

Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Quantifizierung**  
**der DNA von *Verticillium dahliae* in planta**  
**mittels kompetitiver PCR und HPLC**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaften  
am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von  
Ioannis Aspromoukos aus Athen

Giessen 2002

***stouV gms\$V nou***

1	Einleitung.....	1
2	Material und Methoden.....	3
2.1	Material.....	3
2.1.1	Pilze.....	3
2.1.2	Pflanzen.....	4
2.1.3	Reagenzien.....	5
2.1.4	Puffer.....	6
2.2	Methoden.....	7
2.2.1	Inokulation.....	7
2.2.2	Probenvorbereitung zur DNA-Isolierung.....	8
2.2.3	Bestimmung der DNA.....	8
2.2.4	PCR.....	9
2.2.5	HPLC.....	10
3	Ergebnisse.....	11
3.1	PCR.....	11
3.1.1	Primer.....	11
3.1.1.1	Auswahl.....	11
3.1.1.2	Spezifität.....	13
3.1.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	15
3.1.2.1	Konzentration von MgCl <sub>2</sub> .....	15
3.1.2.2	Menge der Taq-Polymerase.....	16
3.1.2.3	Annealingtemperatur.....	16
3.1.2	Entwicklung eines internen Standards (IS).....	18
3.1.3.1	Transformation.....	18
3.1.3.2	<i>Fusarium oxysporum</i> .....	19
3.1.3.3	Verkürzte Matrize von <i>V. dahliae</i> -DNA.....	20
3.1.4	Kompetitive Analyse.....	23
3.1.5	Standardprotokoll.....	24
3.2	HPLC.....	25
3.2.1	Analyse der Amplifikate.....	25
3.2.2	Beziehung IS / <i>V. dahliae</i> -DNA.....	27

<b>3.3</b>	<b>Quantifizierung von <i>V. dahliae</i> in Tomatenpflanzen..</b>	<b>32</b>
3.3.1	Probenahme .....	32
3.3.2	Qualitativer Nachweis in Blättern.....	34
3.3.3	Analysensequenz .....	35
3.3.4	Quantifizierung in Wurzeln und Blättern.....	35
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>55</b>

## 1 Einleitung

Um die Entwicklung von Pflanzenkrankheiten besser verfolgen zu können, werden die Wechselbeziehungen zwischen Pathogen-Wirt-Umwelt-Mensch bestimmt und ihre verschiedenenartigen Ausprägungen, wenn möglich, gemessen. Ein wichtiger Parameter einer Krankheit ist die quantitative Bestimmung des Pathogens in einer Wirtspflanze. Dabei stellt sich häufig die Frage nach einer objektiven Auswertung eines Befalls. Im Grunde ist die Verbreitung eines Pathogens in dem Wirtorganismus der entscheidende Faktor des Befalls. Kann er *in planta* quantifiziert werden, dann lässt sich die Krankheitsentwicklung genau verfolgen, gleichzeitig können auch andere Faktoren wie z.B. Wirt-Pathogen-Beziehungen oder die Auswirkung von Umweltfaktoren besser beschrieben werden. Eine solche Auswertung ist nicht nur nützlich für die Erforschung der Pathogenese sondern auch für die Resistenzzüchtung, die Epidemiologie, die Krankheitsbekämpfung und die Quarantäneinspektion von Saatgut oder anderem pflanzlichen Material. Bei Krankheiten mit ausgeprägter Latenzzeit oder bei Tracheomykosen ist eine Bestimmung der Biomasse der Erreger in der Pflanze von besonderer Bedeutung für eine sichere Diagnose.

Einer der wichtigsten Welkeerreger an über 300 Kulturpflanzen und Wildkräutern ist *Verticillium dahliae* Kleb. Außer Tomaten, anderen Solanaceen und Cucurbitaceen werden Baumwolle, Hopfen, Klee, Raps, Oliven- und Steinobstbäume von diesem Pilz befallen (ENGELHARD 1957, PEGG 1985, ATKINSON 1971). In vielen ariden Klimagebieten ist dieser Erreger seit langem ein schwerwiegendes Problem. Mittlerweile kommt er aber auch in Gebieten mit feuchtem und kälterem Klima vor wie z.B. in England, Frankreich und Deutschland.

Der Pilz überdauert mit Mikrosklerotien bis zu 15 Jahre im Boden (AGRIOS 1997). Diese keimen bei günstigen Bedingungen, das Myzel wächst zunächst entlang eines Ausscheidungsgradienten hin zu Pflanzenwurzeln. Nach einer Koloniebildung auf Wurzeloberflächen dringt das Myzel entweder direkt durch die Wurzelrinde oder durch Wunden in Pflanzen ein und verbreitet sich akropetal im Xylem. Daneben ist auch eine Verbreitung durch freie Konidien mit dem Xylemtransport in Pflanzenteile möglich, die vom Infektionsort weit entfernt sind ( BISHOP & COOPER 1983, BECKMAN 1987). Die Krankheitsentwicklung hängt eher von der Verbreitung des Pilzes als von anderen Faktoren, wie z.B. einer Wirkung von pilzlichen Toxinen oder hydrolytischen Enzymen, ab (BECKMAN 1987).

Befallene Pflanzen versuchen das Wachstum des Pilzes durch verschiedenartige Abwehrreaktionen im Xylem zu beschränken. Dazu zählen: Deposition von Callose (BECKMAN *et al.* 1982), Gelablagerung (VAN DER MOLEN 1977), Anreicherung von Phenolen und ihrem Derivat Lignin sowie ungesättigten Fettsäuren und ihrem Derivat Suberin (MACE 1963, FRIEND 1976, ROBB *et al.* 1979), Infusion von Phytoalexinen (SATO *et al.* 1968, TJAMOS & SMITH 1974, DE WIT & KODDE 1981, KUÆ 1982). Der Erreger versucht diese Hindernisse zu überwinden. Schafft er es, dann kann er in der befallenen Pflanze weiter vordringen. Von besonderer Bedeutung ist die Bildung von Tylosen (TALBOYS 1958). Dabei handelt es sich um Ausstülpungen von Protoplasten aus den Parenchymzellen des Xylems (ROBB 1987, NEWCOMBE 1989). Ist das Volumen eines Xylems mit Tylosen verschlossen, dann wird ein weiteres Vordringen des Pathogens endgültig verhindert, denn *V. dahliae* kann Tylosen weder mechanisch noch mit Hilfe von extrazellulären Enzymen penetrieren. Infolge des Xylemverschlusses wird aber gleichzeitig auch der Wasser- und Nährstofftransport in die darüber liegenden Pflanzenteile fast vollkommen unterbrochen, es kommt zur Welke. Starke Welkesymptome einzelner Triebe bis zum Absterben der ganze Pflanze sind die Konsequenz der Abwehrreaktionen einer Pflanze gegen den eingedrungenen Pilz (SCHLÖSSER 1997). *V. dahliae* ist, wie alle anderen Welkeerreger mit Pflanzenschutzmitteln nicht direkt bekämpfbar. Daher wird bereits seit längerer Zeit versucht resistente Sorten von Kulturpflanzen zu züchten. Bei der Analyse der Pathogenese von *V. dahliae* im Anschluß an eine Inokulation anfälliger Kulturpflanzen bzw. einer Beurteilung der Resistenz widerstandsfähiger Sorten muß eine sehr geringe Biomasse des Erregers quantifiziert werden. Mit der zu verwendenden Methode muß *V. dahliae* einmal sehr spezifisch nachweisbar sein, zum anderen müssen mit ihr noch sehr geringe Mengen an Pilzmyzel sicher bestimmt werden können. Für diese schwierige Aufgabe scheinen molekularbiologische Methoden besonders geeignet zu sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher ein entsprechendes Verfahren zur Quantifizierung von *V. dahliae* in befallenen Tomatensorten zu entwickeln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pilze

##### Herkunft

Für die Versuche wurden einmal folgende Isolate des Pathotyps 1 von *V.dahliae* aus der Kultursammlung des Phytopathologischen Institutes Benaki verwendet:

Name	Wirtspflanze	Standort	Isolierung
20V	Tomate	Prewesa, Epirus	April 1994
33V	Kartoffel	Arkadien, Peloponnes	Juli 1994
17V	Tomate	Krioneri, Attika	April 1994
19V	Tomate	Krioneri, Attika	April 1994

Außerdem standen aus der Kultursammlung des Pflanzenschutzinstitutes in Heraklion-Kreta 2 Tomatenisolate des Pathotyps 1 und 2 Tomatenisolate des Pathotyps 2 zur Verfügung.

##### Kulturmedien

Flüssigmedium:

Saccharose-Sodium Nitrat (SSN) leicht modifiziert (Mykologielabor, Phytopathologisches Institut Benaki) :

Saccharose	15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
NaNO <sub>3</sub>	2 g
KCl	0,5 g
H <sub>2</sub> O	auf 1000 ml

Dazu 1ml von folgender Spurenelementlösung:

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	249 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	40 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	44 mg

MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	41 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	51 mg
H <sub>2</sub> O	auf 100 ml

Agarmedien :

Kartoffel-Dextrose-Agar ( PDA )

Sud von 200g Kartoffeln

Dextrose	10 g
Agar	17 g
Wasser	auf 1000 ml

Rote Platte

Glucose	10 g
Hefeextrakt	2 g
Agar	17 g
Wasser	auf 1000 ml

Nach dem Autoklavieren:

Streptomycinsulfat	125 mg
Bengalrosa	25 mg

**Anzucht der Pilze**

*Verticillium dahliae* wurde zur Erhaltung auf PDA in Glassröhrchen kultiviert. Zur Myzel- und Konidienproduktion wurden zuerst Petrischalen mit PDA beimpft. Eine Woche später wurden in einen 300ml Erlenmeyerkolben mit 100ml flüssigem Nährmedium, sechs mit einem Korkbohrer (Ø 5mm) ausgestanzte, frisch bewachsene Agarscheiben eingesetzt und auf einem reziproken Schüttler (120 Stöße/ min) bei Raumtemperatur und natürlichem Tag/Nacht- Rhythmus inkubiert. Um genügend Konidien als Inokulum oder Myzelmasse zu produzieren, wurde nach einer Woche die herangewachsene Flüssigkultur mit weiteren 200ml Nährmedium SSN in einen 1L Kolben überführt und unter den gleichen Bedingungen für zwei weitere Wochen gehalten.

**2.1.2 Pflanzen**

**Tomatensorten**

Vorversuche wurden mit den *V. dahliae* resistenten Hybriden Diplom und Ranger (Hild, Marbach am Neckar) und den *V. dahliae* anfälligen Hybriden Hellfrucht (Erfurter

Samenzucht) und Rentita (Hild, Marbach am Neckar) durchgeführt. Hauptveruche sind mit den resistenten Hybriden Primador (Bruinsma Seeds, Asgrow, Bruchsal), Alma und Bonus (Geoponiko Spiti, Athen) und der anfälligen Hybride Planet (Bruinsma Seeds, Asgrow, Bruchsal) durchgeführt.

### **Anzucht der Pflanzen**

Tomatensamen wurden in Topferde in Pikierschalen ausgesät. Nach dem Pikieren wurden die Pflanzen ab dem Einblattstadium im Gewächshaus unter Tageslicht oder mit Zusatzbeleuchtung von 8000 Lux (Philips SON-T 400) im 16/8h Tag/Nacht Rhythmus gehalten.

### **2.1.3 Reagenzien**

#### **Für die DNA-Isolierung**

Cetyltrimethylammoniumbromid kryst. rein (CTAB), (SERVA)

Dodecylsulfat-Na Salz (SDS) kryst. rein, (SERVA)

Natriumchlorid für die Molekularbiologie, (Merck)

Proteinase K für die Molekularbiologie, (Merck)

Ribonuklease A für die Biochemie 70E/mg, (Roth)

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat Rotipuran p.a., (Roth)

Ammoniumacetat für die Molekularbiologie, (Sigma-Aldrich)

Methanol, Mercaptoethanol, Ethanol, Chloroform, Isoamylalcohol, Isopropanol p.a., (Merck).

#### **Für die PCR**

**Taq-Polymerase:** von den Firmen : Appligene-Oncor (Heidelberg), MBI-Fermentas (Vilnius, Litauen) und anschließend AGS (Heidelberg), mit der auch die Hauptversuche durchgeführt wurden.

**Primer:** zuerst wurden die folgenden Primer der Firma Roth bestellt und verwendet:

5' CCG CCG GTC CAT CAG TCT CTC TGT TTA TAC 3', 30 Basen

5' GCG CTG CGG GAC TCC GAT GCG AGC TGT AAC 3', 30 Basen

anschließend wurden die folgenden Primer der Firma Roth bestellt und verwendet:

5' GGT CCA TCA GTC TCT CTG TTT A 3', 22 Basen

5' ACT CCG ATG CGA GCT GTA AC 3', 20 Basen.

Zur Synthese des homologen internen Standards für die kompetitive PCR wurde der folgende *Linker Primer* bei der Firma Roth bestellt und eingesetzt:

5' CGA GCT GTA ACG GGC TCG AGG GTT GAA ACG 3' 30 Basen.

**dNTPs**: DNA Polymerisation Mix der Pharmacia-Biotech (Freiburg): eine Mischung von den Nukleotiden: dATP, dTTP, dGTP und dCTP 20 mM/ je dNTP.

### **Für die horizontale Gel- Elektrophorese der DNA**

Agarose NEEO Ultra-Qualität Roth (Karlsruhe).

### **Für die DNA Extraktion aus Agarosegel**

JETSORB Gel Extraction Kit, Genomed (Bad Oeynhausen).

#### **2.1.4 Puffer**

Zur DNA Isolierung :

##### TES

Tris-HCl	100mM	
EDTA	10mM	
SDS	2%	pH 8,0

##### TE

Tris-HCl	10mM	
EDTA	1mM	pH 7,6

Zur Elektrophorese von PCR Produkten:

##### TAE (50x)

Tris-HCl	242g	
Eisessig 100%	57,1ml	
EDTA 0,5 M pH 8,0	100ml	pH ca. 7,5-7,8

##### TBE (5x)

Tris-HCl	54g	
Borsäure	27,5g	
EDTA 0,5M pH 8,0	20ml	pH ca. 7,5-7,8

Ladungspuffer: ist kein Puffer im Sinne zur pH Regelung. Er hält wegen seiner Ficoll-bedingten Zähflüssigkeit die Proben in den Gelvertiefungen. Über die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylenzanol wrd die Dauer der Elektrophorese kontrolliert.

Bromphenolblau	0.25g
Xylenzanol FF	0.25g

Ficoll 400	15g
H <sub>2</sub> O	80ml

Lösen lassen, evtl. über Nacht im Kühlschrank

EDTA 0.5M	10ml
H <sub>2</sub> O	100ml

PCR-Reaktionspuffer nach Angabe der Appligene-Oncor (Heidelberg)

Tris-HCl	10mM
KCl	50mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM
TritonX100	0.1%
BSA o. gelatin	0.2mg/ml

pH 9.0, 25°C

PCR -Reaktionspuffer nach Angabe der AGS (Heidelberg)

Tris-HCl	20 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 o. 2.0 mM (je nach Bedarf)

pH 8.55, 25°C

HPLC

Puffer A:

NaCl	1M
Tris-HCl	25 mM

pH 9,0

Puffer B:

Tris-HCl	25 mM
----------	-------

pH 9,0

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Inokulation

Zur Vorbereitung von Inokulum als Konidiensuspension wurde die Pilzbiomasse der Flüssigkultur, nachdem sie für drei Sekunden im Waring Blendor zerkleinert worden war, über Baumwollgewebe filtriert. Die gewonnene Suspension wurde zweimal mit

entionisiertem Wasser gewaschen und zentrifugiert (Sorvall RC5, Rotor SS34, Du Pont, Bad Homburg) bei 13.000 Rcf und 4°C für 20 min und auf  $10^7$  Konidien/ml justiert.

Die Tomatenpflanzen wurden im 3.-4. Blattstadium inokuliert. Dazu wurde folgendes Verfahren angewandt:

Die Konidien suspension in einer Flasche wurde während der Inokulation zwecks einer gleichmäßigen Verteilung der Konidien mit einem Magnetrührer bewegt. Zur Inokulation wurden an drei Stellen um jede Pflanze herum jeweils 10 ml Konidien suspension mit einem Dispenser dosiert und über ein Messingröhrchen in den Boden injiziert. Das Messingröhrchen (6 mm  $\varnothing$ , 12 cm Länge) war am äußeren Ende verschlossen und angeschärft um die Wurzel zu verwunden. Die Konidien suspension konnte in den Boden in unterschiedlichen Richtungen durch Löcher von 0,3 mm austreten, die in das Messingröhrchen pro laufenden Zentimeter gebohrt worden waren. Dadurch war es möglich Inokulummenge, Wurzelverwundung und Art der Applikation zu standardisieren. Kontrollepflanzen wurden gleicher Weise mit Leitungswasser behandelt.

### **2.2.2 Probenvorbereitung zur DNA-Isolierung**

Zur DNA-Isolierung aus Pilzen :

Pilzbiomasse aus Flüssigkultur wurde mit einem Milchfilter abgetrennt und gefriergetrocknet.

Zur DNA-Isolierung von Pflanzen:

Erde wurde von den Wurzeln unter fließendem Leitungswasser entfernt, die Pflanzen in zwei bzw. drei Teile geschnitten und in einem dünnen Briefumschlag verschlossen. Die Proben wurden dann bei -18°C eingefroren, gefriergetrocknet ( Alpha I-6, Christ ) und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Bei Bedarf wurde Wurzel- oder Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zermörsert und nochmals gefriergetrocknet, um kondensierte Luftfeuchtigkeit zu entfernen. Davon wurden 10-30mg in vorgewogene 1,5ml Eppendorfkapseln gewogen und bis zur DNA-Extraktion bei -18°C aufbewahrt.

### **2.2.3 Bestimmung der DNA**

#### **DNA- Isolierung**

DNA wurde nach der Methode von MÖLLER *et al.* (1992) isoliert. Das ganze Verfahren wurde in 1,5 ml Eppendorfkapseln durchgeführt :

- Zermörserte und vorgewogene Proben mehrmals (3-6mal) mit Methanol + 0,1% Mercaptoethanol extrahieren und 10min bei 10000 Rcf und 4°C zentrifugieren bis der Überstand farblos ist.
- Pellet mit 500µl TES, 100µg Proteinase K, bei 55°-60°C 1h inkubieren, dabei gelegentlich umschwenken, um zu mischen.
- NaCl Konzentration auf 1.4 M justieren mit 5 M NaCl (= 140µl), 1/10 vol 10% CTAB dazu geben (= 65µl), vorsichtig mischen und weiter 10min bei 65°C inkubieren.
- Chloroform : Isoamylalkohol 24:1 (=700µl) zugeben, vorsichtig mischen, 30min bei 0°C inkubieren; 10min bei 10000 Rcf und 4°C zentrifugieren.
- Überstand in eine neue 1,5ml Eppendorfkapsel überführen, 225 µl 5 M NH<sub>4</sub>Ac zugeben und vorsichtig mischen; in Eis 30min stehen lassen, dann 10min bei 10000 Rcf und 4°C zentrifugieren.
- Überstand in eine neue 1,5ml Eppendorfkapsel überführen, 0,55 Vol Isopropanol (=510µl) zur DNA Ausfällung; in Eis 30' oder länger stehen lassen und danach 10min bei 10000 Rcf und 4°C zentrifugieren.
- Überstand abgießen, DNA-Pellet zweimal mit kaltem 70%-em Alkohol waschen. Nach vorsichtigem Trocknen (nicht zu warm, nicht zu trocken!), DNA-Pellet in TE Puffer lösen.

Vor der Ausfällung mit Isopropanol kann RNAase mit einer Endkonzentration von 10µg/ml zugefügt werden.

### **Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe der UV-Absorption bei 260nm (Hitachi 100-60 Spektralphotometer). Pro OD<sub>260</sub> Einheit wurden 50µg/ml für die doppelsträngige DNA und 40µg/ml für die einsträngige DNA berechnet. Eine Probe wurde nach der Isolierung als rein akzeptiert, wenn das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280} \cong 1.8$  war.

### **2.2.4 PCR**

Sie wurde in der klassischen Form mit artspezifischen Primern und als kompetitive PCR durchgeführt. Die PCR-Mischung bestand aus 50µl in 200ml Kapseln (PCR Softstrips, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf). Die Amplifikation erfolgte in dem Thermocycler Crocodile III (Oncor-Appligene). Als Referenzmethode oder zur qualitativen Bestimmung der Amplifikate wurde eine horizontale Elektrophorese (Midi Flachgelelektrophorese, Keutz, Reiskirchen) durchgeführt. Von jedem PCR-Ansatz wurden jeweils 8µl mit 2µl

Landungspuffer vermischt und in eine Vertiefung in den Agarosegelen eingebracht. Nach der Elektrophorese erfolgte der übliche Nachweis der DNA-Amplifikate mit Ethidiumbromid.

### **2.2.5 HPLC**

Die HPLC- Anlage besteht aus einem Gradientenformer 250 B, einer Hochdruckpumpe 600/200 bzw. 300 CS und einem UV-Detektor SP6 der Firma Gynkotec. Die Injektion der Proben erfolgte über ein Handventil oder mit einem Marathon Autosampler der Firma Spark. Um PCR Materialien zu sparen, wurden 150µl kleine Glassröhrchen mit Federn in die 1,5 ml Eppendorfkapseln eingepasst und verwendet.

#### **Stationäre Phase**

Die Proben wurden auf einer TSK-GEL, DEAE-NPR Anionenaustauscher Säule (350x4.6mm) mit einer Partikelgröße 2,5µm, (Firma TosoHaas) bei einer Flussrate von 1ml/min aufgetrennt. Die Säule wurde bei einer Temperatur von 30°C gehalten. Zum Schutz der Hauptsäule wurde eine Vorsäule (50x 4.6mm) mit dem gleichen Material und einer Partikelgröße von 5,0µm (Firma TosoHaas) vor die Hauptsäule gesetzt. Als weitere Schutzmaßnahmen diente die Installation einer Vorsäulenkartusche Guardcartridge K2 Lichrospher C18, Partikelgröße 5,0 µm, (Firma Bischoff-Chromatography) zwischen der Pumpe und der Injektionsstelle und eines Inlinefilters mit Fritte von 5,0µm zwischen Injektionsstelle und Vorsäule. Als Fließmittel wurden NaCl und 25mM Tris-HCl in filtriertem Wasser mit einem pH-Wert von 9,0 verwendet. Das Wasser wurde mit einer Anlage der Firma Millipore gewonnen und anschließend durch einen 0,25 µm Membranfilter der Firma Schleicher und Schüll filtriert.

