Identifizierung und Charakterisierung von Genotypen getreidepathogener *Fusarium*-Arten mit RAPD-Markern

E. M. MÖLLER*, A. G. SCHILLING, H. H. GEIGER

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

G. BAHNWEG

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

Eingegangen am 4.12.1993

Möller, E. M., A. G. Schilling, H. H. Geiger & G. Bahnweg (1994) – Identification and characterization of genotypes of cereal-pathogenic *Fusarium* species by means of RAPD markers. Z. Mykol. 60(1): 239–252.

Key Words: PCR, RAPD, arbitrary primers, fingerprinting, species identification, genetic diversity, *Fusarium*

Summary: Methods based on the polymerase chain reaction (PCR) for generating molecular markers are described. Application of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique for mycological research is illustrated by a RAPD analysis of *Fusarium* species. The closely related species *F. culmorum* and *F. graminearum* are major fungal pathogens causing foot rot and head blight of cereals. One-hundred-twenty decamer primers of arbitrary base composition were used to screen six single spore isolates of each species from divers geographic origin. Of these primers eighty-eight provided informative RAPD patterns. Amplification products of 35 % of the primers clearly distinguished between *F. culmorum* and *F. graminearum*. Various RAPD profiles identified two *F. culmorum* isolates to be falsely classified as *F. graminearum*. Profiles of 43 % of the primers were highly polymorphic among *F. graminearum* and allowed typing of individual isolates. In contrast, fragment patterns of *F. culmorum* were more conserved with little variation revealed by only 14 % of the primers. *F. graminearum* isolates display a genetic dissimilarity up to 45 %, *F. culmorum* isolates only up to 12 %.
Factors influencing RAPD profiles, like template DNA concentration, number of amplification cycles, type of thermocycler, and Taq-polymerase are discussed and recommendations are given to generate reliable and reproducible results.

Zusamenfassung: Die Methode zur Entwicklung molekularer Marker mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Anwendung von RAPD (random amplified polymorphic DNA)-Markern in der Mykologie wird erläutert. Je sechs Isolate der beiden eng verwandten getreidepathogenen *Fusarium*-Arten *F. culmorum* und *F. graminearum* wurden mit 120 Decamer-Primern untersucht. 88 der Primer lieferten informative RAPD-Muster; davon waren 35 % für eine Artunterscheidung geeignet. Mit Hilfe der RAPD-Muster konnten zwei *F. culmorum*-Isolate identifiziert werden, die fälschlicherweise als *F. graminearum* klassifiziert worden waren. 43 % der Primer waren hoch polymorph für *F. graminearum* und erlaubten eine Charakterisierung einzelner Isolate. Dagegen zeigten nur 14 % der Primer Variationen in den RAPD-Mustern von *F. culmorum*. Die genetische Diversität ist innerhalb von *F. graminearum* deutlich größer als innerhalb von *F. culmorum*. Letztere wiesen max. 12 % genetische Distanz auf, F. graminearum-Isolate dagegen bis zu 45 %.

* Sonderdruckanforderungen an Dr. E. M. MÖLLER

Methodische Faktoren, die die Ergebnisse einer RAPD-PCR beeinflussen können, wie z. B. Konzentration der genomischen DNA, Anzahl der Amplifikationszyklen, Fabrikat des Thermocyclers und die verwendete Taq-Polymerase, werden diskutiert und es werden Empfehlungen gegeben, um verläßlich reproduzierbare RAPD-Muster zu erhalten.

Molekulare Marker werden in der mykologischen Forschung schon seit über einem Jahrzehnt zur Bearbeitung systematischer Fragestellungen, zur Diagnose von Pathogenen und zur Genotypencharakterisierung verwendet. Im Gegensatz zu morphologischen Merkmalen oder biochemischen Markern (Isozyme, ribosomale Proteine, Aminosäurenprofile) ist ihre Ausprägung unabhängig vom jeweiligen physiologischen Entwicklungsstadium des Organismus. Deshalb sind DNA-Marker besonders gut für Arten geeignet, die nur wenige, für eine makro- oder mikroskopische Klassifizierung brauchbare Merkmale besitzen (z. B. *Fungi imperfecti*) oder bei denen wichtige Bestimmungsmerkmale im Labor nicht oder nur schwer induzierbar sind (Fruchtkörperbildung). Auch für Arten, bei denen der Polymorphiegrad biochemischer Marker nicht ausreichend groß ist, bieten sich DNA-Marker an, weil ihre Anzahl (praktisch) unbegrenzt ist. Weite Anwendung fanden die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) sowie die Sequenzierung der rRNA-Gene und ihrer Spacer (vgl. dazu in dieser Ausgabe BAHNWEG et al. 1994). Mit der Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden neue Markertypen möglich und gewinnen rasch an Bedeutung (FOSTER et al. 1993). Dies läßt sich vor allem auf drei Tatsachen zurückführen:

(1) Die PCR ist eine einfache Methode (keine Radioaktivität, keine Blotting- und Hybridisierungstechniken, keine Transformationen und somit keine Anmelde- oder Genehmigungspflicht gemäß Gentechnik-Gesetz). (2) Sie ist schnell, weil automatisierbar. (3) Als Ausgangsmaterial werden nur geringe DNA-Mengen benötigt (fg bis ng im Gegensatz zu µg bei RFLP-Analysen). Die beiden ersten Punkte machen die PCR besonders für die Bearbeitung großer Probenumfänge geeignet. Die Tatsache, daß geringe DNA-Mengen ausreichend sind, ist von Vorteil bei Organismen, aus denen z. B. auf Grund größerer Mengen an Polyphenolen nur sehr schwierig und/oder wenig DNA extrahiert werden kann oder bei Organismen von denen nicht genügend Frischmaterial zur Verfügung steht (obligate Parasiten, seltene Arten).

