das bei beiden Pilzen stark konserviert ist, sollte die homologe Kompetitorsequenz von *P. xanthii* in 3'-5'-Richtung eingefügt werden, um die Bildung von Sekundärstrukturen oder Rehybridisierungen innerhalb des Plasmids zu minimieren.

Auf Grundlage der Oligonukleotide Px1s und Px2a wurden die neuen Primer PstI_Px1s und NarI_Px2a (Tabelle 3.15) entwickelt, die am 5'-Ende die Erkennungssequenz des entsprechenden Restriktionsenzym enthalten. Um einen Verdau durch die Restriktionsenzyme zu gewährleisten, wurden die Primersequenzen um die vom Hersteller empfohlene Anzahl Adenosin verlängert. Die homologe Kompetitorsequenz von *P. xanthii* wurde mit den Primern PstI_Px1s und NarI_Px2a unter optimierten Bedingungen amplifiziert. Die Annealingtemperatur betrug 65 °C. Das PCR-Fragment und der Vektor wurden anschließend jeweils mit den Enzymen NarI und PstI verdaut, über ein Gel gereinigt (siehe 3.7.8), ligiert (siehe 3.6.1), kloniert (siehe 3.6.2) und aufgearbeitet (siehe 3.7.1). Nach der Kontrolle des Inserts und der Sequenzierung erfolgte die Präparation des Plasmids im Maximaßstab (siehe 3.7.2).

4.7 Experimentelle Überprüfung der Methode im Mischinfektionsversuch

4.7.1 Grundlegende Zusammenhänge

Für die Durchführung des Mischinfektionsversuchs mussten im Vorfeld einige biologische Zusammenhänge geklärt werden. Durch ihre Kenntnis konnte die spätere Versuchsdurchführung zum einen vereinfacht werden, wie durch die Berechnung der Blattfläche mit Hilfe der linearen Blattdimensionen, zum anderen war es durch die Bestimmung des Zusammenhangs zwischen Frischmasse und Blattfläche und durch die

Messung des DNA-Gehalts der Blätter möglich, die im Mischversuch erhobenen Daten auf eine korrekte Basis zu beziehen.

4.7.1.1 Berechnung der Blattfläche

Gurkenblätter wurden wie unter 3.9.1.1 beschrieben vermessen. Die Blattfläche BF (cm^2) konnte sehr genau ($R^2=0,986$) über folgende Gleichung mit dem Produkt aus Blattlänge und Blattbreite $BB \cdot BL$ (cm^2) berechnet und für die einfache Bestimmung der Blattfläche während eines Versuchs benutzt werden (Abbildung 4.22):

$$BF = 0,372 \cdot (BB \cdot BL)^{1,1269} \quad \text{Gl. 4.1}$$

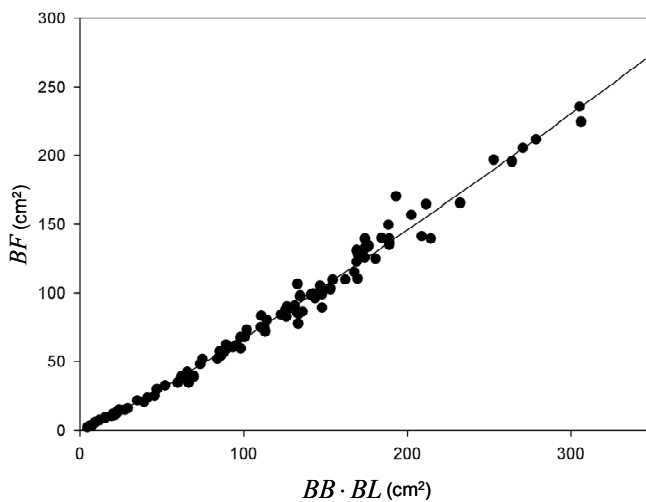


Abbildung 4.22
Zusammenhang zwischen dem Produkt aus Blattbreite und Blattlänge ($BB \cdot BL$) und der Blattfläche (BF) von Gurkenblättern.

Die eingezeichnete Regressionskurve ist im Text unter Gleichung 4.1 aufgeführt (N=95).

4.7.1.2 Zusammenhang zwischen Blattfrischmasse und Blattfläche

Die Blattfrischmasse FM (g) und die Blattfläche BF (cm^2) von Gurken der Sorte 'Chinesische Schlange' wurden, wie unter 3.9.1.2 beschrieben, erhoben. Die in Abbildung 4.23 gezeigten Daten ergaben den in Gleichung 4.2 dargestellten Zusammenhang ($R^2=0,988$).

$$FM = 0,017 \cdot BF \quad \text{Gl. 4.2}$$

Da nicht immer eine sofortige Verarbeitung des frischen Blattmaterials möglich war, wurde zusätzlich überprüft, ob eine Lagerung bei -20 °C einen Einfluss auf die später ermittelte Frischmasse der Blätter hatte. Es zeigte sich, dass das Gewicht der gefrorenen Blätter nur um höchstens 1 % von dem Frischgewicht abwich. Die Blätter konnten deshalb bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren werden und die Probenentnahme auch bei gefrorenen Blättern über das Gewicht erfolgen.

Über den ermittelten Zusammenhang von Blattmasse und Blattfläche ergab sich, dass 100 mg Blattfrischmasse einer Blattfläche von 5,8823 cm² entsprachen. Daher konnte die Angabe der quantifizierten Pilz-DNA auch auf die Blattfläche bezogen erfolgen.

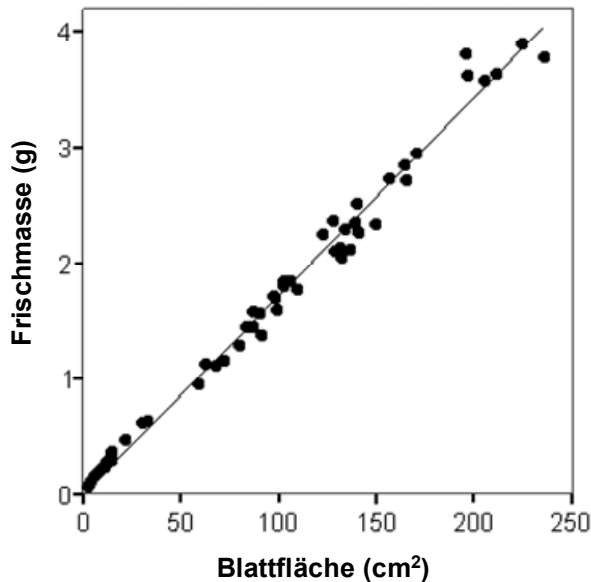


Abbildung 4.23
Zusammenhang zwischen
Blattfläche und Frischmasse
bei Gurkenblättern. Analysiert wurden voll turgeszente Blätter unterschiedlicher Größe der Gurkensorte 'Chinesische Schlange'. Die eingezeichnete Regressionsgerade ist im Text unter Gleichung 4.2 aufgeführt (N=53).

4.7.1.3 DNA-Gehalt der Gurkenblätter

Neben der Blattfläche ist es möglich, die DNA-Konzentration der Probe und somit den DNA-Gehalt der Blätter als Basis für die Verrechnung der quantifizierten Pilz-DNA heranzuziehen. Die Angabe kann dann in % von der Gesamt-DNA erfolgen. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, muss allerdings sichergestellt werden, dass der DNA-Gehalt der aller Blätter vergleichbar ist und sich nicht, z. B. mit zunehmendem Alter, verändert. Aus diesem Grund wurde die DNA aus 100 mg Frischmasse physiologisch unterschiedlich alter Blätter extrahiert und der Gesamt-DNA-Gehalt, wie unter 3.9.1.3 beschrieben, bestimmt und statistisch ausgewertet.

Über Gleichung 4.2 kann der ermittelte DNA-Gehalt pro 100 mg Frischmasse auch auf 5,88 cm² Blattfläche bezogen werden. In Abbildung 4.24 ist der DNA-Gehalt der Gurkenblätter in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetragen. Durch die farbige Markierung der Blattstufen wird der Zusammenhang zwischen physiologischem Alter und Blattgröße deutlich: Die größeren Blätter waren auch physiologisch älter. Eine Ausnahme bildeten die Blätter 1, die in ihrer Größe begrenzt waren und nicht über 140 cm² groß wurden. Die Abnahme des DNA-Gehalts war am höchsten bei der Blattflächenzunahme bis 50 cm², bei Blättern mit einer Blattfläche zwischen ca. 50 und 200 cm² änderte sich der DNA-Gehalt nur noch wenig. Betrachtet nach dem physiologischen Alter, ergab sich, dass die

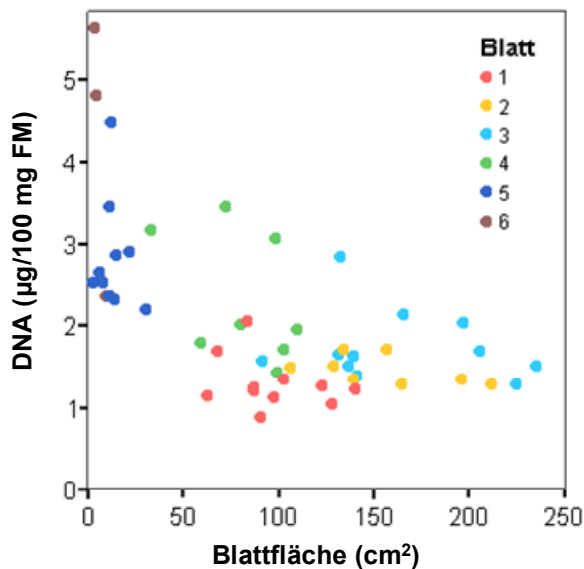


Abbildung 4.24 DNA-Gehalt der Blätter pro 100 mg Blattfrischmasse (FM) in Abhängigkeit von der Blattfläche. Analysiert wurden die Blätter von 24 Tage alten Gurkenpflanzen der Sorte 'Chinesische Schlange'. Farblich gekennzeichnet sind die Blätter 1 bis 6. Die Zahlen der Blätter bezeichnen die Position des Blattes am jeweiligen Internodium. Dabei ist 1 das älteste und 6 das jüngste Blatt.

jüngsten Blätter (Blätter 5 und 6) den höchsten (im Mittel 2,83 µg und 4,27 µg pro 100 mg FM) und die ältesten Blätter (Blatt 1) den niedrigsten DNA-Gehalt (1,29 µg) hatten (siehe Anhang Tabelle 7.1). Die statistische Analyse des DNA-Gehalts der Blätter 1 bis 3 ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Blatt 1 und Blatt 3, nicht aber zwischen Blatt 1 und Blatt 2 und zwischen Blatt 2 und Blatt 3 (siehe Anhang Tabellen 7.2 bis 7.4).

Aus diesem Zusammenhang ließ sich für die zu entwickelnde Methode schließen, dass eine Normierung der quantifizierten Pilz-DNA über die jeweiligen DNA-Konzentrationen der Proben nur in einem gewissen Bereich möglich war: Die analysierten Blätter sollten mindestens 50 cm² groß sein und sich in möglichst gleichem physiologischem Alter und Zustand befinden. Eine Testrechnung ergab, dass der in diesem Fall abweichende DNA-Gehalt der Blätter 1 auf eine potenzielle Quantifizierung nur sehr geringe Auswirkungen gehabt hätte. Bei der Normierung der Quantifizierungsergebnisse durch die spezifische DNA-Konzentration der Proben, sollte deshalb darauf geachtet werden, dass die gemessene Gesamt-DNA-Konzentration der Probe auch durch das Blattalter beeinflusst werden kann. Die Daten sollten deshalb statistisch auf einen signifikanten Einfluss der Blattstufe überprüft werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die DNA-Gehalte der Blätter unter den jeweiligen Versuchsbedingungen stärker voneinander unterscheiden, als es in dieser Testung beobachtet werden konnte.

4.7.2 Mischinfektionsversuch

Der Mischinfektionsversuch wurde wie unter 3.9.2 bis 3.9.8 beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

4.7.2.1 Eichung

Um die Ergebnisse der Quantifizierung in ng genomischer Pilz-DNA angeben zu können, musste im Vorfeld bestimmt werden, wie viele Kompetitorkopien einem ng pilzlicher DNA entsprachen. Hierzu wurden genau bestimmte Mengen reiner Pilz-DNA mit variablen Kompetitormengen koamplifiziert und so die Kopienzahl pro ng errechnet. Für *G. orontii* wurden 79242 Kopien und für *P. xanthii* 57974 Kopien pro ng genomischer DNA bestimmt. Die Nachweisgrenze der kompetitiven pPCR betrug für beide Pathogene 10 pg genomische DNA.

4.7.2.2 Befallsstärke und Pilz-DNA-Gehalt in den Einzelvarianten

In der *P. xanthii*-Variante wurden 66 Proben genommen. Davon wurden zwei Proben (Blatt 1, 21 DAI) nicht ausgewertet, da die Blätter abgestorben waren. Bei vier Proben konnte die Pilz-DNA nicht quantifiziert werden. Zwei davon waren von Blatt 3 am ersten Boniturtag mit einer sehr geringen Befallsstärke (0,02 % und 0,49 %) und die anderen beiden betrafen Proben von Blatt 1 am dritten Boniturtag mit einer sehr hohen Befallsstärke (52,67 % und 34,07 %). In der *G. orontii*-Variante wurden 44 Proben genommen. In zwei Fällen wurden die Proben nicht verarbeitet, da die Blätter abgestorben waren (Blatt 1, 21 DAI) und in sieben Fällen konnte keine Pilz-DNA nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich durchweg um Proben von Blättern mit sehr geringer Befallsstärke (5 mal Blatt 1 bis 3, 7 DAI und 2 mal Blatt 4, 14 DAI). Eine Zusammenfassung der Daten findet sich im Anhang in den Tabellen 7.5 und 7.6.

In Abbildung 4.25 ist die Entwicklung der Befallsstärke (A und B) und der auf zwei Weisen verrechneten quantifizierten Pilz-DNA, einmal bezogen auf den Gesamt-DNA-Gehalt der Probe das andere mal bezogen auf die Blattfläche (siehe 3.10.7.1) (C bis F) auf den jeweiligen Blatttagen über den Versuchsverlauf grafisch dargestellt. In beiden Varianten nahm die Befallsstärke der inokulierten Blätter 1 bis 3 im Versuchsverlauf zu. Auffällig ist hierbei die hohe Befallsstärke von *P. xanthii* im Vergleich zu *G. orontii*, trotz gleicher Inokulummenge. Am ersten Boniturtag, 7 DAI, war die Befallsstärke in beiden Varianten noch deutlich unter 1 %, war aber bei *P. xanthii* schon höher als bei *G. orontii* (siehe Tabelle 6.5). Innerhalb der nächsten sieben Tage nahm die Befallsstärke bei *P. xanthii* stark zu und war ca. 6 mal so hoch wie bei *G. orontii*. In der nächsten Woche flachte die

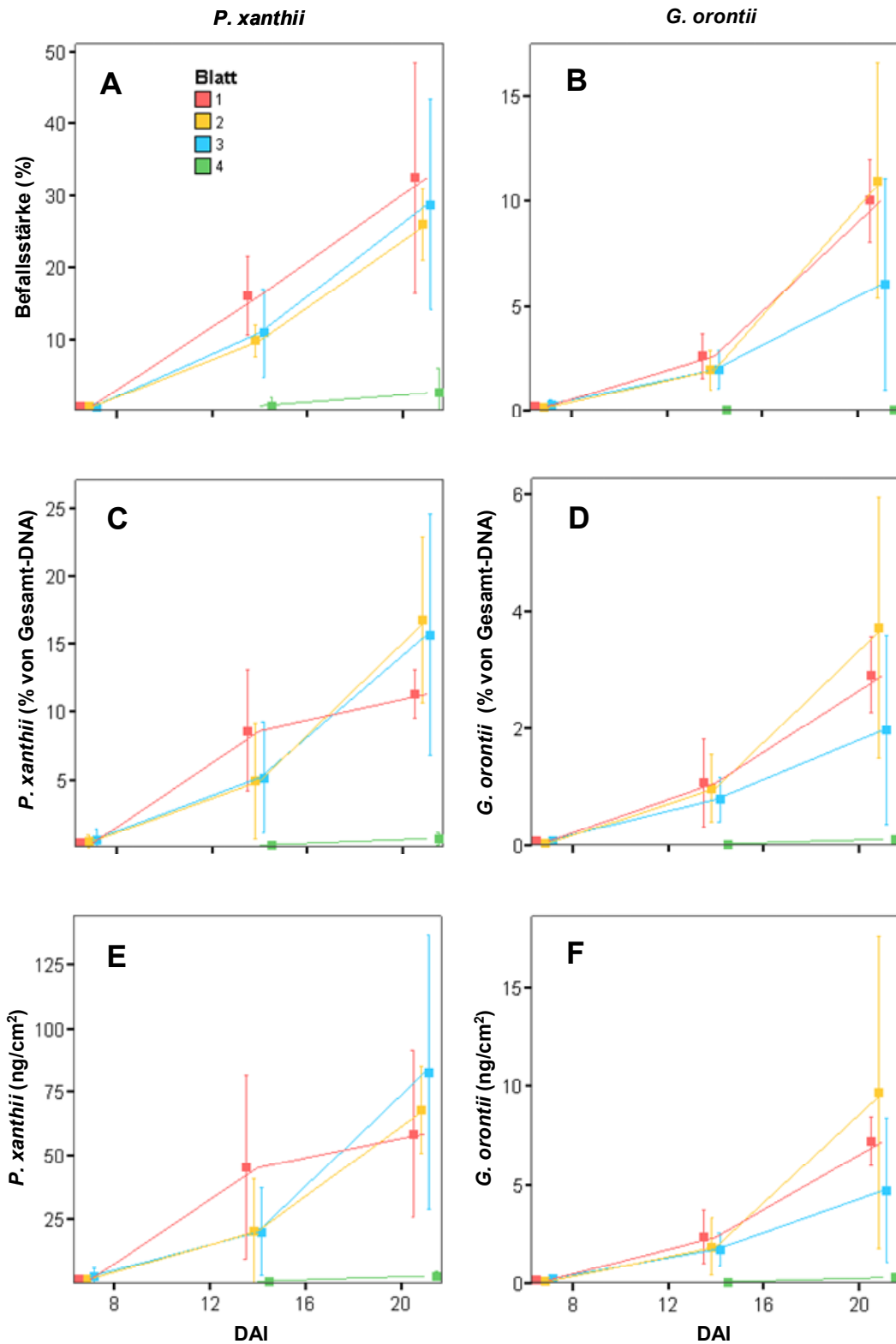


Abbildung 4.25 Befallsstärke (A und B) und Pilz-DNA-Gehalt (C bis F) in den beiden Einzelinokulationsvarianten *G. orontii* und *P. xanthii* auf den Blättagern im Versuchsverlauf. Die Verrechnung des DNA-Gehalts erfolgte bezogen auf die Gesamt-DNA (%) (C und D) und auf die Blattfläche (ng/cm²) (E und F). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung 7, 14 und 21 Tage nach der Inokulation (DAI). Die Blattnumerierung gibt die Position der Blätter am jeweiligen Internodium von unten gezählt an, mit Blatt 1 als unterstes, ältestes bis Blatt 4 als jüngstes Blatt. Blatt 1-3 wurden gezielt inokuliert, Blatt 4 wurde nicht inokuliert. Die Abbildungen sind unterschiedlich skaliert.

Befallsstärkekurve aber etwas ab, während der Befall von *G. orontii* stärker zunahm. Die Befallsstärke von *P. xanthii* war am letzten Boniturtermin nur noch 3 mal so hoch wie die von *G. orontii*.

Die Entnahme von Blatt 4-Proben war erfolgt zur Abschätzung des Sekundärbefalls. Die Befallsstärke auf Blatt 4 nahm in der *P. xanthii*-Variante auf mittlere 2,5 %, 21 DAI, zu. Es ist aber anzunehmen, dass dieser Wert verursacht wurde durch eine unbeabsichtigte Inokulation zu Versuchsbeginn, da er hauptsächlich durch ein Blatt, bei dem ca. 9 %-Befall gefunden worden waren, bestimmt wurde. Bei *G. orontii* konnte fast gar kein Befall detektiert werden. Es ließ sich also schlussfolgern, dass sekundärer Befall innerhalb des Versuchszeitraums keine Rolle gespielt hatte und die Zunahme der Befallsstärke auf das Wachstum der Kolonien zurückzuführen war.

Der nachgewiesene prozentuale Pilz-DNA-Gehalt der Blätter 1 bis 3 folgte für beide Verrechnungsarten dem Verlauf der jeweiligen Befallsstärke. Die statistische Überprüfung (siehe 3.9.8.2) ergab keinen signifikanten Einfluss der Blattetage auf den Pilz-DNA-Gehalt (%) (siehe Anhang Tabellen 7.7 bis 7.10). Die geringe Standardabweichung des Pilz-DNA-Gehalts in der *P. xanthii*-Variante auf Blatt 1 am dritten Boniturtag, 21 DAI, war auf die nur zwei quantifizierbaren Proben zurückzuführen, während zur Ermittlung der Befallsstärke von Blatt 1, 21 DAI, noch vier Proben eingegangen waren.

Die über die Blattfläche verrechneten Pilz-DNA-Daten wiesen denselben Verlauf auf wie die prozentualen Pilz-DNA-Gehalte. Bei *P. xanthii* wurden am dritten Boniturtag, 21 DAI, kleinere Unterschiede in den Relationen der Blattmittelwerte deutlich. Die Standardabweichungen der Daten unterschieden sich in den beiden Verrechnungsarten nicht wesentlich voneinander. Auffällig war jedoch das unterschiedliche Verhältnis der beiden Verrechnungsarten zueinander. Bei *P. xanthii* waren die über die Befallsfläche berechneten Pilz-DNA-Gehalte 4 mal höher als die %-Daten, bei *G. orontii* dagegen nur 2,5 mal höher.

Eine genauere Betrachtung der Verlaufskurven des Pilz-DNA-Gehalts im Vergleich zur jeweiligen Befallsstärke ließ in beiden Varianten eine proportionale Zunahme vermuten. Dieser Eindruck konnte mit einer Regressionsanalyse in beiden Varianten bestätigt werden (Abbildung 4.26). Die Regressionsgeraden für die Pilz-DNA-Mengen von *P. xanthii* M_{1P} und *G. orontii* M_{1G} in Abhängigkeit von der jeweiligen Befallsstärke B_P bzw. B_G werden durch die Gleichungen 4.3 ($R^2=0,846$) und 4.4 ($R^2=0,906$) angegeben:

$$M_{1P} = 0,56 \cdot B_P \quad (\text{mit } B_P < 55 \%) \quad \text{Gl. 4.3}$$

$$M_{1G} = 0,33 \cdot B_G \quad (\text{mit } B_G < 20 \%) \quad \text{Gl. 4.4}$$

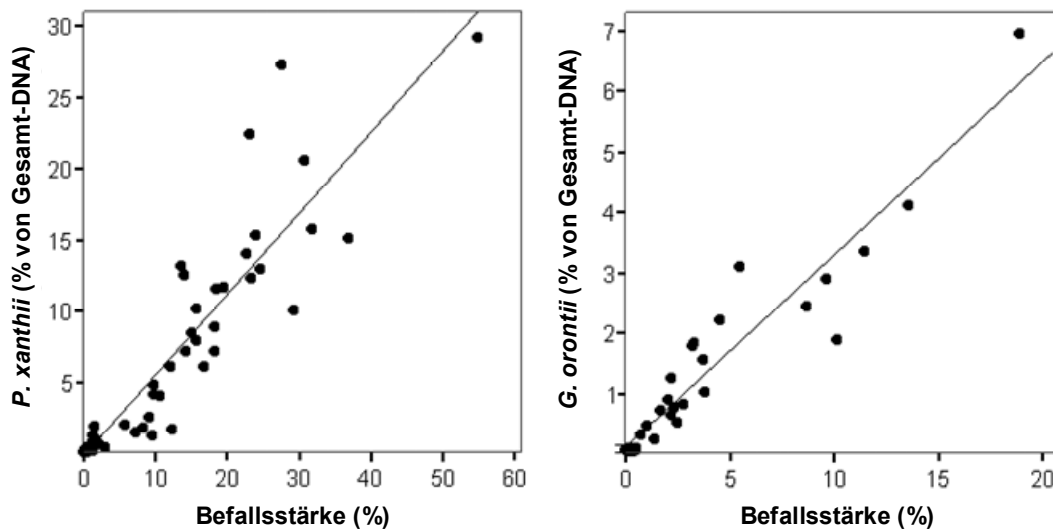


Abbildung 4.26 Zusammenhang zwischen quantifizierter Pilz-DNA und bonitierter Befallsstärke in den beiden Einzelinokulationsvarianten *P. xanthii* und *G. orontii*. Eingezeichnet sind die linearen Regressionsgeraden, Gleichung 4.3 und 4.4, die im Text angegeben sind (*P. xanthii* N=60; *G. orontii* N=35.) Die Darstellung erfolgt in unterschiedlichen Skalierungen.