Um die gesamte HPLC-Anlage (außer Haupt- und Vorsäule sowie die Lichrospher C18 Kartusche) vor der hohen Kochsalzkonzentration zu schützen, wurde sie mit 10% HNO<sub>3</sub> für 15min und einer Flussrate von 1,5ml/min vorbehandelt und danach mit HPLC- Wasser durchgespült bis ein pH-Wert von 7,0 erreicht war. Bei diesem Vorgang, der Passivierung genannt wird, bildet sich auf den Metallflächen der Anlage, die mit dem Fließmittel in Kontakt kommen (Kapillaren, Pumpen usw.), eine Schutzschicht aus - NO<sub>3</sub> Salzen, die vor weiterer Korrosion durch NaCl schützt.

Die Probenschleife enthielt 20µl. Die PCR-Amplifikate wurden bei einer Wellenlänge von 260nm detektiert und die Peakflächen mittels des PC-Programms Gynkosoft V5.42 der Firma Gynkotec gemessen.

### 3 Ergebnisse

Ziel der vorliegende Arbeit war die Entwicklung eines Verfahren zur Quantifizierung der DNA von *Verticillium dahliae* in befallenen Tomatenpflanzen mittels quantitativer PCR, um mögliche Unterschiede zwischen anfälligen und resistenten Tomatensorten feststellen zu können. Dafür mußte zunächst eine quantitative PCR entwickelt werden.

Bis zur Erstellung eines Protokolls wurde die PCR-Reaktionsmischung ( s. 2.1.3, 2.1.4) von NAZAR *et al.* (1991) verwendet, deren 50µl Volumen wie folgt zusammengesetzt sind:

2µl	<i>Taq</i> -Polymerase 1U/µl
1µl	je 12.5 pmol von jedem Primer
1µl	10mM Lösung der dNTPs
5µl	10 x PCR-Reaktionspuffer ( s. Material)
1µl	DNA der Probe in TE Puffer
40µl	destilliertes und steriles Wasser
MgCl <sub>2</sub>	Konzentration 1.5mM

Der Thermocycler wurde auf 30 Zyklen programmiert mit 1min Denaturierung bei 95°C, 1min Annealing bei 60°C und 2min bei 72°C für Polymerasereaktion (Extension).

### 3.1 PCR

#### 3.1.1 Primer

##### 3.1.1.1 Auswahl

Als Ziel für eine spezifische PCR des *V. dahliae*-Genoms wurden das Gen für ribosomale 5.8S RNA und die flankierenden „internal transcribed spacers“ ITS1 und ITS2 gewählt (NAZAR *et al.* 1991, ROBB *et al.* 1993, HU *et al.* 1993). Die ersten Vorversuche wurden mit 30mer Primern nach NAZAR *et al.* (1991) durchgeführt, deren Sequenzen Abschnitten in der ITS1 und ITS2 entsprachen. Diese Primer hatten aber eine sehr hohe Schmelztemperatur ( $T_m$ ) im Vergleich zur angewandten Annealingtemperatur. Dadurch sind die Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleotiden der Primer und der Matrizen-DNA äußerst instabil. Dies hat sehr variable und nicht reproduzierbare Ergebnisse bei Amplifikation zur Folge. Es wurden daher die neuen Primer VdP1 und VdP2 aus den gleichen Stellen ausgewählt und geprüft. Als Kriterien für deren Auswahl wurden folgende Eigenschaften zugrunde gelegt ( ANONYM 1996): CG-Gehalt 40-60 % ( VdP1 45.45 %, VdP2 55.0 %), C und G sollte gleichmäßig entlang der Primer verstreut sein, mit nicht mehr als drei C bzw. G auf dem 3'-Ende. Die  $T_m$  der beiden Primer sollte sich nicht mehr als 5°C unterscheiden (62°C für VdP1 und VdP2,

wenn für A, T 2°C und für C, G°C gerechnet werden). Außerdem sollten bei den beiden Primern keine komplementären Stellen vorhanden sein.

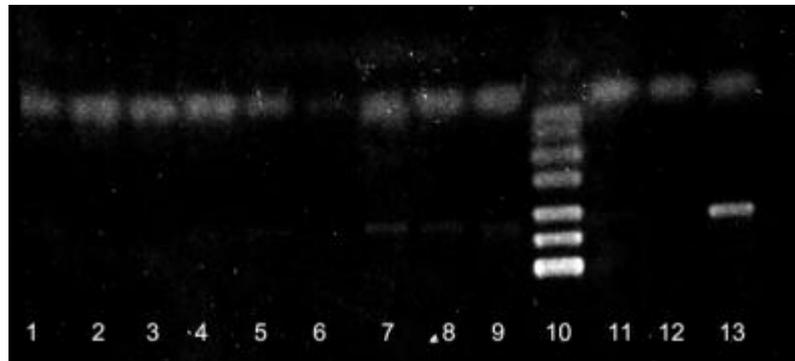
Auf der Basis dieser Kriterien wurde ein 22mer upstream Primer und ein 20mer downstream Primer anhand von 9 Sequenzen verschiedener *Verticillium* spp. Ausgewählt ( Abb. 1), die aus „ European Molecular Biological Library“ ( EMBL) stammen. Bei dem diploiden *V.dahliae* ( Z 29510) handelt es sich wahrscheinlich um die neue Art *V. longisporum* ( KARAPAPA *et al.* 1997). Als Basissequenz dient das haploide *V. dahliae* ( Z 29511). Beide Primer werden in Fettschrift hervorgehoben. Die Ziel-sequenz umfasst jeweils einen Teil der ITS1 und ITS2 sowie das Gen für die 5.8S rRNA mit insgesamt 332 Nukleotiden. Wie an den Ergebnissen in den nachfolgenden Abschnitten erkennbar ist erfüllen die gewählten Primer VdP1 und VdP2 die Anforderungen hinsichtlich Stabilität und Reproduzierbarkeit der Amplifikate. Sie wurden daher für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

**Tabelle 1: Darstellung von 9 Sequenzen verschiedener *Verticillium* spp. hinsichtlich ITS1, 5.8S rRNA-Gen und ITS2 aus der EMBL, mit den ausgewählten Primern VdP1, VdP2 und einem Teil des 3'linker Primers (3'Lin).**

Accession Nr. bei EMBL		
1 <i>V. albo-atrum</i>	L 19499	ccgagtatct atcataacc ctttgaac caaattgttg ctteggcgcc tegtcccgga 60
2 <i>V. tricorpus</i>	L 28679	ccgagtatct atcataacc ctttgaac cacattgttg ctteggcgcc tegtcccgga
3 <i>V. albo-atrum</i>	X 60705	ccctttgga accatattgt tgettccggcg gctcgttctg cgagcccgcc ggtaacatcag
4 <i>V. albo-atrum</i>	Z 29508	ccgagtatct atcataacc ctttgaac catattgttg ctssggcgcc tegtctgcg
5 <i>V. albo-atrum</i>	Z 29509	ccgagtatct atcataacc ctttgaac catattgttg ctteggcgcc tegtctgcg
6 <i>V. dahliae</i> (diploid)	Z 29510	ccgagtatct atcataacc ctttgaac catattgttg ctteggcgcc tegtctgcg
7 <i>V. dahliae</i> (haploid)	<b>Z 29511</b>	ccgagtatct atcataacc ctttgaac catattgttg ctteggcgcc tegtctgcg
8 <i>V. albo-atrum</i>	Z 29523	ccgagtatct atcataacc ctttgaac caaattgttg ctteggcgcc tcecgagccg
9 <i>V. tricorpus</i>	Z 29524	ccgagtatct atcataacc ctttgaac catattgttg ctteggcgcc tegtcccgga
1 gcccgcggg acatcagctc ctatattttt accaacgata cttctgagtg ttcttagca 120		ctattaaaaa tttaaacac ggatctcttg gctctagcat cgatgaagaa cgcagcgaaa 180
2 gcccgcggg acatcagctc cttattttt accaacgata catctgagtg ttcttagca		actattagaa ctttaacaa cggatctctt gctctagca tcatgaaga acgagcgaa
3 tctctttat tataccaacg atactctga gtttcttag ogaactata aaactttaa		caacggatct cttggctcta gcatcgatga agaacgcage gaaacgcgat atgtagtgtg
4 agcccgcggg tacatcagtc tctttatata taccaacgat actctgagtg gttcttagcg		aactattaaa acttttaaca acggatctct tggctctagc atcgatgaag aacgcagcga
5 agcccgcggg tacatcagtc tctttatata taccaacgat actctgagtg gttcttagcg		aactattaaa acttttaaca acggatctct tggctctagc atcgatgaag aacgcagcga
6 agcccgcggg tacatcagtc tctttatata taccaacgat actctgagtg gttcttagcg		aactattaaa acttttaaca acggatctct tggctctagc atcgatgaag aacgcagcga
7 agcccgcggg <b>VdP1 gg tccatcagtc tctctgttta</b> taccaacgat actctgagtg gttcttagcg		aactattaaa acttttaaca acggatctct tggctctagc atcgatgaag aacgcagcga
8 ccggtacatc agtctctata ttittacaa cgatactct gagtgttctt acgaactatt		aaaactttta acaacggatc tcttgctct agcatcgatg aagaacgcag cgaacgcga
9 gcccgcggg acatcagctc cttattttt accaacgat actctgagtg gttcttagca		actattaaaa cttttaacag gatctcttg tcatcgatcg atcgaagaac cgcagcgaag
1 ccggatattg agtftgaatt gcagaattca gtaaatcgc gaacttttag gcgacatag 240		gcgctccag tatectggga ggcatgctg tccgagcgtc gtttaacca tctcgagacc 300
2 acgcgatattg tagtftgaatt tgcagaattc agtgaatcgc gaacttttag aacgcacatg		gcgctccga gtagctggg aggcgatgct tccgagcgtc cgtttcaacc ctcgagccct
3 aattgcagaa ttcagtgaaat catcgaatct tgaacgcac atggcgccct ccagatcctt		gggagggcatg cctgtccgag cgtcgtttca accctcgagc cccagtgccc cgggtttggg
4 aacgcgatga tftagtftga attgcagaat tcaagtgaatc atcgaatctt tgaacgcaca		tggcgccctc cagtatctcg ggagggcatgc ctgtccgagc gtcgtttcaaa cctcagagcc
5 aacgcgatga tftagtftga ttcagaatc cagtgaatca tgaatcttt gaacgcacat		ggcgccctcc agtatctctgg gaggcatgccc tctccgagcgc tegtttcaac cctcagagccc
6 aacgcgatga tftagtftga ttcagaatc cagtgaatca tgaatcttt gaacgcacat		ggcgccctcc agtatctctgg gaggcatgccc tctccgagcgc tegtttcaac cctcagagccc
7 aacgcgatga tftagtftga ttcagaatc cagtgaatca tgaatcttt gaacgcacat		ggcgccctcc agtatctctgg gaggcatgccc tctccgagcgc tegtttcaac cctcagagccc
8 tatgtagcgc gaattgcaga attcagtgaa tcatcgaatc ttgaacgca catggcgctt		ggcgccctcc agtatctctgg gaggcatgccc tctccgagcgc tegtttcaac cctcagagccc
9 cगतatgtag tftgaattgc agaattcagt gaatcagca acttttgaac gcacatggcg		ggcgccctcc agtatctctgg gaggcatgccc tctccgagcgc tegtttcaac cctcagagccc
1 ctagtggccc ggtgttgggg atctactctt gtaggccctt aaaacagtg gcggaccgag 360		ctgtggccctt ccaagcgtag taattttcgg tgcgacgga gtcccgtagg caccagcctc 420
2 agtggcccgg tgttggggat ctactctctt aggcctttaa aagcagtggc ggaccgcgct		ggcctctctc tgcgtagtaa tttctgctc catcgcagtc cgcagggcac cagcctctaa
3 gatctacgic tftagggcctt taaaagcagt ggccgaccgc cgtggccctt cctgctgtag		taattacagc tgcgacgga gtcccgcage acttgcctct aaaccctac aagccgctc
4 ccagtgcccc ggtgttgggg atctactctt gtaggccctt aaaagcagtg gcggaccgac		gtggcccttc ctgctgtagt aattacagct cgcacggag tcccgcaggc acttgcctct
5 cagtggcccc ggttggggga tctactctct gtaggccctt aaaagcagtg gcggaccgac		tggcccttcc ttcgtagta attacagctc gcatcggagt cccgcagga cttgcctcta
6 cagtggcccc ggttggggga tctactctct gtaggccctt aaaagcagtg gcggaccgac		tggcccttcc ttcgtagta attacagctc gcatcggagt cccgcagga cttgcctcta
7 cagtggcccc ggttggggga tctactctct gtaggccctt aaaagcagtg gcggaccgac		tggcccttcc ttcgtagta <b>gttacagctc gcatcggagt VdP2</b> cccgcaggcg cttgcctcta
8 ccggtgttgg gtagtactct ctgttagccc ttaaatcag tggcgaccgc cgtgtggcctt		tcttgcgta gtaattttc ctcgcatcgg agtcccctag gcaccagctc ctaaaccccc
9 ggcccgggtg tgggtagta ctctctgtag cccttaaaag cagtggcgga cccgsgtggc		ccttcttrc gtagtaattt kcgtctgcat cggagtcgg cagcagactg cctctaaac

### 3.1.1.2 Spezifität

Die für eine Quantifizierung von *V. dahliae* geeigneten Primer müssen sich durch eine hohe Spezifität auszeichnen. So dürfen sie z.B. mit der DNA anderer nicht verwandter Pilze keine Amplifikate ergeben.



**Abb. 1: Spezifität der Primer für *Verticillium dahliae* im Vergleich zu anderen Pilzen nach einer unspezifischen PCR (Annealing bei 38°C, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>).**

- |  |   |
|--|---|
| 1, 2 : <i>Alternaria solani</i>              | 10 : DNA Marker                         |
| 3, 4 : <i>Botryodiplodia theobromae</i>      | 11, 12 : <i>Pythium inflatum</i>        |
| 5, 6 : <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 13 : <b><i>Verticillium dahliae</i></b> |

Nach einer unspezifischen Annealingtemperatur von 38°C und 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> waren bei der Gelelektrophorese neben der deutlichen Bande von *V. dahliae* auf Bahn 13, nur auf den Bahnen 7-9 von *F. graminearum* schwache Banden zu erkennen (Abb. 1). Dieser Pilz ist ein Getreidepathogen und befällt keine Tomatenpflanzen. Bei allen übrigen Pilzen waren keine Amplifikate zu erkennen. Dieser Untersuchung hatte ursprünglich das Ziel die DNA eines anderen Pilzes als verwendbaren internen Standard für eine Quantifizierung von *V. dahliae* zu amplifizieren.

Für *V. dahliae* geeignete Primer sollten mit der DNA anderer *Verticillium* spp. keine Amplifikate ergeben. Dies betrifft besonders *V. albo-atrum*, ein Pathogen an einer Vielzahl von Kulturpflanzen und *V. tricorpus* ein saprophytischer Pilz, der praktisch in jedem Boden vorhanden ist. Eine Möglichkeit diese Differenzierung zu erreichen ist eine Auswahl von Primern für *V. dahliae*, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenz mit der DNA anderer *Verticillium* spp. keine störenden Amplifikate ergeben.

Tabelle 2: DNA-Sequenz von *Verticillium dahliae* ( Z 29511) im Vergleich zu entsprechenden DNA-Sequenzen einer diploiden *V.dahliae* und fünf Stämmen von *V. albo-atrum* ( ein Bindestrich steht jeweils für das gleiche Nukleotid).

VdP1 ( ITS1)

<i>V. albo-atrum</i> L 19499	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	T
<i>V. albo-atrum</i> X 60705	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	A	-	-	-	-
<i>V. albo-atrum</i> Z 29508	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	A	-	-	-	-
<i>V. albo-atrum</i> Z 29509	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	A	-	-	C	-
<i>V. albo-atrum</i> Z 29523	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	T
<i>V. dahliae</i> * Z 29510	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	A	-	-	-	-
<i>V. dahliae</i> Z 29511	G	G	T	C	C	A	T	C	A	G	T	C	T	C	T	C	T	G	T	T	T	A
<b>VdP1</b> 22mer	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>
5'  3'																						

VdP2 ( ITS 2)

<i>V. albo-atrum</i> L 19499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	C	T	T	-	-	A
<i>V. albo-atrum</i> X 60705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
<i>V. albo-atrum</i> Z 29508	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
<i>V. albo-atrum</i> Z 29509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
<i>V. albo-atrum</i> Z 29523	G	A	T	-	C	-	C	T	G	A	G	G	-	T	-	-	G	C	-	C	
<i>V. dahliae</i> * Z 29510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
<i>V. dahliae</i> Z 29511	T	G	A	G	G	C	T	A	C	G	C	T	C	G	A	C	A	T	T	G	
<b>VdP2</b> 20mer	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	
5'  3'																					

\*Bei dieser diploiden Art handelt sich wahrscheinlich um die neue Art *Verticillium longisporum*.

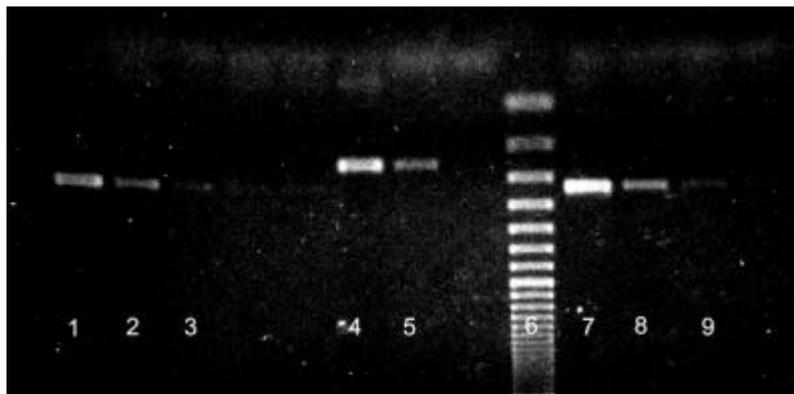
Die Sequenzen von *V. tricorpus* ( L 28679, Z 29524) unterscheiden sich an mehreren Stellen (Tabelle 1) von den entsprechenden Abschnitten der *V. dahliae* ( Z 29511). Beim 22mer ist die Sequenz von *V. albo-atrum* X 60705 an drei Stellen, bei den drei Stämmen L 19499, Z29504 und Z 29523 an vier Stellen von VdP1 unterschieden ( Tabelle 2). Beim 20mer sind die Stämme von *V. albo-atrum* an einer, fünf oder vielen Stellen verschieden vom VdP2, die diploide *V. dahliae* ( Z 29510) an einer Stelle. Diese Unterschiede in der DNA-Sequenz sollten ausreichen, um eine Amplifizierung der DNA anderer *Verticillium* spp. als *V. dahliae* entweder vollkommen oder zumindest weitgehend zu unterdrücken. Eine weitere Möglichkeit der Differenzierung ergibt sich aus der Wahl der Annealingtemperatur ( s. 3.1.2.3).

### 3.1.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

In diesem Zusammenhang wurden die drei Parameter  $MgCl_2$ -Konzentration, Menge an *Taq*-Polymerase und Annealingtemperatur untersucht.

#### 3.1.2.1 Konzentration von $MgCl_2$

Ein wichtiger Faktor für die PCR ist die Konzentration von  $MgCl_2$  im Reaktionsgemisch. Sie liegt üblicherweise zwischen 2.5mM und 1.5mM. Je höher die Konzentration desto einfacher die Reaktion, die gleichzeitig aber auch unspezifischer wird. Bei Konzentrationen von 10,0, 1,0 und 0,1 pg *V. dahliae*-DNA ergab 2,0mM  $MgCl_2$  deutlich stärker ausgeprägte Banden als 1,5mM  $MgCl_2$  ( Abb. 2).



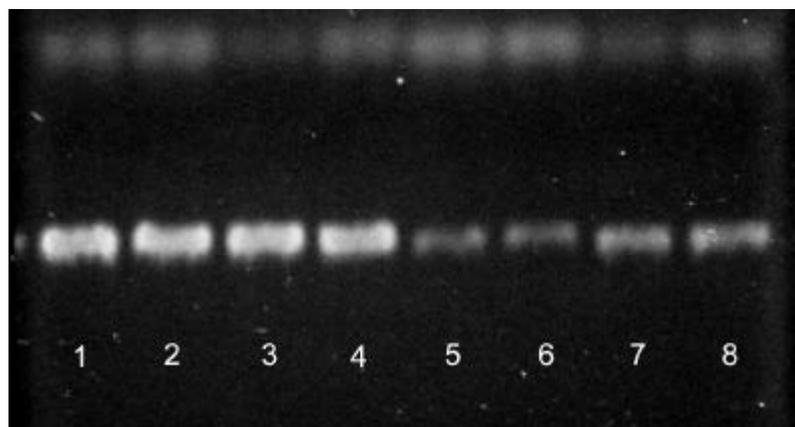
**Abb.2: Einfluss verschiedener  $MgCl_2$ -Konzentrationen bei geringen Mengen von Matrizen-DNA von *Verticillium dahliae*:**

- 1, 2, 3 : 10, 1 und 0,1 pg *V. dahliae*-DNA mit 1,5mM  $MgCl_2$
- 7, 8, 9 : 10, 1 und 0,1 pg *V. dahliae*-DNA mit 2,0mM  $MgCl_2$
- 4, 5 : interner Standard (nach FÖRSTER 1994, s. 3.1.3.3)
- 6 : DNA- Marker

Trotzdem wurden bei allen weiteren Ansätzen 1.5mM MgCl<sub>2</sub> eingesetzt, um die Möglichkeit von falsch Positiven weitgehend zu vermeiden.

### 3.1.2.2 Menge der *Taq*-Polymerase

Diese thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* hat die PCR erst ermöglicht. Da dieser Enzym teuer ist und in relativ höheren Konzentrationen unspezifische Amplifikate bedingt, wurde geprüft, welche der eingesetzte Mengen von 1U bzw. 2 U *Taq*-Polymerase für geringe Mengen an Matrizen-DNA von *V. dahliae* optimal ist.



**Abb. 3: Optimale Menge an *Taq*-Polymerase bei geringer Menge an Matrizen-DNA von *Verticillium dahliae*:**

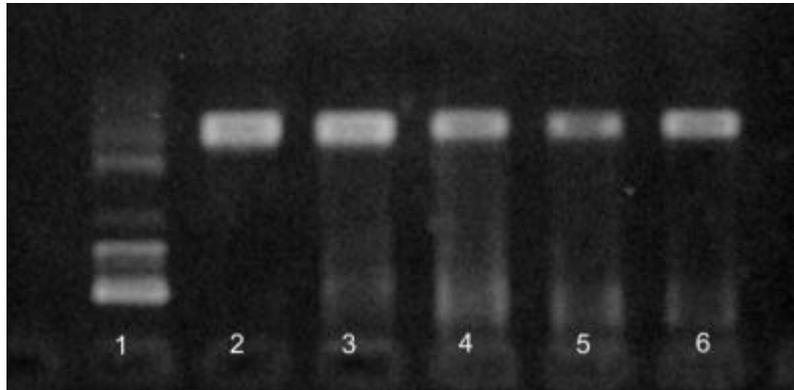
Probe Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
Reaktionsvolumen	µl	50	50	100	100	50	50	100	100
<i>Taq</i> -Polymerase	U	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>V. dahliae</i> -DNA	pg	1	1	2	2	0.1	0.1	0.2	0.2

Bei diesem Vergleich ergab sich kein Unterschied in der Effektivität ( Abb. 3). Die stärkere Ausprägung der Banden in den Bahnen 7 und 8 im Vergleich zu 5 und 6 beruht auf der doppelten Menge an eingesetzter *V. dahliae*-DNA. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in allen weiteren Untersuchungen 1 U *Taq*-Polymerase pro Ansatz (50 µl) verwendet.

