

Westfälische
Wilhelms-Universität
Münster

**Molekulare Analyse des
Genoms von
*Gibberella pulicaris***

Diplomarbeit
vorgelegt von

Lars von Olleschik-Elbheim

aus Glendale, Arizona

Münster, im November 1992

...nichts ist unbedeutend, nur weil es klein ist.

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

bei Herrn Prof. Dr. Paul Tudzynski für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit,

bei Prof. Dr. Friedhelm Meinhardt für die Übernahme des Koreferats,

bei Dr. Klaus-Michael Weltring für vielfältige Unterstützungen im praktischen und theoretischen Bereich,

bei Barbara für Beratung in Stilfragen,

bei, Helga, Heike, Ulrike, Ulrike, Sabine, Sabine, Reinhild, Thomas, Birgitt, Katrin, Uta, Claudia, Siegfried, Peter, Petra, Hinrich, Frau Kammerahl, Frau Höfer und Frau Mäckler für ihre Unterstützung, das schöne Arbeitsklima und manch guten Rat,

bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben,

bei Lisa und Josephine für ihr Verständnis und die schönen Bilder.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Demethylierung von Pisatin als ein Faktor für die Virulenz von <i>N. haematococca</i>	3
1.2	Untersuchungen zum Abbau von Phytoalexinen durch <i>G. pulicaris</i>	6
1.3	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)	8
1.4	Karyotypanalyse mit Hilfe von Pulsfeldgelelektrophoresetechniken	12
1.5	Problemstellung: Molekulare Analyse des Genoms von <i>Gibberella pulicaris</i>	14
2.	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Stämme	16
2.1.2	Genbanken	16
2.1.3	Chemikalien	17
2.1.4	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	18
2.2	Medien und Kulturbedingungen	19
2.2.1	<i>E. coli</i>	19
2.2.2	<i>G. pulicaris</i>	19
2.3	Methoden	19
2.3.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	19
2.3.1.1	Kochmethoden I und II	19
2.3.1.2	Plasmidisolierung mit Hilfe von Qiagensäulen	20
2.3.2	DNA-Präparation von <i>G. pulicaris</i>	20
2.3.2.1	DNA-Präparation mit Aufreinigung im CsCl-Gradienten	21
2.3.2.2	CTAB-Methode	21
2.3.3	Restriktion und Gelelektrophoresen	22
2.3.4	Radioaktive Markierung genomischer DNA	22
2.3.5	Koloniefilterhybridisierung	22
2.3.6	Southernanalyse	23
2.3.6.1	"Southern blots"	23
2.3.6.2	Nichtradioaktive Markierung der Sonden	23
2.3.6.3	Hybridisierung und Detektion	24
2.3.6.4	Dehybridisierung	25
2.3.7	Protoplastierung von <i>G. pulicaris</i>	25
2.3.8	chDNA-Präparation	26
2.3.8.1	ChDNA aus Protoplasten	26
2.3.8.2	ChDNA aus Mycel	26
2.3.9	Pulsfeldgelelektrophorese	26
2.3.9.1	Verwendete Apparatur	26
2.3.9.2	Trennbedingungen	27
2.3.10	Kreuzung von <i>G. pulicaris</i>	28
2.3.10.1	Substrat, Kulturbedingungen	28
2.3.10.2	Isolation und Anzucht der Ascosporen	29
2.3.11	Virulenztest auf Kartoffeln	29
2.3.12	Test auf Rishitinabbaufähigkeit	30
2.3.13	Kopplungsanalyse der RFLP-Marker	30
2.3.13.1	Erfaßte Daten	30

	2.3.13.2	Berechnete Parameter	31
3.		Ergebnisse	33
3.1		Kreuzung der <i>G.pulicaris</i> Stämme R-6380 und R-7843	33
	3.1.1	Kreuzungsansätze	33
	3.1.2	Isolation der Ascosporen	34
3.2		Analyse des Virulenzverhaltens und der Rishitinabbaufähigkeit der Elternstämme der Elternstämme und Kreuzungsnachkommen	36
	3.2.1	Virulenzverhalten im Biotest	36
	3.2.2	Rishitinabbaufähigkeit	39
3.3		Molekulare Analyse von Nachkommen aus der Kreuzung <i>G.pulicaris</i> R-6380 x R-7843	41
	3.3.1	Optimierung der Detektion von RFLP's mit nichtradioaktiv markierter DNA	42
	3.3.2	Suche nach geeigneten RFLP-Markern für die Segregationsanalyse der Nachkommen	44
	3.3.3	Hybridisierung der Nachkommen-DNA mit geeigneten RFLP-Sonden	48
	3.3.4	Segregationsanalyse der detektierten Marken	53
3.4		Karyotypanalyse verschiedener Stämme von <i>G.pulicaris</i>	58
	3.4.1	Optimierung der chDNA-Präparation	58
	3.4.2	Optimierung der Pulsfeldgelelektrophoresebedingungen für verschiedene Größenbereiche der Chromosomen	60
	3.4.3	Karyotypen der analysierten Stämme	70
4.		Diskussion	72
4.1		Kreuzung der <i>G.pulicaris</i> Stämme R-6380 und R-7843	72
4.2		Analyse des Virulenzverhaltens und der Rishitinabbaufähigkeit der Elternstämme und der Kreuzungsnachkommen	73
	4.2.1	Virulenzverhalten im Biotest	73
	4.2.2	Rishitinabbaufähigkeit	77
4.3		Molekulare Analyse von Nachkommen aus der Kreuzung <i>G.pulicaris</i> R-6380 x R-7843	78
	4.3.1	Optimierung der Detektion von RFLP's mit nichtradioaktiv markierter DNA	78
	4.3.2	Suche nach geeigneten RFLP-Markern für die Segregationsanalyse der Nachkommen	79
	4.3.3	Segregationsanalyse der detektierten Markern	80
4.4		Karyotypanalyse verschiedener Stämme von <i>G.pulicaris</i>	82
	4.4.1	Optimierung der chDNA-Präparation	82
	4.4.2	Pulsfeldgelelektrophoretische Auftrennung	83
5.		Zusammenfassung	85

6.	Anhang	87
6.1	Quellcode RFLPDet1	87
6.1.1	Unit Zusätze	87
6.1.2	Hauptprogramm: RFLPDet1	89
6.2	Verzeichnis aller aus der Kreuzung <i>G.pulicaris</i> R-6380 x R-7843 isolierten Nachkommen	104
6.3	Verzeichnis aller mit Hilfe der Cosmid- und Plasmid-Genbanken detektierten RFLP-Marker zwischen <i>G.pulicaris</i> R-6380 und R-7843	105
6.4	RFLP-Analyse: Kopplungsanalyse für jede Kombination der detektierten Marken	108
7.	Literatur	111

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
χ	chi
Δ	delta
λ	lambda
φ	phi
%	Prozent
°C	Grad Celsius
'	Minuten
μ	micro-
Abb.	Abbildung
AMPPD	(3-"2'-spiroadamantan)-4-methoxy-4(3"phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetan
Bed.	Bedingungen
bezgl.	bezüglich
ca.	cirka
chDNA	chromosomale DNA
Chr.	Chromosom
cM	Centimorgan
Cos	Cosmid
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dest.	destilliert(es)
DIG	Dioxigenin
DNA	Desoxiribonucleinsäure
dUTP	Desoxyuridinosintriphosphat
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
f.sp.	forma specialis
FL	FastLane-Agarose
g	Gramm
ges.	gesamt
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
lin	linear
log	logarithmisch
m	milli-
M	molar
m.E.	mit Einschränkungen
M.U.	Morgan Einheit(en)
max.	maximal
mbp	Megabasenpaare
min.	Minute(n)
mind.	mindestens
MOPS	3-N-morpholino-propansulfonische Säure
n.b.	nicht bestimmt
n.r.M.	nicht radioaktive Markierung
nicht erf.	nicht erfaßt
Nr.	Nummer(n)
o.a.	oben angeführt(en)

org.	organisch(e)
PB	Plasmidbande
pers. Mittlg.	persönliche Mitteilung
PPI	Protoplasten
PTG	Promotor-Test-Genbank
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SB	Schatten-Bande
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Grüne Pflanzen können von einer Vielzahl von Krankheiten betroffen sein. Dabei wird eine Krankheit für Pflanzen definiert als signifikante Abweichung vom normalen Metabolismus (Dickinson und Lucas 1982). Somit fällt die Beschäftigung mit jedem Agens, sei es belebt oder nicht, das eine derartige Abweichung hervorrufen kann, in den Bereich der Phytopathologie.

Bei diesen Agenzien kann es sich um physikalische oder chemische Einflüsse, um anorganische oder organische giftige Substanzen, um Pflanzen, Tiere oder Mikroorganismen handeln.

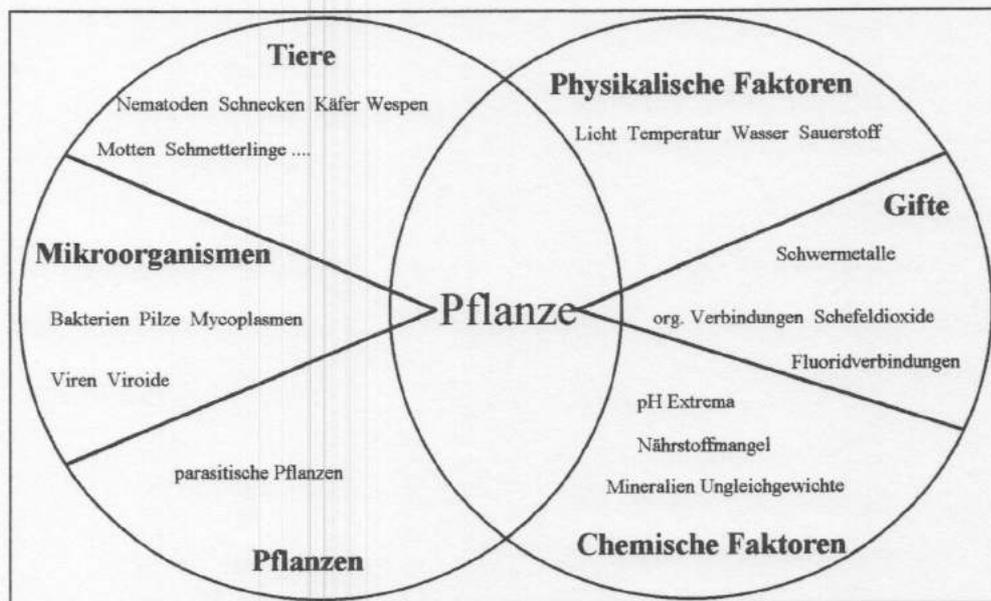


Abb. 1.1: Beispiele für Agenzien, die Pflanzenkrankheiten verursachen können. Verändert nach Dickinson und Lucas (1982).

Auch wenn die Pilze in der Abb. 1.1 nur als einer der Verursacher von Pflanzenkrankheiten aufgeführt werden, ist ihr Anteil insbesondere an den Krankheiten landwirtschaftlich genutzter Pflanzen doch erheblich.

Im Sommer 1845 breitete sich in Irland die Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), hervorgerufen durch den Pilz *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, epidemieartig aus. Der größte Teil der Ernte ging verloren. Da das Land weitgehend auf den Ertrag aus dem Kartoffelanbau angewiesen war, waren Hungersnöte und eine große Auswanderungswelle die unmittelbaren Folgen (Schumann 1991). Mit den Untersuchungen über die Zusammenhänge dieser Epidemie begann die intensive Forschung auf dem Gebiet der Pflanzenkrankheiten.

Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Pilzen als Erreger von Pflanzenkrankheiten beschrieben. Infektionswege und Krankheitsverläufe wurden in vielen Fällen detailliert studiert. Für eine Übersicht sei auf die Bücher von Schumann (1991), Peggs und Ayres (1987) sowie Dickinson und Lucas (1982) verwiesen.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist das Wechselspiel zwischen Pilz und Pflanze. Zwei interessante Fragestellungen lauten: Welche Abwehrmechanismen hat die Pflanze, um die Etablierung des Pilzes zu verhindern oder einzudämmen? Wie überwindet ein Pilz die Abwehrmechanismen der Pflanze?

Die bisher bekannten Abwehrmechanismen von Pflanzen gegenüber Pathogenen werden von Scheel (1992) in 7 Gruppen unterteilt, die in Tabelle 1.1 zusammengestellt sind.

Abwehrreaktion der Pflanze	Mechanismus der Aktivierung
Hypersensitive Reaktion	unbekannt
Phytoalexin-Akkumulation	spezifische Genaktivierung
Veränderungen der Zellwandzusammensetzung <ul style="list-style-type: none"> • Imprägnierung mit phenolischen Substanzen • Einlagern von Proteinen • Kallose-Apposition 	spezifische Genaktivierung
Akkumulation lytischer Enzyme	spezifische Genaktivierung
Akkumulation von PR (pathogenesis-related) Proteinen	spezifische Genaktivierung
Umregulation der Genexpression	spezifische Genaktivierung oder Inaktivierung
Induktion von Resistenz gegenüber Zweitinfektionen	spezifische Genaktivierung (?)

Tab. 1.1: Typische Abwehrreaktionen von Pflanzen gegen Pathogene, nach Scheel (1991).

Wie der Tabelle 1.1 zu entnehmen ist, werden Abwehrreaktionen in der Regel auf genetischer Ebene reguliert.

Einer der aufgeführten Faktoren bei der pflanzlichen Abwehrreaktion ist die Akkumulation sogenannter Phytoalexine.

Phytoalexine sind im allgemeinen lipophile Substanzen, die als Sekundärmetabolite von Pflanzen synthetisiert und häufig an Infektionsstellen oder an Wunden derart hoch akkumuliert werden, daß sie hemmend auf die Entwicklung von Pilzen oder Bakterien wirken (Kuc und Rush 1985). Kuc und Rush (1985) geben an, daß in mindestens 17 Pflanzenfamilien Phytoalexin-Akkumulation im Rahmen der Abwehrreaktion gegenüber Pathogenen beobachtet wurde.

Ihrer Ansicht nach ist die Kompetenz bestimmte, als Phytoalexine einsetzbare, Sekundärmetabolite produzieren zu können, charakteristisch für eine Pflanzenfamilie. Entscheidend für die Resistenz gegenüber bestimmten Pathogenen ist nicht die Synthesefähigkeit an sich, sondern die genetische Ausstattung der Pflanze, mit deren Hilfe sie die Pathogene erkennt und daraufhin Syntheseraten und Akkumulationsorte der von ihr synthetisierbaren Phytoalexine steuert.

Im Unterschied zu den Abwehrmechanismen von Tieren gegenüber einzelnen Pathogenen, z.B. mit Hilfe von Antikörpern, ist die Regulation bei Pflanzen weniger spezifisch.

Pflanzen erkennen in erster Linie Verletzungen und den Kontakt mit "Nicht-selbst"-Komponenten, die als Elicitoren wirken .

So werden beispielsweise nach Untersuchungen von Varns *et al.* (1971b) gekochte, wäßrige Extrakte von *Phytophthora infestans* durch *Solanum tuberosum* unabhängig von Pilzrasse oder Kartoffelsorte über die gleichen Elicitoren (bestimmte Fettsäuren, aus den Gruppen der Arachidonsäuren und Eicosapentaenonsäuren) erkannt und lösen Phytoalexin-Akkumulation, sowie die hypersensitive Reaktion aus (Varns *et al.* 1971a). Kompatible Rassen müssen demnach über Gene verfügen, mit deren Hilfe sie die prinzipiell mögliche Erkennung durch den Wirt unterdrücken (Kuc und Rush 1985).

Kann ein Pilz die Erkennung durch die Pflanze nicht oder nur zum Teil verhindern, so wird er mit den Abwehrreaktionen der Pflanze konfrontiert.

Erfolgreiche Pathogene müssen in diesen Fällen in der Lage sein, z.B. die von der Wirtspflanze synthetisierten Phytoalexine in weniger toxische Komponenten umzuwandeln. Alternativ bzw. ergänzend dazu können die Pathogene so ausgestattet sein, daß sie von den produzierten Phytoalexinraten nicht oder nur wenig gehemmt werden (VanEtten *et al.* 1982).

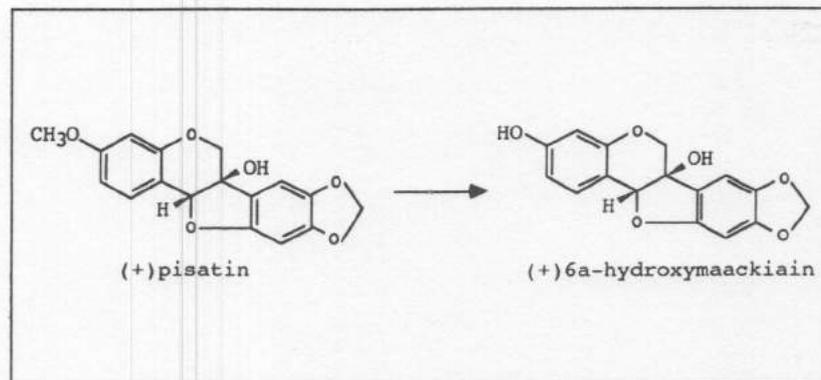
Als Beispiele für solche Parasiten seien hier die auch im weiteren besprochenen Fusarien-Arten *Nectria haematococca* (Berk.) (anamorph: *Fusarium solani* [Mart.] Sacc.) und *Gibberella pulicaris* (Fries) Sacc. (anamorph: *Fusarium sambucinum* [Fuckel]) angeführt. Bei beiden handelt es sich um ubiquitär verbreitete Organismen, die eine Reihe von pflanzlichen Wirten befallen, darüberhinaus aber auch saprophytisch existieren können.

1.1 Demethylierung von Pisatin als ein Faktor für die Virulenz von *N.haematococca*

Die Entgiftung des Phytoalexins Pisatin aus Erbsen (*Pisum sativum* L.) durch *N.haematococca* MP VI gehört zu den bestuntersuchten Beispielen für den Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zum Phytoalexinabbau und der Virulenz eines Pilzes (Weltring 1992).

VanEtten *et al.* (1989) fanden eine enge Korrelation zwischen der Virulenz von Wildisolaten und ihrer Fähigkeit, Pisatin abzubauen zu können.

Stoffwechselphysiologisch handelt es sich bei dem entscheidenden Entgiftungsschritt um eine Demethylierung. Das Schlüsselenzym dabei ist eine Cytochrom P-450 Monooxygenase, die die Demethylierung von Pisatin zu 6a-Hydroxymaackiaïn katalysiert (VanEtten *et al.* 1975, 1989).



Schäfer *et al.* (1989) bezeichnet sie als "fundamentale Gene für Pathogenität", die reinen Saprophyten offenbar fehlen.

Die Befunde weisen stark darauf hin, daß das *Pda*-Gen ein wichtiger Faktor für die Virulenz auf *P.sativum* ist.

Bezüglich der Lokalisation der *Pda*-Gene bei *N.haematococca* wurden Untersuchungen zur Karyotypanalyse durchgeführt (Miao *et al.* 1991a/b). In vorausgegangenen Kreuzungen war aufgefallen, daß das *Pda6*-Gen nicht wie erwartet segregierte. *N.haematococca* ist ein haploider Ascomycet, so daß bei der Kreuzung zweier Stämme mit einem aktiven *Pda6-1*-Gen nur Pda^+ -Nachkommen erwartet wurden. Tatsächlich beobachtete man aber in einigen Asci eine 4:4 Aufspaltung des Pda^+ - und Pda^- -Phänotyps. Bei den Pda^- -Nachkommen konnte das *Pda6-1*-Gen über Hybridisierung von genomischer DNA mit dem *PdaT-9*-Gen nicht nachgewiesen werden, woraus auf einen Totalverlust des Gens im Rahmen der Meiose geschlossen werden mußte.

In Hybridisierungen des klonierten *PdaT-9* Genes mit pulsfeldgelelektrophoretischen Auftrennungen von chDNA (chromosomale DNA) der Elternstämme aus der o.a. Kreuzung wurde das *Pda6-1*-Gen bei beiden Eltern auf einem 1,6 mbp großen Chromosom lokalisiert. Alle Pda^- -Nachkommen aus dieser Kreuzung zeigten Veränderungen, die das 1,6 mbp Chromosom betrafen (Miao *et al.* 1991b). Das Chromosom fehlte oder war teilweise deletiert. Auch für die Pda^+ -Nachkommen waren innerhalb des ursprünglichen 1,6 mbp Chromosoms Veränderungen aufgetreten. Hier wurden ebenfalls Deletionen beobachtet, die jedoch nicht das *Pda6-1*-Gen umfaßten. In anderen Fällen war das gesamte 1,6 mbp Chromosom doppelt vorhanden.

Auch die veränderten Chromosomen der F_1 -Generation erwiesen sich in weiteren Kreuzungen als instabil. Aus diesen Beobachtungen schlossen Miao *et al.* (1991b), daß es sich bei dem beobachteten Chromosom um ein B-Chromosom handeln müsse.

Unter B-Chromosomen, wie sie von Jones und Rees (1982) für Insekten und höhere Pflanzen beschrieben wurden, versteht man Chromosomen ohne funktionale Gene für den Organismus, die im Rahmen der Meiose ungenau auf die Nachkommen verteilt werden.

B-Chromosomen bei Pilzen waren bis dahin nur für *Magnaporthe grisea* (Mills und McCluskey 1990) beschrieben.

Im Unterschied zur Definition der B-Chromosomen enthält das entdeckte 1,6 mbp Chromosom von *N.haematococca* funktionale Gene. Neben dem *Pda6*-Gen wurde von Miao *et al.* (1991b) ein weiteres für die Metabolisierung des Phytoalexins Maackiain wichtiges *Mak*-Gen auf dem instabilen Chromosom lokalisiert.

Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß instabile Chromosomen möglicherweise eine Rolle bei der genetischen Variabilität phytopathogener Pilze spielen (Miao *et al.* 1991b).

1.2 Untersuchungen zum Abbau von Phytoalexinen durch *G.pulicaris*

G.pulicaris ist wie *N.haematococca* ein phytopathogener heterothallischer Ascomycet. Er hat ein breites Wirtsspektrum und wurde von den unterschiedlichsten Substraten isoliert (Erde, Mais, Kartoffeln, Zuckerrohr, Nelken, Kakteen, Pinien u.a. Desjardins *et al.* 1986, 1989).

Eine bekannte, von *G.pulicaris* ausgelöste Pflanzenkrankheit ist die Trockenfäule der Kartoffel. *G.pulicaris* dringt vornehmlich über vorhandene Wunden, wie sie z.B. im Rahmen der Ernte entstehen können, ein und bewirkt das Verrotten des Kartoffelgewebes. Diese Krankheit führt jährlich zu 6% (seltener bis 25%) Verlusten bei eingelagerten Kartoffeln (Chelkowski 1989). Während der Infektion produziert *G.pulicaris* für Tiere und Menschen giftige Trichothecen-Toxine (Hohn 1992), so daß befallene Knollen nicht weiter verwendet werden können.

Die Kartoffel synthetisiert auf entsprechende Reize, z.B. Verletzung, eine Reihe von Phytoalexinen, mit denen der Pilz konfrontiert wird. Die in den höchsten Konzentrationen produzierten Phytoalexine sind die Sesquiterpene Rishitin und Lubimin (VanEtten *et al.* 1989).

Die bisher untersuchten virulenten Wildisolate von *G.pulicaris* sind, wie oben für *N.haematococca* beschrieben, genetisch so ausgestattet, daß sie diese Stoffe tolerieren und metabolisieren können (Desjardins und Gardner 1989).

Stamm Nr.	Habitat	Lubimin Toleranz	zurück-gewonnenes Lubimin ^a	Rishitin Toleranz	zurück-gewonnenes Rishitin ^a	Relative Virulenz auf Kartoffeln
R-6380	Kartoffel	90%	0 µg	82%	0 µg	78%
R-7843	Nelke	74%	0 µg	26%	126 µg	0%
R-5690	Boden	12%	82 µg	12%	170 µg	0%

Tab. 1.2: Lubimin-Toleranz, Rishitin-Toleranz, Rishitin-Metabolismus und Virulenz einiger Stämme von *G.pulicaris* auf Kartoffelknollen (verändert nach Desjardins und Gardner 1989).

^a Jeweils 200µg Rishitin und Lubimin waren in den Ansätzen enthalten. Angegeben ist der Restgehalt an Lubimin und Rishitin nach 7 Tagen.

Die genauen Abbauwege sind erst teilweise bekannt, insbesondere für das Rishitin kennt man bisher nur ein Abbauprodukt. Dabei handelt es sich um 11,12-Epoxyrishitin (Desjardins *et al.* 1992).

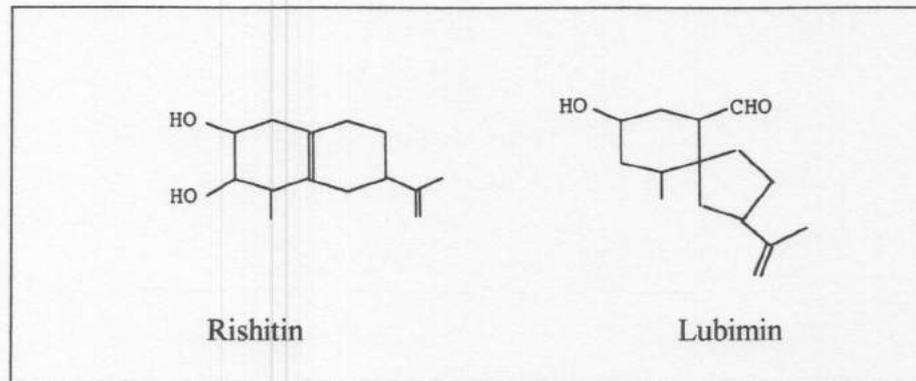


Abb: 1.2: Die Hauptphytoalexine der Kartoffel: Rishitin und Lubimin. Aus Weltring (1992).

Untersuchungen zum Rishitinmetabolismus von Brindle *et al.* (1985) lassen die Hypothese zu, daß der erste Abbauschritt des Rishitins zum 11,12-Epoxyrishitin, wie bei *N.haematococca* (s.o.), um durch eine P-450 Monooxygenase katalysiert werden könnte.

Von Desjardins und Beremand (1986) wurde ein geeignetes genetisches System für *G.pulicaris* etabliert. Sie bestimmten für eine Reihe von Stämmen die Kreuzungstypen und untersuchten, welche Substrate für Kreuzungen verwendet werden können. Als gut geeignet haben sich dabei Kreuzungsansätze auf tyndalisierten Maulbeerbaumästchen (*Morus alba*) erwiesen.

Für genetische Untersuchungen zur Virulenz und Phytoalexin-Toleranz wurde eine Kreuzung zwischen R-6380 und R-7843 durchgeführt (Desjardins und Gardner 1989). Diese Kreuzung, die mit 1104 bezeichnet wurde, war insofern nicht ideal, als R-7843 gegenüber dem hochvirulenten R-6380 immer noch schwach virulent war und auch eine gewisse Rishitin- und Lubimintoleranz aufwies. Ein anderer, nichtvirulenter Stamm vom passenden Kreuzungstyp stand jedoch nicht zur Verfügung.

Desjardins und Beremand (1989) stellten für ihren Kreuzungsansatz 1104 fest, daß keine voll ausdifferenzierten 8sporigen Tetraden gebildet wurden. Im Durchschnitt fanden sie 5 oder weniger auskeimende Sporen pro Ascus.

Innerhalb ihrer Analysen fanden sie, daß die Merkmale Koloniefarbe, Trichothecen-Hydroxylierung, Kreuzungstyp und die Fähigkeit Protoperithezien zu bilden im Verhältnis 1:1 segregierten. Dagegen stellten sie Abweichungen in der Segregation der Merkmale Rishitinmetabolismusfähigkeit (3:1, hoch zu gering) und Virulenz auf Kartoffeln (1:3, hoch zu gering) fest. Hohe Virulenz und hohe Rishitinmetabolismusfähigkeit waren dabei immer gekoppelt.

Ein Nachkomme aus der Kreuzung 1104, bezeichnet als 1104-R-6, hatte den Kreuzungstyp von R-7843, war Rishitin sensitiv und schwach virulent. Mit ihm wurde eine Rückkreuzung, bezeichnet als Kreuzung 1421, mit R-6380 durchgeführt. Die Asc

dieser Kreuzung enthielten im Schnitt 7 keimungsfähige Ascosporen, so daß vollständige Tetraden isoliert und analysiert werden konnten.

Für die Nachkommen dieser Kreuzung beobachteten Desjardins und Gardner (1989) eine 4:4 Segregation für die Eigenschaft der Virulenz auf Kartoffeln.

Für den rishitintoleranten Phänotyp beobachteten sie 4:4, 6:2 und in einem Fall 8:0 (nichttolerant:tolerant) Aufspaltungen. Daraus schlossen sie, daß die Rishitintoleranz von mindestens 2 Genen bewirkt wird, von denen jedes allein für den toleranten Phänotyp ausreicht. Rishitintoleranz und Rishitinmetabolismusfähigkeit segregierten in allen untersuchten Tetraden gekoppelt.

Das völlige Verschwinden des toleranten und virulenten Phänotyps in einer isolierten Tetrade deutet auf Genverlust innerhalb der Meiose hin.

Denkbar wäre, daß die Toleranz- und Virulenzgene auf instabilen Chromosomen lokalisiert ist, wie z.B. für das *Pda*-Gen bei *N.haematococca* (Miao *et al.* 1991b) gefunden.

Alle rishitinsensitiven Nachkommen waren nur schwach virulent, wodurch Desjardins und Gardner (1990) die Hypothese, daß Rishitintoleranz für hohe Virulenz erforderlich ist, gestützt sahen.

Nachkommen aus der Kreuzung 1421 wurden untereinander und wiederum mit R-6380 für weitere Analysen der Segregation von Virulenz- und Metabolismus-Genen verwendet (Desjardins *et al.* 1992). Dabei konnte für die Fähigkeit zum Rishitinabbau die Existenz von mindestens 2 Metabolismusgenen (*Rim1* und *Rim2*) bestätigt werden. Hohe Virulenz erwies sich als gekoppelt an das *Rim1*-Gen, das den Phänotyp des schnellen Rishitinmetabolismus bewirkt.

Zur Zeit wird versucht, wie bei *N.haematococca* mit dem *PdaT9*-Gen gelungen, ein Rishitinmetabolismus- oder ein Lubiminmetabolismusgen zu klonieren (Weltring pers. Mittlg.).

Dazu wurde eine Cosmid-Genbank konstruiert (Desjardins *et al.* 1992), die das Genom des Feldisolates *G.pulicaris* R-6380 umfaßt. R-6380 ist hochvirulent auf Kartoffeln, kann Rishitin und Lubimin metabolisieren und ist gegenüber beiden tolerant (Tab 1.2).

Mit dieser Genbank wird zur Zeit ein anderes Feldisolat *G.pulicaris* R-5690 transformiert. R-5690 ist nicht virulent, wenig tolerant gegenüber Lubimin und Rishitin und kann beide nur langsam metabolisieren (Tab. 1.2).

Ziel ist, metabolisierende Transformanten zu erhalten und aus diesen, analog zum *Pda*-Gen, zumindest eines der Metabolismusgene wieder zu reisolieren.

1.3 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Ein weiterer Ansatz ein derartiges Gen zu isolieren ist es über "Chromosome walking" zu finden.

Dazu muß jedoch zunächst das Genom von *G.pulicaris* R-6380 näher charakterisiert werden. Darauf aufbauend sind chromosomale Marker zu finden, die in unmittelbarer Nähe des zu isolierenden Gens lokalisiert sind.

Für diesen Zweck ist die Erstellung einer RFLP-Karte erforderlich.

Um Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen (RFLP's) zu finden, trennt man die zuvor mit einem beliebigen Restriktionsenzym verdaut DNA zweier nahe verwandter Pilzstämme gelelektrophoretisch auf, blottet sie und hybridisiert mit Sonden, die DNA-Sequenzen des einen der beiden untersuchten Stämme enthalten. Erhält man dabei für beide Stämme ein unterschiedliches Hybridisierungsmuster, so liegt ein RFLP vor.

Diese Beobachtung kann auf DNA-Ebene eine der folgenden Ursachen haben:

- eine Schnittstelle für das zum Verdau der DNA eingesetzte Enzym ist in einem Stamm deletiert,
- es existiert in einem der Stämme eine zusätzliche Schnittstelle oder
- einer der beiden Stämme weist gegenüber dem anderen Insertionen oder Deletionen innerhalb desselben Restriktionsfragmentes auf.

Als Sonden für die Detektion solcher RFLP's werden häufig Einzelkopie-Sequenzen gewählt, da hierbei die auftretenden Bandenmuster in der Regel einfacher auszuwerten sind als bei Sonden, die Vielfachkopie-Bereiche detektieren (Cooley 1992).

Die Anwendungen, die eine RFLP-Analyse bietet, sind vielfältig.

Für die Erstellung von genetischen Karten mit Hilfe von Nachkommen einer Kreuzung werden zunächst Einzelkopie-RFLP-Marker für die beiden Elternstämme gesucht und mit diesen die Nachkommen untersucht (Hulbert *et al.* 1988).

Vielfachkopie-Sequenzen werden dagegen oft für Fingerabdruck Untersuchungen nahe verwandter Stämme eingesetzt, da sie viele Loci gleichzeitig erfassen.

Ein weiteres Beispiel sind RFLP-Untersuchungen, die zur Aufklärung von Stammbäumen dienen. Hierfür werden als RFLP-Sonden üblicherweise die hochkonservierten ribosomalen RNA-Sequenzen eingesetzt (Cooley 1992).

Wie erwähnt, sind RFLP-Analysen ein Hilfsmittel für die Erstellung genetischer Karten. Gegenüber anderen Markern haben RFLP-Marker laut Hulbert *et al.* (1988) und Cooley (1992) die folgenden Vorteile:

- sie sind in großer Zahl verfügbar, bei Bedarf Hunderte von Markern für eine einzige Kreuzung,
- sie sind in der Regel codominant, so daß Genotypen klar erkannt werden können,
- sie ermöglichen die Differenzierung zwischen homozygoten und heterozygoten Individuen,
- sie unterliegen keinem Selektionsdruck,
- die für die Analyse benötigte DNA kann aus jedem Gewebe gewonnen werden,

- häufig existieren viele Allele für den detektierten Locus und
- sie können bei enger Kopplung an interessierende Genorte unmittelbar als Startpunkte für die Klonierung der Gene über "Chromosome walking" eingesetzt werden.

Die Erstellung einer RFLP-Karte erfolgt über eine Analyse der RFLP-Muster der Nachkommen einer Kreuzung. Beobachtet wird dabei die Segregation möglichst vieler Marker, in denen sich die Eltern unterscheiden.

Bei RFLP-Markern ist für die beobachteten Allele von einer 1:1 Segregation auszugehen, insofern sie nicht auf unstabilen Chromosomen lokalisiert sind (s.o.). Daher wird zunächst die Verteilung der Allele eines Markers auf die Nachkommen daraufhin untersucht, ob sie signifikant von einem 1:1 Verhältnis abweicht. Eine Abweichung vom 1:1 Verhältnis kann auch zufällig auftreten. Daher sind statistische Tests erforderlich, um zu prüfen, ob das erhaltene Verhältnis in Bezug auf die Größe der Stichprobe signifikant ist und nicht zufällig erhoben wurde. Häufig wird als Kriterium der χ^2 -Wert unter der Hypothese einer Gleichverteilung der Allele berechnet (Sachs 1974, Fleiss 1981). Überschreitet χ^2 den Wert 3.84 (bei einer Verteilung mit einem Freiheitsgrad, siehe Fleiss [1981]), so ist das angenommene Kriterium mit 95%iger Sicherheit abzulehnen. Das bedeutet für den Fall der verglichenen Allele, daß sie zu 95% nicht frei verteilt vorliegen.

Im zweiten Schritt wird die Rekombinationsfrequenz zwischen zwei Markern anhand der Häufigkeiten der vier auftretenden Klassen von Nachkommen bestimmt. Die Rekombinationsfrequenz ist der Anteil an Nachkommen aus der untersuchten Nachkommenpopulation, der bezüglich des untersuchten Markerpaares je ein Allel der beiden Eltern besitzt.

Sie ist unmittelbar ein Maß für die Kopplung der Marker. Je niedriger die Rekombinationsfrequenz, desto seltener werden die Marker im Rahmen der Meiose durch "Crossing over"-Ereignisse getrennt und desto enger liegen sie folglich beieinander. In der Biologie spricht man statt von Rekombinationsfrequenzen auch von Morgan-Einheiten und meint dabei den genetischen Abstand zweier Marker (die Begriffe sind jedoch keine Synonyme!). Eine Rekombinationshäufigkeit zwischen zwei Markern von 1% entspricht einem CentiMorgan abgekürzt als 1cM.

Für eine vertiefende Einführung in die Erstellung genetischer Karten sei an dieser Stelle auf Suzuki *et al.* (1989) verwiesen.

Nachdem für die Markerpaare berechnet wurde, wie eng sie untereinander gekoppelt sind, muß wiederum ein statistischer Test durchgeführt werden, um abzuschätzen, ob die beobachtete Verteilung signifikant von einer zufälligen Verteilung abweicht (oder nicht). Dabei wird, wie oben, der χ^2 -Wert unter der Hypothese der freien Verteilung der Markerallele auf die Nachkommen berechnet. Zusätzlich wird oft das 95%

Konfidenz-Intervall (Bronson *et al.* 1989) ermittelt. Man versteht darunter nach Sachs (1974) ein aus Stichproben berechnetes Intervall, das den wahren aber unbekanntem Parameter (die tatsächliche Rekombinationshäufigkeit) mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit überdeckt.

In der Praxis (vgl. 2.3.13.2) berechnet man dazu die obere und untere Grenze dieses Intervalls, das die direkt berechnete Rekombinationshäufigkeit überdeckt. Der tatsächliche Wert liegt nun, bedingt durch die Größe der Stichprobe, mit 95% Wahrscheinlichkeit innerhalb dieses Intervalls.

Für eine nicht freie Verteilung der Marker liegt die Rekombinationshäufigkeit unter 50%. Sobald daher die obere Grenze des 95% Konfidenz-Intervalls deutlich größer als 50% Rekombinationshäufigkeit ist, muß die Annahme der Kopplung abgelehnt werden, bis eine Analyse mit einer höheren Zahl von Nachkommen möglich ist oder die Hybridisierung der Marker mit pulsfeldgelelektrophoretisch getrennten Chromosomen eindeutig Kopplung oder Nichtkopplung ergibt.

Ein dritter für die Signifikanz einer Kopplung wichtiger Wert ist der ϕ -Koeffizient. Er gibt an, ob die Verteilung auch unabhängig von der Stichprobengröße signifikant ist (Fleiss 1981).

Die erste RFLP-Karte für einen phytopathogenen Pilz wurde für *Bremia lactucae* von Hulbert *et al.* (1988) erstellt. Für die Erstellung dieser Karte wurden 61 RFLP-Loci gefunden. Mit diesen Markern konnte eine vorläufige genetische Karte, bestehend aus 13 Kopplungsgruppen, erstellt werden.

Beobachtet wurde die Cosegregation dieser Marker mit 8 Avirulenz-Loci. Dabei konnte für einen RFLP-Marker ein Abstand von 6,5 cM zum *Avr6*-Avirulenz-Gen ermittelt werden.

Die Größe des gesamten Genoms wurde auf 2.000 cM und 5×10^7 mbp (Hulbert *et al.* 1988) geschätzt. Demnach entspricht ein Abstand von 6,5 cM bei *B.lactucae* etwa 163 kbp.

Mit Hilfe dieses RFLP-Markers wird die Klonierung des *Avr6*-Gens über "Chromosome walking" versucht (Cooley 1992).

Auch für den Pilz *Magnaporthe grisea*, ein Reis-Pathogen, wird zur Zeit in mehreren Laboratorien an RFLP-Karten gearbeitet (Leong und Holden 1989, Valent und Chumley 1991, Skinner *et al.* 1990). Bislang konnten mit 175 Markern und 67 Kreuzungsnachkommen 6 Kopplungsgruppen (Valent und Chumley 1991) festgestellt werden. Auch hier beobachtete man Kopplung von RFLP-Markern und 2 potentiellen Avirulenzgenen und versucht ihre Klonierung über "Chromosome walking".

Eine weitere, detaillierte Karte ist von Tzeng *et al.* (1992) für *Cochliobolus heterostrophus* beschrieben worden. Sie wurde mit 91 Kreuzungsnachkommen und 132 Markern erstellt und überdeckt 941 cM. Für *C.heterostrophus* postulieren Tzeng *et al.*

(1992) ein kbp/cM Verhältnis von 23:1. Auch in diesem Fall ist die Isolation von pathogenitätsbeeinflussenden Genen geplant (Tzeng *et al.* 1992).

Als letztes Beispiel sei die von Raeder *et al.* (1989) erstellte genetische Karte für *Phanerochaete chrysosporium* angeführt. Hier wurden kbp/cM Verhältnisse von 59:1 ermittelt und Cluster von Lignin-Peroxidase Genen gefunden.

Ein Grund dafür, daß zur Zeit für mehrere Pilze RFLP-Karten erstellt und darauf aufbauend die Klonierung von Genen über "Chromosome walking" versucht wird, ist das Fehlen effizienter Transformationssysteme (Cooley 1992) für diese Pilze. Daneben entfällt beim "Chromosome walking" die oft schwierige Reisolation des Gens aus einem komplementierten Stamm.

1.4 Karyotypanalyse mit Hilfe von Pulsfeldgelelektrophoresetechniken

Im Rahmen der Charakterisierung eines Genoms werden in letzter Zeit immer häufiger pulsfeldgelelektrophoretische Auftrennungen von Chromosomen der untersuchten Organismen in die Analysen mit einbezogen.

Bei der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) handelt es sich um eine Technik, mit deren Hilfe sich DNA-Moleküle von bisher bis zu 12 mbp Größe (Mills und McCluskey 1990) voneinander trennen lassen.

Der Einsatz einer Pulsfeldgelelektrophoresemethode bei Pilzen wurde von Schwarz und Cantor (1984) sowie von Carle und Olson (1984) erstmals beschrieben. In beiden Fällen wurde PFGE für die Trennung von Chromosomen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt.

Die ursprüngliche Technik wurde mittlerweile weiterentwickelt, wie in den Übersichtsartikeln von Anand (1986) oder Mills und McCluskey (1990) dargestellt ist. Theoretische Betrachtungen der zugrundeliegenden Bewegung der DNA-Moleküle durch ein Gel, über dem ein pulsierendes elektrisches Feld liegt, wurden z.B. von Slater *et al.* (1987), sowie Lalande *et al.* (1987) veröffentlicht.

In üblichen Elektrophoresesystemen, die für die Trennung restringierter, genomischer DNA verwendet werden, können DNA-Fragmente von bis zu 20 kbp Länge aufgetrennt werden. Für größere Fragmente ist der Siebeffekt dieser Gele so stark, daß sie nicht mehr getrennt werden, da ihre Bewegung im Gel nicht mehr mit ihrer Größe korreliert ist (Mills und McCluskey 1990).