Das Prinzip der PCR

Die Grundidee der PCR ist genial einfach: Das Enzym DNA-Polymerase kann einen einzelsträngigen DNA-Abschnitt in 5' → 3' Richtung kopieren, wenn ihm als Startpunkt für die Neusynthese ein kurzer (>5 bp bis ca. 25 bp) DNA-Doppelstrang zur Verfügung steht. Diesen Startpunkt gewinnt man durch Anlagerung (Annealing) eines Oligonukleotides (Primer) an die einzelsträngige DNA; die Sequenz des Primers muß komplementär zu einer entsprechenden Sequenz auf der zu untersuchenden DNA sein. Die Anlagerung muß etwas unterhalb der Schmelzpunkt-Temperatur des Primers erfolgen, die wiederum von dessen Basenzusammensetzung abhängt. Steht für jeden der beiden DNA-Stränge solch ein kurzer, doppelsträngiger Startpunkt mit jeweils homologer Sequenz zur Verfügung (Primer-Paar) und haben diese beiden Punkte einen gewissen Abstand voneinander, wird der zwischen ihnen liegende DNA-Abschnitt dupliziert. Der Abstand zwischen den beiden Synthesestartpunkten darf nicht länger sein als die Prozessivität des Enzyms es zuläßt (im Regelfall ca. 3,5 kbp). Will man diesen Prozeß wiederholen, um eine weitere „Kopie der Kopie" herzustellen, müssen die beiden neu synthetisierten Doppelstränge wieder aufgeschmolzen (denaturiert) werden, um einzelsträngige Matrizen-DNA bereitzustellen, an die sich erneut die beiden Primer anlagern können. Die Denaturierung erfolgt durch Erhitzung

auf bis zu 95° C. Bei diesen Temperaturen wird das Enzym jedoch zerstört und müßte daher erneut zugegeben werden. Die Entdeckung und Nutzbarmachung thermostabiler DNA-Polymerasen, gewonnen aus Heißwasser-Organismen wie *Thermus aquaticus* und *Th. thermophilus*, bildete daher die Voraussetzung zur Automatisierung der PCR. Diese Polymerasen „überleben" die Hitzedenaturierung; eine erneute Enzym-Zugabe nach jedem Denaturierungsschritt ist überflüssig. Die PCR erlaubt somit eine schnelle, hochsensitive Detektion und **exponentielle** Amplifikation von DNA-Abschnitten. Als Ausgangsmaterial ist theoretisch eine Kopie der zu untersuchenden DNA ausreichend. PCR-Nachweismethoden sind daher um ein Vielfaches sensitiver als herkömmliche Techniken wie z. B. der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) oder DNA-Hybridisierungen. Deshalb wird PCR-Diagnostik bereits intensiv in der forensischen und klinischen Medizin eingesetzt; aus der molekularbiologischen Grundlagenforschung sind die zahlreich entwickelten Varianten (Übersichten in ROLFS et al. 1992, ERLICH 1989) nicht mehr wegzudenken. Voraussetzung ist dabei immer die Verfügbarkeit von Sequenzinformationen über den betreffenden Organismus, um daraus die Primersequenzen ableiten zu können.

Eine der Varianten ist hervorragend zur schnellen und einfachen Entwicklung vieler Marker geeignet; sie arbeitet mit sogenannten Zufallsprimern und kann auch dann angewendet werden, wenn keinerlei Sequenzinformation über den Organismus vorliegt, wie es häufig der Fall ist.

DNA-Amplifizierung mit Zufallsprimern

Grundlegendes Prinzip ist hierbei die Verwendung nur **eines einzigen** Oligonukleotides mit „zufälliger" Basenabfolge. Eine zu solcher Primersequenz komplementäre Sequenz kann auf jedem der beiden DNA-Stränge eines beliebigen Organismus in je umgekehrter Basenabfolge (vgl. Abb. 1) mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit auftreten. Je kürzer die Primersequenz ist, desto größer wird diese Wahrscheinlichkeit und in desto kürzeren Abständen können die Primer-Bindungsstellen auftreten. Da die nicht-zufallsverteilte Anordnung der vier Basen im Genom sowie oft auch die genaue Genomgröße und der GC-Gehalt unbekannt sind, können diese Wahrscheinlichkeiten und die Anzahl möglicher Amplifikationsprodukte in der Praxis allerdings nicht berechnet werden. Im strengen Sinne ist die Primersequenz allerdings nicht „zufällig": Bei der Zusammenstellung der Sequenz müssen einige Regeln eingehalten werden, die ein Gelingen der Reaktion gewährleisten (geeigneter GC-Gehalt, vermeiden möglicher Sekundärstrukturen und eines AT-reichen 3'-Endes). Sortimente derartiger Primer sind inzwischen kommerziell erhältlich. Drei Varianten dieser Technik sind bekannt geworden; sie unterscheiden sich in der Länge der Primer und der Nachweismethoden für die amplifizierte DNA. Bei der von WILLIAMS et al. (1990) entwickelten und als RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) bekannt gewordenen Methode ist der Primer 9–10 bp lang; nach ca. 40–45 Amplifikationszyklen werden die Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid im UV-Licht fotografiert. WELSH & McCLELLAND (1990) benutzten für ihre AP-PCR (arbitrarily primed PCR) ca. 20 bp lange Primer; während der letzten Zyklen werden radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut, die Produkte auf Polyacrylamidgelen getrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Für das von CAETANO-ANOLLES et al. (1991) propagierte DAF (DNA amplification fingerprinting) werden sehr kurze (5 bp) Primer verwendet; nach ca. 35 Zyklen werden die Amplifikationsprodukte auf Polyacrylamidgelen getrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Die RAPD-PCR ist die am häufigsten angewandte Technik, da sie im Vergleich zur AP-PCR preisgünstiger ist (kürzere Primer, keine radioaktiven Nukleotide) und die Detek-

tion einfacher und schneller erfolgt als bei den beiden anderen Verfahren. Mit allen drei Varianten werden Fragment-Muster erzeugt, die in Abhängigkeit von dem jeweils benutzten Primer eine Differenzierung auf verschiedenen systematischen Ebenen ermöglicht. CAETANO-ANOLLES et al. (1992) schlugen für alle Modifikationen der PCR mit Zufallsprimern die Bezeichnung Multiple Arbitrary Amplicon Profiling (MAAP) vor. Unter der Voraussetzung, daß die RAPD-PCR für jeden Organismus sorgfältig optimiert und standardisiert wird, sind die entstehenden Fragment-Muster zuverlässig reproduzierbare Marker. Sie stellen eine ausgezeichnete Alternative zu zeitaufwendigen Klassifizierungen mit Hilfe biochemischer Marker oder mit Gruppierungen auf Grund der vegetativen Kompatibilität oder der Anastomosis dar. Im Gegensatz zur codominanten Vererbung der RFLP- und Allozym-Marker werden RAPDs überwiegend dominant vererbt. Dies bedeutet, daß Heterozygote nicht ohne weiteres von Homozygoten zu unterscheiden sind. Für haploide Pilze (z.B. Ascomyceten) stellt dies kein Problem dar; bei der Bearbeitung diploider oder dikaryotischer Pilze (Basidiomyceten, Oomyceten) muß es dagegen berücksichtigt werden, z.B. durch eine Erhöhung der Markeranzahl.

