

**Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt
für Land- und Forstwirtschaft
Berlin-Dahlem**



**Charakterisierung und Differenzierung bei
Fusarium Link mittels RAPD und ITS-RFLP**

Von
Olaf Hering

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Mikrobiologie, Berlin-Dahlem

Heft 331

Berlin 1997

*Herausgegeben
von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Berlin-Dahlem*

Parey Buchverlag Berlin
Kurfürstendamm 57, D-10707 Berlin

ISSN 0067-5849

ISBN 3-8263-3165-6

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Hering, Olaf: Charakterisierung und Differenzierung bei *Fusarium Link* mittels RAPD und ITS-RFLP / von Olaf Hering. Hrsg. von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. – Berlin: Parey, [in Komm.], 1997.

(Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem; H. 331)

ISBN 3-8263-3165-6

Dissertation an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, 10.03.1997

Präsident: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Meyer; Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. E. Lindemann

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Bochow, Priv.-Doz. Dr. G. Deml, Dr. H. I. Nirenberg

© Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der Fassung vom 24. Juni 1985 zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

1997 Kommissionsverlag Parey Buchverlag Berlin, Kurfürstendamm 57, 10707 Berlin Printed in Germany by Arno Brynda, Berlin

INHALTSVERZEICHNIS

KURZFASSUNG	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	7
1.1 Die Gattung <i>Fusarium</i> Link.....	7
1.2 Problemstellungen und Ziele.....	14
1.2.1 Sektion <i>Discolor</i>	14
1.2.2 Sektion <i>Eupionnotes</i> – <i>Fusarium tabacinum</i> (van Beyma) W. Gams.....	16
1.2.3 Sektion <i>Elegans</i> – <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	17
1.2.4 Sektion <i>Martiella</i>	18
1.2.5 Methodische Ziele.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Pilz-Isolate.....	20
2.1.1 Sektion <i>Discolor</i>	20
2.1.2 Sektion <i>Eupionnotes</i>	21
2.1.3 Sektion <i>Elegans</i>	22
2.1.4 Sektion <i>Martiella</i>	23
2.2 Vitalisierung und Kultur der Pilzisolat.....	26
2.3 DNA-Extraktion.....	26
2.4 Polymerase Kettenreaktion.....	29
2.4.1 Random Amplified Polymorphic DNA.....	30
2.4.2 Selektive Amplifikation der ITS.....	32
2.5 Restriktionsverdau von ITS1/ITS4 Amplifikaten.....	32
2.6 Agarosegelelektrophorese.....	34
2.6.1 Auftrennung der PCR-Produkte.....	35
2.6.2 Auftrennung der Produkte des Restriktionsverdaus.....	35
2.6.3 Färbung der Agarosegele mit Ethidiumbromid.....	35
2.7 Dokumentation.....	36
2.8 Auswertung.....	36
2.8.1 Random Amplified Polymorphic DNA.....	36
2.8.2 Restriktionsanalysen der ITS-Region.....	37
3 ERGEBNISSE	38
3.1 Methodik.....	38
3.1.1 ITS-RFLP.....	38
3.1.2 RAPD.....	38
3.2 Sektion <i>Discolor</i>	39
3.2.1 ITS-RFLP bei Arten aus der Sektion <i>Discolor</i>	39
3.2.2 RAPD-Ergebnisse bei Arten der Sektion <i>Discolor</i>	41
3.3 Sektion <i>Eupionnotes</i>	44
3.3.1 ITS-RFLP bei <i>F. tabacinum</i> und anderen <i>Fusarium</i> -Arten.....	44
3.3.2 RAPD-Studien bei <i>Fusarium tabacinum</i>	46
3.4 Sektion <i>Elegans</i>	48
3.4.1 ITS-RFLP bei <i>F. oxysporum</i> , <i>F. redolens</i> , <i>F. udum</i> und <i>F. acutatum</i>	48

3.4.2	RAPD-Untersuchungen von <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> -Rassen im Vergleich zu <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> , <i>F. redolens</i> und <i>F. udum</i>	50
3.5	Sektion <i>Martiella</i>	52
3.5.1	ITS-RFLP-Differenzierung von <i>Martiella</i> -Fusarien	52
3.5.2	RAPD-Ergebnisse bei <i>Martiella</i> -Fusarien	55
4	DISKUSSION	62
4.1	Methodische Erfahrungen mit RAPD	62
4.1.1	Einflußparameter der RAPD	62
DNA-Extraktion	62	
Einfluß des Kolonie- bzw. Kulturalters auf die PCR	62	
Reaktionsbedingungen	63	
Proben-DNA	63	
Polymerase	64	
Magnesium-Ionen	64	
Desoxynukleotide	65	
Primer	65	
Denaturierung	66	
Annealing	66	
Extension	67	
Zyklenzahl versus Plateaueffekt	67	
Kontaminationen	67	
4.1.2	Eignung der Primer zur Differenzierung	68
Primerlänge	68	
GC-Gehalt der Primer	68	
Anzahl der Primer zur vergleichenden Charakterisierung bei Pilzen	69	
Primerklassen	69	
4.1.3	Bewertung von RAPD-Banden	69
Banden bei DNA-Nullproben - template unabhängige Banden	69	
Schwache und inkonsistente Banden	70	
Intensitätspolymorphismen	70	
Bevorzugte Amplifikation von Fragmenten	71	
Comigrierende Banden und Validierung	71	
4.2	Differenzierung der untersuchten Fusarien	72
4.2.1	Differenzierung von <i>Discolor</i> -Fusarien	72
4.2.2	Variabilität bei <i>Fusarium tabacinum</i> (<i>Plectosporium tabacinum</i>)	75
4.2.3	Charakterisierung innerhalb der Sektion <i>Elegans</i>	76
Spezieskonzepte von <i>Elegans</i> -Fusarien	76	
<i>Fusarium redolens</i> versus <i>Fusarium oxysporum</i>	77	
Rassendifferenzierung bei <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	78	
4.2.4	RAPD- und ITS-RFLP-Klassifikation von <i>Martiella</i> -Fusarien	81
4.3	Molekulare Techniken zur Differenzierung von Pilzen	96
4.3.1	Nutzung von ITS-RFLP-Analysen zur Artendifferenzierung	96
4.3.2	Eignung der RAPD zur Charakterisierung von Pilzen	98
4.3.3	Methodenvergleich ITS-RFLP und RAPD	102
4.3.4	Der Einsatz molekularer Techniken zur Klassifizierung	102
5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	SUMMARY	107
7	LITERATUR	109
8	SACHREGISTER	131

KURZFASSUNG

Fusarien verursachen Schäden an zahlreichen bedeutsamen Kulturpflanzen. Aufgrund unterschiedlicher Ansichten über die morphologische und phytopathologische Variabilität von Vertretern dieser Gattung existiert eine unterschiedliche Anzahl ausgewiesener Arten und phytopathologischer Formen. Für eine genaue Diagnose des Schaderregers sowie für eine einheitliche, internationale Verständigung ist es jedoch unumgänglich, taxonomische Systeme sowie phytopathologische Einteilungen zu haben und Methoden zu kennen, die einen Erreger eindeutig charakterisieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Techniken 'internal transcribed spacer restriction fragment length polymorphisms' (ITS-RFLP) und 'random amplified polymorphic DNA' (RAPD) auf ihre Eignung zur Charakterisierung und Differenzierung von Isolaten erprobt und zur Lösung taxonomischer und phytopathologischer Problemfälle innerhalb ausgewählter Sektionen der Gattung *Fusarium* eingesetzt.

Beide Techniken erzielen Bandenmuster, die als objektive und von Umgebungsbedingungen unabhängige Merkmale zur Charakterisierung und Identifikation von Isolaten einsetzbar sind. Durch Vergleich von DNA-Merkmalen festgestellte Gruppierungen, korrelieren mit feinen morphologischen Differenzen und erlauben Abgrenzungen. Innerhalb taxonomisch gut bearbeiteter Art- bzw. Artenkomplexe sind beide Methoden in Kombination zur eindeutigen Differenzierung einsetzbar. Die Ergebnisse zeigen aber auch, daß ein generelles, für alle Fusarien gültiges Schema, ab wievielen Bandenunterschieden derzeit beschriebene Gattungen, Arten, Varietäten, spezialisierte Formen oder Rassen abzugrenzen sind, nicht existieren kann. Bei morphologisch und phytopathologisch verhältnismäßig wenig bearbeiteten Pilzgruppen können Bandenmustergruppierungen eine wertvolle Hilfe und Grundlage weiterer Untersuchungen sein.

Die Ergebnisse für ausgewählte Vertreter einiger Sektionen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Innerhalb der Sektion *Discolor* können die Arten *Fusarium sambucinum*, *F. venenatum*, *F. torulosum*, *F. flocciferum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. bactridioides* und *F. sarcocroum* und unterschieden werden. Sektion *Eupionnotes*: *F. tabacinum* zeigt hohe intraspezifische Variabilität in den Bandenmustern, die Überlegungen zu weiteren Unterteilungen dieser Art unterstützen. Sektion *Elegans*: Alle untersuchten spezialisierten Formen von *Fusarium oxysporum* zeigen identische ITS-RFLP-Muster, die von *Fusarium redolens*, *F. udum* und *F. acutatum* eindeutig abzugrenzen sind. Vermutungen über die Conspezifität von *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* und *F. redolens* f. sp. *dianthi* konnten widerlegt werden. Bei sechs untersuchten Rassen von *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* wurden insgesamt vier RAPD-Mustergruppen ermittelt, die den Rassen 1/2/6, 4 und 3/5 sowie einigen duftenden Isolaten entsprechen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Einteilung bestehender spezialisierter Formen und Rassen bei *Fusarium oxysporum* überdacht werden sollte. Entgegen früheren Konzepten zur Sektion *Martiella* können in der vorliegenden Arbeit insgesamt 31 Taxa abgegrenzt werden, die zumeist mit morphologischen oder anderen Merkmalen korrelieren. Weitere bislang unbestimmte Isolate der *Martiella* Sektion zeigen eigenständige ITS-RFLP- und RAPD-Muster, die auf weitere Differenzierungen innerhalb dieser Sektion hinweisen.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Gattung *Fusarium* Link

Fusarium Link (1809) ist eine heterogene und schwierig zu klassifizierende Gattung imperfekter Pilze. Die in ihr zusammengefaßten Arten mit saprophytischer oder parasitischer Lebensweise sind ubiquitär vorkommend oder mehr oder weniger auf bestimmte Lebensräume beschränkt (Wollenweber & Reinking 1935; El-Abyad & Saleh 1973; Booth 1984; Fergani & Khelafi 1990). Sie gehören zu den wichtigsten pilzlichen Schaderregern an Nutzpflanzen und rufen neben Umfallkrankheiten, echten Welken und Blattflecken, auch Fäulen an Wurzel, Stengelbasis und Früchten hervor (Jarvis & Shoemaker 1978; Petrie 1986; Mishra & Rath 1987; Martyn et al. 1989; Elmer 1992; Vilich-Meller 1992; Watanabe et al. 1992; Jiménez et al. 1993; Choi et al. 1994). Ebenso verursachen sie Nachernte- und Lagerschäden an Obst, Gemüse und Hackfrüchten (Alsamarrie et al. 1987; Hentschel 1987; Schiffmann-Nadel et al. 1987; Bedlan 1988; Bryk et al. 1991; Hartill 1991) und treten als Kontaminanten an Lebensmitteln auf (Pitt 1981; Belitz & Grosch 1987; Kunz 1988; Beck et al. 1993; Schwabe et al. 1994). Einige Arten sind an Mensch und Tier pathogen (Savir et al. 1978; Alderman 1981; Morace et al. 1984; Walsh & Pizzo 1989; Bacon et al. 1992; Melcher et al. 1993; Smith et al. 1993; Warnock 1993; Yoshizawa et al. 1994), andere schädigen indirekt durch ihre Mykotoxinproduktion (Joffe & Palti 1974; Mislivec 1981; Ellis 1989; Thrane 1989; Bilgrami 1991; Peng et al. 1992; Pepeljnjak et al. 1992; Creppy 1994; Kim & Lee 1994; Mirocha et al. 1994; Muller et al. 1994; Moss 1995). Daneben sind *Fusarium*-Arten als Materialzerstörer (Guglielminetti et al. 1994) bekannt. Eine gewisse Bedeutung haben Fusarien bei der Biozersetzung von Abfällen (Barz et al. 1976; Anisimov et al. 1988; Gulati & Gaur 1988; Reshetnykov et al. 1988; Kinderlerer 1994; Vassilev et al. 1994; Benka-Coker & Olumagin 1995; Hashem 1995) sowie als Produzenten von Sekundärmetaboliten und Proteinen in der industriellen Mikrobiologie (Thrane 1989; Joshi et al. 1990; Lezinou et al. 1994).

Durch die weite Verbreitung und große ökonomische Bedeutung der Fusarien als Schaderreger ist es für eine sichere Diagnose sowie für eine einheitliche Verständigung unumgänglich, taxonomische Systeme sowie phytopathologische Einteilungen zu haben und Methoden zu kennen, die einen Erreger eindeutig charakterisieren.

Taxonomische Differenzierungen in Arten, Varietäten und Formen erfolgen bei *Fusarium* gemäß dem Internationalen Code der botanischen Nomenklatur über morphologische Merkmale, in erster Linie nach der Gestalt und Größe der Luftmyzelkonidien sowie der Form konidiogener Zellen. Früher wurden dazu auch Merkmale wie Stromafarbe, das Auftreten von Sklerotien und die Septenzahl der Makrokonidien herangezogen (Wollenweber & Reinking 1935; Booth 1971; Gerlach & Nirenberg 1982; Nelson & Cassini 1983). Erstmals monographisch wurde die Gattung von Wollenweber & Reinking (1935) bearbeitet. Dabei wurden 16 Sektionen mit insgesamt 65 Arten, 55 Varietäten und 22 Formen unterschieden.

Als nachteilig erwies sich bei der Differenzierung von Fusarien die starke Variationsbreite morphologischer Merkmale und von Kulturcharakteristiken (Burnett 1984; Nelson 1990), die auf nicht standardisierte Kulturbedingungen und in Kultur degenerierte Stämme zurückzuführen ist. Diese Variation führte zu unterschiedlichen Bewertungsmaßstäben morphologischer Kriterien mit der Folge, daß verschiedene, taxonomische Systeme mit unterschiedlichen Zahlen ausgewiesener Taxa bei *Fusarium* beschrieben wurden (siehe Abb. 1), die teilweise nebeneinander verwendet werden.

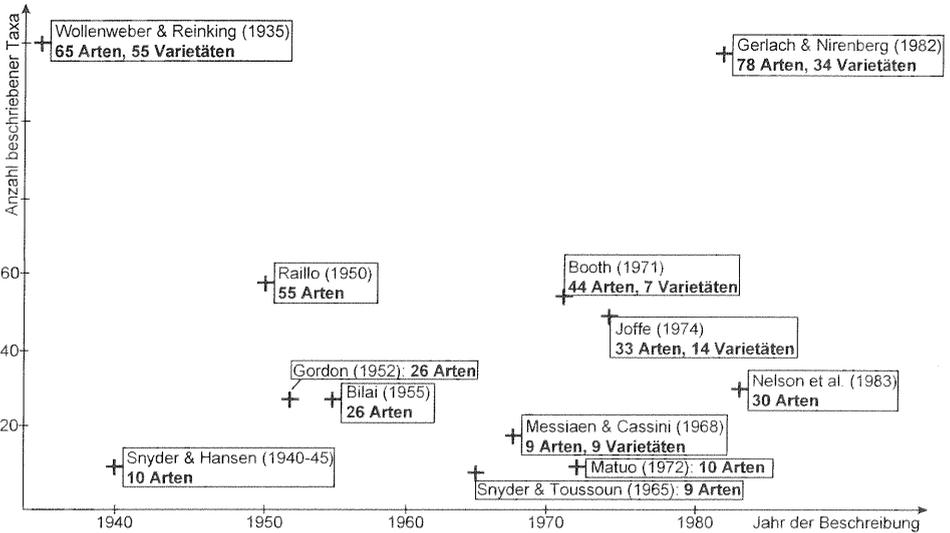


Abb. 1: Schematische Darstellung verschiedener taxonomischer Systeme bei *Fusarium*

Weitere morphologisch nicht differenzierbare, intraspezifische Unterteilungen unterhalb der Art-, Varietät- und Formebene sind bei einigen Fusarien durch die phytopathologischen Kategorien spezialisierte Form und Rasse gekennzeichnet. Nach Aust et al. (1991) sind spezialisierte Formen als „durch unterschiedliches, genetisch fixiertes Wirtspflanzenspektrum differenzierte Formen innerhalb einer Parasitenart (insbesondere bei phytopathogenen Pilzen) ...“ und Rassen „durch ihre Fähigkeit, nur bestimmte Sorten einer Wirtspflanzenart befallen zu können“ definiert. Diese phytopathologisch wichtigen, auf Interaktion zwischen Pathogen und Wirt beruhenden, Zuordnungen werden über Pathogenitätstests an Differentialwirten ermittelt. Von Nachteil ist bei solchen Testungen, daß sie in der Durchführung aufwendig und ihre Ergebnisse stark von Umgebungsbedingungen und der verwendeten Infektionsmethode abhängig sind (Coddington et al. 1987; Manicom et al. 1990b). Zudem ist die Zahl der zu untersuchenden Isolate versuchsstechnisch begrenzt und zur Unterscheidung benötigte Differentialsorten sind teilweise schwierig oder nicht mehr zu beschaffen.

Die Verwendung unterschiedlicher taxonomischer Systeme sowie phytopathologischer Einteilungen und die damit eventuell verbundene unterschiedliche Bezeichnung desselben Erregers erschweren die Nachvollziehbarkeit, die Bewertung wie auch den Vergleich wissenschaftlicher Arbeiten. Eine nicht einheitliche Nutzung taxonomischer und phytopathologischer Kategorien erschwert klare Abgrenzungen. So definierten Snyder und Hansen (1941) bei *Fusarium solani* verschiedene Formen über ihre Pathogenität an Wirtspflanzenarten, also im Sinne spezialisierter Formen, jedoch nicht nach dem für Formen vorgesehenen morphologischen Kriterien. Rassen bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* wurden nicht definitionsgemäß über ihre Pathogenität an verschiedenen Baumwollsorten, sondern über ihre Pathogenität an Baumwollarten und anderen Gattungen (!), wie *Nicotiana*, *Abelmoschus* und *Lupinus*, definiert. Diesem Wirtspflanzenpektrum zufolge hätten weitere spezialisierte Formen ausgewiesen werden müssen.

Die Kenntnis weiterer intraspezifischer, phytopathologisch nicht kategorisierbarer Variabilität, kann Hinweise geben, in welchem Anpassungs- oder Spezialisierungsstadium sich ein Organismus befindet. Eine hohe Variabilität kann als Indiz für die Entstehung potentieller pathogener Formen gewertet werden (Bochow 1996, mündl. Mitteilung). Auch zur Entwicklung von Resistenzzüchtungsstrategien (Schilling 1994) ist es grundlegend wichtig, die Variabilität eines Erregers oder von Erregergruppen zu kennen.

Um die genannten, morphologisch, phytopathologisch sowie taxonomisch bedingten Einschränkungen bei der Charakterisierung von Isolaten zu umgehen und weitere intraspezifische Variabilitäten festzustellen, wurden verschiedene physiologische, biochemische und molekularbiologische Methoden auf ihre dahingehende Eignung erprobt.

Untersuchungen der vegetativen Kompatibilität von Isolaten zueinander können zu Populationsstudien eingesetzt werden, eignen sich jedoch nicht zu einer Charakterisierung auf Artebene (Leslie 1993; Leslie 1996). Vegetative Kompatibilitätsgruppen (VCGs) sollen mit bestehenden Rasseneinteilungen bei einigen Fusarien korrelieren (Puhalla 1985; Bosland & Williams 1987; Fergani & Khelafi 1990; Correll 1991; Elias et al. 1991; Elmer 1991; Leslie 1991; Desjardins & Nelson 1995). Die Bestimmung von VCGs ist allerdings aufwendig und nicht von allen Isolaten können die benötigten auxotrophen Mutanten gewonnen werden. Aber auch nach erfolgreicher Bestimmung schränken weitere Ausnahmen die Verwendung als praktikables Differenzierungskriterium ein. So können Isolate zweier Rassen der gleichen Kompatibilitätsgruppe angehören, wie auch Isolate derselben Rasse in zwei verschiedenen Kompatibilitätsgruppen vertreten sein können (Correll et al. 1985; Manicom et al. 1990b; Whitehead et al. 1992).

Davon abzugrenzen sind Untersuchungen der sexuellen Kreuzbarkeit verschiedener Isolate untereinander. Bei erfolgreicher Kreuzung durch die Bildung der Hauptfruchtform können Isolate einer Art eindeutig charakterisiert und identifiziert werden (Matuo & Snyder 1973; Nirenberg 1976). Nicht zu identifizieren sind in Kultur degenerierte Stämme, denen die Kreuzungsfähigkeit verlorengegangen ist. Eine weitere Einschränkung der Nutzung dieses Merkmals liegt in der bei vielen Fusarien fehlenden Hauptfruchtform.

Biochemische Differenzierungsmethoden, wie die Untersuchung von löslichen Proteinen (Glynn & Reid 1969), Isoenzymen (Reddy & Stahmann 1972; Scala et al. 1981; Bosland & Williams 1987; Rataj-Guranowska & Wolko 1991), Primär- oder Sekundärmetaboliten (Marasas et al. 1984; Joffe 1986; Thrane 1986; Wasfy et al. 1987), Zellfettsäuren (Hering et al. 1992d; Hering 1994) und serologischer Ähnlichkeiten (Madhosingh 1964; Morton & Dukas 1966; Kalyanasundaram et al. 1967; Kalyanasundaram & Charudattan 1969; Kaiser & Gupta 1976; Hornok 1980; Marziano et al. 1981; Iannelli et al. 1983; Rataj-Guranowska et al. 1984; Rataj-Guranowska & Wolko 1991) liefern begrenzt einsetzbare Kriterien zur Unterscheidung auf Art- und Varietätenebene oder von phytopathologischen Zuordnungen bei *Fusarium*. Diese von der Genexpression abhängigen Merkmale haben den Nachteil, daß ihre Ergebnisse stark von physiologischen Umständen und Kulturbedingungen abhängig sind. Ihre Verwendbarkeit zur Differenzierung ist daher und durch die begrenzte Anzahl verfügbarer Merkmale limitiert.

Einen Ausweg bietet die direkte Verwendung der genetischen Information der DNA, die von äußerlichen Bedingungen unbeeinflusst ist (Terachi 1993). Molekulare Techniken werden daher zunehmend zur Charakterisierung, Identifikation und Klassifikation von Pilzen eingesetzt (Manicom et al. 1990a; Meyer et al. 1991; Bachmann 1994; Wyss 1996). Frühe Untersuchungen physikalischer Kenndaten von Nukleinsäuren, wie GC-Gehalt (Szecsi & Dobrovolszky 1985a), DNA Reassoziaton (Szecsi & Dobrovolszky 1985b; Kuninaga & Yokosawa 1989) oder der Gehalt an repetitiven DNA-Sequenzen (Szecsi 1981) liefern nur sehr grobe Anhaltspunkte über verwandtschaftliche Zusammenhänge und sind als alleiniges Merkmal zur Differenzierung innerhalb der Gattung nicht verwendbar. Auflösendere Verfahren zur Bestimmung der genetischen Diversität zeigen methodisch aufwendige genetische Fingerprint- und RFLP-Untersuchungen (Cooper et al. 1988; Manicom et al. 1990b; Kim et al. 1991; Correll et al. 1992). Differenzierungen bis hin zur Ebene von Rassen sollen darüber möglich sein (Coddington et al. 1987; Kistler et al. 1987; Kistler et al. 1991; Whitehead et al. 1992; Bodker et al. 1993; Fernandez et al. 1994; Mes et al. 1994). Sequenzuntersuchungen ribosomaler DNA-Bereiche erlauben Differenzierungen auf Artebene bis zur darauf basierenden Ausweisung neuer sogenannter phylogenetischer Spezies (O'Donnell et al. 1993; Sherriff et al. 1994).

Aufgrund ihrer methodischen Einfachheit haben Techniken, die auf der *in vitro*-Vervielfältigung von Nukleinsäurefragmenten definierter Länge und bekannter Sequenz durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basieren (Saiki et al. 1985; Mullis et al. 1986; Mullis & Faloona 1987; Saiki et al. 1988; Mullis 1990; Saiki 1990), in den letzten Jahren große Bedeutung in der biologischen und medizinischen Forschung erlangt (Erllich 1989; Bär & Hummel 1991; Hummel 1992; Rolfs et al. 1992).

Das Reaktionsprinzip ist einfach und entspricht dem der Replikation der DNA in der Zelle. Nukleinsäuren mit der zu amplifizierenden Sequenz werden dabei mit zwei als Primer bezeichneten Oligonukleotiden enzymatisch zur Reaktion gebracht (Abb. 2). Die unterschiedlichen Primer flankieren dabei das zu amplifizierende Fragment. Sequenzinformationen zumindest beider Endbereiche des zu vervielfältigenden Fragmentes müssen bekannt sein, um die in 5'-3'-Richtung zu den beiden DNA-Einzelsträngen

komplementären Primer synthetisieren zu können. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen hybridisieren die Primer an die Matrizen und dienen der Polymerase als Startpunkt für die Synthese des fehlenden Einzelstranges (Abb. 2-①). Nach der Polymerisation werden die neu gebildeten Doppelstränge erhitzt und dadurch erneut in Einzelstränge zerlegt. Der synthetisierte Tochterstrang enthält die komplementäre Sequenz des zweiten Primers, so daß dieser dort binden kann (Abb. 2-②). Neben anderen linear reproduzierten Fragmenten, werden ab dem dritten Schritt erstmals die gewünschten DNA-Stücke amplifiziert (Abb. 2-③). Bei mehrfacher Wiederholung der als Zyklus bezeichneten Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Primer-Annealing und DNA-Extension kommt es ab dem vierten Zyklus zur eigentlichen Kettenreaktion mit der exponentiellen Anreicherung der Zielsequenz. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung ist die Zielsequenz als Bande nachweisbar, während die anderen gebildeten Fragmente aufgrund ihrer linearen Vervielfältigung nicht nachweisbar sind.

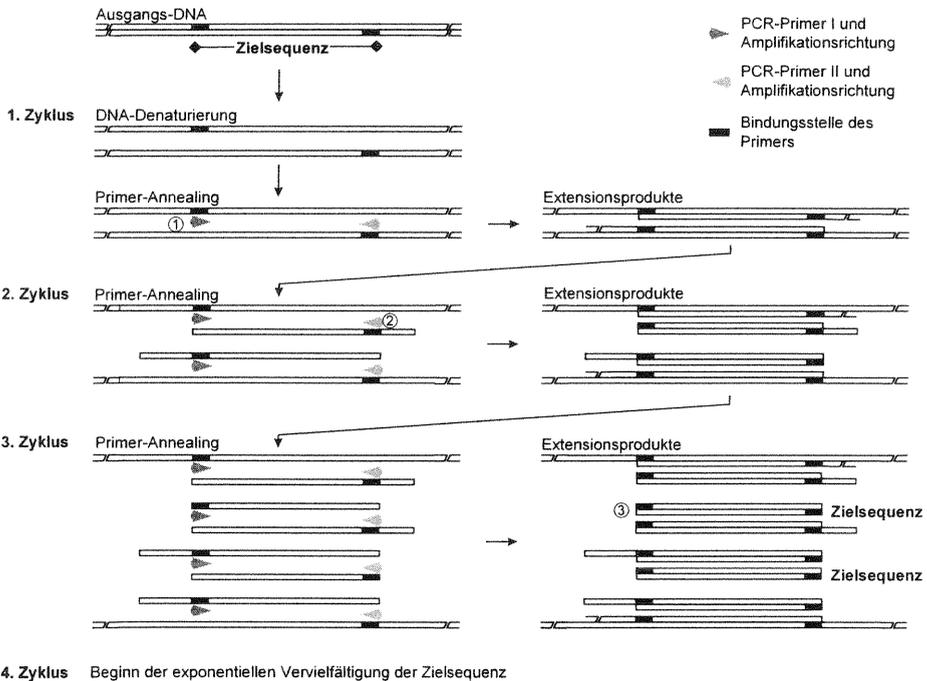


Abb. 2: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die 'random amplified polymorphic DNA' (RAPD) verwendet im Gegensatz zur vorher beschriebenen Standard-PCR nur einen einzelnen relativ kurzen Primer mit willkürlich gewählter Sequenz zur Amplifikation (Williams et al. 1990). Sequenzinformationen über die zu untersuchende DNA müssen hierzu nicht bekannt sein. Während der PCR binden

die Primer an allen kompatiblen Bereichen der einzelsträngigen DNA. Zur Amplifikation von Fragmenten kommt es, wenn sich jeweils eine Primerbindungsstelle in einem Abstand von etwa 500-2.500 Basenpaaren (Williams et al. 1993) auf beiden komplementären Einzelsträngen in 3'-5'-Richtung befindet. Primerabhängig werden zumeist mehrere Fragmente synthetisiert, die als Bandenmuster elektrophoretisch nachweisbar sind (siehe Abb. 3). Die erzielten Banden können als genetische Marker verwendet werden (Rafalski & Tingey 1993; Bachmann 1994) und DNA unterschiedlicher Herkünfte typisieren (Andersen & Fairbanks 1990; DuTeau & Leslie 1991; Nazar et al. 1991).

Mit geringen methodischen Unterschieden wird der Einsatz eines einzelnen Primers zur DNA-Vervielfältigung auch als 'arbitrary primed PCR' (Welsh & McClelland 1990; Welsh et al. 1991), 'DNA amplification fingerprinting', (Caetano-Anollés et al. 1991a, b; Zilberstein et al. 1993), PCR-Fingerprinting (Bostock et al. 1993; Lieckfeldt et al. 1993; Schönian et al. 1993), 'amplification fragment length polymorphism' (Bassam et al. 1992) oder 'universally primed PCR' (Bulat & Mironenko 1993) bezeichnet.

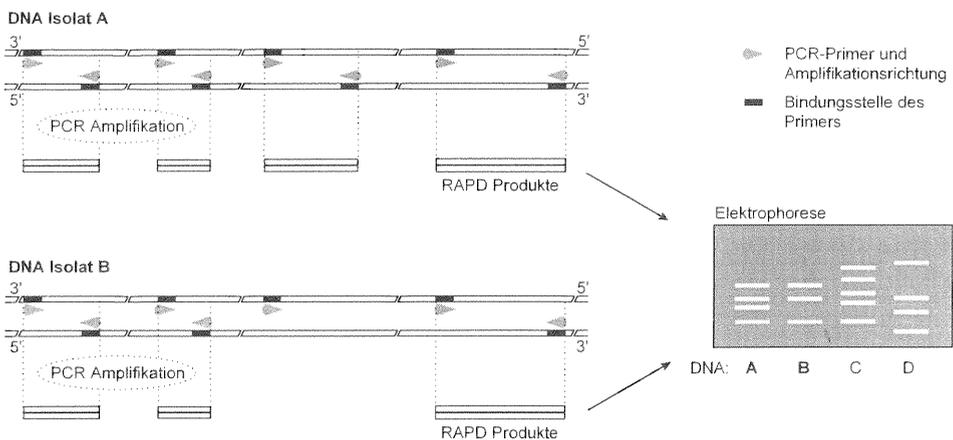


Abb. 3: Schema der RAPD - Entstehung von Polymorphismen bei unterschiedlichen DNA-Herkünften

Der Einsatz von RAPD-Untersuchungen als diagnostisches Werkzeug zur Feststellung genetischer Differenzen hat sich in letzter Zeit zu einer Standardmethode für Routine-Analysen entwickelt (Martin et al. 1994). RAPD-Analysen erfordern keinen allzu großen technischen und personellen Aufwand, Ergebnisse werden schnell erzielt und große Probenmengen können in vergleichbar kurzer Zeit untersucht werden (Andersen & Fairbanks 1990; Williams et al. 1990; Rafalski et al. 1991; Hedrick 1992). Zudem werden für die Analysen nur geringste DNA-Mengen benötigt (Caetano-Anollés et al. 1991a, b), die relativ einfach aus Pilzmaterial zu extrahieren sind (Lee & Taylor 1990; Vaerenbergh

et al. 1995). Darüber hinaus können zu Vergleichszwecken zahlreiche Marker durch unterschiedliche Primerzahlen generiert werden (Crawford et al. 1993). RAPD-Marker gelten als sensitiv und zuverlässig (Amoah et al. 1996) und haben nach Martin-Kearley et al. (1994) den Vorteil, Unterscheidungen bei nicht mit anderen Methoden differenzierbaren Organismen zu treffen.

Als Ersatz oder in Ergänzung zu aufwendigeren klassischen Verfahren wie RFLP- oder DNA-Fingerprint-Techniken zeigt die RAPD ein bedeutendes Potential zur Feststellung genetischer Differenzen, welche mit Taxa, spezialisierten Formen und Rassen sowie Populationen von pflanzenpathogenen Pilzen (Crowhurst et al. 1991; Wöstemeyer et al. 1991; Hadrys et al. 1992; Hoelzel & Green 1992; Hering 1993), Nematoden (Caswell-Chen et al. 1992; Cenis 1993; Castagnonesereno et al. 1994; Chacón et al. 1994; Folkertsma et al. 1994) oder Bakterien (Dooley et al. 1993; Ralph et al. 1993; Matthews & Oliver 1994; Black et al. 1995) korrelieren können. Ebenso ist bei höheren Pflanzen, Tieren und Insekten durch Korrelationen zu bestehenden Taxa ihre Eignung zur Klassifizierung nachgewiesen (Ballinger-Crabtree et al. 1992; Black et al. 1992; Chapco et al. 1992; Demeké et al. 1992; Halward et al. 1992; Kamphampati et al. 1992; Kazan et al. 1992; Dinesh et al. 1993; Gonzalez & Ferrer 1993; Landry et al. 1993; Puterka et al. 1993; Bachmann 1994; Bardakci & Skibinski 1994). Mit Einschränkungen können RAPD Marker auch zu phylogenetischen Untersuchungen bei Pilzen (Fischer et al. 1995; Laroche et al. 1995; Voigt et al. 1995; Shi et al. 1996) oder Pflanzen (Kazan et al. 1992; Margalé et al. 1994) herangezogen werden.

Während RAPD-Muster zur Differenzierung von Isolaten auf der Ebene derzeit ausgewiesener spezialisierter Formen und bei einigen Rassen genutzt werden können (Hering 1993; Zilberstein et al. 1993), erfordert eine Charakterisierung auf Art- und Varietätenebene, die Untersuchung konservativer DNA Bereiche (White et al. 1990; Bruns et al. 1991; Hibbet 1992; Kohn 1992). Gene, welche ribosomale RNA oder mitochondriale RNA kodieren, erfüllen diesen Anspruch, da sie im Laufe der Evolution wesentlich geringeren Veränderungen unterworfen waren als andere DNA-Bereiche (Taylor 1986; Jorgensen & Cluster 1989; Kreitman 1991). Die ribosomale DNA ist in verschieden variable Bereiche gegliedert, wobei die kodierenden Regionen als gering variabel gelten (Olsen et al. 1986; Medlin et al. 1988; Jorgensen & Cluster 1989; Hillis & Dixon 1991; Neuveglise et al. 1994). Ihre Untersuchung durch Restriktionsverdau (Chase et al. 1991) oder Sequenzanalysen (Förster et al. 1990) ist daher zum Studium unterschiedlich weit verwandter Arten (Medlin et al. 1988; Taylor & Natvig 1989; Hillis & Dixon 1991; Gargas & Taylor 1992) oder zum Aufbau phylogenetischer Stammbäume geeignet (O'Donnell 1992; Rehner & Samuels 1994; Sherriff et al. 1994; Spatafora & Blackwell 1994; O'Donnell & Gray 1995). Die ITS-Regionen weisen dagegen eine höhere Variabilität auf und eignen sich deshalb insbesondere zur Charakterisierung von näher verwandten Arten (Chen et al. 1992; Gardes & Bruns 1992; O'Donnell 1993).

Eine Methode, die 'amplified ribosomal DNA restriction analysis' - ARDRA - (Jayarao et al. 1991; Vaneechoutte et al. 1992; Vaneechoutte et al. 1993; Vaneechoutte et al. 1994) nutzt die PCR zur Amplifikation der ribosomalen DNA mittels selektiver Standardpri-

mer (White et al. 1990) und anschließendem Verdau mit häufig schneidenden Restriktionsenzymen. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung erhält man Fragmentmuster, die zur Identifikation und Klassifikation von Bakterien (Vanechoutte et al. 1992; Vanechoutte et al. 1993; Vanechoutte et al. 1994) herangezogen werden können.

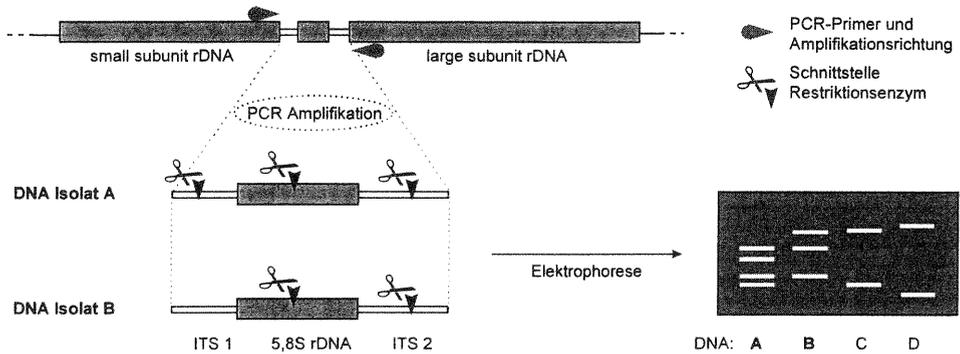


Abb. 4: Schema der ITS-RFLP - Entstehung von Polymorphismen bei unterschiedlichen DNA-Herkünften

Die ITS-RFLP (siehe Abb. 4) ist als methodische Variante anzusehen, wobei nur die Informationen der variablen ITS-Bereiche einschließlich der 5,8S rDNA als Differenzierungskriterien verwendet werden (Harlton et al. 1995; Hering et al. 1995b; Gardes & Bruns 1996). Über Unterschiede in den Bandenmustern konnte eine erfolgreiche Differenzierung vorzugsweise auf Art- und Varietätenebene bei *Pseudocercospora* (Hering et al. 1995c) sowie bei *Pythium* (Chen 1992; Chen et al. 1992), *Tuber* (Henrion et al. 1994) oder *Trichoderma* (Meyer 1991) demonstriert werden.

1.2 Problemstellungen und Ziele

1.2.1 Sektion *Discolor*

Fusarium sambucinum Fuckel sensu lato kommt in temperierten oder subtropischen Zonen in Böden und auf zahlreichen Pflanzen vor. Er verursacht unter anderem eine wirtschaftlich wichtige Trockenfäule an Kartoffelknollen (Vrany et al. 1989; Bedin & Tivoli 1990; Rotkiewicz et al. 1993) und ist darüber hinaus als Mykotoxinproduzent bekannt (Desjardins & Beremand 1987; Abbas et al. 1991; Beremand et al. 1991; Kim & Lee 1994; Altomare et al. 1995).

Unterschiedliche Ansichten existieren zur Taxonomie von *Fusarium sambucinum* sensu lato (siehe Tab. 1): Wollenweber & Reinking (1935) unterschieden *F. sambucinum* Fuckel, *F. sambucinum* Fuckel var. *minus* Wollenw. sowie fünf weiteren Formen, wovon vier

ausschließlich nach Farbunterschieden der Kultur differenziert wurden. *Fusarium trichothecioides* erkannten sie als eigene Art an. Booth (1971) unterschied die Varietäten *F. sambucinum* var. *sambucinum* und *F. sambucinum* var. *coeruleum* sowie die Arten *F. sulphureum* Schlecht und *F. trichothecioides*. Nach seiner Auffassung waren die Kulturen auf Kartoffel-Saccharose-Agar von *F. sambucinum* rot, von *F. sulphureum* gelblich und die von *F. trichothecioides* rosa gefärbt. *Fusarium sarcochroum* hält er für identisch mit *F. sambucinum* und *F. bactridioides* identisch zu *F. trichothecioides*.

Tab. 1: Konzepte von *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato (nach Nirenberg, 1995)

Wollenweber & Reinking (1935)	Booth (1971)	Gerlach & Nirenberg (1982)	Nelson et al. (1983)	Nirenberg (1995)
<i>F. sambucinum</i> Fuckel	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. sambucinum</i> (all red strains)!	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. sambucinum</i>
<i>F. sambucinum</i> f. 1 Wollenw. = <i>F. sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i> Wollenw. = <i>F. torulosum</i> Berk. et Curt. ? <i>F. culmorum</i> (W.G. Sm.) Sacc. var. <i>cerealis</i> (Cook) Wollenw. pr. p.	! <i>F. sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i>	! <i>F. sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i>	<i>F. sambucinum</i> ? <i>F. culmorum</i>	<i>F. torulosum</i> (Berk. et Curt.) Nirenberg comb. nov. <i>F. venenatum</i> Nirenberg
<i>F. sambucinum</i> f. 2 Wollenw.	<i>F. sambucinum</i> var. <i>coeruleum</i> !	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. sambucinum</i>
<i>F. sambucinum</i> f. 4 Wollenw.	?	<i>F. sambucinum</i> !	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. torulosum</i>
<i>F. sambucinum</i> f. 5 Wollenw.	?	<i>F. sambucinum</i> !	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. torulosum</i>
<i>F. sambucinum</i> f. 6 Wollenw.	<i>F. sulphureum</i>	<i>F. sulphureum</i>	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. sambucinum</i>
<i>F. sambucinum</i> var. <i>minus</i> Wollenw.	<i>F. sambucinum</i>	? <i>F. sambucinum</i>	<i>F. sambucinum</i>	? <i>F. sambucinum</i>
<i>F. trichothecioides</i> Wollenw.	<i>F. trichothecioides</i>	? <i>F. sulphureum</i>	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. sambucinum</i>
<i>F. bactridioides</i> Wollenw.	<i>F. trichothecioides</i>	<i>F. bactridioides</i> ?	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. bactridioides</i> ?
<i>F. sarcochroum</i> (Desm.) Sacc.	<i>F. sambucinum</i>	<i>F. sarcochroum</i>	?	<i>F. sarcochroum</i> ?

? vor dem Taxon - Autor ist sich der Synonymität nicht sicher

! vor dem Taxon - Taxon korrespondiert nicht mit der Originalbeschreibung

! nach dem Taxon - Autor machte Fehler bei der Stellung des Taxons in seinem Konzept synonym zu dem Konzept von Wollenweber & Reinking (1935)

? nach dem Taxon - Konzept zweifelhaft

Gerlach & Nirenberg (1982) betrachten *Fusarium trichothecioides* synonym zu *F. sulphureum* und akzeptierten wie Booth (1971) beide Varietäten von *F. sambucinum*. Sie sehen *F. bactridioides* und *F. sarcochroum* als eigenständige Arten an. Nelson & Cassini (1983) vereinigen *F. bactridioides*, *F. trichothecioides*, *F. sulphureum* und beide Varietäten von *F. sambucinum* zu einer Art; *Fusarium sarcochroum* bleibt in ihrem Konzept unerwähnt. Neuere Untersuchungen morphologischer Merkmale bei *F. sambucinum* sensu lato von Nirenberg (1995c) unterscheiden die drei Arten *F. sambucinum*, *F. torulosum* (Berk. et Curt.) Nirenberg und *F. venenatum* Nirenberg. Ob *Fusarium bactridioides* und/oder *F. sarcochroum* als eigenständige Arten anzusehen sind konnte anhand morphologischer Kriterien nicht eindeutig geklärt werden.

Mittels RAPD- und Restriktionsuntersuchungen der amplifizierten ITS-Regionen sollen die vorliegenden Spezieskonzepte mit molekularbiologischen Methoden diskutiert werden. Geeignet ist diese Gruppe insbesondere dadurch, daß verschiedene Arbeitsgruppen die gleichen Isolate mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen und Techniken innerhalb des Europäischen *Fusarium sambucinum* Projektes (Nirenberg 1995a) untersucht haben. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse verschiedener Methoden auf der Basis von Einzelisolaten ist dadurch möglich. Von besonderem Interesse war auch inwieweit sich einzelne nicht kreuzbare Isolate (Desjardins & Nelson 1995), Isolate unterschiedlicher Mykotoxinproduktion (Schmidt et al. 1995; Thrane & Hansen 1995) mit RAPD und ITS-RFLP unterscheiden lassen. Ebenso interessiert die Fragestellung inwieweit *F. bactridioides* und *F. sarcochroum* als eigenständige Arten anzusehen sind.

1.2.2 Sektion *Eupionnotes* - *Fusarium tabacinum* (van Beyma) W. Gams

Fusarium tabacinum (Beyma) W. Gams (Teleomorph: *Plectosphaerella cucumerina* (Lindfors) W. Gams) ist weitverbreitet und ist auf verschiedenen Substraten beheimatet (Seifert 1996). Der Pilz wird häufig aus landwirtschaftlich genutzten Böden isoliert, kommt aber auch in Sanddünen oder salzhaltigen Stränden vor (Gams & Gerlagh 1968; Gams et al. 1969; Hampel 1970; Domsch et al. 1980). Pathogene Stämme verursachen bei höheren Temperaturen und höherer Feuchtigkeit Sämmlingskrankheiten insbesondere an *Nicotiana tabacum* (Slagg 1921) und *Sinapis arvensis* (Hampel 1970). Wurzelfäulen, Stengelverbräunungen oder Blattflecke wurden an *Viola-Wittrockiana*-Hybr. (van Eek 1937), *Helianthus annuus* (Zazzerini & Tosi 1987), *Ocimum basilicum* (Matta 1978) sowie an *Lycopersicon esculentum* (Pascoe et al. 1984; El-Gindy 1991) und einigen anderen Pflanzen (Klebhahn 1930; Soran & Oezel 1985; Mygind 1986) beobachtet. Außerdem soll er Kiemenkrankungen bei Langusten verursachen (Alderman & Polglase 1985). Kreuzinfektionsversuche einzelner Isolate von Kartoffeln, Gurken, Weizen und Raps blieben erfolglos (Domsch & Gams 1968; Gams & Gerlagh 1968).

Fusarium tabacinum unterscheidet sich von anderen Fusarien durch seine kleinen Konidien ((5,0 -) 8,2 - 13,5 (- 15,0) µm lang, (2,0 -) 2,2 - 3,0 (- 4,0) µm breit; Gams & Gerlagh 1968) mit fehlender charakteristischer Makrokonidien-Fußzelle, in seiner Tendenz keine Sporodochien auszubilden und durch seine Phialiden (Pascoe et al. 1984). *Fusarium tabacinum* gilt als morphologisch und in seinen Kulturcharakteristiken als stark variabel (Gams & Gerlagh 1968; Pascoe et al. 1984).

Der Anamorph wurde erstmals 1933 als *Cephalosporium tabacinum* Beyma beschrieben (van Beyma thoe Kingma 1933). Später wurde er aufgrund des allgemeinen Habitus als *Fusarium tabacinum* (Beyma) W. Gams in die Sektion *Eupionnotes* neben *F. merismoides* Corda gestellt, wenngleich andere Merkmale für die Beschreibung einer neuen Gattung sprachen (Gams & Gerlagh 1968). Seit kurzem ist folgerichtig *F. tabacinum* als *Plectosporium tabacinum* (van Beyma) M. E. Palm, W. Gams et Nirenberg beschrieben (Palm et al. 1995). Aufgrund der allgemeinen Verständlichkeit wird in der vorliegenden Arbeit der alte Namen *F. tabacinum* beibehalten.

Durch seine morphologische und phytopathologische Variabilität ist *F. tabacinum* für Versuche zur molekularen Charakterisierung besonders prädestiniert. RAPD- und ITS-RFLP-Untersuchungen sollen klären, ob sich diese Variabilität in den Bandenmustern widerspiegelt oder die Ergebnisse die Einheitlichkeit der Art bestätigen. Weiterhin sollen eventuell bestehende Korrelationen der Bandenmuster zu einzelnen Wirten oder zu geographischen Herkünften ermittelt werden. Die Untersuchungen der ITS-Region sollen durch Vergleich mit anderen *Fusarium*-Arten Hinweise liefern, ob die Ausgliederung in eine eigene Gattung (Palm et al. 1995) auch auf molekularer Ebene zu rechtfertigen ist.

1.2.3 Sektion *Elegans* – *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Das differenzierte Spezieskonzept von Wollenweber & Reinking (1935) für die Sektion *Elegans* weist die drei Subsektionen *Orthocera*, *Constrictum* und *Oxysporum* mit insgesamt zehn Arten, 18 Varietäten und 10 Formen auf, wobei sie eine ausgesprochene Wirtsspezifität bei den meisten Varietäten und Formen feststellten. Auf dieser Wirtsspezialisierung gründet das Konzept von Snyder & Hansen (1940), welches nur *F. oxysporum* als Art anerkennt, darüber hinaus 25 Formen im Sinne von spezialisierten Formen ausweist. Heute gilt dieses Konzept, erweitert um zahlreiche weitere spezialisierte Formen, als allgemein anerkannt (Booth 1971).

Unterschiedlich wird jedoch die Stellung von *Fusarium redolens* und *F. udum* Berk. und ihr Verhältnis zu *F. oxysporum* angesehen. Gerlach & Nirenberg (1982) grenzen beide als eigenständige Arten innerhalb der Sektion ab, während Booth (1971) *F. redolens* als Varietät von *F. oxysporum* ansieht und *F. udum* als Art der Sektion *Lateritium* ansieht. Wollenweber & Reinking (1935) stellten *F. udum* synonym zu *F. merismoides* in die Sektion *Eupionnotes* und Snyder & Hansen (1940) betrachteten die Art als *F. oxysporum* forma *udum*. Nelson & Cassini (1983) sind sich über Stellung von *F. udum* nicht sicher, sehen aber *F. redolens* conspezifisch zu *F. oxysporum*. Auch kamen Untersuchungen von Baayen & Gams (1988) zu dem Schluß, daß *F. redolens* f. sp. *dianthi* Gerlach und *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prillieux & Delacroix) Snyder & Hans. einen einzigen morphologisch variablen Komplex bilden und beide anhand ihrer Pathogenität und der Ausprägung von Symptomen nicht zu unterscheiden sind. Daher sei eine Unterscheidung in zwei Arten nicht gerechtfertigt. Später folgende Untersuchungen der vegetativen Kompatibilität zueinander ließen diese Frage ebenfalls offen (Baayen & Kleijn 1989).

Zur Differenzierung auf der phytopathologisch spezialisierten Ebene von Rassen wurde *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* als Beispiel ausgewählt, da andere methodische Untersuchungen mit den gleichen Isolaten vorliegen (Hering et al. 1992a, c, d; Ibrahim & Nirenberg 1993; Nirenberg et al. 1994b, 1996). Der pilzliche Erreger der Baumwollwelke ist in fast allen Baumwollanbaugebieten der Welt verbreitet (Ebbels 1975; Ebbels 1976; Snyder & Smith 1981) und verursacht teilweise hohe Ertragseinbußen (Chester 1946; Delgado & Agurto 1984). In der Literatur werden acht Rassen unterschieden, die über ihre Pathogenität auch an Nichtbaumwollwirten ermittelt wurden (Armstrong & Armstrong 1960, 1969, 1978; Chen et al. 1985). Zwischen den Rassen 1, 2 und 6

(Armstrong & Armstrong 1958, 1978) sowie zwischen den Rassen 3 und 5 sollen Ähnlichkeiten (Ibrahim 1966) bestehen. Infektionsversuche an Baumwolle von Ibrahim & Nirenberg (1993) und Nirenberg et al. (1996) bestätigen dies mit für die Rassen 1 und 2, sowie für die Rassen 3 und 5 identischen Symptombildern. Fettsäurespektren, wie sie zur Identifikation von Bakterien routinemäßig eingesetzt werden, unterscheiden drei Gruppen: Isolate der Rassen 1, 2 und 6, Isolate der Rassen 3 und 5 sowie Isolate der Rasse 4 (Hering 1993). Zu den Rassen 7 und 8 liegen keine weiteren Informationen vor.

ITS-RFLP-Untersuchungen mit verschiedenen Vertretern der von Wollenweber & Reinking (1935) beschriebenen Subsektionen, heutigen spezialisierten Formen von *Fusarium oxysporum* sowie *F. redolens*, *F. redolens* f. sp. *dianthi* und *F. udum* sollen auf molekularer Datenbasis Ähnlichkeiten und Differenzen ermitteln. Bei *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* soll die Unterscheidbarkeit von Rassen mittels ITS-RFLP- und RAPD-Mustern überprüft werden. Darüber hinaus soll über RAPD-Muster ein weiterer Diskussionsbeitrag zur Identität von *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* und *F. redolens* f. sp. *dianthi* geliefert werden.

1.2.4 Sektion *Martiella*

Die Sektion *Martiella* gehört zu den am stärksten kontrovers diskutierten Sektionen. Nach Wollenweber & Reinking (1935) und Wollenweber (1943) werden innerhalb dieser Sektion sechs *Fusarium*-Arten, zehn Varietäten und vier Formen anhand der Mikrokonidien und des mittleren Durchmessers der 3-5 septierten Konidien unterschieden. Snyder & Hansen (1941) reduzierten die Taxa auf *Fusarium solani* und unterschieden fünf Formen. Booth (1971) erkennt nur *F. solani* mit einer Varietät *F. solani* var. *coeruleum* an und beschreibt *F. illudens* als neue Art innerhalb der Sektion. Nelson & Cassini (1983) akzeptieren ebenfalls nur *F. solani* als eine Art, alle anderen beschriebenen Arten und Varietäten erklären sie für synonym. Die Reduktion des Konzeptes von Wollenweber & Reinking (1935) auf eine Art wird damit erklärt, daß die beschriebenen Merkmale innerhalb der natürlichen Bandbreite der morphologischen Variabilität einer Art liegen und daher keine Artabgrenzungen rechtfertigen (Snyder & Hansen 1941). Die Untersuchungen von Joffe (1974) führten zur Akzeptanz der drei Taxa *F. solani*, *F. solani* var. *coeruleum* und *F. javanicum* innerhalb der Sektion. Gerlach & Nirenberg (1982) unterschieden ebenfalls *F. javanicum* und *F. solani*, erkannten aber auch *F. coeruleum*, *F. illudens*, *F. eumartii* und *F. caucasicum* als eigenständige Arten an. Neuere morphologische Untersuchungen von Nirenberg (1995b) zeigen eine weitere Unterteilung der Sektion in mindestens 15 Arten, die anhand erster molekularbiologischer Ergebnisse bestätigt wurde (Hering & Nirenberg 1995b). Diese Untersuchungen unterstützen eine differenziertere Betrachtung des Artkonzeptes innerhalb der Sektion *Martiella*.

Bei *Fusarium solani* wurden mehrere spezialisierte Formen sowie insgesamt vier Rassen ausgewiesen. Solche auf Pathogenität und Symptombilder basierenden Konzepte innerhalb der *Martiella*-Sektion (Snyder & Hansen 1941; Sakurai & Matuo 1961b; Snyder & Toussoun 1965; Matuo 1972) sind für den praktischen Phytopathologen zwar einfach

handhabbar, bergen aber die Gefahr in sich, daß es zu Verwechslungen nicht nur innerhalb einer Sektion sondern mit weit entfernten, aber ähnlich aussehenden Arten kommen kann. So führten Überlegungen zur phytopathologischen und physiologischen Variabilität einzelner Isolate von *F. oxysporum* f. sp. *pisi* und *F. solani* f. sp. *pisi* dazu, beide als eine Art vorzuschlagen (Bolton & Donaldson 1972). Andererseits stellten Abney et al. (1993) Unterschiede beim Erreger des 'Soybean Sudden Death Syndroms' fest und vermuteten zwei unterschiedliche Formen von *F. solani* f. sp. *phaseoli* als Verursacher. Spätere Untersuchungen zeigten, daß nur einer der Erreger *F. solani* f. sp. *phaseoli* war, während der andere sich eindeutig als *Fusarium tabacinum* herausstellte (O'Donnell & Gray 1995). Nicht auszudenken, welche Bedeutung ein solches Vorgehen für die Resistenzzüchtung hätte! Ein Screening mit derart charakterisierten Pathogenen würde im Extremfall die Resistenz nur gegen eine Erregerart, nicht jedoch gegen den oder die anderen Erreger aufbauen. Die genaue Charakterisierung eines Erregers ist daher nicht nur aus mykologischen-systematischen Gesichtspunkten zwingend notwendig.

Mit den Ergebnissen von RAPD- und ITS-RFLP-Untersuchungen sollen die oben beschriebenen Konzepte diskutiert werden. Dabei soll ermittelt werden, inwieweit bestehende morphologische und phytopathologische Klassifizierungen mit Bandenmustern korrelieren und ob Ähnlichkeiten oder deutliche Unterschiede zwischen diesen Klassifizierungen feststellbar sind. Die übergreifende Untersuchung aller in dieser Sektion als Arten, Varietäten, spezialisierten Formen und Rassen gruppierten Fusarien soll einen Überblick über die Variabilität geben, die innerhalb dieser *Fusarium*-Sektion zu erwarten ist. Im weiteren Vergleich mit Resultaten aus anderen Sektionen soll der Versuch unternommen werden, ein auf ITS-RFLP- und RAPD-Analysen basierendes Spezieskonzept für die *Martiella*-Sektion zu entwickeln. In ein solches Konzept sollen aus anderen Arbeiten bekannte morphologische, physiologische und biochemische Merkmale integriert werden, um ein aussagekräftiges Modell zu entwickeln.

1.2.5 Methodische Ziele

- Erarbeitung und Evaluation methodischer Grundlagen zur Einsetzbarkeit von RAPD- und ITS-RFLP-Untersuchungen zur Charakterisierung und Differenzierung verschiedener phytopathogener und saprophytischer Fusarien. Dabei sollte ein einheitliches, einfaches sowie nachvollziehbares methodisches Schema für vergleichende Untersuchungen entwickelt werden.
- Bewertung des Einsatzes dieser Methoden auf unterschiedlichen taxonomischen und phytopathologischen Ebenen. Dazu sollen die erzielten Ergebnisse miteinander und mit Resultaten anderer Untersuchungen verglichen werden.
- Anwendung der Techniken zur Lösung der beschriebenen konkreten taxonomischen und phytopathologischen Problemfälle innerhalb der Gattung *Fusarium*.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pilz-Isolate

Alle Isolate wurden der Stammsammlung der Biologischen Bundesanstalt (BBA) entnommen. Die Pilze wurden in Erdröhrchen (Schneider 1958) oder gefriergetrocknet (Bery & Hennebert 1991) bei 4 °C gelagert. Sofern der gleiche Stamm in anderen Sammlungen vorhanden ist, ist deren Isolatnummer mit angegeben. Die verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert. Das Feld „BBA“ kennzeichnet in nachfolgenden Tabellen die Isolatnummer der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie, Berlin-Dahlem; das Feld „DNA“ kennzeichnet die DNA-Präparationsnummern, die in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurden.

Hinsichtlich der besseren Lesbarkeit und Verständlichkeit des Textes wurde bei Namen des Teleomorphs stets auf die Erwähnung verzichtet, daß in allen Fällen ausschließlich der *Fusarium*-Anamorph untersucht worden ist.