Bei beiden Geraden wurde deutlich, dass die Quantifizierungen in einigen Bereichen stark schwankten. Bei *P. xanthii* lagen die gemessenen Pilz-DNA-Gehalte im Bereich zwischen 5 und 10 % Befallsstärke unter der Regressionsgeraden und im Bereich 25 bis 40 % streuten sie erheblich um die Gerade. Bei *G. orontii* wurde der tatsächliche Pilz-DNA-Gehalt im Bereich 10 bis 15 % durch die Regression leicht überschätzt.

Auf Grund der unterschiedlichen Befallsstärken in den beiden Varianten konnte der lineare Zusammenhang zwischen Pilz-DNA-Gehalt und Befallsstärke im Bereich bis 55 % Befallsstärke nachgewiesen werden, während der ermittelte Zusammenhang bei *G. orontii* nur bis 20 % Befallsstärke gültig war. Aus den Gleichungen ließ sich ableiten, dass *P. xanthii* mehr DNA pro %-Befall bildete als *G. orontii*.

4.7.2.3 Pilz-DNA-Gehalt und Befallsstärke in der Mischvariante

In der Mischvariante wurden 43 Blattproben entnommen. Eine Probe wurde nicht ausgewertet, da das Blatt abgestorben war (Blatt 2, DAI 21). Die Quantifizierung auf *G. orontii* brachte in drei Proben keine Ergebnisse, allesamt Proben mit sehr geringer Befallsstärke. Für *P. xanthii* konnte in zwei Proben kein Ergebnis ermittelt werden. Somit standen 37 Proben zur Verfügung, in denen beiden Pilze quantifiziert werden konnten (siehe Anhang Tabelle 7.11).

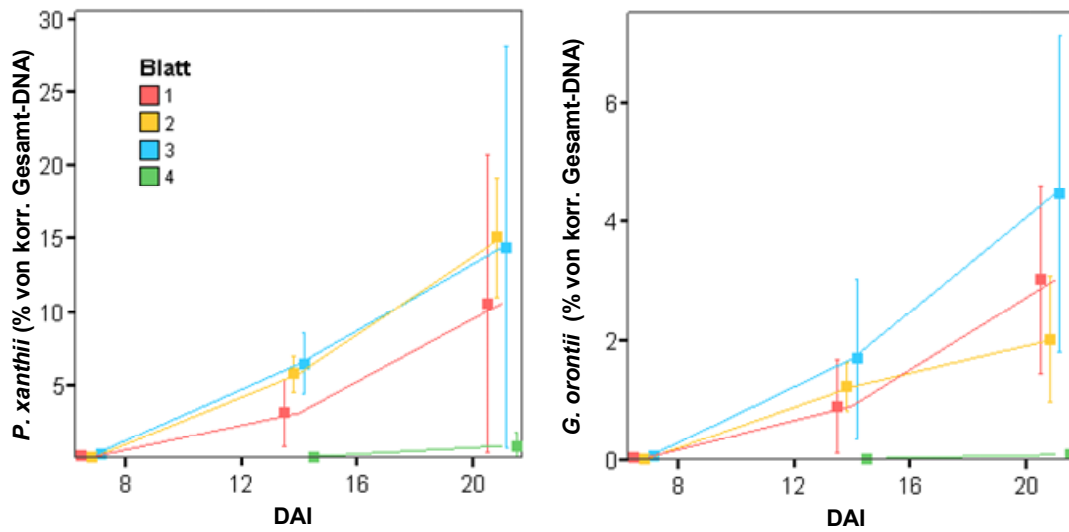


Abbildung 4.27 Korrigierter DNA-Gehalt (%) von *P. xanthii* und *G. orontii* in der Mischvariante auf den Blättern im Versuchsverlauf. Der Gesamt-DNA-Gehalt wurde um den prozentualen Anteil des jeweils anderen Pilzes bereinigt, um eine volle Vergleichbarkeit mit dem Verlauf in den Einzelvarianten zu gewährleisten. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen auf den einzelnen Blättern während des Versuchsverlaufs. Blatt 1-3 wurden gezielt inokuliert, Blatt 4 wurde nicht inokuliert. Blatt 1: unterstes, ältestes bis Blatt 4: jüngstes Blatt.

Da sich beide DNA-Verrechnungsarten außer in den absolut erhaltenen Pilz-DNA-Mengen nicht grundsätzlich voneinander unterschieden, wurde in der Mischvariante nur noch mit dem %-Pilz-DNA-Gehalt gerechnet. Weil sich jedoch die Gesamt-DNA in dieser Variante aus der Pilz-DNA beider Pilze und der Gurken-DNA zusammensetzte, musste der ermittelte %-Wert pro Gesamt-DNA um den %-Anteil des jeweils anderen Pilzes korrigiert werden, um die Pilz-DNA-Gehalte mit denen der Einzelvarianten vergleichen zu können.

Wie aus Abbildung 4.27 ersichtlich war, war der Verlauf der Pilz-DNA-Gehalte in der Mischvariante mit dem jeweiligen Gehalt in den beiden Einzelvarianten vergleichbar. Die Daten wurden wie unter 3.9.8.3 beschrieben statistisch verrechnet. Ein signifikanter Einfluss der Blättertage konnte auch in dieser Variante nicht gefunden werden (Tabellen 7.12 und 7.13). Ein Vergleich der Daten mit den Daten der jeweiligen Einzelvarianten zu jedem Boniturtermin zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen den beiden Varianten (siehe Anhang Tabellen 7.14 bis 7.17).

Obwohl sich der Pilz-DNA-Gehalt in den verglichenen Varianten nicht unterschied, musste nun geprüft werden, ob auch die Befallsstärke gleich blieb. Denn es war denkbar, dass durch potenzielle Wechselwirkungen zwischen den beiden Pilzen, deren Hyphenlänge beeinflusst würde, aber nicht die gebildete Zellzahl. Damit wäre der detektierte Pilz-DNA-

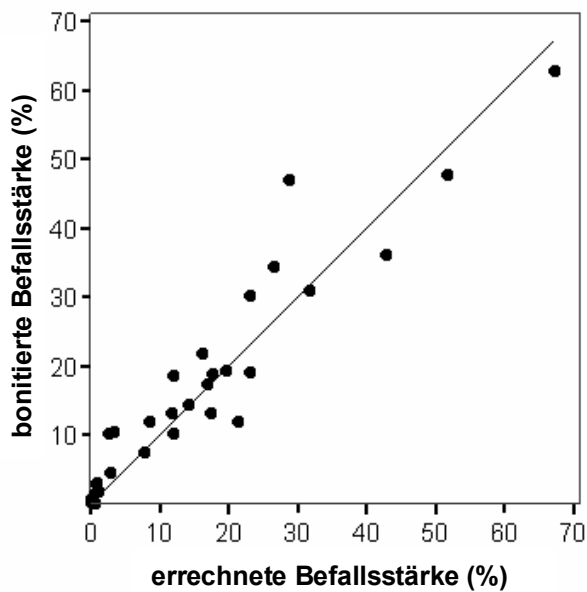


Abbildung 4.28
Zusammenhang zwischen errechneter und bonitierter Befallsstärke in der Mischvariante. Erläuterung im Text. Eingezeichnet ist die Regressionsgerade, die im Text unter Gleichung 4.5 angegeben ist (N=37).

Gehalt gleich, aber die gebildete Befallsstärke unterschiedlich. Anhand der Gleichungen 4.3 und 4.4 konnte den jeweiligen quantifizierten DNA-Gehalten eine theoretische Befallsstärke zugeordnet werden, die der Befallsstärke des Pilzes in einem ungestörten Einzelbefall entsprechen würde. Durch Summierung der beiden errechneten Befallsstärken und einem Vergleich mit der bonitierten Befallsstärke in der Mischvariante, in der Befall durch *P. xanthii* und *G. orontii* unterscheidbar war, konnte bestimmt werden, ob im Mischbefall eine Wechselwirkung zwischen *P. xanthii* und *G. orontii* vorlag, so, dass z. B. ein Pilz in seinem Wachstum gehemmt oder gefördert würde. In Abbildung 4.28 ist die bonitierte Befallsstärke B_M gegen die summierte errechnete Befallsstärke B_{err} aufgetragen. Der Zusammenhang ($R^2=0,901$) der Daten ließ sich durch folgende Regressionsgerade darstellen:

$$B_M = 0,999 \cdot B_{err} \quad \text{Gl. 4.5}$$

Die Überprüfung ergab, dass der Regressionskoeffizient auf dem 5 %-Niveau nicht signifikant von 1 abwich ($t < t_{35;0,05}$). Daraus konnte unter Einbeziehung der Gleichungen 4.3 und 4.4 geschlossen werden:

$$B_{err} = B_M = B_P + B_G \quad \text{Gl. 4.6}$$

Durch die Steigung 1 der Regressionsgeraden wurde deutlich, dass sich die Befallsstärken beider Pilze in einer Mischinfektion addierten und keine gegenseitigen Beeinflussungen auf das Koloniewachstum zu finden waren.

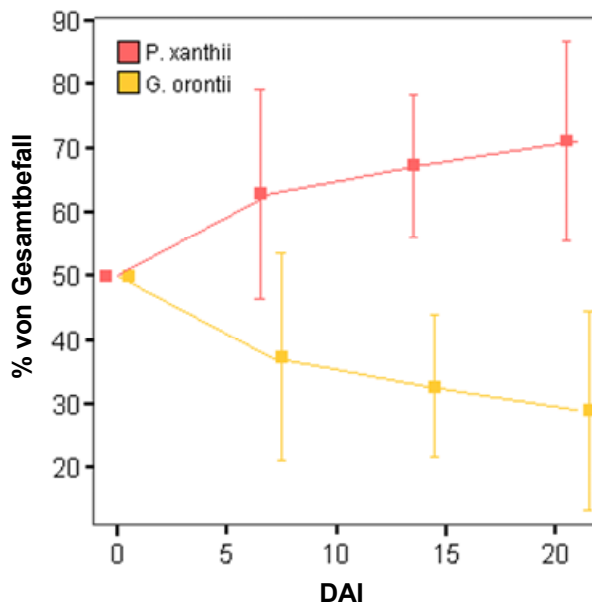


Abbildung 4.29
Entwicklung des relativen
Anteils der Pilze *P. xanthii*
und *G. orontii* an der
Gesamtbefallsstärke in der
Mischvariante im Versuchs-
verlauf. Die Daten wurden
 nach den Gleichungen 4.7 und
 4.8 berechnet. Ausgegangen
 wurde von dem 1:1 Verhältnis
 in der zur Inokulation
 benutzten Konidiensuspension
 zum Zeitpunkt 0 DAI. Gezeigt
 sind die Mittelwerte und die
 Standardabweichung.

Aus Gleichung 4.3 und 4.4 ergab sich unter Berücksichtigung von Gleichung 4.6 folgender Zusammenhang für die Berechnung der relativen Befallsstärke von *G. orontii* aus der quantifizierten Pilz-DNA in einer Mischinfektion:

$$\frac{B_G}{B_M} = \frac{B_G}{B_P + B_G} = \frac{\frac{M_{1G}}{0,33}}{\frac{M_{1P}}{0,56} + \frac{M_{1G}}{0,33}} = \frac{1,696 \cdot M_{1G}}{M_{1P} + 1,696 \cdot M_{1G}} \quad \text{Gl. 4.7}$$

Analog ergab sich für die relative Befallsstärke von *P. xanthii*:

$$\frac{B_P}{B_M} = \frac{B_P}{B_P + B_G} = \frac{M_{1P}}{M_{1P} + 1,696 \cdot M_{1G}} \quad \text{Gl. 4.8}$$

Wurden die auf diese Weise errechneten relativen Befallsstärken der beiden Pilze zu den jeweiligen Boniturzeitpunkten grafisch aufgetragen (Abbildung 4.28), so ließ sich eine Zunahme des *P. xanthii*-Gehalts und damit einhergehend eine Abnahme des prozentualen *G. orontii*-Gehalts im Versuchsverlauf erkennen.

4.7.2.4 Konidienquantifizierung

Die abgesaugten Konidien wurden wie unter 3.9.6 gelagert wie unter 3.9.7 beschrieben aus den Filtern gespült. Ein Aliquot der Konidiensuspension wurde nach 12 minütiger Inkubation bei 95 °C in die PCR eingesetzt. Für die Eichung der Daten wurde vor der Aufbereitung bei mehreren Proben die Konidienkonzentration mit der Fuchs-Rosenthal-

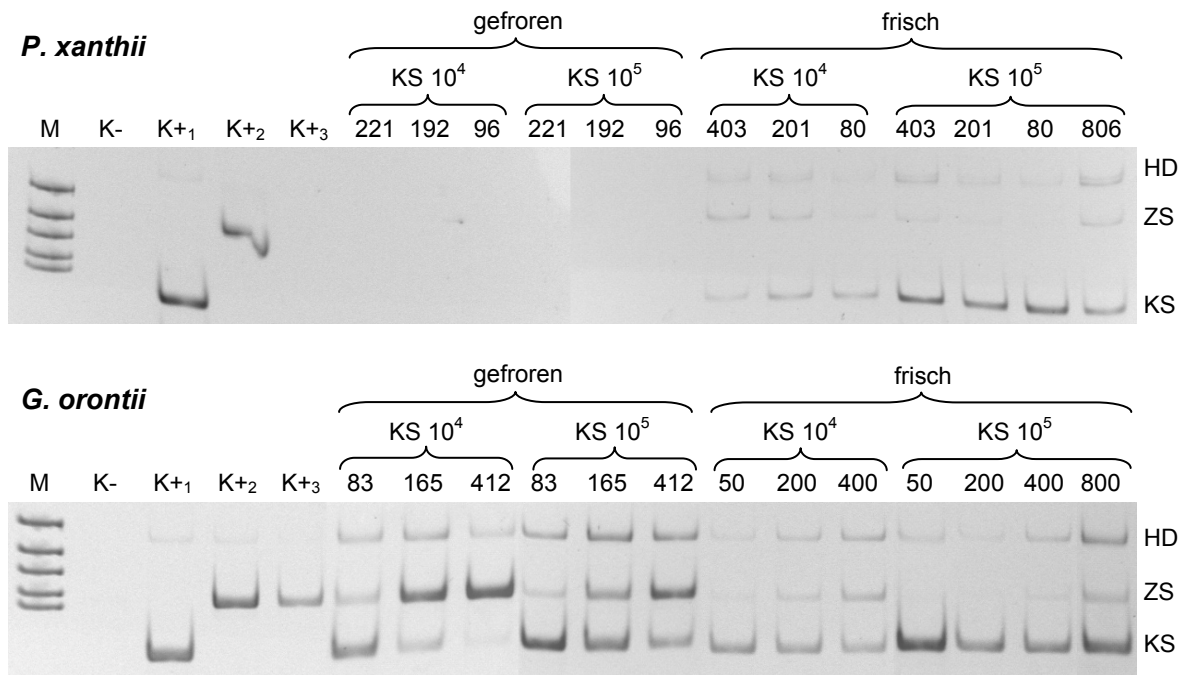


Abbildung 4.30 Amplifikation von gefrorenen und frischen Konidien von *P. xanthii* (oben) *G. orontii* (unten). Gefrorene Konidien, die nach dem Ernten für 13 Tage bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert worden waren, und frische Konidien wurden als Template in die qPCR eingesetzt. Die Konidien wurden in *A. bidest.*, dem 0,1 % Tween 20 zugesetzt worden waren, aufgenommen und die Konzentration mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Unterschiedliche Konidienanzahlen, die über den Banden angegeben sind, wurden mit jeweils 10^4 oder 10^5 Kopien des Kompetitors versetzt und koamplifiziert. **M**: pBR322/*Bsu*RI-Marker; **K-**: Kontrolle ohne DNA; **K+₁**: 5×10^7 KS; **K+₂**: 4ng genomische DNA; **K+₃**: 400 frische Konidien bei *G. orontii* bzw. 221 gefrorene Konidien bei *P. xanthii*. **HD**: Heteroduplizes; **ZS**: Zielsequenz; **KS**: Kompetitorsequenz. 7 % PA-Gel. Inverses Gelfoto.

Zählkammer bestimmt. Wie sich herausstellte, war die Amplifikation der durch dieses Verfahren aufbereiteten *G. orontii*-Konidien in der Einzelvariante kein Problem. Allerdings schlug die Quantifizierung der Konidien der *P. xanthii*-Variante fehl. Es wurden entweder gar keine PCR-Amplifikate detektiert oder in einigen Proben nur der Kompetitor.

Zur Überprüfung auf eine Inhibition wurden gefrorene *P. xanthii*-Konidien mit *G. orontii*-Konidien versetzt, aufbereitet und mit den Go-Primern amplifiziert. Ein spezifisches *G. orontii*-Produkt konnte nicht detektiert werden.

Für eine zusätzliche nähere Untersuchung wurde ein Vergleichstest zwischen der Verwendung von gefrorenen und frischen Konidien als Template durchgeführt (Abbildung 4.30). Unabhängig von der eingesetzten Konidienzahl konnten keine Produkte bei der Benutzung von gefrorenen *P. xanthii*-Konidien als Template nachgewiesen werden. Dagegen gelang bei frischen *P. xanthii*-Konidien noch der Nachweis von ca. 80 Konidien. Bei *G. orontii* war die Amplifikation von frischen und gefrorenen Konidien problemlos, allerdings wurde bei dem Einsatz vergleichbarer Konidienkonzentrationen mit den

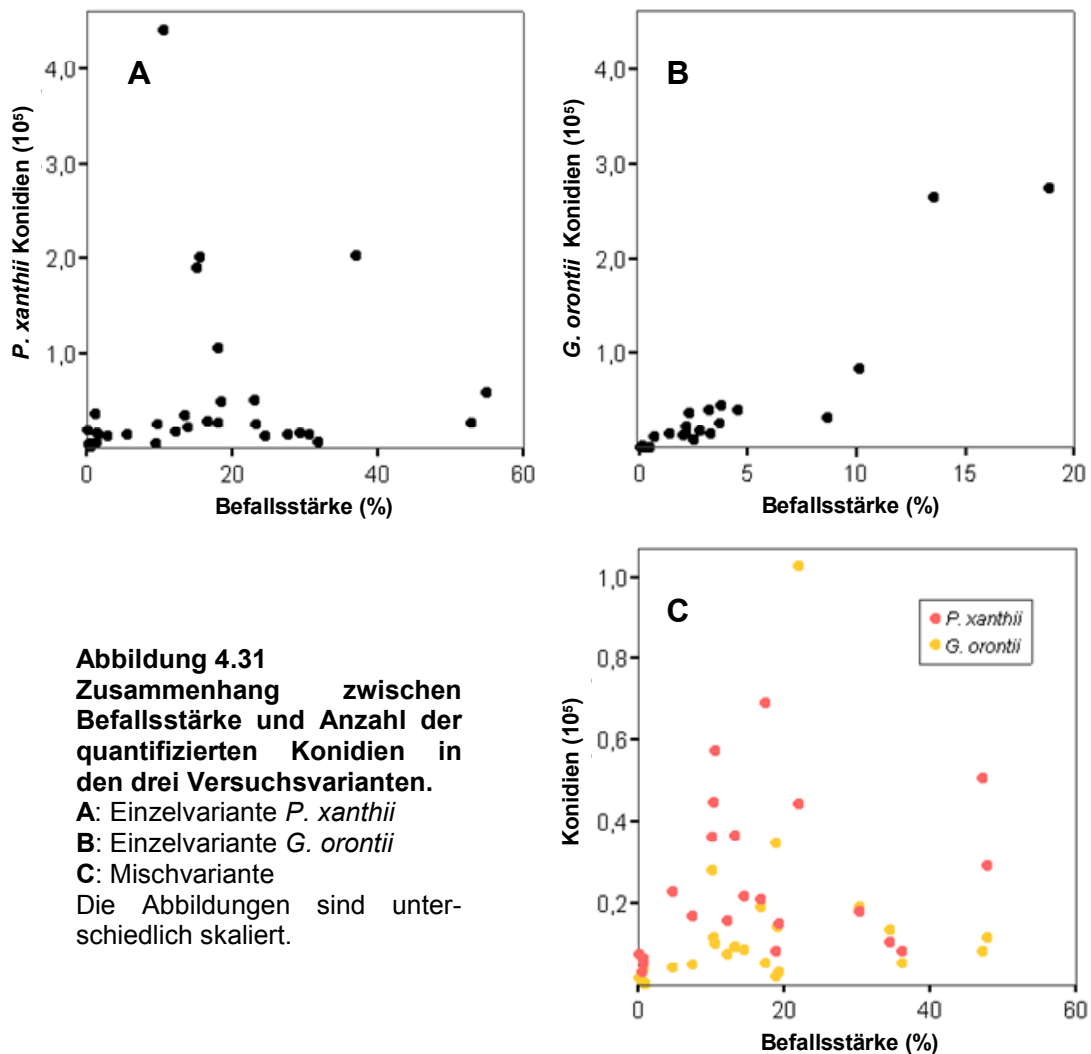


Abbildung 4.31
Zusammenhang zwischen
Befallsstärke und Anzahl der
quantifizierten Konidien in
den drei Versuchsvarianten.
A: Einzelvariante *P. xanthii*
B: Einzelvariante *G. orontii*
C: Mischvariante
 Die Abbildungen sind unter-
 schiedlich skaliert.

gefrorenen Konidien eine höhere Produktmenge erzielt, wie sich an den stärkeren Banden sehen ließ.

Um die Konidien der Versuchsvarianten trotzdem noch quantitativ auswerten zu können, wurden sie nach der unter 3.7.6 beschriebenen Chelex-Methode aufgearbeitet. Auf diese Weise konnten inhibierende Stoffe aus der Probe entfernt werden. Um eine Vergleichbarkeit zu geben, wurden auch die Konidien der *G. orontii*-Variante mit Chelex aufgearbeitet. Ein Aliquot der aufbereiteten Konidien-DNA wurde in eine qPCR eingesetzt und wie weiter oben beschrieben analysiert. Die Ergebnisse der Quantifizierung in den drei Varianten sind in Abbildung 4.31 grafisch dargestellt. Während in der *P. xanthii*-Variante kein Zusammenhang zwischen Konidienmenge und Befallsstärke zu sehen war (A), nahm in der *G. orontii*-Variante die Konidienmenge in Abhängigkeit von der Befallsstärke zu, allerdings fehlten hier Daten zwischen 10 und 20 %, die diesen

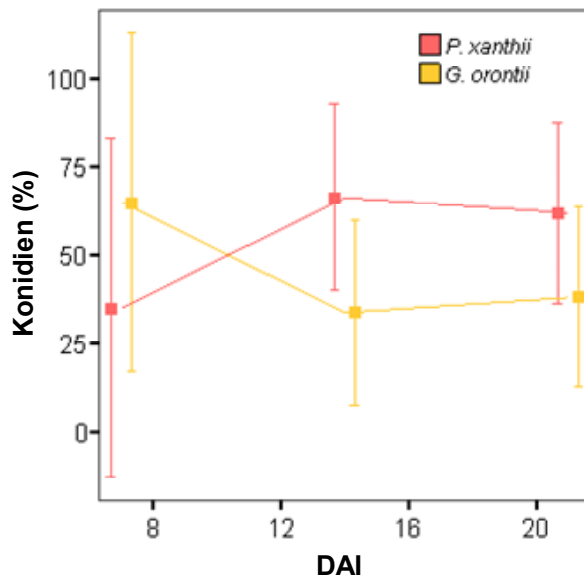


Abbildung 4.32 Entwicklung des relativen Anteils der Konidien von *P. xanthii* und *G. orontii* in der Mischvariante im Versuchsverlauf. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

Zusammenhang untermauert (B). Auf eine Auswertung der Daten mit einer Regressionsanalyse wurde in diesem Fall verzichtet. In der Mischvariante (C) konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Konidienmenge der beiden Pathogene und der Befallsstärke gefunden werden, allerdings waren grundsätzlich mehr *P. xanthii*-Konidien zu finden als *G. orontii*-Konidien. Deutlich sind auch die unterschiedlichen Größenordnungen, in denen sich die Konidienmengen in den einzelnen Varianten befinden. Eine Auswertung über den relativen Anteil jedes Pathogens an der Gesamtkonidienmenge in der Mischvariante zeigte im zeitlichen Verlauf mit 63 % einen erhöhten *G. orontii*-Anteil zu Beginn des Versuchs, 7 DAI, der im Versuchsverlauf auf ca. 35 % sank. Die Standardabweichungen waren am ersten Boniturtermin am höchsten und verringerten sich etwas über den Versuchsverlauf (Abbildung 4.32). Signifikante Unterschiede der Mittelwerte im zeitlichen Verlauf konnten allerdings nicht nachgewiesen werden (siehe Anhang Tabelle 7.18 und 7.19).