In dieser Arbeit berichten wir von der Entwicklung von RAPD-Markern für getreidepathogenene *Fusarium*-Arten. *Fusarium culmorum* (W.G.SM.) Sacc. (Teleomorph unbekannt) und *F. graminearum* Schwabe (Teleomorph: *Gibberella zeae*) sind zwei eng verwandte Arten. Sie verursachen in erheblichem Maße Fußkrankheiten und Ährenerkrankungen des Getreides sowie Stengel- und Kolbenfäulen bei Mais. Ihre Mycotoxine stellen eine Gesundheitsgefährdung für Mensch und Tier dar (CHELKOWSKI 1989). Die Erfassung und Charakterisierung der Pathogen-Genotypen ist daher für die Resistenzzüchtung bei Getreide und Mais von besonderem Interesse. *Fusarium*-Arten sind schwer zu klassifizieren; eng verwandte Taxa, deren morphologische Merkmale darüberhinaus interspezifisch überlappend sein können (Größe und Form von Makro- und Mikrokonidien), sind nur für das geschulte Auge unterscheidbar. Diese Schwierigkeiten spiegeln sich in der Existenz extrem verschiedener taxonomischer Systeme wider. WOLLENWEBER & REINKING (1935) beschreiben 65 Arten, SNYDER & HANSEN (1945) lediglich 9; BOOTH (1971) definiert 44 Arten und GERLACH & NIRENBERG (1982) mehr als 70. *F. culmorum* und *F. graminearum* lassen sich weder serologisch (HORNOK 1980), noch immunologisch (BEYER et al. 1993), noch durch DNA-Reassoziationstechniken (SZECSI & DOBROVOLSZKY 1985) unterscheiden. Lediglich multivariate Distanzmaße basierend auf HPLC-Daten von Kulturfiltraten erbrachten eine klare Artunterscheidung (THRANE 1990). Die HPLC-Technik ist jedoch zur Bearbeitung großer Probenumfänge nicht geeignet. Mit RFLP-Markern wurden vor allem die verschiedenen forma specialis von *F. oxysporum* untersucht (KISTLER et al. 1987, MANICOM et al. 1990, KIM et al. 1992). Für andere Arten wurde das Ausmaß der intra- und interspezifischen genetischen Diversität bisher meist mit Hilfe vegetativer Kompatibilitätsgruppierungen (VCG) erfaßt (z.B. BOWDEN & LESLIE 1992). Eigene Untersuchungen (MÖLLER & KIPP, unveröffentlicht) über das Ausmaß der Polymorphie des ribosomalen DNA-Repeats (rDNA) von *F. culmorum* und *F. graminearum* zeigten, daß rDNA-RFLPs zwar existieren, aber keine eindeutige Artunterscheidung erlauben. Darüberhinaus war der Polymorphiegrad von RFLPs der gesamtgenomischen DNA für *F. culmorum* sehr gering, auch wenn Isolate verschiedener geographischer Herkünfte verglichen wurden. Aus diesen Gründen wählten wir die RAPD-Technik zur Entwicklung von Markern, die eine Artunterscheidung erlauben und zur Erfassung der genetischen Diversität zwischen und innerhalb der Arten *F. culmorum* und *F. graminearum* geeignet sind.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 17 Einspor-Isolate der Arten *Fusarium culmorum, F. graminearum, F. avenaceum, Microdochium nivale* und *Pseudocercosporella herpotrichoides* verwendet (Tab. 1). Die Anzucht der Pilze zum Zwecke der DNA-Extraktion erfolgte für 3–4 d bei 24°C in Petrischalen in flüssigem SNA-Medium (NIRENBERG 1976), das mit 0.01 % Hefeextrakt ergänzt worden war. Als Inokulum dienten 1–3 frisch bewachsene Agarstückchen (Ø4 mm) pro Schale. Das durch Abfiltrieren geerntete Myzel wurde gefriergetrocknet, gemahlen und bis zum Gebrauch bei –80°C aufbewahrt.

DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmungen

Die DNA-Extraktionen erfolgten nach MÖLLER et al. (1992). Um die unerwünschte Amplifizierung von RNA zu verhindern und um eine spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung vornehmen zu können, wurde eine RNase-Behandlung durchgeführt. Die so extrahierte DNA ist hochmolekular (50–150 kbp) – eine notwendige Voraussetzung zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der RAPD-PCR. Zur Bedeutung der weiteren Präparationsschritte vgl. auch BAHNWEG et al. (1994, dieses Heft). Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm. Ein Vergleich dieser Werte mit den durch eine Gelelektrophorese ermittelten zeigt, daß die UV-Werte die tatsächliche Konzentration um durchschnittlich das 5-fache überschätzen. Diese Tatsache muß bei der Entscheidung über die zu verwendende Menge an genomischer DNA berücksichtigt werden (vgl. dazu auch Ergebnisse und Diskussion). Die Konzentrationsangaben in dieser Arbeit beziehen sich auf die UV-Werte.

RAPD-PCR

Die Decamer-Primer mit Zufallssequenzen wurden von OPERON Technologies Inc., Alameda, California, USA, und von der University of British Columbia, Oligonucleotide Synthesis Laboratory, Vancouver, B.C., Canada, bezogen [im folgenden als UBC (Nr.) bezeichnet]. Beim Ansetzen der Reaktionen sollten zur Vermeidung von Kontaminationen die für mikrobiologische Labore üblichen Hygiene- und Vorsichtmaßnahmen streng befolgt werden. Praktische Hinweise geben u. a. KWOK & HIGUCHI (1989). Eine räumliche Trennung von Pre-PCR- und Post-PCR-Arbeiten ist empfehlenswert. Die RAPD-PCR wurde wie bei SCHILLING et al. (1994) beschrieben durchgeführt. Um Pipettierungenauigkeiten und -aufwand zu minimieren wurden die Reaktionskomponenten als „Mastermix" für mehrere Reaktionen vorbereitet. Es ist dringend zu empfehlen, die Konzentration von Stammlösungen so zu wählen, daß immer im optimalen Genauigkeitsbereich der Pipetten gearbeitet werden kann. Ein Ansetzen einzelner Reaktionen mit hochkonzentrierten Stammlösungen ist zu vermeiden. Ein Mastermix für 20 Reaktionen à 25 µl enthielt: 50 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 x; Pharmacia), 20 µl $MgCl_2$(25 mM), 50 µl dNTPs (1 mM; Pharmacia), 20 µl decamer primer (5 µM), 4 µl Taq-Polymerase (5 U µl-1; Pharmacia), 336 µl steriles bidestilliertes Wasser. Der Mix wurde in 24 µl-Portionen aufgeteilt, jeweils 1 µl genomische Pilz-DNA (25 ng/µl) pro Reaktion zugegeben und mit 25 µl Mineralöl überschichtet. Für jeden Primer wurde pro PCR-Lauf eine Kontrollreaktion mit allen Komponenten außer der genomischen DNA angesetzt. Die Amplifizierung erfolgte in dem Thermocycler PREM III (BIOZYM, Hameln) mit folgendem Temperaturprofil: Zyklus 1: 3' bei 94°C, 1' bei 35°C, 2' bei 72°C; Zyklus 2-44: 1' bei 94°C, 1' bei 35°C, 2' bei 72°C; Zyklus 45: 1' bei 94°C, 1' bei 35°C, 5' bei 72°C.

