

Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) der Nadelparasiten *Rhizosphaera* spp. und *Lophodermium* spp.

G. BAHNWEG*, H. SANDERMANN, Jr.

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,
Institut für Biochemische Pflanzenpathologie,
Postfach 1129, D-85758 Oberschleißheim

E. M. MÖLLER, A. G. SCHILLING

Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und
Populationsgenetik der Universität Hohenheim
D-70593 Stuttgart

Eingegangen am 4.12.1993

Bahnweg, G. et. al. (1994) – Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of the needle parasites *Rhizosphaera* spp. and *Lophodermium* spp. Z. Mykol. 60(1): 231–238.

Key Words: RFLP, rDNA, Southern hybridization, needle parasites, *Rhizosphaera*, *Lophodermium*

Summary: Total DNA of 20 isolates of *Rhizosphaera* and *Lophodermium* was prepared and subjected to restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Restriction enzymes used were BglII and BglIII in combination with XbaI, XhoI, BamHI, EcoRV, EcoRI or HindIII. The DNA probe was plasmid pMY60 carrying a rDNA repeat unit of *Saccharomyces carlsbergensis* suitable for heterologous hybridization. These restriction enzyme/probe combinations revealed highly polymorphic rDNA fragments among *Lophodermium* isolates. Fragment patterns of *Rhizosphaera* isolates were rather uniform and thus permitted only identification of the genus rather than of species or strains.

Zusammenfassung: Die Gesamt-DNA von 20 Isolatzen der Gattungen *Rhizosphaera* und *Lophodermium* wurde einer Restriktionsfragment-Längenpolymorphismusanalyse (RFLP) unterworfen. Die Restriktionsenzyme BglII und BglIII kombiniert mit XbaI, XhoI, BamHI, EcoRV, EcoRI oder HindIII wurden verwendet. DNA-Sonde war das Plasmid pMY60 mit einem vollständigen rDNA-Repeat der Hefe *Saccharomyces carlsbergensis*, welche eine heterologe Hybridisierung gestattet. Diese Enzym/Sonden-Kombinationen zeigten hochpolymorphe rDNA-Fragmente bei *Lophodermium*-Isolatzen. Die Fragmentmuster der *Rhizosphaera*-Isolate dagegen waren ähnlich und erlaubten lediglich die Identifizierung der Gattung.

Molekulare Methoden zur Bearbeitung allgemeiner taxonomischer Fragen wie spezieller Probleme erfreuen sich zunehmender Beliebtheit auch in der Pilzkunde. Der Zugriff auf die Erbsubstanz, die DNA (Desoxyribonukleinsäure), eines Organismus bietet den unschätzbaren Vorteil, daß ihre Charakteristika unabhängig sind von äußeren Einflüssen wie Wachstumsbedingungen, Ernährungszustand und Alter oder anderen Faktoren. Weiterhin besitzen alle Organe eines Pilzes (Hyphen, Rhizomorphen, Fruchtkörper) identisches Erbmaterial ebenso wie die imperfekten und perfekten Stadien von Ascomyceten oder Basi-

* Sonderdruckanforderungen an Dr. G. Bahnweg

diomyceten, so daß durch die Analyse der DNA einer beliebigen Probe eine Identifizierung erfolgen kann, ohne auf die Ausbildung von Strukturen angewiesen zu sein, die für eine makro- oder mikroskopische Bestimmung notwendig sind.

Von den verschiedenen Methoden der DNA-Analyse haben sich neben Sequenzierungsverfahren vor allem die RFLP-(Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)-Analyse und die Anwendung der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) in der Mykologie durchgesetzt. Die PCR-Methodik wird in dem Artikel von MÖLLER et al. (1994, dieses Heft) ausführlich erläutert. Der vorliegende Artikel beschränkt sich auf die RFLP-Analyse.