4.7.3 Überprüfung der Daten mit Real-Time PCR

Die Analyse der Befallsstärkeproben der Einzelvarianten erfolgte neben der kompetitiven Quantifizierung auch mit einem Real-Time-Cycler in der Abteilung für Molekulare Phytopathologie und Mykotoxinforschung der Georg-August Universität Göttingen. Ziel dieses Verfahrens war die Überprüfung der gewonnenen Quantifizierungsdaten und ein Vergleich der beiden Methoden.

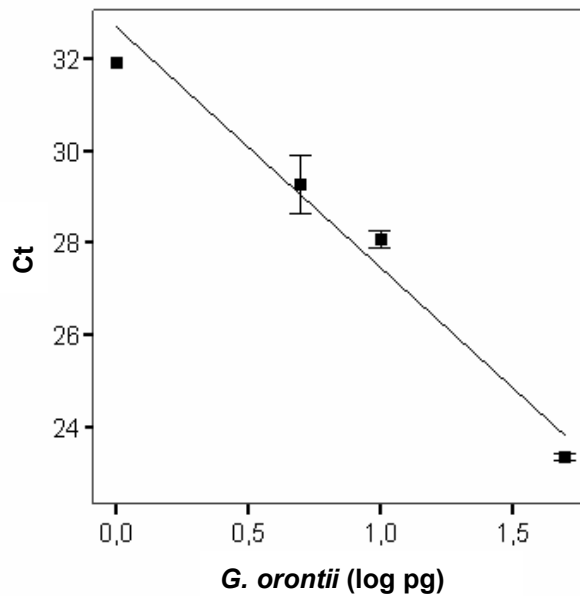


Abbildung 4.33
Eichgerade für die
Quantifizierung mit dem
Real-Time-Cycler.

Aufgetragen sind die Ct-Werte gegen den 10er Logarithmus der in die PCR eingesetzten reinen genomischen DNA von *G. orontii*. Die eingezeichnete Regressionsgerade findet sich im Text unter Gleichung 4.9.

Die Amplifikation von *P. xanthii* führte wiederholt zu kompletten Ausfällen wies ein geringes Maß an Reproduzierbarkeit auf, was wahrscheinlich auf die vorhandenen Inhibitoren zurückzuführen war. Eine Schmelzkurvenanalyse ergab zwei Peaks unabhängig von der Temperatur oder der gewählten MgCl₂-Konzentration. Die Generation einer Eichgerade und die Analyse der *P. xanthii*-Proben wurde somit nicht durchgeführt. Aus diesem Grund beziehen sich die im Weiteren beschriebenen Angaben auf die Amplifikation von *G. orontii*.

Die Überprüfung der optimalen Bedingungen ergab für das Primerpaar Go1s/Go4a im Bezug auf die MgCl₂-Konzentration im Vergleich zum kompetitiven Verfahren mit 3 mM ein leicht abweichendes Optimum von 3,5 mM, allerdings auch unter dem Einsatz von 200 µM je dNTP (Bioline, Luckenwalde). Weiterhin wurden in einen 25 µL-Reaktionsansatz folgende Komponenten zugegeben: 0,2 µL je Primer, 0,25 U BIOTaq DNA-Polymerase (Bioline, Luckenwalde), 10 nM Fluorescein und 0,1x SYBR Green (Invitrogen, Karlsruhe) in einem 1x Ansatz des BIOTaq Reaktionspuffers (Bioline, Luckenwalde). In die Reaktion wurde jeweils 1 µL der Probe als Template eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte nach einer initialen Denaturierung bei 94 °C für 2 min mit 35 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94 °C für 20 s, 20 s Annealing bei 60 °C und Elongation bei 72 °C für 30 s. Das Amplifikationsprogramm wurde beendet durch einen Elongationsschritt für 5 min bei 72 °C. Direkt daran anschloss sich die Schmelzkurvenanalyse, wie unter 3.5.5 beschrieben. Das Programm endete mit einer Abkühlung der Proben auf 15 °C. Die Quantifizierung der Proben wurde mit Hilfe einer externen Eichgerade durchgeführt. Zur Generierung dieser Geraden wurden 1, 5, 10 und

50 pg genomische *G. orontii*-DNA wie oben beschrieben amplifiziert und die gemessenen Ct-Werte in einem Diagramm gegen die logarithmierte Pilz-DNA-Menge P_{real} (pg) aufgetragen (Abbildung 4.33). Die Gerade konnte durch folgende lineare Gleichung beschrieben werden ($R^2=0,962$):

$$Ct = 32,699 - 5,24 \cdot \log_{10}(P_{real}) \quad \text{Gl. 4.9}$$

Die auf diese Weise aus den Ct-Werten errechenbaren *G. orontii*-DNA-Mengen in den Proben der Einzel- und Mischvariante wurden danach über Gleichung 3.4, mit P_{real} anstelle von P_K , auf die Gesamt-DNA bezogen und grafisch gegen die *G. orontii*-DNA-Werte aus der kompetitiven Quantifizierung aufgetragen (Abbildung 4.34). Noch bei 6 Proben mit sehr geringen Befallsstärken, bei denen die kompetitive Quantifizierung zu keinem Ergebnis geführt hatte, konnten mittels Real-Time-Amplifikation Daten genommen werden. Für die Daten der Einzelvariante ließ sich eine enge Korrelation beider Methoden erkennen, wenn man die Werte des höchsten kompetitiven Pilz-DNA-Gehalts als Ausreißer betrachtete (Abbildung 4.34 A). Da dieser Punkt als einziger Wert unterhalb der Winkelhalbierenden lag, wurde dieses Vorgehen als legitim erachtet. Der Zusammenhang der Daten ließ sich wie in Gleichung 4.10 angegeben darstellen ($R^2=0,909$).

$$P_{real} = 1,575 \cdot P_K \quad \text{Gl. 4.10}$$

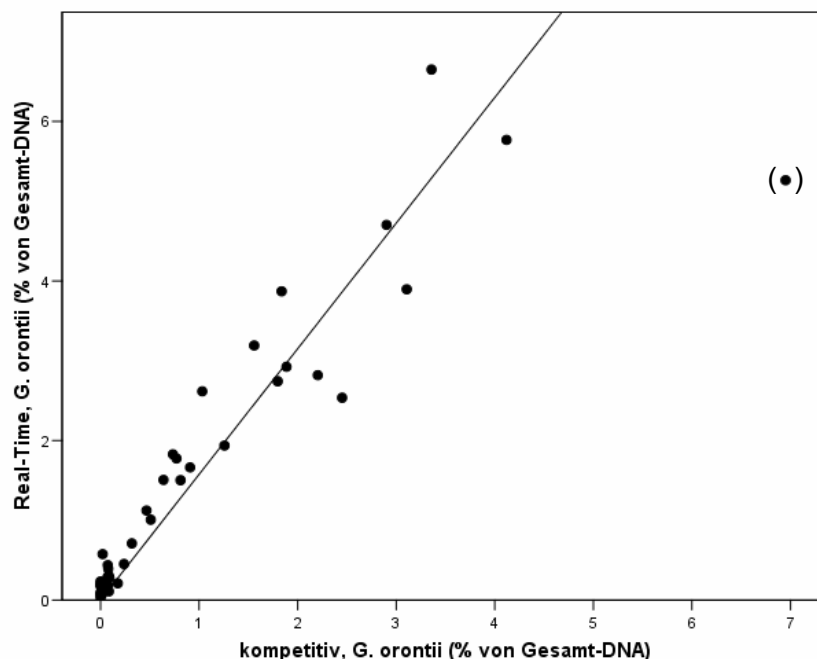


Abbildung 4.34 Vergleich der mit Real-Time PCR und kompetitiver PCR quantifizierten Proben der *G. orontii*-Einzelvariante. Der in Klammern gesetzte Datenpunkt wurde bei der Regressionsanalyse der Daten nicht berücksichtigt. Die Gleichung der Regressionsgeraden ist im Text unter Gleichung 4.10 angegeben.

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, eine qPCR-basierte Methode für die Untersuchung der Populationsdynamiken der beiden Echten Mehltaupathogene an Gurken, *P. xanthii* und *G. orontii*, in Mischinfektionen zu entwickeln.

Um mit den beiden Pilzen arbeiten zu können, musste die Technik der *in vitro*-Erhaltung am IPP etabliert und eine Echte Mehltau-Isolatsammlung angelegt werden, deren genaue Bestimmung mit mikroskopischen und molekularbiologischen Methoden ebenfalls erprobt und etabliert werden musste.

Die qPCR-Methode erforderte die Entwicklung taxaspezifischer Primer und eines geeigneten Kompetitors, die getestet und schließlich in einem artifiziellen Mischinfektionsversuch erprobt wurden.

5.1 Echte Mehltau-Erhaltung

Im Laufe der Jahrzehnte wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, Echten Mehltau zu erhalten. Die unterschiedlichen Methoden sind dabei für verschiedene Zwecke geeignet. Zur Langzeiterhaltung wurden z. B. Cryotechniken entwickelt, die die Lagerung des Echten Mehltaus über mehrere Monate, sogar Jahre, erlauben. Bei den beiden an Kürbisgewächsen vorkommenden Gattungen konnte diese Art der Konservierung allerdings nur mit *Podosphaera*-Isolaten erfolgreich praktiziert werden (O'Brien & Weinert 1994 und 1999; Perez-Garcia et al. 2006), für *Golovinomyces* ist dies bislang noch nicht gelungen (Bardin, pers. Mitteilung). Die „klassische“ Ergaltungstechnik, baut auf dem regelmäßigen Umsetzen der Isolate auf frische Blattstücke oder Kotyledonen auf und ist vor allem dann geeignet, wenn häufig frisches Inokulum benötigt wird. Neben offenen Erhaltungen an ganzen Pflanzen in einem Gewächshaus, werden zunehmend *in vitro*-Verfahren angewendet, die es erlauben, mehrere Isolate unterschiedlicher Gattungen parallel ohne großen Platzaufwand zu erhalten und zu vermehren. Neben der Verwendung ganzer Blätter, wie es in der hier angewendeten Methodik geschehen ist, können zur Erhaltung einiger Echter Mehltau-Arten einem Medium auch klein geschredderte Wirtsblätter zugesetzt werden, so dass das Wachstum der Pilze direkt auf dem Medium erfolgt, wie Arabi & Jawhar (2002) für *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* zeigten. Eine Testung dieser Methode im Rahmen dieser Arbeit zeigte jedoch, dass sich *P. xanthii* und *G. orontii* nicht auf diese Weise erhalten lassen.

Die hier angewendete Methode der Erhaltung des Echten Mehltaus an Cucurbitaceae basierte auf dem von Nicot et al. (2002) beschriebenen *in vitro*-Verfahren. Durch die

vorgenommenen Modifizierungen hinsichtlich der Desinfektion der Kotyledonen wurde es möglich, an Stelle des in der Originalmethode verwendeten hoch giftigen Quecksilbers Natriumhypochlorit zu verwenden. Des Weiteren wurde die Gurkensorte ‚Marketer‘ ersetzt durch die Sorte ‚Delikatess‘, da ‚Marketer‘ nur noch selten auf dem Markt zu bekommen ist und die Sorte, wie sich außerdem zeigte, aus verschiedenen Erhaltungszuchten (hier Frankreich und Italien) unterschiedliche Resistenzen gegen den Echten Mehltau aufwies.

Die in dieser Arbeit verwendeten Erhaltungsbedingungen erwiesen sich als vorteilhafter für *G. orontii*. Dies zeigte sich an dem schnellen Wuchs und der hohen Sporulation von *G. orontii*, während *P. xanthii* spärlicher wuchs, deutlich weniger Konidien bildete und das Myzel auch schneller alterte. Die Überalterung wurde erkennbar an einer leichten rosa Färbung der Hyphen. Dieses Problem schien systemimmanent zu sein, denn auf einen schlechteren Wuchs von *P. xanthii* in der Erhaltung weisen auch die Daten von Bertrand (1991) hin, der dieses System mitentwickelte. Von einzelnen Kotyledonen, die mit *S. fuliginea* (= *P. xanthii*) infiziert waren, konnte er erheblich weniger Konidien sammeln als von Kotyledonen mit *E. cichoracearum* (= *G. orontii*), so wie es auch am IPP der Fall war (siehe 3.3.4). Es scheint, dass durch die hohe Luftfeuchtigkeit, die in den geschlossenen Petrischalen herrschte, die Sporulation von *P. xanthii* gehemmt wurde. Diese Erklärung wird durch die Untersuchungen von Bashi & Aust (1980) gestützt, die für *P. xanthii* eine höhere Sporulation bei niedrigeren Luftfeuchten notierten.

Bei der Echten Mehltau-Erhaltung kam es wiederholt zu Kontaminationen mit *Chaetomium globosum*, die fast ausschließlich in *Podosphaera*-Isolaten zu finden waren. Der Pilz überzog dabei innerhalb kürzester Zeit die Echte Mehltau-Kolonie mit einem flauschigen hyalinen Myzel, in einigen Fällen, in denen Isolate für längere Zeit bei höheren Temperaturen inkubiert wurden, erfolgte auch eine Fruktifikation durch die Bildung von Perithezien. Als Cellulosezer-setzer ist *C. globosum* eigentlich ein typischer Holzerstörer, kann aber in manchen Pilzerhaltungen, die wie in diesem Fall auf saccharosereichen Medien aufbauen, durchaus zu Problemen führen (Webster 1983). Der Befall mit *C. globosum* konnte durch die zeitweise Aussparung der Saccharose im Medium verhindert werden. Der Befall mit anderen Kontaminationspilzen, wie *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. oder *Trichoderma* sp., der zeitweise in einigen Petrischalen zu finden war, konnte durch rechtzeitiges Übersetzen der Isolate auf frische Kotyledonen und Aussortieren der befallenen Petrischalen beschränkt werden und führte zu keinen größeren Problemen.

5.2 Differenzierung der Pilzisolat

5.2.1 Gattungs- und Artendifferenzierung

Zu Beginn der Arbeiten mit den Echten Mehltau-Arten musste sichergestellt werden, dass die in der Literatur beschriebenen morphologischen und molekularbiologischen Merkmale zur Pilzdifferenzierung angewendet werden konnten.

Die Gattungsbestimmung von *Podosphaera* und *Golovinomyces* konnte in Reinkulturen einfach und schnell an Hand der beschriebenen morphologischen Merkmale erfolgen (siehe 2.2.3). Beim Vorliegen eines gemischten Befalls gestaltete sich die eindeutige Zuordnung auf Grund der hohen Variabilität in der Konidienmorphologie schwieriger, so wie es auch schon von Crüger & Meyer (1976) beschrieben worden war. Dies war vor allem der Fall, wenn nicht sicher von einem Mischbefall ausgegangen werden konnte, sondern z. B. die Reinheit eines Isolats überprüft wurde. Hier wiesen in der Regel zwar nur wenige Konidien nicht die typischen Merkmale auf, was aber im Fall eines tatsächlichen Mischbefalls in der Erhaltung zu dem Verlust eines Isolates führen konnte.

Als zuverlässig und eindeutig erwies sich die molekulare Differenzierung zwischen den Gattungen *Podosphaera* und *Golovinomyces* mit dem PCR-RFLP-Marker (siehe 4.1.2.1). Zwar wurde dieser Marker speziell für Isolate von Cucurbitaceae entwickelt, eine Überprüfung mit Datenbanksequenzen ergab jedoch, dass die *Rsa*I-Schnittstelle in einer konservierten Region liegt und damit als gattungsspezifischer Marker auch für Isolate von anderen Wirtspflanzen benutzt werden kann.

Die Zuordnung der *Podosphaera*-Isolate zur Art *P. xanthii* konnte auf Grund der morphologischen Charakteristika und durch den Vergleich mit der beschriebenen rDNA-ITS-Sequenz (Hirata & Takamatsu 2001) eindeutig erfolgen. Hervorgerufen durch die Wirtsspezialisierung verschiedener *P. xanthii*-Linien und die noch relativ junge Erweiterung des Wirtsspektrums auf Cucurbitaceae (Hirata et al. 2000), scheinen *P. xanthii*-Isolate von Cucurbitaceae genetisch homogen zu sein. Dieses geringe Maß an genetischer Variabilität wurde auch in französischen *P. xanthii*-Isolaten von Kürbisgewächsen gefunden (Bardin et al. 1997).

Bei der Untersuchung der morphologischen Merkmale der hannoverschen *Golovinomyces*-Isolate sprachen viele Kriterien, wie z. B. die Konidienbreite und das Längen/Breiten-Verhältnis dafür, dass es sich bei den Isolaten um die Art *G. orontii* handelte. Mit letzter Sicherheit konnte die Art aber auf Grund der Morphologie nicht bestimmt werden, da sich die Abmessungen der meisten Konidien, in dem Überschneidungsbereich beider Arten befanden, der sich in den Angaben von Zheng &

Chen (1981, zitiert in Braun 1995) findet (siehe auch Tabelle 2.1). Auch andere Literaturhinweise bleiben unkonkret und sprechen z. B. nur von allgemein kleineren Konidien oder einer Konidienbreite von eher $<15 \mu\text{m}$ (Vakalounakis & Klironomou 2001). Durch die molekularbiologische Überprüfung auf Grund der rDNA-ITS-Sequenzvergleiche konnte die Zuordnung der hannoverschen *Golovinomyces*-Isolate zu der Art *G. orontii* jedoch bestätigt werden, da die Sequenzen mit anderen *G. orontii* zugeordneten Isolaten übereinstimmten. Dass alle hannoverschen Isolate der Art *G. orontii* zuzuordnen waren, war auf Grund der Literaturlauswertung allerdings nicht zu erwarten gewesen. Dort wird beschrieben, dass die im Freiland dominierende Spezies *G. cucurbitacearum* sei (Vakalounakis et al. 1994; Vakalounakis & Klironomou 2001; Braun, pers. Mitteilung).

Die Schwierigkeit bei der Arteneinteilung innerhalb von *Golovinomyces* auf Kürbisgewächsen liegt vor allem in dem Mangel an konkreten morphologischen Kriterien zur Unterscheidung der beiden Arten begründet. Spezielle Studien mit dem Ziel, die Präsenz und Verbreitung von *G. cucurbitacearum* nachzuweisen und von *G. orontii* an Hand von morphologischen Charakteristika zu unterscheiden, fehlen bislang. Auf das Vorkommen der Art *G. cucurbitacearum* in Europa wurde bisher *a posteriori* nach Angaben in der Literatur und nach einer Feldstudie, die auf ein Monitoring der Gattungen ausgelegt war, geschlossen (Vakalounakis & Klironomou 2001). Da es auch in der älteren Literatur mit der Beschreibung der Arten *E. polyphaga* oder *E. communis* immer wieder Hinweise auf die Präsenz von zwei *Golovinomyces*-Arten auf Kürbisgewächsen gab und auch die molekularbiologische Untersuchungen von Matsuda & Takamatsu (2003) einen zweiten Biotyp auf Cucurbitaceae bestätigten, ist die Art *G. cucurbitacearum* generell nicht in Frage zu stellen. Ob allerdings der molekularbiologisch definierte Biotyp mit dem in der Literatur beschriebenen zweiten Morphotypus identisch ist, bleibt unklar, denn für das potenzielle *G. cucurbitacearum*-Isolat Ecr1 aus Frankreich existieren keine beschriebenen morphologischen Daten.

Bereits Blumer (1967) und Braun (1995) haben in ihren Monografien auf umweltbedingte Veränderungen der Konidienmorphologie in den Erysiphales hingewiesen. Shin (1992) beschrieb zudem einen direkten Effekt der Temperatur auf das Längen/Breiten-Verhältnis der Konidien von *E. cichoracearum* (*G. cichoracearum*). Auch die Variation in den wiederholten Messungen der Konidien von Monosporenisolaten in dieser Arbeit zeigte, dass Umweltbedingungen anscheinend auch bei den an Cucurbitaceae vorkommenden *Golovinomyces*-Arten einen Effekt auf die Größe der Konidien haben können. Es bedarf somit der Überprüfung, ob die Konidienabmessung bei diesen beiden Arten tatsächlich ein geeignetes Kriterium zur Artenunterscheidung ist.

5.3 Taxaspezifische qPCR

Ziel war es, durch die Entwicklung taxaspezifischer Primer, die Arten *P. xanthii* und *G. orontii* sicher voneinander zu diskriminieren und durch die Optimierung der PCR möglichst sensitiv nachzuweisen. Auf eine Diskussion der detaillierten Optimierungsergebnisse wird hier verzichtet, da sie schon im Ergebnisteil, mit Hinblick auf die sich für die Optimierung ergebenden Schlussfolgerungen, vorweggenommen wurde.

5.3.1 Spezifische Primer

Bei phytopathogenen Pilzen wird die rDNA-ITS-Region häufig für das spezifische Primerdesign herangezogen (Ma & Michailides 2007). Aber nur unter der Voraussetzung, dass konservierte Bereiche auf der rDNA-ITS-Region innerhalb der Isolate einer Art zu finden waren, die sich für die Primerentwicklung eigneten und die keine Homologien zur anderen Gattung aufwiesen, konnten spezifische Primer für die beiden Gattungen auf diesem DNA-Abschnitt abgeleitet werden.

Wie die Sequenzvergleiche gezeigt hatten, waren die rDNA-ITS-Regionen von *P. xanthii* und *G. orontii* durch die Heterologie zwischen den beiden Arten und die Homologie innerhalb einer Art grundsätzlich geeignet für die Entwicklung spezifischer Primer. Auf Grund der hohen Sequenzhomologie zwischen allen verglichenen *Golovinomyces*-Isolaten und des unsicheren Artstatus der potenziellen *G. cucurbitacearum*-Isolate, sind die von dieser Region abgeleiteten Oligonukleotide als spezifische Primer für den *G. orontii*-Artenkomplex anzusehen. Inwieweit eine Entwicklung von Primern zur Artendiskriminierung innerhalb der Gattung *Golovinomyces* auf dieser DNA-Region möglich ist, müsste genauer untersucht werden, wenn der Artenstatus innerhalb der Gattung geklärt ist.

Alle getesteten Primerpaare zeigten sich auf den klonierten rDNA-ITS-Regionen als geeignet für die spezifische Amplifikation des jeweiligen Pilzes. Dabei waren die Kombinationen der Primerpaare Go1s/Go4a und Px1s/Px2a optimal in Hinblick auf Sensitivität und Postanalytik. Auf Grund der ähnlichen Länge der PCR- und der Produkte des Restriktionsenzymverdau konnte die Auftrennung auf denselben Gelen unter den gleichen Elektrophoresebedingungen erfolgen, ein Umstand auf den geachtet wurde, damit der Aufwand der Postanalytik möglichst gering gehalten werden konnte.