In Pulsfeldgelelektrophoresen wird nun der Winkel des elektrischen Feldes während des Laufes innerhalb vorgegebener Abstände verändert. Üblicherweise liegt diese Winkeländerung bei etwa 120° oder darunter. Beträgt die Winkeländerung 180°, so spricht man von Feldinversionsgelelektrophorese. Der die Trennung bewirkende Effekt beruht darauf, daß die DNA-Moleküle mit steigender Größe immer länger brauchen, bis sie sich nach einer Winkeländerung des Feldes wieder optimal zum elektrischen Feld

ausgerichtet haben und mit der Nettowanderung beginnen. Die Pulszeiten werden möglichst so gewählt, daß sich die Moleküle der Größenbereiche, die aufgetrennt werden sollen, hauptsächlich in der Reorientierungsphase und nur kurz in der Bewegungsphase befinden (Mills und McCluskey 1990).

Seit der Publizierung dieser Technik vor 8 Jahren sind für mehr als 25 Pilze Karyotypen (Cooley 1992) bestimmt worden, regelmäßig kommen neue hinzu.

Auch für die Gruppe der phytopathogenen Pilze wurde eine Reihe von Karyotypen bestimmt. Einige davon sind in Tab 1.2 dargestellt.

Spezies	Anzahl der Chromosomen	Größenbereiche der Chromosomen [kb]
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
A Chromosomen	3 - 5	2.000 - 6.000
B Chromosomen	3 - 10	270 - 1.200
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>		
A Chromosomen	15	1.300 - 3.700
B Chromosomen	1	1.300
<i>Fusarium oxysporum</i>		
f.sp. <i>conglutinans</i>	8	2.200 - 6.200
f.sp. <i>raphani</i>	11	630 - 6.400
<i>Leptosphaeria maculans</i>	6 - 14	390 - 2.150
<i>Magnaporthe grisea</i>		
A Chromosomen	5 - 6	3.000 - 12.000
B Chromosomen	1 - 4	500 - 2.000
<i>Nectria haematococca</i>	10 - 20	400 - >4.000
<i>Phoma tracheiphila</i>	12	700 - 1.600
<i>Phytophthora megasperma</i>	9 - 14	1.400 - 4.000
<i>Septoria nodorum</i>	14 - 19	500 - 3.500
<i>Septoria tritici</i>	17 - 18	330 - 3.500
<i>Tilletia caries</i>	12 - 15	880 - 4.000
<i>Tilletia contraversa</i>	12 - 16	880 - 4.400
<i>Ustilago hordei</i>	16 - 21	170 - 3.150
<i>Ustilago maydis</i>	20	300 - >2.000
<i>Ustilago tritici</i>	13	250 - 3.000

Tab 1.2: Elektrophoretische Karyotypen einiger phytopathogener Pilze. Nach Cooley (1992) und Mills und McCluskey (1990).

Die Auftrennung und die Größenbestimmung der Chromosomen eines Pilzes ermöglicht die Bestimmung der absoluten Genomgröße.

Diese kann dann z.B. im Rahmen einer RFLP-Analyse für die Bestimmung des Verhältnisses von physikalischem und genetischem Abstand zweier Marker (kbp/cM) verwendet werden.

Weiterhin läßt sich durch Hybridisierung von RFLP-Markern mit pulsfeldgel-elektrophoretisch aufgetrennten Chromosomen die Lage der Kopplungsgruppen bestimmen. Oft wird auch die Kopplung von Markern, die nach der genetischen Analyse einen Abstand von mehr als 20 cM haben, durch Hybridisierungsexperimente überprüft (Tzeng *et al.* 1992).

Nützlich ist die Auftrennung der Chromosomen für geplante Genklonierungen über "Chromosome walking". Es ist möglich, die aufgetrennten Chromosomen aus dem Gel zu isolieren und damit, wie von Zolan *et al.* (1992) für *Coprinus cinereus* beschrieben, chromosomenspezifische Genbanken anzulegen.

In jüngster Zeit erfährt bei phytopathogenen Pilzen insbesondere die Beobachtung der instabilen, kleinen B-Chromosomen-Äquivalente höchste Aufmerksamkeit. Nachdem von Miao *et al.* (1991b) auf einem solchen Chromosom von *N.haematococca* ein für die Resistenz gegenüber dem Phytoalexin Pisatin wichtiges Gen lokalisiert wurde, kann man sich für die B-Chromosomen eine wichtige Funktion beim lateralen Gentransport zwischen verschiedenen Pilzstämmen vorstellen. Trifft diese Hypothese zu, so könnte sie die hohe Variabilität mancher phytopathogener Pilze und ihre Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Wirte erklären.

1.5 Problemstellung: Molekulare Analyse des Genoms von *Gibberella pulicaris*

Innerhalb der hier vorgelegten Arbeit sollten Analysen des Genoms von *G.pulicaris* im Hinblick auf phytopathogene Merkmale durchgeführt werden.

Einerseits sollte versucht werden, die bisher unbekannt Karyotypen des auf Kartoffeln phytopathogenen Stammes R-6380 und der nicht phytopathogenen Stämme R-7843 und R-5690 zu bestimmen und zu vergleichen.

Auftretende Unterschiede zwischen den Karyotypen sollten daraufhin analysiert werden, ob sie in Verbindung mit phytopathogenen Eigenschaften stehen.

Parallel dazu sollte eine Kreuzung zwischen den Stämme R-6380 und R-7843 durchgeführt und eine Reihe von Nachkommen isoliert werden. Dieser Kreuzungsansatz ist bereits einmal von Desjardins und Gardner (1989) als fertil beschrieben (Kreuzung 1104) worden und diente daher u.a. der Etablierung der Kreuzungstechnik für *G.pulicaris* innerhalb der Arbeitsgruppe.

Für die Nachkommen sollten die von den Eltern vererbten Eigenschaften "Virulenz auf Kartoffeln" und "Fähigkeit zur Metabolisierung des Phytoalexins Rishitin" bestimmt werden.

Als dritter Bereich sollten die von Weltring (Desjardins *et al.* 1992) hergestellten Cosmid- und Plasmidgenbanken von *G.pulicaris* R-6380 daraufhin getestet werden, ob sie sich für die Suche nach RFLP-Markern eignen.

Für die gefundenen RFLP-Marker sollte ihre Segregation innerhalb der Kreuzungsnachkommen analysiert und vorhandene Kopplungsgruppen bestimmt werden.

Sofern vorhanden, sollten auch Kopplungen der untersuchten phytopathogenen Eigenschaften mit RFLP-Markern aufgezeigt werden.

Diese Untersuchungen sollten abklären, ob unter den gegebenen Voraussetzungen die Erstellung einer RFLP-Karte für *G.pulicaris* durchführbar und hilfreich für die Klonierung von Genen über "Chromosome walking" sein könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stämme

Gibberella pulicaris (Stamm R-6380): Wildisolat von *Solanum tuberosum* aus der Bundesrepublik Deutschland, Mat1-1, Mln⁺, Fmn⁺, Rim1⁺, Rim2⁺ (Desjardins und Gardner 1991). Die mit (K) bezeichneten Stämme wurden von Desjardins (pers. Mittlg.) zur Verfügung gestellt. Mit (L) bezeichnete Stämme wurden frisch aus lyophilisiertem Myzel, das von Nelson (pers. Mittlg.) zur Verfügung gestellt wurde, angezogen.

Gibberella pulicaris (Stamm R-5690): Bodenisolat (Desjardins und Gardner 1989).

Gibberella pulicaris (Stamm R-7843): Wildisolat von *Dianthus caryophyllus* (Gartennelke) aus Chile, Mat1-2, Mln⁺, Fmn⁻, Rim1⁻, Rim2⁻ (Desjardins und Gardner 1991). Die mit (K) bezeichneten Stämme wurden von Desjardins (pers. Mittlg.) zur Verfügung gestellt. Mit (L) bezeichnete Stämme wurden frisch aus lyophilisiertem Myzel, das von Nelson (pers. Mittlg.) zur Verfügung gestellt wurde, angezogen.

Nachkommen aus der Kreuzung 1104 (Desjardins und Gardner 1989) zwischen *G.pulicaris* Stamm R-6380 und R-7843 wurden freundlicherweise von Desjardins (pers. Mittlg.) zur Verfügung gestellt. Die Bezeichnung dieser Nachkommen beginnt mit 1104-.

Nachkommen aus der selbst durchgeführten Kreuzung von *G.pulicaris* Stamm R-6380 und R-7843 (Aufstellung, siehe Anhang). Die Bezeichnung dieser Nachkommen beginnt mit RAP oder P₃A₁- (vgl.3.1.2).

2.1.2 Genbanken

Promotor-Test-Genbank (PTG) von genomischer DNA von *G.pulicaris* R-6380 in *E.coli* HB101. 0,5 - 2,0 kbp Insertionen in pKBCosHT (Weltring unveröffentlicht).

Cosmid-Genbank von genomischer DNA von *G.pulicaris* R-6380 in *E.coli* DH1. 40 - 45 kbp Insertionen in pGPC1 (Desjardins *et al.* 1992).

2.1.3 Chemikalien

Amersham:	Hybond-N
Babendererde:	Nytex-Membran
Biometra:	PFGE-Chromosomenstandards (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , Stamm CBS 1058 und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm Way 5-4A), GTP-Agarose
Biozym:	FastLane-Agarose, InCert-Agarose
Boehringer:	Ethidiumbromid, Random Primed Labeling Kit, DIG DNA Labeling and Detection Kit, Nylonmembran
Diagen:	Qiagen-Affinitätschromatographiesäulen, Nylonmembranen
Difco:	Casaminsäuren
DuPont:	Genescreen-, Genescreen ⁺ -Nylonmembran, α -[³² P]-dATP
Felegara:	V8-Gemüsesaft
Gibco-BRL:	Agarose, Pepton No. 140, Yeast Extract, Select-Agar
Macherey-Nagel:	Membranfilter
New England Biolabs:	λ -Leiter PFGE Marker
Novo Biolabs:	Novozym 234 (Chargen: PPM-3276, PPM-3897)
Oxoid:	Malzextrakt
Pharmacia:	DNA-Polymerase I, Restriktionsenzyme
Riedel-de-Haen:	Essigsäure, Isopropanol
Roth:	Ethanol, Saccharose, Sorbit
Schleicher&Schuell:	Rundfilter, Membranfilter, Einmal-Filterhalter
Serva:	Ampicillin, Lysozym, Maleinsäure, Natriumdodecylsulfat (SDS), Dextranblau, Bromphenolblau
Sigma:	Driselase (Lot 29F-0206), Chitinase (LOT 11H4028), CTAB
Tropix:	AMPPD, CSPD
Westmilch:	Magermilchpulver

Alle weiteren Chemikalien stammen von der Firma Merck.

2.1.4 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

AMPPD-Lösung:	AMPPD-Vorratslösung (10 mg/ml) 1:100 verdünnt in Puffer III
Antikörperlösung:	Anti-DIG-Antikörperkonjugat 1:10.000 verdünnt in Puffer II.
CSPD-Lösung:	CSPD-Vorratslösung (11,6 mg/ml) 1:100 verdünnt in Puffer III
CTAB-Puffer:	1% CTAB, 0,7 M NaCl, 0,1% Mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl
chDNA-Lysepuffer :	10 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 1 mg/ml Proteinase K, 1% Sarkosyl, pH 8,0
Dehybridisierungs- Puffer:	1 x TE, 1% SDS
Denaturierungspuffer:	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH, pH 12,5
(Vor-)Hybridisierungs- lösung :	7% SDS, 5 x SSC, 2% Blocking (aus 10% Stammlösung in Puffer I), 0,1% Laurylsarkosyl, 50% Formamid
Lagerpuffer:	10 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA, pH 0,8
Lysis buffer:	0,5% Triton-X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 10 mM Saccharose, 0,1% Lysozym, pH 8,0
Neutralisationspuffer:	2 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 5,5
Pilz-Lysepuffer:	100 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% SDS, 0,2% Proteinase K
Puffer I (n.r.M.):	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5
Puffer II (n.r.M.):	1% Blocking Reagenz in Puffer I
Puffer III (n.r.M.):	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂
Saltfree:	10 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, pH 8,2
SSC (20x):	150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0
STC (0,85 M):	0,85 M Sorbit, 10 mM Tris-HCl, 50 mM CaCl ₂ , pH 7,5
STC (1,2 M):	1,2 M Sorbit, 10 mM Tris-HCl, 50 mM CaCl ₂ , pH 7,5
STET-Puffer:	8% Saccharose, 5% Triton-X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
TE:	10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0
TBE (10x):	0,89 M Tris-HCl, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 9,0 (für PFGE)
TAE (20x):	0,8 M Tris-HCl, 40 mM EDTA, pH 8,0 mit Essigsäure eingestellt (für PFGE und normale Elektrophoresen)
Waschlösung I :	0,1% SDS, 2 x SSC
Waschlösung II:	0,1% SDS, 0,1 x SSC
Waschpuffer:	0,3% Tween20 in Puffer I

2.2 Medien und Kulturbedingungen

2.2.1 *E.coli*

Die Anzucht der *E.coli*-Klone aus den Genbanken erfolgte auf LB-Medium nach Miller (1972) (10 g/l Casein, 5 g/l Yeast Extract, 5 g/l NaCl, pH 7,2, 2% Agar [nur für Festmedien], dem jeweils 50 mg/l Ampicillin zugefügt wurde (Selektionsdruck).

Flüssigkulturen wurden bei 37°C und 180 U/min inkubiert.

2.2.2 *G.pulicaris*

Platten-, bzw. Schrägagarröhrchenkulturen der verwendeten Stämme wurden mit V8-Medium (Stevens 1974), bestehend aus: 3 g/l CaCO₃, 20% V8-Gemüsesaft und 2% Agar angelegt.

Die Platten wurden bei RT unter ständiger Beleuchtung inkubiert, um die Sporulation anzuregen.

Flüssigkulturen mit abgeschwemmten Sporen erfolgten in YEPD-Medium, bestehend aus: 0,3% Yeast Extract, 1% Pepton und 2% Glucose. Die Inkubation erfolgte bei 28°C und 180 U/min.

2.3 Methoden

2.3.1 Plasmidisolierung aus *E.coli*

Um eine optimale Ausbeute an Plasmid- bzw. Cosmid-DNA für anschließende Markierungsexperimente zu erhalten, wurden verschiedene Methoden zur Plasmidisolierung getestet.

2.3.1.1 Kochmethoden I und II

Kochmethode I

Diese Methode für eine Plasmid Minipräparation im Eppendorfmaßstab erfolgt nach einer Beschreibung von Holmes und Quigley (1981).

Die eingesetzten Klone wurden dazu in je 1 ml LB_{amp} angeimpft und ü.N. auf dem Schüttler inkubiert, pelletiert, in 75 µl Lysepuffer resuspendiert und wie bei Holmes und Quigley (1981) beschrieben weiter behandelt.

Kochmethode II

Im Unterschied zu der o.a. Kochmethode I wurde hier ein anderer Lysepuffer, bezeichnet als "Lysis buffer", verwendet. Darüberhinaus wurde die DNA 2mal gefällt, um eine höhere Aufreinigung zu erreichen.

Die wie in Kochmethode I angezogenen und pelletierten Zellen wurden in je 200 µl Lysis buffer (Weltring, unveröffentlicht) resuspendiert, genau 1 Minute gekocht und dann für 15 Minuten in einer Eppendorf Zentrifuge (12.000 U/min) zentrifugiert. Das Pellet wurde entfernt und die Plasmid- bzw. Cosmid-DNA mit 0,1 Vol 3 M Na-Acetat und 2 Vol Ethanol bei -70°C für 30 Minuten gefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation in der Eppendorf Zentrifuge (12.000 U/min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 100 µl TE gelöst. Dann wurden je 50 µl Wasser und anschließend 100 µl einer wäßrigen Lösung mit 20% PEG 4000 und 2,5 M NaCl zupipettiert und die Fällung für eine Stunde bei 0°C durchgeführt. Anschließend wurde wiederum für 15 Minuten in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und abschließend in 20 µl TE aufgenommen.. Diese Isolationsmethode lieferte eine höhere DNA-Ausbeute als Kochmethode I und wurde daher insbesondere für die Plasmidpräparation verwendet.

2.3.1.2 Plasmidisolation mit Hilfe von Qiagensäulen

In dieser Plasmid-, bzw. Cosmidisolationmethode wird die Plasmidisolation durch alkalische Lyse und eine daran anschließende Aufreinigung der isolierten DNA mit Hilfe von Affinitätschromatographiesäulen durchgeführt. Man erhält so weitgehend von Verunreinigungen freie DNA-Präparationen. Die Anzucht der Klone erfolgte wie oben beschrieben, jedoch in einem größeren Volumen (5-10ml). Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Qiagen-tip-20 Säulen.

2.3.2 DNA-Präparation von *G.pulicaris*

Für die Präparation genomischer DNA von *G.pulicaris* wurden die Stämme zunächst für 3-5 Tage in Flüssigkultur angezogen, das Myzel dann abfiltriert, 2mal mit Wasser gewaschen, unter flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Das getrocknete Myzel wurde unter flüssigem Stickstoff aufgerieben und bis zur DNA-Isolation bei -20°C in geeigneten Plastikgefäßen gelagert.

2.3.2.1 DNA-Präparation mit Aufreinigung im CsCl-Gradienten

Das pulverisierte Myzel wurde in GSA-Bechern mit Pilz-Lysepuffer knapp 1 Minute resuspendiert, dann 1 h bei 37°C, sowie im Anschluß daran 1 h bei 60°C unter leichtem Schwenken inkubiert.

Myzelreste wurden im GSA-Rotor bei 10.000 U/min 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Zentrifugenbecher überführt, mit 1/10 Vol kaltem 5 M K-Acetat gemischt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden daraufhin durch Zentrifugation (27.500 g, 15') abgetrennt und der Überstand wiederum in ein neues Gefäß überführt. Hier wurde die DNA-haltige Lösung mit 1 Vol Isopropanol überschichtet und vorsichtig gemischt. Die DNA wurde, soweit möglich, um eine leicht gekrümmte, zugeschmolzene Pasteurpipette gewickelt, in 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA wieder in TE gelöst.

Die DNA-Lösung wurde mit CsCl versetzt, mit Hilfe des Refraktometers wurde dabei eine Dichte von 1,391 eingestellt und anschließend die DNA-Lösung in Ultrazentrifugationsröhrchen gefüllt. Jedem Ultrazentrifugationsröhrchen wurden 50 µl Ethidiumbromid zugefügt und die Röhrchen verplombt. Die anschließende Ultrazentrifugation erfolgte bei 45.000 U/min für 20 Stunden. Der CsCl-Gradient wurde unter UV-Licht betrachtet und die durch interkalierendes Ethidiumbromid deutlich sichtbaren DNA-Banden mit Hilfe einer feinen Kanüle gezapft.

Zum Entfernen des Ethidiumbromids wurde mehrmals mit CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Sowie bei Betrachtung unter UV-Licht keine Ethidiumbromidreste mehr zu erkennen waren, wurde mit 3 Vol TE verdünnt, die DNA mit 2 Vol Ethanol gefällt und wiederum aufgewickelt. Die Pasteurpipetten mit anhaftender DNA wurden kurz in 70%iges Ethanol gewaschen, die DNA an der Luft getrocknet und in 50-200 µl TE gelöst.

Die DNA war nach dieser Aufarbeitung sehr sauber und gut schneidbar.

2.3.2.2 CTAB-Methode

Da im Zuge der RFLP-Analyse sehr häufig genomische DNA isoliert werden mußte, wurde in der Regel eine vereinfachte, schnelle DNA-Isolation bevorzugt. Diese Methode wurde von Doyle (1990) als gut geeignet zur Isolation von pflanzlicher DNA beschrieben. Der von Doyle (1990) angegebene CTAB-Puffer wird für die Präparation pilzlicher DNA 1:1 mit Wasser verdünnt und dann eingesetzt.

Je Ansatz wurden 0,4 g pulverisiertes, gefriergetrocknetes Myzel in 10 ml CTAB-Puffer, der bereits auf 60°C vorgewärmt war, resuspendiert und 1 Stunde bei 60°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach der Lyse wurde mit 1 Vol kaltem Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Dabei wurde vorsichtig (Rollen zwischen den Händen) gemischt, um Scherkräfte gering

zu halten. Die Phasentrennung erfolgte in der Regel im Ausschwingrotor (Beckman JS-13) für 30' bei 1.600 x g. Die wäßrige (obere) Phase wurde vorsichtig in ein Glasröhrchen überführt und mit 2/3 Vol Isopropanol überschichtet. Nachdem die DNA deutlich sichtbar ausfiel, wurden die Phasen allmählich gemischt. Das Präzipitat wurde, wenn es sich nicht aufwickeln ließ, durch 2 Minuten Zentrifugation bei 500 x g pelletiert und in 76%igem Ethanol mit 10 mM Ammoniumacetat mindestens eine Stunde gewaschen. Falls nötig wurde wiederum bei 500 x g zentrifugiert und getrocknet. Abschließend wurde das getrocknete Pellet in 1 ml TE aufgenommen. Die DNA-Ausbeuten liegen in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm zwischen 15 und 100 µg pro 0,1 g lyophilisiertem Myzel.

2.3.3 Restriktion und Gelelektrophoresen

Gelelektrophoresen und Restriktionen, sowohl chromosomaler, als auch Cosmid- bzw. Plasmid-DNA wurden nach den von Maniatis *et al.* (1982) angegebenen Methoden durchgeführt.

Von der chromosomalen DNA für die RFLP-Analyse wurden jeweils 8-10 µg DNA in 140 µl Restriktionsansätzen mit 20 Units des jeweiligen Restriktionsenzym für 3-5 Stunden verdaut. Die DNA wurde mit 1/10 Vol 3 M Na-Acetat und 2 Vol Ethanol gefällt, getrocknet und in 25 µl TE aufgenommen.

Die Auftrennung der DNA erfolgte in 0,8 - 1% igen Agarosegelen, die für die RFLP-Analyse mit Tris-Acetat-Puffer bei 25 V, ansonsten mit Saltfree-Puffer bei 100 V, durchgeführt wurden. Als Größenstandard diente mit Hind III restringierte λ-DNA.

Nach der Elektrophorese wurde die im Gel aufgetrennte DNA mit ethidiumbromidhaltigem (50 µg/l) Elektrophoresepuffer gefärbt, unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und photographiert.

2.3.4 Radioaktive Markierung genomischer DNA

Die DNA (1 µg) wurde zunächst mit BamH I restringiert, dann 5' bei 95°C denaturiert und 10' auf Eis inkubiert.

Die Markierung erfolgte mit Hilfe des Random Prime Labeling Kits von Boehringer Mannheim nach Angaben des Herstellers. Als radioaktives Nukleotid wurde α-[³²P]-dATP eingesetzt.

2.3.5 Koloniefilterhybridisierung

Für die Koloniefilterhybridisierung nach Grunstein und Hogness (1975), wurden LB_{amp}-Platten mit Vereinzlungsansätzen von *E.coli* Klonen der verwendeten Genbanken eingesetzt.

Die radioaktive Hybridisierung erfolgte nach einer Methode von Johnson *et al.* (1984). Die Vor- und die Hybridisierungslösung enthielten jeweils 0,25% Magermilchpulver. Die Reststrahlung der Filter wurde nach dem letzten Waschschrift mit einem Detektor gemessen, die Filter dann in Klarsichtfolie eingeschlagen und für mehrere Tage auf einen Röntgenfilm mit Verstärkerschirm aufgelegt. Die Exposition erfolgte im Gefrierschrank bei -20°C.

2.3.6 Southernanalyse

Für die RFLP-Analyse mußte eine Vielzahl von "Southern blots", Hybridisierungen und Dehybridisierungen durchgeführt werden. Dabei war die Aufgabe, alle Hybridisierungen möglichst nichtradioaktiv, mit Hilfe des Digoxigenin-(DIG)-Systems von Boehringer Mannheim durchzuführen. Die Detektion erfolgte mit den nach Aktivierung durch alkalische Phosphatase lichtemittierenden Farbstoffen AMPPD und CSPD der Firma Tropix.

2.3.6.1 "Southern blots"

Der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten, erfolgte auf geladene und ungeladene Nylonmembranen verschiedener Hersteller. Geblottet wurde jeweils nach Angabe der jeweiligen Membranhersteller.

Der größte Teil der Blots erfolgte auf ECL-getesteter, ungeladener Hybond-N Membran.

Nach dem Blotten wurden die Membranen in 2 x SSC gewaschen und die DNA durch 2stündiges Backen bei 80°C hitzefixiert.

2.3.6.2 Nichtradioaktive Markierung der Sonden

Die Markierung der Sonden erfolgte nach den Anweisungen des verwendeten DIG DNA Labeling and Detection Kits der Firma Boehringer Mannheim. Bei diesem System ist eines der verwendeten Nukleotide, das dUTP an Digoxigenin (DIG) gekoppelt, so daß die neu synthetisierte DNA mit Hilfe von Anti-DIG-Antikörpern, die wiederum an alkalische Phosphatase gekoppelt sind, detektiert werden kann.

Bei der markierten DNA handelte es sich um Plasmid-, bzw. Cosmid-DNA von Einzelklonen der verwendeten Genbanken. Vor der Markierung wurde die DNA durch 1stündige Restriktion mit EcoR I linearisiert, durch 10minütiges Erhitzen auf 95°C und anschließenden Kälteschock denaturiert und in dieser Form zum Markierungsansatz gegeben.

Zur Kontrolle der Markierungseffizienz wurden Verdünnungsreihen der markierten Sonden-DNA und der dem Kit beiliegenden markierten Kontroll-DNA bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} in 1 μl Portionen auf Nylonfilter pipettiert, hitzefixiert und mit diesen Filtern der nichtradioaktive Nachweis geführt.

Für eine Hybridisierung wurden nur solche Sonden verwendet, von denen 1 μl noch in der Verdünnung 10^{-5} detektiert werden konnte.

Derartig getestete Markierungsansätze wurden zunächst bei -20°C gelagert und für die Hybridisierungen in bis zu 12 ml Hybridisierungslösung verdünnt. Die verdünnten Sonden wurden bis zu 5 mal wiederverwendet.

2.3.6.3 Hybridisierung und Detektion

Nylonmembranen mit hitzefixierter DNA wurden zunächst in $2 \times \text{SSC}$ benetzt und dann in oben offene Hybridisierungsbeutel aus Kunststoff eingeschweißt. Pro 100 cm^2 Filterfläche wurden 15-20 ml auf 37°C vorgewärmte Vorhybridisierungslösung (verändert nach Church und Gilbert 1984) zupipettiert, die Hybridisierungsbeutel luftbasenfrei zugeschweißt und die Lösung durch mehrmaliges Streichen der Beutel über die Tischkante gleichmäßig verteilt.

Die weitere Hybridisierung und Detektion fand nach Angaben des Herstellers mit folgenden Änderungen statt:

Während der Hybridisierung und der Inkubation mit Antikörperlösung wurden die Filter luftblasenfrei eingeschweißt und die Lösungen jeweils durch Streifen der eingeschweißten Filter über die Tischkante gleichmäßig verteilt.

Einmal verwendete Hybridisierungslösungen wurden aufgefangen und bei -20°C eingefroren.

Für die Lumineszenzreaktion wurden für jeden Filter zwei Folien derart zurechtgeschnitten, daß der Filter darin eingeschweißt werden konnte (etwa 4 cm länger und breiter als der Filter). Je 1 ml frisch (im Verhältnis 1:100) in Puffer III verdünnter AMPPD- bzw. CSPD-Vorratslösung wurde zentral auf eine der Folien aufpipettiert.

Der Filter wurde mit der DNA-Seite auf den Tropfen gelegt und mit der zweiten Folie bedeckt. Mit Hilfe einer Pipette oder vorsichtigem Streichen mit den Fingern wurde die Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilt. Die obere Folie wurde abgenommen und überschüssige Flüssigkeit mit Whatman-Papier abgesaugt, so daß der Filter gerade noch leicht feucht blieb. Dann wurden die Filter eingeschweißt und die lichtemittierende Reaktion durch 10-15 minütige Inkubation bei 37°C aktiviert.

Auf die DNA-Seite der Filter wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und die Expositionstasche mit Glasplatten und Gewichten beschwert, um Filter und Film möglichst plan aneinanderzupressen.

Die Filme wurden nach 2 Stunden Expositionszeit entwickelt. Wenn das Signal noch zu schwach war, wurde erneut ein Film aufgelegt.

Die Leuchtreaktion hielt über mehrere Tage unvermindert an, der unspezifische Hintergrund nahm jedoch nach den ersten 3 Stunden zu.

2.3.6.4 Dehybridisierung

Für die Dehybridisierung wurden die Filter zunächst mit Wasser gewaschen und dann 2 mal 10 Minuten bei 99°C mit vorgewärmter Dehybridisierungslösung inkubiert. Abschließend wurden die Filter in 2 x SSC gewaschen und bis zur nächsten Hybridisierung feucht eingeschweißt.

Schonendere Dehybridisierungsmethoden führten in der Regel nicht zu einer vollständigen Entfernung der markierten Sonde.

2.3.7 Protoplastierung von *G.pulicaris*

Die Protoplastierung von *G.pulicaris* wurde nach einer Methode von Klaus Weltring (pers. Mittlg.) durchgeführt. Lediglich die Mengen der verwendeten zellwandlysierenden Enzyme wurden variiert.

Je drei eine Woche alte, sporulierende Kulturen des zu protoplastierenden Stammes auf V8-Agarplatten wurden mit 2mal 15 ml YEPD abgeschwemmt und die Sporen vom Myzel durch Mullfiltration (3 Lagen Mull) weitgehend abgetrennt. Der Sporentiter des Filtrats wurde bestimmt und 100 ml V8-Flüssigmedium mit $1-5 \times 10^8$ Sporen beimpft. Die Konidienkeimung erfolgte auf dem Schüttler für 10 Stunden.

Die gekeimten Konidien wurden durch Filtration über Nytex-Membran (Porengröße 20-30 µm) vom Kulturmedium getrennt und zweimal mit KCl-Lösung gewaschen. Die Molarität der dafür eingesetzten KCl-Lösung lag zwischen 0,8 und 1,2 Mol pro Liter.

Je 0,5-2 g Myzel wurden in 40 ml Protoplastierungspuffer (KCl-Lösung der gleichen Molarität, wie zum Waschen eingesetzt) mit 200-300 µg Novozym und 200-300 µg Driselase resuspendiert und in 10 ml Portionen in kleinen Erlenmeyerkolben bei 30°C unter leichtem Schütteln (etwa 80 U/min) 3-6 Stunden protoplastiert.

Das Restmyzel wurde wiederum durch Nytexfiltration abgetrennt und das die Protoplasten enthaltende Filtrat 5 Minuten bei 1.075 g abzentrifugiert, der Überstand abgossen, 10 ml KCl-Lösung zupipettiert, das Pellet resuspendiert und erneut für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl KCl aufgenommen und der Protoplastentiter bestimmt.

2.3.8 ChDNA-Präparation

Die Präparation chromosomaler DNA (chDNA), eingebettet in Agaroseblöckchen, kann aus Protoplasten oder auch direkt aus Myzel erfolgen (McCluskey *et al.* 1990).

2.3.8.1 ChDNA aus Protoplasten

Um chDNA aus Protoplasten zu gewinnen, wurden diese, wie von Kayser und Wöstemeier (1991) beschrieben, in Konzentrationen von 1×10^7 bis 1×10^9 Protoplasten/ml in 0,6% InCert-Agarose eingebettet. Die so hergestellten Agaroseblöckchen wurden je 2mal 24 h mit chDNA Lysepuffer bei 50°C inkubiert, mehrfach in Lagerpuffer gewaschen und in diesem bei 4°C aufbewahrt.

2.3.8.2 ChDNA aus Myzel

Von McCluskey, Russel und Mills (1990), sowie von Kayser (1991) wurden Methoden zur chDNA-Präparation direkt aus jungem Myzel beschrieben.

Bei chDNA-Präparationen aus Myzel (Kayser 1991) wurde das, wie für die Protoplastierung angezogene, Myzel mit 0,8 M KCl gewaschen und je 1-1,2 g in 1 ml 0,8 M KCl mit 0,7% InCert-Agarose und 20 mg Novozym 234 resuspendiert und Agaroseblöckchen gegossen. Diese Blöckchen wurden für 3 h bei 28°C in je 20 ml 1,2 M KCl mit 1% Novozym 234 inkubiert und im Anschluß daran wie oben beschrieben mit chDNA-Lysepuffer inkubiert.

2.3.9 Pulsfeldgelelektrophorese

2.3.9.1 Verwendete Apparatur

Für die Pulsfeldgelelektrophoresen wurde das System Rotaphor V5.1. der Firma Biometra (Göttingen) eingesetzt. Das Gerät arbeitet nach dem Prinzip der "Rotierendes-Feld-Elektrophorese" (RFE), wie sie von Southern *et al.* (1987) und Ziegler *et al.* (1987) beschrieben wurde.

Ein Vorteil der verwendeten Apparatur ist, daß viele Parameter über eine angeschlossene Steuereinheit (Controler) programmiert werden können. Dies ermöglicht eine flexible und reproduzierbare Variation aller wichtigen Trennparameter wie: Temperatur, Spannung, Winkel des elektrischen Feldes und Pulsdauer auch während des Laufes.

Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 x TAE oder 0,25 x TBE. Die Gele aus Elektrophoresepuffer mit 0,6-1% FastLane-Agarose wurden in zur Apparatur gehörenden Gießformen gegossen.

In die einzelnen Geltaschen wurden 1 oder 2 geviertelte Agaroseblöckchen plaziert und die Tasche mit 0,7%iger InCert-Agarose verschlossen. Die für die Trennung angelegte Spannung lag zwischen 1,6 und 5,8 V/cm. Die genauen Parameter sind im folgenden Abschnitt dargestellt (Tab. 2.1).

Als Größenstandards wurden, in Abhängigkeit vom zu analysierenden Trennbereich, λ -Leitern (48,5 kbp, 97,0 kbp,...,1018 kbp), sowie chDNA-Präparationen von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm WAY5-4A (245 kbp - 2,5 mbp, 13 Banden) und *Schizosaccharomyces pombe* Stamm CBS 1058 (3,0 mbp, 4,6 mbp, 5,7 mbp) eingesetzt.

2.3.9.2 Trennbedingungen

Es wurde eine Reihe von Trennbedingungen ausprobiert, um die Effekte auf die Auftrennung der Chromosomen in verschiedenen Größenbereichen zu studieren. Begonnen wurde mit Parametern, die von Kayser (1991) im Rahmen seiner Dissertation für die Karyotypanalyse bei *Penicillium janthinellum* eingesetzt wurden. Daneben wurden Bedingungen von Miao *et al.* (1991a), die zur Karyotypanalyse bei *Nectria haematococca* eingesetzt wurden und solche des Geräteherstellers Biometra (1990) auf ihre Eignung zur Trennung der hier vorliegenden Chromosomen getestet.

Nr.	Gesamtdauer	Pulszeiten	Winkel	Spannung	Temperatur	Gelstärke	Puffer
1	253 h	19 h: 500 s 48 h: 1000 s 42 h: 1500 s 48 h: 2000 s 48 h: 2500 s 48 h: 4000 s	120°	1,4 V/cm		0,7% FL	0,5xTAE
2	212 h	144 h: 350-1.800 s, lin 68 h: 1.800-5000 s, log	120°	1,4 V/cm	11°C	0,7% FL	0,5xTAE
3	258h	20 h: 500 s 24 h: 1.000 s 28 h: 1.800 s 48 h: 2.000 s 48 h: 2.500 s 40 h: 4.000 s	120°	1,4 V/cm	11°C	0,7% FL	0,5xTAE
4	240h	24 h: 500 s 24 h: 1.500 s 24 h: 2.500 s 24 h: 3.500 s 39 h: 4.000 s	120°	1,4 V/cm	11°C	0,8% FL	0,5xTAE
5	96h	96 h: 4.000-800 s, log	95°-110° lin	1,57 V/cm	13°C	0,7% FL	0,5xTAE
6	210h	130 h: 5.000-500 s, log 80 h: 500-50 s, lin	97°-110° lin 110°-115° log	1,53-1,63 V/cm 1,6-1,97 V/cm	12°C	1,0% FL	0,25xTBE
7	24h	6 h: 150 s 6 h: 90 s 12 h: 60 s	120°	5,8 V/cm	4°C	1,0%FL	0,25xTBE
8	24h	24 h: 100-20 s, lin	120°-100° log	7,0 V/cm	13°C	0,9% FL	0,25xTBE
9	24h	24 h: 100-20 s, lin	110°-100° lin	7,0 V/cm	13°C	1,0% FL	0,25xTBE

Tab. 2.1: Pulsfeldgelelektrophorese. Aufstellung der eingesetzten Trennparameter. Die Bedingungen 1 und 2 stammen von Kayser (1991), Bedingungen 3 und 4 sind von 1 abgeleitet. Die Bedingungen 5 sind variiert nach Biometra (1990), die Bedingungen 6 und 8 sind von Biometra (1990) übernommen, die Bedingungen 7 stammen von Miao *et al.* (1991a) und die Bedingungen 9 sind die Referenzbedingungen für den verwendeten Größenstandard *S.cerevisiae* WAY5-4A von Biometra (1992).

2.3.10 Kreuzung von *G.pulicaris*

2.3.10.1 Substrat, Kulturbedingungen

Schrägagarröhrchen (2% Wasseragar) mit tyndalisierten *Morus alba*-Ästchen wurden zunächst mit einer Sporensuspension von *G.pulicaris* R-6380 beimpft und bis zum Auftreten von Protoperithezien wie von Desjardins und Beremand (1986) beschrieben unter kontinuierlichem, 12stündigen Hell-Dunkel-Wechsel bei 25°C mit Licht, bzw. bei 20°C ohne Licht inkubiert. Sobald unter der Stereolupe Ansätze der Protoperithezienbildung zu erkennen waren (nach 6-8 Wochen), wurden die Kreuzungsansätze für eine Minute mit einer Sporensuspension von *G.pulicaris* R-7843 überschichtet und diese anschließend wieder abgegossen. Die Röhrchen wurden danach bei konstant 15°C bis zum Auftreten reifer Perithezien (weitere 4-8 Wochen) gelagert.

2.3.10.2 Isolation und Anzucht der Ascosporen

Für die Isolation der Ascosporen wurden die reifen Perithezien mit Hilfe einer Pinzette vom *M.alba*-Ästchen gelöst, auf Miracloth-Filtern mehrmals mit 0,1 M KCl gewaschen und auf Petrischalen mit 5%igem Wasseragar überführt. Die Perithezien wurden unter optischer Kontrolle unter dem Mikroskop mit Hilfe feiner Pinzetten vorsichtig geöffnet, so daß die Rosette mit den Asci aus dem Perithezium austrat. Die Ascosporen wurden mit Hilfe von feinen Pinselhaaren, die in die Spitzen von Pasteurpipetten geklebt waren, isoliert und in sporenfreie Bereiche auf dem Agar geschoben, bzw. gezogen. Der Bereich um eine vereinzelt Spore herum wurde mit der Impflanzette ausgestochen und mit der aufliegenden Spore in V8-Schrägagarröhrchen überführt. Die Keimung der Sporen wurde am nächsten Tag unter dem Binokular überprüft. Nach 10tägiger Anzucht bei RT unter ständiger Beleuchtung wurden die Röhrchen mit den mittlerweile wieder sporulierenden Nachkommen bei 4°C gelagert und als Stammröhrchen verwendet.

Alternativ zum "Knacken" der Perithezien konnten Ascosporen auch aus den Ascosporenmassen isoliert werden, die aus dem Ostium reifer Perithezien geschoben wurden. Dazu wurde der kompakte Ascosporentropfen oberhalb der Ostiumöffnung mit einer Pinzette abgehoben und in 500 µl dest. Wasser resuspendiert. Je 10 µl wurden auf Wasseragarplatten pipettiert und die Sporen wie oben beschrieben vereinzelt. Dieses Vorgehen hatte den Vorteil, daß die Verunreinigung mit Konidiosporen relativ gering war. Möglich ist mit dieser Technik jedoch nur die Isolation zufällig ausgewählter Ascosporen und nicht, wie im anderen Fall möglich, von ganzen Tetraden.

2.3.11 Virulenztest auf Kartoffeln

Der Vergleich der Virulenz auf Kartoffeln wurde wie von Desjardins und Gardner (1988) beschrieben durchgeführt. Da die von ihnen verwendeten Kartoffelsorten nicht zur Verfügung standen, wurde der Versuch mit deutschen Kartoffeln der Sorte Sieglinde (Wochenmarkt Münster) aus der Frühjahrsernte 1992 durchgeführt.

Die gewaschenen Kartoffeln wurden kurz in Alkohol abgeflammt. Dann wurden mit Hilfe einer Metallhülse Zylinder von 3 cm Durchmesser ausgestochen. Aus diesen wurden etwa 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten und je drei in eine feuchte Kammer (Petrischale mit angefeuchtetem Filterpapier) überführt. Pro Testansatz wurden jeweils drei Scheiben am Rand mit einem etwa 1 mm² großen Impfstück einer 5-7 Tage alten Kolonie des zu testenden Elter, bzw. Nachkommen aus der Kreuzung beimpft und für 5 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Scheiben gewogen, das verrottete Gewebe entfernt und der nicht angegriffene Rest erneut ausgewogen. Für Aussagen über die Virulenz wurde als Kriterium der Anteil des innerhalb der Inkubationszeit verrotteten Kartoffelgewebes verwendet.

2.3.12 Test auf Rishitinabbaufähigkeit

Für den Test auf Rishitinabbaufähigkeit wurden 5-7 Tage alte V8-Plattenkulturen verwendet.

In Schraubglaskölbchen, die je 250 µl 1%igen V8-Agar mit 75 µg Rishitin enthielten, wurden 1mm² große Impfstücke mit der Myzelseite nach unten auf die Agaroberfläche gelegt. Die Proben wurden für 3 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die Extraktion des nicht metabolisierten Rishitins erfolgte mit Hilfe von Ethylacetat. Jedem Ansatz wurden 300 µl Ethylacetat zugesetzt und über Nacht extrahiert. Jeweils 150 µl der so erhaltenen Ethylacetatextraktion wurde im Gaschromatographen im Vergleich mit einem Standard auf ihren Rishitingehalt hin analysiert.

Verwendet wurde ein Gaschromatograph der Firma Shimadzu GC 14A mit AOC-1400 Probengeber. Die Steuerung des Gaschromatographen erfolgte über einen CR4AX Chromatopac. Die verwendete Säule wird bezeichnet als OV1 (0,25 mm x 25 m x 0,25 µm). Das Temperaturprogramm war: 160°C → 240°C, ΔT = 6°C/min.

2.3.13 Kopplungsanalyse der RFLP-Marker

Die Kopplungsanalyse der RFLP-Marker erfolgte mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Turbo-Pascal Programms (Borland 1988), bezeichnet als: "RFLPDet1". Das Programm liefert in der derzeitigen Form Kopplungsanalysen, wie sie von Bronson *et al.* (1989) für das Programm HAPMAP beschrieben wurde. Im Gegensatz zu HAPMAP ist es jedoch in der Datenmanipulation flexibler und durch das Programmieren in einer Hochsprache bei Bedarf beliebig zu erweitern.

2.3.13.1 Erfasste Daten

Für die Kopplungsanalyse wurden die Bezeichnung des RFLP-Markers, das Restriktionsenzym, bei dem er in der analysierten Form auftrat und die RFLP-Muster der beiden Elternstämme erfaßt. Aus der Analyse der Hybridisierungen der jeweiligen Marker mit der DNA der untersuchten Nachkommen aus der Kreuzung wurde notiert, welchen der beiden Elterntypen ein Nachkomme im Hybridisierungsmuster repräsentierte oder ob er ein verändertes Muster aufwies.