Wichtigstes Werkzeug der RFLP-Analyse sind Restriktionsendonucleasen (Restriktionsenzyme), die bestimmte Basensequenzen erkennen und DNA nur dann spalten, wenn ihre Erkennungssequenz in einer zu schneidenden DNA vorliegt. Restriktionsenzyme mit einer Erkennungssequenz von 6 Basenpaaren (bp) schneiden im statistischen Durchschnitt einmal pro 4096 bp – der größte Teil der gebildeten DNA-Fragmente ist zwischen 200 und 50 000 bp lang. Die durch Restriktionsenzyme produzierten DNA-Fragmente sind für eine DNA charakteristisch und können durch Agarose-Gelelektrophorese ihrer Länge entsprechend aufgetrennt werden. Mit Ethidiumbromid gefärbte DNA fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht rot und kann so sichtbar gemacht werden (Abb. 1.). Sauber getrennt und gemessen werden können in einer üblichen Agarose-Gelelektrophorese Fragmente von 500 bis 15 000 bp. Diskrete DNA-Banden beobachtet man aber nur dann, wenn die Gesamtgröße der untersuchten DNA (des Genoms) klein ist, also z. B. der DNA von Bakteriophagen (z. B. λ , Abb. 1, Bahn 2) oder von Mitochondrien (z. B. des pflanzenpathogenen Oomyceten *Phytophthora parasitica*, Abb. 1, Bahn 3). Der Phage λ hat eine Genomgröße von ca. 49 000 bp, die Mitochondrien von *P. parasitica* von ca. 36 000 bp. Das Pilzgenom ist jedoch ca. 50–100 Millionen bp groß (das von höheren Pflanzen und Tieren noch einmal um den Faktor 100–1000 größer), so daß durch Spaltung mit Restriktionsenzymen eine große Zahl von DNA-Fragmenten aller möglichen Größen entsteht, die im Agarosegel den Eindruck einer „Schmiere“ vermitteln (Abb. 1., Bahn 1, Kern-DNA von *P. parasitica*). Allerdings sind in einer solchen „Schmiere“ oft auch einige besonders helle Banden zu sehen. Ursache hierfür ist DNA, die im Genom in vielfachen identischen Kopien, sog. „Repeats“, vorliegt.

In der RFLP-Analyse hat sich das Interesse vor allem auf solche repetitive DNA konzentriert, wie z. B. die extrachromosomale DNA der Mitochondrien (BRUNS et al. 1988, FÖRSTER et al. 1988, 1989, SMITH & ANDERSON 1989) oder die chromosomalen Gene für die ribosomale RNA (Ribonukleinsäure). Ribosomen sind die Eiweißfabriken einer jeden Zelle; ihr Rückgrat wird durch die ribosomale RNA (rRNA) gebildet. Kleines, großes und 5,8 S Gen der rRNA liegen geordnet auf einem DNA-Fragment von ca. 7000 bis 16 000 bp Länge, getrennt durch zwei interne Spacer und einer großen intergenischen Region (rDNA, Abb. 2). Das vierte rRNA Gen, die 5 S rRNA, liegt meist in der intergenischen Region separat von den drei erstgenannten Genen. Solch eine Einheit (rDNA-Repeat) liegt im Genom in 100 oder mehr (meist) identischen Kopien als Cluster vor, deren Einheiten „head to tail“ verbunden sind. Diese Art der Organisation der ribosomalen RNA Gene ist typisch für Pilze (zusammengefaßt bei GARBER et al. 1988) und den meisten anderen Eukaryonten. Bemerkenswert ist außerdem eine im großen rRNA-Gen vorhandene Bg1II-Schnittstelle (Abb. 2), die in fast allen Pilzen und anderen Eukaryonten zu finden ist (GARBER et al. 1988, De COCK, pers. Mitteilung).

Der Vorteil repetitiver DNA ist, daß geringe Ausgangsmengen an DNA für Analysen ausreichend sind. Mitochondriale DNA ist von der Kern-DNA durch ihre Lokalisation in Mitochondrien (von denen meist viele in einer Zelle vorkommen) und ihrer Basenzusam-