Die Spezifität der ausgewählten Primerpaare war unter optimierten Bedingungen auf den klonierten rDNA-ITS-Sequenzen sehr hoch. Beide Primerpaare konnten bei einer Variation der Plasmid-Konzentration über vier Zehnerpotenzen gegen die DNA-Sequenz

des anderen Pilzes diskriminieren (siehe 4.4.1). Durch diesen großen Diskriminierungsbereich war es theoretisch nicht zwingend erforderlich, die DNA-Proben vor dem Einsatz in die PCR zu verdünnen, und somit faktisch möglich, den Sensitivitätsbereich der PCR zu erweitern. Die Überprüfung der Spezifität mit genomischer DNA erwies sich als schwieriger, da häufig Kontaminationsbanden bei der Amplifikation von *P. xanthii* mit den *G. orontii*-Primern auftraten (Abbildung 4.14). Da sich die Primer in der Datenbanksuche und auch auf den Plasmiden reproduzierbar als spezifisch für *G. orontii* gezeigt hatten, wiesen diese Falschbanden eher auf das sehr gute Wachstum von *G. orontii* in der Echten Mehltau-Erhaltung hin (siehe 5.1) und die damit verbundene Schwierigkeit *P. xanthii* kontaminationsfrei zu erhalten, als auf eine Unspezifität der Primer. Die Kontamination kann schon während der Durchführung der Erhaltung oder aber während des Konidiensammelns für die Extraktion erfolgt sein. Da gerade von *P. xanthii* meistens nicht genug Myzel und Konidien für eine Extraktion aus einer Erhaltungspetrischale gewonnen werden konnten, um im Photometer gut quantifizierbare Konzentrationen ($OD > 0,1$) zu erhalten, wurde Material mehrerer Petrischalen zusammen genommen oder über einen längeren Zeitraum bei einer Lagerung von -20 °C in einem Probengefäß gesammelt. Dabei reichte wahrscheinlich schon eine kleine Menge einer kontaminierten Kolonie, um diese durch die hohe Sensitivität der PCR-Essays zu detektieren. Für die einwandfreie Spezifität der *G. orontii*-Primer sprechen zudem die Ergebnisse der Überprüfung der Methode mit dem Real-Time-Cycler. In der Schmelzkurvenanalyse konnte nachgewiesen werden, dass mit den Primern Go1s/Go4a nur ein Produkt amplifiziert wurde (siehe 5.4.2.6).

Beide Primerpaare erwiesen sich auch gegenüber genomischer Gurken-DNA und der DNA anderer Pilztaxa als sehr diskriminierungsfähig. Für die Spezifitätstestung wurden hierzu Pilztaxa ausgewählt, die einerseits als Kontaminationspilze aus den Echten-Mehltau-Erhaltungen isoliert worden waren und deren DNA folglich auch in DNA-Aufbereitungen zu finden sein konnte. Andererseits erfolgte die Testung auch auf *Ampelomyces quisqualis*, dem typischen und omnipräsenten Hyperparasiten des Echten Mehltaus, mit dessen Auftreten vor allem bei neuen Isolierungen oder in Feldversuchen zu rechnen ist. Die Primer wurden nicht gegen andere Echte Mehltauarten getestet, da in den durchgeführten Versuchen mit artifiziell inokulierten Pflanzen gearbeitet wurde und auch bei natürlichem Befall auf Kürbisgewächsen in Deutschland nur mit *Golovinomyces* sp. und *P. xanthii* zu rechnen ist.

5.3.2 Kompetitorenentwicklung und -testung

Ziel war es, Sequenzen zu entwickeln und zu testen, die als Kompetitor in einer quantitativen PCR eingesetzt werden konnten. Zu diesem Zweck wurden zuerst heterologe Kompetitoren mit dem Primerpaar Px1s/Px2a für *P. xanthii* und dem Primerpaar Go1s/Go2a für *G. orontii* entwickelt. Nach ihrer Überprüfung und befundenen Nichteignung erfolgte daraufhin die Entwicklung der homologe Kompetitoren mit dem gleichen Primerpaar für *P. xanthii* und den Primern Go1s/Go4a für *G. orontii*. Die Diskussion erfolgt hier im Hinblick auf die Eignung von heterologen Kompetitoren im Vergleich zu homologen.

Mit der proportionalen Erhöhung der initialen DNA-Menge von Kompetitor und Zielsequenz in einem PCR-Ansatz erreicht die PCR-Reaktion bei gleich bleibender Zyklenzahl schneller die Plateauphase. Hier, an der Grenze der PCR-Reaktion, zeigt sich besonders deutlich, ob beide Sequenzen mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden (Raeymaekers 1995). Bei derselben Effizienz würde ein konstantes Bandenverhältnis von Ziel- und Kompetitorsequenz zu erwarten sein. Auf diese Weise kann der dynamische Bereich des Testsystems überprüft werden, das heißt der Bereich, in dem das Verhältnis konstant bleibt und eine Quantifizierung erfolgen kann.

In der Testung des heterologen *G. orontii*-Kompetitors und der Zielsequenz auf gleiche Amplifikationseffizienz konnte im unteren Konzentrationsbereich kein konstantes Verhältnis, das bei der gleichzeitigen Mengenerhöhung beider Fragmente unter Vorliegen der gleichen Amplifikationseffizienz zu finden sein müsste, gefunden werden. Erst bei sehr hohen Konzentrationen stellte sich ein konstantes Verhältnis ein, das durch das Erreichen der Plateauphase beider Reaktionen erklärt werden kann (siehe 4.5.2).

Folgt man den Ausführungen von McCulloch et al. (1995), wird die Effizienz der Amplifikation eines Fragments, neben der Sequenz, vor allem durch dessen Länge bestimmt. Da die heterologen Kompetitoren in diesem Fall dieselbe Länge hatten wie die Zielfragmente, musste die unterschiedliche Effizienz in Sequenzunterschieden begründet sein. Der GC-Gehalt beider Fragmente war mit 42 % für den Kompetitor und 44,4 % für die Targetsequenz nahezu gleich. Trotzdem lag die berechnete T_m der Kompetitorsequenz mit 93,7 °C mehr als 2 °C unter der T_m der Zielsequenz mit 95,9 °C. Dieser Wert legt die Vermutung nahe, dass Unterschiede in der Denaturation der Fragmente eine Rolle gespielt haben könnten. Wenn dies allerdings der einzige Faktor gewesen wäre, hätte dies zwar einen Einfluss auf die Amplifikationseffizienz gehabt, es hätte aber ein Bereich gefunden werden müssen, in dem das Produktverhältnis der beiden Fragmente konstant hätte sein müssen, nämlich in dem Bereich, in dem sich beide

Akkumulationskurven in der linearen Phase befunden hätten. Da dieser Bereich nicht existierte, musste davon ausgegangen werden, dass noch mindestens ein weiterer Effizienz beeinflussender Faktor eine Rolle spielte. Es ist anzunehmen, dass dieser Faktor durch das doppelte Vorkommen der Kompetitorsequenz, einmal im Vektor und einmal als Insert, verursacht wurde. Im Bereich hoher Plasmidkonzentrationen führten wahrscheinlich Rekombinationen zwischen Plasmidsequenz und amplifizierten Kompetitorprodukt zu einer Bindung des Kompetitors und damit zu einer Reduktion der zur Amplifikation verfügbaren Kompetitormenge. Um dies zu umgehen, hätte das Insert aus dem Plasmid isoliert werden und ohne umgebende Vektorsequenz als Kompetitor eingesetzt werden können. Allerdings kann eine erneute Aufreinigung zu Verlusten in der Quantität und Qualität der Kompetitorsequenz führen und hätte keine Garantie geliefert, dass der Kompetitor auch auf Grund seines zur Zielsequenz unterschiedlichen T_m -Wertes wirklich zur Quantifizierung hätte benutzt werden können.

Eine Testung des entwickelten heterologen Kompetitors von *P. xanthii* wurde nach diesen Ergebnissen nicht mehr durchgeführt. Da die Kompetitorsequenz wie bei dem *G. orontii*-Kompetitor neben dem Insert auch noch einmal in der Vektorsequenz vorkam und zudem einen höheren T_m -Unterschied zur Zielsequenz aufwies, war nicht zu erwarten, dass sich das Amplifikationsverhalten von heterologem Kompetitor und Zielsequenz von *P. xanthii* von den Ergebnissen für *G. orontii* unterschieden hätte.

Viel Verwirrung und Diskussion über qPCR in der Literatur liegt darin begründet, dass einerseits die Terminologie uneinheitlich verwendet wird (siehe 2.3.2.3) und andererseits die Theorie nicht immer vollständig verstanden wurde. Was die Quantifizierung mit heterologen Kompetitoren betrifft, so ist die Quantifizierung mit ihnen ohne Einschränkung möglich, wenn sie die gleiche Amplifikationseffizienz wie die Zielsequenz aufweisen. Haben sie diese nicht, was zum Beispiel durch unterschiedliche Sequenzen und Längen der Fall sein kann (McCulloch et al. 1995), so ist die Quantifizierung nur im linearen Bereich der Produktzunahme, das heißt in dem Bereich, in dem beide Fragmente eine konstante Amplifikationseffizienz haben, möglich. Durch die unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen ist der dynamische Bereich des Systems, im Vergleich zu Fragmenten mit gleichen Effizienzen, eingeschränkter. Die Quantifizierung sollte somit in einem Bereich erfolgen, in dem die Differenz in den Ausgangsmengen nicht zu groß ist. Wenn dies der Fall ist, könnte die Effizienz des Produkts, das in der größeren Menge vorliegt, schneller abnehmen als die des anderen Produkts und somit zu einer Veränderung der Produktverhältnisse führen (Raeymaekers 1995). Die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Proben ist am Besten gewährleistet, wenn der Standard konstant gehalten und die Probe in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt wird. Auf

diese Weise kann sichergestellt werden, dass sich alle Reaktionen immer im gleichen Bereich der Amplifikationskurven befinden und den linearen Bereich nicht verlassen. Bei der Benutzung solcher heterologen Standards ist allerdings immer im Auge zu behalten, dass die absolute Menge nicht genau bestimmt werden kann, da sich der Äquivalenzpunkt durch die unterschiedlichen Effizienzen verschiebt. Theoretisch ist auf diese Weise keine absolute, sondern nur eine relative Quantifizierung möglich (Raeymaekers 1995). Eine Vergleichbarkeit zwischen den Proben wird aber dadurch gegeben, dass die Verschiebung des Äquivalenzpunktes in allen Proben gleich ist. Sie kann ausgeglichen werden mit einem Korrekturfaktor, der durch den Abgleich einer bekannten Zielsequenzmenge mit der bekannten Kompetitormenge berechnet werden kann. Liegt die Zielsequenz einzeln, z. B. in einem Plasmid vor, so ist auf diese Weise auch die Herstellung einer Eichkurve möglich. In diesem Fall wird eine Verdünnungsreihe der Zielsequenz mit einer konstanten Kompetitormenge koamplifiziert und der Logarithmus der Bandenstärkenverhältnisse gegen den Logarithmus der eingesetzten Zielsequenzmenge aufgetragen. Mittels dieser Referenzgerade können anschließend die unbekannt DNA-Mengen in den Proben ermittelt werden und die sonst üblichen Mehrfachbestimmungen werden überflüssig. Wichtig ist jedoch auch in diesem Fall, dass die Eichgerade linear ist und eine Steigung von 1 hat. Zeigt sie einen nichtlinearen Verlauf, so ist davon auszugehen, dass sich ein Fragment bereits in der exponentiellen Phase befindet. In diesem Fall kann bis zu einem gewissen Grad die Reduktion der Zyklenzahl und/oder die Verringerung der initialen DNA-Menge Abhilfe schaffen (Raeymaekers 1995). Bleibt die Gerade jedoch nichtlinear, beeinflussen auch unbekannte Faktoren die Amplifikation.

Homologe Kompetitoren werden in der Literatur seltener angewendet als heterologe. Dies liegt vor allem an ihrer Eigenschaft, Heteroduplizes zu bilden, unspaltbare Hybridisierungsprodukte aus Ziel- und Kompetitorsequenz. Dabei nimmt die Heteroduplexanzahl zu, je weiter Ziel- und Kompetitorsequenz in der Ausgangsmenge im Gleichgewicht sind und nimmt ab mit zunehmender Verschiebung der Verhältnismengen (Serth et al. 1998). Berücksichtigt man die Heteroduplex-Bande bei der quantitativen Auswertung nicht, so kann es außerhalb des Gleichgewichtsbereichs zu einer Über- oder Unterschätzung des zu bestimmenden Fragments kommen. Die rechnerische Einbeziehung der Heteroduplizes in die Auswertung nach dem von Serth et al. (1998) entwickelten System ergab, dass die Quantifizierung mit beiden homologen Kompetitorfragmenten in der Größenordnung bis zu mindestens einem Logarithmus über und unterhalb der eingesetzten Kompetitorkonzentration erfolgen konnte. Durch die Validierung des Testsystems mit einer erhöhten (10^6) und einer erniedrigten (10^4)

Kompetitoranzahl ergibt sich daraus ein gesicherter Quantifizierungsbereich von 10^3 bis 10^7 Kopien. Theoretisch wäre dieser Bereich durch die weitere Erhöhung oder Erniedrigung der Kompetitoranzahl noch erweiterbar.

Die größte Fehlerquelle bei der Durchführung einer Quantifizierung liegt in der akkuraten Konzentrationsmessung des Kompetitors als Referenz. Bei der Validierung des Systems, wie auch bei der Testung der heterologen Kompetitoren zeigte sich, dass trotz mehrfacher Reinigung über Säulen und größter Sorgfalt bei der Messung der Plasmidkonzentration, die tatsächlich eingesetzten Plasmidmengen nicht immer der gemessenen und errechneten Kopienzahl entsprochen haben konnten. Dies wurde z. B. deutlich an ungleichen Bandenstärken trotz des Einsatzes der gleichen Konzentration von Kompetitor und Zielsequenz in einer PCR. Auf die Gefahr der Variabilität der Kompetitormenge zwischen verschiedenen Proben oder Versuchen und die damit verbundene Nicht-Vergleichbarkeit machte Ferre (1992) aufmerksam. Da in dieser Arbeit die Quantifizierungsergebnisse, die mit zwei Kompetitoren erhalten worden waren, miteinander verglichen werden sollten, war zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit eine Standardisierung zwischen den beiden Kompetitoren nötig. Dies konnte am Besten erreicht werden durch die Verwendung eines multispezifischen Kompetitors, eines Plasmids, in dem beide Kompetitorfragmente vereinigt sind. Kompetitoren mit einem ähnlichen Prinzip wurden von Wang & Mark (1990) und von Cottrez et al. (1994) benutzt. Durch die Verwendung derselben Plasmidaufbereitung in allen Quantifizierungen konnte deshalb sichergestellt werden, dass die Ergebnisse vollkommen vergleichbar waren.

5.3.3 Nachweisgrenzen

Die Sensitivitätsbestimmung eines entwickelten Testsystems, das heißt die Bestimmung der Nachweisgrenzen, hängt von der benutzten Diagnosemethodik ab. So spielen das verwendete Gel, seine Konzentration und auch der verwendete Farbstoff eine Rolle (Martin 1996). Grundsätzlich können auf PA-Gelen noch geringere DNA-Mengen nachgewiesen werden als auf Agarosegelen (Sambrook & Russel 2001). Eine Eigenschaft, die bei der Bestimmung der Nachweisgrenze in diesem Fall deutlich zu sehen war. Die für die spezifische PCR errechnete Nachweisgrenze für genomische DNA auf Agarosegelen betrug ca. 30 pg für beide Pilze. Auf PA-Gelen konnte dagegen noch das PCR-Produkt von ca. 1 pg reiner DNA jedes Pilzes nachgewiesen werden.

Die Sensitivität der kompetitiven PCR wurde durch die Präsenz von genomischer Hintergrund-DNA (150 ng) allerdings auf ca. 10 pg etwas erniedrigt. Diese Sensitivitätsreduktion durch die Präsenz von Hintergrund-DNA wurde auch für viele andere Essays beschrieben (Wilson 1997; Zeng et al. 2005; Hayden et al. 2006). Die

Nachweisgrenzen sind vergleichbar mit denen anderer Testsysteme, die auf Einzelrunden PCR-Ansätzen beruhen. Beispielsweise lag das Limit für den Nachweis von *Fusarium* spp. an Weizen bei etwas weniger als 10 pg (Schilling et al. 1996) oder bei *Gremmeniella abietina* bei 15 pg (Zeng et al. 2005). Durch die Erhöhung der Zyklenzahl, vor allem aber durch die Verwendung von „nested“ PCR-Ansätzen (Haff 1994) kann die Sensitivität allerdings bis um das 10000fache gesteigert werden und damit DNA noch bis in den einstelligen fg-Bereich (Zeng et al. 2005) oder aus einzelnen Konidien (Matsuda et al. 2005) nachgewiesen werden.

5.4 Experimentelle Überprüfung der Methode im Mischinfektionsversuch

5.4.1 Biologische Zusammenhänge

5.4.1.1 Blattfläche

Durch die mathematische Formulierung des Zusammenhangs zwischen den linearen Dimensionen und der Fläche eines Blatts sollte eine einfache Methode gefunden werden, um die Blattfläche in den Versuchen bestimmen zu können.

Die Messung linearer Blattdimensionen, wie Blattbreite und Blattlänge, ist eine etablierte Methode zur nichtdestruktiven Abschätzung der Blattfläche und findet breite Anwendung vor allem bei der Modellierung des Pflanzenwachstums. Für eine große Anzahl verschiedener Pflanzen existieren Gleichungen über die die Blattfläche an Hand der Blattbreite und/oder Blattlänge geschätzt werden kann, so z. B. für *Vitis labruscana* (Elsner & Jubb 1988) oder *Helianthus annuus* (Bange et al. 2000). Für *C. sativus* gibt es sortenspezifische Gleichungen, beispielsweise für die Sorte 'Hokushin' (Blanco & Folegatti 2003), aber auch sortenunabhängige (Robbins & Pharr 1987). Eine Überprüfung der beiden Gleichungen bei der Sorte 'Chinesische Schlange' ergab, dass die Gleichung von Blanco & Folegatti (2003) zu einer Überschätzung der Blattfläche führte und mit der Formel von Robbins & Pharr (1987) zwar die Blattfläche von mittelgroßen bis ausgewachsenen Blättern relativ genau berechnet werden konnte, jedoch nicht von kleineren Blättern.

Durch die neu ermittelte Gleichung 4.1, konnte die Bestimmung der Blattfläche der Sorte 'Chinesische Schlange' über das Produkt aus Blattbreite und Blattlänge mit einer sehr hohen Genauigkeit vorgenommen werden. Diese Formel hat den Vorteil, dass sie für Blätter jeder Größe verwendet werden kann und auch die ersten Laubblätter einbezogen

werden können. Die ersten Laubblätter wichen in ihren Dimensionen von denen der nachfolgenden Blätter ab. Länge wie Breite waren meist auf ca. 10 cm begrenzt und ihre Blattfläche überstieg nie 140 cm² (siehe Abbildung 4.22). Blanco & Folegatti (2003) hatten für diese Blätter eine spezielle Gleichung entwickelt.

Durch die hohe Korrelation zwischen dem Produkt von Blattbreite und Blattlänge und der Blattfläche konnte durch die ermittelte Gleichung auf eine einfache und sichere Methode zur Blattflächenbestimmung zurückgegriffen werden.

5.4.1.2 Blattfrischmasse

Bei der Beprobung der Blätter musste davon ausgegangen werden, dass der Befall mit Echtem Mehltau, trotz einer möglichst homogenen Inokulation, nicht gleichmäßig über die gesamte Blattfläche vorkommen würde, sondern wahrscheinlich auch aggregiert. Eine Beprobung der Blätter durch die Entnahme gleich großer Blattstücke, z. B. mit einem Korkbohrer, würde daher unter Umständen nicht repräsentativ für das Blatt sein und könnte zu einer Über- oder Unterschätzung des tatsächlichen Befalls führen. Um in den späteren Quantifizierungsversuchen eine repräsentative Aussage über die Präsenz einer Echten Mehltauart auf dem Blatt treffen zu können, konnte die Entnahme des zu analysierenden Aliquots nur aus einer vollkommen homogenisierten Blattprobe erfolgen. Da eine repräsentative Probeentnahme nach der Homogenisierung nur über die Bestimmung der Masse möglich war, musste im Vorfeld geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen Frischmasse und Blattfläche gegeben war, der es erlaubte, Rückschlüsse von dem Gewicht auf die Blattfläche zu ziehen. Durch die nachgewiesene sehr enge Korrelation zwischen Blattfläche und Frischmasse wurde es möglich, die Quantifizierungsergebnisse auf eine Blattflächeneinheit umzurechnen. Allerdings ist dieser Zusammenhang nur unter folgend erläuterten Voraussetzungen gültig.

Die Frischmasse eines Blattes setzt sich zusammen aus seinem Wassergehalt und seiner Trockenmasse. Hierbei wird der Wassergehalt hauptsächlich durch die Umweltbedingungen, die einen Einfluss auf die Transpirationsrate haben bestimmt und der Trockenmassegehalt durch den freien Stickstoff sowie den Kohlenhydrat-, Protein-, und Zellulosegehalt der Zellen (Lainson & Thornley 1982). Durch Faktoren, die eine oder mehrere dieser Komponenten beeinflussen, wie z. B. Düngergaben oder die Veränderung der Lichtverhältnisse und eine dadurch bedingte Veränderung der Photosyntheserate, kann die Trockenmasse erhöht oder erniedrigt werden. Ein enger Zusammenhang zwischen Blattfläche und Frischmasse zeigt sich nur, wenn einerseits alle Blätter den gleichen prozentualen Wassergehalt haben und andererseits die verwendeten

Gurkenpflanzen unter den gleichen Bedingungen angezogen werden, damit die Trockenmassebildung zwischen den Gurkenpflanzen vergleichbar ist. Da die Gurkenanzucht immer unter den gleichen Bedingungen erfolgte, konnte davon ausgegangen werden, dass der Gehalt der Trockenmasse nicht beeinflusst wurde. Um allerdings den prozentualen Wassergehalt in den Blättern vergleichbar zu halten, wurde darauf geachtet, dass alle Blätter bei der Entnahme voll turgeszent waren.

Die übliche Methode bei der Arbeit mit Pflanzenmassen ist das Umgehen des variablen Wassergehaltfaktors durch die Bestimmung der Trockenmasse. Wie aber Ergebnisse in Vorversuchen gezeigt hatten, erwies sich die Arbeit mit getrockneten Blättern in diesem Fall aus mehreren Gründen als unvorteilhaft: Das Trocknen der Blätter verursachte zum einen einen erheblichen Mehraufwand an Zeit und Arbeit, zum anderen ließ sich die DNA aus der getrockneten Blattmasse schwieriger extrahieren und war von geringerer Qualität als die aus frischen Blättern (gemessen an der Länge der DNA-Moleküle). Aus diesen Gründen wurde die Arbeit mit frischem Blattmaterial fortgesetzt.

5.4.1.3 Gesamt-DNA-Gehalt der Blätter

Der letzte zu überprüfende biologische Zusammenhang betraf die Möglichkeit der Standardisierung der Quantifizierungsergebnisse über den DNA-Gehalt der Blätter. Eine genaue Standardisierung ist hierbei nur möglich, wenn der DNA-Gehalt der Blätter pro Blattflächeneinheit gleich ist. Variiert der DNA-Gehalt in den Blättern, so würde die zu quantifizierende Pilz-DNA in Blättern mit niedrigem DNA-Gehalt verhältnismäßig überschätzt und in Blättern mit höherem DNA-Gehalt unterschätzt.

Der grafisch dargestellte Zusammenhang zwischen Blattgröße und DNA-Gehalt, aufgefächert nach dem Alter der Blätter (Abbildung 4.24), zeigte, dass sich der reduzierte DNA-Gehalt eines Blattes sowohl durch dessen Größe, als auch durch sein physiologisches Alter erklären ließ. Dass der Alterseffekt nicht nur auf die wachstumsbedingte Zunahme der Blattfläche zurückzuführen war, wurde deutlich an den ersten, ältesten Blättern, die durch ihr begrenztes Wachstum nicht die größten Blätter waren, aber die Blätter mit dem signifikant kleinsten DNA-Gehalt.

Die Abnahme des DNA-Gehalts in Abhängigkeit von der Blattgröße lässt sich erklären durch den Einsatz höherer Zellzahlen in die DNA-Extraktion von kleineren Blättern als von größeren. Die Zellen jüngerer, noch stark im Wachstum befindlicher Blätter sind deutlich kleiner als die Zellen bereits ausgewachsener Blätter (Lainson & Thornley 1982). Aus diesem Grund befinden sich in den jüngeren Blättern mehr Zellen pro Gewichts- oder Blattflächeneinheit als in den älteren. Die Zellenanzahl pro Blattflächeneinheit wurde bei

ausgewachsenen Blättern relativ stabil und damit auch der DNA-Gehalt pro Blattflächeneinheit. Zu einer weiteren Reduktion des DNA-Gehalts führte allerdings in der Folge die beginnende Seneszenz der Blätter. Obwohl die Blätter äußerlich noch keine starken Seneszenzmerkmale aufwiesen, waren die Zellen anscheinend schon im Absterben begriffen, wobei die Degeneration des Zellkerns, die auf den programmierten Zelltod (Apoptosis) zurückzuführen ist, mit einer Reduktion des DNA-Gehalts einhergeht (Bhattacharya et al. 1996).