2.1.1 Sektion *Discolor*

Tab. 2: *Fusarium sambucinum sensu lato* und Kontrollisolate
Einteilung der Isolate in der Reihenfolge der RAPD-Untersuchung, Abb. 9

Species	BBA	andere Samml.	DNA	Substrat	geograph. Herk.
<i>F. sambucinum</i> Fuckel	62.397	IMB 11.243	025	<i>Solanum tuberosum</i>	Deutschland
	62.433	CBS 125.95	026	<i>Beta vulgaris</i>	Spanien
	62.434	IMB 11.124	027	<i>Solanum tuberosum</i>	Iran
	64.226	CBS 146.95	922	<i>Solanum tuberosum</i>	England
	64.480	Sep 801-2	022	<i>Solanum tuberosum</i>	Finnland
	64.484	-	021	<i>Solanum tuberosum</i>	Finnland
	64.678	Thr TAE/32	028	<i>Triticum</i>	Schweiz
	64.737	-	030	<i>Solanum tuberosum</i>	Deutschland
	64.960	Thr KNAR 5-2	029	Boden	Dänemark
	64.995	PD 78/917	032	<i>Brassica oleracea</i>	Niederlande
	64.998	-	024	<i>Solanum tuberosum</i>	-
	65.009	-	929	<i>Solanum tuberosum</i>	-
	64.262	-	023	<i>Glycine max</i> , Samen	Brasilien
<i>F. venenatum</i> Nirenb.	64.478	CBS 127.95	525	<i>Solanum tuberosum</i>	Finnland
	64.537	-	068	<i>Triticum sativum</i>	Österreich, Wien
	64.757	-	526	<i>Humulus lupulus</i>	Deutschland, Bayern
	64.935	Pol KF 707	527	<i>Solanum tuberosum</i>	Polen
	65.030	-	781	<i>Zea mays</i>	Deutschland
65.031	-	035	<i>Zea mays</i>	Deutschland	
<i>Gibberella pulicaris</i> (Fr. ex. Fr.) Sacc.	62.719	IMB 11.143	041	<i>Pterocarya fraxinifolia</i>	Iran
	64.918	Sam 85-208	070	Palme	Nord Sulawesi
<i>F. indet.</i>	64.280	-	034	<i>Ruschia cunosa</i> , Samen	Deutschland, Berlin
<i>F. indet.</i>	63.575	LEV 10256	063	<i>Medicago sativa</i>	Neuseeland
<i>F. indet.</i>	64.371	LEV 21244b	065	<i>Cucurbita maxima</i>	Neuseeland
<i>F. semitectum</i> Berk et Rav. var. <i>semitectum</i>	64.351	-	036	<i>Helianthus</i>	Jugoslawien
<i>F. bactrioides</i> Wollenw.	63.602	CBS 177.35	038	<i>Cronartium ribicola</i> a. <i>Pinus</i>	USA, Arizona
<i>F. culmorum</i> (W. G. Smith) Sacc.	64.218	-	040	<i>Hordeum vulgare</i>	Finnland
<i>F. cerealis</i> (W. G. Smith) Sacc.	64.545	-	526	<i>Triticum durum</i>	Deutschland
<i>F. torulosum</i> (Berk. et Curt.) Nirenb.	62.398	-	062	<i>Betula verrucosa</i>	Deutschland, Berlin
	63.933	LEV 15233	037	<i>Triticum aestivum</i>	Australien

Species	BBA	andere Samml.	DNA	Substrat	geograph. Herk.
<i>F. torulosum</i> (Berk. et Curt.) Nirenb.	64.465	CBS 576.94	066	<i>Triticum aestivum</i>	Deutschland
	64.479	Sep 6816-4	067	<i>Solanum tuberosum</i>	Finnland
	64.645	Thr Ho 52	069	<i>Solanum tuberosum</i>	Dänemark
	64.948	Thr PVN B13A	071	-	Dänemark
	64.988		072	<i>Hordeum vulgare</i>	Ungarn
<i>F. flocciferum</i> Corda	64.365		410	<i>Secale cereale</i> 'Halo'	
<i>F. lateritium</i> Nees ex Link	64.225		187	<i>Malus domestica</i>	Deutschland
<i>F. compactum</i> (Wollenw.) Gord.	64.640	Thr SMC 2	042	<i>Herbes provencale</i>	Dänemark
<i>F. sarcochroum</i> (Des.) Sacc.	63.714	CBS 745.79	064	<i>Viscum album</i>	Schweiz, Zürich
<i>F. sambucinum</i> ?	-	Korschel 13	1033	Boden	GUS, Russland

2.1.2 Sektion *Eupionnotes*

Tab. 3: *Fusarium tabacinum* und Kontrollisolate

Species	BBA	andere Samml.	DNA	Substrat	geograph. Herk.
<i>F. tabacinum</i> (van Beyma) W. Gams	64.010	-	367	-	-
	64.809	-	369	<i>Brassica napus</i>	Deutschland
	66.026	-	372	Ackerboden	Deutschland
	66.135	-	379	Ackerboden	Deutschland
	62.445	DSM 62445	366	<i>Solanum tuberosum</i>	Deutschland
	68.046	DAOM 215646	456	-	-
	68.043	-	465	<i>Apium graveolens</i>	USA, Kalifornien
	65.834	-	225	<i>Platycodon</i>	Deutschland, Berlin
	67.558	CBS 291.38	458	<i>Solanum tuberosum</i>	USA, Maryland
	62.444	DSM 62444	375	<i>Solanum tuberosum</i>	Deutschland
	67.613	DAOM 213337	455	<i>Panax</i>	Kanada
	62.443	CBS 423.66	365	Boden	Afrika, Katanga
	67.563	-	262	<i>Beta vulgaris</i>	Australien
	67.559	Sam 84-531	446	<i>Nicotiana tabacum</i>	Neuseeland
	65.399	-	370	<i>Chrysanthemum frutescens</i>	Deutschland, Hessen
	64.585	-	368	<i>Chrysanthemum maximum</i>	Deutschland, Berlin
	65.637	-	371	<i>Senecio cruentus</i>	-
	68.021	CBS 137.37	401	-	-
	67.557	CBS 137.33	457	<i>Nicotiana tabacum</i>	UK, England
	67.558	CBS 291.38	458	<i>Solanum tuberosum</i>	USA, Maryland
	68.038	-	463	<i>Cucumis melo</i>	USA, Arkansas
	67.717	-	452	<i>Cucumis melo</i>	USA, Arkansas
	68.040	-	460	-	-
	68.039	-	459	<i>Asclepias</i>	USA, Nebraska
	66.190	-	373	Ackerboden	Deutschland
	66.202	-	374	Ackerboden	Deutschland
	68.042	CBS 367.73	464	<i>Viola odorata</i>	Ägypten
	64.343	-	223	<i>Triticum</i> 'Diplomat'	Deutschland, Bayern
	68.041	DAOM 213369	454	<i>Ambrosia artemisifolia</i>	Kanada, Ontario
	67.716	DAOM 213338	451	<i>Ambrosia trifida</i>	Kanada
	68.037	-	461	<i>Cucurbita</i>	USA, Louisiana
67.560	-	462	<i>Cucurbita pepo</i>	USA, Louisiana	
68.022	-	539	<i>Cucurbita pepo</i>	USA, Louisiana	
<i>Plectosphaerella cucumerina</i> (Lindfor) W. Gams	66.315	-	226	Ackerboden	Deutschland, Nieders.
<i>F. merismoides</i> Corda var. <i>chlamydosporale</i> Wollenw.	62.256	IMB 11.002	723	<i>Asparagus officinalis</i>	Deutschland
<i>F. coeruleum</i> (Libert) ex Sacc.	64.413	CBS 836.85	236	<i>Solanum tuberosum</i> 'Hansa'	Deutschland, Berlin
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> r1	66.843	ATCC 16421	1180	-	-
<i>F. torulosum</i> (Berk. et Curt.) Nirenb.	64.645	Thr Ho 52	069	<i>Solanum tuberosum</i>	Dänemark
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. var. <i>solani</i>	64.383	-	874	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Deutschland, Nieders.
<i>F. illudens</i> C. Booth	64.788	-	158	Baumrinde	Neuseeland
<i>F. sambucinum</i> Fuckel	62.397	IMB 11.243	025	<i>Solanum tuberosum</i>	Deutschland

2.1.3 Sektion *Elegans*

Tab. 4: *Fusarium* Sektion *Elegans*

Unterteilungen bei *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* und *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* nach RAPD-Ergebnissen (S. 50ff)

Species	BBA	andere Samml.	DNA	Substrat	geograph. Herk.
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht : Fries f. sp.					
<i>aechmeae</i> (Gerl. et Saut.) Gord.	62.298	IMB 8.388	668	<i>Aechmea fasciata</i>	Deutschland
<i>batatas</i> (Wollenw.) Snyd. et Hans.	62.299	IMB 8.423	669	<i>Aechmea fasciata</i>	Deutschland, Bayern
<i>betae</i> (Stewart) Snyd. et Hans.	64.378	-	758	<i>Beta vulgaris</i>	Deutschland
<i>callistephi</i> (Beach) Snyd. et Hans.	65.837	-	869	<i>Callistephus chinensis</i>	Deutschland
<i>cepae</i> (Hanzawa) Snyd. et Hans.	62.306	IMB 7.767	673	<i>Allium cepa</i>	USA
<i>cattleyae</i> Foster	62.302	CBS 742.79	724	<i>Phalaenopsis</i>	Deutschland, Nieders.
<i>chrysanthemi</i> G.M. Armstrong, J. K. Armstrong et Littrell r2	63.890	CBS 126.81	751	<i>Chrysanthemum</i>	Deutschland
<i>conglutinans</i> (Wollenw.) Snyd. et Hans. r1	63.571	-	257	<i>Brassica</i>	Niederlande
r2	63.757	-	258	<i>Raphanus sativus</i>	Deutschland, Bayern
r3	62.308	IMB 8.398	256	<i>Matthiola incana</i>	Deutschland, Berlin
<i>cubense</i> (E. F. Smith) Snyd. et Hans.	62.312	IMB 8.973	678	<i>Musa</i>	Honduras
<i>cucumerinum</i> Owen	62.314	IMB 7.709	726	<i>Cucumis sativus</i>	Deutschland
<i>cyclaminis</i> Gerlach	62.316	IMB 7.521	680	<i>Cyclamen persicum</i>	Deutschland
<i>gladioli</i> (Massey) Snyd. et Hans.	62.324	IMB 7.558	684	<i>Gladiolus</i>	Deutschland
<i>lupini</i> Snyd. et Hans.	62.333	IMB 7.235	729	<i>Lupinus angustifolius</i>	Deutschland
<i>lycopersici</i> (Sacc.) Snyd. et Hans. r1	62.059	DSM 62059	162	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Niederlande
r2	62.060	DSM 62060	163	<i>Lycopersicon esculentum</i>	USA
<i>melonis</i> Snyd. et Hans.	62.342	IMB 7.761	694	<i>Cucumis melo</i>	USA
<i>opuntiarum</i> Pettinari	62.349	CBS 743.79	700	<i>Zygocactus truncatus</i>	Deutschland
<i>passiflorae</i> Gordon apud Puss	62.355	CBS 744.79	703	<i>Passiflora edulis</i>	Brasilien
<i>pisi</i> (van Hall) Snyd. et Hans. r2	62.058	IMB 12.503	658	<i>Pisum sativum</i>	Niederlande
<i>tracheiphilum</i> (E.F.Smith) Snyd. et Hans r1	63.927	CBS 130.81	755	<i>Chrysanthemum</i>	Nigeria
<i>tuberosi</i> Snyd. et Hans.	62.367	IMB 11.098	707	<i>Solanum tuberosum</i>	Iran
<i>tulipae</i> Apt	62.372	IMB 10.487	710	<i>Tulipa</i>	Deutschland
<i>vasinfectum</i> (Atkinson) Snyd. et Hans.	64.495	-	043	<i>Gossypium barbadense</i>	Ägypten
	65.633	-	044	<i>G. hirsutum</i> 'Acala'	USA, California
	65.635	-	045	<i>G. hirsutum</i> 'Acala'	USA, California
r1	66.843	ATCC 16421	1180	-	-
	65.634	-	046	<i>G. hirsutum</i> 'Acala'	USA, California
r2	66.844	ATCC 16611	052	<i>Gossypium</i>	USA
	65.636	-	047	<i>G. hirsutum</i> 'Acala'	USA, California
	69.404	-	1031	<i>Gossypium barbadense</i>	Peru
	69.405	-	1032	<i>Gossypium barbadense</i>	Peru
	65.655	ATCC 16611	050	<i>Gossypium</i>	USA
	65.653	CBS 267.50	172	<i>Gossypium</i>	-
r6	66.847	ATCC 36198	055	<i>Gossypium</i>	-
r2	68.060	-	720	<i>G. barbadense</i> 'Pima'	Peru, Piura
	68.061	-	721	<i>G. barbadense</i> 'Pima'	Peru, Piura
	62.373	IMB 7.766	146	<i>Gossypium</i>	USA
r4	65.934	IMI 338123	149	<i>Gossypium</i>	-
	69.517	-	1122	<i>Gossypium</i>	China
	69.518	-	1123	<i>Gossypium</i>	Indien
	69.519	-	1124	<i>Gossypium</i>	China
	64.496	-	144	<i>Gossypium barbadense</i>	Ägypten, Alexandria
r3	66.845	ATCC 16612	053	<i>Gossypium</i>	-
r5	65.650	-	048	<i>G. barbadense</i> 'Ashmanouni'	Sudan
r5	65.654	-	049	<i>Gossypium barbadense</i>	Sudan
r3	67.521	CBS 174.30	061	<i>Gossypium hirsutum</i>	Ägypten
	62.374	IMB 8.641	147	<i>Gossypium</i>	Ägypten, Giza
	62.375	IMB 8.835	711	<i>Gossypium</i>	Ägypten, Giza
	67.668	-	295	<i>Gossypium</i>	Angola, Bi
	67.669	-	296	<i>Gossypium</i>	Angola, Cuanza

Species	BBA	andere Samml.	DNA	Substrat	geograph. Herk.
<i>dianthi</i> (Prillieux et Delacroix) Snyder. et Hans.	62.317	IMB 7.487	681	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Deutschland
	62.321	IMB 9.560	682	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Deutschland
	65.195	-	148	<i>Dianthus</i>	-
	67.518	-	150	<i>Dianthus</i>	Deutschland
<i>F. redoleus</i> Wollenw. <i>f. sp. dianthi</i> Gerlach	67.774	-	608	<i>Pisum sativum</i>	Deutschland
	64.556	-	766	<i>Solanum tuberosum</i>	Deutschland, Nieders.
	62.378	IMB 7.736	735	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Deutschland
	62.394	IMB 9.594	745	<i>Dianthus barbatus</i>	Deutschland
<i>F. udum</i> E. Butler	62.451	CBS 747.79	747	<i>Cajanus indicus</i>	Indien
<i>F. acutatum</i> Nirenb. & O'Donnell	63.520	-	750	<i>Cajanus indicus</i>	Indien

2.1.4 Sektion *Martiella*

Tab. 5: *Fusarium* Sektion *Martiella*
Unterteilungen nach den RAPD-Ergebnissen (S. 55ff)

Species	BBA	andere Samml.	DNA	Substrat	geograph. Herk.
<i>F. ambrosium</i> (Gadd et Loos) Agnihoth. et Nirenb.	65.382	-	247	<i>Camellia sinensis</i>	Indien
	65.389	-	248	<i>Camellia sinensis</i>	Indien
	65.390	-	249	<i>Camellia sinensis</i>	Indien
	67.605	ATCC 16563	232	<i>Hevea brasiliensis</i>	-
<i>F. carneolum</i> Sacc. (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. var. <i>minus</i> Wollenw.) (= <i>F. caucasicum</i> Letov)	67.615	NRRL 20546	227	-	-
	65.631	-	007	Boden	Kuba
	67.792	-	619	Boden	Ecuador
	67.731	-	537	<i>Antelaea azadirachta</i>	Indien
	67.707	-	424	Citrus	USA, Florida
	67.705	-	422	Citrus	USA, Florida
	67.706	-	423	Citrus	USA, Florida
	67.604	ATCC 24395	429	Boden	Afrika, Sudan
	67.708	-	425	Citrus	USA, Florida
	63.603	CBS 179.35	886	<i>Gossypium hirsutum</i>	GUS, Aserbaidj.
	64.441	-	237	<i>Cucurbitacea</i>	Komoren
	64.554	-	239	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	-
<i>F. coeruleum</i> (Libert) ex Sacc.	62.176	IMB 7.128	313	<i>Solanum tuberosum</i>	Deutschland
	62.177	IMB 11.155	1038	-	Deutschland
	64.401	-	1039	-	Frankreich
	64.477	Sep 8027-1	1040	-	Finnland
	64.738	-	1041	-	-
	64.413	CBS 836.85	236	<i>Solanum tuberosum</i> 'Hansa'	Deutschland, Berlin
<i>F. ensiforme</i> Wollenw. et Reink.	62.233	IMB 8.095	314	<i>Populus species</i>	Deutschland
	64.381	-	321	<i>Raphanus</i>	Deutschland
	69.484	-	1132	-	Japan
	68.572	-	919	<i>Coffea arabica</i>	Süd Afrika
	64.404	-	056	<i>Plumeria alba</i>	-
	64.107	LEV 16130a	080	Orchideen-Bulben	Neuseeland
	62.214	IMB 11.144	152	Citrus	Iran
	64.552	-	092	<i>Solanum tuberosum</i>	Argentinien
	64.222	-	081	<i>Welwitschia mirabilis</i>	Deutschland, Berlin
	<i>F. epimyces</i> Cke. (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. var. <i>martii</i> (App. et Wollenw.) Wollenw.)	67.586	Sam 91-122	141	<i>Robinia</i>
64.695		-	104	<i>Scolytus scolytus</i> , <i>Coleoptera</i>	Großbritannien
64.802		-	242	<i>Scolytus scolytus</i> , <i>Coleoptera</i>	Deutschland
64.622		-	058	<i>Picea vulgaris</i>	Deutschland, Bayern
<i>F. eumartii</i> Carp. (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>eumartii</i> (Carp.) Snyder. et Hans. pr. p.)	62.213	IMB 8.678	939	<i>Coffea arabica</i>	Guatemala
	65.064	-	898	-	-
	62.215	CBS 487.76	074	<i>Solanum tuberosum</i>	Argentinien
<i>F. illudens</i> C. Booth	64.608	Sam 85-67	156	-	Neuseeland
	67.606	NRRL 22090	229	-	-
	64.748	-	157	Baumrinde	Neuseeland
	64.789	-	189	Baumrinde	Neuseeland
	65.073	Sam 86-301	118	-	-
	64.788	-	158	Baumrinde	Neuseeland
	64.607	Sam 85-37	155	<i>Metrosideros</i>	Neuseeland

Species	BBA	andere Samml.	DNA	Substrat	geograph. Herk.
<i>F. javanicum</i> Koord. Teleomorph: <i>Nectria caucris</i> Rutgers	68.471	-	1127	-	Singapur
	68.472	-	1128	-	Singapur
	68.473	-	1129	-	Singapur
	68.474	-	1130	-	Singapur
	68.475	-	1131	-	Singapur
<i>F. lathyri</i> Taub. (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. var. <i>martii</i> (App. et Wollenw.) Wollenw. forma 2 Snyder) (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>pisi</i> (Jon.) Snyder et Hans.)	64.428	-	57	<i>Zea mays</i>	Ägypten
	65.247	-	246	<i>Beta</i>	-
	62.234	IMB 9.194	940	Trinkwasser	Deutschland, Berlin
	65.641	-	119	<i>Morus alba</i>	GUS, Usbekistan
	64.492	vE 6-36 FM	090	Ackerboden	USA, New York
	64.493	vE 6-94 FM	091	-	USA, New York
	62.420	IMB 7.144	884	<i>Pisum sativum</i>	Deutschland
	66.134	-	905	Ackerboden	Deutschland, Nieders.
	68.521	-	839	<i>Pisum sativum</i> 'Waverex'	Deutschland, Nieders.
	68.522	-	840	<i>Pisum sativum</i> 'Markana'	Deutschland, Nieders.
66.808	Sam 92-26	907	<i>Pisum</i>	USA, Kalifornien	
<i>F. martiiphaseoli</i> Burkholder (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. var. <i>martii</i> forma 3) (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>phaseoli</i> (Burk.) Snyder et Hans.)	64.384	-	889	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Deutschland, Nieders.
	64.394	CBS 265.50	335	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-
	68.441	-	910	<i>Glycine max</i>	Brasilien, Brasilia
	68.442	-	911	<i>Glycine max</i>	Brasilien, Brasilia
<i>F. pestis</i> Sor. (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. var. <i>martii</i> forma 1)	66.201	-	252	Ackerboden	Deutschland, Nieders.
	65.044	-	243	Ackerboden	Deutschland, Nieders.
	65.083	-	245	Ackerboden	Deutschland, Nieders.
	65.995	-	251	Gartenboden	Deutschland, Nieders.
	66.055	-	121	Ackerboden	Deutschland, Nieders.
	64.806	Pol KF 724	896	<i>Solanum tuberosum</i>	Polen
<i>F. radicolola</i> Wollenw. (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>eumartii</i> (Carp.) Snyder et Hans. pr. p.)	64.923	-	096	<i>Solanum tuberosum</i>	Argentinien
	65.936	-	112	Boden	Neukaledonien
	64.924	-	97	<i>Solanum tuberosum</i>	Argentinien
	64.925	-	376	<i>Solanum tuberosum</i>	-
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. var. <i>solani</i>	62.410	IMB 9.576	233	<i>Arachis hypogaea</i>	Libyen
	64.245	-	264	<i>Panax ginseng</i>	-
	62.419	IMB 11.958	878	<i>Cucumis melo</i>	Türkei
	64.282	-	887	<i>Arachis hypogaea</i>	Südafrika
	64.511	-	893	<i>Abelmoschus esculentus</i>	Ägypten
	67.626	-	909	-	Deutschland
	68.421	-	644	<i>Cucumis sativus</i>	Österreich
	62.412	IMB 9.896	944	<i>Cucumis sativus</i>	Deutschland
	64.383	-	874	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Deutschland, Nieders.
	64.510	-	892	<i>Abelmoschus esculentus</i>	Ägypten
	62.409	IMB 9.385	941	<i>Daucus carota</i>	Deutschland
	68.573	-	912	<i>Catha edulis</i>	Jemen
	62.411	IMB 9.703	943	<i>Pinus sylvestris</i>	Deutschland
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. var. <i>petroliphilum</i> Chen (= <i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>cucurbitae</i> (Jon.) Snyder et Hans. Rasse 2)	68.003	-	431	-	-
	64.719	-	241	<i>Vicia faba</i>	Deutschland, Berlin
	65.794	-	327	Schleifwasser	Deutschland
	64.637	-	240	-	-
	65.047	-	244	Swimming-Pool	Deutschland, Berlin
	67.690	-	340	Schleifwasser	-
	67.691	-	380	Schleifwasser	-
	67.725	NRRL 22268	542	Petroleum	China
68.549	CBS 203,32	913	-	Südafrika	
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>batatas</i> McClure	64.856	Sam 85-4	116	<i>Ipomoea batatas</i>	-
	64.954	Clark S-567	346	<i>Ipomoea batatas</i>	-
	64.683	-	59	<i>Ipomoea batatas</i>	USA
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>cucurbitae</i> (Jon.) Snyder et Hans. Rasse 1	64.715	ATCC 18098	325	Boden	-
	64.716	ATCC 18099	344	Boden	-
	66.807	-	253	<i>Cucurbita</i>	USA, California
	64.411	CBS 616.66	319	<i>Cucurbita ficifolia</i>	-
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>mori</i> (Sakurai et Matuo)	64.592	SUF 217-19	114	-	Japan
	64.594	SUF 217-24	115	-	Japan
	64.528	SUF 217-5	393	-	Japan
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>robiniae</i> (Matuo et Sakurai)	64.489	vE T 151	087	Boden	USA, New York
	67.723	ATCC 18692	396	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Japan
	64.486	vE T 153	086	Boden	USA, New York
	67.724	ATCC 18693	397	<i>Robinia pseudoacacia</i>	-

Species	BBA	andere Samml.	DNA	Substrat	geograph. Herk.
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc. f. <i>sp. xanthoxyli</i> (Sakurai et Matuo)	64.533	SUF XV-23	088	-	Japan
	64.534	SUF 407	113	-	Japan
<i>F. striatum</i> Sherb. Teleomorph: <i>Nectria ipomoeae</i> (Halsted) Wollenw.	64.379	-	411	<i>Passiflora edulis</i>	Deutschland, Berlin
	64.431	CBS 225.58	199	Baumwollgewebe	Panama
	67.597	NRRL 22176	383	Rinde	Venezuela
	65.223	-	193	<i>Kalanchoe</i>	-
	65.131	PD 88-303	192	<i>Capsicum annuum</i>	Niederlande
	67.596	Sam 71-91	122	<i>Theobroma cacao</i>	Jamaika
	65.059	-	138	Rinde	Franz. Guyana
68.571	-	918	-	Deutschland, Hessen	
<i>F. sp. nov. I</i>	67.715	Sam 84-382	450	Rinde	Venezuela
	65.069	Sam 86-334	108	-	-
	65.071	Sam 86-203	060	-	Franz. Guyana
	67.588	Sam 86-337	125	<i>Nectandra grandis</i>	Franz. Guyana
	65.068	Sam 87-18	204	-	-
	67.585	Sam 87-9	126	Rinde	Franz. Guyana
<i>F. sp. nov. II</i>	64.793	-	095	Baum	Neuseeland
	65.098	Sam 76-21	901	-	Neuseeland
	64.747	-	323	Baum	Neuseeland
<i>F. sp. nov. III</i>	65.685	Sam 90-170	195	-	Venezuela
	65.099	Sam 71-24	191	-	Jamaika
	67.595	Sam 71-148	123	-	Venezuela
	67.714	Sam 92-132	427	Rinde	Frankreich
	67.748	Sam 92-138	467	<i>Elaeagnus pungens</i> .	Frankreich
	67.594	Sam 90-168	139	Rinde	Venezuela
	67.593	Sam 73-22	137	<i>Hoheria populnea</i>	Neuseeland
<i>F. sp. nov. IV</i>	65.683	Sam 90-195	173	-	Venezuela
	65.927	Sam 90-251	904	holziger Zweig	Venezuela
	65.096	Sam 86-286	900	<i>Passiflora</i>	Franz. Guyana
<i>F. sp. nov. V</i>	65.023	Sam 87-127	107	Holz	Franz. Guyana
	65.050	Sam 87-151	897	Rinde	-
	65.045	-	377	Holz	Franz. Guyana
<i>F. sp. nov. VI</i>	67.737	Sam 92-140	601	<i>Buxus sempervirens</i>	Frankreich
	67.738	Sam 93-6	530	<i>Buxus sempervirens</i>	Frankreich
<i>Nectria bolbophylli</i> P. Henn (= <i>F. radicolica</i> Wollenw. pr. p.)	62.801	IMB 11.134	078	<i>Gleditsia caspica</i>	Iran
	63.765	IMB 10.613,	196	<i>Phalaenopsis amabilis</i>	Deutschland, Nieders.
	63.767	DSM 62804	198	<i>x Laelocattleya</i>	-
	62.803	IMB 12.424	197	<i>Paphiopedilum</i>	Deutschland
	64.482	-	200	<i>Phalaenopsis</i>	Deutschland, Bayern
<i>Nectria borneensis</i> Petrak	65.095	Sam 85-197	899	-	Indonesien
<i>Nectria haematococca</i> Berk. et Br. sensu Wollenw.	65.035	PD 88-12	326	<i>Polyscias</i>	Sri Lanka
	68.547	-	842	Larve - <i>Delia radicum</i>	Kanada
	67.784	Sam 93-16	617	Rinde	Kuba
<i>Nectria plagiantli</i> Dingley	68.511	Sam 83-146	832	-	Neuseeland
<i>Nectria „subsequens“</i> (Isolat unter diesem nicht beschriebenen Namen erhalten)	66.998	Sam 91-44-5	131	-	Brasilien
<i>F. indet.</i>	65.021	Sam 87-148	128	Blatt eines abgest. Astes	Franz. Guyana
	67.587	Sam 91-148	142	<i>Liriodendron</i>	USA, Maryland
	64.363	-	082	<i>Musa species</i>	-
	62.236	IMB 11.452	076	Bohrloch in <i>Acer</i>	Deutschland
	65.097	Sam 76-205	880	<i>Citrus</i>	Rarotonga
	64.529	SUF 208	879	<i>Gladiolus</i>	Japan
	64.658	-	103	<i>Brachycthon</i>	Israel
	67.625	-	908	-	Deutschland, Meckl.
	62.417	IMB 11.343	882	<i>Paphiopedilum</i>	Deutschland
	65.208	-	902	<i>Morus alba</i>	China, Yunnan
	67.591	Sam 87-137	127	Rinde	Franz. Guyana
	65.077	Sam 86-67	190	-	-
	65.072	Sam 88-9	117	-	Franz. Guyana
	69.106	-	1043	-	Spanien, La Palma
	64.610	Sam 84-409	322	Rinde	Brasilien
	65.027	Sam 87-138	159	Rinde	Franz. Guyana
	68.523	-	841	-	Franz. Guyana
	67.589	Sam 81-185-4	133	-	Venezuela
	65.075	Sam 86-106	167	-	-
63.665	CBS	194	Rinde	Venezuela	

2.2 Vitalisierung und Kultur der Pilzisolate

MYP – Malt Yeast Pepton-Flüssigmedium (Bandoni 1972)

7,0	g	Malzextrakt (Difco)
1,0	g	Soja-Pepton (Difco)
0,5	g	Hefe Extrakt (Merck 5391)
1000,0	ml	Aqua dest.

SNA – synthetischer nährstoffarmer Agar mod. nach Nirenberg (1976)

1,0	g	KH ₂ PO ₄
1,0	g	KNO ₃
0,5	g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
0,5	g	KCl
0,2	g	Glucose
0,2	g	Saccharose
6,0	ml	Natronlauge (NaOH, 1 M)
17,0	g	Agar (Oxoid L 13)
ad 1000,0	ml	Aqua dest.

Die Vitalisierung der in Erdröhrchen gelagerten Pilzreinkulturen erfolgte durch Auskrümeln auf SNA-Platten und Kultur bei 20 °C im Labor. Bei gefriergetrocknet konservierten Isolaten wurden die Glasröhrchen aufgebrochen. Mit einem Tropfen sterilem Aqua dest. wurden die getrockneten Konidien im Wasser suspendiert und auf SNA-Platten ausgestrichen. Nach ca. 8 Tagen wurden die Platten mikroskopisch auf Bakterien oder Fremdpilze überprüft. Bewachsene Agarstückchen mit ca. 5 mm Kantenlänge wurden von diesen Platten ausgeschnitten und auf neue SNA-Platten übertragen. Die Weiterkultur erfolgte bei 20 °C bis die Platten halb bewachsen waren.

Für die DNA-Extraktion wurden aus den äußeren Wachstumszonen jeweils vier bewachsene Agarstückchen mit ca. 5 mm Kantenlänge ausgeschnitten und damit 40 ml MYP-Flüssigmedium in 100 ml Erlenmeyerkölbchen beimpft. Die Isolate wurden bei 20 °C auf einem Kulturschüttler (140 Upm) solange kultiviert bis das Medium leicht trübe erschien oder einzelne Myzelklumpen sichtbar waren. Bei den untersuchten Fusarien war dieser Zustand nach etwa 2-4 Tagen erreicht. Vor der Filtration wurden die Flüssigkulturen mikroskopisch auf bakterielle Verunreinigungen überprüft.

2.3 DNA-Extraktion

EDTA-Stammlösung (500 mM, pH 8,0)

73,06	g	EDTA (Titriplex II, Merck 8417)
		NaOH-Plätzchen (Roth 6771)
ad 250	ml	Aqua dest.

Lösen mit NaOH-Plätzchen in 150 ml Aqua dest. unter ständiger pH-Wert Kontrolle; Endvolumen 250 ml

Ethanol (70 %)

70	ml	Ethanol absolut (Merck 983)
30	ml	Aqua dest.

Lithiumchlorid (4 M)

16,96	g	LiCl (Merck 5679)
ad 100	ml	Aqua dest.

Lysispuffer (1 % SDS, 10 mM EDTA)

10 ml SDS-Stammlösung, pH 8,0
 2,0 ml EDTA-Stammlösung
 88 ml Aqua dest.

Polyethylenglycol (PEG 6000) $M_C = 6000$ (Serva 33137, Heidelberg)**SDS-Stammlösung (10%ig w/v)**

10,0 g SDS (Merck 12012)
 ad 100 ml Aqua dest.

TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA)

1,0 ml TRIS-HCl-Stammlösung, pH 8,0
 0,2 ml EDTA Stammlösung, pH 8,0
 98,8 ml Aqua dest.

TEL-Puffer

90 ml TE-Puffer
 10 ml LiCl (4 M)

TRIS-HCl-Stammlösung (1 M, pH 8,0)

121,14 g TRIS-Base (Roth 4855)
 1 N HCl (Merck Titrisol 9970)

Lösen in HCl, mit Aqua dest. auf ca. 700 ml auffüllen, pH-Korrektur durch Titration mit 1 N HCl unter ständiger pH-Kontrolle; Endvolumen 1.000 ml

TRIS-HCl-Stammlösung (1 M, pH 8,6)

wie oben, jedoch pH-Wert auf 8,6 eingestellt

weitere verwendete Chemikalien

Isopropanol (2-Propanol; Merck 998)

NaCl (Merck 6404)

Stickstoff, flüssig

Geräte

Filtersystem	Sartorius SM 16510 (zur Filtration der Flüssigkulturen)
Mörser	Porzellanmörser (50 mm Innendurchmesser, 25 ml Volumen) mit Pistille
Multipipette	Eppendorf mit Combitips in den Größen: 0,05 ml, 0,50 ml, 1,25 ml
pH-Meter	Hanna Instruments (HI 9023; Kunststoffelektrode - HI 1230) mit automatischem Temperaturabgleich
Pipetten	Gilson; in den Größen 1-10 μ l, 1-20 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l
Pipettenspitzen	10 μ l, 100 μ l und 1000 μ l (versch. Hersteller)
Reagenzglasschüttler	Heidolph REAX 2000
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml mit Schnappdeckel (Polypropylen, versch. Hersteller) 1,5 ml mit Schraubverschluß (Polypropylen, zur Lagerung der DNA)
Überkopfschüttler	Heidolph REAX 2
Zentrifuge	Eppendorf 5415C mit Rotor für 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße

Das Myzel aus den Flüssigkulturen (siehe 2.2) wurde durch Vakuum-Filtration mit dem Sartorius-Filtersystem gewonnen. Als Filter dienten passend geschnittene Kaffeefilterpapiere (Melitta). Im Myzelpellet verbliebene Agarstückchen wurden entfernt. Anschließend wurde das Myzel zweimal gründlich mit Aqua dest. gespült. Der Feuchtigkeitsgehalt der Myzelpellets wurde durch leichtes Pressen mit Fließpapier reduziert.

Falls die Pellets nicht sofort weiter verarbeitet wurden, lagerten sie in Petrischalen im Gefrierfach bei -20 °C.

Jeweils 18 Isolate oder ein Vielfaches davon wurden innerhalb eines Arbeitsschrittes bearbeitet. Vor dem Beginn der Aufarbeitung wurden in entsprechender Anzahl mit den Probennummern beschriftete 1,5 ml Schnappdeckel-Reaktionsgefäße mit 1 ml Lysispuffer und 1,5 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäße mit 120 mg PEG 6000 befüllt. Die Reaktionsgefäße wurden in mit zerstoßenem Eis befüllten Styropor-Racks aufbewahrt.

Von den Myzelpellets wurden ca. 150 mg Material entnommen und unter flüssigem Stickstoff zu feinem Staub zermörsert. Das Myzelpulver wurde mit gekühlten Spateln in die mit Lysispuffer befüllten Reaktionsgefäße überführt und durch Überkopfschütteln mit der Hand suspendiert. Für ca. 30 min lysierten die Proben bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 120 mg NaCl zugegeben und durch Schütteln gelöst. Nach weiteren 30 min im Überkopfmischer wurden die Myzelreste und ausgefällte Proteine für 10 min bei 15.800 g abzentrifugiert.

In die mit PEG 6000 befüllten Schraubdeckel-Reaktionsgefäße wurde 1 ml des Überstandes pipettiert. Dabei wurde vermieden, dem Reaktionsansatz aufschwimmende hydrophobe Verunreinigungen mit zu übernehmen. Nach 60 min im Überkopfmischer auf Eis sollte das PEG 6000 vollständig gelöst sein. Die ausgefällte DNA (Paithankar & Prasad 1991) wurde für 10 min bei 1.300 g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen. Die Reaktionsgefäße wurden kopfüber auf Fließpapier aufgestellt, so daß Reste der PEG-Lösung herauslaufen konnten.

Nach 5 min wurde das DNA-Pellet mit 250 µl TEL-Puffer versetzt und nach einigen Minuten Einweichzeit vollständig durch über Kopf schütteln oder durch Fingerschnippen gelöst. Durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Isopropanol fällt die DNA aus der Lösung fädig aus. Zur vollständigen Präzipitation wurde weitere 30 min im Überkopfmischer auf Eis geschüttelt.

Die ausgefällte DNA wurde für 5 min bei 1.300 g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen. Da einige Pellets Farbstoffreste aufwiesen, wurden sie zur weiteren Reinigung mit 1 ml Ethanol kräftig durch Fingerschnippen suspendiert und für 30 min oder länger im Überkopfmischer auf Eis geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 1.300 g zentrifugiert, danach der Überstand verworfen. Ethanolreste konnten durch umgekehrtes Aufstellen der Reaktionsgefäße für 5 min auf Fließpapier herauslaufen. Nach diesem Schritt sollte die DNA weiß bis weißlich-grau aussehen.

Die Pellets trockneten in den offenen Reaktionsgefäßen über Nacht unter der Sterilbank. Am nächsten Morgen wurden die DNA-Proben mit 100 µl TE-Puffer gelöst und zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

Für die weitere Verwendung wurde von jeder Probe eine 1:100 Verdünnung mit TE-Puffer hergestellt. Dazu wurden 2,5 µl der präparierten DNA in 1,5 ml Schnappdeckel-Reaktionsgefäße mit 250 µl TE-Puffer verdünnt und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Nach Schäfer & Wöstemeyer (1992) sollen in 5 µl dieser Verdünnung ca. 10-25 ng DNA enthalten sein.

2.4 Polymerase Kettenreaktion

Primer (Stammlösung 10 µM; Auftragssynthese bei TIB-Molbiol, Roth, Eurogentec, Biometra)

Für die PCR wurden die Primer auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Primersequenzen siehe Tab. 6. Schmelzpunkte der Primer siehe bei Thein & Wallace (1986), Meinkoth & Wahl (1984) oder Petruska et al. (1988). Hinweise zum Primer-Design siehe bei Kubelik & Szabo (1995).

Tab. 6: Primer

Primer	Sequenz	Basen-Anzahl	GC-Gehalt	Annealing-Temperatur
Core-Sequenz des Phagen M13 (Ryskov et al. 1988; Huey & Hall 1989)				
5	5'-GAG GGT GGC GGT TCT	15	66 %	53 °C
Simple-Repeat-Primer (Epplen 1988; Weising et al. 1989; Meyer et al. 1992)				
6	5'-G ACA GAC AGA CAG ACA	16	50 %	53 °C
13	5'-G ATA GAT AGA TAG ATA	16	25 %	53 °C
14	5'-G GAT GGA TGG ATG GAT	16	50 %	53 °C
15	5'-GTC GTC GTC GTC GTC	15	66 %	53 °C
16	5'-TCC TCC TCC TCC TCC	15	66 %	53 °C
17	5'-C ACA CAC ACA CAC ACA	16	50 %	53 °C
31	5'-GTG TGT GTG TGT	12	50 %	53 °C
32	5'-GTG GTG GTG GTG GTG	15	67 %	53 °C
33	5'-CAC CAC CAC CAC CAC	15	67 %	53 °C
AFLP-Primer (Caetano-Anollés et al. 1991b)				
11	5'-AA TGC AGC	8	50 %	40 °C
12	5'-CG CGG CCA	8	87 %	40 °C
Standard-RAPD Primer (Welsh & McClelland 1990; Williams et al. 1990)				
20	5'-TGT TCC AGG C	10	60 %	40 °C
21	5'-TTC GGTA GGC	10	60 %	40 °C
22	5'-CGA TAG CCT C	10	60 %	40 °C
23	5'-CTT CCG TCA G	10	60 %	40 °C
24	5'-AAC GGT CAG C	10	60 %	40 °C
25	5'-TGG GCA TCT G	10	60 %	40 °C
26	5'-GGT CTG AAC C	10	60 %	40 °C
27	5'-ACG GTC TTG G	10	60 %	40 °C
28	5'-GGC ATC GGC C	10	80 %	40 °C
29	5'-AAC GGI CAC G	10	60 %	40 °C
40	5'-CGT CCT CAG C	10	70 %	40 °C
60	5'-CCG GCT ACG G	10	80 %	40 °C
willkürlich gewählte, längere Primer				
63	5'-CAG CAG GTC GAT GCG	15	67 %	53 °C
65	5'-GCG CAT GAC TGG CAG	15	67 %	53 °C
41 ¹⁾	5'-CGC GCC CCG TAA AAA	15	67 %	53 °C
42 ¹⁾	5'-TTT GGG GAG TGC AGC	15	60 %	53 °C
43 ¹⁾	5'-GGC CCG CCG CAG GAA	15	80 %	53 °C
44 ¹⁾	5'-GGG GAG TGC AGC AGG	15	73 %	53 °C
55 ²⁾	5'-CAG AGT CCT ATG GCC GTG GAT	21	57 %	53 °C
Zur selektiven Amplifikation der ITS-Regionen (White et al. 1990)				
1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19	63 %	60 °C
4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20	45 %	60 °C

¹⁾ zum selektiven Nachweis von *F. cerealis*, *F. culmorum* und *F. graminearum* (Hering et al. 1995e)

²⁾ zur Amplifikation von IGS-Bereichen (Anderson & Stasovski 1992)

dNTP (Stammlösung 10 mM)

Die Einzelnukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 100 µl, 100 mM im Set; Böhlinger 1277049) wurden miteinander vermischt. Das gekennzeichnete Gemisch (dNTP) wurde zu je 100 µl aliquotiert und zur Lagerung bei -20 °C eingefroren. Zum Gebrauch wurde jeweils ein Aliquot aufgetaut und mit 900 µl sterilem Aqua dest. verdünnt.

KCl (1 M)

7,46 g KCl (Merck 4936)
ad 100 ml Aqua dest.

MgCl₂ (1 M)

20,33 g MgCl₂ (Merck 5832)
ad 100 ml Aqua dest.

MgCl₂ (50 mM)

10 ml MgCl₂ (1 M)
190 ml Aqua dest.
sterilisiert und zu je 5 ml aliquotiert

Mineralöl (Sigma M-5904)**Polymerase (5 U/µl; Taq-Polymerase)**

Stratagene 600139; in Anwendungskonzentration geliefert

Polymerase-Puffer PX (Stammlösung 10x)

10 ml Tris-HCl (1 M, pH 8.6)
1,5 ml MgCl₂ (1 M)
50 ml KCl (1 M)
1,0 ml BSA (1 % w/v in Aqua dest.)
0,1 ml Triton X-100 (Serva 37238)
ad 100 ml Aqua dest.
Lagerung als 2 ml Aliquote bei -20 °C

Geräte

Thermocycler Biometra Trio-Thermoblock für 0,5 ml Reaktionsgefäße
Biometra Uno-Thermoblock für 96-well Mikrotiterplatten

2.4.1 Random Amplified Polymorphic DNA

PCR-Ansätze wurden für insgesamt 40 Untersuchungen gleichzeitig hergestellt. Dabei wurden jeweils 20 DNA-Herkünfte mit zwei Primern getestet.

Verwechslungen von DNA-Proben während des Ansatzes konnten durch ein streng standardisiertes Pipettierschema vermieden werden: Zwei Reaktionsgefäßständer mit je 6 Reihen und 10 Spalten wurden längs nebeneinander aufgestellt. Von 1-20 gekennzeichnete 0,5 ml Reaktionsgefäße wurden in einer Reihe in die Ständer gesetzt. In einer zweiten Reihe wurden weitere von 1-20 gekennzeichnete aber zusätzlich farblich markierte Reaktionsgefäße gestellt. Anschließend wurden 5 µl des ersten Primers mittels Multipipette (0,05 ml Combitip, Stellung 5) in die erste Reihe der Reaktionsgefäße pipettiert, danach der zweite Primer in die zweite Reihe. Im nächsten Schritt jeweils 5 µl der 1:100 verdünnten DNA-Proben in die untereinander in Spalten angeordneten Reaktionsgefäße derart einpipettiert, daß sich die DNA-Tröpfchen zunächst nicht mit den Primertröpfchen vermischten. Bei diesem Schema entsprachen gleiche Nummerierungen den gleichen DNA-Proben, gleiche farbliche Markierungen kennzeichneten gleiche Primer.

Um homogene Reaktionsbedingungen für alle gleichzeitig untersuchten Proben zu schaffen wurde das Reaktionsgemisch als Mastermix mit allen Reagenzien ohne DNA und ohne Primer für jeweils 40 Reaktionen gleichzeitig angesetzt (siehe Tab. 7). Meßfehler, die auf das Pipettieren kleinster Volumina für Einzelansätze zurückzuführen wären, konnten dadurch weitestgehend ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde stets 10 % Mastermix mehr angesetzt damit in der Multipipette eventuell verbleibende Restmengen ausgeglichen werden. In den Mastermix wurden das sterile Aqua dest., der Polymerase-Puffer PX und das $MgCl_2$ (Mengen siehe Tab. 7) in ein 2,0 ml RG pipettiert. Wegen ihrer geringeren Stabilität im hohen pH-Bereich kamen die Nukleotide (dNTPs) sowie die Taq-Polymerase zuletzt hinzu. Der Mastermix wurde gründlich durchmischt.

Tab. 7: Reaktionsgemischkonzentration und Ansatz (50 μ l Reaktionsvolumen)

Reagenz	Reaktionskonzentration	Menge je Ansatz		
Primer (10 μ M)	1 μ M	5,0 μ l		
DNA-Probe	ca. 10-25 ng	5,0 μ l		
Mastermix:			für 40 ¹⁾ Ansätze	für 160 ²⁾ Ansätze
steriles Aqua dest.		31,9 μ l	1403,6 μ l	5614,4 μ l
Polymerase-Puffer PX (10 x)		5,0 μ l	220,0 μ l	880,0 μ l
Tris-HCl (pH 8,6)	10,0 mM			
KCl	50,0 mM			
BSA	0,001 %			
Triton X-100	0,01 %			
$MgCl_2$	1,5 mM			
$MgCl_2$ (50 mM)	3,0 mM	3,0 μ l	132,0 μ l	528,0 μ l
dNTP (10 mM)	75,0 μ M	3,0 μ l	132,0 μ l	528,0 μ l
Units Polymerase (5 U/ μ l)	0,4/0,7 ³⁾ U	0,08/0,14 ³⁾ μ l	3,52/6,16 ³⁾ μ l	14,1/24,6 ³⁾ μ l
Ölüberschichtung		50,0 ⁴⁾ μ l		

¹⁾ für jeweils 40 0,5 ml Reaktionsgefäße; ²⁾ für zwei Mikrotiterplatten; ³⁾ für Primer 10, 11, 20-29, 40, 60;

⁴⁾ bei Mikrotiterplatten nur 25 μ l Ölüberschichtung

Mit der Multipipette wurden je Probe 40 μ l (0,5 ml Combitip, Stellung 4) des Mastermix zugegeben. Dabei wurden die vorgelegten DNA- und Primertröpfchen an den Rändern der Reaktionsgefäße heruntergespült. Um eine Aufkonzentration des Reaktionsgemisches durch Wasserverdunstung zu vermindern, wurden abschließend die Ansätze jeweils mit 50 μ l Mineralöl, bei Verwendung von Mikrotiterplatten mit 25 μ l, überschichtet. Nach leichtem Anzentrifugieren der Proben wurden diese in den programmierbaren Thermocycler (Programmierung siehe Tab. 8) eingesetzt. Die zur Amplifikation benutzten Annealingtemperaturen wurden auf der Basis früherer Studien (Welsh & McClelland 1990; Williams et al. 1990; Steffan & Atlas 1991; Williams et al. 1991; Ellsworth et al. 1993; Ayliffe et al. 1994) empirisch für die jeweiligen Primer ermittelt.

Nach der Polymerase-Kettenreaktion wurden die Proben entweder sofort elektrophoretisch aufgetrennt oder im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Derart aufbewahrte Proben zeigten nach 2 Wochen keine qualitativen Unterschiede im Vergleich zu sofort aufgetrennten Reaktionsgemischen.

Tab. 8: Programmierung der Thermocycler

Programmschritt	Reaktionsschritt	Schleifenzahl	Zeit	Temperatur
1	initiale DNA-Denaturierung	1	120 s	95 °C
	Zyklus:	37		
2	DNA-Denaturierung		45 s	95 °C
3	Primer Annealing		60 s	40/53/60 °C ¹⁾
4	Extension		90 s	75 °C
5	Auffüllen der Ketten	1	300 s	75 °C
6	Ende	1	~	6 °C

¹⁾ Annealingtemperatur abhängig vom eingesetzten Primer (siehe Tab. 6)

2.4.2 Selektive Amplifikation der ITS

Die Verfahrensschritte zum Ansatz der Reaktionsgemische zur selektiven Amplifikation der ITS-Regionen erfolgten analog zu den unter 2.4.1 beschriebenen. Einzige Unterschiede liegen in der Wahl der Primer und der Annealingtemperatur der PCR. Die Primer 01 und 04 wurden paarweise eingesetzt, wobei je Primer 2,5 µl in jedes Reaktionsgefäß einpipettiert wurden. Die Annealingtemperatur zur selektiven Amplifikation betrug 60 °C.

2.5 Restriktionsverdau von ITS1/ITS4 Amplifikaten

Restriktionsenzyme

siehe Tab. 9; der vom Hersteller gelieferte Reaktionspuffer wurde eingesetzt

Geräte

Kühlthermostat: Biometra KH-2

Mittels Multipipette wurden 45 µl der nicht weiter aufgereinigten PCR-Produkte aus Abschnitt 2.4.2 vorsichtig unter dem Mineralöl herauspipettiert und zu jeweils 15 µl in 0,5 ml Reaktionsgefäße (0,05 ml Combitip, Einstellung 3) aliquotiert. Dabei kam das unter 2.4.1 beschriebene Pipettierschema in leicht abgewandelter Form zum Einsatz: Statt der zwei Reihen wurden drei Reihen nummerierte Reaktionsgefäße in die nebeneinander stehenden Racks gestellt. Gleiche Nummern bedeuteten auch hier gleiche DNA-Herkünfte. Farblich unterschiedliche Markierungen kennzeichneten nun unterschiedliche Restriktionsenzyme. Pro ITS-Amplifikat konnten so drei Restriktionsuntersuchungen gleichzeitig durchgeführt werden. Bis zur weiteren Verarbeitung lagerten die Proben im Kühlschrank bei 4 °C.

Die verbleibenden 5 µl der PCR-Produkte wurden zur Kontrolle der Amplifikation elektrophoretisch aufgetrennt.

Tab. 9: Verwendete Restriktionsenzyme, ihre Isoschizomere und Erkennungssequenzen

Restriktions- enzym	Isoschizomer(e)	Erkennungssequenz und Schnittstelle (/)	Lieferant
Alu I	-	5'-... AG CT ... 3'-... TC GA ...	Eurogentec
BsiZ I	Sau 96 I, Bsu54 I, Cfr13 I	5'-... G GNC C ... 3'-... C CNG G ...	Eurogentec
Bsp 143 I	-	5'-... AG CT ... 3'-... TC GA ...	Eurogentec
Hae III	Bsh I, BspK I, BsuR I, FnuD I	5'-... GG CC ... 3'-... CC CC ...	Gibco BRL, Eurogentec
Hha I	Cfo I, Hin6 I	5'-... G CG G ... 3'-... C GC C ...	Gibco BRL
Hinf I	-	5'-... G ANT C ... 3'-... C TNA G ...	Gibco BRL, Eurogentec
Msp I	Hpa II	5'-... C CG G ... 3'-... G GC C ...	Gibco BRL
Nde II	Sau3A I, Mbo I	5'-... GATC ... 3'-... CTAG ...	Eurogentec
Rsa I	-	5'-... GT AC ... 3'-... CA TG ...	Gibco BRL, Eurogentec
Taq I	TthHB8 I	5'-... T CGA ... 3'-... AGC T ...	Gibco BRL

Für die Restriktionsansätze wurden Mastermix wie folgt hergestellt: Steriles Aqua dest. wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt, der mitgelieferte Puffer sowie die Restriktionsenzyme hinzupipettiert und der ganze Ansatz gut durchmischt. Wie bei den PCR-Ansätzen wurde auch hier 10 % mehr Mastermix angesetzt. Die genauen Mengenangaben sind der Tab. 10 zu entnehmen. Die Restriktionsenzyme Hae III + Hinf I, Hha I + Taq I und Msp I + Rsa I wurden gemeinsam im Doppelverdau, Alu I, Bsp 143 I und BsiZ I einzeln für die Untersuchungen eingesetzt.

Tab. 10: Ansatz des Restriktionsgemisches (40 µl Reaktionsvolumen)

Reagenz	Endkonzentration	Menge je RG	Mastermix
PCR Produktmenge		15,0 µl	
steriles Aqua dest.		20,8 µl	457,6 µl
Puffer (10 x)	4 µl	4,0 µl	88,0 µl
Units je Restriktionsenzym	2 U	0,2 µl	4,4 µl

Jeder DNA-Probe wurden 25 µl (Multipipette: 1,25 ml Combitip, Stellung 1) des Mastermix zugegeben. Für jede Enzymkombination bzw. jedes Enzym wurden unterschiedlich gekennzeichnete Combitips verwendet. Nach leichtem Anzentrifugieren der Proben wurden diese in das auf 37 °C konstant erwärmte Wasserbad des Kühlthermostaten gestellt. Nach 120 min wurde der Verdau mit 5 µl Gel-Loading Puffer je DNA-Probe abgebrochen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben.

2.6 Agarosegelelektrophorese

Agarosegel (1,5%ig (w/v))

3 g LE Agarose (Gibco BRL 15510-027, electrophoresis grade)
ad 200 ml 0,5x TBE-Puffer

Agarosegel (4,0%ig (w/v))

8 g LE Agarose (Gibco BRL 15510-027, electrophoresis grade)
ad 200 ml 0,5x TBE-Puffer

Ethidiumbromid (1%ige Stammlösung)

10 mg Ethidiumbromid (Serva 21238)
ad 10,0 ml Aqua dest.

Zum Anfärben des Gels werden 0,4 ml der Stammlösung mit 400 ml Aqua dest. verdünnt (Färbelösung); Lagerung unter Lichtabschluß

Gel Loading Buffer mod. nach Rolfs et al. (1992)

10 mg Bromphenolblau (Fluka 18030)
10 mg Xylencyanol (Merck 10590)
0,2 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)
50,0 ml Glycerin (Serva 23175)
49,8 ml Aqua dest.

Lagerung bei Raumtemperatur

Größenstandard 1 kBp-Leiter (für 50 Spuren)

250 µl Gel Loading Buffer
250 µl TE-Puffer
50 µl 1 kBp-Leiter (1 µg/µl; Gibco BRL)
700 µl Aqua dest.
25 µl (= 1 µg) je Marker-Spur

Größenstandard 1 kBp-Leiter (doppelt konzentriert)

250 µl Gel Loading Buffer
250 µl TE-Puffer
100 µl 1 kBp-Leiter (1 µg/µl; Gibco BRL)
650 µl Aqua dest.
25 µl (= 2 µg) je Marker-Spur

TBE-Puffer (Stammlösung 10x) nach Sambrook et al. (1989)

108 g TRIS-Base (Roth 4855)
550 g Borsäure (Roth 6943)
40 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)
ad 1000 ml Aqua dest.

Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C

TBE-Puffer (für Elektrophorese 0,5x)

250 ml 10x TBE
ad 5000 ml Aqua demin.

Geräte

Elektrophoresekammern

(Eigenbau der BBA Braunschweig, Institut für Biochemie und Pflanzenvirologie)
Elektrodenabstand: 37 cm, Gelbreite: 20 cm, Gellänge: 25 cm, Puffervolumen 2,2 l;
Kämme mit je 24 Taschen, Taschenquerschnitt: 5,0 mm x 2,5 mm; Jeweils zwei Elektrophoresekammern waren an eine Stromversorgung angeschlossen

Stromversorgung (Biometra Powerpack P24; Spannung: 0-250 V; Strom: 0-600 mA)

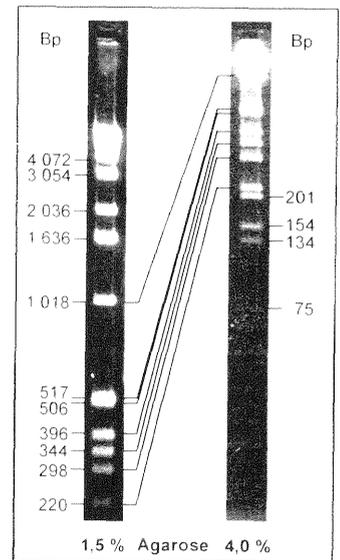


Abb. 5: Auftrennung der Größenstandards (links 1 µg, rechts 2 µg DNA; 2h, 250 V)

2.6.1 Auftrennung der PCR-Produkte

Für ein 1,5%iges Agarosegel wurden 3,0 g Agarose in 200 ml 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und auf 60 °C unter fließendem Wasser schüttelnd abgekühlt. Die flüssige Agarose wurde in das mit Tesafilm abgeklebte Geltablett eingegossen.

Um 40 Proben aus einem Reaktionsansatz gleichzeitig untersuchen zu können, wurden zwei Käbme im Abstand von 10 cm in das Gel eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurden die Käbme vorsichtig herausgezogen. Anschließend wurden die Vorratskammern der Elektrophoreseapparatur mit 0,5x TBE Puffer befüllt, so daß das Gel mit ca. 0,5 cm Puffer überschichtet war. Vor der Elektrophorese äquilibrierten die Gele einige Stunden im Puffer. Die Gele konnten einige Tage in den Kammern aufbewahrt werden, wenn verdunstetes Wasser regelmäßig ersetzt wurde.

Die PCR-Proben aus dem Thermocycler bzw. im Kühlschrank gelagerte Proben wurden mit je 5 ml Gel Loading Puffer versetzt und leicht anzentrifugiert. Vor dem Überführen der Amplifikate in das Gel wurde die Probe mit dem Gel Loading Puffer durch Auf- und Abziehen mit der Pipette durchmischt. Anschließend wurden 45 µl der gefärbten Probe unter dem Paraffinöl herauspipettiert und in die Geltaschen übertragen. In die jeweils äußeren Taschen wurden 25 µl des Größenstandards (Auftrennung siehe Abb. 5, linke Spur) einpipettiert und danach die Elektrophorese gestartet. Die angelegte Spannung betrug 250 V bei einer Laufzeit von ca. 120 min. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Bande ca. 10 cm im Gel gewandert war.

2.6.2 Auftrennung der Produkte des Restriktionsverdaus

Für ein 4,0%iges Agarosegel wurden 8,0 g Agarose in 200 ml 0,5x TBE-Puffers im sprudelnden Wasserbad aufgekocht. Sobald die Agarose vollkommen gelöst war, wurden die Schraubflaschen kräftig geschüttelt. Luftblasen ließen sich durch weiteres Kochen für 20 min im sprudelnden Wasser entfernen. Die flüssige Agarose wurde heiß in das mit Tesafilm abgeklebte Geltablett eingegossen. Das weitere Vorgehen ist unter 2.6.1 geschildert.

Die Produkte des Restriktionsverdaus wurden aus den Reaktionsgefäßen pipettiert und in die Geltaschen übertragen. In die jeweils äußeren Taschen wurden 25 µl des doppelt konzentrierten Größenstandards (= 2 µg) einpipettiert (Auftrennung siehe Abb. 5, rechte Spur) und danach die Elektrophorese gestartet. Die angelegte Spannung betrug 250 V bei einer Laufzeit von 120 min.

2.6.3 Färbung der Agarosegele mit Ethidiumbromid

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen, mit Aqua demin. gespült und für 15-20 min in der Ethidiumbromid-Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel durch zweimaliges Spülen in Aqua demin. für je ca. 30 min entfärbt. Nicht an DNA interkaliertes Ethidiumbromid, welches unspezifisch den Hintergrund anfärbt, wurde dadurch entfernt.

2.7 Dokumentation

UV-Illuminator	Bachhofer, Reutlingen mit 254 nm und 365 nm Auflicht; 312 nm Durchlicht
Photodokumentation	Sofortbildkamera Polaroid MP 4 mit UV-Filter (Kodak Wratten 2A) und Orange-Filter (Kodak Wratten 22) Filme: Polaroid 667 ISO 3000
EDV-Dokumentation	Epson Scanner GT 8000, Rechner HCSS Pentium 133 mit 48 MB RAM und 2,6 GB Festplattenspeicher
Densitometrie-Software	ScanPack II von Biometra

Nach Elektrophorese und Anfärbung konnten die Bandenmuster unter dem UV-Auflicht bei 254 nm sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden mit einer Polaroid MP4-Kamera und Polaroid 667-Film durch UV- und Orange-Filter bei Blende 11 fotografiert. Die Belichtungszeit betrug dabei je nach Intensität der Banden 17-28 s. Die Photos wurden ca. 70 s bei 20 °C entwickelt.

Die Polaroidphotos wurden mit dem Programm ScanPack II und einem Epson GT 8000 Scanner bei einer Auflösung von 400 dpi gescannt und als Dateien im Bitmap-Grafikformat mit einer Auflösung von 100 dpi abgespeichert.

Für die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden jeweils zwei gespeicherte Photos mittels Micrografix Picture-Publisher Version 6.0 zusammengesetzt und bei einer Drucker-Auflösung von 600 dpi ausgedruckt.

2.8 Auswertung

2.8.1 Random Amplified Polymorphic DNA

Mit dem Densitometerprogramm ScanPack II wurde zunächst das Densitogramm der einzelnen Spuren erstellt. Anhand der Molekulargewichtsmarker als Größenstandards konnte anschließend den einzelnen RAPD-Banden ihr approximiertes Molekulargewicht zugeordnet werden. In das Programm integriert ist eine Clusteranalyse, welches über die Densitogramme der Spuren oder über die Molekulargewichte der RAPD-Banden Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Proben ermitteln kann.

Als Nachteil bei der Erstellung der Clusteranalysen erwies sich, daß jeweils nur Proben, die mit einem Primer untersucht wurden, verglichen werden konnten.

Das Programm wurde daher bei den Vorversuchen zur groben Gruppierung der Isolate herangezogen. Festgestellte Gruppierungen wurden durch wiederholte PCR validiert.

2.8.2 Restriktionsanalysen der ITS-Region

Zur Darstellung der prozentualen Ähnlichkeiten der Isolate anhand der ITS-Restriktionsmuster wurden Clusteranalysen durchgeführt. Dazu wurde die Gesamtzahl aller Bandenpositionen ermittelt, die mit einer Restriktionsuntersuchung erzielt wurden. Anschließend wurde jede Probe innerhalb dieses Bandenrasters auf vorhandene (1) oder nicht vorhandene (0) Banden bonitiert und daraus eine 0-1-Matrix erstellt. Ungeschnittene Fragmente und Produkte, die aus dem offensichtlichen Überverdau bzw. Teilverdau mancher Enzyme resultierten, wurden mit bonitiert, da sie aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit unter den gleichen Reaktionsbedingungen als zusätzliche Ähnlichkeitsmerkmale herangezogen wurden.