2.3.13.2 Berechnete Parameter

Aus den erfaßten Daten wurden mit Hilfe des Programms RFLPDet1 für jede mögliche Markerkombination der theoretische Abstand in Centimorgan Einheiten (cM) berechnet. Als Kriterium für eine signifikante Kopplung der verglichenen Marker wurde aus den zur Verfügung stehenden Daten jeweils der χ^2 -Wert, der ϕ -Koeffizient, sowie das 95%-Konfidenz-Intervall ermittelt.

Kopplung zweier Marker wurde immer dann vermutet, wenn die errechneten Werte eine Nichtkopplung der Merkmale zu 95% ausschlossen.

Die Berechnungen erfolgten nach den Angaben von Fleiss (1981).

Nach Eingabe der Daten wurden die Kopplungswahrscheinlichkeiten innerhalb des Programms RFLPDet1 wie folgt berechnet:

Berechnung von χ^2

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^4 \frac{(|obs - exp| - 0,5)^2}{exp}$$

Dabei ist: i = je eine der vier möglichen Klassen von Nachkommentypen, obs = Anzahl der beobachteten Nachkommen mit den Eigenschaften der zugehörigen Klasse, exp = Anzahl der erwarteten Nachkommen mit den Eigenschaften der zugehörigen Klasse.

Berechnung der oberen und unteren Grenzen des 95% Konfidenz-Intervalls

$$obere\ Grenze = \frac{(2np + c^2 - 1) - c\sqrt{c^2(2 + \frac{1}{n}) + 4p(nq + 1)}}{2(n + c)}$$

$$untere\ Grenze = \frac{(2np + c^2 - 1) + c\sqrt{c^2 + (2 - \frac{1}{n}) + 4p(nq + 1)}}{2(n + c^2)}$$

Dabei ist: obere Grenze, bzw. untere Grenze = Grenze des 95% Konfidenz-Intervalls, p = Anteil der Rekombinanten, $q=1-p$, $c=1.96$. Ist $p=0$ so wird die untere Grenze auch gleich 0 gesetzt.

Berechnung des ϕ -Koeffizienten

$$\phi = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}}$$

Dabei ist: n = die Zahl der Nachkommen insgesamt.

Das Programm RFLPDet1 gibt die so berechneten Werte, zusammen mit den zugehörigen Markerkombinationen, den ermittelten Rekombinationshäufigkeiten und den Häufigkeiten der 4 möglichen Klassen in Form einer Tabelle aus. Der Quellcode des Programms ist im Anhang wiedergegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Kreuzung der *G.pulicaris* Stämme R-6380 und R-7843

Die Kreuzung der beiden Fusarien Stämme verfolgte zwei Ziele.

Einerseits sollte die von Desjardins und Beremand (1986) beschriebene Vorgehensweise für eine erfolgreiche Kreuzung von *G.pulicaris* im Labor etabliert werden, indem zunächst eine bereits durchgeführte, d.h. erwiesenermaßen kompatible Kreuzung nachvollzogen wurde.

Die Erfahrungen aus diesem Kreuzungsansatz sollen in Zukunft für weitere Kreuzungsansätze Anwendung finden, in denen als ein Kreuzungspartner z.B. ein transformierter Stamm eingesetzt wird.

Desweiteren sollten die Nachkommen aus dieser Kreuzung für die RFLP-Analyse bei *G.pulicaris* eingesetzt werden. Es galt vorhandene Kopplungsgruppen der eingesetzten RFLP-Marker untereinander, sowie günstigstenfalls auch Kopplungen der molekularen Marker mit der phänotypisch beobachteten Segregation von Virulenzverhalten und Rishitinabbaufähigkeit zu finden.

3.1.1 Kreuzungsansätze

Die Kreuzung wurde insgesamt 5 mal angesetzt, wobei jeweils 3 bis 9 Parallelansätze durchgeführt wurden, um mit hoher Wahrscheinlichkeit in mehreren Ansätzen bis zur Perithezienbildung zu kommen.

Die Protoperithezienbildung konnte nach 6 bis 8 Wochen in 90% der Ansätze beobachtet werden. Die restlichen Ansätze zeigten auch nach dreimonatiger Inkubation keine Protoperithezienbildung. Spätestens nach 8 Wochen wurde mit einer Konidien suspension von *G.pulicaris* R-7843 überschichtet und bei 15°C inkubiert.

Die Differenzierung der Protoperithezien in reife Perithezien konnte nur für etwa 10% der insgesamt weit über 100 beobachteten Protoperithezien verfolgt werden (Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Kreuzungsansatz *G.pulicaris* R-6380 x R-7843. *M.alba*-Zweig mit Protoperithezien und Perithezien, eines davon mit herausgeschobenen Ascosporen (PP = Protoperithezium, P = Perithezium, A = Ascosporentropfen).

3.1.2 Isolation der Ascosporen

Die Isolation der Ascosporen erfolgte wie beschrieben, sowohl aus den oben aus den Perithezien herausgeschobenen Ascosporentropfchen, als auch bei einem Perithezium aus den Ascis selbst. Ein Problem bei der Isolation aus den Ascis war, den richtigen Zeitpunkt abzapfen, zu dem die Ascosporen in den Ascis bereits ausdifferenziert waren, diese aber noch keine Ascosporen abgegeben hatten (Abb. 3.2).

Die Differenzierung zwischen Ascosporen und Konidiosporen war gut möglich, da die Ascosporen stets nur 3fach septiert und kompakter waren, als die im Schnitt um 25% längeren und 4-6fach septierten Konidiosporen. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal waren die oft leicht abgewinkelten, schmalen Nasen der Konidiosporen im Gegensatz zum leicht gekrümmt, zigarrenförmigen Habitus der Ascosporen (Abb 3.3).

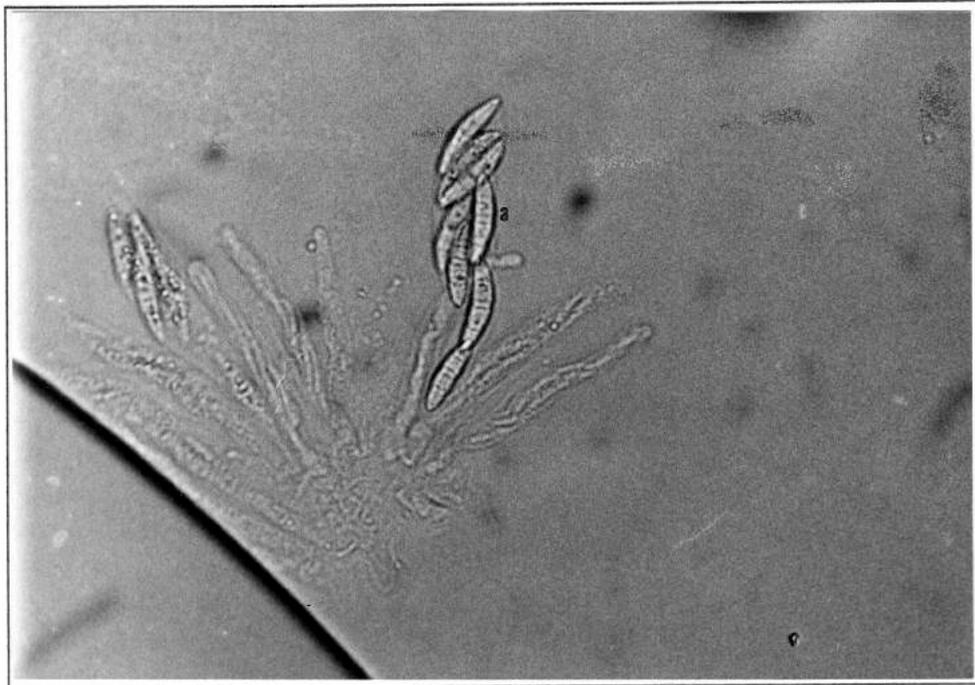


Abb. 3.2: Kreuzungsansatz *G.pulicaris* R-6380 x R-7843. Asci-Rosette aus einem reifen Perithezium. Zu erkennen sind Reste der Rosette mit einem intakten Ascus mit 8 ausdifferenzierten Ascosporen (A = Ascospore).

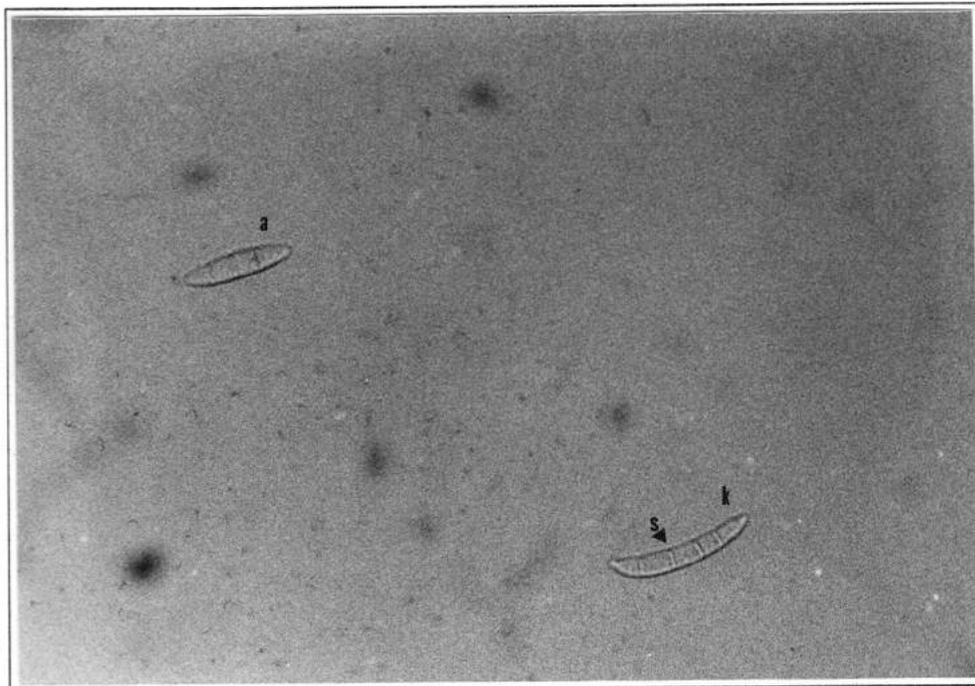


Abb. 3.3: Kreuzungsansatz *G.pulicaris* R-6380 x R-7843. Asco- und Konidiosporen nebeneinander (A = Ascospore, K = Konidie, S = Septe).

In vielen Fällen konnte beobachtet werden, daß die Ascosporen bereits innerhalb von 30 Minuten nach Überführen auf Wasseragar keimten.

Insgesamt wurden 33 Ascosporen isoliert und in V8-Schrägagarrröhrchen überführt. 32 davon keimten aus. Die jeweiligen Anzuchtröhrchen wurden für weitere Experimente als Stammkulturen verwendet.

Fünf dieser Ascosporen entstammen einer Tetrade, sie werden im weiteren mit P₃A₁-1 bis P₃A₁-5 bezeichnet (Perithezium 3, Ascus 1, Ascosporenummer 1-5).

Die restlichen 28 Ascosporen sind zufällig ausgewählte Ascosporen. Folgende Bezeichnungen wurden vergeben: RAP1-1 bis RAP1-7, RAP2-1, RAP2-2, bis RAP2-4 bis RAP 2-12, RAP3-1 bis RAP3-9 (Random-Ascospore aus Perithezium 1-3, Ascosporenummer 1-12).

3.2 Analyse des Virulenzverhaltens und der Rishitinabbaufähigkeit der Elternstämme und Kreuzungsnachkommen

Nachkommen aus der durchgeführten Kreuzung und die Elternstämme wurden auf ihre Fähigkeit zum Rishitinabbau, sowie auf ihre Virulenz auf Kartoffeln (*S.tuberosum*) untersucht.

Die dabei erhaltenen Ergebnisse sollten ggf. Kopplungen zwischen wichtigen phytopathogenen Merkmalen und den mit Hilfe der RFLP-Sonden detektierten Marken aufdecken. Die Auswahl der getesteten Nachkommen ist daher analog zu den in der RFLP-Analyse verwendeten Stämmen erfolgt.

3.2.1 Virulenzverhalten im Biotest

Der Biotest wurde wie unter 2.3.11 beschrieben durchgeführt. Die Kartoffelsorte Sieglinde wurde gewählt, da keine andere Frühkartoffel erhältlich war. Nach fünf Tagen Inkubation ergab sich der Anteil verrotteten Gewebes wie in Tabelle 3.1 dargestellt.

Die für die Kreuzung eingesetzten Eltern sind in der Tabelle nicht aufgeführt, da bis zu diesem Experiment noch nicht klar war, daß die Virulenz des *G.pulicaris* Stammes R-6380 (K) nach Laborkultur gegenüber dem frisch aus lyophilisiertem Myzel angezogenen stark herabgesetzt war. Erwartet worden war, daß R-6380 (K) nach wie vor virulenter ist, als R-7843 (K). Das Gegenteil war der Fall, wie aus Abbildung 3.4 deutlich wird.

Nr.	Bezeichnung der Stämme	Gesamtgewicht nach 5 Tagen Inkubation [g]	Gewicht des verrotteten Gewebes [g]	Nr.	Bezeichnung der Stämme	Gesamtgewicht nach 5 Tagen Inkubation [g]	Gewicht des verrotteten Gewebes [g]
1	RAP 1-1	13,66	0,59	25	1104-3-2	10,86	4,61
2	RAP 1-2	11,83	2,58	26	1104-5-4	13,44	5,58
3	RAP 1-3	12,96	0,26	27	1104-6-4	10,77	6,77
4	RAP 1-4	10,76	2,83	28	1104-14-2	12,66	5,71
5	RAP 1-6	13,90	2,66	29	1104-R-9	11,21	4,66
6	RAP 1-7	8,54	3,94	30	1104-R-11	13,18	0,90
7	RAP 2-1	12,75	3,16	31	1104-R-12	10,98	5,46
8	RAP 2-2	11,73	3,46	32	RAP 3-5	16,68	3,34
9	RAP 2-4	14,31	4,41	33	RAP 3-6	16,25	4,81
10	RAP 2-5	12,80	0,19	34	RAP 3-7	14,09	1,16
11	RAP 2-7	12,18	4,11	35	RAP 3-8	14,45	3,81
12	RAP 2-9	10,60	7,34	36	P ₃ A ₁ -1	13,82	2,70
13	RAP 3-1	12,96	4,81	37	P ₃ A ₁ -2	11,49	4,68
14	RAP 3-2	10,64	5,25	38	P ₃ A ₁ -3	14,06	1,02
15	RAP 3-3	12,19	1,53	39	P ₃ A ₁ -4	13,10	1,31
16	RAP 3-4	12,56	2,48	40	P ₃ A ₁ -5	15,94	7,93
17	1104-8-1	12,07	6,87	41	1104-R-1	12,36	4,79
18	1104-8-3	11,10	4,45	42	1104-R-2	13,81	1,02
19	1104-8-4	14,35	6,52	43	1104-R-5	14,04	0,62
20	1104-8-6	11,85	4,47	44	1104-R-6	13,49	0,23
21	1104-15-1	12,31	5,30	45	1104-R-7	13,10	0,91
22	1104-15-2	10,30	3,00	46	1104-R-8	13,52	2,36
23	1104-7-3	12,47	4,69	47	R-7843 (K)	11,93	3,76
24	1104-7-5	11,93	3,35	48	R-6380 (K)	11,51	0,87

Tab. 3.1: Virulenztest für die Nachkommen aus der innerhalb der Arbeit durchgeführten Kreuzung und für Nachkommen aus der Kreuzung 1104 von Desjardins und Gardner (1988). Bei den beiden mit (K) gekennzeichneten Stämmen handelt es sich um Kulturen, die bereits seit längerem im Labor kultiviert werden. Eingesetzt wurden jeweils 3 Kartoffelscheiben mit 3 cm Durchmesser und ca. 0,5 cm Dicke.

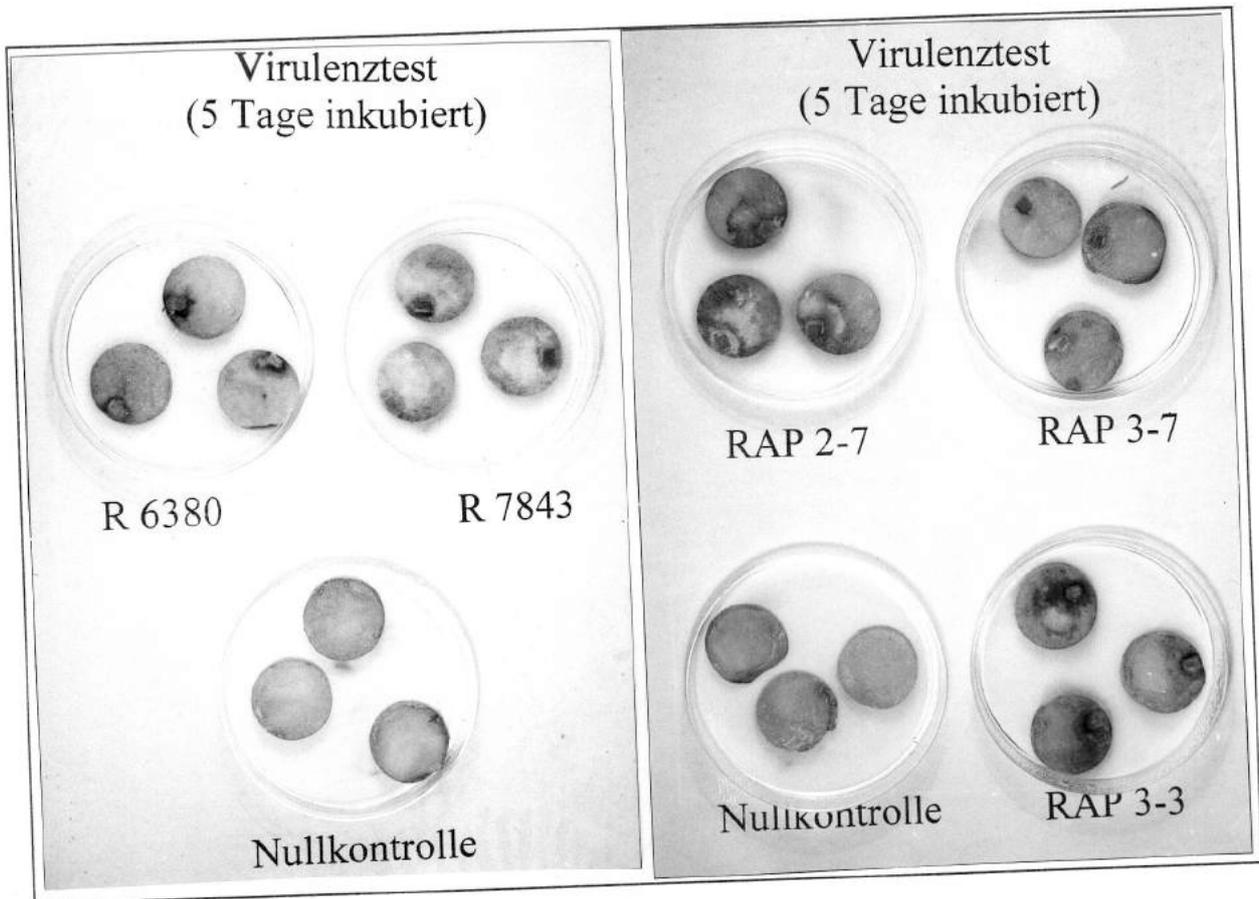


Abb. 3.4: Virulenztest auf Kartoffel. Photographie der Versuchsansätze nach 5 Tagen Inkubation. Bei den Stämmen R-6380 und R-7843 handelt es sich um die im Text mit (K) gekennzeichneten Stämme.

Die Virulenz der Elternstämme (L), im Vergleich mit den im Labor bereits seit längerem kultivierten (K), wurde daher in einem zweiten Versuchsansatz bestimmt (Tab. 3.2).

Nr.	Bezeichnung der Stämme	Gesamtgewicht nach 5 Tagen Inkubation [g]	Gewicht des verrotteten Gewebes [g]
1	R-6380 (K)	43,35	5,62
2	R-6380 (L)	43,62	23,66
3	R-7843 (K)	24,15	16,9
4	R-7843 (L)	43,42	22,28

Tab. 3.2: Virulenztest auf Kartoffeln. Vergleich der Laborkulturen (K) und der frisch aus lyophilisiertem Myzel angeimpften (L) Kulturen von *G.pulicaris* (Stämme R-6380 und R-7843) bezüglich ihrer Virulenz auf *S.tuberosum*, Sorte Sieglinde. Eingesetzt wurden je 9 Kartoffelscheiben von je 3 cm Durchmesser und ca. 0,5 cm Dicke.

Hierbei ergab sich, daß die frischen Stämme in beiden Fällen virulenter waren, als die in Kultur gehaltenen. Der Stamm R-6380 (L) zeigte eine 4,2fach höhere Virulenz als R-6380 (K), die Virulenz des Stammes R-7843 (L) lag beim 1,3fachen von R-7843 (K).

Der Virulenzunterschied der beiden Elternstämme lag unter diesen Bedingungen bei etwa 3% zugunsten von R-6380 (L). R-7843 (L) verrottete 51%, R-6380 (L) zersetzte

54% des zur Verfügung stehenden Kartoffelgewebes. Dies stellt keinen signifikanten Unterschied dar.

Die untersuchten Nachkommen unterscheiden sich dagegen in ihrer Virulenz z.T. erheblich, wie in der Abb. 3.5 dargestellt.

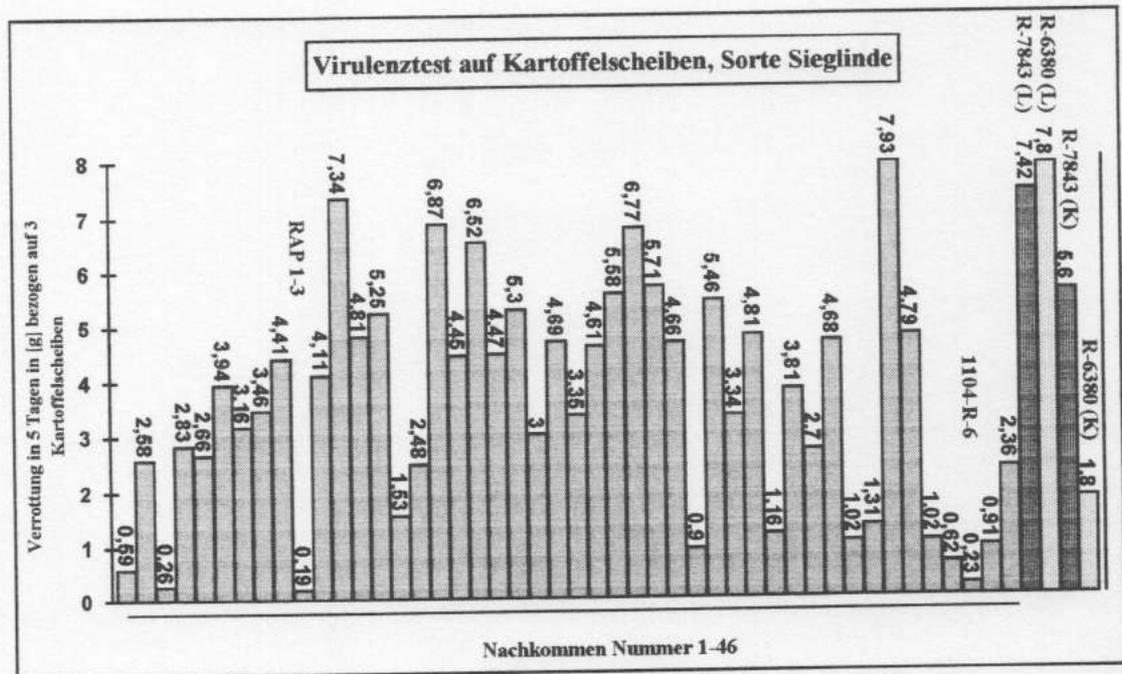


Abb. 3.5: Virulenztest mit Nachkommen aus der Kreuzung *G.pulicaris* R-6380 x R-7843. Graphische Darstellung der Werte aus Tabelle 3.1 und 3.2.

Im Rahmen der RFLP-Analyse der Nachkommen wurde versuchsweise der Virulenztest mit als Marke aufgenommen. Unabhängig vom Verhalten der Eltern wurde als Kriterium für Virulenz auf Kartoffeln unter den gegebenen Bedingungen alternativ eine Verrottung von mindestens 2 g, 3 g, 4 g, 5 g und 6 g Kartoffelgewebe gewählt. Für keines der drei Kriterien wurde eine signifikante Kopplung mit einem der anderen Marker detektiert.

3.2.2 Rishitinabbaufähigkeit

Die Rishitinabbaufähigkeit sollte zunächst nach einem von Weltring (pers. Mittlg.) standardisiert angewendeten Verfahren für die Analyse von Transformanten ermittelt werden. Die Ansätze wurden wie unter 2.3.12 beschrieben durchgeführt. Einziger Unterschied war, dass die Rishitinkonzentration in der ersten Versuchsreihe bei 50 µg / 250 µl lag. Unter diesen Bedingungen war bei beiden Elternstämmen nach 4 Tagen kein Rishitin mehr nachzuweisen.

In Vortests (nicht dargestellt) wurde ermittelt, daß bei einer Erhöhung der Rishitinkonzentration auf etwa 75 µg / 250 µl nach drei Tagen Inkubation noch ein

deutlich höherer Restrishitingehalt in den Ansätzen mit R-7843, gegenüber denen mit R-6380 nachweisbar war.

Mit den entsprechend erhöhten Rishitinkonzentrationen wurde eine zweite Versuchsreihe gestartet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.3 dargestellt. Ein Nachkomme wurde immer dann als schneller Rishitinabbauer eingestuft, wenn nach 3 Tagen nur noch weniger als die Hälfte des ursprünglich im Ansatz vorhandenen Rishitins nachweisbar war. Dabei wurden nicht die absoluten Konzentrationen, sondern die Flächen unter den jeweiligen Rishitinsignalen der gaschromatographischen Auswertungen betrachtet. Die angegebenen Restrishitingehalte sind gerundet und beziehen sich auf den Nullwert (Probe Nr. 49) mit 75 µg Rishitin im Ansatz.

Nr.	Bezeichnung	Rishitin-signal	Restrishitingehalt	schneller Abbauer [+/-]	Desj. [+/-]	Nr.	Bezeichnung	Rishitin-signal	Restrishitingehalt	schneller Abbauer [+/-]	Desj. [+/-]
1	RAP 1-1	15619	56 µg	-		26	1104-5-4	8853	32 µg	+	n.b.
2	RAP 1-2	10581	38 µg	-		27	1104-6-4	3107	11 µg	+	n.b.
3	RAP 1-3	19829	71 µg	-		28	1104-14-2	5337	19 µg	+	
4	RAP 1-4	10463	37 µg	-		29	1104-R-9	5949	21 µg	+	+
5	RAP 1-6	6817	24 µg	+		30	1104-R-11	17079	61 µg	-	+
6	RAP 1-7	5303	18 µg	+		31	1104-R-12	13274	47 µg	-	+
7	RAP 2-1	9939	35 µg	+		32	RAP 3-5	9092	32 µg	+	
8	RAP 2-2	15326	54 µg	-		33	RAP 3-6	8441	30 µg	+	
9	RAP 2-4	4196	15 µg	+		34	RAP 3-7	9806	34 µg	+	
10	RAP 2-5	6248	22 µg	+		35	RAP 3-8	5502	20 µg	+	
11	RAP 2-7	7618	27 µg	+		36	P ₃ A ₁ -1	16444	59 µg	-	
12	RAP 2-9	8049	28 µg	+		37	P ₃ A ₁ -2	7018	25 µg	+	
13	RAP 3-1	14580	52 µg	-		38	P ₃ A ₁ -3	4873	17 µg	+	
14	RAP 3-2	8458	30 µg	+		39	P ₃ A ₁ -4	15282	54 µg	-	
15	RAP 3-3	8694	31 µg	+		40	P ₃ A ₁ -5	12300	43 µg	-	
16	RAP 3-4	16703	59 µg	-		41	1104-R-1	10439	37 µg	-	-
17	1104-8-1	3504	12 µg	+	n.b.	42	1104-R-2	17016	61 µg	-	-
18	1104-8-3	3886	14 µg	+	n.b.	43	1104-R-5	16591	59 µg	-	
19	1104-8-4	7317	26 µg	+	n.b.	44	1104-R-6	20004	71 µg	-	-
20	1104-8-6	11043	39 µg	-	n.b.	45	1104-R-7	12702	47 µg	-	+
21	1104-15-1	10132	36 µg	-	n.b.	46	1104-R-8	9764	35 µg	+	+
22	1104-15-2	5452	19 µg	+	n.b.	47	R-7843 (L)	12710	45 µg	-	-
23	1104-7-3	9452	34 µg	+	n.b.	48	R-6380 (L)	5782	21 µg	+	+
24	1104-7-5	8443	30 µg	+	n.b.	49	Nullwert	21078	75 µg		
25	1104-3-2	12453	44 µg	-							

Tab. 3.3: Rishitinmetabolismus von Eltern und Nachkommen aus der Kreuzung *G.pulicaris* R-6380 x R-7843. Rishitinsignale in GC-Einheiten nach 3 Tagen Inkubation. Der angegebene Restrishitingehalt ist im Vergleich mit dem Nullwert berechnet und auf volle µg gerundet. In der Spalte "Desj." sind die Ergebnisse zur schnellen Rishitinmetabolismusfähigkeit der Nachkommen aus der Kreuzung 1104 von Desjardins *et al.* (pers. Mittlg.), soweit bekannt angegeben. Ein Nachkomme wurde als schnell metabolisierend angesehen, wenn die Fläche des Rishitinsignals in GC-Einheiten kleiner als 10.000 war.

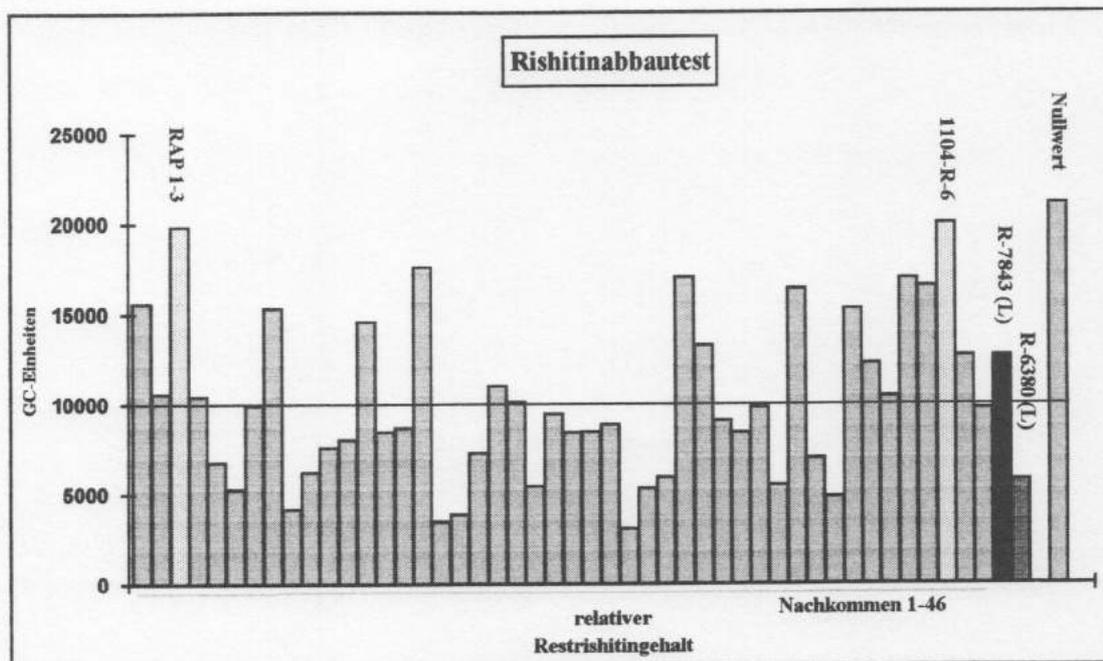


Abb. 3.6: Rishitinmetabolismus von Eltern und Nachkommen aus der Kreuzung *G.pulicaris* R-6380 x R-7843 in graphischer Darstellung. Eingezeichnet ist ein Balken bei 10.000 relativer Restgehalt an Rishitin. Dieses Kriterium diente für die Auswertung als Grenze zwischen schnellen und langsamen Abbauern.

Unter dem Kriterium, daß ein Nachkomme als schneller Rishitinabbauer eingestuft wird, wenn der relative Restrishitingehalt unter den gewählten Bedingungen kleiner als 10.000 ist, sind 26 der untersuchten 46 Nachkommen als schnelle Rishitinabbauer einzustufen. Die Nachkommen 1104-R-6 und RAP 1-3 sind eindeutig Nichtabbauer. Die Auswertung dieses Tests wurde innerhalb der Kopplungsanalyse der RFLP-Marker als zusätzliche Marke verwendet (siehe 3.3.4 Segregationsanalyse der detektierten Marken). Dabei wurde eine signifikante Kopplung mit dem Cosmid RFLP-Marker CosII 4 festgestellt.

3.3 Molekulare Analyse von Nachkommen aus der Kreuzung *G.pulicaris* R-6380 x R-7843

Um die molekulare Analyse der Kreuzungsnachkommen durchführen zu können, galt es zunächst eine Reihe von RFLP-Markern zu finden, in denen sich die Elternstämme unterscheiden. Diese sollten im Rahmen der Segregationsanalyse als genetische Marker für die Analyse der Nachkommen dienen. Kopplungen der Marker untereinander sowie auftretende Kopplungen der RFLP's mit den untersuchten Fähigkeiten zur Virulenz und zum Rishitinabbau sollten ermittelt und, soweit im Rahmen dieser Arbeit möglich, statistisch abgesichert werden.

3.3.1 Optimierung der Detektion von RFLP's mit nichtradioaktiv markierter DNA

Eine technische Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit war, die Detektionen von RFLP's mit nichtradioaktiv markierten DNA-Sonden zu etablieren. Für die Markierung stand dabei das "DNA Labeling and Detection Kit nonradioactive" der Firma Boehringer Mannheim zur Verfügung.

Die Detektion erfolgte mit den lichtemittierenden Substraten AMPPD und CSPD für die alkalische Phosphatase.

In der Anfangsphase war insbesondere der häufig auftretende unspezifische Hintergrund ein Problem, da er die Auswertung der Hybridisierungen erschwerte.

Als wichtige Faktoren zur Hintergrundminimierung wurden die Wahl der zum Blotten verwendeten Nylonmembran, die Art des Blottingverfahrens an sich, die Kontrolle der Markierungseffizienz der Sonden vor der Hybridisierung, die Hybridisierungs- und Detektionsbedingungen und die Wahl des eingesetzten Hybridisierungspuffers angesehen.

Bezüglich des Blottingverfahrens wurde jeweils das vom Hersteller der Membran empfohlene angewendet, da in Vortests mit verschiedenen Blotting-Puffern (20 x SSC, 1 M NH₄-Acetat und 0,25 M NaOH mit 1,5 M NaCl) keine signifikanten Unterschiede der Hybridisierungsgüte in Abhängigkeit vom Blottingpuffer erkennbar waren. Der positive Effekt einer UV-Fixierung der DNA auf die Hybridisierungsgüte, wie er von Allefs *et al.* (1990) beschrieben ist, konnte nicht überprüft werden, da kein UV-Crosslinker zur Verfügung stand. Die DNA wurde deswegen stets durch Hitzefixierung an die Nylonmembran gebunden.

Der Vergleich verschiedener Membranen ergab, daß die Hybridisierung an positiv geladene Membranen (Genescreen⁺, Quiagen⁺) effektiver erfolgt als an ungeladene (Quiagen, Genescreen). Gleichzeitig stieg jedoch bei positiv geladenen Membranen der unspezifische Hintergrund stark an, wenn lediglich die Standardhybridisierungspuffer verwendet wurden.

Die Wahl eines Hybridisierungspuffers mit 50% Formamid- und 7%iger SDS-Konzentration (modifiziert nach Church und Gilbert 1984) reduzierte den Hintergrund stark, so daß dieser bei einer Expositionsdauer von unterhalb zwei Stunden schwach bis gar nicht zu erkennen war.

Dies galt allerdings mit Sicherheit nur für solche Membranen, die bereits vom Hersteller auf die Eignung für nichtradioaktive Markierung getestet waren (Hybond-N, Boehringer Nylonmembran). Nichtgetestete Membranen, unabhängig davon ob geladen oder nicht, zeigten teilweise so starken Hintergrund, daß keine Sonden mehr differenziert werden konnten (insbesondere Genescreen und Genescreen⁺).

Für die Hybridisierungen zur Analyse der RFLP-Segregation wurde daher stets eine für die nichtradioaktive Markierung und Detektion mit lichtemittierenden Substraten getestete Membran verwendet (Hybond-N oder Boehringer Nylonmembran).

Ebenso erwies es sich als wichtig, die Markierungseffizienz der eingesetzten Sonde vor der Hybridisierung zu überprüfen, da diese oft unterschiedlich gut war. Markierte DNA-Sonden, von denen noch 1 µl einer 10^{-5} -Verdünnung nach 4stündiger Exposition detektierbar waren, lieferten auch in der Hybridisierung mit genomischer DNA gute Ergebnisse (Abb. 3.7).

SONDE	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
PPKT14-1	•	•	•				
PPST2-1	•	•	•	•	•		
PPKT10-4	•	•	•	•	•		
CII 1	•	•	•				
B 2	•	•	•				
B 4	•	•	•	•	•		
B 6	•	•	•	•	•		
B 7	•	•	•	•	•		
B 8	•	•	•	•	•		
COS 3	•	•	•	•	•		
COS 4	•	•	•	•			
COS 5	•	•	•	•	•		
COS 7	•	•	•	•	•		
COS 10	•	•	•	•	•		

Abb. 3.7: Sondenqualitätsprobe einer nichtradioaktiven Markierung von Plasmid- und Cosmid-DNA. Aufpipettiert wurde jeweils 1 µl markierte DNA-Lösung in den angegebenen Verdünnungen. Die Exposition des Filters erfolgte für 3 Stunden.

Derartig getestete Sonden konnten bis zu 5mal für eine Hybridisierung eingesetzt werden, ohne daß sich das Signal wesentlich verschlechterte.

Weiterhin galt es, die Filter möglichst mehrfach benutzen zu können, um das Ausmaß der erforderlichen DNA-Präparationen, Restriktionen, und "Southern blots" nicht übermäßig anwachsen zu lassen.

Die in der Anleitung zum verwendeten Markierungskit beschriebenen Dehybridisierungsvorschriften erwiesen sich unter unseren Bedingungen als schlecht geeignet. Häufig wurde keine völlige Dehybridisierung erreicht, was die Auswertung erschwerte. Daher wurde letztendlich auf eine Dehybridisierung durch 10minütiges Waschen mit 1 x TE und 1% SDS bei 99°C ausgewichen. Diese Methode hat den Nachteil, daß auch ein Teil der Ziel-DNA mit abgelöst wird, sie führt jedoch in der Regel zum völligen Verschwinden der Hintergrundbanden vorheriger Sonden.

Derartig dehybridisierte Filter wurden im Rahmen der RFLP-Segregationsanalyse bis zu 5mal wiederverwendet und waren immer noch auswertbar.

3.3.2 Suche nach geeigneten RFLP-Markern für die Segregationsanalyse der Nachkommen

Als einsetzbare Marker für die RFLP-Analyse standen die von Weltring (unveröffentlicht) hergestellten Cosmid- und Promotor-Test-Genbanken (PTG) von *G.pulicaris* Stamm R-6380 zur Verfügung.

Zunächst wurde für die Promotor-Test-Genbank geprüft, ob es sich bei den klonierten Fragmenten vorwiegend um Einzelkopie-Elemente handelt.

Dazu wurden Koloniefilterhybridisierungen mit Klonen aus dieser Bibliothek durchgeführt (Abb 3.8).

Analog zum Vorgehen von Tzeng *et al.* (1992), die eine RFLP-Karte für *C.heterostrophus* angefertigt haben, wurden Klone, die nur schwach mit genomischer DNA von *G.pulicaris* R-6380 hybridisierten, in erster Annahme als Einzelkopie-Klone angesehen.

Tzeng *et al.* (1992) geben an, daß sie die Annahme für das Vorliegen von Einzelkopie-Elementen immer dann verwarfen, wenn der Klon mit mehr als 5 Banden von Hind III geschnittener Eltern-DNA hybridisierte. Dies traf für keinen der bisher untersuchten 22 PTG-Klone zu.

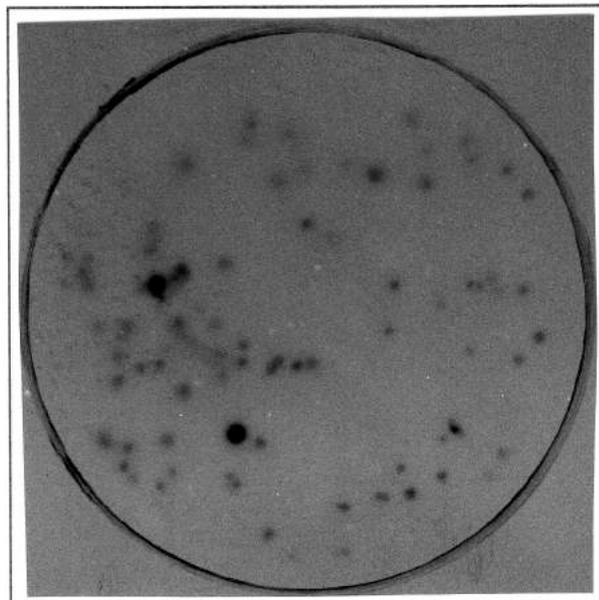


Abb. 3.8: Koloniefilterhybridisierung von Klonen der verwendeten Promotor-Test-Genbank mit genomischer DNA von *G.pulicaris* R-6380. Nur 2 Kolonien auf dem abgebildeten Filter hybridisieren stark. Mittel bis schwach hybridisierende Klone wurden für die Suche nach RFLP's eingesetzt.

Die insgesamt 21 eingesetzten Klone aus der Cosmid-Genbank wurden aufgrund ihrer "Incert"-Größe von 40-50 kbp nicht entsprechend untersucht, da für die eingesetzten

Restriktionsenzyme auch bei Einzelkopie-Elementen eine Vielzahl von Banden zu erwarten war.

In Hybridisierungsexperimenten wurde analysiert, ob die aus der Promotor-Test-Genbank und der Cosmid-Genbank ausgewählten Klone mit "Southern blots" restringierter und gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA der beiden Elternstämme, einen RFLP zeigen.

Bei den verwendeten Restriktionsenzymen handelte es sich jeweils um solche, die Sechser-Palindrome als Schnittstellen erkennen: EcoR I, BamH I, Bgl II, Pst I, Kpn I, Hind III, Xho I und Xba I. Die Auswahl dieser Enzyme erfolgte in erster Linie zugunsten der kostengünstigsten, da auch Tzeng *et al.* (1992) beschreiben, daß es eher auf die Anzahl, als auf die Erkennungssequenzen der für die Suche nach RFLP's verwendeten Restriktionsenzyme ankommt.