Für die angestrebte Quantifizierung der Pilze ergab sich aus dieser Analyse, dass eine Standardisierung des Pilzgehalts über den DNA-Gehalt der Blätter nur sinnvoll erfolgen kann, wenn die Blätter ausgewachsen, aber noch nicht zu alt sind. Die Daten sollten deshalb vor einer weiteren Berechnung auf einen möglichen Einfluss des Blattalters überprüft werden.

5.4.2 Mischinfektionsversuch

Die entwickelte qPCR sollte in einem Mischinfektionsversuch auf ihre Anwendbarkeit überprüft werden. Zur Erhebung der epidemiologisch relevanten Daten von Sporulation und Befallsstärke sollten Konidien und Myzel im vorliegenden Fall getrennt erhoben und analysiert werden. Hierzu wurde jede Kolonie bei der Bonitur einzeln vermessen und die gebildeten Konidien mit gestopften Filterspitzen abgesaugt. Zur Abschätzung des Anteils eines jeden Pilzes an der Gesamtbefallsstärke im Mischversuch, wurden mit Hilfe der Einzelinokulationsvarianten Referenzgeraden erstellt, über die es möglich war, von dem quantifizierten DNA-Gehalt auf die Befallsstärke in der Mischvariante schließen zu können.

5.4.2.1 Verrechnung des quantifizierten Pilz-DNA-Gehalts

Bei dem Vergleich der beiden unterschiedlichen Verrechnungsvarianten zeigte sich, dass über beide Varianten ein gleicher Verlauf der Infektion gezeigt werden konnte und die Art der Verrechnung, zumindest in diesem Versuch, keinen Einfluss auf die Detektion signifikanter Unterschiede in den Daten hatte. Die Streuung der Pilz-Gehalte auf einigen Blättern konnte durch die Normierung über die DNA-Konzentration im Vergleich zur unkorrigierten Verrechnung über die Blattfläche verringert werden. Bei einigen Daten zeigte sich aber auch der gegenteilige Effekt und die Streuung nahm zu, was auf die erfolgte DNA-Konzentrationskorrektur durch den Konzentrationsmittelwert zurückzuführen war. An Hand dieser Ergebnisse zeigte sich, dass eine genaue Validierung und gegebenenfalls erforderliche Korrektur der Proben-DNA-Konzentration schwer

durchführbar ist, da nicht leicht zu unterscheiden ist, welcher der DNA-Konzentrationswerte zwar sehr hoch, aber korrekt ist und bei welchem die DNA-Konzentration auf Grund einer Kontamination z. B. mit RNA oder Substanzen aus der Extraktionsprozedur, fehlerhaft gemessen wurde. Das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} kann in diesem Fall zwar eine Entscheidungshilfe geben, ist aber auch nicht immer verlässlich. Die Verwendung fehlerhafter Messwerte, die auf einer erhöhten Messung durch eine Probenkontamination beruhen, führt zu einer Unterschätzung des Pilz-DNA-Gehalts. Die fälschliche Korrektur eines hohen Messwerts durch den Probenkonzentrationsmittelwert, führt zu einer Überschätzung. Es ist somit von den Messdaten selbst abzuschätzen, welcher der beiden Fehler geringer ist.

Der Vergleich der beiden Verrechnungsvarianten zeigte ferner, dass eine Normierung über die DNA-Konzentration nicht zwingend erforderlich ist. Was allerdings hierbei sichergestellt werden muss, ist die gleiche Effizienz in der DNA-Extraktion der Proben. In diesem Fall zeigte sich, dass die DNA-Gehalte bezogen auf die Blattfläche bei *G. orontii* etwa 2,5 mal größer waren als die der DNA-Gehalte der konzentrationsbezogenen Verrechnungsvariante. Bei *P. xanthii* lag das Verhältnis der beiden DNA-Gehalte dagegen um 4. Dieser Unterschied wurde hervorgerufen durch eine generell niedrigere DNA-Konzentration in den Proben der *G. orontii*- als in der *P. xanthii*-Variante. Ein unkorrigierter Vergleich der beiden so gewonnenen Daten würde hier zu einer Unterschätzung von *G. orontii* im Vergleich zu *P. xanthii* führen. Bei der Verrechnung über die Blattfläche muss also bei sehr unterschiedlichen DNA-Extraktionseffizienzen gegebenenfalls ein Korrekturfaktor mit eingebaut werden.

Aus den Ergebnissen dieses Abschnitts lässt sich festhalten, dass DNA-Extraktionseffizienzunterschiede zwischen den Proben nur einen geringen Einfluss auf das Gesamtergebnis der Quantifizierung haben, solange sicher gestellt ist, dass sich die DNA-Extraktionseffizienz zwischen den Varianten nicht erheblich voneinander unterscheidet. Die Normierung der Quantifizierungsergebnisse über die DNA-Konzentration, die diesen Extraktionsunterschieden Rechnung tragen sollte, brachte keine wesentliche Erhöhung der Genauigkeit. Der hohe Arbeitsaufwand der Konzentrationsbestimmung jeder Probe stand dazu in keinem Verhältnis.

5.4.2.2 Befallsstärke und Pilz-DNA-Gehalt in den Einzelvarianten

Um die Befallsstärke der einzelnen Pilze in Mischinfektion schätzen zu können, musste zu Beginn geprüft werden, ob von der quantifizierten Pilz-DNA auf die Befallsstärke rückgeschlossen werden durfte.

Um die Befallsstärke möglichst genau angeben zu können, wurde mit dem mittleren Durchmesser der an zwei Stellen vermessenen Kolonie mit Hilfe der Kreisformel die befallene Fläche berechnet. Miller et al. (2003) benutzen diese Methode bei der Flächenberechnung von Läsionen, verursacht durch das Pathogen *S. macularis* f. sp. *fragariae* (= *P. aphanis* var. *aphanis*), und wiesen einen engen Zusammenhang zwischen den auf diese Weise berechneten mit den durch Bildanalyse bestimmten Flächen nach.

Bei dem Vergleich der beiden Einzelvarianten zeigte sich, dass die Befallsstärke von *P. xanthii* im gesamten Versuchsverlauf deutlich über der von *G. orontii* lag. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Ratna Hadi (2005), der bei 20 °C sowohl eine höhere Infektionseffizienz als auch eine höhere Wachstumsrate von *P. xanthii* im Vergleich zu *G. orontii* gefunden hatte.

Die Korrelation zwischen Pilz-DNA-Gehalt und Befallsstärke war für *G. orontii* etwas enger als für *P. xanthii*. Dies lag an der hohen Streuung der Datenpunkte, die im Bereich zwischen 20 und 40 % Befallsstärke in der *P. xanthii*-Variante auftrat (siehe Abbildung 4.26). An der errechneten Regressionsgeraden ließ sich zudem sehen, dass der Pilz-DNA-Gehalt in der *P. xanthii*-Variante im Bereich bis 10 % durch die Gerade überschätzt wurde, während bei der *G. orontii*-Variante die Regressionsgerade genauer durch die Punkte führte. Die Steigung der beiden Geraden gibt an, wie viel DNA jeder Pilz pro % Befallsstärke gebildet hatte. Während *P. xanthii* 0,56 ng/% Befallsstärke gebildet hatte, ließen sich bei *G. orontii* nur 0,33 ng/% Befallsstärke analysieren. Diese Werte könnten durch eine höhere Verzweigung des Myzels, d. h. durch die verstärkte Bildung von sekundären und tertiären Hyphen, verursacht worden sein. Dies würde zu kompakteren Kolonien von *P. xanthii* im Vergleich zu *G. orontii* führen. Eine weitere Erklärung könnte die Bildung kürzerer Hyphen liefern. Hierbei wären die Kolonien nicht kompakter, sondern nur die Zellzahl pro Längeneinheit bei *P. xanthii* im Vergleich zu *G. orontii* erhöht. Welcher der beiden Erklärungsansätze richtig war, kann aus den hier erhobenen Daten allein nicht geklärt werden. Das benutzte Versuchsdesign könnte allerdings zur Klärung dieser Frage herangezogen werden. Da die Zunahme der Befallsstärke hier auch gleichzeitig der zeitlichen Entwicklung einer Kolonie entsprach, könnte eine „kompaktere“ Wachstumsphase, d. h. die verstärkte Bildung von Hyphenverzweigungen, durch den Anstieg des Pilz-DNA-Gehalts bei nur minimalem Anstieg der Befallsstärke gekennzeichnet werden. Der Verlauf des Pilz-DNA-Gehalts wäre somit nichtlinear zur Befallsstärke. Ebenso könnten Faktoren, die den Anteil der freigesetzten Konidien beeinflussen, auch den ermittelten DNA-Gehalt/% Befallsstärke erhöhen oder erniedrigen, da dadurch der Anteil der dem Myzel zugerechneten Konidien steigen oder sinken kann, ohne eine Veränderung in der Befallsstärke zu beobachten. Faktoren dieser Art können

Luftfeuchte (Kenyon et al. 2002), Windstärke oder Alter der Kolonie sein (Willocquet & Clerjeau 1998; Willocquet et al. 1998).

Die praktische Umsetzung zeigte, dass für diese Art der Analyse die Streuung der Daten, vor allem in der *P. xanthii*-Variante, zu hoch war. Durch eine Regressionsanalyse konnte nicht sicher geklärt werden, ob der Pilz-DNA-Gehalt tatsächlich linear oder nichtlinear verlief, da nichtlineare Gleichungen nur unwesentlich bessere Anpassungen lieferten. Die Ursache hierfür war in der Methodik der Probenentnahme zu suchen. Während des Absaugens in den Einzelvarianten hatte sich gezeigt, dass das Myzel der beiden Pilzarten anscheinend unterschiedlich sensibel gegenüber dem Prozess des Konidienabsaugens war. Es schien, dass *P. xanthii* etwas empfindlicher war und sich manchmal Teile des Myzels mit ablösten. Des Weiteren konnten die *P. xanthii*-Konidien nicht so sauber und vollständig abgesaugt werden wie die *G. orontii*-Konidien. Einerseits lösten sich die Konidien nicht vollständig von den Konidiophoren, was durch Einflüsse der oben erwähnten Faktoren erklärt werden kann, andererseits blieben aber auch viele Konidien besonders bei den höheren Befallsstärken, d. h. bei erhöhter Konidienproduktion, am Myzel hängen. Hierbei könnten Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit der Konidien eine Rolle gespielt haben (siehe 5.4.2.4).

Theoretisch könnte aus dem Zusammenhang zwischen Pilz-DNA-Gehalt und Befallsstärke, die minimale Befallsstärke errechnet werden, die mit der Methode detektiert werden kann. Dies war allerdings auf Grund der hohen Schwankungen innerhalb der Daten, 7 DAI, nicht möglich, so dass die Regressionsgeraden durch den Nullpunkt gelegt wurden.

Es bleibt festzuhalten, dass die verwendete Absaugtechnik zur Detektion des Einflusses von Faktoren, die Unterschiede im DNA-Gehalt des Myzels verursachen könnten, zu ungenau war. Trotzdem war der ermittelte Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt und Befallsstärke so hoch, dass mittels dieser Referenzgeraden die Berechnung der Befallsstärke in der Mischvariante erfolgen konnte.

5.4.2.3 Pilz-DNA-Gehalt und Befallsstärke in der Mischvariante

Mit Hilfe der Referenzgeradengleichungen aus den beiden Einzelvarianten konnte aus dem Pilz-DNA-Gehalt die theoretische Befallsstärke ermittelt werden, die die beiden Pilze in einer Mischinfektion ohne gegenseitige Beeinflussung hätten. Durch den Vergleich mit der bonitierten Befallsstärke der Mischvariante konnte so ermittelt werden, ob das Wachstum der Pilze in einem Mischbefall dem ungestörten Wachstum bei alleinigem Befall entsprach.

Der Vergleich der Pilz-DNA-Gehalte zwischen der Mischvariante und der jeweiligen Einzelvariante machte deutlich, dass sich die Pilz-DNA-Gehalte nicht unterschieden. Allerdings musste bei diesem Vergleich darauf geachtet werden, dass die Pilz-DNA-Gehalte vor dem Vergleich auf die gleiche DNA-Basis bezogen wurden, d. h. die Gesamt-DNA in der Mischvariante um den DNA-Gehalt des zweiten Pilzes bereinigt wurde. Dass auch hier der Rückschluss von der Pilz-DNA auf die Befallsstärke legitim war, zeigte der Vergleich der summierten errechneten mit der bonitierten Befallsstärke. Die Auswertung ergab, dass sich die Befallsstärke der einzelnen Pilze in der Mischvariante zur Gesamtbefallsstärke addierte. Eine gegenseitige Beeinflussung der Pilze, die an einer Abweichung der Geradensteigung von eins deutlich geworden wäre, konnte mit diesem System nicht gefunden werden.

5.4.2.4 Konidienquantifizierung

Neben der Erhebung der Befallsstärke sollte mit der entwickelten Methode auch das Reproduktionspotenzial der beiden Pilze über die Quantifizierung der Konidien abgeschätzt werden. Hierzu wurden verschiedene Sammeltechniken erprobt. Eine Vielzahl an Methoden zur Sammlung von Konidien wurden im Laufe der Zeit entwickelt. Das Abschwemmen der Konidien mit detegenzienvesetzten Wasser ist beispielsweise eine sehr übliches Verfahren. Es wurde auch hier erprobt, durch die Trichome der Gurkenblätter, die die gleichmäßige Benetzung der Blätter verhinderten, führte sie aber nicht zum Erfolg. Ein von Dutzmann & Kranz (1982) entwickelter Konidienkollektor, bei dem mit Hilfe einer Spritze die Konidien einer Gerstenmehltaukolonie abgespült wurden, konnte nicht angewendet werden, da die Kolonien des Echten Gurkenmehltaus die Größe der Echten Gerstenmehltaukolonien um ein Vielfaches überschritten. Der Sporenkollektor wurde daraufhin an die Größe der Echten Gurkenmehltaukolonien angepasst. Die Ergebnisse waren aber ebenfalls nicht zufrieden stellend. Das Absaugen der Konidien bot eine funktionierende Alternative.

Die nachfolgende Aufbereitung der Konidien sollte dann mit einer möglichst einfachen Methode erfolgen. Die einfachste Methode, der Hitzeaufschluss der nicht weiter behandelten Konidien suspension, schlug jedoch in der *P. xanthii*-Variante fehl. Dies war auf die Präsenz von Inhibitoren zurückzuführen, die sich bei *P. xanthii* wahrscheinlich durch die Tiefkühlagerung gebildet oder akkumuliert hatten (siehe 5.4.2.5). Eine präparative Aufbereitung der Konidien suspension war unumgänglich. Da durch die Chelex-Extraktion auch inhibitorische Stoffe entfernt werden können (Walsh et al. 1991), sie arbeitsexensiv ist und gut amplifizierbare DNA liefert, wurde diese Methode gewählt. Wie sich zeigte, reichte diese Aufbereitung aus, um erfolgreich PCR-Produkte aus

P. xanthii-Konidien amplifizieren zu können. Allerdings zeigten die Daten in der *P. xanthii*-Variante, im Gegensatz zur *G. orontii*-Variante, keinen ersichtlichen Trend zwischen Befallsstärke und detektierter Konidienmenge.

Die Ursache hierfür könnte einerseits wie beschrieben in dem gewählten Absaugverfahren liegen, mit dem nicht alle Konidien, gerade bei hohen Befallsstärken, erfasst werden konnten. Andererseits ließen sich *P. xanthii*-Konidien im weiteren Verlauf auch schwieriger aufarbeiten als *G. orontii*-Konidien. Die eingefrorenen *P. xanthii*-Konidien klumpten zusammen und waren in einer Lösung nur schwer gleichmäßig zu verteilen. Auf Grund des mehrfachen Aufarbeitens kann es daher dazugekommen sein, dass das analysierte Aliquot im Endeffekt nicht mehr repräsentativ für die gesamte Probe war. Bei der Verarbeitung frischer Konidien zeigte sich die umgekehrte Situation: hier tendierten die Konidien von *G. orontii* zum Klumpen. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass sich beide Arten in der Oberflächenbeschaffenheit der Konidien hinsichtlich ihrer hydrophilen Eigenschaften unterscheiden und sich diese durch das Einfrieren änderten. Ob dies auch der Grund für die beobachteten inhibitorischen Effekte bei der PCR ist, kann an dieser Stelle nur vermutet werden.

Die Quantifizierungen der Mischvariante waren verwertbar, da hier die Proben ohne Zwischenschritte mit der Chelex-Extraktion aufbereitet worden waren. Allerdings wurde deutlich, dass mit den absoluten Konidienmengen nicht gearbeitet werden konnte, da die Probenaufbereitung einen zu hohen Effekt auf die absolute Anzahl der Konidien hatte. Die relativierten Konidienzahlen, aufgetragen im zeitlichen Verlauf, machten deutlich, dass der Anteil an *G. orontii*-Konidien anfänglich etwas höher war. Dies könnte erklärt werden durch eine etwas kürzere Latenzzeit von *G. orontii*. Allerdings wird dies durch die Daten von Ratna Hadi (2005), der keinen signifikanten Unterschied in den Latenzzeiten der beiden Pilze finden konnte, nicht unterstützt. Im Versuchsverlauf sank die Konidienanzahl von *G. orontii* jedoch, blieb aber bei 14 und 21 DAI auf dem gleichen Niveau.

5.4.2.5 PCR-Inhibition von *P. xanthii*

Die Amplifikation von *P. xanthii* führte häufig zu keinem detektierbaren Produkt oder schlecht reproduzierbaren Ergebnissen. Ein Phänomen, das auch Bardin (1996) bei der molekularbiologischen Arbeit mit diesem Pathogen erwähnt. Der inhibitorische Effekt war vermindert, solange gut aufgereinigte DNA benutzt wurde. Besonders stark kam er zum Vorschein bei der Amplifikation nicht präparierter gefrorener Konidien.

Die Testung auf Inhibitoren erfolgte durch die Zugabe des Kompetitors, durch den in jeder Probe eine Kontrolle auf Amplifikation möglich war. Eine unabhängige Überprüfung

bestand in einer amplifizierbaren Menge an *G. orontii*-Konidien, die einer Suspension aus gefrorenen *P. xanthii*-Konidien zugesetzt worden waren. Die Amplifikation mit *G. orontii*-Primern führte ebenfalls zu einem Ausbleiben des PCR-Produkts. Einen weiteren Hinweis brachte der Einsatz des aus einer nicht amplifizierbaren Konidienprobe gewonnenen Chelex-DNA-Extrakts als Template in einer erneuten PCR. *P. xanthii* konnte hier ohne Probleme amplifiziert werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass keine Degeneration der DNA in den eingefrorenen Konidien stattgefunden hatte, sondern dass sich tatsächlich Inhibitoren in den Proben befanden. Die Bildung der Inhibitoren war entweder durch das Einfrieren ausgelöst worden oder aber es war durch das Einfrieren zu einer Akkumulation gekommen.

Das Vorkommen von PCR-Inhibitoren ist keine Seltenheit. Wilson (1997) benennt dabei die Probenaufbereitung als auch die PCR selbst als mögliche Bereiche, in denen Inhibitoren wirksam werden können. So können inhibitorische Stoffe z. B. schon bei der DNA-Präparation mit der Zelllysis interagieren oder die DNA selbst degradieren oder immobilisieren. Im PCR-Ansatz können neben externen Stoffen, die in den Proben enthalten sind, wie z. B. Huminstoffe bei Bodenproben, oder zur Probenaufbereitung verwendete wurden, klassischerweise Phenol oder Ethanol, auch Substanzen der Organismen selbst inhibitorisch wirken. Häufig handelt es sich dabei um Proteine und Polysaccharide, die die DNA durch physikalische Effekte der Polymerase unzugänglich machen können. Aber auch die verwendeten Plastikmaterialien oder ungenügend gereinigte kommerziell erhältliche Enzyme können zu Amplifikationsausfällen führen (Wilson 1997). Inhibitoren können meist am einfachsten durch Ausdünnung, das heißt durch eine Verdünnung der Probe, umgangen werden. Dies geschieht aber auf Kosten der Sensitivität der PCR. Weitere Möglichkeiten bestehen in der Benutzung von Zusätzen wie BSA, DMSO, PVP, Tween 20 oder entrahmter Milch. Hierbei ist aber Vorsicht geboten, denn viele Zusätze können, in der falschen Konzentration angewendet, selbst zu einem Inhibitor werden (Demeke & Adams 1992; Ma & Michailides 2007). Auch die Verwendung eines neuen Enzyms kann Ziel führend sein, denn die Polymerasen zeigen unterschiedliche Sensitivität gegenüber Hemmstoffen (Wiedbrauk et al. 1995; Abu Al-Soud & Radstrom 1998). Durch die Anwendung von „nested“ Primern oder eine erneute Extraktion der Probe können ebenfalls inhibitorische Effekte aufgehoben werden (Wilson 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Inhibierung der extrahierten Blattproben bereits durch eine 1:2 Verdünnung der Proben wirksam ausgeschaltet werden. Im Falle der Konidiensususpension war dagegen die Anwendung einer einfachen Extraktionsmethode ausreichend.

Der Ursprung vieler Inhibitoren bei der molekularbiologischen Arbeit mit Pilzen, liegt in dem Medium auf dem die Pilze kultiviert werden. Auf zuckerreichen Medien kultivierte Pilze produzieren vermehrt Polysaccharide, die eine spätere PCR-Amplifikation hemmen können (Paterson 2007). Auch in dieser Arbeit erfolgte die Kultur von *P. xanthii* auf einem zuckerreichen Medium. Die Reduktion des Zuckers in dem Medium ist möglich, führt aber zu einer Verringerung der Konidienbildung (Bertrand 1991). Es ist allerdings fraglich, ob eine Veränderung der Kulturbedingungen zu einer besseren Amplifizierung von *P. xanthii* führen würde, da die hier beschriebenen Schwierigkeiten sowohl bei der Amplifikation von Konidien auftraten, die nicht aus der Echten-Mehltau-Erhaltung, sondern von kultivierten Gurken stammten, als auch bei aufbereiteter *P. xanthii*-DNA, die bereits durch die Verwendung von Säulen präpariert worden war. Dies Verfahren wurde als optimal zur Entfernung von Hemmstoffen beschrieben (Wilson 1997).

Die Effekte, die Probenkontaminationen der verschiedensten Art auf PCR-Ergebnisse haben können, wurden in den letzten Jahren zunehmend untersucht (Dyer & Leonard 2000; Tichopad et al. 2004). Auch dem durch Inhibitoren verursachten Problem der falsch-negativen Ergebnisse wurde verstärkt Beachtung geschenkt und zunehmend Detektionssysteme mit einer internen Amplifikationskontrolle entwickelt (Patrik 2000; Glick et al. 2002; Menzel et al. 2002; Hayden et al. 2006). Die Einführung einer Amplifikationskontrolle als Standardprozedur bei Detektionssystemen zur Qualitätsüberprüfung wird von einigen Wissenschaftlern neuerdings sogar vehement gefordert (Paterson 2007). Bei der Durchführung einer kompetitiven PCR allerdings ist der Einsatz einer Amplifikationskontrolle unnötig, da das Kompetitorfragment bereits als solche fungiert.

Für die molekularbiologischen Arbeiten mit *P. xanthii* ergibt sich aus den Ergebnissen, dass möglichst nur frisches Myzel und frische Konidien für die DNA-Extraktion benutzt werden sollten, und das Extrakt vor seiner weiteren Verwendung ausreichend verdünnt werden sollte. Zudem sollte bei der PCR eine Amplifikationskontrolle erfolgen. Durch eine Identifikation des inhibitorisch wirksamen Stoffes könnten zudem Maßnahmen ergriffen werden, durch die es möglich wäre, ihn gezielt zu vermeiden.