Die Matrizen aller sechs Restriktionsuntersuchungen wurden zusammengefaßt und clusteranalytisch ausgewertet. Die Ähnlichkeitsmatrix wurde über den Dice-Koeffizient (S_{Dice}) erstellt (Dice 1945):

$$S_{\text{Dice}} = \frac{2h}{a+b}$$

h = Anzahl identischer Beobachtungen (Banden) bei Probe A und B
 a = Gesamtzahl der Beobachtungen (Banden) bei Probe A
 b = Gesamtzahl der Beobachtungen (Banden) bei Probe B

Synonym zum Dice-Koeffizienten ist Nei und Li's genetic distance (Nei & Li 1979) sowie der Band-Sharing-Index (Lynch 1990). Diese Koeffizienten erwiesen sich für RFLP- und Fingerprinting-Auswertungen als brauchbar (Hartung & Civerolo 1989; Francis et al. 1994; Moser & Lee 1994; Stammers et al. 1995). Der Dice-Koeffizient wurde für die vorliegenden Untersuchungen gewählt, weil die gemeinsam vorhandenen Eigenschaften stärker gewichtet werden (Sneath & Sokal 1973).

Die Ähnlichkeitsmatrix wurde über die 'unweighted pair grouping method using arithmetic averages' - UPGMA (Sokal & Michener 1958; Sneath & Sokal 1973) verrechnet und als Dendrogramm dargestellt. UPGMA wird als brauchbare Grundlage zur Darstellung von Ähnlichkeits- oder Distanzdaten in Phenogrammen genannt (Kohn 1992).

Zur Berechnung der Ähnlichkeitsmatrix wurde das Programm SIMQUAL, zur Clusteranalyse das Programm SAHN und zur Dendrogrammerstellung das Programm TREE des Programmpaketes NTSYS-PC (Rohlf 1992) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Methodik

3.1.1 ITS-RFLP

Die ITS-RFLP-Muster zeichnen sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Versuchen aus, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Die verwendeten Restriktionsenzyme mit kurzen Erkennungssequenzen produzieren erwartungsgemäß viele Fragmente, die als Marker zur Isolatcharakterisierung herangezogen werden. Einzelne Restriktionsfragmente sind versuchsübergreifend über die eingesetzten Fragmentgrößenstandards vergleichbar (Abb. 6, Abb. 10, Abb. 16, Abb. 13). Bewußter Überverdau, durch den Einsatz höherer Enzymkonzentrationen, führt zu einer erwünschten und unter den gleichen Bedingungen reproduzierbaren Erhöhung der Markeranzahl. Der direkte Verdau der PCR-Produkte ohne zusätzliche Aufreinigung oder Extraktion der DNA bereitet keine Schwierigkeiten. Ob ein partieller Verdau, welcher bei Bsp 143 I oder Alu I bei einigen Isolaten beobachtet wurde, auf das jeweilige Enzym oder auf den Einfluß der Salze des PCR-Reaktionspuffers zurückzuführen sind wurde nicht weiter untersucht.

3.1.2 RAPD

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen erwiesen sich die RAPD-Muster in beiden verwendeten Thermocyclern als reproduzierbar. Die Primer, die für die RAPD eingesetzt wurden, amplifizieren unterschiedlich konservative Bereiche der genomischen DNA. Primer 15, 44 und 63 (Abb. 18-Abb. 21a, b, e, Abb. 12b) bilden häufig für näher verwandte Gruppen monomorphe Banden aus, die Ähnlichkeiten zwischen den Gruppen aufzeigen. Primer 27 (Abb. 9g, Abb. 18-Abb. 21g) oder Primer 55 (Abb. 18-Abb. 21h) produzieren, abhängig vom Verwandtschaftsgrad der Isolate zueinander, nahezu ausschließlich gruppenspezifische Muster. Es wurden verschieden Primerklassen (siehe Tab. 6 und Abschnitt 0) für die Untersuchungen verwendet. Es zeigte sich, daß simple-repeat-Primer 6, 15, 16, 32, wie auch die Core-Sequenz des Phagen M13 (Primer 5), brauchbare, d. h. auswertbare Bandenmuster liefern. Sehr gute Ergebnisse wurden ebenfalls mit allen willkürlich gewählten Primern erzielt. Die 8-Basen-Primer, eigentlich für AFLP-Anwendungen gedacht, zeigten unter den getesteten PCR-Bedingungen keine Amplifikationsmuster. Mit Ausnahme von Primer 27 (Abb. 9g, Abb. 12e, Abb. 18-Abb. 21g) und 40 (Abb. 9h) produzierten die Standard-10-Basen Primer im Gegensatz zu den ersten drei Klassen gar keine oder nur wenige Marker (dargestellt ist Primer 22 - Abb. 12f). Generell zeigte sich, daß die Amplifikation mit den längeren Primern (15, 16 und 21 Basen) im Durchschnitt zu besser auswertbaren Bandenmustern führt, als die Untersuchungen mit Standard-RAPD-Primern.

3.2 Sektion *Discolor*

3.2.1 ITS-RFLP bei Arten aus der Sektion *Discolor*

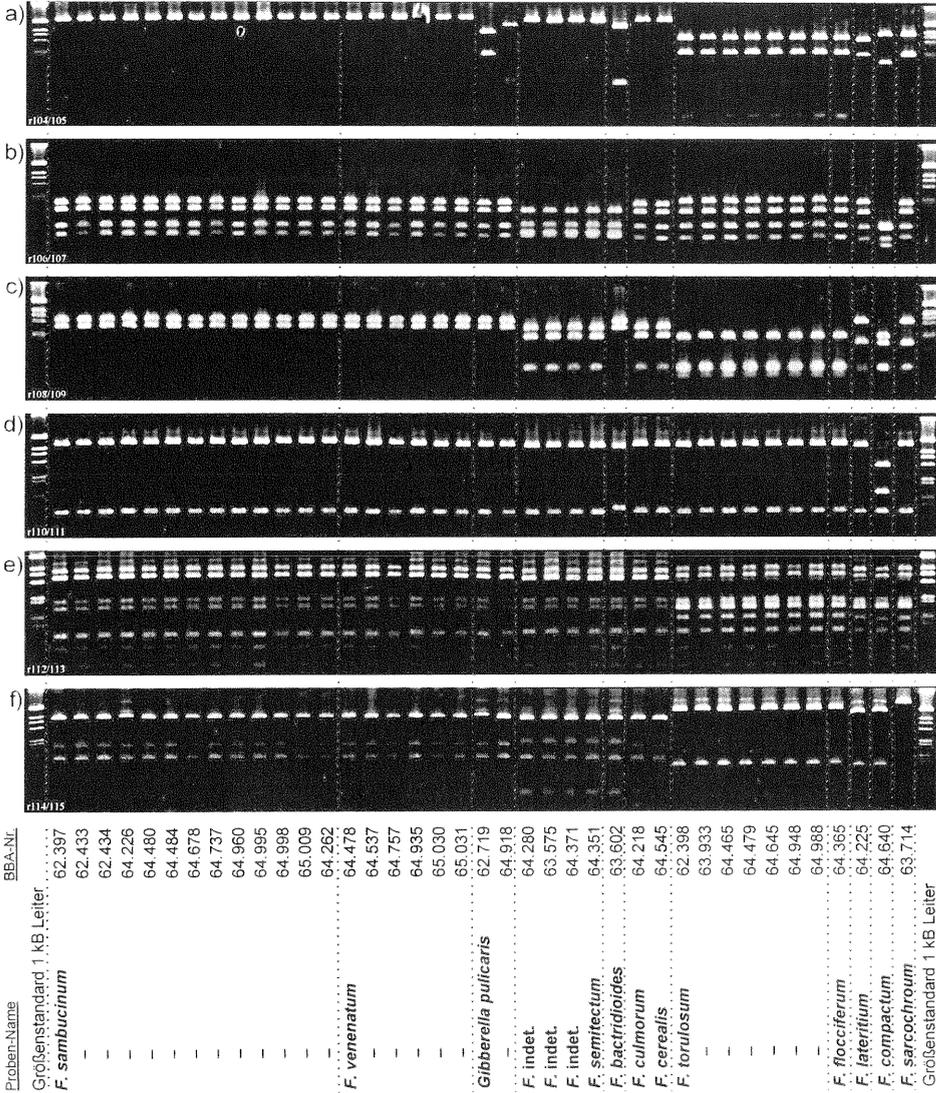


Abb. 6: ITS-RFLP Ergebnisse bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Discolor*
 Restriktionsenzyme: a) Msp I + Rsa I; b) Hae III + Hinf I; c) Hha I + Taq I; d) BsiZ I; e) Bsp 143 I;
 f) Alu I.

Die clusteranalytische Auswertung der Restriktionsuntersuchungen der ITS-Region einschließlich des 5,8S rDNA-Abschnittes unterscheidet drei Gruppen bei einem Ähnlichkeitsniveau von ca. 68 % (Abb. 7).

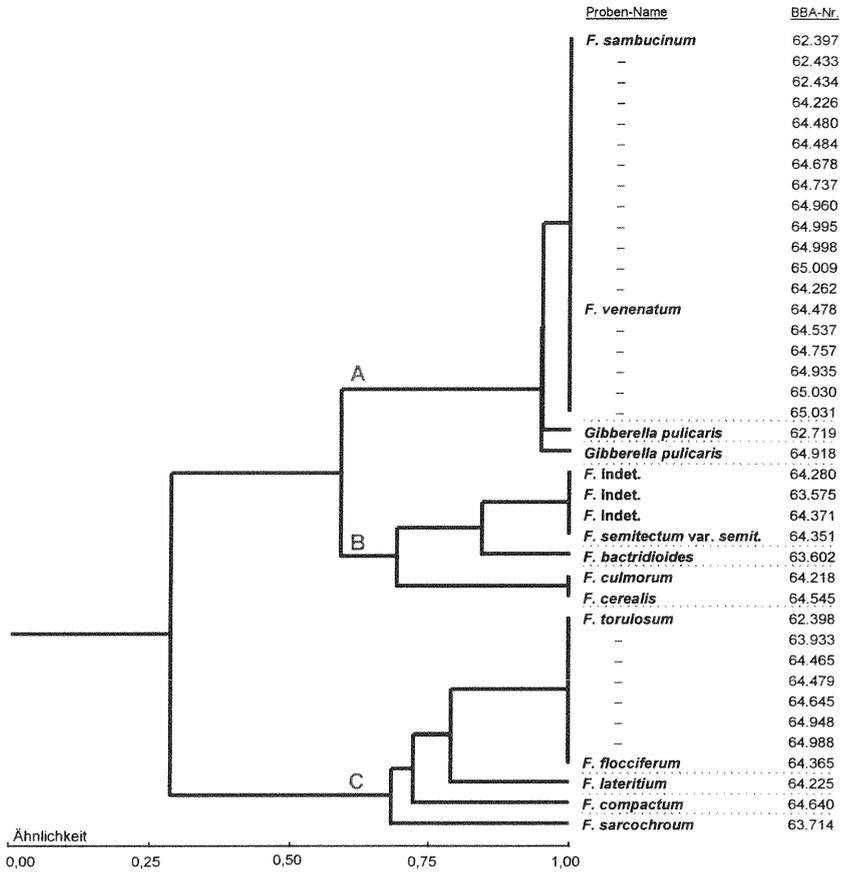


Abb. 7: Clusteranalyse der ITS-RFLP Untersuchungen bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Discolor*

In der Gruppe A werden die Isolate von *Fusarium sambucinum*, *F. venenatum* und mit geringen Unterschieden die Isolate von *Gibberella pulicaris* geclustert. Die *G. pulicaris*-Isolate 62.719 und 64.918 unterscheiden sich von *F. sambucinum* und *F. venenatum* nur durch den Verdau mit Msp I+Rsa I, alle anderen verwendeten Restriktionsenzyme generieren gleiche Fragmente (Abb. 6). *Fusarium sambucinum* und *F. venenatum* können hier nicht unterschieden werden. Erst durch bewußte Änderung der Restriktionsbedingungen konnte mit der Enzymkombination Hae III+Hinf I ein teilweiser Überverdau erzielt werden, mit dessen Hilfe Isolate von *F. sambucinum* und *F. venenatum* differenzierbar sind. Bei Isolaten von *F. venenatum* sind dabei durch eine zusätzlich auftretende Schnittstelle weitere Banden zu erkennen (Abb. 8 - Pfeile). Das Isolat 64.262, welches anhand der RAPD Muster (vgl. Abb. 9) nicht eindeutig zugeordnet werden kann, ist in den ITS-RFLP-Mustern mit *F. sambucinum* identisch. Zu Isolaten der ITS-RFLP-Gruppe B besteht eine Ähnlichkeit von ca. 60 %.

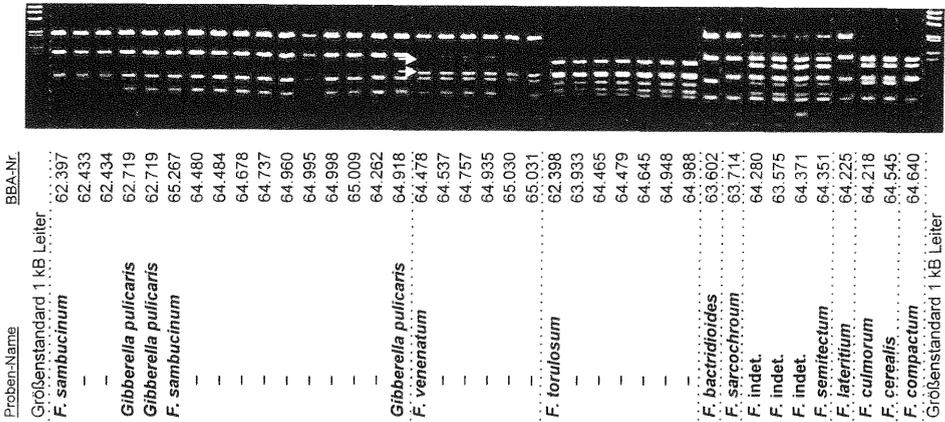


Abb. 8: ITS-RFLP-Ergebnisse bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Discolor* durch Überverdau. Restriktionsenzyme: Hae III + Hinf I im Doppelverdau, je Enzym wurden 3 U eingesetzt. Zwei zeitlich unabhängige DNA-Präparationen bei Isolat 62.719. Pfeile - Fragmente durch Überverdau.

Innerhalb der Gruppe B werden Isolate von *Fusarium cerealis*, *F. culmorum*, *F. bactridioides* sowie die Stämme 64.280, 63.575, 64.371 und das als *F. semitectum* bezeichnete Isolat 64.351, geclustert. Letztgenannte Stämme mit unklarer Zuordnung zu *F. sambucinum* lassen sich durch ein eigenständiges Muster eindeutig abgrenzen. In deren Nähe wird mit einer Ähnlichkeit von ca. 82 % der Stamm von *F. bactridioides* und mit einer Ähnlichkeit von ca. 68 % die Isolate mit gleichen Restriktionsmustern von *F. cerealis* und *F. culmorum* gestellt.

Stämme von *Fusarium torulosum* lassen sich von *F. sambucinum* und *F. venenatum* mit Ausnahme der Untersuchung mit BsiZ I stets abgrenzen, wobei das Isolat von *F. flocciferum* (64.365) mit den untersuchten Restriktionsenzymen von *F. torulosum* nicht zu unterscheiden ist. Die als weitere Kontrollen eingesetzten Isolate von *F. lateritium*, *F. compactum* und *F. sarcochroum* weisen zu *F. torulosum* und *F. flocciferum* Ähnlichkeiten von ca. 68-80 % auf. Die Auswertung aller Banden clustert diese Gruppe C mit einer Ähnlichkeit von 30 % weit entfernt von den anderen beiden Gruppen.

3.2.2 RAPD-Ergebnisse bei Arten der Sektion *Discolor*

Von den untersuchten Primern wurden mit den Primern 21 und 22 keine Fragmente amplifiziert. Primer 13, 14, 17, 20 und 23 produzieren lediglich ein bis zwei schwache Banden und Primer 31 und 33 zeigen unspezifische Amplifikationen. Primer Nr. 24, 25, 26 und 60 ergeben deutlichere Muster mit wenigen Banden. Die Ergebnisse sind anhand der gut amplifizierenden Primer 05, 06, 15, 27, 32, 40, 44, 63 dargestellt.

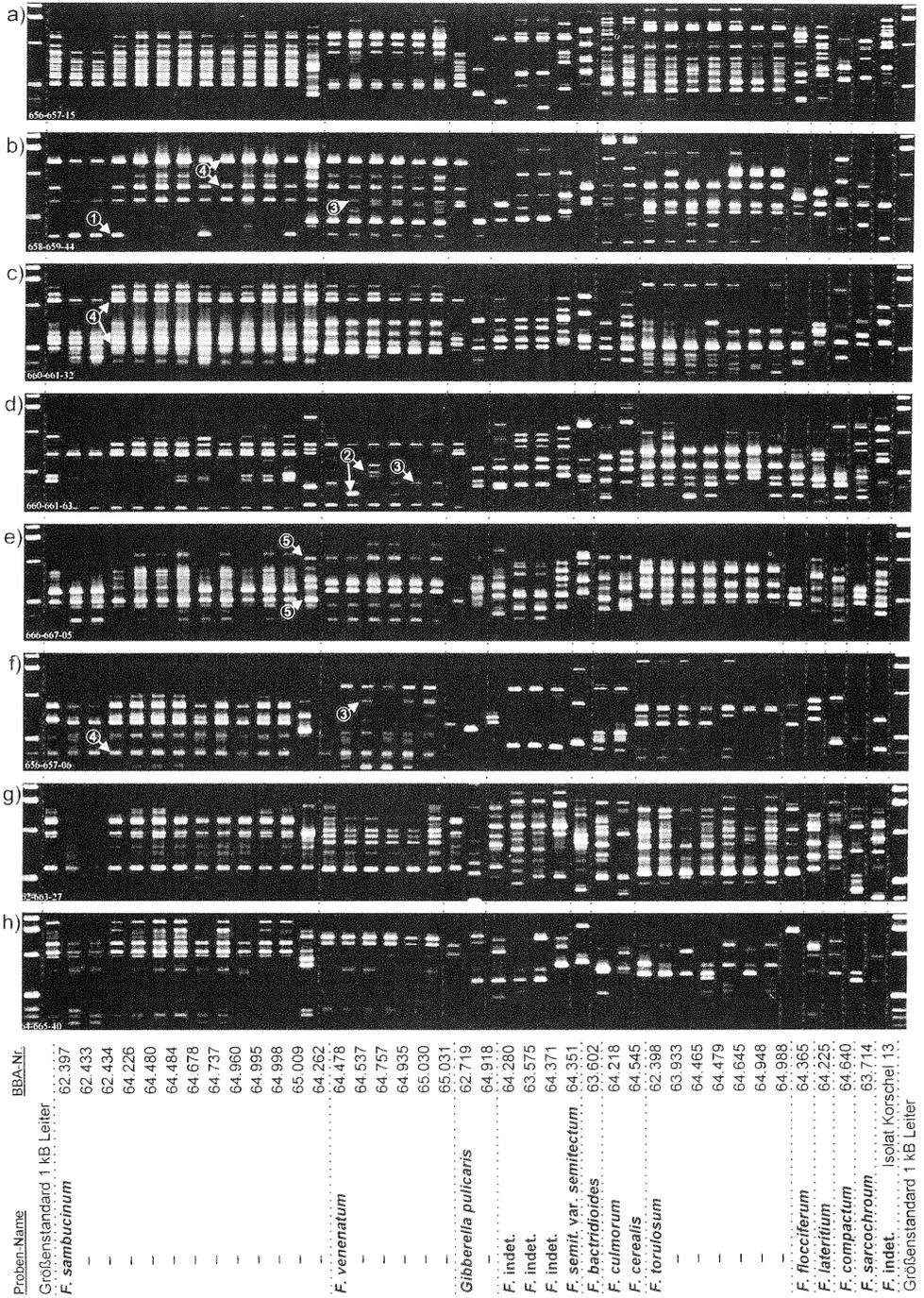


Abb. 9: RAPD-Bandenmuster bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Discolor*.
 Primer: a) 15; b) 44; c) 32; d) 63; e) 05; f) 06; g) 27; h) 40.

Klar sind die mit der RAPD differenzierbaren Gruppenzugehörigkeiten erkennbar, die im wesentlichen den untersuchten Arten entsprechen.

Mit Ausnahme des brasilianischen Isolates 64.262, zeigen alle getesteten *Fusarium sambucinum*-Isolate sehr einheitliche Muster. Eine Untergruppe mit geringen Abweichungen zum typischen Bandenmuster kann aus den aus Spanien und Iran stammenden Isolaten 62.433 und 62.434 sowie dem *Gibberella pulicaris*-Isolat 62.719 gebildet werden. Einen weiteren Polymorphismus zeigt Primer 44 (Abb. 9b - Pfeil ①), der die *F. sambucinum*-Isolate in zwei Gruppen teilt. Von zwei Stämmen des Teleomorphs *G. pulicaris* entsprechen bei Stamm 62.719 die Bandenmuster mit geringen Abweichungen denen von *F. sambucinum*, während die Muster von Stamm 64.918 nicht zuzuordnen sind. Eine geringe intraspezifische Variabilität weisen die Isolate von *F. venenatum* auf, wobei einige Banden- und Intensitätspolymorphismen mit Primer 63 bei den Isolaten 64.537 und 64.757 zu erkennen sind (Abb. 9d - Pfeil ②). Weitere Polymorphismen an schwach amplifizierten Banden sind mit den Primern 44, 63 und 06 erkennbar (Abb. 9b, d, f - Pfeil ③). Zwischen *F. sambucinum* und *F. venenatum* sind einige Banden monomorph, d. h. sie weisen identische Bandenpositionen auf, die besonders mit Primer 32, 44 und 06 ersichtlich sind (Abb. 9b, c, f - Pfeil ④).

Das aus den arttypischen Bandenmustern herausfallende brasilianische Isolat 64.262 bildet mit Primer 05 eine zu *Fusarium venenatum* monomorphe Bande aus, während eine andere monomorph zu *F. sambucinum* ist (Abb. 9e - Pfeil ⑤). Weitere Banden, die charakteristisch für *F. venenatum*-Isolate sind, werden mit Primer 44 und 63 ausgebildet. Eine zu *F. sambucinum* monomorphe Bande zeigt auch die Untersuchung mit Primer 27.

Isolate von *Fusarium torulosum* besitzen eine stärkere intraspezifische Variabilität, die besonders bei der Untersuchung mit Primer 40 zu erkennen ist (Abb. 9g). Neben artcharakteristischen Banden, treten abhängig vom eingesetzten Primer weitere Polymorphismen auf. Anhand einzelner polymorpher Marker (= Banden) lassen sich die Isolate gruppieren. Bezogen auf die Summe der mit allen Primern erzielten Polymorphismen sind die Muster isolatspezifisch. Das Isolat von *F. flocciferum* (64.365), welches identische ITS-RFLP Muster mit *F. torulosum* aufweist, läßt sich über die Bandenmuster deutlich abgrenzen. Allerdings treten einige zu *F. torulosum* monomorphe Banden mit Primer 32, 63, 65, 27 (Abb. 9c, d, e, g) auf.

Eine weitere eigenständige RAPD-Gruppe kann aus Isolaten 63.575, 64.371, 64.280 und 64.351 gebildet werden, die auch nach den ITS-RFLP-Ergebnissen abgrenzbar ist. Beide erstgenannten Isolate sind in ihren Bandenmustern zueinander sehr ähnlich. Die Isolate 64.280 und 64.351 zeigen primerabhängig größere Unterschiede.

Von den Kontrollstämmen weisen *Fusarium culmorum* (64.218) und *F. cerealis* (64.545) zueinander ähnliche Muster auf. Die anderen Kontrollen *F. bactridioides*, *F. sarcochroum*, *F. lateritium* und *F. compactum* zeigen Einzelmuster, die mit keinem der anderen getesteten Isolate übereinstimmen.

Das unbestimmte Isolat „Korschel 13“ kann, da sein Muster keinem der vorliegenden RAPD-Muster entspricht, keinem der getesteten Isolate zugeordnet werden.

3.3 Sektion *Eupionnotes*

3.3.1 ITS-RFLP bei *F. tabacinum* und anderen *Fusarium*-Arten

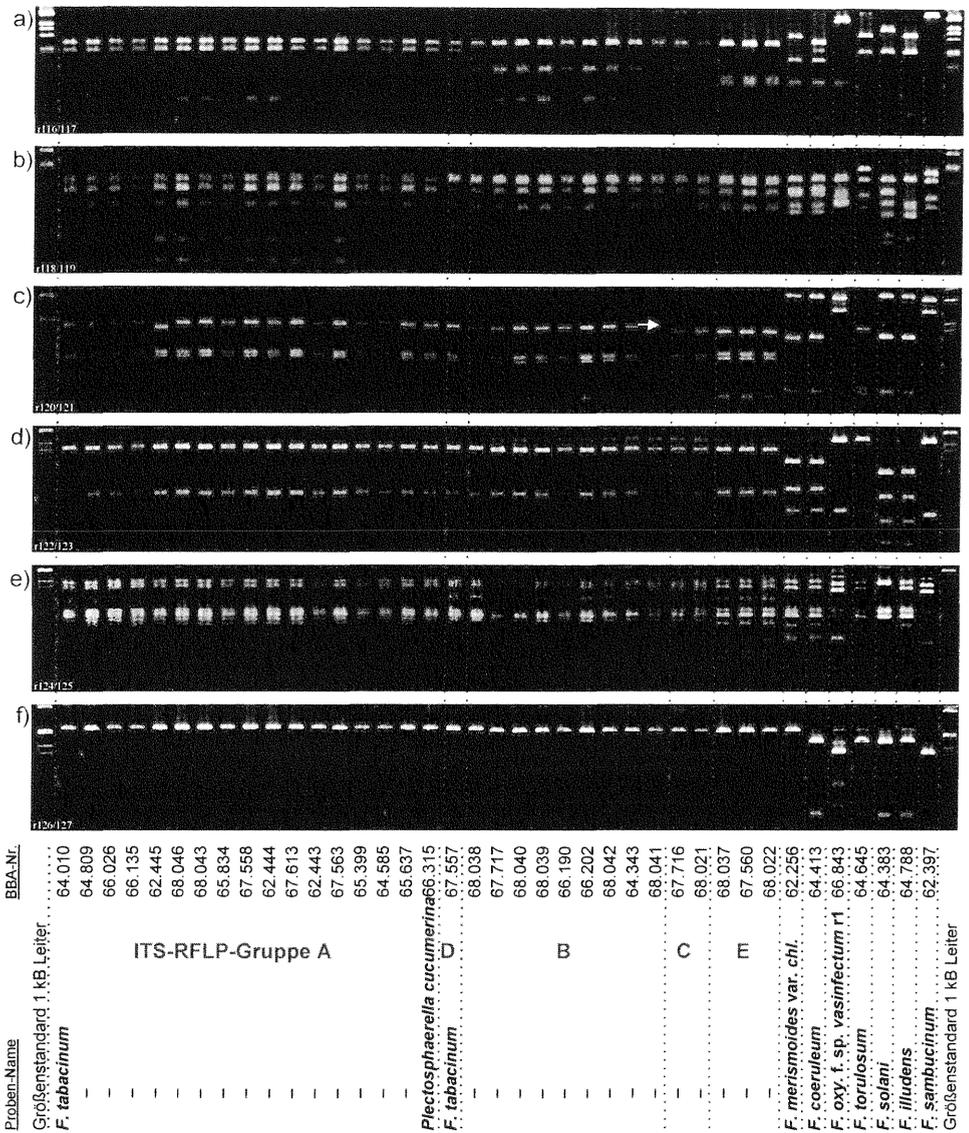


Abb. 10: ITS-RFLP-Ergebnisse bei *Fusarium tabacinum* und anderen *Fusarium*-Arten
 Restriktionsenzyme: a) Msp I + Rsa I; b) Hae III + Hinf I; c) Hha I + Taq I; d) BsiZ I;
 e) Bsp 143 I; f) Alu I.

Fusarium tabacinum-Isolate stellen sich anhand der ITS-RFLP-Untersuchungen (Abb. 10) sehr uneinheitlich dar. Unter Berücksichtigung aller verwendeten Restriktionsenzyme lassen sich die fünf Mustergruppen A-E bei *F. tabacinum* differenzieren. Nach der Clusteranalyse (Abb. 11) unterscheiden sich die Gruppen A, B und C bei einem Ähnlichkeitslevel von ca. 94 % nur gering, wobei sich die Gruppe C von B nur durch einen mit Hha I+Taq I erkennbaren Längenpolymorphismus (Abb. 10c - Pfeil) unterscheidet. Der gleiche Polymorphismus ist bei Isolat 62.445 innerhalb der Gruppe A festzustellen. Aufgrund der Ähnlichkeit in den RAPD-Mustern (Abb. 12a, b) mit Isolaten aus der ITS-RFLP-Gruppe wurde er in der clusteranalytischen Auswertung nicht bonitiert. Das Isolat 67.557 bildet mit Hae I+Hinf I (Abb. 10b) ein von den anderen abgrenzbares Muster aus und wird dadurch in Gruppe D geclustert, wobei Übergänge zu den anderen Gruppen vorhanden sind. Gleiche Restriktionsfragmente mit Gruppe A werden durch den Verdau mit Msp I+Rsa I erreicht, während mit Gruppe B identische Muster mit Bsp 143 I erzielt werden.

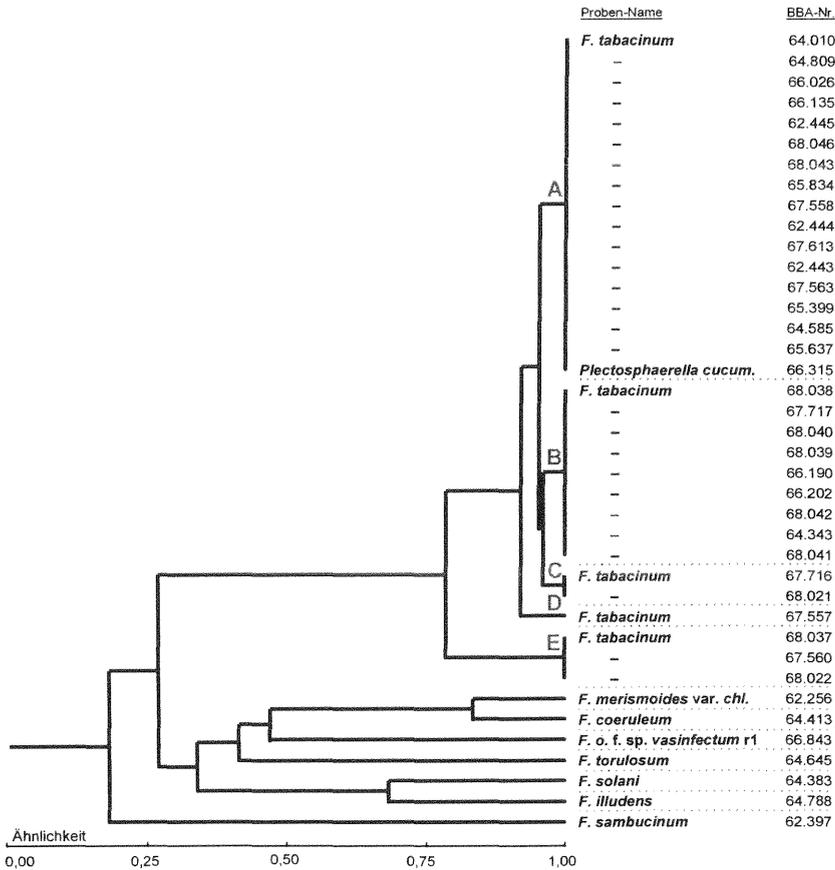


Abb. 11: Clusteranalyse der ITS-RFLP-Resultate bei *Fusarium tabacinum* und anderen *Fusarium*-Isolaten

Gruppe E ist mit drei der sechs Enzyme bzw. Enzymkombinationen von den anderen deutlich abzugrenzen. In dieser Gruppe sind die Isolate 68.037, 67.560 und 68.022 enthalten, die alle von *Cucurbita* isoliert wurden. Korrelationen morphologischer Merkmale, ihrer Matrix oder Herkunft der Isolate zu den ITS-RFLP-Gruppen A-D bestehen nicht.

Als Kontrollen eingesetzte Isolate von *Fusarium merismoides* var. *chlamydosporale*, *F. coeruleum*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Rasse 1, *F. torulosum*, *F. solani* var. *solani*, *F. illudens* und *F. sambucinum* zeigen unterschiedliche Muster und werden mit einer geringen Ähnlichkeit von ca. 26 % weit entfernt von den *F. tabacinum*-Isolaten geclustert (Abb. 11). Beachtenswert ist bei *F. coeruleum* die Clusterung in die Nähe von *F. merismoides* und *F. oxysporum*, also entfernt von den anderen *Martiella*-Fusarien *F. solani* und *F. illudens*.

Die meisten Fragmentunterschiede werden mit der Enzymkombination Hae III+Hinf I erzielt, welche zu vier Mustergruppen führt. Jeweils drei Mustergruppen sind durch den Verdau mit Msp I+Rsa I oder Bsp 143 I zu differenzieren. Hha I+Taq I unterscheidet die Isolate von *F. tabacinum* nur durch einen Längenpolymorphismus der größten Bande. Keine Unterschiede sind mit den Enzymen BsiZ I und Alu I zu erreichen.

3.3.2 RAPD-Studien bei *Fusarium tabacinum*

Fusarium tabacinum zeigt eine hohe intraspezifische Variabilität in seinen RAPD-Mustern (Abb. 12). Zahlreiche unterschiedliche, teilweise isolatspezifische Muster werden mit den benutzten Primern erzielt. Mit keinem der untersuchten Primer sind Banden zu finden, die identisch bei allen Isolaten dieser Art auftreten. Verschiedene Isolate weisen jedoch anhand der Bandenmuster zueinander Ähnlichkeiten auf und lassen sich dadurch gruppieren. Identische Banden werden mit allen Primern bei den von *Cucurbita* isolierten Stämmen der ITS-RFLP-Gruppe E ausgebildet. Ebenfalls zeigen die Isolate 64.010, 64.809, 66.026 und 66.135 mit allen Primern sehr homogene Muster. Die Isolate 68.046, 68.043 und 65.834 können zu einer inhomogeneren Gruppe zusammengefaßt werden; identische Muster werden dabei nur mit den Primern 05, 06 und 15 erhalten.

Primer 16, 22 und 27 amplifizieren weniger Banden als die anderen Primer. Trotz geringerer Bandenanzahl ist ihre Verwendung gegenüber den anderen Primern interessant, da sie übergeordnet gruppieren. So gruppiert Primer 22 anhand zweier Banden die Isolate 68.040, 68.039, 66.190, 66.202 und 68.042 oder durch eine Doppelbande die Isolate 68.021, 67.557, 68.038 und 67.717 zusammen. Mit den anderen Primer werden für diese Isolate nur einige übereinstimmende Banden oder zueinander ähnliche Muster bei nicht allen Isolaten erzielt.

Das RAPD-Muster bei Isolat 67.716 mit bei ITS-RFLP-Untersuchungen mit Hae III+Hinf I festgestelltem Längenpolymorphismus (Abb. 10b - Pfeil) ist ähnlich dem Isolat 68.041 aus der Gruppe B. Vergleichbares wurde bei Isolat 62.445 gegenüber den Isolaten 64.010, 64.809, 66.026 und 66.135 mit Primern 05 und 15 festgestellt.

Korrelationen der RAPD-Bandenmustergruppen zum Wirtspflanzenspektrum bestehen nur bei den Isolaten 68.037, 67.560 und 68.022 von *Cucurbita*. Diese Isolate hatten die

gleiche geographische Herkunft aus Louisiana/USA. Die Isolate 64.010, 64.809, 66.026 und 66.135 korrelieren in ihren RAPD-Mustern mit ihrer norddeutschen Herkunft, nicht aber mit ihren Wirten. Sie weisen auch keine Ähnlichkeit zu anderen Stämmen aus Norddeutschland auf. In den anderen RAPD-Gruppierungen sind Stämme verschiedener Wirte und Bodenisolate enthalten.

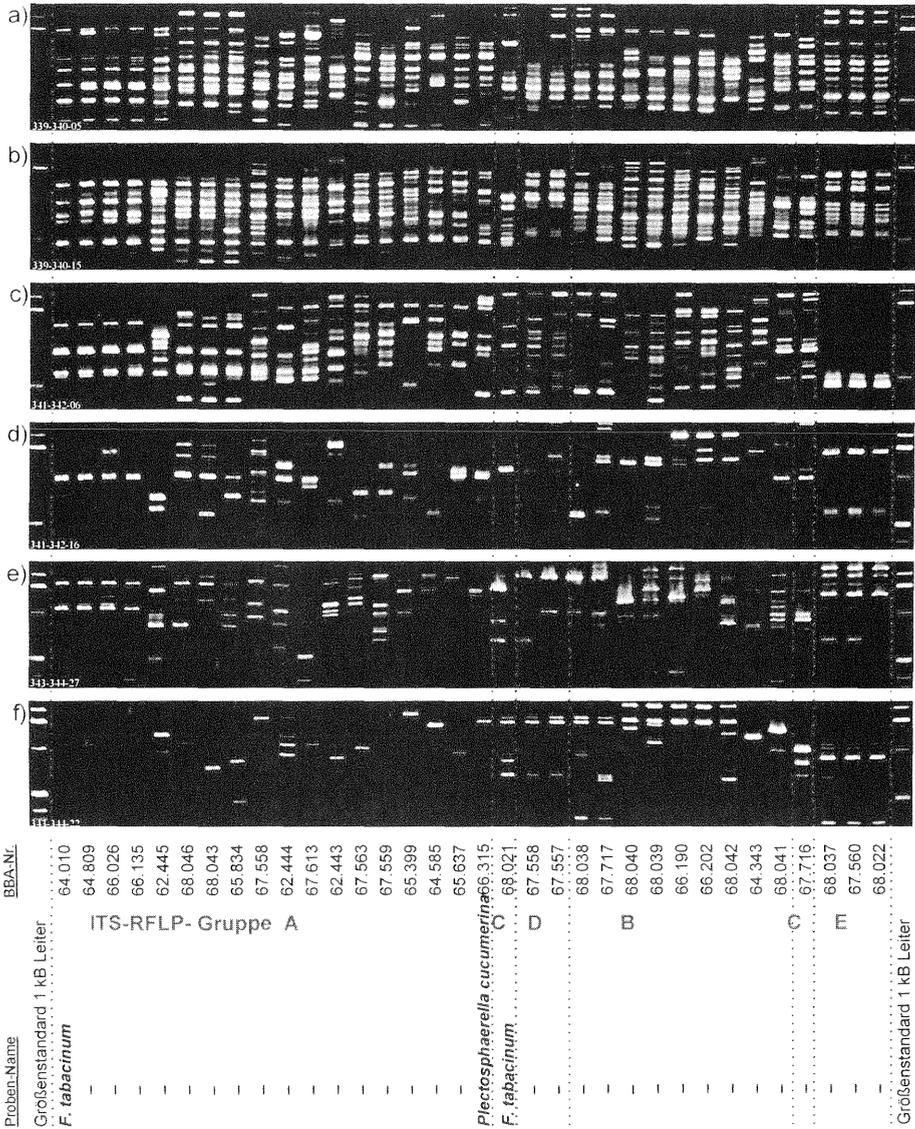


Abb. 12: RAPD-Bandenmuster bei *Fusarium tabacinum*.
Primer: a) 05; b) 15; c) 06; d) 16; e) 27; f) 22

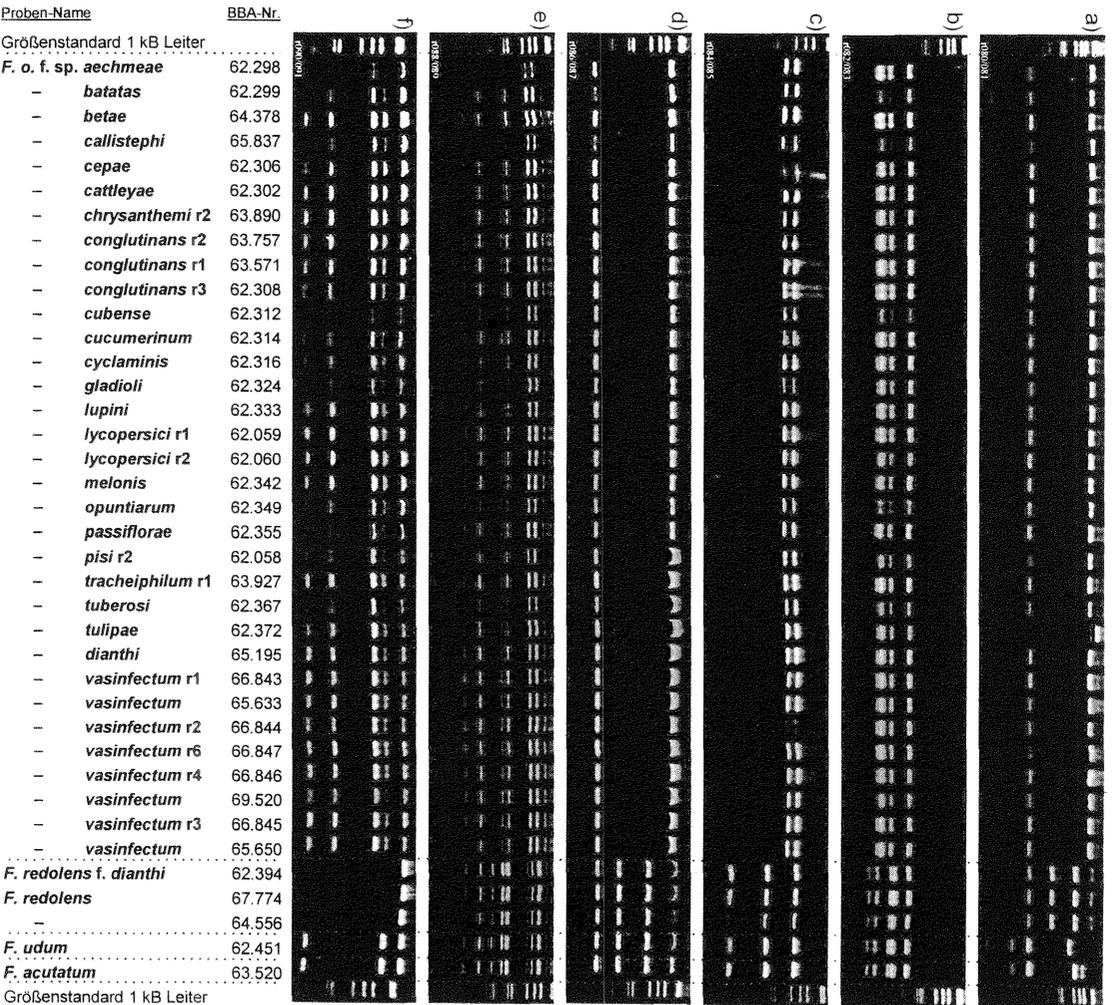
3.4 Sektion *Elegans*3.4.1 ITS-RFLP bei *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. udum* und *F. acutatum*

Abb. 13: ITS-RFLP-Ergebnisse bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Elegans*
 Restriktionsenzyme: a) Msp I + Rsa I, b) Hae III + Hinf I, c) Hha I + Taq I, d) BstZ I,
 e) Bsp 143 I, f) Alu I.

Neben *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*-Stämmen wurden Isolate weiterer spezialisierter Formen von *F. oxysporum* untersucht, wobei die Restriktionsanalysen der ITS-Region (Abb. 13a-f) für alle untersuchten Isolate mit den zur Verfügung stehenden Restriktionsenzymen identische Muster zeigen. Deutlich sind anhand der ITS-RFLP-Muster mit allen untersuchten Restriktionsenzymen Isolate von *F. redolens*, *F. udum* und *F. acutatum* zu unterscheiden. *Fusarium redolens* kann von *F. udum* und *F. acutatum* mit den Restriktionsenzymen Hae III+Hinf I sowie mit Alu I differenziert werden (Abb. 13a, f). Zwischen den untersuchten Isolaten von *F. redolens* und *F. redolens* f. sp. *dianthi* sind keine Unterschiede feststellbar. Die beiden Arten *F. udum* und *F. acutatum* lassen sich nur mit der Enzymkombination Hae III+Hinf I (Abb. 13a) trennen.

Die Clusteranalyse (Abb. 14) trennt bei einer ca. 55%igen Ähnlichkeit *F. oxysporum* von *F. redolens* sowie von *F. udum* und *F. acutatum*. *F. redolens* ist mit ca. 88% zu *F. udum* und *F. acutatum* ähnlich. Beide letztgenannten Arten werden auf einem Niveau von ca. 96 % getrennt.

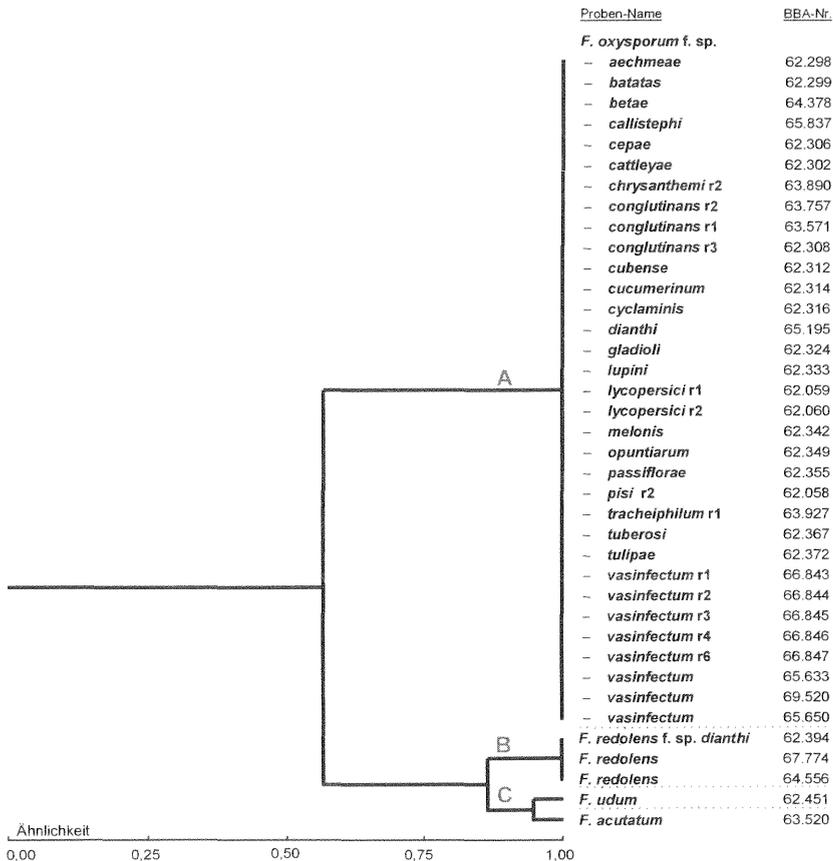


Abb. 14: Clusteranalyse der ITS-RFLP Untersuchungen innerhalb der *Fusarium*-Sektion *Elegans*

3.4.2 RAPD-Untersuchungen von *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*-Rassen im Vergleich zu *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, *F. redolens* und *F. udum*

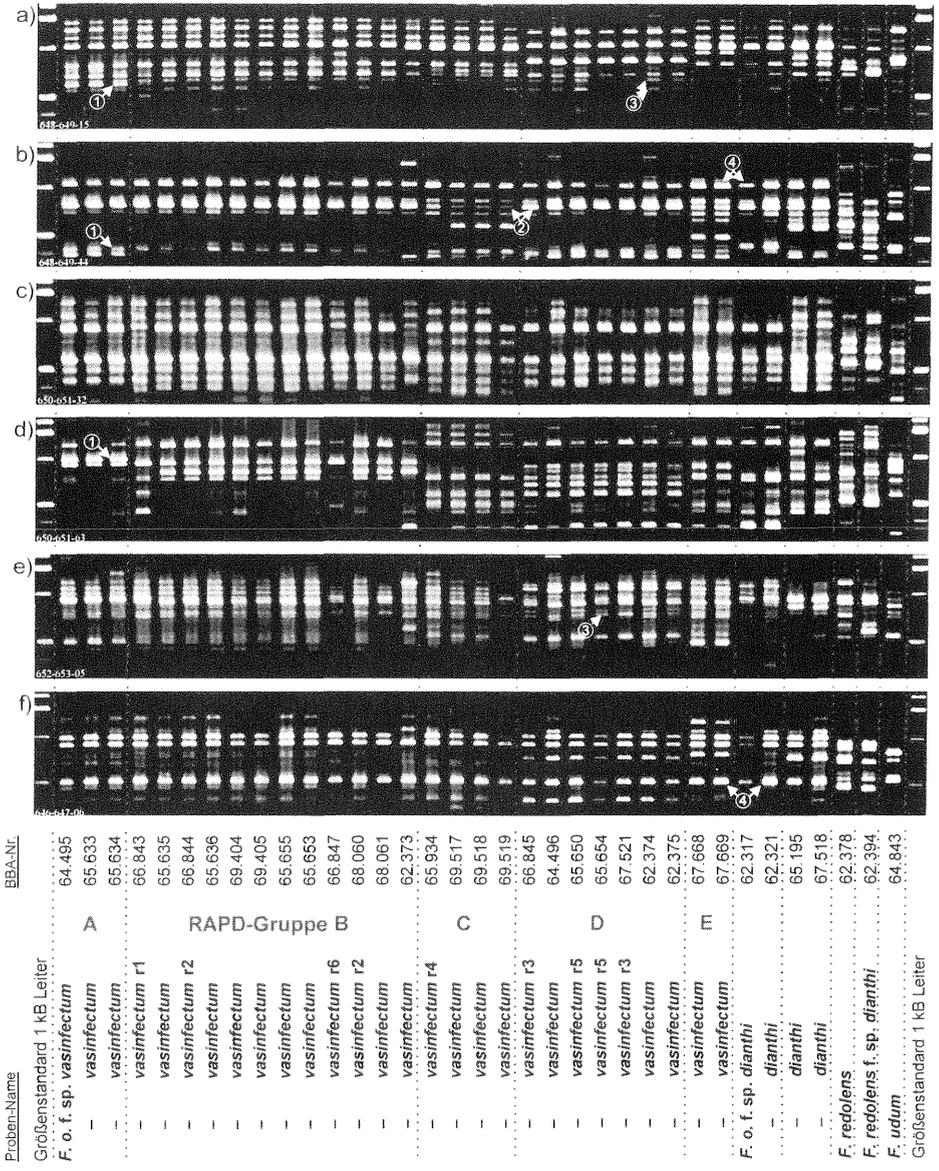


Abb. 15: RAPD-Bandenmuster bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, *F. redolens* und *F. udum*.

Primer: a) 15; b) 44; c) 32; d) 63; e) 05; f) 06.

Die untersuchten *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*-Isolate lassen sich anhand der RAPD-Muster in die fünf Gruppen A-E gliedern (Abb. 15). Zwischen den einzelnen Gruppen bestehen in den Bandenmustern Übergänge. Primer 06 generiert verhältnismäßig ähnliche Muster für die Gruppen A-C. Zueinander ähnliche Muster im Bereich der höheren Molekulargewichte zeigen die Gruppen A, B und D mit Primer 44. Klare Gruppendifferenzierungen werden mit Primer 63 erzielt. Zwei in der Stammsammlung mit *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* bezeichneten Isolate aus Angola (67.668 und 67.669) bilden innerhalb der Gruppe E gleiche Bandenmuster aus, die von den anderen Gruppen verschieden sind.

In Gruppe A befinden sich die in Reinkulturen duftenden Isolate 64.495, 65.633 und 65.634. Die Abgrenzung gegenüber den anderen Bandenmustergruppen erfolgt über zusätzliche Polymorphismen, die mit den Primern 15, 44, 63 erscheinen (Abb. 15a, b, d - Pfeil ①).

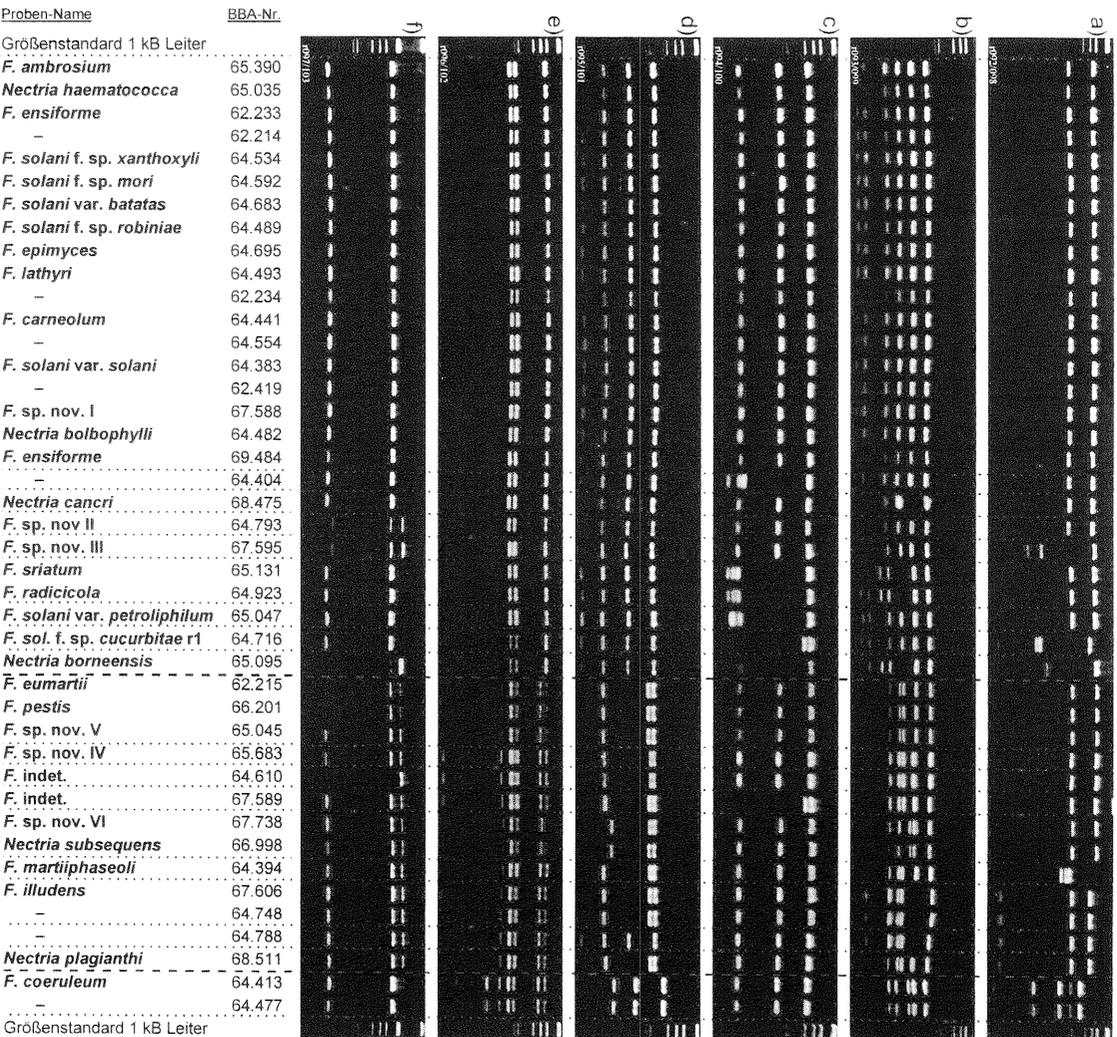
Ein hohes Maß an Ähnlichkeit zu dieser Gruppe weisen die Isolate der Gruppe B auf, in der die Referenzisolate der Rassen 1, 2 und 6 eingeordnet sind. Lediglich die Isolate 66.843, 62.373 und 66.847 fallen durch einige unterschiedliche Polymorphismen auf. Im Vergleich zu den Mustern der anderen RAPD-Gruppen ist ihre Stellung in der Gruppe B gerechtfertigt.

Deutlich abgrenzbar ist die Gruppe C mit Isolaten der Rasse 4, die insbesondere mit Primer 44 und 63 (Abb. 15b, d) deutliche Unterschiede der Bandenmuster aufweisen. Auch grenzt ein mit Primer 44 generierter, reproduzierbarer Intensitätspolymorphismus Isolate dieser Gruppe gegenüber den anderen Gruppen ab (Abb. 15b - Pfeil ②). Geringere Differenzen, vornehmlich in der Ausprägung schwacher Banden, werden mit den anderen Primern erzielt. Innerhalb der Rasse 4-Isolate sind bei den Isolaten 65.934 mit Primer 44 und 69.519 mit Primer 05 polymorphe Banden festzustellen.

In der RAPD-Gruppe D befinden sich Isolate der Rassen 3 und 5 mit sehr homogenen Bandenmustern. Es sind nur geringe Intensitätspolymorphismen und Polymorphismen bei schwach ausgeprägten Banden insbesondere mit Primer 15 und 05 feststellbar (Abb. 15a, e - Pfeil ③).

Bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* können zwei eigenständige RAPD-Mustergruppen differenziert werden, welche die Isolate 62.317 und 62.321 von den Isolaten 65.195 und 67.518 trennen. Ähnlichkeiten mit den für *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* festgestellten RAPD-Mustern bestehen in einigen monomorphen Banden, die insbesondere mit den Primern 44 und 06 zu erkennen sind (Abb. 15b, f - Pfeil ④).

Die als Kontrollen eingesetzten Isolate von *Fusarium redolens*, *F. redolens* f. sp. *dianthi* und *F. udum* sind untereinander und von *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*- sowie von *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*-Isolaten deutlich zu unterscheiden. *Fusarium redolens* und seine spezialisierte Form *dianthi* zeigen dabei zueinander ähnliche Muster. Betrachtet man die RAPD-Muster ausschließlich auf Artebene, so sind für die Arten *Fusarium redolens*, *F. udum* und *F. oxysporum* charakteristische Unterschiede festzustellen.

3.5 Sektion *Martiella*3.5.1 ITS-RFLP-Differenzierung von *Martiella*-FusarienAbb. 16: ITS-RFLP-Ergebnisse bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Martiella*.

Restriktionsenzyme: a) Msp I + Rsa I; b) Hae III + Hinf I; c) Hha I + Taq I;

d) Bsp143 I; e) Bsp 143 I; f) Alu I.

Die ITS-RFLP-Untersuchungen bei Isolaten innerhalb der Sektion *Martiella* zeigen neben einheitlichen Mustern auch deutliche Unterschiede (Abb. 16). Die übergreifende Auswertung aller Restriktionsfragmente mittels Clusteranalyse ermöglicht eine Unterscheidung der Isolate in insgesamt 19 Gruppen (Abb. 17). Eine übergeordnete Struktur in die Cluster A, B und C ist bei einem Ähnlichkeitsniveau von ca. 65 % möglich, wobei die Gruppe C deutlich mit einer genetischen Distanz von unter 0,45 von A und B abgegrenzt ist. Untergeordnete Einzelgruppen sind mit A1-A9, B1-B9 bezeichnet.

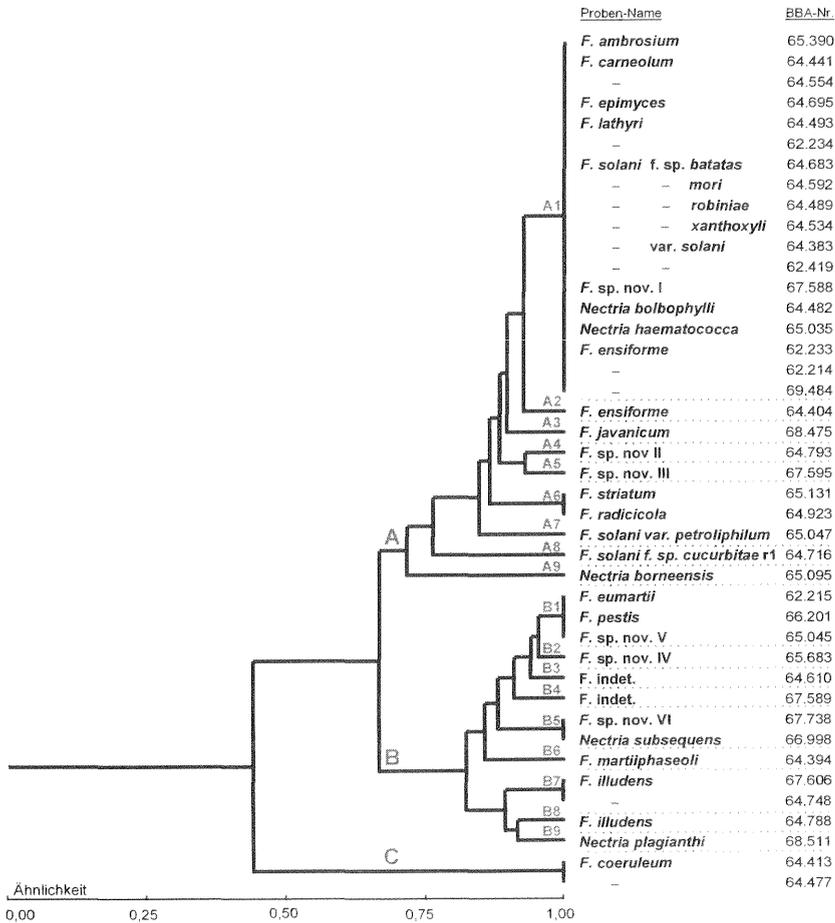


Abb. 17: Clusteranalyse der ITS-RFLP-Untersuchungen bei *Martiella* Fusarien

Eindeutig anhand der ITS-Restriktionsmustergruppen sind folgende zehn Arten charakterisiert: *Fusarium javanicum* (A3), *Fusarium* sp. nov. II, III und IV (A4, A5, B2), *F. solani* var. *petroliphilum* (A7), *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1 (A8), *Nectria borneensis* (A9), *F. martiiphaseoli* (B6), *Nectria plagianthi* (B9) sowie *F. coeruleum* (C). Isolate von *Fusarium coeruleum* werden von den anderen *Martiella*-Fusarien deutlich abgetrennt geclustert. Größere Ähnlichkeiten, als zu Isolaten der Sektion *Martiella* bestehen zu *F. merismoides* und *F. oxysporum*, wie es aus der Clusteranalyse in Kapitel 3.3.1 – Abb. 11 ersichtlich ist.