Insgesamt wurden 22 Plasmid- und 20 Cosmid-Klone untersucht (Tab. 3.4). 11 Plasmid- und 15 Cosmid-Klone erwiesen sich mit einem bis zu 6 der verwendeten Restriktionsenzyme als geeignete RFLP-Marker. Statistisch waren somit 75% der zufällig ausgewählten Cosmid-Klone und 50% der Plasmid-Klone tatsächlich RFLP-Marker.

Probe Nr.	Probenbezeichnung	Filter-Code	RFLP [+/-]	BamH I	Bgl II	EcoR I	Hind III	Kpn I	Pst I	Xba I	Xho I
C 1	Cos 3	11 - 3/4	+ (1)	-	-	-	+	-		-	-
C 2	Cos 4	12 - 8/4	-	-							-
C 3	Cos 5	30II - 15/4	-	-	-	-		-		-	-
C 4	Cos 7	30I - 22/4	+ (3)	-	-	-	-	+	+	-	+
C 5	Cos 10	30III - 22/4	+ (1)	-	-	-	-	-	-	-	+
C 6	Cos II 4	34I - 4/5	+ (4)	+	+	+			+ *	-	-
C 7	Cos II 5	34II - 4/5	+ (7)	+	+	+ *	+	+	-	+	+
C 8	Cos II 1	30I - 4/5	+ (2)	-	-	-		+ *	+	-	-
C 9	Cos II 21	34I - 12/5	+ (6)	+	+	+	+ *		+	+	+
C 10	Cos II 2	30II - 4/5	+ (5)	+	+	+ *		+		-	+ *
C 11	Cos II 3	30III - 4/5	+ (1)	+	-	-				-	-
C 12	Cos II 7	30I - 12/5	+ (3)	-	-	-	-	+	+ *	-	+
C 13	Cos III 3	37III - 19/5	+ (1)	-	-	+	-	-	-	-	-
C 14	Cos III 1	37II - 19/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 15	Cos III 7	34I - 20/5	+ (2)	-	-	-	-	+	-	+ *	-
C 16	Cos III 10	34II - 20/5	+ (2)	-	-	-	-	+	+ *	-	-
C 17	Cos II 19	10.7.II - 18/7	+ (6)	+	+	+	-	+		+	+
C 18	Cos II 6	34 I - 27/5	+ (1)	-	-	+	-	-	-	-	-
C 19	Cos III 6	37I - 27/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 20	Cos II 10	30III - 13/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P 1	PTG PPKT 10/4	11 - 26/3	-	-	-	-	-	-			-
P 2	PTG PPST 2/1	2 - 14/2 30I - 24/4	- -	-	-	-	-		-		-
P 3	PTG B4	30II - 22/4	-					-	-		-
P 4	PTG B7	30II - 24/4	-	-	-			-	-		-
P 5	PTG C2	37I - 19/5	+ (1)	-	-	-	-		+	-	-
P 6	PTG C9	40II - 2/6	+ (2)	+	-	-	-	-	-	+ *	-
P 7	PTG C4	40I - 2/6	+ (1)					+ *	-	-	-
P 8	PTG C12	40III - 2/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P 9	PTG B13	40II - 4/6	-	-	-	-	-	-	-		-
P 10	PTG B15	10/7II 13/7	+ (1)	-	-	-	-	+ *	-	-	-
P 11	PTG B11	41I - 2/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P 12	PTG CII 10	10.7.II - 15/7	+ (2)	-	-	-	-	-	+ *	-	+
P 13	PTG B10	41I - 17/6	-					-	-	-	-
P 14	PTG B8	10.7.I 13/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P 15	PTG B17	41IV - 23/6	+ (5)		+	+ *	+	+	-	+	
P 16	PTG B5	7.7. - 13/7	+ (1)	-	-	-	-	-	-	-	+
P 17	PTG B19	45III - 2/7	+ (1)	-	-	-	-	-	-	+	-
P 18	PTG B12	41II - 11/6	-					-	-	-	-
P 19	PTG B14	10.7.I - 15/7	+ (2)	-	-	+ *	-	-	-	-	+
P 20	PTG B1	7.7. - 21/7	+ (2)	-	-		-	-	+ *	+	-
P 21	PTG B9	10.7.I - 21/7	-	-	-	-	-	-			
P 22	PTG C13	10.7.II - 21/7	+ (3)	+	-	- *	+	-	+	-	-
	Gesamtauswertung:	PTG-RFLP's	11								
		Cos-RFLP's	15								
		insgesamt	26	8	6	9	5	11	10	9	10

Tab. 3.4: Suche nach geeigneten RFLP-Markern für die Analyse der Nachkommen aus der Kreuzung *G.pulicaris* R-6380 x R-7843. Getestete Sonden aus der Promotor-Test-Genbank und Cosmid-Genbank von Weltring (unveröffentlicht). Ein Sternsymbol (*) bei einem gefundenen RFLP-Marker bedeutet, daß diese Marke für die RFLP-Analyse verwendet wurde. In der Spalte "Probe Nr." steht ein "P" für einen Plasmid-Klon und "C" für einen Cosmid-Klon. Die eingeklammerten Zahlen in der Spalte "RFLP [+/-]" stehen für die Zahl der Restriktionsenzyme für die der Klon einen RFLP detektiert.

Exemplarisch sind in den folgenden Abbildungen einige Southernhybridisierungen dokumentiert. Plasmid-Klone (Abb 3.9) hybridisierten im allgemeinen mit einer, z.T. aber auch mit bis zu 4 Banden.

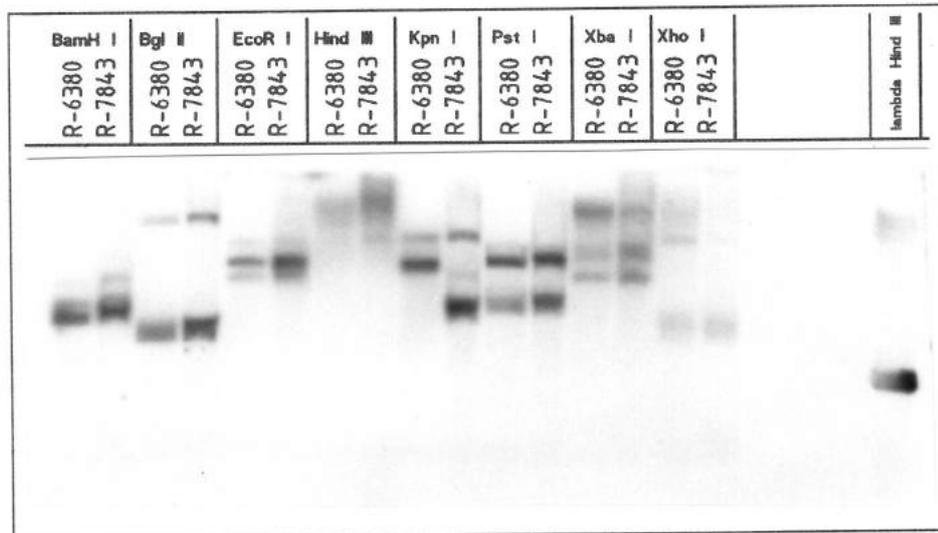


Abb. 3.9: RFLP-Analyse der Eltern aus der durchgeführten Kreuzung. Beispiel für das Ergebnis eines Hybridisierungsexperimentes mit "Southern blots" restringierter und gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA der beiden Eltern. Die DNA in jeder Spur ist jeweils mit einem von 8 Restriktionsenzymen geschnitten worden. Hybridisiert wurde mit dem Plasmid RFLP-Marker B 15. Der Marker detektiert einen RFLP für Kpn I geschnittene Eltern-DNA.

Die ursprüngliche Annahme, daß die Cosmid-Klone aufgrund der Größe der hybridisierenden Fragmente nahezu immer einen RFLP detektieren und das Bandenmuster häufig unübersichtlich sein sollte, bestätigte sich nicht. Ein Viertel der eingesetzten Cosmid-Klone detektierte im Rahmen der Untersuchungen keinen RFLP zwischen den Stämmen (Abb 3.10). Die Cosmid-Klone hybridisierten in der Regel mit 4 bis 10 Banden auf dem Blot, so daß das Muster in allen Fällen überschaubar blieb (Abb 3.10 und 3.11).

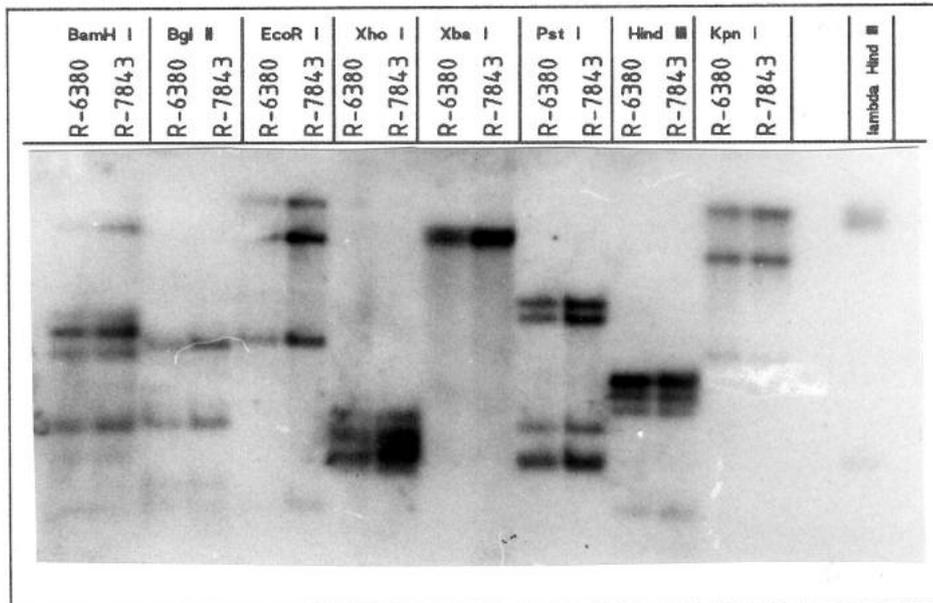


Abb. 3.10: RFLP-Analyse der Eltern aus der durchgeführten Kreuzung. Beispiel für das Ergebnis eines Hybridisierungsexperimentes von "Southern blots" restringierter und gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA der beiden Eltern. Die DNA in jeder Spur ist mit jeweils einem von 8 Restriktionsenzymen geschnitten worden. Für diese Hybridisierung wurde der Cosmid Klon CosIII 6 eingesetzt. Für diesen Marker zeigt sich kein RFLP.

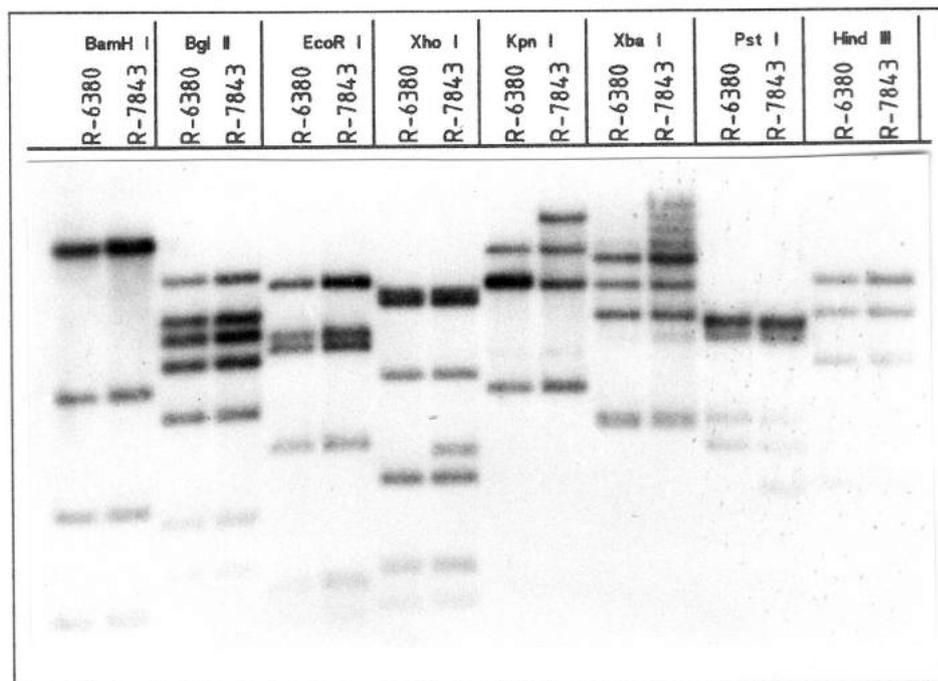


Abb. 3.11: RFLP-Analyse der Eltern aus der durchgeführten Kreuzung. Beispiel für das Ergebnis eines Hybridisierungsexperimentes von "Southern blots" restringierter und gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA der beiden Eltern. Die DNA in jeder Spur ist mit jeweils einem von 8 Restriktionsenzymen geschnitten worden. Zur Hybridisierung wurde der Cosmid Klon Cos 7 eingesetzt. Er detektiert RFLP's zwischen den Elternstämmen wenn diese mit den Restriktionsenzymen Kpn I, Pst I oder Xho I geschnitten werden.

3.3.3 Hybridisierung der Nachkommen-DNA mit geeigneten RFLP-Sonden

Von den insgesamt 25 gefundenen RFLP-Markern wurden bisher 15 für eine Segregationsanalyse der Nachkommen aus der durchgeführten Kreuzung eingesetzt.

Der Cosmid Marker CosII 2 wurde zweimal mit verschieden restringierter Nachkommen-DNA (Xho I und EcoR I) hybridisiert, was jeweils ein unterschiedliches RFLP-Muster ergab. Die Segregationsanalyse zwischen diesen sicher gekoppelten Marken diente als Positivkontrolle für die Kopplungsanalyse (Eine Hybridisierung mit dem gleichen DNA-Fragment, das für mehrere Restriktionsenzyme einen RFLP detektiert, muß in der Hybridisierung mit entsprechend verdauter Nachkommen-DNA eine sehr enge Kopplung zeigen, wenn der Klon nicht rekombinierte DNA enthält.)

Aus den im Rahmen der eigenen Kreuzung erhaltenen Nachkommen wurden 25 für die Segregationsanalyse verwendet. Dazu kamen noch einmal 21 Nachkommen aus der analogen Kreuzung 1104 von Desjardins und Gardner (1989).

Die Auswertung der Hybridisierungen erfolgte im Vergleich mit den RFLP-Mustern der beiden Eltern. Beobachtet wurden bezüglich der Musterverteilung vier Typen, nämlich die beiden Elterntypen, Kombinationen aus den Hybridisierungsmustern der Eltern sowie deutlich abweichende Nachkommenmuster.

Die Abb. 3.12 und 3.13 zeigen exemplarisch je eine der für die Segregationsanalyse durchgeführten Hybridisierungen der 46 Nachkommen mit RFLP-Markern. In Abb. 3.12 ist das Ergebnis eines Hybridisierungsexperiments mit dem Plasmid-Klon B 15 wiedergegeben. Abb.3.13 zeigt ein entsprechendes Experiment mit dem Cosmid.Klon Cos II 2.

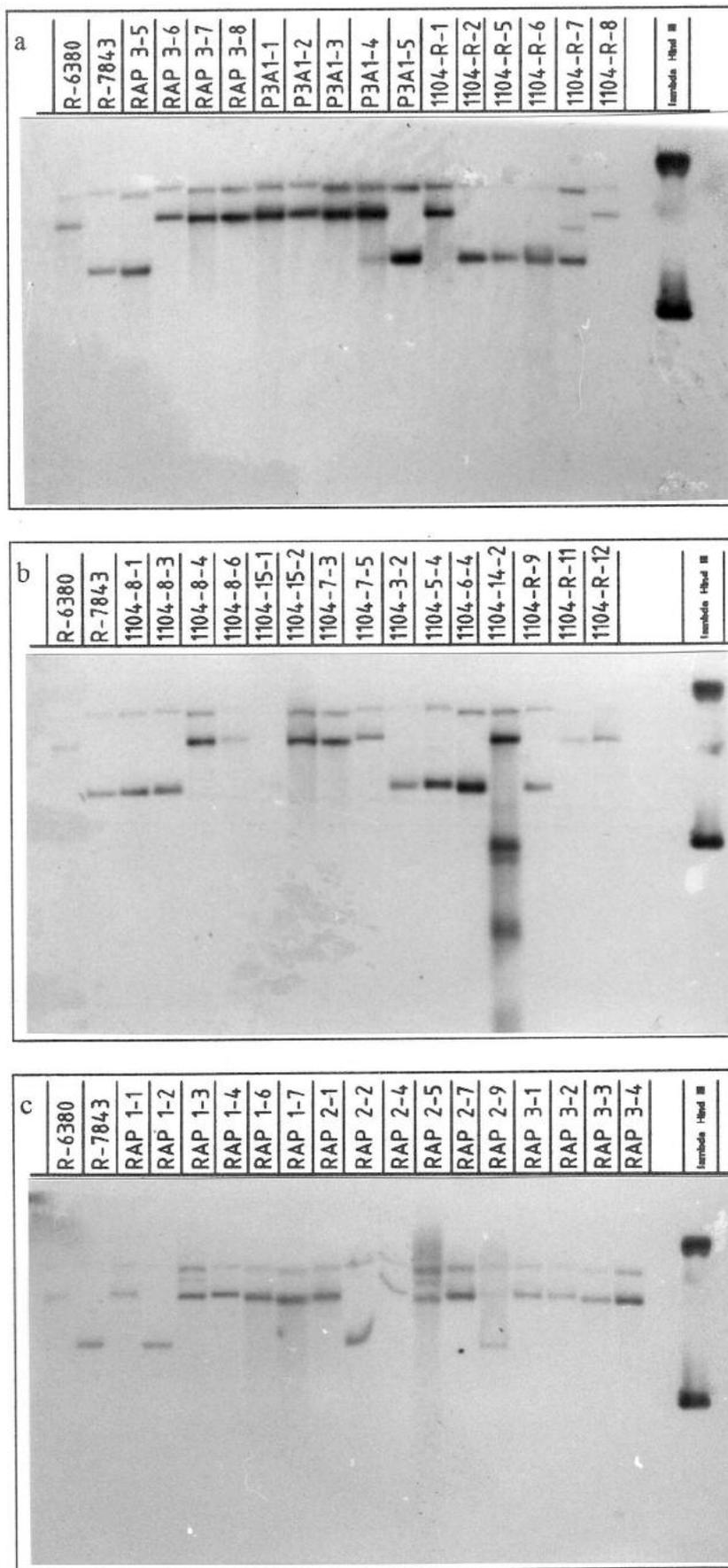


Abb. 3.12 a-c: RFLP-Analyse der Nachkommen aus der Kreuzung R-6380 x R-7843. Hybridisierung von 46 Nachkommen mit dem Plasmid RFLP-Marker B 15 (Kpn I). Charakteristisch für diesen RFLP-Marker ist, daß für das durch R-6380 repräsentierte Muster, die untere der beiden Banden für ein 14,5 kbp großes Fragment steht, das entsprechende Fragment beim von R-7843 repräsentierte Muster jedoch nur 6,9 kbp groß ist.

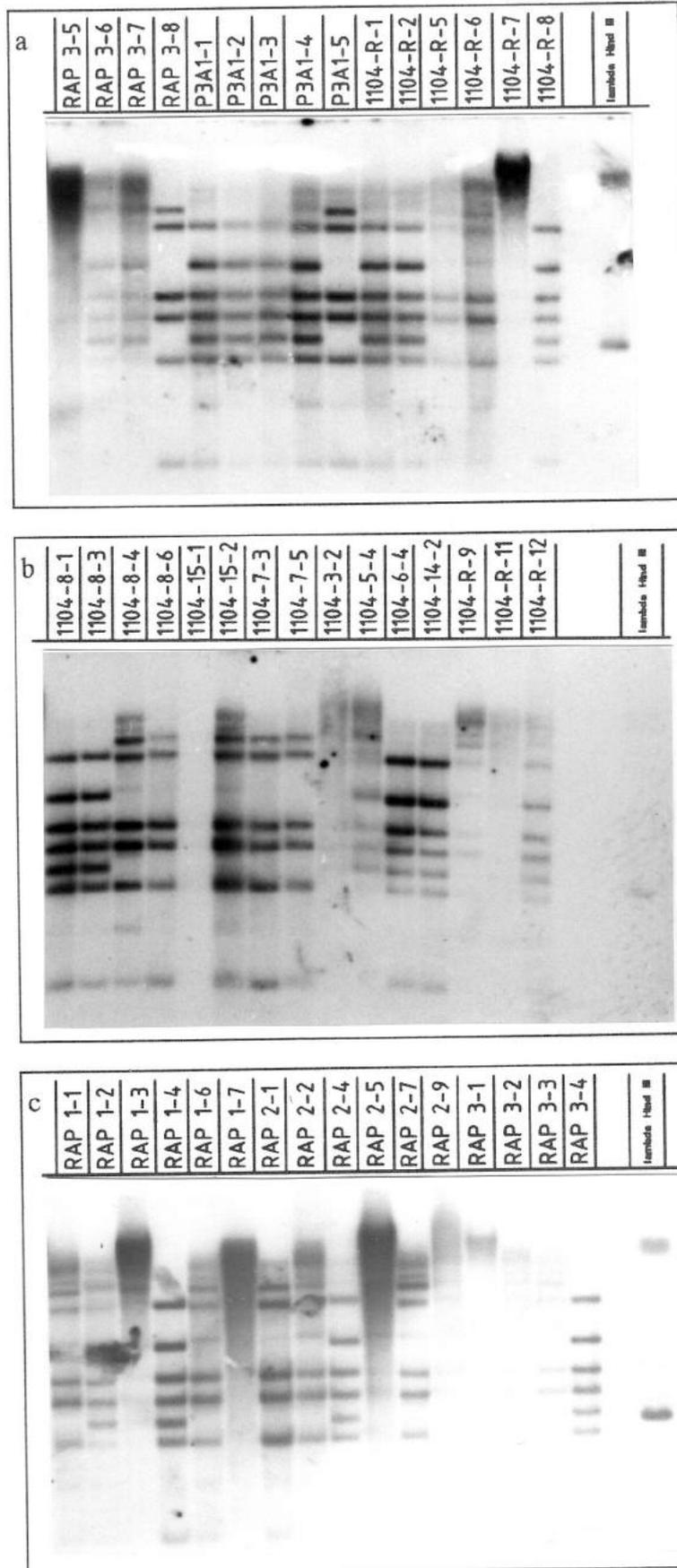


Abb. 3.13 a-c:

RFLP-Analyse mit den Nachkommen aus der Kreuzung R-6380 x R-7843. Hybridisierung von 46 Nachkommen mit dem Cosmid RFLP-Marker Cos II 2 (Xho I). Charakteristisch für diesen RFLP-Marker ist: Im dem von R-7843 repräsentierten Hybridisierungsmuster findet sich eine Hybridisierung mit einem 15 kbp großen Fragment. Diese Bande fehlt im Muster von R-6380. Stattdessen tritt zusätzlich eine Hybridisierung mit zwei anderen Fragmenten (7,5 kbp und 5 kbp) auf.

Für die Auswertung der Segregation der untersuchten Marken wurden die eingesetzten Nachkommen von 1 bis 46 durchnummeriert (Tab. 3.6).

Das Ergebnis der durchgeführten 16 Hybridisierungen mit Sonden, die RFLP's markieren, ist in Tabelle 3.6 zusammengestellt. Wichtig ist neben der Angabe der jeweiligen Sonde auch das Restriktionsenzym, mit dem die als Ziel-DNA verwendete Nachkommen-DNA geschnitten war (Nur in Kombination mit DNA, die mit diesem Restriktionsenzym geschnitten ist, ist der Klon ein RFLP-Marker!). Im Anhang zu dieser Arbeit findet sich als Ergänzung zu den hier dargestellten Daten eine Aufstellung der beobachteten Unterschiede im Hybridisierungsmuster der beiden Elternstämme mit den gefundenen RFLP-Markern.

Nachkommen-nummer	Bezeichnung	Nachkommen-nummer	Bezeichnung	Nachkommen-nummer	Bezeichnung	Nachkommen-nummer	Bezeichnung
1	RAP 1-1	13	RAP 3-1	25	1104-3-2	37	P ₃ A ₁ -2
2	RAP 1-2	14	RAP 3-2	26	1104-5-4	38	P ₃ A ₁ -3
3	RAP 1-3	15	RAP 3-3	27	1104-6-4	39	P ₃ A ₁ -4
4	RAP 1-4	16	RAP 3-4	28	1104-14-2	40	P ₃ A ₁ -5
5	RAP 1-6	17	1104-8-1	29	1104-R-9	41	1104-R-1
6	RAP 1-7	18	1104-8-3	30	1104-R-11	42	1104-R-2
7	RAP 2-1	19	1104-8-4	31	1104-R-12	43	1104-R-5
8	RAP 2-2	20	1104-8-6	32	RAP 3-5	44	1104-R-6
9	RAP 2-4	21	1104-15-1	33	RAP 3-6	45	1104-R-7
10	RAP 2-5	22	1104-15-2	34	RAP 3-7	46	1104-R-8
11	RAP 2-7	23	1104-7-3	35	RAP 3-8		
12	RAP 2-9	24	1104-7-5	36	P ₃ A ₁ -1		

Tab 3.5: Aufstellung der für die Hybridisierungsexperimente verwendeten Nachkommen aus der Kreuzung *G.pulicaris* Stamm R-6380 x R-7843. Nachkommenbezeichnungen, die mit RAP oder P₃A₁ beginnen stammen aus der selbst durchgeführten Kreuzung. Bei Nachkommen, deren Bezeichnung mit 1104 beginnt, handelt es sich um Nachkommen aus der Kreuzung 1104 von Desjardins und Gardner (1989).

Für die Auswertung der Hybridisierungen mit Hilfe des Computerprogramms RFLPDet1 wurden die Nachkommenmuster für alle eingesetzten Nachkommen erfaßt. Eine Hybridisierung, die dem Elterntyp R-6380 entsprach, wurde mit "A" bezeichnet. Analog dazu wurde eine dem Elterntyp R-7843 entsprechende Hybridisierung mit "B" bezeichnet. Ein "C" kennzeichnet in der Tabelle 3.6 ein gegenüber beiden Eltern verändertes Muster (z.B bewirkt durch Rekombination im detektierten Bereich) und ein "X" steht immer dann, wenn keine Auswertung für diesen Nachkommen möglich war.

Die Weiterverarbeitung der Nachkommenmuster aus Tabelle 3.6 erfolgte zunächst mit Hilfe des Programms RFLPDet1.

Sonde Nr.	Sondenbezeichnung	Typ der Sonde	Restriktionsenzym	Nachkommenmuster (1-46)
1	B 14	Plasmid-Klon	EcoR I	XBBBB BABBB ABABA BBBAA BABBB BBABA BBBAB BAABB BABBX B
2	CII 10	Plasmid-Klon	Pst I	ABAAB ABBCA ABXCA AAABA BAAAA BBABA BABAB BAABB BAAXX A
3	B 17	Plasmid-Klon	EcoR I	ABBBB BABBB ABABA BBBAA BABXB BAABA BBBXB BAABB BABBX B
4	B 1	Plasmid-Klon	Pst I	CBCBA AABAB AXABA BBBBA BBBBB BAAAA BBBAB BAABB BBACX B
5	CosII 2	Cosmid-Klon	EcoR I	BAAAB ABBAB BBBBB AAABB BBBBA AAABA ABAAB AAAAB AABBB A
6	CosII 10	Cosmid-Klon	Pst I	ABCAB AABBB BAAAA AAAAB AAAAA BBABX BABAA BBBCA BAABA B
7	CosII 5	Cosmid-Klon	EcoR I	AABAA BABBA BABBA BAABB AABBB BBBAA ABAXB BBBBA BABBB B
8	CosII 4	Cosmid-Klon	Pst I	CBCBB BABAX BXAAB BAABB BBBBB AAABB BABAB BAABB ABBEX B
9	B 15	Plasmid-Klon	Kpn I	ABAAA AABAA AAAAA ABBAA CAAAB BBXBA AAAAA AAACB ABBBX A
10	C 4	Plasmid-Klon	Kpn I	CBAAB AAXAX BXAAA ABBBA ABBBA ABBAX AAAAB ABBAA BBABB B
11	CosII 7	Cosmid-Klon	Pst I	ABAAB AABBB BBAAA AAAAX XXAAA BBCBX XXXXX BBBBC BAXXX X
12	C 9	Plasmid-Klon	Xba I	ABBBB XAABX ABABA ABBAX XBBAX XBABA BXXXB AAAAB XAXXX A
13	CosII 2	Cosmid-Klon	Xho I	BAAAB XBBAX BBXBB AAABB XBBBA AAABX AXAAB AAAAB AABBX A
14	CosII 21	Cosmid-Klon	Hind III	ABAAA XBBAX AXXXX BAAAB XBBBX CBAAA AXXXX BAACA BBXXX B
15	CosIII 7	Cosmid-Klon	Xba I	BBBBB XAABX ABABA ABBAA BBBBX ABABX BXBAB AAAAB BAABX B
16	CosII 1	Cosmid-Klon	Kpn I	ABCAB AABBB BAAAA AAAAB AAAAA BBABA BABAA BBBBA BAABA A

Tab 3.6: RFLP-Analyse. Aufstellung der für die Hybridisierung eingesetzten Sonden. Segregation der RFLP-Marker bei den Nachkommen. Im Feld Nachkommenmuster sind die beobachteten Hybridisierungsmuster der Nachkommen aufgelistet. Jeder Buchstabe steht für einen Nachkommen: A = Muster wie bei R-6380, B = Muster wie bei R-7843, C = neues Muster, X = nicht auswertbar.

3.3.4 Segregationsanalyse der detektierten Marken

Als Kriterien für eine Kopplung zweier Marker wurde der χ^2 -Wert, das 95% Konfidenz-Intervall sowie der ϕ -Koeffizient für die vorliegende Verteilung bestimmt. Auszugehen war bei der Verteilung von nur einem Freiheitsgrad (Fleiss 1981). In diesem Fall ist die Nullhypothese, d.h. die zufällige Verteilung der Marker, immer dann abzulehnen, wenn $\chi^2 > 3,84$ ist (Sachs 1974). Das 95% Konfidenz-Intervall hingegen überdeckt den Bereich der tatsächlichen Rekombinationshäufigkeit (entspricht in diesem Fall den in Centimorgan (cM) angegebenen Morgan-Einheiten) zu 95%. Hier war ein Kriterium, daß die obere Grenze des Intervalls kleiner als 50 sein mußte, da eine Rekombinationshäufigkeit von 50 für freie Verteilung der Merkmale steht. In zwei Fällen, für die Kopplungsanalyse von CosII 4 (EcoR I) mit CosII 2 (Xho I) und B14 (EcoR I) mit B15 (Kpn I), überschritt die obere Grenze des 95% Konfidenz-Intervalls den Wert 50, obwohl der χ^2 -Wert Kopplung anzeigte. In diesen Fällen ist eine Kopplung nicht sicher.

Der ebenfalls berechnete ϕ -Koeffizient ist ein Maß für die Signifikanz der berechneten Rekombinationshäufigkeit unabhängig vom Stichprobenumfang (der Anzahl analysierter Nachkommen). In der hier vorliegenden Verteilung muß der ϕ -Koeffizient größer als 0,34 sein, damit die Signifikanz der Kopplung unabhängig von der Stichprobengröße ist. Für die Markerpaarung B14 (EcoR I) - B15 (Kpn I), deren 95% Konfidenz-Intervall bereits über den Wert 50 hinausreicht ist der ϕ -Koeffizient mit 0,31 ebenfalls zu niedrig für eine signifikante Kopplung. Für das zweite Markerpaar, CosII 4 (Pst I) - CosII 2 (Xho I), dessen 95% Konfidenz-Intervall über 50 hinausgeht, liegt der ϕ -Koeffizient genau auf der Grenze zur signifikanten Kopplung.

Da die notwendigen Berechnungen für sehr viele Markerkombinationen durchzuführen waren und beim Hinzufügen neuer Markerdaten jedesmal eine vollständig neue Berechnung erfolgen muß, wurde die Auswertung mit Hilfe eines Computerprogramms durchgeführt. Das hier verwendete Programm, bezeichnet als RFLPDet1, wurde zu diesem Zweck entwickelt (Quellcode, siehe Anhang). Es berechnet u.a. Rekombinationshäufigkeiten, Konfidenz-Intervalle, χ^2 -Werte und ϕ -Koeffizienten für Marker einer beliebigen Kreuzung zweier haploider Organismen, ähnlich wie das Programm HAPMAP, welches für die Erstellung einer RFLP-Karte bei *C.heterostrophus* eingesetzt wurde (Bronson *et al.* 1989).

Die Verteilung der Markermuster auf die Nachkommen und die Aufstellung der Markerkombinationen, deren Kopplung nach dem χ^2 -Test zu 95% wahrscheinlich ist, sind in den Tabellen 3.7 und 3.8 dargestellt. Bei beiden Tabellen handelt es sich um Auswertungsprotokolle, die mit dem Programm RFLPDet1 erstellt wurden. Die vollständige Kopplungsanalyse für alle Marker, unabhängig vom Grad der Signifikanz, ist dem Anhang beigefügt.

Nr.	Markerbez.	Elterntyp:		Chi ² für die Elternallele	Nachkommen:		
		(a)	(b)		ges.	erfaßt	nicht erf.
1	B14(EcoRI)	14	30	5.11	46	44	2
2	CII 10 (Ps)	24	17	0.88	46	41	5
3	B17(EcoRI)	15	28	3.35	46	43	3
4	B1(PstI)	16	25	1.56	46	41	5
5	CosII2(Eco)	23	23	0.02	46	46	0
6	cosIII0(Ps)	25	18	0.84	46	43	3
7	cosII5(Eco)	18	27	1.42	46	45	1
8	CosII4(Pst)	14	27	3.51	46	41	5
9	B15(KpnI)	28	13	4.78	46	41	5
10	C4(KpnI)	22	19	0.10	46	41	5
11	cosII7(Pst)	16	15	0.00	46	31	15
12	C9(XbaI)	18	15	0.12	46	33	13
13	cosII2(Xho)	21	19	0.03	46	40	6
14	cosII21(Hi)	17	13	0.30	46	30	16
15	cosIII7(Xb)	18	22	0.23	46	40	6
16	cosIII1(Kpn)	27	18	1.42	46	45	1
17	Rish10000	25	21	0.20	46	46	0
18	Virulenz_2	12	35	10.30	47	47	0
19	Vir_3g	19	28	1.36	48	47	1

Tab. 3.7: Kopplungsanalyse mit Hilfe des Programms RFLPDet1. Markerverteilung der Elterntypen auf die Nachkommen.
a = erster Elterntyp (*G.pulicaris* R-6380), b = zweiter Elterntyp (hier *G.pulicaris* R-7843)

Marker1	Marker2	cM	Chi ²	95% K.I.	Phi	NK	MM	AA	AB	BA	BB
B14(EcoRI)	B17(EcoRI)	2.4	33.44	0.1 - 14.2	0.89	42	4	13	0	1	28
B14(EcoRI)	B1(PstI)	19.5	11.56	9.4 - 35.7	0.53	41	5	11	3	5	22
B14(EcoRI)	B15(KpnI)	40.0	3.86	25.3 - 57.1	0.31	40	6	12	1	15	12
B14(EcoRI)	C9(XbaI)	21.9	9.11	9.9 - 40.9	0.53	32	14	11	1	6	14
B14(EcoRI)	cosIII7(Xb)	17.9	14.04	8.1 - 34.4	0.60	39	7	12	1	6	20
CII 10 (Ps)	cosII7(Pst)	21.4	7.15	9.0 - 42.0	0.51	28	18	12	4	2	10
CII 10 (Ps)	cosIII1(Kpn)	27.5	5.84	15.1 - 44.5	0.38	40	6	18	5	6	11
B17(EcoRI)	B1(PstI)	17.9	12.32	8.1 - 34.4	0.56	39	7	11	3	4	21
B17(EcoRI)	C9(XbaI)	21.9	8.42	9.9 - 40.9	0.51	32	14	12	2	5	13
B17(EcoRI)	cosIII7(Xb)	23.7	8.21	12.0 - 41.0	0.46	38	8	11	3	6	18
B1(PstI)	cosIII7(Xb)	27.8	5.73	14.8 - 45.9	0.40	36	10	11	3	7	15
CosII2(Eco)	cosII2(Xho)	0.0	36.09	0.0 - 10.9	0.95	40	6	21	0	0	19
cosIII0(Ps)	cosII7(Pst)	3.4	21.63	0.2 - 19.8	0.86	29	17	15	1	0	13
cosIII0(Ps)	cosIII1(Kpn)	2.3	35.20	0.1 - 13.9	0.90	43	3	25	0	1	17
CosII4(Pst)	cosII2(Xho)	33.3	4.06	19.1 - 51.6	0.34	36	10	10	2	10	14
CosII4(Pst)	Rish10000	31.7	5.86	18.6 - 48.7	0.38	41	5	12	2	11	16
cosII7(Pst)	cosIII1(Kpn)	3.3	22.63	0.2 - 19.2	0.87	30	16	15	0	1	14
C9(XbaI)	cosIII7(Xb)	9.4	18.74	2.5 - 26.4	0.77	32	14	14	3	0	15
Virulenz_2	Vir_3g	13.0	21.92	5.4 - 27.2	0.69	46	2	12	0	6	28

Tab. 3.8: Kopplungsanalyse mit Hilfe des Programms RFLPDet1. Aufstellung aller Markerkombinationen, deren Kopplung nach dem χ^2 -Test zu 95% wahrscheinlich ist.
Marker 1, Marker 2 = verglichenes Markerpaar / 95% K.I. = 95% Konfidenz-Intervall / NK = Nachkommen / MM = Fehlpaarungen / AA, BB = Elterntypen / AB, BA = Rekombinationstypen

Das Programm selbst detektiert nur die Kopplung zwischen jeweils zwei Markern. Die Zusammenstellung der Kopplungsgruppen erfolgte daher von Hand. Dazu wurde die vom Programm berechneten Kopplung zweier Marker mit der Kopplung zu einer

weiteren Marke, die mit beiden oder einem der Marker des beliebig wählbaren Ausgangspaares signifikant gekoppelt war, verglichen.

Dazu ein Beispiel: Die Marker B 1 und B 14 sind signifikant miteinander gekoppelt. Ihr genetischer Abstand beträgt 19,5 cM. Der Marker B 17 ist sowohl mit B 14 (Abstand: 2,4 cM) als auch mit B 1 (Abstand: 17,9 cM) signifikant gekoppelt. Addiert man die Abstände von B 17 und B 14 (2,4 cM) und von B 17 und B 1 (17,9 cM) so ergibt das 20,3 cM, was leicht über 19,5 cM, dem berechneten Abstand von B 14 und B 1 liegt. Der Marker B 17 liegt somit zwischen B 14 und B 1. Die Differenz zwischen 20,3 cM und 19,5 cM ist dadurch begründet, daß bei der direkten Abstandsbestimmung zwischen den Markern innerhalb der Meiose aufgetretene "Doppelcrossover" unberücksichtigt bleiben, da sie sich nicht auf die Rekombinationshäufigkeit auswirken. "Doppelcrossover" können erst berücksichtigt werden, wenn ein dritter, zwischen den beiden ersten Markern liegender Marker mit berücksichtigt wird. Der Abstand zwischen den beiden äußeren Markern muß dann nach oben korrigiert werden (vgl. Suzuki *et al.* 1989).

Dieses Vorgehen wurde solange wiederholt, bis sämtliche Marker der Kopplungsgruppe gefunden waren.

Eine Analyse der Daten aus Tabelle 3.8 ergibt 3 Kopplungsgruppen, die im ersten Fall von zwei, im zweiten von vier und im dritten von 6 Markern beschrieben werden. Drei Marker zeigen keine signifikante Kopplung mit anderen und stehen ebenfalls für eigene Kopplungsgruppen.

Folgende Kopplungsgruppen wurden ermittelt:

Kopplungsgruppe I wird charakterisiert von den RFLP-Sonden B 14, B 17, B 1, C 9 und CosIII 7,

Kopplungsgruppe II besteht aus den Markern CII 10, CosII 7, CosII 1 und CosIII 10,

Kopplungsgruppe III besteht aus CosII 2 und CosII 4.

Bei den Markern, für die sich aus den durchgeführten Hybridisierungen keine signifikante Kopplung ablesen ließ, handelt es sich um CosII 5, C 4 und CosII 21. Der Marker B15 zeigt im χ^2 -Test Kopplung mit B14, die obere Grenze des Konfidenzintervalls liegt jedoch bei 57,1 und der Wert des ϕ -Koeffizienten liegt nur bei 0,31, so daß eine Kopplung nicht zu belegen ist.

Die im Rahmen der Untersuchungen der Kreuzungsnachkommen auf ihre Fähigkeit zum Rishitinabbau sowie ihre Virulenz auf Kartoffeln beobachteten Eigenschaften (Tab. 3.3 und 3.1) wurden ebenfalls für die Kopplungsanalyse eingesetzt. Bezüglich des Merkmals der Virulenz auf Kartoffeln konnte keine Kopplung mit einem anderen Marker bestimmt werden.

Das für die Fähigkeit zum schnellen Rishitinabbau gewählte Kriterium (Integral über dem Rishitinsignal kleiner als 10.000, Tab 3.3) erwies sich als signifikant gekoppelt mit dem Marker CosII 4.

Aus den für die einzelnen Marker ermittelten Abständen voneinander, läßt sich eine erste Kartierung der drei Kopplungsgruppen anfertigen (Abb. 3.8). In dieser Darstellung sind die durch Zweipunktanalyse ermittelten Abstände zwischen zwei Markern angegeben. Die Chromosomensymbole sind alle gleich groß gewählt, da keine genauen Größen bekannt sind. Ebenso deutet die Lage der Kopplungsgruppen auf den Symbolen nicht auf ihre tatsächliche Position hin. Die Abstände der einzelnen Marker sind innerhalb der Kopplungsgruppe maßstabsgetreu gewählt.