5.4.2.6 Überprüfung der Quantifizierung mit Real-Time PCR

Um die Genauigkeit der Quantifizierung mit der kompetitiven Methode abschätzen zu können, wurden die Werte mit einer Quantifizierung gegen eine externe Standardkurve im Real-Time-Cycler verglichen. Neben der hohen Sensitivität besteht die besondere Attraktivität von Real-Time PCR-Verfahren darin, dass die aufwändige Postanalytik, die

aus dem Restriktionsverdau der PCR-Produkte, ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung, sowie der videodensitometrischen Auswertung besteht, komplett unterbleiben kann. Obwohl die Berechnung der Ct-Werte von der internen Gerätesoftware erfolgt, sollte sich der Benutzer über die Faktoren, die die Ct-Werte beeinflussen, wie zum Beispiel Art des Templates (genomische DNA, PCR-Produkt, Plasmid), Denaturierungstemperatur oder verwendetes Enzym, und zu einer Verschiebung der Standardkurve führen können, im Klaren sein und sie gegebenenfalls optimieren und korrigieren (Wilhelm 2003). Durch die Verwendung eines Kompetitors, auch im Real-Time PCR-Verfahren, fallen viele dieser Faktoren nicht mehr ins Gewicht, da von einer eventuellen Beeinflussung beide Fragmente betroffen sind. Kompetitive Systeme gehören damit zu den genauesten Quantifizierungsverfahren (Wilhelm 2003).

Der Vergleich der mit den beiden unterschiedlichen Methoden erhobenen Daten der *G. orontii*-Variante zeigte, dass die mit Real-Time PCR gewonnen Daten um ein 1,5faches höher waren als die Daten der quantitativ kompetitiven PCR. Die Real-Time-Cycler-Methode erwies sich zudem sensitiver als das kompetitive Verfahren. Dies wurde deutlich an der positiven Testung von Proben, in denen mit der kompetitiven Methode keine Zielsequenz detektiert werden konnte. Das Detektionslimit der Real-Time PCR in Proben mit Hintergrund-DNA lag damit mindestens bei 5 pg. Über den weiteren Datenbereich korrelierten die Ergebnisse der beiden Methoden gut miteinander, ein Ergebnis, das auch Xu et al. (2006) beschrieben haben. Es ist anzunehmen, dass die erhöhten Datenwerte durch Unterschiede in der DNA-Konzentrationen der Proben, gegen die die Eichungen in beiden Methoden erfolgt waren, verursacht worden war. Ebenso denkbar ist eine Überschätzung der in den Proben vorhandenen Pilz-DNA-Gehalte. Dies könnte verursacht worden sein, durch die Verwendung einer verschobenen Eichgeraden. Da die Eichgerade mit Proben ohne Hintergrund-DNA ermittelt wurde, die Hintergrund-DNA aber wie in der kompetitiven PCR nachgewiesen, die Sensitivität eines Systems erniedrigen kann, ist es möglich, dass die tatsächlichen Pilz-Gehalte überschätzt wurden. Die Korrelation zwischen den beiden Methoden könnte durch die Verdünnung der Proben und Verwendung eines höheren Probenvolumens, anstelle des eingesetzten einen μL im Real-Time PCR-Ansatz, wahrscheinlich zusätzlich erhöht werden. Während die Pipettierung kleinerer Volumina ($< 1 \mu\text{L}$) meist etwas ungenau ist, steigt der Grad an Genauigkeit im höheren Volumenbereich ($> 2 \mu\text{L}$).

Die Amplifikation von *P. xanthii* bereitete auch in der Real-Time PCR Probleme. Die Ursache ist auch hier wahrscheinlich in den Inhibitoren zu suchen. Wie durch die Schmelzkurvenanalyse aber deutlich wurde, könnte eine Ursache auch in den verwendeten Primern liegen. Der doppelte Peak bei der Schmelzkurvenanalyse wies auf

die Amplifikation eines zweiten Produktes hin. Dass es sich in diesem Fall um Primerdimerprodukte gehandelt haben könnte, ist unwahrscheinlich, da in der Schmelzkurvenanalyse der Negativkontrolle keine Produktbildung zu sehen war. Auch eine Falschamplifikation durch Gurken-DNA ist auszuschließen, da es sich bei dem Template um reine *P. xanthii*-DNA gehandelt hatte. Da in der gelelektrophoretischen Auftrennung immer nur ein typisches 295 bp-Produkt gefunden werden konnte, ist es möglich, dass die Amplifikation des unspezifischen Produkts im Real-Time-Cycler auf Grund nicht optimaler Reaktionsbedingungen stattgefunden hat. Eine weitere Erklärung könnte eine Mutation innerhalb einiger Wiederholungseinheiten der rDNA-ITS-Region sein, die zu einer Veränderung der Restriktionsenzymstelle geführt hat. In diesem Fall könnte auch das in der gelelektrophoretischen Analyse detektierte Doppelfragment von 295 bp (siehe Abbildung 4.20) nicht auf den unvollständigen Restriktionsverdau der PCR-Produkte zurückzuführen sein, sondern auf die Mutation innerhalb des Fragmentes. Da keine weitere Testung der *P. xanthii*-Primer unter veränderten Reaktionsbedingungen im Real-Time-Cycler stattgefunden hat, kann an dieser Stelle der Ursprung des Doppelpicks nicht weiter erklärt werden. Um Klarheit über das zusätzliche 295 bp-Fragment zu erhalten, wäre eine Sequenzierung der beiden Fragmente möglich. Da, wie beschrieben, durch dieses Fragment die Quantifizierung aber nur minimal beeinflusst wurde, wurde dies im kompetitiven PCR-Verfahren als unnötig erachtet.

5.4.3 Gesamtdiskussion

In der Phytomedizin findet die PCR-basierte taxaspezifische Pathogendetektion in den unterschiedlichsten Bereichen Anwendung. Vor allem im phytosanitären Bereich wurden nicht quantitative Routineverfahren entwickelt, die auf der Verwendung taxaspezifischer Primer beruhen, z. B. zum Nachweis von Apfelviren (Menzel et al. 2002), von Virus übertragenden Nematoden (Hübschen et al. 2004), bakterieller Quarantäneschädlinge an Kartoffeln (Patrik 2000; Patrik et al. 2002) oder an Zierpflanzen (Glick et al. 2002). Auch zum Nachweis bodenbürtiger Phytopathogene und Pilze existieren viele Testverfahren, wie z. B. für *Phytophthora* spp. (Martin et al. 2004), *Pythium* spp. (Wang et al. 2003), *Polymyxa betae* (Mutasa et al. 1995) oder *Acremonium cucurbitacearum* an Melonen (Martinez-Culebras et al. 2004). Eine große Rolle spielt der artspezifische Nachweis auch bei mykotoxinbildenden Pathogenen, wie dem *Fusarium*-Komplex an Weizen (Schilling et al. 1996; Nicholson et al. 1998; Brandfass & Karlovsky 2006; Paterson 2006).

Bei den Erysiphales existieren neben den allgemeinen Primern, die zur diskriminierenden Amplifikation von Erysiphaceae-DNA aus einem Pilz-DNA-Gemisch entwickelt wurden (Takamatsu & Kano 2001), nur wenige taxaspezifische Primer. Dies liegt daran, dass die

Echten Mehлтаupathogene durch ihr epiphytisches Myzel einer genauen Diagnose unvermittelt zugänglich sind. Unter Berücksichtigung der Wirtsart sowie der Morphologie der Anamorphe und der Fruchtkörper kann die Erysiphales-Art sehr genau bestimmt werden, so dass der Einsatz einer PCR für Diagnosezwecke häufig nicht angebracht erscheint. Die morphologische Diagnose stößt allerdings an ihre Grenzen, wenn Wirtspflanzen von mehreren Echten Mehltauarten befallen werden und die Pilze sehr ähnliche Anamorphe haben und keine Fruchtkörper bilden. In diesen Fällen wurden auch bei den Erysiphales artspezifische Primer für die Diagnose entwickelt. Dies geschah z. B. zur Unterscheidung von *E. pulchra* und *Phyllactinia guttata* an *Cornus florida* (Mmbaga et al. 2004) oder zum Nachweis von *E. australiana* an *Lagerstroemia indica* (Shi & Mmbaga 2006). Für *E. necator* entwickelten Stummer et al. (2006) verschiedene spezifische Nachweise in Wein und Most und Hajjeh et al. (2005) eine PCR, mit der zwei Biotypen des Pilzes unterschieden werden können. Die entwickelten Primerpaare für *P. xanthii* und *G. orontii* gehören damit zu den wenigen artspezifischen Primern, die bei den Erysiphales entwickelt wurden.

Eine Präzisierung der Pathogendetektion im phytosanitären Bereich wurde durch den Einsatz quantitativer Methoden erreicht. Hierbei handelt es sich meist um kompetitive als auch Real-Time basierte PCR-Verfahren, die z. B. zur Quantifizierung von *Pythium* spp. in Bodenproben (Schroeder et al. 2006), *Phytophthora ramorum* an Gehölzen (Hayden et al. 2006) oder *Rhynchosporium secalis* an Gerstensaatzgut (Lee et al. 2002) eingesetzt wurden. Für Erysiphales wurde eine qPCR beschrieben, die im Bereich der Lebensmittelanalytik zur Quantifizierung von *Erysiphe necator* in Most und Saft entwickelt wurde (Stummer et al. 2006). Eine Erweiterung des Anwendungsgebietes auf den Pflanzenschutz wurde demonstriert durch die Evaluierungen von Maßnahmen zur biologischen Kontrolle von Falschem Mehltau an Wein, *Plasmopara viticola*, (Valsecia et al. 2005) oder des Effekts von Azoxystrobin-Behandlungen auf *Mycosphaerella graminicola* an Weizen (Rohel et al. 2002). Auch in die vergleichenden Untersuchungen von Populationsdynamiken fand die qPCR Eingang. Die Arbeitsgruppe um Nicholson benutzte kompetitive PCR-Systeme zur eingehenden Untersuchung der Entwicklung von verschiedenen mit Halm- oder Wurzelkrankheiten von Getreide assoziierten Pathogenen, wie *Fusarium* spp., *Tapesia* spp., *Microdochium nivale* oder *Rhizoctonia cerealis* (Nicholson et al. 1998), hinsichtlich eines Einflusses der Wirtstaxa (Simpson et al. 2000; Nicholson et al. 2002) oder von Fungiziden (Bateman et al. 2000; Simpson et al. 2001).

Populationsstudien mit Echten Mehлтаupathogenen wurden bisher vor allem für Rassen oder Pathotypen verschiedener f.sp. von *Blumeria graminis* durchgeführt (Stähle et al. 1984; O'Hara & Brown 1996; O'Hara et al. 2000), die hauptsächlich auf der Evaluierung

der Konidien beruhen. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode der kompetitiven PCR zur vergleichenden Analyse von *P. xanthii* und *G. orontii* ist somit hinsichtlich der Untersuchung von epiphytischen Blattpathogenen, als auch hinsichtlich der vergleichenden populationsdynamischen Untersuchung zweier Mehltauarten in einer Mischinfektion neu.

Durch den nachgewiesenen Zusammenhang zwischen Pilz-DNA-Gehalt und Befallsstärke ist es möglich, die Befallsstärke aus dem ermittelten Pilz-DNA-Gehalt in einer Mischinfektion zu berechnen. Voraussetzung hierfür ist die genaue Kenntnis des Pilz-DNA-Gehalts pro %-Befallsstärke, der am Besten durch die Analyse von Vergleichsvarianten erfolgt. Die Erprobung der Konidienquantifizierung hat gezeigt, dass die Methode prinzipiell funktioniert, aber hinsichtlich der repräsentativen Probenanalyse, bedingt durch die Oberflächeneigenschaften der Konidien, noch einer Überarbeitung bedarf. Die Anwendung der von Moriura et al. (2006) entwickelten Methode, die auf der elektrostatischen Anziehung der Konidien beruht, bietet in diesem Zusammenhang vielleicht eine Möglichkeit. Hierdurch könnten alle Konidien, die von einer Kolonie entlassen werden, sofort aufgefangen werden und verlustfrei der weiteren Analyse zugänglich gemacht werden. Die Bestimmung der Befallsstärke bei Echtem Mehltau mit Hilfe einer qPCR wurde noch nicht beschrieben. Einzig Stummer et al. (2006) korrelierten den Pilz-DNA-Gehalt ihrer Messungen mit der Befallsstärke der Weinzweige mit *E. necator* und fanden einen sehr engen Zusammenhang. Allerdings wurde in diesem Essay nicht zwischen Myzel und Konidien getrennt. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte bei beiden Pilzen ebenfalls eine gute Korrelation zwischen Pilz-DNA-Gehalt und der gemessenen Befallsstärke in den Einzelvarianten ermittelt werden.

Durch die Überprüfung der Quantifizierungsergebnisse von *G. orontii* mit einer Real-Time PCR konnte festgestellt werden, dass zwischen den beiden Methoden eine enge Korrelation besteht. Für die routinemäßige Quantifizierung von *P. xanthii* müssten noch zusätzliche Optimierungen oder aber der Wechsel der Primer, z. B. zu Px3s/Px6a, durchgeführt werden.

Die Ergebnisse des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mischinfektionsversuchs zeigen, dass bei einem Mischinfektionsbefall von *P. xanthii* und *G. orontii* gegenseitige Beeinträchtigung des Myzelwachstums wohl eher nicht zu erwarten ist. Vielmehr scheinen vom Wirt ausgehende Selektionsfaktoren und unterschiedliche Wachstumsraten der Pilze, die z. T. auch durch die Umweltfaktoren beeinflusst werden, bei der primären Besiedlung des Wirtes die Hauptrollen zu spielen. Inwieweit auch die Sporulationsrate der Pilze, durch die die weitere Verbreitung des Pilzes bestimmt wird, in einem Mischbefall gleich

bleibt, kann hier nicht mit vollständiger Sicherheit beantwortet werden. Die Analyse der relativen Konidienanteile in der Mischvariante zeigt zumindest die Tendenz, dass der Konidienanteil von *G. orontii* nicht im gleichen Verhältnis sinkt, wie die Befallsstärke. Eine sichere Aussage über diesen Effekt kann aber nur durch die Wiederholung des Versuchs über eine längere Laufzeit getroffen werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abiko, K. 1978. Studies on the specialization of parasitism of *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) Pollacci 1. Powdery mildew fungi parasitic on cucurbits, eggplant, edible burdock and japanese butterbur. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 44: 612-618
- Abu Al-Soud, W. & P. Radstrom. 1998. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3748
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402
- Amano, K. 1986. Host Range and Geographical Distribution of the Powdery Mildew Fungi. Japan Scientific Societies Press, Tokyo
- Andres, T. C. 2000. Cucurbitaceae web site. *Acta Horticulturae* 510: 139-141 (<http://www.cucurbit.org/>)
- Arabi, M. I. E. & M. Jawhar. 2002. The ability of barley powdery mildew to grow *in vitro*. *Journal of Phytopathology* 150: 305-307
- Aust, H. J. & J. v. Hoyningen-Huene. 1986. Microclimate in relation to epidemics of powdery mildew. *Annual Review of Phytopathology* 24: 491-510
- Ballantyne, B. 1975. Powdery mildew on Cucurbitaceae. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 99: 100-120
- Bange, M. P., G. L. Hammer, S. P. Milroya & K. G. Rickert. 2000. Improving estimates of individual leaf area of sunflower. *Agronomy Journal* 92: 761-765
- Bardin, M. 1996. Diversité phénotypique et génétique des oïdiums des cucurbitacées, *Sphaerotheca fuliginea* et *Erysiphe cichoracearum*. Dissertationsschrift. Université Claude Bernard, Lyon (in Französisch)
- Bardin, M., J. Carlier & P. C. Nicot. 1999. Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichoracearum*, a causal agent of powdery mildew of cucurbits. *Plant Pathology* 48: 531-540
- Bardin, M., P. C. Nicot, P. Normand & J. M. Lemaire. 1997. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. *European Journal of Plant Pathology* 103: 545-554
- Bashi, E. & H. J. Aust. 1980. Quality spores produced in cucumber powdery mildew compensates for their quantity. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 87: 594-599
- Bateman, G. L., S. G. Edwards, J. Marshall, L. W. Morgan, P. Nicholson, M. Nuttall, D. W. Parry, M. Scrancher & A. S. Turner. 2000. Effects of cultivar and fungicides on stem-base pathogens, determined by quantitative PCR, and on diseases and yield of wheat. *Annual Applied Biology* 137: 213-221
-

- Bechtold, U., S. Karpinski & P. M. Mullineaux. 2005. The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signalling responses in plant-biotrophic pathogen interactions. *Plant, Cell and Environment* 28: 1046-1055
- Bélanger, R. R., W. R. Bushnell, A. J. Dik & T. L. W. Carver (eds.). 2002. *The Powdery Mildews - A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul, Minnesota
- Bertrand, F. 1991. Les oïdiums des cucurbitacées: Maintien en culture pure - Etude de leur variabilité et de la sensibilité chez le Melon. Dissertationsschrift. Université Paris-Sud, Centre d'Orsay (in Französisch)
- Bhattacharya, P. K., A. J. Pappelis, S. C. D. Lee, J. N. BeMiller & C. S. Karagiannis. 1996. Nuclear (DNA, RNA, histone and non-histone protein) and nucleolar changes during growth and senescence of may apple leaves. *Mechanisms of Ageing and Development* 92: 83-99
- Birnboim, H. C. & J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523
- Blanco, F. F. & M. V. Folegatti. 2003. A new method for estimating the leaf area index of cucumber and tomato plants. *Horticultura Brasileira* 21: 666-669
- Blumer, S. 1967. *Echte Mehltaupilze*. G. Fischer, Jena
- Bösewinkel, H. J. 1977. Identification of Erysiphaceae by conidial characteristics. *Revue de mycologie* 41: 493-507
- Bösewinkel, H. J. 1980. The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). *Botanical Review* 46: 167-224
- Brandfass, C. & P. Karlovsky. 2006. Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. *BMC Microbiology* 6: 4
- Braun, U. & S. Takamatsu. 2000. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysipheae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecae) inferred from rDNA ITS sequences - some taxonomic consequences. *Schlechtendalia* 4: 1-33
- Braun, U. 1995. *The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe*. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Braun, U. 1999. Some critical notes on the classification and generic concept of the Erysiphaceae. *Schlechtendalia* 3: 48-54
- Braun, U., R. T. A. Cook, A. J. Inman & H. D. Shin. 2002. The taxonomy of the powdery mildew fungi. In: Bélanger, R. R., W. R. Bushnell, A. J. Dik & T. L. W. Carver (eds.). *The Powdery Mildews - A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul, Minnesota, S. 13-55
- Braun, U., N. Shishkoff & S. Takamatsu. 2001. Phylogeny of *Podosphaera* sect. *Sphaerotheca* subsect. *Magnicellulatae* (*Sphaerotheca fuliginea* auct. s.lat.) inferred from rDNA ITS sequences - a taxonomic interpretation. *Schlechtendalia* 7: 45-52
-

-
- Brown, J. K. M. & M. S. Hovmøller. 2002. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* 297: 537-541
- Caballero, O. L., L. L. Villa & A. J. G. Simpson. 1995. Low-stringency-PCR (LS-PCR) allows entirely internally standardized DNA quantitation. *Nucleic Acids Research* 23: 192-193
- Callaway, A. S., R. Abranches, G. C. Allen, W. F. Thompson & J. Scroggs. 2002. High-throughput transgene copy number estimation by competitive PCR. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 265-277
- Chehadeh, H. E., G. Zerlauth & J. W. Mannhalter. 1995. Video image analysis of quantitative competitive PCR products: Comparison of different evaluation methods. *BioTechniques* 18: 26-28
- Clark, J. M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 16: 9677-9686
- Cohen, Y. & H. Eyal. 1988. Pathogenicity of *Erysiphe cichoracearum* to cucurbits. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 11: 87-90
- Cook, R. T. A., A. J. Imman & C. Billings. 1997. Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. *Mycological Research* 101: 975-1002
- Coquer, M., M. Boccara & A. Vidal-Cros. 2003. A semi-quantitative RT-PCR method to readily compare expression levels within *Botrytis cinerea* multigenic families *in vitro* and *in planta*. *Current Genetics* 43: 303-309
- Cottrez, F., C. Auriault, A. Capron & H. Groux. 1994. Quantitative PCR: validation of the use of a multispecific internal control. *Nucleic Acids Research* 22: 2712-2713
- Crüger, G. & E. Meyer. 1976. Möglichkeiten zur Differenzierung der Erreger des Echten Mehltaus an Kürbisgewächsen (*Sphaerotheca fuliginea* und *Erysiphe cichoracearum*). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 28: 49-55
- Crüger, G. & W. D. Philipp. 1977. Zur Identifizierung und Bekämpfung der Erreger des Echten Mehltaus an Gurken. *Jahresbericht BBA* : H 29
- Demeke, T. & R. P. Adams. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques* 12: 332-334
- Dheda, K., J. F. Huggett, S. A. Bustin, M. A. Johnson, G. Rook & A. Zumla. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37: 112-119
- Dieffenbach, C. W. & G. S. Dveksler (eds.). 2003. *PCR Primer - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Ding, C. & C. R. Cantor. 2004. Quantitative analysis of nucleic acids - The last few years of progress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37: 1-10
-

- Dutzmann, S. & J. Kranz. 1982. Vergleich von zwei Methoden zum Messen der Sporulation von *Erysiphe graminis*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 89: 678-681
- Dutzmann, S. 1984. Einfluss von Sortenresistenz und Witterung auf die Sporulation von *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* Marchal unter besonderer Berücksichtigung der Methodik des Sporenfanges. Dissertationsschrift. Tropeninstitut, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Dyer, A. T. & K. J. Leonard. 2000. Contamination, error, and nonspecific molecular tools. Phytopathology 90: 565-567
- Elsner, E. A. & G. L. Jubb. 1988. Leaf area estimation of concord grape leaves from simple linear measurements. American Journal of Enology and Viticulture 39: 95-97
- Favre, N. & W. Rudin. 1996. Salt-dependent performance variation of DNA polymerases in co-amplification PCR. BioTechniques 21: 28-30
- Ferre, F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus myth. PCR Methods and Applications 2: 1-9
- Fille, M., J. D. Shanley & J. Aslanzadeh. 1997. Quantitative RT-PCR using a PCR-generated competitive internal standard. BioTechniques 23: 34-36
- Förster, E. 1994a. An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. BioTechniques 16: 18-20
- Förster, E. 1994b. Rapid generation of internal standards for competitive PCR by low-stringency primer annealing. BioTechniques 16: 1006-1008
- Freeman, W. M., S. J. Walker & K. E. Vrana. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. BioTechniques 26: 112-125
- Gardes, M. & T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113-118
- Gerbi, S. A. 1985. Evolution of ribosomal DNA. In: MacIntyre, R. J. (ed.). Molecular Evolutionary Genetics. Plenum Press, New York, S. 419-517
- Gilliland, G., S. Perrin, K. Blanchard & H. F. Bunn. 1990a. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences 87: 2725-2729
- Gilliland, G., S. Perrin & H. F. Bunn. 1990b. Competitive PCR for quantitation of mRNA. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (eds.). PCR Protocols: A Guide for Methods and Applications. Academic Press, San Diego, S. 60-69
- Giraud, T. 2006. Selection against migrant pathogens: the immigrant inviability barrier in pathogens. Heredity 97: 316-318
- Glick, D. L., C. M. Coffey & M. A. Sulzinski. 2002. Simultaneous PCR detection of the two major bacterial pathogens of geranium. Journal of Phytopathology 150: 54-59
-

-
- Haff, L. A. 1994. Improved quantitative PCR using nested primers. *PCR Methods and Applications* 3: 332-337
- Hajjeh, H., M. Miazzi, M. A. De Guido & F. Faretra. 2005. Specific SCAR primers for the "flag shoot" and "ascospore" biotypes of the grape powdery mildew fungus *Erysiphe necator*. *Journal of Plant Pathology* 87: 71-74
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98
- Haugland, R. A., M. Varma, L. J. Wymer & S. J. Vesper. 2004. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 198-210
- Hayden, K., K. Ivors, C. Wilkinson & M. Garbelotto. 2006. TaqMan chemistry for *Phytophthora ramorum* detection and quantification, with a comparison of diagnostic methods. *Phytopathology* 96: 846-854
- Hayward-Lester, A., P. J. Oefner, S. Sabatini & P. A. Doris. 1995. Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC. *Genome Research* 5: 494-499
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger & R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 11: 1026-1030
- Hillis, D. M. & M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-453
- Hirata, K. 1968. Notes on host range and geographic distribution of the powdery mildew fungi. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 9: 73-88
- Hirata, T. & S. Takamatsu. 1996. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* 37: 283-288
- Hirata, T. & S. Takamatsu. 2001. Phylogeny and cross-infectivity of powdery mildew isolates (*Podosphaera fuliginea* s. lat.) on cosmos and cucumber. *Journal of General Plant Pathology* 67: 1-6
- Hirata, T., J. H. Cunnington, U. Paksiri, S. Limkaisang, N. Shishkoff, B. Grigaliunaite, Y. Sato & S. Takamatsu. 2000. Evolutionary analysis of subsection *Magnicellulatae* of *Podosphaera* section *Sphaerotheca* (Erysiphales) based on the rDNA internal transcribed spacer sequences with special reference to host plants. *Canadian Journal of Botany* 78: 1521-1530
- Hübschen, J., L. Kling, U. Ipach, V. Zinkernagel, N. Bosselut, D. Esmenjaud, D. J. F. Brown & R. Neilson. 2004. Validation of the specificity and sensitivity of species-specific primers that provide a reliable molecular diagnostic for *Xiphinema diversicaudatum*, *X. index* and *X. vuittenezi*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 779-788
- Innis, M. A., D. H. Gelfand & J. J. Sninsky (eds.). 1999. *PCR Applications - Protocols for Functional Genomics*. Academic Press, San Diego
-

- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (eds.). 1990. PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego
- Janke, C., K. Peter & A. Hellwig. 1977. Über das Auftreten der Mehltaugattungen *Erysiphe* und *Sphaerotheca* an Gurken in der DDR. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz, Berlin 4: 263-269
- Jarvis, W. R., W. D. Gubler & G. G. Grove. 2002. Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems. In: Bélanger, R. R., W. R. Bushnell, A. J. Dik & T. L. W. Carver (eds.). The Powdery Mildews - A Comprehensive Treatise. APS Press, St. Paul, Minnesota, S. 169-199
- Jobes, D. V. & L. B. Thien. 1997. A conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. Plant Molecular Biology Reporter 15: 326-334
- Kenyon, D. M., G. R. Dixon & S. Helfer. 2002. Effects of relative humidity, light intensity and photoperiod on the colony development of *Erysiphe* sp. on *Rhododendron*. Plant Pathology 51: 103-108
- Khan, M. W. 1983. The identity of powdery mildew of cucurbits - a critical appraisal. Acta Botanica Indica 11: 97-126
- Khan, M. W. & A. M. Khan. 1970. Studies on the cucurbit powdery mildew I. Perithecial production in cucurbit powdery mildew in northern India. Indian Phytopathology 13: 497-502
- Kilian, E. M. 1990. Der Einfluss von Fungiziden auf die Rassendynamik des Gerstenmehltaus *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* Marchal. Dissertationsschrift. Tropeninstitut der Justus-Liebig-Universität Gießen
- Kristkova, E. & A. Lebeda. 1999. Powdery mildews on *Cucurbita* spp. in the Czech Republic. Acta Horticulturae 492: 377-382
- Kristkova, E., A. Lebeda & B. Sedlakova. 2004. Virulence of Czech cucurbit powdery mildew isolates on *Cucumis melo* genotypes MR-1 and PI 124112. Scientia Horticulturae 99: 257-265
- Kristkova, E., A. Lebeda, B. Sedlakova & M. Duchoslav. 2002. Distribution of cucurbit powdery mildew species in the Czech Republic. Plant Protection Science 38: 415-416
- Kusser, W., S. Javorschi & M. A. Gleeson. 2003. New technology for quantitative PCR. In: Dieffenbach, C. W. & G. S. Dveksler (eds.). PCR Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 199-209
- Lainson, R. A. & J. H. M. Thornley. 1982. A model for leaf expansion in cucumber. Annals of Botany 50: 407-425
- Lebeda, A. 1983. The genera and species spectrum of cucumber powdery mildew in Czechoslovakia. Phytopathologische Zeitschrift 108: 71-79
- Lebeda, A., B. Sedlakova & E. Kristkova. 2004. Distribution, harmfulness and pathogenic variability of cucurbit powdery mildew in the Czech Republic. Acta fytotechnica et zootechnica 7: 174-176
-

-
- Lee, H. K., J. P. Tewari & T. K. Turkington. 2002. Quantification of seedborne infection by *Rhynchosporium secalis* in barley using competitive PCR. *Plant Pathology* 51: 217-224
- Lemaire, J. M., M. Conus, P. Mas, M. Bardin, H. Ferriere & P. Nicot. 1998. Powdery mildew of cucurbitaceous crops: the epidemic cycle and the range of hosts. *Phytoma* 508: 34-37
- Liebig, H.-P. 1991. Cucurbitaceae (Kürbisgewächse). *In*: Krug, H. (ed.). *Gemüseproduktion*. Parey, Berlin und Hamburg, S. 394-417
- Ma, Z. & T. J. Michailides. 2007. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 26: 145-161
- Martin, F. N., P. W. Tooley & C. Blomquist. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* 94: 621-631
- Martin, R. 1996. *Elektrophorese von Nucleinsäuren*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Martinez-Culebras, P. V., P. Abad-campos & J. García-Jiménez. 2004. Molecular characterization and PCR detection of the melon pathogen *Acremonium cucurbitacearum*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 801-809
- Matsuda, S. & S. Takamatsu. 2003. Evolution of host-parasite relationships of *Golovinomyces* (Ascomycete: Erysiphaceae) inferred from nuclear rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 314-327
- Matsuda, Y., T. Sameshima, N. Moriura, K. Inoue, T. Nonomura, K. Kakutani, H. Nishimura, S. Kusakari, S. Takamatsu & H. Toyoda. 2005. Identification of individual powdery mildew fungi infecting leaves and direct detection of gene expression by single conidium polymerase chain reaction. *Phytopathology* 95: 1137-1143
- McCreight, J. D. 2006. Melon powdery mildew interactions reveal variation in melon cultigens and *Podosphaera xanthii* Races 1 and 2. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131: 59-65
- McCulloch, R. K., C. S. Choong & D. M. Hurley. 1995. An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods and Applications* 4: 219-226
- Menzel, W., W. Jelkmann & E. Maiss. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99: 81-92
- Meyer, E. 1976. Versuchsanlage zur getrennten Kultur von Isolaten des Echten Mehltaus auf Gurken. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 28: 57
- Miller, T. C., W. D. Gubler, S. Geng & D. M. Rizzo. 2003. Effects of temperature and water vapor pressure on conidial germination and lesion expansion of *Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*. *Plant Disease* 87: 484-492
-

- Mmbaga, M. T., N. B. Klopfenstein, M.-S. Kim & N. C. Mmbaga. 2004. PCR-based identification of *Erysiphe pulchra* and *Phyllactinia guttata* from *Cornus florida* using ITS-specific primers. *Forest Pathology* 34: 321-328
- Möller, E. M., G. Bahnweg, H. Sandermann & H. H. Geiger. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20: 6115-6116
- Molot, P. M. & H. Lecoq. 1986. Powdery mildews of cucurbits. 1. Bibliographical review and preliminary experimental results. *Agronomie* 6: 355-362
- Mori, Y., Y. Sato & S. Takamatsu. 2000. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* 92: 74-93
- Morishita, M., K. Sugiyama, T. Saito & Y. Sakata. 2002. An improved evaluation method for screening and selecting powdery mildew resistant cultivars and lines of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 71: 94-100
- Morishita, M., K. Sugiyama, T. Saito & Y. Sakata. 2003. Powdery mildew resistance in cucumber. *JARQ* 37: 7-14
- Moriura, N., Y. Matsuda, W. Oichi, S. Nakashima, T. Hirai, T. Nonomura, K. Kakutani, S. Kusakari, K. Higashi & H. Toyoda. 2006. An apparatus for collecting total conidia of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* from leaf colonies using electrostatic attraction. *Plant Pathology* 55: 367-374
- Müller, H. J. 2001. PCR - Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Munger, H. M. 1979. The influence of temperature on powdery mildew resistance in cucumber. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 2: 9-10
- Mutasa, E. S., D. M. Chwarszczynska, M. J. Adams, E. Ward & M. J. C. Asher. 1995. Development of PCR for the detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots and its application in field studies. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 303-313
- Nagy, G. S. 1970. Die Identifizierung des Mehltaus der Kürbisgewächse auf Grund der Konidienmerkmale. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 2-4: 231-248
- Nagy, G. S. 1973. Powdery mildews of cucurbitaceous plants I. Morphology of cleistothecia of *Erysiphe cichoracearum* and of *Sphaerotheca fuliginea*. *Növényvédelem*: 481-484
- Nagy, G. S. 1975. Revision of the powdery mildew species *Erysiphe polyphaga* Hamm. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 10: 377-388
- Newton, M. R., A. S. Wright, L. L. Kinkel & K. J. Leonard. 1999. Competition alters temporal dynamics of sporulation in the wheat stem rust fungus. *Journal of Phytopathology* 147: 527-534
-

- Nicholson, P., D. R. Simpson, G. Weston, H. N. Rezanoor, A. K. Lees, D. W. Parry & D. Joyce. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53: 17-37
- Nicholson, P., A. S. Turner, S. G. Edwards, G. L. Bateman, L. W. Morgan, D. W. Parry, J. Marshall & M. Nuttall. 2002. Development of stem-base pathogens on different cultivars of winter wheat determined by quantitative PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108: 163-177
- Nicot, P. C., M. Bardin & A. J. Dik. 2002. Basic methods for epidemiological studies of powdery mildews: culture and preservation of isolates, production and delivery of inoculum, and disease assessment. *In*: Bélanger, R. R., W. R. Bushnell, A. J. Dik & T. L. W. Carver (eds.). *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul, Minnesota, S. 83-99
- O'Brien, R. G. & M. Weinert. 1994. A storage technique for cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*). *Australasian Plant Pathology* 23: 86-87
- O'Hara, R. B. & J. K. M. Brown. 1996. Frequency- and density-dependent selection in wheat powdery mildew. *Heredity* 77: 439-447
- O'Hara, R. B., B. J. Nielsen & H. Østergård. 2000. The effect of fungicide dose on the composition of laboratory populations of barley powdery mildew. *Plant Pathology* 49: 558-566
- Pastrik, K.-H. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology* 106: 155-165
- Pastrik, K.-H., J. G. Elphinstone & R. Pukall. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108: 831-842
- Paterson, R. R. M. 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry* 41: 1467-1474
- Paterson, R. R. M. 2007. Internal amplification controls have not been employed in fungal PCR hence potential false negative results. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1-10
- Perez-Garcia, A., E. Mingorance, M. E. Rivera, D. del Pino, D. Romero, J. A. Tores & A. de Vicente. 2006. Long-term preservation of *Podosphaera fusca* using silica gel. *Journal of Phytopathology* 154: 190-192
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet & T. P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26: 509-515
- Piatak, M., K. C. Luk, B. Williams & J. D. Lifson. 1993. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *BioTechniques* 14: 70-81
-

- Raeymaekers, L. 1995. A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Research* 5: 91-95
- Ratna Hadi, B. A. 2005. Interactions Between two Powdery Mildew Pathogens (*Podosphaera xanthii* & *Golovinomyces orontii*) on cucumber. MSc-Arbeit. Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Leibniz-Universität Hannover
- Reuveni, R., Y. Cohen & J. Rotem. 1971. Sporulation of *Erysiphe cichoracearum* as influenced by conditions favouring photosynthesis in the host. *Israel Journal of Botany* 20: 78-83
- Reuveni, R. & J. Rotem. 1974. Effect of humidity on epidemiological patterns of the powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on squash. *Phytoparasitica* 2: 25-33
- Robbins, N. S. & D. M. Pharr. 1987. Leaf area prediction models for cucumber from linear measurements. *HortScience* 22: 1264-1266
- Rohel, E. A., P. Laurent, B. A. Fraaije, N. Cavelier & D. W. Hollomon. 2002. Quantitative PCR monitoring of the effect of azoxystrobin treatments on *Mycosphaerella graminicola* epidemics in the field. *Pest Management Science* 58: 248-254
- Saenz, G. S. & J. W. Taylor. 1999. Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 77: 150-168
- Saenz, G. S., J. W. Taylor & A. Gargas. 1994. 18S rRNA gene sequences and supraordinal classification of the Erysiphales. *Mycologia* 86: 212-216
- Sambrook, J. & D. W. Russel. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schepers, H. T. A. M. 1984. A pattern in the appearance of cucumber powdery mildew in dutch greenhouses. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 90: 247-256
- Schilling, A. G., E. M. Möller & H. H. Geiger. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86: 515-522
- Schlösser, E. 1976a. Differenzierung zwischen Konidien der beiden Arten des Cucurbitaceen-Mehltaus, *Sphaerotheca fuliginea* und *Erysiphe cichoracearum*. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 28: 65-67
- Schlösser, E. 1976b. Vorkommen und Verbreitung der beiden Arten des Gurkenmehltaus, *Sphaerotheca fuliginea* und *Erysiphe cichoracearum*, in der Bundesrepublik Deutschland. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent* 41: 539-544
- Schlösser, E. 1979. Anfälligkeit von Gurkensorten gegenüber den beiden Erregern des Gurkenmehltaus, *Erysiphe cichoracearum* D.C.ex Merat und *Sphaerotheca fuliginea* Schl.ex F. *Gartenbauwissenschaft* 44: 217-219
- Schmitt, J. A. 1955. The host specialization of *Erysiphe cichoracearum* from zinnia, phlox and cucurbits. *Mycologia* 47: 688-701
-

-
- Schroeder, K. L., P. A. Okubara, J. T. Tambong, C. A. vesque & T. C. Paulitz. 2006. Identification and quantification of pathogenic *Pythium* spp. from soils in eastern Washington using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 96: 637-647
- Serth, J., F. Panitz, H. Herrmann & J. Alves. 1998. Single-tube nested competitive PCR with homologous competitor for quantitation of DNA target sequences: theoretical description of heteroduplex formation, evaluation of sensitivity, precision and linear range of the method. *Nucleic Acids Research* 26: 4401-4408
- Shi, A. & M. T. Mmbaga. 2006. Perpetuation of powdery mildew infection and identification of *Erysiphe australiana* as the crape myrtle pathogen in mid-Tennessee. *Plant Disease* 90: 1098-1101
- Shin, H. D. 1992. Change in size measurements of powdery mildew conidia in relation to air temperature. *Korean Journal of Mycology* 20: 309-314
- Siebert, P. D. & J. W. Larrick. 1993. Competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *BioTechniques* 14: 244-249
- Simpson, D. R., H. N. Rezanoor, D. W. Parry & P. Nicholson. 2000. Evidence for differential host preference in *Microdochium nivale* var. *majus* and *Microdochium nivale* var. *nivale*. *Plant Pathology* 49: 261-268
- Simpson, D. R., G. E. Weston, J. A. Turner, P. Jennings & P. Nicholson. 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* 107: 421-431
- Sitterly, W. R. 1978. Powdery Mildews of Cucurbits. *In*: Spencer, D. M. (ed.). *The Powdery Mildews*. Academic Press, London und New York, S. 359-379
- Stähle, U. 1986. Investigations on the influence of inoculum density on the fitness of races of barley powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC. f. Sp. hordei Marchal). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 93: 172-176
- Stähle, U., J. Kranz & B. Hau. 1984. Investigations on the competitive ability of a simple and a complex pathotype of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 91: 543-548
- Staub, T., H. Dahmen & F. J. Schwinn. 1973. Light and scanning electron microscopy of cucumber and barley powdery mildew on host and nonhost plants. *Phytopathology* 64: 364-372
- Stummer, B. E., T. Zanker, P. R. Harvey & E. S. Scott. 2006. Detection and quantification of *Erysiphe necator* DNA in wine grapes and resultant must and juice. *Mycological Research* 110: 1184-1192
- Stummer, B. E., T. Zanker & E. S. Scott. 1999. Cryopreservation of air-dried conidia of *Uncinula necator*. *Australasian Plant Pathology* 28: 82-84
- Sykes, P. J., S. H. Neoh, M. J. Brisco, E. Hughes, J. Condon & A. A. Morley. 1992. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques* 13: 444-449
-

- Szibor, M. & H. Morawietz. 2002. Serial competitive RT-PCR using multiple standards. *BioTechniques* 33: 744-748
- Takamatsu, S. 2004. Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Erysiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycoscience* 45: 147-157
- Takamatsu, S., T. Hirata & Y. Sato. 1998. Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). *Mycoscience* 39: 441-453
- Takamatsu, S. & Y. Kano. 2001. PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. *Mycoscience* 42: 135-139
- Temmen, K. H., W. Gruppe & E. Schlösser. 1980. Investigations on the resistance of plants to powdery mildew IV. Basis for horizontal resistance of cucumber cv. against *Sphaerotheca fuliginea*. Eucarpia Meeting - Breeding of cucumbers and melons 16-22
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882
- Tichopad, A., A. Didier & M. W. Pfaffl. 2004. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Molecular and Cellular Probes* 18: 45-50.
- Ulbrich, A. & S. E. Smolka. 1994. Erste Funde von Kleistothezien der beiden Echten-Mehltau-Arten *Sphaerotheca fuliginea* und *Erysiphe cichoracearum* an Gewächshausgurken (*Cucumis sativus*) in Deutschland. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 46: 154-159
- Ullmann, A. 1967. Characterisation by *in-vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase gene of *E. coli*. *Journal of Molecular Biology* 24: 339
- Vági, P., G. M. Kovács & L. Kiss. 2007. Host range expansion in a powdery mildew fungus (*Golovinomyces* sp.) infecting *Arabidopsis thaliana*: *Torenia fournieri* as a new host. *European Journal of Plant Pathology* 117: 89-93
- Vakalounakis, D. J. & E. Klironomou. 1995. Race and mating type identification of powdery mildew on cucurbits in Greece. *Plant Pathology* 44: 1033-1038
- Vakalounakis, D. J. & E. Klironomou. 2001. Taxonomy of *Golovinomyces* on cucurbits. *Mycotaxon* 80: 489-491
- Vakalounakis, D. J., E. Klironomou & A. Papadakis. 1994. Species spectrum, host range and distribution of powdery mildews on Cucurbitaceae in Crete. *Plant Pathology* 43: 813-818.
- Valsesia, G., D. Gobbin, A. Patocchi, A. Vecchione, I. Pertot & C. Gessler. 2005. Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 95: 672-678
-

- Vogel, G. 1996. Cucurbitaceae, Kürbisgewächse. *In*: Vogel, G. (ed.). Handbuch des speziellen Gemüsebaus. Ulmer, Stuttgart, S. 436-545
- Volkenandt, M., A. P. Dicker, D. Banerjee, R. Fanin, B. Schweitzer, T. Horikoshi, K. Danenberg, P. Danenberg & J. R. Bertino. 1992. Quantitation of gene copy number and mRNA using the polymerase chain reaction. *Proceedings of the society of experimental biology and medicine* 200: 1-6
- Walsh, P. S., D. A. Metzger & R. Higushi. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513
- Wang, A. M. & D. F. Mark. 1990. Quantitative PCR. *In*: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, S. 70-75
- Wang, P. H., Y. T. Wang & J. G. White. 2003. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. *Letters in Applied Microbiology* 37: 127-132
- Wang, Z., M. Binder, C. L. Schoch, P. R. Johnston, J. W. Spatafora & D. S. Hibbett. 2006. Evolution of helotialean fungi (Leotiomycetes, Pezizomycotina): A nuclear rDNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 295-312
- Watzinger, F. & T. Lion. 2003. Approaches to quantification of RNA targets by PCR based techniques. *Current Genomics* 4: 185-204
- Watzinger, F., E. Horth & T. Lion. 2001. Quantification of mRNA expression by competitive PCR using non-homologous competitors containing a shifted restriction site. *Nucleic Acids Research* 29: e52
- Webster, J. 1983. *Pilze - Eine Einführung*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Weiner, M. P. & G. L. Costa. 2003. PCR Rapid PCR site-directed mutagenesis. *In*: Dieffenbach, C. W. & G. S. Dveksler (eds.). *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 459-465
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London, S. 315-322
- Wiedbrauk, D. L., J. C. Werner & A. M. Drevon. 1995. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2643-2646
- Wiesner, R. J. 1992. Direct quantification of picomolar concentrations of mRNAs by mathematical analysis of a reverse transcription/exponential polymerase chain reaction assay. *Nucleic Acids Research* 20: 5863-5864
- Wiesner, R. J., J. C. Ruegg & I. Morano. 1992. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183: 553-559
-

- Wilhelm, J. 2003. Entwicklung real-time-PCR-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik. Dissertationsschrift. Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Willis, E. H., E. R. Mardis, W. L. Jones & M. C. Little. 1990. Prep-A-Gene: A superior matrix for the purification of DNA and DNA fragments. *BioTechniques* 9: 92-97
- Willoquet, L., F. Berud, L. Raoux & M. Clerjeau. 1998. Effects of wind, relative humidity, leaf movement and colony age on dispersal of conidia of *Uncinula necator*, causal agent of grape powdery mildew. *Plant Pathology* 47: 234-242
- Willoquet, L. & M. Clerjeau. 1998. An analysis of the effects of environmental factors on conidial dispersal of *Uncinula necator* (grape powdery mildew) in vineyards. *Plant Pathology* 47: 227-233
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3741-3751.
- Xu, S., M. Green, L. Kingsley, S. Webber & D. Rowe. 2006. A comparison of quantitative-competitive and realtime PCR assays using an identical target sequence to detect Epstein-Barr virus viral load in the peripheral blood. *Journal of Virological Methods* 137: 205-212
- Zaracovitis, C. 1965. Attempts to identify powdery mildew fungi by conidial characters. *Transactions of the British Mycological Society* 48: 553-558
- Zeller, K. A. & M. Levy. 1995. Intraspecies differentiation in the powdery mildew *Erysiphe cichoracearum* determined with rDNA RFLPs. *Molecular Ecology* 4: 277-283
- Zeng, Q. Y., P. Hansson & X. R. Wang. 2005. Specific and sensitive detection of the conifer pathogen *Gremmeniella abietina* by nested PCR. *BMC Microbiology* 5: 65
- Zheng, R. Y. & G. Q. Chen. 1981. The genus *Erysiphe* in China. *Sydowia* : 214-327
- Zimmermann, K. & J. W. Mannhalter. 1996. Technical aspects of quantitative competitive PCR. *BioTechniques* 21: 268-279
-

7 ANHANG

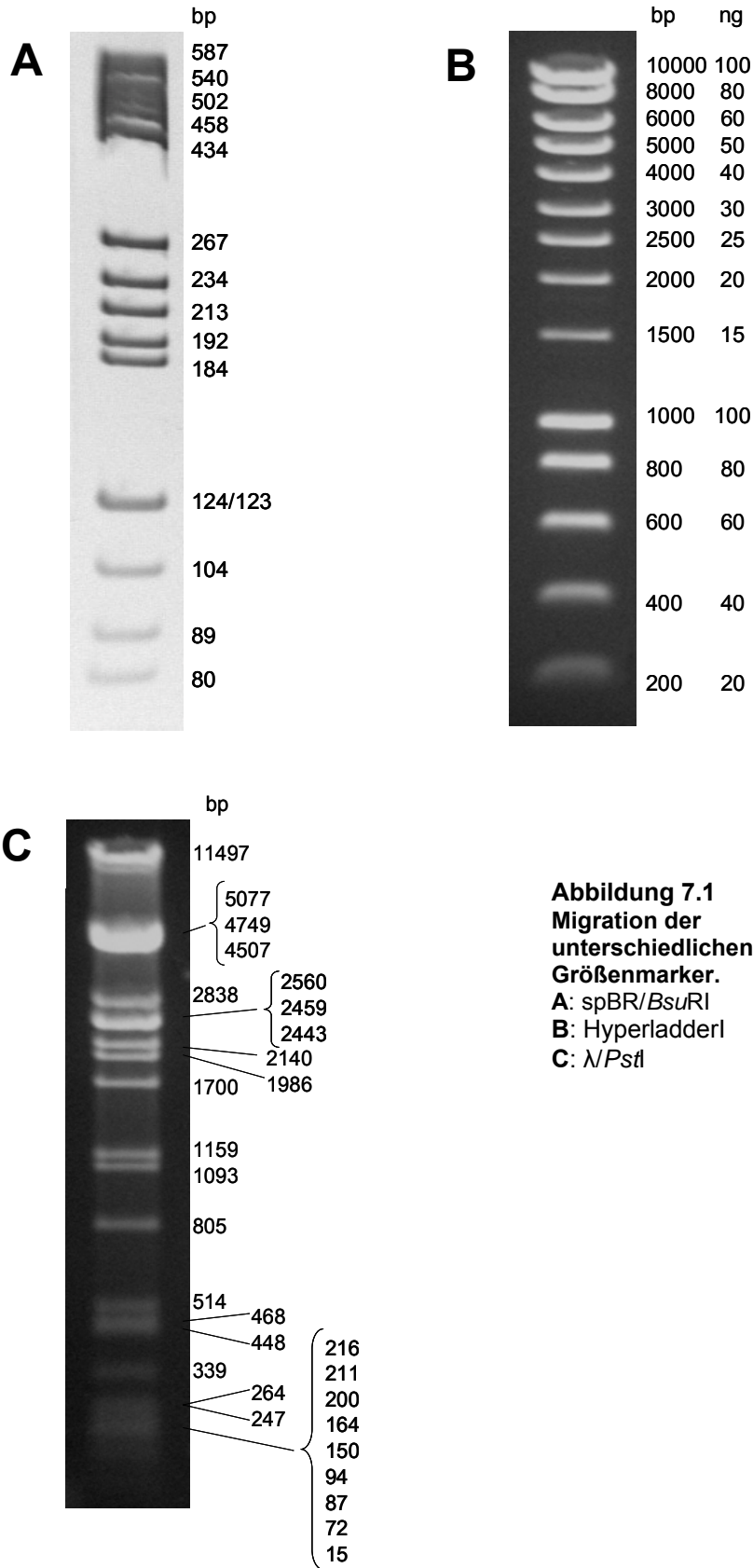


Abbildung 7.1
Migration der
unterschiedlichen
Größenmarker.
A: spBR/*Bsu*RI
B: HyperladderI
C: λ /*Pst*I

A

1 GTGTCCGCCA ^{Go1s} AAGACCCAAC CTAATTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
 51 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
 101 AACAAATAGG GGTTC ^{Hin6I} GCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGATGCG
 151 GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG ^{Go2a} AAAATACTTG GTATTCCGAG
 201 GGGCATG

B

1 AACTCGTGCT ^{Px1s} GTGAGTGTG TCTGAGAGCC CCCGATTTAG AGCTTGACGG
 51 GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGAAAGAAAG CGAAAGGAGC
 101 GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA
 151 CACCCGCCGC GCTTAATGCG CCGCTACAGG GCGCGTCCAT TC ^{BglI} GCCATTCA
 201 GGCTGCGCAA CTGTTGGGAA GGGCGATCGG TCGGGGCCTC TTCGCTATTA
 251 CGCCAGCTGG CGAAAGGGGG ATGTGCTCTC ^{Px2a} CGCGTAGTCA TGTAT

Abbildung 7.2 Sequenzen der heterologen Kompetitoren.