mensetzung (AT-reicher und damit „leichter“) unterscheidbar. Werden die Mitochondrien aus einem Zellhomogenat isoliert oder die mitochondriale DNA (mtDNA) von der Gesamt-DNA abgetrennt (HUDSPETH et al. 1980), können mtDNA-Fragmente direkt im Agarosegel ohne störende Kern-DNA-Schmiere nachgewiesen werden (Abb. 1). Beides erfordert aber eine aufwendige Zentrifugation (Gleichgewichts-Dichtegradienten-Zentrifugation) und limitiert dadurch die Zahl der Proben erheblich. Eleganter ist der Nachweis von bestimmten DNA-Fragmenten in der Gesamt-DNA durch Hybridisierung mit Gensonden. Die durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennte DNA wird zunächst durch Alkalibehandlung denaturiert (Trennung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge), auf einen Nylonfilter übertragen („Blotting“) und dort fixiert. Der Filter („Blot“) wird dann mit der ebenfalls denaturierten DNA-Sonde unter Bedingungen inkubiert, die eine Anlagerung der Sonde (Hybridisierung) an die mit ihr homologen Sequenzen der filtergebundenen DNA-Fragmente erlauben. Die Sonde wird vor der Hybridisierung markiert, so daß ihre Hybride später auf dem Filter (Blot) nachgewiesen werden können. Dies kann entweder durch radioaktive Markierung erfolgen (die auf einem Röntgenfilm eine Schwärzung verursacht) oder in neuerer Zeit mit nichtradioaktiven Verfahren, z. B. der Markierung der DNA-Sonde mit Biotin (SCHNEIDER & MÜLLER 1988). Biotinylierte DNA wird in nachfolgenden Reaktionen mit einem Enzymkonjugat (Streptavidin/alkalische Phosphatase) behandelt, dessen Streptavidinkomponente an Biotin bindet, während der Phosphataseanteil durch Spaltung chemischer Substrate Farbstoffe bildet oder Chemilumineszenz erzeugt. Die Lage von biotinylierten DNA-Hybriden wird so durch farbige Banden direkt auf dem Nylonfilter oder durch Schwärzung eines Röntgenfilms angezeigt. Diese Methode ist gegenüber dem direkten Fluoreszenznachweis von DNA im Agarosegel um den Faktor 100–1000 empfindlicher und kann noch wenige pg (Picogramm = 10^{-12} g) eines DNA-Fragments sichtbar machen. Voraussetzung ist aber, daß die nachzuweisenden DNA-Fragmente eine für die Hybridisierung ausreichende Sequenzhomologie (Ähnlichkeit der Basensequenzen) zur Gensonde besitzen. Hier eignet sich die rDNA ganz besonders deshalb, weil die Basensequenzen ihrer Gene hochkonserviert, d. h. auch zwischen weit entfernt verwandten Arten sehr ähnlich sind, die der Spacer und intergenischen Region dagegen nicht. Ein rDNA Fragment einer beliebigen Pilzart kann so mit einer artfremden (heterologen) rDNA-Sonde (z. B. aus Hefe) dann nachgewiesen werden, wenn es noch einen Teil eines der rRNA-Gene selbst enthält.

In der vorliegenden Arbeit werden RFLP-Untersuchungen an den Nadelparasiten *Lophodermium* spp. und *Rhizosphaera* spp. vorgestellt. Arten beider Gattungen verursachen Nadelbefall und -verfärbung und gelegentlich auch massenhaften vorzeitigen Nadelabwurf (Nadelschütten, BUTIN 1989, LIVSEY & BARKLUND 1992) bei verschiedenen Koniferen. Die Pilze können auch aus gesunden grünen Nadeln isoliert werden (BUTIN 1986, RACK & BUTIN 1984, SUSKE & ACKER 1989) und werden dann als Endophyten bezeichnet.

Material und Methoden

Pilze:

Name und Herkunft der untersuchten Pilze sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengestellt (CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland; L = H. Butin, Biologische Bundesanstalt, Braunschweig; M, E = B. Meßner, GSF-Forschungszentrum, Neuherberg). Die Reihenfolge entspricht der Anordnung in Abb. 3 und Abb. 4.

Tabelle 1: Herkunft der untersuchten Pilze

Nr.	Name	Herkunft
1.	<i>Rhizosphaera macrospora</i> CBS 208.79	<i>Abies alba</i> , Frankreich
2.	<i>Rhizosphaera macrospora</i> CBS 134.81	<i>Abies sp.</i> , Holland
3.	<i>Rhizosphaera oudemansii</i> CBS 207.79	<i>Abies alba</i> , Frankreich
4.	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> CBS 280.38	<i>Picea pungens</i> , BRD
5.	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> M	<i>Picea abies</i> , Bayern
6.	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> E	<i>Picea abies</i> , Bayern
7.	<i>Rhizosphaera macrospora</i> CBS 467.82	<i>Abies alba</i> , Schweiz
8.	<i>Rhizosphaera oudemansii</i> CBS 427.82	<i>Abies alba</i> , Schweiz
9.	<i>Rhizosphaera oudemansii</i> CBS 226.83	<i>Abies pinsapo</i> , Spanien
10.	<i>Rhizosphaera pini</i> CBS 189.26	Holland
11.	<i>Rhizosphaera pini</i> CBS 206.79	<i>Abies alba</i> , Frankreich
12.	<i>Lophodermium seditiosum</i> L225	<i>Pinus sylvestris</i> , BRD
13.	<i>Lophodermium arundinaceum</i> CBS 556.84	<i>Phragmites australis</i> , England
14.	<i>Lophodermium arundinaceum</i> CBS 596.84	<i>Phragmites australis</i> , England
15.	<i>Lophodermium macrosporum</i> L236	= CBS 200.38
16.	<i>Lophodermium macrosporum</i> CBS 200.38	BRD
17.	<i>Lophodermium molitoris</i> CBS 597.84	<i>Pinus taeda</i> , USA
18.	<i>Lophodermium piceae</i> L240	<i>Picea abies</i> , Bayern
19.	<i>Lophodermium pinastri</i> CBS 323.50	<i>Pinus sylvestris</i> , Holland
20.	<i>Lophodermium pinastri</i> CBS 324.50	<i>Pinus sylvestris</i> , Holland