Gelelektrophorese und Nachweis der Amplifikationsprodukte

Zu den PCR-Reaktionen wurde 5 µl Gellade-Puffer (SAMBROOK et al. 1989) und zur Extraktion des Mineralöls 25 µl Chloroform hinzupipettiert, gemischt und kurz abzentrifugiert. In Abhängigkeit von der Größe der Geltaschen wurden 9–15 µl auf ein Agarosegel (1,5 %) geladen und bei 2 V cm^{-1} in 1 x TAE (40 mM Tris-Acetat, 1 mM Na_2EDTA, pH 8,0) für 4,5 h getrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurden in der Regel eine 100 bp-Leiter (Pharmacia) und λ-DNA, verdaut mit BstEII, verwendet. Die Gele wurden in Ethidiumbromid (5 µg ml^{-1}) gefärbt, in destilliertem Wasser entfärbt und unter UV-Licht mit einer Polaroidkamera fotografiert.

Ergebnisse und Diskussion

Es wurden 120 Decamer-Primer mit einem Test-Set bestehend aus je 6 Isolaten *F. culmorum* und *F. graminearum* verschiedener geographischer Herkunft geprüft. Zu Vergleichszwecken wurde jeweils ein Isolat von *F. avenaceum, Microdochium nivale* (vormals: *F. nivalis,* Erreger des Schneeschimmels bei Getreide) und *Pseudocercosporella herpotrichoides* var. *acuformis,* ebenfalls ein Fußkrankheits-Erreger des Getreides, mituntersucht. Von den 120 Primern erwiesen sich 32 (= 26 %) als ungeeignet. Sie erzeugten entweder diffuse, nicht auswertbare Bandenmuster (6 %) oder amplifizierten nur bei wenigen Isolaten (7 %) bzw. gar nicht (13 %). Die restlichen 88 Primer (im folgenden = 100 % gesetzt) erzeugten informative RAPD-Muster mit ein bis zehn Fragmenten pro Isolat in der Größenordnung von 250 bp bis ca. 3,5 kbp. Mit ca. 35 % der informativen Primer lassen sich die beiden Arten *F. culmorum* und *F. graminearum* deutlich unterscheiden, wobei einige dieser Primer gleichzeitig auch für eine intraspezifische Differenzierung geeignet sind. *F. avenaceum, M. nivale* und *P. herpotrichoides* zeigten mit allen Primern immer deutlich andere Muster als *F. culmorum/F. graminearum.* In Abb. 2. sind die RAPD-Muster des Primer UBC85 dargestellt. Dieser erzeugt für alle untersuchten *F. culmorum*-Isolate ein identisches Muster; dieses tritt bei keinem der *F. graminearum*-Isolate auf. Der Monomorphismus konnte inzwischen für weitere 35 *F. culmorum*-Isolate bestätigt werden (SCHILLING et al., unveröffentlicht). Die in Spur 11 und 14 mit Pfeilen gekennzeichneten Isolate „*F. graminearum* 7.4" und „*F. graminearum 13*"weisen das *F. culmorum*-typische Muster auf. Tatsächlich stellten sich diese beiden Isolate im Laufe der Untersuchungen als falsch klassifiziert heraus. Sowohl mit allen anderen RAPD-Primern als auch mit einer für die Artunterscheidung geeigneten RFLP-Sonde und bei der rDNA-Analyse konnten beide Isolate als *F. culmorum* identifiziert werden (MÖLLER & KIPP, unveröffentlicht). Dies demonstriert die Eignung der RAPD-Technik zur Artidentifikation. Abb. 2 spiegelt auch eines der wichtigsten Ergebnisse des Primer-Screenings wider: Die intraspezifische genetische Diversität ist für *F. graminearum* deutlich größer als für *F. culmorum.* Von den informativen Primern waren 43 % für *F. graminearum* hoch polymorph, jedoch nur 14 % für *F. culmorum.* Eine Clusteranalyse nach der UPGMA-Methode unter Verwendung des Ähnlichkeitskoeffizienten von NEI & LI (1979) zeigte, daß die genetische Distanz zwischen *F. graminearum*- Isolaten bis zu ca. 45 % gegenüber nur 12 % bei den *F. culmorum*-Isolaten betragen kann (SCHILLING et al. 1994). Für die Analyse wurden ausschließlich intensive, reproduzierbare Banden ausgewertet.

Einige der von uns geprüften Primer sind zur intraspezifischen Differenzierung beider Arten gleichermaßen geeignet. Abb. 3 zeigt die Amplifikationsprodukte des Primer UBC 30. Die Muster aller Isolate sind unterschiedlich. Primer wie dieser sind geeignet, populationsgenetische Untersuchungen an natürlichen Feldpopulationen vorzunehmen. Isolatspezifische Primer mit deutlichen, intensiven und reproduzierbaren Banden (vgl. z. B. Abb. 3,

Spuren 2–4) können darüberhinaus benutzt werden, um einzelne Isolate nach Inokulation im Feld zu erfassen und deren Dynamik in Abhängigkeit vom Wirtspflanzenbestand und von der Umwelt zu untersuchen. Auf Grundlage der Screening-Ergebnisse wurden Primer ausgewählt, mit denen die Genotypen in natürlichen Populationen erfaßt und charakterisiert werden können.