A: *G. orontii* mit den Primern Go1s und Go2a und der Restriktionsschnittstelle *Hin6I*.

B: *P. xanthii* mit den Primern Px1s und Px2a und der Restriktionsschnittstelle *BglI*.

ZS	1	GTGTCCGCCA	^{Go1s} AAGACCCAAC	CTAACTCGTG	TTGTCGTGTA	GTCTGAGGAA
KS	1
ZS	51	GAAATATTGA	ATTGTTAAAA	CTTTCAACAA	CGGATCTCTT	GGCTCTGGCA
KS	51GCGC..... <i>Hin6I</i>
ZS	101	TCGATGAAGA	ACGCAGCGAA	ATGCGATAAG	TAATGTGAAT	TGCAGAATTT
KS	101
ZS	151	AGTGAATCAT	CGAATCTTTG	AACGCACATT	^{Hin6I} GCGCCCTTG	GTATTCCGAG
KS	151C.....
ZS	201	GGGCATGCCT	GTTCGAGCGT	^{Go4a} CGTCACACCC	CCTCAAGCCG	C
KS	201

Abbildung 7.3 Sequenz des homologen Kompetitors von *G. orontii* im Vergleich zur Zielsequenz. Punkte zeigen gleiche Nukleotide mit der oberen Sequenz. Eingezeichnet sind die Primer Go1s und Go4a, sowie die beiden Restriktionsschnittstellen von *Hin6I*.

```

                Px1s
ZS 1   AACTCGTGCT GTGAGTGTTG TCTGAGGAAA TGTGGAATTA GTAAACTTT
KS 1   .....

ZS 51  CAACAACGGA TCTCTTGGCT CTGGCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAATGC
KS 51  .....

ZS 101 GATAAGTAAT GTGAATTGCA GAATTTAGTG AATCATCGAA TCTTTGAACG
KS 101 .....

ZS 151 CACATTGCGC CCCCCGGCAT TCCGAGGGGC ATGCCTGTTC GAGCGTCAGA
KS 151 .....GC CCCCCGGGC.....

ZS 201 ACACCCCTCA Bgl AGCCTAGCTT GGTCTTGGGG CTCGCCGGCT Bgl CGGCGGCCCC
KS 201 ..... ..C.....

ZS 251 TAAACGCAGT GCGGTGCTG GTGTGCTCTC Px2a CGCGTAGTCA TGTAT
KS 251 .....

```

Abbildung 7.4 Sequenz des homologen Kompetitors von *P. xanthii* im Vergleich zur Zielsequenz.

Punkte zeigen gleiche Nukleotide mit der oberen Sequenz. Eingezeichnet sind die Primer Px1s und Px2a, sowie die beiden Restriktionsschnittstellen von *Bgl*.

Tabelle 7.1 Statistische Werte der DNA-Gehalte und Blattflächen der einzelnen Blattstufen bei 24 Tage alten Gurkenpflanzen. Blatt 1: ältestes Blatt bis Blatt 6: jüngstes Blatt

		N	Median	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standard- abweichung
1	DNA (µg/100 mg FM)	11	1,23	1,29	,87	2,06	,32
	Blattfläche (cm ²)	11	90,22	97,05	62,45	139,73	24,37
2	DNA (µg/100 mg FM)	8	1,42	1,46	1,28	1,71	,18
	Blattfläche (cm ²)	10	153,13	155,59	106,02	211,70	31,63
3	DNA (µg/100 mg FM)	11	1,64	1,75	1,29	2,84	,44
	Blattfläche (cm ²)	11	140,97	163,43	90,73	235,39	45,67
4	DNA (µg/100 mg FM)	8	1,99	2,33	1,43	3,46	,78
	Blattfläche (cm ²)	8	89,14	81,62	32,62	109,25	26,17
5	DNA (µg/100 mg FM)	10	2,59	2,83	2,19	4,49	,69
	Blattfläche (cm ²)	11	11,61	13,04	2,45	29,85	7,52
6	DNA (µg/100 mg FM)	3	4,82	4,27	2,36	5,65	1,71
	Blattfläche (cm ²)	3	3,73	5,32	3,41	8,83	3,04

Tabelle 7.2 Ränge des Kruskal-Wallis-Tests des DNA-Gehalts der einzelnen Blattstufen.

	Blatt	N	Mittlerer Rang
DNA ($\mu\text{g}/100 \text{ mg FM}$)	1	11	9,18
	2	8	16,00
	3	11	21,45
	Total	30	

Tabelle 7.3 Teststatistik des Kruskal-Wallis-Tests zwischen dem DNA-Gehalt der Blätter 1 bis 3.

DNA ($\mu\text{g}/100 \text{ mg FM}$)	
Chi-Square	10,724
df	2
Asymp. Sig.	,005

Tabelle 7.4 Multipler Mittelwertvergleich des DNA-Gehalts der Blätter 1 bis 3 nach Scheffé.

Abhängige Variable: DNA ($\mu\text{g}/100 \text{ mg FM}$)
Scheffé

(I) Blatt	(J) Blatt	Mittlere Differenz (I-J)	Std. Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
					Untere Grenze	Obere Grenze
1	2	-,16313	,15983	,600	-,5771	,2508
	3	-,45700*	,14667	,016	-,8369	-,0771
2	1	,16313	,15983	,600	-,2508	,5771
	3	-,29387	,15983	,203	-,7078	,1201
3	1	,45700*	,14667	,016	,0771	,8369
	2	,29387	,15983	,203	-,1201	,7078

*Die mittlere Differenz ist signifikant zum 0,05-Niveau.

Tabelle 7.5 Statistische Daten der *P. xanthii*-Einzelvariante. Angegeben sind die Befallsstärke (%) sowie der *P. xanthii*-DNA-Gehalt der einzelnen Blätter an den drei Boniturterminen bezogen auf die Gesamt-DNA (%) und auf die Blattfläche (ng/cm²).

		N	Gültige N	Median	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standard- abweichung	
7 DAI	Blatt 1	Befallsstärke (%)	6	6	,71	,69	,20	1,35	,40
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	6	,22	,28	,16	,55	,14
		DNA (ng/cm ²)	6	6	,94	1,18	,71	2,38	,63
	Blatt 2	Befallsstärke (%)	6	6	,37	,55	,10	1,14	,46
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	6	,28	,43	,09	1,28	,44
		DNA (ng/cm ²)	6	6	1,02	1,45	,42	3,59	1,22
	Blatt 3	Befallsstärke (%)	6	6	,43	,51	,02	1,36	,49
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	4	,11	,54	,08	1,83	,87
		DNA (ng/cm ²)	6	4	,69	2,41	,35	7,92	3,67
14 DAI	Blatt 1	Befallsstärke (%)	6	6	16,06	16,02	8,91	23,86	5,44
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	6	8,01	8,61	2,53	15,34	4,47
		DNA (ng/cm ²)	6	6	35,68	45,33	8,26	111,83	35,97
	Blatt 2	Befallsstärke (%)	6	6	9,64	9,74	7,00	13,47	2,20
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	6	4,07	4,90	1,45	13,17	4,27
		DNA (ng/cm ²)	6	6	14,72	20,39	4,22	60,87	20,74
	Blatt 3	Befallsstärke (%)	6	6	13,59	10,84	1,22	15,57	6,08
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	6	4,97	5,16	,79	10,14	4,11
		DNA (ng/cm ²)	6	6	16,63	20,08	2,81	45,72	17,16
	Blatt 4	Befallsstärke (%)	6	6	,00	,66	,00	2,79	1,14
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	6	,16	,14	,01	,35	,12
		DNA (ng/cm ²)	6	6	,52	,49	,07	1,10	,38
21 DAI	Blatt 1	Befallsstärke (%)	6	4	31,59	32,42	13,83	52,67	16,01
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	2	11,30	11,30	10,03	12,56	1,79
		DNA (ng/cm ²)	6	2	58,69	58,69	35,40	81,97	32,93
	Blatt 2	Befallsstärke (%)	6	6	25,98	25,96	18,32	31,68	4,98
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	6	14,40	16,76	11,58	27,27	6,12
		DNA (ng/cm ²)	6	6	65,40	68,19	47,15	95,75	17,07
	Blatt 3	Befallsstärke (%)	6	6	22,83	28,66	16,60	54,80	14,67
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	6	14,57	15,66	6,07	29,20	8,89
		DNA (ng/cm ²)	6	6	80,24	82,73	19,97	149,43	53,98
	Blatt 4	Befallsstärke (%)	6	6	1,60	2,49	,00	9,34	3,45
		DNA (% von Gesamt-DNA)	6	6	,68	,63	,08	1,29	,47
		DNA (ng/cm ²)	6	6	3,05	2,56	,22	4,87	1,91

Tabelle 7.6 Statistische Daten der *G. orontii*-Einzelvariante. Angegeben sind die Befallsstärke (%) sowie der *G. orontii*-DNA-Gehalt der einzelnen Blätter an den drei Boniturterminen bezogen auf die Gesamt-DNA (%) und auf die Blattfläche (ng/cm²).

		N	Gültige N	Median	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standard- abweichung	
7 DAI	Blatt 1	Befallsstärke (%)	4	4	,17	,20	,12	,32	,10
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	3	,08	,07	,05	,08	,02
		DNA (ng/cm ²)	4	3	,15	,15	,13	,17	,02
	Blatt 2	Befallsstärke (%)	4	4	,11	,15	,08	,30	,10
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	2	,04	,04	,03	,04	,01
		DNA (ng/cm ²)	4	2	,08	,08	,06	,10	,03
	Blatt 3	Befallsstärke (%)	4	4	,31	,28	,00	,49	,23
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	2	,08	,08	,07	,09	,01
		DNA (ng/cm ²)	4	2	,20	,20	,19	,20	,01
14 DAI	Blatt 1	Befallsstärke (%)	4	4	2,72	2,62	1,36	3,69	1,06
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	4	1,10	1,07	,24	1,84	,75
		DNA (ng/cm ²)	4	4	2,47	2,35	,79	3,66	1,37
	Blatt 2	Befallsstärke (%)	4	4	1,85	1,96	,95	3,17	,93
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	4	,82	,98	,47	1,80	,58
		DNA (ng/cm ²)	4	4	1,26	1,85	,89	4,00	1,45
	Blatt 3	Befallsstärke (%)	4	4	2,22	1,97	,71	2,76	,88
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	4	,79	,79	,32	1,26	,38
		DNA (ng/cm ²)	4	4	1,69	1,73	,76	2,75	,82
	Blatt 4	Befallsstärke (%)	4	4	,00	,00	,00	,00	,00
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	2	,02	,02	,01	,02	,00
		DNA (ng/cm ²)	4	2	,05	,05	,04	,05	,01
21 DAI	Blatt 1	Befallsstärke (%)	4	2	10,05	10,05	8,66	11,45	1,97
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	2	2,90	2,90	2,45	3,36	,64
		DNA (ng/cm ²)	4	2	7,21	7,21	6,35	8,06	1,21
	Blatt 2	Befallsstärke (%)	4	4	9,83	10,99	5,46	18,84	5,63
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	4	3,00	3,71	1,89	6,95	2,22
		DNA (ng/cm ²)	4	4	6,41	9,68	4,53	21,38	7,92
	Blatt 3	Befallsstärke (%)	4	4	4,12	6,06	2,48	13,50	5,04
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	4	1,62	1,97	,51	4,12	1,60
		DNA (ng/cm ²)	4	4	3,76	4,70	1,46	9,82	3,66
	Blatt 4	Befallsstärke (%)	4	4	,00	,02	,00	,10	,05
		DNA (% von Gesamt-DNA)	4	4	,08	,10	,07	,17	,05
		DNA (ng/cm ²)	4	4	,25	,27	,17	,42	,11

Tabelle 7.7 Ränge der Kruskal-Wallis-Tests der Pilz-DNA-Gehalte der Blätter 1 bis 3 zu den einzelnen Boniturterminen bei den Varianten *P. xanthii* und *G. orontii*.

Versuch	DAI	Blatt	N	Mittlerer Rang	
<i>P. xanthii</i>	7	1	6	9,00	
		2	6	9,67	
		3	4	6,00	
			Total	16	
	14	DNA (% von Gesamt-DNA)	1	6	12,50
			2	6	7,83
			3	6	8,17
		Total	18		
<i>G. orontii</i>	14	1	4	6,75	
		2	4	6,75	
		3	4	6,00	
			Total	12	

Tabelle 7.8 Test-Statistik der Kruskal-Wallis-Tests zum Einfluss des Faktors Blatt auf den Pilz-DNA-Gehalt zu den einzelnen Boniturterminen in den Varianten *P. xanthii* und *G. orontii*.

Versuch	DAI	DNA (% von Gesamt-DNA)	
<i>P. xanthii</i>	7	Chi-Square	1,529
		df	2
		Asymp. Sig.	,465
	14	Chi-Square	2,854
		df	2
		Asymp. Sig.	,240
<i>G. orontii</i>	14	Chi-Square	,115
		df	2
		Asymp. Sig.	,944

Tabelle 7.9 Ränge und Rangsummen der U-Tests nach Mann-Whitney der Pilz-DNA-Gehalte in den Blättern 2 und 3 zum Zeitpunkt 21 DAI bei den Einzelvarianten *P. xanthii* und *G. orontii*.

Versuch	DAI		Blatt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
<i>P. xanthii</i>	21	DNA (% von Gesamt-DNA)	2	6	6,67	40,00
			3	6	6,33	38,00
			Total	12		
<i>G. orontii</i>	21	DNA (% von Gesamt-DNA)	2	4	5,50	22,00
			3	4	3,50	14,00
			Total	8		

Tabelle 7.10 Teststatistiken der U-Tests zum Einfluss des Faktors Blatt zum Zeit 21 DAI in den Einzelvarianten *P. xanthii* und *G. orontii* zwischen den Blättern 2 und 3.

Versuch	DAI		DNA (% von Gesamt-DNA)
<i>P. xanthii</i>	21	Mann-Whitney U	17,000
		Wilcoxon W	38,000
		Z	-,160
		Asymp. Sig. (2-tailed)	,873
		Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,937 _a
		Mann-Whitney U	4,000
<i>G. orontii</i>	21	Wilcoxon W	14,000
		Z	-1,155
		Asymp. Sig. (2-tailed)	,248
		Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,343 _a

^a. Nicht korrigiert für Bindungen.

Tabelle 7.11 Statistische Daten der Mischvariante. *G. orontii*- und *P. xanthii*-DNA-Gehalt (% von korrigierter Gesamt-DNA, d.h. % von Gurken-DNA) der einzelnen Blätter an den drei Boniturterminen.

		Gültige N	Median	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standard- abweichung	
7 DAI	Blatt 1	<i>P. xanthii</i>	3	,05	,12	,02	,28	,15
		<i>G. orontii</i>	3	,02	,04	,01	,10	,05
	Blatt 2	<i>P. xanthii</i>	2	,10	,10	,03	,17	,09
		<i>G. orontii</i>	2	,03	,03	,02	,03	,00
	Blatt 3	<i>P. xanthii</i>	4	,28	,29	,04	,58	,23
		<i>G. orontii</i>	4	,05	,05	,02	,08	,03
14 DAI	Blatt 1	<i>P. xanthii</i>	4	3,02	3,07	,99	5,26	2,31
		<i>G. orontii</i>	4	,70	,91	,24	1,99	,78
	Blatt 2	<i>P. xanthii</i>	3	5,07	5,74	5,01	7,16	1,22
		<i>G. orontii</i>	3	1,06	1,23	,94	1,67	,39
	Blatt 3	<i>P. xanthii</i>	4	6,76	6,41	3,59	8,54	2,07
		<i>G. orontii</i>	4	1,28	1,69	,66	3,55	1,35
Blatt 4	<i>P. xanthii</i>	4	,03	,03	,02	,05	,02	
	<i>G. orontii</i>	4	,01	,01	,01	,02	,01	
21 DAI	Blatt 1	<i>P. xanthii</i>	4	7,09	10,55	2,57	25,46	10,17
		<i>G. orontii</i>	4	3,01	3,03	1,14	4,95	1,57
	Blatt 2	<i>P. xanthii</i>	4	15,27	15,06	9,88	19,83	4,09
		<i>G. orontii</i>	4	1,82	2,03	1,01	3,46	1,06
	Blatt 3	<i>P. xanthii</i>	3	8,42	14,36	4,61	30,05	13,72
		<i>G. orontii</i>	3	3,01	4,46	2,85	7,52	2,65
Blatt 4	<i>P. xanthii</i>	2	,82	,82	,19	1,45	,89	
	<i>G. orontii</i>	2	,08	,08	,08	,09	,01	

Tabelle 7.12
Ränge des Kruskal-Wallis-Tests der korrigierten Pilz-DNA-Gehalte (%) in den Blättern 1 bis 3 zu den drei Boniturterminen in der Mischvariante.

Pathogen	DAI	Blatt	N	Mittlerer Rang
P. xanthii	7	1	3	4,00
		2	2	3,50
		3	4	6,50
		Total	9	
	14	1	4	3,50
		2	3	7,00
		3	4	7,75
		Total	11	
	21	1	4	4,50
		2	4	7,50
		3	3	6,00
		Total	11	
G. orontii	7	1	3	4,00
		2	2	4,00
		3	4	6,25
		Total	9	
	14	1	4	4,75
		2	3	6,67
		3	4	6,75
		Total	11	
	21	1	4	6,00
		2	4	4,50
		3	3	8,00
		Total	11	

Tabelle 7.13
Teststatistik des Kruskal-Wallis-Tests der korrigierten Pilz-DNA-Gehalte (%) in den Blättern 1 bis 3 zu den drei Boniturterminen in der Mischvariante.

Pathogen	DAI	Chi-Square	df	Asymp. Sig.	korrigierter Pilz-DNA-Gehalt (%)
P. xanthii	7	2,200	2	,333	
		3,659	2	,160	
		1,636	2	,441	
	14	1,500	2	,472	
		,894	2	,640	
		1,909	2	,385	
	21				

Tabelle 7.14 Mittelwerte der über die Blätter 1-3 gepoolten *G. orontii*-DNA-Gehalte in der Einzel- und in der Mischvariante.

DAI		Versuch	N	Mittel	Standardabweichung	Standardfehler des Mittels
7	Pilz-DNA-Gehalt (%)	G. orontii	7	,0635	,02315	,00875
		Mischung	9	,0434	,03075	,01025
14	Pilz-DNA-Gehalt (%)	G. orontii	14	,8121	,60624	,16202
		Mischung	15	,9425	,98458	,25422
21	Pilz-DNA-Gehalt (%)	G. orontii	14	2,0658	1,97398	,52757
		Mischung	13	2,7087	1,98375	,55019

Tabelle 7.15 Mittelwertvergleich (t-Test) der gepoolten *G. orontii*-DNA-Gehalte zwischen Einzel- und Mischvariante an den einzelnen Boniturterminen.

DAI			Levenes Test auf Gleichheit der Varianzen		t	df	Sig. (2-tailed)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
			F	Sig.						Unten	Oben
			7	Pilz-DNA-Gehalt (%)						Gleiche Varianzen angenommen	,832
Gleiche Varianzen nicht angenommen			1,49		13,997	,159	,02008	,01348	-,00883	,04898	
14	Pilz-DNA-Gehalt (%)	Gleiche Varianzen angenommen	1,665	,208	-,426	27	,674	-,13041	,30635	-,75899	,49817
		Gleiche Varianzen nicht angenommen			-,433	23,507	,669	-,13041	,30146	-,75329	,49247
21	Pilz-DNA-Gehalt (%)	Gleiche Varianzen angenommen	,099	,756	-,844	25	,407	-,64289	,76212	-,21249	,92672
		Gleiche Varianzen nicht angenommen			-,843	24,833	,407	-,64289	,76226	-,21333	,92755

Tabelle 7.16 Mittelwerte der über die Blätter 1-3 gepoolten *P. xanthii*-DNA-Gehalte in der Einzel- und in der Mischvariante.

DAI		Versuch	N	Mittel	Standardabweichung	Standardfehler des Mittels
7	Pilz-DNA-Gehalt (%)	<i>P. xanthii</i>	16	,4000	,48063	,12016
		Mischung	9	,1922	,18784	,06261
14	Pilz-DNA-Gehalt (%)	<i>P. xanthii</i>	24	4,7041	4,63175	,94545
		Mischung	15	3,6869	3,03880	,78461
21	Pilz-DNA-Gehalt (%)	<i>P. xanthii</i>	20	11,0444	9,06958	2,02802
		Mischung	13	11,3213	9,32852	2,58727

Tabelle 7.17 Mittelwertvergleich (t-Test) der gepoolten *P. xanthii*-DNA-Gehalte zwischen Einzel- und Mischvariante an den einzelnen Boniturterminen.

DAI			Levenes-Test auf Gleichheit der Varianzen		t	df	Sig. (2-tailed)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
			F	Sig.						Untere	Obere
			7	Pilz-DNA-Gehalt (%)						Gleiche Varianzen angenommen	1,947
Gleiche Varianzen nicht angenommen			1,53		21,307	,140	,20785	,13549	-,07368	,48938	
14	Pilz-DNA-Gehalt (%)	Gleiche Varianzen angenommen	3,305	,077	,753	37	,456	1,01723	1,35027	-,171867	3,75314
		Gleiche Varianzen nicht angenommen			,828	36,864	,413	1,01723	1,22862	-,147249	3,50696
21	Pilz-DNA-Gehalt (%)	Gleiche Varianzen angenommen	,035	,853	-,085	31	,933	-,27683	3,26717	-,694027	6,38661
		Gleiche Varianzen nicht angenommen			-,084	25,255	,934	-,27683	3,28737	-,704383	6,49018

Tabelle 7.19 Ränge des Kruskal-Wallis-Test der relativierten Konidienanzahl von *G. orontii* zwischen den drei Boniturterminen.

	DAI	N	Mittlerer Rang
	7	5	17,20
Konidien	14	10	13,00
(%)	21	13	14,62
Total		28	

Tabelle 7.18 Teststatistik des Kruskal-Wallis-Tests der relativierten Konidienanzahl von *G. orontii* zwischen drei Boniturterminen.

Konidien (%)	
Chi-Square	,879
df	2
Asymp. Sig.	,645