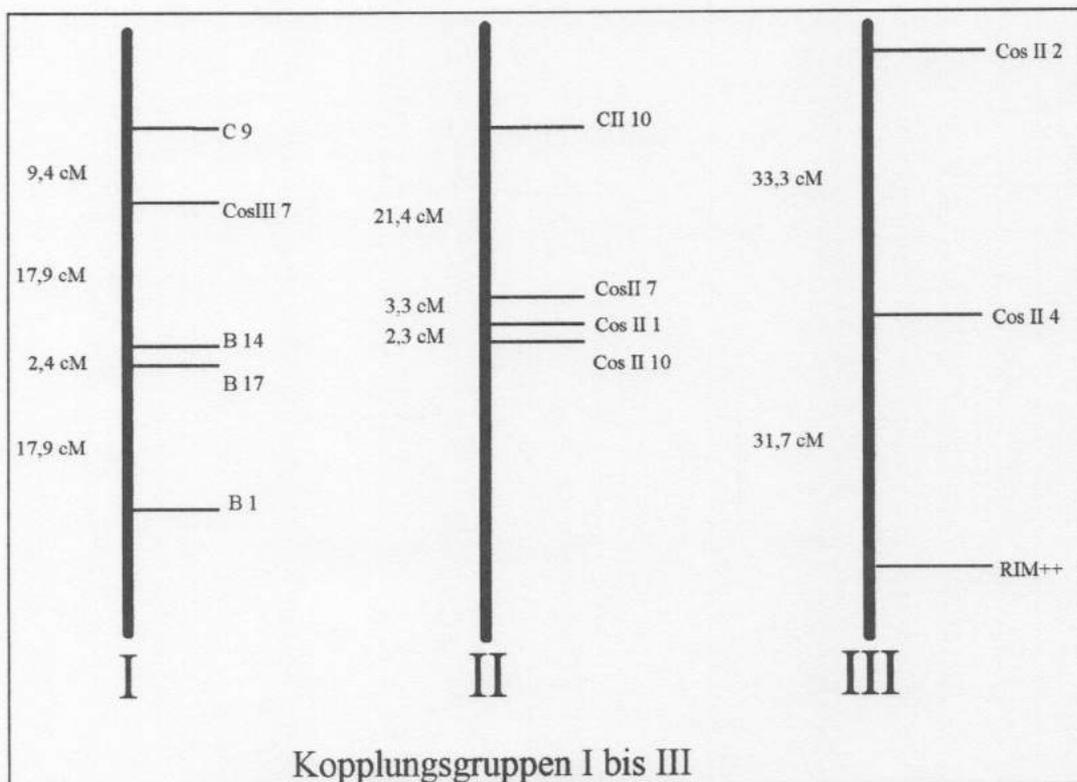


Abb. 3.8: Kopplungsgruppen-Analyse der Nachkommen aus der Kreuzung *G.pulicaris* R-6380 x R-7843. Schematische Darstellung der ermittelten drei Kopplungsgruppen. Die Markierung RIM++ steht für das Merkmal des schnellen Rishitinmetabolismus. Alle anderen Markierungen entsprechen den Bezeichnungen der zugehörigen RFLP-Marker. Die Größe der Kopplungsgruppensymbole und die Positionen der Kopplungsgruppen darauf sind willkürlich gewählt.

Kopplungsgruppe I überdeckt einen Bereich von 47,6 cM, Kopplungsgruppe II einen von 27 cM und Kopplungsgruppe III einen Bereich von 35 cM.

Der Klon Cos II 4 ist nach den durchgeführten Analysen signifikant mit der Fähigkeit zum schnellen Rishitinabbau (RIM++) gekoppelt. Der Abstand von 31,7 cM ist allerdings noch zu hoch, um ihn für die Klonierung des Gens einsetzen zu können. Er sollte jedoch für die chromosomale Lokalisation des Gens sowie bei der Suche nach enger mit der RIM++-Fähigkeit gekoppelten genetischen Marken dienlich sein.

3.4 Karyotypanalyse verschiedener Stämme von *G.pulicaris*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Karyotyp der für die Kreuzung eingesetzten Stämme von *G.pulicaris* bestimmt werden. Dazu mußten die chDNA-Präparationen sowie die Trennbedingungen innerhalb der Pulsfeldgelelektrophorese auf die zu analysierenden Stämme hin optimiert werden.

3.4.1 Optimierung der chDNA-Präparation

Für die chDNA-Präparation wurden die beiden für die Kreuzung eingesetzten Elternstämme *G.pulicaris* R-7843 und R-6380 sowie der im Rahmen der Arbeitsgruppe regelmäßig transformierte Stamm R-5690 verwendet.

Alternativ wurde die chDNA-Präparation aus Protoplasten, sowie aus jungem Myzel versucht.

Die anfänglich eingesetzten Protoplastierungsbedingungen waren auf den Stamm R-5690 hin optimiert. Als Protoplastierungspuffer dienten je 20ml 1,2 M KCl.

Novozym 243, Batch PPM 3276 und Driselase wurden in einer Konzentration von je 5 mg/ml zugesetzt (Tab 3.9).

Nach 4 stündiger Protoplastierung war die Protoplastenausbeute wie in Tabelle 3.9 dargestellt.

Stammbezeichnung	Frischgewicht	Protoplasten/ml	μ l insgesamt
R-5690	1,5 g	$8,9 \times 10^8$	510 μ l
R-6380	1,4 g	$6,9 \times 10^8$	510 μ l
R-7843	0,8 g	$1,4 \times 10^7$	450 μ l

Tab 3.9: Protoplastierung von *G.pulicaris*. Ergebnis des ersten Protoplastierungsexperimentes.

Wie von Brody und Carbon (1989) für chDNA-Präparationen bei *Aspergillus nidulans* beschrieben wurde, sollten Einbettungen erst ab einer Protoplastenkonzentration von 2×10^8 PPl/ml erfolgen [Walz und Kück (1990) beschreiben für ihre chDNA-Präparationen von *Acremonium chrysogenum* sogar Mindestkonzentrationen von 1×10^9 PPl/ml]. Daher wurden nur von R-5690 und R-6380 Agaroseblöckchen gegossen und die Protoplasten darin wie beschrieben (vgl. 2.3.7) lysiert.

Die erste Auftrennung im Pulsfeldgel (Abb 3.16.) lieferte nur für die chDNA-Präparationen von R-5690 ein gutes Ergebnis. Daraus wurde gefolgert, daß die eingebettete Protoplastenkonzentration, etwa aufgrund eines denkbaren anderen Kern-Cytoplasmaverhältnisses, für R-6380 noch viel zu niedrig war.

Das nächste Ziel war daher Protoplastenkonzentrationen von 1×10^9 PPl/ml oder noch darüber einzubetten.

Alternativ zur chDNA-Präparation aus Protoplasten wurde auch die von Kayser (1991) beschriebene Präparationsmethode aus jungem Myzel ausprobiert (vgl. 2.3.7). Diese lieferte wiederum für den Stamm R-5690 gute Ergebnisse, für die anderen Stämme jedoch nicht (vgl. Abb 3.16, Abb. 3.18).

Im Rahmen der Versuche zur Erhöhung der Protoplastenausbeute wurde zunächst das eingesetzte Frischgewicht gegenüber dem ersten Versuch auf je 2 g erhöht und die Protoplastierung in 40 ml 0,8 M KCl (optimal für R-5690) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sank die Protoplastenausbeute auf jeweils 1×10^8 PPI/ml in insgesamt je 210 μ l.

Nach einer Mitteilung von Risch (pers. Mittlg.) ist die Protoplastenausbeute stark abhängig von der Molarität des verwendeten Protoplastierungspuffers. Daher wurde im nächsten Schritt eine Protoplastierungsreihe mit Pufferkonzentrationen zwischen 0,4 und 1,2 M KCl durchgeführt. Jeweils 0,5 g Myzel der Stämme R-6380 und R-7843 wurden in je 20 ml Lysepuffer mit 100 mg Novozym 234, Batch PPM 3274 und 100 mg Driselase für 4,5 Stunden protoplastiert.

Die dabei erhaltenen Protoplastenausbeuten sind in Tabelle 3.10 zusammengestellt.

Stamm	Mol/l KCl	Protoplastenend- ausbeute pro ml	Endvolumen
R-6380	0,4	-	-
R-6380	0,6	$1,0 \times 10^6$	400 μ l
R-6380	0,8	$5,0 \times 10^6$	300 μ l
R-6380	1,0	$1,3 \times 10^8$	350 μ l
R-6380	1,2	$1,1 \times 10^8$	350 μ l
R-7843	0,4	$1,0 \times 10^6$	100 μ l
R-7843	0,6	$1,2 \times 10^7$	200 μ l
R-7843	0,8	$1,8 \times 10^7$	400 μ l
R-7843	1,0	$1,9 \times 10^8$	250 μ l
R-7843	1,2	$4,4 \times 10^8$	300 μ l

Tab. 3.10: Optimierung der Protoplastenausbeute für *G.pulicaris*, Stämme R-6380 und R-7843: Effekt der KCl-Konzentration des Protoplastierungspuffers auf die Protoplastenausbeute. Die Protoplastierung erfolgte jeweils aus 0,5 g Myzel in 20 ml Puffer mit 100 mg Novozym 234, Batch PPM 3276, sowie 100 mg Driselase.

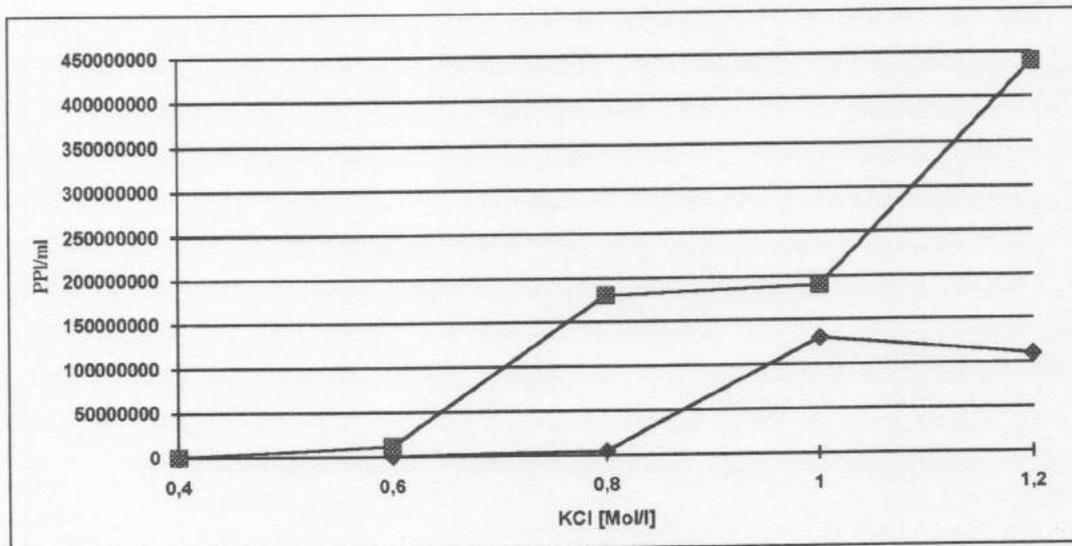


Abb. 3.15: Protoplastenpräparation von *G.pulicaris* R-6380 und R-7843. Einfluß der KCl-Konzentration des Protoplastierungspuffers auf die Protoplastenausbeute.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß für weitere Protoplastierungsversuche mit dem Stamm R-6380 1 M KCl und für den Stamm R-7843 1,2 M KCl gewählt werden sollte.

Nach den Erfahrungen aus diesen Vortests wurden dann in einem größeren Ansatz aus je 2 g Myzel für den Stamm R-7843 $1,5 \times 10^9$ PPI/ml (insgesamt 1 ml) und für den Stamm R-6380 4×10^8 PPI/ml (insgesamt 0,5 ml) gewonnen.

Desweiteren wurde untersucht, ob durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration von Novozym 234 und Driselase von 5 mg/ml auf 7,5 mg/ml eine weitere Steigerung der Protoplastenausbeute auftritt. Als Folge dieser Änderung konnte die Protoplastenausbeute für R-6380 nochmals auf $1,5 \times 10^9$ PPI/ml gesteigert werden; die Ausbeute für R-7843 stieg dabei auf $1,7 \times 10^9$ PPI/ml.

Da die bisher verwendete Novozym-Charge (Batch PPM 3276) nach diesen Experimenten aufgebraucht war, mußte für weitere Versuche auf den Batch PPM 3897 ausgewichen werden.

Mit dieser Charge sank die Protoplastierungsrate wieder um den Faktor 10.

3.4.2 Optimierung der Pulsfeldgelelektrophoresebedingungen für verschiedene Größenbereiche der Chromosomen

Bei der Optimierung der Chromosomenauftrennung wurden zunächst Bedingungen gewählt, wie sie von Kayser (1991) im Rahmen seiner Karyotypanalysen bei *Penicillium janthinellum* und *Absidia glauca* beschrieben wurden. Davon ausgehend wurden in weiteren Läufen einzelne Parameter variiert, welche die Auftrennung innerhalb der beobachteten Chromosomengrößenbereiche verbessern sollten. Dazu

wurden auch weitere, (Miao *et al.* 1991a, Biometra 1990) Protokolle eingesetzt, die für Auftrennungen in für uns interessanten Größenbereichen optimiert waren.

Wie oben beschrieben, verlief die Protoplastierung und chDNA-Präparation der beiden für die Kreuzung eingesetzten Stämme von *G.pulicaris* R-6380 und R-7843 nicht so wie erwartet. Stattdessen verlief sie gut für den Stamm R-5690. Aus diesem Grund wurden die Effekte veränderter Trennparameter insbesondere für diesen Stamm beobachtet.

Eine Zusammenstellung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Trennparameter findet sich in Tabelle 2.1.

Im folgenden sind die Ergebnisse der wesentlichen Pulsfeldgelelektrophoresen (PFGE) beschrieben. Aussagen über die Größen der aufgetrennten Chromosomen wurden nur insoweit gemacht, als sie durch den Vergleich mit den Chromosomen der Größenstandards möglich waren, da die Wanderung von Chromosomen in pulsfeldgelelektrischen Auftrennungen nicht immer relativ zu ihrer Größe erfolgt (Miao *et al.* 1991a).

Der erste Versuch zur Karyotypanalyse, dokumentiert in Abb. 3.16, wurde unter den Elektrophoresebedingungen 1 durchgeführt. Dieser Lauf mit festen Pulszeiten ließ für den Stamm R-5690 fünf Chromosomenbanden, die zweitgrößte davon eine Doppelbande, erkennen. Die ebenfalls mitgelaufenen chDNA-Präparationen von R-6380 und R-7843 zeigen hier nur jeweils eine Bande oberhalb von 5,7 mbp.

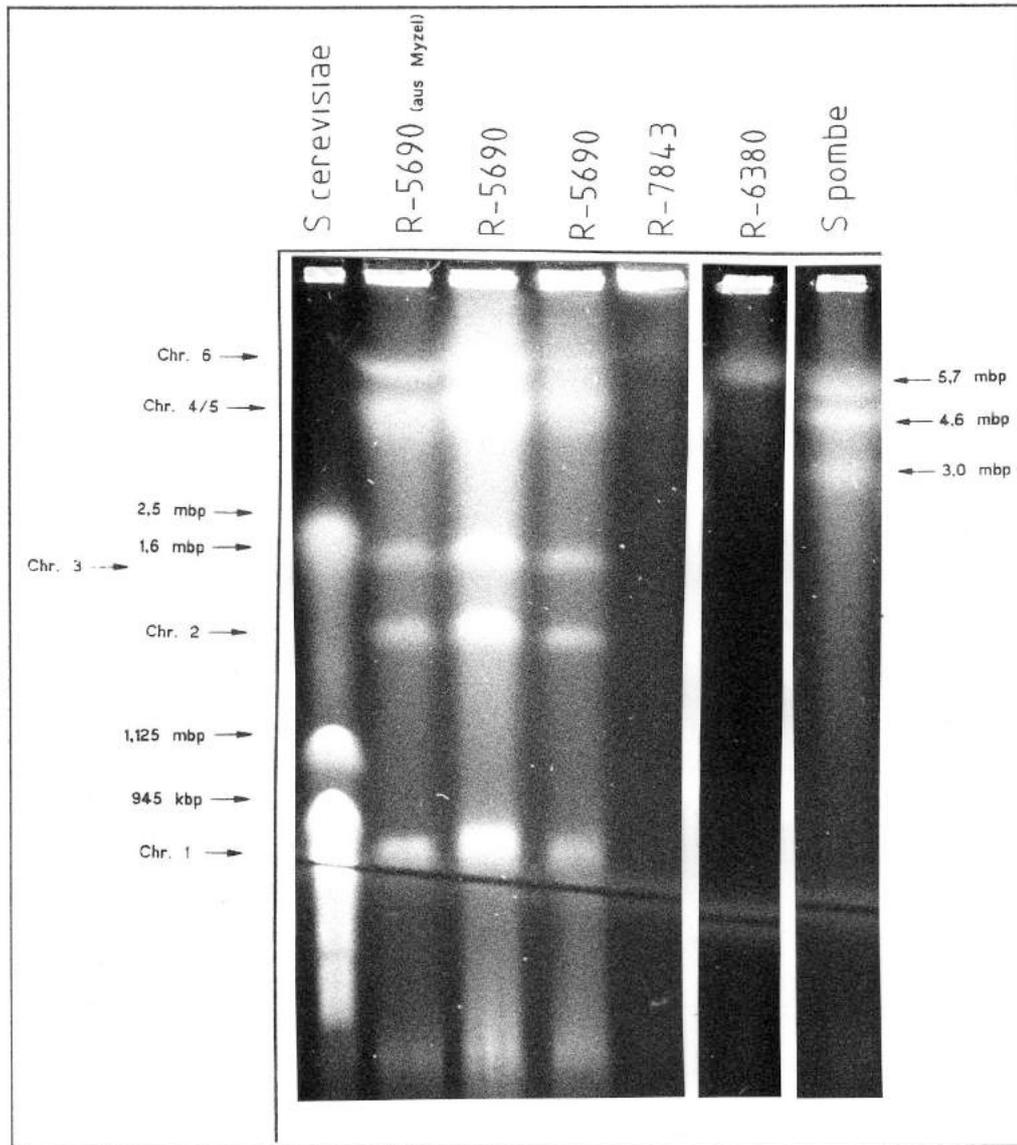


Abb. 3.16: Versuch zur Karyotypanalyse bei *G.pulicaris*. Pulsfeldgel 1. Elektrophoresebedingungen 1.

Die Chromosomen von R-5690 wurden für die weitere Beschreibung ausgehend von der in Abb. 3.16 dargestellten Auftrennung von 1 bis 6 (beginnend mit dem kleinsten Chromosom) durchnummeriert. Diese Nummerierung ist nur vorläufig und muß ggf. geändert werden, wenn eine Auftrennung aller Chromosomen gelungen ist.

Chromosom 6 liegt oberhalb der 5,7 mbp Bande des Größenstandards *S.pombe*. Chromosom 4 und 5 sind als Doppelbande etwa auf Höhe der 4,6 mbp Bande von *S.pombe* zu erkennen. Chromosom 3 liegt auf Höhe der 2,5 mbp Bande von *S.cerevisiae*. Chromosom 2 ist etwa in der Mitte des Abstandes zwischen der 2,5 mbp Bande und der 1,6 mbp Bande von *S.cerevisiae* positioniert. Chromosom 1 liegt im Bereich unter 1,125 mbp. In dieser Region ist auch der Standard nicht mehr deutlich aufgetrennt

Die zweite Auftrennung (Bedingungen 2, Tab. 2.1), dargestellt in Abb. 3.17, erfolgte mit linearen und logarithmischen Zeitabstufungen. Der Stamm R-5690 wurde dabei

einmal in Form einer chDNA-Präparation aus Protoplasten, sowie einmal als chDNA aus eingebettetem Myzel eingesetzt. Die Auftrennung ist etwas schlechter als im ersten Lauf (Abb 3.16).

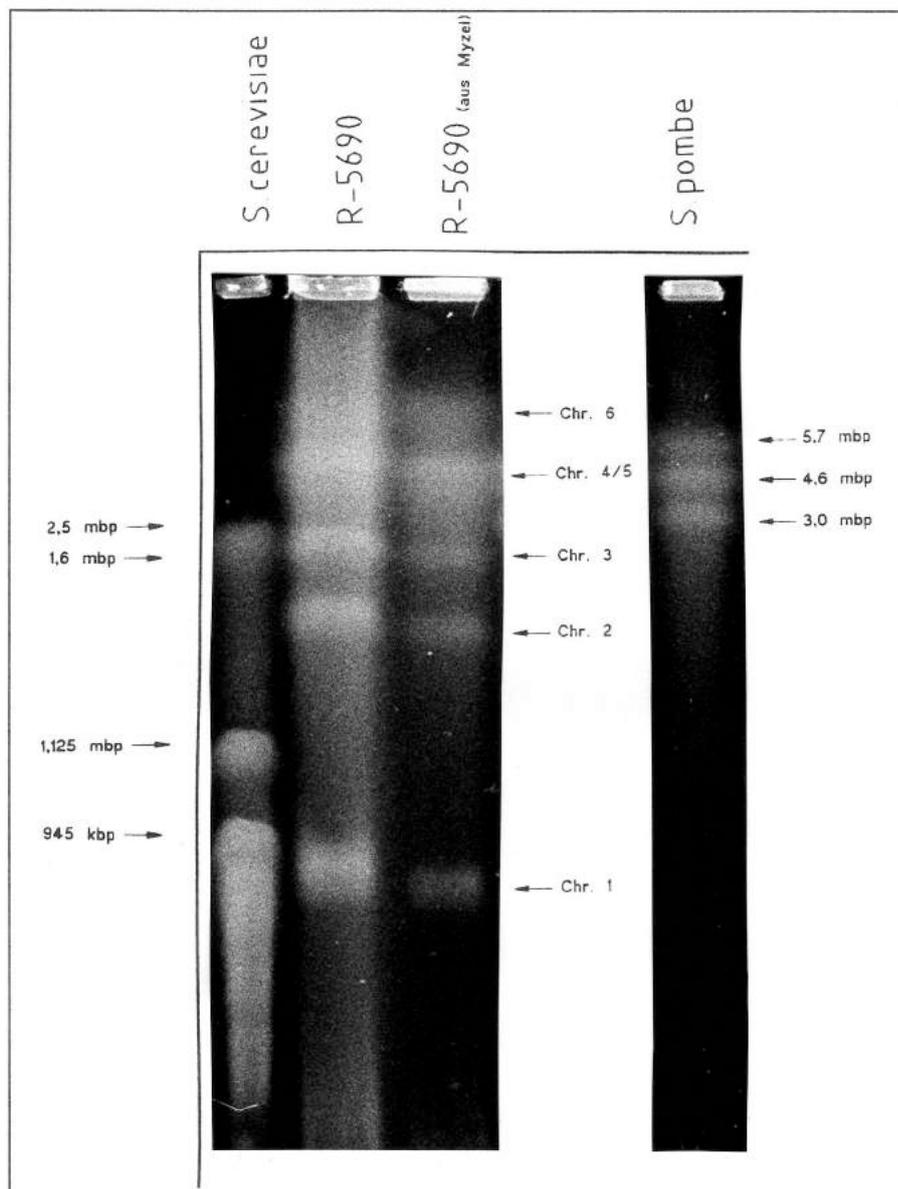


Abb. 3.17: Versuch zur Karyotypanalyse bei *G.pulicaris*. Elektrophoresebedingungen 2.

Da die Langzeitauftrennung mit festen Pulszeiten die besseren Ergebnisse lieferte, wurden für die nächsten beiden Ansätze (Bed. 3 und 4, Tab 2.1) ebenfalls feste Pulszeiten gewählt, dabei wurde jedoch die Abstufung der Pulszeiten untereinander verändert. Unter den Bedingungen 3 wurde eine weitere Pulszeit von 1.800 s eingefügt und die Dauer des Laufes um 5 Stunden verlängert. Eine verbesserte Auftrennung für R-5690 ergab sich dadurch jedoch nicht. Die Abstände der Chromosomen blieben in etwa gleich. Daraus wurde geschlossen, daß bei der gewählten Feldstärke von 1,4 V/cm eher längere Pulszeiten als 1.800 s zu einer Verbesserung der Auftrennung führen sollten.

Die Bedingungen 4 aus Tab. 2.1 (Abb. 3.18) waren eigentlich nicht in dieser Form beabsichtigt. Bedingt durch einen Geräteausfall wurde die Auftrennung nach 258h beendet. Für R-5690 hatte sich in diesem Lauf die Auftrennung der Chromosomen 2 und 3 deutlich verschlechtert, wohingegen die Doppelbande der Chromosomen 4 und 5 deutlicher ist und zudem weiter als bisher von der obersten Bande des Chromosoms 6 entfernt liegt. In den Spuren mit R-6380 und R-7843 kann man in diesem Lauf die obere Bande deutlich erkennen. Etwas oberhalb von Chromosom 1 (bei etwa 1,125 mbp), zwischen Chromosom 2 und 3 (etwa 2,5 mbp) sowie am unteren Rand der Doppelbande von Chromosom 4/5 (etwa 4,6 mbp) sind in den Laufspuren der Proben mit R-6380 und R-7843 3 Schattenbanden zu erkennen. Ob diese Banden tatsächlich Chromosomen repräsentieren ist noch nicht klar, da sie unter anderen Trennbedingungen nicht beobachtet werden konnten.

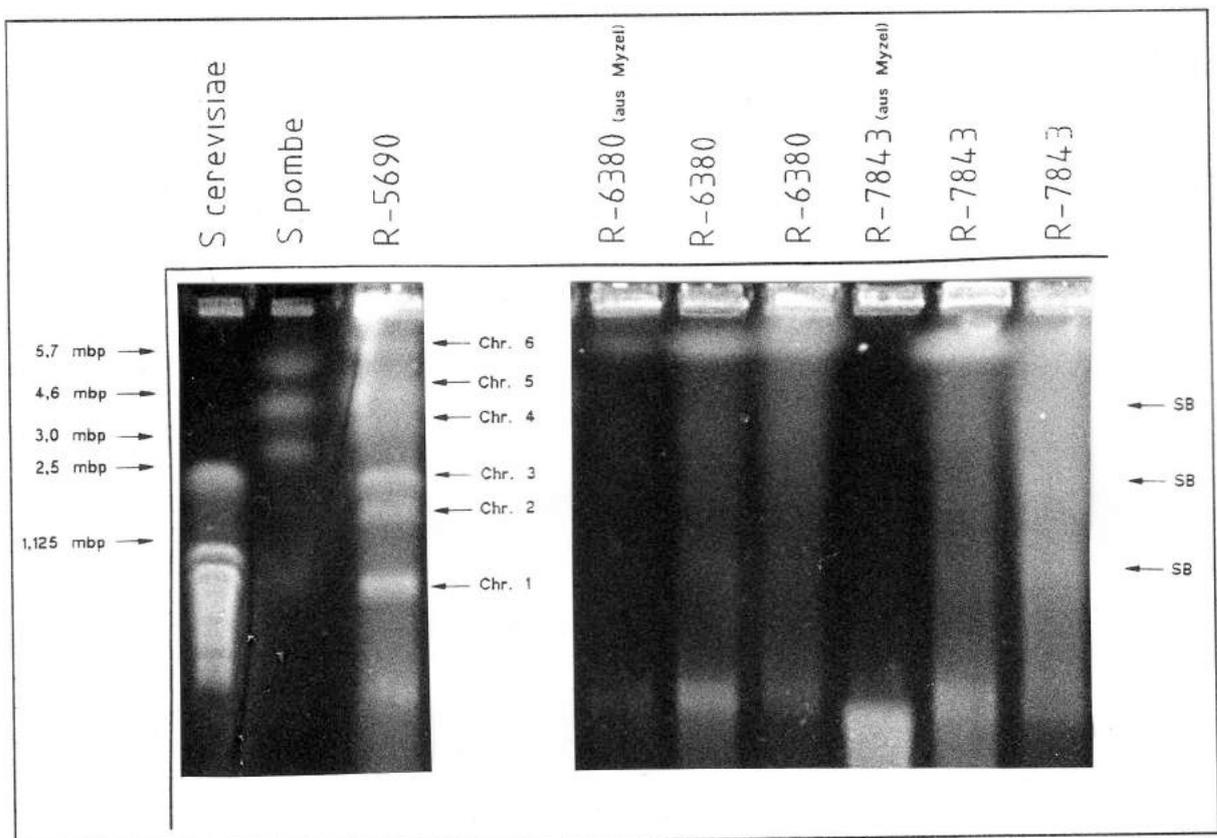


Abb. 3.18: Versuch zur Karyotypanalyse bei *G.pulicaris*. Elektrophoresebedingungen 4. SB = Schattenbande

Ein weiterer Lauf, nach Angaben von Biometra (1990) optimiert auf Trennungen im Bereich von 1 - 6 mbp (Bed. 5, Abb 3.19), trennte die Doppelbande der Chromosomen 4 und 5 von R-5690 auf. Gleichzeitig wurden die Banden aber unschärfer, so daß die oberste Bande von Chromosom 6 praktisch nur noch zu erahnen war. Die Laufspur von R-7843 lag unter diesen Bedingungen sehr stark degeneriert vor und zog sich als deutlicher "Schmier" über die gesamte Laufspur. Lediglich die obere Chromosomenbande ist noch zu identifizieren. Eine Auftrennung unterhalb von 1 mbp erfolgte unter

diesen Bedingungen nicht, was am Laufverhalten des Größenmarkers *S.cerevisiae* deutlich wird. Die Auftrennung für *S.pombe* ist dagegen gut.

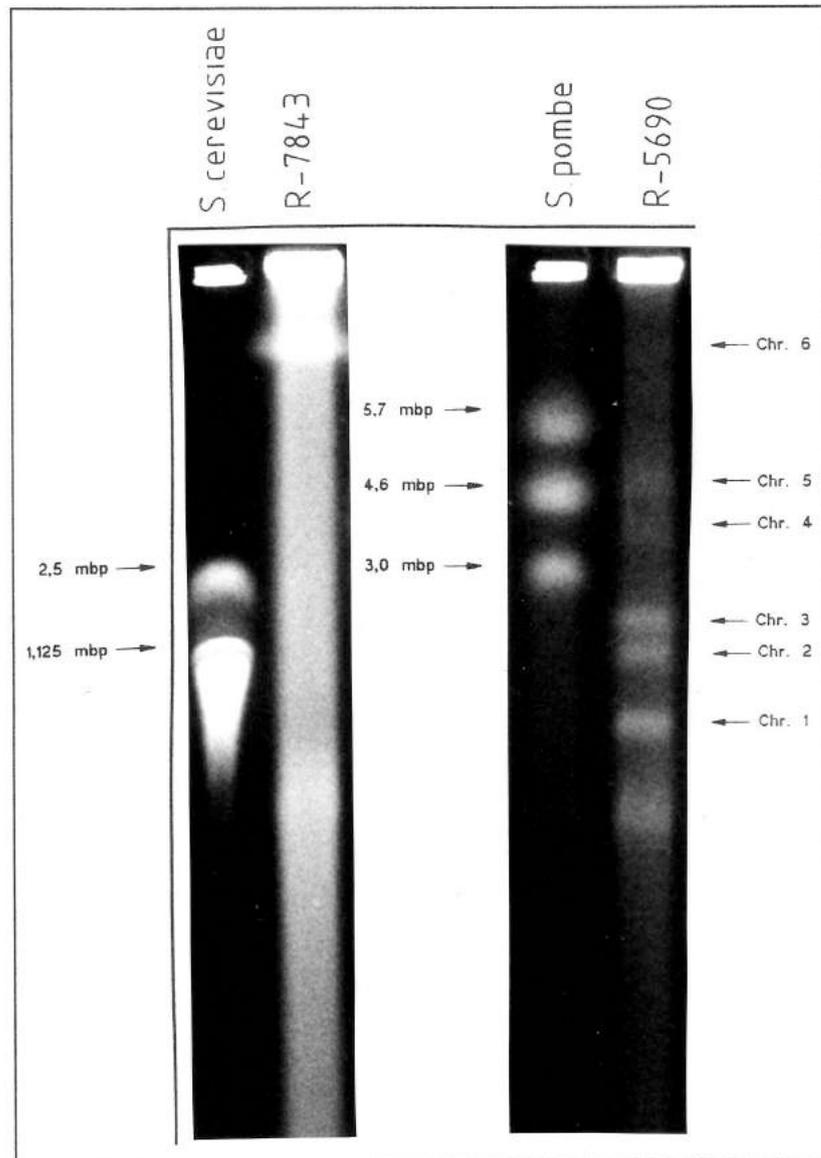


Abb. 3.19: Versuch zur Karyotypanalyse bei *G.pulicaris*. Elektrophoresebedingungen 5.

Der nächste Lauf sollte eine Trennung auch unterhalb von 1 mbp ermöglichen. Dafür wurden die Bedingungen 6 gewählt (Tab. 2.1), die nach Befunden von Biometra (1990) eine gute Trennung im Bereich von 0,5 - 6 mbp gewährleisten. Wie in Abb. 3.20 zu sehen ist die Trennung im Bereich unter 1 mbp tatsächlich erfolgt. Für R-6380 und R-7843 ist hier die bisher beobachtete breite Chromosomenbande in zwei Banden aufgespalten. Beide liegen oberhalb der Bande des Chromosoms 6 von *G.pulicaris* R-5690. Letztere kann hier auch für R-5690 als Chromosom 7 beobachtet werden.

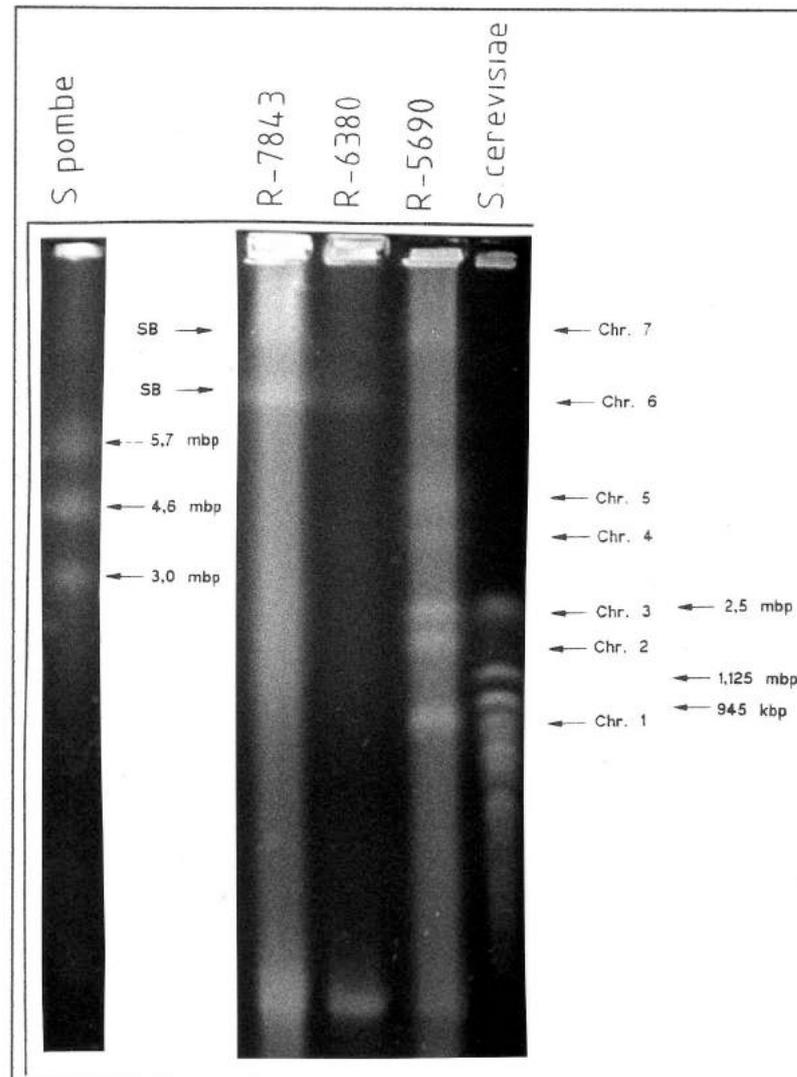


Abb. 3.20: Versuch zur Karyotypanalyse bei *G. pulicaris*. Elektrophoresebedingungen 6.

Um den Größenbereich der bisher nur für R-5690 beobachteten Chromosomen 1 bis 3 besser aufzutrennen, wurden Bedingungen ausprobiert, die über den gesamten Größenbereich von 0,245 bis 2,5 mbp der 13 Chromosomen des eingesetzten *S. cerevisiae* Stammes auflösen (Bed. 7, 8).

Mit den Bedingungen 7 (Tab. 2.1) erfolgte eine Auftrennung bis in einen Bereich von unter 50 kbp. Dabei konnten für den Stamm R-6380 eine und für den Stamm R-7843 drei charakteristische Plasmidbanden beobachtet werden (Abb. 3.21). Diese Banden konnten auch in Elektrophoresen mit Gesamt-DNA der beiden Stämme beobachtet werden. Vermutlich handelt es sich bei diesen Plasmiden um RNA-Plasmide, da sie nach kurzzeitiger RNase Behandlung nicht mehr auftreten (Abb. 3.22).

Für R-5690 sind in dieser Auftrennung, neben einer breiten Bande an der oberen Grenze des Trennbereiches, zwei distinkte Banden zu sehen. Sie liegen im Vergleich zu früheren Auftrennungen in einem Bereich der bisher als Chromosom 1 bezeichnet wurde. Offenbar ist diese Bande tatsächlich eine bisher nicht getrennte Doppelbande. Daher wird im weiteren von Chromosom 1a und 1b gesprochen. Im Vergleich mit dem Größenstandard (Abb. 3.23) liegt Chromosom 1a knapp unter der 1,125 mbp Bande,

Chromosom 1b liegt etwas oberhalb der 1 mbp Bande, was einem Größenunterschied von etwa 120 kbp entspricht. Weiterhin zeigt sich in der Laufspur von R-5690 eine breite Schattenbande bei etwa 0,5 mbp (vgl. Abb. 3.34).

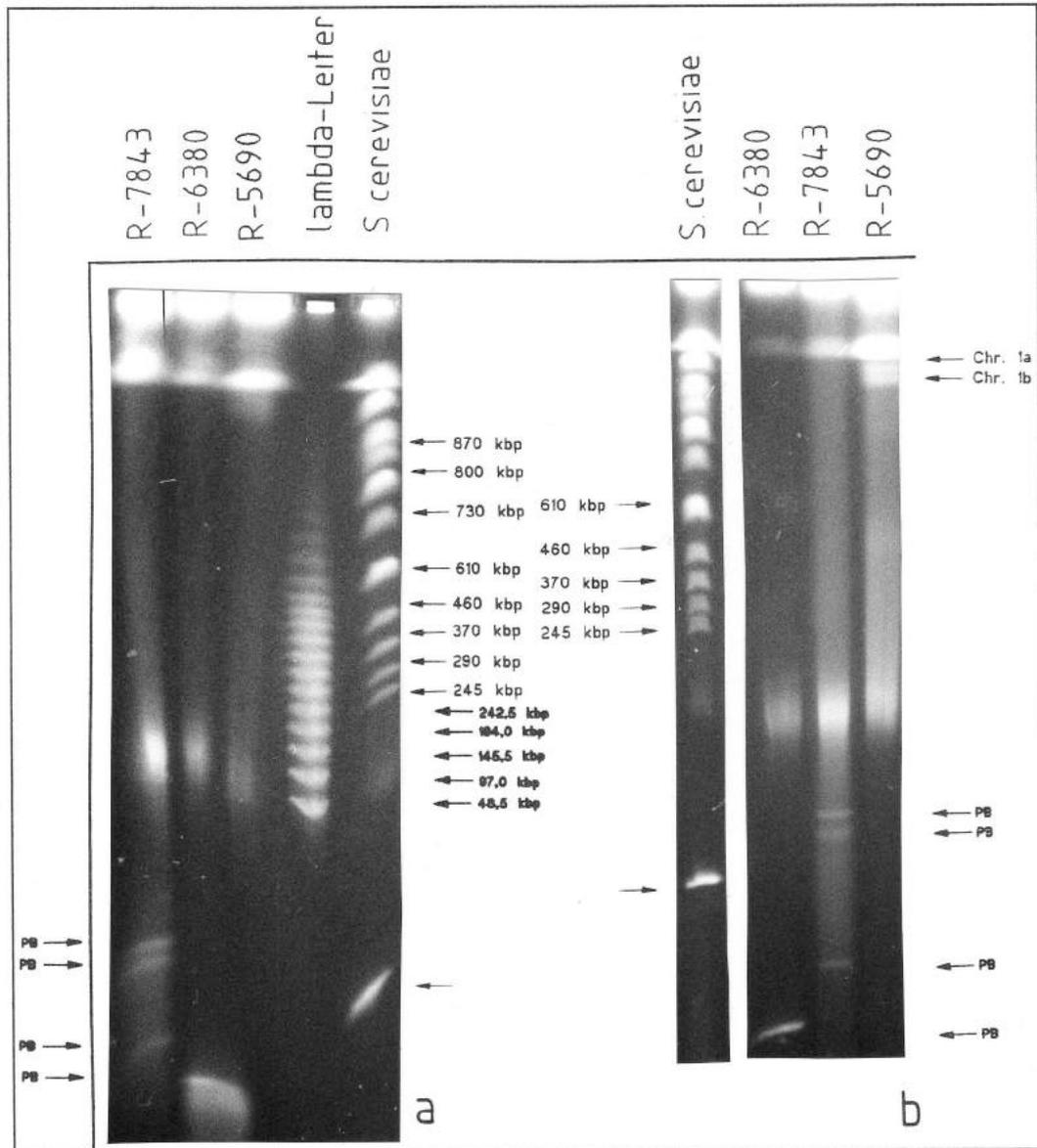


Abb. 3.21a/b: Versuch zur Karyotypanalyse bei *G.pulicaris*. Elektrophoresebedingungen 7a/b. Die in der Auftrennung 7a zu beobachtende Schrägstellung der Banden, beruht auf Salzablagerungen auf einer Elektrode. PB = Plasmidbanden. Pfeil ohne Beschriftung = Plasmidbande im Chromosomenstandard

Die Auftrennung der Chromosomen 1a und 1b erfolgte auch unter den Bedingungen 8 (Abb. 3.23). Innerhalb dieses Laufes waren für R-7843 drei kleine Chromosomen als schwache, verschmierte Banden zu erkennen. Sie liegen im Vergleich mit den *S.cerevisiae*-Banden etwa bei 0,8, 1,125 und 2,5 mbp.

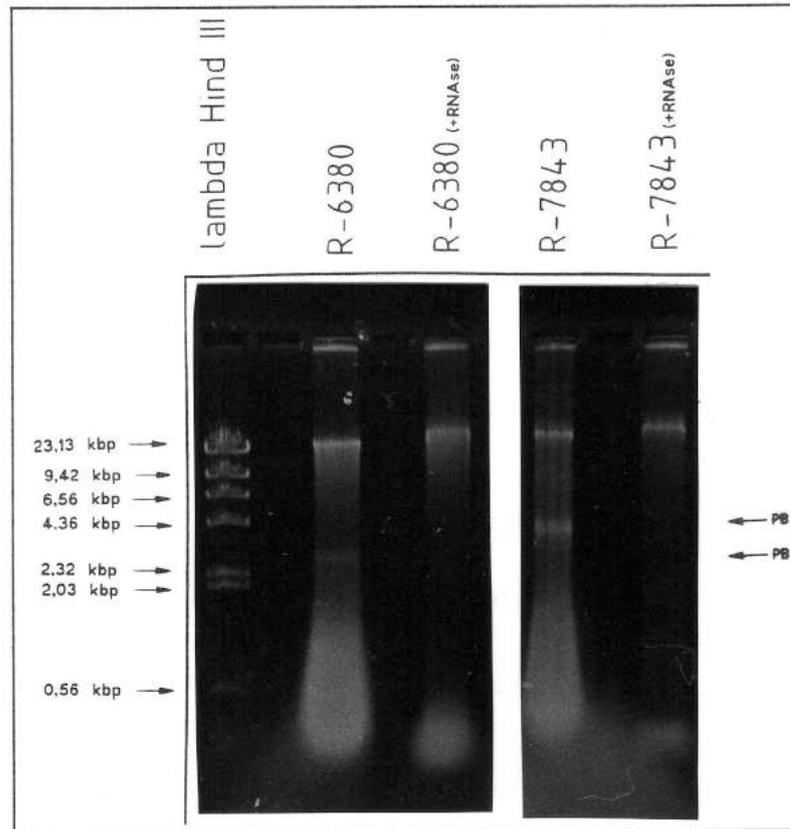


Abb. 3.22: Elektrophorese einer CTAB-Gesamt-DNA-Isolation der Stämme *G.pulicaris* R-6380 und R-7843, einmal ohne und einmal mit 10 minütiger RNase Behandlung. Deutlich sichtbar ist das Verschwinden der Plasmidbanden nach RNase Behandlung. PB = Plasmidbanden

Das eben beschriebene kleine Chromosom von R-7843 konnte noch in einer weiteren Auftrennung unter den Bedingungen 9 beobachtet werden (Abb. 3.24). In dieser Auftrennung sind starke Degradationen der DNA aufgetreten, so daß die Laufspuren mit "DNA-Schmier" überzogen sind. Dennoch erkennt man auch für R-5690 wieder schwach die Banden von Chromosom 1a und 1b, daneben aber auch noch drei weitere sehr schwache Banden im Größenbereich zwischen 610 und 460 kbp (Nr. 9, 10, 11) sowie eine vierte Bande bei 870 kbp (Nr. 8). Für R-6380 und R-7843 beobachtet man auf Höhe des 2,5 mbp Chromosoms von *S.cerevisiae* ebenfalls eine Chromosomenbande.