Im Gegensatz zu der von uns festgestellten ausgeprägten Diversität innerhalb der Art *F. graminearum* fanden OUELLET & SEIFERT (1993) für die von ihnen mit RAPD-PCR untersuchten *F. graminearum*-Isolate nur geringen Polymorphismus. Sie prüften 3 Primer mit 19 Isolaten, von denen 18 aus Canada stammten (davon allein 11 aus der Provinz Ontario und 5 von einem einzigen Feld). Nur ein Isolat kam aus England. Die Anzahl der von diesen Primern amplifizierten Fragmente ist auffällig geringer, als bei einem Großteil der von uns getesten Primer. Ob die Diskrepanz der Befunde auf Auswahl ungeeigneter Primer und/oder auf methodische Unterschiede in der Durchführung der RAPD-PCR zurückzuführen ist, läßt sich nicht mit letzter Sicherheit entscheiden. BOWDEN & LESLIE (1992) konnten *F. graminearum*-Isolate von 23 Standorten in Kansas/USA in 23 verschiedene VCGs einordnen; dies spricht für eine große intraspezifische Variablität dieser Art selbst innerhalb kleinerer Gebiete. OUELLET & SEIFERT (1993) testeten anfänglich 40 Decamer-Primer mit 2 *F. graminearum*-Isolaten; lediglich fünf der Primer amplifizierten polymorphe Fragmente. Der auffällig große Prozentsatz ungeeigneter Primer (87,5 %) ist vermutlich auf die Verwendung von nur zwei Isolaten für das Screening zurückzuführen. Wählt man hierbei zufällig zwei sehr ähnliche Genotypen aus, wird das tatsächliche Ausmaß der genetischen Variation stark unterschätzt. Auch unter den von uns verwendeten sechs Testisolaten befanden sich zwei (*F. graminearum* 7.1 und *F. graminearum* 7.5, Abb. 2, Spuren 7 und 10), die einander mit der Mehrheit der Primer sehr ähneln. Ein Screening mit nur diesen beiden Isolaten hätte zu völlig anderen Schlußfolgerungen geführt. Zur intraspezifischen Differenzierung der weniger polymorphen Art *F. culmorum* waren bei uns 12 (14 %) von 88 Primern geeignet. Wollte man für weiterführende Untersuchungen wenigstens mit fünf intraspezifisch gut differenzierenden Primern arbeiten, müßten unter der Annahme, daß nur 14 % geeignet sind, mindestens 35 Primer geprüft werden, um fünf geeignete auswählen zu können. Für die genetisch diversere Art *F. graminearum* müßten mindestens 12 Primer getestet werden. Daß OUELLET & SEIFERT (1993) trotz des Screenings mit 40 Primern kaum eine Differenzierung zwischen ihren Isolaten erhielten, läßt sich nur durch die Verwendung von lediglich zwei, vermutlich genetisch sehr ähnlichen Isolaten erklären. Dieses Beispiel belegt, wie wichtig es ist, für das Screening-Programm hinreichend repräsentative Stichproben sowohl der Primer als auch der Isolate heranzuziehen.

Auch methodische Unterschiede können zu den Abweichungen zwischen den Ergebnissen von OUELLET & SEIFERT und unseren eigenen beigetragen haben. So verwendeten sie maximal 2 ng oder weniger genomische DNA (basierend auf UV-Messung) im Gegensatz zu 25 ng in unseren Experimenten und nur 35 Amplifikatonszyklen gegenüber 45 Zyklen; auch das Fabrikat des Thermocyclers und die Taq-Polymerase waren unterschiedlich. Von diesen möglichen Faktoren dürfte der Einfluß der genomischen DNA-Menge am geringsten sein. In eigenen methodischen Vorversuchen zur Standardisierung der RAPD-PCR war der Einfluß der DNA-Menge in einem Bereich von ca. 2,5 ng bis 250 ng vernachlässigbar (Abb. 4, oben). Erst unterhalb von ca. 1 ng und oberhalb von ca. 500 ng ist mit einem veränderten RAPD-Muster zu rechnen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen ELLSWORTH et al. (1993).

Der Einfluß der Zyklenzahl kann entscheidender sein. In Abb. 4 (unten) sind die Ergeb-

nisse von 35 vs. 45 Zyklen für 2 verschiedene Primer und je einem Isolat von *F. culmorum* und *F. graminearum* dargestellt. Mit Primer UBC 1 werden bei nur 35 Zyklen erheblich weniger Fragmente amplifiziert als bei 45 Zyklen. Für Primer UBC 2 dagegen ist der Einfluß vernachlässigbar. Dies bedeutet, daß der Einfluß der Zyklenanzahl vom jeweiligen Primer abhängt. YU & PAULS (1992) fanden diese Abhängigkeit ebenfalls, als sie RAPD-Muster von Luzerne verglichen, die mit 35, 55 und 75 Zyklen und zwei Primern erzeugt worden waren.

Auch das Fabrikat des Thermocyclers und die jeweils verwendete Taq-Polymerase können das Amplifikationsergebnis erheblich beeinflussen, wie wiederholt demonstriert wurde (MacPHERSON et al. 1993, MEUNIER & GRIMONT 1993, PENNER et al. 1993). In eigenen Versuchen erwiesen sich sechs von acht Taq-Polymerasen als untauglich auf Grund zu schwacher Amplifikation, vermutlich bedingt durch die unterschiedliche Thermostabilität der Enzyme: Gegenüber einer „normalen" PCR mit ca. 20–25 Zyklen muß die Polymerase für die RAPD-PCR bis zu 45 Denaturierungszyklen überdauern. Weitere Faktoren, wie z. B. unterschiedlich effiziente Amplifizierung von Sekundärstrukturen der genomischen DNA durch die jeweilige Polymerase und Konkurrenzeffekte zwischen potentiellen Primer-Anlagerungstellen können ebenfalls zu unterschiedlichen Amplifikationsprodukten beitragen. In einem vergleichenden Test dreier Thermocycler fanden wir für zwei der Fabrikate sehr gut vergleichbare Bandenmuster, während das Dritte zu deutlichen Abweichungen führte. Muster, die mit unterschiedlichen Geräten und/oder Polymerasen erzeugt wurden, sind demnach nur dann sinnvoll vergleichbar, wenn zuvor nachgewiesen wurde, daß trotz methodischer Unterschiede dieselben Amplifikationsprodukte entstehen. Dies muß bei gemeinschaftlichen RAPD-Projekten verschiedener Arbeitsgruppen unbedingt beachtet werden. Auf Grund der nicht exakt vorhersagbaren Kinetik einer PCR mit Zufallsprimern können verschiedene Aufheiz- und Abkühlgeschwindigkeiten der Geräte die Amplifikation ebenso beeinflussen, wie die Tatsache, daß gleiche Temperatur-Sollwerte nicht unbedingt gleichen Istwerten entsprechen. Letzteres kann z. B. zu einer Tolerierung bzw. Nicht-Tolerierung unvollständiger Primer-Genom-Paarungen führen, (sogenannte Mismatches), die auf unvollständige Sequenzhomologie zwischen Primer und Genom zurückzuführen sind. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn als Sollwert eine stringente, d.h. nahe dem Primerschmelzpunkt liegende Anlagerungs-Temperatur gewählt wurde und der Istwert eines der Geräte davon stärker abweicht als der andere. Je größer dann die Abweichung vom Sollwert ist, desto größer kann die Anzahl der pro Primer tolerierten Fehlpaarungen sein. Dies führt zur Amplifizierung anderer und/oder zusätzlicher DNA-Abschnitte.