DNA-Präparation:

Die DNA-Extraktion wurde nach der Vorschrift von MÖLLER et al. (1992) durchgeführt. Frische Myzelkulturen der Pilze (5–10 Tagen in 3 % Malzextrakt) wurden in flüssigem Stickstoff zu Pulver zermahlen (ca. 100–500 mg) und 1 h bei 55° C in Extraktionspuffer mit Proteinase K inkubiert. Dabei werden Membranen zerstört, Proteine abgebaut und DNA solubilisiert. Gleichzeitig werden DNA-abbauende Enzyme (DNasen) gehemmt und inaktiviert. Nach Erhöhung der Salzkonzentration wurden saure Polysaccharide mit CTAB (Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid) gefällt. Nach kurzem Schütteln mit Chloroform (denaturiert Proteine, zerstört Membranen) und Zentrifugation wurde der Überstand mit Ammoniumazetat aufgesalzen (fällt weitere Proteine). Die DNA wurde dann relativ selektiv mit 0,55 Volumen Isopropanol gefällt und in 100 µl Puffer gelöst. Die Konzentration der DNA wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

Restriktion und Agarose-Gelelektrophorese:

200 ng Gesamt-DNA wurden je Ansatz in einem Reaktionsvolumen von 15 µl mit jeweils 10 Einheiten der Restriktionsenzyme geschnitten (1 h/37° C). Das Enzym BglII wurde allein und in Kombinationen mit einem der folgenden Enzyme, XbaI, XhoI, BamHI, EcoRV, EcoRI oder HindIII (LIFE TECHNOLOGIES, Eggenstein), eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden in einer horizontalen Agarosegelelektrophorese (0,8 % Agarose, 20 cm x 20 cm x 5 mm) in TAE-Puffer (40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit 1 Volt/cm für 18 h aufgetrennt. Als Längenstandard wurde ein Gemisch von DNA-Fragmenten des Phagen λ geschnitten mit BstEII und PvuI verwendet.

Hybridisierung und Nachweis von DNA-Hybriden:

Nach der Elektrophorese wurde die DNA mit Hilfe eines Vakuumblotting-Gerätes (PHARMACIA, Freiburg) entsprechend den Angaben des Herstellers alkalisch denaturiert, neutralisiert und aus dem Agarosegel auf einen PHOTOGENETTM-Nylonfilter (LIFE TECHNOLOGIES, Eggenstein) übertragen und dort durch UV-Bestrahlung fixiert (UV Stratalinker 1800, STRATAGENE, La Jolla, Kalifornien, USA). Prähybridisierung, Hybridisierung, Stringenzwaschungen, Streptavidin-alkalische Phosphatase-Behandlung und die Nachweisreaktion durch Chemilumineszenz wurde mit Reagenzien und dem PHOTOGENETTM-Nukleinsäure Detektionssystem der Firma LIFE TECHNOLOGIES, Eggenstein, nach deren Angaben durchgeführt. DNA-Sonde war das Plasmid pMY60 (VERBEET et al. 1983), das einen vollständigen rDNA-Repeat der Hefe *Saccharomyces carlsbergensis* enthält. Das Plasmid pMY60 und die DNA des Phagen λ wurden mit dem BioNickTM kit (LIFE TECHNOLOGIES) biotinyliert.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Hybridisierungen Bg1II und Bg1II + XbaI geschnittener Gesamt-DNA von 11 *Rhizosphaera*-Isolaten und 9 *Lophodermium*-Isolaten mit der rDNA aus *Saccharomyces carlsbergensis* sind in den Abb. 3 und 4 dargestellt. Die konservierte Bg1II-Schnittstelle im großen rRNA-Gen (Abb. 2) führt zu einer rDNA-Bande, deren Länge identisch mit der einer „Repeat“-Einheit ist. Liegen weitere Bg1II-Schnittstellen in der rDNA vor, treten zwei oder mehr Fragmente auf (z. B. Nr. 10, Abb. 3), deren Summe die Länge einer „Repeat“-Einheit bilden kann, aber nicht notwendigerweise bilden muß. Letzteres ist dadurch zu erklären, daß durch weitere Bg1II-Schnittstellen Stücke der variablen intergenischen Region herausgeschnitten werden können, die mit der heterologen rDNA-Sonde kein Hybridisierungssignal geben. Die Verwendung weiterer Restriktionsenzyme, deren Schnittstelle(n) auch im konservierten Gen-Bereich der rDNA liegen, erzeugen in Kombination mit Bg1II konservierte DNA-Fragmente, die bei verwandten Isolaten gleich sein können. Liegen die weiteren Schnittstellen aber in der variablen intergenischen Region, können die entstehenden DNA-Fragmente auch nah verwandter Isolate verschieden sein.

Die verschiedenen Isolate von *Rhizosphaera* zeigen einen rDNA-Repeat von 8300 bis 8500 bp Länge. Lediglich ein Stamm von *R. pini* (Abb. 3, Bahn 10) fällt mit zwei Fragmenten von 7200 bp und 5400 bp aus der Reihe. Die Summe der Fragmente paßt damit eher in die Größenordnung der rDNA-Repeats von *Lophodermium* spp. Letztere zeigen mit rDNA-Repeatlängen von 7600 bp (Abb. 3, Bahn 15, 16) bis 13 000 bp (Abb. 3, Bahn 17, 20) eine sehr große Variabilität. Bemerkenswert ist die Doppelbande der Isolate von *R. macrosporum* (Abb. 3, Bahn 15, 16), die einen internen Polymorphismus (zwei verschiedene rDNA-Repeat Längen in einem Genom) aufdeckt. Derartige rDNA-Repeat-Längenpolymorphismen sind auch von dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* (SPECHT et al. 1984) und mehreren Arten der Oomycetengattung *Phytophthora* (DE COCK, pers. Mitteilung.) beschrieben worden. In Bahn 20 (Abb. 3) ist das obere (13 000 bp) der drei Fragmente im Rahmen der Meßgenauigkeit die Summe der beiden kleineren (7400 und 5400) und dadurch zu erklären, daß diese DNA nicht vollständig geschnitten wurde. Derartige „unvollständig“ geschnittene DNA ist auch in einigen Bahnen (1, 2, 4, 5, 9, 18, 20) der Abb. 4 zu sehen (vergleiche Abb. 3 und 4). Bei der gleichzeitigen Anwendung zweier Restriktionsenzyme (Bg1II + XbaI, Abb. 4) fällt auf, daß die *Rhizosphaera*-Isolate (mit Ausnahme von *R. pini*, Bahn 10) wiederum sehr ähnliche Fragmentmuster zeigen. So besitzen alle Isolate bis auf eines von *R. kalkhofii* (Bahn 5) ein rDNA-Fragment von 3300 bp; ein Fragment von 3550 bp ist 5 weiteren Isolaten gemeinsam. Letztere repräsentieren