### 3.1.2.3 Annealingtemperatur

Sie kann im Prinzip um 5°C niedriger sein als die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer, die für VdP1 und VdP2 mit 62°C berechnet wurde. Eine Annealingtemperatur von 57°C wäre allerdings zu unspezifisch, denn eine PCR ist um so spezifischer je dichter die Schmelztemperaturen von Primern und Annealing zusammenliegen. Es wurde daher versucht

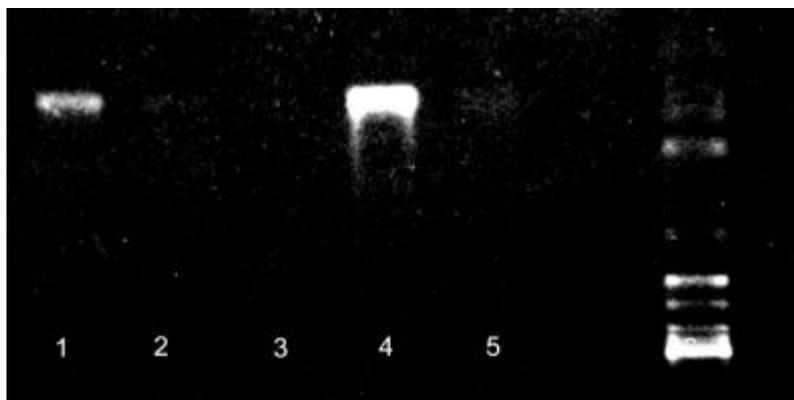
die Annealingtemperatur entsprechend zu optimieren. In die vergleichenden Untersuchungen wurden verschiedene *Verticillium* spp. einbezogen, um zu prüfen ob und wie die Annealingtemperatur die Differenzierung von *V. dahliae* beeinflusst.



**Abb. 4: PCR von *Verticillium* Arten bei einer Annealingtemperatur von 60°C und 2.0mM MgCl<sub>2</sub> :**

1 : DNA-Marker	2 : <i>V. dahliae</i>	3 : <i>V. tricorpus</i>
4 : <i>V. nigrescens</i>	5 : <i>V. lecanii</i>	6 : <i>V. albo-atrum</i>

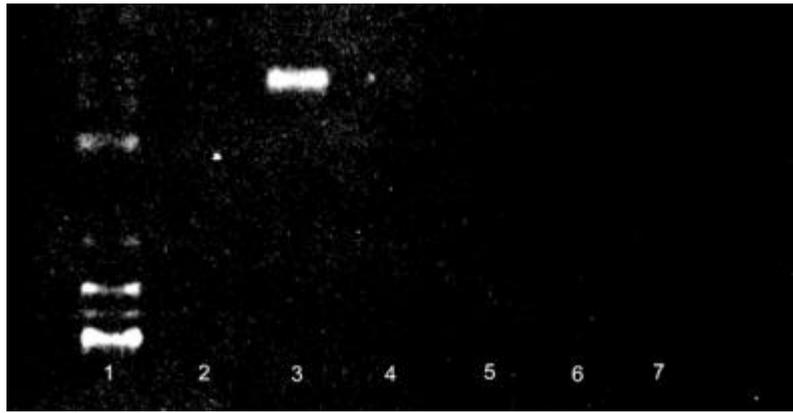
Bei einer Annealingtemperatur von 60°C und 2.0mM MgCl<sub>2</sub> waren die Amplifikate von fünf *Verticillium* spp. kaum unterschieden ( Abb. 4), alle Arten wurden amplifiziert.



**Abb. 5: PCR von *Verticillium* Arten bei einer Annealingtemperatur von 61°C und 1.5mM MgCl<sub>2</sub> :**

1 : <i>V. tricorpus</i> (V31)	2 : <i>V. albo-atrum</i>	3 : <i>V. nigrescens</i>
4 : <i>V. dahliae</i> (V30)	5 : <i>V. lecanii</i>	6 : DNA-Marker

Bei einer Annealingtemperatur von 61°C und 1.5mM MgCl<sub>2</sub> war neben dem ausgeprägten Amplifikat für *V. dahliae* nur noch eine relativ schwache Bande für *V. tricorpus* zu erkennen (Abb. 5).



**Abb. 6: PCR von verschiedenen *V. tricornutus* Isolaten und einem Isolat von *V. dahliae* bei einer Annealingtemperatur von 62°C und 1.5mM MgCl<sub>2</sub> :**

1 : DNA-Marker            2 : *V. tricornutus* 17            3 : ***V. dahliae*** V30            4 : *V. tricornutus* 28  
 5 : *V. tricornutus* V31       6 : *V. tricornutus* 52            7 : *V. tricornutus* 1080

Da die Sequenzunterschiede der beiden Primer nicht ausreichend waren, um bei einer Annealingtemperatur von 61°C *V. tricornutus* sicher auszuschalten wurde ein Annealing bei 62°C mit einer Reihe verschiedener Stämme von *V. tricornutus* geprüft. Es zeigte sich (Abb. 6), dass bei dieser Bedingung keiner der *V. tricornutus* Stämme amplifiziert worden war, sondern nur *V. dahliae*. Damit war eine optimale Identifizierung von *V. dahliae* erreicht.

Da in der vorliegenden Arbeit die zu untersuchenden Tomatenpflanzen aufgrund einer künstlichen Inokulation nur mit *V. dahliae* in Kontakt gekommen waren, wurde für alle weiteren Untersuchungen eine Annealingtemperatur von 60°C gewählt. Sie führt zwar zu einer weniger spezifischen Amplifikation, was bei dem System der künstlichen Inokulation vernachlässigt werden kann, sie ist dafür aber stärker ausgeprägt.

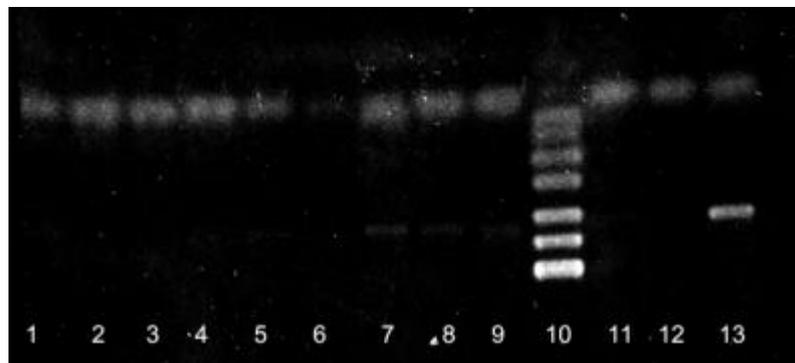
### 3.1.3 Entwicklung eines Internen Standards (IS)

Um Schwankungen in der Amplifikation von DNA-Proben ausgleichen zu können muss für eine zuverlässige Quantifizierung bei jeder Probe eine DNA Matrize als Interner Standard (IS) ko-amplifiziert werden. Sein Amplifikat dient als Basis für eine Verrechnung eventueller Schwankungen in der Amplifikation von DNA-Proben.

#### 3.1.3.1 Transformation

Zuerst wurde versucht den gewünschten IS mit Hilfe des Plasmids pUC18 nach PILARSKY & FLACH (1994) zu erzeugen. Nachdem die kreisförmige DNA des Plasmids durch eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoR I geöffnet worden war, wurde das 332bp PCR-Amplifikat von *V. dahliae* an der Schnittstelle der Plasmid-DNA inseriert, so dass der DNA-Ring wieder geschlossen war. Nach einer doppelten Restriktion mit den Restriktionsenzymen

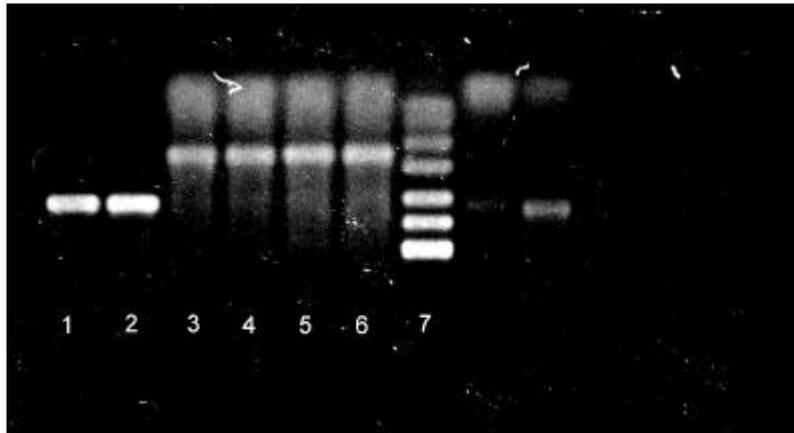
Cla I und EcoR I an den Stellen 94 und 138 der Insertion, wurde der Vektor mit T4 Ligase wieder ligiert. Durch die doppelte Restriktion war ein 44-Basen langes Fragment von dem 332-bp *V. dahliae*-Amplifikat entfernt worden, so dass der IS eine Länge von 288 Nukleotiden haben sollte. Der Plasmid-Vektor mit der Insertion wurde von kompetenten *E. coli*-Zellen der Linie GM48 aufgenommen, vermehrt und wieder isoliert. Bei einer folgenden PCR mit den *V. dahliae*-Primern sollte der Plasmid-Vektor die Funktion des IS haben. Bei der kompetitiven PCR war, neben den beiden erwarteten Banden, noch eine dritte größere Bande von etwa 400-bp vorhanden (Abb. 7). Bei ihr handelt es sich wahrscheinlich um eine Hybride der beiden anderen Banden (HU *et al.* 1993). Das transformierte Produkt war demnach nicht als IS geeignet.



**Abb. 7:** 1 : DNA-Marker  
 2-7 : PCR von 1ng *V. dahliae*-DNA mit 0, 1:100, 1:500, 1:5000, 1:10000  
 Verdünnungen des internen Standards aus der Plasmidstammlösung  
 8-13 : PCR von 0.1ng *V. dahliae*-DNA mit den gleichen Mengen des IS  
 Die mittlere Bande ist die von *V. dahliae*-DNA.

### 3.1.3.2 *Fusarium oxysporum*

Oft wird versucht einen IS für die kompetitiven PCR aus dem Genom einer nicht verwandten DNA zu entwickeln. Im vorliegenden Fall wurde die DNA aus 10 Isolaten des Welkeerreger *F. oxysporum* von Sojabohnen auf ihre Eignung geprüft. Hierzu wurde eine unspezifische PCR mit Annealingtemperaturen zwischen 38°C – 42°C und 2.5mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt.



**Abb. 8:** Unspezifische PCR der DNA von *V. dahliae* (1- 2) und *Fusarium oxysporum* ( 3- 6) mit den Primern VdP1 und VdP2 ( 7: DNA- Marker).

Bei einem Isolat wurde mit den Primern VdP1 und VdP2 eine Bande von etwa 230bp amplifiziert ( Abb. 8 und 11). Trotz aller Bemühungen war es nicht möglich diese Bande als reines Produkt zu isolieren. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

### 3.1.3.3 Verkürzte Matrize von *V. dahliae*-DNA

Hier zu wird in drei PCR Schritten mittels eines sogenannten „linker primer“ aus der ursprünglichen Matrize eine nach Wahl verkürzte Matrize amplifiziert, die dann als IS verwendet werden kann. Für *V. dahliae* erfolgte die Konstruktion einer verkürzten Matrize in folgenden drei Schritten ( Abb. 9).

Zuerst wurde einer normalen PCR aus dem *V. dahliae*-Genom das 332bp des 5.8S rRNA Gens und die flankierenden ITS1 und ITS2 amplifiziert und aus dem Agarosegel isoliert.

Danach erfolgte eine zweite PCR unter folgenden Bedingungen. Als Matrize wurde das 332bp Produkt verwendet und VdP1 als 5'Ende Primer. Für den 3' Ende Primer wurde ein 30mer Primer entworfen dessen 19 Nukleotide an seinem 3'Ende komplementär für den Abschnitt der Nukleotide 232 bis 214 des 5.8S rRNA Gens von *V. dahliae* sind (Abb. 10). Die übrigen 11 Nukleotiden am 5' Ende des 3'linker Primer sind identisch mit den letzten 11 Nukleotiden am 3'Ende des VdP2 (Abb. 10).

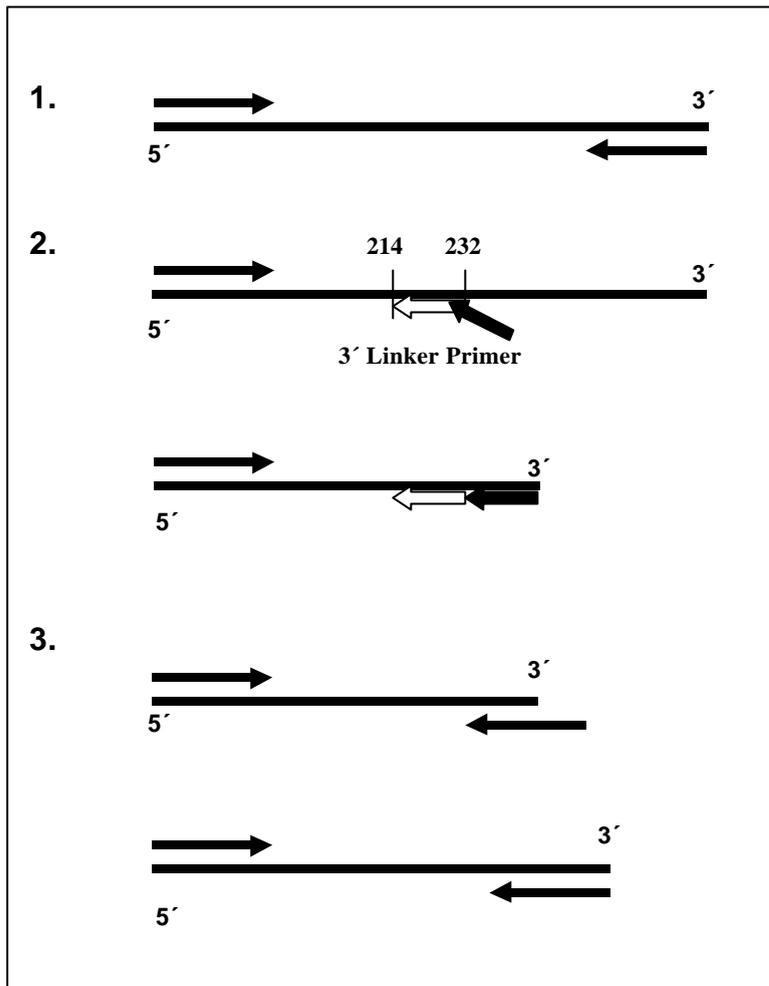
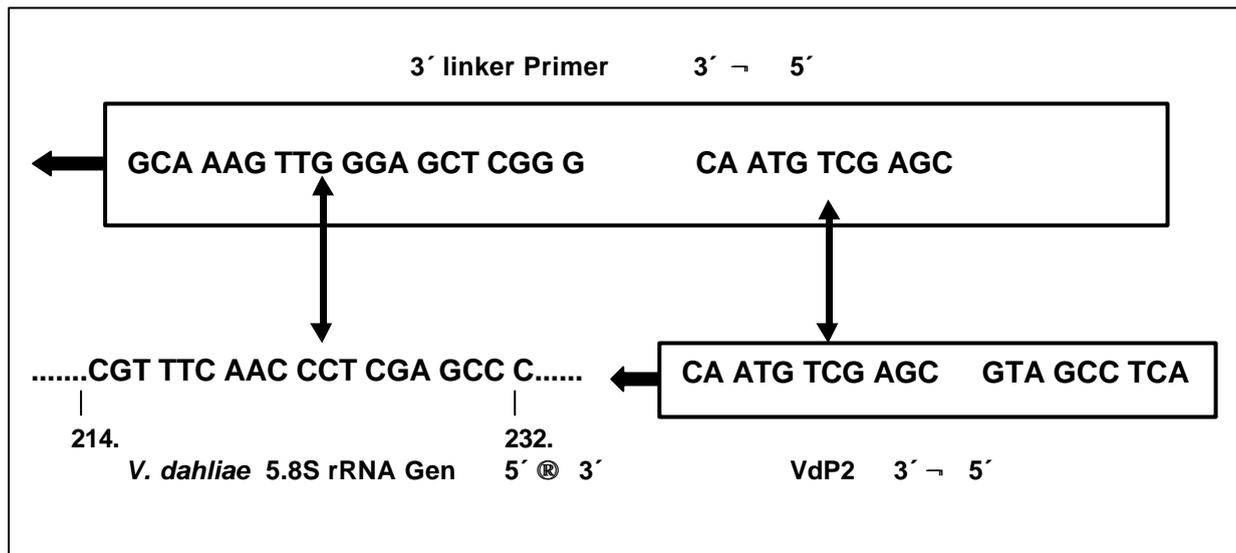


Abb. 9 : Schema zur Konstruktion einer verkürzten DNA-Matrize nach FÖRSTER (1994).

Die PCR-Mischung von 50µl war wie folgt zusammengesetzt:

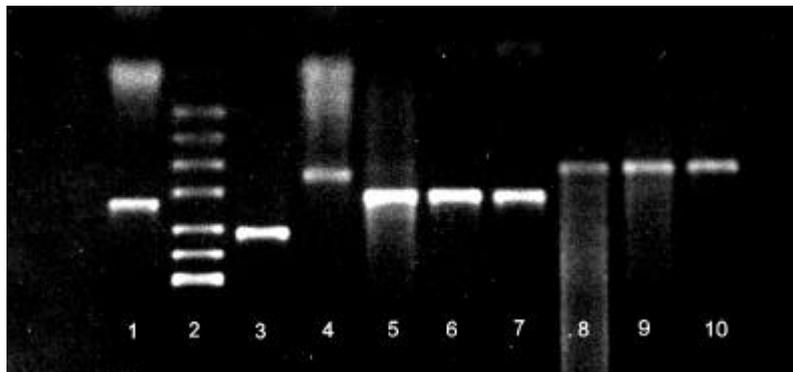
- 10µl : 125pmol VdP1
- 2.5µl : 125pmol 3' linker Primer
- 1µl von 10mM dNTPs
- 5µl von 10x PCR-Reaktionspuffer
- 4µl : 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 2.5µl : *Taq*-Polymerase 1 U / µl
- 1µl *V. dahliae*-DNA
- 24µl destilliertes und steriles H<sub>2</sub>O

Für die Reaktion wurden 26 Zyklen von 1min 94°C, 1 min 54°C und 2 min 72°C programmiert. Die 19 Nukleotide am 3'Ende des „linker Primer“ wurden bei der zweiten PCR unter unspezifischen Reaktionsbedingungen an die Position der Nukleotide 232-214 der *V.dahliae* Matrize angelagert (Abb. 10). Es bildet sich zunächst ein 243mer, bestehend aus den 232 Nukleotiden der *V. dahliae* Matrize und den 11 übrigen Nukleotiden des „3' linker Primer“.



**Abb. 10:** Schema der Anlagerung des „3' linker Primer“ an die Matrize des *V. dahliae* 5.8S rRNA Gens.

Dieses Amplifikat diente ab dem zweiten Zyklus als Matrize. Nachdem es gereinigt und bis zu 1:1000 verdünnt worden war, erfolgte eine dritte PCR mit den zwei *V. dahliae*-Primern unter spezifischen Bedingungen. Sie ergab ein Amplifikat von 252bp, das den gewünschten IS darstellt. Nach einer Reinigung wurde dieses Produkt in einer vierten PCR auf seine Verwendbarkeit als IS geprüft.



**Abb. 11:** Gelelektrophorese des aus Agarose isolierten und gereinigten FIS (IS nach FÖRSTER 1994) und des IS von *Fusarium oxysporum*

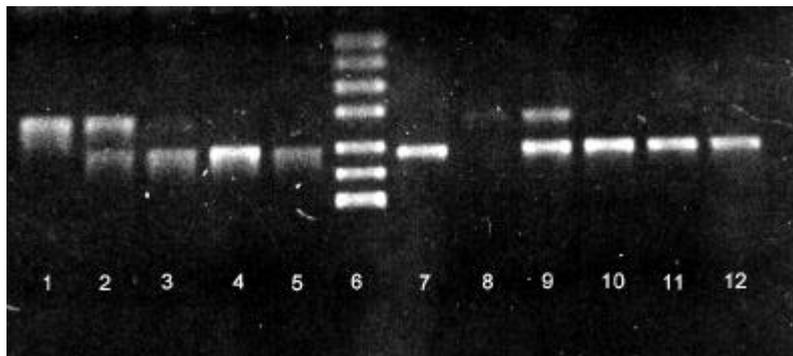
- 1 : FIS
- 2 : DNA-Marker
- 3 : *V. dahliae*-DNA
- 4 : IS von *F. oxysporum*
- 5, 6, 7 : PCR mit FIS 1:10, 1:100, 1:1000
- 8, 9, 10 : PCR mit IS aus *F. oxysporum*-DNA ebenfalls 1:10, 1:100, 1:1000.

Es zeigte sich (Abb. 11), dass der neue IS nur zu einer klaren Bande führt, deren Position deutlich von der Bande für *V. dahliae* unterschieden war. Damit war der gewünschte IS konstruiert worden. Der gleichzeitig geprüfte IS aus *F. oxysporum* zeigte, trotz mehrfacher

Reinigung, kein klares Produkt (Abb. 11: 8, 9, 10 ) und war daher nicht geeignet für einen Einsatz als IS. Der IS nach FÖRSTER (1994) wird nachfolgend als FIS bezeichnet.

### 3.1.4 Kompetitive Analyse

Hierfür müssen sowohl die *V. dahliae*-DNA als auch der IS deutlich erkennbar amplifiziert werden. Ist einer der beiden Partner im Überschuss vorhanden, so wird die Amplifikation des anderen entsprechend unterdrückt. Die *V. dahliae* Matrize und der IS müssen daher im Reaktionsgemisch in einem konkurrenzfähigen Verhältnis vorliegen.