Die Ergebnisse von OUELLET & SEIFERT (1993) sind an dieser Stelle so ausführlich mit den eigenen verglichen worden, um daran beispielhaft aufzuzeigen, worauf bei der Durchführung von RAPD-Analysen zu achten ist, will man reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse erhalten. Die Tatsache, daß viele Faktoren die Ergebnisse einer RAPD-PCR beeinflussen können, spricht nicht gegen die Technik als solche; werden sie bei der Versuchsplanung entsprechend berücksichtigt, sind RAPD-Marker verläßlich reproduzierbar. Unserer Erfahrung nach sind RAPDs eine brauchbare, einfache und schnelle Alternative zu den in der Mykologie bisher verwendeten Markern, sofern ein für den jeweiligen Organismus optimiertes und standardisiertes Protokoll entwickelt wurde.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bei der RAPD-PCR besonders auf folgende Aspekte zu achten ist:

- möglichst exakte Bestimmung der DNA-Konzentration
- Wahl der geeigneten DNA-Menge (Titrierungsversuche)

- Optimierung der Primer- und $MgCl_2$-Konzentrationen (vgl. auch WILLIAMS et al. 1990)
- Verwendung einer ausreichend thermostabilen Taq-Polymerase (Vergleich verschiedener Lieferfirmen)
- ausreichende Anzahl von Amplifikationszyklen
- hohe Pipettiergenauigkeit
- ausreichender Stichprobenumfang von Primern und Isolaten für das Screening
- nur stark amplifizierte und reproduzierbare Banden auswerten.

Darüberhinaus sind zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit Wiederholungsexperimente mit erneut extrahierter DNA und neu angesetzten Mastermixen zu empfehlen; diese sollten von anderen Personen, nach Möglichkeit in einem fremden Labor, durchgeführt werden. Abschließend sei darauf hingewiesen, daß für vergleichende Untersuchung mehrerer Arten darauf geachtet werden muß, daß für jede der Arten ungefähr dieselbe Anzahl gut differenzierender Primer ausgewählt wird. Bei überwiegender Verwendung von Primern, die besonders gut innerhalb nur einer der untersuchten Arten differenzieren, können sich die absoluten Werte der genetischen Distanzen deutlich verschieben, wie wir durch entsprechende Verrechnung zeigen konnten.

Danksagung

Die Autoren danken Frau Marika TAKÁCS für ihre sorgfältige und sachkundige technische Assistenz und Herrn Dr. T. MIEDANER für die Überlassung von Pilzisolaten. Die Untersuchungen wurden vom Bundesminister für Forschung und Technologie (BEO 21/0318897B) unterstützt.

Literatur

BAHNWEG, G., E. M. MöLLER, A. G. SCHILLING & H. SANDERMANN (1994) – Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) der Nadelparasiten *Rhizosphaera* spp. und *Lophodermium* spp. Z. Mykol. **60**(1): 231–238.

BEYER, W., H. HÖXTER, T. MIEDANER, E. SANDER, & H. H. GEIGER (1993) – Indirect ELISA for quantitative assessment of *Fusarium* spp. in rye. J. Plant Diseases and Protection, 100(3): 278– 284.

BOOTH, C. (1971) – The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK, 237 Seiten.

BOWDEN, R. L. & J. F. LESLIE (1992) – Nitrate-nonutilizing mutants of *Gibberella zeae (Fusarium graminearum)* and their use in determining vegetative compatibility. Experimental Mycol., 16: 308–315.

CAETANO-ANOLLES, G., B. J. BASSAM & P. M. GRESSHOFF (1991) – High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/Technology, 9: 553–556.

– & – (1992) – DNA Fingerprinting: MAAPing out a RAPD redefinition? Bio/Technology, 10: 937.

CHELKOWSKI, J. (Hrg.) (1989) – *Fusarium* Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Elsevier, Amsterdam, 492 Seiten.

ELLSWORTH, D. L., K. D. RITTENHOUSE & R. L. HONEYCUTT (1993) – Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. BioTechniques 14(2): 214–217.

ERLICH, H. A. (Hrg.) (1989) – PCR Technology. Principles and Appications for DNA Amplification. Stockton Press. New York. 246 Seiten.

FOSTER, L. M., K. R. KOZAK, M. G. LOFTUS, J. J. STEVENS, & I. K. ROSS (1993) – The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. Mycol. Res. 97(7): 769–781.

GERLACH, W. & H. NIRENBERG (1982) – The genus *Fusarium* – A pictorial atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 209: 1–406.

HORNOK, L. (1980) – Serotaxonomy of *Fusarium* species of the sections Gibbosum and Discolor. Trans. Br. mycol. Soc. 74(1): 73–78.

KIM, D. H., R. D. MARTYN & C. W. MAGILL (1992) – Restriction Fragment Length Polymorphism Groups and Physical Map of Mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Phytopathology, 82(3): 346–353.

KISTLER H. C., P. W. BOSLAND, U. BENNY, S. LEONG & P. H. WILLIAMS (1987) – Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. Phytopathology 77: 1289–1293.

KWOK, S. & R. HIGUCHI (1989) – Avoiding false positives with PCR. Nature, 339: 237–238

MacPHERSON, J. M., P. E. ECKSTEIN, G. J. SCOLES & A. A. GAJADHAR (1993) – Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. Molecular and Cellular Probes 7: 293–299.

MANICOM, B. Q., M. BAR-JOSEPH, J. M. KOTZE & M. M. BECKER (1990) – A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. *Phytopa*thology, 80: 336–339.

MEUNIER, J. M. & P. A. D. GRIMONT (1993) – Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Res. Microbiol., 144: 373–379.

MÖLLER, E. M., G. BAHNWEG, H. SANDERMANN & H. H. GEIGER (1992) – A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentus fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nuc. Acids Res. 20(22): 6115–6116.

NEI, M. & W. H. LI (1979) – Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5269–5273.

NIRENBERG, H. I. (1976) – Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion Liseola. Mitteilungen Biologische Bundesanstalt Land-/Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, 169: 1–117.