aber keineswegs Isolate der gleichen Art. Ähnliche Fragmentmuster der *Rhizosphaera*-Isolate zeigen auch die Blots der Bg1II + XhoI- (konserviertes Fragment von 1950 bp) und Bg1II + EcoRI-geschnittenen DNA (konservierte Fragmente von 1450, 1650 und 2200 bp). Völlig aus der Reihe fällt in allen Blots das bereits oben erwähnte Isolat von *R. pini* (Bahn 10), das keine der für die anderen *Rhizosphaera*-Isolate typischen Banden zeigt. Die Identität dieses Stammes muß nach den vorliegenden Ergebnissen in Frage gestellt und neu überprüft werden. Im Gegensatz zu *Rhizosphaera* unterscheiden sich alle Isolate von *Lophodermium* sehr stark voneinander. Weder können gattungsspezifische rDNA-Fragmente entdeckt werden, noch zeigen Isolate der gleichen Art Übereinstimmung ihrer Bandenmuster.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß mit Hilfe der RFLP-Technik bei Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme und DNA-Sonden sowohl stamm- und art- als auch gattungsspezifische DNA-Fragmente bzw. Fragmentmuster gefunden werden können. Die Identifizierung von unbekanntem Isolat setzt allerdings eine genügend große Datenbank voraus. Gerade die rDNA eignet sich wegen ihrer konservierten Gensequenzen (erlauben heterologe Hybridisierungen) und der gleichzeitigen Existenz variabler Regionen für die Anlage von RFLP-Datenbanken. Dadurch wird es möglich werden, Kulturen von Endophyten zu klassifizieren, deren Identifizierung bisher mangels morphologischer Merkmale scheiterte (JOHNSON & WHITNEY 1989). Die vorliegenden Ergebnisse mit Isolat der Gattungen *Rhizosphaera* und *Lophodermium* zeigen exemplarisch, wie unterschiedlich homo- bzw. heterogen Arten oder Gattungen sein können. Nur die Bearbeitung einer ausreichend großen Zahl von Isolat gestattet die Abschätzung der inter- wie intraspezifische Variationsbreiten, eine Voraussetzung für weiterführende taxonomische wie populationsgenetische Studien.

Literatur

- BUTIN, H. (1986) – Endophytische Pilze in grünen Nadeln der Fichte (*Picea abies* Karst.). Z. Mykol. 52: 335–345.
- (1989) – Krankheiten der Wald- und Parkbäume: Diagnose, Biologie, Bekämpfung. 2. überarb. und erw. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- BRUNS, T. D., J. D. PALMER, D. S. SHUMARD, L. I. GROSSMAN & M. E. S. HUDSPETH (1988) – Mitochondrial DNAs of *Suillus*: three fold size change in molecules that share a common gene order. Curr. Genet. 13: 49–56.
- FÖRSTER, H., T. G. KINSCHERF, S. A. LEONG & D. P. MAXWELL (1988) – Estimation of relatedness between *Phytophthora* species by analysis of mitochondrial DNA. Mycologia 80: 466–478.
- & (1989) – Restriction fragment length polymorphisms of the mitochondrial DNA of *Phytophthora megasperma* isolated from soybean, alfalfa and fruit trees. Canad. J. Botany 67: 529–537.
- GARBER, L. C., B. G. TURGEON, E. U. SELKER & O. C. YODER (1988) – Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. Curr. Genet. 14: 573–582.
- HUDSPETH, M. E. S., D. S. SHUMARD, K. M. TATTI & L. I. GROSSMAN (1980) – Rapid purification of yeast mitochondrial DNA in high yield. Biochim. Biophys. Acta 610: 211–228.
- JOHNSON, J. A. & N. J. WHITNEY (1989) – A study of fungal endophytes of needles of balsam fir (*Abies balsamea*) and red spruce (*Picea rubens*) in New Brunswick, Canada, using culture and electron microscope techniques. Canad. J. Botany 67: 3513–3516.
- LIVSEY, S. & P. BARKLUND (1992) – *Lophodermium piceae* and *Rhizosphaera kalkhoffii* in fallen needles of norway spruce (*Picea abies*). Eur. J. For. Path. 22, 204–216.
- 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.
- A. G. SCHILLING, H. H. GEIGER & G. BAHNWEG (1994) – Identifizierung und Charakterisierung von Genotypen getreidepathogener *Fusarium*-Arten mit RAPD-Markern. Z. Mykol. 60(1): 239–252.
- RACK, K. & H. BUTIN (1984) – Experimenteller Nachweis nadelbewohnender Pilze bei Koniferen. Eur. J. For. Path. 14: 302–310.

SCHNEIDER, J. & L. MÜLLER (1988) – DNA-DNA-Hybridisierung mit biotinylierten DNA-Sonden: Eine einfache und wirkungsvolle Alternative zur radioaktiven Markierung. *Forum Mikrobiologie* **11**(8): 254–262.

SMITH, M. L. & J. B. ANDERSON (1989) – Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNAs of *Armillaria*: identification of North American biological species. *Mycol. Res.* **93**, 247–250, 1989.

SPECHT, C. A., C. P. NOVOTNY & R. C. ULLRICH (1984) – Strain specific differences in ribosomal DNA from the fungus *Schizophyllum commune*. *Curr. genet.* **8**: 219–222.