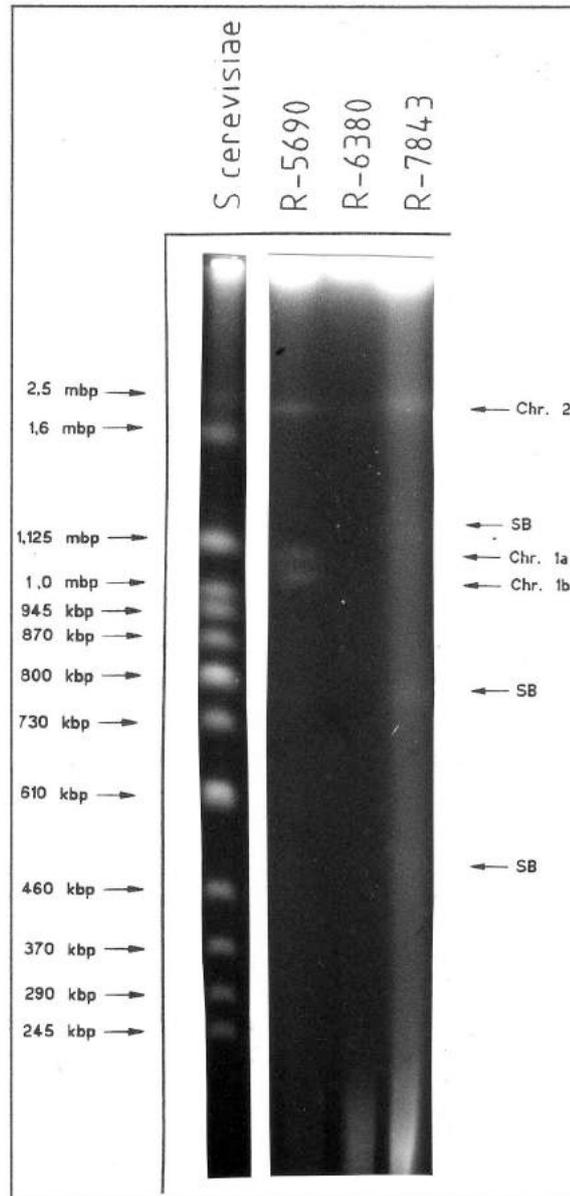


Abb. 3.23: Versuch zur Karyotypanalyse bei *G. pulicaris*. Elektrophoresebedingungen 8. SB = Schattenbande

Weitere Optimierungen der Auftrennungen konnten nicht durchgeführt werden, da die Pulsfeldgelelektrophoresekammer wegen eines defekten Ventils zum Ende der Arbeit für längere Zeit nicht einsetzbar war.

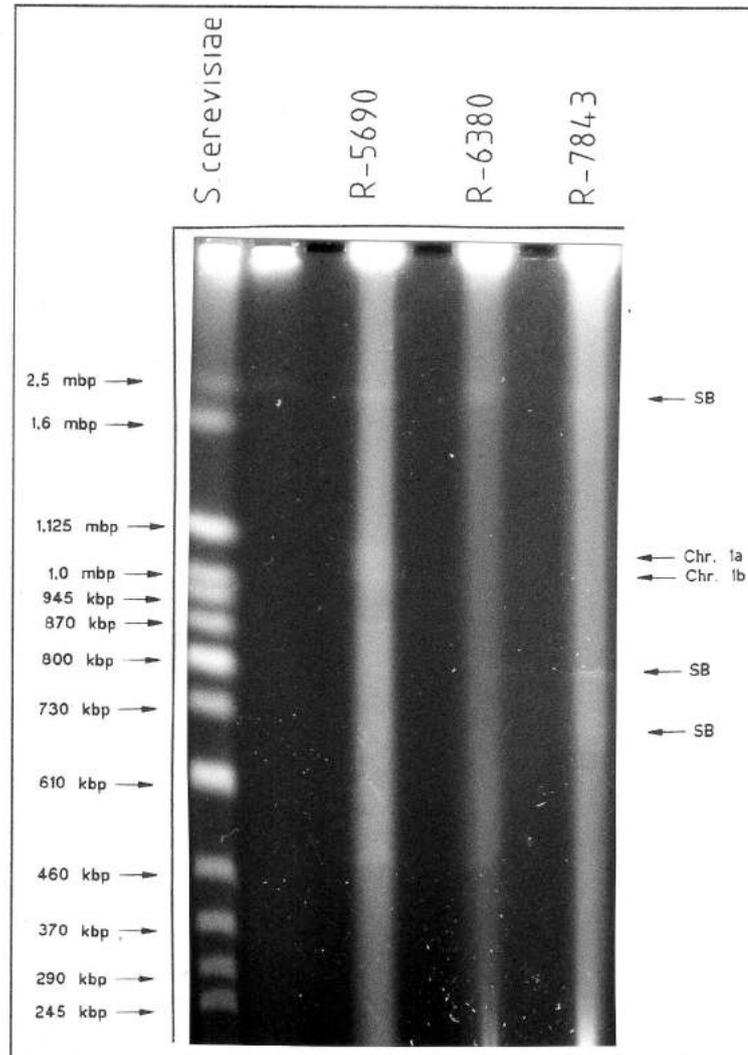


Abb. 3.24: Versuch zur Karyotypanalyse bei *G. pulicaris*. Elektrophoresebedingungen 9. SB = Schattenbande

3.4.2 Karyotypen der analysierten Stämme

Aus den Ergebnissen der pulsfeldgelelektrophoretischen Auftrennungen lassen sich erste Aussagen zum Karyotyp der untersuchten Stämme R-5690, R-7843 und R-6380 machen (Tab 3.11).

R-5690	R-6380	R-7843	Größenbereich
2 Chromosomen (Nr. 6, 7)	2 Chromosomen	2 Chromosomen	über 5,6 mbp
1 Chromosom > 4,6 mbp (Nr. 5)	1 Chromosom	1 Chromosom	etwa 4,6 mbp
1 Chromosom < 4,6 mbp (Nr. 4)			
1 Chromosom (Nr. 3)	1 Chromosom	1 Chromosom	etwa 2,5 mbp
1 Chromosom (Nr. 2)			etwa 2 mbp
1 Chromosom (Nr. 1a)	1 Chromosom	1 Chromosom	etwa 1,125 mbp
1 Chromosom (Nr. 1b)			etwa 1,02 mbp
1 Chromosom (Nr. 8)			etwa 0,87 mbp
		1 Chromosom	etwa 0,8 mbp
3 Chromosomen (Nr. 9,10,11)			etwa 0,5 mbp
	1 RNA-Plasmid	3 RNA-Plasmide	unter 50 kbp

Tab. 3.11: Aufstellung der im Rahmen der Karyotypanalyse bisher beobachteten Chromosomengrößen für die *G.pulicaris* Stämme R-5690, R-6380 und R-7843. Die in Klammern angegebene Nummerierung der Chromosomen von R-5690 entspricht der im Text verwendeten.

Aus den Effekten, die die eingesetzten Bedingungen auf die Chromosomentrennung hatten (vgl. 3.4.1), ist zu erwarten, daß bei weiteren Auftrennungen unter verbesserten Trennbedingungen noch weitere Chromosomen differenzierbar sein werden. Die eingeführte Nummerierung der Chromosomen von R-5690 muß zu gegebener Zeit noch einmal überdacht werden. Für die beiden anderen Stämme wurde noch keine Nummerierung der Chromosomen eingeführt.

4. Diskussion

4.1 Kreuzung der *G.pulicaris* Stämme R-6380 und R-7843

Eine Voraussetzung für die Durchführung der RFLP-Analyse von *G.pulicaris* war die Verfügbarkeit von Nachkommen aus einer Kreuzung von R-6380 mit einem zweiten Stamm. Nachkommen aus der Kreuzung 1104 von Desjardins und Gardner (1989) standen als Reserve zur Verfügung, sollten jedoch nur ergänzend mit untersucht werden.

Die eigene Isolation von Kreuzungsnachkommen war somit eine wichtige Voraussetzung für die Arbeiten zur RFLP-Analyse von *G.pulicaris*.

Der Kreuzungsansatz R-6380 x R-7843 konnte erfolgreich durchgeführt und dabei Perithezienbildung und ausdifferenzierte Ascosporen beobachtet werden. Nur ein Bruchteil der gebildeten Ascosporen wurde isoliert.

Die von Desjardins und Beremand (1986) beschriebene Kreuzungstechnik für *G.pulicaris* auf Maulbeerbaumästchen kann somit auch unter den in unserem Labor vorliegenden Bedingungen nachvollzogen werden.

Wie unter 3.1.1 beschrieben wurde nur für etwa 10% der gebildeten Protoperithezien eine Ausdifferenzierung zu Perithezien beobachtet. Das entspricht insofern den Beobachtungen von Desjardins und Beremand (1986), als sie angeben, daß die Differenzierung zu Perithezien nicht für alle Protoperithezien erfolgte. Sie geben weiterhin an, daß in ihren Ansätzen oft nur geringe Anteile reifer Perithezien auftraten, wenn der männliche Partner bereits vor der Protoperithenbildung zugefügt wurde. Prozentuale Angaben z.B. wieviele Protoperithezien in reife Perithezien ausdifferenzieren machen sie nicht, so daß kein direkter Vergleich möglich ist.

Innerhalb der selbst durchgeführten Kreuzung wurde spätestens nach 8 Wochen mit einer Konidiensuspension des männlichen Kreuzungspartners R-7843 überschichtet. Nicht in allen Kreuzungsansätzen waren zu diesem Zeitpunkt bereits Protoperithezien zu erkennen; viele zeigten sich erst danach. Die Beobachtung, daß unter 10% der Protoperithezien in reife Perithezien differenzierten, ist daher möglicherweise mit einer noch zu frühen Inokulation mit dem männlichen Kreuzungspartner zu erklären.

Daraus kann für weitere Kreuzungen geschlossen werden, daß auch länger als 8 Wochen auf das Auftreten von Protoperithezien gewartet werden sollte, bevor mit einer Konidiensuspension des männlichen Kreuzungspartners überschichtet wird.

Im Gegensatz zur Kreuzung 1104 von Desjardins und Gardner (1989) konnte keine herabgesetzte Keimungsrate für die Ascosporen aus der Kreuzung R-6380 x R-7843 beobachtet werden. 32 von 33 isolierten Ascosporen keimten aus. Wie erwähnt

(vgl. 3.1.2) wurde die einsetzende Keimung in vielen Fällen bereits eine halbe Stunde nach Überführen der Ascosporen auf Wasseragar unter dem Mikroskop beobachtet.

4.2 Analyse des Virulenzverhaltens und der Rishitinabbaufähigkeit der Elternstämme und der Kreuzungsnachkommen

Die Bestimmung der Virulenz auf Kartoffeln sowie die Rishitinabbaufähigkeit der Nachkommen aus der Kreuzung sollten als phänotypische Marken für die RFLP-Analyse eingesetzt werden. Weiterhin sollte beobachtet werden, ob die von Desjardins und Gardner (1989) beobachtete, von der Gleichverteilung abweichende, 3:1 bzw. 1:3 (stark:schwach) Segregation (vgl. 1.2) für Virulenzverhalten und Rishitinmetabolismusfähigkeit auch für die aus dieser Kreuzung isolierten Nachkommen zuträfe.

Die hier diskutierten Versuchsergebnisse beruhen nur auf relativ geringen Nachkommenszahlen. Versuchsreihen zur statistischen Absicherung der erhaltenen Ergebnisse konnten nicht mehr durchgeführt werden. Dies soll baldmöglichst nachgeholt werden.

4.2.1 Virulenzverhalten im Biotest

Der Biotest auf Kartoffeln beruht auf der Fähigkeit der eingesetzten Kartoffelsorten auf Verletzungsreize hin rasch Phytoalexine freizusetzen, die das Wachstum sensitiver Organismen stark hemmen (vgl. 1.2).

Wie unter 3.2.1 (Abb 3.5) beschrieben, war die Virulenz der getesteten Nachkommenstämme auf den eingesetzten Kartoffeln der Sorte Sieglinde sehr unterschiedlich.

Für die Stämme R-7843 (K) und R-6380 (K), die von Desjardins zur Verfügung gestellt worden waren, zeigte sich unter den gewählten Bedingungen statt der erwarteten höheren Virulenz von R-6380 (Desjardins und Gardner 1989), genau das Gegenteil. R-7843 war deutlich virulenter als R-6380. Dafür kann es mehrere Erklärungen geben:

- Für die Virulenz auf der Kartoffelsorte Sieglinde könnten Faktoren notwendig sein, die für die Virulenz von *G.pulicaris* R-6380 und R-7843 auf den von Desjardins und Gardner (1989) getesteten Sorten Russel Burbank und Sebago keine Rolle spielen,
- die Stämme R-6380 (K) und R-7843 (K) könnten durch die lange Kultivierung auf V8-Medium in bezug auf ihr Virulenzverhalten degeneriert sein oder
- die Stämme sind vertauscht worden.

Die für die Kreuzung als Eltern eingesetzten Stämme R-6380 (L) und R-7843 (L), die von Nelson (pers. Mittlg.) zur Verfügung gestellt wurden, erwiesen sich im Gegensatz zu den (K)-Stämmen beide als hoch virulent auf dieser Sorte. Über 50% des Kartoffelgewebes war nach 3 Tagen verrottet.

Damit war der Test in bezug auf die Vererbung von Virulenz der beiden Eltern gegenüber dieser Kartoffelsorte nicht auszuwerten.

Sinnvoll ist es, diesen Test mit anderen Kartoffelsorten zu wiederholen. Dazu sollten möglichst die Sorten Russel Burbank oder Sebago, für die R-6380 und R-7843 nach Untersuchungen von Desjardins und Gardner (1989) unterschiedliche Virulenz zeigen, eingesetzt werden. Alternativ können auch andere Sorten verwendet werden, bei denen sich im Rahmen von Vortests deutlich unterschiedliche Virulenz der Elternstämme zeigt.

Obwohl die Elternstämme im Biotest nahezu die gleiche Virulenz aufwiesen, zeigten die Nachkommen der Kreuzung auf der Kartoffelsorte Sieglinde deutliche Unterschiede im Virulenzverhalten (vgl. Tab. 3.1 und Abb. 3.5). Denkbar ist, daß Virulenzfaktoren, die in beiden Eltern gegenüber den Resistenzmechanismen der eingesetzten Kartoffelsorte vorhanden sind, für die Nachkommen getrennt segregieren. Die auftretende Segregation der Virulenz könnte z.B. durch Virulenzgene bewirkt werden, die den gleichen virulenten Phänotyp auf dieser Sorte bewirken, im Genom jedoch unterschiedlich lokalisiert sind.

Für den Fall das diese Gene nicht gekoppelt vererbt werden und jedes allein den virulenten Phänotyp bewirkt, sollte unter den Nachkommen eine 3:1 Aufspaltung (virulent:nichtvirulent) auftreten. Letzteres ist der Fall, wenn als Grenze für den nichtvirulenten Phänotyp ein Verrotten von weniger als 2 g Gewebe gewählt wird. Diese Grenze ist jedoch willkürlich gezogen und hängt vor allem von der Definition eines virulenten Stammes ab.

Möglich wäre ebenfalls eine Lokalisation der Virulenzgene auf instabilen Chromosomen, wie von Miao *et al.* (1991b) für das *Pda*-Gen von *N.haemotococca* beschrieben. Abhängig von der Stabilität dieser Chromosomen wäre der Verlust des virulenten Phänotyps mehr oder weniger häufig zu beobachten. Ein Hinweis, daß derartige Chromosomen in *G.pulicaris* denkbar sind, ist die Beobachtung von Desjardins und Gardner (1989), daß im Rahmen einer Kreuzung eines virulenten mit einem nichtvirulenten Stamm der virulente Phänotyp innerhalb einer Tetrade völlig verschwinden kann (vgl. 1.2).

Es war schwierig ein Kriterium für den virulenten Phänotyp festzulegen, da die Eltern beide hoch virulent auf der Kartoffelsorte Sieglinde waren (über 50% Gewebe verrottet) und die Nachkommen sehr unterschiedliche Virulenz zeigten. Wie beschrieben (vgl. 3.2.1), wurden überprüft, ob eine Grenzziehung bei 2 g, 3 g, 4 g, 5 g

oder 6 g verrottetem Gewebe eine Kopplung des so definierten virulenten Phänotyps mit einem RFLP-Marker zeigte. Dies traf für keines der möglichen Kriterien zu.

Alternativ zur diskutierten 2 g Grenze, bei der eine 3:1 Auspaltung (virulent:nichtvirulent) aufträte, sollte auch die 4 g Grenze mit in die Diskussion einbezogen werden, da 4 g etwa der Hälfte der maximal beobachteten Menge (7,8 g bei R-6380 [K]) an verrottetem Geweben entspricht.

Für die teilweise isolierte Tetrade (P_3A_1 - P_3A_5) mit 5 Ascosporen findet man unter dem 4 g Kriterium eine Aufspaltung der Virulenz von 1:1,5 (virulent:nichtvirulent). Vergleicht man alle ausgewählten 46 Nachkommen unter dem 4 g Kriterium, so ist die Aufspaltung 1:1,2. Diese Grenzziehung wäre dann sinnvoll, wenn die Elternstämme ein deutlich unterschiedliches Virulenzverhalten gezeigt hätten. In diesem Fall hätte die Möglichkeit, daß die Virulenz auf dieser Kartoffelsorte stark von nur einem Gen beeinflußt wird, diskutiert werden können.

Für die Diskussion noch höherer Grenzen, z.B. mindestens 6 g verrottetes Gewebe, als Kriterium für einen virulenten Stamm, wäre das Verhältnis virulent zu nichtvirulent etwa 1:9. In diesem Fall müßte das Zusammenwirken mehrerer Virulenzgene diskutiert werden, die nur gemeinsam den voll ausgeprägten virulenten Phänotyp bewirken, zumal die in diesem Fall als nicht virulent eingestuft Nachkommenstämme noch deutliche Unterschiede in ihrer Fähigkeit zeigen, das Kartoffelgewebe anzugreifen.

Um mehr über die Faktoren herauszufinden, die für Virulenz speziell auf der Kartoffelsorte Sieglinde wichtig sind, sollte eine Rückkreuzung mit einem der hier sicher nicht virulenten Stämme RAP 1-1, RAP 1-3, RAP 2-5, 1104-R-5 und 1104-R-6 durchgeführt und die Virulenz dieser Nachkommen untersucht werden.

Desjardins und Gardner (1989) berichten für ihren Virulenztest mit den Nachkommen aus der Kreuzung 1104 von einer unerwarteten Segregation der Virulenz. Sie beobachteten eine 1:3 Segregation (virulent:nichtvirulent). Auch hier wurde eine Rückkreuzung (1421) zwischen einem Elter R-6380 der ersten Kreuzung und einem der nichtvirulenten Nachkommen 1104-R-6 durchgeführt. Für die Nachkommen dieser Kreuzung stellten sie keine unvollständige Ascosporendifferenzierung (s.o.) fest und ermittelten eine 1:1 Segregation von virulentem zu nichtvirulentem Phänotyp.

Sie schlossen daraus, daß die Virulenz der Stämme R-6380 und R-7843 bei den von ihnen untersuchten Kartoffelsorten nur von einem Gen abhängt. Die abweichende Segregation in der Ausgangskreuzung wurde mit einem möglicherweise bestehenden Zusammenhang zwischen nichtvirulentem Phänotyp und der von ihnen für die Kreuzung 1104 festgestellten unvollständigen Differenzierung der Ascosporenenreife erklärt, die häufig zu nicht keimungsfähigen Ascosporen führte.

Der für die Rückkreuzung 1421 eingesetzte Stamm 1104-R-6 könnte auch für weitere Untersuchungen über die Virulenzfaktoren, die bei der Kartoffelsorte Sieglinde eine

Rolle spielen, eingesetzt werden, da er auch auf dieser Sorte unter jedem der diskutierten Kriterien nicht virulent ist.

Die beobachtete Virulenz auf der Kartoffelsorte Sieglinde steht in keinem eindeutigen Zusammenhang zur beobachteten Rishitinabbaufähigkeit (vgl. 3.2.2). Mehrere Stämme mit niedriger Virulenz gehörten auch zu den langsamen Rishitinmetabolisierern (z.B. RAP 1-3 und 1104-R-6), wohingegen u.a. der Stamm RAP 2-5 ein umgekehrtes Bild zeigte. Er verrottete im Virulenztest unter 0,2 g Gewebe, konnte aber im Metabolismustest fast 3/4 des Rishitins abbauen. Weiterhin zeigte sich z.B. der Stamm P₃A₁-3 als guter Rishitinabbauer (über 3/4 des zur Verfügung stehenden Rishitins wurden umgesetzt). Er war jedoch mit nur 1,02 g verrottetem Gewebe eindeutig als nicht virulent einzustufen.

Desjardins und Gardner (1989) stellten in ihren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen hoher Virulenz und schnellem Rishitinmetabolismus auf den von ihnen untersuchten Kartoffelsorten fest. Hohe Virulenz auf den Kartoffelsorten Russet Burbank und Sebago war immer gekoppelt mit der Fähigkeit zum schnellen Rishitinmetabolismus. Umgekehrt war die Fähigkeit zum schnellen Rishitinmetabolismus jedoch nicht unmittelbar mit einem hoch virulenten Phänotyp gekoppelt. Das bedeutet, der Phänotyp "Schneller Rishitinmetabolisierer" ist nur einer von mehreren Virulenzfaktoren.

Offenbar ist für eine Virulenz auf den für den Biotest verwendeten Kartoffeln der Sorte Sieglinde die Fähigkeit Rishitin rasch metabolisieren zu können kein zwingendes Erfordernis für Virulenz und umgekehrt. Das kann einerseits dadurch begründet sein, daß die Sorte Sieglinde generell nur wenig Rishitin produzieren kann. Andererseits kann es daran liegen, daß die Kartoffeln vor der Verwendung im Biotest noch nicht ausreichend eingelagert waren. Wie in der Literatur beschrieben (Seppänen 1982) ist die Rishitinakkumulation in älteren, eingelagerten Kartoffeln höher als in frisch geernteten.

Es ist nicht auszuschließen, daß die Fähigkeit zum Rishitinmetabolismus auch für die Kartoffelsorte Sieglinde ein Virulenzfaktor ist. In diesem Fall reichte jedoch unter den gegebenen Versuchsbedingungen bereits die Fähigkeit zum langsamen Rishitinmetabolismus aus, damit ein Stamm, der auch alle darüberhinaus notwendigen Virulenzgene besitzt, auf der Sorte Sieglinde einen virulenten Phänotyp zeigte.

Rishitinakkumulation ist nur einer der möglichen Resistenzfaktoren von Kartoffeln. Allein für die als Phytoalexine auftretenden Sesquiterpene beschreibt Kuc (1982) neben Rishitin und Lubimin auch noch Phytuberin, Phytuberol, Solavetivon und 13-Anhydro- β -rotunol. Weiterhin sind die Phytoalexine der Solanaceen nicht auf die Gruppe der Sesquiterpene beschränkt, sondern es werden z.B. auch phenolische Substanzen und Glycoalkaloide gebildet. Die Konzentrationen, in denen die verschiedenen Phytoalexine im Rahmen der Pathogenabwehr akkumuliert werden können, sind sehr unterschiedlich,

so daß für die Virulenz auf der Kartoffelsorte Sieglinde durchaus andere Virulenzgene wichtig sein können, als für die von Desjardins und Gardner (1989, 1991) betrachteten Sorten.

4.2.2 Rishitinabbaufähigkeit

Unter dem gewählten Kriterium (vgl. 3.2.2) daß ein Stamm dann als schneller Abbauer eingestuft wird, wenn er innerhalb von 3 Tagen mehr als 37,5 µg Rishitin metabolisieren kann, fand sich für die Nachkommen eine Aufspaltung von 1:0,8 (schnell:langsam) abbauend (vgl. Tab. 3.3).

Eine Reihe von Nachkommen (z.B. RAP-1-7 oder RAP 3-8) metabolisierte deutlich langsamer als R-7843. Zwei Nachkommen metabolisierten Rishitin überhaupt nicht (RAP 1-3, 1104-R-6).

Die Unterscheidung zwischen langsamen und schnellen Rishitinmetabolisierern unter dem gewählten Kriterium (s.o.) ist nur eine erste Annäherung. Ergänzend dazu sollten für die untersuchten Stämme die Kinetik des Rishitinabbaus bestimmt werden, da sie vermutlich ein besseres Kriterium für die Unterscheidung zwischen schnell und langsam abbauenden Stämmen ist.

Wie Desjardins *et al.* (1992) beschreiben, segregierten innerhalb der Rückkreuzung 1421 und weiteren Kreuzungen (vgl. 1.2) 2 Rishitinmetabolismuse Gene *Rim1* und *Rim2*. *Rim1* steht für schnellen Rishitinmetabolismus und ist gekoppelt mit der Virulenz auf den von ihnen getesteten Kartoffelsorten. Dem Stamm 1104-R-6 fehlen beide Gene, so daß für RAP 1-3 das gleiche vermutet werden kann.

Im Rahmen der RFLP-Analyse konnte unter dem gewählten Kriterium für den Phänotyp: "Schneller Rishitinmetabolisierer (RIM++)" eine Kopplung mit einem RFLP-Marker festgestellt werden (vgl. 3.3.4). Der genetische Abstand von 31,7 cM ist vermutlich zu hoch, um damit beispielsweise "Chromosome walking"-Experimente durchzuführen. Weiterhin liegt er bereits nahe an der Grenze, für die mit der untersuchten Nachkommenzahl noch sichere Aussagen zum genetischen Abstand möglich sind.

Es sollte jedoch möglich sein, das Chromosom zu lokalisieren auf dem das vorläufig als *Rim++* bezeichnete Gen lokalisiert ist. Dazu ist zwingend eine weitere Optimierung der bisher unvollständigen Karyotypanalyse von *G.pulicaris* notwendig.

Eines der nächsten Ziele sollte sein das Chromosom mit dem gesuchten Gen über Hybridisierung mit dem RFLP-Marker auf "Southern blots" pulsfeldgelelektrophoretisch aufgetrennten Chromosomen zu finden. Gelingt dies, so könnte es isoliert und damit weitergearbeitet werden.

Mit der DNA dieses Chromosoms könnten die bestehenden Genbanken durchsucht werden, um Klone zu finden die Fragmente dieses Chromosoms enthalten. Unter diesen

Klonen könnten dann eng an das gesuchte Gen gekoppelte RFLP-Marker gesucht werden. Ebenso könnte von diesem Chromosom eine neue, chromosomenspezifische Genbank konstruiert werden, eine Strategie die derzeit auch für die Klonierung der *Rad*-Gene von *Coprinus cinereus* durch Zolan *et al.* (1992) eingesetzt wird.

4.3 Molekulare Analyse von Nachkommen aus der Kreuzung *G.pulicaris* R-6380 x R-5690

Um die Erstellung einer detaillierten Genkarte für einen Organismus rasch voranzutreiben, ist es wichtig, neben den zu lokalisierenden, phänotypischen Marken, möglichst viele molekulare Marken analysieren zu können. RFLP-Marker sind dafür aus den unter 1.3 dargelegten Gründen sehr hilfreich. Dazu kommt, daß bei Verwendung von RFLP-Markern, die oben (vgl. 4.2.1 und 4.2.2) beschriebenen Probleme der Grenziehung bei phänotypischen Markern weitgehend entfallen. In der Regel sind klare Ja-Nein-Aussagen möglich, was einer weiteren Auswertung sehr entgegenkommt.

4.3.1 Optimierung der Detektion von RFLP's mit nichtradioaktiv markierter DNA

Der Einsatz nichtradioaktiv markierter Sonden, für die Detektion von RFLP-Markern erwies sich als praktikabel. Im Gegensatz zur radioaktiven Markierung, bei der die hybridisierte Sonde selbst detektiert wird, erfolgt die Detektion im Rahmen der hier eingesetzten nichtradioaktiven Markierungstechnik nicht direkt, sondern im Anschluß an die Kopplung eines Antikörpers an die mit einem entsprechenden Hapten versehene Sonde und erst nach Hybridisierung mit der Ziel-DNA.

Unspezifische Bindung der eingesetzten Sonde, sowie des verwendeten Antikörpers an die Membran muß weitgehend verhindert werden, da andernfalls der Verstärkereffekt des an den Antikörper gekoppelten Enzyms zu stark störendem Hintergrund auf den Detektionen führt.

Wie sich herausstellte, sind nur solche Membranen verwendbar, die auf geringen Eigenhintergrund bei der Verwendung in Kombination mit nichtradioaktiv markierten Sonden getestet sind (vgl.3.3.1).

Soll ein Filter mehrfach verwendet werden, muß eine vollständige Dehybridisierung des Filters gewährleistet sein, da auch geringe Reste einer alten Sonde deutlich erkennbar bleiben. Ein Problem dabei ist, daß der Erfolg einer Dehybridisierung nicht unmittelbar festzustellen ist. Deswegen sollten möglichst sichere Dehybridisierungsmethoden verwendet werden.

Der Einsatz von lichtemittierenden Substraten für die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase zeigte gute Ergebnisse, wenn ausreichend DNA auf den Filter

gesaugt, nur getestete Sonden verwendet, die Waschschritte gründlich durchgeführt wurden und die Filter während der Exposition nur noch leicht feucht waren (vgl. 3.3.1).

"Southern blots" mit restringierter Nachkommen-DNA konnten wie beschrieben mehrfach dehybridisiert werden (vgl. 3.3.1). Die Dehybridisierung von Plasmid-Sonden war vermutlich aufgrund ihrer geringeren Größe (0,5-2 kbp) effektiver, als für Cosmid-Sonden (40-50 kbp). Bei mehrfachen Rehybridisierungen sollten daher immer zuerst die Plasmid-Marker eingesetzt werden.

4.3.2 Suche nach geeigneten RFLP-Markern für die Segregationsanalyse der Nachkommen

Für die Suche nach geeigneten RFLP-Markern standen die erwähnten (vgl. 3.3.2) Cosmid- und Plasmid-Klone zur Verfügung. Klone aus beiden Genbanken eignen sich zur Detektion von RFLP's. Unter den eingesetzten Cosmid-Klonen war der Umfang der beobachteten RFLP's geringer als erwartet. In 25% der Fälle (vgl. Tab. 3.4) konnte kein RFLP zwischen den Stämmen in den 40-50 kbp großen, zu R-6380 homologen DNA-Insertionen der Cosmid-Klone beobachtet werden. Dies deutet auf eine nahe Verwandtschaft der beiden Stämme hin.

Dadurch, daß nur 8 Restriktionsenzyme für die Suche nach RFLP's eingesetzt wurden, ist sicherlich eine Reihe von Markern, insbesondere unter den Plasmid-Klonen, nicht berücksichtigt worden. Tzeng *et al.* (1992) haben für die Suche nach Plasmid-Klonen die RFLP's detektieren bei *C.heterostrophus* 18 Restriktionsenzyme (bei Cosmid-Klonen 10) eingesetzt und fanden damit für 39% ihrer Plasmid-Klone einen RFLP. 49% der so detektierten Plasmid-Marker zeigten nur mit einem der eingesetzten Enzyme einen RFLP.

Sie untersuchten weiterhin, wieviele RFLP-Marker beim Einsatz von 10 oder weniger Restriktionsenzymen gefunden werden. Dabei stellte sich heraus, daß mit 10 Enzymen immer noch 31% (gegenüber 39% mit 18 Enzymen) der Plasmid-Klone RFLP's detektierten. Sie schlossen daraus, daß der Einsatz von mehr als 5-10 Restriktionsenzymen nicht notwendig ist, um mit vertretbarem Aufwand ausreichend RFLP-Marker zu finden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte die Zahl von 8 Restriktionsenzymen ausreichend gewesen sein, um damit die Klone aus den *G.pulicaris* Genbanken auf ihre Eignung als RFLP-Marker zu testen. Im Ergebnis detektierten 50% der Plasmid-Klone und 75% der Cosmid-Klone mindestens einen RFLP (vgl. Tab 3.4). Das gewählte Verfahren hat sich somit für *G.pulicaris* als geeignet erwiesen.

Die eingesetzten RFLP-Marker deuteten nicht darauf hin, daß sie für repetitive Sequenzen codieren. Die eingesetzten Plasmid-Klone hybridisierten nur schwach mit genomischer DNA von R-5690 (vgl. Abb.3.8) und detektierten nie mehr als 4 Banden auf den Filtern mit geschnittener genomischer DNA. Diese Kriterien wurden auch von Tzeng *et al.* (1992) für Einzelkopie-Klone von Plasmid-Klonen verwendet. Im Rahmen der Hybridisierung der Cosmid-Klone mit genomischer DNA trat kein Klon ungewöhnlich deutlich hervor. Die Hybridisierungen waren auch nicht stärker als für die getesteten Plasmidsonden.

Die Verwendung der detektierten RFLP-Marker für die Segregationsanalyse der Nachkommen war nicht in allen Fällen möglich. In einigen Fällen (insbesondere bei der Hybridisierung der Sonde mit Fragmenten die größer als 18 kbp waren) war der Laufunterschied der mit den Plasmidsonden hybridisierenden Restriktionsfragmente nur gering. Er konnte in diesen Fällen zwar direkt zwischen den Elternstämmen detektiert werden, die sichere Zuordnung zu den Elterntypen war jedoch auf den Filtern mit den Nachkommen-DNA's nicht mit Sicherheit möglich, wenn die zu analysierenden Spuren nicht unmittelbar neben den als Vergleich dienenden Eltern-DNA's lagen.

Die Segregationsanalyse der Nachkommen war immer dann einfach, wenn die Elterntypen ein deutlich unterscheidbares Muster zeigten, also wenn für den einen Elter Hybridisierungen in Größenbereichen erfolgten, die dem anderen völlig fehlten.

4.3.3 Segregationsanalyse der detektierten Marken

Insgesamt wurde für 46 Nachkommen die Segregation von 16 RFLP-Marken analysiert und dabei 3 Kopplungsgruppen gefunden, die aus mehreren Markern bestehen.

Ziel war nicht die abschließende Erstellung einer RFLP-Karte (dazu sind diese Zahlen noch viel zu gering), denn dies hätte den Rahmen der Arbeit gesprengt.

Vielmehr sollte die prinzipielle Möglichkeit für die Erstellung einer solchen Karte mit den eingesetzten Methoden demonstriert werden. Dieses Ziel ist erreicht worden, so daß die Konstruktion einer RFLP-Karte für *G.pulicaris* prinzipiell realisierbar ist.

Derartige Karten sind, wie unter 1.3 beschrieben, schon für einige phytopathogene Pilze erstellt worden, bzw. noch in Arbeit.

Die Zahl der analysierten RFLP-Marker betrug beispielsweise für die Karte von *B.lactucaae* 61 (Hulbert *et al.* 1988) und für die Karte von *C.heterostrophus* 128 (Tzeng *et al.* 1992).

Die Anzahl der einzusetzenden RFLP-Marker ist immer abhängig vom Nutzen, den man sich von der zu erstellenden Karte erhofft. Sie ist auch abhängig von der Verteilung der eingesetzten RFLP-Marker innerhalb des Genoms. Soll eine vollständige

Karte erstellt und auf dieser nach und nach immer mehr Gene eingeordnet werden, so sollten die eingesetzten RFLP-Marker zufällig über das ganze Genom verteilt sein und so viele davon analysiert werden, daß mit den RFLP-Loci ein möglichst enges Raster über das Genom gelegt werden kann. In dieses Raster können dann andere Gene eingeordnet werden.

Die Genauigkeit dieses Rasters steigt mit der Zahl der Nachkommen aus der (bzw. den) betrachteten Kreuzung(en), die in die Segregationsanalyse mit einbezogen werden. Für die erwähnte Karte von *C.heterostrophus* (Tzeng *et al.* 1992) wurden dafür 91 zufällig ausgewählte Nachkommen aus einer Kreuzung verwendet.

Eine hohe Nachkommenzahl ist wichtig, wenn die Signifikanz größerer Rekombinationshäufigkeiten abgesichert werden soll. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Segregationsanalyse lag die Grenze der mit Signifikanz noch feststellbaren Rekombinationshäufigkeiten etwas über 30%. Tzeng *et al.* (1991) konnten mit ihren 91 Nachkommen Rekombinationshäufigkeiten von bis zu 37% signifikant nachweisen. Sie verifizierten Rekombinationshäufigkeiten von über 20% jedoch zusätzlich durch Hybridisierung der RFLP-Marker mit Chromosomen, was gleichzeitig der Lokalisation der gefundenen Kopplungsgruppen diene.

Weiterhin ist eine Erhöhung der untersuchten Nachkommenzahl auch für die möglichst genaue Abstandsbestimmung zwischen eng gekoppelten Markern notwendig. Dazu ein Beispiel: Findet man unter den für diese Arbeit untersuchten 46 Nachkommen für den Vergleich zweier Marker nur einmal einen Rekombinationstyp, so entspricht das rechnerisch einer Rekombinationshäufigkeit von 2,2% und somit einem Abstand von 2,2 cM. Der tatsächliche Abstand kann geringer oder größer sein, doch die nächstmöglichen Werte wären 0 cM oder 4,3 cM. Dazwischen liegende Werte können aufgrund der beschränkten Stichprobengröße nicht erfaßt werden.

Daher sollte in einem der nächsten Schritte die Segregationsanalyse auf größere Nachkommenzahlen ausgedehnt werden, um feinere Abstufungen der bestimmten Rekombinationshäufigkeiten zu ermitteln.

Die mathematische Signifikanz der bereits ermittelten Kopplungsgruppen bleibt davon jedoch unberührt, da die für die Kopplungsanalyse zweier Marker verwendete Stichprobe von 28 bis 46 Nachkommen im Prinzip groß genug war.

Mathematisch erforderlich ist ein Stichprobenumfang von mindestens dem 5fachen jeder der auftretenden Klassen (Sachs 1974). 4 Klassen (AA, BB, AB, BA) werden erwartet (vgl. 3.3.4, Tab 3.8), so daß signifikante Kopplungen bereits ab einer Stichprobengröße von 20 Nachkommen bestimmt werden können, wenn die Kopplung eng genug ist.

Anstatt eine vollständige RFLP-Karte zu erstellen, kann es sinnvoll sein, die Karte zunächst auf einen Teil des Genoms, etwa ein Chromosom zu beschränken. Dieser Ansatz, wie er auch von Zolan *et al.* (1992) beschrieben wird, wäre auch für weitere

Arbeiten an der RFLP-Karte für *G.pulicaris* zu empfehlen, wenn sie mit dem Ziel, Virulenz- oder Metabolismusgene zu klonieren, angelegt wird.

Sobald ein Marker, der mit einem der interessierenden Gene gekoppelt ist, gefunden wurde, sollten weitere potentielle Marker zunächst im Hinblick auf ihre Lokalisation auf demselben Chromosom wie dieser überprüft werden. Erst danach sollte eine Segregationsanalyse durchgeführt werden, wodurch der erforderliche Aufwand, eng an das zu isolierende Gen gekoppelte Marker zu finden, voraussichtlich stark reduziert werden könnte.

Ein solcher Marker, der mit der Fähigkeit zum schnellen Rishitinmetabolismus gekoppelt ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit gefunden werden (vgl. 3.3.4).

Es erscheint ungewöhnlich, daß von 14 eingesetzten RFLP-Markern 11 auf drei Kopplungsgruppen verteilt und nur 3 isoliert vorliegen. Das Ergebnis kann auf Zufall beruhen, ebenso könnte es jedoch auf eine nur geringe Chromosomenzahl der untersuchten Stämme hindeuten. Falls sich die pulsfeldgelelektrophoretischen Auftrennungen für die beobachteten schwachen Chromosomenbanden bestätigen, ist jedoch von mindestens 5, bzw. 6 Chromosomen auszugehen, auf die sich die Kopplungsgruppen verteilen sollten. Denkbar ist, daß die DNA der drei Chromosomen, die größer als 4,6 mbp sind (vgl. Tab. 3.11), in den Genbanken gegenüber der DNA der kleineren Chromosomen überrepräsentiert ist. Dies könnte erklären, weshalb die detektierten RFLP-Marker vorwiegend zu den drei ermittelten Kopplungsgruppen gehören.

Nachzuweisen bleibt allerdings, ob die drei Kopplungsgruppen tatsächlich auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Um dies abzusichern, sind Hybridisierungen mit einzelnen Sonden der Kopplungsgruppen mit pulsfeldgelelektrophoretischen Auftrennungen der Elternstämme erforderlich.

4.4 Karyotypanalyse verschiedener Stämme von *G.pulicaris*

4.4.1 Optimierung der chDNA-Präparation

Wie beschrieben (vgl. 3.4.1) konnte durch Optimierung der Protoplastierungsbedingungen die Protoplastenausbeute für R-6380 und R-7843 auf über $1,5 \times 10^9$ gesteigert werden. Für Protoplastierungen mit der neuen Novozym-Charge konnten diese Werte nicht erreicht werden, so daß die Protoplastierung wieder neu optimiert werden muß. Dabei sollten sowohl die Konzentrationen der eingesetzten Enzyme variiert, als auch das verwendete Osmotikum erneut optimiert werden.

Für die chDNA-Präparation ist weiterhin zu prüfen, ob die Lysebedingungen noch schonender gestaltet werden können, um Chromosomendegradationen im Verlauf der Lyse möglichst gering zu halten. Das Auftreten derartiger Degradationen während der im Rahmen dieser Arbeit angefertigten chDNA-Präparationen könnte ein Grund für den in mehreren Auftrennungen beobachteten "DNA-Schmier" gewesen sein, der sich über die gesamte Laufspur hinzog.

4.4.2 Pulsfeldgelelektrophoretische Auftrennung

Mit den durchgeführten pulsfeldgelelektrophoretischen Auftrennungen ließen sich für die untersuchten *G.pulicaris* Stämme R-5690 12, für R-6380 5 und für R-7843 6 Chromosomen separieren (vgl. 3.4.2).