**Abb. 12: Kompetitive PCR der DNA von *Verticillium dahliae*, dem nach FÖRSTER (1994) konstruierten internen Standard ( FIS) und den Primern VdP1 und VdP2:**

- |   |   |
|---|---|
| 1 : 25pg FIS                            | 6 : DNA-Marker                                  |
| 2 : 25pg FIS + <i>V.dahliae</i> -DNA    | 7 : 10ng <i>V. dahliae</i> -DNA                 |
| 3 : 2.5pg FIS + <i>V.dahliae</i> -DNA   | Bei 1-5 je 3µl ( =37.5 pmol) der beiden Primer  |
| 4 : 0.25pg FIS + <i>V.dahliae</i> -DNA  | 9-12 : wie 2-5 aber nur 1 µl ( = 12.5 pmol) der |
| 5 : 0.025pg FIS + <i>V.dahliae</i> -DNA | beiden Primer.                                  |

Eine spezifische PCR mit den beiden Primern VdP1 und VdP2 ergab folgenden Beziehungen für eine Basiskonzentration von 10ng *V. dahliae*-DNA (Abb. 12). Bei den Proben 3-5 und 10-12 war das Verhältnis so ungünstig, dass der FIS nicht erkennbar amplifiziert wurde, sondern nur die *V. dahliae*-DNA. Bei den Proben 2 und 9 waren zwei deutlich erkennbare Banden vorhanden, die bei der Primerkonzentration von 12.5 pmol schärfer ausgeprägt war als bei der höheren Dosierung von 37.5 pmol. Ein Verhältnis von 25pg IS zu 10ng *V. dahliae*-DNA ist also geeignet methodisch bedingte Schwankungen der Analyse von *V. dahliae*-DNA über den FIS zu verrechnen.

### 3.1.5 Standardprotokoll

Die Bedingungen, die schließlich für eine spezifische PCR von *V. dahliae* gewählt wurden, sind die folgenden:

#### PCR-Reaktionsmischung auf 50µl

1µl : *Taq*-Polymerase 1 U/µl  
1µl : 12.5 pmol VdP1  
1µl : 12.5 pmol VdP2  
1µl 10mM Lösung von dNTPs  
5µl 10x PCR-Reaktionspuffer  
1µl *V. dahliae*-DNA in TE-Puffer  
35µl destilliertes und steriles H<sub>2</sub>O  
5µl MgCl<sub>2</sub> 15mM

Der Thermocycler wird auf 27 Zyklen programmiert mit 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 60°C und 2 min bei 72°C für die Polymerasereaktion. Für eine kompetitive PCR wurde 1µl jeweils 0.25, 2.5 oder 25pg FIS eingesetzt. Alle weiteren Untersuchungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach diesem Protokoll durchgeführt.

## 3.2 HPLC

Es gibt mehrere Möglichkeiten PCR-Amplifikate zu detektieren. Die elektrophoretische Auftrennung in Agarose- oder Polyacrylamidgelen und ausschließender Darstellung mittels Ethidiumbromid oder der 10fach empfindlicheren Silberfärbung dienen ganz überwiegend einem qualitativen Nachweis (KATO *et al.* 1989, KATZ & HAFF 1990, HAGEN-MANN & MANN 1994, ZIMMERMANN & MANNHALTER 1996). Die Stärke der Banden kann mit einem geeigneten Scanner quantifiziert werden. Daneben könnte eine Quantifizierung von Amplifikaten durch HPLC erfolgen. Diese Möglichkeit wurde im vorliegenden Fall geprüft.

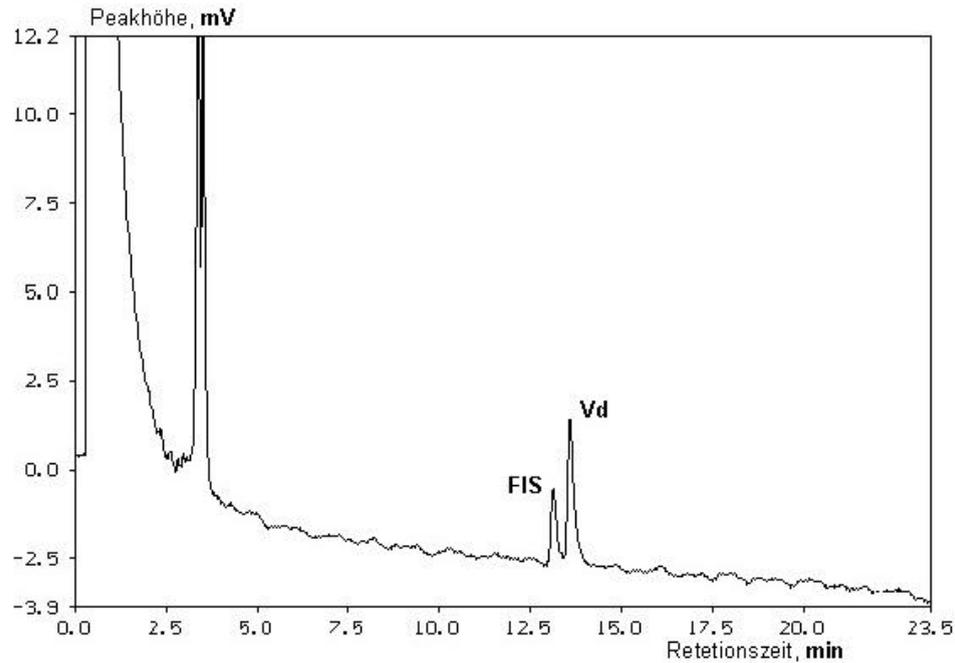
### 3.2.1 Analyse der Amplifikate

Nach umfangreichen Voruntersuchungen erwies sich folgender Gradient als geeignet die beiden Amplifikate der kompetitiven PCR aufzutrennen und darzustellen (Abb. 13):

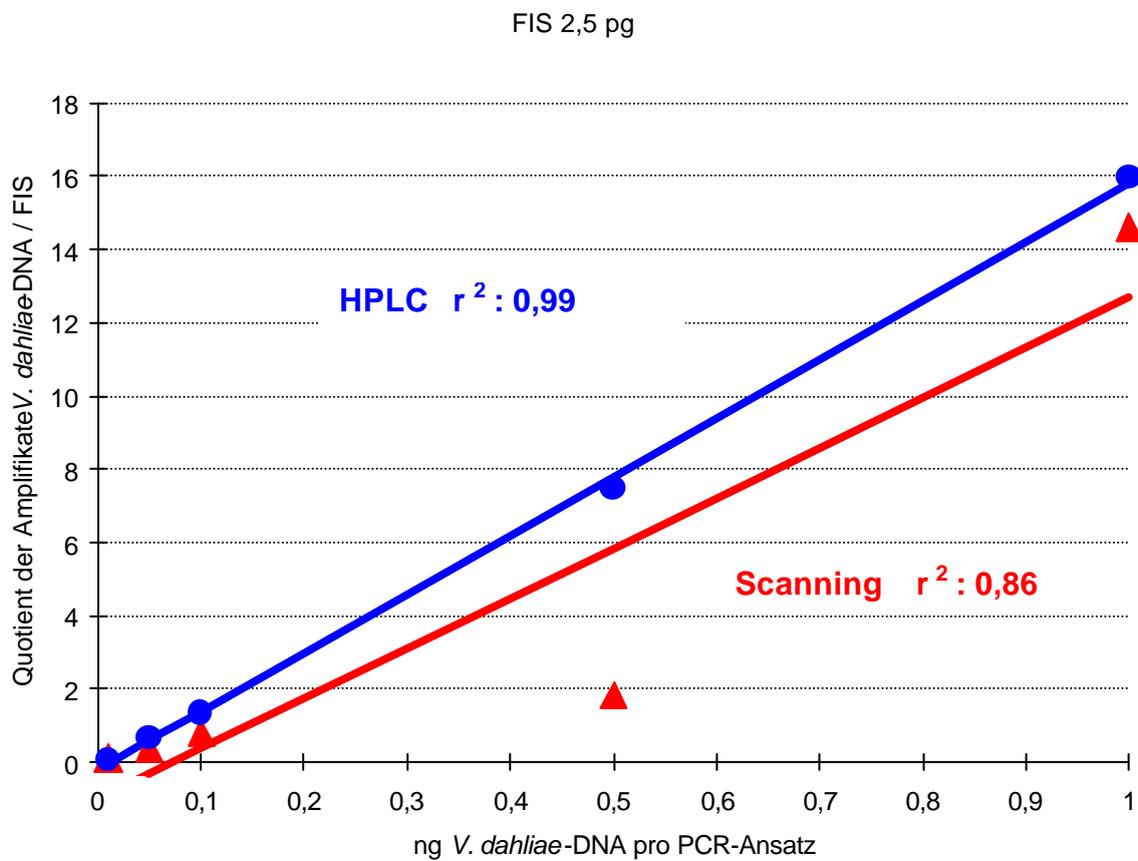
für 8min	0,25M NaCl	(in 0,25mM Tris-HCl pH 9,0)
in 1min	von 0,75M NaCl	auf 0,5M NaCl
für 1min	0,5M NaCl	
in 20min	von 0,5M NaCl	auf 0,68M NaCl
in 3min	von 0,68 M NaCl	auf 1,0M NaCl
für 1min	1,0M NaCl	
in 3min	von 1,0M NaCl	auf 0,25M NaCl
für 4min	0,25M NaCl	

Mit diesem System hatten die Amplifikate einer kompetitiven PCR von FIS und *V. dahliae*-DNA Retentionszeiten von 13.2 und 13.8 min. Die Menge eines Amplifikates wurde aus der jeweiligen Peakfläche berechnet.

Wie ist diese Art der Auswertung gegenüber einem Scanning der Ethidiumbromid-Banden zu bewerten? Diese Frage wurde anhand von *V. dahliae*-DNA in den Mengen von 0,01-0,05-0,1-0,5-1.0 ng und einem FIS von 2.5 pg pro PCR-Ansatz untersucht (Abb. 14). Als Grundlage für die Regressionsanalysen diente der Quotient der *V. dahliae*-DNA : FIS. Die Analyse ergab, dass eine Auswertung der Amplifikate mittels HPLC einem Scanning von Ethidiumbromid-Banden mindestens gleichwertig, wenn nicht überlegen ist.



**Abb. 13:** Typische Chromatogramm der Amplifikate einer kompetitiven-PCR:  
 Interner Standard nach FÖRSTER ( FIS, Matzize 252bp), *V.dahliae*-DNA ( Vd, Matzize 332bp).



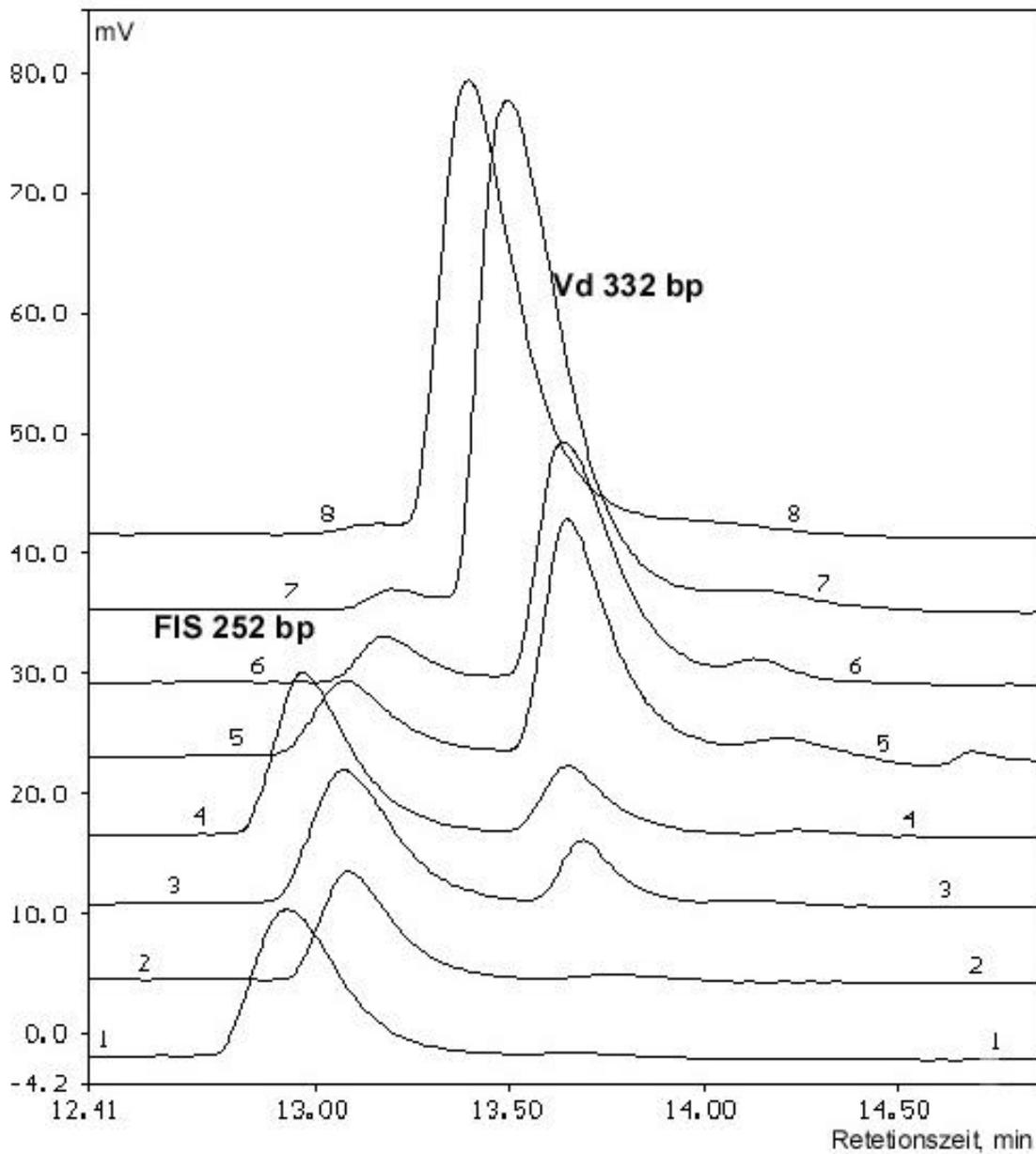
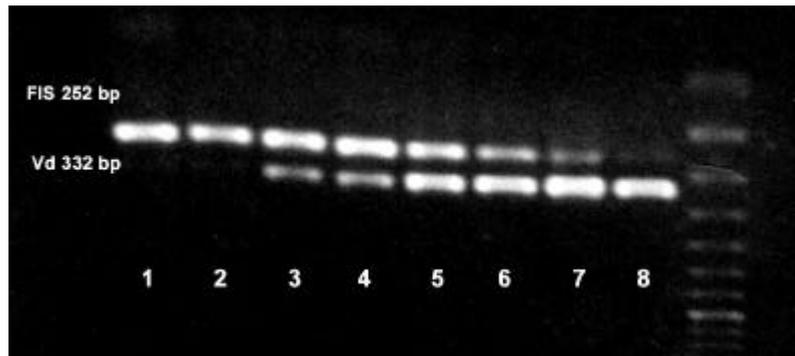
**Abb. 14 :** Regressionsanalyse der Amplifikate verschiedener Mengen von *V. dahliae*-DNA mit jeweils 2.5 pg FIS nach kompetitiver PCR; Auswertung mittels HPLC ( Peakflächeninhalt ) und Scanning der Ethidumbromid-Banden nach Gelelektrophorese.

### 3.2.2. Beziehung FIS / *V. dahliae*-DNA

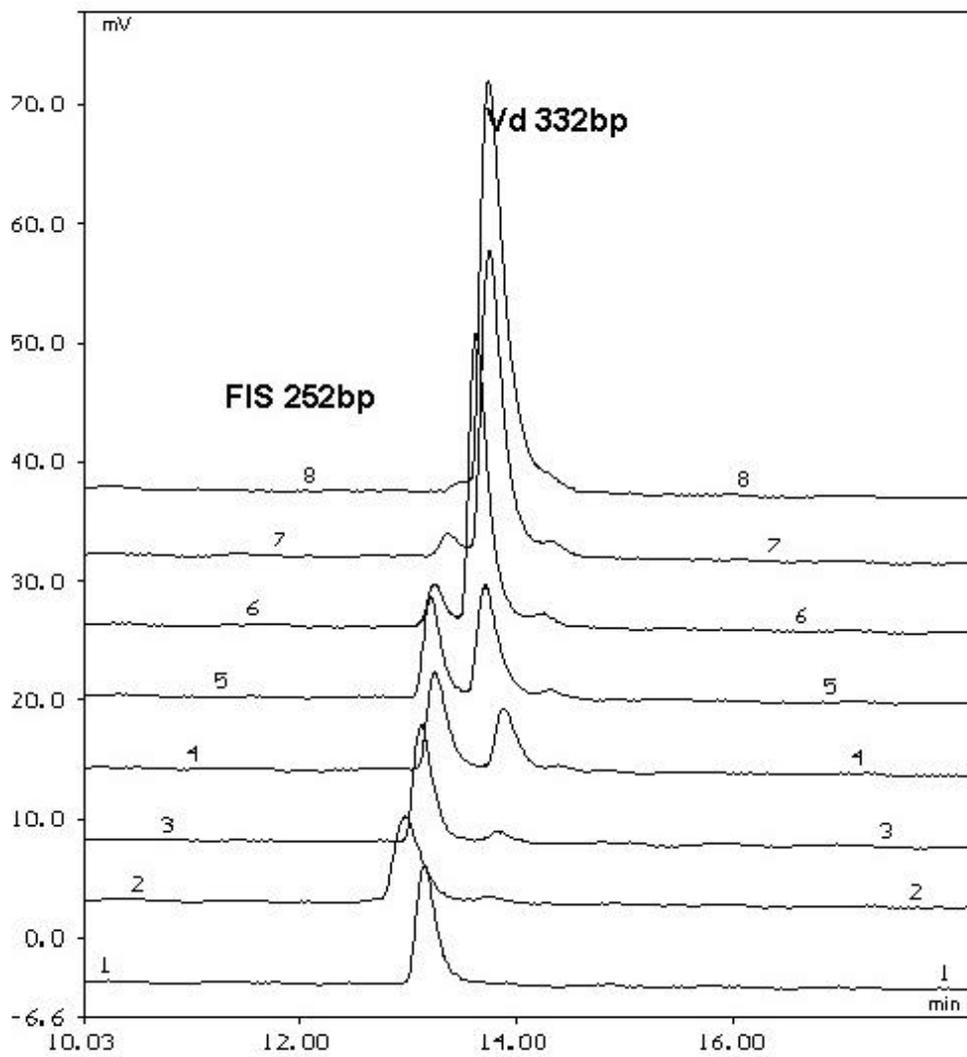
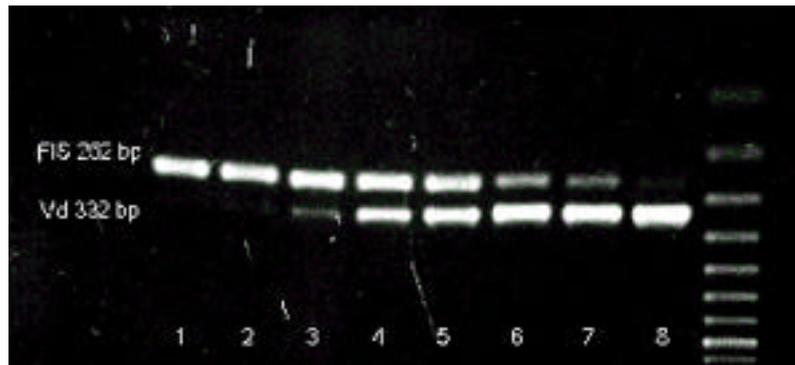
Für eine kompetitive PCR müssen die Matrizen der *V. dahliae*-DNA (332bp) und des FIS (252bp) in einem konkurrenzfähigen Verhältnis in einer PCR-Reaktionsmischung vorhanden sein, um beide amplifizieren zu können. Diese Beziehung wurde in folgenden drei Ansätzen geprüft:

- *V. dahliae*-DNA (0.005-0.01-0.05-0,1-0,5-1-5-10 ng) zu FIS (jeweils 25 pg) Abb.15
- *V. dahliae*-DNA (0.001-0.005-0,01-0,05-0,1-0,5-1-5 ng) zu FIS (jeweils 2,5 pg) Abb.16
- *V. dahliae*-DNA (0,1-1-2-4-6-8-10-50-100 pg) zu FIS (jeweils 0,25 pg) Abb.17

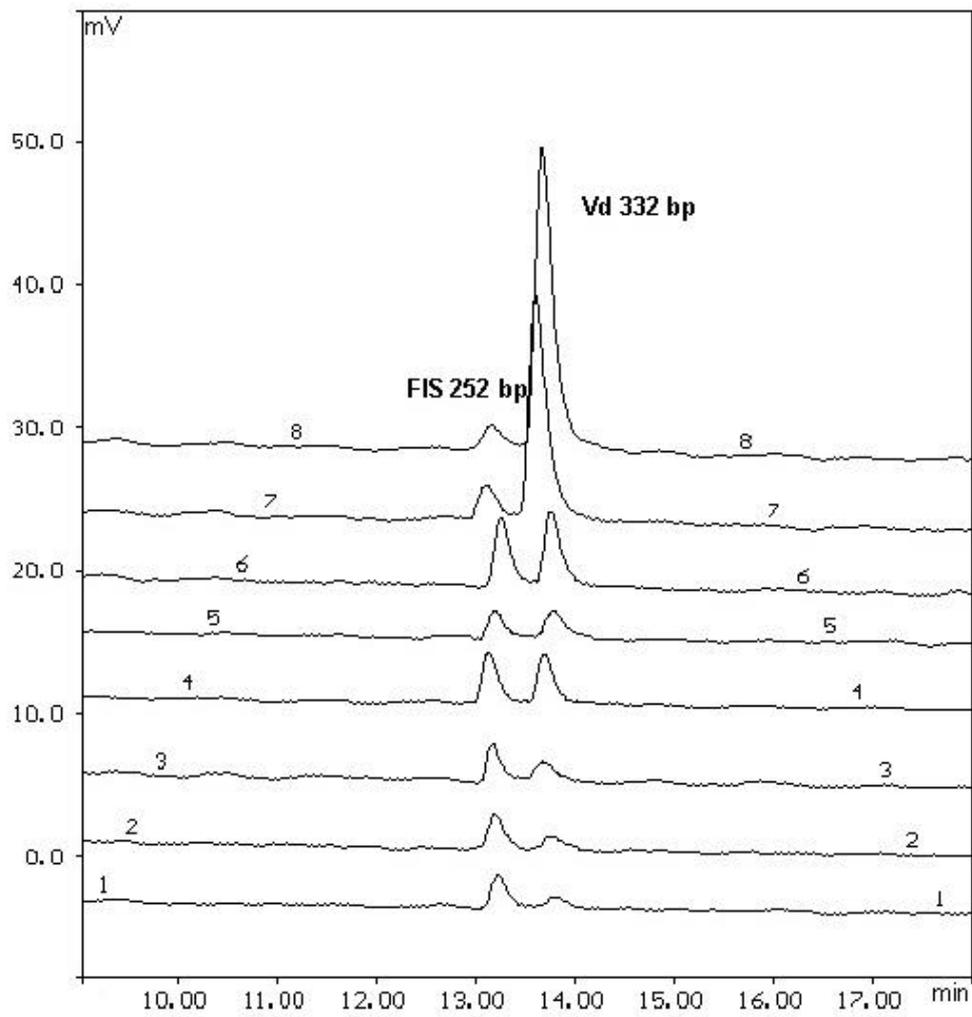
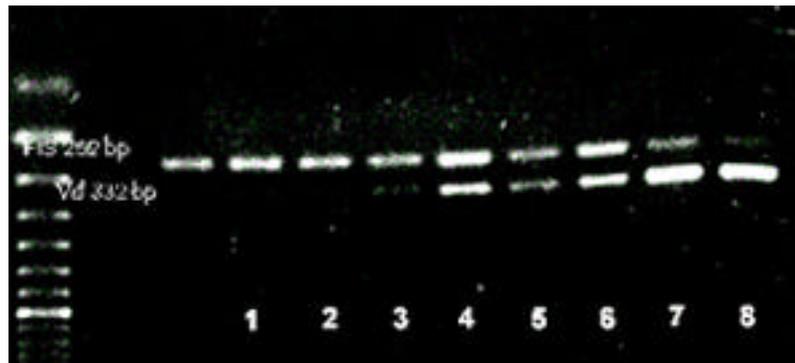
Von jedem PCR-Ansatz wurde jeweils eine Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid und eine HPLC durchgeführt, um beide vergleichen zu können ( Abb. 15, 16, 17 ).