SUSKE, J. & G. ACKER (1989) – Endophytic needle fungi: culture, ultrastructural and immunocytochemical studies. In: *Forest Decline and Air Pollution* (Herausg. E.-D. SCHULZE, O. L. LANGE & R. OREN), pp. 121–136. Springer Verlag, Berlin & Heidelberg.

VERBEET, M. P., J. KLOOTWIJK, H. VAN HEERIKHUIZEN, R. FONTIJN, E. VREUGDENHIL & R. J. PLANTA (1983) – Molecular cloning of the rDNA of *Saccharomyces rosei* and comparison of its transcription initiation region with that of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene* **23**: 53–63.

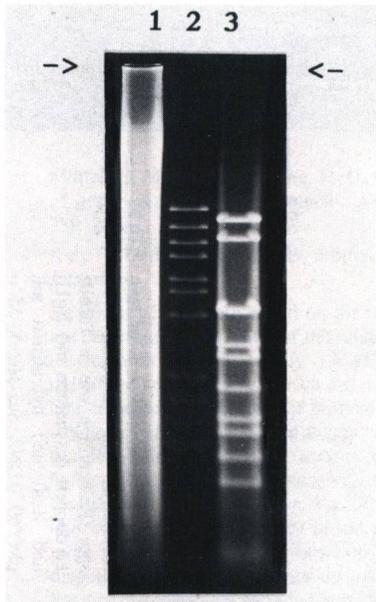


Abb. 1: Agarose-Gelelektrophorese geschnittener DNA:

- 1. *Phytophthora parasitica* Kern-DNA mit HindIII
 - 2. λ -DNA mit BstEII
 - 3. *Phytophthora parasitica* Mitochondrien-DNA mit HindIII
- > <- Start der Elektrophorese

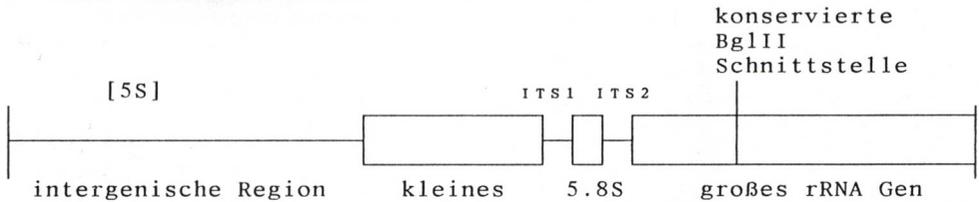


Abb. 2: Aufbau einer rDNA-Repeat-Einheit.

Die rRNA-Gene werden durch zwei kleine „interne, transkribierte Spacer“ (ITS) und eine große intergenische Region getrennt, die nicht in RNA überschrieben (transkribiert) wird. Die Basenfolgen der Gene selbst sind hochkonserviert, die der Spacer und der intergenischen Region dagegen sind sehr variabel. Die Länge eines rDNA-Repeat ist art- oder rassenspezifisch und kann zwischen ca. 7000 und 16 000 Basenpaaren variieren. Die Unterschiede werden durch Längenvariation der intergenischen Region verursacht. Das 5S Gen befindet sich bei den meisten Pilzen in der intergenischen Region separat von den anderen drei rRNA Genen.