Insbesondere die Trennbedingungen für die Stämme R-7843 und R-6380 sind noch zu verbessern, da die kleineren Chromosomen dieser Stämme teilweise nur als Schatten vor einem Hintergrund aus "DNA-Schmier" erkennbar waren.

Ob ein Chromosom innerhalb einer Auftrennung degradiert und daher nur schwach erkennbar ist, hängt stark von den eingesetzten Trennparametern ab. Dies wird z.B. an der Auftrennung der kleinen Chromosomen (Größenbereich unter 600 kbp) von R-5690 deutlich. In der Auftrennung nach den Bedingungen 8 (vgl. Abb. 3.23) können sie nur als breiter Schatten identifiziert werden, wohingegen unter den Bedingungen 9 (vgl. Abb. 3.24) bereits drei schwache Banden differenzierbar sind.

Die eingesetzten, für den Größenstandard *S.cerevisiae* optimierten, kurzen Trennbedingungen von 24 Stunden leisten eine hohe Auflösung für den Größenbereich unter 2 mbp. Damit einher ging jedoch eine Degradation der Chromosomen. Daraus ist zu schließen, daß die unter diesen Bedingungen eingesetzten Feldstärken von den *G.pulicaris* Chromosomen nicht toleriert werden. *S.cerevisiae*-Chromosomen blieben dagegen stabil.

Eine wichtige Aufgabe wird daher sein, schonende Trennbedingungen für Chromosomen kleiner Größenbereiche (unter 2 mbp) zu erarbeiten.

Wie unter 3.3.2 beschrieben trat für die zunächst als Chromosom 1 bezeichnete Chromosomenbande von R-5690 unter veränderten Trennbedingungen eine Aufspaltung in zwei Banden ein. Dies entspricht Beobachtungen von Kayser (1991), dem es nicht gelang Trennbedingungen zu finden, unter denen alle Chromosomen der von ihm analysierten Pilze gleichermaßen gut aufgetrennt wurden. Es ist daher wahrscheinlich, daß die beobachteten Chromosomenzahlen für *G.pulicaris* in weiteren Chromosomenauftrennungen noch zunehmen werden, zumal in Karyotypanalysen anderer phytopathogener Fusarien bereits bis zu 20 Chromosomen für einen Stamm beschrieben sind (vgl. Tab. 1.2).

Besonderes Augenmerk verdienen in diesem Zusammenhang auch die mehr als 5,6 mbp großen Chromosomen, die in allen untersuchten *G.pulicaris* Stämmen vorliegen.

Aufgrund der Breite und Deutlichkeit ihrer Banden im Vergleich zu anderen Chromosomenbanden ist es durchaus wahrscheinlich, daß sie noch in weitere Banden aufgetrennt werden können. So sind z.B. auch für *Magnaporthe grisea* Chromosomen von bis zu 12 mbp Größe beschrieben (vgl. Tab 1.2), ein Größenbereich, der mit den bisher eingesetzten Trennbedingungen sicherlich noch nicht ausreichend abgedeckt ist.

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen zum Karyotyp der Stämme R-6380 und R-7843 läßt sich noch nicht darüber spekulieren, ob Größenveränderungen kleiner Chromosomen in Korrelation zu phytopathogenen oder anderen phänotypisch erfaßbaren Eigenschaften stehen, wie das z.B. von Miao *et al.* (1991) für *N.haematococca*, von Tzeng *et al.* (1992) für *C.heterostrophus* oder von Taylor *et al.* (1991) für *Leptosphaeria maculans* gezeigt wurde.

Sobald es gelingt, die Auftrennungen in diesem Bereich zu optimieren, sollten Karyotypen verschiedener Wildisolate, sowie von Kreuzungsnachkommen bestimmt werden. Falls dabei Unterschiede auftreten, ist zu prüfen, ob diese in Korrelation mit dem virulenten Phänotyp stehen und welche Chromosomen die Informationen für den virulenten Phänotyp tragen.

Hilfreich dabei werden voraussichtlich Hybridisierungen der Chromosomen dieser Stämme mit eng an den virulenten Phänotyp gekoppelten RFLP-Markern sein.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur molekularen Analyse des Genoms von *Gibberella pulicaris* durchgeführt.

Die *G.pulicaris* Stämme R-6380 und R-7843 wurden gekreuzt und 32 Nachkommen aus dem Kreuzungsansatz isoliert. Mit 25 dieser Nachkommen und 21 Nachkommen aus einer analogen Kreuzung von Desjardins und Gardner (1989) wurden Untersuchungen zur Virulenz auf der Kartoffelsorte Sieglinde, zur Rishitin-abbaufähigkeit sowie RFLP-Analysen durchgeführt.

Der Virulenzunterschied der beiden Elternstämme auf der eingesetzten Kartoffelsorte Sieglinde, erwies sich als zu gering, um daraus phänotypisch erfassbare Unterschiede abzuleiten. Beide Stämme waren unter den gegebenen Bedingungen annähernd gleich virulent. Die Fähigkeit zur Virulenz spaltete sich jedoch unter den Nachkommen in stark und schwach virulente Stämme auf.

Die Untersuchungen zur Rishitinmetabolismusfähigkeit zeigten deutliche Unterschiede in der Metabolismusfähigkeit der Elternstämme und der getesteten Nachkommenstämme. Nur zwei der 46 untersuchten Nachkommen konnten kein Rishitin abbauen, der Rest spaltete sich in schnell und langsam metabolisierende Stämme auf. Das Merkmal der Fähigkeit zum schnellen Rishitinmetabolismus konnte als phänotypische Marke verwendet werden. Im Rahmen der durchgeführten RFLP-Analysen erwies sich die Fähigkeit zum schnellen Rishitinmetabolismus (RIM++) als gekoppelt mit einem der untersuchten Cosmid-RFLP-Marker. Der genetische Abstand beträgt 31,5 cM.

42 Klone aus bestehenden Cosmid- und Plasmid-Genbanken von *G.pulicaris* R-6380 (Weltring unveröffentlicht) wurden auf Ihre Eignung als RFLP-Marker untersucht. 75% von 20 untersuchten Cosmid-Klone und 50% von 22 untersuchten Plasmid-Klonen detektierten einen oder mehrere RFLP's zwischen den Elternstämmen der durchgeführten Kreuzung.

15 der insgesamt 26 gefundenen RFLP-Marker und die phänotypische Marke: "schneller Rishitinmetabolisierer" (RIM++) wurden für die RFLP-Analyse verwendet. Für die Auswertung der RFLP-Analyse wurde ein Computerprogramm erstellt.

Die Segregationsanalyse der detektierten Marken ergab drei Kopplungsgruppen, bestehend aus drei, vier und fünf der analysierten Marken. Für 4 RFLP-Marker konnte keine Zuordnung zu einer Kopplungsgruppe erfolgen.

Kopplungsgruppe I überdeckt einen Bereich von 47,6 cM, Kopplungsgruppe II einen von 27 cM und Kopplungsgruppe III einen Bereich von 35 cM. Die phänotypische Marke RIM++ ist Bestandteil von Kopplungsgruppe III.

Für drei Stämme von *G.pulicaris* R-5690, R-6380 und R-7843 wurden Untersuchungen zur Karyotypanalyse durchgeführt. Die beobachteten Chromosomenbanden für die Stämme R-6380 und R-7843 waren teilweise nur schwach zu erkennen, so daß die ermittelten Chromosomenzahlen noch überprüft werden müssen.

Unter diesem Vorbehalt konnten für den Stamm R-5690 12 Chromosomen im Größenbereich von 500 kbp bis über 5,6 mbp, für den Stamm R-6380 5 Chromosomen im Größenbereich 1,125 mbp bis über 5,6 mbp und für den Stamm R-7843 5 Chromosomen im Größenbereich von 800 kbp bis über 5,6 mbp beobachtet werden

6. Anhang

6.1 Quellcode des Programms RFLPDet1

6.1.1 Unit Zusätze

```
Unit Zusaetze;

Interface

Uses Crt;
Procedure Loesche (x1, y1, x2, y2: Integer);
Procedure Box (x1, y1,x2, y2, Zeichen: Integer);
Procedure Melodie;
Procedure Piep;
Procedure Piepa;
Procedure Piepb;
Procedure Piepc;
Procedure Writepos (Text: string; x1,y1: Integer);

Implementation

Procedure Loesche (x1, y1, x2, y2: Integer);
begin
  Window (x1, y1, x2, y2);
  ClrScr;
  Window (1,1,80,25);
end;

Procedure Box (x1,y1,x2,y2,Zeichen: Integer);
var Zaehler: integer;
begin
  For Zaehler := x1 to x2 do
  begin
    Gotoxy (Zaehler,y1);
    Write (Chr(Zeichen));
    Gotoxy (Zaehler,y2);
    Write (chr(Zeichen));
  end;
  For Zaehler := y1 to y2 do
  begin
    Gotoxy (x1,Zaehler);
    Write (chr(Zeichen));
    Gotoxy (X2,Zaehler);
    Write (chr(Zeichen));
  end;
end;

Procedure Melodie;
begin
  Sound (300);
  Delay (200);
  Nosound;
end;
```

```
Procedure Piep;  
begin  
    Sound (320);  
    Delay (200);  
    Nosound;  
end;  
  
Procedure PiepA;  
begin  
    Sound (340);  
    Delay (200);  
    Nosound;  
end;  
  
Procedure PiepB;  
begin  
    Sound (360);  
    Delay (200);  
    Nosound;  
end;  
  
Procedure PiepC;  
begin  
    Sound (380);  
    Delay (200);  
    Nosound;  
end;  
  
Procedure Writepos (Text: string; x1,y1: integer);  
begin  
    Gotoxy (x1,y1);  
    Write (Text);  
end;  
  
end.
```

6.1.2 Hauptprogramm: RFLPDet1

```

Program RFLPDet1;

{ ***** RFLP-Analyse ***** }

{Programm zur Berechnung der Kopplung von RFLP-Markern zwischen Nachkommen einer }
{Kreuzung zweier haploider Organismen }
{Das Programm ermöglicht Dateneingabe und jederzeitige Korrektur. Es berechnet}
{Rekombinationsfrequenzen, und prüft ihre Signifikanz mittels statistischer Tests}
{Version 1.0, verfasst im September 1992 von Lars von Olleschik}
{Institut für allgemeine Botanik und Mikrobiologie, AK Prof. Tudzynski, Schloßgarten 3, 4400 Münster}
{Die Programmiersprache ist TurboPascal in der Version 5.5}
{Ein mathematischer Coprozessor wird emuliert, um hohe Rechengenauigkeit zu ermöglichen}

{$V-}
{$N+}

Uses Crt, DOS, Printer, Zusaetze;

Type
  Dateiart = Record
    Organismus      : String [25];
    Kreuzungspartner : String [25];
    Anz_RFLP_Marker : Integer;
    Anz_Nachkommen  : Integer;
  end;

  Zuordnung = Record
    Nachkommenbezeichnung : String [10];
    Nachkommennummer     : Integer;
  end;

  Datensatz = Record
    RFLP_Marker   : String [10];
    RFLP_TYP      : String [20];
    Nachkommendaten : String [250];
    RFLP_Nummer   : Integer;
  end;

var
  Kriterium, Entscheidung, Taste, Wahl      : Char;
  Teilstring                                 : String;
  Analysedatei, Tempdatei                   : File of Datensatz;
  Zuordnungsdatei                           : File of Zuordnung;
  Kreuzungsdatendatei                       : File of Dateiart;
  TDateiart                                  : Dateiart;
  TZuordnung                                 : Zuordnung;
  TDatensatz, BDatensatz                    : Datensatz;
  Nummer, I, Nr, Zl                          : Integer;
  ZaehlerA, ZaehlerB, ZaehlerX             : Integer;
  Zwischenerg, n, NK, MM, AA, AB, BA, BB    : Extended;
  NKgesamt, NKerfasst, NKnichterfasst      : Integer;
  MU, Chi, PL, PU, Phi, c, p, q             : Extended;
  Wort, Markername                          : String [25];
  Suchwort, Such, Eingabe                   : String;
  Doppelt, Gefunden                         : Boolean;
  Year, Month, Day, DayofWeek               : Word;

```

```

Procedure Existiert_nicht;
Begin
  WritePos ('Die Datei bzw. Diskette konnte nicht gefunden werden!',5,5);
  WritePos ('Drücken Sie die Leertaste, um ins Menue zurückzukehren.',5,8);
  PiepC;
  PiepA;
  repeat
    Taste := ReadKey;
  until Taste = #32;
end;

Procedure Kein_Drucker;
begin
  ClrScr;
  Piep;
  Piep;
  Melodie;
  Writepos ('Ihr Drucker läßt sich nicht ansprechen!',5,5);
  Writepos ('Bitte überprüfen sie Datenleitung, Druckerstatus oder Papierzufuhr!',5,8);
  Delay (500);
  Writepos ('Drücken Sie bitte die Leertaste, um ins Menue zurückzukehren.',5,10);
  Taste := Readkey;
  Taste := '@';
  Repeat
    Taste := Readkey;
  Until Taste = #32;
end;

Procedure Neukreuzung;
begin
  repeat
    ClrScr;
    Melodie;
    Rewrite (Kreuzungsdatendatei);
    {$I-}
    Reset (Kreuzungsdatendatei);
    {$I+}
    If IOResult <> 0 then
      begin
        Existiert_nicht;
        Exit;
      end;
    With TDateiart do
      begin
        Box (4,3,76,23,178);
        Writepos (' Neue Kreuzungsdatendatei anlegen ',28,3);
        Organismus := 'A';
        Repeat
          Writepos (' Name des zu analysierenden Organismus: ',5,11);
          Readln (Organismus);
          Until Organismus <> '';
          Writepos (' Bezeichnung der Kreuzungspartner: ',5,13);
          Readln (Kreuzungspartner);
          Anz_RFLP_Marker := 0;
          Reset (Zuordnungsdatei);
          Anz_Nachkommen := 0;
          Close (Zuordnungsdatei);
          Write (Kreuzungsdatendatei, TDateiart);
          Close (Kreuzungsdatendatei);
          Loesche (10,5,75,20);
        end;
      end;
  until
    Writepos (' Alle Eingaben korrekt [J/N] ? ',10,16);

```

```

        Repeat
            Taste := Readkey;
        Until Upcase (Taste) in ['J','N'];
    Until Upcase (Taste) = 'J';
end;
```

```

Procedure AendZuordnung;
begin
    Melodie;
    ClrScr;
    Box (4,3,76,23,178);
    Writepos (' Bezeichnung der Nachkommen ', 28,3);
    Reset (Zuordnungsdatei);
    Reset (Kreuzungsdatendatei);
    Writepos ('Sie greifen zu auf die Kreuzungsdatendatei: ',6,5);
    Read (Kreuzungsdatendatei,Tdateiart);
    With Tdateiart do
    begin
        Write (Kreuzungspartner);
    end;
    Writepos ('Anzahl bisher eingegebener Nachkommen: ',6,6);
    Write (Filesize(Zuordnungsdatei));
    Repeat
        Writepos (' Wieviele Nachkommen möchten Sie eingeben/anhängen? (1-255): ',6,8);
        {$I-};
        Readln (Nummer);
        {$I+};
    Until IOResult = 0;
    While Nummer > 0 do
    begin
        with TZuordnung do
        begin
            Nachkommennummer := (Filesize(Zuordnungsdatei)+1);
            Writepos ('Nachkommennummer: ',7,10);
            Write (Nachkommennummer);
            Writepos ('Nachkommenbezeichnung: (max 10 Zeichen): ', 7,12);
            Readln (Nachkommenbezeichnung);
            Seek (Zuordnungsdatei, filesize(Zuordnungsdatei));
            Write (Zuordnungsdatei,TZuordnung)
        end;
        Nummer := (Nummer-1);
        Melodie;
    end;
    with Tdateiart do
    begin
        Anz_Nachkommen := Filesize(Zuordnungsdatei);
    end;
    Seek (Kreuzungsdatendatei,0);
    write (Kreuzungsdatendatei,Tdateiart);
    Close (Zuordnungsdatei);
end;
```

```

Procedure Anhaengen;
begin
    ClrScr;
    {$I-}
    Reset (Analysedatei);
    Reset (Zuordnungsdatei);
    Reset (Kreuzungsdatendatei);
    {$I+}
```

```

If IOResult <> 0 then
begin
  Existiert_nicht;
  Exit;
end;
with TDatensatz do
begin
  Box (4,3,76,23,178);
  Writepos (' Kreuzungsdatendatei ',30,3);
  Writepos ('Sie haben Zugriff aus folgende Kreuzungsdatendatei:',7,5);
  with TDateiart do
  begin
    Read (Kreuzungsdatendatei, TDateiart);
    Box (16,7,60,12,177);
    Writepos ('Organismus: ',18,8);
    Write (Organismus);
    Writepos ('gekreuzte Stämme: ',18,9);
    Write (Kreuzungspartner);
    Writepos ('Zahl eingegebener Nachkommen: ',18,10);
    Write (Anz_Nachkommen);
    Writepos ('Zahl getesteter Marker: ',18,11);
    Write (Anz_RFLP_Marker);

    end;
  Writepos ('Bitte drücken Sie eine Taste, um fortzufahren.',15,20);
  Wahl := '*';
  Repeat
    gotoxy (7,21);
    Wahl := Readkey;
  Until Upcase(Wahl) <> '*';
  RFLP_Marker := 'A';
  While RFLP_Marker <> '' do
  begin
    ClrScr;
    Box (4,3,76,16,178);
    Writepos (' Datensätze eingeben ',28,3);
    WritePos ('RFLP Marker Nummer: ', 7,6);
    RFLP_Nummer := (Filesize(Analysedatei)+1);
    Write (RFLP_Nummer);
    Repeat
      Doppelt := false;
      Writepos ('RFLP-Bezeichnung (max. 10 Zeichen): ', 7,7);
      Readln (Eingabe);
      For I := 0 to (Filesize(Analysedatei)-1) do
      begin
        Seek (Analysedatei,I);
        Read (Analysedatei,Tdatensatz);
        If RFLP_Marker = Eingabe then Doppelt := true;
      end;
      If Doppelt = true then
      begin
        Writepos ('Diese Markerbezeichnung existiert bereits! Bitte verändern!',7,15);
        Melodie;
        Delay (1500);
        Writepos ('',7,15);
      end;
    Until Doppelt = false;
    RFLP_Nummer := (Filesize (Analysedatei)+1);
    RFLP_Marker := Eingabe;
    If RFLP_Marker <> '' then
    begin
      WritePos ('RFLP-Typ (max. 20 Zeichen): ', 7,8);
      Readln (RFLP_Typ);
      Writepos (' Eingabe der RFLP Verteilung auf die Nachkommen als Zeichenkette.', 7,12);
      Writepos (' A=Elterntyp1, B=Elterntyp2, C=Verändertes Muster, X=Daten fehlen,', 7,13);
    end;
  end;
end;

```

```

Writepos (' Z=Ende - Bsp.: abbbaxaabbcaabbbaabz ', 7,14);
Writepos (' Eingabe entsprechend der Nummerierung der Nachkommen!', 7,15);
Taste := '@';
Nachkommendaten := '';
Writepos (' Nachkommendaten: ', 7, 18);
Repeat
  Repeat
    Taste := Readkey;
  Until Uppcase (Taste) in ['A','B','C','X','Z'];
  Write (Uppcase(Taste));
  Piep;
  Nachkommendaten := (Nachkommendaten + Uppcase(Taste));
Until Uppcase (Taste) = 'Z';
Melodie;
Seek (Analysedatei,Filesize(Analysedatei));
Write (Analysedatei, TDatensatz);
With TDateiart do
begin
  Anz_RFLP_Marker := RFLP_Nummer;
  Seek (Kreuzungsdatendatei,0);
  Write (Kreuzungsdatendatei, TDateiart);
end;
end;
end;
Close (Analysedatei);
Close (Kreuzungsdatendatei);
Close (Zuordnungsdatei);
end;
end;

```

Procedure MarkerListe;

```

begin
  ClrScr;
  Box (3,14,78,16,176);
  Writepos ('Wünschen Sie eine Liste der bereits eingegebenen Markernamen? [J/N] : ',5,15);
  Repeat
    Taste := Readkey;
  Until Uppcase(Taste) in ['J','N'];
  If Uppcase(Taste) = 'N' then Exit;
  {$I-}
  Reset (analysedatei);
  {$I+}
  If IOResult <> 0 then
  begin
    Existiert_nicht;
    Exit;
  end;
  ClrScr;
  Nr := 0;
  For i := 0 to (Filesize(Analysedatei)-1) do
  begin
    With Tdatensatz do
    begin
      Seek (analysedatei,i);
      Read (Analysedatei,tdatensatz);
      Writeln;
      Writeln (' Markernummer: ',RFLP_Nummer:3,' Markername: ',RFLP_Marker);
      Nr := Nr+2;
      If Nr = 22 then
      begin
        Writeln;
        Writeln (' Bitte auf die [Leertaste] drücken, um fortzufahren');
        Piep;
      end;
    end;
  end;
end;

```

```

        Repeat
            Taste := Readkey;
        Until Taste = #32;
        Clrscr;
        Nr := 0;
    end;
end;
end;
Writeln;
Writeln (' *** Dateiende erreicht ! ***');
Writeln;
Writeln (' Bitte auf die ["W"-Taste] drücken, um fortzufahren');
Piep;
Repeat
    Taste := Readkey;
Until Uppcase(Taste) in ['W'];
ClrScr;
Close (Analysedatei);
end;

Procedure NeuDatei;
begin
    ClrScr;
    Box (33,4,45,6,176);
    Writepos ('Vorsicht!',35,5);
    Melodie;
    Melodie;
    Writepos ('Bei "Neu anlegen" werden alle Daten gelöscht!',15,10);
    Writepos ('Wollen Sie die RFLP-Datei neu anlegen [J/N]? ',15,12);
    Repeat
        Taste := Readkey;
    Until Uppcase(Taste) in ['J','N'];
    If UpCase(Taste) = 'J' then
    begin
        Writepos ('Bitte legen Sie eine formatierte Datendiskette in Laufwerk B: ein',5,15);
        Writepos ('Bitte drücken Sie eine Taste, wenn Sie fertig sind.', 5,16);
        Rewrite (Zuordnungsdatei);
        Neukreuzung;
        AendZuordnung;
        Rewrite (Analysedatei);
        Anhaengen;
    end;
end;

Procedure Daten_Loeschen;
begin
    MarkerListe;
    ClrScr;
    Assign (Tempdatei,'b:Analyse.tmp');
    {I-};
    Reset (Analysedatei);
    Reset (Kreuzungsdatendatei);
    Rewrite (Tempdatei);
    {I+};
    If IOResult <> 0 then
    begin
        Existiert_nicht;
        Exit;
    end;
    Wahl := 'N';
    Box (4,3,76,23,178);
    Writepos (' RFLP-Marker Daten löschen ',27,3);
    Writepos ('Bezeichnung des RFLP-Markers: ',7,5);
    Readln (Markername);

```

```

Gefunden := false;
While (not Gefunden) and (not Eof(Analysedatei)) do
begin
  Read (Analysedatei, TDatensatz);
  With Tdatensatz do
  begin
    If RFLP_Marker = Markername then
    begin
      Gefunden := true;
      Box (7,9,45,14,177);
      Writepos (' RFLP-Marker Nummer: ',8,10);
      Writeln (RFLP_Nummer);
      WritePos (' Bezeichnung: '+RFLP_Marker,8,12);
      WritePos (' RFLP-Typ: '+RFLP_Typ,8,13);
      WritePos (' Nachkommendaten: '+Nachkommendaten,8,16);
      WritePos ('Sollen die Daten für diesen RFLP gelöscht werden [J/N]? > <',12,20);
      Gotoxy (70,20);
      Repeat
        Wahl := ReadKey;
      Until UpCase(Wahl) in ['J','N'];
      If UpCase(Wahl) = 'J' then
      begin
        Nummer :=Filepos(Analysedatei);
        Reset (Analysedatei);
        Nr := 1;
        While not Eof(Analysedatei) do
        begin
          Read (Analysedatei,Tdatensatz);
          If Nr < Nummer then
            Write (Tempdatei, Tdatensatz);
          If Nr > Nummer then
          begin
            With Tdatensatz do
            begin
              RFLP_Nummer := (RFLP_Nummer-1);
            end;
            Write (Tempdatei,Tdatensatz);
          end;
          Inc(Nr);
        end;
      end;
    end;
  end;
end;
If not Gefunden then
begin
  Writepos ('Der Eintrag wurde nicht gefunden!',20,25);
  Delay (3000);
end;
end;
Close (Kreuzungsdatendatei);
Close (Analysedatei);
Close (Tempdatei);
If Upcase(wahl) = 'J' then
begin
  Erase (analysedatei);
  Rename (tempdatei, 'b:Analyse.dat');
  Reset (Analysedatei);
  Reset (Kreuzungsdatendatei);
  With TDateiart do
  begin
    Seek (Kreuzungsdatendatei,0);
    Read (Kreuzungsdatendatei,TDateiart);
    Anz_RFLP_Marker:= filesize(analysedatei);
  end;
end;

```

```

        Seek (Kreuzungsdatendatei,0);
        Write (Kreuzungsdatendatei,TDateiart);
    end;
    Close (Analysedatei);
    Close (Kreuzungsdatendatei);
end;
end;

Procedure Liste_Drucken;

begin
    Melodie;
    ClrScr;
    {$I-};
    Reset (Analysedatei);
    Reset (Zuordnungsdatei);
    Reset (Kreuzungsdatendatei);
    {$I+};
    If IOResult <> 0 then
    begin
        Existiert_nicht;
        Exit;
    end;
    Box (4,3,76,23,178);
    WritePos (' Datenliste drucken ',28,3);
    Writepos ('Bitte aktivieren Sie den Drucker und legen Papier ein. ',10,6);
    Writepos ('Bitte drücken Sie eine Taste, wenn Sie fertig sind.',10,10);
    Repeat until Keypressed;
    {$I-}
    Writeln (lst,Chr(13));
    {$I+}
    If IOResult <> 0 then
    begin
        Kein_Drucker;
        Close (Kreuzungsdatendatei);
        Close (Analysedatei);
        Close (Zuordnungsdatei);
        Exit;
    end;
    Getdate (Year,Month,Day,DayofWeek);
    Writeln (lst,'          >>> RFLPDet1 - Ausdruck der eingegebenen Rohdaten <<< ');
    Writeln (lst);
    Writeln (lst);
    Writeln (lst,'          Ausdruck vom: ',(Day),'.',(Month),'.',(Year));
    Writeln (lst);
    With TDateiart do
    begin
        Seek (Kreuzungsdatendatei,0);
        Read (Kreuzungsdatendatei,TDateiart);
        Writeln (lst,' Organismus:           ',Organismus);
        Writeln (lst,' Kreuzungspartner:           ',Kreuzungspartner);
        Writeln (lst,' Anzahl untersuchter Nachkommen: ',Anz_Nachkommen);
        Writeln (lst,' Anzahl eingegebener Marken:   ',Anz_RFLP_Marker);
    end;
    Writeln (lst);
    Writeln (lst);
    Writeln (lst,'### Zuordnung von Nachkommennummer und Nachkommenbezeichnung ###');
    writeln (lst);

    With TZuordnung do
    begin
        While not EOF (Zuordnungsdatei) do
        begin
            Read (Zuordnungsdatei, TZuordnung);

```

```

        Writeln (LST,Nachkommennummer,' -----> ',Nachkommenbezeichnung);
        Writeln (lst);
    end;
end;
Writeln (lst);
Writeln (lst,' *** Ende der Zuordnungsdatei ***');

Writeln (lst);
Writeln (lst);
Writeln (lst,'###   Eingegebene Markermuster   ###');
Seek (Analysedatei,0);
With TDatensatz do
begin
    While not EOF (Analysedatei) do
    begin
        Read (Analysedatei,TDatensatz);
        Writeln (lst);
        Writeln (lst,' Marker Nummer:      ',RFLP_Nummer:4);
        Writeln (lst,' Bezeichnung:      ',RFLP_Marker);
        Writeln (lst,' Marker-Typ:      ',RFLP_Typ);
        writeln (lst);
        writeln (lst);
        I := 1;
        While I <= (Length(Nachkommandaten)) do
        begin
            Write (lst,' Nachkommen ',I:3,'-',(I+19):3,' : ');
            Write (lst,(Copy(Nachkommandaten,I,5)),' ',(Copy(Nachkommandaten,i+5,5)),' ');
            Writeln (lst,(Copy(Nachkommandaten,I+10,5)),' ',(Copy(Nachkommandaten,i+15,5)),' ');
            I := (I+20);
        end;
        Writeln (LST,'....');
    end;
end;
Writeln (lst,' *** Ende der Daten *** ',chr(12));
Close (Analysedatei);
Close (Kreuzungsdatendatei);
Close (Zuordnungsdatei);
Writepos ('Druckerausgabe beendet!',10,20);
Delay (2000);
end;

Procedure Marker_suchen;
begin
    MarkerListe;
    ClrScr;
    {$I-}
    Reset (Analysedatei);
    {$I+}
    If IOResult <> 0 then
    begin
        Existiert_nicht;
        Exit;
    end;
    Box (4,3,76,23,178);
    WritePos (' Markerdaten suchen ',32,3);
    Writepos ('Der Markername kann auch abgekürzt werden!',10,5);
    Writepos ('Wonach soll gesucht werden?',10,6);
    Writepos (' -> Markername: ',10,8);
    Readln (Such);
    While not EOF(analysedatei) do
    begin
        Read (analysedatei,tdateinsatz);
        With tdateinsatz do
        begin

```

```

    If copy (RFLP_Marker,1,length(Such)) = Such then
    begin
        ClrScr;
        Box (4,3,76,15,178);
        Writepos (' Marker gefunden ',28,3);
        Piep;
        Eingabe := '';
        Writepos (' Markerbezeichnung: '+RFLP_Marker,5,6);
        Writepos (' Typ: '+RFLP_Typ,5,8);
        Writepos (' Markernummer: ',5,10);
        Write (RFLP_Nummer);
        Writepos (' Zahl der für diesen Marker erfassten Nachkommen: ',5,12);
        Write (length(Nachkommandaten)-1);
        Writepos (' Nachkommandaten: '+Nachkommandaten,5,18);
        Writepos ('Bitte drücken Sie eine Taste, um fortzufahren!',10,21);
        Repeat
            Gotoxy (22,10);
            Wahl := '*';
            Wahl := readkey;
        Until Wahl <> '*';
    end;
end;
end;
Writepos ('Es wurde kein (weiterer) passender Eintrag gefunden!',10,22);
Melodie;
Delay (3000);
Close (analysedatei);
end;

```

```

Procedure Daten_Veraendern;

```

```

begin
    MarkerListe;
    ClrScr;
    {$I-};
    Reset (Analysedatei);
    {$I+};
    If IOResult <> 0 then
    begin
        Existiert_nicht;
        Exit;
    end;
    Box (4,3,76,15,178);
    Writepos (' Datensätze editieren ',28,3);
    Writepos ('Der Name des zu ändernden Markers muß genau angegeben werden!',6,5);
    Writepos ('Name des zu ändernden Markers: ',6,6);
    ReadLn (Markername);
    Gefunden := false;
    While (NOT Gefunden) AND (NOT EOF(Analysedatei)) do
    begin
        With Tdatensatz do
        begin
            Read (Analysedatei,Tdatensatz);
            If RFLP_Marker = Markername then
            begin
                Gefunden := true;
                Eingabe := '';
                Writepos ('Markernummer: ',6,8);
                Write (RFLP_Nummer);
                Writepos ('Alter Markername: '+RFLP_Marker,6,10);
                Writepos ('Neuer Markername: ',6,11);
                ReadLn (Eingabe);
                If Eingabe <> '' then
                    RFLP_Marker := Eingabe;
                Eingabe := '';
            end;
        end;
    end;
end;

```

```

Writepos ('Alter MarkerTyp: '+RFLP_Typ,6,13);
Writepos ('Neuer MarkerTyp: ',6,14);
Readln (Eingabe);
If Eingabe <> '' then
  RFLP_Typ := Eingabe;
Eingabe := '';
Writepos ('Möchten Sie die alten Markerdaten übernehmen, dann geben Sie "0" ein.',6,16);
Writepos ('Alte Nachkommendaten: '+Nachkommendaten,6,17);
Writepos ('Neue Nachkommendaten: ',6,19);
Repeat
  Repeat
    Taste := Readkey;
  Until Upcase (Taste) in ['A','B','C','X','Z','O'];
  Write (Upcase(Taste));
  Piep;
  Eingabe := (Eingabe+Upcase(Taste));
Until (Upcase (Taste) = 'Z') or (Upcase (Taste) = 'O');
If Upcase(Taste) = 'Z' then Nachkommendaten := Eingabe;
Melodie;
Writepos ('Änderungen speichern?          [J/N] <>',10,21);
Gotoxy (47,21);
Entscheidung := 'N';
Repeat
  Entscheidung := Readkey;
Until UpCase(Entscheidung) in ['J','N'];
If Upcase (Entscheidung) = 'J' then
begin
  Seek (Analysedatei,Filepos(Analysedatei)-1);
  Write (Analysedatei,TDatensatz);
end;
end;
end;
end;
If not gefunden then
begin
  Writepos ('Der Eintrag wurde nicht gefunden!',20,25);
  Delay (3000);
end;
Close (analysedatei);
end;

Procedure Kopplungsanalyse;
begin
  Melodie;
  ClrScr;
  Box(4,3,76,23,178);
  Writepos (' Kopplungsanalyse ',33,3);
  Writepos ('Bitte schalten Sie den Drucker ein.',10,8);
  Writepos ('Sind Sie bereit, die Kopplungsanalyse zu starten? [J/N] <>',10,10);
  Gotoxy (69,10);
  Repeat
    Taste := Readkey;
  Until Upcase(Taste) in ['J','N'];
  If Upcase(Taste) = 'N' then Exit;
  {$I-}
  Reset (Kreuzungsdatendatei);
  Reset (Analysedatei);
  Reset (Zuordnungsdatei);
  {$I+}
  If IOResult <> 0 then
  begin
    Existiert_nicht;
    Exit;
  end;
end;

```

```

Writepos ('Ich habe die Daten gefunden und beginne mit der Auswertung!',10,12);
{$I-}
writeln (lst,chr(13));
{$I+}
If IOResult <> 0 then
begin
  Kein_Drucker;
  Close (Kreuzungsdatendatei);
  Close (Analysedatei);
  Close (Zuordnungsdatei);
  Exit;
end;
Writepos ('(1) - Marker Verteilung auf die Nachkommen',10,14);
Writeln (lst);
Writeln (lst,'          ### RFLPDet1 - Kopplungsanalyse   ##');
Writeln (lst);
Writeln (lst);
Writeln (lst);
Getdate (Year,Month,Day,DayofWeek);
Writeln (lst,'          Ausdruck vom: ',(Day),'.',(Month),'.',(Year));
Writeln (lst);
With Tdateiart do
begin
  Seek (Kreuzungsdatendatei,0);
  Read (Kreuzungsdatendatei,Tdateiart);
  Writeln (lst,' Organismus:          ',Organismus);
  Writeln (lst,' Kreuzungspartner:          ',Kreuzungspartner);
  Writeln (lst,' Anzahl zugeordneter Nachkommen: ',Anz_Nachkommen);
  Writeln (lst,' Anzahl eingegebener Marken:    ',Anz_RFLP_Marker);
  Writeln (lst);
  Writeln (lst);
  Writeln (lst);
  Writeln (lst,' ***** Verteilung der Marker auf die Nachkommen *****');
  Writeln (lst);
  Writeln (lst,' Nr. - Markerbez. - Elterntyp: - Chi2 für die - Nachkommen:');
  Writeln (lst,'          (a) (b)   Elternallele   ges.   erfaßt   nicht erf. ');
  Writeln (lst,' --- ----- ----- ----- -----');
  While not EOF(Analysedatei) do
  begin
    With Tdatensatz do
    begin
      Read (Analysedatei,Tdatensatz);
      Write (lst,' ',RFLP_Nummer:3,' ');
      Write (lst,RFLP_Marker:10,' ');
      ZaehlerA := 0;
      ZaehlerB := 0;
      ZaehlerX := 0;
      NKgesamt := 0;
      NKerfasst := 0;
      NKnichterfasst := 0;

      NKgesamt := Length(Nachkommendaten)-1;
      For I := 1 to NKgesamt do
      begin
        Teilstring := Copy(Nachkommendaten,I,1);
        If (Teilstring = 'A') or (Teilstring = 'a') then ZaehlerA := ZaehlerA+1;
        If (Teilstring = 'B') or (Teilstring = 'b') then ZaehlerB := ZaehlerB+1;
        If (Teilstring = 'C') or (Teilstring = 'c') then ZaehlerX := ZaehlerX+1;
        If (Teilstring = 'X') or (Teilstring = 'x') then ZaehlerX := ZaehlerX+1;
      end;
      NKerfasst := (ZaehlerA+ZaehlerB);
      NKnichterfasst := ZaehlerX;
      {Chi2-Test auf freie Verteilung der Markerallele}
      Chi := sqr(abs(0.5*NKerfasst-ZaehlerA)-0.5)/(0.5*NKerfasst);
    end;
  end;
end;

```

```

Chi := Chi + sqr(abs(0.5*NKerfasst-ZaehlerA)-0.5)/(0.5*NKerfasst);
Write (lst,ZaehlerA:3,' ',ZaehlerB:3,' ');
if Chi <= 10 then Write (lst,' ');
Write (lst,Chi:2:2,' ');
Write (lst,NKgesamt:3,' ',NKerfasst:3,' ');
Writeln (lst,NKnichterfasst:3);

end;
end;
Writeln (lst,Chr(12));

end;
Reset (Analysedatei);
Reset (Kreuzungsdatendatei);
Writepos ('(2) - Kopplungsanalyse für jedes Markerpaar',10,15);
Writepos (' Wünschen sie einen Ausdruck für <A>lle möglichen',10,16);
Writepos (' oder <N>ur für die nach dem Chi2-Test wahrscheinlichen',10,17);
Writepos (' Kopplungen? [A/N] :',10,18);
Repeat
  Wahl := Readkey;
Until Uppcase(Wahl) in ['N','A'];
Wahl := Uppcase(Wahl);
PiepA;
Writepos (' O.K.',10,19);
Writeln (lst);
Writeln (lst);
If Wahl = 'A' then
begin
  Writeln (lst,' **** Kopplungsanalyse für jede Kombination der eingegebenen Marker ****',chr(10),chr(10));
end;
If Wahl = 'N' then
begin
  Writeln (lst,' **** Kopplungsanalyse für alle Markerkombinationen, deren Kopplung ****');
  Writeln (lst,' **** nach dem Chi2-Test zu 95% wahrscheinlich ist ****',chr(10),chr(10));
end;
end;
Writeln (lst,' Marker1 Marker2 cM Chi',Chr(253),' 95% K.I. Phi NK MM AA AB BA BB');
Writeln (lst,'-----');
Nummer := Filesize(Analysedatei);
For Nr := 0 to (Nummer-1) do
begin
  Seek (Analysedatei,Nr);
  With Tdatensatz do
  begin
    Read (analysedatei,TDatensatz);
    For Zl := (Nr+1) to (Nummer-1) do
    begin
      With Bdatensatz do
      begin
        Seek (Analysedatei,Zl);
        Read (Analysedatei,Bdatensatz);
        NK := 0;
        MM := 0;
        AA := 0;
        AB := 0;
        BB := 0;
        BA := 0;
        MU := 0;
        Chi := 0;
        I := Length(Tdatensatz.Nachkommendaten);
        If I < Length(Bdatensatz.Nachkommendaten) then I := length(Bdatensatz.nachkommendaten);
        I := I-1;
        NK := I;
        While I>0 do
        begin

```

```

If Copy (Tdatensatz.Nachkommandaten,i,1) = 'A' then
begin
  If Copy (Bdatensatz.Nachkommandaten,i,1) = 'A' then AA := AA+1;
  If Copy (Bdatensatz.Nachkommandaten,i,1) = 'B' then AB := AB+1;
end;
if Copy (Tdatensatz.Nachkommandaten,i,1) = 'B' then
begin
  If Copy (Bdatensatz.Nachkommandaten,i,1) = 'A' then BA := BA+1;
  If Copy (Bdatensatz.Nachkommandaten,i,1) = 'B' then BB := BB+1;
end;
I := I-1;
end;
MM := NK-AA-BB-AB-BA {Zahl der Fehlpaarungen};
NK := NK-MM {Für diesen Marker vergleichbare Nachkommen};
MU := ((AB+BA)/NK)*100 {Berechnung der Rekombinationshäufigkeit in %};
If NK > 0 then
begin
  (Chi2-Test / 1 Freiheitsgrad - [Fleiss, J.L. (1973)]);
  Chi := (NK*(sqr(abs((AA*BB)-(AB*BA))-0.5*NK)))/((AA+BA)*(AB+BB)*(AA+AB)*(BA+BB)) ;
end;

{Berechnung des Konfidenz-Intervalls für 95% Bronson et al. 1989};
n := NK {Zahl der erfassten Nachkommen};
p := (AB+BA)/n {Anteil der Rekombinanten};
c := 1.96;
q := 1-p;
{PL = untere Grenze des Konfidenz-Intervalls}
PL := (2*n*p)+sqr(c)-1;
Zwischenerg := 2+(1/n);
Zwischenerg := (4*p*((n*q)+1)) - Zwischenerg;
Zwischenerg := sqr(c) + Zwischenerg;
Zwischenerg := sqrt(Zwischenerg);
Zwischenerg := c * Zwischenerg;
PL := PL - Zwischenerg;
Zwischenerg := 2*(n+sqr(c));
PL := 100*PL / Zwischenerg;
if p = 0 then PL := 0;
{PU = obere Grenze des Konfidenz-Intervalls}
PU := (2*n*p)+sqr(c)+1;
Zwischenerg := 2-(1/n);
Zwischenerg := (4*p*((n*q)+1)) + Zwischenerg;
Zwischenerg := sqr(c) + Zwischenerg;
Zwischenerg := sqrt(Zwischenerg);
Zwischenerg := c * Zwischenerg;
PU := PU + Zwischenerg;
Zwischenerg := 2*(n+sqr(c));
PU := 100 * PU / Zwischenerg;
{Phi = Phi-Koeffizient (Maß für die Kopplung unabh. vom Stichprobenumfang);
{ Phi < 0.35 (vermutlich zufällige Kopplung) - Phi nahe 1 (sehr enge Kopplung);
Zwischenerg := Chi / n;
Phi := sqrt (Zwischenerg);
If (Wahl = 'A') or ((Wahl = 'N') and (Chi > 3.83)) then
begin
  Write (lst,Tdatensatz.RFLP_Marker:10,' ',Bdatensatz.RFLP_Marker:10);
  If MU < 10 then Write (lst,' ');
  Write (lst,' ',MU:3:1,' ');
  If Chi < 10 then write (lst,' ');
  Write (lst,Chi:4:2,' ',PL:4:1,' - ',PU:3:1,' ',Phi:2:2,' ',NK:3:0,MM:5:0,AA:5:0);
  Writeln (lst,AB:4:0,BA:4:0,BB:4:0);
end;
end;
end;
end;
end;

```

6. Anhang

```

Writeln (lst);
Writeln (lst);
Writeln (lst,' ***** Hinweise zur weiteren Auswertung! *****');
Writeln (lst,' *');
Writeln (lst,' * Werte von Chi2> 3,84 lassen Kopplung vermuten; zu 95% liegt eine nicht *');
Writeln (lst,' * zufällige Verteilung vor (Die Verteilung hat 1 Freiheitsgrad). *');
Writeln (lst,' * Der Phi-Koeffizient ist ein Maß für Kopplung, unabh. vom Stichprobenumfang. *');
Writeln (lst,' * Möglich sind Werte zwischen 0 und 1. Für Phi <= 0,34 ist zufällige Kopplung *');
Writeln (lst,' * anzunehmen. *');
Writeln (lst,' * Das 95% Konfidenz-Intervall bezeichnet den Bereich rechts und links der *');
Writeln (lst,' * ermittelten Rekombinationshäufigkeiten, angegeben in cM (Centimorgan) *');
Writeln (lst,' * innerhalb dem die tatsächliche Rekombinationshäufigkeit mit 95%iger Wahr- *');
Writeln (lst,' * scheinlichkeit liegt. Ist die obere Grenze deutlich kleiner als 50, so liegt *');
Writeln (lst,' * mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Kopplung der Marker vor. *');
Writeln (lst,' * *');
Writeln (lst,' * Abkürzungen: cM = Centimorgan / NK = Zahl der berücksichtigten Nachkommen *');
Writeln (lst,' * MM = Zahl der Fehlpaarungen / AA,BB = Elterntypen / AB,BA = Rekombinations- *');
Writeln (lst,' * typen / K.I. = Konfidenz-Intervall / Phi = Phi-Koeffizient *');
Writeln (lst,' * *');
Writeln (lst,' *****');
Writeln (lst,chr(12));
Close (Analysedatei);
Close (Kreuzungsdatendatei);
Close (Zuordnungsdatei);
end;

```

{Hauptprogramm}

```

begin
  Wahl := ' ';
  While Upcase (Wahl) <> 'E' do
    begin
      Assign (Analysedatei, 'b:Analyse.dat');
      Assign (Kreuzungsdatendatei, 'b:Kreuzung.dat');
      Assign (Zuordnungsdatei, 'b:Zuordnu.dat');
      ClrScr;
      Box (1,2,78,25,219);
      Writepos ('LvO 9/92',67,25);
      Writepos ('*** RFLP-Analyseprogramm - Hauptmenue ***',20,4);
      Writepos ('N --> Neue Marker/RFLP-Analysedatei anlegen',5,8);
      Writepos ('A --> Anhängen von Marker/RFLP-Datenreihen',5,10);
      Writepos ('L --> Löschen einzelner Marker/RFLP-Datenreihen',5,11);
      Writepos ('V --> Verändern von RFLP-Datenreihen',5,12);
      Writepos ('S --> Suchen nach bereits eingegebenen Markern',5,13);
      Writepos ('Z --> Anhängen von Daten an die Zuordnungstabelle',5,14);
      Writepos ('D --> Drucken der gesamten Marker/RFLP-Analysedatei',5,16);
      Writepos ('K --> Kopplungsanalyse für die eingegebenen Marker/RFLPs',5,18);
      Writepos ('E --> Programm beenden',5,20);
      Writepos ('      **** Bitte wählen Sie durch Tastendruck < >',5,22);
      Repeat
        Gotoxy (52,22);
        Wahl := Readkey;
      Until Upcase (Wahl) In ['N','A','L','V','S','Z','D','K','E'];
      case UpCase (Wahl) of
        'N' : NeuDatei;
        'A' : Anhaengen;
        'L' : Daten_Loeschen;
        'D' : Liste_Drucken;
        'V' : Daten_Veraendern;
        'S' : Marker_suchen;
        'Z' : AendZuordnung;
        'K' : Kopplungsanalyse;
        'E' : ClrScr;
      end;
    end;
end;

```

end;
end;

end.