Nicht eindeutig zuzuordnen sind Isolate von *Fusarium ensiforme* und *F. illudens*, welche verschiedenen Bandenmustergruppen (A1 und A2 bzw. B7 und B8) angehören. Keine Differenzierung ist aufgrund gleicher ITS-RFLP-Muster innerhalb der Gruppe A1 bei Isolaten von *F. ambrosium*, *F. carneolum*, *F. epimyces*, *F. lathyri*, *Fusarium* sp. nov. I, *Nectria bolbophylli*, *Nectria haematococca*, den in dieser Gruppe liegenden Isolaten von *F. ensiforme*, den spezialisierten Formen *batatas*, *mori*, *robiniae*, *xanthoxyli* sowie der Varietät *solani* von *F. solani* möglich. Ebenso lassen sich über ihre Fragmentmuster *F. striatum* und *F. radicolica* innerhalb der Gruppe A6 nicht unterscheiden. Innerhalb der Gruppe B1 sind die Isolate von *F. eumartii*, *F. pestis* und *Fusarium* sp. nov. V sowie in der Gruppe B5 die Isolate von *Nectria subsequens* und *Fusarium* sp. nov. VI identisch.

Die ITS-RFLP-Untersuchungen (siehe Abb. 16) gruppieren die Isolate anhand ihrer Restriktionsfragmentmuster unterschiedlich sensitiv. Sehr feine Differenzierungen sind mit Hae III+Hinf I (Abb. 16b) in neun Fragmentmustern sowie mit Msp I+Rsa I (Abb. 16a) in sieben Mustergruppen möglich. Hha I+Taq I (Abb. 16c) unterscheidet die Isolate nach sechs und BsiZ I (Abb. 16c) nach vier Restriktionsmustern. Die einzeln eingesetzten Enzyme Bsp 143 I oder Alu I (Abb. 16e, f) erzielen für die Isolate jeweils drei unterschiedliche Restriktionsmuster. Neben dieser übergreifenden Auswertung feststellbarer Fragmentmuster innerhalb der Sektion ist es sinnvoll, die Restriktionsenzyme zu kennen, die eine eindeutige Zuordnung undefinierter Isolate mit geringem Untersuchungsaufwand ermöglichen.

Eine grobe Charakterisierung unbekannter Isolate in die Gruppen A, B oder C ermöglicht der Verdau der ITS-Amplifikate mit Bsp 143 I. Mit der Enzymkombination Msp I+Rsa I können die fünf Arten *Fusarium* sp. nov. III, *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1, *Nectria borneensis*, *F. martiiphaseoli* und *F. coeruleum* charakterisiert werden. Ebenso zeigt *F. javanicum* mit Hae III+Hinf I und *F. solani* var. *petroliphilum* mit Hha I+Taq I artspezifische Muster. Im Gegensatz dazu lassen sich die anderen Arten mit einzelnen Enzymen oder Enzympaarungen in Mustergruppen mit unterschiedlicher Abstufung zusammenfassen. So gruppieren Hae III+Hinf I oder Hha I+Taq I *Fusarium* sp. nov. VI und *Nectria subsequens* zusammen. Hae III+Hinf I zeigt gleiche Muster für *F. striatum*, *F. solani* f. sp. *eumartii* und *Nectria borneensis*.

3.5.2 RAPD-Ergebnisse bei *Martiella*-Fusarien

Die RAPD-Untersuchungen zeigen wesentlich feinere Differenzierungen mit einer höheren Variabilität als die Restriktionsuntersuchungen der ITS-Region (Abb. 18-Abb. 21). Insgesamt lassen sich die Isolate der *Martiella*-Fusarien in 31 mehr oder weniger variable RAPD-Mustergruppen unterscheiden (Tab. 11). Insgesamt können die Isolate von 25 Arten, spezialisierten Formen und Varietäten innerhalb der Sektion *Martiella* diesen Mustern zugeordnet werden. Sechs zusätzlich differenzierbare RAPD-Muster mit morphologisch unterscheidbaren Isolaten (Nirenberg, 1996 mündl. Mitt.), bislang jedoch nicht näher definierter Arten sind in dieser Untersuchung mit *Fusarium* sp. nov. I-VI gekennzeichnet.

Tab. 11: RAPD-Differenzierung innerhalb der Sektion *Martiella* und Bandenmustervariabilität

RFLP-Gruppe	geringe Variabilität	mittlere Variabilität	hohe Variabilität
A1, A2	<i>F. solani</i> f. sp. <i>batatas</i> <i>F. solani</i> f. sp. <i>xanthoxyli</i> <i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i> <i>F. solani</i> f. sp. <i>robiniae</i> <i>Nectria bolbophylli</i> <i>Fusarium</i> sp. nov. I	<i>F. ambrosium</i> <i>F. epimyces</i> <i>F. lathyri</i>	<i>F. solani</i> var. <i>solani</i> <i>F. carneolum</i> <i>Nectria haematococca</i> <i>F. ensiforme</i>
A3-A9	<i>F. solani</i> var. <i>petroliphilum</i> <i>F. striatum</i> <i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i> r1 <i>F. radicolica</i> <i>Nectria plagianthi</i> *	<i>F. javanicum</i> <i>Fusarium</i> sp. nov. II <i>Fusarium</i> sp. nov. III	
B1-B9	<i>F. pestis</i> <i>Nectria subsequens</i> * <i>Nectria borneensis</i> * <i>Fusarium</i> sp. nov. VI	<i>F. martii</i> phaseoli <i>Fusarium</i> sp. nov. V	<i>F. eumartii</i> <i>F. illudens</i> <i>Fusarium</i> sp. nov. IV
C	<i>F. coeruleum</i>		

* Für die Untersuchungen stand jeweils nur ein Isolat zur Verfügung

Innerhalb der Restriktionsgruppe A1 werden mit der RAPD insgesamt dreizehn Bandenmustergruppen unterschieden (Tab. 11). Mit homogenen RAPD-Mustern sind Isolate der spezialisierten Formen *batatas*, *xanthoxyli*, *mori*, *robiniae* von *F. solani*, *Nectria bolbophylli* und *Fusarium* sp. nov. I eindeutig charakterisiert. Einige Polymorphismen in den ansonsten einheitlichen Mustern weisen Isolate von *F. epimyces* und *F. ambrosium* auf.

Als *Fusarium lathyri* eingestuftes Isolate zeigen eine gewisse Variabilität in den Bandenmustern. Die von *Pisum sativum* isolierten Stämme (62.420, 68.521, 68.522, 66.808) sowie ein Isolat aus Ackerboden (66.134) lassen sich mit den Primern 40 und 63 durch homogene Bandenmuster von der anderen Gruppe, in der einige Isolate vormals als *F. radicolica* bezeichnet waren, abgrenzen.

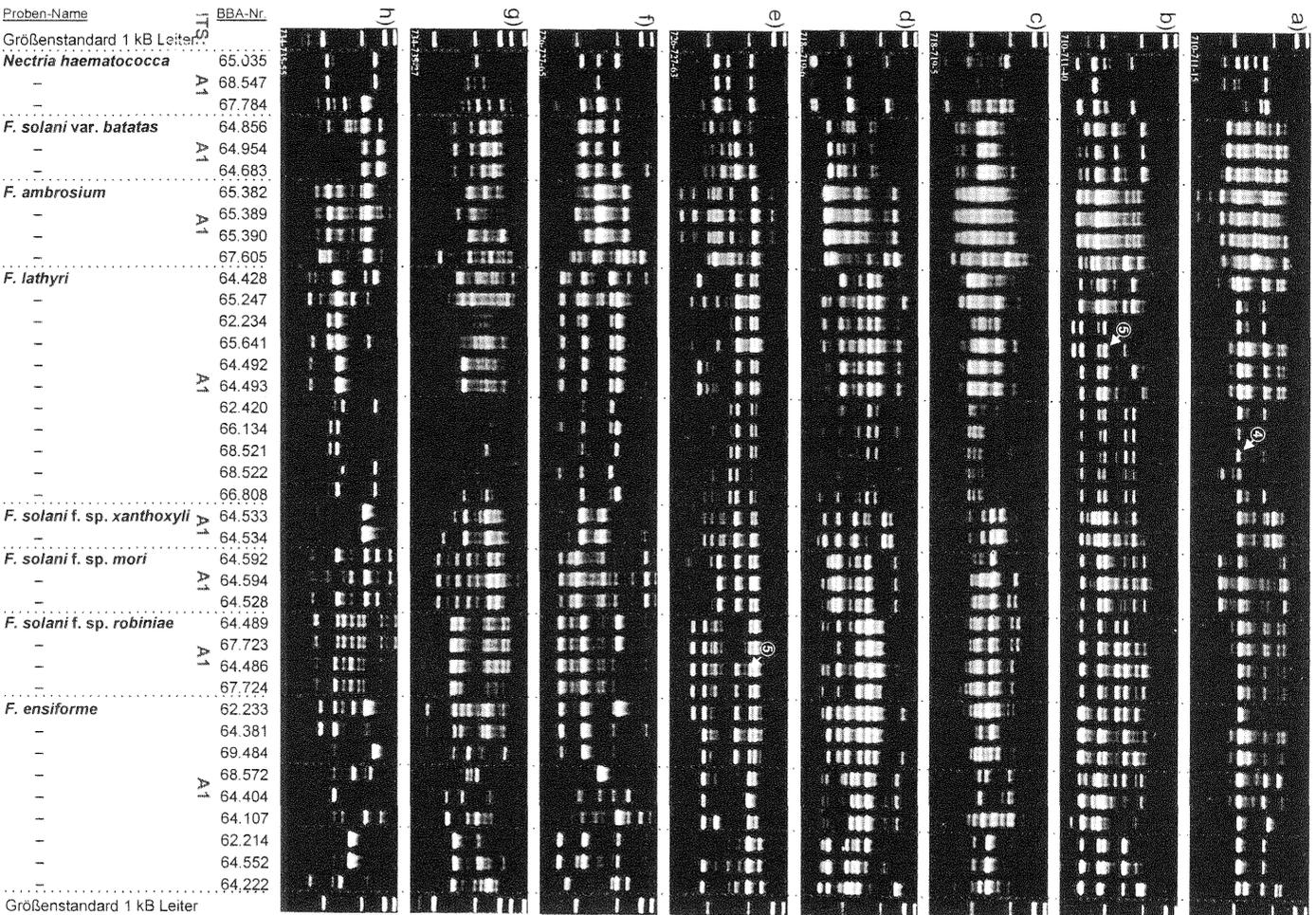


Abb. 18: RAPD-Bandenmuster bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Martiella* - Teil 1.
Verwendete Primer: a) 15; b) 44; c) 05; d) 06; e) 65; f) 65; g) 27; h) 55.

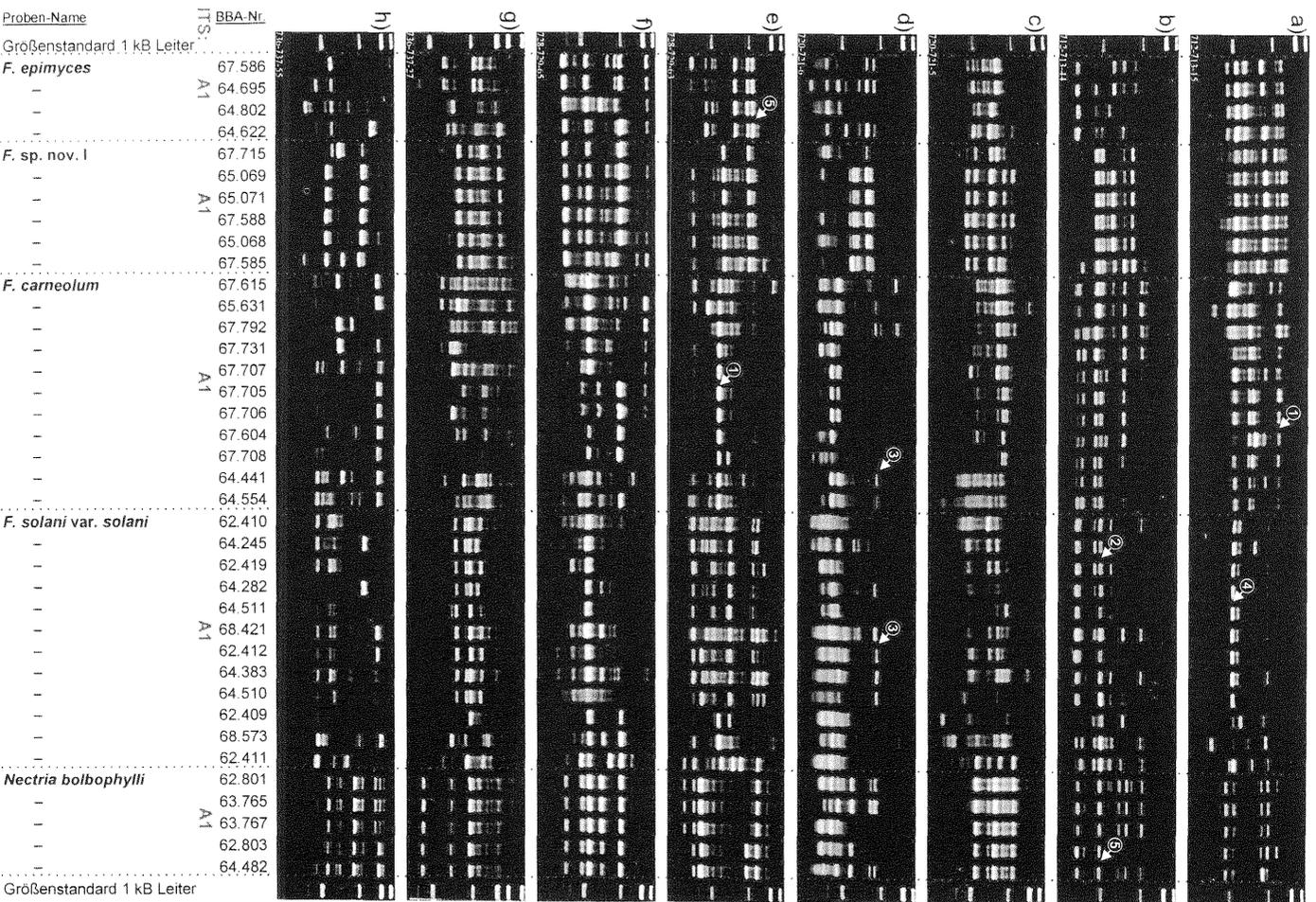


Abb. 19: RAPD-Bandenmuster bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Martiella* - Teil 2.
Verwendete Primer: a) 15; b) 44; c) 05; d) 06; e) 63; f) 65; g) 27; h) 55.

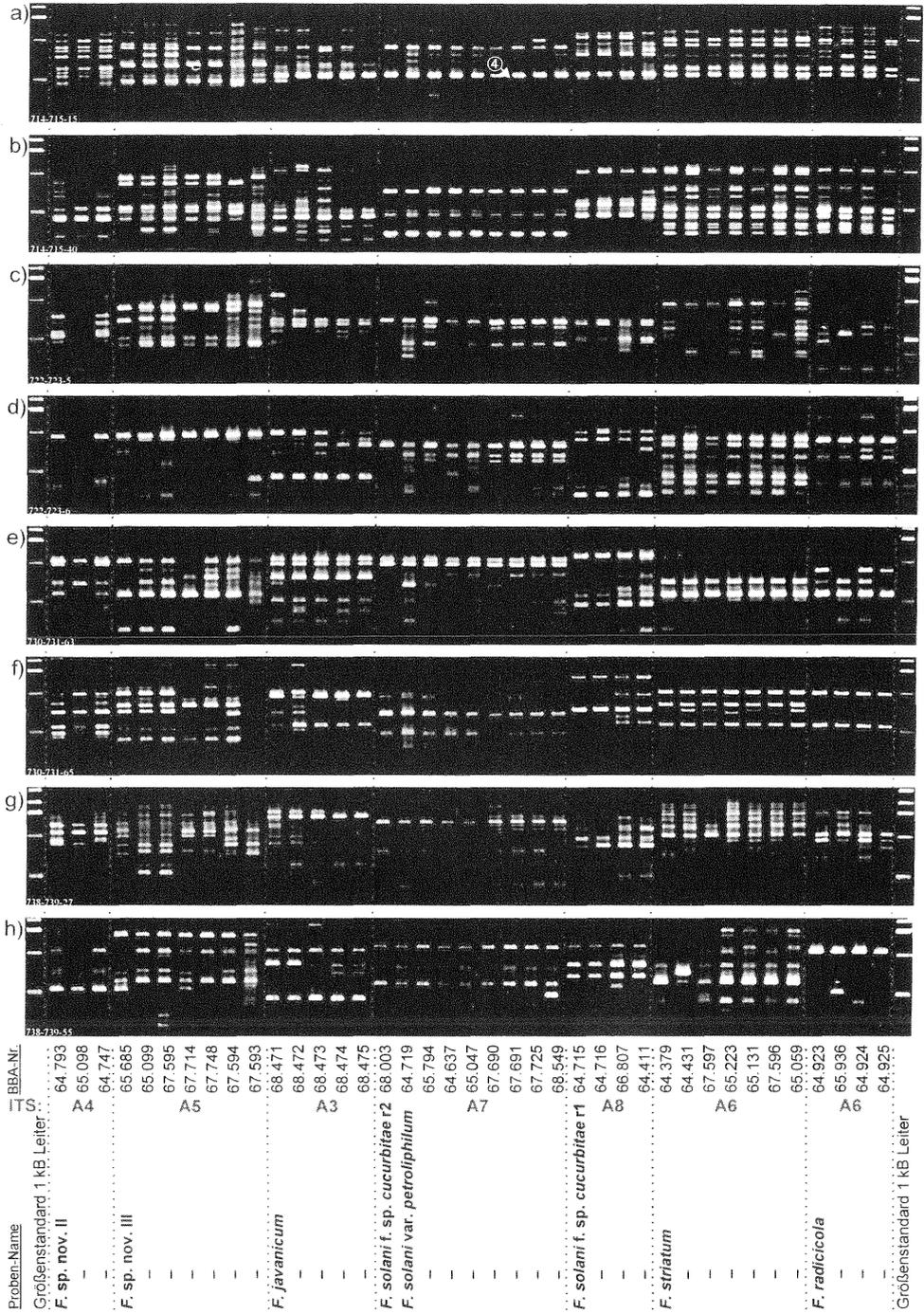


Abb. 20: RAPD-Bandenmuster bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Martiella* - Teil 3.

Verwendete Primer: a) 15; b) 44; c) 05; d) 06; e) 63; f) 65; g) 27; h) 55.

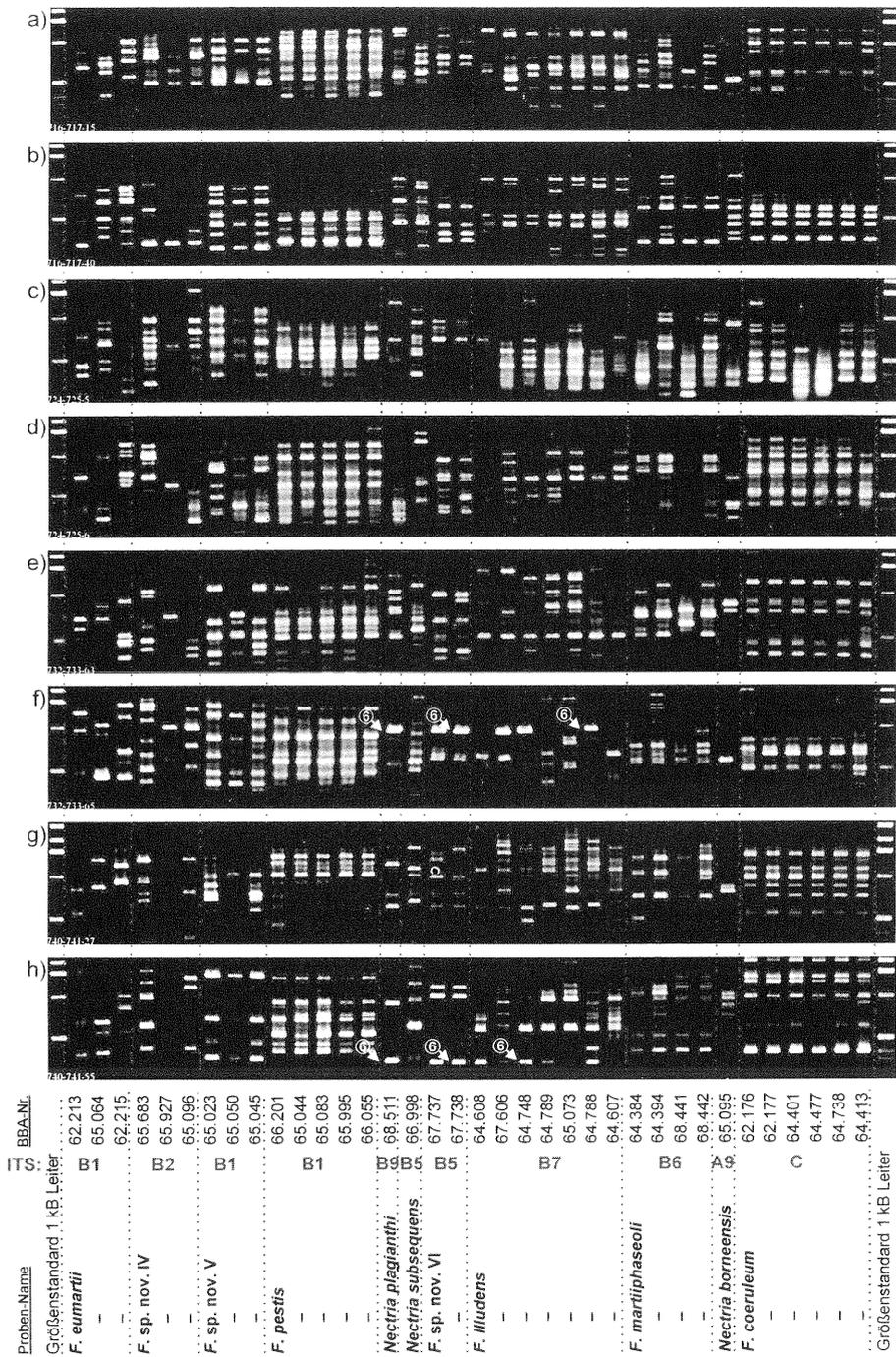


Abb. 21: RAPD-Bandenmuster bei *Fusarium*-Arten der Sektion *Martiella* - Teil 4.
Verwendete Primer: a) 15; b) 44; c) 05; d) 06; e) 63; f) 65; g) 27; h) 55.

Isolate von *Fusarium solani* var. *solani*, *F. carneolum* sowie von *Nectria haematococca* zeigen eine auffallende Variabilität in ihren Bandenmustern. Über die Auswertung des mit allen Primern im direkten Vergleich erzielten Gesamteindrucks lassen sich die diesen Arten entsprechenden RAPD-Muster ableiten. Anschließend können einige markante Marker als artcharakteristisch definiert werden. Primer 15 und 63 generieren jeweils eine für alle Isolate von *F. carneolum* charakteristische Bande (Abb. 19a, e; - Pfeil ①), die zur Abgrenzung von *F. solani* var. *solani* herangezogen werden können. Dennoch sind zwischen beiden Arten Ähnlichkeiten in den Bandenmustern feststellbar. Eine Reihe von Markern treten dabei bei allen Isolaten monomorph auf (Abb. 19b - Pfeil ②), während andere nur vereinzelt in beiden Arten erscheinen (Abb. 19d - Pfeil ③).

Die heterogene Gruppe der Isolate von *Fusarium ensiforme* kann anhand bestimmter Marker weiter unterteilt werden. Eine augenscheinliche Differenzierung ermöglicht Primer 06, wiedergegeben in Abb. 18d. Eine Gruppe umschließt dabei die Isolate 62.233, 64.381 und 69.484, eine zweite die Isolate 68.572, 64.404 und 64.107 und die dritte die Isolate 62.214, 64.552, 64.222. Allerdings weist das in der zweiten Gruppe liegende Isolat 64.404 ein unterschiedliches ITS-RFLP-Muster auf.

Mit eigenen Restriktionsgruppen waren die Isolate von *Fusarium* sp. nov. II und III (A4, A5) sowie Isolate von *F. javanicum* (A3) bereits eindeutig charakterisiert (Abb. 17). Anhand unterschiedlicher und charakteristischer RAPD-Muster mit mittlerer Variabilität ist die Unterscheidung der Arten ersichtlich.

Isolate von *Fusarium striatum* und *F. radicola*, beide in der ITS-Restriktionsgruppe A6 angesiedelt, können mit RAPD unterschieden werden. Mit Primer 15, 44, 63 und 27 erzielte Amplifikationsmuster zeigen jedoch Ähnlichkeiten zwischen beiden Arten auf; Primer 06 und 55 hingegen differenzieren sie charakteristisch (vgl. Abb. 20).

Fusarium solani f. sp. *cucurbitae* Rasse 1-Isolate sind in den RAPD-Mustern deutlich von *F. solani* var. *petroliphilum* (= *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 2) unterschiedlich. Die ITS-RFLP-Unterscheidung in die Gruppen A11 und A12 wird durch RAPD-Differenzen bestätigt (vgl. Abb. 17). Das Isolat 68.003, welches als *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 2 erhalten wurde kann aufgrund seiner Bandenmuster eindeutig als *F. solani* var. *petroliphilum* identifiziert werden.

Einige Isolate, die früher auch als *Fusarium eumartii* bezeichnet waren und nach den ITS-RFLP-Resultaten in den Gruppen A1, A4, A6, A9 und B2 lokalisiert sind, erscheinen ebenfalls in unterschiedlichen RAPD-Gruppen. Das Referenzisolat 62.215 (= CBS 487.76) für *F. eumartii* bildet ein einzelnes RAPD-Muster innerhalb der ITS-RFLP-Gruppe B1 aus. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit der Isolate 65.064 und 62.213 sind diese in der gleichen RAPD Gruppe angesiedelt. Ebenfalls in der ITS-RFLP-Gruppe B1 sind mit einheitlichen RAPD-Mustern die Isolate von *F. pestis* und mit etwas variableren Mustern die Isolate von *Fusarium* sp. nov. V zu finden (siehe Abb. 21).

Die ITS-RFLP-Gruppe B2 beinhaltet die anhand der RAPD-Muster hoch variable Gruppe von *Fusarium* sp. nov. IV.

Zwei von *Buxus* isolierte Fusarien sind als *Fusarium* sp. nov. VI in der gleichen ITS-RFLP-Gruppe B5 wie *Nectria subsequens* angesiedelt. Von *Nectria subsequens* sind sie durch einheitliche RAPD-Muster klar abzutrennen.

Deutlich abgrenzbar präsentieren sich die Isolate von *Fusarium martiiphaseoli*, die mit Primer 40 und 55 homogenere Muster zeigen als mit den anderen Primern. Alle Isolate sind durch die eigenständige ITS-RFLP-Gruppe B6 charakterisiert.

Morphologisch als *Fusarium illudens* bestimmte Isolate zeigen sich in den RAPD-Mustern variabler. Einzelne monomorphe Banden für alle Isolate dieser Art werden mit den Primern 06, 40 und 63 gebildet. Einzelne Isolate zeigen mit Primer 55 und 65 monomorphe Marker mit *Fusarium* sp. nov. VI und *Nectria plagianthi* (Abb. 21f, h - Pfeil ⑥). Mit Ausnahme von Isolat 64.788, welches in der ITS-RFLP-Gruppe B8 lokalisiert ist, sind die alle Isolate von *F. illudens* in Gruppe B7 sortiert.

Als vorläufig sind die Ergebnisse der Isolate von *Nectria plagianthi*, *Nectria subsequens* und *Nectria borneensis* anzusehen, da jeweils nur ein Isolat für die Untersuchungen zur Verfügung stand. Alle Isolate sind jedoch anhand ihrer charakteristischen Bandenmuster und ihrer ITS-RFLP-Muster voneinander und den übrigen Arten unterscheidbar.

Isolate von *Fusarium coeruleum* bilden nahezu identische RAPD Muster aus. Innerhalb der ITS-RFLP Gruppe C haben sie keine Ähnlichkeiten zu anderen *Martiella*-Mustern.

Zwischen den RAPD-Mustern innerhalb der Restriktionsgruppe A bestehen Ähnlichkeiten. Primer 15 amplifiziert eine Bande (Abb. 18a - Abb. 20a; Pfeil ④), die monomorph für alle RAPD-Gruppen ist. Einige Intensitätsunterschiede dieser Bande bei einzelnen Isolaten und bei *Fusarium solani* f. sp. *batatas* und *F. ambrosium* seien hierbei außer acht gelassen. Primer 44 wie auch Primer 63 zeigen innerhalb der Restriktionsgruppe A1 RAPD-gruppenübergreifende Banden (Abb. 18b, e, Abb. 19b, e; Pfeil ⑤) mit Ausnahme der Isolate von *Nectria haematococca*, *F. solani* f. sp. *batatas*, *F. ambrosium* und *F. epimyces*. Banden die monomorph für mehrere RAPD-Gruppen sind, liefern die Primer 05, 06, 63 und 65. Im Gegensatz zu den generalisierenden Primern differenzieren die Primer 27 und 55 mit deutlichen Musterunterschieden und kaum identischen Markern die RAPD-Mustergruppen spezifischer. Gemeinsamkeiten werden schwächer oder gar nicht herausgestellt.

Diese Primer sind als konservativ oder generalisierend in Bezug auf die Differenzierbarkeit anzusehen, da sie anhand charakteristischer Banden die Gemeinsamkeiten aus den Restriktionsuntersuchungen mittels ITS-RFLP widerspiegeln.

Die im Material- und Methodenteil als *Fusarium* indet. aufgeführten Isolate zeigten von den oben dargestellten Arten differierende und untereinander zumeist unterschiedliche RAPD-Muster auf.

4 DISKUSSION

4.1 Methodische Erfahrungen mit RAPD

4.1.1 Einflußparameter der RAPD

DNA-Extraktion

Methodisch unterschiedliche Extraktionstechniken für Pilz-DNA sind bekannt (Lee & Taylor 1990; Rollo 1990; Cenis 1992; Cheung et al. 1993; Zhu et al. 1993; Lecellier & Silar 1994; Fujimori & Okuda 1995; Gang & Weber 1995; Vaerenbergh et al. 1995). Daneben wurden zahlreiche sogenannte Minipreps entwickelt, deren Vorteil in relativ schnellen für 20 oder mehr Reaktionen ausreichenden DNA-Isolationen liegt (DuTeau & Leslie 1991; Yoon et al. 1991; Goodwin & Lee 1993; Grando et al. 1994). Nach Williams et al. (1991) sind verschiedene Extraktionsmethoden für die PCR einsetzbar und auch bei RAPD-Anwendungen mit *Trichoderma*-DNA (Zimand et al. 1994) waren keine negativen Auswirkungen feststellbar. Allerdings zeigen andere Vergleiche der Präparationsmethoden deutliche Unterschiede bei RAPD-Bandenmustern (Fujimori & Okuda 1995). Rückstände der verwendeten Extraktions- und Reinigungschemikalien, die sich hemmend auf die PCR auswirken können oder Unreinheiten werden dafür verantwortlich gemacht (Demeke & Adams 1992; Yu & Pauls 1992). Um mit der DNA-Präparation zusammenhängende Probleme im Vorfeld auszuschließen und ausreichende DNA-Mengen zum Aufbau einer DNA-Referenzsammlung zu erzielen, wurde die unter Abschnitt 2.3 aufgeführte, chloroform- und phenolfreie DNA-Extraktionsmethode einheitlich für alle Isolate verwendet.

Einfluß des Kolonie- bzw. Kulturalters auf die PCR

Einen großen Einfluß des Kolonialters auf die RAPD-Muster wurde bei einigen Bakterien festgestellt (Coutinho et al. 1993). Haemmerli et al. (1992) vermuten bei *Discula umbrinella*, daß zusätzliche Polymorphismen durch Mutationen unter Laborbedingungen oder während der Lagerung auftreten können.

Um eine für die Differenzierung bei *Fusarium* ungewollte Variabilität zu erfassen, wurde in Vorversuchen der Einfluß verschiedener Degenerationsstufen überprüft. Dazu wurden einige als hoch variabel geltende *Fusarium*-Isolate (Nirenberg 1990) in Vorversuchen auf nährstoffreichem Agar über einen Zeitraum von sechs Monaten kultiviert. Aus Sektoren und morphologisch degenerierten Bereichen verschiedener Altersklassen wurden wiederholt frische Platten überimpft. DNA-Proben aller Stufen und aus frisch vitalisierten Pilzen der gleichen Isolate wurden mittels RAPD verglichen. Unterschiede in den Bandenmustern, die auf Degenerierungen zurückführbar wären, konnten innerhalb des Versuchszeitraumes nicht beobachtet werden. Daraus ist abzuleiten, daß bei *Fusarium* innerhalb des verglichen mit Bakterien kurzen Generationszeitraumes keine Bandenmusteränderungen auftreten.

Reaktionsbedingungen

Häufig und kontrovers wird die Reproduzierbarkeit von RAPD-Ergebnissen diskutiert (Riedy et al. 1992; Weeden et al. 1992; Yu & Pauls 1992; MacPherson et al. 1993; Meunier & Grimont 1993; Kemp & Teale 1994; Mösges & Friedt 1994). Zahlreiche Parameter beeinflussen die RAPD, von denen an erster Stelle die Reaktionsbedingungen genannt werden (Devos & Gale 1992; Waugh & Powell 1992; Tommerup et al. 1995). Bei Einhaltung standardisierter Bedingungen ist jedoch die Reproduzierbarkeit sicher gewährleistet (Williams et al. 1990; Arnold et al. 1991; Quiros et al. 1991; Ballinger-Crabtree et al. 1992; Tommerup et al. 1995). Aus anderen Arbeiten ist bekannt, daß optimale Reaktionsbedingungen zwischen verschiedenen Organismen variieren können (Klein-Lankhorst et al. 1991; Hadrys et al. 1992; Munthali et al. 1992; Tham et al. 1994).

Daher war ein Ziel dieser Arbeit optimale und einheitliche Reaktionsbedingungen für vergleichende Massenuntersuchungen verschiedener Pilze zu schaffen. Folgende theoretische Forderungen mußten dazu erfüllt werden: Der gegenseitige Einfluß der Magnesium-, Primer-, Polymerase- und DNA-Konzentrationen sollte innerhalb einer Bandbreite geringstmögliche Auswirkungen auf die Amplifikationsprodukte haben, um Auswirkungen von Pipettierungenauigkeiten zu minimieren. Ebenso sollten Einflüsse des Temperatur-Zeit-Verlaufes der Reaktion sowie der Zyklenzahl auf die Ergebnisse in einem akzeptablen minimierten Bereich liegen. Aus praktischen Erwägungen sollten alle Versuche mit wenigen unterschiedlichen Reaktionsansätzen durchgeführt werden.

In den Tab. 7 und Tab. 8 aufgeführte Untersuchungsbedingungen führten stets zu reproduzierbaren Ergebnissen, zumal die Proben innerhalb der Fragestellungen mehrfach wiederholt, zeitgleich oder in kurzen Abständen vergleichend untersucht wurden. Eine durch Reaktionsparameter bedingte Variabilität der Ergebnisse war daher in den vorliegenden Resultaten als vernachlässigbar einzustufen. Detaillierte Erfahrungen mit einzelnen Einflußparametern auf die RAPD werden nachfolgend diskutiert.

Proben-DNA

Der Einfluß unterschiedlicher DNA-Konzentration auf die RAPD-Ergebnisse wird zumeist als hoch bewertet (Munthali et al. 1992; Yoon 1992; Koller et al. 1993; Williams et al. 1993). Zu niedrige Konzentrationen an Matrix-DNA führen zu nicht reproduzierbaren Bandenmustern (Bassam et al. 1992; Devos & Gale 1992; MacPherson et al. 1993) – zu hohe Konzentrationen zeigen schmierende und nicht klar differenzierbare Banden (Williams et al. 1993). Optimalkonzentrationen werden daher abhängig der untersuchten Organismen unterschiedlich im Bereich von 0,1-100 ng DNA angegeben (Weeden et al. 1992; Edwards & Hoy 1993; Takemori et al. 1994; Tham et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich unter den angeführten Reaktionsbedingungen ebenfalls nur geringe Auswirkungen unterschiedlicher Verdünnungsstufen in einem weiten Bereich.

Eine bis zu vierjährige Lagerung mancher DNA-Proben bei -20 °C und laborübliches Auftauen und Einfrieren zeigte im Vergleich zu frisch extrahierter DNA keine Veränderungen in den Bandenmustern. Dadurch ist es möglich DNA zu Referenzzwecken mehrere Jahre aufzubewahren.

Polymerase

Zu hohe Enzymkonzentrationen führen zu unerwünschter Nebenproduktbildung (Yoon 1992), die insbesondere bei zeitlich lang auseinanderliegenden, vergleichenden RAPD-Untersuchungen zu Fehlinterpretationen führen könnte. In zahlreichen Arbeiten werden für die PCR im Normalfall Konzentrationen von 1,0-2,5 U pro 50 µl Reaktionsgemisch verwendet (Welsh et al. 1991; Yu & Pauls 1992, Pammi et al. 1994). Die vorliegenden Untersuchungen demonstrieren, daß unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen der Einsatz von 0,4 U für längere Primer und 0,7 U für Decamer-Primer ausreichend war. In Vorversuchen führte eine Erhöhung der Polymerasekonzentration in einigen Fällen bei Primern die schwache Banden amplifizierten zu einer Intensitätssteigerung, bei den anderen Primern traten verstärkt unspezifische Reaktionsprodukte als Schmier auf. Aus Gründen der eingangs erwähnten Forderung nach wenigen und einheitlichen Reaktionsansätzen für alle Untersuchungen wurden stets diese zwei Konzentrationen verwendet.

Teilweise traten zwischen einigen, um Jahre auseinanderliegenden Wiederholungen, Unterschiede bei schwach ausgeprägten Banden, vornehmlich im Bereich der niedrigsten und höchsten Molekulargewichte, auf. Eine Ursache ließ sich später auf die Verwendung unterschiedlicher Chargen der Polymerase, insbesondere auf die mitgelieferten Reaktionspuffer, zurückführen. Auch (Levi et al. 1993) und (Meunier & Grimont 1993) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß Standardpuffer unter bestimmten Bedingungen zu schwachen Amplifikationen führen können. Der Reaktionspuffer wurde daher optimiert in großer Menge angesetzt und konnte für alle Untersuchungen einheitlich verwendet werden.

Magnesium-Ionen

Einen drastischen Effekt auf die Ausprägung der RAPD-Ergebnisse hat die Magnesium-Konzentration (Munthali et al. 1992). Magnesium-Ionen beeinflussen die PCR durch die Bindungsaffinität der Primer, die Dissoziationstemperatur von Matrize und Extensionsprodukten, die Bildung von Primer-Artefakten sowie die Genauigkeit und Aktivität der Taq-Polymerase (Oste 1989; Tham et al. 1994). Zu hohe Magnesium-Konzentrationen verringern die Spezifität der PCR und äußern sich in RAPD-Mustern durch unsauber trennbare Banden (Munthali et al. 1992; Newton & Ghraham 1994). Sind die Konzentrationen zu gering, werden unter bestimmten Umständen keine Banden amplifiziert (Devos & Gale 1992; Kazan et al. 1993). Eine exakte Einstellung der Konzentration ist für eine optimale Amplifikation aus diesen Gründen sehr wichtig. Häufig werden Konzentrationen von 1,0-5,0 mM Mg²⁺ für RAPD-Untersuchungen verwendet (Tingey et al. 1992; Tham et al. 1994). Ob die im Polymerase-Reaktionspuffer zusätzlich vorhandenen Magnesium-Ionen berücksichtigt wurden, ist bei den einzelnen Untersuchungen nicht immer vermerkt. Bei der Findung optimaler Konzentrationen sind in Puffern verwendete Chelatoren wie EDTA, welche die aktuelle Ionen-Konzentration senken, mit zu berücksichtigen (Lachmund & Sachse 1994).

Innerhalb eines Bereiches von 4,0 - 5,0 mM Mg^{2+} -Gesamtkonzentration wurden in Vorversuchen keine Bandenmusterdifferenzen festgestellt. Die vorliegenden Untersuchungen wurden daher bei mit 4,5 mM Mg^{2+} durchgeführt. Keinen Unterschied machte es dabei, ob die Magnesium-Ionen aus $MgCl_2$ oder Magnesiumacetat stammten.

Desoxynukleotide

Gewöhnlich werden für RAPD-Anwendungen Konzentrationen von 100-200 μM eines jeden Nukleotids bezogen auf 50 μl Reaktionsvolumina eingesetzt (Nicholson et al. 1993c; Manulis et al. 1994). Die optimale dNTP-Konzentration ist abhängig von der Mg^{2+} - und Primer-Konzentration, wobei wiederum eine zu hohe Konzentration den Gehalt freier Mg^{2+} -Ionen und damit die Polymeraseaktivität und das Primerannealing beeinflußt (Rolfs et al. 1992).

Die Vorversuche zeigten, daß im Bereich von ca. 60 - 100 μM dNTPs keine Veränderungen in den RAPD-Bandenmustern auftreten. Darunterliegende Konzentrationen führten in Vorversuchen zu einer geringeren Menge amplifizierter DNA, was aus weniger intensiv anfärbbare Banden ersichtlich war. Höhere Konzentrationen führten zu Intensitätssteigerungen, die ab 125 μM zum Verschmieren der Banden führten. 75 mM lagen daher im Optimalbereich der vorliegenden Versuchsbedingungen. Niedrigere Konzentrationen sollen auch einen positiven Effekt auf die Genauigkeit der Taq-Polymerase haben (Lachmund & Sachse 1994).

Primer

Einige der untersuchten Primer verursachen schmierende Banden aufgrund unspezifischer Reaktionsprodukte oder schwach anfärbbare Banden. Solche schlecht amplifizierende Primer sollen durch Optimierung der Reaktionsbedingungen zu besseren Ergebnissen führen (Devos & Gale 1992; Munthali et al. 1992; Edwards & Hoy 1993). In der Tat zeigten Vorversuche, daß eine Änderung der Konzentration einzelner Reaktionskomponenten sowie der Thermocyclereinstellungen bei schlecht amplifizierenden Primern (z. B. Primer 31, 33) zu besseren Ergebnissen führt. Um ein rationelles und gleichzeitiges Untersuchen verschiedener Primer in einer Mikrotiterplatte zu ermöglichen, wurde jedoch darauf verzichtet solche Primer einzusetzen.

Optimale Primer-Konzentrationen werden bei analytischer PCR im Bereich von 0,02 bis 1,0 μM je 100 μl -Reaktion angegeben (Rolfs et al. 1992; Lachmund & Sachse 1994). Höhere Konzentrationen sollen die Bildung von Primer-Dimer-Artefakten und von nicht spezifischen Produkten begünstigen (Watson 1989; Erlich et al. 1991; Simon et al. 1991; Steffan & Atlas 1991; Caetano-Anollés et al. 1992). Mit Hot-Start-Techniken sollen solche Artefakte vermeidbar sein (Chou et al. 1992). Eigene Vorversuche zeigten nur bei sehr hohen Primer-Konzentrationen Primer-Dimer-Bildungen, wobei Hot-Start-PCR keine Auswirkung auf die Artefakte und die RAPD-Ergebnisse zeigte. Mit höheren Konzentrationen steigt auch die Anzahl der amplifizierten Banden, da mit zunehmenden Überschuß die Primer bevorzugt auch an teilweise komplementären Bereichen binden (MacPherson et al. 1993). Bei der klassischen PCR-Vervielfältigung ist diese verringerte

Selektivität der Reaktion unerwünscht. Hingegen ist dieser Effekt bei vergleichenden RAPD-Anwendungen innerhalb eines gewissen Konzentrationsbereiches durchaus gewollt, da zusätzliche charakterisierende Banden erzielt werden können. Bei RAPD liegen die durchschnittlichen Konzentrationen bezogen auf gleiche Reaktionsvolumina daher teilweise deutlich höher (Bassam et al. 1992; Manulis et al. 1994; N'Goran et al. 1994; Pammi et al. 1994; Steindel et al. 1994). Allerdings zeigt sich auch bei RAPD-Untersuchungen, daß zu hohe Konzentrationen zu unklaren RAPD-Mustern führen können (MacPherson et al. 1993).

Die optimale Primer-Konzentration für die vorliegenden Untersuchungen wurde mit 1 μM je 50 μl Ansatz ermittelt. Geringere Konzentrationen bis 0,5 μM führten durch eine geringere Gesamtausbeute an DNA zu schwächer gefärbten Banden. Höhere Konzentrationen bis 2 μM zeigten nur geringe Veränderungen der Bandenmuster.

Denaturierung

Die Höhe der Denaturierungstemperatur und Dauer der Inkubation seien die kritischsten Parameter zur Erzielung reproduzierbarer Fragmente (Levi et al. 1993). Die Wahl dieser Parameter bildet ein Kompromiß zwischen einer optimalen Denaturierung und der Thermostabilität der verwendeten Polymerase (Gelfand & White 1990). Eine niedrigere Temperatur von 90 °C gegenüber höheren Temperaturen resultiert in veränderten Bandenmustern (Devos & Gale 1992; Tommerup et al. 1995), wie auch Vorversuche zur vorliegenden Arbeit bestätigten. Häufig werden in anderen Arbeiten 94 °C als Standard-Denaturierungstemperatur angegeben (Yu & Pauls 1992). Die vorliegenden Untersuchungen wurden bei 95 °C durchgeführt.

Als optimal angegebene und zur RAPD verwendete Denaturierungszeiten variieren von 5 s (Yu & Pauls 1992; Young et al. 1994) bis zu 60 s (Williams et al. 1990; Nelson et al. 1993; Manulis et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden bei 60 s Denaturierung keine nachteiligen Effekte beobachtet.

Annealing

Für RAPD-Untersuchungen mit 10er Primern wird eine Annealingtemperatur im Bereich von 35-37 °C als üblich angegeben (Böhm et al. 1993; Foster et al. 1993; Nelson et al. 1993; Büscher et al. 1994; Zimand et al. 1994). Dadurch ist es den Primern möglich auch an teilweise komplementären DNA-Bereichen zu hybridisieren, was zur gewollten Erhöhung der RAPD-Polymorphismen führt. Ein Anstieg der Annealingtemperatur führt zu höherer Bindungsspezifität der Primer (Saiki et al. 1988) und resultiert in geringerer Bandenanzahl (Caetano-Anollés et al. 1992; Munthali et al. 1992). Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die höhere Annealingtemperatur von 40 °C gewählt, da hierdurch auch die Gesamtreaktionsdauer im Thermocycler gegenüber niedrigeren Temperaturen verkürzt werden konnte. Unterschiede zum Annealing bei 36 oder 38 °C wurden vergleichbar den Ergebnissen von Weeden et al. (1992) nicht beobachtet. Andere Erfahrungen, die diese Temperatur als zu hoch einschätzen (Williams et al. 1993), konnten damit nicht bestätigt werden.

Für alle verwendeten längeren Primer erwies sich die höhere Temperatur von 53 °C als zweckmäßig. Verschiedene untersuchte Annealingzeiten von 30 bis 120 s zeigten keine Unterschiede in den Bandenmustern.

Extension

Üblicherweise wird eine Extensionstemperatur von 70-72 °C angegeben (Zimand et al. 1994). Diese Temperatur ist als Kompromiß zwischen dem Optimum der Polymeraseaktivität, welches meistens zwischen 75 °C und 80 °C liegt (Chien et al. 1976), und des mit steigender Temperatur beginnenden Ablösens des gerade entstehenden Tochterstranges von der template DNA zu sehen. Da bei 75 °C Extensionstemperatur keine nachteiligen Amplifikationsprodukte feststellbar waren, wurden die Reaktionen stets diesem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase entsprechend durchgeführt.

Die Produktausbeute korreliert positiv mit steigender Extensionszeit (Yu & Pauls 1992). Vorversuche zu dieser Arbeit und Munthali et al. (1992) bestätigen dies, stellten aber auch Veränderungen in den Bandenmustern fest: Kürzere Extensionszeiten führen zu vorwiegend kleineren Amplifikationsprodukten, während längere Zeiten daneben auch vermehrt größere Banden zur Folge haben. Ab 75 s und bis zu den untersuchten 120 s traten keine weiteren Unterschiede mehr auf. Eine Verlängerung der Extensionszeiten bis zu 8 min soll wiederum die unspezifische Produktbildung fördern (Saiki et al. 1988). Um im sicheren Bereich zu liegen wurden daher die Extensionen mit 90 s durchgeführt.

Zyklenzahl versus Plateau-effekt

Ab einer bestimmten Anzahl durchgeführter PCR-Zyklen verlangsamt sich die potentielle Vervielfältigung der amplifizierten Fragmente (Saiki 1989). Dieser Plateau-effekt wird auf eine zunehmende Endprodukthemmung, auf Aktivitätsverluste der Polymerase sowie auf den Verbrauch von dNTPs und Primern zurückgeführt (Innis & Gelfand 1990; Bassam et al. 1992). Als ausreichend werden durchschnittlich 35 Zyklen angesehen (Williams et al. 1993), wobei höhere Zyklenzahlen zumeist keine Auswirkungen auf die Bandenmuster haben sollen (Munthali et al. 1992; Mailer et al. 1994).

Vorversuche zu dieser Arbeit zeigten, daß 30 oder weniger Zyklen unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen zu deutlich schwächeren und unregelmäßigeren Bandenmustern führten. Bei 35-40 Zyklen wurden konstante Ergebnisse erzielt, die weiteren Untersuchungen wurden dann mit 37 Zyklen durchgeführt.

Kontaminationen

Grundsätzlich können alle im Reaktionsgemisch verwendete Chemikalien mit FremddNA kontaminiert sein. Herstellerseitig können neben der in Abschnitt 0 diskutierten Polymerase, insbesondere Rinderserumalbumin, welches in PCR-Puffern häufig verwendet wird, mit DNA kontaminiert sein (Rolfs et al. 1992). Daneben können Kontaminationen durch unsauberes Arbeiten bei der DNA-Extraktion, bei DNA-Verdünnungen und bei den Reaktionsansätzen verursacht werden. Letztere Kontaminationsquellen sind durch sauberes sowie konzentriertes Arbeiten und durch laborübliche Maßnahmen, wie

Aliquotieren der Reagenzien, regelmäßige Kontrollen auf Verunreinigungen und steriles Arbeiten weitmöglichst auszuschließen (Kwok & Higuchi 1989; Nienhaus & Gehrman 1991).

Im Gegensatz zu analytischen PCR-Anwendungen (Lo et al. 1988) ist die Bedeutung sporadischer DNA-Verunreinigungen, wie sie durch einfallenden Staub oder umherfliegende Sporen verursacht sein können, bei RAPD-Untersuchungen nach Williams et al. (1993) und eigenen Erfahrungen vernachlässigbar.

4.1.2 Eignung der Primer zur Differenzierung

Primerlänge

Üblich verwendete Decamere produzieren zumeist zwischen 0 bis etwa 9 Banden (Williams et al. 1993; Bailey & Lear 1994; Huang et al. 1995), was mit den meisten in der vorliegenden Untersuchungen verwendeten 10er Primern übereinstimmt. Lediglich Primer 27 war in der Bandenanzahl mit den eingesetzten längeren Primern vergleichbar. Längere Primer zeigen durchschnittlich mehrere Fragmente als Decamer-Primer (Castiglione et al. 1993; Fritsch et al. 1993; MacPherson et al. 1993; Bidochka et al. 1994).

Die vorliegenden Ergebnisse mit den Primern 05, 06, 16, 55, 63 und 65 sowie andere Primer, die ursprünglich für den selektiven Nachweis von Ährenfusarien hergestellt worden sind (Hering et al. 1995e), bestätigen dies. Der Verwendung längerer Primer gegenüber den klassischen 10er Oligonukleotide ist wegen der dadurch bedingten größeren Aussagekraft der Ergebnisse der Vorzug zu geben.

GC-Gehalt der Primer

Standardvorschriften zum Primerdesign entsprechend werden Primer mit höherem GC-Gehalt bevorzugt für RAPD-Charakterisierungen eingesetzt. Durch höheren GC-Gehalt werden gewöhnlich mehrere Fragmente erzielt, die eine Effektivitätssteigerung zur Folge haben (Kubelik & Szabo 1995).

Nach Williams et al. (1990) kommt es auch dann zu einer Amplifikation, wenn die Primer nicht 100%ig komplementär zur tDNA sind. Einzige Voraussetzungen dafür sind die komplementäre Bindung einiger Basenpaare am 3'-Ende des Primers, also dem Ansatzpunkt der Polymerase, sowie eine genügend feste Bindung des Primers, damit es nicht zu vorzeitiger Ablösung des Primers kommt. Die Festigkeit der Bindung hängt vom Schmelzpunkt der Primer-tDNA-Verbindung ab. Der Schmelzpunkt wiederum ist bestimmt durch die Anzahl der GC- und AT-Bindungen zwischen Primer und Template. Da GC-Bindungen gegenüber den zweibindigen AT-Bindungen dreibindig sind, reichen 2 GC-Bindungen aus um die theoretisch gleiche Festigkeit zu erreichen wie 3 AT-Bindungen. Bei angenommenen gleichen Verhältnissen von G, C, A, T in der genomischen DNA, hat also ein GC-reicher Primer eine höhere Wahrscheinlichkeit häufiger für eine Amplifikation ausreichend feste Bindungen einzugehen, womit eine höhere Bandenanzahl erklärbar ist.

Anzahl der Primer zur vergleichenden Charakterisierung bei Pilzen

Für verschiedene Differenzierungsfragen werden aussagefähige Ergebnisse bereits über RAPD-Untersuchungen mit drei oder vier Primern erzielt (Hu & Quiros 1991; Durand et al. 1993; Freeman et al. 1993; Hamelin et al. 1993; Russel et al. 1993; Wolff & Peters-van Rijn 1993; Mendel et al. 1994; Plummer et al. 1994; Savard et al. 1994). Diese Ergebnisse decken sich mit den vorliegenden Erfahrungen. Jedoch sollte darauf geachtet werden, daß verschiedene Klassen von Primern (siehe unten und Tab. 6) für die Untersuchungen herangezogen werden.

Primerklassen

Einige Primer führen bei untersuchten Proben zu homogenen Bandenmustern oder taxaübergreifenden identischen Banden, während andere Primer variabelere und taxadifferenzierende Bandenmuster zeigen. Diese Differenzen sind auf Amplifikationen unterschiedlich konservierter Regionen der template DNA zurückzuführen, die der jeweilige Primer abdeckt (Bowditch et al. 1993; Williams et al. 1993). Primer, die konservative DNA-Regionen feststellen, erzielen höhere Bandenmusterähnlichkeiten innerhalb von Arten oder Artkomplexen, welche als Hinweis auf verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Taxa interpretiert werden können. Zu dieser Kategorie sind insbesondere Primer 06, 15 und 32 zu zählen. Bei näher verwandten Arten oder zur Bestimmung intraspezifischer Variabilitäten ist der Einsatz von Primern, die variabelere DNA-Bereiche amplifizieren zur eindeutigen Trennung besser geeignet. In diese Kategorie sind insbesondere Primer 63, 55 aber auch Primer 44 zu zählen. Der Einsatz unterschiedlicher Primerklassen ermöglicht ein umfassendes Studium verschieden variabler Regionen der Proben-DNA.

4.1.3 Bewertung von RAPD-Banden

Banden bei DNA-Nullproben - template unabhängige Banden

Öfters werden in DNA-Nullproben bei RAPD-Anwendungen als Geisterbanden bezeichnete, schwache Amplifikationsprodukte festgestellt (Meunier & Grimont 1993; Thormann et al. 1994). Das Auftreten solcher template unabhängiger Banden wird gewöhnlich auf die Verwendung universeller Primer in Verbindung mit natürlichen DNA-Kontaminationen der Taq-Polymerase zurückgeführt (Böttger 1990; Bentley et al. 1994). Die Kontaminationen der Taq-Polymerase liegen offenbar in äußerst geringen Konzentrationen vor und treten nur bei einzelnen Primern unregelmäßig bei Proben auf, denen keine DNA zugesetzt wurde. Andere Ursachen sind auszuschließen, da regelmäßig sämtliche Lösungen auf Kontaminationen überprüft wurden (Bentley et al. 1994).

Nach eigenen und anderen (Williams et al. 1990; Klein-Lankhorst et al. 1991; Meunier & Grimont 1993) Erfahrungen beeinflusst die vermutlich chargenweise unterschiedliche Polymerase-Kontamination nicht die RAPD-Bandenmuster: Sobald Proben-DNA im Reaktionsgemisch vorhanden ist, verschwinden diese Artefakte. Zudem stimmt keine der wesentlich schwächeren Banden mit den normalen RAPD-Bandenpositionen über-

ein. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß bei den Untersuchungen die Proben-DNA im relativen Überschuß gegenüber den Kontaminationen im Reaktionsgemisch vorliegt, so daß nahezu ausschließlich die Proben-DNA amplifiziert wird.

Da in vergleichenden Charakterisierungsstudien stets mehrere Primer eingesetzt werden können diese ungewollten Artefakte nach eigenen Erfahrungen vernachlässigt werden.

Schwache und inkonsistente Banden

Bei RAPD-Untersuchungen treten neben klaren und intensiv anfärbbaren, schwache und weniger deutlich erkennbare Banden (Williams et al. 1990; Bassam et al. 1992; Nicholson et al. 1993a) vorwiegend im hoch- und niedermolekularen Amplifikationsbereich auf (Puterka et al. 1993; Van Buren et al. 1994). Ihr Auftreten bei verschiedenen Organismen wird meist als sporadisch, inkonsistent oder variabel bezeichnet (Böhm et al. 1993; Edwards & Hoy 1993; Puterka et al. 1993; Kesseli et al. 1994). Sie erscheinen bei manchen Wiederholungen unter den gleichen Reaktionsbedingungen (Edwards & Hoy 1993), werden aber zumeist auf zu geringe tDNA-Konzentrationen (Bassam et al. 1992; Tham et al. 1994), auf thermische well-to-well Variationen des Thermocyclers (Linz 1990; Devos & Gale 1992) oder auf Pipettierfehler zurückgeführt. Eine andere mögliche Erklärung beruht auf der Bildung von Heteroduplex-Bindungen (Jansen & Ledley 1990; Wenger & Nielsen 1991; Ayliffe et al. 1994; Novy & Vorsa 1996). Inkonsistente Banden eignen sich nicht als genetische Marker und sollten daher nicht bonitiert werden (He et al. 1992; Edwards & Hoy 1993; Koller et al. 1993).

Inkonsistente Banden können gewöhnlich durch mehrfache, mindestens zweifache Wiederholungen identifiziert werden (Hadrys et al. 1992; Mösges & Friedt 1994) und lassen sich dann nach eigenen Erfahrungen eindeutig durch ihre Lage im vorwiegend nieder- oder höhermolekularen Amplifikationsbereich von nachfolgend diskutierten Intensitätspolymorphismen unterscheiden.

Intensitätspolymorphismen

Auch bei anderen RAPD-Untersuchungen wird des öfteren eine reproduzierbare Variation der Intensität einzelner Banden zwischen verschiedenen Isolaten beobachtet (Crowhurst et al. 1991; Goodwin & Annis 1991; Bostock et al. 1993; Lieckfeldt et al. 1993). Intensitätspolymorphismen werden auf Differenzen der Sequenzhomologie der Primerbindungsstellen zurückgeführt (Bassam et al. 1992; Hunt & Page 1992; Tham et al. 1994). Da quantitative Unterschiede schwer zu bewerten sind, sollten diese Banden nur binär nach vorhanden/nicht vorhanden bonitiert werden (Heun & Helentjaris 1993).

Nach eigenen Beobachtungen können Intensitätspolymorphismen manchmal mit bestimmten Isolateigenschaften korrelieren und dann als brauchbare Marker zur Charakterisierung eingesetzt werden. Die *Fusarium sambucinum*-Stämme 62.433 und 62.434 (vgl. Abb. 9g, h) stammen beide aus wärmeren Regionen und zeigen gegenüber den anderen Isolaten auffallende, reproduzierbare Intensitätspolymorphismen. Ebenso können mit Primer 44 erzielte Intensitätspolymorphismen Rasse 4-Isolate von allen anderen *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*-Isolaten abgegrenzt werden (vgl. Abb. 15b - Pfeil ②).

Bevorzugte Amplifikation von Fragmenten

Bei einigen DNA/Primer Kombinationen wurde unter bestimmten Reaktionsbedingungen festgestellt, daß sie kein differenziertes RAPD-Muster aufweisen, sondern nur wenige stark amplifizierte Banden ausbilden (Kirkpatrick et al. 1991; Sweeney & Danneberger 1994). Dies wird, wenn Einflüsse der Mg^{2+} -Konzentration auszuschließen sind, mit einer stärkeren Homologie des Primers zur DNA begründet, wobei solche Bereiche auf Kosten anderer Amplifikationsprodukte vervielfältigt werden (Gibbs et al. 1989).

Dieser Effekt wurde in Vorversuchen mit Primer 29 festgestellt, der sich in seiner Sequenz von Primer 24 durch ein Inosin an sechster Stelle unterscheidet. Dadurch, daß Inosin komplementär an allen Basen binden kann, sollen Primer mit Inosin eine höhere Affinität zur DNA besitzen (Knoth et al. 1988; Linz et al. 1990; Aarts et al. 1991). Der ursprünglich geplante Einsatzzweck, durch Erhöhung der potentiellen Primerbindungsstellen zusätzliche Polymorphismen zu erzielen, konnte aufgrund dieser bevorzugten Amplifikation nicht erreicht werden. Dieses Ergebnis ist jedoch als indirekter Beweis zu werten, daß bei RAPD-Untersuchungen nicht alle Banden auf perfekte komplementäre Bindungen des Primers an die DNA, sondern auch auf Primermismatches, zurückzuführen sind (Williams et al. 1990).