OUELLET, T. & K. A. SEIFERT (1993) – Genetic Characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. Phytopathology 83(9): 1003–1007.

PENNER, G. A., A. BUSH, R. WISE, W. KIM, L. DOMIER, K. KASHA, A. LAROCHE, G. SCOLES, S. J. MOLNAR & G. FEDAK (1993) – Reproducibility of Random amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis among laboratories. PCR 2(4): 341–345.

ROLFS, A., I. SCHULLEP, U. FINCKH & I. WEBER-ROLFS (1992) – PCR: Clinical Diagnostics and Research. Springer-Verlag, 271 Seiten + Anhang.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH & MANIATIS, T. (1989) – Molecular cloning. A laboratory manual. 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

SCHILLING A. G, E. M. MÖLLER, H. H. GEIGER (1994) – RAPDs of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*: Application for genotyping and species identification. In: Modern assays for plant pathogenic fungi. A. Schots, F. M. Dewey, and R. Oliver (eds.), pp. 47–56, CAB International, Oxford.

SNYDER W. C. & H. N. HANSEN (1945) – The species concept in *Fusarium* with reference to Discolor and other sections. A. J. Bot., 32: 657–666.

SZECSI, A. & A. DOBROVOLSZKY (1985b) – Genetic distance in fungus genus *Fusarium* measured by comparative computer analysis of DNA thermal denaturation profiles. Mycopathologia, 89: 95–100.

THRANE, U. (1990) – Grouping *Fusarium* Discolor isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite produktion. J. Microbiol. Meth. 12: 23–39.

WELSH, J. & M. McCLELLAND (1990) – Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nuc. Acids Res. 18: 7213–7218.

WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI & S. V. TINGEY (1990) – DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuc. Acids Res. 18: 6531–6535.

WOLLENWEBER, H. W., & O. A. REINKING (1935) – Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin. 355 Seiten.

YU, K. & K. P. PAULS (1992) – Optimization of the PCR program for RAPD analysis. Nuc. Acids Res. 20(10): 2606.

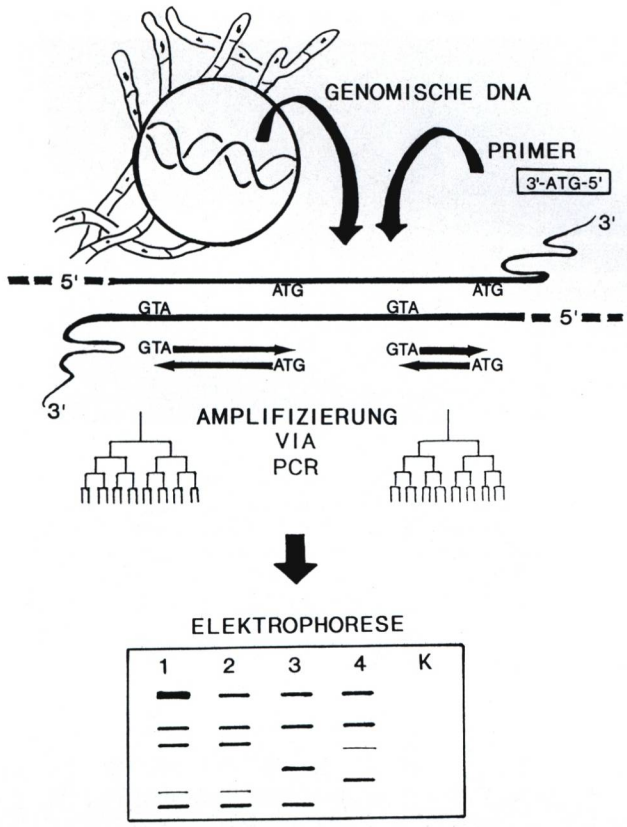

Abb. 1: Schematische Darstellung der Schritte einer RAPD-PCR. Die Primer-Sequenz ist mit nur 3 Basen angegeben, um die Polarität des Moleküls (3'-Ende vs. 5'-Ende) und die Syntheserichtung zu verdeutlichen. Die exponentielle Amplifizierung und die entstehenden Fragment-Muster sind symbolisch dargestellt. K = Kontrollreaktion ohne genomische DNA. Weitere Erläuterungen im Text.

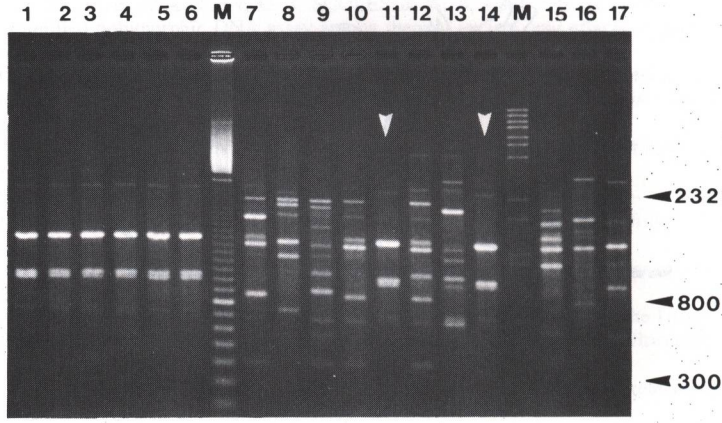

Abb. 2: Amplifikation genomischer DNA von sechs Isolaten *F. culmorum* (Spuren 1–6), sechs Isolaten *F. graminearum* (Spuren 7–10 und 12–13) sowie je ein Isolat *F. avenaceum* (Spur 15), *Microdochium nivale* (Spur 16) und *Pseudocercosporella herpotrichoides* var. *acuformis* (Spur 17) mit Primer UBC 85. Die mit weißen Pfeilen gekennzeichneten Spuren 11 und 14 zeigen zwei fälschlicherweise als *F. graminearum* klassifizierte Isolate. Mit M bezeichnete Spuren sind Molekulargewichtsstandards (100 bpLeiter, Pharmacia, links; λ-DNa, verdaut mit BstEII, rechts; Größenangaben in bp). Die Amplifikationsbedingungen sind in Material und Methoden beschrieben.