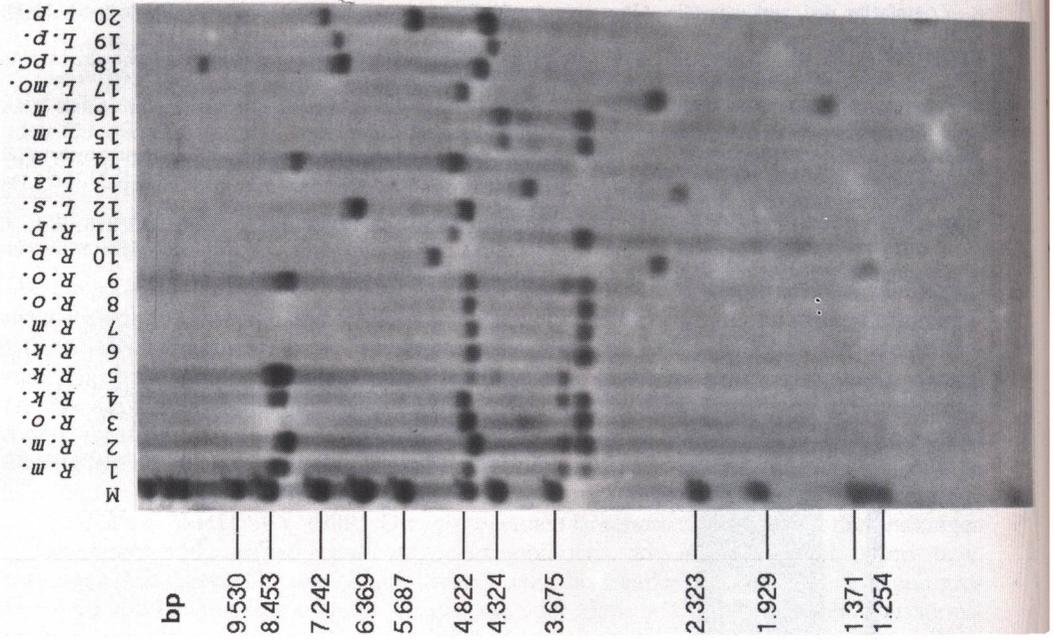


Abb. 4. Gesamt-DNA von *Rhi-zosphaera* und *Lophodermium* spp. (Reihenfolge wie in Tabelle 1) doppelt geschnitten mit BgIII und XbaI und hybridisiert mit pMY60 (rDNA aus Hefe). M = Längenstandard (Gemisch aus λ -DNA geschnitten mit BstEII und PvuI)

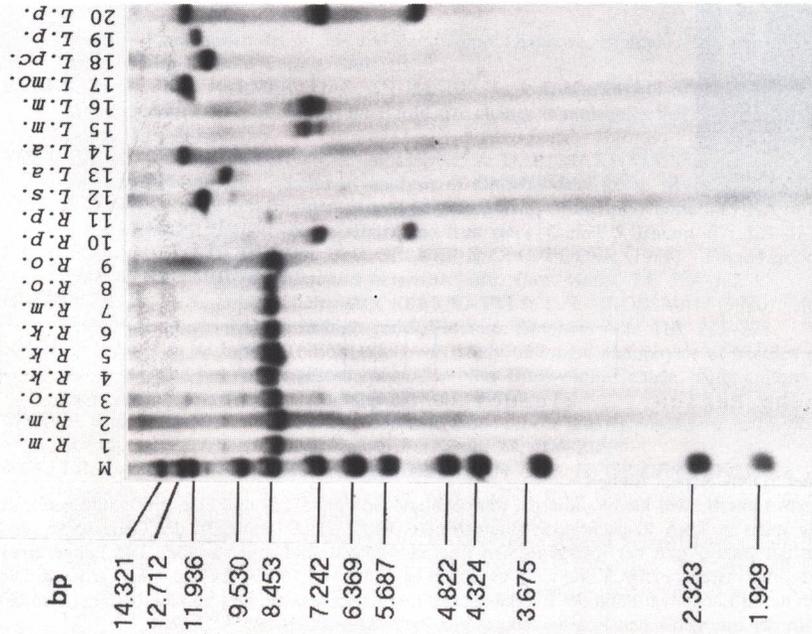


Abb. 3. Gesamt-DNA von *Rhi-zosphaera* und *Lophodermium* spp. (Reihenfolge wie in Tabelle 1) geschnitten mit BgIII und hybridisiert mit pMY60 (rDNA aus Hefe). M = Längenstandard (Gemisch aus λ -DNA geschnitten mit BstEII und PvuI)



Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.
German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der DGfM.

www.dgfm-ev.de

Über [Zobodat](#) werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- **Zeitschrift für Mykologie**
Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- **Zeitschrift für Pilzkunde**
(Name der Heftreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen**
Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- **Beihefte der Zeitschrift für Mykologie**
Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der [Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz](#) (CC BY-ND 4.0).



- **Teilen:** Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- **Namensnennung:** Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- **Keine Bearbeitungen:** Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die [vollständigen Lizenzbedingungen](#), wovon eine [offizielle deutsche Übersetzung](#) existiert. Freigebiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society](#)

Jahr/Year: 1994

Band/Volume: [60_1994](#)

Autor(en)/Author(s): Bahnweg G., Sandermann H., Möller E. M., Schilling A. G.

Artikel/Article: [Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen \(RFLPs\) der Nadelparasiten *Rhizosphaera* spp. und *Lophodermium* spp. 231-238](#)