Comigrierende Banden und Validierung

Bei RAPD-Untersuchungen zur Differenzierung verschiedener Isolate, taucht immer wieder die Frage nach der Authentizität von Banden gleicher Laufweiten auf. Häufig wird vermutet, daß solche Banden nicht immer den gleichen genomischen Ursprung aufweisen (Weeden et al. 1992; Yli-Mattila et al. 1996). Comigrierende Banden können verschiedene Ursachen haben: Sie sind identisch, sie sind nicht identisch, besitzen aber zufällig gleiche Molekulargewichte oder die gleiche elektrophoretische Mobilität. Hybridisierungen fraglicher Fragmente mit Banden aus anderen Spuren sollen die Authentizität comigrierender Banden feststellen können (Chalmers et al. 1992). Nach eigenen Beobachtungen sollten comigrierende Banden nicht überbewertet werden, da bei Wiederholungen mit unterschiedlicher Spurenzusammensetzung und geübter visueller Bonitur der Banden, welche andere als fraglich ansehen (Chalmers et al. 1992; Inai et al. 1993), richtig identifiziert werden können. Außerdem wäre der prozentuale Fehler, der auf falsch positive oder falsch negative Bonitur solcher Banden beruhen würde, bei der Vielzahl der zum Vergleich herangezogenen Banden zu vernachlässigen.

Daneben können comigrierende Banden innerhalb der gleichen Spur auftreten. Nach eigenen Erfahrungen sind sie durch ihre Dicke und durch die intensive Anfärbung zu erkennen. Sie entstehen durch Überlagerung zweier oder mehrerer Banden ähnlichen Molekulargewichtes in Verbindung mit schlechter elektrophoretischer Auftrennung. Von intensiv gefärbten Einzelbanden gleichen genetischen Ursprungs können sie nur durch veränderte Elektrophoresebedingungen oder -techniken unterschieden werden (Brunel 1994; Tsuchiya et al. 1994; Procnier et al. 1995). Wie oben können diese in gleicher Spur auftretenden comigrierenden Banden bei der Vielzahl der mit verschiedenen Primern erzielten und verglichenen Banden vernachlässigt werden.

4.2 Differenzierung der untersuchten Fusarien

4.2.1 Differenzierung von *Discolor*-Fusarien

Nach den vorliegenden Ergebnissen bestehen klare Beziehungen zwischen den RAPD-Bandenmustern und der morphologischen Differenzierung durch Nirenberg (1995c) in die drei Taxa *Fusarium sambucinum*, *F. venenatum* und *F. torulosum*.

Lediglich zwei Isolate, 64.262 aus Brasilien und 64.918 (*Gibberella pulicaris*) aus Indonesien, entsprachen dabei nicht dem für *Fusarium sambucinum* vorgefundenem Bandenmuster. Allerdings ist es fraglich, ob diese Stämme tatsächlich als echte *F. sambucinum* anzusehen sind, da sie mit zwei Teststämmen von *G. pulicaris* nicht kreuzbar waren (Desjardins & Nelson 1995). Auch in weiteren Merkmalen zeigten diese beiden Stämme Unterschiede. Während bei allen anderen Isolaten von *F. sambucinum* und *F. venenatum* Diacetoxy-scirpenol (DAS) nachgewiesen werden konnte, produzierten diese Stämme statt dessen T2-Toxin (Thrane & Hansen 1995). Kulturfiltrate der untersuchten *F. venenatum*- und *F. sambucinum*-Isolate reagierten im Biotest toxisch auf *Artemia salina* L., hingegen erwies sich das Isolat 64.262 als nicht und das Isolate 64.918 als gering toxisch (Schmidt et al. 1995).

Abgesehen von den beiden diskutierten Isolaten, die nach obigen Resultaten nicht als *Fusarium sambucinum* anzusehen wären, bilden die aus wärmeren Regionen (Spanien und Frankreich) stammenden *Fusarium sambucinum*-Isolate eine anhand der RAPD-Muster unterscheidbare Population. Weitere Korrelationen zur geographischen Herkunft oder zu Wirten konnten bei *F. sambucinum*, *F. venenatum* und *F. torulosum* jedoch nicht festgestellt werden.

Eine Unterscheidung von *Fusarium sambucinum* und *F. venenatum* anhand der ITS-RFLP-Untersuchungen unter Standardbedingungen ist nicht möglich. Daraus und aus der gemeinsamen Produktion von DAS beider Arten (Thrane & Hansen 1995) kann auf eine engere Verwandtschaft geschlossen werden. Erst nach gezieltem Überverdau der Proben-DNA war eine Unterscheidung beider Arten über weitere Restriktionsfragmente möglich. *Fusarium torulosum* läßt sich stets deutlich und wie die Clusteranalyse zeigt weit abgrenzen.

Isolate, bei denen über die RAPD keine Zuordnung möglich ist, können mittels ITS-RFLP auf einer übergeordneten und geringer variablen Ebene charakterisiert werden. Danach ist das brasilianische Isolat 64.262 in den Komplex zu *F. sambucinum* und *F. venenatum* zu stellen, bei der Untersuchung im Überverdau ist dieses Isolat in den Restriktionsfragmenten mit *F. sambucinum* identisch. Die beiden *Gibberella pulicaris*-Isolate sind nur durch die Restriktionsenzymkombination Msp I+Rsa I untereinander und von *F. sambucinum* und *F. venenatum* zu unterscheiden.

Die vorgefundenen Gruppierungen anhand RAPD und ITS-RFLP stimmen mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen innerhalb des Europäischen *Fusarium sambucinum* Projektes (Nirenberg 1995a) überein, welche die gleichen Pilzisolat mit verschiedenen Techniken untersucht haben.

Desjardins & Nelson (1995) untersuchten das Kreuzungsverhalten der Isolate zu zwei Teststämmen von *Gibberella pulicaris* (Mating Typ 1 und 2). Nur Isolate, die dem für *Fusarium sambucinum* spezifischen RAPD-Muster entsprachen, erwiesen sich dabei als fertil. Szécsi et al. (1995) verglichen die Isolate anhand ihrer Esterase-Zymogramme. Insgesamt sechs Isoenzyme wurden dabei zur Differenzierung herangezogen. Trotz dieser geringen Zahl an Markern konnten sie *F. sambucinum*, *F. venenatum* und *F. torulosum* sicher unterscheiden. Beide Isolate von *G. pulicaris* waren dabei von *F. sambucinum* unterschiedlich; ihre Variationsbreite war mit den vorliegenden ITS-RFLP-Resultaten vergleichbar. Thrane & Hansen (1995) untersuchten die Sekundärmetabolitenzusammensetzung dieser Isolate: Alle dem RAPD-Muster für *F. sambucinum* entsprechenden Isolate produzierten Diacetoxyscirpenol (DAS) sowie zwei nicht identifizierte Metaboliten. Lediglich bei den Stämmen 64.960 und 62.719 wurde zusätzlich Butenolide nachgewiesen. Stämme von *F. venenatum* produzierten ebenfalls DAS, waren aber durch einen anderen nicht definierten Inhaltsstoff von *F. sambucinum* unterschiedlich. Vier Isolate wiesen zusätzlich Butenolide auf, die in ihren RAPD-Mustern jedoch keine Unterschiede zu den anderen Isolaten aufwiesen. Die höhere RAPD-Variabilität bei *F. torulosum*-Isolaten spiegelt sich auch in ihrer unterschiedlichen Produktion von Wortmannin, Antibiotic Y und Butenolide wieder. Das phylogenetische Arrangement über Sequenzen einer bestimmten rRNA-Region (Logrieco et al. 1995) ist mit den vorliegenden ITS-RFLP- und RAPD-Resultaten vergleichbar.

Die Stämme 64.351 (*Fusarium semitectum* var. *semitectum*) sowie die nicht identifizierten Isolate 63.575, 64.371 und 64.280 werden als eigenständige ITS-RFLP Gruppe geclustert. Bei diesen Isolaten sind Korrelationen der RAPD-Muster zur geographischen Herkunft feststellbar, wobei die neuseeländischen Isolate 63.575 und 64.371 sehr ähnliche RAPD-Muster aufweisen. Zu beiden anderen Isolaten aus den ehemaligen Jugoslawien und den Niederlanden sind primerabhängig Ähnlichkeiten feststellbar. Szécsi et al. (1995) stellten identische, eigenständige Esterasemuster für die Isolate 63.575, 64.371 und 64.351 fest, jedoch bei Isolat 64.280 waren die Isoenzyme mit denen von *F. sambucinum* identisch. Thrane & Hansen (1995) konnte Equisetin als gemeinsame Komponente bei den ersten drei Stämmen nachweisen, daneben traten isolatspezifisch Zerealenon oder Butenolide auf; Stamm 64.280 produzierte ausschließlich ein Fusarin-ähnliches Toxin. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten ist anzunehmen, daß es sich bei den neuseeländischen Isolaten ebenfalls um *F. semitectum* handelt. Die Unterschiede in den RAPD-Mustern könnten auf eine Differenzierung auf der Ebene von Varietäten oder spezialisierte Formen hinweisen. Zukünftige Untersuchungen mit mehreren Referenzstämmen aus dem *F. semitectum*-Komplex werden dies klären. Die Einordnung des Isolates 64.280, abgesehen von der genetischen Ähnlichkeit zu *F. semitectum*, bleibt vorerst unklar.

Die Frage, ob *Fusarium bactridioides* und/oder *F. sarcochroum* synonym zu *F. sambucinum* zu betrachten sind oder nicht, konnte über morphologische Merkmale nicht eindeutig beantwortet werden (Nirenberg 1995c). Nach den ITS-RFLP-Resultaten ist *Fusarium bactridioides* deutlich von *F. sambucinum* und den anderen Isolaten durch unterschiedliche Restriktionsfragmente abzugrenzen. Vielmehr stellt die clusteranalytische

Auswertung *F. bactridioides* in die Nähe von *F. semitectum* und *F. culmorum*/*F. cerealis*. Auch die erzielten spezifischen RAPD-Muster für *F. bactridioides* erlauben eine eindeutige Abgrenzung. In ähnlicher Weise unterscheidet sich *F. sarcochroum* von *F. sambucinum* und den anderen Isolaten, jedoch wird *F. sarcochroum* in die ITS-RFLP-Clustergruppe C zu *F. torulosum* gestellt. In anderen Untersuchungen sind diese Zuordnungen beider Arten umstritten. Während die Esterasemuster bei *F. bactridioides* dem von *F. torulosum* entsprechen und damit die von Nirenberg (1995c) festgestellte morphologische Ähnlichkeit stützen, sind sie bei *F. sarcochroum* mit *F. sambucinum* identisch (Szécsi et al. 1995). Nach den Sekundärmetaboliten produziert *F. bactridioides* zwar kein DAS, jedoch spricht für eine Ähnlichkeit zu *F. sambucinum*, die Produktion der beiden für *F. sambucinum* typischen Metaboliten. *F. sarcochroum*, produziert neben Fusarin den gleichen Fusarin-ähnlichen Stoff, der auch von dem Isolat 64.280 produziert wird. Letztendlich bestätigen die verschiedenen Untersuchungen das Konzept von Wollenweber & Reinking (1935), welches beide Arten im Gegensatz zu Booth (1971) als eigenständig anerkennt.

Gleiche ITS-RFLP-Muster und einige monomorphe RAPD-Banden, insbesondere mit Primer 63, demonstrieren eine nahe Verwandtschaft von *Fusarium flocciferum* zu *F. torulosum*. Da *F. flocciferum* als eigenständige Art akzeptiert ist (Booth 1971; Gerlach & Nirenberg 1982), ist anhand dieser Ergebnisse zu sehen, daß auch unterschiedliche Arten gleiche ITS-RFLP-Muster aufweisen können. Vergleichbar zu diesen Ergebnissen sind identische ITS-RFLP-Ergebnisse mit geringfügigen Unterschieden in den RAPD-Mustern bei *F. culmorum*, *F. cerealis* und *F. graminearum* (Hering et al. 1995d; Hering et al. 1995f) oder bei den später diskutierten Fusarien der Sektion *Martiella* (S. 81ff). Die anderen Kontrollisolate weisen isolatspezifische RAPD-Muster auf. Eine Ähnlichkeit in den RAPD-Mustern zwischen *Fusarium culmorum* und *F. cerealis*, wie sie in der vorliegenden Untersuchung mit Primer 06, 15 und 32 deutlich ist, konnte bereits früher festgestellt werden (Schilling 1994; Hering et al. 1995e). In den ITS-RFLP-Untersuchungen lassen sich beide Isolate nicht voneinander unterscheiden. Aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeit sind den Ergebnissen zufolge *F. culmorum* und *F. graminearum* in die nähere Verwandtschaft zu *F. semitectum* und *F. bactridioides* zu stellen. Nach anderen ITS-RFLP-Ergebnissen sind in diese Gruppe ebenfalls *F. graminearum*, *F. tumidum* und *F. robustum* einzuordnen (Hering et al. 1995e).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß durch Kombination von ITS-RFLP-Techniken mit RAPD brauchbare taxonomische Charakterisierungen bei Isolaten innerhalb der Sektion *Discolor* durchführbar sind.

Mit RAPD problematische Zuordnungen, z. B. bei dem brasilianischen Isolat 64.262, können anhand der ITS-RFLP übergeordnet klassifiziert werden. Andererseits zeigen die Isolate von *Fusarium sambucinum*/*F. venenatum*, *F. torulosum*/*F. flocciferum* oder *F. cerealis*/*F. culmorum*, daß diese Arten trotz ihrer jeweils gleichen ITS-RFLP-Muster über charakteristische RAPD-Muster differenzierbar sind.

4.2.2 Variabilität bei *Fusarium tabacinum* (*Plectosporium tabacinum*)

Isolate von *Fusarium tabacinum* gelten in ihren morphologischen und phytopathologischen Merkmalen, wie auch in ihrer Eigenschaft den Teleomorph auszubilden, als hoch variabel (Gams & Gerlagh 1968; Pascoe et al. 1984). Die für *F. tabacinum* vorgefundenen unterschiedlichen ITS-RFLP-Gruppen und RAPD-Muster bestätigen auf molekularbiologischer Ebene diese Variabilität. Eine geringe Variation innerhalb der ITS-Sequenzen soll ebenfalls beobachtet worden sein (Rehner & Palm, zit. in Palm et al. 1995). Die hohe intraspezifische Variabilität kann bei nicht wirtsspezialisierten Isolaten auf die weite Verbreitung von *F. tabacinum* in landwirtschaftlich genutzten Böden (Domsch & Gams 1968; Gams et al. 1969; Hampel 1970; Scholte et al. 1985) und dem Auftreten saprophytischer Formen zurückgeführt werden.

Aus einer hohen Variabilität kann auch geschlossen werden, daß sich Isolate dieser Art im Stadium der Anpassung an bestimmte Lebensräume oder an bestimmte Wirte befinden, wobei eine vergleichbar ausgeprägte Wirtsspezialisierung wie bei *F. oxysporum* noch nicht stattgefunden hat oder noch nicht vorgefunden wurde. Diese Hypothese stützen auch andere RAPD-Untersuchungen, wobei apathogene stets deutlich von pathogenen Isolaten zum Beispiel bei *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Manulis et al. 1994) oder *Cochliobolus carbonum* (Jones & Dunkle 1993) unterschieden werden konnten.

Tatsächlich existieren Überlegungen diese Art weiter im Hinblick auf seine Differenzen und Variationen weiter zu unterteilen (Palm et al. 1995). Allerdings scheinen Sequenzdaten der 28S-Untereinheit der ribosomalen DNA kein zusätzliches Differenzierungskriterium zu liefern, da sie mit morphologischen und biologischen Merkmalen nicht korrelieren (O'Donnell & Rehner, zit. in Palm et al. 1995). Hingegen scheinen Untersuchungen der variablen ITS-Region brauchbarer. In der vorliegenden Arbeit konnten fünf zueinander ähnliche Untergruppen unterschieden werden, wobei die vorgefundenen ITS-Restriktionsmuster der von *Cucurbita* isolierten Stämmen 68.037, 67.560 und 68.022 mit ihrer Wirtsherkunft korrelieren. Weitere Korrelationen waren auf diesem Niveau nicht feststellbar. Eigentlich sollten diese genetischen Unterschiede in Verbindung mit der selektiven Wirtspathogenität und eindeutigen RAPD-Bandenmustern zumindest zur Abgrenzung als spezialisierte Form *F. tabacinum* f. sp. *cucurbitae* (*Plectosporium tabacinum* f. sp. *cucurbitae*) ausreichen. In diesem Zusammenhang sprechen für die Existenz weiterer spezialisierter Formen auch Untersuchungen mit verschiedenen Stämmen, die auf ihre Kreuzpathogenität gegenüber unterschiedlichen Wirten getestet wurden (Domsch & Gams 1968; Gams & Gerlagh 1968) sowie das nachgewiesene breite Wirtspflanzenspektrum von *F. tabacinum* (Klebhahn 1930; van Eek 1937; Hampel 1970; Matta 1978; Pascoe et al. 1984; Alderman & Polglase 1985; Mygind 1986; Zizzerini & Tosi 1987). Hier müssen mit den über RAPD charakterisierten Isolaten weitere Untersuchungen zur Pathogenität erfolgen um sichere Aussagen über das Auftreten spezialisierter Formen treffen zu können.

Die ITS-RFLP Untersuchungen liefern verglichen mit den RAPD-Mustern homogenere Ergebnisse, die übergeordnete Gruppierungen ermöglichen. Fraglich bleibt die Bedeu-

tung von Längenpolymorphismen als Differenzierungskriterium bei einigen *Fusarium tabacinum*-Isolaten, die zueinander ähnliche RAPD-Muster für Isolate mit oder ohne diesen Polymorphismus aufweisen (siehe hierzu auch Abschnitt 4.3.1 - S. 96). Bei den Amplifikationen mit Primer 16, 22 und 27 sind weniger Banden sichtbar als mit anderen Primern. Trotz geringerer Markeranzahl ist ihre Verwendung interessant, da sie offensichtlich konservativere Bereiche der genomischen DNA amplifizieren und daher übergeordnet Ähnlichkeiten feststellen können (vgl. Abb. 12f).

Bislang wurde *Fusarium tabacinum* zur Sektion *Eupionnotes* neben *F. merismoides* gestellt (Gams & Gerlagh 1968). Die taxonomische Revision von Palm et al. (1995) grenzt *F. tabacinum* als neue Gattung *Plectosporium* davon ab. Die ungewöhnlich hohe Intra-Sektions-Variabilität von 70 % nach der Clusteranalyse der ITS-RFLP-Fragmente zwischen *F. tabacinum* und dem in der gleichen Sektion angesiedelten *F. merismoides* wurde in dieser Höhe bei keiner anderen der untersuchten Sektionen festgestellt. Legt man die durchschnittliche Variationsbreite von ca. 30 % bei ITS-RFLP-Mustern innerhalb der Sektion *Martiella* (vgl. Abb. 17) mit Ausnahme von *F. coeruleum* als Vergleichsmaßstab zugrunde, dann wäre daraus zu folgern, daß *F. tabacinum* nicht in die Sektion *Eupionnotes* einzuordnen ist. Die molekularen Daten dieser Arbeit stützen damit die Erkenntnisse der neueren Revision von Palm et al. (1995) als eigenständige Gattung.

4.2.3 Charakterisierung innerhalb der Sektion *Elegans*

Spezieskonzepte von *Elegans*-Fusarien

Vertreter aller der von Wollenweber & Reinking (1935) beschriebenen Subsektionen wurden in den vorliegenden ITS-RFLP-Analysen berücksichtigt. Abgeleitet aus der Synonymliste von Snyder & Hansen (1940) wurden aus der Subsektion *Orthocera* die spezialisierten Formen *betae*, *callistephi*, *conglutinans*, aus der Subsektion *Constricta*, die spezialisierten Formen *batatas*, *lycopersici*, *melonis* und *tracheiphilum* und aus der Sektion *Oxysporum* die spezialisierten Formen *cubense*, *gladioli*, *pisi*, *tuberosi*, *dianthi* und *vasinfectum* von *Fusarium oxysporum* untersucht.

Alle untersuchten Isolate von *Fusarium oxysporum* weisen in den ITS-RFLP-Mustern keine Differenzen auf und stimmen damit mit früheren rDNA-Untersuchungen (Kistler et al. 1987) überein. Nach derzeitigem Kenntnisstand über die Bewertung der intraspezifischen Variabilität der ITS-RFLP-Muster (siehe 4.3.1, S. 96) würde die vorgefundene Einheitlichkeit dem Spezieskonzept für *F. oxysporum* von Snyder & Hansen (1940) mit Ausnahme der Betrachtung von *F. redolens* und *F. udum* entsprechen. Beide letztgenannten Arten sind anhand der ITS-RFLP-Muster eindeutig als eigenständige Arten charakterisierbar.

Fusarium udum, welches Wollenweber & Reinking (1935) synonym zu *F. merismoides* betrachteten und in die Sektion *Eupionnotes* stellten, wurde als eigenständige Art von Booth (1971) in die Sektion *Lateritium* gestellt. In der Tat sprechen für *F. udum* und *F.*

lateritium ähnliche ITS-RFLP-Muster mit den Enzymen Hha I+Taq, Bsp 143 I und Alu I für eine Verwandtschaft beider Arten und eine Einreihung Sektion *Lateritium* (vergl. hierzu Abb. 6c, e, f und Abb. 13c, e, f). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit mit *F. redolens* und der deutlichen Abgrenzbarkeit beider Arten von *F. oxysporum* wäre schließlich auch *F. redolens* in die Nähe zu *F. udum* und *F. lateritium*, also in die Sektion *Lateritium* einzuordnen. Die für *F. udum* dargestellte Zuordnung ist analog für die neu beschriebene, über ITS-RFLP abgrenzbare, Art *F. acutatum* (Nirenberg & O'Donnell 1996) gültig.

Fusarium redolens* versus *Fusarium oxysporum

Einleitend wurden bereits die unterschiedlichen Ansichten zur taxonomischen Stellung und zur Conspezifität von *Fusarium oxysporum* und *F. redolens* erläutert.

Die vorliegenden Untersuchungen auf der Ebene der ITS-RFLP als auch mit RAPD grenzen beide Arten eindeutig voneinander ab. Zu vergleichbaren Ergebnissen für *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*- und *F. redolens* f. sp. *dianthi*-Isolaten verschiedener VCGs kommen unter Verwendung von zwei Restriktionsenzymen ebenfalls Waalwijk & Baayen (1995). Eine klare Trennung wie bei den vorliegenden RAPD-Resultaten zeigen Untersuchungen an einigen *F. oxysporum* und *F. redolens*-Isolaten von *Hordeum vulgare*-Wurzeln (Yli-Mattila et al. 1996). Mit anderen Techniken sind ebenfalls Unterschiede zwischen beiden Arten manifestiert: RFLP-Untersuchungen der Gesamt-DNA zeigen mit einer Ausnahme für beide Arten unterschiedliche Muster (Manicom & Baayen 1993), wie auch Untersuchungen bei *F. oxysporum* f. sp. *lupini* und *F. oxysporum* var. *redolens* (Wollenw.) Gordon (= *F. redolens* Wollenw.) in fünf von acht untersuchten Isoenzymssystemen Unterschiede vorfinden (Rataj-Guranowska & Wolko 1991). Ebenso sind Sequenzinformationen der 28S rRNA bei *F. oxysporum* und *F. redolens* unterschiedlich (Guadet et al. 1989).

Gegen eine Differenzierung in zwei Arten sprechen Untersuchungen zur vegetativen Kompatibilität, wobei sich die Rasse 1 von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini* vegetativ kompatibel zu einem Isolat von *F. redolens*, die Rasse 2 zu zwei anderen Isolaten von *F. redolens* verhalten soll (Rataj-Guranowska et al. 1991). Auch zeigen Protein- und Esterasemuster von an Ölpalmen pathogenen *F. redolens*- und *F. oxysporum* f. sp. *elaidis*-Isolaten keine nennenswerten Unterschiede (Ho et al. 1985). Möglich ist, daß in beiden Fällen die Isolate nicht eindeutig identifiziert waren. Eine letztendliche Bestätigung würden erneute Untersuchungen zur vegetativen Kompatibilität mit den über RAPD charakterisierten Isolaten liefern.

Aufgrund aller Ergebnisse sind beide Arten gemäß der früheren Beschreibung (Wollenweber & Reinking 1935; Gerlach & Nirenberg 1982) als getrennt und eigenständig zu betrachten. Vermutungen über die Conspezifität von *F. redolens* und *F. oxysporum* sind abzulehnen. Die Sektionszuordnung beider Arten wurde im vorigen Abschnitt diskutiert.

Eine größere Variabilität ist innerhalb von *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* anhand verschiedener VCGs und der Trennung in Rassen bekannt (Baayen & Gams 1988;

Baayen & Kleijn 1989; Rataj-Guranowska et al. 1991; Rataj-Guranowska & Wolko 1991). Über RAPD-Bandenmusterunterschiede lassen sich zwei Subpopulationen bei den untersuchten Isolaten von *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* ermitteln. Leider liegen keine näheren Informationen zu den VCGs der hier untersuchten Isolate vor, so daß bestehende Korrelationen zu VCGs oder anderen Eigenschaften nur vermutet werden können. *Fusarium redolens* f. sp. *dianthi*-Isolate von *Dianthus caryophyllus* und *D. barbatus* werden in unterschiedliche VCGs von *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* gegliedert und als neue Rassen definiert (Aloi & Baayen 1993). Aufgrund der klaren Unterscheidbarkeit über ITS-RFLP- und RAPD-Muster der Arten *F. redolens* und *F. oxysporum*, ist dieser Neubenennung zu widersprechen.

Rassendifferenzierung bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum*-Isolate lassen sich nach der vorliegenden Arbeit in fünf RAPD-Mustergruppen unterschiedlicher Variabilität differenzieren.

Nach der Beschreibung von Wollenweber & Reinking (1935) waren die in der Gruppe A mit homogenen Bandenmustern angesiedelten Isolate 64.495, 65.633 und 65.634 aufgrund ihres Duftes als echte Rasse 1 zu interpretieren. Die RAPD-Bandenmuster unterscheiden sich jedoch von dem als Referenz für Rasse 1 hinterlegtem Isolat 66.843 (ATCC 16421). Auch Pathogenitätstestungen an Baumwoll- und Tabaksorten zeigen (Nirenberg et al. 1996), daß das Merkmal Duft nicht mit der Rasse 1 korreliert ist. Da bis auf den Duft keine Korrelationen zu anderen physiologischen oder zu phytopathologischen Merkmalen feststellbar sind, ist nach derzeitigem Kenntnisstand eine Erklärung dieser mit RAPD-Mustern oder über Fettsäureprofile (Hering 1994) abgrenzbaren Isolate nicht möglich.

Nach den vorliegenden und früheren Untersuchungen (Hering 1993) können bei den Referenzisolaten der Rassen 1, 2, 6 Isolate sowie den anderen in der gleichen Gruppe B sortierten Isolate keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Eine mit den vorliegenden RAPD-Ergebnissen vergleichbare Variabilität stellten Assigbetse et al. (1994) innerhalb dieser Gruppe fest. Als Konsequenz der festgestellten RAPD-Ähnlichkeiten definierten sie alle Isolate der Rassen 1, 2 und 6 als eigenständige Rasse „A“. Frühere Vermutungen über die Ähnlichkeit der Rassen 1 und 2 (Armstrong & Armstrong 1958) sowie der Rasse 6 zu Rasse 2 (Armstrong & Armstrong 1978) können also mit RAPD-Untersuchungen bestätigt werden. Auch in ihrer Pathogenität gegenüber Baumwolle unterscheiden sie sich nicht (Assigbetse et al. 1994; Nirenberg et al. 1994b). Die unterschiedliche Pathogenität an Tabaksorten (!), die zur ursprünglichen Ausweisung der Rassen 1, 2 und 6 führte (Armstrong & Armstrong 1958, 1978) konnte von Nirenberg et al. 1996 in Infektionsversuchen nachvollzogen werden.

Wie auch in früheren Ergebnissen (Hering 1993; Assigbetse et al. 1994) bilden Isolate der Rasse 4 eine eigenständige Gruppe (C), die von den anderen Gruppen deutlich abzugrenzen ist. Die in Indien oder China an *Gossypium arboreum* und *G. herbaceum* pathogene Rasse 4 läßt sich demnach mit RAPD eindeutig charakterisieren.

Innerhalb der RAPD-Gruppe D sind die Isolate der Rassen 3 und 5 gruppiert. Frühere Vermutungen über eine nahe Verwandtschaft der Rassen 3 und 5 (Ibrahim 1966) können durch die vorliegenden RAPD-Muster bestätigt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit Infektionsversuchen, wo diese Isolate eine charakteristische Adernvergilbung hervorrufen (Nirenberg et al. 1994b); Pathogenitätstestungen an Nichtbaumwollwirten zeigen allerdings auch hier eine Unterscheidbarkeit (Nirenberg et al. 1996).

Die in der vorliegenden Arbeit in Gruppe E sortierten, als *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* erhaltenen, Isolate 67.668 und 67.669 fallen aus den für die anderen *F. o. f. sp. vasinfectum*-Isolaten festgestellten Bandenmustern heraus. Da, sie nach Nirenberg et al. (1996) nicht pathogen an den von ihnen getesteten Baumwollsorten sind, müssen diese Isolate vorbehaltlich zukünftiger Ergebnisse als fehlbestimmt angesehen werden.

Zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Untersuchungen standen keine Isolate der aus China beschriebenen Rassen 7 und 8 zur Verfügung. Untersuchungen zur Pathogenität zeigen auch hier Unterschiede (Chen et al. 1985; Nirenberg et al. 1996). Neueste RAPD-Resultate zeigen für Isolate der Rasse 7 Ähnlichkeiten zur Rasse 4, während die Rasse 8 von allen anderen *F. o. f. sp. vasinfectum*-Isolaten unterscheidbar ist (Hering et al. 1996b).

Die vorgefundenen Gruppierungen stimmen mit RAPD-Untersuchungen an anderen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*-Isolaten mit gleichem Rassenspektrum mit Ausnahme der Rassen 7 und 8 (Assigbetse et al. 1994) sowie mit Untersuchungen zur Fettsäurezusammensetzung (Hering et al. 1993; Hering 1994) überein. Die zitierten Arbeiten wie auch Untersuchungen zur vegetativen Kompatibilität (Fernandez et al. 1994) stellten für alle der hier in Gruppe B sortierten Isolate, ebenfalls eine höhere Variabilität fest.

Die Frage, ob Rassen bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* mit RAPD differenziert werden können ist nach den vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig zu beantworten, da die phytopathologische Definition einer Rasse nur bestimmte Sorten einer Wirtsart befallen zu können (Aust et al. 1991) bei der Ausweisung der Rassen von *F. o. f. sp. vasinfectum* nicht angewendet wurde. Die Einteilung in Rassen erfolgte nicht nur anhand ihrer Pathogenität gegenüber bestimmten Baumwollsorten, sondern auch über die Pathogenität an *Gossypium arboreum*, *G. hirsutum*, *G. barbadense* sowie verschiedenen Nichtbaumwollwirten wie *Nicotiana*, *Glycine*, *Lupinus*, *Abelmoschus* und einigen anderen (Armstrong & Armstrong 1958, 1959, 1969, 1978, 1980; Ebbels 1975).

Ausschließlich an Baumwollarten und -sorten durchgeführte Infektionsversuche zeigen für *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* nur drei unterscheidbare Infektionsmuster, die mit den bisher beschriebenen Rassen 1/2/6, 3/5 sowie 4 korrelieren (Ibrahim & Nirenberg 1993; Assigbetse et al. 1994; Nirenberg et al. 1994b). Assigbetse et al. (1994) interpretieren ihre ähnlichen Pathogenitäts- wie auch RAPD-Resultate dahingehend, daß an Baumwolle nur drei Rassen existieren. Legt man diese Interpretation zur Frage der Differenzierbarkeit von Rassen bei *F. o. f. sp. vasinfectum* zugrunde, dann können diese so definierten Rassen mit RAPD unterschieden werden.

Werden allerdings die sechs untersuchten, an Nichtbaumwollwirten ermittelten Rassen als Differenzierungsbasis vorausgesetzt, dann können die Rassen 1, 2 und 6 sowie die

Rassen 3 und 5 über RAPD-Muster nicht getrennt werden. Ähnliche Probleme zeigen auch andere RAPD-Untersuchungen zur Rassendifferenzierung innerhalb spezialisierter Formen von *Fusarium oxysporum*: Bei *F. o. f. sp. pisi* ist lediglich die Rasse 2 von vier untersuchten Rassen abgrenzbar (Grajal-Martin et al. 1993) und *F. o. f. sp. dianthi*-Isolate verschiedener Rassenzugehörigkeit zeigen nur zwei RAPD-Gruppen, die von nicht pathogenen *F. oxysporum*-Isolaten unterschiedlich sind (Manulis et al. 1993; Manulis et al. 1994; Wright et al. 1996). Ebenso korrelierten die festgestellten RAPD-Muster bei *F. o. f. sp. cubense* (Bentley et al. 1995) und *F. o. f. sp. phaseoli* (Woo et al. 1996), vergleichbar mit den vorliegenden Untersuchungen, nicht mit bisher bezeichneten Rassen.

Daß durch unterschiedliche Virulenz definierte Rassen, nicht mit RAPD differenzierbar sind, kann mit der Gen-für-Gen-Hypothese begründet werden. Sie besagt, daß in einem Pathosystem, dem im Wirt vorhandenen Resistenzgenen, ein Gen im Erreger (Virulenzgen) gegenüberstehen muß, welches in der Lage ist, diese Resistenz zu überwinden (Aust et al. 1991). Bei *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* ist diese Hypothese allerdings zu erweitern, da nicht davon auszugehen ist, daß tatsächlich das gleiche Resistenzgen in den verschiedenen Wirtspflanzen vorhanden ist. Vielmehr ist anzunehmen, daß wirtsseitig mehrere Resistenzgene und auf der Erregerseite mehrere Virulenzgene existieren müssen. Zu einer Infektion käme es immer dann, wenn sich mindestens ein Resistenzgen und ein Virulenzgen gegenüber stehen. Das Wirtsspektrum von *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* ist durch die Existenz mehrerer Virulenzgene erklärbar, denen wirtsabhängig eine Auswahl von Resistenzgenen gegenüberstehen: Beispielsweise sind Rasse 2-Isolate an *Nicotiana tabacum* 'Gold Dollar' pathogen, Isolate der Rasse 1 nicht; Isolate der Rasse 2 besitzen das entsprechende Virulenzgen welches das Resistenzgen bei *Nicotiana tabacum* 'Gold Dollar' überwinden kann; bei Rasse 1-Isolaten ist es nicht vorhanden, somit kommt es nicht zu einer Infektion. Ein anderes Virulenzgen muß in den Pathosystemen Rasse 1 oder Rasse 2 und *Lupinus luteus* 'Weiko 3' für die Anfälligkeit verantwortlich sein, dieses Virulenzgen fehlt bei Rasse 6-Isolaten. Nach diesen Überlegungen wäre die bisherige phytopathologische Definition einer Rasse, nämlich nur bestimmte Sorten einer (!) Wirtspflanzenart zu infizieren, entsprechend weiter zu fassen.

Auf molekularer Ebene ist zu folgern, daß über Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen definierte Rassen sich nur in einigen oder wenigen Genen bzw. DNA-Sequenzen unterscheiden. RAPD-Untersuchungen, wie sie hier mit einer begrenzten Anzahl von Primern durchgeführt wurden, analysieren nur einen Bruchteil des Gesamtgenoms. Daher ist die Wahrscheinlichkeit gering, gerade diejenigen DNA-Bereiche zu treffen, die physiologische Rassen charakterisieren. Würde man die Untersuchungen mit hunderten von Primern durchführen, dann ist es theoretisch denkbar, eine Bande zu finden, die mit einem Pathogenitätsgen gekoppelt ist. Wirtsseitig werden solche als 'bulkled segregant' bezeichnete Analysen dazu verwendet, um bei Pflanzen an bestimmte Resistenzen gekoppelte Marker feststellen (Haley et al. 1993; Adam-Blondon et al. 1994; Koller et al. 1994; Mouzeyar et al. 1995; Poulsen et al. 1995). Für eine rasche Isolatcharakterisierung auf Erregerseite sind sie aufgrund des immensen Aufwandes jedoch nicht geeignet.

Nach der Definition, daß spezialisierte Formen ein „unterschiedliches, genetisch fixiertes Wirtspflanzenspektrum innerhalb einer Parasitenart“ besitzen (Aust et al. 1991), wäre aufgrund der Pathogenitätsreaktionen an verschiedenen Arten, eine Ausweisung zweier weiterer spezialisierter Formen neben *F. o. f. sp. vasinfectum* angebracht gewesen. Vergleichbar mit der vorliegenden RAPD-Differenzierungsebene, wären dann andere Untersuchungen auf der Ebene spezialisierter Formen, die Isolate von *F. o. f. sp. lycopersici* von *F. o. f. sp. radidis-lycopersici* unterscheiden (Carbonell et al. 1994).

Vermutlich muß bei Betrachtung des *Fusarium oxysporum*-Komplexes von ganz anderen intraspezifischen Verhältnissen ausgegangen werden als sie derzeit durch Kategorien wie spezialisierte Formen und Rassen gliederbar sind. RFLP-Untersuchungen mitochondrialer DNA zeigen für Rassen von *F. o. f. sp. vasinfectum* auf gleichem Niveau Differenzen, wie die spezialisierten Formen *conglutinans*, *matthioli*, *raphani* und *lycopersici* von *F. oxysporum* untereinander (Fernandez et al. 1994). In diesen Ergebnissen wird eine engere genetische Verwandtschaft von *F. o. f. sp. vasinfectum* Rasse 1-, 2- und 6-Isolaten zu *F. o. f. sp. raphani* und von Rasse 3-Isolaten zu *F. o. f. sp. conglutinans* deutlich, wie auch Isolate der Rasse 4 in gleichem genetischen Abstand zu *F. o. f. sp. matthioli* und zur Gruppe der Rasse 3- und *F. o. f. sp. conglutinans*-Isolate geclustert werden. Vergleichbare Resultate mit diesen DNA-Ähnlichkeiten deuten auch neueste RAPD-Untersuchungen mit unterschiedlichen spezialisierten Formen bei *F. oxysporum* an (Hering et al. 1996b).

Alle bisher vorliegenden molekularen Untersuchungen und ihr Bezug zu phytopathologischen Eigenschaften deuten an, daß zukünftig eine veränderte intraspezifische Betrachtung bei *Fusarium oxysporum* mit der Überarbeitung ausgewiesener spezialisierter Formen und Rassen nötig ist, um alle Erkenntnisse in einem einheitlichen Schema zu integrieren. Wie die Ergebnisse zeigen, wären RAPD-Mustergruppen als Hilfe zur Charakterisierung oberhalb der Ebene phytopathologisch ermittelter Rassen geeignet.

4.2.4 RAPD- und ITS-RFLP-Klassifikation von *Martiella*-Fusarien

Die Zuordnungen von 19 morphologisch differenzierbaren Arten und einer Varietät (Nirenberg, pers. Mitt. 1996) sowie von fünf spezialisierten Formen zu vorgefundenen RAPD-Mustergruppen zeigen, wie auch sechs weitere abgrenzbare Mustergruppen (Hering & Nirenberg 1995b) ein wesentlich differenzierteres Spezieskonzept innerhalb der Sektion *Martiella* auf, als bisher in der Literatur (Wollenweber & Reinking 1935; Snyder & Hansen 1941; Wollenweber 1943; Messiaen 1959; Booth 1971; Joffe 1974; Nelson et al. 1981; Gerlach & Nirenberg 1982) angenommen.

Die aktuellen Untersuchungen bestätigen damit bisher durchgeführte Mating Type- und Isoenzym-Studien sowie molekularbiologische Arbeiten, die eine breitere Diversität innerhalb der Sektion *Martiella* feststellten. Sieben verschiedene Mating Groups sind bislang den spezialisierten Formen *batatas*, *mori*, *xanthoxyli*, *robiniae*, *pisi* (= *F. lathyri*) bei *F. solani*, sowie *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1 und Rasse 2 (= *F. solani* var. *petroliphilum*) zugeordnet (Sakurai & Matuo 1960; Schippers & Snyder 1967; Matuo & Snyder 1973).

Katalase- (Hall 1967) oder Esterase-Isoenzymuntersuchungen (Xiao 1988) stellten ebenfalls größere Unterschiede innerhalb der Sektion fest. An einigen Isolaten durchgeführte Sequenzuntersuchungen der großen Untereinheit der RNA zeigten insgesamt sieben Gruppierungen (Guadet et al. 1989) bzw. deckten phylogenetische Unterschiede zwischen *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1, Rasse 2 (= *F. solani* var. *petroliphilum*), *F. lathyri*, *F. martiiphaseoli* und *F. solani* var. *solani* auf (O'Donnell & Gray 1995). Bisherige RAPD-Studien bei Isolaten innerhalb der Sektion *Martiella* demonstrierten ebenfalls Unterschiede zwischen *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1 und *F. solani* var. *petroliphilum* (Crowhurst et al. 1991) und grenzen Isolate von *F. lathyri* von einigen anderen ab (Gray & Achenbach 1995).

Abgesehen von Isolaten mit klar definierten Mating Types sind die in einigen Untersuchungen verwendeten Namen der Isolate aufgrund der unterschiedlichen nomenklatorischen Auffassung innerhalb der Sektion *Martiella* nicht eindeutig zuzuordnen, um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen. Beispielsweise wird *Fusarium solani* var. *coeruleum* Snyder et Hans. in den Sequenzuntersuchungen von Guadet et al. (1989) zusammen mit *F. lathyri* geclustert. *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Sacc.) Booth ist die Synonymbezeichnung zu der anerkannten Art *F. coeruleum* (Wollenweber & Reinking 1935; Gerlach & Nirenberg 1982). Da die vorliegenden Untersuchungen sowohl mit RAPD als auch mit ITS-RFLP *F. coeruleum* und *F. lathyri* deutlich distanzieren, stellt sich die Frage warum die Ergebnisse derart widersprüchlich ausfallen.

Eine mögliche Erklärung ist im Verlauf der Taxonomie für *F. coeruleum* zu finden, welche in diesem Fall zur falschen Bezeichnung dieses Isolates geführt haben könnten. Nach Snyder & Hansen (1941) wurde *F. coeruleum* und *F. radicolica* aufgrund der bläulichen Farbe der Kulturen synonym als *F. solani* f. sp. *radicolica* gestellt. Booth (1971) hat später *F. solani* f. sp. *radicolica* von der neu eingeführten Varietät *F. solani* var. *coeruleum* unterschieden. Daher ist denkbar, daß dieses Isolat zunächst als *F. solani* f. sp. *radicolica* gemäß der Nomenklatur von Snyder & Hansen (1941) bestimmt wurde und eventuell durch die Kulturfarbe bedingt, nach der Nomenklatur von Booth (1971) als *F. solani* var. *coeruleum* bezeichnet wurde. Damit ist allerdings noch nicht die Frage geklärt, warum dieses *F. solani* var. *coeruleum*-Isolat nach den Sequenzuntersuchungen in die gleiche Gruppe mit *F. lathyri* gestellt wird. Bekannt ist, daß von *F. solani* f. sp. *radicolica* zwei Rassen beschrieben sind, wobei die Rasse 2 später durch den gleichen Mating Type als identisch mit *F. lathyri* angesehen wurde (Sakurai & Matuo 1960; Matuo & Sakurai 1963; Reichle et al. 1964). Letztendlich kann daraus abgeleitet werden, daß sich bei dem in der Untersuchung von Guadet et al. (1989) verwendeten *F. solani* var. *coeruleum*-Isolat um ein *F. solani* f. sp. *radicolica* Rasse 2, also um ein *F. lathyri* gehandelt haben muß. In diesem Fall würden ihre Resultate, die Untersuchungen zum gleichen Mating Typ für *F. solani* f. sp. *radicolica* Rasse 2 und *F. lathyri* sowie die vorliegenden Ergebnissen übereinstimmen.

Den hilfreichen Einsatz der ITS-RFLP-Technik zur Charakterisierung von Pilzen demonstrieren deutliche Differenzen bei Isolaten, die zuvor als *Fusarium eumartii* bezeichnet waren. Diese Stämme werden nach der ITS-RFLP verschiedenen Gruppen zugeordnet (A1, A4, A6, A9, B1) und auch nach den RAPD-Mustern sind diese Isolate eindeutig

anderen Arten zuzuordnen. Weiterhin deuten gleiche Restriktionsmuster enge genetische Beziehungen von *F. solani* zu einigen seiner spezialisierten Formen und anderen Arten an (vgl. Abb. 17). Im Vergleich mit morphologischen Befunden (Nirenberg, pers. Mitt.) bei vorkommenden Hauptfruchtformen ist festzustellen, daß mittelgroße Ascosporen vorwiegend bei Vertretern der ITS-RFLP-Gruppe A und große Ascosporen vorwiegend in der Gruppe B auftreten. Die ITS-RFLP-Technik stellt somit ein ergänzendes Werkzeug dar, welches eine übergeordnete Charakterisierung von Isolaten erlaubt. Insbesondere dann, wenn andere Techniken, wie die feiner differenzierende RAPD durch viele verschiedene Muster keine klare Aussagen mehr zulassen. Am Beispiel der mit *F. eumartii* bezeichneten Isolate, wäre nur mit RAPD-Untersuchungen kein einheitliches Bild zu erzielen.

Allgemein betrachtet ermöglicht die RAPD die Feststellung von Variabilitäten innerhalb taxonomischer Gruppen. Die Einsetzbarkeit sowie die Art und Weise der Auswertung der Resultate ist im Abschnitt 4.3 ausführlich diskutiert. Die vorliegenden Ergebnisse bei *Martiella*-Fusarien zeigen, daß sich die Wirtsspezifität (McClure 1951; Sakurai & Matuo 1959; Sakurai & Matuo 1961a; Matuo & Sakurai 1965) in relativ einheitlichen RAPD-Mustern widerspiegelt. Variablere Bandenmuster sind zumeist bei denjenigen Arten festzustellen, in denen neben unterschiedlich parasitischen auch saprophytische Isolate vorhanden sind (*F. solani* var. *solani*, *F. carneolum*, *F. lathyri*) oder die unterschiedlichen geographischen Regionen entstammen (*F. ensiforme*). Vergleichbare Ergebnisse zu pathogenen und nicht pathogenen Isolaten sind bei *F. oxysporum* bekannt (Manulis et al. 1993; Manulis et al. 1994; Wright et al. 1996). Aufgrund der Rekombination ist bei heterothallichen Arten ebenfalls eine gewisse Variabilität zuzulassen (vgl. Kap. 4.3.2 - S. 98).

Beurteilt man die eingesetzten Primer anhand ihrer methodischen Eigenschaft möglichst homogene und artspezifische Muster herauszufinden, so stellt sich Primer 63 als besonders geeignet heraus. Die anderen Primer, insbesondere Primer 15 und 44 zeigen artübergreifende monomorphe Banden. Solche Primer sind ebenfalls interessant, spiegeln sie doch genetische Ähnlichkeiten, die als verwandtschaftliche Beziehungen interpretiert werden können, zwischen einzelnen RAPD-Gruppen wider. Letztgenannte Primerkategorie bestätigt dann auf der viel feiner differenzierenden RAPD-Ebene, die auch auf höhere Ebene ermittelte ITS-RFLP-Ähnlichkeit.

Die Kombination beider molekularer Techniken in Verbindung mit bisherigen morphologischen, physiologischen und biologischen Kenntnissen anderer Arbeiten ermöglicht den Aufbau des nachfolgenden vorläufigen Klassifikationsschemas. Vorläufig deshalb, weil einige Isolate (64.610, 67.589) mit unterschiedlichen ITS-RFLP-Gruppierungen und ca. 30 weitere *Martiella*-Stämme (siehe Tab. 5) einzelne RAPD-Muster ausbilden, die bislang nicht zuzuordnen sind. Auch konnten Isolate weiterer beschriebener spezialisierter Formen in die Untersuchungen nicht mit einbezogen werden. Von ihnen muß angenommen werden, daß sie, wie die hier untersuchten aufgrund morphologischer, phytopathologischer (Xiao 1988, Yu & Fang 1948) und biochemischer Untersuchungen (Xiao 1988) ebenfalls, vielleicht sogar auf Artebene abgegrenzt werden können. Es muß also vermutet werden, daß innerhalb der *Martiella*-Sektion noch einige weitere Grup-

pierungen existieren. Dies deuten auch Untersuchungen von O'Donnell (zit. in Nirenberg (1995b) an, der 40 sogenannte phylogenetische Arten innerhalb der Sektion unterscheiden konnte.

Zahlreiche in der vorliegenden Untersuchung verwendete Referenzisolate sollen in zukünftigen Arbeiten einen sicheren Vergleich von Ergebnissen ermöglichen. Die Bezeichnungen der in diesem Klassifikationsschema verwendeten Taxa, wie auch der phytopathologischen Termini basieren auf früheren Beschreibungen, die an entsprechender Stelle genannt sind.

***Fusarium ambrosium* (Gadd et Loos) Agnihothrudu et Nirenberg**

= *F. bugnicourtii* Brayford

= *F. tumidum* var. *coeruleum* Bugnicourt

ist als eigenständige Art anerkannt (Brayford 1987; Nirenberg 1990). Aufgrund der verlängerten konidiogenen Zellen vom Typ der *Martiella*-Fusarien und der Konidienähnlichkeiten zu *F. solani* wurde *F. ambrosium* in diese Sektion gegliedert (Brayford 1987). Die Untersuchungen der ITS bestätigen diese Zuordnung mit identischen Restriktionsmustern zu *F. solani* var. *solani* und den anderen in A1 gruppierten Arten und spezialisierten Formen. Über RAPD-Muster sind Isolate von *F. ambrosium* eindeutig charakterisiert, wobei identische RAPD-Marker mit anderen Isolaten der gleichen ITS-Restriktionsgruppe kaum vorhanden sind. Das RAPD-Muster des Isolates 67.605, isoliert von *Hevea brasiliensis*, weist Unterschiede zu den drei anderen Isolaten 65.382, 65.389 und 65.390 auf, die von *Camellia sinensis* isoliert wurden. Ob dies als Indiz für das Auftreten phytopathologischer Gruppierungen im Sinne von Wirtsspezialisierungen oder als natürliche Variabilität innerhalb der Art zu werten ist, können letztendlich nur Pathogenitätstestungen klären.

***Fusarium carneolum* Sacc.**

= *F. solani* (Mart.) Sacc. var. *minus* Wollenw.

= *F. caucasicum* Letov

unterscheidet sich morphologisch von *F. solani* var. *solani* durch „kleinere 3-, selten 4-, ausnahmsweise 5-septierte Konidien“ (Wollenweber & Reinking 1935). Obwohl einige Ähnlichkeiten in den Bandenmustern zu *F. solani* var. *solani* bestehen, sind sie mit einigen Primern (15, 63) deutlich davon und den anderen Arten abzugrenzen. Die Bandenmuster sind wie bei *F. solani* var. *solani* stärker variabel und ist auch hier auf geographisch unterschiedliche Populationen und Wirtsherkünfte zurückzuführen. RAPD-Bandenmuster von ursprünglich als *F. caucasicum* (63.603) bezeichneten Isolaten lagen im Bereich der intraspezifischen Variabilität. Vorbehaltlich nicht ausschließender Fehlbestimmungen oder Verwechslungen der untersuchten Isolate und vorbehaltlich der Untersuchungen mit dem Originalisolat wird *F. caucasicum* synonym zu *F. carneolum* angesehen.

***Fusarium caucasicum* Letov**

siehe *Fusarium carneolum* Sacc.

Fusarium coeruleum (Libert) ex. Sacc.

wird von Wollenweber (1943) und Gerlach & Nirenberg (1982) als eigene Art akzeptiert, wohingegen Joffe & Palti (1972) und Booth (1971) es als Varietät von *F. solani* betrachten. *Fusarium coeruleum* ist durch seine tiefblau bis purpurnen Kolonien und morphologisch durch seine fast zylindrischen bis spindelig-sichelförmigen Makrokonidien charakterisiert (Wollenweber 1943; Domsch et al. 1980). Verwandtschaftlich ist *F. coeruleum* nach den ITS-RFLP-Mustern weit entfernt von den anderen *Martiella*-Fusarien einzustufen, da *F. coeruleum*-Stämme sich deutlich von Isolaten der ITS-RFLP-Gruppen A und B unterscheiden. Vielmehr ist *F. coeruleum*, wie die ITS-RFLP-Analysen im Zusammenhang bei *F. tabacinum* zeigen, in die Nähe zu *F. merismoides* (62.256) und *F. oxysporum* (66.843) geclustert (vgl. Abb. 11). Es ist daher zu überdenken, ob diese Art weiterhin der Sektion *Martiella* zuzurechnen ist.

Die nahezu identischen und damit als artspezifisch anzusehenden RAPD-Muster für Isolate unterschiedlicher geographischer Herkünfte von *F. coeruleum* bestätigen die Eigenständigkeit der Art. Andere Arbeiten mit *F. coeruleum* sind, wie einleitend in diesem Kapitel dargestellt, mit Vorsicht auszuwerten, da nach der Nomenklatur von Snyder & Hansen (1941) die ebenfalls kartoffelpathogenen und abgrenzbaren *F. radiculicola* zusammen mit *F. coeruleum* synonym als *F. solani* var. *radiculicola* definiert wurden.

Fusarium ensiforme Wollenw. et Reink.

= *F. javanicum* Koord. var. *ensiforme* Wollenw. et Reink.

besitzt ein breites Wirtspflanzenspektrum (Wollenweber & Reinking 1935), welches den Wirtsherkünften der in dieser RAPD-Gruppe angesiedelten Isolate weitgehend entspricht. Innerhalb der Gruppe können mit einigen Primern drei weitere Subpopulationen unterschieden werden, die nach Nirenberg (mündl. Mitt., 1996) mit feinen morphologischen Unterschieden korrelieren. Das Isolat 64.406 unterscheidet sich durch zusätzliche Schnittstellen von der ITS-RFLP Gruppe A1, was ebenfalls auf eine differenziertere Betrachtung von *F. ensiforme* schließen läßt. Eine Arbeit in der *F. javanicum* var. *ensiforme* Erwähnung findet (Schippers 1966), muß vorsichtig interpretiert werden, da eine Verwechslung mit *F. solani* f. sp. *cucurbitae* nicht auszuschließen ist.

Fusarium epimyces Cke.

= *F. solani* (Mart.) Sacc. var. *martii* (App. et Wollenw.) Wollenw.

hat längere und schlankere Konidien als *F. solani* var. *solani* (Wollenweber & Reinking 1935). Von anderen Autoren wird *F. epimyces* als *F. solani* var. *solani* angesehen (Snyder & Hansen 1941; Messiaen 1959; Booth 1971; Joffe 1974; Nelson et al. 1981). Nach den RAPD-Mustern ist die Art gut charakterisiert und ist als eigenständig anzuerkennen. Da bereits früher von Wollenweber morphologische Abgrenzungen erfolgten, wird die frühere Artbeschreibung anerkannt. Ähnlichkeiten in den RAPD-Bandenmustern bestehen zu *Fusarium* sp. nov. I und zu *F. lathyri*.

***Fusarium eumartii* Carp.**

= *F. solani* (Mart.) App. et Wollenw. var. *eumartii* (Carp.) Wollenw.

= *F. solani* f. sp. *eumartii* (Carp.) Snyder et Hans. pr. p.

Ist in erster Linie pathogen an *Solanum tuberosum* und verursacht eine Trockenfäule (Goss 1924; Escande & Radtke 1973; Escanole et al. 1973; Zarzycka 1984; Hwang & Evans 1985; Mantecon 1993), soll daneben auch an anderen Bäumen, wie z. B. an *Quercus* (Ragazzi et al. 1993) Infektionen hervorrufen. Nach Wollenweber & Reinking (1935) unterscheidet sich der Pilz von *Fusarium solani* durch höher septierte Konidien. Der von ihnen angegebene Wirtspflanzenkreis mit Kartoffeln und anderen subtropischen und tropischen Gewächsen, darunter auch Kaffee, stimmt mit den drei hier gruppierten Isolaten überein.

Jedoch erwies sich in Infektionsversuchen (Nirenberg 1995, unveröffentlicht) nur das Referenzisolat 62.215 (Gerlach & Nirenberg 1982) pathogen an Kartoffeln. Dieses Isolat bildet ein einzelnes RAPD-Muster aus und ist dadurch klar von den anderen Isolaten abgrenzbar, die aufgrund morphologischer Merkmale in dieser RAPD-Gruppe angesiedelt wurden. Aus den unterschiedlichen Mustern kann auf eine Existenz weiterer intraspezifischer Unterteilungen geschlossen werden.

Früher und in der BBA-Stammsammlung mit *F. eumartii* bezeichnete Isolate sind verschiedenen ITS-RFLP-Gruppen (A1, A4, A6, A9, B2) zugeordnet, wobei diese Einteilung ebenfalls durch die RAPD-Muster bestätigt wird. Daher muß angenommen werden, daß bislang als *F. eumartii* benannte Stämme nur nach ihrer Pathogenität an Kartoffeln gemäß der Nomenklatur von Snyder & Hansen (1941) oder einfach nach der höheren Konidienseptierung (Wollenweber & Reinking 1935) identifiziert wurden. Bislang als *F. eumartii* angesehenen Isolate müssen daher wesentlich differenzierter betrachtet werden, als bisher angenommen.

Abgrenzen läßt sich die Gruppe *F. eumartii* mit den Isolaten 62.213, 62.215 und 65.064 von den anderen Fusarien durch seine ITS-RFLP-Sortierung in die Gruppe B1, welche deutliche genetische Unterschiede zu *F. solani* var. *solani* und seinen ebenfalls in A angesiedelten spezialisierten Formen aufweisen. Mit gleichen ITS-RFLP-Mustern kann auf enge verwandtschaftliche Beziehungen zu *F. pestis* und *Fusarium* sp. nov. V geschlossen werden. Die anderen kartoffelpathogenen Isolate von *F. solani* f. sp. *bata-tas*, *F. striatum* und *F. radicola* sind durch deutliche Unterschiede in den ITS-RFLP- und RAPD-Mustern als eigenständig von diesem *F. eumartii* (62.215) abgrenzbar (siehe Abb. 17).

***Fusarium illudens* Booth (Teleomorph: *Nectria illudens*)**

ist von Gerlach (1981) und Gerlach & Nirenberg (1982) als morphologisch abgrenzbare Art akzeptiert, wobei Ähnlichkeiten zu *F. eumartii* bestehen sollen. Die Ascosporen sind merklich größer als die von *Nectria haematococca* sensu Wollenw. (Booth 1971). Hier mit ähnlichen RAPD-Mustern gruppierte Isolate stammen von Bäumen aus Neuseeland. Eine höhere Variabilität der Bandenmuster ist zu bemerken. Bis auf ein Isolat sind alle Isolate der ITS-RFLP-Gruppe B7 zugeordnet. Das herausfallende Isolat

64.788 zeigt Unterschiede mit dem Restriktionsenzym BsiZ I und ist im Muster identisch zu den Gruppe A-Isolaten. Dieses Isolat ist in den mit Primer 15 und 44 erzielten RAPD-Mustern eindeutig zu *F. illudens* zu stellen. Einzelne Marker, die mit den anderen Primern erzielt wurden sind ebenfalls mit anderen in dieser Gruppe gestellten Stämmen identisch. Dies ist einer der wenigen Fälle, wo in RFLP-Untersuchungen der ITS innerhalb einer RAPD-Gruppierung unterschiedliche Restriktionsmuster auftreten. Vergleichbare Studien von Sequenzierungen der ITS-Region bei *F. solani* f. sp. *phaseoli* zeigen ebenfalls an einer oder wenigen Positionen Basenunterschiede (O'Donnell & Gray 1995), so daß solche geringfügigen Unterschiede als natürliche intraspezifische Variabilität hingenommen werden müssen.

Fusarium javanicum Koord. (Teleomorph: *Nectria cancri* Rutg.)

= *Hypomyces haematococcus* (Berk. et. Br.) var. *cancrici* (Rutg.) Wollenw.

soll in der Sporenform *Fusarium striatum* ähnlich sein, sich aber von diesen durch eine öfter vorkommende höhere Septierung unterscheiden (Wollenweber & Reinking 1935). Nach den für alle Isolate relativ einheitlichen RAPD-Mustern und der eigenständigen ITS-RFLP-Gruppe A3 läßt sich *Fusarium javanicum* von den anderen Martiellen abgrenzen.

Fusarium lathyri Taub.