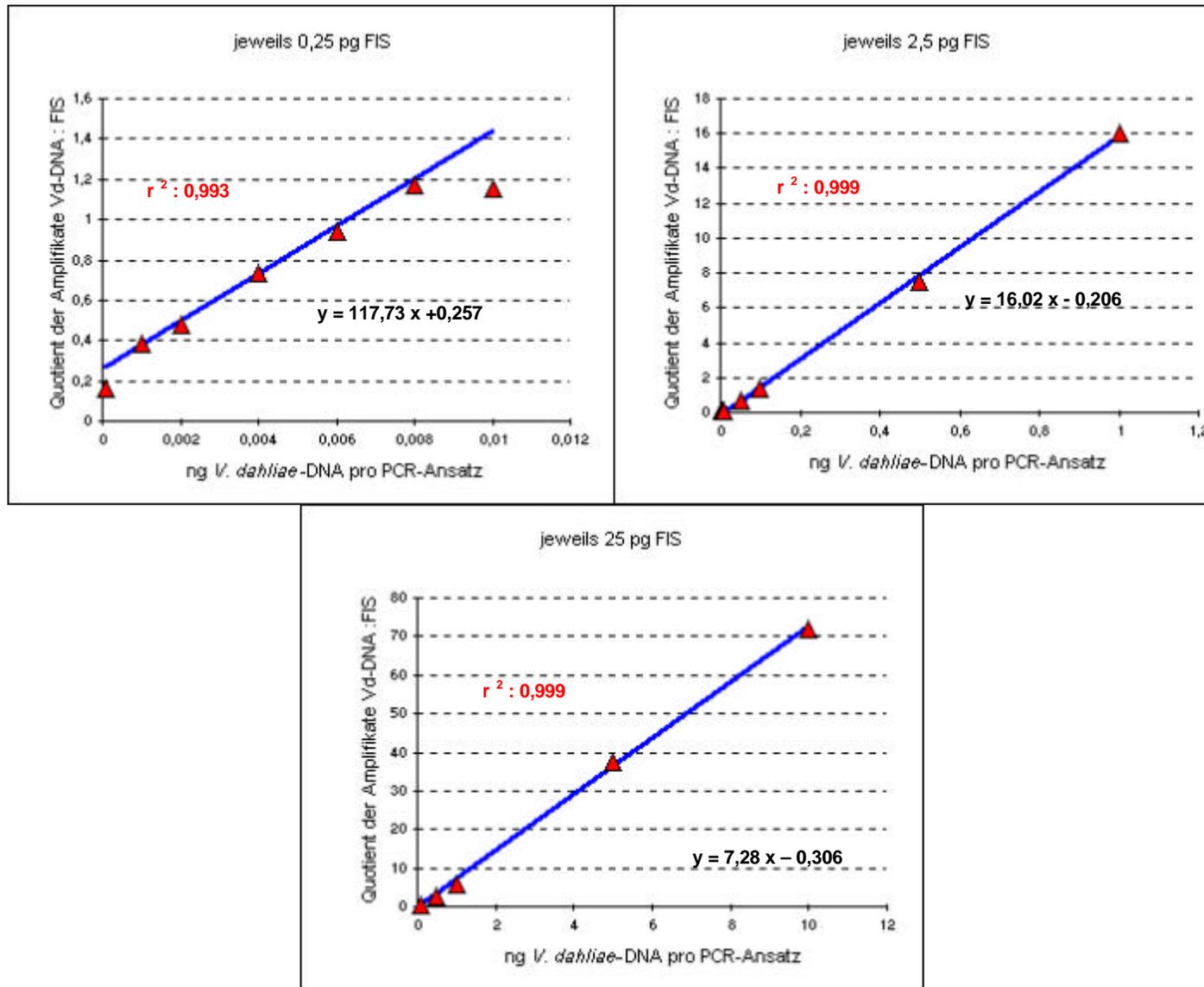
**Abb.15** : Vergleichende Auswertung der Amplifikate einer kompetitiven PCR des Internen Standards (FIS) und *V. dahliae*-DNA durch Gelelektrophorese / Ethidiumbromid und HPLC. Bahn 1-8: 0.005-0.01-0.05-0.1-0.5-1-5-10 ng *V.dahliae*-DNA ( s. Text) mit jeweils 25 pg FIS.



**Abb. 16:** Vergleichende Auswertung wie im Abb. 15. Bahn 1-8: 0,001-0,005-0,01-0,05-0,1-0,5-1-5 ng *V. dahliae*-DNA ( s. Text) mit jeweils 2,5 pg FIS.



**Abb. 17:** Vergleichende Auswertung wie im Abb.15. Bahn 1-8 : 0,1-1-2-4-6-8-10-50-100 pg *V. dahliae*-DNA mit jeweils 0,25 pg FIS.



**Abb. 18** : Regressionsanalysen verschiedener Verhältnisse von *V. dahliae* zu FIS auf der Basis ihrer Amplifikate nach kompetitiver PCR.

Die gewünschte gleichzeitige Amplifikation der beiden DNA-Matrizen von 252 und 332bp war nicht in jedem Fall gegeben (Abb. 15, 16, 17). Dieser Befund unterstreicht noch einmal, dass bei einer kompetitiven PCR die beiden Matrizen, hier *V. dahliae*-DNA und FIS, in der PCR-Reaktionsmischung in einem konkurrenzfähigen Verhältnis vorliegen müssen, wenn beide gleichzeitig amplifiziert werden sollen.

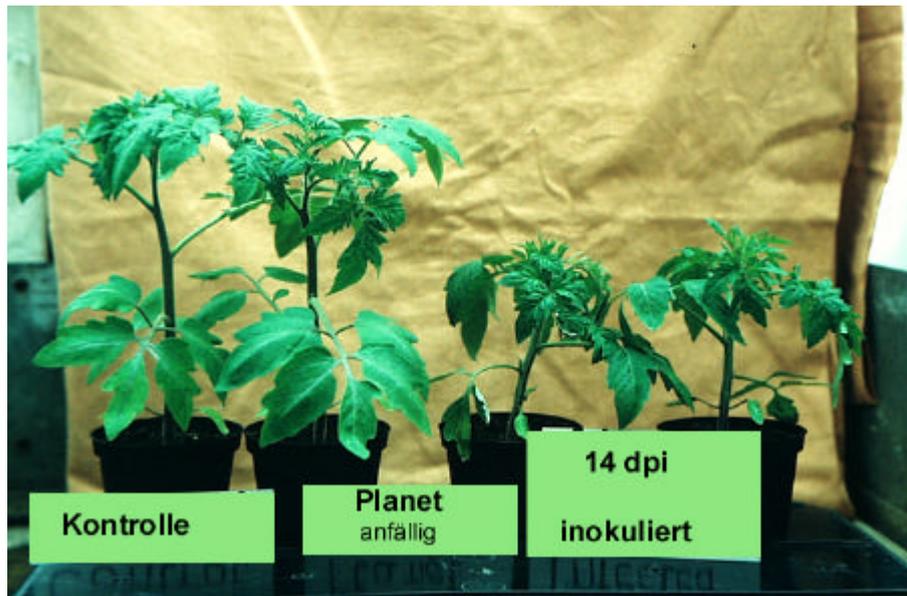
Anhand der Quotienten der Amplifikate  $Vd : FIS$  wurden Regressionsanalysen durchgeführt (Abb. 18). Sie geben Aufschluss über die Nachweisbarkeit und die angestrebte Quantifizierungsmöglichkeit von *V. dahliae*-DNA mittels der HPLC. Wenn ein Quotient gemessen werden kann, dann kann auch eine *V. dahliae*-DNA-Ausgangsmenge kalkuliert werden. Durch Ko-amplifikation mit 0.25, 2.5 oder 25 pg FIS wird der gesamte Bereich der zu erwartenden Menge an *V. dahliae*-DNA in befallenen Pflanzenteilen erfasst. Die hohe Empfindlichkeit des Verfahrens sollte ausreichen die geringen Mengen des Welkeerregers in der Frühphase der Pathogenese sicher bestimmen zu können.

### **3.3 Quantifizierung von *V. dahliae* in Tomatenpflanzen**

Nach den methodischen Untersuchungen des Welkeerregers *in vitro*, der Etablierung einer kompetitiven PCR und eines Verfahrens zur Messung der Amplifikate mittels HPLC sollte geprüft werden, ob und wie gut *V. dahliae in planta* quantifiziert werden kann.

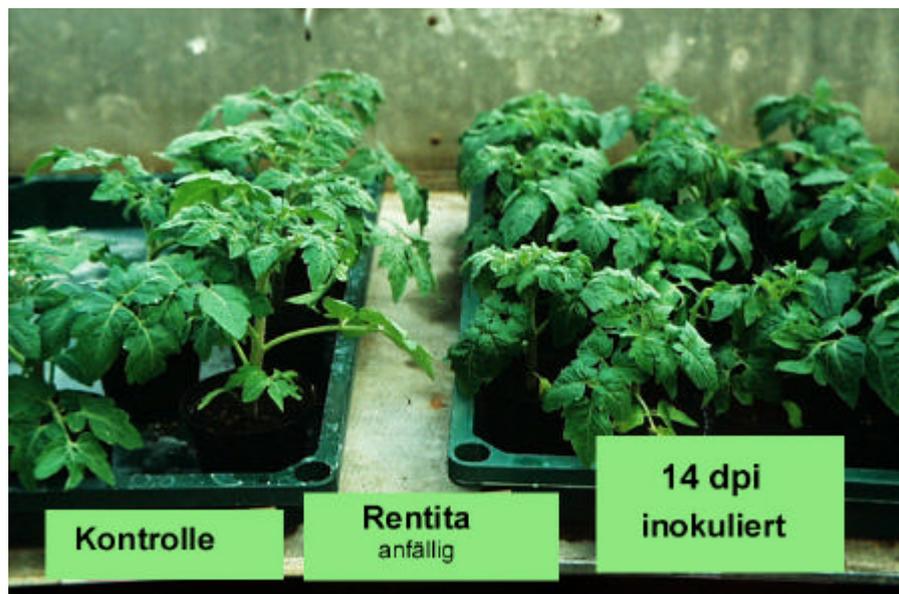
#### **3.3.1 Probenahme**

In Vorversuchen war festgestellt worden, dass die ersten makroskopisch erkennbaren Symptomen bei anfälligen Tomatensorten, die im 3.-4. Blattstadium inokuliert worden waren, erst nach 10 dpi (days post inoculation) auftraten. Zuerst ist eine Epinastie und Wachstumsverzögerung beim 1. und 2. Blatt zu erkennen. Dann folgt bis 14 dpi eine Vergilbung des 1. und 2. Blattes. Dabei kommt es zu einer Bildung von Nekrosen, die vorzugsweise an den Blatträndern auftreten. Im Vergleich zu behandelten, aber nicht mit *V. dahliae* inokulierten Kontrollpflanzen, war bei den befallenen Pflanzen 14 dpi eine ausgeprägte Wuchsstauchung vorhanden (Abb. 19).



**Abb. 19:** Wuchsstauchung von Tomatenpflanzen der anfälligen Hybridsorte Planet durch *V. dahliae* 14 dpi.

Die gewählte Methode der Inokulation ( 2.2.1) führte zu einer sehr gleichmäßigen makroskopischen Symptomausprägung, was an einer einheitlichen Wuchsstauchung fast aller inokulierter Pflanzen zu erkennen war (Abb. 20).



**Abb. 20 :** Gleichmäßigkeit der Wuchsstauchung von Tomatenpflanzen der anfälligen Hybridsorte Rentita durch *V. dahliae* 14 dpi.

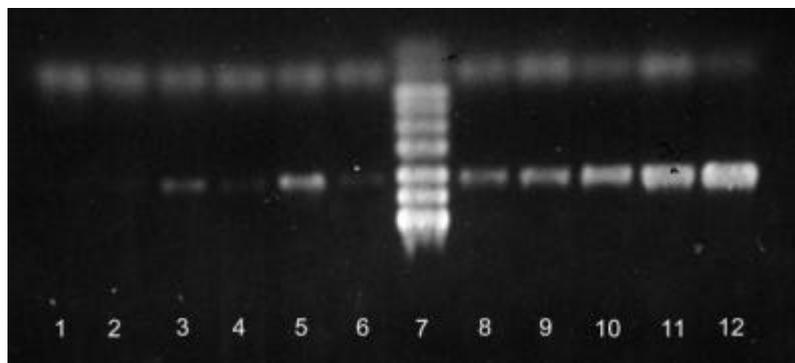
Nach diesen Befunden war die gewählte Art der Inokulation für die vorgesehenen Untersuchungen gut geeignet.

Aufbauend auf den Beobachtungen in den Vorversuchen wurde die Entwicklung von *V.dahliae* in den ersten 14 Tagen nach einer künstlichen Inokulation verfolgt. Dazu wurden von jeder Tomatensorte 40 Pflanzen im 3. – 4. Blattstadium verwendet. Von diesen wurden 10 als Kontrolle behandelt und 30 mit dem Welkeerreger inokuliert. Am 1., 2., 3., 4., 6., 8.,

10., 12. und 14. dpi wurden für jede Sorte Proben von drei inokulierte und einer Kontrollpflanze genommen. Von jeder Pflanze eines Termins wurde jeweils die DNA des 1. Blattes und der Wurzeln extrahiert und dann mittels PCR und HPLC analysiert.

### 3.3.2 Qualitativer Nachweis in Blättern

Das Protokoll für die PCR zur Bestimmung von *V. dahliae* war mit DNA-Extrakten aus reinen Pilzkulturen entwickelt worden. Ist es aber auch geeignet für eine Bestimmung des Welkeerregers in pflanzlichem Gewebe? Diese Frage wurde anhand von DNA-Extrakten aus dem 1. Blatt von Kontrollen und inokulierten Pflanzen geprüft (Abb. 21).



**Abb. 21: Amplifikate einer spezifischen PCR von *V. dahliae*-DNA aus dem 1. Blatt inokulierter Tomatenpflanzen 7 und 14 dpi.**

1, 2 : cv. Planet und Primador, nicht inokuliert	8, 9 : resistentes cv. Primador, 14 dpi
3, 4 : resistentes cv. Primador, 7 dpi	10, 11 : anfälliges cv. Planet, 14 dpi
5, 6 : anfälliges cv. Planet, 7 dpi	12 : <i>V. dahliae</i> , Kultur
7 : DNA-Marker	

( bei der oberen, durchgehenden Reihe von Banden handelte es sich um nicht verbrauchte Reste der Primer).

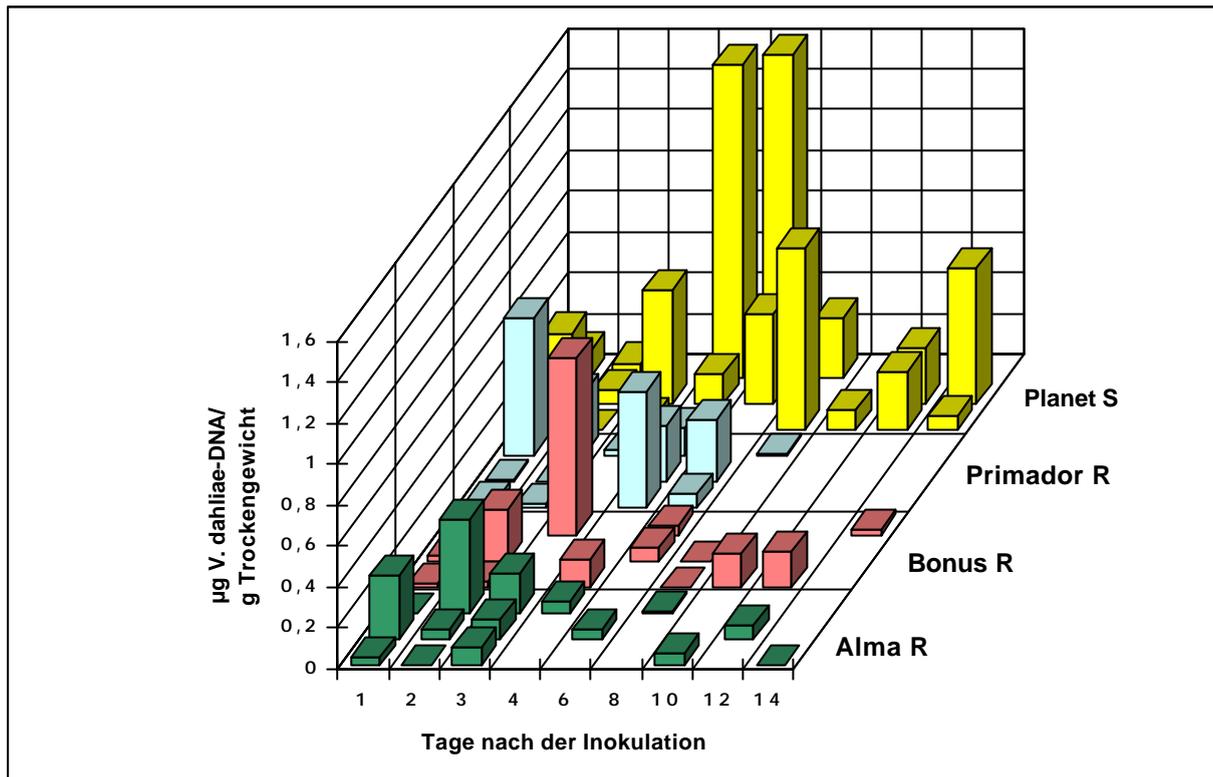
Nach einer spezifischen PCR waren bei den Blattproben nicht inokulierter Tomatenpflanzen keine Banden vorhanden ( 1, 2). Bei Blättern inokulierter Pflanzen waren sowohl 7 als auch 14 dpi Amplifikate zu erkennen, da die am späteren Termin deutlich stärker waren. Sie waren sowohl bei den Proben des resistenten cv. Primador ( 3, 4- 8, 9) als auch des anfälligen cv. Planet ( 5, 6- 10, 11) vorhanden, bei letzteren waren sie erwartungsgemäß stärker ausgeprägt. An diesen Befunden wird klar, dass das PCR-Protokoll für eine Bestimmung der *V. dahliae*-DNA in befallenem Pflanzenmaterial geeignet ist.

### 3.3.3 Analysensequenz

Zuerst wurde von jeder Probe eine spezifische PCR durchgeführt. War eine Bande vorhanden, dann folgte eine kompetitive PCR mit FIS in den Mengen 0.25, 2.5 oder 25 pg pro Ansatz, je nach Menge des Amplifikates der spezifischen PCR. Auf der Basis der zwei koamplifizierten Banden konnte die ursprüngliche Menge von *V. dahliae*-DNA berechnet werden. War die spezifische PCR negativ, dann wurde trotzdem eine kompetitive PCR mit FIS in den Mengen 0.25, 2.5 oder 25 pg durchgeführt. War die FIS gut amplifiziert, dann wurde die Probe hinsichtlich *V. dahliae*-DNA endgültig als negativ beurteilt. War die FIS schlecht oder überhaupt amplifiziert, dann wurde ein Inhibitionseffekt angenommen. Solche Inhibitoren der PCR sind häufig gefunden worden, so z.B. in Proben aus Sonnenblumen oder Kartoffeln (HU *et al.* 1993, ROBB *et al.* 1994, BUNTING *et al.* 1996). Dieses Problem kann durch Verdünnungen mit Wasser in Verhältnis 1:10, 1:100 bis zu 1:1000 überwunden werden. Sie führt zu einer Aufhebung der Inhibitionswirkung, während die verbleibende Menge an *V.dahliae*-DNA noch für eine Amplifikation ausreicht. Nach Ausschaltung der Inhibitoren durch Verdünnung musste die FIS gut amplifiziert werden. War dies der Fall und fehlte gleichzeitig eine Bande für die *V. dahliae*-DNA, dann wurde die Probe als negativ bewertet. Bei einer jetzt möglichen Amplifikation von DNA des Erregers wurde die Ausgangsmenge über den FIS errechnet. Mit dieser Analysensequenz konnte die Möglichkeit eines Befalls von Tomatenpflanzen durch *V. dahliae* sicher beurteilt und die DNA des Erregers zuverlässig bestimmt werden.