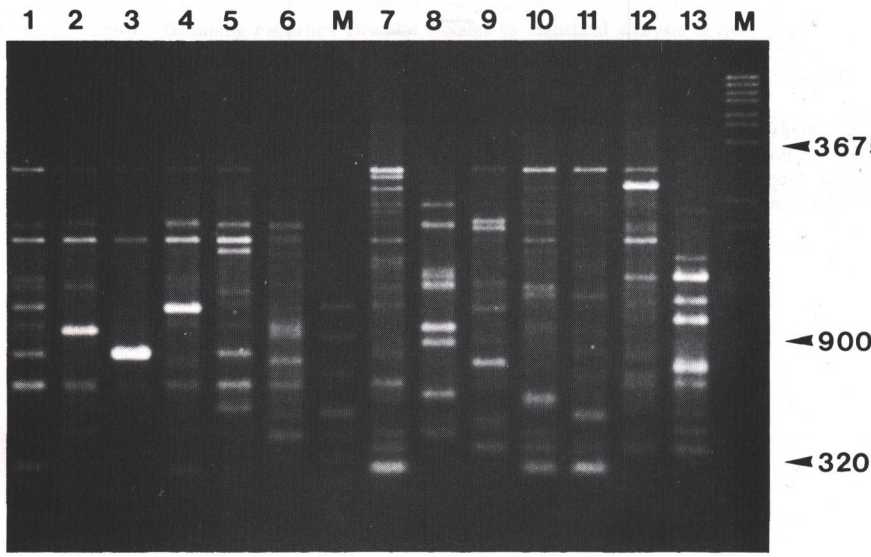

Abb. 3: Amplifikation genomischer DNA von sechs Isolaten *F. culmorum* (Spuren 1–6), sechs Isolaten *F. graminearum* (Spuren 7–12) sowie ein Isolat *F. avenaceum* (Spur 13) mit Primer UBC 30. Mit M bezeichnete Spuren sind Molekulargewichtsstandards (Standard VIII, Boehringer, links; λ-DNA, verdaut mit BstEII, rechts; Größenangaben in bp). Die Amplifikationsbedingungen sind in Material und Methoden beschrieben.

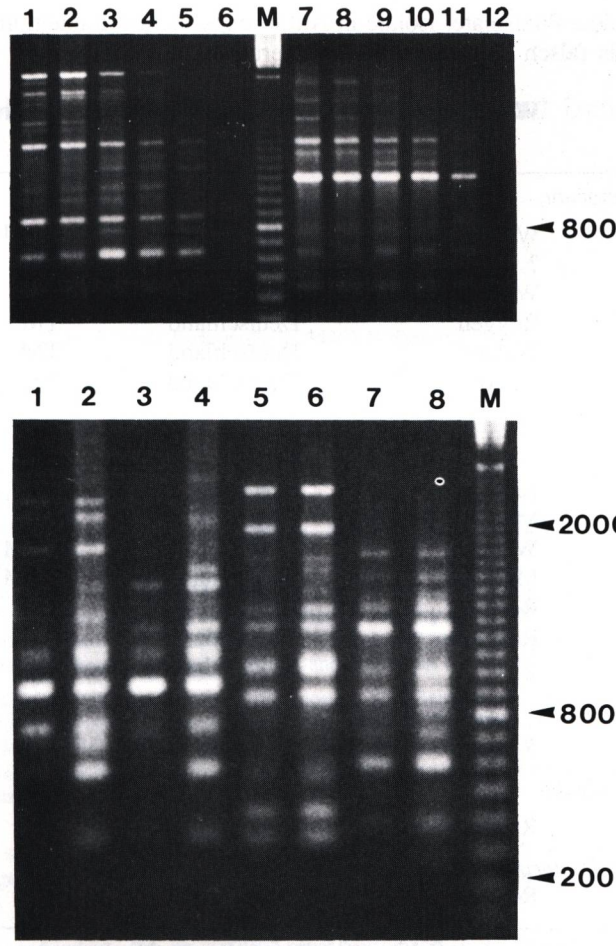

Abb. 4: Einfluß der Konzentration der genomischen DNA (oben) und der Anzahl der Amplifikationszyklen (unten) auf die Fragment-Muster einer RAPD-PCR. Mit M bezeichnete Spuren sind Molekulargewichtsstandards (100 bp-Leiter, Pharmacia; Größenangaben in bp).

Oben: Amplifikation genomischer DNA von *F. culmorum* (Spur 1: 320 ng, Spur 2: 32 ng, Spur 3: 3.2 ng, Spur 4: 320 pg, Spur 5: 32 pg, Spur 6: 3.2 pg) und *F. graminearum* (Spur 7: 250 ng, Spur 8: 25 ng, Spur 9: 2.5 ng, Spur 10: 250 pg, Spur 11: 25 pg, Spur 12: 2.5 pg) mit Primer UBC 75.

Unten: Amplifikation genomischer DNA von *F. culmorum* (Spuren 1–2, 5–6) und *F. graminearum* (Spuren 3–4, 7–8) mit Primer UBC 1 (Spuren 1–4) bzw. UBC 2 (Spuren 5–8). Die Amplifikationen mit 35 Zyklen (Spuren 1, 3, 5 und 7) und 45 Zyklen (Spuren 2, 4, 6 und 8) sind jeweils direkt nebeneinander aufgetragen.

Tab. I: Verwendete Pilzisolate. Isolate in Anführungszeichen konnten im Verlauf der Untersuchungen als falsch klassifiziert identifiziert werden.

Isolat	**Wirtspflanze**	**Geographische Herkunft**	**Referenz**
Fuscarium culmorum			
FC 3.1	Weizen	?	CBS[1] 251.52
FC 3.7	?	Canada	TM[2]
FC 3	Weizen/Boden	Norwegen	TM
FC 9	Roggen	Deutschland	TM
FC 11	Weizen	Deutschland	TM
FC 16	Roggen	Deutschland	TM
F. graminearum			
FG 7.1	Weizen	Niederlande	CBS 389.62
FG 7.2.	Banane	Honduras	CBS 415.86
FG 7.3	Mais	Südafrika	CBS 316.73
„FG 7.4“	Weizen	Bulgarien	DSM 62223
FG 7.5	Mais	Deutschland	DSM[3] 4528
FG 8	Roggen	Deutschland	TM
FG 10	Roggen	Deutschland	TM
„FG 13“	?	Deutschland	TM
F. avenaceum			
FA 3	Roggen	Deutschland	TM
Microdochium nivale			
MN	Roggen	Deutschland	TM
Pseudocersporella herpotrichoides var. *acuformis*			
PHA!	Roggen	Deutschland	TM

CBS[1] = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
DSM[2] = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
TM[3] = Dr. T. Miedaner, Landessaatzuchtanstalt, Stuttgart, Deutschland

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): Möller E. M., Schilling A. G., Geiger H. H., Bahnweg G.

Artikel/Article: Identifizierung und Charakterisierung von Genotypen getreidepathogener Fusarium-Arten mit RAPD-Markern 239-252