= *F. solani* (Mart.) Sacc. var. *martii* (App. et Wollenw.) Wollenw. forma 2 Snyder

= *F. solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *pisi* Snyd. et Hans.

ist an *Pisum sativum* (Snyder & Hansen 1941; Sakurai & Matuo 1959; Bolton & Donaldson 1972) und *Lathyrus odoratus* (Wollenweber & Reinking 1935) pathogen. Von anderen *Martiella*-Fusarien sind diese Isolate über ihre Mating Population VI (Matuo & Snyder 1973) abgrenzbar und nach O'Donnell & Gray (1995) als phylogenetische Art aufgrund der Auswertung von ITS-Sequenzdaten anzusehen. Morphologische Unterscheidungsmerkmale zu *F. solani* waren die Ursache, daß diese Art früher als Varietät abgegrenzt war (Jones 1923; Wollenweber & Reinking 1935). Auch in seiner physiologischen Eigenschaft, der Toleranz gegenüber dem Phytoalexin Pisatin, unterscheiden sich *F. lathyri*- von *F. solani* f. sp. *cucurbitae*- und *F. solani* f. sp. *phaseoli*-Isolaten (VanEtten & Stein 1978). Aufgrund der RAPD-Ähnlichkeit zueinander wurden die Isolate dieser Gruppe zugeordnet. Dennoch können zwei Untergruppen festgestellt werden: In einer Untergruppe mit Stämmen isoliert von *Pisum* und einem Isolat aus dem Boden sind mit mehreren Primern homogene RAPD-Muster zu erzielen, welche *F. solani* f. sp. *pisi* im engeren Sinn entsprechen würden. Die andere Untergruppe beinhaltet Isolate von unterschiedlichen Wirten und geographischen Herkünften. Drei dieser Isolate waren in der Stammsammlung der BBA ursprünglich als *F. radicolica* identifiziert, zwei weitere mit *F. solani* var. *martii* forma 2 bezeichnet. Diese Untergruppe ist durch gemeinsame RAPD-Polymorphismen in die engere Verwandtschaft zu *F. solani* f. sp. *pisi* zu stellen. Eine Abgrenzung als eigene Gruppe liegt anhand der Muster nahe, ist aber nur durch Pathogenitätstests an Kartoffeln und Erbsen oder durch Bestimmung der Mating Types der in der vorliegenden Arbeit molekularbiologisch definierten Isolate zu verifizieren. Das von Wollenweber & Reinking

(1935) beschriebene *F. javanicum* var. *radicicola* (= *F. radicicola*) war als Pathogen von Kartoffeln und einigen anderen Pflanzen nachgewiesen, kam jedoch nicht an *Pisum* und *Lathyrus* vor, dem Wirtspflanzenkreis von *F. solani* var. *martii* forma 2. Von den in dieser Untersuchung als *F. radicicola* abgegrenzten kartoffelpathogenen Isolate lassen sie sich durch die unterschiedlichen ITS-RFLP-Gruppen deutlich unterscheiden. Die Hypothese, daß *F. solani* f. sp. *pisi* und *F. oxysporum* f. sp. *pisi* aufgrund ihrer phytopathologischen und morphologischen Variabilität eine einzige Art repräsentieren (Bolton & Donaldson 1972), muß aufgrund der drastischen ITS-RFLP-Unterschiede zwischen beiden Arten entschieden abgelehnt werden.

Fusarium martiiphaseoli Burkholder

= *F. solani* (Mart.) Sacc. var. *martii* (App. et Wollenw. sub specie) Wollenw. forma 3 Snyder
 = *F. solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyd. et Hans.

gilt als Verursacher des 'Sudden death syndrome' (SDS) an *Glycine max* (Abney et al. 1993; Hnetkovsky et al. 1996) ist darüber hinaus pathogen an *Phaseolus vulgaris* (Jones 1923; Wollenweber & Reinking 1935; Booth 1971). *Fusarium martiiphaseoli*-Isolate bilden die abgrenzbare ITS-RFLP-Gruppe B6 mit nur gering variablen von den anderen Arten deutlich abgrenzbaren RAPD-Mustern. Bandenmusterunterschiede sind bei den untersuchten Isolaten von Sojabohne und Bohne nicht feststellbar. Andere RAPD-Untersuchungen konnten SDS-Isolate ebenfalls von anderen Fusarien unterscheiden (Gray & Achenbach 1995). Die morphologische Unterscheidbarkeit von anderen *Martiella*-Fusarien (Matuo & Snyder 1973), phylogenetische Untersuchungen von ITS-Sequenzdaten (O'Donnell & Gray 1995), die vorliegenden Ergebnisse rechtfertigen die Stellung als eigene Art.

Fusarium pestis Sor.

= *F. solani* (Mart.) Sacc. var. *martii* (App. et Wollenw.) forma 1 Wollenw.

Nach dem Artkonzept von Snyder & Hansen (1941) wird der von Wollenweber als *Fusarium solani* var. *martii* forma 1 geführte Pilz zu *F. solani* gerechnet. Die ITS-RFLP-Untersuchungen zeigen aber, daß dieser bodenbewohnende Pilz deutlich durch seine Zugehörigkeit zu Gruppe B1 von *F. solani* zu unterscheiden ist. Auffällig sind die sehr homogenen RAPD-Muster für Isolate, bei denen bislang keine selektive Pathogenität nachgewiesen ist. Weitere Untersuchungen mit den hier charakterisierten Isolaten zur Pathogenität müssen erfolgen. Genetische Ähnlichkeiten nach der ITS-RFLP-Charakterisierung bestehen zu *F. eumartii* und zu *Fusarium* sp. nov. V.

Fusarium radicicola Wollenw. s. str.

= *F. javanicum* Koord. var. *radicicola* Wollenw. pr. p.

wird als pathogen an *Solanum tuberosum* beschrieben, soll aber auch an anderen Wirten vorkommen (Wollenweber & Reinking 1935). Nach den charakteristischen RAPD-Mustern lassen *F. radicicola*-Isolate von den ebenfalls an Kartoffeln pathogenen *F. striatum* unterscheiden, obwohl zwischen beiden Ähnlichkeiten in den Mustern bestehen. Auch die Ansiedlung in der gleichen ITS-RFLP-Gruppe A6 zusammen mit *F. striatum* läßt auf eine engere genetische Verwandtschaft zwischen beiden schließen.

Nach den RAPD-Mustern wäre auch eine Abgrenzung auf der Ebene einer spezialisierten Form von *F. striatum* denkbar. Jedoch sprechen Infektionsversuche dagegen, in denen sich alle Isolate von *F. radicolica* und *F. striatum* als gleichermaßen kartoffelpathogen erwiesen (Nirenberg 1995, unveröffentlicht). Von den orchideenpathogenen *Nectria bolbophylli* sind sie durch ihre Zugehörigkeit zu unterschiedlichen ITS-Restriktionsfragmentgruppen deutlich zu differenzieren. Schwierigkeiten im Vergleich mit anderen Veröffentlichungen ergeben sich durch den Zusammenschluß der von Wollenweber differenzierten *F. javanicum* var. *radicolica* und *F. coeruleum* als *F. solani* f. sp. *radicolica* Snyd. et Hans. durch Snyder & Hansen (1941).

Fusarium solani (Mart.) Sacc. var. *minus* Wollenw.
siehe *Fusarium carneolum* Sacc.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. var. *solani*

wird aufgrund der verschiedenen Konzepte sehr unterschiedlich interpretiert. Nach Gerlach (1981) sind die von Wollenweber & Reinking (1935) unterschiedenen *F. solani* var. *minus* Wollenw., *F. solani* var. *martii* (Appel et Wollenw.) Wollenw., *F. solani* var. *striatum* (Sherb.) Wollenw. und *F. solani* var. *aduncisporum* (Weimer et Harter) Wollenw. als synonym zu *F. solani* var. *solani* zu betrachten. Mit Ausnahme der Varietät *aduncisporum*, wo keine eindeutigen Isolate zur Untersuchung verfügbar waren, entsprechen die obigen Varietäten eigenen abgrenzbaren RAPD-Mustergruppen. Die hier aufgrund der RAPD-Muster gruppierten *F. solani* var. *solani*-Isolate sind als *F. solani* im Sinne von Wollenweber anzusehen. Spätere Unterscheidungen in weitere spezialisierte Formen (z. B. (McClure 1951; Sakurai & Matuo 1959; Sakurai & Matuo 1961a; Matuo & Sakurai 1965) sind darüber hinaus eindeutig über ihre RAPD-Muster zu charakterisieren und daher von *F. solani* var. *solani* streng abzugrenzen. *Fusarium solani* var. *solani* ist als Pathogen an zahlreichen Kulturpflanzen weltweit bekannt, wodurch sich die höhere Variabilität in den RAPD-Bandenmustern erklären läßt. Aufgrund gleicher ITS-RFLP-Ergebnisse sind die Isolate von *F. solani* var. *solani* genetisch als sehr ähnlich mit *F. carneolum* (= *F. solani* var. *minus*), *F. epimyces* (= *F. solani* var. *martii*), *F. lathyri* (= *F. solani* var. *martii* forma 2), *F. ensiforme*, *Fusarium*-Anamorph von *Nectria bolbophylli*, Anamorph von *Nectria haematococca* sensu Wollenw. und *F. ambrosium* anzusehen. Innerhalb dieser Arten deuten einige RAPD-Marker, die für einige oder mehrere Arten identisch sind, auf eine nähere Verwandtschaft hin.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. var. *petroliphilum* Chen

= *F. javanicum* Koord. pr. p.

= *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *cucurbitae* (Jon.) Snyd. et Hans. Rasse 2

wurde von Chen & Fu (1986) beschrieben und ist anhand der für alle Isolate sehr homogenen RAPD-Muster abgrenzbar. Vergleichbare Ergebnisse in Bezug zur Variabilität und zur Differenzierung von *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1 zeigten die RAPD-Untersuchungen von Crowhurst et al. (1991). Auch sie fanden deutliche Unterschiede in den Bandenmustern zwischen den beiden bei *F. solani* f. sp. *cucurbitae* beschriebenen Rassen. Anhand der für *F. solani* var. *petroliphilum* spezifischen ITS-RFLP-Gruppe

A7 sowie den bei *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1 diskutierten Kriterien und ihrer phylogenetischen Klassifizierung (O'Donnell & Gray 1995) sind sie ebenfalls als eigenständige Gruppe, evtl. auf Artebene abgegrenzt, zu akzeptieren.

***Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *cucurbitae* (Jon.) Snyder. et Hans. Rasse 1**
= *F. javanicum* Koord. pr. p.

wird als spezifisch pathogen an Wurzeln, Stengeln und Früchten von *Cucurbita* beschrieben (Snyder 1938; Prasad 1949; Paternotte 1987; Ohto et al. 1989; Nagao et al. 1994). Später wurde die Rasse 2 eingeführt, die im Gegensatz zur Rasse 1 nur pathogen an Früchten ist (Toussoun & Snyder 1961). Beide Rassen sind untereinander nicht kreuzbar (Toussoun & Snyder 1961) und unterscheiden sich durch ihre Mating Groups I bzw. V (Matuo & Snyder 1973; Snyder et al. 1975). Morphologische Untersuchungen kamen zu widersprüchlichen Aussagen. Während (Toussoun & Snyder 1961) keine Unterschiede bei Makrokonidien feststellen konnten, ordneten (Matuo & Snyder 1973) sie zwei unterschiedlichen morphologischen Gruppen zu. Differenzierungen mittels RAPD (Crowhurst et al. 1991) ergaben, wie auch die vorliegende Arbeit, deutliche Bandenmusterunterschiede zwischen beiden Rassen bzw. Mating Types. Die Variabilität in den RAPD-Mustern für Rasse 1-Isolate mit einigen Primern entspricht den Ergebnissen von Crowhurst et al. (1991). Von den anderen *Martiella*-Fusarien sind die RAPD-Muster klar unterscheidbar. Die eigene ITS-RFLP-Gruppe A8, wie auch phylogenetische Untersuchungen von ITS-Sequenzdaten (O'Donnell & Gray 1995), sprechen für eine eigenständige Behandlung, die sie von Rasse 2-Isolaten abgrenzt. Eine Differenzierung beider Rassen auf Artebene sollte daher in Erwägung gezogen werden. Ebenso wurde aus biochemischen, genetischen und physiologischen Daten geschlossen (Van Etten & Kistler 1988), daß die MP I und MP VI (*F. lathyri*) unterschiedliche Arten im biologischen Sinn darstellen. Auch diese Ansicht wird von den vorliegenden Ergebnisse unterstützt.

***Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *cucurbitae* (Jon.) Snyder. et Hans. Rasse 2**
siehe *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. var. *petroliphilum* Chen

***Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *batatas* McClure**

verursacht wirtschaftlich bedeutsame Schäden durch Wurzel-, Oberflächen- und Endfäulen auf Süßkartoffelknollen (McClure 1951; Campbell & Collins 1987; Campbell & Collins 1988; Chen et al. 1990) sowie Lagerschäden (Nielsen & Moyer 1979; Clark 1992). Daneben sollen an *Ipomoea batatas* pathogene *Fusarium solani* Isolate an anderen Früchten auch Wundfäulen hervorrufen können (Nielsen & Moyer 1979; Clark 1980); Eine sichere Bestimmung als *F. solani* f. sp. *batatas* war aus ihren Arbeiten jedoch nicht ersichtlich. Eindeutig sind Isolate von *F. solani* f. sp. *batatas* nach ihrem Mating Type II zu charakterisieren (Matuo & Snyder 1973; Matuo 1979). Ebenso eindeutig ist die Abgrenzung nach den einheitlichen RAPD-Mustern. Nach den ITS-RFLP-Mustern sind sie in der gleichen Gruppe A1 mit *F. solani* und den spezialisierten Formen *mori*, *robiniae* und *xanthoxyli* angesiedelt. Aufgrund dieser nahen Verwandtschaft, der Abgrenzbarkeit über den Mating Type und der RAPD-Muster besteht kein Grund an der

Differenzierung als spezialisierte Form nach McClure (1951) zu zweifeln, vielmehr ist zu überlegen, ob aufgrund der fehlenden Kreuzbarkeit mit anderen spezialisierten Formen nicht auch eine Artabgrenzung erfolgen sollte.

***Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *mori* Sakurai et Matuo**

ist aus Japan als Erreger einer Stammfäule an Maulbeerbäumen (*Morus*) beschrieben. Inokulationen an Kartoffeln, Bohnen, Erbsen und Süßkartoffeln führten nicht zu Infektionen (Sakurai & Matuo 1959). Wie durch die Wirtsspezifität sind Isolate eindeutig durch den Mating Type III (Matuo & Snyder 1973) und den einheitlichen RAPD-Mustern sehr gut als eigenständige Population charakterisiert. Die Isolate gehören der ITS-Restriktionsgruppe A1 an und sind damit auch genetisch in die Nähe von *F. solani* stellen.

***Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *pisi* Snyder et Hans.**

siehe *Fusarium lathyri* Taub.

***Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *phaseoli* Snyder et Hans.**

siehe *Fusarium martiiphaseoli* Burkholder

***Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *robiniae* Matuo et Sakurai**

zeigt eine höhere Virulenz an Zweigen von *Robinia pseudoacacia* als die anderen spezialisierten Formen (Matuo & Sakurai 1965). Ebenso, wie mit der Zuordnung zur Mating Population VII (Matuo & Snyder 1973), sind Isolate anhand der RAPD-Muster eindeutig zuzuordnen. Anhand einzelner polymorpher Marker lassen sich zwei Untergruppen bilden, deren Bedeutung derzeit noch unklar ist. Nach den ITS-Restriktionsmustern der Gruppe A1 und der damit gezeigten genetischen Verwandtschaft kann die Klassifizierung als spezialisierte Form von *F. solani* akzeptiert werden.

***Fusarium solani* (Mart.) App. et Wollenw. f. sp. *xanthoxyli* Sakurai et Matuo**

= *F. elegans* Yamamoto et Maeda

verursacht Stammfäule an *Xanthoxylum piperitum* (Sakurai & Matuo 1961b). Von den anderen spezialisierten Formen und Arten ist der Pilz durch seine selektive Pathogenität (Sakurai & Matuo 1961b) und durch seine spezifische Mating Population IV klar charakterisiert (Matuo & Snyder 1973). Auch nach den homogenen, deutlich von anderen Martiellen abgrenzbaren, RAPD-Mustern für Isolate von *F. solani* f. sp. *xanthoxyli* besteht an der eigenständigen Behandlung kein Zweifel. Unterschiedliche Ansichten herrschen jedoch über die grundlegende taxonomische Stellung des Pilzes: (Yamamoto 1961) stellte morphologische Unterschiede zu *F. solani* fest, beschrieb den Pilz als neue Art *Fusarium elegans* und reihte ihn in die Sektion *Elegans* ein, während (Sakurai & Matuo 1961b; Matuo 1972) ihn als spezialisierte Form von *F. solani* zu *Martiella* betrachten. Die ITS-RFLP-Analysen (Gruppe A1) bestätigen eine engere Verwandtschaft zu *F. solani* und den spezialisierten Formen *batatas*, *mori* und *robiniae* sowie die Zuordnung in die Sektion *Martiella*. Dennoch könnte er wegen der fehlenden Kreuzbarkeit mit *F. solani* oder dessen anderen spezialisierte Formen (Sakurai & Matuo 1961b) auch auf Artebene abgegrenzt betrachtet werden. Auch würden dem

einige identische RAPD-Banden mit anderen *Martiella*-Fusarien nicht widersprechen, da im Verhältnis wesentlich größere Ähnlichkeiten in den RAPD-Mustern zwischen *F. graminearum*, *F. cerealis* und *F. culmorum* bestehen, die ebenfalls gleiche ITS Restriktionsmuster aufweisen (Hering et al. 1995e). Gleiches gilt für die anderen hier dargestellten spezialisierten Formen.

***Fusarium striatum* Sherb. (Teleomorph: *Nectria ipomoeae* Halst.)**

= *F. javanicum* Koord. var. *radicicola* Wollenw. pr. p.

In Infektionsversuchen erwiesen sich Isolate von *F. striatum* (Nirenberg & Brielmaier-Liebetanz 1996), wie auch von *F. radicicola* und *F. eumartii* als gleichermaßen pathogen an Kartoffeln (Nirenberg 1995, unveröffentlicht). Sie lassen sich von letzteren jedoch durch ihre RAPD-Muster trennen. Durch gleiche ITS-RFLP-Ergebnisse (Gruppe A6) und einige für *F. striatum* und *F. radicicola* monomorphe RAPD-Banden bestehen große Ähnlichkeiten. Ob beide hier differenzierbaren Arten morphologisch oder phytopathologisch synonym als eine Art anzusehen sind muß zunächst weiteren Untersuchungen zur Biologie und Pathogenität vorbehalten bleiben. Von anderen *Martiella*-Fusarien sind beide Arten abgrenzbar, wie auch Sequenzanalysen der 28S rRNA des CBS-Stammes 225.58 (= 64.431) bestätigen (Guadet et al. 1989). Dies unterstützt die Eigenständigkeit der morphologischen Charakterisierung von Halsted.

***Fusarium* sp. nov. I**

Die hier gruppierten Isolate bilden eine klar abgrenzbare homogene RAPD-Mustergruppe innerhalb der ITS-Restriktionsgruppe A1. Nach Untersuchungen von Nirenberg (unveröffentlicht) sind die hier gruppierten Isolate morphologisch von den anderen Arten unterscheidbar. Alle untersuchten Isolate stammen aus Venezuela oder Guyana und wurden von Rinde tropischer Bäume isoliert. Nach der Homogenität in den Bandenmustern, wie sie bei anderen Arten und phytopathologischen Formen innerhalb dieser Restriktionsgruppe festgestellt wurden, kann ebenso angenommen werden, daß auch hier eine spezialisierte Form, vergleichbar mit den anderen in dieser ITS-RFLP-Gruppe angesiedelten spezialisierten Formen bei *F. solani*, vorliegt. Zukünftige Untersuchungen über das Kreuzungsverhalten dieser mittels RAPD definierten Isolate könnten weitere Aufschlüsse über die taxonomische Stellung bringen. Mit den Primern 15 und 65 sind monomorphe Banden mit *F. epimyces* festzustellen.

***Fusarium* sp. nov. II**

Eine zweite klar anhand der RAPD-Muster abgrenzbare Gruppe bilden Stämme, die allesamt von Bäumen aus Neuseeland isoliert wurden. Von *Fusarium* sp. nov. I, *Nectria haematococca* sensu Wollenw. und anderen Isolaten lassen sie sich durch die eigene ITS-RFLP-Gruppe (A4) unterscheiden. Einige Isolate aus der BBA-Stammesammlung der BBA waren früher, wohl aufgrund der höher septierten Konidien, als *F. eumartii* bezeichnet. Aufgrund dieser Unterschiede zu den anderen *Martiella*-Fusarien sollte diese Gruppe als eigenständig definiert werden. Letztendliche Klärung der taxonomischen Stellung dieser Isolate muß über ergänzende Studien erfolgen.

***Fusarium* sp. nov. III**

Eine weitere Gruppe mit Isolaten von Bäumen aus Südamerika, Neuseeland und Frankreich ist durch die eigene ITS-RFLP-Gruppe A5 charakterisiert. Die RAPD-Muster der Isolate in dieser Gruppe zeigen trotz vieler Gemeinsamkeiten eine höhere Variabilität, die mit der geographischen Verbreitung zu erklären ist. Isolate aus Venezuela und Jamaica sind von denen aus Frankreich und Neuseeland mit den Primern 15, 63 und 65 anhand einzelner Marker zu unterscheiden. Auf welchem taxonomischen Level letztendlich die Abgrenzung erfolgen kann, können nur zukünftige morphologische Untersuchungen, der hier definierten Isolate klären.

***Fusarium* sp. nov. IV**

Hier gruppierte Isolate sind von Bäumen oder tropischen Pflanzen aus Venezuela und Französisch-Guyana isoliert. Sie bilden eine heterogene RAPD-Gruppe. Die Einordnung in diese Gruppe erfolgte aufgrund von Ähnlichkeiten einzelner Banden, die mit Primer 15 und 40 erzielt wurden. Die Charakterisierung nach der ITS-RFLP ordnet alle Isolate in die eigene Gruppe B2 ein. Die Isolate 65.683 und 65.927 waren bis zu dieser Untersuchung in der BBA-Stammsammlung als *F. eumartii* bezeichnet.

***Fusarium* sp. nov. V**

Diese Isolate stammen von holzigen Pflanzen aus Guyana. Nach den RAPD-Mustern bilden sie eine relativ homogene Gruppe, die von den anderen abgegrenzt zu betrachten ist. Bereits Samuels, von dem die Isolate 65.023 und 65.050 eingesandt wurden, grenzte beide als neue Art von den anderen ab. Die eigenständige RAPD-Gruppe bestätigt seine Auffassung. Mit ihrer ITS-RFLP-Mustergruppe B1 sind sie mit *F. pestis* und *F. eumartii* identisch, was auf engere genetische Beziehungen schließen läßt.

***Fusarium* sp. nov. VI**

Diese Isolate wurden von *Buxus sempervirens* isoliert. Vermutlich um den gleichen Erreger handelt es sich in einer anderen Arbeit (Montgomery & Wills 1973), in der *F. solani* an *Buxus* eine Wurzelfäule hervorruft. Morphologisch und aufgrund ihrer selektiven Pathogenität an *Buxus* sind diese Isolate von den anderen *Martiella*-Fusarien zu unterscheiden (Nirenberg, 1995, mündl. Mitt.). In den RAPD-Mustern sind sich die zwei verfügbaren Isolate sehr ähnlich. Nach den ITS-RFLP-Analysen bilden sie zusammen mit dem Isolat 66.998 von *Nectria subsequens* die von den anderen Martiellen abgrenzbare Gruppe B5. Aufgrund der morphologischen Unterschiede, deren molekularbiologischen Bestätigung und der spezifischen Pathogenität an *Buxus* ist die Abgrenzung als eigenständige Art gerechtfertigt.

***Nectria bolbophylli* P. Henn (*Fusarium*-Anamorph)**

= *Nectria ipomoeae* (Hals.) Wollenw. forma 1 Wollenw. pr. p.

Bei diesen Isolaten ist aufgrund ihrer Wirtsherkünfte eine Spezialisierung zu vermuten, da bis auf ein Isolat alle von Orchideen aus deutschen Gärtnereien isoliert wurden. Es ist daher anzunehmen, daß diese Isolate mit dem Isolat, welches Wollenweber & Reinking (1935) von *Bulbophyllum* beschrieben, vergleichbar sind. Auch ließen sie

damals die Frage offen, ob der Pilz mit dem kartoffelpathogenen *Fusarium radicolica* (= *F. javanicum* var. *radicolica*) identisch ist oder nicht. Eindeutige Unterschiede in den RAPD-Bandenmustern zwischen beiden und die Zuordnung zu verschiedenen ITS-RFLP-Gruppen sprechen für die getrennte Akzeptanz beider Arten. Die ITS-RFLP-Zugehörigkeit zur Gruppe A1 zusammen mit den meisten spezialisierten Formen von *F. solani*, kann auch dahingehend interpretiert werden, daß diese Isolate als spezialisierte Form, z. B. als *F. solani* f. sp. *bolbophylli* f. sp. nov. anzusehen sind.

***Nectria haematococca* Berk et Br. sensu Wollenw. (*Fusarium*-Anamorph)**
= *Hypomyces haematococcus* (Berk. et Br.) Wollenw.

Nach der Beschreibung von Wollenweber & Reinking (1935) soll die Konidienstufe mit *F. eumartii* übereinstimmen, wenngleich in manchen Isolierungen bei *Nectria haematococca* höher septierte Konidien vorkommen sollen. Der Wirtspflanzenkreis wird mit verschiedenen tropischen holzigen Pflanzen angegeben. Die für die Isolate ermittelte RAPD-Gruppe ist uneinheitlicher, was nach den Erfahrungen auf unterschiedliche Wirts- und geographische Herkünfte zurückführbar ist. Mit Primer 63 werden nahezu einheitliche Muster ausgeprägt, die diese Gruppe von den anderen *Martiella*-Fusarien abgrenzen. Nach den ITS-RFLP-Zuordnungen in die Gruppe A1 bestehen genetische Ähnlichkeiten zu *F. solani* und den anderen in dieser Gruppe angesiedelten Fusarien (siehe Abb. 18 und Abb. 19).

***Nectria plagianthi* Dingley (*Fusarium*-Anamorph)**

Das Anamorph-Stadium ist morphologisch von den anderen *Martiella*-Fusarien zu unterscheiden (Nirenberg, unveröffentlicht). Diese Abgrenzung des Stammes 68.511 ist anhand der eigenständigen ITS-RFLP-Gruppe B9 zu bestätigen mit näherer Verwandtschaft nach der Clusteranalyse (Abb. 17) zu den ebenfalls aus Neuseeland stammenden Isolaten von *F. illudens*. Auch nach dem einzelnen RAPD-Muster wäre die Artabgrenzung zu rechtfertigen. Einzelne monomorphe RAPD-Marker mit Primer 55 und 65 deuten Ähnlichkeiten ebenfalls zu *F. illudens* und zu Isolaten von *Fusarium* sp. nov. VI an. Leider stand nur ein Isolat für die Untersuchungen zur Verfügung.

***Nectria „subsequens“* von G. J. Samuels unter diesem Namen erhalten (*Fusarium*-Anamorph)**

ist morphologisch, wie die vorherige Art abgrenzbar (Nirenberg, unveröffentlicht). Auch hier stand nur das Isolat 66.998 für die Untersuchungen zur Verfügung. Die ITS-RFLP-Resultate ordnen es zusammen mit den *Fusarium* sp. nov. VI-Isolaten in die Gruppe B5 ein. Von diesen ist es jedoch durch vollkommen unterschiedliche RAPD-Muster zu unterscheiden. Die Abtrennung als eigene Art ist daher gerechtfertigt.

***Nectria borneensis* Petrak (*Fusarium*-Anamorph)**

ist, obwohl nur ein Isolat aus Indonesien zur Verfügung stand, klar morphologisch zu differenzieren (Nirenberg, unveröffentlicht). Nach den ITS-RFLP-Mustern ist dieses Isolat einzelstehend der Gruppe A9 zugeordnet und auch anhand der eigenen RAPD-Bandenmuster klar von den anderen abgrenzbar.

Nach den bisherigen Erfahrungen, daß auf Wirte spezialisierte Formen über ihre spezifischen RAPD-Muster differenziert werden können und einige auf Artebene abgrenzbar sind, ist zu vermuten, daß die nachfolgend aufgeführten spezialisierten Formen in ähnlicher Weise unterschieden werden können. Von allen standen leider keine Isolate für die Untersuchungen zur Verfügung.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *albizziae* Bagchee (Bagchee 1954); Habitat: *Albizia procera*.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *aleuritidis* Chen et Xiao (Chen & Xiao 1989)

Habitat: *Aleurites fordii*. Nach morphologischen Kriterien, Kulturcharakteristiken und Pathogenitätstests (Chen & Xiao 1989) sowie über Esterase-Profile (Xiao 1988) werden Unterschiede zu acht anderen spezialisierten Formen ermittelt.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *aurantifoliae* Bhatnagar et Prasad (Bhatnagar 1966)

Habitat: *Citrus aurantifolia*

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *dalbergiae* Bakshi et Singh (Bakshi & Singh 1959)

Habitat: *Dalbergia sissoo*.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *fabae* Yu et Fang (Yu & Fang 1948)

soll nach der Sporengröße und durch die typischen Wurzelfäule an *Vicia fabae* von *F. martiiphaseoli* (= *F. solani* f. sp. *phaseoli*) und *F. lathyri* (= *F. solani* f. sp. *pisi*) zu unterscheiden sein (Yu & Fang 1948).

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *keratitis* Ming et Yu (Ming & Yu 1968)

wurde aus einer eitrigen Wunde vom Menschen isoliert.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *lupini* Weimer (Weimer 1944)

Habitat: *Lupinus*. Da Pathogenitätstests des als f. sp. *lupini* beschriebenen Isolates an Erbsen fehlen, ein weiteres Isolat eindeutig als *F. solani* f. sp. *pisi* identifiziert wurde, welches gleiche Symptome an *Lupinus luteus* und *Lupinus angustifolius* hervorruft ist auch aufgrund der Beschreibung und der wenigen verfügbaren Literatur (Weimer 1944; Patil 1972; Patil 1973) zu vermuten, daß *F. solani* f. sp. *lupini* synonym zu *F. solani* f. sp. *pisi* anzusehen ist.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *otomycosis* Ming (Booth 1971).

Wurde von Ming & Yu (1966) zunächst als *F. otomycosis* Ming als Krankheitserreger im menschlichen Ohr beschrieben. Dadurch, daß eine frühere Artbeschreibung existiert, muß angenommen werden, daß diese Isolate ebenfalls eine genetisch eigenständige Gruppe bilden.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *piperis* Albuquerque (Albuquerque 1961)

Habitat: *Piper nigrum*.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *radicicola* (Wollenw.) Snyder et Hans. Rasse 2

ist mit *F. solani* f. sp. *pisi* kreuzbar, mit allen anderen spezialisierten Formen nicht (Sakurai & Matuo 1960), daher wurde in anderen Arbeiten der Pilz synonym mit *F. solani* f. sp. *pisi* gestellt (Matuo & Sakurai 1963; Reichle et al. 1964). Von *F. radicicola* (= *F. solani* f. sp. *radicicola*), dessen Isolate nur an *Solanum tuberosum* pathogen sind, sollen Rasse 2-Isolate zusätzlich an *Morus* Infektionen hervorruhen (Sakurai & Matuo 1960; Booth 1971).

Fusarium solani (Mart.) Sacc. f. sp. *viridiflavum* Ming et Yu (Ming & Yu 1964)

Habitat: eiterige Stelle am Fuß eines Patienten. Nach den Aussagen in der Veröffentlichung soll *F. redolens* Wollenw. synonym zur neu kombinierten spezialisierten Form sein. Leider standen keine Isolate zur Verfügung an denen überprüft werden könnte, ob es sich hierbei um ein *Fusarium* der Sektion *Martiella* handelt oder ob die Isolate als *F. redolens* anzusehen sind. *Fusarium redolens* ist deutlich anhand der ITS-RFLP-Unterschiede abzugrenzen (siehe Abb. 11).

4.3 Molekulare Techniken zur Differenzierung von Pilzen

4.3.1 Nutzung von ITS-RFLP-Analysen zur Artendifferenzierung

Bisherige Arbeiten zur Differenzierung von Pilzen über die ITS-Region lassen sich generell drei unterschiedlichen Aussagen zuordnen: Während die einen charakteristische art- oder varietätspezifische ITS-RFLP-Muster mit keiner oder nur geringer intraspezifischer Variabilität feststellen, finden andere deutliche intraspezifische Unterschiede vor. Ein weiterer Teil verfügbarer Publikationen handelt von gleichen Mustern für Isolate verschiedener Arten. Die vorliegenden Ergebnisse bei verschiedenen Fusarien lassen sich allen drei Kategorien zuordnen.

Die artspezifische Differenzierung mit einheitlichen ITS-RFLP-Mustern wurde bei *Pythium heterothallicum*, *P. splendens* und *P. sylvaticum* (Chen 1992) sowie bei *P. ultimum*, *P. irregulare* und *P. spinosum* demonstriert (Chen et al. 1992). Sieben *Tuber*-Arten können ebenfalls unterschieden werden, wobei bei *Tuber melanosporum* eine geringe intraspezifische Variabilität zugelassen wird (Henrion et al. 1994). Neben der Unterscheidung auf Artebene bei *Pseudocercospora anguises*, *P. aestiva* sind davon die Varietäten *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* und *P. herpotrichoides* var. *acuformis*, wenngleich zwischen beiden höhere Ähnlichkeiten vorhanden sind, zu differenzieren (Hering et al. 1995c). Weiterhin fanden sich für vier *Phytophthora*-Arten (Lee & Taylor 1992), für *Gremmeniella abietina*-Isolate verschiedener geographischer Herkünfte (Hellgren & Högberg 1995), *Polymyxa betae* (Ward et al. 1994) sowie für vier *Trichoderma*-Arten (Meyer 1991) artcharakteristische ITS-RFLP-Muster. Auch zeigte der Ektomykorrhizapilz *Tylospora fibrillosa* keine intraspezifischen Unterschiede (Erland et al. 1994). Dieser ersten Kategorie entsprechen die vorgefundenen Ergebnisse für *Fusarium oxysporum*, *F. redolens*, *F. coeruleum*, *Nectria cancri*, *F. martiiphaseoli*, darüber hinaus auch die klar definierten Isolate von *F. sambucinum* und *F. venenatum* bei Überverdau (siehe Abb. 8). Lee & Taylor (1992) und Erland et al. (1994) interpretieren ihre Ergebnisse dahingehend, daß die Unterschiede in der ITS-Region zur Identifikation und Differenzierung auf Artebene geeignet sind. In diesem Zusammenhang und im Vergleich mit den eigenen Ergebnissen wären die mit charakteristischen Mustern abgrenzbaren, morphologisch und physiologisch unterschiedlichen *Fusarium solani* var. *petroliphilum* und *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1 vermutlich als eigene Arten anzusehen (siehe auch Abschnitt 4.2.4 ab S. 81).

Hohe intraspezifische Variabilität sei hier als die Variabilität innerhalb derzeit beschriebener Taxa definiert. Es existieren jedoch Hinweise darauf, daß intraspezifische Unterschiede mit morphologischen oder anderen biologischen Merkmalen korrelieren, die eigentlich eine Artabgrenzung aus methodischer Sicht rechtfertigen würden. Beispielsweise lassen sich innerhalb von *Trichoderma viride* zwei morphologisch differenzierbare Untergruppen unterscheiden, die den unterschiedlichen ITS-RFLP-Mustern entsprechen (Meyer 1991). Bei *Heterobasidion annosum* konnten die zu zwei Intersterilitätsgruppen zuordenbaren Isolate abgegrenzt werden, wenngleich hohe Ähnlichkeiten zwischen beiden vorhanden waren (Chase et al. 1991; Karjalainen & Fabritius 1993); von beiden

Gruppen konnten *H. araucariae*-Isolate abgegrenzt werden (Chase et al. 1991). Das letzte Beispiel wäre vergleichbar mit der Differenzierung bei *Pseudocercospora*, wo neben Arten zwei zueinander ähnliche Varietäten differenziert werden (Hering et al. 1995c). Studien bei den *Gaeumannomyces graminis*-Varietäten *tritici*, *avenae* und *graminis*, die voneinander und von *Phialophora graminicola* abgrenzbar sind zeigen einige aus den Gruppierungen herausfallende Isolate (Ward & Akrofi 1994). Dies wird dahingehend ausgewertet, daß nicht alle Stämme des *Gaeumannomyces-Phialophora*-Komplexes in beschriebene taxonomische Gruppen fallen und, daß sich scheinbar bisherige Spezies und Varietätengrenzen überlappen (Ward & Akrofi 1994). Eine andere Interpretation der Daten wäre, daß die morphologisch bestimmbaren Grenzen fließend sind, und daraufhin fehlbestimmte Isolate zur vorgefundenen intraspezifischen Variation führten. Eine genaue Klärung dieses Sachverhaltes könnte nur von den Autoren selbst mit der Verifizierung der herausfallenden Isolate erfolgen. Hingegen konnte bislang bei zwei innerhalb von *Polymyxa graminis* festgestellten ITS-RFLP-Untergruppen keine Korrelation mit anderen biologischen Eigenschaften festgestellt werden (Ward et al. 1994). Als genetisch unterschiedliche Gruppen werden bei *Rhizoctonia solani* fünf ITS-RFLP-Muster innerhalb der Anastomosegruppe 2 (Liu & Sinclair 1992) und sechs innerhalb der Anastomosegruppe 1 (Liu & Sinclair 1993) interpretiert. Die eigenen Ergebnisse zeigen Differenzen bei einem Isolat von *Fusarium ensiforme* (64.404) welches aus der Gruppe der anderen herausfällt und bei *F. illudens*-Isolaten, die zwei unterschiedlichen Restriktionsgruppen zuzuordnen sind. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen über den Einsatz von ITS-RFLP-Mustern zur Differenzierung (Hering et al. 1995a; Hering et al. 1996a; Hering et al. 1996b; Niere et al. 1996) und der diskutierten Vermutungen über weitere noch nicht beschriebene Arten innerhalb der Sektion *Martiella* wird vorläufig angenommen, daß diese herausfallenden Isolate sich später tatsächlich als taxonomisch abgrenzbar herausstellen werden. Eine vergleichsweise starke intraspezifische Variation wurde auch bei *F. tabacinum* beobachtet; hier lassen sich die Isolate in fünf ITS-RFLP-Gruppen unterscheiden. *Fusarium tabacinum* ist taxonomisch wenig bearbeitet, eine hohe morphologische und phytopathologische Variabilität ist bekannt. Daher muß auch hier eine zukünftige Abgrenzung auf der Ebene von Varietäten oder spezialisierten Formen vermutet werden (siehe auch Abschnitt 4.2.2 - S. 75).

Verschiedene Arten mit gleichen ITS-RFLP-Mustern wurden bei den Ascomyceten *Monosporascus cannonballus* und *M. eutypoides* vorgefunden (Lovic et al. 1993), die zur Hypothese führten, daß trotz Differenzierbarkeit anhand der Sporen pro Ascus, beide Arten als synonym anzusehen sind (Martyn et al. 1993). Gleiche von den anderen untersuchten *Pythium*-Arten abweichende Muster hatten die morphologisch ähnlichen *P. arrhenomanes* und *P. graminicola*, was zur Vermutung führt beide Arten seien identisch und sollten neu kombiniert werden (Chen et al. 1992). Widersprüchlich zu den aufgestellten Hypothesen sind die vorliegenden Ergebnisse bei *Martiella*-Fusarien innerhalb der Restriktionsgruppe A1 zu sehen, wo mindestens neun Arten klar anhand der RAPD-Muster und anderer Merkmale abgrenzbar sind. Auch sind *Nectria ipomoeae* und *F. radicola* wie auch *F. eumartii*, *F. pestis* und *Fusarium* sp. nov. V trotz gleicher ITS-RFLP-

Muster über RAPD zu unterscheiden. *Fusarium culmorum*, *F. cerealis* und *F. graminearum* sind morphologisch klar zu charakterisieren und sind daher trotz gleicher ITS-RFLP-Resultate und hoher Ähnlichkeit in den RAPD-Mustern nach wie vor als Arten anzusehen (Hering et al. 1995e).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt zeigen die Arbeiten, daß sich die ITS-RFLP in vielen Fällen zur Charakterisierung und Klassifikation von Pilzen auf taxonomischen Ebenen eignet. Gewöhnlich unterscheiden sich Arten deutlicher in ihren Bandenmustern, während Varietäten höhere Ähnlichkeiten aufweisen. Ausnahmen wurden bei einigen genetisch eng verwandten Arten festgestellt, die nicht über ITS-RFLP-Muster unterschieden werden konnten. Andere Abweichungen können auf taxonomisch unzureichend bearbeitete Gruppen oder Isolate zurückgeführt werden.

Zusammenfassend läßt sich aus den Ergebnissen und bisherigen Veröffentlichungen folgern, daß ITS-RFLP-Differenzen nicht pauschal für jede Pilzgruppe eine Art- oder Varietätenabgrenzung rechtfertigen, wie auch gleiche Muster nicht in jedem Fall als artspezifisch definiert werden können. Um zu eindeutigen Aussagen zu gelangen, muß eine Kombination mit klassischen morphologischen Merkmalen und/oder sensitiveren Methoden, wie der RAPD, zur weiteren Beurteilung der Differenzen hinzugezogen werden. Zur groben Vorsortierung oder zur Klassifizierung unbekannter Isolate haben sich ITS-RFLP-Untersuchungen jedenfalls sehr gut bewährt.

4.3.2 Eignung der RAPD zur Charakterisierung von Pilzen

Nach den vorliegenden Ergebnissen sind Pilz-Arten eindeutig zu unterscheiden, wenn für alle Isolate einer Art nahezu homogene RAPD-Muster gebildet werden und zu den RAPD-Mustern der anderen Arten charakteristische Unterschiede bestehen. Danach können auch verschiedene Arten bei *Colletotrichum* (Sreenivasaprasad et al. 1992; Freeman et al. 1993), *Pseudocercospora* (Hering & Nirenberg 1993) und entomopathogene Pilze (Bidochka et al. 1994) unterschieden werden. Morphologisch ähnliche Arten können über RAPD-Muster zur eindeutigen Unterscheidung, z. B. bei *Drechslera*-Arten an *Lolium* (Nirenberg et al. 1994a) oder wie in der vorliegenden Arbeit bei *Martiella*-Fusarien, herangezogen werden. Ebenso lassen sich weitere *Fusarium*-Arten anhand ihrer Muster unterscheiden (Vagujfalvi & Szecsi 1993; Moeller et al. 1994; Voigt et al. 1995; Yli-Mattila et al. 1996). Allerdings sind die zur Abgrenzung heranzuziehenden Bandenmuster verschieden zu bewerten. *Fusarium sambucinum*, *F. venenatum* und *F. torulosum* zeigen artspezifische deutlich unterscheidbare Bandenmuster mit nur geringer intraspezifischer Variabilität. Ähnlichkeiten zwischen *F. sambucinum* und *F. venenatum* sind dabei nur vereinzelt mit einigen Primern zu erzielen. Hingegen sind die Muster bei *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. cerealis* sehr ähnlich (Hering et al. 1995e) und vergleichbar mit der hier vorliegenden Abgrenzung spezialisierter Formen bei *F. solani* oder *F. oxysporum*. Lediglich einzelne Marker werden hierbei zur Differenzierung der Arten herangezogen.

Diese Beispiele zeigen, daß zur Artunterscheidung die Bandenmuster stark unterschiedlich bewertet werden müssen und derzeit nur auf den untersuchten Artkomplex zu beziehen sind. Demnach ist momentan eine Differenzierung und Identifizierung nur bei Spezies eindeutig möglich, die taxonomisch gut bearbeitet sind und darüber hinaus, biochemisch und phytopathologisch eindeutig oder zusätzlich charakterisierbar sind (siehe Differenzierung bei *Discolor*-Fusarien, S. 62) und bei denen keine Varietäten, spezialisierten Formen oder Rassen ausgewiesen sind.

Sind vorgenannte intraspezifische Gruppierungen oder Variabilitäten bekannt, so treten gewöhnlich weitere Musterunterschiede auf. In ihrer Anzahl und Ausprägung überschneiden sie sich fließend mit den oben diskutierten Ergebnissen zur Artdifferenzierung. Werden die Ergebnisse ausschließlich auf den jeweils untersuchten Artkomplex bezogen, dann können RAPD-Marker erfolgreich zur Differenzierung unterhalb der Artebene eingesetzt werden: z. B. weist *Pseudocercospora herpotrichoides* die zwei gegenüber Pflanzenschutzmitteln ungleich sensitive Varietäten *herpotrichoides* und *acufiformis* auf, die über RAPD-Muster eindeutig zugeordnet werden können (Hering et al. 1995c) wie auch Formen bei *Drechslera teres* anhand von RAPD-Mustern unterschieden werden können (Schüler et al. 1993; Nirenberg et al. 1994c). Insbesondere zur Unterscheidung morphologisch nicht differenzierbarer phytopathologischer Zuordnungen wie spezialisierter Formen bei *Fusarium oxysporum* (Hering et al. 1996b) und *Fusarium solani* oder einiger derzeit ausgewiesener Rassen bei *Fusarium oxysporum* (Hering et al. 1992b; Grajal-Martin et al. 1993; Hering 1993; Assigbetse et al. 1994; Manulis et al. 1994; Bentley et al. 1995; Waalwijk & Baayen 1995; Wright et al. 1996), *Gremmeniella abietina* (Hamelin et al. 1993), *Ophiostoma ulmi* (Pipe et al. 1995), *Exserophilum turcicum* (Abadi et al. 1996) sowie bei *Bipolaris maydis* (Nicholson et al. 1993b; Nicholson et al. 1993c) sind RAPD-Muster einsetzbar. Bei anderen Arten, z. B. *Colletotrichum orbiculare* (Correll et al. 1993) oder *Metarhizium anisoplae* (Cobb & Clarkson 1993; Bidochka et al. 1994), wurden bislang keine intraspezifischen Differenzierungen vorgenommen; Wirtsspezialisierungen lassen sich hier über RAPD-Muster charakterisieren. Ebenso können Weizensteinbrandisolate – *Tilletia* spp. – wirtsabhängig in zwei RAPD-Gruppen unterschieden werden (Shi et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit sind bei *Fusarium tabacinum*-Isolaten von *Cucurbita* und innerhalb von *F. lathyri* die Wirtsherkünfte über charakteristische RAPD-Banden ableitbar. Weiterhin können Virulenzunterschiede bei *Venturia inaequalis* über RAPD-Marker festgestellt werden (Sierotzki et al. 1994). Kritische Anmerkungen zur prinzipiellen Differenzierbarkeit von Rassen mittels RAPD wurden am Beispiel von *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*-Rassen in Kapitel 4 ab S. 78 diskutiert.

In welcher Beziehung VCGs, somatische Inkompatibilität oder Anastomosegruppen bei Pilzen zu bestehenden Klassifikationsschemata zu sehen sind wird unterschiedlich diskutiert. Unklar ist daher auch inwieweit unterschiedliche RAPD-Muster für verschiedene VCGs zu interpretieren sind. Bei *Fusarium* werden VCGs häufig in Verbindung mit Rassen oder spezialisierten Formen gebracht (Correll 1991; Gonzalez-Candelas & Kolattukudy 1992; Guo et al. 1995). RAPD-Untersuchungen somatisch kompatibler

Isolate von *Phellinus tremulae* (Holmer et al. 1994), *Phomopsis subordinaria* (Meijer et al. 1994) oder *Aspergillus flavus* (Bayman & Cotty 1993) zeigen zumeist gleiche RAPD-Muster. Interpretationen dieser Ergebnisse führen jedoch zu gegensätzlichen Annahmen, VCGs entweder als Klone anzusehen (Meijer et al. 1994) oder, daß einige Arten sogenannte Speziesaggregate darstellen (Bayman & Cotty 1993). Nicht immer erwiesen sich somatisch kompatible Isolate auch genetisch als identisch, wie andere RAPD-Studien an *Suillus granulatus* (Jacobson et al. 1993) zeigen. Auch bei *Rhizoctonia solani* wird vermutet, daß innerhalb von Anastomosegruppen große genetische Unterschiede bestehen (Liu et al. 1991; Liu & Sinclair 1992; Liu & Sinclair 1993), die durch RAPD-Untersuchungen bislang bestätigt werden konnten (Duncan et al. 1993; Tommerup et al. 1995).

Korrelationen der RAPD-Analysen zu geographischen Herkünften wurden bei *Gremmeniella abietina* (Hellgren & Högberg 1995), *Colletotrichum graminicola* (Guthrie et al. 1992), *Laccaria bicolor* (de la Bastide et al. 1994) sowie bei *Heterobasidion annosum* (Garbelotto et al. 1993) festgestellt. Hingegen sind von Bandenmusterergebnissen bei *Puccinia striiformis* keine Korrelationen zu geographischen Populationen abzuleiten (Chen et al. 1993). Eine augenscheinliche Korrelation zur geographischen Verteilung der Rassen bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in der vorliegenden Arbeit ist eher auf das in den Kontinenten jeweilig angebaute Baumwollsortiment zurückzuführen. Die bisherigen Arbeiten zeigen, daß geographische Populationen bei einzelnen, aber nicht bei allen Pilzen zu unterscheiden sind.

Unabhängig von derzeit möglichen Differenzierungsebenen werden grobe Unterschiede der RAPD-Muster gerne zur Aufstellung von Hypothesen zu weiteren Artunterteilungen nicht nur bei Pilzen benutzt: Perring et al. (1993) folgerten über verschiedene RAPD-Muster bei zwei unterschiedlich wirtsspezialisierten Typen der Weißen Fliege (*Bemisia tabaci*), sie als verschiedene Arten anzusehen. Goodwin & Annis (1991) sind der Meinung, daß deutlich unterschiedliche Bandenmuster, wie sie und andere (Schäfer & Wöstemeyer 1992; Plummer et al. 1994) für pathogene und nicht pathogene Isolate bei *Leptosphaeria maculans* vorfanden, Unterschiede auf Artebene repräsentieren. Zu gleichen Folgerungen kommen Untersuchungen bei *Cochliobolus carbonum*, dessen Muster der Rasse O von den anderen Rassen soweit unterschiedlich sind, wie die Muster anderer *Cochliobolus*-Arten zueinander (Jones & Dunkle 1993). Bei Untersuchungen an *Fusarium avenaceum*-Isolaten (Yli-Mattila et al. 1996) wird ebenfalls vermutet, daß die vorgefundene intraspezifische Variabilität auf weitere Arten schließen läßt. Aufgrund unterschiedlicher RAPD-Gruppen in Verbindung mit unterschiedlicher Aflatoxin-Produktion wird bei *Aspergillus flavus* ein Speziesaggregat vermutet (Bayman & Cotty 1993).

Schwierig ist allerdings eine Interpretation solcher Folgerungen sowie eine darauf begründete Abgrenzung von Taxa und darunterliegender Rangstufen, wenn eine hohe Variabilität vorliegt. Für eine Abgrenzung solcher Gruppen sind nach Bailey (1983) bei Isoenzym-Markern folgende Kriterien zu erfüllen: Eine maximale inter-Gruppen-Variation in Verbindung mit minimaler intra-Gruppen-Variation sowie eine zeitlich und **umgebungsunabhängige** Stabilität der verwendeten Marker. Nach Untersuchungen von

Castiglione et al. (1993) zur Differenzierung bei *Populus* sollen RAPD-Marker die vorgenannten Forderungen erfüllen. Sollen RAPD-Marker zur Differenzierung bei Pilzen herangezogen werden, so müssen zunächst mögliche Ursachen, die auf eine inter- oder intra-Gruppen-Variabilität schließen lassen, ergründet werden. Zwei Ursachen der Variabilität sind zu unterscheiden. Eine natürliche Variabilität sowie eine Variabilität, die mit bestimmten morphologischen, biologischen oder biochemischen Eigenschaften korreliert ist und zur Abgrenzung herangezogen werden kann.

Natürliche Variabilität ist dabei auf sexuelle oder asexuelle Rekombination zurückzuführen und spiegelt allgemein eine gewisse Isolat-zu-Isolat-Variabilität wider. Bei RAPD-Untersuchungen ist die natürliche Variabilität anhand einiger der weniger unterschiedlicher Banden in den ansonsten recht homogenen Mustern zu erkennen (siehe dazu auch den Absatz Artcharakterisierung am Anfang dieses Abschnittes). Ein Schätzmaß zur Bestimmung der natürlichen Variabilität liefern bei Pilzen mit Hauptfruchtformen RAPD-Untersuchungen von Tetraden siehe (van der Vlugt-Bergmanns et al. 1993; Dyer et al. 1994; Shi & Leung 1994). Bei Formen ohne Hauptfruchtform erfolgt die Erfassung der Bandbreite natürlicher Variabilität über die Untersuchung mehrerer sicher bestimmter Isolate der gleichen Gruppe, wie es bei *Fusarium solani* var. *solani* demonstriert ist. Eine vergleichbare Variabilität ermittelten ebenfalls RAPD-Untersuchungen bei *Lentinus edodes* (Kwan et al. 1992) oder bei *Cladosporium fulvum* (Arnau et al. 1994). Generell zeigt sich, daß bei Pilzen mit apathogenen oder bodenbewohnenden Formen eine höhere natürliche Variabilität in den Bandenmustern akzeptiert werden muß (*F. solani* var. *solani*, *F. tabacinum*), als bei wirtsspezialisierten Pilzen (spezialisierte Formen bei *F. solani*).

Die andere Art der Variabilität korreliert in diesem Zusammenhang mit morphologischen, biologischen oder phytopathologischen Eigenschaften. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist diese Variabilität zur Abgrenzung auf genotypischer Ebene z. B. bei *Martiella*-Fusarien und *Fusarium sambucinum* s. l. (Hering & Nirenberg 1995a) geeignet. Anhand der RAPD-Muster ist diese Variabilität durch das Auftreten deutlicher, voneinander unterscheidbarer *intra-taxa*-Gruppierungen mit nur noch geringer verbleibender Restvariabilität charakterisierbar. Die Restvariabilität ist logisch auf die natürliche Variabilität zurückführbar. Vom internationalen Code der Botanischen Nomenklatur werden molekularbiologische Merkmale als Klassifizierungskriterium derzeit nicht akzeptiert. Daher können solche intraspezifischen RAPD-Gruppierungen als Hilfsmittel zur taxonomischen Bewertung morphologischer Unterschiede, die bis dahin als nicht ausreichend oder als innerhalb einer natürlichen Variationsbreite liegend erachtet wurden, herangezogen werden. In einigen Arbeiten, die zur Neukombination bei *Ranunculus* (Van Buren et al. 1994) und *Phoma etheridgei* (Hutchinson et al. 1994) führten, wird der Einsatz von RAPD-Ergebnissen zur Unterstützung taxonomischer Merkmale erfolgreich gezeigt. Auch die vorliegende Arbeit stützt sich daher auf frühere morphologische Beschreibungen und erkennt daher Isolate mit artcharakteristischen RAPD-Musterguppen innerhalb der *Martiella*-Sektion mit ihren früher beschriebenen Artnamen an und grenzt sechs weitere RAPD-Gruppierungen als *Fusarium* sp. nov. ab.

Die Ergebnisse zeigen, daß RAPD-Muster zur inter- und intraspezifischen Klassifikation stark unterschiedlich ausfallen und keinesfalls pauschal bewertet werden dürfen. Vielmehr sind die Ergebnisse streng auf den untersuchten Isolat- bzw. Artkomplex bezogen auszuwerten, um eine Übereinstimmung mit bestehenden Taxa und intraspezifischen Gruppierungen zu erhalten. Zusätzliche intraspezifische Gruppierungen sind glaubhaft mit charakteristischen RAPD-Mustern nachzuweisen, wenn Unterschiede nicht nur mit einer Methode, sondern mit zusätzlichen Techniken insbesondere mit morphologischen Differenzen zu begründen sind.

Neben der verwandtschaftlichen Charakterisierung können RAPD-Marker zur sicheren Identifikation unbekannter oder unklar bestimmter Isolate herangezogen werden (Castiglione et al. 1993). Gewöhnlich erfolgt dies durch den direkten Vergleich bekannter und nicht bekannter Isolate auf demselben Elektrophoresegele (Garbelotto et al. 1993). Dadurch werden auch Probleme der korrekten Fragmentgrößenbestimmung und der Bonitur von Intensitätsunterschieden umgangen. Wenn bei den zu identifizierenden Isolaten mit den Referenzisolaten stark unterschiedliche Muster auftreten, kann zumindest nach dem Ausschlußprinzip und unter Berücksichtigung der vorher diskutierten Punkte zum Thema Variabilität, festgestellt werden, daß die Isolate verschieden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde dies anhand zahlreicher Isolate bei *Martiella*-Fusarien demonstriert.

4.3.3 Methodenvergleich ITS-RFLP und RAPD

Wie die vorliegenden Ergebnisse und frühere Veröffentlichungen (Hering et al. 1994) zeigen führt die Kombination von ITS-RFLP und RAPD zu einer geeigneten Methode zur molekularen Charakterisierung von Pilzen. Untersuchungen der ITS-Region decken grobe Unterschiede zumeist auf der taxonomischen Ebene von Arten oder Varietäten auf. Während die feiner differenzierenden RAPD-Untersuchungen zur ergänzenden Charakterisierung vorwiegend unterhalb der Artebene eingesetzt werden können.

Im Vergleich zu Kontrollisolaten können unbekannte Isolate durch die ITS-RFLP einem Spezieskomplex grob zugeordnet werden und anschließend über RAPD sicher identifiziert bzw. weiteren untergeordneten Gruppen zugeordnet werden. Die Kombination beider Methoden erlaubt eine Darstellung genetischer Ähnlichkeiten.

4.3.4 Der Einsatz molekularer Techniken zur Klassifizierung

Molekulare Techniken haben gegenüber morphologischen Merkmalsausprägungen grundsätzliche Vorteile. Zum einen stehen wesentlich mehr Merkmale zur Klassifizierung zur Verfügung (Hillis 1987), da jede Bande als genetischer Marker betrachtet werden kann (Rafalski & Tingey 1993). Zum anderen lassen sich molekulare Techniken standardisieren und damit objektivieren (Kurtzman 1985; Kurtzman 1987). Außerdem sind sie nicht vom Einfluß von Kultur- oder Umgebungsbedingungen abhängig, die zu

unterschiedlichen morphologischen Betrachtungen (Burnett 1984; Nirenberg 1990) führen können. Die Analyse der Variation auf molekularem Level vermeidet daher viele Probleme, die im Gebrauch der phenotypischen Variation zur Bestimmung der verwandtschaftlichen Beziehungen liegen. In diesem Sinn repräsentieren direkte DNA-Untersuchungen ein Endstadium in einer Linie angefangen von morphologischen Merkmalen, die von einigen Genen kontrolliert werden, über Sekundärmetaboliten, die dem Genotyp bereits näher stehen und über Proteine, die von einzelnen Genen kodiert sind (Doyle & Doyle 1991).

Morphologische Charakteristiken haben dagegen den Vorteil, daß Herbarexemplare und palaeontologische Funde in eine vergleichende Analyse einbezogen werden können (Hillis 1987). Obwohl bereits aus einigen Herbarpräparaten DNA für molekularbiologische Untersuchungen extrahiert werden kann (Rogers & Bendich 1985; Pääbo et al. 1988; Pääbo 1989; Golenberg et al. 1990; Cano & Poinar 1993), so wird dies nicht in allen Fällen möglich sein.

Inwieweit molekulare Klassifizierungen, die bei *Mycoplasma like organisms* weithin anerkannt sind (Lee et al. 1993; Prince et al. 1993; Schneider et al. 1993a; Schneider et al. 1993b; Lee et al. 1994), zukünftig bei Pilzen angewendet werden können, wird derzeit diskutiert. Reynolds & Taylor (1991) sind der Meinung, daß es künftig unvermeidbar sein wird DNA-basierende Charaktersets als Typus-Elemente anzusehen und liefert Beispiele, wie solche Beschreibungen aussehen könnten. Bruns et al. (1991) geben Hinweise auf welchen Differenzierungsebenen, welche Methoden brauchbar eingesetzt werden können. In der Vergangenheit wurden ebenfalls zunehmend Techniken in Artbeschreibungen mit einbezogen, die nicht den auch bei Pilzen geltenden Typus-Elementen des Codes der Botanischen Nomenklatur, entsprechen. Als Beispiel wurden innerhalb der *Chytridiomycota* ergänzende ultrastrukturelle Untersuchungen zur Artbeschreibung herangezogen (Barr 1980) und Arten bei hefeförmigen Pilzen aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften beschrieben (Kregere-van Rij 1984; Nakase et al. 1989).

Eine alleinige Betrachtung molekularer Ähnlichkeiten hätte bei den untersuchten *Fusarien* zur Folge, daß *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* und *F. cerealis* (Hering et al. 1995e), aufgrund ihrer Bandenmusterähnlichkeiten als Varietäten einer Art einzustufen wären. Auch alle innerhalb der ITS-RFLP-Gruppe A1 liegenden Isolate müßten als *F. solani* angesehen werden. Weitere intraspezifische Gruppen würden dann dem Level von Varietäten oder spezialisierten Formen entsprechen. Die früher beschriebenen und hier gruppierten Varietäten *minus* und *martii* sowie die spezialisierten Formen *batatas*, *mori*, *robiniae*, *xanthoxyl* und *pisi* würden ein solches, mit den spezialisierten Formen bei *F. oxysporum* (Hering et al. 1996b) vergleichbares Konzept, bestätigen. Ebenso müßten *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1 oder *F. solani* var. *petroliphilum* (= *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 2) den genetischen Unterschieden entsprechend auf Artebene abgegrenzt werden. *F. radicolola* wäre aufgrund gleicher ITS-RFLP-Muster und geringer Unterschiede zu *F. striatum* als Varietät anzusehen. In gleicher Weise sind die Ähnlichkeiten zwischen *F. eumartii*, *F. pestis*, *Fusarium* sp. nov. V und *Nectria subsequens* und *Fusarium* sp. nov. VI auszuwerten. Die Variabilität der ITS-Region bei *F. tabacinum* würde ausreichen, um

mindestens in drei Arten mit über RAPD-Muster unterscheidbaren zahlreichen Untergruppen zu differenzieren. Die Interpretation der genetischen Ähnlichkeit würde *F. venenatum* in die Nähe von oder unterhalb von *F. sambucinum* abgrenzen. Klar abzugrenzen von beiden ist *F. torulosum*, allerdings ist *F. flocciferum* molekularbiologisch davon nur mit der sensitiveren RAPD-Technik zu unterscheiden, was wiederum vergleichbar mit einer Abgrenzung auf der Ebene einer Varietät oder spezialisierten Form wäre. In vielen Fällen jedoch korrelieren die molekularen Differenzierungen mit morphologischen Abgrenzungen: Beispielsweise ist die Abgrenzung von *Nectria cancri*, *Nectria borneensis*, *F. pestis*, *F. martii-phaseoli*, *F. pestis* und einiger als *Fusarium* sp. nov. definierter Gruppierungen durch unterschiedliche ITS-RFLP-Muster sicher vereinbar.