6.2 Verzeichnis aller aus der Kreuzung *G.pulicaris* R-6380 x R-7843 isolierten Nachkommen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 32 Nachkommen aus der Kreuzung *G.pulicaris* R-6380 x R-7843 isoliert.

Diese Nachkommen sind im folgenden aufgelistet.

Zufällig ausgewählte Ascosporeisolate:

- RAP 1-1, RAP 1-2, RAP 1-3, RAP 1-4, RAP 1-5, RAP 1-6, RAP 1-7,
- RAP 2-1, RAP 2-2, RAP 2-4, RAP 2-5, RAP 2-6, RAP 2-7, RAP 2-8, RAP 2-9, RAP 2-10, RAP 2-11, RAP 2-12,
- RAP 3-1, RAP 3-2, RAP 3-3, RAP 3-4, RAP 3-5, RAP 3-6, RAP 3-7, RAP 3-8, RAP 3-9.

Ascosporeisolate aus einen Ascus:

- P₃A₁-1, P₃A₁-2, P₃A₁-3, P₃A₁-4, P₃A₁-5.

6.3 Verzeichnis aller mit Hilfe der Cosmid- und Plasmid Genbanken detektierten RFLP-Marker zwischen *G. pulicaris* R-6380 und R-7843

Nr.	Bezeichnung des Klons	RFLP mit Restriktionsenzym	Unterschiede im Hybridisierungsmuster (Banden, die nur bei einem Eltern-Typ auftreten)
1	Cos 3	Hind III	R-6380: 10,1 kbp R-7843: 12,4 kbp
2	Cos 7	Kpn I Pst I Xho I	R-6380: 16,6 kbp R-6380: 3,2 kbp R-7843: 1,9 kbp R-7843: 3,8 kbp
3	Cos 10	Xho I	R-6380: 14,0 kbp R-7843: 14,5 kbp
4	Cos II 1	Kpn I Pst I	R-6380: 15,9 kbp R-7843: 10,5 kbp R-6380: 17,4 kbp R-7843: 12,0 kbp
5	Cos II 2	BamH I Bgl II EcoR I Kpn I Xho I	R-6380: 16,5 kbp R-7843: R-6380: 4,7 kbp R-7843: 10,5 kbp R-6380: >23,1 kbp R-7843: 13,7 kbp R-6380: 7,5 kbp, 5 kbp R-7843: 15,0 kbp R-6380: >23,0 kbp, 3,0 kbp R-7843: 17,8 kbp, 3,7 kbp
6	Cos II 3	BamH I	R-6380: 13,7 kbp R-7843: 9,8 kbp
7	Cos II 4	BamH I Bgl II EcoR I Pst I	R-6380: R-7843: 3,0 kbp R-6380: 7,3 kbp R-7843: 7,0 kbp R-6380: R-7843: 22,5 kbp R-6380: 6,6 kbp R-7843: 23,0 kbp
8	Cos II 5	BamH I Bgl II EcoR I Hind III Kpn I Xba I Xho I	R-6380: >23,1 kbp R-7843: 22,0 kbp R-6380: 6,6 kbp R-7843: 7,3 kbp R-6380: 6,6 kbp R-7843: 3,9 kbp R-6380: R-7843: 7,7 kbp R-6380: 23,1 kbp R-7843: > 23,1 kbp R-6380: 6,6 kbp R-7843: R-6380: 5,0 kbp R-7843:
9	Cos II 6	EcoR I	R-6380: >23,1 kbp, 10,5 kbp R-7843: 9,4 kbp, 7,4 kbp, 1,7 kbp

Nr.	Bezeichnung des Klons	RFLP mit Restriktionsenzym	Unterschiede im Hybridisierungsmuster (Banden, die nur bei einem Eltern-Typ auftreten)
10	Cos II 7	Kpn I Xho I Pst I	R-6380: 8,0 kbp R-7843: 15,0 kbp R-6380: 1,6 kbp R-7843: 3,1 kbp R-6380: 3,8 kbp R-7843: 1,7 kbp
11	Cos II 19	BamH I Bgl II EcoR I Kpn I Xba I Xho I	R-6380: 4,5 kbp R-7843: R-6380: 6,3 kbp R-7843: R-6380: > 23,1 kbp, 7,2 kbp R-7843: 18,7 kbp, 2,8 kbp R-6380: 10,0 kbp R-7843: R-6380: 18,7 kbp R-7843: >23,1 kbp R-6380: 18,7 kbp, 8 kbp R-7843: 11,5 kbp, 9,4 kbp
12	Cos II 21	BamH I Bgl II EcoR I Hind III Pst I Xba I Xho I	R-6380: 4,7 kbp, 3,5 kbp R-7843: 6,4 kbp R-6380: 5,8 kbp R-7843: 15,2 kbp R-6380: 20,5 kbp, 7,4 kbp, 4,4 kbp R-7843: 17,2 kbp, 4,3 kbp, 3,6 kbp R-6380: R-7843: 7,5 kbp R-6380: 6,5 kbp, 3,1 kbp, 2,3 kbp R-7843: 10,5 kbp R-6380: 5,4 kbp R-7843: 23,0 kbp R-6380: 20,5 kbp R-7843:
13	Cos III 3	EcoR I	R-6380: 6,8 kbp R-7843: >23,1 kbp
14	Cos III 7	Kpn I Xba I	R-6380: 6,6 kbp R-7843: 4,1 kbp, 2,1 kbp R-6380: >23,1 kbp, 4 kbp R-7843: 11,5 kbp, 6,9 kbp, 4,3 kbp
15	Cos III 10	Kpn I Pst I	R-6380: 19,0 kbp R-7843: 15,5 kbp R-6380: >23,1 kbp R-7843: 16,8 kbp

Nr.	Bezeichnung des Klons	RFLP mit Restriktionsenzym	Unterschiede im Hybridisierungsmuster (Banden, die nur bei einem Eltern-Typ auftreten)
1	PPL B1	Pst I Xba I	R-6380: 4,7 kbp R-7843: 4,4 kbp R-6380: 9,0 kbp R-7843: 13,0 kbp, 6,7 kbp
2	PPL B5	Xho I	R-6380: R-7843: 6,6 kbp, 16,9 kbp
3	PPL B14	EcoR I Xho I	R-6380: > 23,1 kbp R-7843: 13,0 kbp R-6380: >23,1 kbp R-7843: 1,3 kbp
4	PPL B15	Kpn I	R-6380: 14,4 kbp R-7843: 6,9 kbp
5	PPL B17	Bgl II EcoR I Hind III Kpn I Xba I	R-6380: 11,0 kbp R-7843: R-6380: 9,7 kbp R-7843: R-6380: 3,9 kbp R-7843: R-6380: 2,8 kbp R-7843: R-6380: >21,1 kbp R-7843:
6	PPL B19	Xba I	R-6380: R-7843: 4,0 kbp
7	PPL C2	Pst I	R-6380: R-7843: 2,8 kbp
8	PPL C4	Kpn I	R-6380: 1,0 kbp R-7843: 1,1 kbp
9	PPL C9	BamH I Xba I	R-6380: >23,1 kbp R-7843: 22,5 kbp R-6380: >23,1 kbp R-7843: 21,5 kbp
10	PPL C13	BamH I Hind III Pst I	R-6380: R-7843: > 23,1 kbp R-6380: R-7843: 8,4 kbp R-6380: 6,8 kbp R-7843: 10,5 kbp
11	PPL CII 10	Pst I Xho I	R-6380: > 23,1 kbp R-7843: 7,0 kbp R-6380: 10,4 kbp R-7843: 7,2 kbp, 1,4 kbp

6.4 RFLP-Analyse: Kopplungsanalyse für jede Kombination der detektierten Marken

Marker1	Marker2	cM	Chi ²	95% K.I.	Phi	NK	MM	AA	AB	BA	BB
B14(EcoRI)	CII 10 (Ps	40.0	1.91	25.3 - 57.1	0.22	40	6	10	3	13	14
B14(EcoRI)	B17(EcoRI)	2.4	33.44	0.1 - 14.2	0.89	42	4	13	0	1	28
B14(EcoRI)	B1(PstI)	19.5	11.56	9.4 - 35.7	0.53	41	5	11	3	5	22
B14(EcoRI)	CosII2(Eco	56.8	0.28	41.1 - 72.0	0.08	44	2	6	8	17	13
B14(EcoRI)	cosIII0(Ps	48.8	0.02	33.2 - 65.3	0.02	41	5	8	5	15	13
B14(EcoRI)	cosII5(Eco	41.9	0.06	27.4 - 58.3	0.04	43	3	6	7	11	19
B14(EcoRI)	CosII4(Pst	39.0	0.25	24.6 - 56.0	0.08	41	5	6	8	8	19
B14(EcoRI)	B15(KpnI)	40.0	3.86	25.3 - 57.1	0.31	40	6	12	1	15	12
B14(EcoRI)	C4(KpnI)	62.5	1.25	45.8 - 77.7	0.18	40	6	5	8	17	10
B14(EcoRI)	cosII7(Pst	46.7	0.00	28.8 - 66.3	0.00	30	16	5	4	10	11
B14(EcoRI)	C9(XbaI)	21.9	9.11	9.9 - 40.9	0.53	32	14	11	1	6	14
B14(EcoRI)	cosII2(Xho	59.0	0.45	42.2 - 74.8	0.11	39	7	5	7	16	11
B14(EcoRI)	cosII21(Hi	41.4	0.44	24.1 - 61.7	0.12	29	17	8	4	8	9
B14(EcoRI)	cosIII7(Xb	17.9	14.04	8.1 - 34.4	0.60	39	7	12	1	6	20
B14(EcoRI)	cosIII(Kpn	48.8	0.06	33.6 - 64.9	0.04	43	3	9	5	16	13
B14(EcoRI)	Rish10000	47.7	0.13	32.7 - 63.7	0.05	44	2	9	5	16	14
B14(EcoRI)	Virulenz_2	31.8	1.04	19.1 - 48.1	0.15	44	3	5	9	5	25
B14(EcoRI)	Vir_3g	39.5	0.21	25.4 - 56.0	0.07	43	5	6	7	10	20
CII 10 (Ps	B17(EcoRI)	41.0	1.16	26.0 - 58.4	0.17	39	7	10	12	4	13
CII 10 (Ps	B1(PstI)	42.1	0.90	26.7 - 59.7	0.15	38	8	10	12	4	12
CII 10 (Ps	CosII2(Eco	43.9	0.16	28.8 - 60.7	0.06	41	5	14	10	8	9
CII 10 (Ps	cosII10(Ps	31.6	3.38	18.0 - 49.3	0.30	38	8	16	6	6	10
CII 10 (Ps	cosII5(Eco	57.5	0.30	41.0 - 73.3	0.09	40	6	9	14	9	8
CII 10 (Ps	CosII4(Pst	48.6	0.03	32.2 - 66.0	0.03	37	9	7	14	4	12
CII 10 (Ps	B15(KpnI)	37.8	0.48	22.9 - 55.8	0.11	37	9	17	6	8	6
CII 10 (Ps	C4(KpnI)	55.6	0.16	38.3 - 72.5	0.07	36	10	10	11	9	6
CII 10 (Ps	cosII7(Pst	21.4	7.15	9.0 - 42.0	0.51	28	18	12	4	2	10
CII 10 (Ps	C9(XbaI)	40.0	0.42	23.2 - 60.0	0.12	30	16	11	6	6	7
CII 10 (Ps	cosII2(Xho	45.9	0.01	29.8 - 63.5	0.02	37	9	12	9	8	8
CII 10 (Ps	cosII21(Hi	41.4	0.19	24.1 - 61.7	0.08	29	17	11	7	5	6
CII 10 (Ps	cosIII7(Xb	44.4	0.12	28.3 - 62.4	0.06	36	10	10	9	7	10
CII 10 (Ps	cosIII(Kpn	27.5	5.84	15.1 - 44.5	0.38	40	6	18	5	6	11
CII 10 (Ps	Rish10000	46.3	0.00	31.0 - 63.0	0.00	41	5	14	10	9	8
CII 10 (Ps	Virulenz_2	39.0	3.82	24.6 - 56.0	0.31	41	6	9	15	1	16
CII 10 (Ps	Vir_3g	37.5	2.25	23.2 - 54.7	0.24	40	8	12	11	4	13
B17(EcoRI)	B1(PstI)	17.9	12.32	8.1 - 34.4	0.56	39	7	11	3	4	21
B17(EcoRI)	CosII2(Eco	58.1	0.57	42.2 - 73.3	0.11	43	3	6	9	16	12
B17(EcoRI)	cosIII0(Ps	50.0	0.02	34.1 - 66.6	0.02	40	6	8	6	14	12
B17(EcoRI)	cosII5(Eco	44.2	0.02	29.4 - 60.5	0.02	43	3	7	8	11	17
B17(EcoRI)	CosII4(Pst	38.5	0.35	23.8 - 55.9	0.09	39	7	6	8	7	18
B17(EcoRI)	B15(KpnI)	41.0	2.35	26.0 - 58.4	0.25	39	7	12	2	14	11
B17(EcoRI)	C4(KpnI)	68.4	3.41	51.2 - 83.0	0.30	38	8	4	9	17	8
B17(EcoRI)	cosII7(Pst	46.7	0.00	28.8 - 66.3	0.00	30	16	6	5	9	10
B17(EcoRI)	C9(XbaI)	21.9	8.42	9.9 - 40.9	0.51	32	14	12	2	5	13
B17(EcoRI)	cosII2(Xho	60.5	0.84	43.4 - 76.4	0.15	38	8	5	8	15	10
B17(EcoRI)	cosII21(Hi	44.8	0.05	27.0 - 64.9	0.04	29	17	9	5	8	7
B17(EcoRI)	cosIII7(Xb	23.7	8.21	12.0 - 41.0	0.46	38	8	11	3	6	18
B17(EcoRI)	cosIII(Kpn	50.0	0.00	34.4 - 66.2	0.01	42	4	9	6	15	12
B17(EcoRI)	Rish10000	46.5	0.09	31.5 - 62.7	0.05	43	3	9	6	14	14
B17(EcoRI)	Virulenz_2	34.9	0.59	21.5 - 51.4	0.12	43	4	5	10	5	23
B17(EcoRI)	Vir_3g	42.9	0.01	28.1 - 59.5	0.02	42	6	6	8	10	18
B1(PstI)	CosII2(Eco	53.7	0.00	37.6 - 69.7	0.01	41	5	8	8	14	11
B1(PstI)	cosIII0(Ps	59.0	0.41	42.2 - 74.8	0.10	39	7	7	8	15	9
B1(PstI)	cosII5(Eco	52.5	0.11	36.3 - 68.9	0.05	40	6	5	10	11	14
B1(PstI)	CosII4(Pst	35.0	1.65	21.1 - 52.2	0.20	40	6	8	8	6	18
B1(PstI)	B15(KpnI)	44.7	0.78	29.0 - 62.2	0.14	38	8	12	3	14	9

Marker1	Marker2	cM	Chi ²	95% K.I.	Phi	NK	MM	AA	AB	BA	BB
B1(PstI)	C4(KpnI)	47.4	0.02	31.3 - 64.6	0.02	38	8	9	6	12	11
B1(PstI)	cosII7(Pst)	60.7	0.60	40.7 - 79.2	0.15	28	18	4	7	10	7
B1(PstI)	C9(XbaI)	36.7	1.63	20.5 - 56.8	0.23	30	16	9	3	8	10
B1(PstI)	cosII2(Xho)	58.3	0.25	40.9 - 74.9	0.08	36	10	6	7	14	9
B1(PstI)	cosII21(Hi)	32.1	2.52	16.6 - 53.1	0.30	28	18	9	3	6	10
B1(PstI)	cosIII7(Xb)	27.8	5.73	14.8 - 45.9	0.40	36	10	11	3	7	15
B1(PstI)	cosIII1(Kpn)	58.5	0.32	42.2 - 74.1	0.09	41	5	8	8	16	9
B1(PstI)	Rish10000	43.9	0.54	28.8 - 60.7	0.12	41	5	11	5	13	12
B1(PstI)	Virulenz_2	34.1	1.24	20.6 - 51.1	0.17	41	6	5	11	3	22
B1(PstI)	Vir_3g	45.0	0.00	29.6 - 61.9	0.01	40	8	6	10	8	16
CosII2(Eco)	cosII10(Ps)	62.8	1.74	46.7 - 77.4	0.20	43	3	9	11	16	7
CosII2(Eco)	cosII5(Eco)	53.3	0.03	38.0 - 68.7	0.03	45	1	8	14	10	13
CosII2(Eco)	CosII4(Pst)	39.0	1.72	24.6 - 56.0	0.21	41	5	10	12	4	15
CosII2(Eco)	B15(KpnI)	51.2	0.01	35.4 - 67.5	0.02	41	5	14	7	14	6
CosII2(Eco)	C4(KpnI)	48.8	0.04	33.2 - 65.3	0.03	41	5	12	10	10	9
CosII2(Eco)	cosII7(Pst)	54.8	0.04	36.3 - 73.2	0.04	31	15	8	9	8	6
CosII2(Eco)	C9(XbaI)	51.5	0.03	33.9 - 69.7	0.03	33	13	9	8	9	7
CosII2(Eco)	cosII2(Xho)	0.0	36.09	0.0 - 10.9	0.95	40	6	21	0	0	19
CosII2(Eco)	cosII21(Hi)	46.7	0.01	28.8 - 66.3	0.02	30	16	10	7	7	6
CosII2(Eco)	cosIII7(Xb)	50.0	0.10	34.1 - 66.6	0.05	40	6	9	11	9	11
CosII2(Eco)	cosIII1(Kpn)	60.0	1.07	44.4 - 74.6	0.15	45	1	11	11	16	7
CosII2(Eco)	Rish10000	52.2	0.00	37.1 - 67.4	0.00	46	0	12	11	13	10
CosII2(Eco)	Virulenz_2	50.0	0.11	35.1 - 65.4	0.05	46	1	6	17	6	17
CosII2(Eco)	Vir_3g	42.2	0.63	28.0 - 58.2	0.12	45	3	11	12	7	15
cosIII0(Ps)	cosII5(Eco)	45.2	0.25	30.2 - 61.7	0.08	42	4	11	13	6	12
cosIII0(Ps)	CosII4(Pst)	51.3	0.07	35.0 - 68.0	0.04	39	7	8	14	6	11
cosIII0(Ps)	B15(KpnI)	48.7	0.12	32.7 - 65.6	0.05	39	7	14	7	12	6
cosIII0(Ps)	C4(KpnI)	43.6	0.21	28.2 - 60.8	0.07	39	7	13	10	7	9
cosIII0(Ps)	cosII7(Pst)	3.4	21.63	0.2 - 19.8	0.86	29	17	15	1	0	13
cosIII0(Ps)	C9(XbaI)	53.3	0.01	34.6 - 72.2	0.01	30	16	9	9	7	5
cosIII0(Ps)	cosII2(Xho)	60.5	0.95	43.4 - 76.4	0.16	38	8	8	12	11	7
cosIII0(Ps)	cosII21(Hi)	46.4	0.00	28.0 - 66.8	0.00	28	18	8	6	7	7
cosIII0(Ps)	cosIII7(Xb)	52.6	0.00	36.0 - 69.4	0.01	38	8	9	12	8	9
cosIII0(Ps)	cosIII1(Kpn)	2.3	35.20	0.1 - 13.9	0.90	43	3	25	0	1	17
cosIII0(Ps)	Rish10000	46.5	0.00	31.5 - 62.7	0.00	43	3	15	10	10	8
cosIII0(Ps)	Virulenz_2	51.2	0.04	35.7 - 67.1	0.03	43	4	6	19	3	15
cosIII0(Ps)	Vir_3g	54.8	0.00	38.8 - 70.5	0.01	42	6	8	16	7	11
cosII5(Eco)	CosII4(Pst)	55.0	0.92	38.7 - 71.1	0.15	40	6	3	12	10	15
cosII5(Eco)	B15(KpnI)	57.5	0.04	41.0 - 73.3	0.03	40	6	10	6	17	7
cosII5(Eco)	C4(KpnI)	47.5	0.01	31.8 - 64.3	0.02	40	6	8	6	13	13
cosII5(Eco)	cosII7(Pst)	45.2	0.05	27.8 - 64.5	0.04	31	15	7	5	9	10
cosII5(Eco)	C9(XbaI)	63.6	1.39	45.1 - 80.2	0.21	33	13	6	9	12	6
cosII5(Eco)	cosII2(Xho)	56.4	0.21	39.8 - 72.6	0.07	39	7	7	9	13	10
cosII5(Eco)	cosII21(Hi)	36.7	1.34	20.5 - 56.8	0.21	30	16	10	4	7	9
cosII5(Eco)	cosIII7(Xb)	64.1	2.64	47.2 - 79.2	0.26	39	7	4	12	13	10
cosII5(Eco)	cosIII1(Kpn)	45.5	0.29	30.7 - 61.5	0.08	44	2	12	6	14	12
cosII5(Eco)	Rish10000	48.9	0.00	33.9 - 64.6	0.01	45	1	10	8	14	13
cosII5(Eco)	Virulenz_2	42.2	0.01	28.0 - 58.2	0.01	45	2	5	13	6	21
cosII5(Eco)	Vir_3g	40.9	0.35	26.7 - 57.2	0.09	44	4	8	9	9	18
CosII4(Pst)	B15(KpnI)	57.9	0.00	40.9 - 74.1	0.01	38	8	8	5	17	8
CosII4(Pst)	C4(KpnI)	53.8	0.00	37.4 - 70.3	0.00	39	7	7	7	14	11
CosII4(Pst)	cosII7(Pst)	55.6	0.03	35.6 - 75.2	0.03	27	19	5	6	9	7
CosII4(Pst)	C9(XbaI)	56.7	0.02	37.7 - 75.1	0.02	30	16	5	5	12	8
CosII4(Pst)	cosII2(Xho)	33.3	4.06	19.1 - 51.6	0.34	36	10	10	2	10	14
CosII4(Pst)	cosII21(Hi)	42.9	0.30	25.0 - 63.5	0.10	28	18	6	3	9	10
CosII4(Pst)	cosIII7(Xb)	45.9	0.01	29.8 - 63.5	0.02	37	9	7	6	11	13
CosII4(Pst)	cosIII1(Kpn)	53.7	0.04	37.6 - 69.7	0.03	41	5	8	6	16	11
CosII4(Pst)	Rish10000	31.7	5.86	18.6 - 48.7	0.38	41	5	12	2	11	16
CosII4(Pst)	Virulenz_2	43.9	0.04	28.8 - 60.7	0.03	41	6	2	12	6	21
CosII4(Pst)	Vir_3g	60.0	2.78	43.4 - 75.5	0.26	40	8	2	12	12	14

Marker1	Marker2	cM	Chi ²	95% K.I.	Phi	NK	MM	AA	AB	BA	BB
B15(KpnI)	C4(KpnI)	45.9	0.00	29.8 - 63.5	0.00	37	9	14	11	6	6
B15(KpnI)	cosII7(Pst)	41.4	0.14	24.1 - 61.7	0.07	29	17	12	8	4	5
B15(KpnI)	C9(XbaI)	33.3	2.14	17.9 - 53.5	0.27	30	16	14	8	2	6
B15(KpnI)	cosII2(Xho)	54.1	0.06	37.1 - 70.9	0.04	37	9	12	13	7	5
B15(KpnI)	cosII21(Hi)	44.8	0.01	27.0 - 64.9	0.01	29	17	12	9	4	4
B15(KpnI)	cosIII7(Xb)	47.2	0.08	30.8 - 65.0	0.05	36	10	12	13	4	7
B15(KpnI)	cosIII(Kpn)	45.0	0.00	29.6 - 61.9	0.00	40	6	16	11	7	6
B15(KpnI)	Rish10000	41.5	0.29	26.7 - 58.3	0.08	41	5	17	11	6	7
B15(KpnI)	Virulenz_2	58.5	0.07	42.2 - 74.1	0.04	41	6	7	21	3	10
B15(KpnI)	Vir_3g	47.5	0.23	31.8 - 64.3	0.08	40	8	12	15	4	9
C4(KpnI)	cosII7(Pst)	40.7	0.31	23.0 - 61.9	0.11	27	19	9	5	6	7
C4(KpnI)	C9(XbaI)	55.2	0.03	36.0 - 74.2	0.03	29	17	6	7	9	7
C4(KpnI)	cosII2(Xho)	47.2	0.00	30.8 - 65.0	0.00	36	10	11	7	10	8
C4(KpnI)	cosII21(Hi)	44.4	0.09	26.0 - 65.4	0.06	27	19	7	4	8	8
C4(KpnI)	cosIII7(Xb)	43.2	0.26	27.5 - 61.0	0.08	37	9	10	9	7	11
C4(KpnI)	cosIII(Kpn)	47.5	0.00	31.8 - 64.3	0.01	40	6	13	8	11	8
C4(KpnI)	Rish10000	61.0	1.35	44.5 - 76.2	0.18	41	5	10	12	13	6
C4(KpnI)	Virulenz_2	51.2	0.06	35.4 - 67.5	0.04	41	6	5	17	4	15
C4(KpnI)	Vir_3g	52.5	0.03	36.3 - 68.9	0.03	40	8	8	14	7	11
cosII7(Pst)	C9(XbaI)	50.0	0.11	30.4 - 70.8	0.07	26	20	8	6	7	5
cosII7(Pst)	cosII2(Xho)	55.2	0.03	36.0 - 74.2	0.03	29	17	7	7	9	6
cosII7(Pst)	cosII21(Hi)	47.8	0.06	27.4 - 70.2	0.05	23	23	7	5	6	5
cosII7(Pst)	cosIII7(Xb)	57.1	0.14	37.4 - 76.2	0.07	28	18	6	8	8	6
cosII7(Pst)	cosIII(Kpn)	3.3	22.63	0.2 - 19.2	0.87	30	16	15	0	1	14
cosII7(Pst)	Rish10000	51.6	0.02	33.4 - 70.4	0.03	31	15	9	7	9	6
cosII7(Pst)	Virulenz_2	48.4	0.01	30.6 - 67.5	0.02	31	16	4	12	3	12
cosII7(Pst)	Vir_3g	51.6	0.05	33.4 - 70.4	0.04	31	17	6	10	6	9
C9(XbaI)	cosII2(Xho)	51.6	0.03	33.4 - 70.4	0.03	31	15	8	8	8	7
C9(XbaI)	cosII21(Hi)	53.6	0.03	34.2 - 73.1	0.03	28	18	9	7	8	4
C9(XbaI)	cosIII7(Xb)	9.4	18.74	2.5 - 26.4	0.77	32	14	14	3	0	15
C9(XbaI)	cosIII(Kpn)	50.0	0.03	32.2 - 68.6	0.03	32	14	11	7	9	5
C9(XbaI)	Rish10000	57.6	0.37	39.4 - 75.0	0.11	33	13	9	9	10	5
C9(XbaI)	Virulenz_2	39.4	2.07	23.4 - 58.4	0.25	33	14	6	12	1	14
C9(XbaI)	Vir_3g	34.4	2.52	19.2 - 53.9	0.28	32	16	10	8	3	11
cosII2(Xho)	cosII21(Hi)	48.3	0.06	29.9 - 68.1	0.05	29	17	9	7	7	6
cosII2(Xho)	cosIII7(Xb)	50.0	0.09	33.7 - 67.0	0.05	38	8	9	11	8	10
cosII2(Xho)	cosIII(Kpn)	59.0	0.67	42.2 - 74.8	0.13	39	7	9	11	12	7
cosII2(Xho)	Rish10000	55.0	0.14	38.7 - 71.1	0.06	40	6	11	10	12	7
cosII2(Xho)	Virulenz_2	52.5	0.03	36.3 - 68.9	0.03	40	7	5	16	5	14
cosII2(Xho)	Vir_3g	43.6	0.33	28.2 - 60.8	0.09	39	9	10	11	6	12
cosII21(Hi)	cosIII7(Xb)	51.7	0.06	32.9 - 71.2	0.05	29	17	7	9	6	7
cosII21(Hi)	cosIII(Kpn)	48.3	0.06	29.9 - 68.1	0.05	29	17	9	7	7	6
cosII21(Hi)	Rish10000	43.3	0.10	26.0 - 63.2	0.06	30	16	10	7	6	7
cosII21(Hi)	Virulenz_2	43.3	1.03	26.0 - 63.2	0.18	30	17	5	12	1	12
cosII21(Hi)	Vir_3g	51.7	0.13	32.9 - 71.2	0.07	29	19	7	10	5	7
cosIII7(Xb)	cosIII(Kpn)	56.4	0.18	39.8 - 72.6	0.07	39	7	9	9	13	8
cosIII7(Xb)	Rish10000	55.0	0.07	38.7 - 71.1	0.04	40	6	9	9	13	9
cosIII7(Xb)	Virulenz_2	37.5	1.22	23.2 - 54.7	0.17	40	7	6	12	3	19
cosIII7(Xb)	Vir_3g	38.5	1.08	23.8 - 55.9	0.17	39	9	9	9	6	15
cosIII(Kpn)	Rish10000	44.4	0.09	30.0 - 60.4	0.05	45	1	16	11	9	9
cosIII(Kpn)	Virulenz_2	53.3	0.01	38.0 - 68.7	0.01	45	2	7	20	4	14
cosIII(Kpn)	Vir_3g	52.3	0.08	36.9 - 67.9	0.04	44	4	10	16	7	11
Rish10000	Virulenz_2	63.0	1.86	47.5 - 77.1	0.20	46	1	4	21	8	13
Rish10000	Vir_3g	66.7	3.58	50.9 - 80.4	0.28	45	3	6	18	12	9
Virulenz_2	Vir_3g	13.0	21.92	5.4 - 27.2	0.69	46	2	12	0	6	28

NK= Anzahl vergleichener Nachkommen, MM= Fehlpaarungen, AA, BB= Elterntypen, AB, BA= Rekombinationstypen, Phi = ϕ -Koeffizient, 95% K.I.= 95% Konfidenz-Intervall

7. Literatur

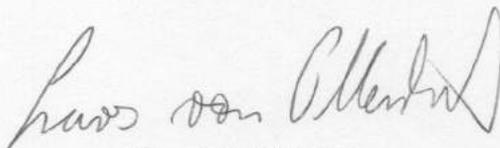
- Allefs J.J.H.M., Salentijn E.M.J., Krens F.A., Rouwendal G.J.A. (1990) Optimization of non-radioactive single copy detection and reuse of blots. *Nucl Acids Res* 18: 3099-3100
- Anand R. (1986) Pulsed field gel electrophoresis: a technique for fractionating large DNA molecules. *Trends Genet* 2: 278-283
- Biometra (1990) *Rotaphor Typ V: Bedienungsanleitung*. Göttingen, Biometra 28-31
- Biometra (1992) *Beipackzettel zum Größenstandard: S.cerevisiae* WAY 4A. Biometra, Göttingen
- Borland (1988) *Turbo Pascal 5.5*. Borland GmbH, München
- Brindle P.A., Coolbear T., Kuhn P.J., Threfall D.R. (1985) An O₂ study of the biosynthesis and metabolism of rishitin. *Phytochemistry* 24: 1219-1222
- Bronson C.R., Chang C.-S., Tzeng T.-H. (1989) HAPMAP: a computer program for the linkage analysis of haploids. *Fungal Genet Newsl* 36: 41-21
- Carle G.F., Olson M.V. (1984) Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucl Acids Res* 12: 5647-5664
- Chelkowski J. (1989) Toxinogenicity of *Fusarium* species causing dry rot of potato tubers. In: Chelkowski J. (ed.) *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V.
- Cooley R.N. (1992) The use of RFLP analysis, electrophoretic karyotyping and PCR in studies of plant pathogenic fungi. In: Stahl U., Tudzynski P. (eds.) *Molecular biology of filamentous fungi*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 13-25
- Curch G., Gilbert W. (1984) Genetic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 81: 1991-1995
- Desjardins A.E., Beremand M. (1986) A genetic system for trichothecene toxin production in *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*). *Phytopathology* 77: 678-683
- Desjardins A.E., Gardner H.W. (1989) Genetic analysis in *Gibberella pulicaris*: rishitin tolerance, rishitin metabolism and virulence on Potato Tubers. *Mol Plant Microbe Inter* 2: 26-34
- Desjardins A.E., Gardner H.W. (1990) Virulence of *Gibberella pulicaris* on potato tubers and its relationship to a gene for rishitin metabolism. *Genetics* 81: 429-435
- Desjardins A.E., Gardner H.W., Weltring K.M. (1992) Detoxification of sesquiterpene phytoalexins by *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*) and its importance for virulence on potato tubers. *J Ind Microbiol* 9: 201-211
- Dickenson C.H., Lucas J.A. (1982) *Plant pathology & plant pathogens* (Basic microbiology, v.6). Oxford, Blackwell Scientific Publications
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15
- Fleiss J.L. (1981) *Statistical methods for rates and proportions*. 2nd ed., Wiley, New York

- Grunstein M., Hogness D.S. (1975) Colony hybridisation: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci* 81: 3069-3073
- Gutzeling H. (1992) *Basiswissen: Turbo Pascal*. München, C.H. Beck Verlag
- Hohn T.M. (1992) Biosynthesis of sesquiterpenoid toxins. In: Stahl U., Tudzynski P. (eds.) *Molecular biology of filamentous fungi*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 99-109
- Holmes D.S., Quigley M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197
- Hulbert S.H., Iltott T.W., Legg E.J., Lincoln S.E., Lander E.S., Michelmore R.W. (1988) Genetic analysis of the fungus *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* 120: 947-958
- Johnson D.A., Gautsch S.W., Sportsman J.R., Elder J.H. (1984) Improved technique utilization nofat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal Technol* 1: 3-8
- Jones R.N., Rees H. (1982) *B Chromosomes*. London, London
- Kayser T. (1991) Protoplastenfusion sowie elektrophoretische Chromosomentrennung und Genkartierung bei filamentösen Pilzen: *Penicillium janthinellum*, *Absidia glauca* und *Cochliobolus heterostrophus* (Dissertation, Humbolt-Universität zu Berlin)
- Kuc J. (1982) Phytoalexins from the solanaceae. In: Bayley J.A., Mansfield J.W. (eds.) *Phytoalexins*. Glasgow and London, Blackie & Son Ltd., 81-105
- Kuc J., Rush J.S. (1985) Phytoalexins. *Arch Biochem Biophys* 236: 455-472
- Lalande M., Noolandi J., Turmel C., Rousseau J, Slater G.W. (1987) Pulsed-field electrophoresis: application of a computer model to the separation of large DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci* 84: 8011-8015
- Leong S.A., Holden D.W. (1989) Molecular genetic approaches to the study of fungal pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 27: 463-481
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982) *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory
- McCluskey K., Russel B.W., Mills D. (1990) Electrophoretic karyotyping without the need for generating protoplasts. *Curr Genet* 18: 385-386
- Miao V.P., Covert S.F., VanEtten H.D. (1991b) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science* 254: 1773-1776
- Miao V.P.W., Matthews D.E. and VanEtten H.D. (1991a) Identification and chromosomal locations of a family of cytochrome P-450 genes for pisatin detoxification in the fungus *Nectria haematococca*. *Mol Gen Genet* 226: 214-223
- Michelmore R.W., Hulbert S.H. (1987) Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Ann Rev Phytopathol* 25: 383-404
- Miller J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory
- Mills D., McCluskey K. (1990) Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. *Mol Plant-Microbe Interact* 3: 351-357
- Peggs G.F. und Ayres P.G. (1991) *Fungal infection of plants*. Cambridge, Cambridge University Press

- Raeder U., Thompson W., Broda P. (1989) RFLP-based genetic map of *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol Microbiol* 3: 911-918
- Sachs L. (1974) *Angewandte Statistik*. 4. Aufl., Berlin, Springer Verlag
- Schäfer W., Straney D., Ciuffetti L., VanEtten H.D., Yoder O.C. (1989) One enzyme makes a fungal pathogen, but not a saprophyte, virulent on a new host plant. *Science* 246: 247-249
- Scheel D. (1992) Molecular aspects of host defense responses after infection by pathogenic fungi: an overview. In: Stahl U., Tudzynski P. (eds.) *Molecular biology of filamentous fungi*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 125-138
- Schuhmann G.L. (1991) *Plant Diseases: Their Biology and Social Impact*. St. Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society
- Schwarz D.C., Cantor C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75
- Seppänen E. (1982) *Fusariums of the potato in Finland*. IV. Variation of tuber resistance to storage diseases before and after harvesting. *Ann Agric Fenn* 21: 123-130
- Skinner D.Z., Leung H., Leon S.A. (1990) Genetic map of the blast fungus *Magnaporthe grisea*. In: O'Brien S.J. *Genetic maps: Locus maps of complex genomes*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory 3.82-3-83
- Slater G.W., Rousseau J., Noolandi J. (1987) On the stretching of DNA in the reptation theories of gel electrophoresis. *Biopolymers* 26: 863-872
- Southern E.M., Anand R., Brown W.R.A., Fletcher D.S. (1987) A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucl Acids Res* 15: 5925-5943
- Stevens R.R. (1974) *Mycological guidebook*. Seattle, University of Washington Press
- Suzuki D.T., Griffiths A.J.F., Miller J.H., Lewontin R.C. (1989) *An introduction to genetic analysis*. 4th ed., New York, Freeman and Company
- Taylor J. L., Borgmann I., Séguin-Swartz G. (1991) Electrophoretic karyotyping of *Leptosphaeria maculans* differentiates highly virulent from weakly virulent isolates. *Curr Genet* 19: 273-277
- Tzeng T.-H., Lyngholm L.K., Ford C.F., Bronson C.R. (1991) A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Genetics* 130: 81-96
- Valent B., Chumley F.G. (1991) Molecular genetic analysis of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Phytopathol* 29: 443-467
- VanEtten H.D., Matthews D.E., Smith D.A. (1982) Metabolism of phytoalexins. In: Bailey J.A., Mansfield J.W. (eds.) *Phytoalexins*. Glasgow, Blackie & Son, 181-217
- VanEtten H.D., Matthews D.E., Matthews P.S. (1989) Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. *Ann Rev Phytopathol* 27: 143-164
- VanEtten H.D., Pueppke S.G., Kelsey T.C. (1975) 3,6a dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan as a metabolite of pisatin produced by *Fusarium solani f.sp. pisi*. *Phytochemistry* 14: 1103-1105

- Varns J.L., Currier W.W. und Kuc J. (1971a) Suppression of rishitin and phytuberin accumulation and hypersensitive response in potato by compatible races of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 61: 178-181
- Varns J.L., Currier W.W. und Kuc J. (1971b) Specificity of rishitin and phytuberin accumulation by potato. *Phytopathology* 61: 968-971
- Walz M., Kück U. (1990) Polymorphic karyotypes in related *Acremonium* strains. *Curr Genet* 19: 73-76
- Weltring K.M. (1992) Phytoalexins in the relation between plants and their fungal pathogens. In: Stahl U., Tudzynski P. (eds.) *Molecular biology of filamentous fungi*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 111-124
- Weltring K.M., Turgeon B.G., Yoder H.D., VanEtten H.D. (1988) Isolation of a phytoalexin-detoxification gene from the plant pathogenic fungus *Nectria haematococca* by detecting its expression in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 68: 335-344
- Yoder O.C., Valent B., Chumley F. (1986) Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 76: 383-385
- Ziegler A., Geiger K.H., Ragoussis J, Szalay G. (1987) A new electrophoresis apparatus for separating very large DNA molecules. *J Clin Biochem* 25: 578-579
- Zolan M.E., Crittenden J.R., Heyler N.K., Seitz L.C. (1992) Efficient isolation and mapping of *rad* genes of the fungus *Coprinus cinereus* using chromosome-specific libraries. *Nucl Acids Res* 20: 3993-3999

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Diplomarbeit selbst
verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel
verwendet habe.



Lars von Olleschik-Elbheim

Münster, im November 1992