### 3.3.4 Quantifizierung in Wurzeln und Blättern

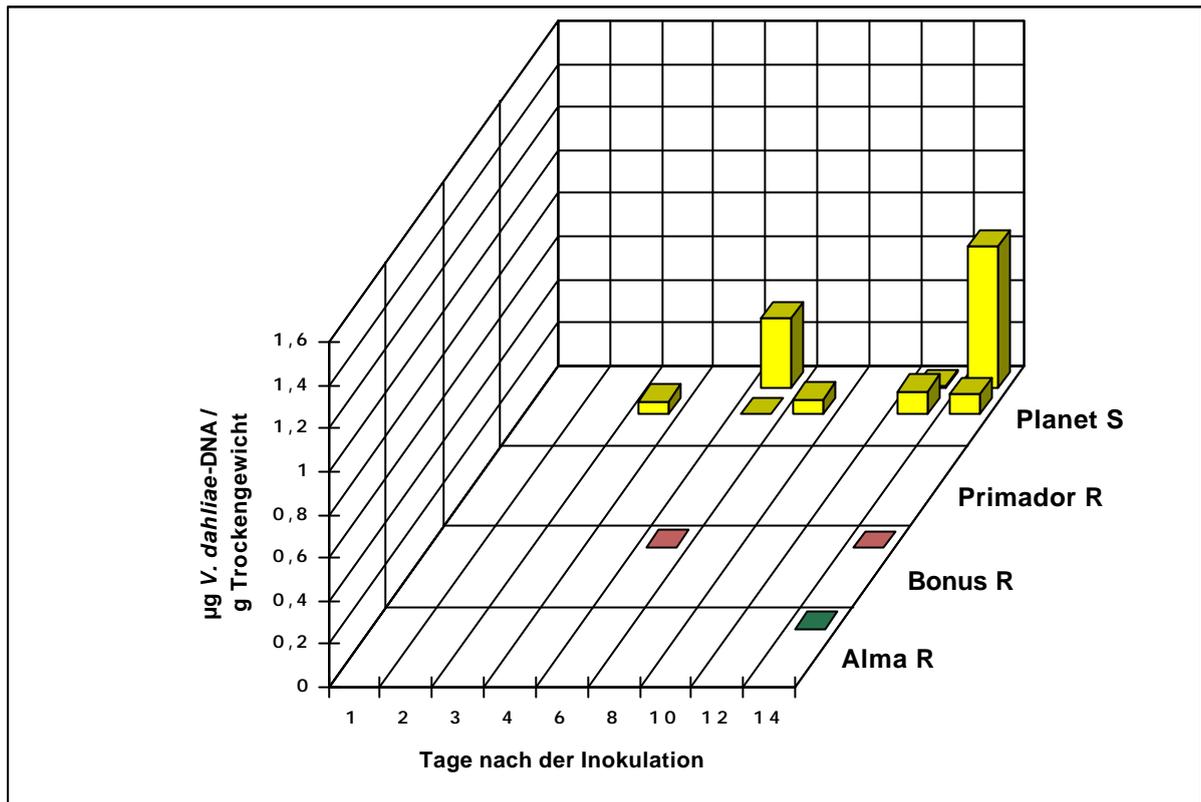
In den Wurzeln der Proben 1- 3 dpi variierte die *V. dahliae*-DNA von 5.0 bis 550 ng / g Trockengewicht ( Abb. 22). Der Welkeerregger war nicht in jeder der drei Proben pro Termin und Tomatesorte nachzuweisen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben des anfälligen cv. Planet und den drei resistenten Tomatensorten war nicht zu erkennen.



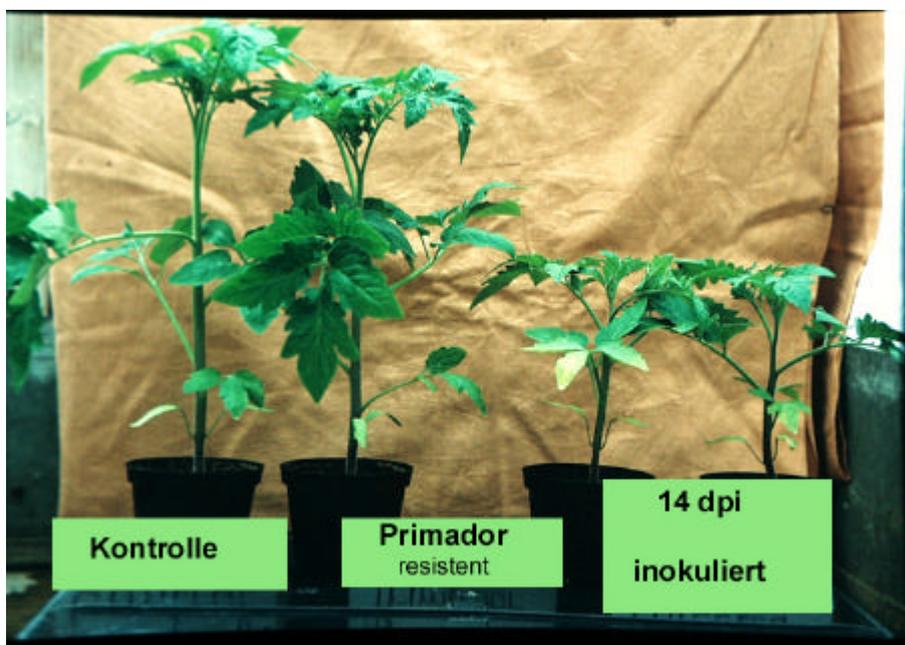
**Abb. 22 : *V. dahliae*-DNA in Wurzeln** anfälliger (S) und resistenter (R) Tomatensorten, 1 – 14 dpi ( für den 10. Tag nur jeweils 1 Pflanze analysiert).

Ab 4. dpi war die Menge an nachweisbarer DNA des Erregers in den Wurzeln resistenter Tomatensorten deutlich geringer, während sie in den Wurzeln des anfälligen cv. Planet erheblich höher war.

Bei der Analyse der Blattproben ergab sich ein anderes Bild ( Abb. 23). In den Proben resistenter Tomatensorten waren allen Terminen, wenn überhaupt, nur Spuren des Erregers nachzuweisen. In den Blattproben des anfälligen cv. Planet war *V. dahliae*-DNA in zwei der drei Proben ab 6. dpi deutlich vorhanden. Die Proben in denen keine *V. dahliae*-DNA nachgewiesen werden konnte waren eindeutig negativ (s. 3.2.3).



**Abb. 23** : *V. dahliae*-DNA im 1. Blatt anfälliger (S) und resistenter (R) Tomatensorten, 1 – 14 dpi ( für den 10. Tag nur jeweils 1 Pflanze analysiert).



**Abb. 24** : Wuchsstauchung des resistenten Tomaten cv. Primador durch *V. dahliae*, 14 dpi.

Trotz der deutlich geringeren Menge an *V. dahliae*-DNA in den Wurzeln und vor allem in den Blättern war die Wuchsstauchung des resistenten cv. Primador 14 dpi in gleicher Weise ausgeprägt wie bei dem anfälligen cv. Planet ( Abb. 19) und allen weiteren anfälligen Tomatensorten. Die am cv. Primador beobachtete Wuchsstauchung war auch bei den anderen resistenten Tomatensorten in gleicher Weise vorhanden.

## 4 Diskussion

Es gibt wichtige Fragestellungen bei denen der Welkeerreger *V. dahliae* in befallenen Pflanzenteilen quantifiziert werden muss. Wie entwickelt sich der Pilz nach dem Eindringen in Wurzeln in der Frühphase der Pathogenese vor dem Auftreten makroskopisch erkennbarer Symptome oder in Pflanzen mit verschieden hohem Abwehrpotential? In beiden Fällen kann nur eine präzise Ermittlung der pilzlichen Biomasse im befallenen Pflanzengewebe die erstrebte Aufklärung geben. Welche Verfahren stehen für diese notwendige Quantifizierung zur Verfügung?

Bei dem ältesten, mikrobiologischen Verfahren werden pflanzliche Gewebe, nach Oberflächensterilisation, zerkleinert und möglichst viele Teilstücke auf Agarmedien in Petrischalen ausgelegt. Anhand des Prozentsatzes bewachsener Pflanzenteilchen mit den typischen Konidienträgern und Konidien von *V. dahliae* ist eine gewisse Quantifizierung eines Befalls möglich (ELGERSMA *et al.* 1972, PEGG & STREET 1984, SCHLÖSSER 1997). Ebenso kann der Erreger durch licht- und elektronenmikroskopische Analyse des Xylems auf ein Vorhandensein von Pilzfäden bestimmt werden (ELGERSMA *et al.* 1972, NEWCOMBE & ROBB 1988). Diese Art der Auswertung ist aber arbeitsaufwendig und vor allem relativ unspezifisch, da Myzelfäden im Xylem nicht nur von *V. dahliae*, sondern auch von anderen Pilzen, wie z.B. den ubiquitären *Fusarium spp.* stammen können. Beide kommen nicht selten gemeinsam in einer Pflanze vor. Der Erreger kann auch anhand seiner Bestandteile Chitin oder Ergosterin durch chemische Analyse befallener Pflanzenteile quantifiziert werden. Beide kommen in Pflanzen nicht vor und sind daher ein zuverlässiger Indikator für einen Nachweis von Pilzen. Die Verfahren sind allerdings sehr aufwendig und vor allem unspezifisch, da beide Bestandteile in fast allen Pilzarten vorhanden sind (RIDE & DRYSDALE 1972, SEITZ *et al.* 1977).

Die Einführung immunologischer Methoden, speziell des ELISA, führte in eine neue Dimension hinsichtlich der Diagnose und Quantifizierung phytopathogener Erreger in befallenen Pflanzenteilen. Ein Vorteil dieser neuen Verfahren ist einmal die hohe Empfindlichkeit, die noch einen Nachweis sehr geringer Biomassen von Krankheitserregern ermöglicht. Noch höher ist die außerordentlich hohe Spezifität der serologischen Verfahren einzuschätzen. Sie ermöglicht es z.B. Erreger in Homogenaten befallener Gewebe ohne aufwendige Reinigungsschritte direkt zu messen. Analog dem klassischen Nachweis pflanzlichen Viren (CLARK & ADAMS 1977) quantifizierten CASPER & MENDGEN (1979) den Hyperparasiten *Verticillium lecanii* an Urediniosporen des Gelbrostes. In der

Folgezeit wurden nach der Entwicklung entsprechender Antiseren serologische Verfahren zur Bestimmung phytopathogener Pilze weltweit eingesetzt ( WERRES & STEFFENS 1994).

Polyklonale Antikörper ( PAb ) gegen *Verticillium* spp. wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen hergestellt und für diverse Fragestellungen verwendet (CASPER & MENDEN 1979, STRUNNIKOVA & MUROMTSEV 1987, GERIK *et al.* 1987, GERIK & HUISMAN 1988). Sie wurden nach der klassischen Methode über eine Immunisierung von Kaninchen gewonnen. PAb können aber auch über eine Immunisierung von Hühnern produziert werden. ( PATTERSON *et al.* 1962, JENSENIUS *et al.* 1981 ). Hierbei können große Mengen von PAb aus dem Eidotter gewonnen werden, da die vom Huhn produzierten Antikörper über einen langen Zeitraum in die Eier eingelagert werden (BLAMBELL 1970).

Dieses Verfahren hat den Vorteil „unblutig“ zu sein und eine Gewinnung großer Mengen von PAb zu ermöglichen, wie sie z.B. für eine Züchtung krankheitsresistenter Kulturpflanzen notwendig wären. Der Titer an PAb ist dabei meist deutlich höher als bei einer Immunisierung von Kaninchen (PATTERSON *et al.* 1962, ROSE *et al.* 1974).

FORTNAGEL & SCHLÖSSER (1996) haben PAb aus Hühnereiern gewonnen, mit denen *V. dahliae* sehr spezifisch nachgewiesen werden konnte. Es wurde auch versucht monoklonale Antikörper (MAb) gegen *V. dahliae* in Verbindung mit einem ECL-Western blotting System zu gewinnen ( FORTNAGEL & SCHLÖSSER 1992). Da es nicht gelang große Mengen an MAb zu produzieren, wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt. Trotz hoher Qualität und einer mit anderen Antikörpern vergleichbaren Empfindlichkeit waren die PAb und MAb ganz allgemein nicht geeignet sehr geringe Biomassen von *V. dahliae* in nachweisbar befallenen Pflanzen sicher und zuverlässig nachzuweisen ( FORTNAGEL 1994). Sie konnten daher nicht für die grundlegenden Fragestellungen „Frühphase der Pathogenese“ bzw. „Frühselektion resistenter Pflanzen“ verwendet werden. Das hierfür notwendige Verfahren musste bei gleicher Spezifität noch eine deutlich höhere Empfindlichkeit haben, um die geringen Mengen von *V. dahliae* in den befallenen Pflanzenteilen sicher quantifizieren zu können.

Waren in befallenen Pflanzen aber größere Mengen an Biomasse von *V. dahliae* vorhanden , dann konnte mit ELISA eine gewisse Quantifizierung des Erregers erfolgen. So z.B. über indirekt kompetitiven ELISA mit MAb in Kartoffeln (PLASENCIA *et al.* 1996). CERNUSKO & WOLF konnten 14 dpi in künstlich inokulierten Rapspflanzen *V. dahliae* über direkten ELISA mit PAb nachweisen und die Pflanzen in hoch oder niedrig befallen klassifizieren. Im Vergleich zur Bonitur von Freilandprüfungen ist ein indirekter ELISA mit PAb eine sehr gute Alternative, um quantitative Einstufungen der Anfälligkeit von

Rapspflanzen gegen *V. dahliae* vornehmen zu können (KONTOWSKI *et al.* 1995, KONTOWSKI 1998)

Die kodeartige und doppelhelikale Struktur der DNA haben die Methodik zur Identifizierung und Quantifizierung von Pflanzenpathogenen stark beeinflusst. So wurden *Phytophthora cinnamomi* (JUDELSON & MESSENGER-ROUTH 1996) und der zur Ektomykorrhiza zählende *Pisolithus tinctorius* (CARNERO-DIAZ *et al.* 1997) über DNA-Hybridisierung mit artspezifischen, radioaktiv markierten [ $\alpha^{32}\text{P}$ ], DNA-Sonden quantifiziert. Einen erheblichen Fortschritt brachte die PCR. Nachdem die thermostabile *Taq*-Polymerase zur allgemeinen Verfügung stand wurde diese Methode in allen Bereichen der Biologie angewandt, zuerst nur zur Identifizierung, dann aber auch zur Quantifizierung. In der Phytopathologie haben erstmals HU *et al.* (1993) eine kompetitive PCR benutzt, um genomische DNA von *V. albo-atrum* an Luzerne und *V. dahliae* an Sonnenblumen zu quantifizieren. Dazu wurden artspezifische Primer entworfen und ein interner Standard zur Effizienzkontrolle der Amplifikation konstruiert. Von der gleichen Arbeitsgruppe wurden *V. dahliae* (ROBB *et al.* 1994) und *V. tricorpus* (MOUKHAMEDOV *et al.* 1994) an Kartoffeln quantifiziert. Weitere mit quantitativer PCR bestimmte Krankheitserreger im befallenen Pflanzenteilen sind: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* an Kartoffeln und Auberginen (HU *et al.* 1995), *Microdochium nivale* var. *nivale* und *Microdochium nivale* var. *majus* an Winterweizen (NICHOLSON *et al.* 1996), sowie *Fusarium graminearum* und *F. culmorum* an Winterweizen und Wintergerste (NICHOLSON *et al.* 1998) und *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* an Kartoffelknollen (HYMAN *et al.* 2000). Aufgrund der hohen Spezifität und der gegenüber ELISA um den Faktor 100 höheren Empfindlichkeit ist die PCR für die Phytopathologie ein hervorragend geeignetes Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Krankheitserregern *in planta*. Da für unsere Untersuchungen von *V. dahliae* an Tomaten ELISA nicht hinreichend empfindlich war wurde geprüft, ob der Erreger in unserem Wirt-Pathogen-System mittels PCR sich quantifiziert werden kann.

Der Entwurf geeigneter Primer ist eine Grundlage jeder PCR. LI *et al.* (1994) benutzen das Gen für mitochondriale SSU (small subunit) rRNA für eine Differenzierung von *Verticillium* spp.. Mit einem Paar der entworfenen Primer konnte *V. dahliae* von *V. albo-atrum* und *V. tricorpus* unterscheiden werden. Seit Mitte der 80iger Jahre wurden Gensequenzen von ribosomaler RNA besonders attraktiv für phylogenetische Untersuchungen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen. Als Ziel für eine spezifische PCR wurde meistens das Gen für die 5.8S rRNA mit den flankierenden „internal transcribed spacers“ (ITS1 und ITS2) gewählt. Während dieses Gen bei den verschiedenen Gattungen konserviert ist, unterscheiden sich die

ITS1 und ITS2 der verschiedenen Arten einer Gattung (WHITE *et al.* 1990) und können daher für eine artspezifische Differenzierung als Primer für eine spezifische PCR bzw. als DNA-Sonden zur DNA-Hybridisierung verwendet werden. Das 5.8S rRNA Gen befindet sich in wiederholten Folgen, zusammen mit den anderen rRNA Genen von 18S - und 28S RNA, in der nuklearen DNA von Eukaryonten-Zellen (KNIPPERS *et al.* 1990). Diese Wiederholungen sind ein Vorteil für die PCR, da in einer einzigen Zelle die Matrizen-DNA über 100mal vorhanden sein kann. So wurden z.B. für *Saccharomyces cerevisiae* 140 Wiederholungen berichtet (LEWIN 1994).

NAZAR *et al.* (1991) haben die ITS1 und ITS von *V. dahliae* und *V. albo-atrum* sequenziert und deutliche, artspezifische Unterschiede gefunden. Mit den gewählten Primern konnten die beiden Arten in einer spezifischen PCR unterschieden werden. ROBB *et al.* (1993) haben dazu ein Primerpaar mit jeweils 30 Nukleotiden entworfen. Die ITS1 und ITS2 sowie das Gen für 5.8S r RNA wurden von MORTON *et al.* (1995) für insgesamt 38 Isolate von *V. dahliae* (haploid und diploid), *V. albo-atrum* und *V. tricorpus* sequenziert. Für die vorliegende Arbeit wurden die Primer auf der Basis von ROBB *et al.* (1993) und MORTON *et al.* (1995) entworfen. Da sich die Annealingtemperatur (Atp) von 60°C für eine spezifische Anlagerung der 30mer Primer als zu niedrig erwies wurden neue, kürzere Primer entwickelt, die bei einer Atp von 60°C eine zufriedenstellende Amplifikation ermöglichen sollten. Unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien (s. 3.1.1.1) wurden ein 22mer „upstream“ Primer (VdP1) aus ITS1 und ein 20mer „downstream“ Primer (VdP2) aus ITS2 anhand von 9 Sequenzen verschiedener *Verticillium* spp. ausgewählt. Für *V. dahliae* und *V. albo-atrum* gab es bei VdP1 drei unterschiedliche Nukleotide und bei VdP2 mindestens einen Unterschied. Für *V. dahliae* und *V. tricorpus* gab es an mehreren Stellen unterschiedliche Nukleotide (s. 3.1.1.1). Bei einer Atp von 60°C waren nach spezifischer PCR mit den beiden Primern VdP1 und VdP2 fünf verschiedener Arten von *Verticillium* gleichermaßen amplifiziert. Bei einer Erhöhung der Atp auf 61°C war neben *V. dahliae* noch *V. tricorpus* mit einer schwachen Bande amplifiziert. Erst bei einer Atp von 62°C war nur noch *V. dahliae* identifizierbar. Bei keinem der fünf geprüften Stämme von *V. tricorpus* war nach Gelelektrophorese eine Bande zu erkennen. Damit war eine optimale Identifizierung von *V. dahliae* erreicht. Für die späteren Untersuchungen von Tomatenpflanzen wurde aber trotzdem eine Atp von 60°C gewählt. Einmal war in dem System mit künstlicher Inokulation keine Interferenz von anderen *Verticillium* spp. zu erwarten, zum anderen ist bei dieser Temperatur die Amplifikation deutlich stärker ausgeprägt als einer Atp von 62°C. In der Praxis ist die Effizienz der Reaktion

deutlich geringer als der theoretisch erwartete Wert von 1. Daher kann die Amplifikatmenge  $Y$  mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$Y_n = K \cdot (1+E)^n$$

mit  $Y_n$  : Menge an Amplifikat nach  $n$  Zyklen  
 $K$  : Anfangskonzentration der Matrizen-DNA  
 $n$  : Anzahl der Reaktionzyklen  
 $E$  : Effizienz der Reaktion

Die Effizienz der Reaktion bleibt aber nur für eine begrenzte Anzahl von Zyklen konstant. Nur in diesem Bereich ist eine Quantifizierung möglich, da in dieser Phase die Menge des Amplifikates direkt proportional der Ausgangsmenge an Matrizen-DNA ist. Nach dieser exponentiellen Phase erreicht die Reaktion ein Plateau, wo das Amplifikat nicht proportional gebildet wird ( FERRE 1992, MERZ *et al.* 1993, PILARSKY & FLACH 1994). Viele Protokolle von kompetitiver PCR am Anfang der 90iger Jahre sind mit 30-50 Zyklen gelaufen ( HU *et al.* 1993, ZIMMERMANN & MANNHALTER 1996). Spätere Untersuchungen wurden mit 25 (NICHOLSON *et al.* 1998) bzw. 26 Zyklen (SOUAZÉ *et al.* 1996) durchgeführt. Welcher Zyklenbereich ist optimal für einen großen Bereich an Ausgangsmengen von Matrizen-DNA? Die Entwicklung sogenannter LightCycler erlaubt eine kontinuierliche Messung von Amplifikatsmengen während des Reaktionsverlaufes. Bei der Reaktion in Glaskapillaren wird mit einem Lichtdetektor ein bereits markiertes Amplifikat gemessen. Die Markierung erfolgt auf verschiedene Weise, so z.B. mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green (ANONYM 1998, RASMUSSEN *et al.* 1998). Mit dieser technischen Innovation konnte nachgewiesen werden, dass eine Anzahl von 25 Zyklen für einen großen Bereich von Matrizen-DNA geeignet ist. Bei der vorliegenden Arbeit wurden auf Empfehlung von Prof. Dr. G. HOBOM (Gießen) generell 27 Zyklen durchgeführt.

Nach dem allgemeinen Prinzip der PCR wird die eingesetzte Menge an Matrizen-DNA, im vorliegenden Fall das 5.8S rRNA Gen von *V. dahliae* mit den flankierenden ITS1 und ITS2, mit jedem Zyklus verdoppelt. Es ist daher möglich die Ausgangsmenge an DNA zu bestimmen, solange der Zusammenhang zwischen Zyklenzahl und Amplifikatmenge linear ist. Diese theoretische Beziehung ist aber meistens nicht gegeben, denn es gibt eine Reihe von Faktoren, die für Effizienzunterschiede bei der Amplifikation verantwortlich sein können:

- Länge der Matrizen-DNA, kürze DNA-Fragmente lassen sich in der Regel mit höherer Effizienz amplifizieren
- Primerlänge und -sequenz
- Suboptimale Konzentration einzelner Komponenten in der Reaktionsmischung
- Materialunterschiede bei den Reaktionsgefäßen
- Pipettierungsungenauigkeiten
- Temperaturschwankungen zwischen den Thermozyklerstellen
- Inhibitoren der *Taq*-Polymerase in Proben von biologischen Material.