Eine ausschließlich auf Bandenmusterähnlichkeiten basierende Interpretation der Verwandtschaft bei Pilzen ist nicht linear auf die etablierte, morphologisch begründete Systematik zu übertragen, wie bereits Kohn (1992) vermutete. Wie bei RFLP-Untersuchungen an *Aspergillus flavus* und *A. oryzae* (Klich & Mullaney 1987) und in den vorangegangenen Kapiteln bei ITS-RFLP- und RAPD-Studien gezeigt, kann nach bisherigen Erfahrungen kein generelles Schema, vergleichbar den Untersuchungen zur DNA Homologie (Kuninaga & Yokosawa 1991), entwickelt werden, ab wievielen Bandenunterschieden derzeit beschriebene Gattungen, Arten, Varietäten, spezialisierte Formen oder Rassen abzugrenzen sind. Die Resultate mit verschiedenen Pilzen und ihr Bezug zur bestehenden Nomenklatur sind dazu zu uneinheitlich. Es konnte auch gezeigt werden, daß bei morphologisch sicher definierten Arten gänzlich unterschiedliche RAPD- oder ITS-RFLP-Muster zwei Arten eindeutig trennen, andererseits charakterisieren in anderen Fällen gleiche ITS-RFLP-Muster und sehr ähnliche RAPD-Muster verschiedene Arten.

Daher scheint es sinnvoll zunächst molekulare Techniken in Einklang mit morphologische Klassifikationen zu bringen. Die Beziehungen zwischen molekularen Charakteren und anderen Merkmalen, insbesondere morphologischen, kann dann als Ausgangspunkt zu weiteren Betrachtungen werden (Doyle 1992). Molekulare Techniken liefern zusätzliche Beweise zur Unterstützung morphologischer Marker, wie es anhand von RFLP-Analysen der rDNA bei *Colletotrichum gloeosporioides* und verwandten Arten (Braithwaite et al. 1990) oder im Kapitel „Eignung der RAPD zur Charakterisierung“ gezeigt wurde. Ausschließlich auf den jeweils untersuchten Art- bzw. Artenkomplex bezogen, sind ITS-RFLP- und RAPD-Untersuchungen sinnvoll zur Differenzierung einsetzbar, da sie mit objektiven Merkmalen einzelne morphologische oder phytopathologische Rangstufen repräsentieren können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Fusarium ist eine heterogene Gattung imperfekter, parasitischer und saprophytischer Pilze. Aufgrund verschiedener Interpretationen der morphologischen und phytopathologischen Variationsbreite existieren mehrere taxonomische Systeme mit unterschiedlichen Anzahlen beschriebener Fusarien. Mittels ITS-RFLP und RAPD wurden auf molekularer Ebene verschiedene Artkonzepte und Differenzierungsfragen bei morphologisch ähnlichen Fusarien überprüft. Beide Techniken erzielten Bandenmuster, die als objektive Merkmale zur Charakterisierung von Isolaten auf verschiedenen taxonomischen und phytopathologischen Ebenen erfolgreich einsetzbar sind.

Die Ergebnisse zeigen, daß innerhalb eines taxonomisch gut bearbeiteten Art- bzw. Artenkomplexes beide Methoden in Kombination sinnvoll zur eindeutigen Differenzierung einsetzbar sind. Sie zeigen aber auch, daß ein generelles, für alle Fusarien allgemeingültiges Schema, ab wievielen Bandenunterschieden derzeit beschriebene Gattungen, Arten, Varietäten, spezialisierte Formen oder Rassen abzugrenzen sind, nicht existieren kann. Die Resultate bei verschiedenen Sektionen sind dazu zu uneinheitlich: Morphologisch sicher definierte Arten können mit gänzlich unterschiedlichen RAPD- oder ITS-RFLP-Mustern getrennt werden (*F. sambucinum*/*F. torulosum*), in anderen Fällen sind gleiche ITS-RFLP-Muster und sehr ähnliche RAPD-Muster für verschiedene Arten charakteristisch (*F. culmorum*/*F. cerealis*; einige *Fusarium*-Arten innerhalb der Sektion *Martiella*).

Die Differenzierbarkeit von Rassen mittels ITS-RFLP- oder RAPD-Mustern ist bei den untersuchten Fusarien nicht eindeutig zu beweisen, da zum einen die Ausweisung von Rassen bei *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* nicht definitionsgemäß erfolgte und zum anderen bei den Rassen 1 und 2 von *F. solani* f. sp. *cucurbitae* auch andere Merkmale für eine Abgrenzung auf höherer Ebene sprechen.

Bei morphologisch und phytopathologisch verhältnismäßig wenig bearbeiteten Pilzgruppen, wie beispielsweise bei *Fusarium tabacinum*, sind Bandenmustergruppierungen eine wertvolle Hilfe als Grundlage weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse für ausgewählte Vertreter einiger Sektionen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Sektion *Discolor*

Die Isolate von *Fusarium sambucinum*, *F. venenatum* und *F. torulosum* können mittels ITS-RFLP und RAPD unterschieden und von eingesetzten Kontrollisolaten abgegrenzt werden. *Fusarium flocciferum* und *F. torulosum* wie auch *F. culmorum* und *F. cerealis* zeigen jeweils identische ITS-RFLP-Muster, was auf eine nähere Verwandtschaft beider Paare schließen läßt. Über artspezifische RAPD-Muster sind die Arten jedoch zu unterscheiden. *Fusarium bactridioides* und *F. sarcochrom* sind als eigenständige Arten anzusehen. Drei unbestimmte Isolate waren als *F. semitectum* zu identifizieren.

Sektion *Eupionnotes*

Für *Fusarium tabacinum* (*Plectosporium tabacinum*) wurden fünf verschiedene ITS-RFLP-Mustergruppen festgestellt. In den RAPD-Mustern spiegelt sich die hohe intraspezifische Variabilität dieser Pilzgruppe wider. Überlegungen zu weiteren Unterteilungen dieser Art werden durch die Ergebnisse gestärkt. Eindeutig mit beiden Techniken sind an *Cucurbita* pathogene Stämme zu charakterisieren; die Benennung als spezialisierte Form *F. tabacinum* f. sp. *cucurbitae* wird vorgeschlagen.

Sektion *Elegans*

Die untersuchten spezialisierten Formen von *Fusarium oxysporum* zeigen identische ITS-RFLP-Muster. Von diesen sind *Fusarium redolens*, *F. udum* und *F. acutatum* als eigenständige Arten eindeutig abzugrenzen. *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* und *F. redolens* f. sp. *dianthi*, bei denen eine Conspezifität vermutet wurde, lassen sich durch unterschiedliche RAPD-Muster klar differenzieren und sind daher auch auf Artebene getrennt zu betrachten.

Bei sechs untersuchten Rassen von *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* wurden insgesamt vier RAPD-Mustergruppen ermittelt, die den Rassen 1/2/6, 4 und 3/5, sowie drei in Reinkultur duftenden Isolaten entsprachen.

Die Diskussion der Ergebnisse zeigt, daß die Einteilung bestehender spezialisierter Formen und Rassen bei *Fusarium oxysporum* überdacht werden sollte.

Sektion *Martiella*

Mittels ITS-RFLP lassen sich 19 Mustergruppen bilden. Danach sind zehn Taxa eindeutig charakterisiert: *Fusarium coeruleum*, *F. martiiphaseoli* (= *F. solani* f. sp. *phaseoli*), *F. javanicum*, *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 1, *F. solani* var. *petroliphilum* (= *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Rasse 2), *Fusarium* sp. nov. II, III und IV, *Nectria borneensis* und *Nectria plagianthi*. Weitere 21 Taxa sind in Kombination mit RAPD-Mustern zu differenzieren: *F. ambrosium*, *F. carneolum* (= *F. solani* var. *minus*; = *F. caucasicum*), *F. epimyces*, *F. illudens*, *F. lathyri* (= *F. solani* f. sp. *pisi*), *F. pestis*, *F. radicola*, *F. solani* var. *solani*, die spezialisierten Formen *batatas*, *mori*, *robiniae*, *xanthoxyli* von *Fusarium solani*, *F. striatum*, *Fusarium* sp. nov. I, V, VI, *Nectria bolbophylli*, *Nectria haematococca* und *Nectria subsequens*. Weitere bislang unbestimmte Isolate der *Martiella* Sektion zeigen zum Teil eigenständige ITS-RFLP- und RAPD-Muster, die auf eine weitere Differenzierung innerhalb dieser Sektion hinweisen.

Die clusteranalytischen Auswertungen der ITS-RFLP-Resultate trennen *Fusarium coeruleum* weit entfernt von den anderen *Martiella* Fusarien. Daher und aufgrund von ITS-RFLP-Ähnlichkeiten zu Isolaten anderer Sektionen, sollte die Stellung von *F. coeruleum* in der Sektion *Martiella* überdacht werden.

6 SUMMARY

Characterization and Differentiation of *Fusarium* Link by RAPD and ITS-RFLP

Fusarium Link is a heterogeneous genus of parasitic and saprophytic imperfect fungi. Due to different interpretations of morphological and phytopathological variations several taxonomic systems with various numbers of fusaria exist. Strains of different *Fusarium* taxa were tested on a molecular basis by ITS-RFLP and RAPD. Both techniques reveal banding patterns, which can be successfully used as objective markers for characterization of isolates on different taxonomical and phytopathological levels.

Both methods in combination can be a powerful tool for unambiguous differentiation within well known species complexes. They also show that a general scheme of the number of different bands necessary for the differentiation of genera, species, varieties, specialised forms or races, can not exist. The results in different sections are not uniform enough. Morphologically well defined species can have either, completely different RAPD and ITS-RFLP patterns (*F. sambucinum*/*F. torulosum*) or identical ITS-RFLP bands and very similar RAPD patterns (*F. culmorum*/*F. cerealis*; some *Fusarium* species within the *Martiella* section).

Races of the fusaria examined could not generally be differentiated using ITS-RFLP and RAPD. The race description of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* was not carried out according to the definition of races and in the races 1 and 2 of *F. solani* f. sp. *cucurbitae* other features indicate a delimitation at a higher level as well.

In morphological and phytopathological not sufficiently treated fungal groups, such as *Fusarium tabacinum*, banding pattern groupings can be helpful as a basis of further investigations.

The results for selected representatives of some sections are summarized as follows:

Section *Discolor*

Isolates of *Fusarium sambucinum*, *F. venenatum*, and *F. torulosum* can be differentiated by means of ITS-RFLP and RAPD. They can be further delimited from isolates of other species. *Fusarium flocciferum*/*F. torulosum* and *F. culmorum*/*F. cerealis*, respectively, show identical ITS-RFLP patterns, indicating a close relationship. All four species can be differentiated by characteristic RAPD patterns. *Fusarium bactridioides* and *F. sarcochroum* are considered autonomous species. Three unknown species could be identified as *Fusarium semitectum*.

Section *Eupionnotes*

Five different ITS-RFLP pattern groupings were found in isolates of *Fusarium tabacinum* (*Plectosporium tabacinum*). The RAPD patterns reflect the high intraspecific variability within this fungal group. Considerations for further subdivisions within this species were supported by the results shown. Isolates of *F. tabacinum* pathogenic to *Cucurbita* can clearly be differentiated by both techniques. A subdivision as specialised form *F. tabacinum* f. sp. *cucurbitae* is suggested.

Section *Elegans*

The investigated specialized forms of *Fusarium oxysporum* show identical ITS-RFLP patterns. *Fusarium redolens*, *F. udum*, and *F. acutatum* could clearly be differentiated as autonomous species. *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *F. redolens* f. sp. *dianthi*, which were suspected to be conspecific, are differentiated clearly by various RAPD patterns demonstrating a differentiation at species level.

In six investigated races of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* altogether four RAPD pattern groupings were determined, which correspond to races 1/2/6, 3/5 and 4, as well as to three further isolates produce odour in pure cultures.

The discussion of the results demonstrates that the division of existing specialized forms and races at *Fusarium oxysporum* should be reconsidered.

Section *Martiella*

Nineteen different banding patterns were obtained by ITS-RFLP investigations. Ten taxa could be obviously characterized after this: *Fusarium coeruleum*, *F. martiiphaseoli* (= *F. solani* f. sp. *phaseoli*), *F. javanicum*, *F. solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, *F. solani* var. *petroliphilum* (= *F. solani* f. sp. *cucurbitae* race 2), *Fusarium* sp. nov. II, III and IV, *Nectria borneensis*, and *Nectria plagianthi*. Additionally 21 taxa could be differentiated in combination with RAPD: *F. ambrosium*, *F. carneolum* (= *F. solani* var. *minus*; = *F. caucasicum*), *F. epimyces*, *F. illudens*, *F. lathyri* (= *F. solani* f. sp. *pisi*), *F. pestis*, *F. radicola*, *F. solani* var. *solani*, the specialised forms *batatas*, *mori*, *robiniae*, *xanthoxyli* of *Fusarium solani*, *F. striatum*, *Fusarium* sp. nov. I, V, VI, *Nectria bolbophylli*, *Nectria haematococca*, and *Nectria subsequens*. Unique ITS-RFLP and RAPD patterns obtained for some additional unidentified isolates of the *Martiella* section indicate a further differentiation within this section.

The clusteranalytical evaluations of the ITS-RFLP results separate *Fusarium coeruleum* far from the other *Martiella* fusaria. Therefore and due to greater ITS-RFLP-similarities to isolates from other sections, the position of *F. coeruleum* in the section *Martiella* should be reconsidered.

7 LITERATUR

- Aarts, J.M.M.J.G., Hontelez, J.G.J., Fischer, P., Verkerk, V., van Kammen, A. & Zabel, P. (1991). Acid phosphatase-1, a tightly linked molecular marker for root-knot nematode resistance in tomato: From protein to gene, using PCR and degenerate primers containing deoxyinosine. *Plant Mol. Biol.* **16**: 657-661.
- Abadi, R., Perl-Treves, R. & Levy, Y. (1996). Molecular variability among *Exserophilum turcicum* isolates using RAPD (random amplified polymorphic DNA). *Can. J. Plant Pathol.* **18**: 29-34.
- Abbas, H.K., Mirocha, C.J. & Gunther, R. (1991). Bildung von Zearalenon, Nivalenol, Moniliformin und Wortmannin aus toxischen Kulturen von *Fusarium* aus Bodenproben von Weideland Neuseelands. *Mycotoxin Res.* **7**(2): 53-60.
- Abney, T.S., Richards, T.L. & Roy, K.W. (1993). *Fusarium solani* from ascospores of *Nectria haematococca* causes sudden death syndrome of soybean. *Mycologia* **85**: 801-806.
- Adam-Blondon, A.F., Sévignac, M., Bannerot, H. & Dron, M. (1994). SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theor. Appl. Genet.* **88**(6-7): 865-870.
- Albuquerque, F.C. (1961). Podridao das raízes e do pé da pimenta do reino. *Circ. Inst. agron. N., Belem* **5**: 19.
- Alderman, D.J. (1981). *Fusarium solani* causing an exoskeletal pathology in cultured lobsters, *Homarus vulgaris*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **76**: 25-27.
- Alderman, D.J. & Polglase, J.L. (1985). *Fusarium tabacinum* (Beyma) Gams as a gill parasite in the crayfish, *Austropotamobius pallipes* Lereboullet. *J. Fish Dis.* **8**: 249-252.
- Aloi, C. & Baayen, R.P. (1993). Examination of the relationships between vegetative compatibility groups and races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Plant Pathol.* **42**: 839-850.
- Alsamarrie, A.A., Al-Ani, A.M. & Hussain, M.I. (1987). Postharvest diseases of melon *Cucumis melo* and their control. In: 11. International Congress of Plant Protection; Manila (Philippines); 5-9. Oct. 1987.
- Altomare, C., Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A. & Evidente, A. (1995). Production of type A trichothecenes and enniatin B by *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato. *Mycopathologia* **129**: 177-181.
- Amoah, B.K., MacDonald, M.V., Rezanoor, N. & Nicholson, P. (1996). The use of the random amplified polymorphic DNA technique to identify mating groups in the *Fusarium* section *Liseola*. *Plant Pathol.* **45**: 115-125.
- Andersen, W.R. & Fairbanks, D.J. (1990). Molecular markers: Important tools for plant genetic resource characterization. *Diversity* **6**(3/4): 51-53.
- Anderson, J.B. & Stasovski, E. (1992). Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* **84**: 505-516.
- Anisimov, A.A., Fel'Dman, M.S. & Aleksandrova, I.F. (1988). Comparative study of the proteolytic activity of micromycetes that damage industrial materials. *Mikol. Fitopatol.* **22**(1): 44-50.
- Armstrong, G.M. & Armstrong, J.K. (1960). American, Egyptian and Indian wilt Fusaria: Their pathogenicity and relationship to other wilt Fusaria. *Techn. Bull. US Dep. Agric.* **1219**: 18p.
- Armstrong, G.M. & Armstrong, J.K. (1969). Relationships of *Fusarium oxysporum* formae speciales *apii*, *asparagi*, *cassiae*, *melongenae*, and *vasinfectum* race 3 as revealed by pathogenicity for common hosts. *Phytopathology* **59**: 1256-1260.
- Armstrong, G.M. & Armstrong, J.K. (1978). A new race (race 6) of the cotton-wilt *Fusarium* from Brazil. *Plant Dis. Rep.* **62**: 421-423.
- Armstrong, G.M. & Armstrong, J.K. (1980). Race 6 of the cotton-wilt *Fusarium* from Paraguay. *Plant Dis.* **64**: 596.
- Armstrong, J.K. & Armstrong, G.M. (1958). A race of the cotton wilt *Fusarium* causing wilt of yelredo soybean and flue-cured tobacco. *Plant Dis. Rep.* **42**: 147-151.
- Armstrong, J.K. & Armstrong, G.M. (1959). *Phytophthora alkekengi* L., a new host for the U.S. cotton-, *Cassia*-, sweetpotato-wilt fusaria. *Plant Dis. Rep.* **43**: 509-510.
- Arnau, J., Housego, A.P. & Oliver, R.P. (1994). The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Curr. Genet.* **25**(5): 438-444.
- Arnold, M.L., Buckner, C.M. & Robinson, J.J. (1991). Pollen mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **88**: 1398-1402.
- Assigbetse, K.B., Fernandez, D., Dubois, M.P. & Geiger, J.P. (1994). Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* **84**(6): 622-626.

- Aust, H.-J., Buchenauer, H., Klingauf, F., Niemann, P., Pöhling, H.M. & Schönbeck, F. (1991). Glossar Phytomedizinischer Begriffe. Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft. Vol. 3. Ulmer-Verlag: Stuttgart; 123 p.
- Ayliffe, M.A., Lawrence, G.J., Ellis, J.G. & Pryor, A.J. (1994). Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucl. Acids Res.* **22**(9): 1632-1636.
- Baayen, R.P. & Gams, W. (1988). The *Elegans fusaria* causing wilt disease of carnation. 1. Taxonomy. *Neth. J. Plant Pathol* **94**(6): 273-288.
- Baayen, R.P. & Kleijn, J. (1989). The *Elegans fusaria* causing wilt disease of carnation. 2. Distinction of vegetative compatibility groups. *Neth. J. Plant Pathol* **95**(4): 185-194.
- Bachmann, K. (1994). Molecular markers in plant ecology. *New Phytol.* **126**: 403-418.
- Bacon, C.W., Bennet, R.M. & Hinton, D.M. (1992). Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Dis.* **76**: 144-148.
- Bagchee (1954). *Indian For.* **80**(5): 246-251.
- Bailey, D.C. (1983). Isoenzymic variation and plant breeders' rights. In: Tanksley, S.D. & Orton, T. J. (eds.): *Isoenzymes in plant genetics and breeding*, part. A. Elsevier: Amsterdam; 425-441.
- Bailey, E. & Lear, T.L. (1994). Comparison of thoroughbred and Arabian horses using RAPD markers. *Animal Genet.* **25**(Suppl. 1): 105-108.
- Bakshi, B.K. & Singh, S. (1959). Root diseases of shisham (*Dalbergia sissoo* Roxb.). *Indian For.* **85**(7): 415-421.
- Ballinger-Crabtree, M.E., Black, W.C.V. & Miller, B.R. (1992). Use of genetic polymorphisms detected by the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**: 893-901.
- Bandoni, R.J. (1972). Terrestrial occurrence of some aquatic hyphomycetes. *Can. J. Bot.* **50**: 2283-2288.
- Bär, W. & Hummel, K. (1991). DNA fingerprinting: Its application in forensic case work. In: Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A.J. et al. (eds.): *DNA fingerprinting: Approaches and applications*. Birkhäuser-Verlag: Basel; 349-355.
- Bardaki, F. & Skibinski, D.O.F. (1994). Application of the RAPD technique in tilapia fish: Species and subspecies identification. *Heredity* **73**(Part 2): 117-123.
- Barr, D.J.S. (1980). An outline for the reclassification of the *Chytridiales*, and for a new order, the *Spi-zellomycetales*. *Can. J. Bot.* **58**: 2380-2394.
- Barz, W., Schleppehorst, R. & Laimer, J. (1976). The degradation of poly phenols by fungi of the genus *Fusarium*. *Phytochemistry* **15**(1): 87-90.
- Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P.M. (1992). DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 70-76.
- Bayman, P. & Cotty, P.J. (1993). Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: Association with aflatoxin production and morphology. *Can. J. Bot.* **71**: 23-31.
- Beck, R., Suss, A. & Lepschy, J. (1993). Fusarien verantwortlich für Bierfehler? *PSP Pflanzenschutz Praxis* **2**: 26-29.
- Bedin, P. & Tivoli, B. (1990). Les champignons responsables des pourritures seches des tubercules (*Fusarium roseum* var. *sambucinum*, *Fusarium solani* var. *coeruleum*, *Fusarium roseum* var. *arthrosporioides*, *Phoma exigua* var. *foveata*). *Pomme de Terre Francaise* **458**: 113-118.
- Bedlan, G. (1988). Parasitäre Lagerkrankheiten des Gemüses. *Pflanzenschutz* **5**: 6-8.
- Belitz, H.-D. & Grosch, W. (1987). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 3. ed. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York; 862 p.
- Benka-Coker, M.O. & Olumagin, A. (1995). Waste drilling-fluid-utilising microorganisms in a tropical mangrove swamp oilfield location. *Bioresour-ce Technol.* **53**(3): 211-215.
- Bentley, S., Pegg, K.G. & Dale, J.L. (1994). Optimization of RAPD-PCR fingerprinting to analyse genetic variation within populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *J. Phytopathol.* **142**(1): 64-78.
- Bentley, S., Pegg, K.G. & Dale, J.L. (1995). Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycol. Res.* **99**(11): 1378-1384.
- Beremand, M.N., Desjardins, A.E., Hohn, T.M. & VanMiddlesworth, F.L. (1991). Survey of *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) for mating type, trichothecene production, and other selected traits. *Phytopathology* **81**: 1452-1458.
- Berny, J.F. & Hennebert, G.L. (1991). Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: Effects of protectants and colling rates. *Mycologia* **83**: 805-815.
- Bhatnagar, G.C. (1966). Studies on *Fusarium* twig disease of lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Indian Phytopathol.* **19**: 257-261.
- Bidochka, M.J., McDonald, M.A., St. Leger, R.J. & Roberts, D.W. (1994). Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* **25**: 107-113.
- Bilai, V.I. (1955). The fusaria (Biology and systematics). *Akad. Nauk. Ukr. SSR: Kiev*; 320 p.

- Bilgrami, K.S. (1991). Professor Saligram Sinha memorial lecture. Fungal toxins - their adverse effects on living organisms. *Natl. Acad. Sci. Lett.* **14**(7): 275-284.
- Black, S.F., Gray, D.I., Fenlon, D.R. & Kroll, R.G. (1995). Rapid RAPD analysis for distinguishing *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serotypes using a capillary air thermal cyclor. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**(3): 188-190.
- Black, W.C.V., DuTeau, N.M., Puterka, G.J., Nechols, J.R. & Pettorini, J.M. (1992). Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (*Homoptera: Aphididae*). *Bull. Entomol. Res.* **82**: 151-159.
- Bodker, L., Lewis, B.G. & Coddington, A. (1993). The occurrence of a new genetic variant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Plant Pathol.* **42**: 833-838.
- Böhm, M., Low, R., Haag-Kerwer, A., Lüttge, U. & Rausch, T. (1993). Evaluation of comparative DNA amplification fingerprinting for rapid species identification within the genus *Clusia*. *Bot. Acta* **106**: 448-453.
- Bolton, A.T. & Donaldson, A.G. (1972). Variability in *Fusarium solani* f. *pisi* and *F. oxysporum* f. *pisi*. *Can. J. Plant Sci.* **52**(2): 189-196.
- Booth, C. (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal: Bucks, UK; 237 p.
- Booth, C. (1984). The *Fusarium* problem: Historical, economic and taxonomic aspects. *British Mycological Society Symposium* **0**(0): 1-14.
- Bosland, P.W. & Williams, P.H. (1987). An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isoenzyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Can. J. Bot.* **65**: 2067-2073.
- Bostock, A., Khattak, M.N., Matthews, R. & Burnie, J. (1993). Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2179-2184.
- Böttger, E.C. (1990). Frequent contamination of Taq polymerase with DNA. *Clin. Chem.* **36**(6): 1258-1259.
- Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G.K. & Braun, M.J. (1993). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. In: Zimmer, E.A., White, T.J., Cann, R.L. et al. (eds.): *Methods in Enzymology: Molecular Evolution - Producing the Biochemical Data*. Academic Press Inc.: London, New York; 294-309.
- Braithwaite, K.S., Irwin, J.A.G. & Manners, J.M. (1990). Ribosomal DNA as a molecular taxonomic marker for the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Aust. Syst. Bot.* **3**: 733-738.
- Brayford, D. (1987). *Fusarium bugnicourtii* new species and its relationship to *Fusarium tumidum* and *Fusarium tumidum* var. *coeruleum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **89**(3): 347-352.
- Brunel, D. (1994). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA: Rapid and reliable identification of *Helianthus annuus* L. cultivars. *Seed Sci. Technol.* **22**(2): 585-194.
- Bruns, T.D., White, T.J. & Taylor, J.W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **22**: 525-564.
- Bryk, H., Wojtas-Kozziel, B., Lewandowska, M. & Rejnuś, M. (1991). Fungi causing apple diseases in storage and their control with several fungicides (bitertand, dithianon, flusilasol, iminoctadine, methylothiophanate, pyrifenoxy). *Prace Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa. Ser. A* **30**: 127-135.
- Bulat, S.A. & Mironenko, N.V. (1993). Genetic differentiation of phytopathogenic fungi *Cochliobolus sativus* (Ito und Kurib.) Drechs. ex Dastur (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc: Sorok.) Shoem.) revealed by a universally primed polymerase chain reaction UP-PCR technique - correlation with host specificity. *Genetika* **29**(8): 1295-1301.
- Burnett, J.H. (1984). Aspects of *Fusarium* genetics. In: Moss, M.O. & E., S.J. (eds.): *The Applied Mycology of Fusarium*. Cambridge University Press: Cambridge; 39-69.
- Büscher, N., Zyprian, E., Bachmann, O. & Blaich, R. (1994). On the origin of the grapevine variety 'Müller Thurgau' as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis* **33**: 15-17.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. & Gresshoff, P.M. (1991a). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technol.* **9**: 553-557.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. & Gresshoff, P.M. (1991b). DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **9**: 294-307.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. & Gresshoff, P.M. (1992). Primer-templates interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 157-165.
- Campbell, T.M. & Collins, W.W. (1987). *Fusarium solani* root rot resistance in sweet potatoes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **112**(2): 386-389.
- Campbell, T.M. & Collins, W.W. (1988). Effects of *Fusarium solani* root rot and presprouting treatments on 'Jewel' sweet potato plant production. *Can. J. Plant Pathol.* **10**(3): 240-245.
- Cano, R.J. & Poinar, H.N. (1993). Rapid isolation of DNA from fossil and museum specimens suitable for PCR. *BioTechniques* **15**(3): 432-435.

- Carbonell, C., Cenis, J.L., Cifuentes, D. & Tello, J. (1994). Diferenciación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. o. f. sp. radices-lycopersici* y su detección en planta mediante marcadores RAPD. Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas 20(4): 919-926.
- Castagnonesereno, P., Vanlerberghemasutti, F. & Leroy, F. (1994). Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. Genome 37(6): 904-909.
- Castiglione, S., Wang, G., Damiani, G., Bandi, C., Bisoffi, S. & Sala, F. (1993). RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. Theor. Appl. Genet. 87: 54-59.
- Caswell-Chen, E.P., Williamson, V.M. & Wu, F.F. (1992). Random amplified polymorphic DNA analysis of *Heterodera cruciferae* and *H. schachtii* populations. J. Nematol. 24: 343-351.
- Cenis, J.L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucl. Acids Res. 20: 2380.
- Cenis, J.L. (1993). Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). Phytopathology 83: 76-78.
- Chacón, M.R., Rodríguez, E., Parkhouse, R.M.E., Burrows, P.R. & Garate, T. (1994). The differentiation of parasitic nematodes using random amplified polymorphic DNA. J. Helminthol. 8: 109-113.
- Chalmers, K.J., Waugh, R., Sprent, J.I., Simons, A.J. & Powell, W. (1992). Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. Heredity 69: 465-472.
- Chapco, W., Ashton, N.W., Martel, R.K.B., Antonishyn, N. & Crosby, W.L. (1992). A feasibility study of random amplified polymorphic DNA in population genetics and systematics of grasshoppers. Genome 35: 569-574.
- Chase, T.E., Otrrosina, W.J., Spieth, P.T. & Cobb, F.W. (1991). Use of PCR to distinguish biological species within *Heterobasidion annosum* complex (Abstr). Phytopathology 81: 1190.
- Chen & Fu, X.-H. (1986). Acta Mycol. Sin. Suppl. 1: 330.
- Chen, L.F., Xu, Y.G. & Fang, Z.D. (1990). Identification of isolates causing root rot of sweet potato and tests on resistance of varieties of sweet potato to root rot. Jianguo J. Agric. Sci. 6(2): 27-32.
- Chen, Q.Y., Ji, X. & Sun, W.J. (1985). Identification of races of cotton-wilt *Fusarium* in China. Sci. Agric. Sin. 6: 1-6.
- Chen, S. & Xiao, Y. (1989). A new forma specialis of *Fusarium solani* causing root-rot of tung-oil tree. Sci. Silvae Sin. 25(2): 113-119.
- Chen, W. (1992). Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. Phytopathology 82: 1467-1472.
- Chen, W., Hoy, J.W. & Schneider, R.W. (1992). Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. Exp. Mycol. 16: 22-34.
- Chen, X., Line, R.F. & Leung, H. (1993). Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. Phytopathology 83: 1489-1497.
- Chester, K.S. (1946). The loss from cotton wilt and the temperature of wilt development: A study of new uses for old data. Plant Dis. Rep. 30: 253-260.
- Cheung, W.Y., Hubert, N. & Landry, B.S. (1993). A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. PCR Meth. Applic. 3(1): 69-70.
- Chien, A., Edgar, D.B. & Trela, J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol. 127: 1550-1557.
- Choi, J.S., Cheong, S.S., Kim, J.M. & So, I.Y. (1994). Stem rot of carnation caused by *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. Kor. J. Plant Pathol. 10(4): 314-318.
- Chou, Q., Russel, M., Birch, D.E., Raymond, J. & Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucl. Acids Res. 20: 1717-1723.
- Clark, C.A. (1980). End rot, surface rot, and stem lesions caused on sweet potato by *Fusarium solani*. Phytopathology 70(2): 109-112.
- Clark, C.A. (1992). Postharvest diseases of sweet potatoes and their control. Postharvest News Inform. 3(4): 75N-79N.
- Cobb, B.D. & Clarkson, J.M. (1993). Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. FEMS Microbiology Letters 112(3): 319-324.
- Coddington, A., Matthews, P.M., Cullis, C. & Smith, K.H. (1987). Restriction digest patterns of total DNA from different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* - an improved method for race classification. J. Phytopathol. 118: 9-20.
- Cooper, C.R., Jr., Harris, J.L. & Szaniszló, P.J. (1988). Restriction fragment polymorphisms of intact chromosomes to differentiate pathogenic dematiaceous fungi. Ann. Meeting Am. Soc. For. 393.

- Correll, J.C. (1991). The relationship between formae speciales, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **81**: 1061-1064.
- Correll, J.C., Gordon, T.R. & McCain, A.H. (1992). Genetic diversity in California and Florida populations of the pitch canker fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. *Phytopathology* **82**: 415-420.
- Correll, J.C., Puhalla, J.E., Schneider, R.W. & Kraft, J.M. (1985). Differentiating races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* based on vegetative compatibility (Abstr.). *Phytopathology* **75**: 1347.
- Correll, J.C., Rhoads, D.D. & Guerber, J.C. (1993). Examination of mitochondrial DNA restriction fragment polymorphisms, DNA fingerprints, and randomly amplified polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathology* **83**: 1199-1204.
- Coutinho, H.L.C., Handley, B.A., Kay, H.E., Stevenson, L. & Beringer, J.E. (1993). The effect of colony age on PCR fingerprinting. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**: 282-284.
- Crawford, D.J., Brauner, S., Cosner, M.B. & Stuessy, T.F. (1993). Use of RAPD markers to document the origin of the intergeneric hybrid x *Margyra-caena skottsbergii* (*Rosaceae*) on the Juan Fernandez Islands. *Am. J. Bot.* **80**(1): 89-92.
- Creppy, E.E. (1994). Plant diseases and production quality. Mycotoxins and human and animal health. *Maladies des plantes et qualite des productions. Mycotoxines et sante humaine et animale. Phytoma La Defense des Vegetaux* **467**: 27-32.
- Crowhurst, R.N., Hawthorne, B.T., Rikkerink, E.H.A. & Templeton, M.D. (1991). Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplified polymorphic DNA. *Curr. Genet.* **20**: 391-396.
- de la Bastide, P.Y., Kropp, B.R. & Piche, Y. (1994). Spatial distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *New Phytol.* **127**(3): 547-556.
- Delgado, M.A. & Agurto, V.R. (1984). Estimado del monto de danos producidos por patógenos radiculares y fibrovasculares mediante muestros, análisis y evaluaciones periódicas de la población de plantas de diferentes zonas algodonerás de Piura. *Fitopatología, Peru* **19**: 27-38.
- Demeke, T. & Adams, R.P. (1992). The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques* **12**: 332-333.
- Demeke, T., Adams, R.P. & Chibbar, R. (1992). Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): A case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* **84**: 990-994.
- Desjardins, A.E. & Beremand, M. (1987). A genetic system for trichothecene toxin production in *Gibberella pulicaris* (*Fusarium sambucinum*). *Phytopathology* **77**: 678-683.
- Desjardins, A.E. & Nelson, P.E. (1995). Sexual fertility of forty *Fusarium* strains from the European *Fusarium sambucinum* Project. *Mycopathologia* **129**: 149-151.
- Devos, K.M. & Gale, M.D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **84**: 567-572.
- Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* **26**: 295-302.
- Dinesh, K.R., Lim, T.M., Chua, K.L., Chan, W.K. & Phang, V.P.E. (1993). RAPD analysis - an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zool. Sci.* **10**: 849-854.
- Domsch, K.H. & Gams, W. (1968). Die Bedeutung vorfuchtabhängiger Verschiebungen in der Bodenpilzflora. I. Einfluß auf die Wurzelentwicklung von Weizen, Erbsen und Raps. *J. Phytopathol.* **63**: 64-74.
- Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.-H. (1980). *Compendium of soil fungi*. Vol. 1. Academic Press Inc.: London, New York; 859 p.
- Dooley, J.J., Harrison, S.P., Mytton, L.R., Dye, M., Cresswell, A., Skot, L. & Beeching, J.R. (1993). Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium* isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Can. J. Microbiol.* **39**: 665-673.
- Doyle, J.J. (1992). Gene trees and species trees: Molecular systematics as one character taxonomy. *Syst. Bot.* **17**: 144-163.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1991). DNA and higher plant systematics: Some examples from the legumes. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. & Young, J.P.W. (eds.): *Molecular techniques in taxonomy*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York; 101-115.
- Duncan, S., Barton, J.E. & O'Brien, P.A. (1993). Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. *Mycol. Res.* **97**: 1075-1082.
- Durand, N., Reymond, P. & Fèvre, M. (1993). Randomly amplified polymorphic DNAs assess recombination following an induced parasexual cycle in *Penicillium roquefortii*. *Curr. Genet.* **24**: 417-420.
- DuTeau, N.M. & Leslie, J.F. (1991). A simple, rapid procedure for the isolation of DNA for PCR from *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Fungal Gen. Newsl.* **38**: 72.

- Dyer, P.S., Nicholson, P., Rezanoor, H.N., Lucas, J.A. & Peberdy, J.F. (1994). Two-allele heterothallism in *Tapesia yallundae*, the teleomorph of the cereal eyespot pathogen *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **43**: 403-414.
- Ebbels, D.L. (1975). *Fusarium* wilt of cotton. A review with special reference to Tanzania. *Cotton Growing Rev.* **52**: 295-339.
- Ebbels, D.L. (1976). Diseases of Upland Cotton in Africa. *Rev. Plant Pathol.* **55**: 747-763.
- Edwards, O.R. & Hoy, M.A. (1993). Polymorphism in 2 parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Biol. Control* **3**: 243-257.
- El-Abyad, M.S. & Saleh, Y.E. (1973). Competitive saprophytic colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **60**: 187-195.
- El-Gindy, A.A. (1991). A new root-rot disease of tomato in egypt caused by *Fusarium tabacinum*. *Zentbl. Mikrobiol.* **146**: 77-79.
- Elias, K.S., Schneider, R.W. & Lear, M.M. (1991). Analysis of vegetative compatibility groups in nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from symptomless tomato roots. *Can. J. Bot.* **69**: 2089-2094.
- Ellis, J.J. (1989). An alignment of toxigenic *Gibberella* strains having anamorphs in section *Liseola* of *Fusarium*. *Mycologia* **81**: 307-311.
- Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D. & Honeycutt, R.J. (1993). Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Bio-Techniques* **14**: 214-217.
- Elmer, W.H. (1991). Vegetative compatibility groups of *Fusarium proliferatum* from *Asparagus* and comparisons of virulence, growth rates, and colonization of *Asparagus* residues among groups. *Phytopathology* **81**: 852-857.
- Elmer, W.H. (1992). Suppression of *Fusarium* crown and root rot of *Asparagus* with sodium chloride. *Phytopathology* **82**: 97-104.
- Epplen, J.T. (1988). On simple GATA (GACA) sequences in animal genomes: A critical reappraisal. *J. Heredity* **79**: 409-417.
- Erland, S., Henrion, B., Martin, F., Glover, L.A. & Alexander, I.J. (1994). Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrillosa* donk by RFLP analysis of the PCR-amplified its and IGS regions of ribosomal DNA. *New Phytol.* **126**: 525-532.
- Erlich, H.A. (1989). PCR-technology. Principles and applications for DNA amplification. Macmillan Publishers Ltd.: Basingstoke, UK; 246 p.
- Erlich, H.A., Gelfand, D. & Sninsky, J.J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* **252**: 1643-1651.
- Escande, A. & Radtke, W. (1973). Comparacion de metodos de inoculacion con *Fusarium eumartii* en cultivares de papa. *Rev. Investigaciones Agropecuarias* **5**(10): 211-233.
- Escanole, A., Fernandez, H. & Radtke, W. (1973). Losses caused by rot in stored potatoes. *IDIA* **305**: 8-15.
- Fergani, H. & Khelafi, H. (1990). The classification of some pathogenic and saprophyte strains of *Fusarium oxysporum* by a general compatibility. Institut National Agronomique El Harrach, Dept. de Botanique; Alger (Algeria); 88 p.
- Fernandez, D., Assigbetse, K., Dubois, M.P. & Geiger, J.P. (1994). Molecular characterization of races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(11): 4039-4046.
- Fischer, C., Porta-Puglia, A. & Barz, W. (1995). RAPD analysis of pathogenic variability in *Ascochyta rabiei*. *J. Phytopathol.* **143**(10): 601-607.
- Folkertsma, R.T., Vandervoort, J.N.A.M.R., Vangentpelzer, M.P.E., Degroot, K.E., Vandenbos, W.J.R., Schots, A., Bakker, J. & Gommers, F.J. (1994). Inter- and intraspecific variation between populations of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* revealed by random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology* **84**(8): 807-811.
- Förster, H., Coffey, M.D., Elwood, H. & Sogin, M.L. (1990). Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia* **82**: 706-312.
- Foster, L.M., Kozak, K.R., Loftus, M.G., Stevens, J.J. & Ross, I.K. (1993). The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycol. Res.* **97**: 769-781.
- Francis, D.M., Gehlen, M.F. & St. Clair, D.A. (1994). Genetic variation in homothallic and hyphal swelling isolates of *Pythium ultimum* var. *ultimum* and *P. ultimum* var. *sporangiferum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**(6): 767-775.
- Freeman, S., Pham, M. & Rodriguez, R.J. (1993). Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Exp. Mycol.* **17**: 309-322.
- Fritsch, P., Hanson, M.A., Spore, C.D., Pack, P.E. & Rieseberg, L.H. (1993). Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**(1): 10-20.

- Fujimori, F. & Okuda, T. (1995). Rapid preparation of PCR-amplifiable fungal DNA by benzyl bromide extraction. *Mycoscience* **36**: 465-467.
- Gams, W., Domsch, K.H. & Weber, E. (1969). Nachweis signifikant verschiedener Pilzpopulationen bei gleicher Bodennutzung. *Plant and Soil* **31**(3): 439-450.
- Gams, W. & Gerlach, M. (1968). Beiträge zur Systematik und Biologie von *Plectosphaerella cucumeris* und der zugehörigen Konidienform. *Persoonia* **5**: 177-188.
- Gang, D.R. & Weber, D.J. (1995). Preparation of genomic DNA for RAPD analysis from thick-walled dormant teliospores of *Tilletia* species. *BioTechniques* **19**(1): 92-96.
- Garbelotto, M., Bruns, T.D., Cobb, F.W. & Orosina, W.J. (1993). Differentiation of intersterility groups and geographic provenances among isolates of *Heterobasidium annosum* detected by random amplified polymorphic DNA assays. *Can. J. Bot.* **71**: 565-569.
- Gardes, M. & Bruns, T.D. (1992). ITS primers with enhanced specificity for *Basidiomycetes* - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**: 113-118.
- Gardes, M. & Bruns, T.D. (1996). ITS-RFLP matching for identification of fungi. In: Clapp, J.P. (ed.): *Methods in Molecular Biology*, Vol. 50. Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods. Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, USA; 177-186.
- Gargas, A. & Taylor, J.W. (1992). Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* **84**: 589-592.
- Gelfand, D.H. & White, T.J. (1990). Thermostable DNA polymerases. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. et al. (eds.): *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press Inc.: San Diego, California; 129-141.
- Gerlach, W. (1981). The present concept of *Fusarium* classification. In: Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Cook, R.J. (eds.): *Fusarium: Diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press: University Park and London; 413-426.
- Gerlach, W. & Nirenberg, H. (1982). The genus *Fusarium* - A pictorial atlas. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.* **209**: 406 p.
- Gibbs, R.A., Nguyen, P.N. & Caskey, C.T. (1989). Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming. *Nucl. Acids Res.* **17**: 2437-2448.
- Glynn, A.N. & Reid, J. (1969). Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in the genus *Fusarium*. *Can. J. Bot.* **47**: 1823-1831.
- Golenberg, E.M., Giannasi, D.E., Clegg, M.T., Smiley, C.J., Durbin, M., Henderson, D. & Zurawski, G. (1990). Chloroplast DNA sequence from a miocene *Magnolia* species. *Nature* **344**: 656-658.
- Gonzalez, J.M. & Ferrer, E. (1993). Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. *Genome* **36**: 1029-1031.
- Gonzalez-Candelas, L. & Kolattukudy, P.E. (1992). Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population VI). *J. Bacteriol.* **174**(20): 6343-6349.
- Goodwin, D.C. & Lee, S.B. (1993). Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Bio-Techniques* **15**(3): 438-444.
- Goodwin, P.H. & Annis, S.L. (1991). Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2482-2486.
- Gordon, W.L. (1952). The occurrence of *Fusarium* species in Canada. II. Prevalence and taxonomy of *Fusarium* species. *Can. J. Bot.* **30**: 209-251.
- Goss, R.W. (1924). Potato wilt and stem-end rot caused by *Fusarium eumartii*. *Research bulletin/University of Nebraska, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station*. Vol. 27. Lincoln, Neb University of Nebraska: Nebraska, USA; 83 p.
- Grajal-Martín, M.J., Simon, C.J. & Muehlbauer, F.J. (1993). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Phytopathology* **83**(6): 612-614.
- Grando, M.S., Ubeda, J. & Briones, A.I. (1994). RAPD analysis of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains differentiated by pulsed field gel electrophoresis. *Biotechnol. Techn.* **8**(8): 557-560.
- Gray, L.E. & Achenbach, L. (1995). Use of RAPD and species-specific PCR primers as aides in identifying SDS isolates of *Fusarium solani* (Abstr. Annual Meeting of the American Phytopathological Association, Pittsburgh, Pennsylvania, USA, August 12-16, 1995). *Phytopathology* **85**(10): 1155.
- Guadet, J., Julien, J., Lafay, J.F. & Brygoo, Y. (1989). Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* **6**(3): 227-242.

- Guglielminetti, M., Giuli Morghen, C., Radaelli, A., Bistoni, F., Carruba, G., Spera, G. & Carretta, G. (1994). Mycological and ultrastructural studies to evaluate biodeterioration of mural paintings. Detection of fungi and mites in frescoes of the Monastery of St. Damian in Assisi. *Int. Biodeterioration Biodegradation* **33**(3): 269-283.
- Gulati, S.L. & Gaur, A.C. (1988). Enzymatic hydrolysis of cellulose from agricultural and industrial wastes. *Biological Wastes* **25**(4): 309-314.
- Guo, W., Gonzalez-Candelas, L. & Kolattukudy, P.E. (1995). Cloning of a new pectate lyase gene *pelC* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**(2): 352-360.
- Guthrie, P.A.I., Magill, C.W., Frederiksen, R.A. & Odvody, G.N. (1992). Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **82**: 832-835.
- Hadrys, H., Balick, M. & Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1**: 55-63.
- Haemmerli, U.A., Brändle, U.E., Petrini, O. & McDermott, J.M. (1992). Differentiation of isolates of *Discula umbrinella* (Teleomorph: *Apiognomonina errabunda*) from beech, chestnut, and oak using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 479-483.
- Haley, S.D., Miklas, P.N., Stavely, J.R., Byrum, J. & Kelly, J.D. (1993). Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor. Appl. Genet.* **86**(4): 505-512.
- Hall, R. (1967). Proteins and catalase isoenzymes from *Fusarium solani* and their taxonomic significance. *Aust. J. Biol. Sci.* **20**: 419-428.
- Halward, T., Stalker, T., LaRue, E. & Kochert, G. (1992). Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Mol. Biol.* **18**: 315-325.
- Hamelin, R.C., Oulette, G.B. & Bernier, L. (1993). Identification of *Gremmeniella abietina* races with random amplified polymorphic DNA Markers. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1752-1755.
- Hampel, M. (1970). *Phoma eupyrena* Sacc. ss. Wr. und *Plectosphaerella cucumeris* Kleb., zwei wenig bekannte Keimlingspathogene. *Z. Pflkrankh. Pflschut.* **77**: 225-227.
- Harlton, C.E., Levesque, C.A. & Punja, Z.K. (1995). Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. *Phytopathology* **85**(10): 1269-1281.
- Hartill, W.F.T. (1991). Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zealand. *New Zealand J. Crop Hort. Sci.* **19**(3): 297-304.
- Hartung, J.S. & Civerolo, E.L. (1989). Restriction fragment polymorphisms distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *X. c. pv. citri*. *Phytopathology* **79**: 793-799.
- Hashem, A.R. (1995). Crude oil utilization by fungi isolated from the soil of industrial Yanbu City, Saudi Arabia. *Geobios (Jodhpur)* **22**(2-3): 121-124.
- He, S., Ohm, H. & MacKenzie, S. (1992). Detection of DNA polymorphisms among wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* **84**: 573-578.
- Hedrick, P. (1992). Shooting the RAPDs. *Nature* **355**: 679-680.
- Hellgren, M. & Högberg, N. (1995). Ecotypic variation of *Gremmeniella abietina* in northern Europe - disease patterns reflected by DNA variation. Dissertation, Dep. of Forests Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Science: Uppsala, Schweden. (Teil 4) 1-23.
- Henrion, B., Chevalier, G. & Martin, F. (1994). Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* **98**: 37-43.
- Hentschel, K.D. (1987). Möglichkeiten der Bekämpfung von Lagerkrankheiten bei Speisemöhren. *Feldwirtschaft* **28**(11): 507-508.
- Hering, O. (1993). Rassendifferenzierung bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* mittels RAPD-PCR. *Phytomedizin* **23**: 51-52.
- Hering, O. (1994). Untersuchungen zur Nutzung von Fettsäureprofilen als Hilfsmittel bei der Identifikation von Rassen bei *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl : Fries f. sp. *vasinfectum* (Atkinson) Snyder & Hansen, dem Erreger der parasitären Baumwollwelke. Magisterarbeit, Fachbereich Agrarwissenschaften, Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz. Georg-August-Universität: Göttingen; 77 p.
- Hering, O., Deml, G., Köhn, S. & Nirenberg, H.I. (1993). Untersuchungen zur Nutzung von Fettsäureprofilen bei der Identifikation von Rassen bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw.* **132**-133.
- Hering, O., Deml, G. & Nirenberg, H.I. (1992a). Chromosomenuntersuchungen mittels Rotating-Field-Gel-Elektrophorese an *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* und Rassen von *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Rasse 1, 2 und 5). *Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw.* **92**.
- Hering, O., Deml, G. & Nirenberg, H.I. (1992b). RAPD-PCR als Werkzeug zur Differenzierung von *Fusarium*-Arten auf der Ebene von Rassen. *Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw.* **93**.

- Hering, O., Deml, G. & Nirenberg, H.I. (1992c). Studien an Chromosomen von *Fusarium*-Arten mittels Rotating-Field-Gel-Elektrophorese. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. 283: 314.
- Hering, O., Köhn, S., Deml, G. & Nirenberg, H.I. (1992d). Eignung hydrolysierbarer Zellfettsäuren zur Art- und Rassendifferenzierung bei *Fusarium*. Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw. 92-93.
- Hering, O. & Nirenberg, H.I. (1993). RAPD-Untersuchungen bei *Pseudocercospora*-Arten. Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw. 135.
- Hering, O. & Nirenberg, H.I. (1995a). Differentiation of *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato and related species by RAPD PCR. Mycopathologia 129(3): 159-164.
- Hering, O. & Nirenberg, H.I. (1995b). Differentiation of *Fusarium solani* Mart. s. Snyd. & Hans. by RAPD and ARDRA. In: International Seminar on *Fusarium*-Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Martina Franca, Italy, 9.-13. May 1995; 186.
- Hering, O., Nirenberg, H.I. & Deml, G. (1994). Grenzen und Möglichkeiten der RAPD-Analysen zur Charakterisierung von Pilzen. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. 301: 160.
- Hering, O., Nirenberg, H.I. & Deml, G. (1995a). ITS-RFLP-Untersuchungen an spezialisierten Formen von *Fusarium oxysporum* Schlecht. ex Fries. Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw. 149-150.
- Hering, O., Nirenberg, H.I. & Deml, G. (1995b). ITS-RFLP-Untersuchungen bei *Pseudocercospora*-Isolaten. Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw. 151.
- Hering, O., Nirenberg, H.I. & Deml, G. (1995c). RAPD and ARDRA studies on *Pseudocercospora*. Züchtungsforschung - Berichte aus der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen 1(2): 324-327.
- Hering, O., Nirenberg, H.I. & Deml, G. (1995d). RAPD- und ITS-RFLP-Untersuchungen bei *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* und *F. cerealis*. Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw. 150.
- Hering, O., Nirenberg, H.I. & Deml, G. (1996a). Charakterisierung von *Fusarium solani* Mart. sensu Snyd. & Hans. mit ITS-RFLP- und RAPD-Untersuchungen. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. 321: 71.
- Hering, O., Nirenberg, H.I. & Deml, G. (1996b). RAPD-Untersuchungen an spezialisierten Formen von *Fusarium oxysporum* Schlecht. Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. 321: 86.
- Hering, O., Nirenberg, H.I., Deml, G., Hagedorn, G. & Rainey, F. (1995e). Selective amplification of rDNA internal transcribed spacer regions to detect *Fusarium graminearum*, *F. cerealis* and *F. culmorum*. Züchtungsforschung - Berichte aus der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen 1(2): 328-331.
- Hering, O., Nirenberg, H.I., Deml, G., Hagedorn, G. & Rainey, F. (1995f). Selektiver Nachweis von *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* und *F. cerealis*. Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw. 150-151.
- Heun, M. & Helentjaris, T. (1993). Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. Theor. Appl. Genet. 85: 961-968.
- Hibbet, D.S. (1992). Ribosomal RNA and fungal systematics. Trans. Mycol. Soc. Japan 33: 533-556.
- Hillis, D.M. (1987). Molecular versus morphological approaches to systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 18: 23-42.
- Hillis, D.M. & Dixon, M.T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. Quart. Rev. Biol. 66(4): 411-453.
- Hnetkovsky, N., Chang, S.J., Doubler, T.W., Gibson, P.T. & Lightfoot, D.A. (1996). Genetic mapping of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). Crop Sci. 36(2): 393-400.
- Ho, Y.W., Varghese, G. & Taylor, G.S. (1985). Protein and esterase patterns of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis* and *Fusarium oxysporum* var. *redolens* from Africa and non-pathogenic *F. oxysporum* from Malaysia. J. Phytopathol. 144: 301-311.
- Hoelzel, A.R. & Green, A. (1992). Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In: Hölzel, A.R. (ed.): Molecular genetic analysis of populations. IRL Press: Oxford; 159-186.
- Holmer, L., Nitare, L. & Stenlid, J. (1994). Population structure and decay pattern of *Phellinus tremulae* as determined by somatic incompatibility. Can. J. Bot. 72: 1391-1396.
- Hornok, L. (1980). Serotaxonomy of *Fusarium* species of the sections *Gibbosum* and *Discolor*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 74: 73-78.
- Hu, J. & Quiros, C.F. (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Rep. 10: 505-511.
- Huang, Z.Y., Smalley, E.B. & Curies, R.P. (1995). Differentiation of *Mycosphaerella dearnessii* by cultural characters and RAPD analysis. Phytopathology 85(5): 522-527.

- Huey, B. & Hall, J. (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite probes from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* **171**: 2528-2532.
- Hummel, M. (1992). Die Polymerase-Kettenreaktion in der modernen Diagnostik. *BIOforum* **15**: 395-400.
- Hunt, G.J. & Page, R.E., Jr. (1992). Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 15-20.
- Hutchinson, L.J., Chakravarty, P., Kawchuk, L.M. & Hiratsuka, Y. (1994). *Phoma etheridgei* sp. nov. from black galls and cankers of trembling aspen *Populus tremuloides* and its potential role as a bioprotectant against the aspen decay pathogen *Phellinus tremulae*. *Can. J. Bot.* **72**: 1424-1431.
- Hwang, S.F. & Evans, I.R. (1985). Eumartii wilt of potato in Alberta. *Can. Plant Dis. Surv.* **65**(2): 57-59.
- Iannelli, D., Capparelli, R., Marziano, F., Scala, F. & Noviello, C. (1983). Production of hybridomas secreting monoclonal antibodies to the genus *Fusarium*. *Mycotaxon* **17**: 523-532.
- Ibrahim, F.M. (1966). A new race of cotton-wilt *Fusarium* in the Sudan Gezira. *Empire Cotton Growing Rev.* **43**: 296-299.
- Ibrahim, G. & Nirenberg, H.I. (1993). Response of some Sudanese cotton cultivars to race 1 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Z. Pflkrankh. Pflschutz.* **100**: 645-651.
- Inai, S., Ishikawa, K., Nunomura, O. & Ikehashi, H. (1993). Genetic analysis of stunted growth by nuclear-cytoplasmic interaction in interspecific hybrids of *Capsicum* by using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **87**: 416-422.
- Innis, M.A. & Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. et al. (eds.): *PCR protocols - A guide to methods and applications*. Academic Press Inc.: San Diego, California; 3-12.
- Jacobson, K.M., Miller, O.K. & Turner, B.J. (1993). Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **90**(10): 9159-9163.
- Jansen, R. & Ledley, F.D. (1990). Disruption of phase during PCR amplification and cloning of heterozygous target sequences. *Nucl. Acids Res.* **18**: 5153-5156.
- Jarvis, W.R. & Shoemaker, R.A. (1978). Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathology* **68**(12): 1679-1680.
- Jayarao, B.M., Dor, J.J.E., Jr., Baumbach, G.A., Matthews, K.R. & Oliver, S.P. (1991). Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* **29**(12): 2774-2778.
- Jiménez, M., Logrieco, A. & Bottalico, A. (1993). Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in Banana fruits. *J. Phytopathol.* **137**: 214-220.
- Joffe, A.Z. (1974). A modern system of *Fusarium* taxonomy. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **53**: 201-228.
- Joffe, A.Z. (1986). *Fusarium* Species: Their biology and toxicology. John Wiley & Sons Inc.: Somerset, N.J., USA; Chichester, England. XVII+588 p.
- Joffe, A.Z. & Palti, J. (1972). *Fusarium* species of the *Martella* section in Israel. *J. Phytopathol.* **73**: 123-148.
- Joffe, A.Z. & Palti, J. (1974). Relations between harmful effect on plants and on animals of toxins produced by species of *Fusarium*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **52**: 209-218.
- Jones, F.R. (1923). Stem and root rot of peas in the United States caused by species of *Fusarium*. *J. Agric. Res.* **26**: 459-475.
- Jones, M.J. & Dunkle, L.D. (1993). Analysis of *Cochliobolus carbonum* races by PCR amplification with arbitrary and gene-specific primers. *Phytopathology* **83**: 366-370.
- Jorgensen, R.A. & Cluster, P.D. (1989). Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: New characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **75**: 1238-1247.
- Joshi, A., Garg, S.K. & Verma, J. (1990). Production of ethanol from sugars in wood hydrolysate by *Fusarium oxysporum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 10-14.
- Kaiser, S.A.K.M. & Gupta, P.K.S. (1976). Serological and electrophoretic studies of three formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **67**: 33-37.
- Kalyanasundaram, R. & Charudattan, R. (1969). Serological studies in the genus *Fusarium*: A comparison of strains. *J. Phytopathol.* **64**: 28-31.
- Kalyanasundaram, R., Desaei, V.B. & Sirsi, M. (1967). Serological studies in the genus *Fusarium*. *J. Phytopathol.* **59**: 39-45.
- Kamphampati, S., Black, W.C.V. & Rai, K.S. (1992). Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (*Diptera: Culicidae*): Techniques, statistical analysis, and applications. *J. Med. Entomol.* **29**: 939-945.

- Karjalainen, R. & Fabritius, A.L. (1993). Identification of intersterility groups of *Heterobasidion annosum* by restriction analysis of PCR products. *J. Phytopathol.* **139**: 193-200.
- Kazan, K., Manners, J.M. & Cameron, D.F. (1992). Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 882-888.
- Kazan, K., Manners, J.M. & Cameron, D.F. (1993). Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genome* **36**: 43-49.
- Kemp, S.J. & Teale, A.J. (1994). Randomly primed PCR amplification of pooled DNA reveals polymorphism in a ruminant repetitive DNA sequence which differentiates *Bos indicus* and *B. taurus*. *Animal Genet.* **25**: 83-88.
- Kesseli, R.V., Paran, I. & Michelmore, R.W. (1994). Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics* **136**: 1435-1446.
- Kim, D.H., Martyn, R.D. & Magill, C.W. (1991). Chromosomal polymorphism in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Phytopathology* **81**: 1218-1219.
- Kim, J.C. & Lee, Y.W. (1994). Sambutoxin, a new mycotoxin produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from rotted potato tubers. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(12): 4380-4386.
- Kinderlerer, J.L. (1994). Degradation of the lauric acid oils. *Int. Biodeterioration Biodegradation* **33**(4): 345-354.
- Kirkpatrick, B.W., Cowan, C.M. & Dentine, M.R. (1991). Differential amplification of alleles: Potential for misclassification with PCR genotyping. *Animal Biotech* **2**(1): 1-14.
- Kistler, H.C., Bosland, P.W., Benny, U., Leong, S. & Williams, P.H. (1987). Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology* **77**: 1289-1293.
- Kistler, H.C., Momol, E.A. & Benny, U. (1991). Repetitive genomic sequences for determining relatedness among strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **81**: 331-336.
- Klebhahn, H. (1930). Vergilbende junge Treibgurken, ein darauf gefundenes *Cephalosporium* und dessen Schlauchfrüchte. *J. Phytopathol.* **1**: 31-44.
- Klein-Lankhorst, R.M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T. & Zabel, P. (1991). Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* **83**: 108-114.
- Klich, M.A. & Mullaney, E.J. (1987). DNA restriction enzyme fragment polymorphism as a tool for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Exp. Mycol.* **11**: 170-175.
- Knoth, K., Roberds, S., Poteet, C. & Tamkun, M. (1988). Highly degenerate, inosine-containing primers specifically amplify rare cDNA using the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* **16**: 10932.
- Kohn, L.M. (1992). Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* **84**(2): 139-153.
- Koller, B., Gianfranceschi, L., Seglias, N., McDermott, J. & Gessler, C. (1994). DNA markers linked to *Malus floribunda* 821 scab resistance. *Plant Mol. Biol.* **26**(2): 597-602.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J.M. & Gessler, G. (1993). Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 901-904.
- Kregere-van Rij, N.J.W. (1984). The yeasts: A taxonomic study. 3 ed. Elsevier: Amsterdam.
- Kreitman, M. (1991). Variation at the DNA level: Something for everyone. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. & Young, J.P.W. (eds.): *Molecular techniques in taxonomy*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York; 15-32.
- Kubelik, A.R. & Szabo, L.J. (1995). High-GC primers are useful in RAPD analysis of fungi. *Curr. Genet.* **28**(4): 384-389.
- Kuninaga, S. & Yokosawa, R. (1989). Genetic relatedness within and between formae speciales of *Fusarium oxysporum* as measured by DNA-DNA reassociation kinetics. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **55**: 216-223.
- Kuninaga, S. & Yokosawa, R. (1991). Determination of the taxonomic status of tomato crown root rot isolates in *Fusarium oxysporum* by DNA Homology. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **57**: 9-16.
- Kunz, B. (1988). *Grundriss der Lebensmittel-Mikrobiologie*. Behr-Verlag: Hamburg; 504 p.
- Kurtzman, C.P. (1985). Molecular taxonomy of the fungi. In: Bennett, J.W. & Lasure, L. (eds.): *Gene manipulations in fungi*. Academic Press Inc.: New York; 35-65.
- Kurtzman, C.P. (1987). Impact of nucleic acid comparison on the classification of fungi. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* **97**: 185-202.
- Kwan, H.S., Chiu, S.W., Pang, K.M. & Cheng, S.C. (1992). Strain typing in *Lentinus edodes* by polymerase chain reaction. *Exp. Mycol.* **16**: 163-166.
- Kwok, S. & Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* **339**: 237-238.

- Lachmund, A. & Sachse, G.E. (1994). Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ihre Anwendungsbereiche. In: Gassen, H.G., Sachse, G.E. & Schulte, A. (eds.): PCR - Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, Jena, New York; 1-13.
- Landry, B.S., Dextraze, L. & Boivin, G. (1993). Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (*Hymenoptera: Mymaridae* and *Trichogrammatidae*) used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome* 36: 580-587.
- Laroche, A., Gaudet, D.A., Schaalje, G.B., Erickson, R.S. & Ginns, J. (1995). Grouping and identification of low temperature basidiomycetes using mating, RAPD and RFLP analyses. *Mycol. Res.* 99(3): 297-310.
- Lecellier, G. & Silar, P. (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* 25: 122-123.
- Lee, I.M., Gundersen, D.E., Hammond, R.W. & Davis, R.E. (1994). Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed- MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84: 559-566.
- Lee, I.M., Hammond, R.W., Davis, R.E. & Gundersen, D.E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Lee, S.B. & Taylor, J.W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. et al. (eds.): PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press Inc.: San Diego, California; 282-287.
- Lee, S.B. & Taylor, J.W. (1992). Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* 9: 636-653.
- Leslie, J.F. (1991). Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* 81: 1058-1060.
- Leslie, J.F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 127-151.
- Leslie, J.F. (1996). Fungal vegetative compatibility - Promises and prospects. *Phytoparasitica* 24(1): 3-7.
- Levi, A., Rowland, L.J. & Hartung, J.S. (1993). Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. *Hortscience* 28: 1188-1190.
- Lezinou, V., Christakopoulos, P., Kekos, D. & Macris, B.J. (1994). Simultaneous saccharification and fermentation of sweet *Sorghum* carbohydrates to ethanol in a fed-batch process. *Biotechnol. Lett.* 16(9): 983-988.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W. & Börner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.* 33(6): 413-426.
- Link, H.F. (1809). Observaciones in Ordines plantarum naturales. *Mag. Ges. nat. Fr.* 3: 3-42.
- Linz, U. (1990). Thermocycler temperature variation invalidates PCR results. *BioTechniques* 9(3): 286-293.
- Linz, U., Rübbsamen-Waigmann, H., Roesch, R. & Seliger, H. (1990). Inosine-substituted primers prevent false-negative PCR results due to 3'-mismatches. *Amplifications* 4: 14-15.
- Liu, Z., Nickrent, D.L. & Sinclair, J.B. (1991). Genetic relationships among isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 based on isoenzyme analysis. *Can. J. Plant Pathol.* 12: 376-382.
- Liu, Z.L. & Sinclair, J.B. (1992). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology* 82: 778-787.
- Liu, Z.L. & Sinclair, J.B. (1993). Differentiation of intraspecific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani* using ribosomal DNA internal transcribed spacer and isozyme comparisons. *Can. J. Plant Pathol.* 15: 272-280.
- Lo, Y.M.D., Mehal, W.Z. & Fleming, K.A. (1988). False positive results and the polymerase chain reaction. *Lancet* 2: 679.
- Logrieco, A., Peterson, S.W. & Botalico, A. (1995). Phylogenetic relationship within *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato, determined from ribosomal RNA sequences. *Mycopathologia* 129: 153-158.
- Lovic, B.R., Martyn, R.D. & Miller, M.E. (1993). PCR amplification, sequence, and RFLP analysis of the ribosomal transcribed spacer regions of *Monosporascus* species (Abstr.). *Phytopathology* 83: 1347.
- Lynch, M. (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* 7: 478-484.
- MacPherson, J.M., Eckstein, P.E., Scoles, G.J. & Gajadhar, A.A. (1993). Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Mol. Cell. Probes* 7: 293-299.
- Madhosingh, C. (1964). A serological comparison of three *Fusarium* species. *Can. J. Bot.* 42: 1143-1146.

- Mailer, R.J., Scarth, R. & Fristensky, B. (1994). Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* **87**: 697-704.
- Manicom, B.Q. & Baayen, R.P. (1993). Restriction fragment length polymorphisms in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and other fusaria from *Dianthus* species. *Plant Pathol.* **42**: 851-857.
- Manicom, B.Q., Bar-Joseph, M. & Kotze, J.M. (1990a). Molecular methods of potential use in the identification and taxonomy of filamentous fungi, particularly *Fusarium oxysporum*. *Phytophylactica* **22**(2): 233-239.
- Manicom, B.Q., Bar-Joseph, M., Kotze, J.M. & Becker, M.M. (1990b). A restriction fragment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology* **80**: 336-339.
- Mantecon, J.D. (1993). Evaluation of seed-piece treatments for the control of *Fusarium* potato wilt and stem-end rot in Argentina. *Tests Agrochemicals Cultivars* **14**: 52-53.
- Manulis, S., Kogan, N., Reuven, M. & Ben-Yephet, Y. (1994). Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. *Phytopathology* **84**(1): 98-101.
- Manulis, S., Kogen, N., Reuven, M. & Ben-Yephet, Y. (1993). Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* by the RAPD technique. *Phytoparasitica* **21**(2): 128.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. & Toussoun, T.A. (1984). *Toxicogenic Fusarium species, identity and mycotoxicology*. Pennsylvania State University Press: University Park (USA); 328 p.
- Margalé, E., Chèvre, A.M., Delourme, R. & Hervé, Y. (1994). Description de la diversité génétique chez *Brassica oleracea* à l'aide de marqueurs isoenzymatique et moléculaires. *Genet. Sel. Evol.* **26**(Suppl. 1): 137-153.
- Martin, F., Tommerup, I.C. & Tagu, D. (1994). Genetics of ectomycorrhizal fungi - progress and prospects. *Plant and Soil* **159**: 159-170.
- Martin-Kearley, J., Gow, J.A., Péloquin, M. & Greer, C.W. (1994). Numerical analysis and the application of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction to the differentiation of *Vibrio* strains from a seasonally cold ocean. *Can. J. Microbiol.* **40**: 446-455.
- Martyn, R.D., Lovic, B.R. & Miller, M.E. (1993). Evidence that *Monosporascus cannonballus* and *M. eutypoides* may be synonymous (Abstr.). *Phytopathology* **83**: 1347.
- Martyn, R.D., Rush, C.M., Biles, C.L. & Baker, E.H. (1989). Etiology of a root rot disease of sugar beet in Texas. *Plant Dis.* **73**: 879-884.
- Marziano, F., Noviello, C. & Iannelli, D. (1981). Impiego dei metodi sierologici nello studio tassonomico del genere *Fusarium*. (Anwendung serologischer Methoden zur taxonomischen Untersuchung der Gattung *Fusarium*). *Ann. Fac. Sci. Agrar. Univ. Studi Napoli Portici Ser.* **15**: 11-25.
- Matta, A. (1978). *Fusarium tabacinum* (Beyma) W. Gams patogeno in natura su basilico e pomodoro. *Riv. Patol. Vegetale* **14**: 119-125.
- Matthews, K.R. & Oliver, S.P. (1994). Differentiation of *Staphylococcus* species by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *J. Food Protect.* **57**: 486-489.
- Matuo, T. (1972). Taxonomic studies of phytopathogenic fusaria in Japan. *Rev. Plant Protect. Res.* **5**(1972): 34-45.
- Matuo, T. (1979). Fusaria found in the environment of human life - with special reference to the relation between plant pathogenic fusaria and human pathogenic fusaria. *Japan. J. Med. Mycol.* **20**(3): 164-170.
- Matuo, T. & Sakurai, Y. (1963). On the relation between *Fusarium solani* f. sp. *radicicola* race 2 and *F. solani* f. sp. *pisi* (Abst.). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **28**: 311.
- Matuo, T. & Sakurai, Y. (1965). *Fusarium solani* f. sp. *robiniae* n. f., one of the causal fusaria of the twig blight of *Robinia pseudoacacia*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **30**(1): 31-36.
- Matuo, T. & Snyder, W.C. (1973). Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in *Fusarium solani*. *Phytopathology* **63**: 562-565.
- McClure, T.T. (1951). *Fusarium* root rot of sweet-potato sprouts. *Phytopathology* **41**: 72-77.
- Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S. & Sogin, M.L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* **71**: 491-499.
- Meijer, G., Megnegneau, B. & Linders, E.G.A. (1994). Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. *Mycol. Res.* **98**: 267-276.
- Meinkoth, J. & Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilization solid supports. *Anal. Biochem.* **138**: 267-284.
- Melcher, G.P., McGough, D.A., Fothergill, A.W., Norris, C. & Rinaldi, M.G. (1993). Disseminated hyalohyphomycosis caused by a novel human pathogen *Fusarium napiforme*. *J. Clin. Microbiol.* **31**(6): 1461-1467.

- Mendel, Z., Nestel, D. & Gafny, R. (1994). Examination of the origin of the Israeli population of *Matsucoccus josephii* (Homoptera, Matsucoccidae) using random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction method. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**(2): 165-169.
- Mes, J.J., Vandoorn, J., Roebroek, E.J.A., Vanegmond, E., Vanaartrijk, J. & Boonekamp, P.M. (1994). Restriction fragment length polymorphisms, races and vegetative compatibility groups within a worldwide collection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Plant Pathol.* **43**: 362-370.
- Messiaen, C.M. (1959). La systematique du genre *Fusarium* selon Snyder et Hansen. *Rev. Pathol. Vegetale Entomol. Agric. France* **38**: 253-266.
- Messiaen, C.M. & Cassini, R. (1968). Recherches sur la fusarioses. IV. La systématique des *Fusarium*. *Ann. Épiphyt.* **19**: 387-454.
- Meunier, J.R. & Grimont, P.A.D. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* **144**: 373-379.
- Meyer, R.J. (1991). Molecular systematics of *Trichoderma* species by restriction analysis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments (Abstr.). *Phytopathology* **81**: 1240.
- Meyer, W., Lieckfeldt, E. & Börner, T. (1991). DNA Fingerprinting. Charakterisierung, Differenzierung und Identifizierung von Pilzen. *BioTec* **5**: 37-41.
- Meyer, W., Morawetz, R., Börner, T. & Kubicek, C.P. (1992). The use of DNA-fingerprint analysis in the classification of some species of *Trichoderma* aggregate. *Curr. Genet.* **21**: 27-30.
- Ming, Y.-N. & Yu, T.-F. (1964). Identification of a pathogenic *Fusarium*, isolated from foot ulcer of a male patient. *Acta Microbiol. Sin.* **10**: 415.
- Ming, Y.-N. & Yu, T.-F. (1966). A new *Fusarium*, the causal agent of otomycesis. *Acta Microbiol. Sin.* **12**(2): 176-179.
- Ming, Y.-N. & Yu, T.-F. (1968). Identification of a *Fusarium* species, isolated from corneal ulcer. *Acta Microbiol. Sin.* **12**(2): 180-186.
- Mirocha, C.J., Xie, W., Xu, Y., Wilcoxson, R.D., Woodward, R.P., Etebarian, R.H. & Behele, G. (1994). Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* on barley and wheat. *Mycopathologia* **128**: 19-23.
- Mishra, D. & Rath, G.C. (1987). Factors affecting rotting of brinjal fruits caused by four species of *Fusarium*. *Indian J. Mycol. Plant Pathol.* **16**(3): 277-279.
- Mislivec, P.B. (1981). Mycotoxin production by conidial fungi. In: Cole, G.T. & Kendrick, B. (eds.): *Biology of conidial fungi*. Academic Press Inc.: London, New York; 38-74.
- Moeller, E.M., Schilling, A.G., Geiger, H.H. & Bahnweg, G. (1994). Identification and characterization of genotypes of cereal-pathogenic *Fusarium* species by means of RAPD markers. *Z. Mykol.* **60**(1): 239-252.
- Montgomery, G.B. & Wills, W.H. (1973). Further progress on boxwood decline investigations. *Boxwood Bull.* **13**(2): 30-31.
- Morace, G., Cataldi, L. & Polonelli, L. (1984). Human pathogenic actinomycetes and fungi in soil from different areas of Tunis and its environs. *L'Igiene Moderna* **81**(3): 496-503.
- Morton, D.J. & Dukes, P.D. (1966). Serological differentiation of race 1 from race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Dis. Rep.* **50**: 444-445.
- Moser, H. & Lee, M. (1994). RFLP variation and genealogical distance, multivariate distance, heterosis, and genetic variance in oats. *Theor. Appl. Genet.* **87**: 947-956.
- Mösgeles, G. & Friedt, W. (1994). Genetic 'fingerprinting' of sunflower lines and F1 hybrids using isozymes, simple and repetitive sequences as hybridization probes, and random primers for PCR. *Plant Breeding* **113**(2): 114-124.
- Moss, M.O. (1995). Mycotoxins in foods, feeds and pastures. *Biodeterioration Abstr.* **9**(3): 259-264.
- Mouzeyar, S., Roeckel-Drevet, P., Gentzbittel, L., Philippon, J., Tourvielle de Labrouhe, D., Vear, F. & Nicolas, P. (1995). RFLP and RAPD mapping of the sunflower P11 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* race I. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 733-737.
- Muller, H.M., Metzger, K.U., Modi, R. & Reimann, J. (1994). Ergosterin und Fusarientoxine in Weizenkleie und Weizen. Ergosterol and *Fusarium* toxins in wheat bran and wheat. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutrition* **71**(1): 48-55.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* **51**: 263-273.
- Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**: 36-43.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.

- Munthali, M., Ford-Lloyd, B.V. & Newbury, H.J. (1992). The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Meth. Applic.* **1**: 274-276.
- Mygind, H. (1986). *Fusarium-visnesyge i Campanula isophylla (Fusarium wilt in Campanula isophylla)*. *Tidsskr. Planteavl.* **90**: 3-13.
- Nagao, H., Sato, K. & Ogiwara, S. (1994). Susceptibility of *Cucurbita* spp. to the cucurbit root-rot fungus, *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1. *Agro-nomie* **14**: 95-102.
- Nakase, T., Okada, G., Sugiyama, J., Itoh, M. & Suzuki, M. (1989). *Ballistosporymycetes*, a new ballistospore-forming anamorphic yeast genus. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **35**: 289-309.
- Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D. & Robb, J. (1991). Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**: 1-11.
- Nei, M. & Li, W.H. (1979). Mathematical models for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **76**: 5269-5273.
- Nelson, C.D., Nance, W.L. & Doudrick, R.L. (1993). A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. *Theor. Appl. Genet.* **87**: 145-151.
- Nelson, P.E. (1990). Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. In: Ploetz, R.C. (ed.): *Fusarium wilt of Banana*. American Phytopathological Society: St. Paul, Minnesota, USA; 27-35.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Penn. State Univ. Press: University Park and London; 193 p.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Cook, R.J. (1981). *Fusarium: Diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press: University Park, Pa. USA. xi + 457 p.
- Neuveglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B. & Riba, G. (1994). Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycol. Res.* **98**: 322-328.
- Newton, C.R. & Ghraham, A. (1994). *PCR. Spectrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford*; 206 p.
- N'Goran, J.A.K., Laurent, V., Risterucci, A.M. & Lanaud, C. (1994). Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. *Heredity* **73**(Part 6): 589-597.
- Nicholson, P., Rezanoor, H.N. & Su, H. (1993a). Use of amplified polymorphic DNA (RAPD) Analysis and genetic fingerprinting to differentiate isolates of race, O, C and T of *Bipolaris maydis*. *J. Phytopathol.* **139**: 261-267.
- Nicholson, P., Rezanoor, H.N. & Su, H. (1993b). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and genetic fingerprinting to differentiate isolates of race O, C and T of *Bipolaris maydis*. *J. Phytopathol.* **139**(3): 261-267.
- Nicholson, P., Rezanoor, H.Z. & Su, H. (1993c). Using RAPD analysis and genetic fingerprinting to differentiate isolates of race O, C and T of *Cochliobolus heterostrophus*. *Acta Phytopathol. Sin.* **23**: 2.
- Nielsen, L.W. & Moyer, J.W. (1979). A *Fusarium* root rot of sweetpotatoes. *Plant Dis. Rep.* **63**(5): 400-404.
- Nienhaus, C. & Gehrman, P. (1991). PCR: Kontaminationen und deren Vermeidung. *BioTec* **6**.
- Niere, B., Hering, O., Nirenberg, H.I. & Deml, G. (1996). RAPD- und ITS-RFLP-Charakterisierung von *Claviceps purpurea*-Isolaten verschiedener Wirte. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.* **321**: 83.
- Nirenberg, H.I. (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanst.* **169**: 117 p.
- Nirenberg, H.I. (1990). Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. *Stud. Mycol.* **32**: 91-101.
- Nirenberg, H.I. (1995a). The European *Fusarium sambucinum* project. *Mycopathologia* **129**(3): 129.
- Nirenberg, H.I. (1995b). Morphological and phytopathological differentiation of *Fusarium* strains within the *Martiella* section. In: International Seminar on *Fusarium* Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Martina Franca (Italy) 147.
- Nirenberg, H.I. (1995c). Morphological differentiation of *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu stricto, *F. torulosum* (Berk. et Curt.) Nirenberg comb. nov. and *F. venenatum* Nirenberg sp. nov. *Mycopathologia* **129**(3): 131-141.
- Nirenberg, H.I. & Brielmaier-Liebetanz, U. (1996). *Nectria ipomoeae* Halst., Anamorph: *Fusarium striatum* Sherb. an *Passiflora edulis* Sims. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. Eingereicht zur Veröffentlichung.
- Nirenberg, H.I., Hering, O. & Deml, G. (1994a). Charakterisierung von an Weidelgräsern vorkommenden *Drechslera*-Arten mittels RAPD-Analysen. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.* **301**: 179.

- Nirenberg, H.I., Ibrahim, G., Hering, O. & O'Donnell, K. (1996). Evaluation of the systematic position of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* - morphological, phytopathologic, and molecular experiments with 8 races. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.* **321**: 644.
- Nirenberg, H.I., Ibrahim, G. & Michail, S.H. (1994b). Race identity of three isolates of *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyd. & Hans. from Egypt and the Sudan. *Z. Pflkrankh. Pflschutz.* **101**(6): 594-597.
- Nirenberg, H.I. & O'Donnell, K. (1996). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. Eingereicht zur Veröffentlichung.
- Nirenberg, H.I., Schüler, K., Hering, O. & Deml, G. (1994c). RAPD-Analysen von an Gerste vorkommenden *Drechslera*-Arten. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.* **301**: 178.
- Novy, R.G. & Vorsa, N. (1996). Evidence for RAPD heteroduplex formation in cranberry: Implications for pedigree and genetic-relatedness studies and a source of co-dominant RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **92**(7): 840-849.
- O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genet.* **22**: 213-220.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation In Fungal Systematics*; International Symposium, Newport, Oregon, USA, August 4-7, 1992. XVI+375 p.: CAB International: Wallingford, England, UK; Tucson, Arizona, USA. ISBN 0-85198-865-2; 225-233.
- O'Donnell, K. & Gray, L.E. (1995). Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**(5): 709-716.
- O'Donnell, K., Samuels, G. & Nirenberg, H. (1993). Molecular genetic relationships within *Fusarium solani* (Abstr.). *Phytopathology* **83**: 1346.
- Ohto, K., Dai, K. & Shimonagane, K. (1989). Occurrence and control of cucurbit foot rot caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 in Japan. *Plant Protection* **43**(12): 625-628.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J. & Pace, N.R. (1986). Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 337-365.
- Oste, C. (1989). Optimization of magnesium concentration in the PCR reaction. *Amplifications* **1**: 10-11.
- Pääbo, S. (1989). Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **86**: 1939-1943.
- Pääbo, S., Gifford, J.A. & Wilson, A.C. (1988). Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9775-9787.
- Paithankar, K.R. & Prasad, K.S.N. (1991). Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucl. Acids Res.* **19**: 1346.
- Palm, M.E., Gams, W. & Nirenberg, H.I. (1995). *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. *Mycologia* **87**(3): 397-406.
- Pammi, S., Schertz, K., Xu, G., Hart, G. & Mullet, J.E. (1994). Random-amplified-polymorphic DNA markers in *Sorghum*. *Theor. Appl. Genet.* **89**(1): 80-88.
- Pascoe, I.G., Nancarrow, R.J. & Copes, C.J. (1984). *Fusarium tabacinum* on tomato and other hosts in Australia. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **82**: 343-345.
- Paternotte, S.J. (1987). Pathogenicity of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 to courgette. *Neth. J. Plant Pathol.* **93**(6): 245-252.
- Patil, P.L. (1972). Root exudates of virus infected white lupine plants and their effects on growth of *Fusarium solani* f. sp. *lupini*. *Res. J. Mahatma Phule Agric. Univ.* **3**(2): 131-135.
- Patil, P.L. (1973). Increased susceptibility to root and stem rot in virus infected white lupine (*Lupinus albus* L.). *Maharashtra Vidnyan Mandir Patrika* **8**(2): 24-31.
- Peng, A., Yang, C., Rui, H. & Li, H. (1992). Study on the pathogenic factors of Kashin-Beck disease. *J. Toxicol. Environm. Health* **35**(2): 79-90.
- Pepeljnjak, S., Ueno, Y. & Tanaka, T. (1992). Mycological situation and occurrence of fusariotoxins in cereals from endemic nephropathy region in Croatia. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* **10**(2): 191-197.
- Perring, T.M., Cooper, A.D., Rodriguez, R.J., Farrar, C.A. & Bellows, T.S., Jr. (1993). Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* **259**: 74-77.
- Petrie, G.A. (1986). Yield losses in Saskatchewan rapeseed/canola crops from basal stem cankers of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) in 1982, with notes on other diseases. *Can. Plant Dis. Surv.* **65**(2): 43-46.
- Petruska, J., Goodman, M.F., Boosalis, M.S., Sowers, L.C., Chaejoon, C. & Tinoco, I. (1988). Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**: 6252-6256.

- Pipe, N.D., Buck, K.W. & Brasier, C.M. (1995). Molecular relationships between *Ophiostoma ulmi* and the NAN and EAN races of *O. novo-ulmi* determined by RAPD markers. *Mycol. Res.* **99**(6): 653-658.
- Pitt, J.I. (1981). Food spoilage and biodeterioration. In: Cole, G.T. & B., K. (eds.): *Biology of conidial fungi*. Academic Press Inc.: London, New York; 111-142.
- Plummer, K.M., Dunse, K. & Howlett, B.J. (1994). Non-aggressive strains of the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, are present in Australia and can be distinguished from aggressive strains by molecular analysis. *Aust. J. Bot.* **42**: 1-8.
- Poulsen, D.M.E., Henry, R.J., Johnston, R.P., Irwin, J.A.G. & Rees, R.G. (1995). The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* **91**(2): 270-273.
- Prasad, N. (1949). Variability of the cucurbit root rot fungus, *Fusarium (Hyphomyces) solani* f. sp. *cucurbitae*. *Phytopathology* **39**: 133-141.
- Prince, J.P., Davis, R.E., Wolf, T.K., Lee, I.M., Mogen, B.D., Dally, E.L., Bertaccini, A., Credi, R. & Barba, M. (1993). Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with Grapevine Yellow and their classification with Aster Yellow, X-Disease, and Elm Yellow MLOs. *Phytopathology* **83**: 1130-1137.
- Procunier, J.D., Townley-Smith, T.F., Fox, S., Prashar, S., Gray, M., Kim, W.K., Czarnecki, E. & Dyck, P.L. (1995). PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes Lr29 and Lr25 in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Genetics & Breeding* **49**(1): 87-91.
- Puhalla, J.E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* **63**(2): 179-183.
- Puterka, G.J., Black, W.C.V., Szeiner, W.M. & Burton, R.L. (1993). Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of Russian wheat aphid. *Heredity* **70**: 604-618.
- Quiros, C.F., Hu, J., This, P., Chevre, A.M. & Delseny, M. (1991). Development and chromosomal localization of genome specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* **82**: 627-632.
- Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1993). Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* **9**: 275-280.
- Rafalski, J.A., Tingey, S.V. & Williams, J.G.K. (1991). RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News Inf.* **3**: 645-648.
- Ragazzi, A., Mugnai, L., Moricca, S., Vagniluca, S. & Dellavalle, I. (1993). Requirements and biological aspects of *Fusarium eumartii* and its possible role in oak decline in North-eastern Italian oak forests. *Eur. J. Forest Pathol.* **23**(3): 171-177.
- Raillo, A. (1950). *Griby roda Fusarium*. State Publ. Gos. izd-voselk-hoz. lit-ry: Moskva; 415 p.
- Ralph, D., McClelland, M., Welsh, J., Baranton, G. & Perolat, P. (1993). *Leptosira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. *J. Bacteriol.* **175**: 973-981.
- Rataj-Guranowska, M., Paszewski, A., Walkowiak, I., Schmid, M. & Nanda, I. (1991). *Fusarium oxysporum* forms heterokaryons with *Fusarium redolens*. *J. Phytopathol.* **132**: 294-302.
- Rataj-Guranowska, M., Wiatroszak, I. & Hornok, L. (1984). Serological comparison of two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini*. *J. Phytopathol.* **110**: 221-225.
- Rataj-Guranowska, M. & Wolko, B. (1991). Comparison of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium oxysporum* var. *redolens* by analyzing the isoenzyme and serological patterns. *J. Phytopathol.* **132**: 287-293.
- Reddy, M.N. & Stahmann, M.A. (1972). Isozyme patterns of *Fusarium* species and their significance in taxonomy. *J. Phytopathol.* **74**: 115-125.
- Rehner, S.A. & Samuels, G.J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* **98**: 625-634.
- Reichle, R.E., Snyder, W.C. & Matuo, T. (1964). *Hyphomyces* stage of *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Nature* **203**: 664-665.
- Reshetnykov, S.V., Merezko, T.O., Rusiyeshvili, V.M. & Shanidze, D.V. (1988). Current methods of studying micromycetes biodestructors. *Ukrains'Ky Botanicnyi Zhurnal* **45**(2): 91-96.
- Reynolds, D.R. & Taylor, J.W. (1991). DNA specimens and the 'International code of botanical nomenclature'. *Taxon* **40**(5): 311-315.
- Riedy, M.F., Hamilton, W.J. & Aquadro, C.F. (1992). Excess of non-parental bands in offspring from known pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucl. Acids Res.* **20**: 918.
- Rogers, S.O. & Bendich, A.J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* **5**: 69-76.
- Rohlf, F.J. (1992). NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 1.7. Applied Biostatistics, Inc.: Setauket, New York.

- Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U. & Weber-Rolfs, I. (1992). PCR: Clinical diagnostics and research. Springer: Berlin, Heidelberg, New York; 271 p. + 96 p.
- Rollo, F. (1990). Highly sensitive and fast detection of *Phoma tracheiphila* by polymerase chain reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 572-576.
- Rotkiewicz, T., Szarek, J. & Tarkowian, S. (1993). Pathogenic effects of *Fusarium sulphureum*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* and dry rot affected potatoes on the internal organs of rats. *Acta Microbiol. Polonica* **42**: 51-57.
- Russel, J.R., Hosein, F., Johnson, E., Waugh, R. & Powell, W. (1993). Genetic differentiation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. *Mol. Ecol.* **2**: 89-97.
- Ryskov, A.P., Jincharadze, A.G., Prosnjak, M.I., Ivanov, P.L. & Limborska, S.A. (1988). M13 phage DNA as universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. *FEBS Letters* **232**: 388-392.
- Saiki, R.K. (1989). The design and optimization of the PCR. In: Erlich, H.A. (ed.): PCR technology. Stockton Press: New York, London, Tokyo; 8-16.
- Saiki, R.K. (1990). Amplification of genomic DNA. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. et al. (eds.): PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press Inc.: San Diego, California; 13-20.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis of diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sakurai, Y. & Matuo, T. (1959). On the form name and race of *Hypomyces solani* (Rke. et Berth.) Snyder et Hans. which is pathogenic to the mulberry trees. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **24**(4): 219-223.
- Sakurai, Y. & Matuo, T. (1960). Studies on the intraspecific groups in *Fusarium solani* (1). On mating populations and morphologic groups in the species. *Res. Rep. Fac. Textile & Sericulture, Shinshu Univ.* **10**: 21-32.
- Sakurai, Y. & Matuo, T. (1961a). Studies on the intraspecific groups in *Fusarium solani* (2). On the differentiation in utilization of carbon sources among the intraspecific groups. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **26**(3): 118-124.
- Sakurai, Y. & Matuo, T. (1961b). Taxonomy of the causal fungus of trunk-blight of *Xanthoxylum piperitum* and heterothallism in this fungus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **26**: 112-117.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory: New York.
- Savard, L., Hutchinson, J.N.G. & Dowhanick, T.M. (1994). Characterization of different isolated of *Obesumbacterium proteus* using random amplified polymorphic DNA. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**(2): 62-65.
- Savir, H., Henig, E. & Lehrer, N. (1978). Exogenous mycotic infections of the eye and adnexa. *Ann. Ophthalmol.* **10**(8): 1013-1018.
- Scala, F., Cristinzio, G., Marziano, F. & Noviello, C. (1981). Endopolygalacturonase zymograms of *Fusarium* species. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **77**: 587-591.
- Schäfer, C. & Wöstemeyer, J. (1992). Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). *J. Phytopathol.* **136**: 124-136.
- Schiffmann-Nadel, M., Chalutz, E., Waks, J., Lomaniec, E. & Yotte, A.Z. (1987). Increase of *Fusarium* rot in stored citrus fruits. *J. Phytopathol.* **120**(2): 154-157.
- Schilling, A.G. (1994). RAPD-Marker zur Analyse der genetischen Diversität von Isolaten getreidepathogener *Fusarium*-Arten. *Vortr. Pflanzenzüchtung* **28**: 77-79.
- Schippers, B. (1966). Compatibility, sex and distribution of *Fusarium* (*Hypomyces*) *solani*, *F. cucurbitae* (*F. javanicum* var. *ensiforme*), cause of root rot in *Cucurbitaceae*. *Neth. J. Plant Pathol* **72**(3): 207.
- Schippers, B. & Snyder, W.C. (1967). Mating type and sex of *Fusarium solani* f. *cucurbitae* race I in the Netherlands. *Phytopathology* **57**(1967): 328.
- Schmidt, R., Zajkowski, P. & Wink, J. (1995). Toxicity of *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato to brine shrimp. *Mycopathologia* **129**: 173-175.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C. & Seemüller, E. (1993a). Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 519-527.
- Schneider, B., Ahrens, U. & Seemüller, E. (1993b). Classification of MLOs based on restriction site analysis of the 16S rRNA gene. *Phytopathol. Mediter.* **32**: 77.
- Schneider, R. (1958). Untersuchungen über Variabilität und Taxonomie von *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. *J. Phytopathol.* **32**: 95-126.

- Scholte, K., Veenbaas-Rijks, J.W. & Labruyere, R.E. (1985). Potato growing in short rotations and the effect of *Streptomyces* spp., *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium tabacinum* and *Verticillium dahliae* on plant growth and tuber yield. *Potato Res.* 28: 331-348.
- Schönian, G., Meusel, O., Tietz, H.J., Meyer, W., Gräser, Y., Tausch, I., Presber, W. & Mitchel, T.G. (1993). Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. *Mycoses* 36: 171-179.
- Schüler, K., Nirenberg, H.I., Hering, O. & Deml, G. (1993). RAPD-PCR Untersuchungen der an Gerste vorkommenden *Drechslera*-Arten - RAPD PCR investigations of *Drechslera* species occurring on barley. *Jahresb. Biol. Bundesanst. Land- und Forstw.* 135.
- Schwabe, M., Fenz, R., Engels, R., Krämer, J. & Rath, F. (1994). Nachweis von *Fusarium* auf Braugerste mit dem EPS-Latex-Agglutinations-Test. *Monatsschr. Brauwiss.* 47(5): 160-164.
- Seifert, K.A. (1996). *Plectosporium tabacinum*. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 309-311.
- Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, G.M., Lafay, J.F., Brygoo, Y. & Bailey, J.A. (1994). Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Exp. Mycol.* 18: 121-138.
- Shi, Y.L., Loomis, P., Christian, D., Carris, L.M. & Leung, H. (1996). Analysis of the genetic relationships among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. *Phytopathology* 86(3): 311-318.
- Shi, Z. & Leung, H. (1994). Genetic analysis and rapid mapping of a sporulation mutation in *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 113-120.
- Sierotzki, H., Eggenschwiler, M., Boillat, O., McDermott, J.M. & Gessler, C. (1994). Detection of variation in virulence toward susceptible apple cultivars in natural populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 84(10): 1005-1009.
- Simon, C., Franke, A. & Martin, A. (1991). The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In: Hewitt, G.M., B., J.A.W. & W., Y.J.P. (eds.): *Molecular techniques in taxonomy*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York; 329-355.
- Slagg, C.M. (1921). A new seedling disease of tobacco (Abstr.). *Phytopathology* 21: 49.
- Smith, A.G., Bustamante, C.I. & Wood, C. (1993). Disseminated cutaneous and vascular invasion by *Fusarium moniliforme* in a fatal case of lymphocytic leukemia. *Mycopathologia* 122: 15-20.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973). *Numerical taxonomy*. Freeman and Company: San Francisco, CA; 573 p.
- Snyder, W.C. (1938). A *Fusarium* root rot of *Cucurbita* (Abstr.). *Phytopathology* 28: 19.
- Snyder, W.C., Georgopoulos, S.G., Webster, R.K. & Smith, S.N. (1975). Sexuality and genetic behavior in the fungus *Hypomyces (Fusarium) solani* f. sp. *cucurbitae*. *Hilgardia* 43(1975): 161-185.
- Snyder, W.C. & Hansen, H.N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27: 64-67.
- Snyder, W.C. & Hansen, H.N. (1941). The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *Am. J. Bot.* 28: 738-742.
- Snyder, W.C. & Smith, S.N. (1981). Current status. In: Mace, M.E., Bell, A.A. & Beckmann, C.H. (eds.): *Fungal wilt disease of plants*. Academic Press Inc.: London, New York; 25-50.
- Snyder, W.C. & Toussoun, T.A. (1965). Current status of taxonomy in *Fusarium* species and their perfect stages. *Phytopathology* 55: 833-837.
- Sokal, R.R. & Michener, C.D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38: 1409-1438.
- Soran, H. & Oezel, M. (1985). Light and electron microscopic examinations on roots of melon (*Cucumis melo*) infected with *Fusarium* spp. *J. Turk. Phytopathol.* 14: 103.
- Spatafora, J.W. & Blackwell, M. (1994). The polyphyletic origins of ophiostomatoid fungi. *Mycol. Res.* 98: 1-9.
- Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E. & Mills, P.R. (1992). DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 265-281.
- Stammers, M., Harris, J., Evans, G.M., Hayward, M.D. & Forster, J.W. (1995). Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex. *Heredity* 74(Part 1): 19-27.
- Steffan, R.J. & Atlas, R.M. (1991). Polymerase chain reaction: Applications in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 137-161.
- Steindel, M., Dias Neto, E., Pinto, C.J.C., Grisard, E.C., Menezes, C.L.P., Murta, S.M.F., Simpson, A.J.G. & Romanha, A.J. (1994). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J. Eukaryotic Microbiol.* 41: 261-267.
- Sweeney, P.M. & Danneberger, T.K. (1994). Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass - A comparison of bulk samples vs. individuals. *Hortscience* 29(6): 624-626.
- Szecs, A. (1981). Kinetic complexity and repetitiveness of *Fusarium graminearum* nuclear DNA. *Exp. Mycol.* 5: 323-329.

- Szecsí, A. & Dobrovolszky, A. (1985a). Genetic distance in fungus genus *Fusarium* measured by comparative computer analysis of DNA thermal denaturation profiles. *Mycopathologia* **91**: 95-100.
- Szecsí, A. & Dobrovolszky, A. (1985b). Phylogenetic relationships among *Fusarium* species measured by DNA reassociation. *Mycopathologia* **91**: 89-94.
- Szecsí, Á., Turóczy, G. & Bordás, B. (1995). Analysis of esterase zymograms of *Fusarium sambucinum* and related species. *Mycopathologia* **129**: 165-171.
- Takemori, N., Shinoda, K. & Kadotani, N. (1994). RAPD markers for confirmation of somatic hybrids in the dihaploid breeding of potato (*Solanum tuberosum* L). *Plant Cell Rep.* **13**: 367-371.
- Taylor, J.W. (1986). Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. *Exp. Mycol.* **10**: 259-269.
- Taylor, J.W. & Natvig, D.O. (1989). Mitochondrial DNA and evolution of heterothallic and pseudo-homothallic *Neurospora* species. *Mycol. Res.* **93**: 257-272.
- Terachi, T. (1993). The progress of DNA analyzing techniques and its impact on plant molecular systematics. *J. Plant Res.* **106**: 75-79.
- Tham, F.Y., Lucas, J.A. & Wilson, Z.A. (1994). DNA fingerprinting of *Peronospora parasitica*, a biotrophic fungal pathogen of crucifers. *Theor. Appl. Genet.* **88**(3-4): 490-496.
- Thein, S.L. & Wallace, R.B. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: Davies, K.E. (ed.): *Human genetic diseases: a practical approach*. IRL Press: Herndon, Virginia; 33-50.
- Thormann, C.E., Ferreira, M.E., Camargo, L.E.A., Tivang, J.G. & Osborn, T.C. (1994). Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* **88**(8): 973-980.
- Thrane, U. (1986). Detection of toxigenic *Fusarium* isolates by thin layer chromatography. *Lett. Appl. Microbiol.* **3**(5): 93-96.
- Thrane, U. (1989). *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites. In: Chelkowski, J. (ed.): *Fusarium: Mycotoxin, taxonomy, and pathogenicity Topics in Secondary Metabolism - Volume 2*. Elsevier: Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo; 199-225.
- Thrane, U. & Hansen, U. (1995). Chemical and physiological characterization of taxa in the *Fusarium sambucinum* complex. *Mycopathologia* **129**: 183-190.
- Tingey, S.V., Rafalski, J.A. & Williams, J.G.K. (1992). Genetic analysis with RAPD markers. In: Symposium on application of RAPD technology to plant breeding, 01.11.1992 Minneapolis, MN, USA; 3-8.
- Tommerup, I.C., Barton, J.E. & O'Brien, P.A. (1995). Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. *Mycol. Res.* **99**(2): 179-186.
- Toussour, T.A. & Snyder, W.C. (1961). The pathogenicity, distribution, and control of two races of *Fusarium* (*Hyponyces*) *solani* f. *cucurbitae*. *Phytopathology* **51**: 17-22.
- Tsuchiya, Y., Kano, Y. & Koshino, S. (1994). Identification of lactic acid bacteria using temperature gradient gel electrophoresis for DNA fragments amplified by polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**(3): 95-99.
- Vaerenbergh, B.v., Grootaert, B. & Moens, W. (1995). Validation of a method for the preparation of fungal genomic DNA for polymerase chain reaction (PCR) and random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *J. Mycologie Medicale* **5**(3): 133-139.
- Vagujfalvi, A. & Szecsí, A.M. (1993). Differentiation of *Fusarium moniliforme* and related *Fusarium* species by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Növényvédelem* **29**(12): 548-553.
- van Beyma thoe Kingma, F.H. (1933). Beschreibung einiger Pilzarten aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures II. *Zentbl. Bakt. ParasitKde. Abt. II* **89**: 236-243.
- Van Buren, R., Harper, K.T., Andersen, W.R., Stanton, D.J., Seyoum, S. & England, J.L. (1994). Evaluating the relationship of autumn buttercup (*Ranunculus acrifolius* var. *aestivalis*) to some close congeners using random amplified polymorphic DNA. *Am. J. Bot.* **81**: 514-519.
- van der Vlugt-Bergmanns, C.J.B., Brandwagt, B.F., van't Klooster, J.W., Wagemakers, C.A.M. & van Kan, J.A.L. (1993). Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* **97**: 1193-1200.
- van Eek, T. (1937). Wortelrot van *Viola tricolor* L. max. hort. Diss. Univ. Amsterdam; 83 p.
- Van Etten, H.D. & Kistler, H.C. (1988). *Nectria haematococca*, mating populations I and VI. In: Sidhu, G.S. (ed.): *Advances in Plant Pathology - Genetics of plant pathogenic fungi*. Academic Press Inc.: London, New York; 189-206.
- Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Verschraegen, G., De Vos, P. & Claeys, G. (1994). Identification of *Acinetobacter* genospecies with amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA). In: 94th General Meeting of the American Society for Microbiology. Las Vegas, Nevada, USA, May 23-27, 1994: Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology; 564.

- Vaneechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paeppe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G. & Kersters, K. (1992). Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* **93**(3): 227-233.
- Vaneechoutte, M., Verschraegen, G., Claeys, G., Elaichouni, A., Portaels, F. & De Beenhouwer, H. (1993). Identification of mycobacteria with amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA). 13th IWGMT (International working group on mycobacterial taxonomy) conference: Integration of traditional and modern methods in the control of leprosy and in the study of mycobacterial taxonomy, Antwerp, Belgium, December 16-19, 1992. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale* **73** (Suppl. 1): 66.
- VanEtten, H.D. & Stein, J.I. (1978). Differential response of *Fusarium solani* isolates to pisatin and phaseolin. *Phytopathology* **68**(9): 1276-1283.
- Vassilev, N., Baca, M.T. & Vassileva, M. (1994). Plant lignocellulose and decomposition by fungi: From nature to industrial use. *Mycologist* **8**(3): 113-114.
- Vilich-Meller, V. (1992). *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia cerealis* stem rot in pure stands and interspecific mixtures of cereals. *Crop Protection* **11**: 45-50.
- Voigt, K., Schleier, S. & Bruckner, B. (1995). Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* **27**(6): 528-535.
- Vrany, J., Rasochova, M., Dobias, J. & Horackova, V. (1989). *Fusarium* on surface of tubers of selected potato varieties. *Zentbl. Mikrobiol.* **144**(6): 399-404.
- Waalwijk, C. & Baayen, R.P. (1995). Identification of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* by DNA fingerprinting and vegetative compatibility. *EPPO Bull.* **25**(1-2): 117-124.
- Walsh, T.J. & Pizzo, P.A. (1989). Fungal infections in granulocytopenic patients: Current approaches to classification, diagnosis, and treatment. In: Holmberg, K. & Meyer, R.D. (eds.): *Diagnosis and therapy of systemic fungal infections*. Conference June 1988, Stockholm, Sweden. Raven Press: New York, USA; 47-40.
- Ward, E., Adams, M.J., Mutasa, E.S., Collier, C.R. & Asher, M.J.C. (1994). Characterization of *Polymyxa* species by restriction analysis of PCR-amplified ribosomal DNA. *Plant Pathol.* **43**(5): 872-877.
- Ward, E. & Akrofi, A.Y. (1994). Identification of fungi in the *Gaeumannomyces - Phialophora* complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycol. Res.* **98**: 219-224.
- Warnock, D.W. (1993). Emerging fungal pathogens. *PHLS Microbiol. Digest* **10**(3): 163-167.
- Wasfy, E.H., Bridge, P.D. & Brayford, D. (1987). Preliminary studies on the use of biochemical and physiological tests for the characterization of *Fusarium* isolates. *Mycopathologia* **99**(1): 9-13.
- Watanabe, K., Kawazu, T. & Doi, Y. (1992). Research in market diseases of fruits and vegetables. *Bull. Faculty Agric. Tamagawa University* (32): 83-94.
- Watson, R. (1989). The formation of primer artifacts in polymerase chain reactions. *Amplifications* **2**: 5-6.
- Waugh, R. & Powell, W. (1992). Using RAPD markers for crop improvement. *Trends Biotechnol.* **10**: 186-191.
- Weeden, N.F., Timmermann, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E. & Lodhi, M.A. (1992). Inheritance and reliability of RAPD markers. In: *Symposium on application of RAPD technology to plant breeding*. Minneapolis, MN 01.11.1992. Minneapolis, MN, USA; 12-17.
- Weimer, J.L. (1944). Some root rots of a foot rot of lupines in the southeastern part of the United States. *J. Agric. Res.* **68**: 441-457.
- Weising, K., Weigand, F., Driesel, A.J., Kahl, G., Zischler, H. & Epplen, J.T. (1989). Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. *Nucl. Acids Res.* **17**: 10128.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* **18**: 7213-7218.
- Welsh, J., Petersen, C. & McClelland, M. (1991). Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: Application to strain identification and genetic mapping. *Nucl. Acids Res.* **19**: 303-306.
- Wenger, R.H. & Nielsen, P.J. (1991). Reannealing of artificial heteroduplexes generated during PCR-mediated genetic isotyping. *Trends Genet.* **6**: 178.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. et al. (eds.): *PCR Protocols*. Academic Press Inc.: San Diego, New York, Boston; 315-322.
- Whitehead, D.S., Coddington, A. & Lewis, B.G. (1992). Classification of races by DNA polymorphism analysis and vegetative compatibility grouping in *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **41**: 295-305.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* **218**: 704-740.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1991). Genetic analysis with RAPD markers. In: Bennett, J.W. & Lasure, L.L. (eds.): *More gene manipulation in fungi*. Academic Press Inc.: San Diego, CA, USA; 431-439.
- Woo, S.L., Zoina, A., Del Sorbo, G., Lorito, M., Nanni, B., Scala, F. & Noviello, C. (1996). Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* **86** (9): 966-973.
- Wolff, K. & Peters-van Rijn, J. (1993). Rapid detection of genetic variability in *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* **71**: 335-341.
- Wollenweber, H.W. (1943). *Fusarium*-Monographie. II. Fungi parasitici et saprophytici. *Zentbl. Bakt. ParasitKde. Abt. II* **106**: 104-135, 171-202.
- Wollenweber, H.W. & Reinking, O.A. (1935). *Die Fusarien, Ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Paul Parey: Berlin; 355 p.
- Wöstemeyer, J., Schäfer, C., Kellner, M. & Weisfeld, M. (1991). DNA polymorphisms detected by random primer dependent PCR as a powerful tool for molecular diagnostics of plant pathogenic fungi. In: *Advances in Molecular Genetics*. Hüthig-Verlag: Heidelberg; 227-240.
- Wright, G.F.K., Guest, D.I., Wimalajeewa, D.L.S. & Vanheeswijck, R. (1996). Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**(5): 451-457.
- Wyss, P. (1996). The use of RAPD for isolate identification of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Clapp, J.P. (ed.): *Methods in Molecular Biology*, Vol. 50. *Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods*. Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, USA; 199-207.
- Xiao, Y.G. (1988). Determination of esterase isoenzymes of the pathogen of tung root rot. *Forest Pest Dis.* **3**: 15-17.
- Yamamoto, W. (1961). *Nectria elegans* Yamamoto et Maeda causing the trunk blight of *Xanthoxylum piperitum* in comparison with *Hypomyces solani* Reike et Berthold. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **26**: 206-210.
- Yli-Mattila, T., Paavainen, S., Hannukkala, A., Parikka, P., Tahvonen, R. & Karjalainen, R. (1996). Isozyme and RAPD-PCR analyses of *Fusarium avenaceum* strains from Finland. *Plant Pathol.* **45**(1): 126-134.
- Yoon, C.S. (1992). Examination of parameters affecting polymerase chain reaction in studying RAPD. *Kor. J. Mycol.* **20**(4): 315-323.
- Yoon, C.S., Glawe, D.A. & Shaw, P.D. (1991). A method for rapid small-scale preparation of fungal DNA. *Mycologia* **83**: 835-838.
- Yoshizawa, T., Yamashita, A. & Luo, Y. (1994). Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1626-1629.
- Young, K.A., Power, E.G.M., Dryden, M.S. & Phillips, I. (1994). RAPD typing of clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**: 86-89.
- Yu, K. & Pauls, K.P. (1992). Optimizing for the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acids Res.* **20**: 2606.
- Yu, T.F. & Fang, C.T. (1948). *Fusarium* diseases of broad bean. III. Root-rot and wilt of broad beans caused by two new forms of *Fusarium*. *Phytopathology* **38**: 587-594.
- Zarzycka, H. (1984). Fuzariozy ziemniaków w okresie wegetacji (*Fusarium* diseases of potato in the growing period). *Acta Mycol.* **20**(1): 3-12.
- Zizzerini, A. & Tosi, L. (1987). New sunflower disease caused by *Fusarium tabacinum*. *Plant Dis.* **71**: 1043-1044.
- Zhu, H., Qu, F. & Zhu, L.H. (1993). Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucl. Acids Res.* **21**: 5279-5280.
- Zilberstein, A., Pnini-Cohen, S., Eyal, Z., Shuster, S., Hillel, J. & Lavi, U. (1993). Application of DNA fingerprinting for detecting genetical variation among isolates of the wheat pathogen *Mycosphaella graminicola*. In: Chet, I. (ed.): *Biotechnology in plant disease control*. Wiley-Liss, Inc.; 341-353.
- Zimand, G., Valinsky, L., Elad, Y., Chet, I. & Manulis, S. (1994). Use of the RAPD technique procedure for identification of *Trichoderma* strains. *Mycol. Res.* **98**(5): 531-534.

8 SACHREGISTER

A

- AFLP · 12
 Primer · 29
 amplification fragment length polymorphism · siehe
 AFLP
 amplified ribosomal DNA restriction analysis ·
 siehe ARDRA
 Annealing · 66
 -temperatur · 29, 31, 32, 66
 -zeit · 67
 AP-PCR · 12
 arbitrary primed PCR · siehe AP-PCR
 ARDRA · 13

B

- Banden
 Amplifikationsgröße · 67
 -anzahl · 66, 68
 Artefakte · 69
 bei Nullproben · 69
 bevorzugte Amplifikation von · 71
 comigrierend · 71
 inkonsistente · 70
 Intensität von · 70
 Laufweite · 71
 schmierende · 65
 schwache · 65, 70
 template unabhängige · 69
 Validierung · 71
 variable · 70

C

- Cephalosporium tabacinum* · siehe *Fusarium tabacinum*
 Clusteranalyse · 36, 37, 40, 45, 49, 53, 54, 72, 94

D

- DAF · 12
 Desoxynukleotide · Siehe dNTP
Discolor · siehe *Fusarium* Sektion *Discolor*
 DNA
 Amplifikation · 11
 Denaturierung · 11, 32
 Extension · 11, 32, 67
 Extraktion · 26, 62, 67
 Konzentration · 63
 mitochondrial · 81
 ribosomale · 10, 13
 DNA amplification fingerprinting · siehe DAF
 dNTP
 Konzentration · 65

E

- Elegans* · siehe *Fusarium* Sektion *Elegans*
 Elektrophorese · 34, 35, 36, 71
Eupionnotes · siehe *Fusarium* Sektion *Eupionnotes*
 Extensionstemperatur · 67

F

- forma specialis · siehe spezialisierte Formen
Fusarium

- acutatum* · 23, 48, 49
ambrosium · 23, 54-56, 84, 89
bactridioides · 15, 16, 20, 41, 43, 73, 74
bugnicourtii · siehe *Fusarium ambrosium*
carneolum · 23, 54, 55, 57, 60, 83, 84, 89
causaticum · 18, 23, 84
cerealis · 20, 29, 41, 43, 74, 92, 98, 103
coeruleum · 18, 21, 23, 46, 54, 55, 59, 61, 76, 82, 85,
 89, 96
compactum · 21, 41, 43
culmorum · 15, 20, 29, 41, 43, 74, 92, 98, 103
elegans · 91
ensifforme · 23, 54-56, 60, 83, 85, 89, 97
epimyces · 23, 54, 55, 57, 61, 85, 89, 92
eumartii · 18, 23, 54, 55, 59, 60, 82, 83, 86, 88, 92-94,
 97, 103
flocciferum · 21, 41, 43, 74
graninearum · 29, 74, 92, 98, 103
illudens · 18, 21, 23, 46, 54, 55, 59, 61, 86, 87, 94, 97
javanicum · 18, 24, 54, 55, 58, 60, 85, 87-90
javanicum var. *radicicola* · 88, 92, 94
lateritium · 21, 41, 43, 76, 77
lathyri · 24, 54-56, 81-83, 85, 87, 89-91, 95, 99
martii · 24, 54, 55, 59, 61, 82, 88, 91, 95, 96,
 104
merismoides · 16, 17, 46, 54, 76, 85
merismoides var. *chlamydosporale* · 21, 46
oxysporum · 18, 77, 80
oxysporum f. sp. *aechmeae* · 22, 48, 49
oxysporum f. sp. *batatas* · 22, 48, 49, 76
oxysporum f. sp. *betae* · 22, 48, 49, 76
oxysporum f. sp. *callistephi* · 22, 48, 49
oxysporum f. sp. *cattleyae* · 22, 48, 49
oxysporum f. sp. *cepa* · 22, 48, 49
oxysporum f. sp. *chrysanthemi* · 22, 48, 49
oxysporum f. sp. *conglutinans* · 22, 48, 49, 76, 81
oxysporum f. sp. *cubense* · 22, 48, 49, 76, 80
oxysporum f. sp. *cucumerinum* · 22, 48, 49
oxysporum f. sp. *cyclaminis* · 22
oxysporum f. sp. *cyclaminis* · 48, 49
oxysporum f. sp. *dianthi* · 17, 18, 23, 48, 49, 51, 76-
 78, 81
oxysporum f. sp. *gladioli* · 22, 48, 49, 76
oxysporum f. sp. *lupini* · 22, 48, 49, 77
oxysporum f. sp. *lycopersici* · 22, 48, 49, 76, 81

Fusarium

- oxysporum* f. sp. *matthioli* · 81
oxysporum f. sp. *melonis* · 22, 48, 49, 76
oxysporum f. sp. *opuntiarum* · 22, 48, 49
oxysporum f. sp. *passiflorae* · 22, 48, 49
oxysporum f. sp. *pisi* · 19, 22, 48, 49, 76, 80, 88
oxysporum f. sp. *raphani* · 81
oxysporum f. sp. *tracheiphilum* · 22, 48, 49, 76
oxysporum f. sp. *tuberosi* · 22, 48, 49, 76
oxysporum f. sp. *tulipae* · 22, 48, 49
oxysporum f. sp. *vasinfectum* · 17, 22, 48, 49, 51, 76
 Rasse 1 · 21, 22, 46, 51, 79, 81
 Rasse 2 · 22, 51, 79, 81
 Rasse 3 · 22, 51, 80, 81
 Rasse 4 · 22, 78, 79, 81
 Rasse 5 · 22, 51, 80
 Rasse 6 · 22, 51, 79, 81
 Rasse 7 · 79
 Rasse 8 · 79
oxysporum f. *udum* · 17
pestis · 24, 54, 55, 59, 60, 86, 88, 93, 97, 103, 104
radicicola · 58, 89
redolens · 17, 18, 23, 49, 50, 51, 76, 77, 95, 96
redolens f. sp. *dianthi* · 17, 18, 23, 49, 51, 77, 78
sambucinum · 14-16, 20, 21, 40, 41, 43, 46, 70, 72-74, 96, 98, 101, 104
sambucinum var. *coeruleum* · 15
sambucinum var. *niinus* · 14, 15
sambucinum var. *sambucinum* · 15
sarcocotrourm · 15, 16, 21, 41, 43, 73, 74
 Sektion
Discolor · 39, 40-42, 74, 99
Elegans · 17, 22, 48, 91
Eupionnotes · 16, 17, 21, 76
Lateritium · 17, 76, 77
Martella · 18, 19, 23, 52-61, 76, 81-95, 97, 98, 101, 102
semitectum · 41, 73, 74
semitectum var. *semitectum* · 20, 41, 73
solani · 18, 52
solani f. sp. *albizziae* · 95
solani f. sp. *aleuritidis* · 95
solani f. sp. *aurantifoliae* · 95
solani f. sp. *batatas* · 24, 54, 55, 61, 81, 86, 90, 91, 103
solani f. sp. *cucurbitae*
 Rasse 1 · 24, 54, 58, 81, 89, 90
 Rasse 2 · 89 siehe *Fusarium solani* var. *petroliphilum*
solani f. sp. *dahlbergiae* · 95
solani f. sp. *eumartii* · siehe *Fusarium radicicola*
solani f. sp. *fabae* · 95
solani f. sp. *keratitis* · 95
solani f. sp. *lupini* · 95
solani f. sp. *mori* · 24, 54-56, 81, 90, 91, 103
solani f. sp. *otomycosis* · 95
solani f. sp. *petroliphilum*
 Rasse 1 · 96
solani f. sp. *phaseoli* · 19, 87, 88, 95 siehe *Fusarium martiiphaseoli*

Fusarium

- solani* f. sp. *piperis* · 95
solani f. sp. *pisi* · 19, 24, 81, 87, 88, 95
solani f. sp. *radicicola* · siehe *Fusarium radicicola*
 Rasse 2 · 82, 95 siehe *Fusarium lathyri*
solani f. sp. *robiniae* · 24, 54-56, 81, 90, 91, 103
solani f. sp. *viridiflavum* · 95
solani f. sp. *xanthoxyli* · 25, 54-56, 81, 90, 91, 103
solani var. *batatas* · 56
solani var. *coeruleum* · 18, 82 siehe *Fusarium coeruleum*
solani var. *martii* · 85 siehe *Fusarium epimyces*
solani var. *martii* forma 1 · siehe *Fusarium pestis*
solani var. *martii* forma 2 · 87 siehe *Fusarium lathyri*
solani var. *martii* forma 3 · 88 siehe *Fusarium martiiphaseoli*
solani var. *minus* · 84 siehe *Fusarium carneolum*
solani var. *petroliphilum* · 24, 54, 55, 58, 60, 81, 82, 89, 90, 96, 103
solani var. *solani* · 21, 24, 46, 55, 57, 60, 82-86, 89, 101
striatum · 25, 54, 55, 58, 60, 86, 87, 89, 92, 103
sulphureum · 15
tabacinum · 16, 21, 44-47, 75
torulosum · 15, 20, 21, 41, 43, 46, 72-74, 98, 104
trichothecioides · 15
tumidum var. *coeruleum* · siehe *Fusarium ambrosium*
udum · 17, 18, 23, 48-51, 76, 77
venenatum · 15, 20, 40, 41, 43, 72-74, 96, 98, 104

G

- Gibberella pulicaris* · 20, 40, 43, 72

I

- Inosin · 71
 Intensitätspolymorphism · 43, 51, 70
 Internal Transcribed Spacer · siehe ITS
 ITS · 14
 ITS 1 · 14
 ITS 2 · 14
 ITS-RFLP · 14
 Reaktionsbedingungen · 37
 Reaktionsprinzip · 14

K

- Kontaminationen · 67

L

- Lateritium* · siehe *Fusarium* Sektion *Lateritium*

M

Magnesium

Konzentration · 63, 65, 71

Martiella · siehe *Fusarium* Sektion *Martiella*

Mastermix · 31, 33

Mykotoxin · 14, 16

N*Nectria**bolbophylli* · 25, 55, 57, 89, 93*borneensis* · 25, 54, 55, 59, 61, 94, 104*cancri* · 24, 87, 96, 104*haematococca* · 25, 54, 55, 60, 61, 86, 89, 92, 94*ipomoeae* · 25, 92*ipomoeae* forma 1 · 93*plagianthi* · 25, 54, 55, 59, 61, 94*subsequens* · 25, 54, 55, 59, 61, 93, 94, 103

P

PCR

arbitrary primed · siehe AP-PCR

universally primed · siehe UP-PCR

PCR

Fingerprinting · 12

Produktausbeute · 67

Reaktionsbedingungen · 11

Reaktionsprinzip · 10

Pipettierfehler · 63, 70

Plateau-effekt · 67

Plectosphaerella cucumerina · 16, 21*Plectosporium tabacinum* · 16, 19, 75, 76 siehe auch*Fusarium tabacinum*

Polymerase · 30

-aktivität · 67

Kontaminationen · 69

Konzentration · 31, 63, 64

-Puffer · 30, 31

Polymeraseaktivität · 65, 67

Polymerase-Kettenreaktion · siehe PCR

Primer · 65

Annealing · 11, 32, 65

Anzahl · 69

-bindung · 12, 68, 70, 71

GC-Gehalt · 29, 68

-klassen · 69, 83

Konzentration · 63, 65

-länge · 68

-mismatch · 71

Sequenz · 11, 29

R

random amplified polymorphic DNA · siehe RAPD

RAPD

Durchführung · 30

Marker · 12

Primer · 29

Reaktionsansatz · 31

Reaktionsbedingungen · 31, 63-65, 67, 70, 71

Reaktionsprinzip · 11

Rassen

Definition · 8, 9, 79, 80

rDNA

28S · 75

5,8S · 14, 39

large subunit · 14

small subunit · 14

Reproduzierbarkeit · 37, 38, 63

RNA

mitochondriale · 13

ribosomale · 13

S

spezialisierte Formen

Definition · 8, 81

T

Thermocycler · 30, 31, 35, 38, 65, 66, 70

Einfluß auf PCR · 70

Programmierung · 32

U

universally primed PCR · siehe UP-PCR

UP-PCR · 12

Z

Zyklenzahl · 63, 67