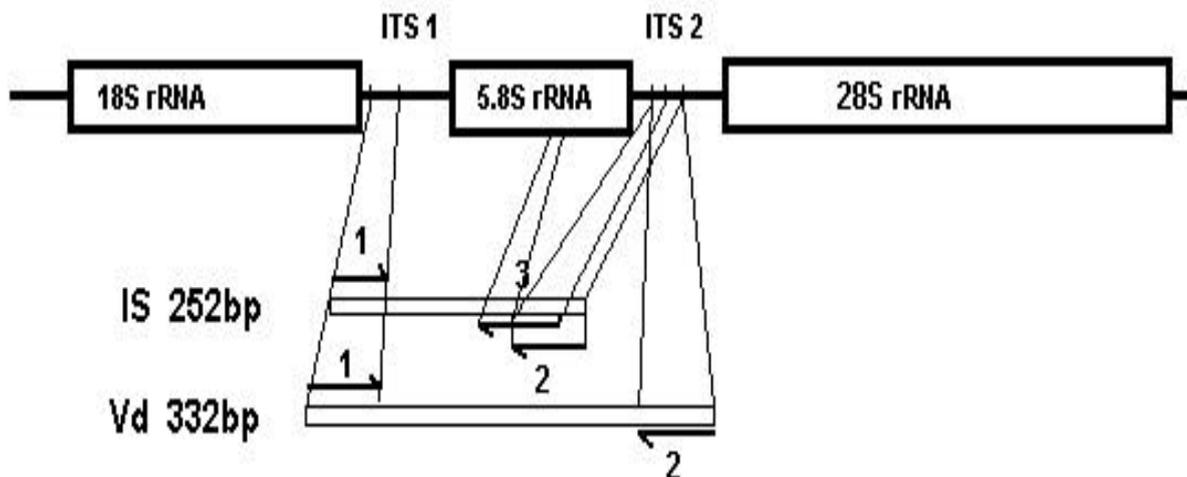
Die meisten dieser Faktoren sind nicht vorhersehbar (HAGEN-MANN & MANN 1994). Um eventuelle Schwankungen ausgleichen zu können wird bei der PCR eine bekannte Menge einer DNA-Sonde als interner Standard (IS) eingesetzt. Er muss mit der Matrizen-DNA und koamplifizierbar sein. Hierfür müssen die 5'- und 3'- Enden des IS mit denen der Matrizen-DNA identisch sein. Beide DNA-Sonden konkurrieren während der Amplifikation. Ist eine der beiden zu Beginn der Reaktion in einem deutlichen Übergewicht vorhanden, so wird nur diese amplifiziert. Für die andere DNA- Sonde erscheint kein Amplifikat. Daraus folgt, dass Matrizen-DNA und der IS in einem konkurrenzfähigen Verhältnis vorhanden sein müssen, dass eine erfolgreiche Koamplifikation beider zulässt. Dieser Art des Reaktionsablaufes wird als kompetitive PCR bezeichnet. Anhand von Eichkurven mit unterschiedlichen Mengen an Matrizen-DNA und bestimmten Mengen des IS ist eine zuverlässige Quantifizierung der ursprünglichen DNA-Menge einer Probe möglich.

HU *et al.* (1993) haben versucht den gewünschten IS über eine Transformation des 332bp Amplifikates von *V. dahliae* mit Hilfe des Plasmids pBR322 zu konstruieren. Dieser Versuch wurde auch in der vorliegenden Arbeit mit dem Plasmid pUC18 unternommen. In beiden Fällen gab es das gleiche unbefriedigende Resultat. Bei einer kompetitiven PCR mit den beiden Primern VdP1 und VdP2 wurde der IS zwar amplifiziert, es war aber neben den beiden Banden für die *V. dahliae*-DNA und den IS noch eine dritte Bande von etwa 400bp vorhanden. Nach HU *et al.* (1993) handelt es wahrscheinlich um eine Hybride der beiden anderen Banden. Nach diesem Befund ist das transformierte Produkt nicht als IS geeignet.

Oft wird versucht den IS für eine kompetitive PCR aus dem Genom einer nicht verwandten DNA zu entwickeln. HU *et al.* (1993) haben bei einer unspezifischen Atp von 42°C DNA von *Fusarium oxysporum* amplifiziert und erfolgreich als IS für eine Quantifizierung der *V.dahliae*-DNA verwendet. In eigenen Untersuchungen wurde die DNA von 10 Isolaten des Welkeerreger *Fusarium oxysporum* von Sojabohnen auf ihre Eignung als IS geprüft. Bei

einer unspezifischen Atp zwischen 38-42°C wurde mit den Primern VdP1 und VdP2 bei einem Isolat eine Bande von etwa 230bp amplifiziert. Trotz vielfältiger Bemühungen war es nicht möglich diese Bande als reines Produkt zu isolieren, um dieses Amplifikat als IS verwenden zu können. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

Eine andere Möglichkeit besteht nach FÖRSTER (1994) darin mit einem sogenannten „linker primer“ eine etwas verkürzte DNA-Matrize zu konstruieren, die dann als IS koamplifiziert werden kann. NICHOLSON et al. (1996) haben diese Technik zur Konstruktion eines IS für die kompetitive PCR des Pilzes *Microdochium nivale* von Winterweizen erfolgreich eingesetzt. Diese erfolgversprechende Technik wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwandt (s. 3.1.3.3). Aus dem amplifizierten 332bp des 5.8S rRNA Gens von *V. dahliae* wurde eine verkürzte DNA-Matrize von 252bp konstruiert (Abb. 25).



**Abb. 25:** Anordnung des rRNA Gens von *V. dahliae* in Richtung der Transkription: 18S-, ITS 1, 5.8S-, ITS 2, 28S.

- Vd 332bp : Ziel-DNA
- 1, 2 : Primer VdP1 und VdP2
- 3 : 3' linker primer
- IS 252bp : Interner Standard

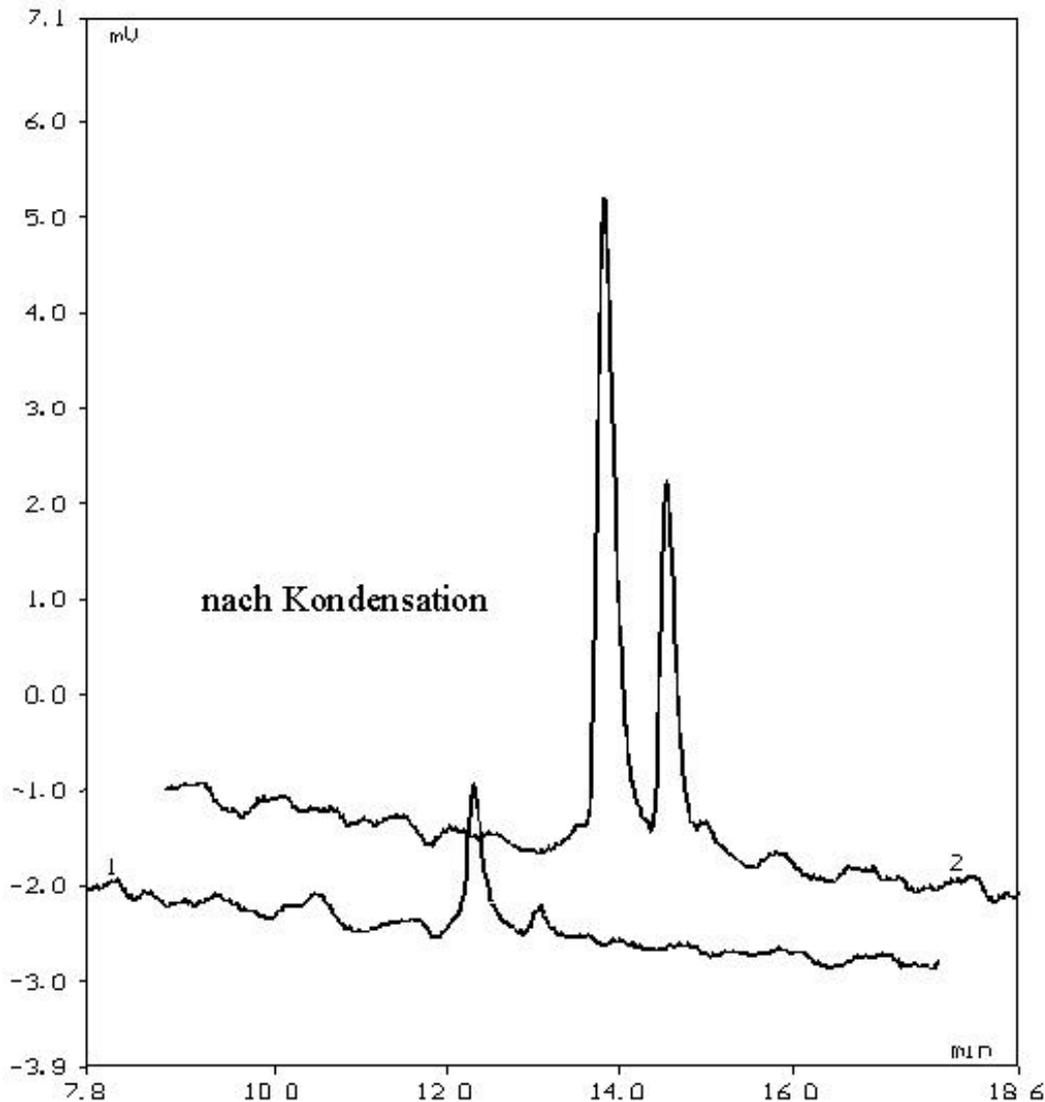
Bei kompetitiver PCR erfüllte dieses Produkt mit 252bp alle Bedingungen für einen erfolgreichen Einsatz als IS. Da es nach FÖRSTER (1994) konstruiert worden war, wurde es nachfolgend als FIS bezeichnet.

Es gibt mehrere Möglichkeiten die durch PCR gewonnen Amplifikate zu quantifizieren. Anfang der 90iger Jahre wurden sie mit  $^{32}\text{P}$  markiert und nach Gelelektrophorese ihre Beta-Strahlung bestimmt. Entweder direkt durch Ausschneiden der Banden und Messung ihrer Radioaktivität in einem Scintillationszähler oder indirekt durch Auflegen eines radioaktiven Films auf die Banden mit anschließender densitometrischer Messung (FERRE 1992, HU et al.

1993, MOUKHAMEDOV *et al.* 1994, ROBB *et al.* 1994, JUDELSON & MESSENGER-ROUTH 1996, CARNERO-DIAZ *et al.* 1997). NICHOLSON *et al.* (1996, 1998) haben die nicht radioaktiv markierten Amplifikate nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung densitometrisch vermessen. Daneben wurden verschiedene Techniken einer „kalten“ Markierung der Amplifikate, z.B. mittels Digoxigenin, Biotin, Chemolumineszenz, enzymatisch katalysierten Farbreaktionen, geprüft (HAGEN-MANN & MANN 1994).

Eine direkte Detektion und Quantifizierung von PCR-Amplifikaten kann auch ohne weitere Bearbeitung der Reaktionsprodukte über HPLC erreicht werden (KATO *et al.* 1989, KATZ & HAFF 1990, HAGEN-MANN & MANN 1994). Dieses Verfahren hat gegenüber der üblichen Darstellung und Auswertung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese mehrere Vorteile:

- Direkte Analyse der PCR-Produkte ohne weitere Bearbeitung.
- Keine zusätzliche Markierung der Reaktionsprodukte, da die UV-Absorption der DNA selbst gemessen wird.
- Höhere Empfindlichkeit des Nachweises.
- Bessere Reproduzierbarkeit der Analysen.
- Größere Trennungskapazität.
- Die analysierten Produkte können nach UV-Detektion direkt weiter verwendet werden. z.B. als Sonden, zur Sequenzierung oder Klonierung.



**Abb. 26:** Verbesserte HPLC-Analyse durch Kondensation der Amplifikate nach Reduzierung (10:1) der PCR-Reaktionsflüssigkeit (Darstellung der kondensierten Amplifikate nach rechts versetzt).

Von besonderem Interesse ist die Möglichkeit einer Reduzierung der Reaktionsflüssigkeit nach Ablauf der PCR. Durch die Kondensation der Amplifikate können sehr viel geringere Mengen detektiert und gemessen werden (Abb. 26). Mit diesem einfachen Schritt kann die Empfindlichkeit des Nachweises beträchtlich gesteigert werden.

Aufgrund der deutlichen Vorteile wurde in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit einer HPLC-Analyse der Amplifikate geprüft ( ASPROMOUGOS & SCHLÖSSER 2000). Zunächst wurde ein Protokoll für die Trennung der amplifizierten Produkte einer kompetitiven PCR erarbeitet. Im Vergleich zu einem densitometrischen Scanning der Ethidiumbromid-Banden ( $r^2$ : 0,86) erwies sich die Auswertung der Peakflächeninhalt nach HPLC ( $r^2$ : 0,99) als überlegen. Bei Koamplifikation verschiedener Mengen von *V. dahliae*

und bestimmten Konzentration von FIS pro PCR-Ansatz ergaben sich folgende lineare Beziehungen für eine Quantifizierung der Amplifikate:

<i>V.dahliae</i> -DNA ng	FIS pg	r <sup>2</sup> von Regressionsanalyse
0,0001 – 0,01	0.25	0.993
0.001- 1.0	2.5	0.999
0.005 - 10	25	0.999

Dies bedeutet, dass *V. dahliae*-DNA in den Mengen zwischen 0,0001 und 10 ng sicher quantifiziert werden kann. Damit steht ein sehr empfindlicher Nachweis für *V. dahliae*-DNA zur Verfügung.

Eine künstliche Inokulation von Pflanzen mit bodenbürtigen Pilzen verläuft zumeist in folgenden Schritten: Entnahme der Pflanze aus dem Boden, Entfernung der Erde oder des Substrates von den Wurzeln durch intensives Waschen, Eintauchen der Wurzeln in eine Konidiensuspension und Wiedereinpflanzen in Boden. Dieses Verfahren hat mehrere Nachteile. Einmal stellt es einem erheblichen Stressfaktor für die zu inokulierenden Pflanzen dar, zum anderen ist es arbeits- und zeitaufwendig. Schwerwiegend ist auch, dass eine gleichmäßige Dosierung des Inokulums für jede Pflanze kaum zu erreichen ist. Das Wiedereinpflanzen bewirkt in der Regel einen Wachstumsschock von 4-7 Tagen. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen wurde eine andere Inokulationsmethode gewählt. Sie ist die verbesserte Version eines Verfahrens zur Inokulation junger Citrusbäume mit *Deuterophoma tracheiphila* (ASPROMOUGOS & CHITZANIDIS 1992). Zur Inokulation im 3. – 4. Blattstadium bleiben die jungen Tomatenpflanzen im Boden und werden durch Injektion einer Konidiensuspension von *V. dahliae* inokuliert (s. 2.2.1). Durch diese schonende und sehr genau steuerbare Inokulation werden alle vorstehend beschriebenen Nachteile des konventionellen Verfahrens vermieden. Leider hat diese Art der Applikation von *V. dahliae*, wie auch bei der konventionellen Inokulation üblich ist, zu einem ungleichmäßigen Befall geführt. Bei allen Tomatensorten waren neben deutlich befallenen Pflanzen auch solche vorhanden, in denen der Welkeerreger nicht nachweisbar war. Die Inokulationsmethodik müsste also noch weiter optimiert werden. Trotz dieser Einschränkung war der Infektionserfolg aber ausreichend, um die Fragen hinsichtlich der Verwendbarkeit der DNA-Analyse zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *V. dahliae* in befallenen Tomatenpflanzen sicher beurteilen zu können.

Für die Untersuchungen zur DNA-Analytik wurde überwiegend reines Myzel von *V. dahliae* verwendet. Bei einem Nachweis des Erregers *in planta* muss die mögliche Anwesenheit von Inhibitoren der *Taq*-Polymerase berücksichtigt werden, die die Aktivität dieses Enzyms teilweise oder sogar vollständig unterbinden können. Solche Inhibitoren wurden z.B. in Sonnenblumen und Kartoffeln gefunden (HU *et al.* 1993, ROBB *et al.* 1994). In fast allen Wirt-Pathogen-Systemen ruft Pilzbefall einen Ausstieg des Gehaltes verschiedener phenolischer Verbindungen hervor, so auch in Tomatenpflanzen nach Befall mit *V. dahliae* (BECKMAN 1987). Daher vermuten HU *et al.* (1993), dass es sich bei den PCR-Inhibitoren um Phenole handelt. Da sie zu falsch-negativen Ergebnissen führen können, muss ihre Wirkung sicher ausgeschaltet werden. Dazu wurden verschiedene Techniken bei oder nach der DNA-Extraktion genutzt. PICARD *et al.* (1992) entfernten phenolische Verbindungen durch dreimalige Reinigung über HPLC, VOLOSSIOUK *et al.* (1995) neutralisierten die Inhibitoren in Bodenproben durch Milchpulver. BERTEAU (persönliche Mitteilung 1998) hat die störenden Hemmstoffe durch Zugabe von Silikatpartikeln bei der DNA-Extraktion ausgeschaltet. Sie wurden so fest adsorbiert, dass eine Hemmwirkung vollkommen unterbunden war. In der vorliegenden Arbeit wurde folgender Weg zur Eliminierung der Inhibitorwirkung gewählt. Bei dem negativen Ergebnis in einer kompetitiven PCR wurde die Probe mit Wasser 1:10, 1:100 bis 1:1000 verdünnt. Dies führt zu einer Aufhebung der Inhibitorwirkung eines DNA-Extraktes, während die verbleibende Menge an DNA noch für eine Amplifikation ausreicht. Bei einer erneuten kompetitiven PCR der verdünnten Probe musste der FIS jetzt gut amplifiziert werden. War dies der Fall und war gleichzeitig keine Bande für *V. dahliae* vorhanden, dann wurde die Probe endgültig als negativ bewertet. Alle bei der Untersuchung pflanzlicher Proben angefallenen negativen Befunde hinsichtlich *V.dahliae*-DNA wurden mit dieser Methodik überprüft.

Bei der Untersuchung von Wurzelproben waren bis 3 dpi bei anfälligen und resistenten Tomatensorten keine Unterschiede hinsichtlich *V. dahliae*-DNA zu erkennen. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund von HU *et al.* (1993) überein, wonach es bei Isolinen von Tomaten keine Resistenzexpression gegenüber *V. dahliae* außerhalb des Xylems gibt (HUTSON & SMITH 1983). Dass der Erreger überhaupt nachweisbar war beruht wahrscheinlich auf seiner starken Koloniebildung auf Wurzeloberflächen. Diese oberflächigen Infektionsstellen kommen anscheinend einige tausendmal häufiger vor als eine systemische Infektion nach erfolgreicher Penetration des Xylems (HUISMAN 1982). In der vorliegenden Untersuchung nahm der Gehalt an *V. dahliae*- DNA in der Wurzeln der drei

resistenten Tomatensorten nach 4 dpi kontinuierlich ab. Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass hier nicht bestimmte Abwehrmechanismen eine Vermehrung des Erregers im Wurzelgewebe und eine systemische Infektion des Xylems weitgehend verhindert haben. Der gelegentliche Nachweis des Erregers in Wurzelproben aus der Periode 4-14 dpi dürfte auf eine erneute Wurzelbesiedlung durch das im Boden noch vorhandene Inokulum zurückzuführen sein. In den Wurzeln des anfälligen cv. Planet war ab 4 dpi ein Gehalt an *V. dahliae*-DNA nachzuweisen, der erheblich über dem vor 4 dpi lag. Es hatte demnach in der Wurzeln eine deutliche Vermehrung des Welkeerregers stattgefunden, wahrscheinlich mit einer Invasion des Xylems. Im ersten Blatt der drei resistenten Tomatensorten war der Welkeerregers, von Spuren abgesehen, nicht nachzuweisen. Das erste Blatt des anfälligen cv. Planet enthielt dagegen ab 6 dpi deutlich nachweisbare Mengen an *V. dahliae*-DNA. Der Erreger hatte also das Blattgewebe besiedelt. Diese Befunde der Wurzel- und Blattanalysen entsprechen dem für die vier Tomatensorten deklarierten Verhalten gegenüber *V. dahliae*. Der Widerstand gegenüber dem Welkeerregers kann auf einer innerhalb von 4 dpi ausgeprägten Bildung von Lignitubern im Kortextbereich beruhen (HUTSON & SMITH 1983), die ein weiteres Vordringen des Welkeerregers bis ins Xylem unterbinden. TJAMOS & SMITH (1975) vermuten eine Hypersensitivitätsreaktion im Bereich der Rhizodermis- und Kortextzellen. Darüber hinaus könnten noch andere Komponenten der Abwehrkaskade (SCHLÖSSER 1997) an der Resistenzprägung beteiligt sein.

Makroskopisch erkennbare Symptome eines erfolgreichen Befalls waren 14 dpi bei dem anfälligen cv. Planet eine beträchtliche Wuchsstauchung sowie eine, im Vergleich zu nicht inokulierten Kontrollepflanzen, deutlich verstärkte Gelbfärbung der älteren Blätter. Welkesymptome waren nicht zu erkennen. Überraschenderweise waren diese Symptome bei allen drei resistenten Tomatensorten in gleicher Weise ausgeprägt, obwohl der Erreger im Wurzel- und Blattgewebe nur in sehr geringem Maße nachweisbar war, d.h. offensichtlich keine signifikante Vermehrung des Erregers *in planta* stattgefunden hatte. Es muss betont werden, dass diese negativen Befunde nicht auf falsch-negativen Ergebnissen der PCR beruhen, die durch eine spezielle Methodik ( s. 3.3.3) ausgeschlossen werden konnten. Eine mögliche Erklärung könnte eine Bildung von Tylosen sein (SCHLÖSSER 1997). Diese als Abwehrreaktion gebildeten plasmatischen Ausstülpungen im Xylem verringern den Wasser- und damit auch den Nährstofftransport in Pflanzenteile oberhalb des Verschlusses. Die dadurch entstehende Unterversorgung kann zu der beobachteten Wuchsstauchung führen. Dies bedeutet, dass die Schädigung zwar durch den Erreger ausgelöst wird, aber ganz überwiegend eine Folgeerscheinung der pflanzlichen Abwehrreaktion ist. Diese Interpretation

beruht auf der Annahme, dass der Erreger auch in resistenten Pflanzen das Xylem erreichen und eine Tylosenbildung auslösen kann (BECKMAN 1987). Die bei anfälligen und resistenten Tomatenpflanzen gleichermaßen aufgetretene Wuchsstauchung könnte darauf beruhen, dass aufgrund einer zu hohen Inokulumdichte der Befallsdruck zu stark war. Bei dem massiven Angriff könnten einzelne Pilzindividuen, trotz aller Abwehrreaktionen, das Xylem erreichen und eine Tylosenbildung verursachen, die dann zur beobachteten Wuchsstauchung führen könnte. Bei einem natürlichen, weitaus geringeren Befallsdruck könnten alle eindringenden Erreger durch Abwehrreaktionen im Rhizodermis- und Kortextbereich so abgefangen werden, dass sie das Xylem nicht erreichen können. Eine Tylosenbildung unterbleibt, es kommt zu keiner Wuchsstauchung. Gegenüber *V. dahliae* resistente Tomatensorten würden sich unter solchen Befallsbedingungen in ihrem Habitus nicht von nicht inokulierten Pflanzen unterscheiden.

Mit dem in der vorliegenden Arbeit erstellten Protokoll zur kompetitiven PCR mit nachfolgender Quantifizierung der Amplifikate durch HPLC kann *V. dahliae*-DNA bis zu 0,1 pg bestimmt werden. HU *et al.* (1993) berichten von nachweisbaren Mengen dieses Erregers niedriger als 1 pg. Die DNA von *Microdochium* spp. und *Fusarium* spp. *in planta* konnte ab 1 pg gemessen werden (NICHOLSON *et al.* 1998).

Dieses hochempfindliche Verfahren einer kompetitiven PCR im Kombination mit HPLC eignet sich daher für einen sicheren Nachweis sehr geringer Mengen an Biomasse des Welkeerregers, die mit ELISA nicht erfasst werden können. So wurde der Anstieg der *V.dahliae*-DNA auf 1.0- 1.5 µg DNA / g Wurzeltrockengewicht des anfälligen Tomaten cv. Planet eindeutig als Vermehrungsschritt des Erregers *in planta* gemessen. Damit ist eine Analyse des Welkeerregers in der Frühphase der Pathogenese möglich, Resistenzunterschiede können wenige Tage nach einer künstlichen Inokulation erkannt werden. Dieses Verfahren ist so empfindlich, dass bei Verwendung nur eines Teiles des Wurzelwerkes eine Bestimmung der Resistenzeigenschaften einzelner Pflanzen aus besonderen Kreuzungen gegenüber bodenbürtigen Erregern möglich erscheint. Mit dem verbleibenden Wurzelwerk könnten wertvolle Einzelpflanzen weiter kultiviert werden. Die Prüfung könnte, ohne Zerstörung der Pflanzen, jederzeit wiederholt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Verfahren zur Quantifizierung geringer Biomasse von *V. dahliae in planta* zu entwickeln, wurde erreicht. Es bleiben aber noch einige offene Punkte:

- Optimierung der Inokulationsmethode, um einen möglichst gleichmäßigen Befall aller Pflanzen zu erreichen.
- Verbesserung der DNA-Extraktion hinsichtlich eines sicheren Ausschlusses pflanzlicher Inhibitoren der *Taq*-Polymerase.
- Konstruktion von Primern mit höherer Spezifität, die *V. dahliae* von anderen *Verticillium* spp. eindeutig diskriminieren können.

Trotz dieser Punkte kann das entwickelte Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *V. dahliae* bereits jetzt in der Resistenzzüchtung, der Epidemiologie und bei Untersuchungen der Pathogenese angewandt werden.

## 5 Zusammenfassung

Da die sehr geringe Biomasse des Welkeerregers *Verticillium dahliae* in der Frühphase der Pathogenese in jungen Tomatenpflanzen mit ELISA nicht quantifiziert werden kann wurde die Möglichkeit einer molekularbiologischen Analyse geprüft. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt.

- Anhand der DNA-Sequenzen von 9 verschiedenen *Verticillium* spp. wurden aus dem ITS1 ein 22mer „upstream“ Primer (VdP1) und aus dem ITS2 ein 20mer „downstream“ Primer (VdP2) konstruiert.
- In einer spezifischen PCR mit den beiden Primern und einer Annealingtemperatur von 62°C erfolgt eine Amplifikation der *V. dahliae*-DNA. Unter den gleichen Bedingungen wurde die DNA von *V. albo-atrum*, *V. lecanii*, *V. nigrescens* und *V. tricorpus* nicht amplifiziert.
- Für eine Effizienzkontrolle der PCR wurde mittels eines „3′ linker primer“ ein interner Standard (FIS) konstruiert. Dabei wurde das amplifizierte 332bp des 5.8S rRNA Gens von *V. dahliae* zu einer DNA-Matrix von 252bp verkürzt.
- Es wurden die Bedingungen für eine Koamplifikation von *V. dahliae*- DNA und FIS ermittelt, der Voraussetzung für eine kompetitive PCR.
- Um die Amplifikate quantifizieren zu können wurde ein Protokoll für eine HPLC-Analyse erstellt.
- Mit 0.25, 2.5 oder 25 pg FIS pro PCR-Ansatz und ausschließender Quantifizierung der Amplifikate durch HPLC kann *V. dahliae*-DNA in linearer Beziehung in Mengen zwischen 0.0001 bis 10 ng sicher bestimmt werden.
- Nach künstlicher Inokulation stieg die *V. dahliae*-DNA in den Wurzeln des anfälligen Tomaten cv. Planet in der Periode 4- 14 dpi auf 1.0-1.5 µg / g Trockengewicht. Bei drei resistenten Tomatensorten war ein entsprechender Anstieg nicht erkennbar.
- Im ersten Blatt des anfälligen cv. Planet war der Welkeerregger ab 6 dpi deutlich vorhanden. Bei drei resistenten Tomatensorten waren, wenn überhaupt, nur Spuren von *V. dahliae* nachzuweisen.

Mit einer kompetitiven PCR und HPLC-Analyse der Amplifikate können sehr geringe Mengen von *V. dahliae*-DNA *in planta* gemessen werden, die mit ELISA nicht quantifiziert werden können. Dieses neu entwickelte und hoch empfindliche Verfahren kann in der Resistenzzüchtung, der Epidemiologie und Untersuchungen zur Pathogenese genutzt werden.

## 6 Summary

### Quantification of DNA from *Verticillium dahliae* in planta by competitive PCR and HPLC.

The very small biomass of *V. dahliae* in the early phase of pathogenesis in young tomato seedlings can not be quantified with ELISA. Thus, the possibility of a molecular biological analysis was tested with the following results.

Based on the DNA-sequences of 9 different *Verticillium* spp. A 22mer upstream primer (VdP1) was constructed from the ITS1 and a 20mer downstream primer (VdP2) from the ITS2.

- In a specific PCR with the two primers and an annealing temperature of 62°C the *V.dahliae*-DNA was amplified, while there was no amplification with *V. albo-atrum*, *V. lecanii*, *V. nigrescens* and *V. tricorpus*.
- For an efficiency control of the PCR, an internal standard (FIS) was constructed, employing a 3' linker primer. Thereby, the amplified 332 bp of the 5.8S rRNA gene of *V. dahliae* was converted into a shorter DNA-template of 252 bp.
- The conditions for a coamplification of *V. dahliae*-DNA and FIS were determined, the prerequisite for a competitive PCR.
- A HPLC protocol was developed for a quantification of the amplified products.
- With 0.25, 2.5 or 25 pg FIS in the PCR-probes and subsequent quantification of the amplified products by HPLC *V. dahliae*-DNA can be measured in a linear relation between 0.0001 to 10ng.
- After artificial inoculation of the susceptible tomato cv. Planet, the *V. dahliae*-DNA in the roots rose to 1.0 – 1.5 µg / g dry weight in the period 4 –14 dpi. With the three resistant tomato cultivars there was no such an increase.
- In the first leaf of the susceptible cv. Planet the wilt pathogen was clearly present 6 dpi. With the three resistant tomato cultivars the pathogen was, if at all, only detectable in traces.

With a competitive PCR and a HPLC-analysis of the amplified products very small quantities of *V. dahliae*-DNA can be measured in planta. This new developed and very sensitive analytical tool can be utilized in resistance breeding, epidemiology and studies on the pathogenesis.

## 7 Literaturverzeichnis

AGRIOS G.N., 1997 : Plant Diseases caused by Fungi: *Verticillium* Wilts. In AGRIOS G.N. (ed.): Plant Pathology, 346, Academic Press, San Diego.

ATKINSON J. D., 1971: Diseases of tree fruits in New Zealand. Wellington, New Zealand, A. R. Shearer, Govt Printer.

ANONYMUS, 1996: Polymerase Chain Reaction-DNA amplification protocol. In : MBI FERMENTAS-Molecular Biology 96/97 Catalogue & product application guide, 153-154, Vilnius, Lithuania.

ANONYMUS, 1998: The LightCycler<sup>TM</sup> – the smartest innovation for more efficient PCR. Biochemica- Roche Molecular Biochemicals **2**, 4-7.

ASPROMOUGOS I. & A. CHITZANIDIS, 1992: A method for root-infection of citrus nursery trees with pycnidiospores of *Phoma tracheiphila*. In: Summaries of invited and research papers of the 6th National Phytopathological Congress of the Hellenic Phytopathological Society. Rio-Patras-Greece, October 6-8, p. 71.

ASPROMOUGOS I. & E. SCHLÖSSER, 2000: A competitive PCR assay to quantify *Verticillium dahliae* in infected resistant and susceptible tomato hybrids with HPLC. In TJAMOS E.C., ROWE R.C., HEALE J.B. & D.R. FRAVEL (eds.): Advances in *Verticillium*-Research and Disease Management-Proc. 7<sup>th</sup> Int. *Verticillium* Symposium, Athens-Sounion, October 1997, 44- 47, APS Press, St. Paul, Minnesota.

BECKMAN C. H., MUELLER W. C., TESSIER B. J. & N. A. HARRISON, 1982: Regognition and callose deposition in response to vascular infection in *Fusarium* wilt-resistant or susceptible tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.* **20**, 1-10.

BECKMAN C. H., 1987: The nature of wilt diseases of plants, 7-11, 23-25, 43, APS Press, St Paul, Minnesota.

BISHOP C. D. & R. M. COOPER, 1983: Ultrastructure of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* **23**, 323-343.

BLAMBELL F. W. R., 1970: The transmission of passive immunity from mother to young. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

BUNTING T. E., PLUMLEY K. A., CLARKE B. B. & B. I. HILLMAN, 1996: Identification of *Magnaporthe poae* by PCR and examination of its relationship to other fungi by analysis of their nuclear rDNA ITS-1 regions. *Phytopathology* **86**, 398-404.

CARNERO-DIAZ E., TAGU D. & F. MARTIN, 1997: Ribosomal DNA internal transcribed spacers to estimate proportion of *Pisolithus tinctorius* and *Eucalyptus globulus* RNAs in Ectomycorrhiza. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 840-843.

CASPER R. & K. MENDGEN, 1979: Quantative serological estimation of a hyperparasite: Detection of *Verticillium lecanii* in yellow rust infected wheat leaves by ELISA. *Phytopath. Z.* **94**, 89-91.

CERNUSKO R. & G. WOLF, 1996: Immunological methods for the detection of *Verticillium dahliae* in oilseed rape. In DEHNE H.W., ADAM G., DIEKMANN M., FRAHM J., MAULER-MACHNIK A & P. van HALTEREN (eds.): Proc. 4<sup>th</sup> Int. Symp. Eur. Found. Plant Path., Bonn, Germany, 9-12 September 1996, 109-112, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

CLARK M. F. & A. N. ADAMS, 1977: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475-483

DE WIT P. J. G. M. & E. KODDE, 1981: Induction of polyacetylenic phytoalexins in *Lycopersicon esculentum* after inoculation with *Cladosporium fulvum* ( syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Plant Pathol.* **18**, 143-148.

ELGERSMA D. M., MACHARDY W. E. & C. H. BECKMAN, 1972: Growth and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in near-isogenic lines of tomato resistant or susceptible to wilt. *Phytopathology* **6**, 1232- 1237.

ENGELHARD W. A., 1957: Host index of *Verticillium albo-atrum* Reinke und Berthold (including *Verticillium dahliae* Kleb.). *Plant Dis. Repr. Suppl.* **244**, 23- 49.

FERRE F., 1992: Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus Myth. *PCR Methods and Applications* **2**, 1-9.

FORTNAGEL B., 1994: Herstellung poly- und monoklonaler Antikörper gegen phytopathogene Pilze am Beispiel von *Polymyxa betae* Keskin und *Verticillium dahliae* Kleb. Diss. FB Biologie Universität Gießen.

FORTNAGEL B. & E. SCHLÖSSER, 1992: The ECL-Western blotting system, a new tool in the production of monoclonal antibodies against *Verticillium dahliae*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **57**, 145-151.

FORTNAGEL B. & E. SCHLÖSSER, 1996: Polyclonal antibodies against *Verticillium dahliae* Kleb. from oilseed rape via immunized hens. *Z. PflKrankh. PflSchutz.* **103**, 582-589.

FÖRSTER E., 1994: An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. *Biotechniques* **16**, 18-20.

FRIEND J., 1976: Lignification in infected tissue. In FRIEND J. & D. R. THELFALL (eds.): *Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships*, 291- 303, Academic Press, New York.

GERIK J. S., LOMMEL S. A. & O. C. HUISMAN, 1987: A specific serological staining procedure for *Verticillium dahliae* in cotton root tissue. *Phytopathology* **77**, 261- 266.

GERIK J. S. & O. C. HUISMAN, 1988: Study of field –grown cotton roots infected with *Verticillium dahliae* using an immunoenzymatic staining technique. *Phytopathology* **78**, 1174- 1178.

HAGEN-MANN K. & W. MANN, 1994: Quantitative PCR. In WINK M. & H. WEHRLE (eds.): PCR (Polymerase Kettenreaktion) im medizinischen und biologischen Labor-Handbuch für den Praktiker, 84-96, GIT Verlag GmbH, Darmstadt.

HU X., NAZAR R. N & J. ROBB, 1993: Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **42**, 23-36.

HU X., LAI F.-M., REDDY S. N. & C. A. ISHIMARU, 1995 : Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* **85**, 1468-1473.

HUISMAN O. C., 1982: Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of root-invading fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **20**, 303-327.

HUTSON R. A. & I. M. SMITH, 1983: The response of tomato seedling roots to infection by *Verticillium albo-atrum* or *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Ann. Appl. Biol.* **102**, 89-97.

HYMAN L. J., BIRCH P. R., DELLAGI A., AVRORA A. O. & I. K. TOTH, 2000: A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* on potato tubers. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 330-335.

JENSENIUS J. C., ANDERSEN I., HAU J., CRONE M. & C. KOCH, 1981: Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Meth.* **46**, 63- 68.

JUDELSON H. S. & B. MESSENGER-ROUTH, 1996: Quantitation of *Phytophthora cinnamomi* in avocado roots using a species-specific DNA probe. *Phytopathology* **86**, 763-768.

KARAPAPA V. K., BAINBRIDGE B. W. & J. B. HEALE, 1997 : Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comp. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycol. Res.* **101**, 1281- 1294.

KATO Y., YAMASAKI Y., ONAKA A., KITAMURA T., HASIMOTO T., MUROTSU T., FUKUSHIGE S. & K. MATSUBARA, 1989: Separation of DNA restriction fragments by high-performance ion-exchange chromatography on a non-porous ion exchanger. *J. Chromatogr.* **478**, 264-268.

KATZ E. D. & L. A. HAFF, 1990: Rapid separation, quantitation and purification of products of polymerase chain reaction by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **512**, 433-444.

KNIPPERS R., PHILIPPSSEN P., SCHÄFER K. P. & E. FANNING, 1990: Eukariotische RNA-Polymerasen und die Transkription von rRNA und tRNA-Genen. In KNIPPERS R., PHILIPPSSEN P., SCHÄFER K. P. & E. FANNING (eds.): *Molekulare Genetik*, 374-390, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

KONTOWSKI S., 1998: Entwicklung von Methoden zur Resistenzselektion gegen *Verticillium dahliae* bei Winterraps (*Brassica napus* L.) Diss. FB Agrarwiss. u. Umwelts. Universität Gießen.

KONTOWSKI S., HORN R. & W. FRIEDT, 1995: Selection for resistance to *Verticillium dahliae* in rapeseed (*Brassica napus*) by the use of immunological techniques. Proc. 9<sup>th</sup> Int. Rapeseed Conf. 1995, Cambridge, Great Britain, 1292-1294.

KUÆJ., 1982: Phytoalexins from the Solanaceae. In R.K.S. WOOD (ed.): *Active defence mechanisms in plants*, 81- 105, Plenum Press, New York.

LEWIN B., 1994: Gene Numbers : Repetition and Redundancy. In *Genes V*, 723, Oxford University Press, Oxford 1994.

LI K.-N., ROUSE D. I. & T. L. GERMAN, 1994: PCR primers that allow intergeneric differentiation of ascomycetes and their application to *Verticillium* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4324-4331.

MACE M. E., 1963 : Histochemical localization of phenols in healthy and diseased banana roots. *Physiol. Plant* **16**, 915-925.

MERZ B., JACOBOWSKY B., HÖTTEN G., H. NEIDHART, 1993: Quantitative PCR DNA-Spurenanalytik in rekombinanten Proteinen. *Bioforum* **16**, 400-406.

MÖLLER E.M., BAHNWEG G., SANDERMANN H. & H.H. GEIGER, 1992: A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* **20**, 6115-6116.

MORTON A., CARDER J. H. & D. J. BARBARA, 1995: Sequences of the internal transcribed spacers of the ribosomal RNA genes and relationships between isolates of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. *Plant Pathology* **44**, 183-190.

MOUKHAMEDOV R., HU X., NAZAR R. N. & J. ROBB, 1994: Use of a polymerase chain reaktion- amplified ribosomal intergenic sequences for diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* **84**, 256-259.

NAZAR R. N., HU X., SCHMIDT J., CULHAM D. & J. ROBB, 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.

NEWCOMBE G. & J. ROBB, 1989: The chronological development of a lipid to suberin response at *Verticillium* trapping sites in alfa-alfa. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 55- 73.

NICHOLSON P., LEES A. K., MAURIN N., PARRY D. W. & H. N. REZANOOR, 1996: Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *majus* in wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **48**, 257-271.

NICHOLSON P., SIMPSON D. R., WESTON G., REZANOOR H. N., LEES A. K., PARRY D. W. & D. JOYCE, 1998: Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **53**, 17-37.

PATTERSON R., YOUNGER J.S., WEIGLE W.O. & F. J. DIXON, 1962: Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.* **89**, 272-278.

- PEGG G. F. & P. F. S. STREET, 1984: Measurement of *Verticillium albo-atrum* in high and low resistance hop cultivars. *Trans. Br. mycol. Soc.* **82**, 99- 106.
- PEGG G. F., 1985: Life in a black hole. The micro-environment of the vascular pathogen. *Trans. Br. mycol. Soc.* **85**, 1- 20.
- PICARD C., PONSONNET C., PAGET E., NESME X. & P. SIMONET, 1992 : Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2717-2722.
- PILARSKY C. & R. FLACH, 1994: Quantitative PCR. In GASSEN H.G., SACHSE G.E. & A. SHULTE (eds.): *PCR- Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion*, 97-104, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- PLASENCIA J., JEMERSON R. & E. E. BANTTARI, 1996: Production and characterization of monoclonal antibodies to *Verticillium dahliae* and development of a quantitative immunoassay for fungal biomass. *Phytopathology* **86**, 170- 176.
- RASMUSSEN R., MORRISON T., HERRMANN M. & C. WITTEW, 1998: Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica - Roche Molecular Biochemicals* **2**, 8- 11.
- RIDE J. P. & DRYSDALE R. P., (1972): A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Phys. Plant Pathol.* **2**, 7 –15.
- ROBB J., BRISSON J. D., BUSCH L. V. & B. C. LU, 1979: Ultrastructure of wilt syndrome caused by *Verticillium dahliae*. VII. Correlated light and elektron transmission microscope identification of vessel coatings and tyloses. *Can. J. Bot.* **57**, 822-834.
- ROBB J., POWELL D. A. & P. F. S. STREET, 1987: Vascular coating: a barrier to colonisation by the pathogen in *Verticillium* wilt of tomato. *Can. J. Bot.* **67**, 600- 607.
- ROBB J., HU X., PLATT H. & R. N. NAZAR, 1994: PCR-based assays for the detection and quantification of *Verticillium* species in potato. In: SCHOTS A., DEWEY F. M. & R. P.

OLIVER (eds.): Modern assays for plant pathogenic fungi, 83-90, CAB International, Wallingford, UK.

ROBB J., MOUKHAMEDOV R., HU X., PLATT H. & R. N. NAZAR, 1993: Putative subgroups of *Verticillium albo-atrum* distinguishable by PCR-based assays. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **43**, 423-436.

ROSE M. E., ORLANS E. & N. BUTTRESS, 1974: Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* **4**, 521- 523.

SATO N., TOMIYAMA K., KATSUI N. & T. MASAMUNE, 1968: Isolation of rishitin from tomato plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **34**, 344- 345.

SCHLÖSSER E., 1997: *Algemeine Phytopathologie*, 2. Aufl. Thieme. Stuttgart, New York.

SEITZ L. M., MOHR H. E., BURROUGHS R. & B. SAUER, 1977: Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.* **54**, 1207- 1217.

SOUAZÉ F., NTODOU-THOMÉ A., TRAN C. Y., ROSTÈNE W. & P. FORGEZ, 1996 : Quantitative RT-PCR : limits and accuracy. *Biotechniques*, **21**, 280-285.

STRUNNIKOVA O. K. & G. S. MUROMTSEV, 1987: Serological types of phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* Kleb.. *Sov. Agri. Sci. New York*, Allerton Press **3**, 15- 18.

TALBOYS P. W., 1958: Association of Tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. mycol. Soc.* **41**, 249- 260.

TJAMOS E. C. & I. M. SMITH, 1974: The role of phytoalexins in the resistance of tomato to *Verticillium* wilt. *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 249- 259.

VAN DER MOLEN G. E., BECKMAN C. H. & E. RODEHORST, 1977: Vascular gelation: A general response phenomenon following infection. *Physiol. Plant Pathol.* **11**, 95-100.

VOLOSSIOUK T., ROBB J. & R. N. NAZAR, 1995: Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3972-3976.

WERRES S. & C. STEFFENS, 1994 : Immunological techniques used with fungal plant pathogens aspects of antigens, antibodies and assays for diagnosis. *Ann. Appl. Biol.* **125**, 615-643.

WHITE T. J., BRUNS T., LEE S. & J. TAYLOR, 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In INNIS M. A., GELFAND D. H., SNINSKY J. J. and T. J. WHITE (eds.): *PCR Protocols- A guide to methods and applications*, 315-322, Academic Press, San Diego.

ZIMMERMANN K. & J. W. MANNHALTER, 1996: Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques* **21**, 268-279.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Eckart Schlösser für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Anschaffung der Laborausrüstung, und für seine stetigen und regen Bemühungen um den Fortgang der Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt für die Übernahme des Koreferates.

Allen damaligen und heutigen Mitarbeitern des Institutes für Phytopathologie und Angewandte Zoologie danke ich für die produktive und herzliche Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank geht dabei an Herrn Dr. Bernd Steinhauer, Frau Dr. Brigitte Fortnagel, Herrn Dr. Susseelandra Desai, Herrn Dr. Nedim Cetinkaya, Herrn Dr. Heiner Prillwitz, Frau Dr. Monica Osnaya-Gonzales, Herrn Dr. Diego Falconi, Frau Dr. Katrin Besser, Herrn Dr. Hans Pinnschmidt, Frau Dipl. Ing. Ursula Packzad, Frau Elke Stein, Frau Martina Düringer, Frau Renate Köhler, Frau Susanne Habermehl, Frau Christel Zörb und Herrn Dieter Bork.

Für die finanzielle Unterstützung der Arbeit danke ich der Stiftung staatlicher Stipendien Griechenlands ( I.K.Y.) und dem Phytopathologischen Institut Benaki in Athen. Ich bedanke mich auch bei meiner ehemaligen Direktorin des Phytopathologischen Institutes Benaki Frau Dr. Annetta Chitzanidis und Herrn Professor Dr. Jürgen Kranz, die mir den Kontakt zur Justus-Liebig-Universität Giessen ermöglicht haben.

Ich danke meiner Frau und meinen Kindern für ihre Geduld und ihre Unterstützung.